

TN02000044/1-V8

ŽIVNÉ MÉDIUM PODPORUJÍCÍ

MNOŽENÍ PROBIOTICKÝCH

MIKROORGANISMŮ PŘIPRAVENÉ Z

VEDLEJŠÍCH ZEMĚDĚLSKÝCH A

POTRAVINÁŘSKÝCH PRODUKTŮ

(FUNKČNÍ VZOREK)

Živné médium podporující množení probiotických mikroorganismů připravené z vedlejších zemědělských a potravinářských produktů - Gfunk TN02000044/1_V8

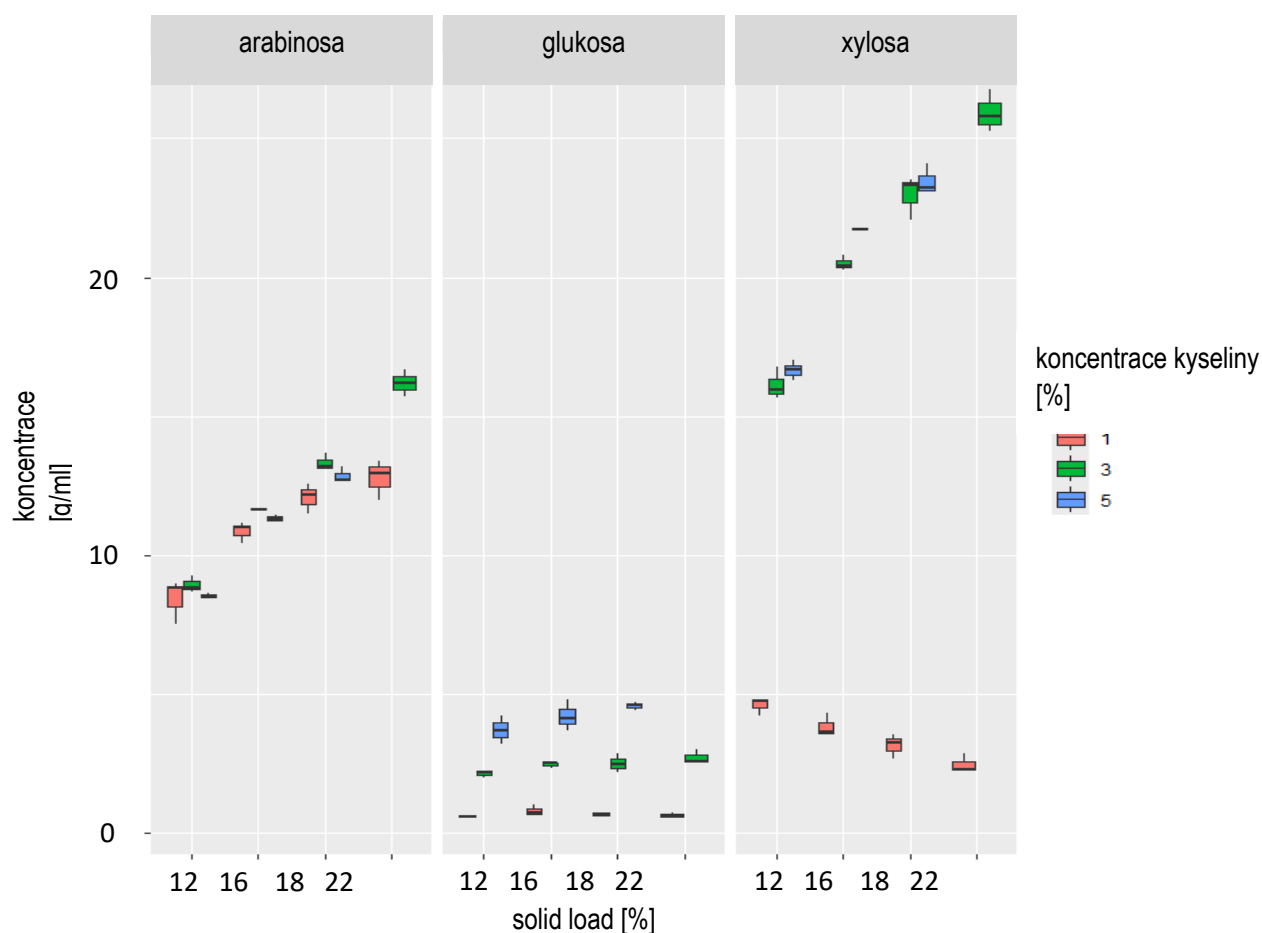
Popis funkčního vzorku

Funkční vzorek představuje živné médium připravené z jednodruhového odpadu, pivovarského mláta, které může být alternativně doplněno hydrolyzátem živočišného či autolyzátem mikrobiálního původu v koncentraci od 0,1 do 1,0 %. Médium obsahuje 44 ± 1 g/l přímo utilizovatelných monosacharidů (glukosa 16 g/l, xylosa 18 g/l a arabinosa 10 g/l), a $> 0,56 \pm 0,04$ g/l dusíku ($\sim 3,5$ g/l proteinu). Obsah inhibičních složek je v mg/l: furfural 49,1; hydroxymethylfurfural 30,0 a ferulová kyselina 149,6; což jsou koncentrace nižší než publikované hodnoty negativně ovlivňující růst bakterií a kvasinek. Schopnost růstu na médiu byla prokázána pro probiotické i jinak technologicky využitelné zástupce vláknitých hub: *Aspergillus oryzae*, *Monascus purpureus*, *Monascus pilosus*; kvasinek: *Saccharomyces boulardii* 2192, *Saccharomyces cerevisiae* RED a bakterií: *Lactobacillus casei* CCDM 198, *Lactobacillus reuteri* LHR-14, *Clostridium butyricum* CBM 588, *Clostridium butyricum* NBRC 13949 a *Clostridium acetobutylicum* LMG 5710. Pivovarské mláto bylo zpracováno v surovém, vlhkém stavu. Na 1 kg mláta byl přidán roztok 31,25 g H_2SO_4 (96%) v 560 ml vody z vodovodního řádu. Směs byla sterilována při 121°C po dobu 20 minut. Po zchlazení bylo upraveno pH pomocí 30% KOH na hodnotu $5,0 \pm 0,2$ a přidán enzym v množství 22 FPU/kg vlhkého mláta, hydrolýza probíhala při 50°C 20 hodin. Hodnota pH média byla upravena na 6,5. Stupeň konverze převodu pevného podílu na kapalný činil 38,6 %, množství získaných sacharidů odpovídá zisku 19,8 % z celkové sušiny. Přípravě funkčního vzorku předcházela optimalizace podmínek zpracování materiálu s následným ověřením biotechnologické využitelnosti k výživě mikroorganismů.

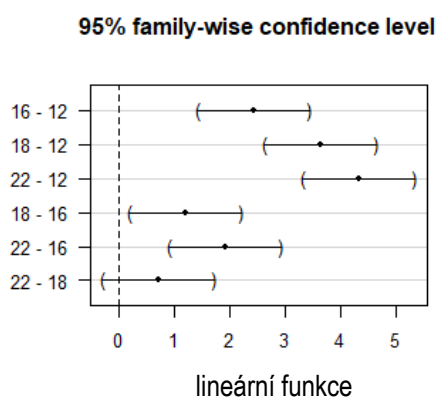
Stanovení pevného podílu a koncentrace kyselin

Koncentrace kyselin byla testována v rozsahu 1% - 5% pro pevný podíl mláta 12 % - 22 %, přičemž 22 % odpovídá hodnotám pro vlhké surové mláto po ukončení scezování a vyslazování (viz obrazová příloha).

Při analýze vlivu pevného podílu a koncentrace kyseliny na uvolňování sacharidů z kompaktní lignocelulózy struktury mláta pomocí modelu ANOVA (R^2 cca 0.97 - model dobře vysvětluje variabilitu dat) bylo prokázáno, že poměr pevné fáze, která byla podrobena hydrolýze, má statisticky významný efekt na množství uvolňovaných sacharidů. V případě koncentrace kyseliny v porovnání s pevným podílem, její efekt byl o něco méně statisticky významný, nicméně stále nezanedbatelný ($p < 0,001$). Významnost vlivu pevné složky závisí na koncentraci kyseliny; podle provedené analýzy se jako významná ukázala kombinace 22 % podílu sušiny a 3 % kyseliny sírové, přičemž ale již hodnoty při použití 2% kyseliny sírové ukazují podobný nárůst koncentrací. Podle Post-hoc TukeyHSD analýzy byly pozorovány významné rozdíly mezi většinou hladin pevného podílu s výjimkou pevného podílu 18 a 22% ($p = 0,24$). V rámci analýzy byly pro jednotlivé sacharidy vytvořeny boxploty znázorňující rozložení hodnot mezi jednotlivými skupinami (Obr. 1). Pro ověření statistické významnosti rozdílů byla navíc provedena korekce family-wise confidence (FWC), viz Obrázek 2, která upravuje intervaly spolehlivosti s ohledem na vícečetné porovnávání. Tato korekce minimalizuje riziko chybné identifikace výsledku jako statisticky významného pouze v důsledku náhodných odchylek vzniklých při provádění vícenásobných testů.



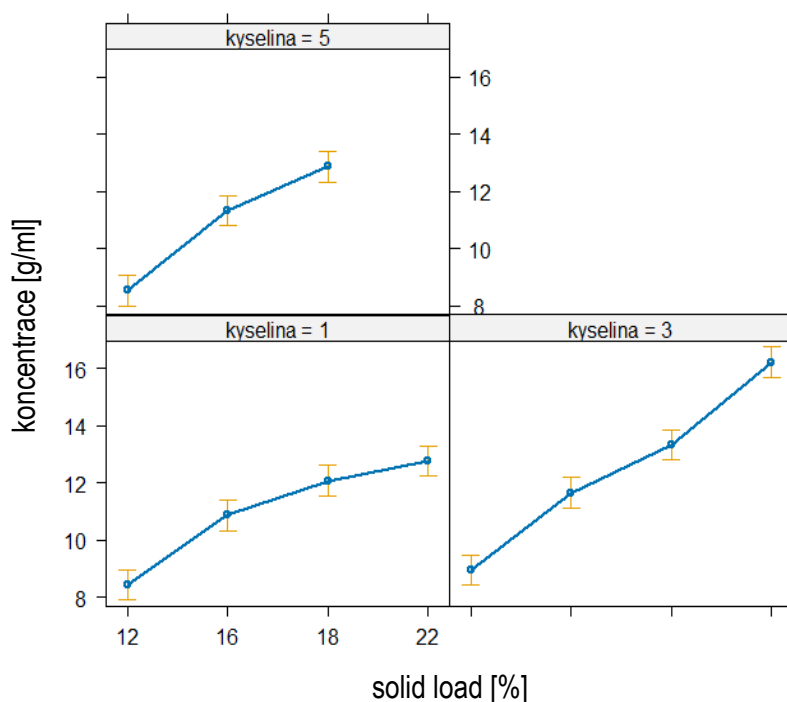
Obrázek 1. Boxploty pro rozložení naměřených hodnot koncentrací pro jednotlivé sacharidy (boxplot pro arabinosu vlevo, pro glukosu uprostřed, pro xylosu vpravo)



Obrázek 2. Porovnání průměrů s kontrolou family-wise confidence level (95%)

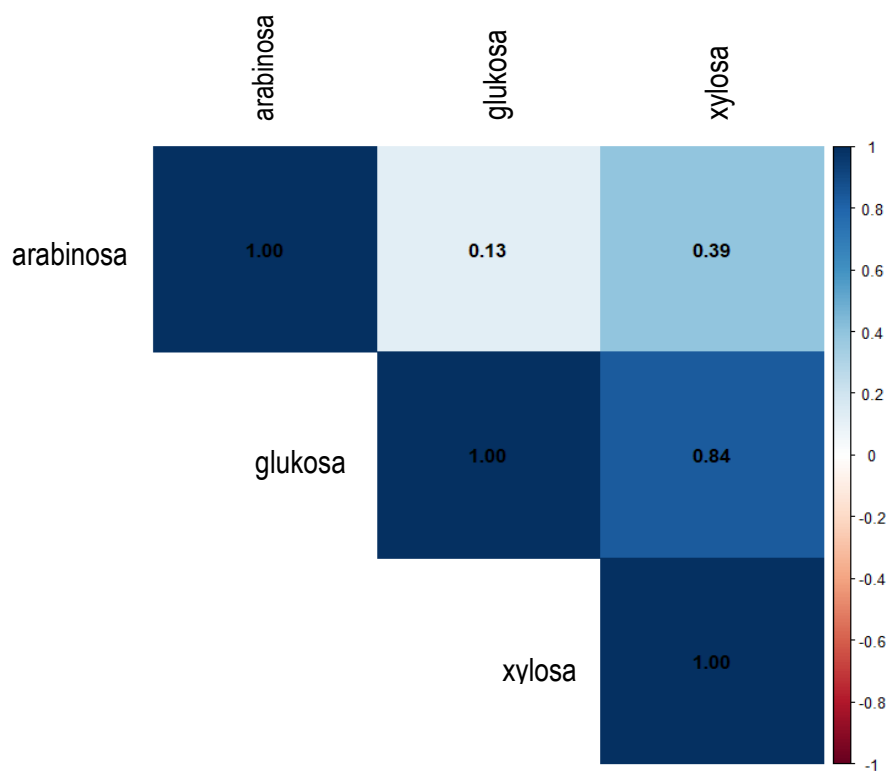
Pro vizualizaci vlivu jednotlivých proměnných (koncentrace kyseliny, pevný podíl) na závisle sledovaný parametr (koncentrace sacharidů) byla použita metoda effect plot, která graficky znázorňuje odhadované efekty nezávislých proměnných v rámci regresního modelu (Obr. 3). Všechny křivky vykazují rostoucí trend, což ukazuje, že se s rostoucí koncentrací zvyšuje i hodnota sledovaného parametru napříč všemi úrovněmi pevného podílu. Zároveň se jednotlivé křivky liší svou polohou i strmostí, což potvrzuje, že pevný podíl má na výsledek také významný vliv.

Effect plot kombinující vliv koncentrace kyseliny [%] a pevného podílu

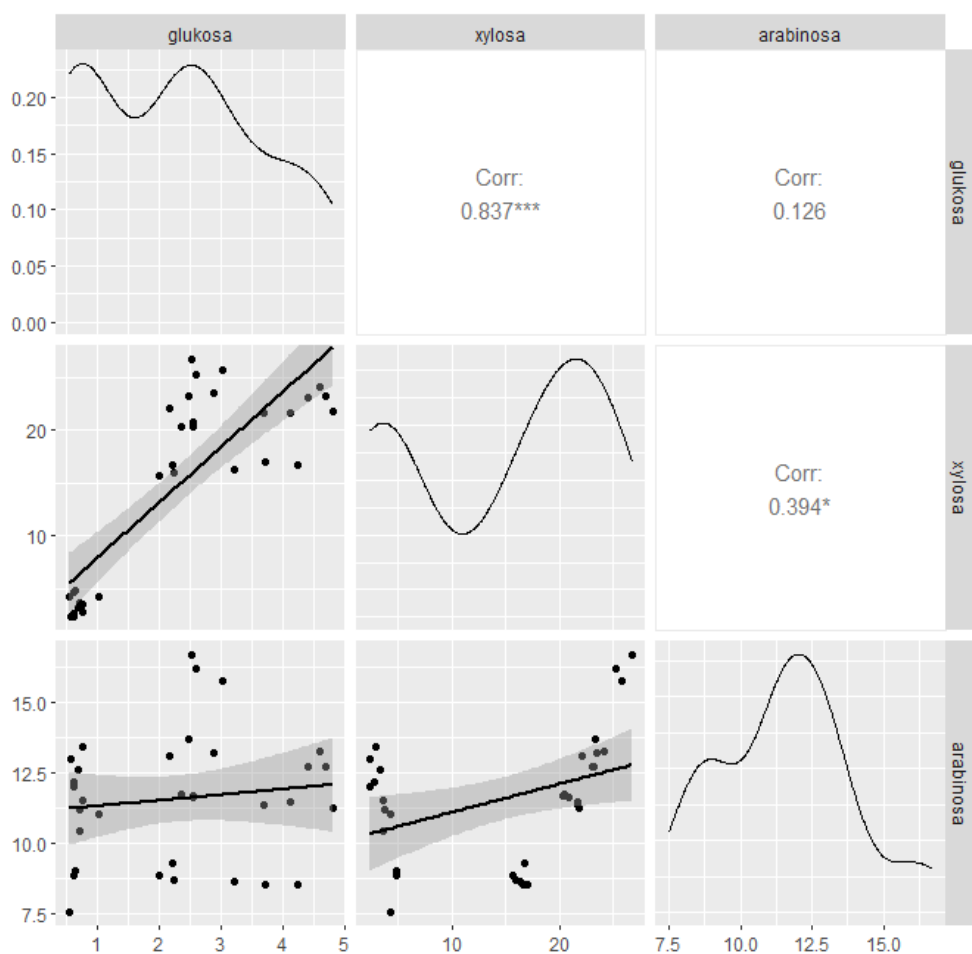


Obrázek 3. Grafické znázornění odhadovaných efektů nezávislých proměnných v rámci regresního modelu pro různé koncentrace kyseliny a poměry pevného podílu

Z hlediska korelační analýzy sacharidů byla objevena statisticky významná pozitivní korelace znázorněná pomocí korelační matice a heatmapy (viz Obr. 4 a 5). Lineární model ($R^2 = 0.7014$) mezi glukosou a xylosou ukazuje silnou a statisticky významnou pozitivní korelaci ($p = 1,23 \cdot 10^{-9}$), kdy odhadovaný sklon činí 0,134, což ve výsledku značí, že s každou jednotkou nárůstu xylosy se očekává, že glukosa vzroste o 0,134 jednotek, přičemž tento lineární vztah je robustní a statisticky významný. Závislost mezi xylosou a arabinosou už se jeví jako slabší, nicméně stále statisticky významná ($p = 0,0231$). Naopak v případě závislosti mezi glukosou a arabinosou se korelační vztah neprokázal jako statisticky významný.



Obrázek 4. Heatmapa zobrazující korelační vztahy mezi jednotlivými sacharidy



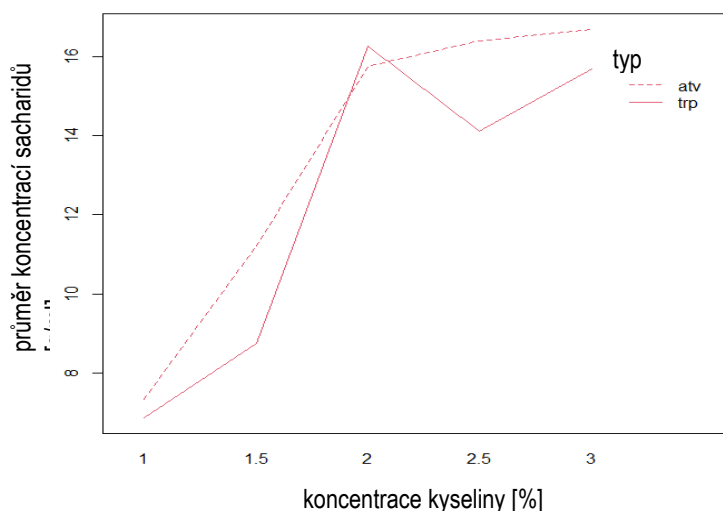
Obrázek 5. Korelační matice s korelačními koeficienty pro výsledné koncentrace [g/ml] glukosy, xylosy a arabinosy

Úpravy vstupního materiálu a forma předúpravy

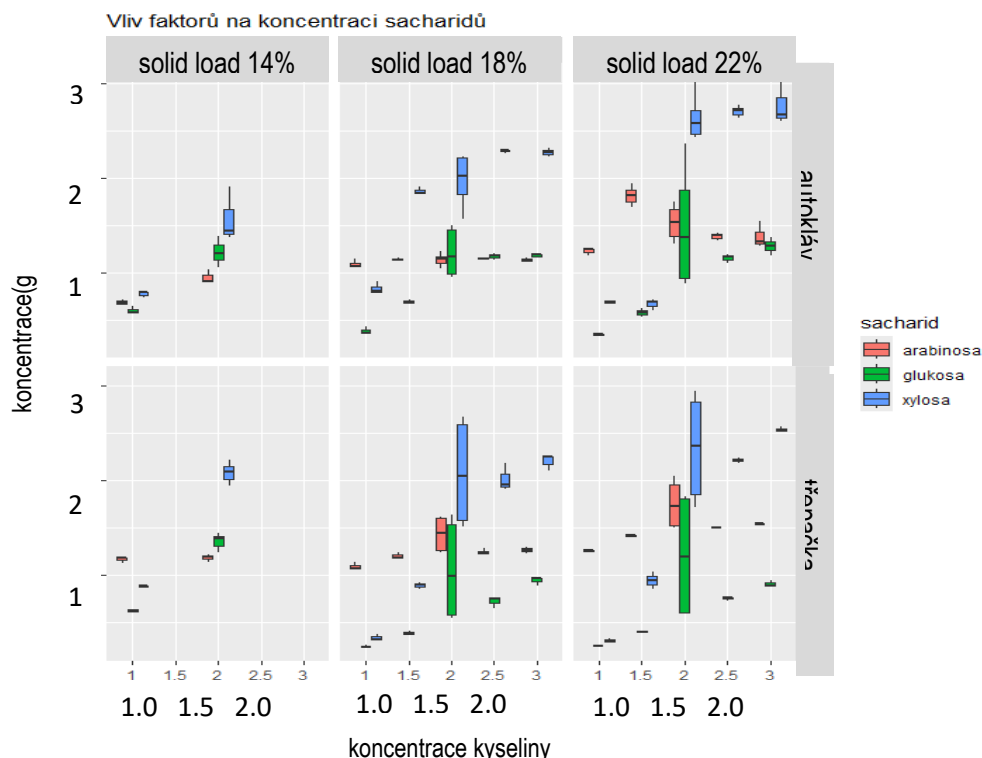
Mláto bylo zpracováno ve dvou formách předúpravy – **atv**: vysoká teplota (121°C)/krátký čas (20 min)/statické provedení vs. **trp**: nízká teplota (80°C)/delší prodleva (20 h)/míchání (130 RPM).

Byly provedeny post-hoc testy pro všechny relevantní kombinace faktorů, které potvrdily statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými sacharidy a některými podmínkami hydrolýzy. Pro arabinosu nebyl rozdíl statisticky významný ($p = 0,11$). U glukosy byla koncentrace vyšší za podmínek *trp*, rozdíl byl statisticky významný ($p = 0,018$). U xylosy byl rozdíl těsně pod hranicí významnosti ($p = 0,061$).

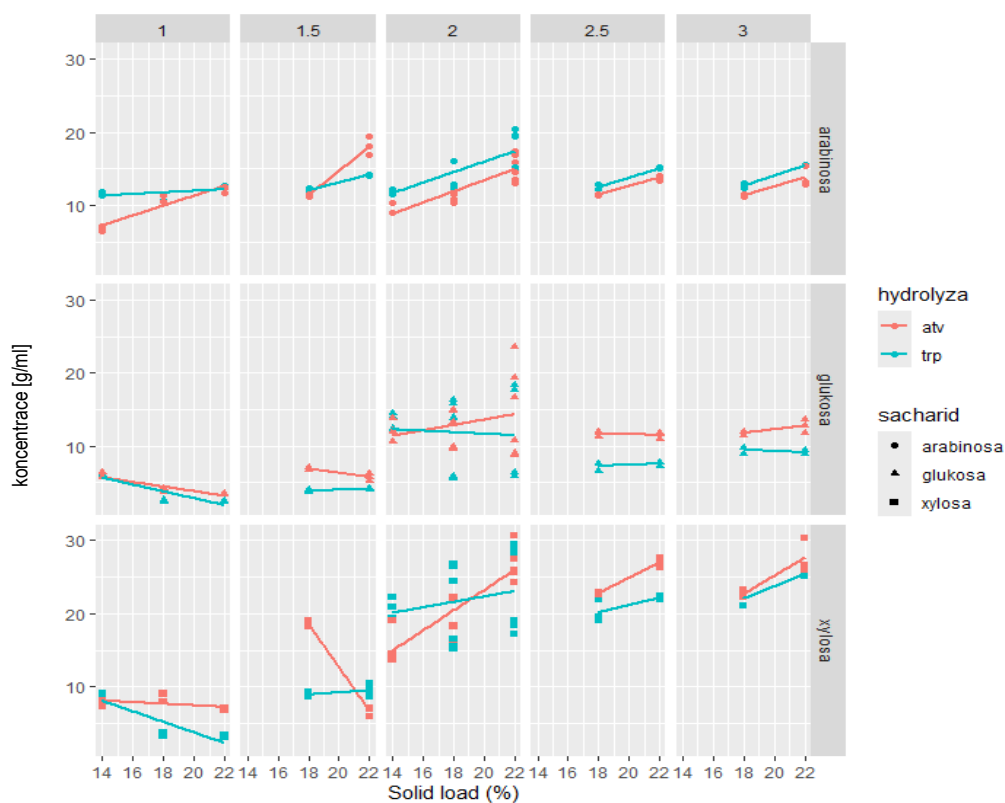
Pro vizualizaci hlavních efektů a interakcí byl vytvořen interakční graf (Obr. 6) a boxploty (Obr. 7) a scatterplot (Obr. 8) rozlišené podle úrovní faktorů.



Obrázek 6. Interakční graf mezi koncentrací kyseliny a typem hydrolýzy



Obrázek 7. Boxplot popisující interakce faktorů (solid load, koncentrace kyseliny, typ hydrolýza: autokláv, třepačka) a jejich vliv na výsledné koncentrace sacharidů

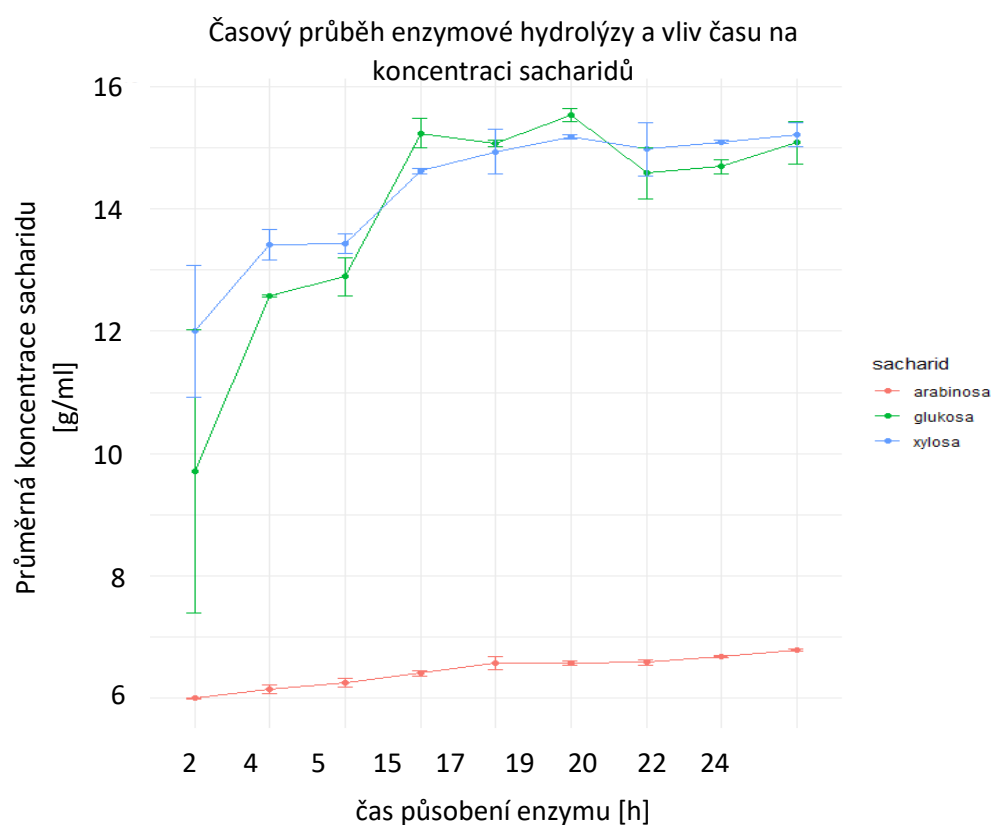


Obrázek 8. Scatterplot pro koncentrace sacharidů s rozlišením podle typu hydrolýzy.

Enzymová hydrolýza

Časová závislost 2-24h

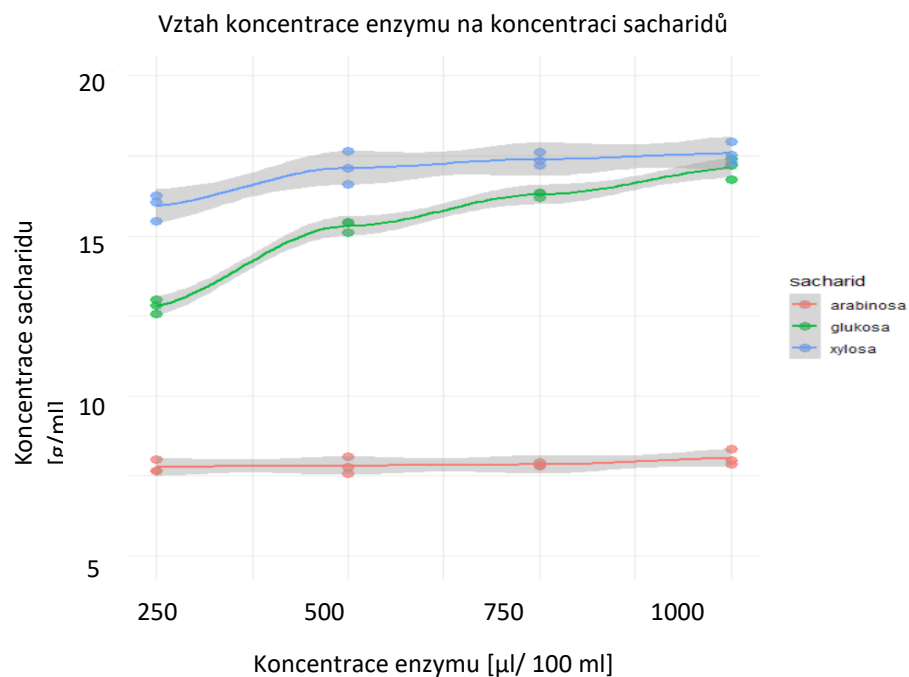
Analýza výsledků pro závislost uvolněných sacharidů na čase enzymového ošetření (viz Obr. 9) byla provedena pro podmínky 8% mláta upraveného 1% kyselinou sírovou a přídatku 68 FPU/l enzymu, pomocí smíšeného lineárního modelu ANOVA a prokázala, že čas působení enzymu má velmi významný efekt na výslednou koncentraci sacharidů ($p = 3,08 \times 10^{-7}$). Nicméně Post-hoc testy pro srovnání jednotlivých časových úseků po korekci p-hodnot žádné významné rozdíly nepřinesly, což znamená, že změny mezi konkrétními časovými body nejsou natolik výrazné jako je změna hodnocená v širších časových intervalech.



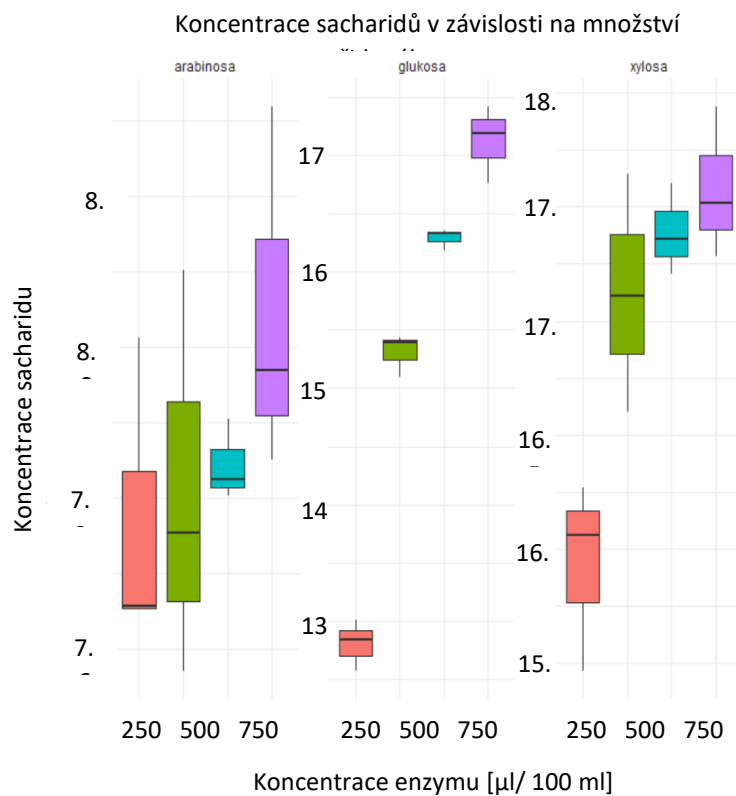
Obrázek 9. Časová závislost koncentrace uvolněných sacharidů na době působení enzymu

Optimalizace množství enzymu

Analýza pomocí jednofaktorové ANOVA pro testovaná množství enzymu: 250 μ l, 500 μ l, 750 μ l, 1000 μ l ukázala, že koncentrace enzymu má významný vliv na uvolňovanou glukosu ($p < 0,001$) a xylosu ($p = 0,001$) avšak ne na arabinosu, u které není vliv statisticky významný (Obr. 10). Pro vizualizaci rozložení hodnot byly využity boxploty (Obr. 11).

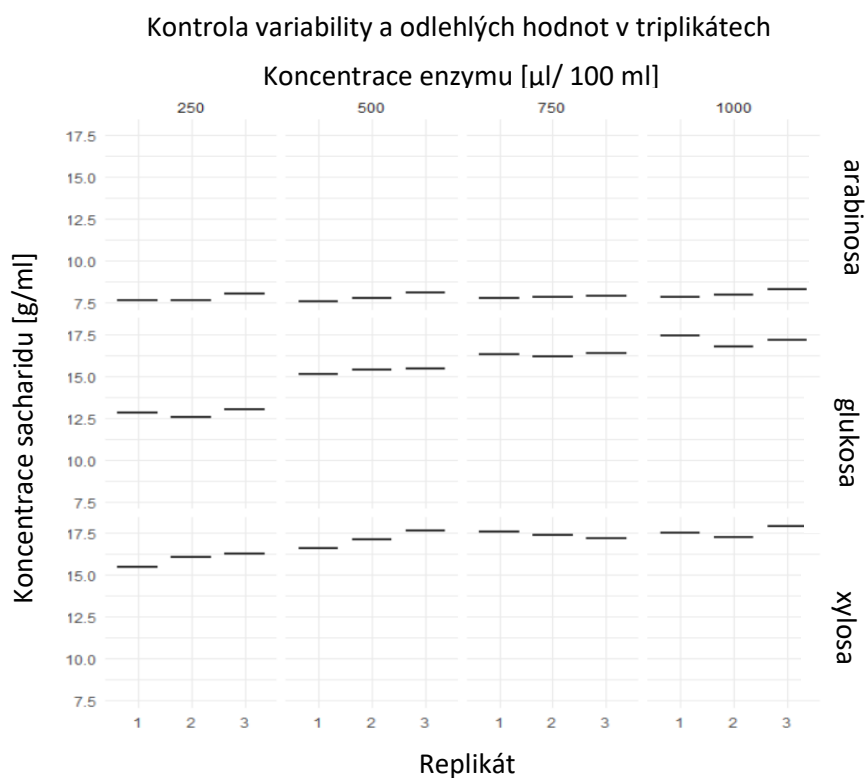


Obrázek 10. Graf pro koncentrace sacharidů v závislosti na množství přidávaného enzymu

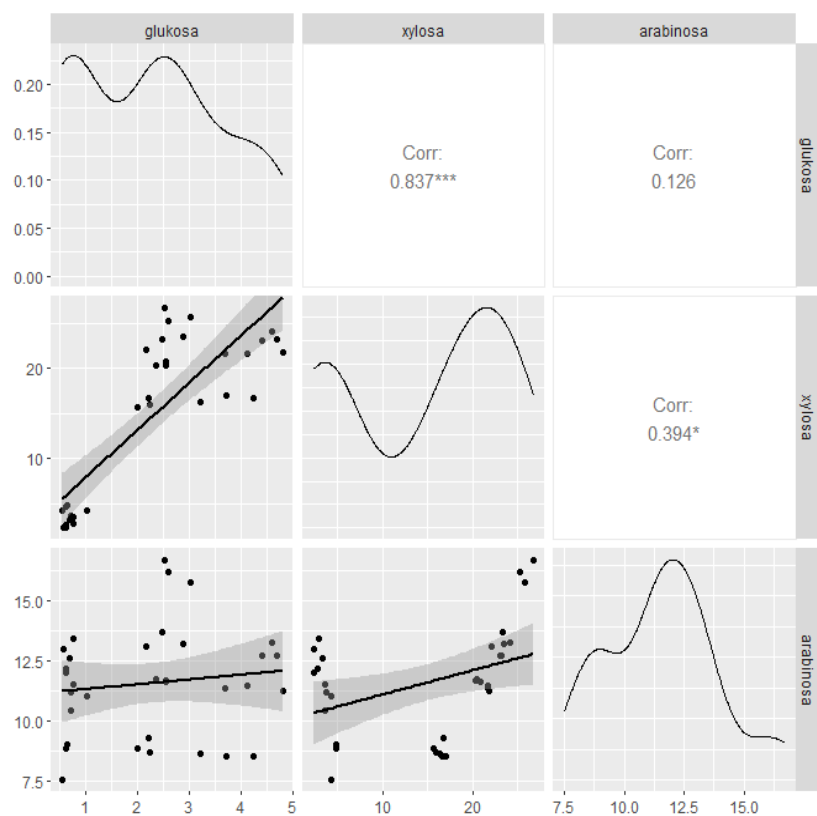


Obrázek 11. Boxplot znázorňující rozdělení hodnot koncentrací sacharidů v závislosti na množství přidávaného enzymu

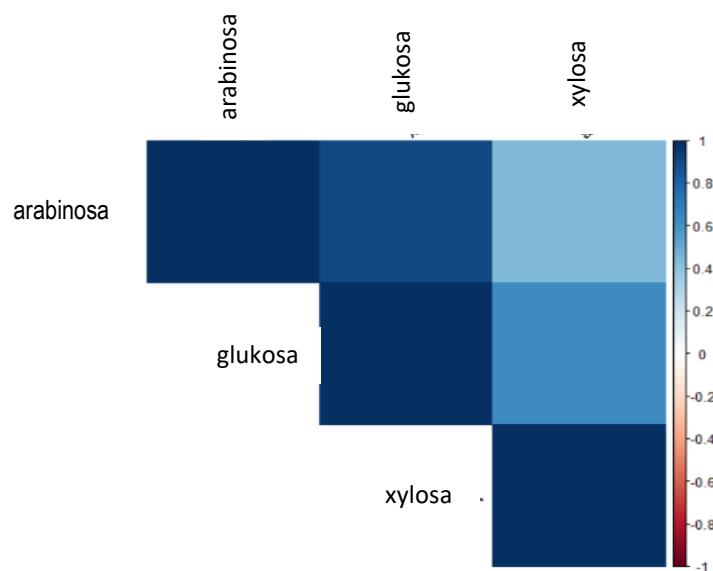
Post-hoc test Tukey HSD provedený pro glukosu a xylosu ukázal, že zvýšení dávky enzymu nad 250 μl vede k významnému navýšení koncentrací glukosy a xylosy. U vyšších koncentrací tento trend zastavuje. Korelační analýza jak s využitím korelační matice (Obr. 13), tak s využitím heatmapy (Obr. 14) ukázala velmi silnou pozitivní závislost mezi glukosou a xylosou ($r = 0,90$), střední korelaci s arabinózou ($r = 0,44$ až $0,62$). Dále pak byla kontrolována variabilita hodnot v rámci replikátů v závislosti na množství přidávaného enzymu (Obr. 12).



Obrázek 12. Graf kontroly variability a odlehlých hodnot v triplikátech



Obrázek 13. Korelační matice s korelačními koeficienty pro výsledné koncentrace [g/ml] glukosy, xylosy a arabinosy

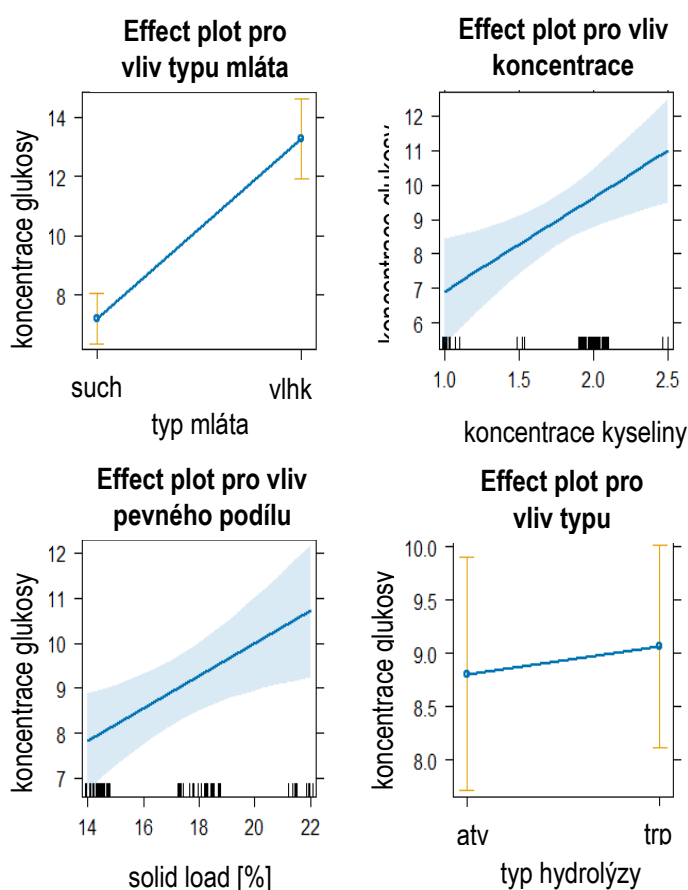


Obrázek 14. Heatmapa zobrazující korelační vztahy mezi jednotlivými sacharidy

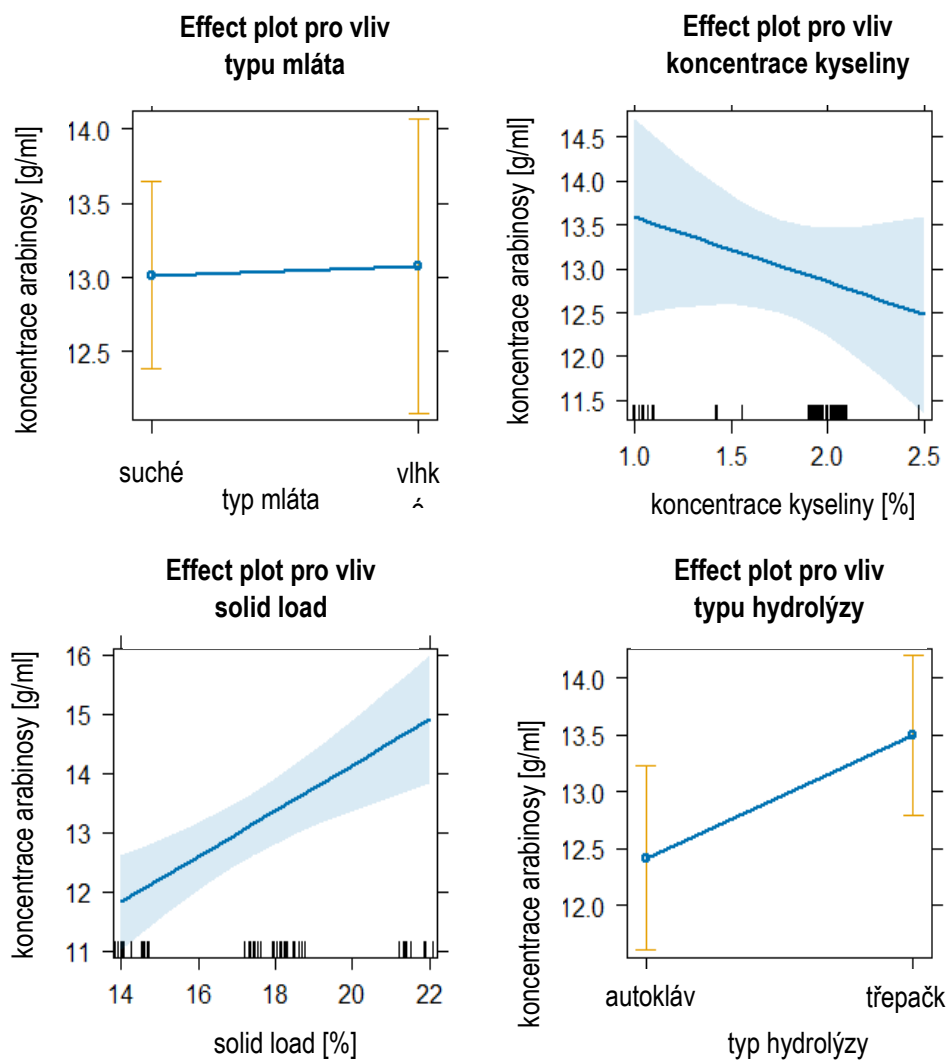
Srovnání suchého a vlhkého mláta

V rámci experimentů bylo srovnáváno využití jak suchého mláta, tak mláta vlhkého, které bylo hydrolyzováno hned po jeho získání bez předúprav. Výsledky naznačují, že využití vlhkého mláta je výhodnější cestou pro hydrolýzu, neboť výsledné koncentrace uvolněných sacharidů převyšují hodnoty získané po zpracování mláta usušeného. Lze tedy vynechat energeticky náročný krok sušení a využít surové mláto s větší výtěžností sacharidů.

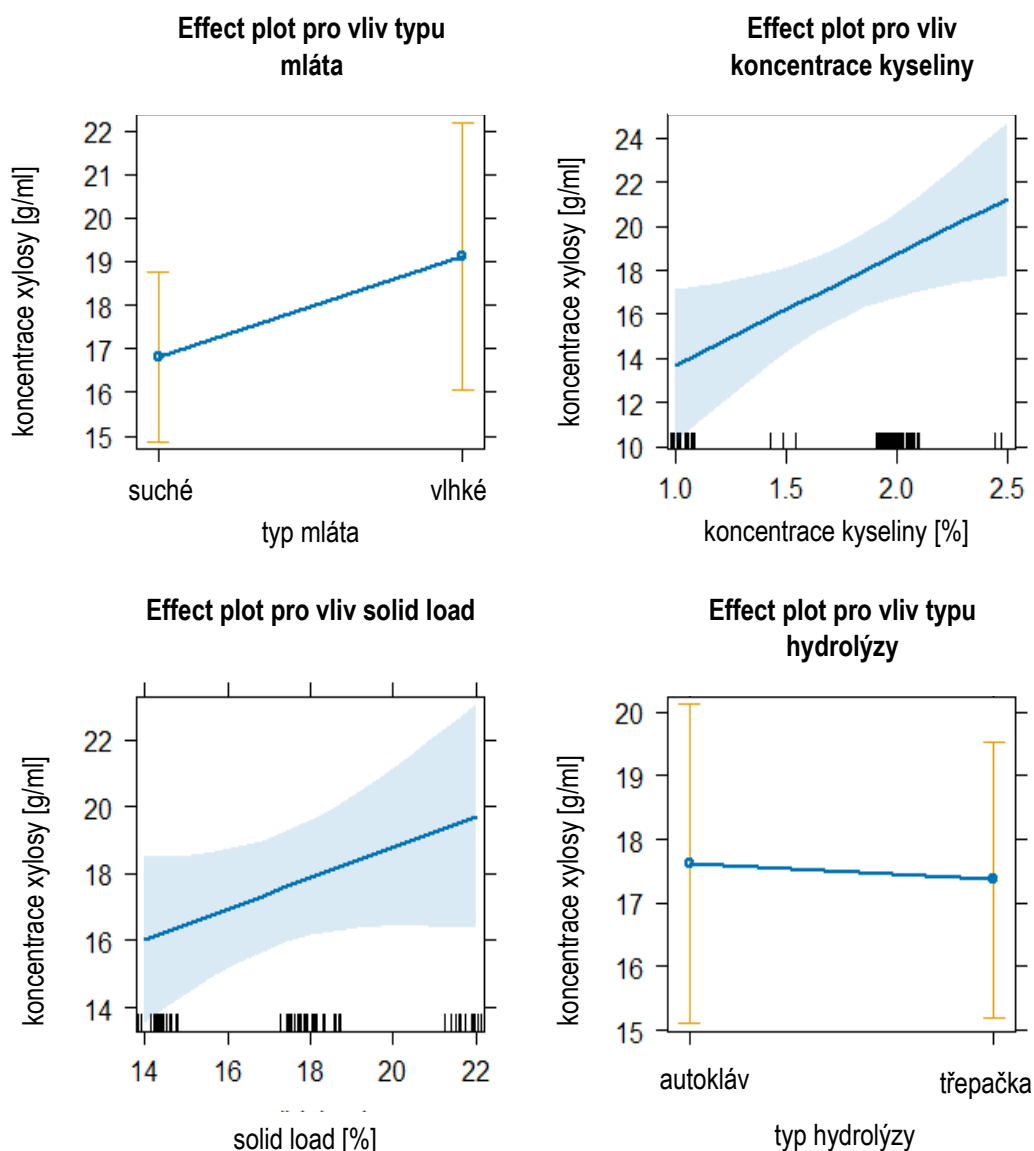
Při porovnání vlivu práce se sušeným a vlhkým mlátem bylo analýzou pomocí lineárního smíšeného modelu zjištěno, že typ mláta má statistický významný vliv na koncentrace uvolněné glukosy (p -hodnota = $8,76 \cdot 10^{-11}$, hodnota testové statistiky $t = 7,582$), viz Obrázek 15, dále pak má zásadní vliv koncentrace kyseliny ($p = 0,00315$, $t = 3,046$) a pevný podíl ($p = 0,00715$, $t = 2,762$). V případě jak arabinosy (Obr. 16), tak xylosy (Obr. 17) není typ mláta tolik statisticky významný (ara $p = 0,915937$, $t = 0,106$; xyl $p = 0,2109$, $t = 1,261$) a naopak je pro arabinosu zásadní poměr pevného podílu a pro xylosu koncentrace kyseliny.



Obrázek 15. Effect plot porovnávající rozdíly ve výsledných koncentracích uvolněné glukosy v případě využití suchého mláta a vlhkého mláta (vlevo nahoře), effect plot srovnávající vliv koncentrace kyseliny na uvolněnou glukosu (vpravo nahoře), effect plot srovnávající vliv solid load na uvolněné množství glukosy (vlevo dole), effect plot srovnávající využití autoklávy a třepačky k hydrolýze v závislosti na uvolněném množství glukosy (vlevo dole)



Obrázek 16. Effect plot porovnávající rozdíly ve výsledných koncentracích uvolněné arabinosu v případě využití suchého mláta a vlhkého mláta (vlevo nahoře), effect plot srovnávající vliv koncentrace kyseliny na uvolněnou arabinosu (vpravo nahoře), effect plot srovnávající vliv solid load na uvolněné množství arabinosu (vlevo dole), effect plot srovnávající využití autoklávu a třepačky k hydrolyze v závislosti na uvolněném množství arabinosu (vlevo dole)



Obrázek 17. Effect plot porovnávající rozdíly ve výsledných koncentracích uvolněné xylosy v případě využití suchého mláta a vlhkého mláta (vlevo nahoře), effect plot srovnávající vliv koncentrace kyseliny na uvolněnou xylosu (vpravo nahoře), effect plot srovnávající vliv solid load na uvolněné množství xylosy (vlevo dole), effect plot srovnávající využití autoklávu a třepačky k hydrolýze v závislosti na uvolněném množství xylosy (vlevo dole)

Test růstu mikroorganismů na Živném médiu podporujícím množení probiotických mikroorganismů připraveném z vedlejších zemědělských a potravinářských produktů

Substrát byl zpracován následovně: K čerstvému vlhkému pivovarskému mlátu byl přidán roztok 31,25 g H_2SO_4 (96%) v 560 ml vody z vodovodního řádu na 1 kg vlhké suroviny. Směs byla sterilována při 121°C po dobu 20 minut. Po zchlazení bylo upraveno pH pomocí 30% KOH na hodnotu $5,0 \pm 0,2$ a přidán enzym v množství 22 FPU/kg vlhkého mláta, hydrolýza probíhala při 50°C 20 hodin. Hodnota pH média byla upravena na 6,5. Médium bylo očkováno rostoucí kulturou v inokulačním poměru 1:20 a podrobeno růstovým testům za podmínek dle požadavků jednotlivých organismů. Schopnost růstu a proliferace byla hodnocena pomocí úbytku sacharidů, produkce metabolitů a vizuálně s využitím mikroskopie. Výsledky kulturačního testu jsou uvedeny v Tabulkách I-III. Vedle schopnosti využívat takto připravené živné médium byla testována potřeba přídavku komplexního zdroje dusíku v podobě kvasničného autolyzátu připraveného z odpadních pivovarských kvasnic a komerčního kvasničného autolyzátu pro výživu probiotických kmenů. Přídavek komerčního přídavku nezlepšil využitelnost

původního média, což indikuje dostatečné pokrytí potřeb mikroorganismů na zdroj dusíku již samotným médiem z mláta. Autolýzát z kvasnic měl ve většině případů negativní dopad na utilizovatelnost substrátu a jeho přídavek je tedy v některých případech nežádoucí.

Tabulka I: Výsledky fermentačních testů v g/l pro kvasinky rostoucí na samotném FV, FV obohaceném o autolýzát odpadních kvasnic a na modelovém roztoku sacharidů s přídavkem autolýzátu odpadních kvasnic.

Podmínky	Mikroorganismus	Zbytková glukosa	Ethanol
Roztok sacharidů s přídavkem kvasničného autolýzátu odpadních kvasnic	<i>S. boulardii</i> 2192	0,00	4,84
Roztok sacharidů s přídavkem kvasničného autolýzátu odpadních kvasnic	<i>S. cerevisiae</i> R	0,00	5,40
FV bez přídavků	<i>S. boulardii</i> 2192	0,00	7,30
FV bez přídavků	<i>S. cerevisiae</i> R	0,00	8,74
FV s přídavkem kvasničného autolýzátu odpadních kvasnic	<i>S. boulardii</i> 2192	0,00	11,09
FV s přídavkem kvasničného autolýzátu odpadních kvasnic	<i>S. cerevisiae</i> R	0,00	11,11

Tabulka III: Výsledky růstových testů v g/l pro vláknité mikromycety na samotném FV a FV obohaceném o autolýzát odpadních kvasnic.

Podmínky	Mikroorganismus	Zbytková glukosa	Zbytková xylosa	Zbytková arabinosa	Mléčná kyselina	Ethanol
FV bez přísad	<i>Monascus purpureus</i> DBM 4360	0,00	2,37	7,10	0,00	8,69
FV bez přísad	<i>Aspergillus oryzae</i> Koji	0,00	0,00	0,00	2,50	0,00
FV s přísadou kvasničného autolýzátu odpadních kvasnic	<i>Monascus purpureus</i> DBM 4360	0,00	5,08	10,64	0,00	11,54
FV s přísadou kvasničného autolýzátu odpadních kvasnic	<i>Aspergillus oryzae</i> Koji	0,00	3,18	10,10	4,45	8,82

Kultivační experimenty potvrdily využitelnost Funkčního vzorku pro širokou škálu mikroorganismů, převážně probiotických bakterií, kvasinek i potravinářsky významných plísní. Funkční vzorek dále poskytoval dostatečné množství živin poskytující veškeré nezbytné složky k růstu mikrobiálních kmenů. Přídavek dalších složek není vyžadován, nicméně v konkrétních aplikacích je možné doplnit médium autolýzátem odpadních pivovarských kvasnic, či alternativně jiným typem hydrolyzátu, např. ze zbytků po separaci masa nebo hydrolyzátem peří. V případě použití kvasničného autolýzátu je potřeba zohlednit citlivost kultivovaných kmenů k přítomnosti reziduálních složek z výroby piva a také zvýšený obsah alkoholu v autolýzátu. V případě kvasinek, které nebyly citlivé k přítomnosti těchto látek byla použitím Funkčního vzorku namísto čistých sacharidů zlepšena produkce o 62 % bez přísady autolýzátu a konečná koncentrace ethanolu s přísadou autolýzátu byla vyšší o 129 % v případě *S. boulardii* 2192. U *S. cerevisiae* R bylo pozorováno zlepšení o 62 % a 106 %, resp. Bakteriální kmeny byly přítomností autolýzátu inhibovány.

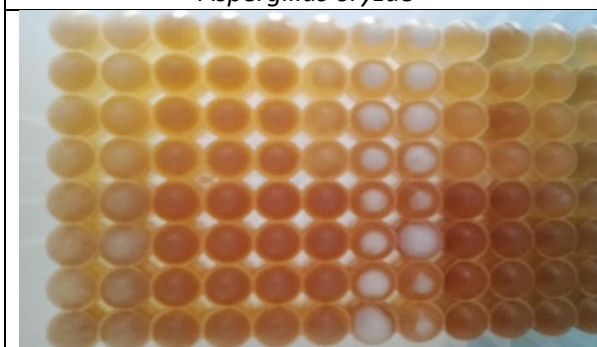
Obrazová příloha



Aspergillus oryzae



Monascus purpureus



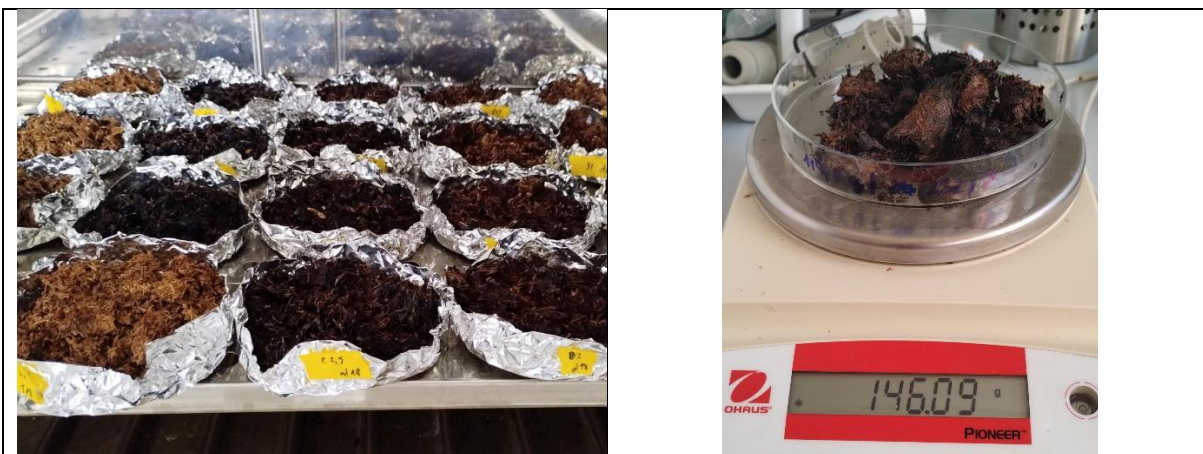
Screeningové testy



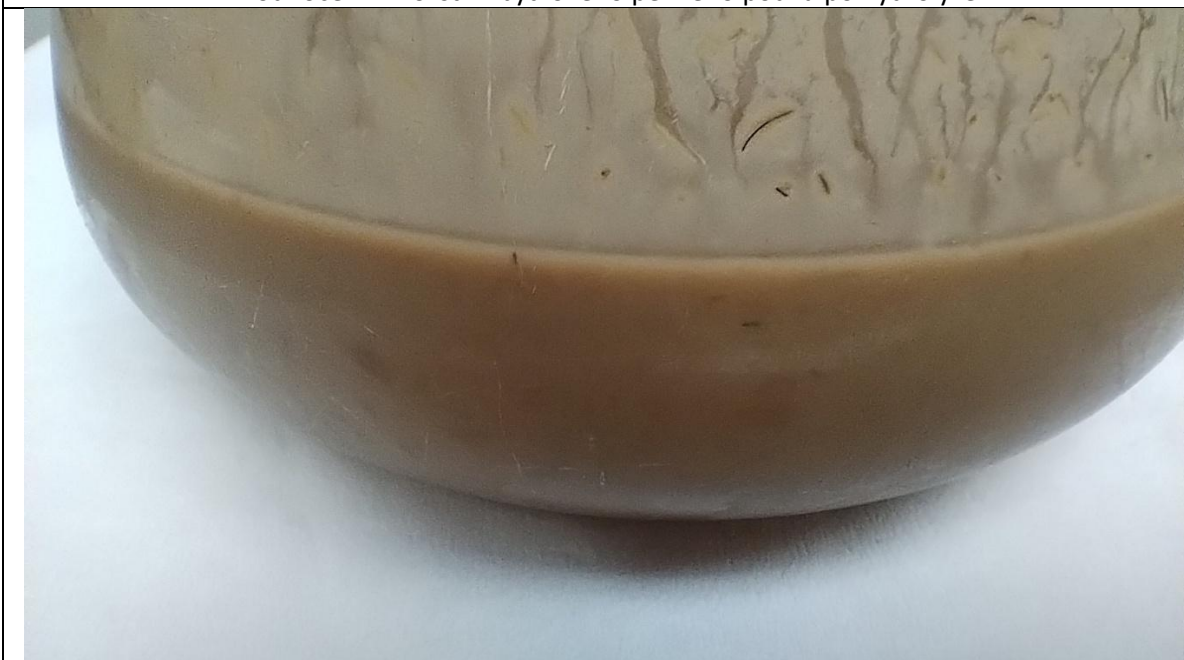
Mláto v surovém stavu



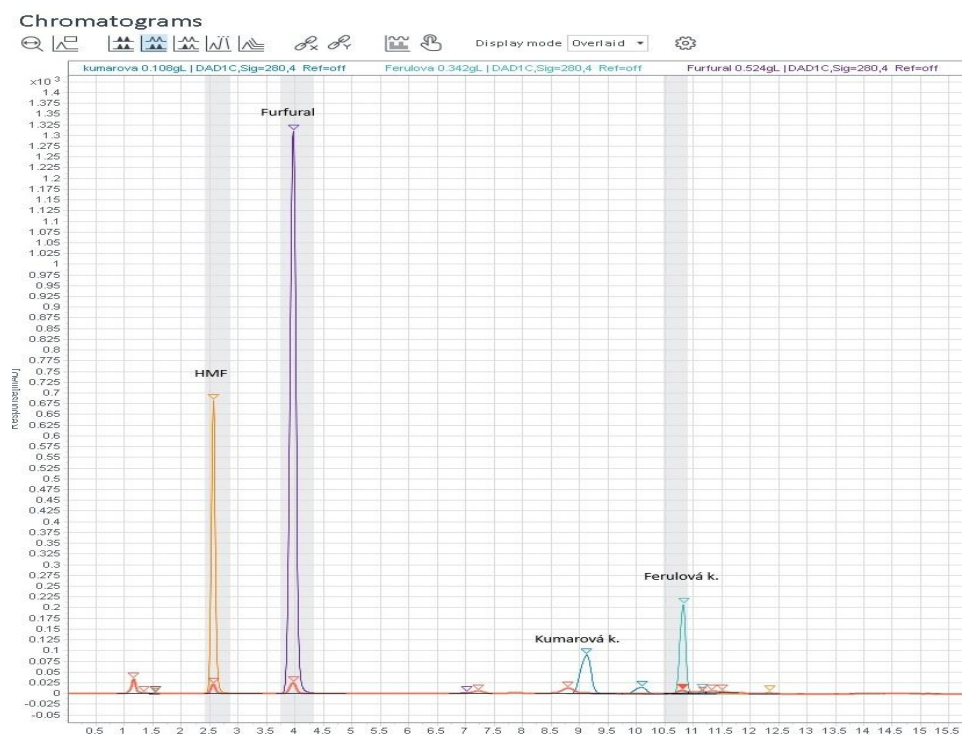
Autolyzát odpadních kvasnic



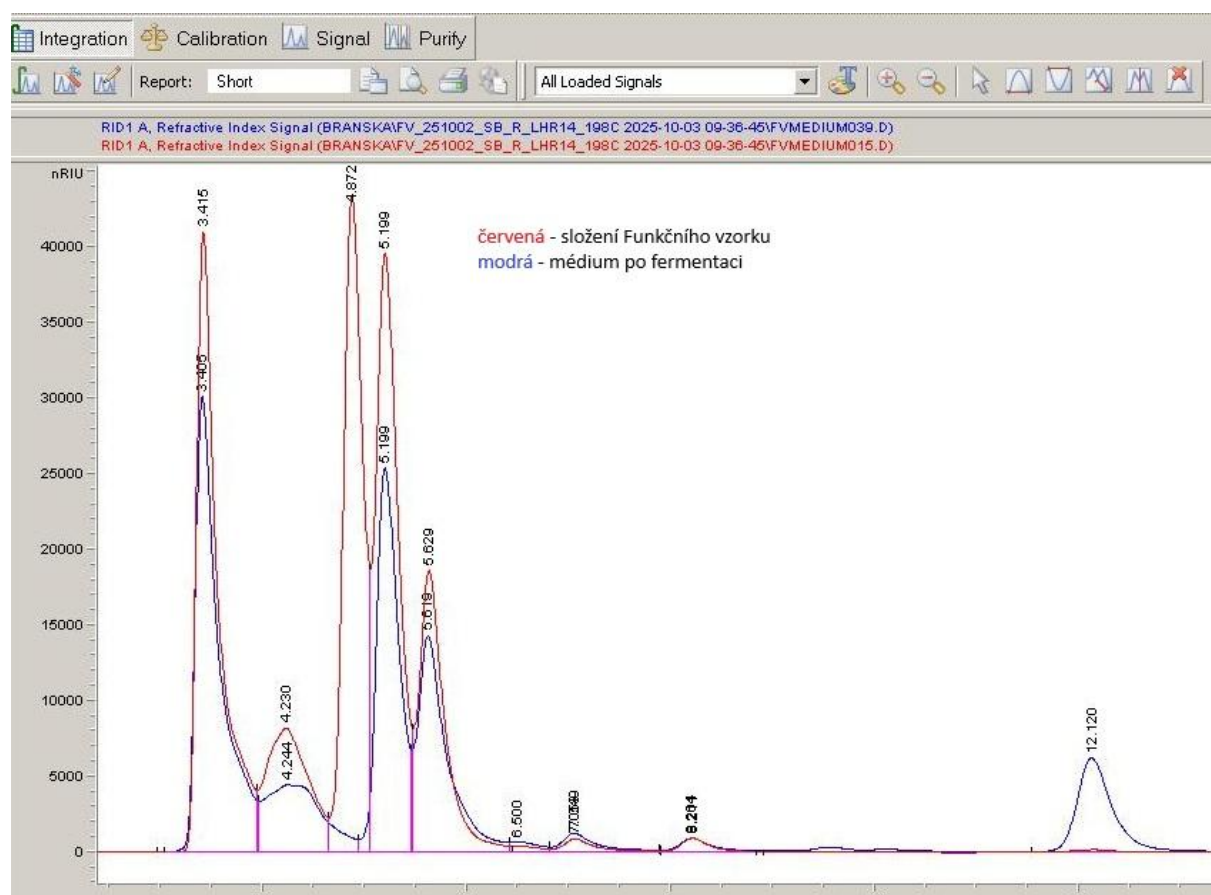
Hodnocení množství zbytkového pevného podílu po hydrolýze



Vzorek: Živné médium podporující množení probiotických mikroorganismů připravené z vedlejších zemědělských a potravinářských produktů - Gfunk TN02000044/1_V8



Obr. 18: Chromatogram Funkčního vzorku (červeně) spolu se standardy inhibitorů – UV-VIS detektor.



Obr. 19: Chromatogram původního Funkčního vzorku (červeně) a prokvašeného média (modře) – RID detektor.

Závěr: Živné médium podporující množení probiotických mikroorganismů připravené z vedlejších zemědělských a potravinářských produktů - Gfunk TN02000044/1_V8, představuje komplexní zdroj živin a jednoduchých sacharidů využitelných nejen probiotickými mikroorganismy. Zároveň obsahuje tolerované množství inhibitorů, běžně se vyskytujících v těchto typech hydrolyzátu z lignocelulosové biomasy. Postup přípravy vynechává energeticky náročný krok sušení pivovarského mláta a přidavkem roztoku kyseliny je dosaženo nejen rozvolnění lignocelulosové struktury, tak zároveň zajištění mikrobiologické stability materiálu, jinak velmi náchylného k rychlému kažení. Postup přípravy média byl navržen zároveň tak, že obsahuje všechny nezbytné nutrienty v podobě využitelných složek a pro testované mikroorganismy nemusí být doplňováno o další živiny.

Datum dokončení přípravy funkčního vzorku: 7. 11. 2025

Místo zpracování a uložení: Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha, Technická 5, Praha 6

Autoři výsledku:

Ing. Daniela Doubková, VŠCHT Praha

doc. Ing. Barbora Branská, Ph.D., VŠCHT Praha

prof. Dr. Ing. Petra Patáková, VŠCHT Praha

doc. Ing. Petr Kaštánek, Ph.D. EcoFuel Laboratories s.r.o.

prof. Ing. Karel Melzoch, CSc, VŠCHT Praha