



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**VALORIZACE POTRAVINÁŘSKÝCH ODPADŮ V RÁMCI
SCHÉMATU BIORAFINERIE**

BIOTECHNOLOGICAL CONVERSION OF SPENT BREWERY GRAINS INTO MICROBIAL POLYMERS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Klaudia Bystrická

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1748/2021

Akademický rok: 2021/22

Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií

Studentka: **Klaudia Bystrická**

Studijní program: Chemie a technologie potravin

Studijní obor: Biochemická technologie

Vedoucí práce: **prof. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Valorizace potravinářských odpadů v rámci schématu biorafinerie

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Analýza složení pivovarského mláta
3. Charakterizace komerčního enzymového koktejlu
4. Hydrolýza polysacharidů mláta na zkvasitelné sacharidy
5. Charakterizace získaných hydrolyzátů
6. Využití hydrolyzátů k biotechnologické produkci polyhydroxyalkanoátů

Termín odevzdání bakalářské práce: 27.5.2022:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu.
Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Klaudia Bystrická
studentka

prof. Ing. Stanislav Obruča,
Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Predložená bakalárska práca sa zaoberá štúdiom biotechnologickej produkcie polyhydroxyalkoanátov (PHA), použitím hydrolyzátov z pivovarského mláta a vybraných bakteriálnych zástupcov rodu *Schlegelella*, *Halomonas*, *Tepidimonas* a *Burkholderia*. Cieľom tejto práce bolo zistiť, či hydrolyzáty pochádzajúce z pivovarského mláta môžu slúžiť ako vhodný substrát pri produkcii PHA. Dôraz bol pritom kladený na rôzne spôsoby predúpravy lignocelulózneho materiálu. Pivovarské mláto bolo podrobené kvantitatívnej analýze a pre komerčný enzýmový kokteil používaný pri hydrolýze, bolo stanovené teplotné a pH optimum. Najefektívnejšia premena cukrov na PHA bola dosiahnutá u baktérie *H. organivorans* za použitia hydrolyzátu mláta, ktoré bolo upravené plazmou. Hydrolyzáty, ktoré boli pripravené šetrnejšími metódami, obsahovali menej bakteriálnych inhibítorov a dostatočné množstvo cukrov, čím slúžili ako vhodnejší substrát pre rast mikrorganizmov.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Polyhydroxyalkoanáty, extremofilné mikroorganizmy, *Schlegelella*, *Tepidimonas*, *Halomonas*, *Burkholderia*, pivovarské mláto, valorizácia

ABSTRACT

The presented bachelor thesis deals with the study of biotechnological production of polyhydroxyalkoanates (PHA), using hydrolysates of brewer's spelt grain (BSG) and selected bacterial strains *Schlegelella*, *Halomonas*, *Tepidimonas* and *Burkholderia*. The thesis aims to determine whether it is possible to use BSG hydrolysates as a substrate for PHA production, with the emphasis on different pretreatment methods of the lignocellulosic material. BSG was submitted to quantitative analysis and the optimum temperature and pH of the commercial enzymatic cocktail used for the hydrolysatation was determined. The most effective transformation of sugars to PHA was accomplished by bacteria *H. organivorans* with the use of a hydrolysate from plasma pretreated BSG. Hydrolysates which were prepared with moderate methods, contained less bacterial inhibitors and sufficient amounts of sugars. These hydrolysates served therefore as preferable substrates for the microorganism growth.

KEY WORDS

Polyhydroxyalkoanates, extremophilic microorganisms, *Schlegelella*, *Tepidimonas*, *Halomonas*, *Burkholderia*, brewer's spelt grain, valorisation

Bibliografická citácia

BYSTRICKÁ, Klaudia. *Valorizace potravinářských odpadů v rámci schématu biorafinerie*. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/138821>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Stanislav Obruča.

Prehlásenie

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne, a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho práce a dekana VUT.

.....

Klaudia Bystrická

Pod'akovanie

Rada by som sa poďakovala vedúcemu práce prof. Stanislavovi Obručovi za odborné vedenie a skvelý prístup. Veľké poďakovanie patrí predovšetkým konzultantke Ing. Xenii Kouřilovej za profesionálny prístup, cenné rady, ochotu riešiť problémy a za veľkú dávku trpezlivosti. Ďalej by som sa chcela poďakovať firme ASA za dodanie enzýmov, vedcom z Poľnohospodárskej univerzity v Aténach za poskytnutie hydrolyzátu pivovarského mláta a pivovaru Cerveza Mica za dodávanie mláta. V neposlednom rade by som sa chcela poďakovať rodine a priateľom za psychickú podporu počas celej doby štúdia.

Obsah

ÚVOD.....	6
1 TEORETICKÁ ČASŤ	7
1.1. Polyhydroxyalkoanáty.....	7
1.1.1. Základné fyzikálno-chemické vlastnosti PHA.....	7
1.1.2. Biosyntéza PHA.....	8
1.1.3. Aplikácie PHA	10
1.1.4. Biodegradácia PHA.....	11
1.2. Extremofilné mikroorganizmy	12
1.2.1. Halofilné mikroorganizmy.....	13
1.2.2. Termofilné mikroorganizmy	14
1.3. Valorizácia potravinárskeho odpadu	15
1.3.1. Valorizácia pre produkciu biopalív	16
1.3.2. Valorizácia pre produkciu bioaktívnych látok a enzýmov	16
1.3.3. Valorizácia pre produkciu biopolymérov	17
1.4. Lignocelulózny materiál	18
1.4.1. PHA z lignocelulózneho odpadu.....	19
1.4.2. PHA z mláta.....	19
2 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	21
2.1. Použité mikroorganizmy, chemikálie a prístroje	21
2.1.1. Použité mikroorganizmy.....	21
2.1.2. Použité chemikálie	21
2.1.3. Použité prístroje	22
2.2. Príprava hydrolyzátu z mláta	23
2.3. Príprava hydrolyzátu s extrakciou fenolických látok a bielkovín.....	23
2.4. Kultivácie mikroorganizmov	24
2.4.1. Kultivačné médiá	24
2.4.2. Minerálne médiá.....	26
2.5. Použité metódy.....	28
2.5.1. Analytický rozbor mláta	28
2.5.2. Stanovenie redukujúcich cukrov v hydrolyzátoch pomocou DNS	30
2.5.3. Stanovenie obsahu cukrov pomocou HPLC	31
2.5.4. Spektrofotometrické stanovenie fenolických látok.....	32

2.5.5.	Stanovenie množstva biomasy	33
2.5.6.	Analýza PHA pomocou plynovej chromatografie	33
2.5.7.	Stanovenie optimálnej teploty a pH pre enzýmový kokteíl.....	33
3	VÝSLEDKY A DISKUSIA	35
3.1.	Stanovenie teplotného a pH optima enzýmov	35
3.2.	Charakterizácia mláta	37
3.3.	Charakterizácia hydrolyzátov mláta	38
3.3.1.	Stanovenie redukujúcich cukrov pomocou DNS	38
3.3.2.	Analýza cukrov pomocou HPLC	38
3.3.3.	Stanovenie celkových fenolických látok v hydrolyzátoch	40
3.4.	Vyhodnotenie schopnosti produkcie PHA.....	41
3.4.1.	Kultivácia s hydrolyzátom alkalicky upraveného mláta	41
3.4.2.	Kultivácia s hydrolyzátom neutrálne upraveného mláta	42
3.4.3.	Kultivácia s hydrolyzátom mláta upraveného plazmou	42
3.4.4.	Vyhodnotenie kultivácií	43
	ZÁVER	45
4	ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV	47

ÚVOD

Posledné roky si polyhydroxyalkoanáty (PHA) získavajú stále väčšiu pozornosť. Vlastnosťami sa podobajú petrochemickému plastom, avšak pochádzajú zo znovu obnoviteľných zdrojov, sú biodegradovateľné, biokompatibilné a netoxické [1].

V roku 2019 dosiahla ročná produkcia plastov približne 368 miliónov ton, čo má za následok mnohé negatívne environmentálne problémy. Z tohto dôvodu sa za účelom udržateľnosti hľadajú stále nové náhrady petrochemických polymérov, vysoký potenciál pritom vykazujú práve PHA [2]. Aplikujú sa v medicínskych, kozmetických, farmaceutických, poľnohospodárskych a textilných odvetviach, alebo sa používajú ako obaly a fólie [2; 3; 4]. Ich produkcia je limitovaná vysokou cenou, použitím odpadových materiálov ako substrát by ju však bolo možné znížiť až o 50 % [1]. PHA sa akumulujú v bunkách mikroorganizmov kde slúžia ako zdroj uhlíka a energie [4]. V súčasnej dobe je známych vyše 300 druhov mikróbov, schopných syntézy PHA [1]. Do tejto skupiny patria aj extrémofilné mikroorganizmy, ktoré sa vyznačujú vysokou adaptáciou k extrémnym podmienkam. Vďaka tejto jedinečnosti prežívajú v prostredí, ktoré pre mezofilné mikroorganizmy nie je vhodné a tým je ich kultivácia menej náchylná ku kontaminácii. Prioritne sú využívané k produkcii enzýmov, predstavujú však aj vhodné produkčné kultúry, nakoľko u nich bola dokázaná akumulácia PHA vo vysokých množstvách, aj z odpadových materiálov [5].

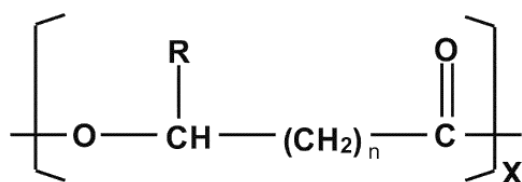
Ročne sa vyprodukuje až 1,3 miliárd ton potravinárskeho odpadu, čo spôsobuje mnohé záťaž pre životné prostredie [6]. Najčastejšie sa tento odpad odstraňuje spaľovaním alebo kompostovaním, tiež môže slúžiť ako krmivo pre zvieratá, hnojivo alebo putuje na skládku. Valorizácia však ponúka získanie vysokohodnotných produktov z potravinárskeho odpadu environmentálne priateľskou cestou [7]. Ako vhodný substrát pri biotechnologickej produkcii PHA, by mohlo slúžiť aj mláto, ktoré tvorí väčšinu pivovarského odpadu [8]. Tento materiál je celoročne dostupný, nesúperí s potravinovým reťazcom ľudí a obsahuje vysoké množstvo celulózy, z ktorej možno získať vysoké koncentrácie cukrov. Napriek tomu sú biotechnologické aplikácie pivovarského mláta takmer neprebádané [8; 9].

1 TEORETICKÁ ČASŤ

1.1. Polyhydroxyalkoanáty

Polyhydroxyalkoanáty (PHA) sú biopolyméry syntetizované rôznymi mikroorganizmami formou intracelulárnych hydrofóbných inklúzií v cytoplazme, dosahujúcich až 90 hm. % bunky. Sú akumulované pri limitujúcom množstve dusíka, fosforu, síry alebo kyslíka a pri prebytku uhlíka. Po vyvážení nutričných zdrojov sú degradované intracelulárnymi depolymerázami a ďalej využívané v metabolických procesoch ako zdroj uhlíka a energie [4].

Z chemického hľadiska sú PHA alifatické, opticky aktívne polyesterové zložené z monomérov hydroxyalkánových kyselín. Medzi monomérmi je esterová väzba tvorená karboxylovou a vedľajšou hydroxylovou skupinou [4; 10]. Ich fundamentálna štruktúra je uvedená na obr. č.1 [4]. Najviac zastúpeným a preskúmaným PHA je poly-3-hydroxybutyrát (PHB), ktorý objavil francúzsky mikrobiológ Maurice Lemoigne v roku 1926 [3]. Monomér tvoria 3 atómy uhlíka, pričom na uhlíku č. 1 je naviazaná karboxylová skupina a na poslednom je naviazaná hydroxylová a alkylová metylová skupina [11].



Obr. 1: Všeobecná štruktúra PHA [4]

1.1.1. Základné fyzikálno-chemické vlastnosti PHA

Dnes je známych vyše 150 rôznych hydroxyalkánových kyselín [3] a vyše 300 druhov mikroorganizmov [1] podieľajúcich sa na štruktúre a tvorbe PHA. Na základe dĺžky uhlíkovodíkového reťazca tvoriaceho monomér, je možné rozdeliť PHA do troch skupín: scl-PHA obsahujúci 3-5 atómov C, mcl-PHA obsahujúci 6-14 atómov C a lcl-PHA obsahujúci viac ako 14 atómov C. Dĺžka uhlíkovodíkových reťazcov a charakter naviazaných funkčných skupín výrazne ovplyvňujú fyzikálne vlastnosti polyméru [4]. Scl-PHA sa vyznačujú tvrdosťou, krehkosťou a vysokým stupňom kryštalizácie. U mcl-PHA prevláda flexibilita, elasticita, nízky stupeň kryštalizácie a nízka pevnosť v ťahu a teplota topenia [3]. Chemická štruktúra závisí od výberu mikroorganizmu a zdroja uhlíka v médiu [10]. Medzi všeobecné vlastnosti PHA patrí nerozpustnosť vo vode, dobrá rozpustnosť v chlórovaných rozpúšťadlách

(napr. chloroform, dichlóretán, dichlórmétán), odolnosť voči UV žiareniu a nízka rezistencia voči kyselinám a zásadám. Najvýznamnejšou charakteristikou je biodegradácia a biokompatibilita. Vytváraním zmesí polymérov s možnosťou prídania aditív a kopolymerizáciou je možné upraviť ich vlastnosti a tým ich vhodne prispôbiť k rôznym možnostiam použitia [11]. Napr. PHB, patriaci medzi scl-PHA, je krehký, málo elastický, termicky nestabilný a vysoko kryštalický s teplotou topenia pod 180 °C. Tieto vlastnosti limitujú jeho použitie. Zmes PHB s chitosánom však vykazuje vyššiu flexibilitu, termickú stabilitu a pevnosť v ťahu [3]. Takto optimalizovanú zmes možno použiť na výrobu biodegradovateľných obalov [11].

1.1.2. Biosyntéza PHA

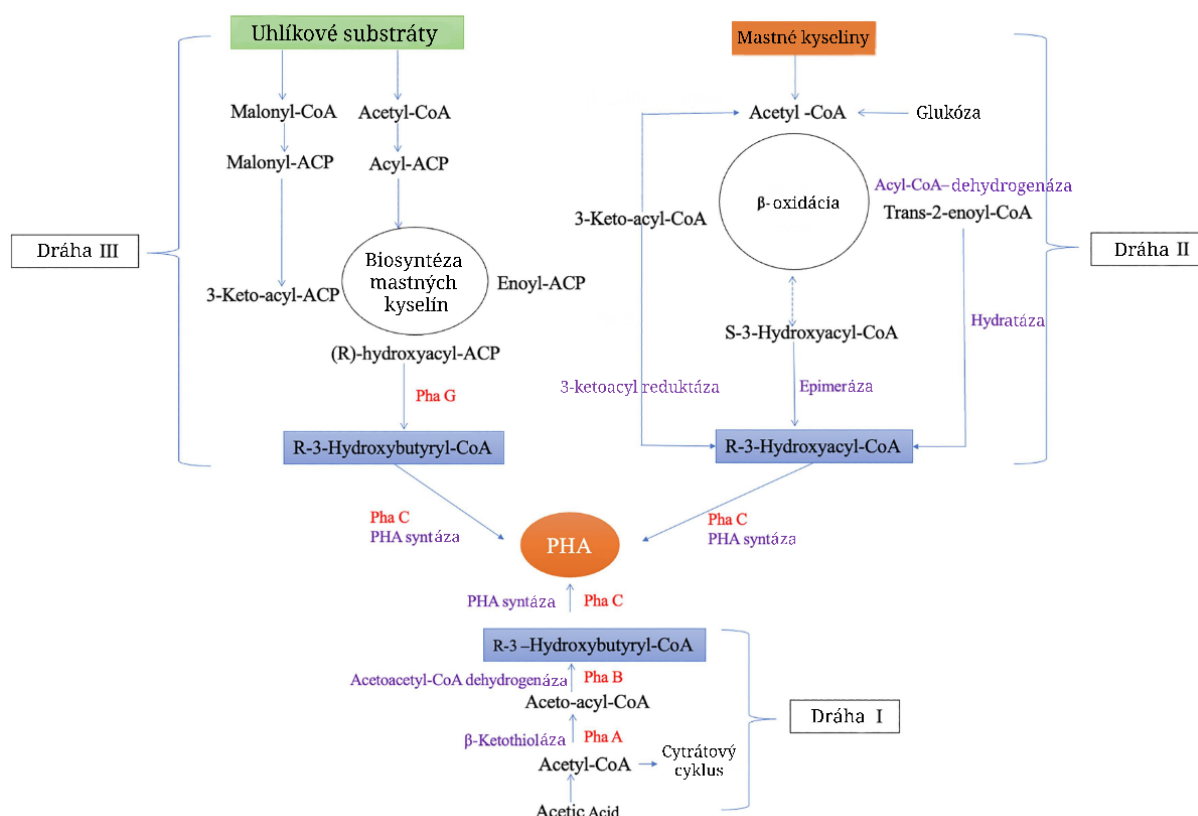
Na základe funkčných skupín, sekvencie aminokyselín a substrátovej špecifity, možno rozdeliť enzýmy podieľajúce sa na syntéze PHA (PHA syntázy) na 4 triedy. Triedy I, III a IV sú charakteristické pre syntézu scl-PHA a trieda IV pre syntézu mcl-PHA. Enzýmy I. a II. triedy sú nositeľmi bielkoviny PhaC. Triedy III a IV vyžadujú k aktivite kombináciu dvoch bielkovín a to PhaC a PhaE alebo PhaC a PhaR. Granule PHA sú pokryté fosfolipidovou vrstvou, na ktorej sa nachádzajú všetky proteíny, okrem regulačného proteínu PhaD, spojené so syntézou alebo odbúravaním PHA. To znamená polymerázy PhaC₁ a PhaC₂, depolymeráza PhaZ, regulačný proteín PhaG a phasíny PhaI a PhaF. Phasíny PhaI a PhaF sú zodpovedné za štruktúru a vznik granule a vytvárajú fázové rozhranie medzi granulou a cytoplazmou. Napriek tomu, že technologické aspekty produkcie PHA sú intenzívne študované posledné desaťročia, je tento proces veľmi komplexný a zatiaľ bolo možné na molekulárnej úrovni, popísať mechanizmy len týchto šiestich proteínov [10].

Pre produkciu PHA sú najbežnejšie 3 rôzne metabolické dráhy, zobrazené na obr. 2. Jedna, typická pre scl-PHA a dve pre mcl-PHA. V dráhe I sú pri tvorbe scl-PHA cukry v prvom kroku, premieňané glykolýzou na acetyl-CoA. Ďalej vzniká Claisenovou kondenzáciou pomocou enzýmu β -ketotioláza, väzba medzi dvomi molekulami acetyl-CoA, čím vzniká acetoacetyl-CoA. Acetoacetyl-CoA dehydrogenáza závislá na NADPH, katalyzuje stereoselektívnu redukciu acetoacetyl-CoA na (R)-3-hydroxybutyryl-CoA. Poslednou reakciou, ktorá je katalyzovaná PHA syntázou, je naviazanie (R)-3-hydroxybutyryl-CoA na rastúci reťazec PHB esterovou väzbou [12]. Táto metabolická dráha je charakteristická napr. pre mikroorganizmy *Cupriavidus necator*, *Aeromonas hydrophila* alebo *Pseudomonas stutzeri* [10].

Dráha II charakteristická pre produkciu mcl-PHA vedie cez β -oxidáciu mastných kyselín. Produkovaný enoyl-CoA je možné katalyzovať s enoyl-CoA hydratázou za vzniku 3-ketoacyl-CoA. Pôsobením (R)-3-hydroxyacyl-CoA hydratázy na enoyl-CoA a 3-ketoacyl reductázou na 3-keto-acyl-CoA, vzniká (R)-3-hydroxyacyl-CoA. Ten je ďalej katalyzovaný PHA syntázou na mcl-PHA [13; 14]. Táto dráha je typická napr. pre *Pseudomonas oleovorans*, *P. entmophila*, *P. aeruginosa* alebo *P. putina*. [12; 14].

V dráhe III pochádza mcl-PHA z biosyntézy mastných kyselín premenou rôznych štruktúrne odlišných a jednoduchých substrátov napr. glukózy, fruktózy alebo sacharózy. Tie sú najprv v glykolýze premieňané na acetyl-CoA, ktorý vo forme acyl-ACP putuje do syntézy mastných kyselín, ktorej hlavným produktom je (R)-3-hydroxyacyl-ACP. Jeho prekursori sú z ACP formy (acyl carrier protein) konvertované na CoA formu enzýmom acyl-ACP-CoA transacylázou [13; 10]. Táto metabolická dráha bola nájdená v takmer všetkých baktériách rodu *Pseudomonas*, okrem *P. oleovorans* [13].

Typ biosyntézy nezávisí len na použitom MO, ale aj na voľbe substrátu. Pre navzájom rozličné látky, ako je glukóza, glukonát alebo acetát, je charakteristická metabolická dráha biosyntézy mastných kyselín. Kompozícia konečného polyméru pri tom závisí na použití uhlíkového zdroja. V opačnom prípade, keď sú substrátom látky navzájom podobné, napr. mastné kyseliny, syntéza PHA vedie cez β -oxidáciu a štruktúra PHA nezávisí na použitom substráte [10].



Obr. 2: Dráhy syntézy PHA [15]. Upravené v aplikácii Autodesk SketchBook.

1.1.3. Aplikácie PHA

Petrochemické plasty sa vyznačujú ľahkosťou, stabilitou, vysokou rezistenciou voči vonkajším podmienkam a širokou škálou fyzikálnych vlastností podľa potreby použitia. Vďaka týmto výhodám, si od roku 1940 rýchlo získali popularitu a dôležité miesto v priemysle [3]. V roku 2019 dosiahla ich ročná produkcia približne 368 miliónov ton, čím predstavujú veľkú záťaž pre životné prostredie [5]. Ohrozujú morský ekosystém, znižujú úrodnosť pôdy, podieľajú sa na globálnom otepľovaní, pri spaľovaní uvoľňujú toxické látky a v podobe mikroplastov sa dostávajú aj do vody. Z týchto dôvodov sa za účelom udržateľnosti hľadajú stále nové náhrady petrochemických polymérov, vysoký potenciál pritom vykazujú práve PHA [2]. Majú plastické vlastnosti, avšak pochádzajú zo znovu obnoviteľných zdrojov, sú biodegradovateľné, biokompatibilné a netoxické. Ich produkciu však limituje vysoká cena, ktorá je 3 až 4-krát vyššia než cena produkcie petrochemických plastov. Avšak použitím odpadových materiálov ako substrát možno znížiť cenové náklady o 40 až 50 % [1]. Prvotne sa začali priemyselne vyrábať v roku 1982 anglickou firmou ICI (Imperial Chemical Industries) pod názvom Biopol®. V roku 1995 bola cena produkcie

približne 13 €/kg, posledné roky je to približne 2,8 €/kg. Medzi ďalšie firmy patrí napr. japonská Shenzen Ecomann Biotechnology Co. s ročnou produkciou PHA 75 000 ton alebo americká firma Metabolix s ročnou produkciou 50 000 ton [3]. Dnes tvoria bioplasty len približne 0,6 % (2,05 miliónov ton) z celkovej produkcie komerčných plastov, v roku 2023 by sa táto hodnota mala vyšplhať na 2,44 miliónov ton [5].

Najčastejšia aplikácia PHA je v odvetví obalov a filmov, kam spadá až 40 % produkovaných bioplastov [3]. Napr. rôzne tašky, kontajnery, nátery, perá, žiletky, dámske hygienické produkty, plienky, príbor, fľaše, poháre a potravinárske obaly. PHA môže nahrádzať aj polyméry v toneroch a vo forme latexu tvoria hydrofóbny film. Vďaka biokompatibilite sú vhodné aj pre rôzne medicínske aplikácie a nástroje, ako napr. chirurgické šijacie materiály, náhrady kože, sieťoviny, implantáty, gázy, spony, detoxikované tampóny, bypassy, doštičky používané pri frakciách tkaniva a kosti. V ortopédii môžu slúžiť ako konštrukcia pre správnu regeneráciu tkaniva, chrupavky alebo kosti. V odvetví farmácie sú používané ako nositeľa liečiva zabezpečujúce postupné uvoľňovanie látok [4]. Využívanie PHA v poľnohospodárstve zahŕňa mnoho výhod. Sú biodegradovateľné, nezaťažujú pôdu škodlivými látkami, ani ťažkými kovmi, redukovujú uhlíkovú stopu a pri pokrývaní pôdy ako mulč stabilizujú teplotu koreňov, pomáhajú udržať vlhkosť v pôde a potláčajú rast nežiaducich rastlín. Kvôli zvyšujúcemu sa dopytu zákazníkov po ekologickejších možnostiach, hrajú bioplasty stále väčšiu rolu aj v textilnom priemysle. Príkladom môžu byť PHB kopolyméry používané v automobilových interiéroch [2]. Znameníé výsledky vykazujú PHA aj pri čistení vody. Pri denitrifikácii predstavujú pevný substrát a ich absorpčná schopnosť olejov umožňuje zbavovanie vody hydrofóbných látok. Ďalej môžu byť použité pri produkcii vlákien. Hydrolýzou PHA vznikajú monoméry, ktoré môžu fungovať ako prekursori iných žiadaných zlúčenín ako napr. β -hydroxy kyseliny, β -amino kyseliny, β -hydroxy estery kyselín a iné [4]. Posledné roky sa PHA implikujú aj ako materiál pri 3D tlači, najmä v biomedicínskom odvetví. Často vo forme kopolymérov napr. s PLA (polymér kyseliny mliečnej) [16].

1.1.4. Biodegradácia PHA

Na rozdiel od petrochemických plastov, sú PHA schopné biodegradácie a to bez potreby špeciálnych podmienok. Rozklad môže prebiehať v aeróbných aj anaeróbných podmienkach, enzymatickou hydrolýzou, termickým alebo chemickým rozkladom. Enzymatická hydrolýza PHA prebieha v prítomnosti mikroorganizmov schopných sekrécie intra- alebo extracelulárnych PHA depolymeráz. Intracelulárne PHA depolymerázy, vylučujú

mikroorganizmy schopné tvorby PHA a v prípade potreby energie hydrolyzujú polyméry akumulované v bunke. Mikróby vylučujúce extracelulárne enzýmy, degradujú PHA na hydrofilné mono- alebo oligoméry a mineralizáciou absorbujú zvyšné fragmenty [4]. Do tejto skupiny sa zaraďujú najmä baktérie a huby *Aspergillus*, *Bacillus*, *Cupriavidus*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* alebo *Streptomyces* [17]. Za aeróbnych podmienok je konečným produktom biodegradácie H_2O a CO_2 , za anaeróbnych navyše aj CH_4 . Degradácia je sprevádzaná redukciou hmotnosti, zvýšením kryštalizácie a straty mechanických vlastností. Rýchlosť rozkladu PHA je ovplyvnená mnohými faktormi: špecifita a aktivita PHA depolymeráz, fyzikálne a chemické vlastnosti polymérov, aktivita mikroroganizmov v prostredí, fyzikálnochemické vlastnosti prostredia a iné [4]. Za účelom cirkulárnej ekonomiky je možné získané monoméry znova využiť ako kosubstrát k produkcii PHA. Napr. aplikáciou alkalicky katalyzovanej depolymerizácie a biotickej repolymerizácie možno získať špecifické PHA [17].

1.2. Extremofilné mikroorganizmy

Extremofilné mikroorganizmy (extremofily) sú vysoko adaptované a metabolicky aktívne pod náročnými podmienkami. Väčšina extremofilov dokáže tolerovať viac extrémnych parametrov naraz, sú charakterizované ako polyextremofily. Adaptácia je spojená s rôznymi stratégiami regulovanými špecifickými génmi a metabolitmi. Extremofily možno klasifikovať na základe primárnej adaptability k prostrediu. Základné rozdelenie je uvedené v tabuľke č.1. Aktuálne sú extremofily využívané prioritne pri produkcii enzýmov, pri komerčnej produkcii biopolymérov len málo. Akumulácia PHA prebieha počas rastovej fázy ako ochrana organel pred stresovými podmienkami. Taktiež slúžia ako zásoba uhlíka a energie. Veľkú časť extremofilov tvorí doména *Archaea*, ktorej membránu tvoria pevnejšie éterové lipidy, poskytujúce väčšiu rezistenciu voči teplote, tlaku a vysokej koncentrácii solí. Membrána baktérií je tvorená zo slabšej, esterovej lipidovej dvojvrstvy [5]. Extremofily predstavujú vhodných kandidátov na konverziu lignocelulózneho materiálu v biopolyméry. Ich hydrolýza je sprevádzaná uvoľňovaním mikrobiálnych inhibítorov ako sú fenolické látky, furfurály a organické kyseliny, ktoré komplikujú spracovanie cukrov, tvorených z rôznych pentóz a hexóz. Z týchto dôvodov je k docieleniu efektívnych výťažkov PHA potreba použiť mikroorganizmy, ktoré sú rezistentné voči mikrobiálnym inhibítorm a ktoré sú schopné konvertovať širokú škálu cukrov. Práve extremofily tieto požiadavky spĺňajú [18].

Tabuľka 1: Základné rozdelenie extremofilných mikroorganizmov [13]

Prostredie	Podkategória	Doména	Rastové podmienky		
			pH	Teplota [°C]	Iné
pH	Acidofily	<i>Bacteria</i>	1,3–3,0	32–52	-
		<i>Archaea</i>	1,0–2,2	53–96	
	Alkalofily	<i>Bacteria</i>	9,0–13,0	45–60	
Teplota	Psychrofily	<i>Bacteria</i>	5,0–10,0	5,0–15,0	-
		<i>Archaea</i>	6,0–9,0	1,0–15,0	
	Hypertermofily	<i>Bacteria</i>	6,5–7,5	80,0–85,0	-
		<i>Archaea</i>	5,5–7,0	80,0–106,0	
Koncentrácia NaCl	Halofily	<i>Bacteria</i>	6,5–8,0	31,0–50,0	>0,3 M NaCl
		<i>Archaea</i>	6,5–9,5	30,0–45,0	
Aktivita vody	Osmofily	<i>Eukarya</i>	3,5–5,5	28,0–35,0	Vysoké koncentrácie organického rozpúšťadla a cukrov
		<i>Bacteria</i>	5,0–7,0	25,0–30,0	
	Xerofily	<i>Eucarya</i>	5,5–6,8	20,0–41,0	$a_w < 0,86$
Tlak	Piezofily	<i>Bacteria</i>	6,5–8,0	10,0–98,0	> 50 Mpa
Radiácia	Radiorezistentné	<i>Bacteria</i>	6,4–9,5	25,0–55,0	> 1 kGy
	MO	<i>Archaea</i>	6,0–7,5	75,0–88,0	

Tabuľka bola zhotovená v MS Excel

1.2.1. Halofilné mikroorganizmy

Do kategórie halofilov patria mikroorganizmy tolerujúce vyše 8,8% salinitu. Pokiaľ prežívajú vo vyššej koncentrácii NaCl ako 14,6 %, charakterizujú sa ako extremohalofily. K prostrediu sa adaptujú najčastejšie dvoma stratégiami zabezpečujúcimi vyšší alebo rovnaký intracelulárny osmotický tlak, v porovnaní s prostredím. Prvou, využívanou archeónmi, je akumulácia K^+ iónov v cytoplazme. Druhá, ktorú uprednostňujú baktérie, spočíva v akumulácii organických biokompatibilných rozpustných látok napr. ektoín, betaín, glycín betaín a iné. [5; 19]. Niektoré z týchto látok majú vysokú hodnotu pre priemysel, napr. ektoín slúži ako osmoprotektant v kozmetike. Dôležitú rolu v priemysle hrajú aj hydrolytické enzýmy vylučované halofilami, napr. amylázy, celulózy, proteázy a xylanázy a ďalšie látky ako karotenoidy, povrchovo aktívne látky, bakteriorhodospin a iné. Využívanie halofilov k produkcii PHA má mnoho výhod. Vďaka vysokej salinite prostredia, sa znižuje riziko

kontaminácie mezofilnými mikróbmami. Pri extrakcii biopolyméru možno bunky jednoducho lyzovať vo vode z dôvodu vyššieho osmotického tlaku na vnútornej strane membrány. Taktiež sú schopné využívať rôzne lacné substráty. Nevýhodou je hrdzavenie bioreaktorov vo vysokých koncentráciách NaCl [19].

Spomedzi domény *Archaea* je najvýznamnejším producentom PHA *Haloferax mediterranei*. Disponuje rýchlym rastom, metabolickou všestrannosťou, genetickou stabilitou a efektívnymi výťažkami. Výnimočnosťou je aj akumulácia priemyselne žiadaného poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerátu) (PHBV) bez prekursorov, čím sa výrazne znižujú jeho finančné nároky k produkcii. V doméne *Bacteria* je pre produkciu PHA najčastejšie využívaný rod *Halomonas*, ktorý je charakteristický pre scl-PHA [19]. Zástupcami tohto rodu sú napr. *H. halophila* a *H. organivorans*. *H. halophila* je Gram-negatívna, striktno aeróbná baktéria, u ktorej bola preukázaná tvorba PHA z rôznych čistých aj komplexných zdrojov uhlíka. Výťažky PHA prevyšujúce 80 % sušiny boli dosiahnuté pri kultivácii na galaktóze ($80,7 \pm 2,0$), glukóze ($81,5 \pm 10,6$) a na celobióze ($90,8 \pm 1,1$). Molárna hmotnosť PHA pritom stúpa so zväčšujúcou sa koncentráciou NaCl v prostredí [20]. Podobne aj *H. organivorans* sa preukázal ako efektívny producent, s najvyšším výťažkom pri použití galaktózy ako substrát ($5,61 \pm 0,01$ g/L) [21].

1.2.2. Termofilné mikroorganizmy

Na základe optimálnej teploty prostredia možno rozdeliť MO na psychrofily (-20 – 10 °C) mezofily (25 – 45 °C), termofily (45 – 80 °C) a hypertermofily (80 – 150 °C) [5]. Termofily, podobne ako halofily, sú z priemyselného hľadiska dôležité najmä pre produkciu enzýmov ako napr. lipázy, xylanázy, nitrilázy, transaminázy a iné. V porovnaní s enzýmami pochádzajúcich z mezofilov, sa termoenzýmy vyznačujú dobrou toleranciou voči vyšším teplotám, tlaku a rozpúšťadlám denaturujúcich bielkoviny [22]. Fermentácia prebieha pri vyšších teplotách, čo zabraňuje kontaminácii mezofilnými mikróbmami. Počas kultivácie je dodávanie tepla podporované dvoma faktormi. Metabolickými procesmi ktoré uvoľňujú teplo a miešaním, pri ktorom vzniká energia. Fermentácia vyžaduje mierne zahrievanie a takmer žiadne chladenie, čím sa znižuje jej finančná náročnosť. Tento proces sa nákladmi s použitím mezofilných baktérií pohybuje v rozmedzí 4,33–5,39 €, v prípade termofilných 3,36–4,42 €. PHA pritom primárne slúžia ako zdroj energie [15]. 3-hydroxybutyrát (3HB) vznikajúci degradáciou PHB rôznymi baktériami a *Archaea*, môže slúžiť ako chemický chaperon. Ten napomáha k ochrane proteínov, enzýmov a iných biomolekúl pred

denaturáciou spôsobenou vyššími teplotami, ťažkými kovmi alebo oxidáciou [23; 24]. Taktiež môže slúžiť ako vysokoúčinný kryoprotektant [24].

U viacerých termofilov bola potvrdená schopnosť akumulácie PHA, napr. *Caldimonas taiwanensis*, *Thermus thermophilus*, *Chelatococcus daeguensis* [15], alebo *Schlegelella thermodepolymerans*, ktorej potenciál produkovať PHB bol už podrobne študovaný a potvrdený v iných prácach [18; 25]. Mnohostrannosť tejto baktérie spočíva v konverzii rôznych zdrojov uhlíka, pričom najvyššie výťažky PHB ($6,27 \pm 0,04$ g/L) boli dosiahnuté pri teplote 55°C kultiváciou na xylóze. Nezvyčajnosťou je práve preferencia xylózy pred glukózou. Toto zistenie je dôležité najmä z biotechnologického hľadiska. Xylóza predstavuje hlavnú zložku hemicelulózy a tým je druhým najčastejším sa vyskytujúcim cukrom v prírode. Pri dodaní vhodných prekursorov, je *S. thermodepolymerans* schopná inkorporovať monoméry 3-hydroxyvalerátu (3HV) do štruktúry PHB za tvorby kopolymérov [25].

1.3. Valorizácia potravinárskeho odpadu

Potravinársky odpad, predstavuje veľký problém v mnohých aspektoch, najmä v environmentálnom a v ekonomickom. Podľa organizácie spojených národov pre výživu a poľnohospodárstvo, sa každoročne znehodnotí až 1,3 miliárd ton potravy vhodnej na konzumáciu, v prepočte to predstavuje približne 443 miliárd eur. To spôsobuje rôzne environmentálne záťaž: strata vody, zbytočné využitie úrodnej pôdy, spotreba hnojív a energií [6]. Potravinársky odpad je navyše zodpovedný za vznik 7 % globálnych skleníkových plynov, rovnajúcich sa ročnej produkcii 3,3 miliárd ton oxidu uhličitého. Toto zahŕňa poľnohospodársky a priemyselný proces výroby, logistiku a skladovanie [26]. Zbavovanie sa potravinárskeho odpadu so sebou prináša mnoho komplikácií. Nedostatočná biologická stabilita a výskyt patogénov podporuje mikrobiálnu aktivitu, vysoká koncentrácia vody zvyšuje logistické náklady a materiál s vysokým obsahom tukov rýchlejšie podlieha kazeniu. Najčastejšie sa potravinársky odpad odstraňuje spaľovaním alebo kompostovaním, tiež môže slúžiť ako krmivo pre zvieratá, hnojivo alebo putuje na skládku [7]. Tieto spôsoby však len eliminujú odpad a neprispievajú k cirkulárnej ekonomike [6]. Za cieľom udržateľnosti a ochrany životného prostredia sa ako vhodná stratégia považuje valorizácia potravinárskeho odpadu - „využívanie potravinárskeho odpadu k zisku hodnotných látok a/alebo k vývoju nových produktov s trhovou hodnotou“ [7]. Nakoľko sa táto práca sústreďuje na spracovanie mláta, nasledovné kapitoly sú venované predovšetkým valorizácii rastlinného odpadu.

1.3.1. Valorizácia pre produkciu biopalív

Najčastejším palivom produkovaným z potravinárskeho odpadu je bioplyn. Obsahuje vysoké množstvo metánu (55-65 %), oxidu uhličitého (30-45 %) a menšie množstvá sirovodíka, amoniaku a kyslíka. Konverzia z potravinárskeho odpadu prebieha pomocou anaeróbných mikroorganizmov procesom anaeróbnej digescie a tvoria ju štyri hlavné fázy. Prvou je hydrolýza, počas ktorej sa organické polyméry štiepia na monoméry. Tie sa ďalej procesom acidogenézy štiepia na prchavé mastné kyseliny a plyny, predovšetkým na oxid uhličitý, vodík a amoniak. Následne v priebehu acetogenézy, redukciou oxidu uhličitého a prchavých mastných kyselín vzniká kyselina octová. V poslednej fáze zvanej metanogenéza, reakciou kyseliny octovej, vodíka a oxidu uhličitého vzniká metán. Známym substituentom petrochemických palív je bioetanol, ktorý vzniká fermentáciou cukrov [27]. Produktom fermentácie je 60% etanol. Súčasne sa ako substrát používa kukurica alebo cukrová trstina, to však predstavuje konkurenciu pre potravinový reťazec a zvyšuje náklady výroby. Z týchto dôvodov by potravinársky odpad slúžil ako výhodný substrát [28]. Ďalším zeleným palivom je biodiesel, ktorý je generovaný transesterifikáciou mastných kyselín a alkoholov v prítomnosti alkalických alebo acidických katalyzátorov [27]. V súčasnej dobe je však jeho produkcia finančne náročná, použitím rias, odpadných olejov a živočíšnych tukov by sa tieto náklady znížili [28; 27]. Fotolýza vody riasami, anaeróbna fermentácia sacharidov a fotolýza organickej hmoty sú procesy využívané pri produkcii biovodíka. Konvenčne sa pre túto metódu využíva potravinársky obsah s vysokým obsahom vody a vysokým pomerom uhlíka a dusíka [28].

1.3.2. Valorizácia pre produkciu bioaktívnych látok a enzýmov

Bioaktívne látky môžu interagovať s proteínmi, DNA a inými biologickými molekulami za tvorby dôležitých látok v ľudskom tele. Práve potravinársky odpad ponúka širokú škálu týchto látok s rôznou štruktúrnou a funkčnou diverzitou. Patria sem fenolické látky, terpény, mastné kyseliny, vláknina a iné. Sú pridávané do kozmetiky alebo sa používajú ako aditíva do potravín a výživové doplnky [6]. Najviac preskúmané sú fenolické zlúčeniny, ktoré sú mnohostranne významné pre ľudský organizmus a prirodzene sa vyskytujú vo všetkých rastlinách ako sekundárne metabolity [29; 6]. Najvýznamnejšie skupiny tvoria fenolické kyseliny, flavonoidy a taníny. Disponujú antioxidačnými a protizápalovými účinkami a chránia telo proti kardiovaskulárnym a karcinogénnym ochoreniam. Ich extrakcia bola

dosiahnutá za použitia rôznych plodín, napr. hrozno, olivy, jablká, zemiaky, cibule, citrusy a rôzne iné.

Terpenoidy tvoria ďalšiu významnú skupinu biologicky aktívnych látok. Taktiež sa nachádzajú ako sekundárne metabolity v rastlinách. Najdôležitejšiu skupinu tvoria karotenoidy, ktoré predstavujú pigmenty zodpovedné za žlté, oranžové a červené sfarbenie ovocia a zeleniny. Bola u nich dokázaná schopnosť prevencie voči karcinogénnym ochoreniam a svalovej degenerácie, antioxidačná schopnosť a tvoria prekurzor vitamínu A [6]. Ich extrakcia je možná z rôznych druhov rastlín, ale aj za použitia mikroorganizmov a organického odpadu, napr. melasy, otrúb alebo srvátky [6; 27]. Plesňou *Blakeslea trispora* v prítomnosti fritovacieho oleja, kukuričného výluhu a butylhydroxytoluénu možno získať karotény. Produkcie červeného pigmentu za použitia hroznového extraktu ako substrátu, je schopná *Monascus purpureus* a žltý pigment možno získať baktériou *Chryseobacterium artocarpi* za prítomnosti odpadového ananásu [27].

Pektín je ďalšia významná látka využívaná v potravinárstve, v medicíne a vo farmaceutike. Konvenčne slúži ako gélové činidlo, zahusťovadlo a stabilizátor ovocných štiav. Ako vhodný zdroj pektínu slúžia jablčné výlisky, citrusové kôry alebo zvyšky cukrovej repy [27].

Enzýmy sú dôležitou súčasťou rôznych priemyselných odvetví, ich produkcia zo surových zdrojov je však finančne náročná. Lacnejšia alternatíva spočíva v mikrobiálnej produkcii enzýmov pri použití potravinárskeho odpadu ako substrátu. Týmto spôsobom bola dokázaná produkcia širokej škály enzýmov, napr. amylázy z mangových jadier hubovým komplexom *Fusarium solani*, proteázy zo zemiakových šupiek baktériou *Bacillus subtilis*, alebo lipázy z kávových usadenín plesňou *Phoma glomerata*. [30; 6].

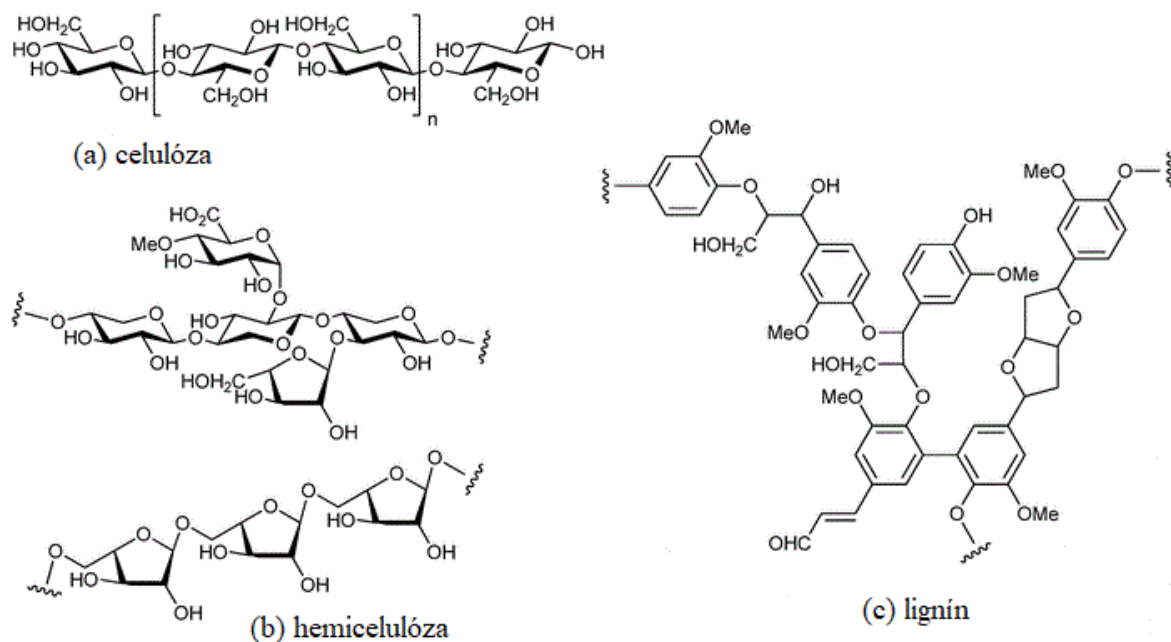
1.3.3. Valorizácia pre produkciu biopolymérov

Okrem PHA, je ďalším rozšíreným bioplastom polymér kyseliny mliečnej (PLA). Kyselina mliečna môže tvoriť dva stereoizoméry, ktoré určujú fyzikálne vlastnosti konečného polyméru [31]. Polyméry s prevládajúcim množstvom L-formy sú semi-kryštalické, naopak D-forma tvorí polyméry s amorfným charakterom. PLA sa komerčne vyrába dvomi spôsobmi, pričom primárny spočíva v otvaraní laktidového cyklu a následnou polymerizáciou. Menej využívaný spôsob je polykondenzácia kyseliny mliečnej. Vďaka vlastnostiam podobným petrochemickým plastom, sa PLA využíva pri ich náhrade v medicínskych, v textilných a v obalových odvetviach s ročnou produkciou približne 600 000 ton [31; 6]. Najvyužívanejšou metódou výroby kyseliny mliečnej, je fermentácia jednoduchých cukrov

baktériami z rodu *Lactobacillus*. Ako substrát možno použiť aj potravinársky odpad, napr. vylisovaná cukrová trstina, zemiakové šupky, pšeničné otruby a slama, melasa a iné [6].

1.4. Lignocelulózny materiál

Lignocelulóza je najzastúpenejším surovým materiálom na Zemi s ročnou produkciou približne 180,5 miliárd ton [32]. Jej štruktúru tvorí najmä celulóza (35–50 %), hemicelulóza (20–35 %) a lignín (5–25 %), ktoré sú zobrazené na obr. 3. V menších množstvách sú zastúpené aj iné látky, ako napr. pektín alebo proteíny. Celulóza je polysacharid tvorený monomérmi D-glukózy spojenými β -1,4-glykozidickými väzbami. Reťazec hemicelulózy okrem D-glukózy tvoria aj iné monosacharidy, napr. xylóza, arabinóza, manóza a galaktóza. Lignín je hydrofóbny polymér tvorený aromatickými podjednotkami a na polysacharidy je naviazaný kovalentnými, vodíkovými, iónovými a hydrofóbnymi interakciami. Procesom hydrolýzy lignocelulózy, možno získať monosacharidy a tie ďalej využiť na produkciu iných látok, napr. biopalivá (etanol, butanol, metanol), organické kyseliny (kyselina fumarová, kyselina octová), polyoly (glycerol, xylitol), bioplyn, PHA a ďalšie. Termochemickými a biologickými procesmi je možné konvertovať aj lignín na rôzne hodnotné látky, napr. lipidy, kyselina adipová, bioplyn, syntézny plyn a polyméry (PLA, polyester, polyamid, PHA a iné) [33].



Obr. 3: Chemická štruktúra (a) celulózy, (b) hemicelulózy a (c) lignínu [34]. Upravené v skicári.

1.4.1. PHA z lignocelulózneho odpadu

Využitie lignocelulózneho odpadu ako substrátu pre produkciu PHA je prospešné z mnohých hľadísk. Je ľahko a celoročne dostupný a nesúperí s potravinovým reťazcom ľudí. Dôležité kroky pri jeho spracovaní sú predúprava a následná hydrolýza, za účelom separácie lignínu a polysacharidov a ich premeny na redukujúce cukry [35; 33]. Do predúpravy patria metódy fyzikálne (drvenie, mletie, tepelná úprava), chemické (úprava kyselinami, zásadami, organickými rozpúšťadlami), biologické (použitie mikrobiálnych enzýmov) a ich kombinácie. Hydrolýza najčastejšie predstavuje použitie kyselín a enzýmov [33]. Vysoké výťažky PHA boli dosiahnuté z rôznych lignocelulóznych materiálov, napr. z hydrolyzátu slnečníc (*Ralstonia eutropha*; 0,73 g PHA/g biomasy), z kávovej usadeniny (*Burkholderia cepacia*; 0,55 g PHA/g biomasy), z hydrolyzovaných smrekových pilín (*Burkholderia cepacia*; 0,75 g PHA/g biomasy) alebo z hydrolyzátu dreva (*Paraburkholderia sacchari*; 0,58 g PHA/g biomasy) [35]. Dôležitý limitujúci faktor je však lignín, ktorý inhibuje dostupnosť polysacharidov a aktivitu enzýmov. Bola však dokázaná aj konverzia lignínu na PHA napr. druhom *Pseudomonas*. Tieto mikroorganizmy sú schopné degradácie lignínu na oligoméry, ktoré sú ďalej premieňané katabolickými dráhami na acetyl-CoA a ten je ďalej syntézou mastných kyselín konvertovaný na PHA [33].

1.4.2. PHA z mláta

Mláto predstavuje odpad produkovaný v pivovarníctve, pričom môže tvoriť až 85% odpadu [8]. Primárne sa využíva ako krmivo pre poľnohospodárke zvieratá, najmä pre hovädzí dobytok, vo forme múky sa pridáva aj do pečiva určeného primárne pre ľudí trpiacimi tráviacimi ťažkosťami. Tento materiál bol uplatnený aj pri produkcii bioplynu, uhoľných tehál, papiera alebo ako adsorbent pre rôzne látky [36]. Štruktúru mláta tvoria najmä celulóza a hemicelulóza, v menších množstvách aj lignín, lipidy, proteíny, makro- a mikroživiny podporujúce rast mikroorganizmov. Práve vysokým obsahom celulózy a nízkym množstvom lignínu predstavuje potenciálny materiál pre biotechnologické aplikácie. Konečné zloženie mláta však závisí od spôsobu spracovania. Napriek tomu sú biotechnologické možnosti mláta takmer neprebádané a k jeho využitiu ako substrát pre produkciu PHA boli vykonané len dve štúdie [9; 8]. K sprístupneniu polysacharidov je nutné podrobiť materiál hydrolýze, ktorá často komplikuje proces fermentácie kvôli uvoľňovaniu nežiaducich látok. Štúdiou zameriavajúcou sa na rôzne spôsoby predúpravy, bolo zistené, že hydrolýza mláta s predúpravou za použitia kyselín, najlepšie sprístupňuje redukujúce cukry,

avšak uvoľňuje aj najvyšší obsah bakteriálnych inhibítorov. Pokiaľ mláto obsahuje menšie množstvo lignínu, vysoké hodnoty cukrov je možné dosiahnuť aj bez drastickej predúpravy, za použitia enzýmov. Práve týmto spôsobom bol dosiahnutý najvyšší výťažok PHA, kultiváciou s *Burkholderia cepacia* ($0,31 \pm 0,02$ g PHB/g biomasy), práve vďaka malému množstvu uvoľnených fenolických látok [8]. Druhá práca sa zameriavala na využitie rôznych húb k produkcii lignocelulóznych enzýmov z mláta a následnú výrobu PHA z hydrolyzáto, kultiváciou s *B. cepacia* a *Cupriavidus necator*. Hydrolýzu tvorila predúprava s objemovým činidlom na zvýšenie pórovitosti zmesi, sterilizácia a pridanie húb alebo komerčného enzýmu. Výsledky ukázali, že lepším producentom je *C. necator* bez ohľadu na použitú hubu alebo enzým. Maximálny výťažok bol však dosiahnutý pri hydrolýze komerčným enzýmom. Pre *C. necator* $0,25 \pm 0,03$ g PHB/g biomasy a pre *B. cepacia* $0,21 \pm 0,03$ g PHB/g biomasy [9].

2 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

2.1. Použité mikroorganizmy, chemikálie a prístroje

2.1.1. Použité mikroorganizmy

V praktickej časti bakalárskej práce sa pracovalo s 2 kmeňmi baktérií z Českej zbierky mikroorganizmov Masarykovej univerzity v Brne (CCM – Czech Collection of Microorganisms), s 3 kmeňmi baktérií z nemeckej zbierky Leibnitz Institut v Braunschweig (DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) a s jedným kmeňom pochádzajúcim z Ghent Univerzity v Belgicku (BCCM/LMG).

- *Schlegelella thermodopolymerans* DSM 15264
- *Schlegelella thermodopolymernas* DSM 15344^T
- *Tepidimonas taiwanensis* LMG 32826
- *Halomonas orgrnivorans* CCM 7142^T
- *Halomonas halophila* CCM 3662
- *Burkholderia sacchari* DSM 17165

2.1.2. Použité chemikálie

- 3,5–dinitrosalicylová kyselina (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Acetonitril (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Bromid sodný (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Citrát železito-amonný (Fluka, Švajčiarsko)
- Citronan sodný (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- D-glukóza monohydrát, p.a. (LachNer, Česká republika)
- Dihydrát chloridu vápenatého (LachNer, Česká republika)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (LachNer, Česká republika)
- Dihydrogenfosforečnan sodný (LachNer, Česká republika)
- Dodekahydát hydrogenfosforečnanu sodného (LachNer, Česká republika)
- Folin-Ciocalteau činidlo
- Hydrogenuhličitan sodný (LachNer, Česká republika)
- Hydroxid sodný (LachNer, Česká republika)
- Chlorid amonný (LachNer, Česká republika)

- Chlorid draselný (LachNer, Česká republika)
- Chlorid horečnatý hexahydrát (LachNer, Česká republika)
- Chlorid sodný, p.a. (LachNer, Česká republika)
- Chloroform (LachNer, Česká republika)
- Isopropylalkohol (LachNer, Česká republika)
- Karboxymetylcelulóza (HiMedia, India)
- Kazeín (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Kvasničný extrakt (HiMedia, India)
- Kyselina benzoová (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Kyselina citrónová (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Kyselina sírová (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Metanol (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Nutrient Broth w/1 % peptone (HiMedia, India)
- Peptone, Himedia (HiMedia, India)
- Pyrohroznan sodný (Penta, České republika)
- Síran amonný (LachNer, Česká republika)
- Síran horečnatý heptahydrát (LachNer, Česká republika)
- Škrob rozpustný (Penta, České republika)
- Uhličitan sodný (LachNer, Česká republika)
- Xylan (VWR Chemicals, Spojené štáty americké)

2.1.3. Použité přístroje

- Analytické váhy PA224C Pioneer
- Váha Kern EW 620–3NM
- Laminární box Aura mini. BioAir, Euroclone
- Temperovaná trepačka IKA KS 4000 i
- Temperovaná trepačka ZWYR-D2401, LABWIT
- Temperovaná trepačka UNIMAX 1010, Heidolph
- Magnetická miešačka, Kartell, TKO
- Vodná vanička WSL
- Vortex, Suspendor Bench mixer, Benchmark
- Plynový chromatograf s FID, Thermo Scientific, Trace 1300; Kolona: DB-WAX 30 m

by 0,25 mm

- Kvapalinový chromatograf SHIMADZU, kolona Waters Carbohydrate Analysis, 3,9x200 mm, refraktometrický detektor
- Blokový termostat Stuart SBH 200D, Bibby Scientific
- Centrifúga EBA 20, Hettich
- Nanofotometer, PEARL
- bežné laboratórne sklo a vybavenie

2.2. Príprava hydrolyzátu z mláta

Pri neutrálnej predúprave bolo mláto najprv pomleté a zaliate vodou tak, aby jeho koncentrácia tvorila 100 g/l. Pri kyslej predúprave bol namiesto vody použitý 1% roztok H_2SO_4 . Takto pripravené suspenzie boli následne vložené do autoklávu pri 130 °C na dobu 40 minút. Pri alkalicknej predúprave slúžil ako kvapalná zložka, 0,5% roztok NaOH. Suspenzia bola následne sterilizovaná v autokláve pri 110 °C na dobu 60 minút. Po vychladení, bolo pH zmesi upravené na hodnotu približne 5, kvôli optimalizácii podmienok pre správnu aktivitu enzýmového koktailu od firmy ASA. Zmesi boli následne vložené do vyhrievanej trepačky (50 °C, 160 rpm) po dobu 24 hodín. Následne bol hydrolyzáť oddelený od pevnej zložky centrifugáciou pri 10000 rpm po dobu 10 minút. Kvôli dosiahnutiu vyššej čistoty a zníženia rizika kontaminácie, bol získaný hydrolyzáť prefiltrovaný pod zníženým tlakom. Takto získané extrakty z mláta boli pripravené na použitie ako kvapalná zložka minerálnych médií. Pri hydrolýze vyšších objemov bol tento postup opakovaný v bioreaktore.

2.3. Príprava hydrolyzátu s extrakciou fenolických látok a bielkovín

Z mláta a 70 % obj. roztoku etanolu bola pripravená zmes s koncentráciou mláta 100 g/l. Táto suspenzia bolo podrobená ultrazvuku na dobu 20 minút. Následne bol pevný podiel oddelený od extraktu s fenolickými látkami centrifugáciou (10000 rpm, 10 minút) a sušený pri 50 °C do konštantnej hmotnosti. Po vysušení bol k mlátu priliaty 1mol/l roztok NaOH tak, aby konečná koncentrácia mláta v zmesi znova činila 100 g/l. Táto zmes bola miešaná mechanickým miešadlom pri teplote 40 °C a rýchlosti 500 rpm po dobu 90 minút. Po tomto procese bol pevný podiel oddelený od extraktu obsahujúceho bielkoviny centrifugáciou (10000 rpm, 10 minút) a sušený pri 50 °C do konštantnej hmotnosti. Takto spracované mláto, z ktorého boli extrahované fenolické látky a bielkoviny, bolo pripravené pre ďalšie úpravy a hydrolýzu. Z prvej polovice výtlačku bola prichystaná zmes mláta a 0,5 % obj. roztoku

NaOH v 500ml Erlenmeyerových bankách, ktoré boli následne sterilizované v autokláve pri 110 °C po dobu 60 minút. S druhou polovicou výťažku sa postupovalo obdobne, namiesto alkalického roztoku bolo mláto zaliate vodou a bolo podrobené sterilizácii v autokláve pri 140 °C po dobu 60 minút. Tieto zmesi boli odstredené (10000 rpm, 10 minút) a prefiltrované pod zníženým tlakom. Takto získané extrakty z mláta boli pripravené na použitie ako kvapalná zložka minerálnych médií. Nakoľko bol tento hydrolyzát pripravený podľa gréckeho protokolu, nesie označenie GR.

2.4. Kultivácie mikroorganizmov

Baktérie boli uchovávané v kryoskúmavkách v 10% glycerole pri – 80 °C. Všetky inokulačné médiá boli po príprave vysterilizované a mikroorganizmy boli zaočkované v sterilnom prostredí v laminárnom očkovačom boxe. Kultivácia mikroorganizmov prebiehala po dobu 24 hodín, u termofiloch pri 50 °C a 160 rpm, u halofiloch a *B. sacchari* pri 30 °C a 160 rpm. Následná produkcia prebiehala pri rovnakých podmienkach ako kultivácia, ale po dobu 72 hodín.

2.4.1. Kultivačné médiá

Inokulačné médiá boli pripravené v 100ml Erlenmeyerových bankách po objeme 50 ml. Kultivácia trvala 24 hodín a zloženie média (Tabuľka 3, 4, 5, 6) záviselo od použitého mikroorganizmu (Tabuľka 2).

Tabuľka 2: Použité mikroorganizmy s príslušnými inokulačnými médiami

Mikroorganizmus	Inokulum
<i>S. thermodepolymerans</i> DSM 15264	K1
<i>S. thermodepolymernas</i> DSM 15344 ^T	K2
<i>T. taiwanensis</i> LMG 32826	K3 (B82)
<i>H. orgnivorans</i> CCM 7142 ^T	NB
<i>H. halophila</i> CCM 3662	NB
<i>B. sacchari</i> DSM 17165	NB

Tabuľka 3: Inokulačné médium K1

Látka	Koncentrácia [g/l]
Kvasničný extrakt	2
Pepton	2
Kazeín	0,5
Glukóza	10
Rozpustný škrob	0,5
Pyrohroznan sodný	0,3
KH ₂ PO ₄	0,3
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,05

Tabuľka 4: Inokulačné médium K2

Látka	Koncentrácia [g/l]
Pepton	15
Kvasničný extrakt	3
NaCl	66
Glukóza	1

Tabuľka 5: Inokulačné médium K3 (B82)

Látka	Koncentrácia [g/l]
Kvasničný extrakt	10
Pepton	5
Glukóza	1
NaCl	81
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	9,6
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	7
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,36
KCl	2
NaHCO ₃	0,06
NaBr	0,026

Tabuľka 6: Inokulačné médium NB

Látka	Koncentrácia [g/l]
Peptón	10
Hovädzí extrakt	10
NaCl	5

2.4.2. Minerálne médiá

Po 24 h inokulácii, nasledovala kultivácia v minerálnom médiu. Kultivácia prebiehala v 250ml Erlenmayerových bankách s objemom média 100 ml, pričom hydrolyzáty, slúžili ako kvapalná zložka médií a zdroj sacharidov. Použitie a zloženie jednotlivých minerálnych médií je uvedené nižšie (Tabuľka 7, 8, 9, 10). Po sterilizácii boli média očkované v pomere 1:10, až na *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344, kde sa na základe predchádzajúcich optimalizácií zvolil pomer 1:20. Zároveň bol do médií pridaný roztok stopových prvkov označený ako MES, TES a TES II (Tabuľka 11, Tabuľka 12, Tabuľka 13).

Tabuľka 7: Použité minerálne médiá pre jednotlivé mikroorganizmy

Mikroorganizmus	Minerálne médium
<i>S. thermodepolymerans</i> DSM 15264	M1
<i>S. thermodepolymernas</i> DSM 15344 ^T	M2
<i>T. taiwanensis</i> LMG 32826	M2
<i>H. orgnivorans</i> CCM 7142 ^T	M3
<i>H. halophila</i> CCM 3662	M3
<i>B. sacchari</i> DSM 17165	M3

Tabuľka 8: Minerálne médium M2

Látka	Koncentrácia [g/l]
(NH ₄) ₂ SO ₄	3
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	11,1
KH ₂ PO ₄	1,05
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2
MES*	1 ml/l

* pridané po sterilizácii

Tabuľka 9: Minerálne médium M3

Látka	Koncentrácia [g/l]
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$	9
KH_2PO_4	1,5
NH_4Cl	1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,2
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,02
$\text{NH}_4\text{Fe}^{\text{III}}\text{citrát}$	0,0012
Kvasničný extrakt	0,5
TES II*	1 ml/l

* pridané po sterilizácii

Tabuľka 10: Minerálne médium M1

Látka	Koncentrácia [g/l]
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$	9,02
KH_2PO_4	1,5
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,1
$\text{NH}_4\text{Fe}^{\text{III}}\text{citrát}$	0,06
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,2
TES*	1 ml/l

* pridané po sterilizácii

Tabuľka 11: Roztok stopových prvkov MES

Látka	Koncentrácia [g/l]
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	9,7
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	7,8
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$	0,156
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,119
$\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,118
CrCl_2	0,062
0,1 M HCl	1000 ml

Tabuľka 12: Roztok stopových prvkov TES

Látka	Koncentrácia [g/l]
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,1
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	0,03
H ₃ BO ₃	0,3
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,2
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,02
NiCl ₂ · 6 H ₂ O	0,02
NaMoO ₄ · 2 H ₂ O	0,03

Tabuľka 13: Roztok stopových prvkov TES II

Látka	Koncentrácia [g/l]
EDTA	50
FeCl ₃	8,3
ZnCl ₂	0,84
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	0,13
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,1
MnCl ₂ · 6 H ₂ O	0,016
H ₃ BO ₃	0,1

2.5. Použité metódy

2.5.1. Analytický rozbor mláta

3.4.4.1 Príprava materiálu

Pre rozbor bolo použité španielske mláto z piva ležiakového typu s označením Pilsen L 21049. Mláto bolo upravené vo vode, v alkalickom a v kyslom prostredí obdobne ako v odseku 3.2. Nedošlo však k hydrolýze použitím enzýmov a pre každú predúpravu bolo navážených 10 g usušeného mláta. So vzorkami sa ďalej pracovalo podľa protokolu od Michaela Ioelovicha [38].

3.4.4.2 Stanovenie lignínu nerozpustného v kyseline

Zo získaných vzoriek jednotlivo upraveného mláta bolo odobraných 0,3 g do 100 ml Erlenmeyerovej banky. Do banky bolo pridaných 5 ml 75 hm.% H_2SO_4 a nasledovala inkubácia pri 25 °C po dobu 2 hodiny vo vodnej lázni. Po skončení inkubácie bol obsah jednotlivých baniek prevedený do baniek s guľatým dnom, do ktorých bolo pridaných 45 ml vody. Banky boli umiestnené do topného hniezda a ich obsah bol podrobený varu po dobu 2 hodiny za použitia refluxu. Po vychladení na laboratórnu teplotu, bola zmes prenesená do 50ml centrifugačných skúmaviek a odstredená pri 10000 rpm po dobu 15 minút. Sediment lignínu bol ďalej premytý s teplou vodou (približne 50 °C), s 5 hm.% NaHCO_3 a vodou s laboratórnou teplotou až po dosiahnutie neutrálneho pH. Lignín bol ďalej sušený pri teplote 70 °C až do konštantnej hmotnosti.

3.4.4.3 Stanovenie holocelulózy

Z jednotlivo upraveného mláta bolo odobratých 0,5 g do 100ml Erlenmeyerovej banky, do ktorej bol pridaný roztok obsahujúci 40 ml vody, 0,5 g NaClO_2 a 1 ml bezvodej kyseliny octovej. Erlenmeyerove banky boli inkubované vo vodnej lázni pri 90 °C po dobu 45 minút za občasného miešania. Po uplynutí 45 minút, bolo do banky pridaných ďalších 0,5 g NaClO_2 a 1 ml octanového pufru. Inkubácia bola vykonávaná ďalších 45 minút. Po ochladení na laboratórnu teplotu, bola táto zmes prevedená do 50ml centrifugačných skúmaviek. Vzorky boli odstredené pri 10000 rpm po dobu 15 minút a vzniknutý sediment bol premytý teplou vodou (približne 50 °C) a vodou laboratórnej teploty až po dosiahnutie neutrálneho pH. Získaná holocelulóza bola sušená pri 70 °C až do konštantnej hmotnosti a ďalej bola použitá k stanoveniu celulózy.

3.4.4.4 Stanovenie celulózy

Jednotlivé vzorky holocelulózy boli zvážené a prevedené do baniek s guľatým dnom, do ktorých bol pridaný 2 hm.% roztok HCl . Banky boli následne vložené do topného hniezda a inkubované pri teplote varu po dobu 2 hodiny, použitím refluxu. Po vychladení na laboratórnu teplotu bola zmes prevedená do 50ml centrifugačných skúmaviek, podrobená odstredovaniu pri 10000 rpm po dobu 15 minút. Získaná celulóza bola premytá s teplou vodou (približne 50 °C), s 1 hm.% NaHCO_3 a vodou s laboratórnou teplotou až po dosiahnutie neutrálneho pH. Celulóza bola ďalej sušená pri teplote 70 °C až do konštantnej hmotnosti.

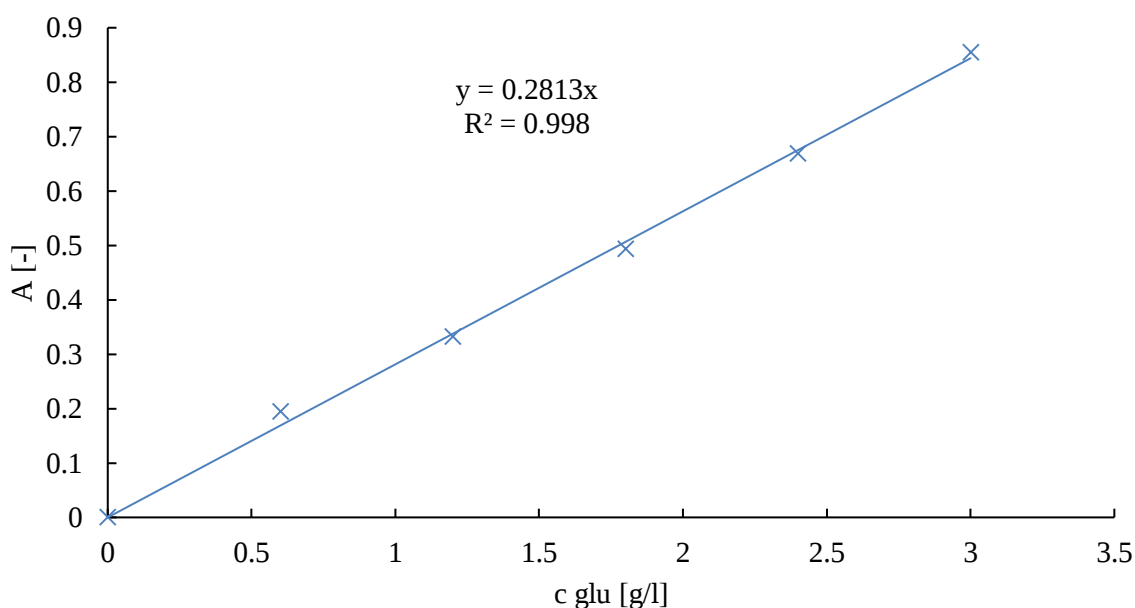
2.5.2. Stanovenie redukujúcich cukrov v hydrolyzátoch pomocou DNS

3.4.1.1 Príprava DNS činidla

K príprave 200 ml činidla, je potrebné najprv previesť 2 g kyseliny 3,5-dinitrosalicylicovej do 100 ml vody. Do roztoku sa pridá 40 ml 2 mol/l NaOH a 60 g vínanu sodno-draselného. Tento roztok sa doplní vodou na celkový objem 200 ml.

3.4.1.2 Príprava kalibračnej krivky

K zostrojeniu kalibračnej krivky (obr. 3) bol použitý zásobný roztok glukózy s koncentráciou 3 g/l. Riedením s vodou, boli pripravené roztoky s koncentráciou 0,6; 1,2; 1,8; 2,4 a 3,0 g/l. Jednotlivé roztoky boli napipetované do skúmaviek po 0,5 ml a k nim bolo pridaných 0,5 ml DNS činidla. Skúmavky boli temperované vo vodnej lázni pri teplote 70 °C po dobu 10 minút. Po skončení temperácie boli za tmy ochladené na laboratórnu teplotu, doplnené vodou na objem 10 ml a premiešané na vortexe. Následne bola zmeraná absorbančia roztokov pri 540 nm.



Obr. 3: Kalibračná krivka pre stanovenie cukrov pomocou DNS

3.4.1.3 Príprava vzoriek

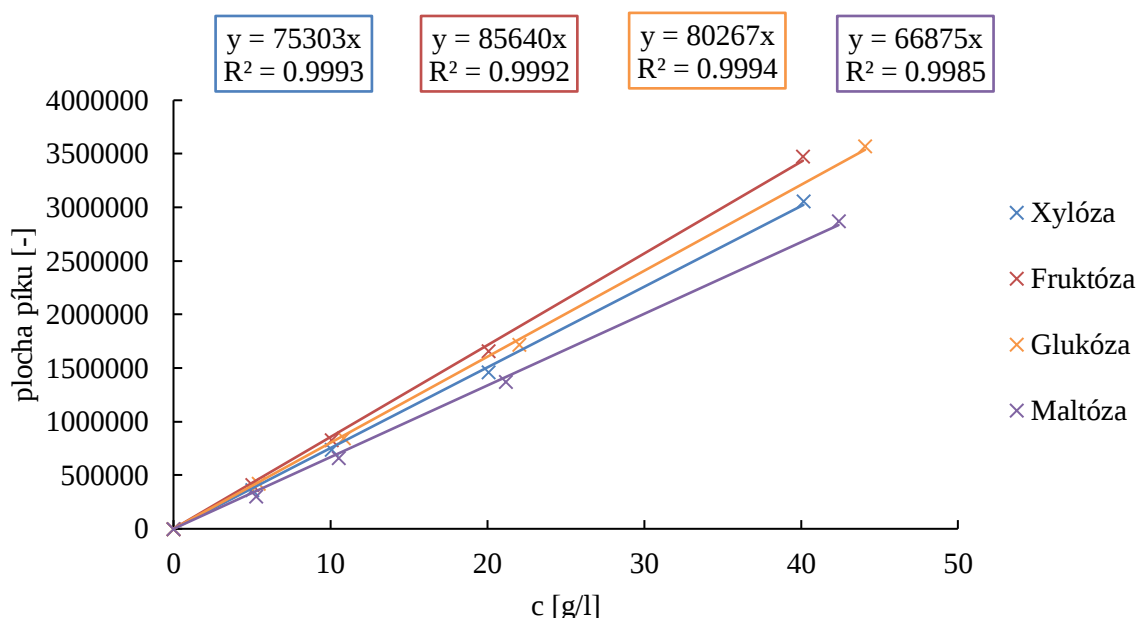
Pri meraní obsahu redukujúcich cukrov vo vzorkách, sa postupovalo rovnako ako pri príprave kalibračnej krivky. Namiesto roztokov glukózy však boli použité vzorky

hydrolyzátov, supernatantov po kultivácii a voda, ktorá slúžila ako blank. Meranie obsahu redukujúcich cukrov pred a po kultivácii slúžilo k získaniu prehľadu o spotrebovanom množstve cukrov.

2.5.3. Stanovenie obsahu cukrov pomocou HPLC

3.4.2.1 Príprava kalibračných kriviek

Boli pripravené kalibračné roztoky xylózy, fruktózy, glukózy a maltózy s koncentráciou 5; 10; 20 a 40 g/L. Tieto roztoky boli zanalyzované pomocou HPLC, kde mobilnú fázu tvorila zmes acetonitrilu a vody v pomere 80:20. Na základe koncentrácií jednotlivých cukrov a plochy píkov boli zostrojené kalibračné krivky uvedené na obr. 4.



Obr. 4: Kalibračné krivky vybraných cukrov

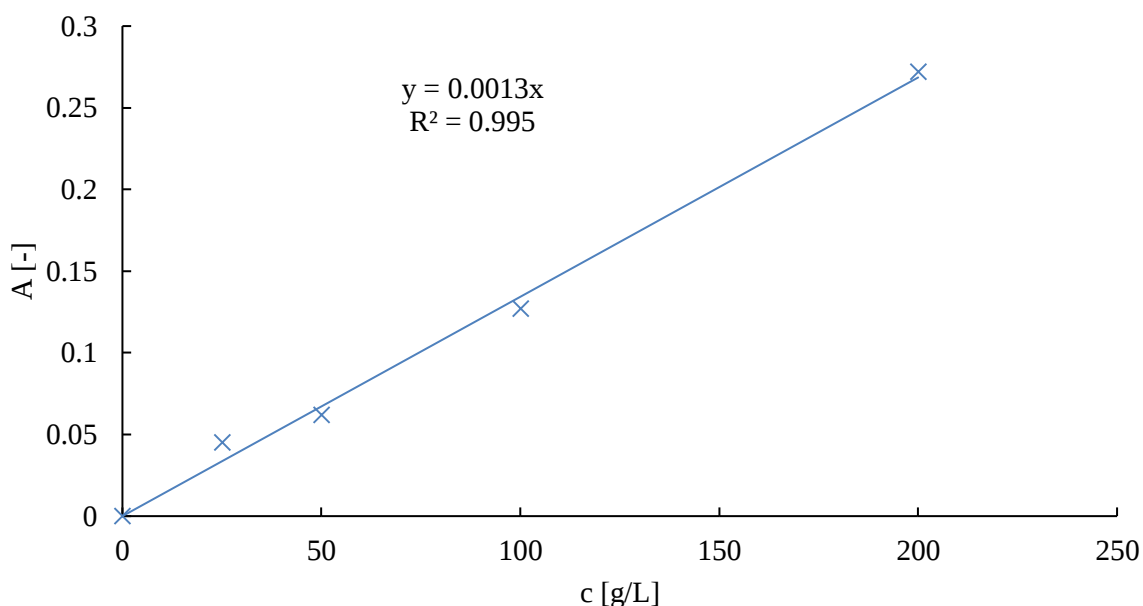
3.4.2.2 Príprava vzoriek

Kvapalinovou chromatografiou boli analyzované hydrolyzáty s alkalickou a neutrálnou predúpravou. Tieto vzorky boli najprv zneutralizované na pH 7, prefiltrované injekčnou striekačkou a filtrom a následne zanalyzované pomocou HPLC.

2.5.4. Spektrofotometrické stanovenie fenolických látok

3.4.3.1 Príprava kalibračnej krivky

K príprave kalibračnej krivky pre fenolické látky (obr. 5) bol použitý roztok kyseliny gallovej s koncentráciou 1 g/l, z ktorého boli pripravené roztoky s koncentráciou 25; 50; 100 a 200 mg/l. Do skúmavky bol napipetovaný 1 ml 10krát zriedeného Folin-Ciocalteuvho činidla a 50 μ l roztoku o známej koncentrácii. Ako blank bola namiesto roztoku použitá voda. Skúmavky boli premiešané a inkubované pri laboratórnej teplote po dobu 5 minút. Následne bol do skúmaviek pridaný 1 ml nasýteného roztoku Na_2CO_3 , skúmavky boli znovu premiešané a inkubované pri laboratórnej teplote po dobu 15 minút. Po inkubácii bola zmeraná absorbancia jednotlivých roztokov pri 750 nm.



Obr. 5: Kalibračná krivka pre stanovenie fenolických látok

3.4.3.2 Príprava vzoriek

Na zmeranie obsahu fenolických látok v hydrolyzátoch bolo potrebné vzorky 5násobne zriediť s vodou. Ďalej sa postupovalo obdobne ako pri kalibračných roztokoch.

2.5.5. Stanovenie množstva biomasy

Stanovenie biomasy bolo vykonané gravimetricky. Po skončení kultivácie bolo 10 ml produkčného média prevedených do centrifugačných skúmaviek. Vzorky boli odstredené pri 6000 rpm po dobu 5 minút. Supernatant bol odliaty pre stanovenie redukujúcich cukrov, biomasa bola premytá s 5 ml vody a vzorky boli znova podrobené centrifugácii pri 6000 rpm po dobu 5 minút. Po odstredení bola prebytočná kvapalina odliata a biomasa bola sušená pri 70 °C do konštantnej hmotnosti.

2.5.6. Analýza PHA pomocou plynovej chromatografie

Vysušená biomasa bola navážená do krimpovacích vialiek v hmotnostnom rozmedzí 8-11 mg. Do vialiek bol pridaný 1 ml chloroformu, a 0,8 ml transesterifikačnej zmesi, ktorá obsahovala 15 % H_2SO_4 v metanole s vnútorným štandardom kyselinou benzoovou s koncentráciou 5 mg/ml. Vialky boli uzavreté a umiestnené do termobloku, ktorý bol vyhriaty na 94 °C po dobu 3 hodiny. Po skončení esterifikácie boli vialky ochladené na laboratórnu teplotu a ich obsah prevedený do väčších vialiek, do ktorých bolo pridaných 0,5 ml 0,05 mol/l NaOH. Vialky boli pretrepané a nechali sa ustáliť fázy. Do šróbovacích vialiek bolo napipetovaných 0,9 ml izopropylalkoholu a 50 μ l zo spodnej organickej fázy, kde bolo extrahované PHA. Vzorky boli uzavreté a analyzované plynovým chromatografom s FID detekciou.

2.5.7. Stanovenie optimálnej teploty a pH pre enzýmový kokteil

V experimentálnej časti bakalárskej práce sa pracovalo s enzýmovým kokteílom od firmy ASA. Jeho zloženie a optimálne rozmedzie teplôt a pH však neboli zverejnené. Za cieľom dosiahnutia najvyššej aktivity enzýmov, bolo potrebné tieto údaje stanoviť. Pri hľadaní optimálnej teploty sa pracovalo v teplotnom rozmedzí 30 – 70 °C po kroku 10 °C. Do 100ml Erlenmayerových baniek bolo navážených 5 g rozmletého mláta, ktoré bolo zaliate s 50 ml vody. pH zmesi sa upravilo na približnú hodnotu 5 a následne boli k suspenzii pridané enzýmy v objeme 50 μ l. Banky sa uzavreli a vložili do sušiarne s príslušnou teplotou. Po uplynutí 1 hodiny boli odobrané vzorky, po uplynutí ďalších 4 hodín bola hydrolýza ukončená. Pre pH sa zvolilo rozmedzie 3,5 – 6,0 s krokom 0,5 pH. Navážka 3,5 g rozmletého mláta v 100ml Erlenmayerovej banke bola zaliate s príslušným citrátovým pufrum s objemom 35 ml. Uzavreté banky boli vložené do sušiarne s teplotou 50 °C a po uplynutí 1 hodiny boli zo zmesi odobrané vzorky. Po uplynutí ďalších 4 hodín sa hydrolýza ukončila. Odobrané

vzorky boli scentrifugované pri 6000 rpm po dobu 5 minút. Získaný hydrolyzát bol optimalizovaný na pH 7 a sfiltrovaný. Takto pripravené vzorky boli analyzované pomocou HPLC. Na základe uvoľnených množstiev cukrov bola stanovená relatívna účinnosť enzýmov.

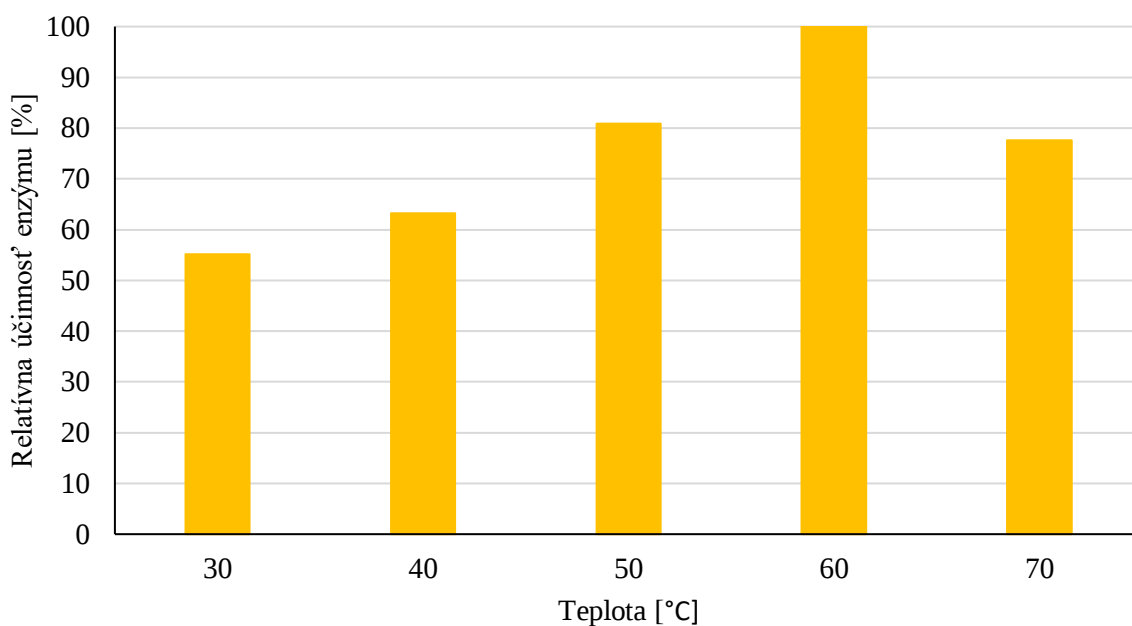
3 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Cieľom experimentálnej časti bakalárskej práce bolo zistiť, či mláto pochádzajúce z piva ležiakového typu, môže byť využité k produkcii PHA, akým spôsobom je nutné tento materiál upraviť k dosiahnutiu najvyššieho výťažku PHA a stanoviť teplotné a pH optimum koktailového enzýmu od firmy ASA, použitého pri hydrolýze mláta. Mláto, s ktorým sa pracovalo bolo charakterizované, čím sa stanovil obsah hemicelulózy, celulózy a lignínu na základe použitej predúpravy.

3.1. Stanovenie teplotného a pH optima enzýmov

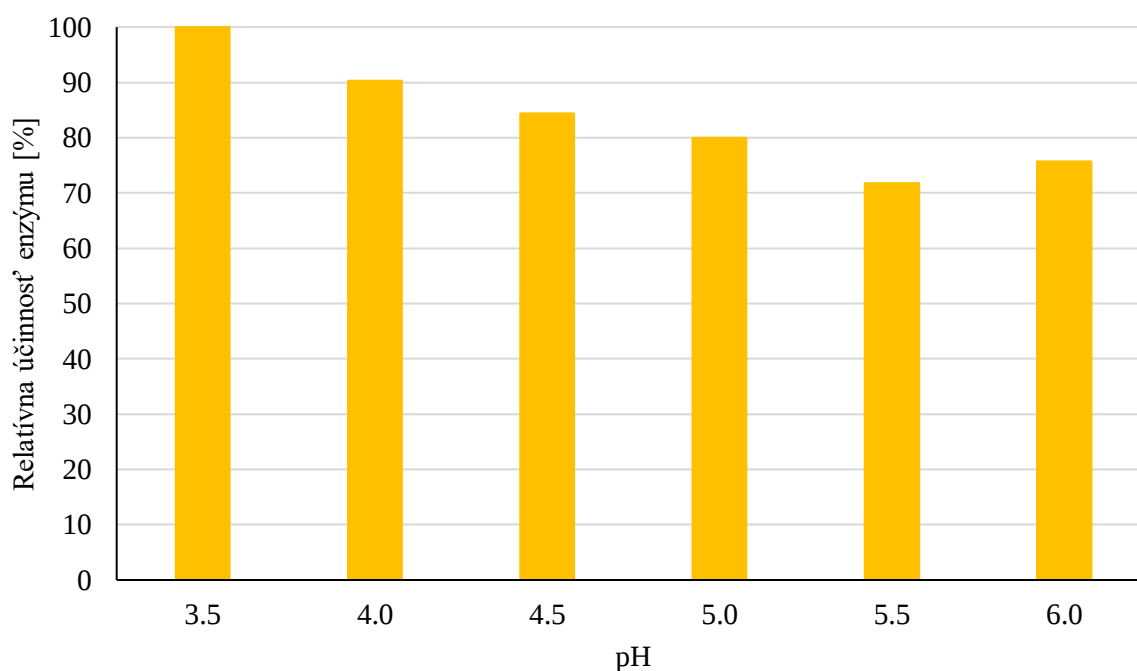
Počas hydrolýzy mláta boli dvakrát odobrané vzorky a to po uplynutí 1 hodiny a 5 hodín. Odbery boli vykonané z dôvodu spozorovania rozdielu a rýchlosti v schopnosti enzýmov rozkladať polysacharidy. V práci sú však vyhodnotené výsledky len po dobe 5 hodín, nakoľko v skúmanom teplotnom rozmedzí, bola pozorovaná zreteľnejšia tendencia hodnôt. V prípade pH rozmedzia, boli získané hodnoty z odberov veľmi podobné. V rámci jednotnosti k výsledkom teplotného rozmedzia, sú aj tieto dáta vyhodnotené po uplynutí 5 hodín.

Z obr. 6 možno vidieť, že najvyššiu aktivitu dosiahli enzýmy pri teplote 60 °C, kde dokázali rozštiepiť maximálne množstvo polysacharidov za uvoľnenia cukrov. Najmenej účinné boli enzýmy pri teplotách 30 a 40 °C, kde relatívna účinnosť nepresiahla 65 %. Počas hydrolýz, kde sa získaný hydrolyzát využil pri kultiváciách ako uhlíkový zdroj, bola použitá teplota 50 °C aj napriek tomu, že pri tejto teplote nebola dosiahnutá najvyššia účinnosť enzýmu. Bola zvolená z dôvodu praktického využitia vo väčších objemoch, nakoľko je potrebné menej energie k dosiahnutiu dostatočnej relatívnej účinnosti enzýmu (80,82 %). Pri teplote 70 °C enzýmy pravdepodobne začali podliehať denaturácii, nakoľko ich relatívna účinnosť poklesla na 77,59 %.



Obr. 6: Relatívna účinnosť enzýmu v závislosti od teploty

V prostredí s rozmedzím pH 3,5 – 6,0 možno z Obr. 7 vyčítať, že pre enzýmový kokteíl je optimálnejšie kyslé prostredie s $\text{pH} \leq 5$, nakoľko pri ňom dosiahol najvyššiu relatívnu účinnosť. Maximálna relatívna účinnosť bola dosiahnutá pri pH 3,5. So stúpajúcim pH v prostredí postupne klesala účinnosť, avšak tieto rozdiely boli pomerne malé. Preto možno povedať, že enzýmy vykazujú aktivitu v širokom rozmedzí pH, optimum je však v rozmedzí 3,5 – 4,0 pH.



Obr. 7: Relatívna účinnosť enzýmu v závislosti od pH

Zloženie enzýmového kokteilu nebolo zverejnené a tým nebolo známe, aký substrát sú schopné tieto enzýmy štiepiť. Jeho použitím k hydrolýze bolo možné vo vysokých koncentráciách získať cukry z lignocelulózneho materiálu (tabuľka 15) a analýza s HPLC ukázala, že uvoľnené cukry boli najmä arabinoxylany a glukóza (tabuľka 16). Tým možno povedať, že v použitom enzýmovom koktaili sa nachádzali xylanázy uvoľňujúce arabinoxylany z hemicelulózy a celulózy odštiepujúce molekuly glukózy z celulózy.

3.2. Charakterizácia mláta

Cieľom charakterizácie mláta bolo stanovenie obsahu polysacharidov a lignínu nerozpustného v kyselinách na základe prípravy vzorky. Dosiahnuté stanovenia sú uvedené v tabuľke 14. Počas kyslej úpravy mláta bolo z hemicelulózy odštiepených najviac cukrov. Nakoľko sa stanovoval lignín nerozpustný v kyselinách, jeho obsah pri kyslej úprave dosiahol najvyššiu hodnotu, až 66,89 hm. %. Pri tejto vzorke bol stanovený aj najvyšší obsah celulózy, až 34,38 hm. %. Pri alkalicky pripravenej vzorke sa odštiepilo najviac cukrov z celulózy, ktorá tvorila konečné množstvo 4,73 hm. %. Časť lignínu sa touto metódou rozpustila a jeho obsah bol stanovený na 30,52 hm. %. Podobná hodnota lignínu bola dosiahnutá aj pri neutrálnej úprave a to hm. 32,89 %. Holocelulóza sa dokázala najmenej rozštiepiť počas neutrálnom spracovaní mláta, v ktorom činila jej koncentrácia 64,16 hm. %. Nepresnosti v meraniach boli spôsobené najmä tým, že obsahy lignínu a holocelulózy boli stanovované z dvoch rôznych vzoriek. Napriek tomu, že pochádzali z rovnakého mláta, táto látka nie je homogénna. Navyše boli k analýze použité malé navážky. Z týchto dôvodov mohli pri rozbere mláta ako jednotného materiálu vzniknúť nepresnosti.

Zloženie mláta sa však na základe spracovania môže líšiť a preto sú jeho zložky uvádzané v literatúre v širšom rozmedzí. Obsah lignínu sa môže pohybovať v rozmedzí 7,0 – 27,8 %. Pre polysacharidy je toto rozmedzie menšie. Hemicelulóza najčastejšie obsahuje 28,4 až 35 % mláta. Celulóza je uvádzaná v rozmedzí 16,8 – 25,4 % [39]. Získané dáta sa blížila hodnotám uvádzaným v literatúre, avšak obsah lignínu je vyšší.

Tabuľka 14: Charakterizácia mláta

Príprava vzorky	Lignín [%]	Holocelulóza [%]	Hemicelulóza [%]	Celulóza [%]
Kyslá	66,89	58,15	23,77	34,38
Alkalická	30,52	44,97	40,24	4,73
Neutrálne	32,89	64,16	48,32	15,84

3.3. Charakterizácia hydrolyzátov mláta

3.3.1. Stanovenie redukujúcich cukrov pomocou DNS

Obsah redukujúcich cukrov v hydrolyzátach mláta bol spektrofotometricky stanovený pomocou DNS. Najvyššiu koncentráciu dosiahol hydrolyzát mláta, ktoré bolo upravené plazmou a to $398,06 \pm 11,54$ g/l. Vzorka je však koncentrát, ktorý bol dodaný v spolupráci s gréckymi vedcami z Poľnohospodárskej univerzity v Aténach (Agricultural University of Athens). Vysoký obsah cukrov bol dosiahnutý aj kyslou predúpravou a to $51,10 \pm 4,12$ g/l. Alkalickou a neutrálnou predúpravou boli uvoľnené veľmi podobné výťažky cukrov v koncentráciách $23,16 \pm 3,09$ g/l a $24,32 \pm 2,72$ g/l jednotlivo. Alkalický hydrolyzát však aj po filtrácii obsahoval veľa nečistôt, ktoré spôsobovali zákal. Najnižšia koncentrácia redukujúcich cukrov bola dosiahnutá pri mláte, z ktorého boli extrahované bielkoviny a fenolické látky (v Tabuľke 15 označené ako GR). Toto mláto bolo ďalej upravené alkalickou a neutrálnou metódou, ktorou sa uvoľnilo $16,93 \pm 0,48$ a $15,53 \pm 0,28$ g/l cukrov jednotlivo. Zistené hodnoty sú uvedené v tabuľke 15.

Tabuľka 15: Obsah redukujúcich cukrov pomocou DNS

Predúprava	Obsah redukujúcich cukrov [g/l]
Kyslá	$51,10 \pm 4,12$
Alkalická	$23,16 \pm 3,09$
Neutrálna	$24,32 \pm 2,72$
GR - alkalická	$16,93 \pm 0,48$
GR - neutrálna	$15,53 \pm 0,28$
Plazmou (koncentrát)	$398,06 \pm 11,54$

3.3.2. Analýza cukrov pomocou HPLC

Kvalitatívna a kvantitatívna analýza cukrov v hydrolyzátach bola prevedená s HPLC. Jednotlivé vzorky obsahovali najmä arabinoxylany a glukózu, hydrolyzát z mláta s neutrálnou predúpravou obsahoval aj maltózu v koncentrácii $5,75 \pm 0,01$ g/l (viď tabuľku 16). Najviac arabinoxylanov aj glukózy sa uvoľnilo pri kyslej predúprave v koncentráciách $20,51 \pm 0,07$ g/l a $30,76 \pm 1,15$ g/l jednotlivo. Alkalická aj neutrálna hydrolyza uvoľňujú najmä glukózu ($24,40 \pm 0,24$ g/l a $14,24 \pm 0,06$ g/l) a veľmi podobné množstvá arabinoxylanov ($2,60 \pm 0,01$ g/l a $2,27 \pm 0,01$ g/l), no v porovnaní s kyslou predúpravou sú koncentrácie arabinoxylanov

veľmi nízke. Hydrolyzáty z ktorých boli extrahované bielkoviny a fenolické látky, neboli analyzované pomocou HPLC z dôvodu neúspešných kultivácií a nízkych koncentrácií cukrov stanovených pomocou DNS.

Tabuľka 16: Analýza cukrov v hydrolyzátoch pomocou HPLC

Predúprava	Sacharid [g/l]			
	Arabinoxylany	Glukóza	Maltóza	Celkový obsah cukrov
Kyslá	20,51 ± 0,07	30,76 ± 1,15	n.	51,27 ± 1,08
Alkalická	2,60 ± 0,01	24,40 ± 0,24	n.	27,00 ± 0,23
Neutrálna	2,27 ± 0,01	14,24 ± 0,06	5,75 ± 0,01	22,27 ± 0,06

n. = nedetekované

Počas analýzy cukrov v hydrolyzáte s mlátom upraveným plazmou, bolo medzi píkmi pre arabinoxylany a glukózu, možné pozorovať dva neznáme píky, ktoré však nezodpovedali žiadnym zo štandardných cukrov, ktoré boli testované (fruktóza, manóza, galaktóza) a tak boli ich koncentrácie orientačne stanovené pomocou kalibračnej krivky glukózy. V porovnaní so spektrofotometrickým stanovením redukujúcich sacharidov, boli získané obdobné hodnoty. Z tohto možno usúdiť, že ide o látky s charakterom redukujúcich cukrov, a i vzhľadom k výsledkom kultivácií, je pravdepodobné, že tieto zatiaľ neidentifikované látky sú využiteľné pre baktérie. Jednoznačne najvyššiu koncentráciu z cukrov obsiahnutých v danom hydrolyzáte vykazuje glukóza a to $362,67 \pm 1,29$ g/l.

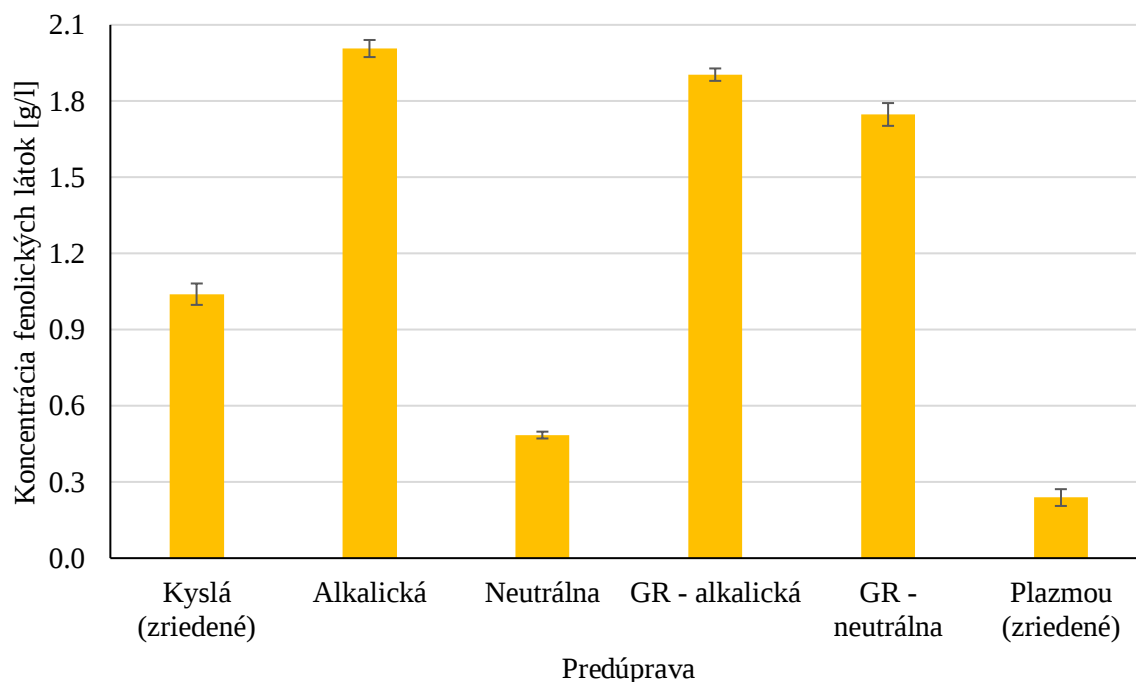
Tabuľka 17: Analýza cukrov v hydrolyzáte s mlátom upraveným plazmou

Sacharid [g/l]					
Arabinoxylany	Neznámy sacharid č. 1	Neznámy sacharid č. 2	Glukóza	Celkový obsah cukrov	
5,57 ± 0,05	10,91 ± 1,08	65,89 ± 0,61	362,67 ± 1,29	445,03 ± 3,03	

Získané hodnoty pri oboch metódach boli veľmi podobné. V porovnaní so spektrofotometrickou metódou je analýza s HPLC presnejšia a je ňou možné určiť aj zastúpenie jednotlivých cukrov, nie len ich celkovú koncentráciu. Je to však časovo náročnejšia metóda a pri potrebe rýchleho zistenia celkovej koncentrácie redukujúcich cukrov je spektrofotometrické meranie pomocou DNS dostatočne vhodná metóda.

3.3.3. Stanovenie celkových fenolických látok v hydrolyzátoch

Obsah fenolických látok v jednotlivých hydrolyzátoch bol stanovený spektrofotometricky. Hodnoty sú prepočítané na koncentráciu cukrov použitú na kultiváciu pri jednotlivých hydrolyzátoch. To znamená, že hydrolyzáty s kyslou a plazmovou úpravou mláta, boli pri kultivácii zriedené na približnú koncentráciu cukrov 20 g/l a tomuto riedeniu je prispôsobený aj obsah fenolických látok. Najvyššia hodnota bola dosiahnutá pri alkalicknej predúprave a to $2,01 \pm 0,03$ g/l. Tento hydrolyzáat bol však zakalený aj po filtrácii, čo mohlo skresliť spektrofotometrické meranie. Veľmi vysoké hodnoty fenolických látok boli stanovené aj pri hydrolyzátoch pripravených z mláta, ktorého predúprava mala extrahovať bielkoviny a fenolické látky. Na základe výsledkov v obr. 8 možno označiť tento postup ako neúčinný. Pomerne vysoké hodnoty boli dosiahnuté aj pri kyslej predúprave s koncentráciou $1,04 \pm 0,04$ g/l. Nízke množstvo fenolických látok bolo uvoľnené pri plazmovej ($0,24 \pm 0,03$ g/l) a neutrálnej ($0,48 \pm 0,01$ g/l) predúprave. Získané hodnoty možno vysvetliť tým, že pri použití drastickej predúpravy, kyselinou alebo zásadou, sa z lignínu odštiepuje väčšie množstvo fenolických látok. Táto skutočnosť bola potvrdená aj vedcami z katalánskej Univerzity vo Vic. Pri kyslej aj alkalicknej predúprave boli získané vysoké koncentrácie inhibičných látok. Pri kyslej predúprave sa uvoľňoval primárne furfural, pri alkalicknej fenoly [8].



Obr. 8: Stanovenie fenolických látok uvoľnených pri jednotlivých predúpravách mláta

3.4. Vyhodnotenie schopnosti produkcie PHA

Získané hydrolyzáty boli použité ako uhlíkový zdroj pri kultivácii vybraných mikrorganizmov. Pri hydrolyzátoch s kyslou predúpravou a s extrakciou bielkovín a fenolických látok, však boli dosiahnuté veľmi malé výťažky biomasy a PHA (≤ 5 hm. % PHA z biomasy). Hydrolyzáty obsahovali vysoké množstvá fenolických látok, inhibujúce rast mikroorganizmov a extrakcia fenolov sa ukázala ako neúčinná a pracná, čím je ťažšie aplikovateľná do praxe. Mikroorganizmom pravdepodobne nevyhovovala vyššia iónová sila spôsobená použitím drastických metód úpravy spojená s výraznou zmenou pH. Z týchto dôvodov sú v práci vyhodnotené len kultivácie s hydrolyzátmi s alkalickou, neutrálnou a plazmovou predúpravou. Koncentrácia PHA bola stanovená pomocou GC a zvyškové cukry v supernatantoch boli stanovené spektrofotometricky pomocou DNS. Na základe týchto dát boli vypočítané výťažnostné koeficienty.

3.4.1. Kultivácia s hydrolyzátom alkalicky upraveného mláta

Pri kultivácii použitím hydrolyzátu mláta s alkalickou predúpravou boli dosiahnuté najmenšie výťažky spomedzi vyhodnotených kultivácií. Zobrazené sú v tabuľke 18. Najvyššie množstvo biomasy a PHA bola schopná vyprodukovať *H. halophila* v koncentrácii $8,02 \pm 0,10$ g/l a $1,20 \pm 0,32$ g/l PHA jednotlivo. *B. sacchari* akumulovala PHA v koncentrácii $0,74 \pm 0,25$ g/l. Zvyšné mikroorganizmy neboli schopné vyššej produkcie PHA než $0,05$ g/l. Hydrolyzát obsahoval vysoké množstvo fenolických látok, ktoré inhibovali rast baktérií. Všetky vzorky biomasy boli hnedej farby, aj pri viacnásobnom premytí vodou boli vzorky pokryté hnedým kalom. Tieto nečistoty z hydrolyzátu skresľovali hmotnosť biomasy.

Tabuľka 18: Vyhodnotenie produkcie PHA použitím hydrolyzátu s alkalickou predúpravou

Mikroorganizmus	Biomasa [g/l]	PHA [hm. %]	PHA [g/l]
<i>S. thermodepolymerans</i> DSM 15264	$2,74 \pm 0,35$	$1,17 \pm 0,04$	$0,03 \pm 0,00$
<i>S. thermodepolymernas</i> DSM 15344 ^T	$2,72 \pm 0,51$	$1,44 \pm 0,32$	$0,04 \pm 0,01$
<i>T. taiwanensis</i> LMG 32826	$1,49 \pm 0,51$	$1,63 \pm 0,14$	$0,02 \pm 0,00$
<i>H. orgnivorans</i> CCM 7142 ^T	$5,13 \pm 0,21$	$0,26 \pm 0,11$	$0,01 \pm 0,01$
<i>H. halophila</i> CCM 3662	$8,02 \pm 0,10$	$14,95 \pm 4,20$	$1,20 \pm 0,32$
<i>B. sacchari</i> DSM 17165	$7,21 \pm 0,68$	$10,26 \pm 3,41$	$0,74 \pm 0,25$

3.4.2. Kultivácia s hydrolyzátom neutrálne upraveného mláta

Kultiváciou za použitia hydrolyzátu mláta s neutrálnou predúpravou bolo možné vyprodukovať pomerne vysoké množstvá PHA. Najvyššie výťažky boli dosiahnuté u halofiloch. Najvyššiu koncentráciu PHA dosiahla *H. organivorans* a to $3,16 \pm 0,18$ g/l PHA. Dobrým producentom je aj *H. halomonas*, ktorá vyprodukovala $2,49 \pm 0,16$ g/l PHA. Percentuálne je obsah PHA v biomase u halofiloch veľmi podobný (viď tabuľka 19), *H. halophila* však vyprodukovala výrazne menej biomasy. Pri kultivácii s *B. sacchari* bola priemerná koncentrácia PHA $1,90 \pm 0,31$ g/l s vysokou tvorbou biomasy, $5,40 \pm 0,75$ g/l. Nižšie výťažky boli dosiahnuté u termofiloch, najnižší u *T. taiwanensis*, len $0,15 \pm 0,03$ g/l PHA. Táto baktéria vytvorila aj najmenej biomasy, len $2,10 \pm 0,17$ g/l.

Tabuľka 19: Vyhodnotenie produkcie PHA použitím hydrolyzátu mláta s neutrálnou predúpravou.

Mikroorganizmus	Biomasa [g/l]	PHA [%]	PHA [g/l]
<i>S. thermodepolymerans</i> DSM 15264	$3,10 \pm 2,81$	$11,63 \pm 5,53$	$0,28 \pm 0,16$
<i>S. thermodepolymernas</i> DSM 15344 ^T	$4,71 \pm 0,00$	$5,73 \pm 0,00$	$0,27 \pm 0,00$
<i>T. taiwanensis</i> LMG 32826	$2,10 \pm 0,17$	$7,01 \pm 1,02$	$0,15 \pm 0,03$
<i>H. orgnivorans</i> CCM 7142 ^T	$5,69 \pm 0,44$	$55,51 \pm 1,12$	$3,16 \pm 0,18$
<i>H. halophila</i> CCM 3662	$4,48 \pm 0,22$	$55,67 \pm 0,92$	$2,49 \pm 0,16$
<i>B. sacchari</i> DSM 17165	$5,40 \pm 0,75$	$35,04 \pm 0,91$	$1,90 \pm 0,31$

3.4.3. Kultivácia s hydrolyzátom mláta upraveného plazmou

Kultiváciou za použitia hydrolyzátu mláta upraveného plazmou boli dosiahnuté najvyššie výťažky PHA (viď tabuľka 20). Najvyššie koncentrácie PHA vyprodukovali halofily a nižšie termofily, obdobne ako pri použití hydrolyzátu s neutrálne predupraveným mlátom. Najvyššia produkcia PHA bola dosiahnutá u *H. organivorans*, až $5,12 \pm 0,12$ g/l s koncentráciou biomasy $6,10 \pm 0,12$ g/l. Druhý najvyšší výťažok dosiahla *H. halophila* s produkciou PHA $3,79 \pm 0,37$ g/l. Napriek tomu, že percentuálna koncentrácia PHA v biomase dosiahla pri kultivácii s *T. taiwanensis* hodnotu $48,42 \pm 0,65$ %, je výťažok biomasy len $1,40 \pm 0,06$ g/l. Tým je koncentrácia PHA v biomase len $0,68 \pm 0,04$ g/l a konverzia substrátu na produkt nebola efektívna. Najnižšie množstvo PHA vyprodukovala *S. thermodepolymernas* DSM

15344^T s obsahom $0,40 \pm 0,02$ g/l. Tento hydrolyzát obsahoval najnižšiu koncentráciu fenolických látok, len $0,24 \pm 0,03$ g/l (obr. 8), čo tvorilo vhodné prostredie pre rast baktérií.

Tabuľka 20: Vyhodnotenie produkcie PHA použitím hydrolyzáta mláta s plazmovou predúpravou

Mikroorganizmus	Biomasa [g/l]	PHA [%]	PHA [g/l]
<i>S. thermodepolymerans</i> DSM 15264	$2,07 \pm 1,06$	$42,99 \pm 4,44$	$0,91 \pm 0,55$
<i>S. thermodepolymernas</i> DSM 15344 ^T	$1,29 \pm 0,09$	$31,51 \pm 3,87$	$0,40 \pm 0,02$
<i>T. taiwanensis</i> LMG 32826	$1,40 \pm 0,06$	$48,42 \pm 0,65$	$0,68 \pm 0,04$
<i>H. orgnivorans</i> CCM 7142 ^T	$6,10 \pm 0,12$	$84,03 \pm 3,70$	$5,12 \pm 0,12$
<i>H. halophila</i> CCM 3662	$5,22 \pm 0,15$	$72,51 \pm 5,11$	$3,79 \pm 0,37$
<i>B. sacchari</i> DSM 17165	$4,03 \pm 0,04$	$45,80 \pm 3,24$	$1,85 \pm 0,11$

3.4.4. Vyhodnotenie kultivácií

Schopnosť premeny cukrov na PHA je zobrazená v Tabuľke 21 vo forme výťažnostných koeficientov. Najhoršiu schopnosť premieňania uhlíkového substrátu na PHA prejavili mikroorganizmy pri kultivácii s hydrolyzátom alkalicky upraveného mláta. To bolo ovplyvnené najmä vysokým obsahom fenolických látok v hodnote $2,01 \pm 0,03$ g/l (obr. 8). Najvyšší výťažnostný koeficient pri danej predúprave bol stanovený u *H. halophila* a to 0,125. Táto hodnota je však skreslená výskytom nečistôt v hydrolyzáte, ktoré sa po odstredení usadili na dne skúmavky a tvorili súčasť hmotnosti biomasy. Po *H. halophila* dosiahla najvyšší výťažnostný koeficient *B. sacchari* s hodnotou 0,107. Pri kultiváciách zvyšných mikroorganizmov boli získané hodnoty veľmi nízke, až zanedbateľné.

Pri kultivácii s neutrálne upraveným mlátom boli najnižšie výťažnostné koeficienty stanovené u termofiloch *S. thermodepolymernas* DSM 15344^T a *T. taiwanensis* v hodnote 0,007. Naopak najefektívnejšia produkcia PHA bola dosiahnutá u halofiloch s výťažnostnými koeficientami 0,180 u *H. halophila* a 0,200 u *H. orgnivorans*.

Najefektívnejšia kultivácia bola pozorovaná pri použití hydrolyzáta mláta upraveného plazmou. Obdobne ako aj pri predošlých kultiváciách, plynú termofily ako horší producenti PHA. Najvyšší výťažnostný koeficient bol stanovený u *H. organivorans* a to 0,317. Vysoká hodnota bola dosiahnutá aj pri *H. halophila*, konkrétne 0,244. *B. sacchari* sa ako jediná mezofilná baktéria spomedzi vybraných mikroorganizmov, stanovenými hodnotami pohybuje

práve medzi termofilmi a halofilmi. Jej schopnosť premieňať substrát na produkt, v prípade hydrolyzáta plazmou opracovaného mláta, bola stanovená koeficientom 0,146.

Tabuľka 21: Výťažnostné koeficienty pre jednotlivé mikroorganizmy a predúpravy

Mikroorganizmus	Y _{P/S} na základe predúpravy		
	Alkalická	Neutrálna	Plazmová
<i>S. thermodepolymerans</i> DSM 15264	0,021	0,014	0,096
<i>S. thermodepolymernas</i> DSM 15344 ^T	0,011	0,007	0,051
<i>T. taiwanensis</i> LMG 32826	0,002	0,007	0,068
<i>H. orgnivorans</i> CCM 7142 ^T	0,004	0,200	0,317
<i>H. halophila</i> CCM 3662	0,125	0,180	0,244
<i>B. sacchari</i> DSM 17165	0,107	0,089	0,146

U vybraných mikroorganizmov bola už viackrát potvrdená produkcia PHA z odpadových substrátov. Napr. pri kultivácii s *S. thermodepolymerans* za použitia ryžovej slamy bolo PHA akumulované v koncentrácii $3,94 \pm 0,21$ g/l PHA [18]. Pre *T. taiwanensis* boli vhodným substrátom vínne výlisky z odrody Vetlínské červené rané, pri ktorých dokázala vyprodukovať PHA v množstve $2,09 \pm 0,08$ g/l [37]. Kultiváciou *B. sacchari* v prítomnosti bagasy bolo možné vyprodukovať $1,52 \pm 0,02$ g/l PHA s výťažnostným koeficientom 0,29. V prípade halofilov je v oblasti produkcie biopolymérov prebádanejšia *H. halomonas* u ktorej bola dosiahnutá akumulácia PHA v koncentrácii $3,98 \pm 0,10$ g/l za použitia pšeničnej slamy [18] a $3,26 \pm 0,27$ g/l PHA v prítomnosti srvátkového hydrolyzáta [20]. U *H. orgnivorans* bola doposiaľ potvrdená produkcia PHA len z čistej látky, s najvyšším výťažkom $5,80 \pm 0,22$ g/l za použitia galaktózy [21]. Na základe týchto údajov možno povedať, že pivovarské mláto slúži ako vhodný substrát pre produkciu PHA, s najvyššími výťažkami za kultivácie *H. organivorans*, pri ktorej boli dosiahnuté podobné výťažky PHA ako pri kultivácii na čistom substráte.

ZÁVER

Polyhydroxyalkoanáty (PHA) si za posledné roky získavajú veľkú pozornosť, nakoľko slúžia ako environmentálne priateľská alternatíva plastov, využívaná v mnohých odvetviach. Najväčším limitujúcim faktorom pri ich produkcii je však vysoká výrobná cena. Použitie potravinárskeho odpadu ako zdroja uhlíka pri biotechnologickej produkcii PHA, by tieto finančné nároky mohlo znížiť až o polovicu. Vhodnou alternatívou uhlíkového zdroja môže byť pivovarské mláto. Je celoročne dostupné, priamo nesúperi s potravinovým reťazcom ľudí a obsahuje vysoké množstvo celulózy, ktorú možno hydrolyzovať na skvasiteľné cukry. Pri hydrolyze mláta však dochádza k uvoľňovaniu látok, ktoré inhibujú rast baktérií. Z tohto dôvodu boli pre experimentálnu časť tejto práce vybrané termofilné a halofilné mikroorganizmy rodu *Schlegelella*, *Halomonas* a *Tepidimonas*, ktoré sú prispôsobené extrémnym podmienkam prostredia. Navyše je pri ich kultivácii znížené riziko kontaminácie mezofilnými mikroorganizmami. Okrem extremofilov bola vybraná aj jedna mezofilná baktéria rodu *Burkholderia*, pri ktorej bola dokázaná produkcia PHA z rôznych odpadových substrátov.

V celej experimentálnej časti sa pracovalo so španielskym mlátom z piva ležiakového typu, pochádzajúceho z pivovaru Cerveza Mica. Najprv bol tento materiál podrobený analytickému rozboru. Bolo zistené, že na základe použitej prípravy vzorky, obsahuje mláto rôzne percentuálne množstvá hemicelulózy, celulózy a lignínu nerozpustného v kyselinách. Kyslá úprava podnietila odštiepovanie cukrov najmä z hemicelulózy, alkalická z celulózy.

K využitiu pivovarského mláta ako substrát pre mikroorganizmy, bolo tento materiál potrebné najprv hydrolyzovať na skvasiteľné cukry. Mláto bolo podrobené 4 rôznym predúpravám: kyslej, alkalickkej, neutrálnej a predúprave s extrakciou fenolických látok a bielkovín. Cieľom týchto metód bolo dosiahnutie čo najefektívnejšieho sprístupnenia polysacharidov, ktoré boli následne rozštiepené komerčným enzýmovým kokteílom od firmy ASA. Hydrolyzáty získané jednotlivými úpravami boli charakterizované stanovením koncentrácie cukrov a fenolických látok. Najviac cukrov bolo uvoľnených v kyslom prostredí, najmenej pri extrakcii bielkovín a fenolických látok. Zastúpená bola najmä glukóza a arabinoxylany. Až na hydrolyzáty získané z neutrálne upraveného mláta, obsahovali zvyšné hydrolyzáty vysoké koncentrácie bakteriálnych inhibítorov. Z týchto metód bola vybraná alkalická a neutrálna, nakoľko pri využití zvyšných úprav, nebola po skončení kultivácie vytvorená takmer žiadna biomasa. V spolupráci s gréckymi vedcami bol dodaný aj koncentrát

hydrolyzáta mláta upraveného plazmou, ktorý obsahoval najmenej bakteriálnych inhibítorov zo všetkých hydrolyzáto.

Najvyššie výťažky PHA boli dosiahnuté pri kultivácii s plazmovo upraveným mlátom. Najefektívnejšiu produkciu PHA preukázala *H. organivorans* s koncentráciou $5,12 \pm 0,12$ g/l PHA a výťažnostným koeficientom 0,317. Pomerne vysoké množstvá biopolyméru dokázala akumulovať aj *H. halophila*, naopak u termofilov rodu *Schlegelella* boli dosiahnuté najnižšie výťažky. Pri kultivácii s neutrálne upraveným mlátom, produkovali halofily znova najvyššie koncentrácie PHA. *H. organivorans* $3,16 \pm 0,18$ g/l PHA a *H. halophila* $2,49 \pm 0,16$ g/l PHA. Najnižšie výťažky boli získané použitím alkalicky upraveného mláta, kde *H. halophila* ako jediná baktéria dokázala vyprodukovať spomenutia hodný obsah PHA v koncentrácii $1,20 \pm 0,32$ g/l. Hydrolyzát bol navyše zakalený aj po filtrácii a tieto nečistoty ostali prilnuté k biomase, čím skresľovali výťažky. Z týchto poznatkov vyplýva, že mikroorganizmy preferujú hydrolyzáty, ktoré boli pripravené šetrnejšími spôsobmi, s nízkym vplyvom iónovej sily a obsahujú nízku koncentráciu fenolických látok, ktoré limitujú ich rast.

Ďalším cieľom práce bolo aj stanovenie teplotného a pH optima používaného komerčného enzýmového kokteilu. Táto analýza bola prevedená hydrolyzou mláta vo vybraných podmienkach. Hydrolyzáty získané po dobe 1 hodiny a 5 hodín boli následne podrobené analýze cukrov pomocou HPLC, čím bola stanovená ich relatívna účinnosť. Týmto spôsobom bola stanovená optimálna teplota 60 °C a ideálne pH v rozmedzí 3,5 až 4,0.

4 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] YADAV, Bhoomika, Anita TALAN, R.D. TYAGI a Patrick DROGUI. Concomitant production of value-added products with polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis: A review. *Bioresource Technology* [online]. 2021, 337 [cit. 2021-11-13]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2021.125419
- [2] PAUL, Sayantani, Bibaswan SEN, Sangita DAS, Sk ABBAS, Surya PRADHAN, Kakali SEN a Sk ALI. Incarnation of bioplastics: recuperation of plastic pollution. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* [online]. 1-24 [cit. 2021-11-13]. ISSN 0306-7319. Dostupné z: doi:10.1080/03067319.2021.1983552
- [3] ALBUQUERQUE, Priscilla a Carolina MALAFAIA. Perspectives on the production, structural characteristics and potential applications of bioplastics derived from polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2018, **107**, 615-625 [cit. 2021-10-28]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.09.026
- [4] MUHAMMADI, , SHABINA, Muhammad AFZAL a Shafqat HAMEED. Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. *Green Chemistry Letters and Reviews* [online]. 2015, 8(3-4), 56-77 [cit. 2021-10-28]. ISSN 1751-8253. Dostupné z: doi:10.1080/17518253.2015.1109715
- [5] OBULISAMY, Parthiba a Sanjeet MEHARIYA. Polyhydroxyalkanoates from extremophiles: A review. *Bioresource Technology* [online]. 2021, 325 [cit. 2021-11-15]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2020.124653
- [6] ESPARZA, Irene, Nerea JIMÉNEZ-MORENO, Fernando BIMBELA, Carmen ANCÍN-AZPILICUETA a Luis M. GANDÍA. *Fruit and vegetable waste management: Conventional and emerging approaches*. *Journal of Environmental Management* [online]. 2020, 265 [cit. 2022-04-24]. ISSN 03014797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jenvman.2020.110510
- [7] OTLES, Semih, Stella DESPOUDI, Camelia BUCATARIU a Canan KARTAL. Food waste management, valorization, and sustainability in the food industry. *Food Waste*

- Recovery [online]. Elsevier, 2015, s. 3-23 [cit. 2022-05-04]. ISBN 9780128003510. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800351-0.00001-8
- [8] CORCHADO-LOPO, Carlos, Oscar MARTÍNEZ-AVILA, Elisabet MARTI et al. Brewer's spent *grain* as a no-cost substrate for polyhydroxyalkanoates production: Assessment of pretreatment strategies and different bacterial strains. *New Biotechnology* [online]. 2021, 62, 60-67 [cit. 2021-11-18]. ISSN 18716784. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbt.2021.01.009
- [9] LLIMÓS, Jordi, Oscar MARTÍNEZ-AVILA, Elisabet MARTI, Carlos CORCHADO-LOPO, Laia LLENAS, Teresa GEA a Sergio PONSÁ. Brewer's spent grain biotransformation to produce lignocellulolytic enzymes *and polyhydroxyalkanoates in a two-stage valorization* scheme. *Biomass Conversion and Biorefinery* [online]. [cit. 2021-11-18]. ISSN 2190-6815. Dostupné z: doi:10.1007/s13399-020-00918-4
- [10] MOŻEJKO-CIESIELSKA, Justyna a Robert KIEWISZ. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous?. *Microbiological Research* [online]. 2016, 192, 271-282 [cit. 2021-10-28]. ISSN 09445013. Dostupné z: doi:10.1016/j.micres.2016.07.010
- [11] BRIASSOULIS, Demetres, Philippos TSEROTAS a Ioanna-Georgia ATHANASOULIA. Alternative optimization routes for improving the performance of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) based plastics. *Journal of Cleaner Production* [online]. 2021, **318** [cit. 2021-10-29]. ISSN 09596526. Dostupné z: doi:10.1016/j.jclepro.2021.128555
- [12] LEE, Sang a Jong-il CHOI. Production and degradation of polyhydroxyalkanoates in waste environment. *Waste Management* [online]. 1999, 19(2), 133-139 [cit. 2021-10-31]. ISSN 0956053X. Dostupné z: doi:10.1016/S0956-053X(99)00005-7
- [13] OBULISAMY, Parthiba a Sanjeet MEHARIYA. Polyhydroxyalkanoates from extremophiles: A review. *Bioresource Technology* [online]. 2021, 325 [cit. 2021-10-31]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2020.124653
- [14] SINDHU, Raveendran, Aravind MADHAVAN, K.B. ARUN et al. Metabolic circuits and gene regulators in polyhydroxyalkanoate producing organisms: Intervention *strategies* for enhanced production. *Bioresource Technology* [online]. 2021, 327 [cit. 2022-04-08].

ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2021.124791

- [15] CHAVAN, Shraddha, Bhoomika YADAV, R.D. TYAGI a Patrick DROGUI. A review on production of polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters by thermophilic microbes using waste feedstocks. *Bioresource Technology* [online]. 2021, **341** [cit. 2021-11-16]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2021.125900
- [16] MEHRPOUYA, Mehrshad, Henri VAHABI, Massimiliano BARLETTA, Pascal LAHEURTE a Valérie LANGLOIS. Additive manufacturing of polyhydroxyalkanoates (PHAs) biopolymers: Materials, printing techniques, and applications. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2021, 127 [cit. 2021-12-15]. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2021.112216
- [17] WANG, Jianfei, Shijie LIU, Jiaqi HUANG a Zixuan QU. A review on polyhydroxyalkanoate production from agricultural waste **Biomass**: Development, Advances, circular Approach, and challenges. *Bioresource Technology* [online]. 2021, 342 [cit. 2022-04-09]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2021.126008
- [18] KOURILOVA, Xenie, Ivana NOVACKOVA, Martin KOLLER a Stanislav OBRUCA. Evaluation of mesophilic *Burkholderia sacchari*, thermophilic *Schlegelella thermodepolymerans* and halophilic *Halomonas halophila* for polyhydroxyalkanoates production on model media mimicking lignocellulose hydrolysates. *Bioresource Technology* [online]. 2021, 325 [cit. 2021-11-17]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2021.124704
- [19] MITRA, Ruchira, Tong XU, Hua XIANG a Jing HAN. Current developments on polyhydroxyalkanoates synthesis by using halophiles as a promising cell factory. *Microbial Cell Factories* [online]. 2020, 19(1) [cit. 2021-11-15]. ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/s12934-020-01342-z
- [20] KUCERA, Dan, Iva PERNICOVÁ, Adriana KOVALCIK et al. Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*. *Bioresource Technology* [online]. 2018, 256, 552-556 [cit. 2021-11-16]. ISSN **09608524**. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2018.02.062

- [21] PERNICOVA, Iva, Dan KUCERA, Ivana NOVACKOVA, Juraj VODICKA, Adriana KOVALCIK a Stanislav OBRUCA. Extremophiles - Platform Strains for Sustainable Production of Polyhydroxyalkanoates. *Materials Science Forum* [online]. 2019, 955, 74-79 [cit. 2021-11-17]. ISSN 1662-9752. Dostupné z: doi:10.4028/www.scientific.net/MSF.955.74
- [22] ATALAH, Joaquín, Paulina CÁCERES-MORENO, Giannina ESPINA a Jenny BLAMEY. Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts. *Bioresource Technology* [online]. 2019, 280, 478-488 [cit. 2021-11-16]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2019.02.008
- [23] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Filip MRAVEC, Ota SAMEK a Ivana MAROVA. Evaluation of 3-hydroxybutyrate as an enzyme-protective agent against heating and oxidative damage and its potential role *in* stress response of poly(**3-hydroxybutyrate**) accumulating cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2016, 100(3), 1365-1376 [cit. 2021-12-15]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-015-7162-4
- [24] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Martin KOLLER, Dan KUCERA a Iva PERNICOVA. Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. *Biotechnology Advances* [online]. 2018, 36(3), 856-870 [cit. 2021-12-15]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2017.12.006
- [25] KOURILOVA, Xenie, Iva PERNICOVA, Karel SEDLAR, Jana MUSILOVA, Petr SEDLACEK, Michal KALINA, Martin KOLLER a Stanislav OBRUCA. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a thermophilic *strain of* Schlegelella thermodepolymerans from xylose rich substrates. *Bioresource Technology* [online]. 2020, 315 [cit. 2021-11-17]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2020.123885
- [26] SCARANO, Pierpaolo, Rosaria SCIARRILLO, Maria TARTAGLIA, Daniela ZUZOLO a Carmine GUARINO. Circular economy and secondary raw materials from fruits as sustainable source for recovery and reuse. *A review*. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2022, 122, 157-170 [cit. 2022-04-23]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2022.02.003

- [27] CHHANDAMA, Michael Van Lal, Alongkrita Chumpi CHETIA, Kumudini Belur SATYAN, SUPONGSENLA AO, Joseph VL RUATPUIA a Samuel Lalthazuala ROKHUM. Valorisation of food waste to sustainable energy *and other* value-added products: A **review**. *Bioresource Technology Reports* [online]. 2022, 17 [cit. 2022-04-23]. ISSN 2589014X. Dostupné z: doi:10.1016/j.biteb.2022.100945
- [28] TALAN, Anita, Bhagyashree TIWARI, Bhoomika YADAV, R.D. TYAGI, J.W.C. WONG a P. DROGUI. Food waste valorization: Energy production using novel integrated *systems*. *Bioresource Technology* [online]. 2021, 322 [cit. 2022-04-24]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2020.124538
- [29] JIMENEZ-LOPEZ, C., M. FRAGA-CORRAL, M. CARPENA et al. Agriculture waste valorisation as a source of antioxidant phenolic compounds within a circular and sustainable bioeconomy. *Food & Function* [online]. 2020, **11**(6), 4853-4877 [cit. 2022-04-24]. ISSN 2042-6496. Dostupné z: doi:10.1039/D0FO00937G
- [30] PANDA, Sandeep K., Swati S. MISHRA, Eugenie KAYITESI a Ramesh C. RAY. Microbial-processing of fruit and vegetable wastes for production of vital enzymes and organic acids: *Biotechnology* and scopes. *Environmental Research* [online]. 2016, 146, 161-172 [cit. 2022-05-04]. ISSN 00139351. Dostupné z: doi:10.1016/j.envres.2015.12.035
- [31] JõGI, Katrin a Rajeev BHAT. Valorization of food processing wastes and by-products for bioplastic production. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* [online]. 2020, 18 [cit. 2022-05-05]. ISSN 23525541. Dostupné z: doi:10.1016/j.scp.2020.100326
- [32] PAUL, Subhash a Animesh DUTTA. Challenges and opportunities of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. *Resources, Conservation and Recycling* [online]. 2018, 130, 164-174 [cit. 2021-12-15]. ISSN 09213449. Dostupné z: doi:10.1016/j.resconrec.2017.12.005
- [33] ABU-THABIT, Nedal, Cristina PÉREZ-RIVERO, Onyinye UWAEZUOKE a Ndidigwu NGWULUKA. From waste to wealth: upcycling of plastic and lignocellulosic wastes to PHAs. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* [online]. [cit. 2022-04-03]. ISSN 0268-2575. Dostupné z: doi:10.1002/jctb.6966

- [34] KOBAYASHI, Hirokazu, Hidetoshi OHTA a Atsushi FUKUOKA. Conversion of lignocellulose into renewable chemicals by heterogeneous catalysis. *Catalysis Science & Technology* [online]. 2012, 2(5) [cit. 2022-05-05]. ISSN 2044-4753. **Dostupné z:** doi:10.1039/c2cy00500j
- [35] VIGNESWARI, Sevakumaran, Muhammad NOOR, Tan AMELIA, Karthnee BALAKRISHNAN, Azila ADNAN, Kesaven BHUBALAN, Al-Ashraf AMIRUL a Seeram RAMAKRISHNA. Recent Advances in the Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates from *Lignocellulosic Feedstocks*. *Life* [online]. 2021, 11(8) [cit. 2022-03-27]. ISSN 2075-1729. Dostupné z: doi:10.3390/life11080807
- [36] MUSSATTO, S.I., G. DRAGONE a I.C. ROBERTO. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science* [online]. 2006, 43(1), 1-14 [cit. 2022-03-27]. ISSN 07335210. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcs.2005.06.001
- [37] KOURILOVA, Xenie, Iva PERNICOVA, Michaela VIDLAKOVA et al. Biotechnological Conversion of Grape Pomace to Poly(3-hydroxybutyrate) by Moderately Thermophilic Bacterium *Tepidimonas taiwanensis*. *Bioengineering* [online]. 2021, 8(10) [cit. 2022-05-20]. ISSN 2306-5354. Dostupné z: doi:10.3390/bioengineering8100141
- [38] IOELOVICH, Michael. Methods for determination of chemical composition of plant biomass. *Journal SITA*, 2015, 17.4: 208-214.
- [39] ALIYU, Salihu; BALA, Muntari. Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10.3: 324-331.