

DOI: 10.18832/kp201718

Odpadní pivovarské a vinařské kvasinky jako surovina pro biotechnologické výroby

Waste Brewery and Winery Yeast as a Raw Material for Biotechnological Productions

Tomáš ŘEZANKA, Andrea PALYZOVÁ, Karel SIGLER

Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 142 20 Prague, Czech Republic

e-mail: rezanka@biomed.cas.cz

Recenzovaný článek / Reviewed Paper

Řezanka, T., Palyzová, A., Sigler, K., 2017: Odpadní pivovarské a vinařské kvasinky jako surovina pro biotechnologické výroby. Kvasny Prum. 63(4): 158–162

Kvasinka rodu *Saccharomyces* je nejběžněji používaným organismem v biotechnologiích a množství její biomasy vznikající při výrobě piva a vína je obrovské. Uvádí se, že celosvětová roční produkce obou nápojů s sebou nese produkci více než půl milionu tun kvasinek, počítáno na sušinu, což je největší produkce jakéhokoliv mikroorganismu na celém světě. Z tohoto důvodu je možno zvážit její použití jako sekundární suroviny. V následujícím review se zaměřujeme na využití biomasy odpadních kvasinek především z hlediska jejího zpracování na biopaliva, zejména bionaftu. Zvláštní pozornost je věnována též využití kvasinek jako zdroje sofistikovaných produktů, především skvalenu a kyseliny palmitolejové, důležité suroviny, která může být použita jako přísada do bionafty, ale je také využívána v kosmetických a dietetických prostředcích.

Řezanka, T., Palyzová, A., Sigler, K., 2017: Waste brewery and winery yeast as a raw material for biotechnological productions. Kvasny Prum. 63(4): 158–162

Yeast of the genus *Saccharomyces* is the most commonly used organism in the production of biotechnological products, and its amount produced in the production of beer and wine is enormous. It is reported that the worldwide annual production of both beverages entails the production of more than half a million tons of yeast, calculated on dry matter, the largest production of any microorganism worldwide. For this reason, it could be used as a potential secondary raw material. In the following review, we focus on the use of waste yeast biomass, particularly in terms of its processing into biofuels, especially biodiesel. Particular attention is also paid to the use of yeast as a source of sophisticated products, especially squalene and palmitoleic acid, an important raw material that can be used as a biodiesel additive, but also in cosmetic and dietetic products.

Řezanka, T., Palyzová, A., Sigler, K., 2017: Die Abfallbrau- und Weinhefe als ein für die Herstellung wertvoller Rohstoff der biotechnologisch wichtigen Produkten. Kvasny Prum. 63(4): 158–162

Die Hefe der Gattung *Saccharomyces* ist ein am meisten gebrauchter Mikroorganismus in der Biotechnologie und ihre während der Bier- und Weinherstellung entstehende Biomasse ist riesig. Es wird angegeben, dass die gesamte Menge an Hefemassee entstandene bei der Weltproduktion der beiden Getränke mehr als eine halbe Million Tonnen (Trockenmasse) beträgt, was die größte Produktion eines Mikroorganismus in der Welt bedeutet. Aus diesem Grund ist es möglich, die Abfallhefe als einen sekundären Rohstoff zu betrachten. In diesem Artikel wird auf die Ausnutzung der Biomasse von Abfallhefe konzentriert, vor allem auf ihre Verarbeitung zum Biobrennstoffe, hauptsächlich Biodiesel. Eine besondere Aufmerksamkeit wird der Nutzung der Abfallhefe als die Quelle der komplexen Produkte gewidmet, vor allem Squalen und Palmitoleinsäure, einem wichtigen Rohstoff, der als Biodieselszusatz oder für kosmetische und diätetische Produkte angewandt werden kann.

Klíčová slova: pivovar, vinařství, kvasinky, bionafta, palmitolejová kyselina, *Saccharomyces cerevisiae*

Keywords: brewery, viticulture, yeast, palmitoleic acid, biodiesel, *Saccharomyces cerevisiae*

1 ÚVOD

Výroba piva a vína je tradiční zemědělská a potravinářská výroba s velkým ekonomickým potenciálem. V roce 2014 činila výroba piva ve 28 zemích EU asi 384 milionů hl a počet pivovarů se pohyboval kolem 6500, kromě dalších 5000 mikropivovarů, tedy malých pivovarů s produkcí méně než 1000 hektolitrů piva ročně (Brewers of Europe, 2015).

Celosvětová produkce vína v roce 2012 činila asi 258 milionů hektolitrů, zatímco produkce vína v Evropě dosáhla asi 165 milionů hektolitrů (International Organization of Vine and Wine, 2016).

Při výrobě piva a vína jsou kvasinky odpadní druhotnou surovinou. Po výrobě 1 hl piva zůstává asi 200 g kvasinek, což znamená v globálním měřítku produkci téměř 400 000 tun kvasinek jako vedlejšího produktu pivovarské výroby. Situace při výrobě vína je podobná; vedlejším produktem po kvašení 1 tuny hroznů je přibližně 1 kg kvasinek, což celosvětově představuje produkci přibližně 160 000 tun kvasinek. Celkem je tak na světě vyrobeno přes půl milionu tun kvasinek ročně. Množství biomasy získané z nepotravinářských procesů je omezené a je proto velice lákavé používat vedlejší produkty, což jsou právě kvasinky z výroby piva a vína. Tyto v podstatě odpadní

1 INTRODUCTION

The production of beer and wine is a traditional branch of food production with a great economic potential. In 2014, beer production in the 28 countries of EU was about 384 million hl and the number of breweries was around 6,500, excluding 5,000 microbreweries, i.e. small breweries producing less than 1,000 hectoliters of beer per year (Brewers of Europe, 2015). World wine production in 2012 was about 258 million hectoliters, while wine production in Europe reached about 165 million hectoliters (International Organization of Vine and Wine, 2016).

In both biotechnological productions, the secondary raw material, formerly called waste, is yeast. Since about 200 grams of yeast remain after 1 hl of beer, it means that almost 400,000 tons of yeast was produced as a by-product of breweries. The situation in wine production is similar, with approximately 1 kg of yeast remaining as a by-product of fermentation of 1 ton of grapes, representing around 160,000 tons of yeast worldwide. In total, over half a million tons of yeast are produced in the world. The amount of biomass obtained generally from non-food processes is limited and it is therefore very tempting to make use of the yeast produced as by-product in beer

surovinu lze využít různými způsoby. Jedním z nich je možnost využít kvasinky jako zdroj bionafty. Díky výhodnému složení mastných kyselin má bionafta získaná z kvasinek optimální vlastnosti, např. bod zákalu pod 10 °C a cetanové číslo přibližně 58. Výhodou je také vysoký podíl kyselin palmitové, palmitolejové a olejové v bionaftě, který zabraňuje oxidaci a polymerizaci polynenasycených mastných kyselin, jak je to běžné u rostlinných olejů (Wu et al., 2012).

Při zpracování hroznů na víno vzniká komplexní směs, která obsahuje vinné kaly, což jsou zbytky na dně nádob po fermentaci, během skladování, nebo získané po filtraci a odstředění. Kaly se skládají hlavně z mikroorganismů (především kvasinek ale také bakterií), vinné kyseliny, anorganických solí a fenolických sloučenin (Pérez-Serradilla a Luque de Castro, 2011). Zpracování kalů lze rozdělit do dvou základních přístupů. Jeden z nich zahrnuje zpracování komplexní biomasy, která obsahuje kvasinky spolu s mnoha nečistotami, jak organickými tak anorganickými, a dále jiné mikroorganismy (např. bakterie mléčného kvašení). Druhou možností je izolace organických sloučenin – squalenu (Naziri et al., 2016; Naziri et al., 2012) nebo lipidů (Gomez et al., 2004).

2 MOŽNOSTI VYUŽITÍ ODPADNÍCH KVASNIC

Jedním ze způsobů, jak výrazně zlepšit ekonomickou návratnost investice do zpracování vinných kalů, je izolace squalenu (Naziri et al., 2016; Naziri et al., 2012). Především je to extrakce pomocí superkritického CO₂ za zvýšeného tlaku a teploty. Při této extrakci je výtěžek 1,69 % squalenu (vztaženo na sušinu kvasinek), při extrakci hexanem činí výtěžek 2,04 % a při klasické extrakci směsí organických rozpouštědel 1,76 % (Naziri et al., 2016).

Při extrakci n-butanolem nasyceným vodou obsahují kaly z vína kolem 5,4 % lipidů. Byl také stanoven obsah jednotlivých lipidových skupin, stejně jako celkových mastných kyselin; hlavní identifikované mastné kyseliny byly kyselina palmitová, stearová a olejová (Gomez et al., 2004).

Vinné kaly mohou být použity pro výrobu bioplynu za termofilních podmínek (Da Ros et al., 2014). Například Fan et al. (2006) použili odpadní pивní kvasinky, které byly inkubovány s kravským hnojem, který obsahuje převážně anaerobní bakterie. Produkce vodíku byla 68,6 ml/g suché biomasy (Bando et al., 2013).

Mnoho prací se zabývá výrobou mikrobiálních olejů z různých uhlíkatých zdrojů a jejich použitím pro přípravu bionafty (Xu et al., 2013).

2.1 Bionafta

Bionafta je definována jako směs mono alkylesterů mastných kyselin pocházejících z rostlinných olejů, živočišných tuků nebo odpadních olejů. Bionafta je technicky konkurenceschopná, šetrná k životnímu prostředí, a tvoří alternativu ke konvenčním zdrojům motorové nafty. Další výhodou je její biologická rozložitelnost nebo možnost jejího získávání z obnovitelných zdrojů. Má však technické nedostatky, jako je špatná tekutost za studena a nestabilita na vzduchu. Za ideálního kandidáta pro zlepšení těchto vlastností bionafty se považuje methylester palmitolejové kyseliny (Xia et al., 2010), který vykazuje nízkou teplotu tání (asi -34 °C), a přijatelnou oxidační stabilitu (2,1 podle testu Rancimat, současně má cetanové číslo 56,6 a kinematickou viskozitu 10,1 m²s⁻¹ při teplotě 0 °C (EN 14214, 2008).

Estery nasycených mastných kyselin sice zvyšují cetanové číslo (Knothe, 2009), ale také zvyšují teplotu tání a tím snižují použitelnost bionafty při nízkých teplotách. Na druhé straně estery nenasycených mastných kyselin snižují teplotu tání, ale mají nízké cetanové číslo a nízkou oxidační stabilitu. Z tohoto hlediska je ideálním kandidátem právě palmitolejová kyselina (viz níže).

2.2 Palmitolejová kyselina

Palmitolejová kyselina může být použita jak v potravinářství a kosmetice, tak pro technické účely, které zahrnují, kromě výroby bionafty, i její použití jako cenného obnovitelného zdroje pro výrobu průmyslově důležité chemikálie 1-oktenu, který se používá při výrobě lineárních polyethylenů s nízkou hustotou. Tato kyselina má důležitou pozici v oblasti zpracování potravin, jako doplněk stravy nebo v kosmetickém průmyslu (All Star Health, 2016).

Studie ukazují, že palmitolejová kyselina může zvýšit fluiditu buněčných membrán, inhibovat onkogenezi (Ito et al., 1982) a snížit pravděpodobnost zánětů spojených s diabetem, onemocněním srdce a dalších zdravotních problémů. Kromě těchto biologických funkcí má antioxidační, antimikrobiální účinky a je používána proti stárnutí. To ji dělá atraktivní jako doplněk stravy, a také v kosmetickém prů-

and wine production. These essentially waste materials can be used in various ways. One of them is to use yeast as a biodiesel source. Due to the preferred fatty acid composition, the yeast obtained from the yeast has optimal properties, such as a cloud point below 10 °C and a cetane number of about 58, with the largest proportion of palmitic, palmitoleic and oleic acids, so that no oxidation and polymerization of polyunsaturated fatty acids takes place, which is otherwise common with vegetable oils (Wu et al., 2012).

The processing of grapes to obtain wine gives rise to a complex mixture which contains wine sludges, which are the residues at the bottom of the vessels after fermentation, during storage, or obtained after filtration and centrifugation. The sludge consists mainly of microorganisms (mainly yeasts but also bacteria), tartaric acid, inorganic salts and phenolic compounds (Pérez-Serradilla and Luque de Castro, 2011). Sludge treatment can be divided into two basic approaches. One involves the processing of a complex biomass containing mostly yeast, including many impurities, both organic and inorganic as well as other microorganisms (e.g., lactic acid bacteria). The other possibility is the isolation of organic compounds - squalene (Naziri et al., 2012; Naziri et al., 2016) or lipids (Gómez et al., 2004).

2 USES OF WASTE YEAST

One way to significantly improve the economic return on investments in sludge processing is to isolate squalene (Naziri et al., 2012, Naziri et al., 2016). The first step is extraction with supercritical CO₂ at elevated pressure and temperature. This extraction yields 1.69% squalene based on yeast dry matter, extraction with hexane yields 2.04% and classic extraction with an organic solvent mixture gives 1.76% (Naziri et al., 2016).

In case of extraction with n-butanol saturated with water, the wine sludge contains about 5.4% of lipids. The content of individual lipid groups as well as total fatty acids was also determined, the main identified fatty acids were palmitic, stearic and oleic acid (Gómez et al., 2004).

Wine sludge can also be used to produce biogas under thermophilic conditions (Da Ros et al., 2014). For example, Fan et al. (2006) used waste brewery yeast which was incubated with cow manure containing essentially anaerobic bacteria. Hydrogen production was 68.6 ml/g dry biomass (Bando et al., 2013).

Many studies deal with the production of microbial oils from different carbon sources and their use for the preparation of biodiesel (Xu et al., 2013).

2.1 Biodiesel

Biodiesel is defined as a mixture of mono-alkyl esters of fatty acids derived from vegetable oils, animal fats or waste oils. It is technically competitive, environmentally friendly and forms an alternative to conventional diesel fuel sources. Biodiesel has many benefits, such as biodegradability or its production from renewable sources. However, it also has technical drawbacks such as poor cold flow and air instability. The ideal candidate for improving these properties of biodiesel is palmitoleic acid methyl ester (Xia et al., 2010). Palmitoleic acid methyl ester, i.e. cis-9-hexadecenoic acid, exhibits a low melting point (about -34 °C) and acceptable oxidation stability 2.1 according to the Rancimat test (EN 14214, 2008). It has at the same time a cetane number of 56.6 and a kinematic viscosity of 10.1 m²s⁻¹ at 0 °C. There are therefore no problems with solidification of biodiesel in winter and at reduced temperatures.

Although saturated fatty acid esters increase the cetane number (Knothe, 2009), they also increase the melting point and, hence, decrease the usefulness of biodiesel, at low temperatures. On the other hand, unsaturated fatty acid esters lower the melting point but have a low cetane number and low oxidation stability. From this perspective, the ideal candidate is palmitoleic acid, (see below).

2.2 Palmitoleic Acid

Palmitoleic acid can also be used in both food industry and cosmetics and for technical purposes, which may include, besides biodiesel production, its use as a valuable renewable source for the production of industrially-important chemical 1-octene, a material used in the production of linear polyethylenes with low density. Palmitoleic acid has an irreplaceable position in the field of food processing, as a dietary supplement or in the cosmetics industry (All Star Health, 2016).

Studies show that palmitoleic acid may increase cell membrane fluidity, inhibit oncogenesis (Ito et al., 1982), and reduce the likeli-

myslu, protože údajně chrání pokožku před škodlivými slunečními paprsky a UV zářením.

Jednou z možností, jak zvýšit produkci palmitolejové kyseliny v kvasinkách, například u rodu *Saccharomyces*, kde její obsah přesahuje 50 % z celkových mastných kyselin, je genetická modifikace spolu s optimalizací kultivačních podmínek. Bohužel, *Saccharomyces* nepatří mezi oleogenní kvasinky (Ratnay, 1988). Kamisaka et al. (2015) se úspěšně pokusili zvýšit obsah lipidů zvýšenou expresí genu DGA1, který kóduje diacylglycerol acyltransferázu (DGAT) s kombinací snf2. Tím byla vytvořena *S. cerevisiae* jako DGA1 mutanta s nadměrnou expresí Dga1p (Dga1ΔNp). Kombinací kultivace při nízkých teplotách (do 20 °C) a přidáním methioninu do kultivačního média se zvýšil relativní a absolutní obsah palmitolejové kyseliny v kvasinkách až 2,5krát (Kamisaka et al., 2015).

Negativním rysem všech komerčně dostupných a pěstovaných olejnin je, že buď neobsahují palmitolejovou kyselinu, nebo je její obsah pouze 1–2 % z celkového obsahu mastných kyselin. Vzhledem k tomu, že palmitolejová kyselina nemůže být získávána z přírodních zdrojů ve velkých množstvích a za relativně nízkou cenu, zájem se zaměřil na metabolické inženýrství geneticky modifikovaných rostlin olejnatých semen. Většina genetických experimentů (Brillhart, 2001; Seip a Zhu, 2011) používá expresi genetického materiálu (Δ^9 desaturasy) ze *Saccharomyces*. Variabilita mastných kyselin v kvasinkách, a to zejména v *Saccharomyces*, je poměrně malá. Rod *Saccharomyces* obsahuje 4 hlavní mastné kyseliny, tj., palmitovou, palmitolejovou, stearovou a olejovou (Řezanka et al., 2013a), které tvoří 90 % z celkového množství mastných kyselin (Řezanka et al., 2013b; Sarris et al., 2011; Sarris et al., 2013). Genetické manipulace, které vedou ke zvýšení obsahu palmitolejové kyseliny, spočívají v tom, že je do rostlin zaváděn gen kódující Δ^9 desaturasu z kvasinek rodu *Saccharomyces*. Další možností je hledat alternativní zdroje přírodní palmitolejové kyseliny, tedy takové organismy, u kterých je její obsah vyšší než 10 % celkových mastných kyselin (Khoormung et al., 2012). Bohužel jen málo rostlin ve svých semenech obsahuje více než 10 % palmitolejové kyseliny. K dispozici jsou ve skutečnosti pouze dvě rostliny, a to makadamové ořechy (Knothe, 2010) a plody rakytníku řešetlákovitého (Rüsch et al., 2004). Jiné zdroje jsou velmi exotické, takže i v případě, že olej z rostliny *Kermadecia* obsahuje až 70 % palmitolejové kyseliny, rostlina nemůže být použita pro komerční účely, protože je to endemická kvetoucí rostlina, která roste pouze v Nové Kaledonii (Řezanka et al., 2015).

Jak již bylo uvedeno, složení lipidů a mastných kyselin v kvasinkách je obecně velmi podobné konvenčním rostlinným olejům. Tato skutečnost může být využita k jejich nahrazení, a to zejména v případě speciálních tuků a olejů, jako je například kakaové máslo nebo jiné exotické tuky používané v potravinářském průmyslu (Henk et al., 1992).

Vzhledem k tomu, že palmitolejová kyselina nemůže být zatím získávána z přírodních zdrojů ve velkém množství a při nízkých nákladech, je třeba najít takové zdroje, které by umožnily její výrobu. Bohužel neochota používat geneticky modifikované kvasinky pro průmyslovou výrobu je obrovská. Jak již bylo zmíněno výše, ideální jsou pivovarské kvasinky jak svrchního (*S. cerevisiae*), tak spodního kvašení (*S. pastorianus*). Kvasinky jako vedlejší surovina z pivovaru s roční produkcí 1 milion hektolitrů (kterou definuje EU jako středně velký pivovar) zahrnují 1000 t pivovarské kvasinkové biomasy (15–17 % sušiny), která obsahuje asi 50 % palmitolejové kyseliny z celkového obsahu mastných kyselin (Sigler a Matoušková, 2013). Poměr palmitolejové kyseliny k celkovým mastným kyselinám je tedy mnohem vyšší než u konvenčních olejů a je srovnatelný s komerčním olejem získaným z rakytníku nebo makadamových ořechů.

Množství palmitolejové kyseliny v biomase je do určité míry ovlivněno technologickým procesem používaným při výrobě piva (svrchní – spodní kvašení, kmen kvasinek). V anaerobní kultuře může při nedostatku kyslíku dojít kablokování biosyntézy a následně reakci Δ^9 desaturasy a skvalen-epoxidasy, což může vést, zejména při výrobě piva v cylindrických tancích, ke zvýšené akumulaci nasycených mastných kyselin nebo ke zvýšené produkci prekurzorů ergosterolu (Rupčić et al., 2010). Fermentační teplota má významný vliv na produkci palmitolejové kyseliny. V souvislosti s technologií výroby piva je oddělování kvasinkové biomasy po fermentaci dobře vyřešeno. Následné centrifugace může být použito pro větší snížení obsahu vody. I po extrakci lipidů obsahuje biomasa stále ještě až 48 % proteinů a může být proto použita jako krmivo pro hospodářská zvířata, na rozdíl od kvasinek po výrobě vína, kde kvasinky mají extrémně nízkou výživnou hodnotu, která je činí nevhodnými pro tento účel (Maugenet, 1973; Rivas et al., 2006).

hood of inflammation associated with diabetes, heart disease and other health problems. In addition to these biological functions, palmitoleic acid has antioxidant and anti-microbial and anti-aging effects. This makes it attractive as a dietary supplement, as well as in the cosmetics industry, as it is reported to protect the skin from harmful sunburns and UV radiation, see the Omega 7 Plus preparation (All Star Health, 2016).

One way to increase the production of palmitoleic acid in yeast, for example in the genus *Saccharomyces*, where the content of palmitoleic acid exceeds 50 % of total fatty acids, is genetic modification along with the optimization of culture conditions. Unfortunately, this yeast is not oleogenic (Ratnay, 1988). Kamisaka et al. (2015) have successfully attempted to increase the lipid content by increasing the expression of DGA1, which encodes diacylglycerol acyltransferase (DGAT) with the snf2 combination. This yielded a *S. cerevisiae* DGA1 mutant with overexpression of Dga1p (Dga1ΔNp). By combining the culture at low temperatures (lower than usual, i.e. only up to 20 °C) and adding methionine to the culture medium, the relative and absolute levels of palmitoleic acid in yeast increased up to 2.5-fold (Kamisaka et al., 2015).

The negative feature of all commercially available and field-grown oilseeds is that they either do not contain palmitoleic acid or contain only 1 to 2 % of the total fatty acid content. Due to the fact that palmitoleic acid cannot be obtained from natural sources in large quantities and at a relatively low price, the focus concentrated at first on the metabolic engineering of genetically modified oilseed plants. Most genetic experiments (Brillhart, 2001; Seip and Zhu, 2011) used Δ^9 desaturase gene expression from *Saccharomyces*. The variability of fatty acids in yeasts, especially in *Saccharomyces*, is relatively low. The *Saccharomyces* genus contains 4 major fatty acids, palmitic, palmitoleic, stearic, and oleic (Řezanka et al., 2013a), which make up 90 % of total fatty acids (Řezanka et al., 2013b; Sarris et al., 2011; Sarris et al., 2013). Genetic manipulations that lead to an increase in palmitoleic acid content thus included the introduction of a gene coding for Δ^9 desaturase from the *Saccharomyces* yeast. Another possibility is to look for alternative sources of natural palmitoleic acid, i.e. those with its content higher than 10 % of total fatty acids (Khoormung et al., 2012). Unfortunately, few plants contain in their seeds more than 10 % palmitoleic acid. Only two plants are in fact available, namely, the macadamia nuts (Knothe, 2010) and the fruits of the buckwheat (Rüsch gen. Klaas and Meurer, 2004). Other sources (Řezanka et al., 2015) are very exotic, so even if the *Kermadecia* oil contains up to 70 % palmitoleic acid, the plant can not be used for commercial purposes because it is an endemic flowering plant that grows only in New Caledonia.

As already mentioned, the composition of lipids and fatty acids in yeast is generally very similar to conventional vegetable oils. This may be used to replace them, especially in the case of special fats and oils such as cocoa butter or other exotic fats used in the food industry (Henk et al., 1992).

Since palmitoleic acid cannot yet be obtained from natural sources in large quantities and at low cost, resources need to be found to enable its large-scale production. Unfortunately, reluctance to use genetically modified yeast for industrial production is enormous. As mentioned above, brewery yeasts are ideal, both top and bottom fermenting ones (*S. pastorianus*). Waste yeast as a side product from the brewery with an annual production of 1 million hectoliters (defined by the EU as a medium-sized brewery) includes 1000 t of yeast biomass (15–17 % dry matter) containing about 50 % palmitoleic acid from the total fatty acid content (Sigler and Matoušková, 2013). The ratio of palmitoleic acid to total fatty acids is therefore much higher than in conventional oils and is comparable to commercial oil obtained from cane or macadamia nuts.

The amount of palmitoleic acid in biomass is to a certain extent influenced by the technological process used in beer production (top or bottom fermentation, yeast strain). In an anaerobic culture with oxygen deficiency, its biosynthesis can be blocked and subsequent reaction of Δ^9 desaturase and squalene epoxidase can lead, in particular in beer production in cylindro-conical fermentors, to increased accumulation of saturated fatty acids or increased production of ergosterol precursors (Rupčić et al., 2010). The fermentation temperature also has a significant effect on the production of palmitoleic acid. In connection with brewery technology, separation of yeast biomass after fermentation has been well solved. Subsequent centrifugation can be used to reduce the water content. Even after the lipid extraction, biomass still contains up to 48 % of proteins and can therefore be used as feed for livestock, unlike yeast after wine production

2.3 Další produkty

Kvasinky jsou obecně výborným organismem pro výrobu dalších důležitých produktů. *S. cerevisiae* tak byla např. použita pro produkci karotenoidů a zvláště β -karotenu tím, že v ní byly exprimovány karotenogenní geny z kvasinky *Xanthophyllomyces dendrorhous* produkující karotenoidy. Protože exprese těchto genů pomocí episomálního expresního vektoru poskytla nestabilní kmeny, byly tyto geny integrovány do genomické DNA a výsledkem byly stabilní buňky *S. cerevisiae*, produkující karotenoidy (Verwaal et al., 2007).

Odpadní kvasinky lze použít např. pro průmyslovou výrobu ergosterolu, tj. provitaminu D₂ (Buehler, 1958; Feeney, 1956). Nejdůležitějším krokem v procesu izolace lipidních látek je buď mechanické, nebo chemické narušení buněčných stěn a následné zpracování. Z ekonomického hlediska jsou kvasinky vlastně odpad a náklady na jejich pěstování jsou součástí nákladů na výrobu piva.

Výroba vína a piva je běžná v mnoha kulturách a kvašené nápoje jsou již dlouho součástí civilizace. Z tohoto důvodu, je možno předpokládat, že pivovarnictví a vinařství bude i nadále nedílnou součástí potravinářského průmyslu v dalších letech. Primární úlohou kvasinek při fermentačních procesech je převedení cukrů přítomných v moštu nebo v mladině na alkohol. Na konci fermentačního procesu jsou kvasinky od produktu odděleny. Díky složení mastných kyselin mohou být tyto odpadní kvasinky dále použity při výrobě bionafty, případně palmitolejové kyseliny, ale i dalších látek patřících do skupiny lipidů.

PODĚKOVÁNÍ

Výzkum byl podpořen Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekt LO1509).

LITERATURA / REFERENCES

- All Star Health, 2016: on-line: http://www.allstarhealth.com/en-au/futurebiotics-omega_7_plus.htm [accessed 25. 8. 2016].
- Bando, Y., Fujimoto, N., Suzuki, M., Ohnishi, A., 2013: A microbiological study of biohydrogen production from beer lees. *Int. J. Hydrogen Energy*, 38(6): 2709-2718. doi: 10.1016/j.ijhydene.2012.11.142.
- Brewers of Europe, 2015: Beer statistics. on line: http://www.brewersofeurope.org/uploads/mycms-files/documents/publications/2015/statistics_2015_v3.pdf [accessed 25.8.2016].
- Brillhart, D.D., 2001: Monounsaturated fatty acid compositions and method of making. US Patent 6,183,796 B1, Feb. 6, 2001.
- Buehler, H. J., 1958: Extraction of sterols. US Patent 2,837,540 A. Jun 3, 1958.
- Da Ros, C., Cavinato, C., Pavan, P., Bolzonella, D., 2014: Winery waste recycling through anaerobic co-digestion with waste activated sludge. *Waste Manage*, 34(11): 2028–2035. doi: 10.1016/j.wasman.2014.07.017
- EN 14214, 2008: European Committee for Standardization, 2008.
- Fan, Y. T., Zhang, G. S., Guo, X. Y., Xing, Y., Fan, M. H., 2006: Biohydrogen-production from beer lees biomass by cow dung compost. *Biomass Bioenergy*, 30(5): 493–496. doi: 10.1016/j.biombioe.2005.10.009
- Feeney, R. J., 1956: Recovery of ergosterol: US Patent 2,730,536 A, Jan 10, 1956.
- Gómez, M. E., Igartur, J. M., Pando, E., Luis, F. R., Mourente, G., 2004: Lipid composition of lees from sherry wine. *J. Agric. Food Chem.*, 52(15): 4791–4794. doi: 10.1021/jf030499r
- Henk, S., Adrie, Y., Elizabeth, C., Ira, I., Martin, M., 1992: Production of cocoa butter equivalents by yeast mutants. In: *Industrial applications of single cell oils*. AOCS Publishing, Minneapolis, pp 185–195. doi: 10.1201/9781439821855.ch10

where the yeast has an extremely low nutritional value that renders it unsuitable for this purpose (Maugenet, 1973; Rivas et al., 2006).

2.3 Other products

Yeast, not only brewery or winery waste, is generally an excellent organism for making other important products. Thus, *S. cerevisiae* was used as a host organism for the production of carotenoids and in particular β -carotene by expressing carotenoid genes from the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* producing carotenoids. Since expression of these genes by the episomal expression vector provided unstable strains, these genes were integrated into genomic DNA and stable carotenoid producing *S. cerevisiae* cells (Verwaal et al., 2007).

Waste yeast can also be used, for example, for the industrial manufacture of ergosterol, i.e. provitamin D₂ (Buehler, 1958; Feeney, 1956); this production process is being commonly used. The most important step in the isolation process is either mechanical or chemical disruption of cell walls and subsequent processing. In addition, in terms of economy, yeast is actually waste and the cost of its production is in fact part of the cost of producing beer or wine.

3 CONCLUSIONS

Wine and beer production is common in many cultures, and fermented beverages have long been part of civilization. For this reason it is possible to assume that brewing and winemaking will continue to be an integral part of the food industry in the coming years. The primary role of yeast is to transfer sugars present in must and wort to alcohol and, at the end of the fermentation process, the yeast is separated from wine and beer. Due to the fatty acid composition, this waste yeast can be further used in the production of biodiesel or palmitoleic acid as well as other substances belonging to the lipid group.

ACKNOWLEDGEMENTS

The research was supported by Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (LO1509).

- International Organisation of Vine and Wine, 2016. on-line: <http://www.oiv.org/en/databases-and-statistics/statistics> [accessed 25.8.2016].
- Ito, H., Kasama, K., Naruse, S., Shimura, K., 1982: Antitumor effect of palmitoleic acid on Ehrlich ascites tumor. *Cancer Lett.*, 17(2): 197–203. doi: 10.1016/0304-3835(82)90032-5
- Kamisaka, Y., Kimura, K., Uemura, H., Yamaoka, M., 2015: Addition of methionine and low cultivation temperatures increase palmitoleic acid production by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99(1): 201–210. doi: 10.1007/s00253-014-6083-y
- Khoomrung, S., Chumnanpuen, P., Jansa-ard, S., Nookaew, I., Nielsen, J., 2012: Fast and accurate preparation fatty acid methyl esters by microwave-assisted derivatization in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 94(6): 1637–1646. doi: 10.1007/s00253-012-4125-x
- Knothe, G., 2009: Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition. *Energy Environ. Sci.*, 2(7): 759–766. doi: 10.1039/b903941D
- Knothe, G., 2010: Biodiesel derived from a model oil enriched in palmitoleic acid, macadamia nut oil. *Energy Fuels*, 24: 2098–2103. doi: 10.1021/ef9013295
- Maugenet, J., 1973: Evaluation of the by-products of wine distilleries. II. Possibility of recovery of proteins in the vinasse of wine distilleries. *C. R. Seances Acad. Agric. Fr.*, 59: 481–487
- Naziri, E., Glisic, S. B., Mantzouridou, F. T., Tsimidou, M. Z., Nedovic, V., Bugarski, B., 2016: Advantages of supercritical fluid extraction for recovery of squalene from wine lees. *J. Supercrit. Fluids*, 107: 560–565. doi: 10.1016/j.supflu.2015.07.014
- Naziri, E., Mantzouridou, F., Tsimidou, M. Z., 2012: Recovery of squalene from wine lees using ultrasound assisted extrac-

- tion-a feasibility study. J. Agric. Food Chem., 60(36): 9195–9201. doi: 10.1021/jf301059y
- Pérez-Serradilla, J. A., Luque de Castro, M. D., 2011: Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from wine lees and spray-drying of the extract. Food Chem., 124(4): 1652–1659. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.07.046
- Rattray, J.B.M., 1988: Yeasts. In: Microbial lipids. Academic Press, London. 555–697.
- Rivas, B., Torrado, A., Moldes, A. B., Dominguez, J. M., 2006: Tartaric acid recovery from distilled lees and use of the residual solid as an economic nutrient for *Lactobacillus*. J. Agric. Food Chem., 54(20): 7904–7911. doi: 10.1021/jf061617o
- Rupčić, J., Jurešić, G. C., Blagović, B., 2010: Influence of stressful fermentation conditions on neutral lipids of a *Saccharomyces cerevisiae* brewing strain. World J. Microbiol. Biotechnol., 26(7): 1331–1336. doi: 10.1007/s11274-009-0297-7
- Rusch gen. Klaas, M., Meurer, P., 2004: A palmitoleic acid ester concentrate from seabuckthorn pomace. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 106: 412–416. doi: 10.1002/ejlt.200400968
- Řezanka, T., Kolouchová, I., Čejková, A., Cajthaml, T., Sigler, K., 2013a: Identification of regioisomers and enantiomers of triacylglycerols in different yeasts using reversed- and chiral-phase LC-MS. J. Sep. Sci., 36(20): 3310–3320. doi: 10.1002/jssc.201300657
- Řezanka, T., Matoulková, D., Kolouchová, I., Masák, J., Sigler, K., 2013b: Brewer's yeast as a new source of palmitoleic acid-analysis of triacylglycerols by LC-MS. J. Am. Oil Chem. Soc., 90(9): 1327–1342. doi: 10.1007/s11746-013-2271-7
- Řezanka, T., Matoulková, D., Kolouchová, I., Masák, J., Viden, I., Sigler, K., 2015: Extraction of brewer's yeasts using different methods of cell disruption for practical biodiesel production. Folia Microbiol., 60(3): 225–234. doi: 10.1007/s12223-014-0360-0
- Sarris, D., Galiotou-Panayotou, M., Koutinas, A.A., Komaitis, M., Papanikolaou, S., 2011: Citric acid, biomass and cellular lipid production by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on olive mill wastewater-based media. J. Chem. Technol. Biotechnol., 86: 1439–1448. doi: 10.1002/jctb.2658
- Sarris, D., Giannakis, M., Philippoussis, A., Komaitis, M., Koutinas, A. A., Papanikolaou, S., 2013: Conversions of olive mill wastewater-based media by *Saccharomyces cerevisiae* through sterile and non-sterile bioprocesses. J. Chem. Technol. and Biotechnol., 88(5): 958–969. doi: 10.1002/jctb.3931
- Seip, J.E., Zhu, Q.Q. $\Delta 9$ desaturase and its use in making polyunsaturated fatty acids. US Patent 6,448,055 B1, Sep 10, 2002.
- Sigler, K., Matoulková, D., 2013: Odpadní pivovarské kvasnice jako zdroj nutričně cenné kyseliny palmitolejové. Pivovarsko-sladařské dny, Praha, 2013.
- Verwaal, R., Wang, J., Meijnen, J. P., Visser, H., Sandmann, G., van den Berg, J. A., van Ooyen, A. J. J., 2007: High-level production of beta-carotene in *Saccharomyces cerevisiae* by successive transformation with carotenogenic genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Appl. Environ. Microbiol., 73(13): 4342–4350. doi: 10.1128/aem.02759-06
- Wu, Y., Li, R., Hildebrand, D. F., 2012: Biosynthesis and metabolic engineering of palmitoleate production, an important contributor to human health and sustainable industry. Progress Lipid Research 51 340–349. doi: 10.1016/j.plipres.2012.05.001
- Xia, E. Q., Deng, G. F., Guo, Y. J., Li, H. B., 2010: Biological activities of polyphenols from grapes. Int. J. Mol. Sci., 11(2): 622–646. doi: 10.3390/ijms11020622
- Xu, J., Du, W., Zhao, X., Zhang, G., Liu, D., 2013: Microbial oil production from various carbon sources and its use for biodiesel preparation. Biofuels, Bioprod. Biorefin., 7: 65–77. doi: 10.1002/bbb.1372

Do redakce došlo / Manuscript received: 22/05/2017
Přijato k publikování / Accepted for publication: 19/06/2017