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

BIOTECHNOLOGICKÁ PRODUKCE PHA Z ODPADNÍCH OTRUB
BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATES ON WHEAT BRAN

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE Pavlína Guziurová
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE prof. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
SUPERVISOR

BRNO 2022

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ

Zadání bakalářské práce

Číslo práce:	FCH-BAK1747/2021	Akademický rok: 2021/22
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Studentka:	**Pavlína Guziurová**	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin	
Studijní obor:	Biochemická technologie	
Vedoucí práce:	**prof. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**	

Název bakalářské práce:

Biotechnologická produkce PHA z odpadních otrub

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Analýza složení odpadních pšeničných otrub
3. Charakterizace vybraných komerčních enzymových koktejlů
4. Hydrolýza polysacharidů otrub 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.

Pavlína Guziurová 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

Bakalářská práce se zabývá biotechnologickou produkcí polyhydroxyalkanoátů (PHA) z odpadních pšeničných otrub. Cílem bylo zjistit, zda hydrolyzát z pšeničných otrub podrobený různým typům předúpravy lze využít jako substrát pro produkci PHA pomocí vybraných bakteriálních kmenů. Vybrané kmeny byly *Halomonas organivorans*, *Halomonas halophila* a dva kmeny *Schlegelella thermodepolymerans*. Za nejlepší producenty byly vybrány halofilní kmeny, se kterými byly následně provedeny další kultivace. Nejefektivněji byly bakteriemi využity hydrolyzáty po neutrální předúpravě, jelikož měly nejnižší obsah mikrobiálních inhibitorů (fenolických látek), a bakterie na nich produkovaly nejvíce PHA. Nejvyšší hodnota naprodukovaného PHA bylo na hydrolyzátu s neutrální předúpravou u kmene *Halomonas organivorans*, konkrétně 2,82 g/l. Hydrolyzát byl využit i pro produkci kyseliny mléčné, pro kterou byly využity bakteriální kmeny *Lactobacillus*. Nejvyšší dosažená koncentrace naprodukované kyseliny mléčné byla 16,73 g/l u kmene *Lactobacillus casei*.

KLÍČOVÁ SLOVA

Polyhydroxyalkanoáty, polyhydroxybutyrát, pšeničné otruby, halofilní mikroorganismy, *Halomonas organivorans*, *Halomonas halophila*

ABSTRACT

The bachelor thesis deals with the biotechnological production of polyhydroxyalkanoates (PHA) from lignocellulosic waste – wheat bran. The aim was to determine whether the hydrolysate from wheat bran subjected to different types of pretreatment could be used as a substrate for the production of PHA using selected bacterial strains. The selected strains were *Halomonas organivorans*, *Halomonas halophila* and two strains of *Schlegelella thermodepolymerans*. Halophilic strains were proved as the best producers and were subsequently used for cultivations. The hydrolysates after neutral pretreatment were utilized by the bacteria most efficiently, due to the lowest content of microbial inhibitors (phenolic substances) where the bacteria produced the most PHA. The highest value of produced PHA was determined on the hydrolysate after neutral pretreatment by using the strain *Halomonas organivorans*, namely 2,82 g/l. The hydrolysate was also used for the production of lactic acid bacterial strains of *Lactobacillus*. The highest achieved concentration of produced lactic acid was 16,73 g/l by the *Lactobacillus casei* strain.

KEYWORDS

Polyhydroxyalkanoates, polyhydroxybutyrate, wheat bran, halophilic microorganisms, *Halomonas organivorans*, *Halomonas halophila*

BIBLIOGRAFICKÁ CITACE

GUZIUROVÁ, Pavlína. *Biotechnologická produkce PHA z odpadních otrub.* Brno, 2022. Dostupné také z: https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/138822. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Stanislav Obruča.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité zdroje jsem správně a úplně ocitovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

Pavlína Guziurová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce prof. Ing. Stanislavu Obručovi Ph.D. za odborné rady a vedení při vypracovávání bakalářské práce. Ráda bych poděkovala i konzultantce Ing. Vendule Hrabalové za ochotu, trpělivost, pomoc v laboratoři, ale i rady a připomínky pro vypracování této práce. Velké díky patří i mé rodině a přátelům za podporu během studia.

OBSAH

1 ÚVOD 9
2 TEORETICKÁ ČÁST 10
2.1 Polyhydroxyalkanoáty 10
2.1.1 Charakteristika a struktura 10
2.1.2 Vlastnosti PHA 11
2.1.3 Biosyntéza PHA 12
2.1.4 Metabolická dráha variabilních uhlíkových zdrojů – I. 12
2.1.5 Metabolická dráha využívající β-oxidaci – II. 12
2.1.6 Metabolická dráha využívající syntézu mastných kyselin – III. 13
2.1.7 Aplikace a využití PHA v průmyslu 15
2.2 Mikroorganismy produkující PHA 15
2.2.1 Psychrofilní organismy 15
2.2.2 Mezofilní organismy 15
2.2.3 Methanotrofní organismy 16
2.2.4 Termofilní organismy 16
2.2.5 Halofilní a halotolerantní organismy 16
2.3 Lignocelulóza 17
2.3.1 Složení lignocelulózy 17
2.4 Valorizace a využití lignocelulózových materiálů 19
2.4.1 Otruby 19
2.4.2 Kávová sedlina 20
2.4.3 Mláto 20
2.4.4 Vinné matoliny 21
2.4.5 Dřevěné piliny 21
2.5 Aktuální výzkum produkce PHA 21
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 23
3.1 Chemikálie, mikroorganismy, materiál a přístroje 23
3.1.1 Chemikálie pro kultivaci mikroorganismů 23
3.1.2 Chemikálie pro stanovení materiálu 23
3.1.3 Chemikálie pro stanovení PHA 23
3.1.4 Mikroorganismy a materiál 24

3.1.5 Přístroje ... 24
3.2 Příprava hydrolyzátů z pšeničných otrub ... 24
3.3 Kultivace mikroorganismů ... 25
3.4 Metody pro charakterizaci substrátu ... 27
3.4.1 Stanovení hlavních komponent pšeničných otrub ... 27
3.4.2 Stanovení fenolických látek v hydrolyzátech ... 28
3.4.3 Stanovení sacharidů pomocí HPLC-RI v hydrolyzátech ... 28
3.4.4 DNS stanovení redukujících sacharidů hydrolyzátu ... 29
3.5 Stanovení optimálních podmínek vybraných enzymů ... 29
3.6 Metody pro charakterizaci mikrobiálních produktů ... 29
3.6.1 Stanovení koncentrace biomasy ... 29
3.6.2 Stanovení optické hustoty ... 30
3.6.3 Stanovení obsahu PHA pomocí plynové chromatografie ... 30
3.6.4 Iontová chromatografie ... 30
4 VÝSLEDKY A DISKUSE ... 31
4.1 Charakterizace pšeničných otrub ... 31
4.1.1 Charakterizace hlavních komponent pšeničných otrub ... 31
4.2 Charakterizace hydrolyzátu z pšeničných otrub ... 31
4.2.1 Stanovení obsahu fenolických látek v hydrolyzátu ... 31
4.2.2 Stanovení obsahu sacharidů v hydrolyzátech ... 32
4.3 Stanovení aktivity hydrolytického koktejlu enzymů pomocí HPLC ... 33
4.4 Produkce PHA na hydrolyzátech z pšeničných otrub ... 35
4.4.1 Vyhodnocení nárůstu biomasy mikroorganismů ... 35
4.4.2 Stanovení obsahu PHA v biomase ... 35
4.4.3 Stanovení optické hustoty (OD) ... 38
4.5 Charakterizace hydrolyzátu po kultivaci ... 40
4.6 Kultivace kmenů *Lactobacillus* ... 43
4.6.1 Charakterizace hydrolyzátu před kultivací ... 43
4.6.2 Stanovení biomasy ... 43
4.6.3 Stanovení optické hustoty ... 44
4.6.4 Charakterizace obsahu zbytkových sacharidů po kultivaci ... 44
4.6.5 Produkce kyseliny mléčné a organických kyselin ... 45
5 ZÁVĚR ... 47

6 BIBLIOGRAFIE 48
7 PŘÍLOHY 56
7.1 Příklady chromatogramů z HPLC-RI 56
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK 57

1 ÚVOD

V dnešní době, kdy je na planetě velké znečištění ropnými plasty, které se v prostředí velmi špatně či téměř vůbec nerozkládají. Proto je jednou z priorit moderní společnosti najít šetrnější alternativu k těmto syntetickým polymerům. Tou by mohla být produkce mikrobiálních biopolymerů, konkrétně polyhydroxyalkanoátů (PHA), které jsou mikroorganismy syntetizovány jako zásobní zdroj energie například při stresových podmínkách. Bakterie potřebují k syntéze PHA dostatečné množství uhlíku, které je daný mikroorganismus schopen využít pro tvorbu PHA.

Dalším důležitým celosvětovým problémem je extrémní produkce odpadu z průmyslu, zejména potravinářského a zemědělského, kdy takový odpad nemá ve většině případů další využití. Tento odpad je většinou netoxický a je možné uvažovat o jeho valorizaci. Odpady lze po předúpravě využít jako uhlíkový zdroj potřebný pro mikrobiální syntézu PHA. Nejrozšířenějším odpadem potravinářského a dřevozpracujícího průmyslu jsou lignocelulózové materiály, které díky svému složení mohou být vhodné pro další valorizační procesy, jako jsou produkce biopaliv, polyhydroxyalkanoátů, polymeru kyseliny mléčné či dalších biopolymerů.

V této práci se pojednává o biotechnologické produkci polyhydroxyalkanoátů a kyseliny mléčné z odpadní lignocelulózy, konkrétně pšeničných otrub z mlynárenského průmyslu, jako substrátu pro biosyntézu PHA pomocí termofilních a halofilních bakterií. V práci jsou zmíněny i další možné lignocelulózové materiály, které je možno valorizovat a využít k syntéze produktů s přidanou hodnotou.

2 TEORETICKÁ ČÁST

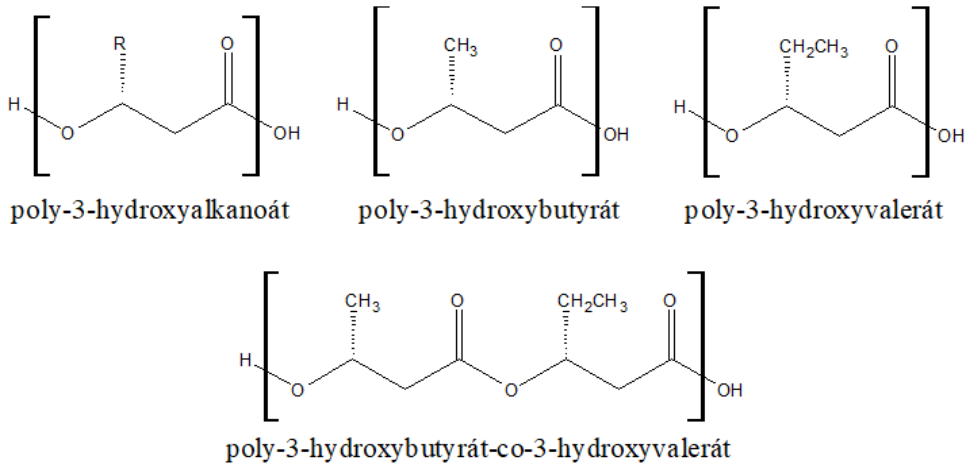
2.1 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou skupina biopolymerů. Tyto polymery jsou produkovány pomocí různých bakteriálních kmenů, pokud mají k dispozici nadbytek uhlíku a nachází se ve stresových situacích či postrádají jinou esenciální živinu (např. dusík nebo fosfor) [1] [2].

2.1.1 Charakteristika a struktura

PHA jsou biopolymery mikrobiálního původu, svou strukturou spadají do skupiny polyesterů, nevykazují toxické vlastnosti [3]. PHA díky své biodegradabilitě a biokompatibilitě hrají významnou roli ve výzkumu a v průmyslu, kde by mohly sloužit jako náhrada běžně používaných ropných plastů. Struktura může být velmi různorodá z důvodu různých kombinací monomerů. Polymery se dělí podle délky řetězce na krátké (scl-PHA, nejčastěji 3 nebo 5 atomů uhlíku), středně dlouhé (mcl-PHA, 6 až 14 atomů uhlíku) a dlouhé (lcl-PHA, delší než 14 atomů uhlíku) [2], [3].

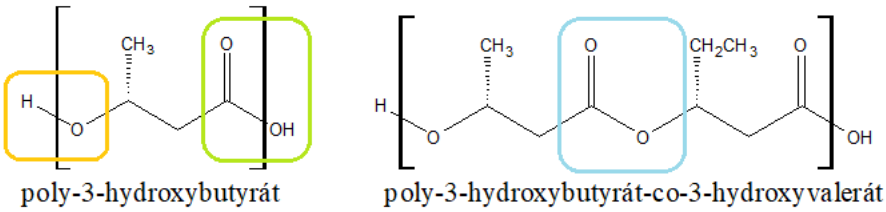
Syntéza homopolymerů a kopolymerů PHA závisí na typu mikroorganismu a zdroji uhlíku [4]. Nejzastoupenějším polymerem PHA je poly-3-hydroxybutyrát (P3HB). Monomery se mohou spojovat esterovou vazbou do heteropolymerů – např. poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) – P3HB3HV, nebo poly(3-hydroxy-butyrát-co-3-hydroxyhexanoát) – P3HB3HHx. [2], [4], [5]. Na obrázku 1 jsou zobrazeny vzorce typů PHA.



Obrázek 1: Schéma vybraných struktur PHA [vlastní obrázek]

Monomery PHA patří mezi hydroxyalkanové kyseliny. Ve struktuře se vyskytují dvě hlavní funkční skupiny – hydroxylová a karboxylová skupina [5]. Obě tyto funkční skupiny hrají roli v polymerační reakci, kterou je polyesterifikace. Polyesterifikace je reakce karboxylové kyseliny s hydroxylovou skupinou nejčastěji alkoholu [6].

Monomery hydroxyalkanových kyselin se spolu spojují esterovou vazbou. Esterová vazba je jednoduše rozložitelná za pomocí hydrolýzy. Tato vlastnost je využitelná pro rozklad použitého biopolymeru v aerobních podmínkách za pomocí mikroorganismů. Některé mikroorganismy umí produkovat enzym pro rozklad PHA a ty jsou rozloženy na neškodné produkty jako je CO_2 a voda [7].



Obrázek 2: Struktura PHA s vyznačenými funkčními skupinami [vlastní obrázek]
Zelená – karboxylová skupina, oranžová – hydroxylová skupina, modrá – esterová vazba

2.1.2 Vlastnosti PHA

Mechanické a fyzikální vlastnosti PHA připomínají ropné plasty [2]. PHA vykazují podobné vlastnosti jako široká škála polymerních materiálů, které mohou mít vlastnosti tvrdé krystalické látky nebo elastické gumy. Tyto vlastnosti jsou ovšem ovlivněny vedlejším řetězcem a navázanou vedlejší funkční skupinou. Ovlivněna je zejména teplota tání, teplota skelného přechodu či krystalinita polymeru. Monomery s fluorovaným postranním inkorporovaným řetězcem je možné chemicky modifikovat pro zisk lepších vlastností polymeru [8]. V přehledu vlastností (tabulka 1) je srovnání PHA rozděleného podle délky řetězce s ropným plastem polypropylenem [3].

Tabulka 1: Srovnání vlastností PHA s různou délkou řetězce a polypropylenu [3]

	PHA_{scl}	**PHA_{mcl}**	**PHA_{lcl}**	**Polypropylen**
Krystalinita [%]	40–80	20–40	-	70
T_t [°C]	80–180	30-80	-	176
Hustota [g·cm^{-3}]	1,25	1,05	-	0,91
UV resistence	dobrá	dobrá	dobrá	špatná
Biodegrabilita	dobrá	dobrá	dobrá	žádná

T_t – teplota tání; scl – short-chain lenght; mcl – medium-chain lenght; lcl – long-chain lenght

Při srovnání PHA s polypropylenem jsou znatelné rozdíly. Interval teplot tání pro P3HB (scl-PHA) je 173–180 °C [9]. Tato teplota je velmi blízká teplotě tání polypropylenu stejně jako krystalinita i hustota PHA s krátkým řetězcem. Z toho důvodu je možné uvažovat o P3HB jako o možné alternativě polypropylenu [3].

PHA jsou zcela nerozpustné ve vodě a v některých organických rozpouštědlech, výjimkou jsou halogenovaná rozpouštědla jako například chloroform. Pro izolaci PHA byla testována i jiná

možná PHA rozpouštědla – cyklické polyestery kyseliny uhličité, propylenkarbonát – ale jsou velmi korozivní a náchylnost techniky další výzkum neumožnila [7].

2.1.3 Biosyntéza PHA

Hlavním faktorem ovlivňujícím biosyntézu jsou podmínky a typ mikroorganismu syntetizujícího PHA. Esenciální roli pro správnou syntézu PHA mají následující enzymy: PHA-syntázy, acetoacetyl-CoA reduktáza a *β*-ketothioláza [10]. Biosyntéza PHA může probíhat ve třech hlavních drahách, poslední krok syntézy je vždy katalyzován PHA-syntázou a podle typu dráhy jsou do procesu syntézy zapojeny další zmíněné enzymy. Výsledný polymer závisí na vstupní formě uhlíkového zdroje, podle kterého se odvíjí i struktura vzniklého polymeru [4], [10].

K syntéze určité formy polymeru či kopolymeru, je nutno dodat prekurzor. Například pro syntézu kopolymeru poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) (P3HB3HV), se přidá kyselina propionová nebo valerát sodný, aby byl vytvořen intermediát 3HV-propionylCoA. Tato varianta se ukázala jako finančně náročná, proto je výhodnější tvorba propionyl-CoA bez adice prekurzorů přes methylmalonyl-CoA a *α*-ketobyturát [4], [11]. Polymer se skládá z monomerů, které jsou všechny v (*R*)-konformaci kvůli stereospecifitě PHA syntázy. Existují tři nejprostudovanější biosyntetické dráhy PHA. Jsou spojeny s různými metabolickými drahami. Jedna dráha využívá různé zdroje uhlíku (zejména sacharidy), další využívá metabolickou dráhu *β*-oxidace a poslední využívá syntézy mastných kyselin. Pro každou dráhu je typická produkce jinak dlouhých PHA řetězců [4].

2.1.4 Metabolická dráha variabilních uhlíkových zdrojů – I.

Acetyl-CoA je metabolicky tvořen z molekul obsahujících uhlík, jako jsou sacharidy, mastné kyseliny nebo aminokyseliny. Využívá se zde katalytické aktivity *β*-ketothiolázy (PhaA) acetoacytyl-CoA reduktázy (PhaB) a PHA-syntázy (PhaC). PhaA enzym je běžně inaktivován koenzymem A pocházejícím z Krebsova cyklu, pokud jsou podmínky vhodné pro růst buněk. Pokud je Krebsův cyklus limitován uhlíkovými zdroji pro růst, neexistuje volný koenzym A pro inhibici PhaA a acetyl-CoA se využije k syntéze PHA [4], [8].

Preferovaným zdrojem uhlíku pro metabolickou dráhu I je glukóza. Z té jsou nejčastěji produkovány PHA s krátkým řetězcem jako P3HB [12]. Je využívána Entner-Doudoroffova dráha, která poskytuje acetyl-CoA. Acetyl-CoA se mění na acetoacetyl-CoA za katalýzy *β*-ketothiolázou. Následný krok využívá redoxní energii NADPH a za působení acetoacetyl-CoA reduktázy je acetoacetyl-CoA transformován na 3-hydroxybutyryl CoA. Tento produkt je následně polymerizován na výsledné PHA s pomocí PHA syntázy (PhaC) [4], [13].

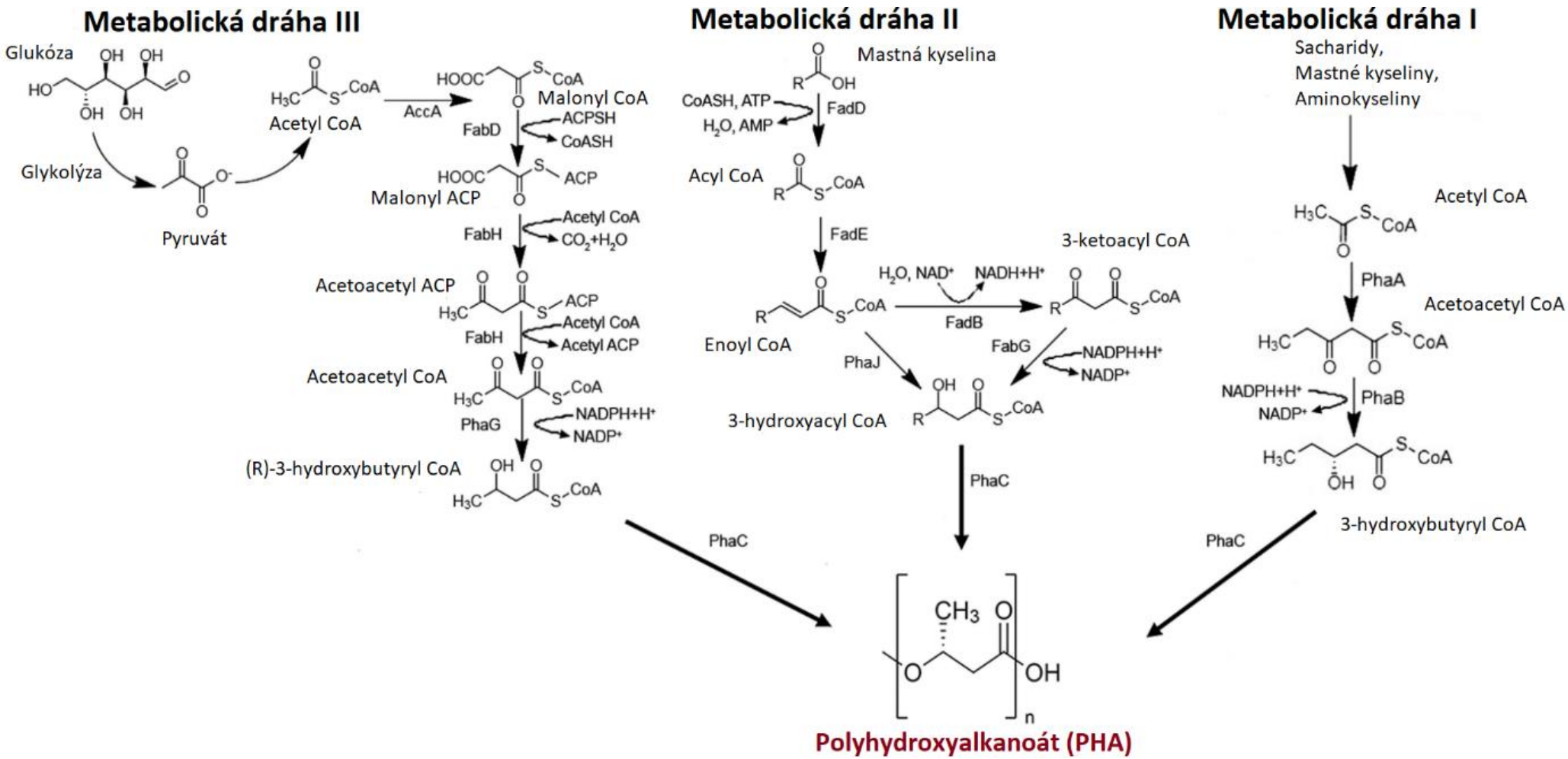
2.1.5 Metabolická dráha využívající β-oxidaci – II.

Touto dráhou nejčastěji vznikají PHA řetězce střední délky. Do této skupiny se řadí například 3-hydroxyhexanoát, 3-hydroxyheptanoát nebo 3-hydroxydekanoát. Dráhu mastných kyselin k syntéze PHA využívají zejména bakterie rodu *Pseudomonas* [14].

Acetyl-CoA z mastné kyseliny vzniká za katalýzy acetyl-CoA syntázy a dále se přeměňuje za pomocí acetyl-CoA dehydrogenázy na enoyl-CoA. Tento krok je součástí *β*-oxidace mastných kyselin, kdy vzniká i vedlejší produkt 3-ketoacyl-CoA působením enoyl-CoA hydratázy. *R*-3-hydroxyacyl-CoA vzniká z 3-ketoacyl-CoA a enoyl-CoA za katalýzy (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA hydratázy a enoyl-CoA reduktázy. Vzniklé monomery PHA syntáza polymerizuje ve výsledné řetězce [4], [15].

2.1.6 Metabolická dráha využívající syntézu mastných kyselin – III.

Acetyl-CoA z glykolýzy je acetyl-CoA karboxylázou (AccA) transformován na malonyl-CoA. Pomocí malonyl-CoA-ACP transacylázy (FabD) je malonyl-CoA přeměněn na malonylCoA-ACP, následně na acetoacetyl-CoA-ACP pomocí 3-ketoacyl-ACP syntázy (FabH). 3-ketoacyl-ACP reduktáza katalyzuje přeměnu acetoacetylu-CoA na (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA a tyto monomery jsou PHA syntázou polymerizovány na výsledné PHA [4], [8], [9].



Obrázek 3: Schéma metabolických drah syntézy PHA [4]

FadB – enoyl-CoA hydratáza, FadD – mastná acyl-CoA syntáza, FadE – acyl-CoA dehydrogenáza, FabG (PhaG) – 3-ketoacyl reduktáza, FabH – 3-ketoacyl-ACP syntáza III, PhaJ – R-3-hydroxyacyl-CoA hydratáza

2.1.7 Aplikace a využití PHA v průmyslu

V porovnání s průmyslovou výrobou syntetických plastů se u syntézy PHA neprodukují vedlejší odpadní produkty. PHA našly široké spektrum uplatnění v různých odvětvích průmyslu díky svým různorodým vlastnostem. Jejich nevýhodou pro průmyslové uplatnění je vysoká výrobní cena, která je způsobena nákladnou kultivací produkujících mikroorganismů. Prozatím se z PHA vytváří balicí boxy, obalové folie, vláknité nebo pěnité formy materiálu, nezávadné implantáty a přenašeče léčiv v medicíně [2]. Například P3HB a P3HB3HV se používají při balení kosmetických výrobků, jako jsou rtěnky, krémy nebo pudry. Obaly z P3HB a P3HB3V chrání produkty před kyslíkem, CO_2, UV zářením a aromatickými sloučeninami. Dalším příkladem využití jsou mulčovací folie v zemědělství. Obvykle jsou vyrobeny z plastových materiálů na ropné bázi, které nejsou biologicky rozložitelné. Místo plastových materiálů je možné k výrobě využít kopolymer poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hexanoát) (P3HB3HHx), který je rozložitelný biologickou cestou [16]. Díky existenci mnoha typů monomerů, které mohou být zapojeny do polymerační reakce PHA, se tato skupina biopolymerů jeví jako velmi atraktivní. U PHA polymerů je možné upravovat vlastnosti podle požadavků na jejich finální aplikace [17].

2.2 Mikroorganismy produkující PHA

Pro biosyntézu PHA se používají různé typy mikroorganismů; zejména bakterií, které mají rozdílné požadavky pro růst a podmínky pro kultivaci. V dnešní době je nutné vylepšit technologie současných biotechnologií tak, aby se snížily velké spotřeby vody a energie pro sterilaci, dodávku kyslíku, chlazení nebo míchání. Zároveň je nutné eliminovat kontaminace kultur, vylepšit nákladnou separaci a čištění produktů, redukovat vysoké ceny atd. Kontaminace lze eliminovat využitím extremofilních bakterií, které přežívají v extrémních podmínkách zabraňujících kontaminacím jinými mikroorganismy [18]. Touto problematikou se zabývá odvětví Next Genetration Industrial Biotechnology (tzn. průmyslové biotechnologie nové generace) [19].

2.2.1 Psychrofilní organismy

Jedná se o mikroorganismy, které žijí v oblastech s chladnými podmínkami, kde se teplota pohybuje mezi 5–20 °C. Optimální růstová teplota se pohybuje okolo 20 °C a viditelný růst vykazují během 7–10 dní. Některé kmeny mohou být zodpovědné za kažení potravin v chladicích boxech nebo lednicích. K této skupině patří zejména patogenní *Vibrio cholera*, *Aeromonas hydrophila* a některé kmeny *Clostridium botullinum* [20].

Zároveň se vyskytují ve velmi chladných oblastech s teplotou velmi blízkou bodu mrazu nebo těsně pod jeho hodnotou. Tyto mikroorganismy se musely přizpůsobit extrémním podmínkám pro život, aniž by došlo k znehodnocení funkce proteinů. Mezi extrémní psychrofily patří zástupci *Acinetobacter, Psychrobacter, Oceanisphaera* [20] [21].

2.2.2 Mezofilní organismy

Tyto organismy nejlépe prosperují při mírnějších teplotách okolo 20–45 °C. Tyto organismy jsou poměrně málo stabilní při extrémních podmínkách jako například vysoké teploty nebo extrémní pH, a tím se zužuje rozmezí podmínek optimální aktivity. Pomocí těchto

mikroorganismů se produkují komerční enzymy, ale ty jsou pro průmyslové inženýrství v drsnějších podmínkách nestálé [22]. Mezi zástupce patří *Cupriavidus necator*, který je významným (modelovým) producentem PHA. *C. necator* je schopen naakumulovat P3HB až na 80 % hmotnosti suché buněčné biomasy. Významnou schopností bakterie *C. necator* je i konverze CO_2 na biopaliva nebo PHA, což může mít za následek snížení skleníkového efektu [23]. Dalším významným zástupcem je *Burkholderia sacchari*, která je velmi slibným producentem PHA z lignocelulózových odpadních materiálů [24].

2.2.3 Methanotrofní organismy

Tyto organismy umí využívat methan a methanol jako jediný zdroj uhlíku a energie pro růst. Methanotrofní bakterie projevily schopnost akumulovat P3HB v bioreaktorech při nesterilních podmínkách [25]. Tyto bakterie používají zřejmě dvě metabolické dráhy k přeměně uhlíku – serinovou nebo pentózofosfátovou dráhu. Methanotrofové se dělí podle struktury membrány a podle používané dráhy pro syntézu PHA [26]. Bakterie, které používají serinovou dráhu, se projevily jako nejefektivnější P3HB producenti. Mezi methanotrofní organismy patří například *Methylosinus trichosporium, Methylocystis* sp. [25], [26].

2.2.4 Termofilní organismy

Termofilní mikroorganismy jsou schopné růstu a přežití při teplotách nad 45 °C. Na tyto organismy se v poslední době upírá hodně pozornosti díky jejich fascinujícím schopnostem se přizpůsobit extrémním podmínkám [18]. Termofilní bakterie v extrémních podmínkách mají potenciál produkce nových, zatím necharakterizovaných, sekundárních metabolitů [27]. Termofilní organismy mají při kultivacích řadu výhod. Díky teplotě nad 40 °C se eliminuje riziko kontaminace mezofilními mikroorganismy, a zároveň jsou nižší náklady na chlazení reaktorů [28]. Mezi zástupce termofilních organismů patří například *Bacillus paralicheniformis* [27] a *Schlegelella thermodepolymerans* [18].

2.2.5 Halofilní a halotolerantní organismy

Halofilním bakteriím vyhovuje hypersalinní prostředí, což znamená přítomnost vysokého procenta soli. Produkují specifické enzymy, které jsou funkční a stabilní v širokém koncentračním rozmezí přítomných solí [29], [30]. Tyto mikroorganismy mají své zástupce v doménách *Archaea*, *Eukcarya* i *Bacteria*, kdy *Archaea* a *Bacteria* jsou nejzastoupenější [31]. Mikroorganismy z této extremofilní skupiny mohou být rozděleny na halotolerantní a halofilní organismy. Halotolerantní jsou schopny přežít v prostředí s nízkou nebo téměř nulovou koncentrací soli. Zároveň jsou schopny růstu i při vysokých koncentracích soli v médiu [32].

Halofilní organismy naopak sůl pro svůj růst a život vyžadují [30]. Vyskytují se zejména ve slaných jezerech, například Velké solné jezero nebo Mrtvé moře [31], ale i v potravinách, například ve slaných sýrech nebo mořských plodech [30]. Halofilní organismy jde dále rozdělit podle jejich nároků na koncentraci soli, a to na extrémní halofily, kteří vyžadují 2,5–5,2 mol/l soli v médiu; na hraničně extrémní halofily, ti vyžadují 1,5–4,0 mol/l soli v médiu; na mírné halofily, u nich je požadovaná koncentrace soli v médiu 0,5–2,5 mol/l [31], [32].

Z důvodu vysoké koncentrace soli v prostředí, je nutná i odolnost proteinů proti denaturaci. Vysvětlení pro vztah mezi strukturou a stabilitou halofilních proteinů v závislosti

na přítomnosti soli je takové, že halofilní proteiny vážou významné množství vody a soli za podobných podmínek jako v jejich fyziologickém prostředí. Zároveň jsou halofilní proteiny charakterizovány nižším zastoupením hydrofobních aminokyselin a vyšší náchylností k náhodnému svinutí než ke svinutí do α-helixu [31].

Mezi zástupce mírných halofilních organismů patří *Halomonas halodenitrificans*, která je schopna přežít v prostředí blízkém vodě, ale i nasyceného roztoku NaCl [32], fakultativně anaerobní *Spirochaeta halophila* přežívá při koncentraci soli 0,75 mol/l [33]. *Halomonas halophil*a, která se často používá jako modelový halofilní organismus [32], je zároveň středně halofilní organismus. *Halomonas halophila* může využívat různé typy substrátů pro kultivaci, protože nevyžaduje komplexní média a je schopna metabolizovat sacharidy získané z lignocelulózových odpadů pro akumulaci PHA [34]. Dalším zástupcem mírně halofilních organismů je *Halomonas organivorans*, která umí využívat široké spektrum organických sloučenin pro dekontaminaci značištěných slaných stanovišť; například kyselinu benzoovou nebo kyselinu salicylovou [35]

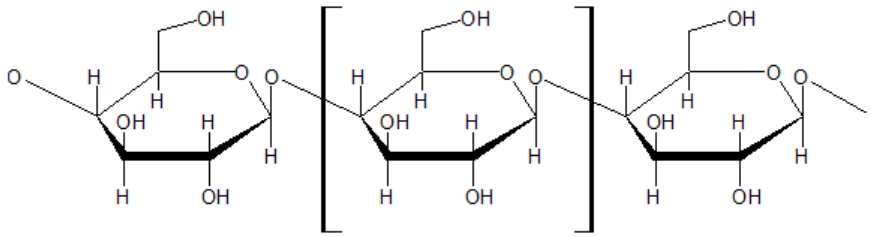
2.3 Lignocelulóza

2.3.1 Složení lignocelulózy

Lignocelulóza je zastoupena u většiny rostlin, tvoří hlavní složku biomasy a představuje jeden z hlavních obnovitelných zdrojů [36]. Hlavními složkami lignocelulózy jsou celulóza, hemicelulóza a lignin. Nejčastěji se využívá v zemědělském, potravinářském nebo lesnickém průmyslu. Mezi lignocelulózové materiály patří slámy kukuřice, obilné slámy, vinné nebo olivové matoliny, otruby nebo mláto, dřevěné hobliny či piliny atd. Každý lignocelulózový materiál má různé zastoupení jednotlivých složek a jiné významné látky, proto každý z nich může mít trochu jiné využití [37].

2.3.1.1 Celulóza

Celulóza je jeden z nejrozšířenějších polymerů na Zemi a je možné ji získat z různých zdrojů, například ze dřeva, rostlin nebo bakterií. Je to polymer, který se nachází ve stěnách buněk nebo je syntetizován mikroorganismy [38]. Tento polymer se skládá z monomerů glukóz lineárně spojených 1,4-*β*-glykosidickou vazbou [39].



Obrázek 4: Struktura celulózy [vlastní obrázek]

Díky své struktuře má celulóza své charakteristické vlastnosti, a to chiralitu, degradovatelnost a díky hydroxylovým skupinám má širokou chemickou reakční variabilitu. Jednotlivá lineární vlákna jsou mezi sebou propojena vodíkovými můstky, které dodávají celulóze pevnost a tvoří

z ní částečně krystalické vláknité struktury [39]. Takto mohou být tvořeny i celulózové nanofibrily, nanokrystaly, bakteriální celulóza nebo molekulový řetězec celulóz. Velikost a vlastnosti jednotlivých druhů celulózy jsou definovány podle původu zdroje [39], [40].

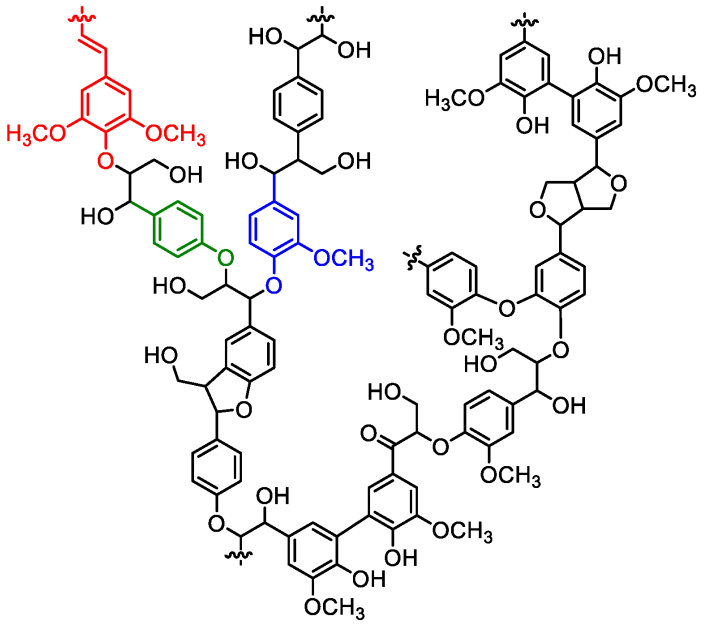
2.3.1.2 Hemicelulóza

Jedná se o heteropolysacharid, u kterého chemické složení závisí na typu rostliny. Hemicelulózu obvykle doprovází lignin a celulóza. Samotná hemicelulóza poskytuje buněčné stěně určitou pružnost; pokud je ale vázána k další složce, tato pružnost klesá. Lignin, jakožto hydrofobní skupina aromatických polyfenolových sloučenin, je kovalentně vázán na hemicelulózové cukerné skupiny glykosidickou, etherovou nebo esterovou vazbou [41]. Kovalentní vazbou vznikají lignin-sacharidové komplexy [42], kdy hemicelulóza s ligninem zajišťují pevnost buněčné stěny [43].

V dřevinách se nachází různé typy hemicelulóz, kdy hlavními hemicelulózami v měkkém a tvrdém dřevě jsou glukomanany a glukoronoxylany v různých poměrech [43]. Ve smrcích a borovicích je to galaktoglukomanan, který představuje 25–35 % suché dřevní hmoty. Galaktoglukomanany jsou hemicelulózy, které jsou často acylované a skládají se z řetězců (1→4) vázaných β-D-mannopyranosylových a β-D-glukopyranosylových jednotek s (1→6) vázanými α-D-galaktopyranosylovými jednotkami připojenými k manóze [42].

2.3.1.3 Lignin

Jedná se o amorfní heteropolymer, který se skládá nejčastěji z fenylpropanoidových jednotek koniferylalkoholu, *p*-kumarylalkoholu a sinapylalkoholu. Složitá struktura ligninu způsobuje jeho odolnost, která komplikuje účinnou depolymeraci [36].



Obrázek 5: Struktura ligninu s barevně vyznačenými nejčastěji vyskytujícími komponentami [70]

(červeně – synapylalkohol, modře – koniferylylalkohol, zeleně – *p*-kumarylalkohol)

Nejčastější metodou depolymerace ligninu je využití termochemických a biologických procesů. Mezi používané termochemické procesy se řadí pyrolýza, chemické oxidace a hydrogenolýza.

Termochemické procesy jsou náročné na energii a vyžadují nákladná zařízení. Naopak biologické metody zpracování ligninu jsou výhodnější z důvodu vysoké specificity, nízkoenergetického vstupu atd. Dnes je známo velké množství mikroorganismů, bakterií i hub, které umí lignin metabolizovat, například *Stropharia coronilla* nebo *Botrytis cinerea* [36], [44].

2.4 Valorizace a využití lignocelulózových materiálů

Díky velkému rozšíření na Zemi je lignocelulóza uznávaná jako velmi slibný obnovitelný zdroj pro valorizaci a výrobu produktů s přidanou hodnotou. Valorizace se provádí pro redukci produkce odpadů z průmyslu a pro nalezení jiného uplatnění odpadu kromě zkrmování hospodářských zvířat [45]. Zde je několik příkladů hojně produkovaných a využívaných lignocelulózových materiálů.

2.4.1 Otruby

Jedná se o běžně dostupný odpad z mlynárenského průmyslu; jde o vedlejší produkt mletí zrn na mouku. Podíl otrub se pohybuje okolo 13–17 % hmotnosti zrna včetně vnějšího a vnitřního oplodí. V aleuronové vrstvě semene je podíl tuků, ale i malé množství bílkovin [46]. Mikroskopické studie ukázaly, že otruby mají několik vrstev, které mohou být rozděleny na tři části. Tyto části se dělí podle mechanických vlastností strukturních vrstev na vnější vrstvu, mezivrstvu a vnitřní vrstvu [47], [46].

Obrázek 6: Mikroskopické zobrazení endospermu, aleuronové vrstvy a perikarpu (oplodí semene) [47]

Otruby jsou v celku heterogenní materiál; kromě vlákniny jsou zde obsaženy i bílkoviny, zbytkový škrob po mletí, vlhkost a popel [48]. Otruby obsahují i minerály, vitaminy i bioaktivní látky jako jsou antioxidační látky, fenolické sloučeniny a další látky uvedené v tabulce 2. V aleuronové vrstvě je nejvyšší obsah fenolů, hlavně kyseliny ferulové. [49].

Tabulka 2: Zastoupení některých složek otrub [48]

Složka	Zastoupení [%]
Bílkoviny	13,2–18,4
Tuky	3,5–3,9
Škrob	13,8–24,9
Celulóza	11,0
Arabinoxylany	10,9–26,0
β-glukany	2,1–2,5
Fenolické látky	1,1
Popel	3,4–8,1

Fyzikálně-chemické vlastnosti otrub jsou zodpovědné za nežádoucí kvalitu celozrnných výrobků. Fyzikální vlastnosti se ovlivňují různými předúpravami, jako jsou autoklávování, hydratace a hydrotermální předúprava [50]. Tyto předúpravy vedou ke komplexním změnám, například velmi zvyšují absorpci a zadržovací kapacitu vody, způsobují změny v mikrostrukturách, v objemové hustotě nebo v obsahu fenolů. Na druhou stranu otruby obsahují nutričně významné látky pro lidský organismus, a v lidské stravě by mohly být významnou složkou jako tzv. hrubá vláknina. Byl prokázán pozitivní vliv tepelné předúpravy na rozpustnost vlákniny; stejně tak i jemné mletí přispělo k ovlivnění vlastností otrub. Jemným mletím se zvětšuje povrch částic a obsah rozpustné vlákniny, tím se vylepšuje biologická dostupnost živin s technologickými vlastnostmi [51].

Otruby mohou být valorizovány i v rámci biorafinerie, například mohou být využity jako surovina pro kultivaci plísní a pro podporu růstu mycelií [52] nebo mohou sloužit jako prekurzory pro polymeraci nebo jako hnojivo v zemědělství [48].

2.4.2 Kávová sedlina

Složení kávové sedliny závisí na mnoha faktorech, například na původu kávových zrn nebo podmínkách pražení. V sedlině je vysoký obsah sacharidů, proteinů, fenolických látek a dalších složek. Sacharidovou frakci je možné rozložit tepelnou, kyselou nebo bazickou hydrolýzou. Z hydrolýzy se získá nejčastěji manóza, galaktóza nebo arabinóza. Tyto sacharidy umí pouze několik druhů bakterií metabolizovat na PHA. Nevýhodou je obsah melanoidinů, které mohou působit cytoxicky a genotoxicky pro organismy a inhibovat biosyntézy [53]. Zároveň je kávová sedlina často využívána pro kompostování, protože zlepšuje kvalitu kompostu a zbavuje jej fytotoxických látek [54].

2.4.3 Mláto

Mláto je odpadním produktem pivovarnictví. Jedná se nerozpustné části ječmenných slupek a je často používáno ke zkrmování hospodářských zvířat. Jelikož je produkováno ve velkém

množství, uvažuje se o jeho valorizaci i jinak než jenom zkrmováním hospodářských zvířat [55]. Možností valorizace mláta je poměrně velké množství, kdy se jedná o produkci xylo-oligosacharidů [56], PHA [57] nebo biodieselu [58].

2.4.4 Vinné matoliny

Bylo studováno složení matolin a bylo zjištěno, že obsahují 43–75 % vody a přibližně podobné množství vlákniny, která je složena z polysacharidů a ligninu, dále obsahují i proteiny a lipidy. Jednou z možností valorizace je použití vinných matolin pro zisk např. oleje ze semen, který se uplatňuje v potravinářském průmyslu [59]. Jako další efektivní způsob valorizace vinných matolin se ukázala biosyntéza PHA se středně dlouhými řetězci, kdy hydrolyzované matoliny mohou být použity jako zdroj uhlíku pro syntézu. Mimo PHA produktu je možné izolovat i lignin a celulózu [60].

2.4.5 Dřevěné piliny

Jelikož se jedná o odpadní materiál dřevozpracujícího průmyslu, je tento lignocelulózový materiál hojně dostupný a možnosti jeho využití mohou být velmi široké. Po úpravách to může být forma aktivního uhlí pro čistění plynů [61], adsorbent obecně používaný pro různé kontaminanty nebo součást organických hnojiv [62]. Z pilin byla zkoušena i produkce PHA, ale z důvodu přítomnosti inhibitorů v hydrolyzátech je mikrobiální kultivace náročnější [63].

2.5 Aktuální výzkum produkce PHA

Z důvodu vysoké ceny PHA jsou hledány alternativy pro snížení jejich ceny. Tímto se zabývá oblast biotechnologií – Next Generation Industrial biotechnology. Cílem je snížení nároků na energii pro výrobu biotechnologicky produkovaných polymerů a dalších produktů za využití extremofilních mikrorganismů. Vhodnou alternativou je i využití levných uhlíkových zdrojů jako jsou odpadní materiály [19].

Jedním z příkladů využití tohoto konceptu byla produkce PHA z odpadního fritovacího oleje. Pernicová a spol. využívali mikroorganismy rodu *Halomonas* a fritovací odpadní olej, který byl převážně slunečnicový. Kultivace probíhaly ve 250 ml Erlenmayerových baňkách v médiích vhodných pro halofilní organismy. Zároveň se zkoumal i potenciál tvorby kopolymerů s využitím prekurzorů. U tří kultur; *H. neptunia*, *H. organivorans*, *H. hydrothermalis*; byl vykazován slibný růst a obsah PHA okolo 25 % v CDM (suchá hmotnost buňky). *Halomonas hydrotermalis* je podle autorů zajímavý kmen pro PHA produkci na odpadním oleji a dalších lidipech, zároveň je tento kmen schopen produkce kopolymeru s přidaným prekurzorem [64].

Alternativním uhlíkovým zdrojem je i kávová sedlina. Tímto výzkumem se zabývala Kovalčík a spol., kdy z hydrolyzátů kávové sedliny za použití mikroorganismu *Halomonas halophila* produkovali PHA. Kávová sedlina se nejprve musela sušit při 80 °C po dobu 24 hodin, následně se extrahovaly tuky pomocí *n*-hexanu Soxhletovou extrakcí a tím se odstranilo i co nejvíce fenolických látek, nakonec se získal hydrolyzát s vysokým obsahem sacharidů. Dalším krokem byla kyselá předúprava 4 % roztokem kyseliny sírové v autoklávu na 100 °C po dobu 2 hodin a následně byly hydrolyzáty detoxikovány adsorpcí na nepolárních pryskyřicích po dobu 5 hodin při 23 °C. Média byla připravena z hydrolyzátů, které se musely naředit, aby bylo dosaženo ideální koncentrace sacharidů pro růst mikroorganismů (20 g/l). Kultivace probíhala

72 hodin na třepačce ve 30 °C s 200 rpm. Výsledná koncentrace PHA se pohybovala od 13 do 27 % v CDM. Autoři potvrzují, že při hydrolýzách se tvoří velké množství inhibitorů, které mohou komplikovat kultivace, jelikož detoxikace (odstranění inhibitorů) je časově náročná [53].

Velký potenciál využití mají i lignocelulózové materiály, například mláto. Corchado-Lopo a spol. se zabývali produkcí PHA z odpadního pivovarského mláta. Pro experimentální kultivaci využili organismy *Burkholderia cepacia* CCM 2656, *Cupriavidus necator* DSM 428 a *Bacillus cereus* DSM 31 a mláto získali z Companyia Cervesera del Montseny. Mláto bylo nejprve sušeno po dobu 48 hodin na 60 °C a z něj následně byly získány hydrolyzáty pomocí několika typů předúprav. Jednou z možností bylo využití zředěné sírové kyseliny, konkrétně 1 obj. %; 2 obj. % obj.; 3 obj. % roztoky. Tyto roztoky byly podrobeny autoklávování na 121 °C po dobu 15 minut. Druhým typem předúpravy byla bazická předúprava, která využívala 5 obj. % roztoku NaOH a následného autoklávování jako u kyselé předúpravy. Dále byla vyzkoušena kombinace roztoku NaOH s mikrovlnnou předúpravou, kdy bylo mláto v roztoku 1 % roztoku NaOH a následně směs byla zahřáta pomocí mikrovln. V neposlední řadě byla použita pouze tepelná předúprava, u které byla použita destilovaná voda a následné autoklávování za stejných podmínek jako u bazické či kyselé předúpravy. Po předúpravě byly přidány enzymy, kdy byl použit enzymový koktejl Viscozym L a vlastní získané celulázy z *Aspergillus niger*. V hydrolyzátech byl stanoven obsah redukujících sacharidů pomocí metody používající 3,5-dinitrosalicylovou kyselinu (DNS) a byl stanoven i obsah mikrobiálních inhibitorů pomocí HPLC. Autoři považovali tepelnou předúpravu s enzymatickou hydrolýzou jako nejschůdnější z důvodů nižšího obsahu inhibitorů než u ostatních předúprav. Kultivace probíhala ve 250 ml Erlenmayerových baňkách po dobu 72 hodin při 30 °C na 120 rpm třepačky a byly odebírány vzorky během kultivace pro zisk průběžných dat po 24 a 48 hodinách. Mikroorganismy *C. necator* a *B. cepacia* naakumulovaly okolo 0,17 g PHB v CDM po 48 hodinách, kdy dosáhly svého maxima. Naopak *B. cereus* naakumuloval pouze třetinu produkce předchozích mikroorganismů; autoři se domnívali, že to bylo z důvodu přítomnosti špatně metabolizovaných sacharidů pro *B. cereus* [65].

Snadno dostupným a použitelným zdrojem fermentovatelných sacharidů jsou rýžové stvoly, které spadají také mezi lignocelulózové materiály. Čínští vědci (Jiawei a spol.) pozorovali vliv předúpravy lignocelulózové biomasy, kterou následně využili pro kultivaci mikroorganismu *Bacillus megaterium* B-10 jako PHA producenta. Byly prováděny pouze kyselé předúpravy, kdy byla používána různá koncentrace kyseliny sírové, konkrétně 0,5 obj. % a 2 obj. %, a různá doba autoklávování. Během kultivace byly odebírány vzorky pro měření optické hustoty kultury a akumulace PHA pomocí UV-VIS spektrometrie. Zároveň pro kontrolu probíhaly kultivace na obdobných zdrojích uhlíku (manóza, glukóza, xylóza, kyselina ferulová, furfural, …). Kultivace probíhaly po dobu 2 dnů ve 100 ml média při 30 °C. Po vyhodnocení obsahu sacharidů a inhibitorů se jako nejvýhodnější jevila nižší koncentrace kyseliny a delší čas autoklávování. Na médiu z této předúpravy byla stanovena koncentrace PHA na 1,496 g/l. Autoři potvrzují, že koncentrace kyseliny pro předúpravu lignocelulózového materiálu má vliv na vznik inhibitorů a rýžové stvoly by mohly být účinným a levným zdrojem uhlíku pro produkci PHA [66].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie, mikroorganismy, materiál a přístroje

3.1.1 Chemikálie pro kultivaci mikroorganismů

- Nutrient Broth w/1 % peptone (HIMEDIA, Indie)
- Yeast extract powder (HIMEDIA, Indie)
- Dodekahydát hydrogenfosforečnanu sodného (Lach-ner, s. r. o.)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-ner, s. r. o.)
- Dihydrát chloridu vápenatého (Lach-ner, s. r. o.)
- Heptahydrát síranu hořečnatého (Lach-ner, s. r. o.)
- Dihydrát chloridu vápenatého (Lach-ner, s. r. o.)
- Citrát železito-amonný (Fluka)
- Síran amonný (Lach-ner, s. r. o.)
- Hydrogenfosforečnan draselný (Lach-ner, s. r. o.)
- Dihydrogenfosforečnan sodný (Lach-ner, s. r. o.)
- Roztok stopových prvků (označení-TES II)

3.1.2 Chemikálie pro stanovení materiálu

- 3,5-dinitrosalycilová kyselina (Sigma-Aldrich)
- Folin-Ciocalteuvo činidlo (VWR chemicals)
- Gallová kyselina (Sigma-Aldrich)
- Hydroxid sodný (Lach-ner, s. r. o.)
- Hydrogenuhličitan sodný (Lach-ner, s. r. o.)
- Chloritan sodný (Sigma-Aldrich)
- Karboxymethylcelulóza (ThermoFisher GmbH)
- Škrob (Sigma-Aldrich)
- Vínan sodno-draselný (Lach-ner, s. r. o.)
- Uhličitan sodný (Lach-ner, s. r. o.)
- Amyloglykosidáza (Sigma-Aldrich)
- Celuláza (Sigma-Aldrich)
- Kyselina mléčná (Sigma-Aldrich)
- Kyselina citronová (Sigma-Aldrich)
- Kyselina octová (Sigma-Aldrich)

3.1.3 Chemikálie pro stanovení PHA

- Isopropylalkohol (Lach-ner, s. r. o.)
- Chloroform (Lach-ner, s. r. o.)
- Sírová kyselina (Sigma-Aldrich)
- Metanol (Sigma-Aldrich)
- Benzoová kyselina (Sigma-Aldrich)
- Hydroxid sodný (Lach-ner, s. r. o.)

3.1.4 Mikroorganismy a materiál

Pro experimentální část bakalářské práce bylo použito sedmi bakteriálních kmenů

- *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344
- *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15264
- *Halomonas halophila* CCM 3662
- *Halomonas organivorans* CCM 7142T
- *Lactobacillus casei* CCM 4798
- *Lactobacillus plantarum* CCM 7039T
- *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825T

Pro experimentální část bakalářské práce byly používány pšeničné otruby z mlýnů J. Voženílek, spol. s.r.o.

3.1.5 Přístroje

- Běžné laboratorní sklo
- Analytické váhy PA224C, Pioneer
- Váha Kern EW 620−3NM
- Hettich Centrifuga Eva 200
- Laminární box Fatran LF
- Temperovaná třepačka, IKA KS 4000
- Magnetická míchačka bez ohřevu technoKartell, TKO
- Vodní lázeň TW2, Julabo
- Vortex, Suspendor Bench mixer, Benchmark
- Plynový chromatograf s FID, Thermo Scientific, Trace 1300
    - Kolona: DB-WAX 30 m by 0,25 mm
- Kapalinový chromatograf SHIMADZU s refraktometrickým detektorem
    - kolona Waters Carbohydrate Analysis, 3,9x300 mm
- Blokový termostat Stuart SBH 200D, Bibby Scientific
- Nanofotometr Implen
- Iontový chromatograf Metrohm 850 IC s konduktometrickým detektorem
    - Kolona metrosep Organic Acids 250/7,8

3.2 Příprava hydrolyzátů z pšeničných otrub

Pro zisk hydrolyzátů byly využívány tři metody předúpravy, které následovala enzymatická hydrolýza. Do Erlenmayerovy baňky byly naváženy pšeničné otruby na výslednou koncentraci 100 g/l. Následovala kyselá nebo bazická předúprava. Pro kyselou předúpravu byl využit 1 hm. % roztok kyseliny sírové a baňka byla umístěna do autoklávu na 40 minut při 130 °C. Při alkalické předúpravě byl použit 0,5 mol/l roztok hydroxidu sodného a baňka byla umístěna na třepačku na 50 °C po dobu 4 hodin. Poslední používanou předúpravou byla neutrální předúprava, kdy do baňky byla přidána destilovaná voda a baňka byla umístěna do autoklávu na 40 minut při 130 °C.

Předupravené roztoky s materiálem byly upraveny na pH cca 4–5 pro optimální aktivitu vybrané směsi enzymů (celuláza a amyloglykosidáza). Přídavek enzymatického koktejlu činil 1 ml na 100 g otrub. Baňka byla umístěna na třepačku při 50 °C na 24 hodin. Následně bylo

provedeno oddělení pevné od kapalné fáze pomocí centrifugace nebo filtrace za sníženého tlaku. Na přípravu minerálních médií byly hydrolyzáty ředěny s destilovanou vodou na vhodnou koncentraci sacharidů pro růst vybraných mikroorganismů.

3.3 Kultivace mikroorganismů

Používané mikroorganismy byly uchovávány při teplotě –80 °C v kryozkumavkách s roztokem 10 % glycerolu jako kryopreotektantem. Mikroorganismy byly kultivovány v živném médiu, tzv. inokulu, při optimální teplotě růstu (tabulka 3).

Tabulka 3: Optimální teploty růstu bakteriálních kmenů

Kmen	$t_{optimální}$ [°C]
Halomonas organivorans	30
Halomonas halophila	30
Schlegelella thermodepolymerans	50

Po 24 hodinách bylo 10 % obj. inokula (výj. *Schlegelella thermodepolymerans* DSM15344 5 % obj.) zaočkováno v laminárním boxu do připraveného vysterilovaného minerálního média obsahující hydrolyzát jako sacharidový substrát. Po sterilaci byly přidány i roztoky stopových prvků TES II a MES.

Tabulka 4: Složení inokula pro *Halomonas halophila*

Látka	Koncentrace [g/l]
Pepton	15
Yeast extract	3
Glukóza	1
NaCl	66

Tabulka 5: Složení inokula pro kmeny *Schlegelella thermodepolymerans*

Látka	Koncentrace [g/l]
Hovězí extrakt	10
Masový pepton	10
NaCl	5

Tabulka 6: Složení inokula pro *Halomonas organivorans*

Látka	**Koncentrace [g/l]**
Pepton	5
Yeast extract	10
Glukóza	1
NaCl	81
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	9,6
$MgCl \cdot 6\ H_2O$	7
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	0,36
KCl	2
$NaHCO_3$	0,06
NaBr	0,026

Tabulka 7: Složení minerálního média pro kmeny *Halomonas*

Látka	**Koncentrace [g/l]**
KH_2PO_4	1,02
$(NH_4)_2SO_4$	3
$Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$	11,1
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,2
NaCl	66 (*H.halophila*)/81 (*H. organivorans*)
MES	1 ml/l

Tabulka 8: Složení minerálního média pro kmeny *Schlegelella thermodepolymerans*

Látka	**Koncentrace [g/l]**
KH_2PO_4	1,5
NH_4Cl	1
$Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$	9
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,2
NH_4Fe^{III} citrát	0,0012
Yeast extract	0,5
TES II	1 ml/l

Tabulka 9: Složení MES

Látka	**Koncentrace [g/l]**
$FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$	9,7
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	7,8
$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	0,156
$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,119
$NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,118
$CrCl_2$	0,062
0,1 M HCl (na rozpuštění)	1000 ml

Tabulka 10: Složení TES II

Látka	Koncentrace [g/l]
$FeCl_3$	8,3
EDTA	50
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$	0,13
$ZnCl_2$	0,84
$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,1
$MnCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,016
H_3BO_3	0,1

U kultivace bakterií rodu *Lactobacillus* pro inokulum bylo použito MRS (de Man-Rogosa-Sharp) médium a pro produkční médium bylo využito připravené MRS médium, kde uhlíkovým substrátem byla zejména glukóza z hydrolyzátu. Složení MRS média je popsáno v tabulce níže (tabulka 11). Kultivace probíhala na živném médiu ve zkumavkách, ve kterých bylo MRS médium o koncentraci 55,15 g/l. Jelikož bakterie *Lactobacillus* byly kultivovány anaerobně, byla inokula umístěna do termostatu bez třepání na 37 °C na 48 hodin. Po 48 hodinách bylo 10 obj. % inokula přeočkováno do připravených médií s hydrolyzátem.

Tabulka 11: Složení MRS média

Látka	Koncentrace [g/l]
Bakteriologický pepton	10
Meat extract	10
Yeast extract	5
Polysorbát 80	1
Citrát amonný	2
Acetát sodný	5
MnSO4	0,05
MgSO4	0,1
Fosforečnan didraselný	2
Dextróza	20

Pro produkční médium s hydrolyzátem byl zdrojem sacharidů připravený hydrolyzát naředěný na koncentraci 20 g/l pro ideální růst mikroorganismů.

3.4 Metody pro charakterizaci substrátu

3.4.1 Stanovení hlavních komponent pšeničných otrub

Pro stanovení zastoupení hlavních komponent otrub byly provedeny chemické předúpravy materiálu popsané v kapitole 3.2. Po centrifugaci byla sedlina převedena na Petriho misku a sušena do konstantní hmotnosti pro další analýzu.

Pro stanovení holocelulózy (celková celulóza a hemicelulóza) bylo použito 0,5 g suché sedliny. Vzorek ve 100 ml Erlenmayerově baňce byl zalit 40 ml destilované vody, 0,5 g $NaClO_2$ a 1 ml koncentrované kyseliny octové. Baňky byly umístěny do vodní lázně na 90 °C po dobu

45 minut. Následně bylo přidáno 0,5 g $NaClO_2$ a 1 ml octového pufru. Poté byly baňky umístěny do lázně za stejných podmínek. Po ochlazení byly vzorky centrifugovány 15 minut při 6000 rpm. Následovalo promytí teplou vodou (cca 50 °C) a promytí destilovanou vodou. Usazenina byla následně sušena do konstantní hmotnosti.

Následovalo stanovení celulózy z holocelulózy, kdy byl využit sušený vzorek. Ten byl smíchán se 100 ml roztoku 2 % (hm.) kyseliny chlorovodíkové. Směs byla ponechána na refluxu po dobu 2 hodin. Po ochlazení byla směs podrobena centrifugaci při 6000 rpm na 15 minut. Usazenina byla promyta vodou, $NaHCO_3$ (1 % hm.) a destilovanou vodou. Následně byla usazenina sušena při 70 °C do konstantní hmotnosti. Hemicelulóza byla stanovena odečtem celulózy od holocelulózy.

Pro stanovení ligninu byl využit vzorek po chemické předúpravě. Bylo využito 0,5 g sušeného vzorku, který byl vystaven hydrolýze v 5 ml roztoku kyseliny sírové (72 % hm.). Směs byla umístěna do vodní lázně při 25 °C na 2 hodiny. Následovalo ředění 45 ml destilované vody a umístění směsi na reflux na 2 hodiny. Následovala centrifugace na 10000 rpm na 10 minut. Po centrifugaci byl vzorek promyt destilovanou vodou a 5 % roztokem $NaHCO_3$. Po další centrifugaci následovalo promytí destilovanou vodou a sušení při 70 °C do konstantní hmotnosti.

3.4.2 Stanovení fenolických látek v hydrolyzátech

Tato metoda je založena na oxidaci fenolů v zásaditém prostředí, kdy jsou redukovány molybdenany a wolframany na směs oxidů molybdenanu a wolframu modrého zabarvení. Jedná se o kolorimetrickou metodu, proto je intenzita modrého zabarvení úměrná koncentraci fenolických látek, která se určuje pomocí spektrometrie [67].

Pro kalibraci byla použita kyselina gallová. Byl připraven její zásobní roztok o koncentraci 1000 mg/l, který byl naředěn na 100; 250; 500 a 750 mg/l. Dále byl připraven 7,5 % nasycený roztok Na_2CO_3. Do zkumavky byl napipetován 1 ml předem zředěného Folin-Ciocaulteauova činidla, následně bylo přidáno 50 µl roztoku kyseliny gallové o známé koncentraci, v případě blanku byla místo vzorku napipetována destilovaná voda. Zkumavky byly promíchány a inkubovány po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Následně byl přidán 1 ml nasyceného 7,5% roztoku Na_2CO_3. Zkumavky se opět ponechaly k inkubaci po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci proběhlo měření absorbance při 750 nm a byla sestavena kalibrační křivka.

Pro měření vzorků hydrolyzátu z pšeničných otrub se postupovalo stejně. Hydrolyzáty byly před měřením vhodně naředěny.

3.4.3 Stanovení sacharidů pomocí HPLC-RI v hydrolyzátech

Pro stanovení kvalitativního i kvantitativního zastoupení sacharidů byla využita vysokoúčinná kapalinová chromatografie s refraktometrickým detektorem (HPLC-RI). Byly připraveny kalibrační roztoky glukózy, fruktózy a xylózy o koncentraci 40 g/l, které byly ředěny na požadovanou koncentraci, a to 5; 10; 20, 40 g/l. Pro analýzu byla volena polární mobilní fáze acetonitril:voda v poměru 80:20. Pro každý sacharid byla sestavena kalibrační křivka.

Vzorky byly před nanesením na kolonu filtrovány přes membránový filtr s 0,45 µm póry. Ve vzorcích byly stanoveny koncentrace a druhy sacharidů podle retenčních časů standardů. Byla k tomu využita kolona Waters Carbohydrate Analysis o rozměru 3,9x300 mm a analýza probíhala při 37 °C a pH 7. Průtok kolonou byl nastaven na 1,2 ml/min a analyty detekovány pomocí refraktometrického detektoru.

3.4.4 DNS stanovení redukujících sacharidů hydrolyzátu

Tato metoda je založena na reakci 3,5-dinitrosalicylové kyseliny s D-glukózou. Při reakci se 3,5-dinitrosalicylová kyselina mění na 3-amino-5-nitrosalicylát za dodání energie, nejčastěji zahřátím. Jedná se o kolorimetrickou metodu, tudíž se sleduje barevná změna ze žlutého zabarvení na oranžové [68].

Bylo připraveno 200 ml zásobního roztoku DNS činidla. Nejprve byly přidány 2 g kyseliny 3,5-dinitrosalycilové ke 100 ml destilované vody, následně bylo přidáno 40 ml 2 mol/lroztoku NaOH a 60 g vínanu sodno-draselného. Tento roztok byl doplněn na objem 200 ml.

Pro kalibrační křivku byl využit zásobní roztok glukózy o koncentraci 3 g/l, který byl ředěn na koncentrace 0,6; 1,2; 1,8; 2,4; a 3 g/l. Do zkumavek bylo napipetováno 500 µl roztoku glukózy o určité koncentraci a doplněno o 500 µl DNS činidla. Zkumavky byly inkubovány při 70 °C na vodní lázni po dobu 10 minut. Po inkubaci byly roztoky ochlazeny a doplněny na objem 10 ml. Vzorky byly měřeny proti blanku při 540 nm.

Samotné vzorky byly připraveny obdobně v paralelních stanoveních. Do zkumavky byl přidán vhodně naředěný vzorek a DNS činidlo. Postup byl stejný jako u kalibračních roztoků. Blank byl připraven obdobně s rozdílem, že místo vzorku byla destilovaná voda. Následně proběhlo měření absorbance při 540 nm.

3.5 Stanovení optimálních podmínek vybraných enzymů

Pro určení optimální teploty enzymů byla použita metoda HPLC-RI. Byla provedena neutrální předúprava (viz kapitola 3.2) následovaná enzymatickou hydrolýzou při teplotách 30 °C, 40 °C, 50 °C; 60 °C a 70°C. Po 1 hodině působení enzymů byly hydrolyzáty analyzovány pomocí HPLC, čímž se zjišťovala optimální teplota pro aktivitu vybraných enzymů.

Podobně bylo stanoveno i optimální pH aktivity enzymů. Neutrální předúprava následovaná enzymatickou hydrolýzou probíhala v pufru o určitém pH; konkrétně 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 a 6,0. Opět po 1 hodině se vzorky analyzovaly pomocí HPLC, aby se stanovilo optimální pH pro enzymatickou aktivitu.

3.6 Metody pro charakterizaci mikrobiálních produktů

3.6.1 Stanovení koncentrace biomasy

Po ukončení kultivace byla gravimetricky stanovena biomasa. Vzorek byl centrifugován po dobu 5 minut při 6000 rpm. Supernatant byl slit a uschován pro další analýzy, usazená biomasa byla promyta destilovanou vodou a opět centrifugována za stejných podmínek. Následně byl slit supernatant po druhé centrifugaci a vzorek byl sušen v sušárně při 70 °C do konstantní hmotnosti.

3.6.2 Stanovení optické hustoty

Pomocí optické hustoty byl určen nárůst biomasy po kultivaci. Z paralelních kultivací byly odebrány vzorky, které byly následně vhodně naředěny. Nárůst bakteriální kultury byl spektrometricky stanoven při 630 nm. Jako blank sloužila destilovaná voda.

3.6.3 Stanovení obsahu PHA pomocí plynové chromatografie

Obsah PHA byl stanovován pomocí plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem (GC-FID). Vysušená biomasa byla navážena do vialek, kdy množství na analýzu odpovídalo 9–11 mg. K navážené biomase byl přidán 1 ml chloroformu a 0,8 ml transesterifikační směsi (15 % kyselina sírová v methanolu) a s vnitřním standardem kyselinou benzoovou – 5 mg/ml). Uzavřené vialky byly umístěny do termobloku na 94 °C po dobu 3 hodin. Po esterifikaci následovala příprava vzorků na GC. Nejprve byla provedena neutralizace vzorků s 0,5 ml 0,05 mol/l NaOH. Vialky byly protřepány a došlo k rozdělení fází. Do vialek s 900 µl isopropylalkoholu bylo odebráno 50 µl spodní organické fáze s obsahem methylesterů 3-hydroxyalkanových kyselin. Vzorky byly následně analyzovány pomocí GC-FID.

3.6.4 Iontová chromatografie

Iontová chromatografie s konduktometrickým detektorem (IC-CD) byla využívána ke stanovení koncentrace kyseliny mléčné. Ke kalibraci byly připraveny zásobní roztoky kyseliny citronové, mléčné a octové. Tyto roztoky byly analyzovány iontovou chromatografií za použití 0,5 mmol/l $HClO_4$ jako mobilní fáze. Průtok kolonou byl nastaven na 0,6 ml/min při teplotě 30 °C a tlaku 6,17 MPa. Jako supresor byl použit 10 mmol/l roztok LiCl. Výsledky byly automaticky vyhodnoceny softwarem MagICnet. Z výsledných dat byly sestaveny kalibrační křivky.

Vzorky supernatantů po kultivaci mléčných bakterií se vhodně naředily destilovanou vodou tak, aby celkový objem ve zkumavce činil 10 ml. Následně se vzorky analyzovaly pomocí IC-CD.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Hlavním cílem bakalářské práce bylo produkovat PHA z hydrolyzátu pšeničných otrub. Pro produkční kultivace byly zvoleny halofilní a termofilní mikroorganismy, konkrétně *Halomonas halophila*, *Halomonas organivorans* a dva kmeny *Schlegelella thermodepolymerans*. V další části experimentu byly hydrolyzáty použity pro produkci kyseliny mléčné pomocí bakterií rodu *Lactobacillus*.

4.1 Charakterizace pšeničných otrub

4.1.1 Charakterizace hlavních komponent pšeničných otrub

Pomocí dříve popsaných metod (viz kapitola 3.4.1) byl stanoven obsah a zastoupení jednotlivých komponent pšeničných otrub. Pomocí hydrolýz byla získána sušina, která se následně použila pro stanovení jednotlivých složek. Nejprve se stanovila holocelulóza (celková celulóza a hemicelulóza), ze které byl odstraněn lignin. Následně byl stanoven obsah celulózy a hemicelulózy v holocelulóze. Ze sušiny se stanovil i lignin a výsledky jsou uvedeny v tabulce 12. Mezi další komponenty otrub patří i škrob, proteiny nebo tuky. Z tohoto důvodu celulóza, hemicelulóza a lignin netvoří 100 % složení pšeničných otrub. Jelikož každá předúprava rozkládá jinou složku lignocelulózy, jsou složení podle předúpravy odlišná.

Tabulka 12: Obsah hlavních komponent pšeničných otrub

Hydrolýza	Holocelulóza [%]	Celulóza [%]	Hemicelulóza [%]	Lignin [%]
Kyselá	66,3	47,7	18,5	15,4
Bazická	44,9	8,6	36,3	19,0
Autolýza	62,2	8,2	54,0	71,3

4.2 Charakterizace hydrolyzátu z pšeničných otrub

V následujících kapitolách jsou hydrolyzáty připraveny pomocí enzymatické hydrolýzy s vybranou předúpravou. Postup metody je popsán v kapitole 3.2. Tyto hydrolyzáty jsou následně charakterizovány metodami zmíněnými v kapitole 3.4.

4.2.1 Stanovení obsahu fenolických látek v hydrolyzátu

V hydrolyzátech se spektrometricky sledoval obsah fenolických látek pomocí Folin-Ciocalteuva činidla a výsledky jsou uvedeny v tabulce 13. Hydrolyzáty po kyselé předúpravě obsahovaly nejvíce fenolických látek, které pro mikroorganismy působí inhibičně, a tím není tento typ předúpravy vhodný pro experimentální kultivace. Koncentrace fenolických sloučenin u kyselé předúpravy dosáhla 1326,9 mg/l. Nejmenší zastoupení bylo prokázáno v hydrolyzátech po neutrální předúpravě. Bazická předúprava měla mírně vyšší obsah fenolických látek než neutrální. Neutrální i bazická předúprava jsou z důvodu nižšího obsahu mikrobiálních inhibitorů vhodnější pro experimentální kultivace než kyselá.

Při kyselé předúpravě je rozkládána hlavně hemicelulóza, ale i část ligninu [66]. Během kyselé předúpravy vznikají fenolické látky, alifatické karboxylové kyseliny a furany [69]. Zejména

degradací ligninu se tvoří fenolické látky, které jsou inhibitory pro mikroorganismy. Z toho důvodu je očekávána vyšší koncentrace fenolických látek u kyselé předúpravy.

Tabulka 13: Obsah fenolických látek v hydrolyzátech

Hydrolýza	*c* [mg/l]
Neutrální	913,5 ± 21,2
Bazická	973,1 ± 15,4
Kyselá	1326,9 ± 11,5

4.2.2 Stanovení obsahu sacharidů v hydrolyzátech

4.2.2.1 HPLC-RI

Pomocí HPLC se stanovil kvantitativně i kvalitativně obsah monosacharidů v hydrolyzátech (tabulka 14). Výsledné koncentrace a zastoupení jednotlivých sacharidů se výrazně liší podle použité metody předúpravy. Kyselá předúprava vykazovala nejvyšší zastoupení monosacharidů: glukózy o koncentraci 28,6 g/l, arabinoxylanů s 20,7 g/l. Bazická a neutrální předúprava obsahovaly podobný obsah sacharidů, který byl téměř poloviční oproti kyselé předúpravě. U bazické i neutrální předúpravy se celkový obsah sacharidů pohyboval kolem 30 g/l, kdy obsah glukózy u bazické předúpravy byl stanoven na 21,6 g/l a u neutrální 21,3 g/l.

U kyselé předúpravy je vysoké zastoupení arabinoxylanů z důvodu štěpení hemicelulózy, ze které se uvolňuje zejména xylóza [66]. Oproti bazické a neutrální předúpravě je proto koncentrace arabinoxylanů výrazně vyšší.

Tabulka 14: Zastoupení sacharidů v hydrolyzátech po vybraných předúpravách následovaných enzymatickou hydrolýzou

Předúprava	*c* [g/l]			
	Arabinoxylany	Fruktóza	Glukóza	Celkem
Neutrální	7,8 ± 0,1	2,2 ± 0,1	21,3 ± 1,0	31,3 ± 8,0
Bazická	6,7 ± 0,1	1,7 ± 0,0	21,6 ± 1,6	30,0 ± 8,4
Kyselá	20,7 ± 0,4	1,2 ± 0,1	28,6 ± 0,1	50,6 ± 0,2

4.2.2.2 DNS metoda

V pšeničných hydrolyzátech byl stanoven obsah redukujících sacharidů pomocí DNS metody. V hydrolyzátech po kyselé předúpravě a enzymatické hydrolýze obsah sacharidů dosáhl nejvyšší koncentrace. U bazické a u neutrální předúpravy s enzymatickou hydrolýzou koncentrace dosáhla výrazně nižších hodnot. U kyselé předúpravy byl obsah redukujících sacharidů mnohem vyšší než u ostatních typů předúpravy a dá se říci, že nejúčinněji rozkládá lignocelulózu.

Tabulka 15: Koncentrace sacharidů po hydrolýze podle typu předúpravy pomocí DNS metody

Předúprava	***c* [g/l]**
Neutrální	47,3 ± 0,3
Bazická	45,9 ± 0,5
Kyselá	68,8 ± 0,6

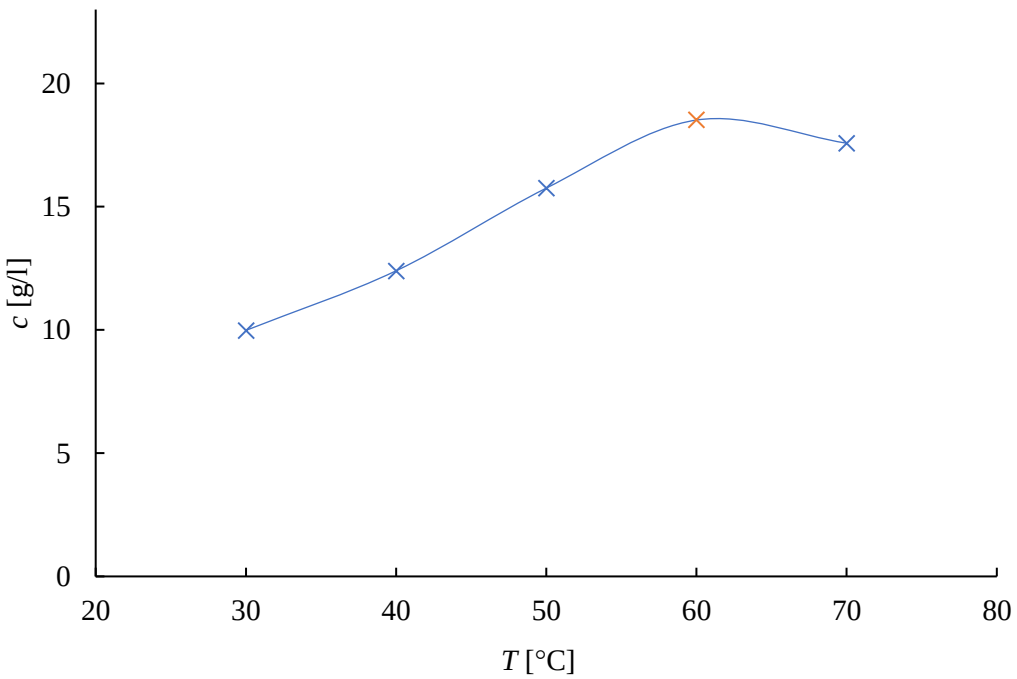
Metoda DNS a HPLC potvrdily, že obsah sacharidů u hydrolyzátů s kyselou předúpravou je mnohem vyšší než u bazické a neutrální. U obou metod kyselá předúprava dosáhla koncentrace sacharidů vyšší než 50 g/l a u bazické a neutrální předúpravy 30 g/l. Výsledky z HPLC a DNS se liší jen mírně, jelikož metoda DNS je kolorimetrickou metodou – proto je méně přesná než chromatografie. Na druhou stranu, pomocí HPLC byly analyzovány pouze sacharidy, na které byla metoda nakalibrována. Kyselá předúprava se sice jevila jako nejvýhodnější díky účinnému štěpení polysacharidů na monosacharidy, ale při této předúpravě vznikal příliš vysoký obsah fenolických sloučenin, který prokázala analýza pomocí Folin-Ciocalteuva činidla.

Před kultivací halofilních a termofilních bakteriálních kmenů byly sacharidy stanoveny metodou DNS a pro přípravu produkčních médií byly hydrolyzáty naředěny na optimální koncentraci 20 g/l pro růst mikroorganismů.

4.3 Stanovení aktivity hydrolytického koktejlu enzymů pomocí HPLC

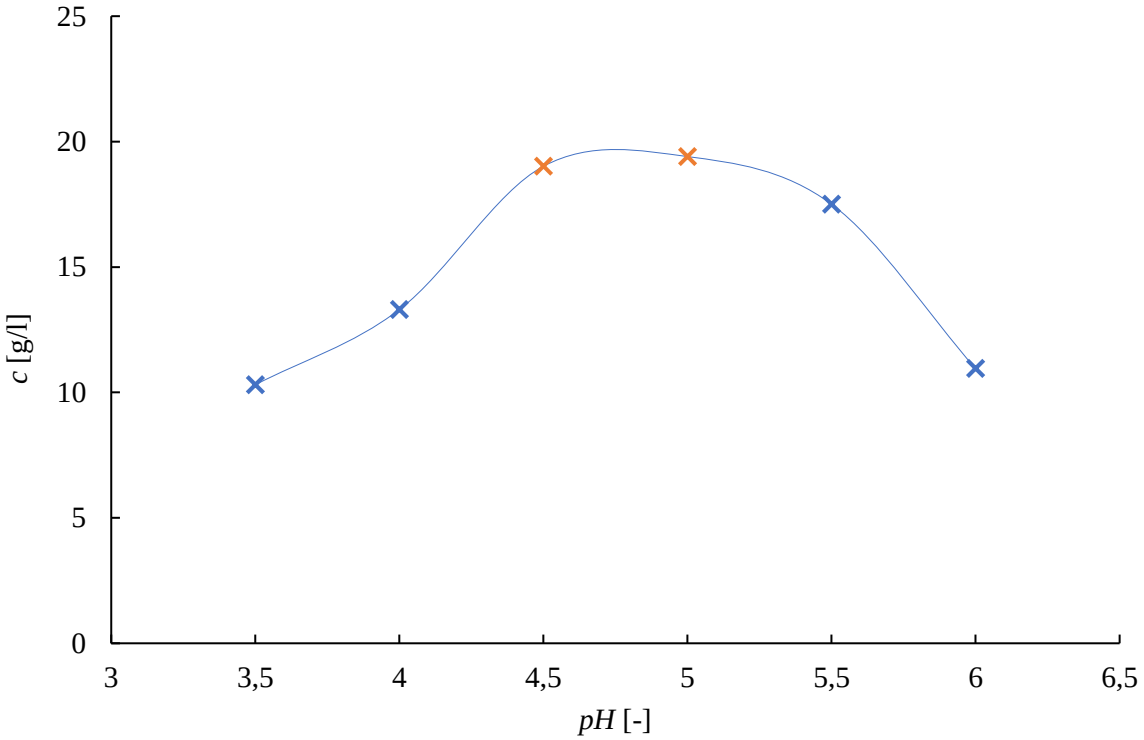
Cílem byla základní charakterizace enzymů, které se využívaly pro enzymatickou hydrolýzu. U hydrolytického koktejlu se optimalizovaly podmínky pro enzymatickou aktivitu, konkrétně teplota a pH. Postup pro optimalizaci podmínek enzymatické aktivity je uveden v kapitole 3.5.

Odebrané vzorky hydrolyzátů po 1 hodině podle teplot vykazovaly nárůst sacharidů v intervalu 50–60 °C. Při 30 °C se očekával nízký nárůst koncentrace sacharidů a při této teplotě také enzymy naštěpily necelých 10 g/l sacharidů. Při analyzovaných vzorcích, které byly odebrány po 5 hodinách působení podmínek na enzymy, tento trend také rostl, kdy při 30 °C byla koncentrace naštěpených sacharidů také nejnižší. Na následujícím obrázku jsou znázorněny optimální hodnoty podle teploty (obrázek 7).



Obrázek 7: Koncentrace naštěpených sacharidů v závislosti na teplotě po 1 hodině

U stanovení optimálního pH enzymatické směsi je opět potvrzen trend pro optimální pH, kdy při pH 3,5 je koncentrace sacharidů, po hodině působení enzymů, nejnižší. U vyššího pH se také očekával nižší obsah sacharidů, ten byl také podle analýzy potvrzen. Interval optimálního pH použitých komerčních enzymů podle certifikátu od výrobce je mezi pH 4–5. Podle analýzy je pro enzymatickou aktivitu optimální pH 4,5–5,0. Na obrázku 8 jsou znázorněny výsledky a optimum pH pro enzymatickou aktivitu.



Obrázek 8: Závislost koncentrace naštěpených sacharidů na pH po 1 hodině

4.4 Produkce PHA na hydrolyzátech z pšeničných otrub

4.4.1 Vyhodnocení nárůstu biomasy mikroorganismů

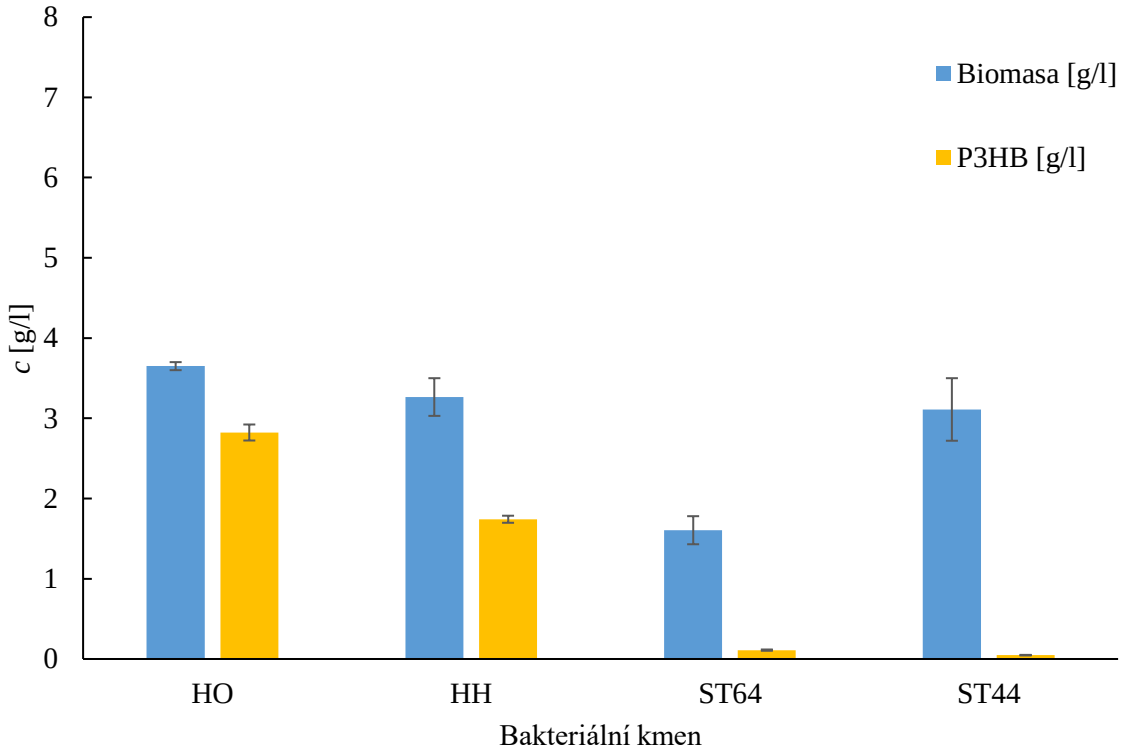
Nárůst biomasy byl stanoven pomocí gravimetrické metody. Po centrifugaci a sušení byla biomasa zvážena. Nejlepšími producenty P3HB byly halofilní bakteriální kmeny; *Halomonas organivorans* a *Halomonas halophila.* Jako výhodná z hlediska celkové hmotnosti biomasy se jevila bazická hydrolýza, ale ta obsahovala velké množství nečistot, tudíž její hmotnost je zkreslená. U kyselé předúpravy byly hodnoty koncentrace biomasy nižší i pro halofilní kmeny, i pro termofilní kmeny. U termofilních kmenů byla stanovená koncentrace biomasy výrazně nižší než u halofilních kmenů. U neutrální předúpravy koncentrace biomasy měla mírně vyšší hodnoty pro halofilní bakterie než u kyselé předúpravy, u termofilních kmenů byla koncentrace biomasy opět nižší, stejně jako při kyselé předúpravě. V hydrolyzátech s neutrální a kyselou předúpravou nebylo v hydrolyzátu takové množství nečistot jako u hydrolyzátu s bazickou předúpravou, proto nebyly výsledky výrazně zkreslené. Po této kultivaci byly vyřazeny termofilní bakterie a pro následné experimenty se využívaly pouze halofilní kmeny. Výsledky kultivace termofilních a halofilních kmenů jsou uvedeny v následující kapitole (obrázek 9, obrázek 10 a obrázek 11).

Při další kultivaci kmen *Halomonas organivorans* kultivovaný na hydrolyzátu upraveném neutrální cestou dosáhl koncentrace biomasy 3,90 g/l. U kyselé předúpravy byla koncentrace biomasy mírně nižší. U bazické předúpravy byla stanovena koncentrace biomasy mírně nižší než u neutrální předúpravy, ale opět byla hmotnost biomasy ovlivněna nečistotami z hydrolýzy, proto je výsledek zkreslený. Kmen *Halomonas halophila* dosahoval podobných výsledků. Těmito výsledky se potvrzuje, že neutrální předúprava se jevila jako výhodnější pro růst mikroorganismů a produkci biomasy. Výsledky jsou shrnuty v následující kapitole (obrázek 12).

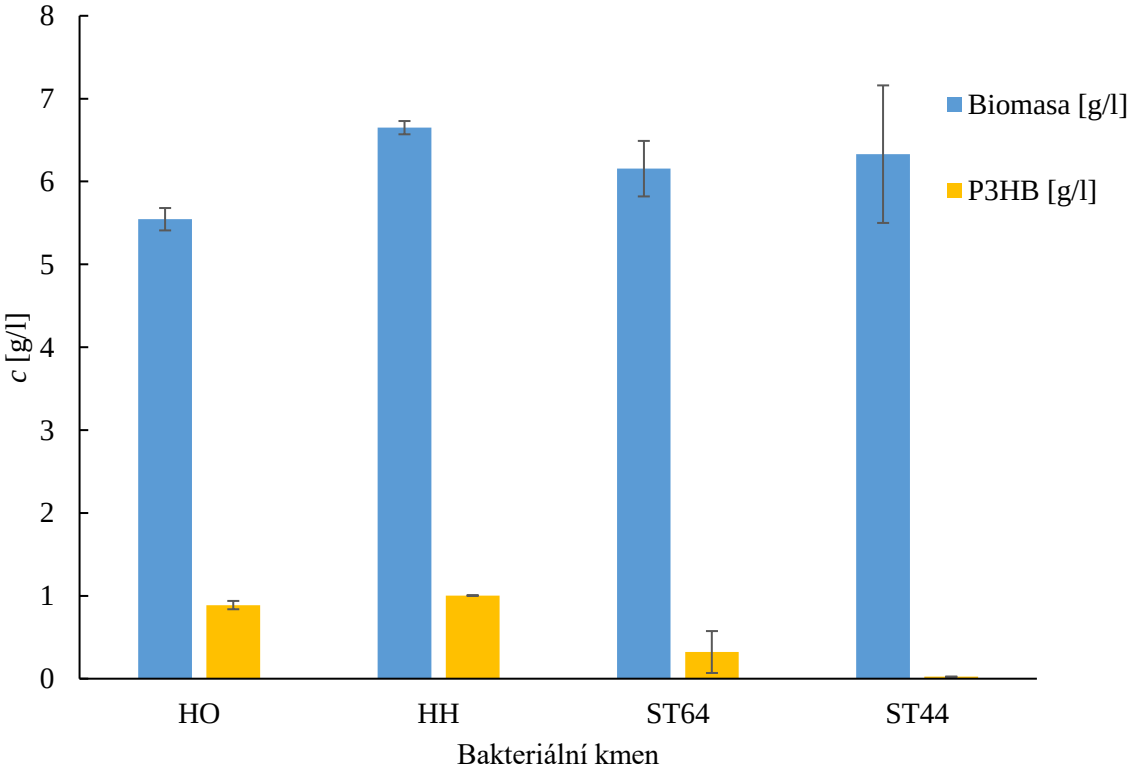
4.4.2 Stanovení obsahu PHA v biomase

Plynovou chromatografií byl stanoven obsah PHA v biomase u halofilních i termofilních bakterií. Pro halofilní kmeny kultivované na hydrolyzátech upravených neutrální cestou vykazovaly vyšší obsah P3HB než u termofilních kmenů. Nejvyšší koncentrace P3HB byla stanovena u kmene *Halomonas organivorans,*která činila 2,82 g/l P3HB a kmen *Halomonas halophila* měl mírně nižší výtěžnost. Termofilní kmeny dosahovaly výrazně nižších koncentrací, kdy se koncentrace P3HB nedostala nad hodnotu 0,2 g/l. U bazické předúpravy byla také stanovena koncentrace P3HB a hodnoty byly nižší než u neutrální předúpravy. Halofilní kmeny naprodukovaly kolem 1 g/l P3HB, termofilní kmeny se pohybovaly naopak u mnohem nižších hodnot, které nepřesáhly 0,5 g/l P3HB. Kyselá předúprava měla mírně nižší výtěžek P3HB než bazická. *Halomonas organivorans* při kultivaci v médiu z hydrolyzátu s kyselou předúpravou naprodukovala podobné množství P3HB jako *Halomonas halophila*. Oba kmeny naprodukovaly kolem 1 g/l P3HB. U termofilních kmenů byl obsah P3HB velmi nízký. Touto kultivací se z experimentálních kultivací vyřadily termofilní mikroorganismy, proto se další experimentální kultivace prováděli pouze s halofilními kmeny bakterií, které dosahovaly výrazně lepších výsledků. V následujících grafech jsou názvy mikroorganismů označeny zkratkami (*Halomonas organivorans* jako HO a *Halomonas halophila* HH., u kmenů

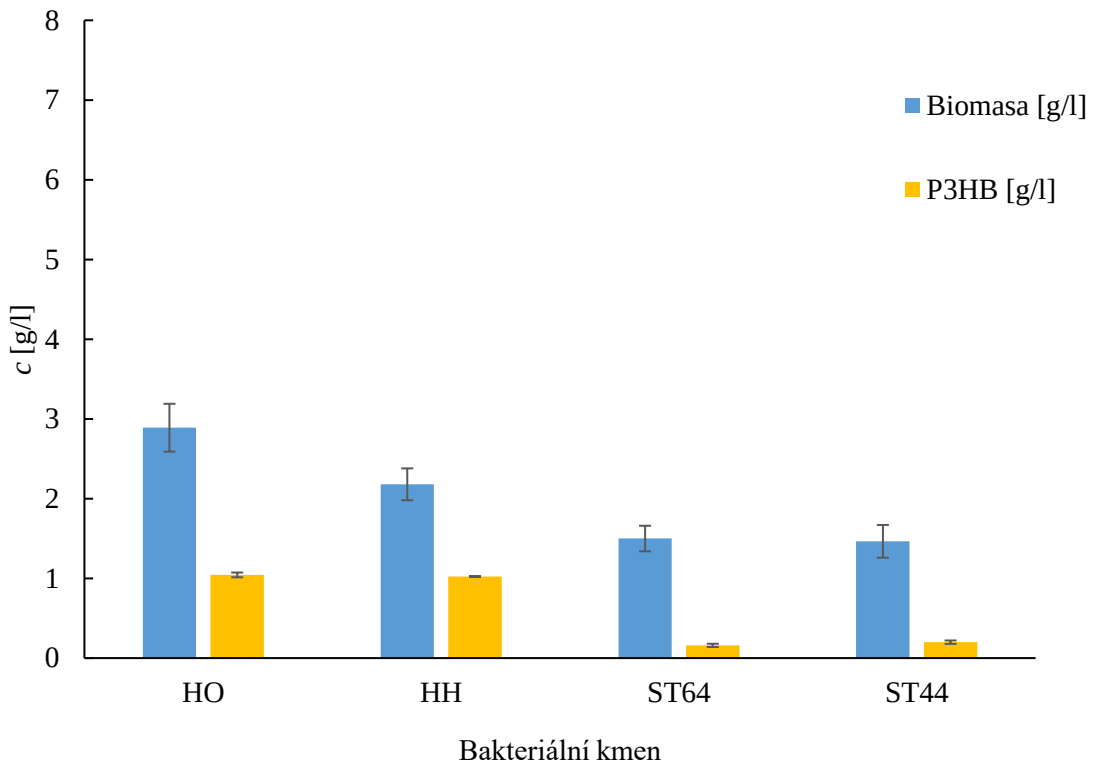
Schlegelella thermodepolymerans je přidáno i koncové dvojčíslí ze sbírkového čísla – ST44 a ST64).



Obrázek 10: Stanovený obsah P3HB v biomase u **neutrální předúpravy** hydrolyzátu



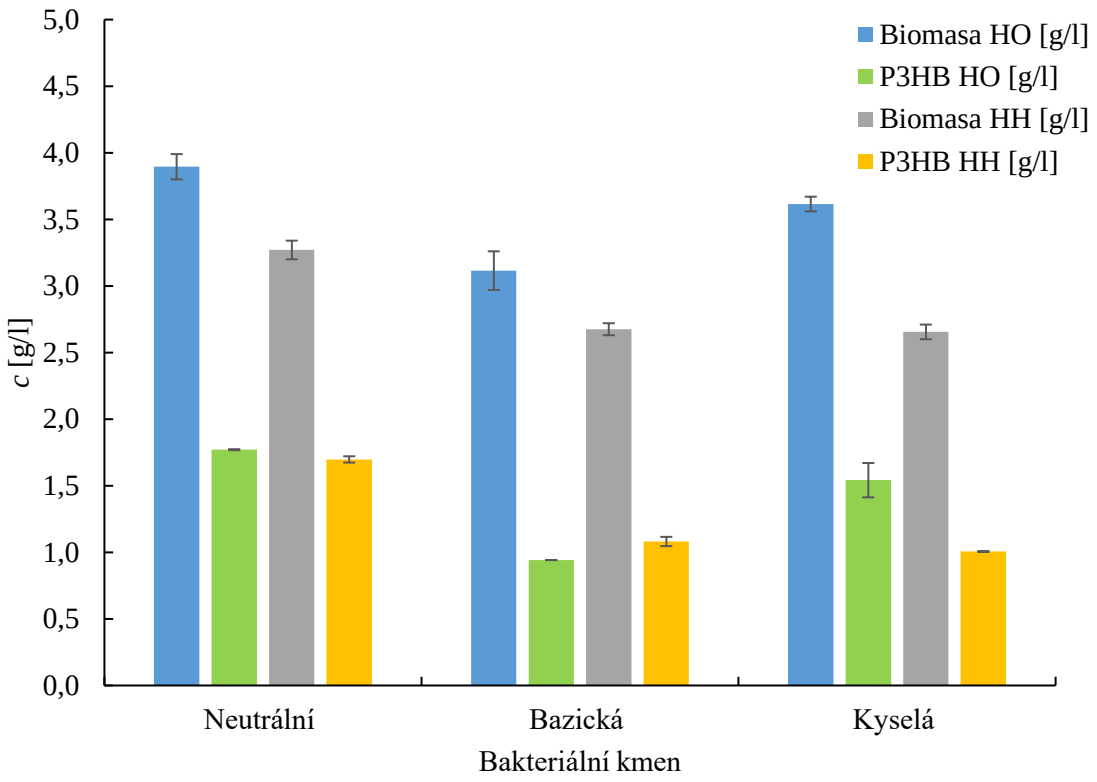
Obrázek 9: Stanovený obsah P3HB v biomase u **bazické předúpravy**



Obrázek 11: Stanovený obsah P3HB v biomase u **kyselé předúpravy**

Nejvyšší produkce P3HB byla očekávána u hydrolyzátů s neutrální předúpravou, u které byla stanovena nejnižší koncentrace inhibitorů ve formě fenolických sloučenin. U termofilních kmenů je produkce P3HB velmi nízká, jelikož používané kmeny *Schlegelella thermodepolymerans* preferují xylózu nad ostatními sacharidy [24]. Z důvodu ředění hydrolyzátu na optimální koncentraci pro růst mikroorganismů (20 g/l), byl obsah xylózy v hydrolyzátech pro produkci příliš nízký. Produkce termofilních kmenů na kyselé hydrolýze, u které byl stanoven vyšší obsah arabinoxylanů, byla omezena přítomnými mikrobiálními inhibitory.

V následující kultivaci byla sledována produkce PHA u halofilních kmenů. Neutrální předúprava se jevila jako nejúčinnější, kdy nejvyšší stanovená koncentrace byla u kmene *Halomonas organivorans*, který naprodukoval 1,77 g/l P3HB. Kyselá předúprava jevila se jako méně účinná, ale výsledné koncentrace P3HB jsou pouze mírně nižší než u neutrální předúpravy. U bazické předúpravy byly také detekovány P3HB, ale v nižší koncentraci než u kyselé předúpravy. V grafu jsou opět mikroorganismy uvedeny pod zkratkami (viz dříve).



Obrázek 12: Stanovený obsah P3HB v biomase u halofilních kmenů

Opět byla očekávána nejvyšší produkce na hydrolyzátu s neutrální předúpravou z důvodu nejnižšího obsahu mikrobiálních inhibitorů. Z výše uvedených výsledků se jako nejvýhodnější pro produkci P3HB jeví právě hydrolyzát připravený neutrální předúpravou. Za účinnou se dá považovat i kyselá předúprava, která vykazovala mírně nižší hodnoty koncentrace P3HB, ale v pro průmyslové manipulace je skrz koroze materiálu méně praktická. Mírně nižší výtěžek u hydrolyzátu s kyselou předúpravou byl způsoben přítomnými fenolickými látkami, které působily na mikroorganismy inhibičně.

4.4.3 Stanovení optické hustoty (OD)

Pro každé médium s bakteriálním kmenem byla stanovena hodnota OD při vlnové délce 630 nm. Nejvyšší hodnoty byly očekávány u halofilních mikroorganismů, jelikož u těch byly vyšší hodnoty biomasy stanoveny gravimetrickou metodou. U halofilních kmenů byla optická hustota mírně vyšší, termofilní kmeny měly rozdílné hodnoty v optických hustotách; *Schlegelella thermodepolymerans* se sériovým číslem DSM 15344 dosáhla výrazně nižších hodnot. Všechny hodnoty optických hustot podle bakteriálního kmene a typu předúpravy se směrodatnými odchylkami jsou uvedeny v následující tabulce (tabulka 16).

Tabulka 16: Optická hustota podle bakteriálního kmene a podle typu předúpravy

Kmen	Předúprava	OD [-]
Halomonas organivorans	Neutrální	13,59 ± 0,61
	Bazická	19,01 ± 0,04
	Kyselá	10,05 ± 0,05
Halomonas halophila	Neutrální	12,73 ± 0,45
	Bazická	22,45 ± 0,13
	Kyselá	21,11 ± 0,01
Schlegelella thermodepolymerans DSM 15264	Neutrální	11,54 ± 1,24
	Bazická	17,58 ± 0,10
	Kyselá	10,96 ± 0,29
Schlegelella thermodepolymerans DSM 15344	Neutrální	4,45 ± 0,05
	Bazická	22,63 ± 1,18
	Kyselá	6,61 ± 0,64

Při kultivaci pouze halofilních kmenů, byla naměřená optická hustota výrazně nižší než u předchozí kultivace. Hodnoty OD u této kultivace nepřekročily hodnotu 15. U *Halomonas organivorans* nejvyšší hodnota OD byla stanovena u neutrální předúpravy. Bazická předúprava měla mírně nižší hodnotu. Hydrolyzáty připravené kyselou předúpravou měly nejnižší optickou hustotu ve srovnání ostatními typy předúprav. Výrazně rozdílné hodnoty OD měla i *Halomonas halophila*; nejvyšší hodnoty dosáhla také u neutrální předúpravy, u bazické je podobný případ jako u *Halomonas organivorans*, kdy OD je jedna z vyšších hodnot, ale výsledek je zkreslen nečistotami. Kyselá hydrolýza měla také nejnižší hodnotu OD. Všechny hodnoty OD jsou uvedeny v následující tabulce (tabulka 17).

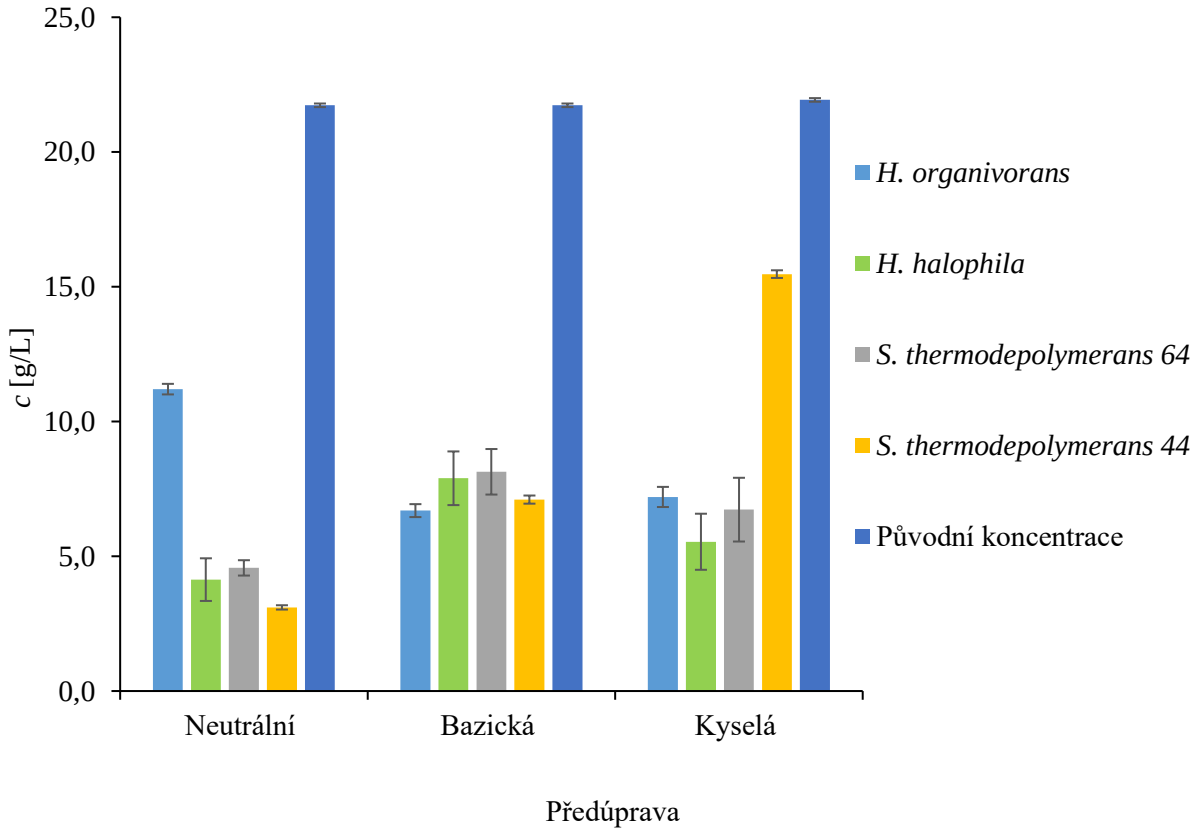
Tabulka 17: Hodnoty optické hustoty podle typu předúpravy pro halofilní kmeny

Kmen	Předúprava	OD [-]
Halomonas organivorans	Neutrální	14,813 ± 0,029
	Bazická	13,338 ± 0,008
	Kyselá	12,050 ±0,007
Halomonas halophila	Neutrální	9,575 ± 0,007
	Bazická	8,100 ± 0,003
	Kyselá	6,950 ±0,008

4.5 Charakterizace hydrolyzátu po kultivaci

Po kultivaci byl získán supernatant, který byl následně analyzován pomocí metody DNS, aby se zjistila spotřeba sacharidů na produkci PHA a růst biomasy. U jednotlivých kmenů se stanovily zbytkové redukující sacharidy z původní koncentrace. Největší úbytek byl pozorován u kmene *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15264, kdy nejvyšší spotřeba se určila u neutrální předúpravy, a u kmene *Halomonas halophila*, kdy největší úbytek byl také zaznamenán u neutrální předúpravy pšeničných otrub. Zvláštností byla nízká spotřeba sacharidů u *Halomonas organivorans*, kdy konečnou koncentraci sacharidů po kultivaci na médiu z hydrolyzátu s neutrální předúpravou činilo 11,20 g/l. Vzhledem k vysoké produkci P3HB se očekávala vyšší spotřeba jako například u *Halomonas halophila*, která měla také poměrně vysokou produkci P3HB s vyšší spotřebou sacharidů. U kmene *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344 nebyla nízká spotřeba sacharidů překvapující, jelikož i produkce P3HB byla nízká.

Po stanovení zbytkových sacharidů byly určeny i výtěžnostní koeficienty pro každý kmen a typ předúpravy, které jsou uvedeny v následující tabulce (tabulka 18). Pro termofilní kmeny byly výtěžnostní koeficienty velmi malé z důvodu velmi nízké produkce PHA. Podle hodnot výtěžnostních koeficientů bylo patrné, že halofilním kmenům více vyhovuje tento substrát, a proto bylo výhodnější pro následující experimentální kultivaci termofilní kmeny vyřadit.

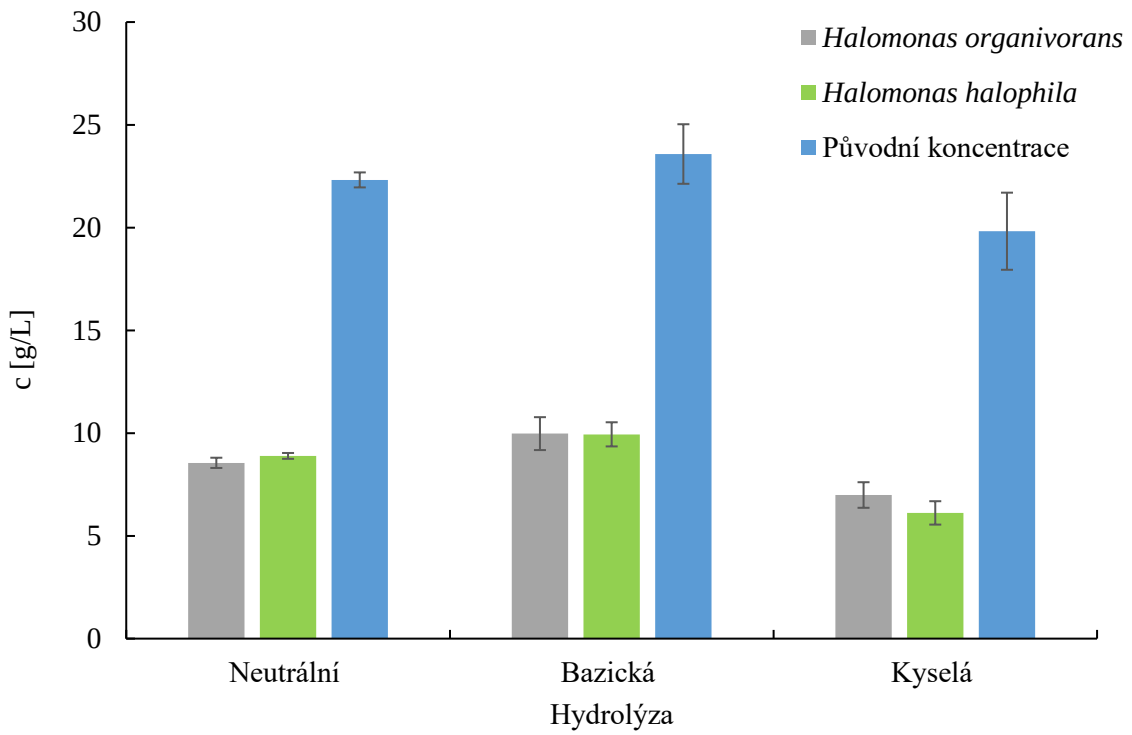


Obrázek 13: Koncentrace zbytkových sacharidů po kultivaci podle typu předúpravy a bakteriálního kmene

Tabulka 18: Výtěžnostní koeficienty halofilních i termofilních kmenů

Kmen	Předúprava	$Y_{P/S}$ [g/g]
Halomonas organivorans	Neutrální	0,268 ± 0,004
	Bazická	0,059 ± 0,002
	Kyselá	0,071 ± 0,036
Halomonas halophila	Neutrální	0,099 ± 0,002
	Bazická	0,073 ± 0,034
	Kyselá	0,062 ± 0,004
Schlegelella thermodepolymerans DSM 15264	Neutrální	0,006 ± 0,001
	Bazická	0,024 ± 0,017
	Kyselá	0,011 ± 0,001
Schlegelella thermodepolymerans DSM 15344	Neutrální	0,0012 ± 0,0002
	Bazická	0,0016 ± 0,0002
	Kyselá	0,0309 ± 0,0026

Při následné kultivaci s halofilními kmeny byl také sledován úbytek z celkového obsahu sacharidů po kultivaci. Z původní koncentrace 22,3 g/l u neutrální předúpravy, se u obou kmenů zbytková koncentrace sacharidů pohybovala přes 8 g/l. Nejvyšší koncentrace zbytkových sacharidů byla stanovena u kyselé předúpravy. U bazické předúpravy je zbytková koncentrace sacharidů výrazně vyšší ve srovnání s kyselou předúpravou. Nejvyšší spotřeba byla očekávána u neutrální předúpravy, ale zbytkové sacharidy byly zastoupeny v koncentraci přes 8 g/l. Ve výsledku byla spotřeba sacharidů velmi podobná, avšak s produkcí si lépe vedla *Halomonas organivorans*, která díky tomu měla vyšší výtěžnostní koeficienty. Výtěžnostní koeficienty pro všechny typy předúprav a halofilní kmeny jsou uvedeny v tabulce (tabulka 19).



Obrázek 14: Stanovená koncentrace zbytkových sacharidů podle typu předúpravy pro halofilní kmeny

Tabulka 19: Výtěžnostní koeficienty podle typu předúpravy pro halofilní kmeny

Kmen	**Předúprava**	**Y P/S [g/g]**
	Neutrální	0,129 ± 0,003
Halomonas organivorans	Bazická	0,069 ± 0,033
	Kyselá	0,120 ± 0,016
	Neutrální	0,126 ± 0,004
Halomonas halophila	Bazická	0,079 ± 0,006
	Kyselá	0,073 ± 0,005

Díky výtěžnostním koeficientům se potvrzuje, že neutrální předúprava hydrolyzátů se jeví jako nejúčinnější z důvodu nejvyšší hodnoty výtěžnostního koeficientu. I přesto že u kyselé předúpravy u kultivace pouze s halofilními kmeny mají mikroorganismy největší spotřebu uhlíkového zdroje, nedokážou jej efektivně využít pro produkci PHA jako při neutrální předúpravě. Následně je zde i potvrzena nízká efektivita bazické předúpravy, kdy její výtěžnostní koeficienty dosahují nižších hodnot než u kyselé a neutrální předúpravy.

4.6 Kultivace kmenů *Lactobacillus*

4.6.1 Charakterizace hydrolyzátu před kultivací

Z předchozích výsledků se prokázalo, že nejvýhodnější metodou přípravy produkčního média pro produkci PHA je neutrální předúprava s enzymatickou hydrolýzou – má nízký obsah fenolických látek, optimální obsah redukujících sacharidů. Proto byl tento postup využit i pro produkci kyseliny mléčné pomocí bakterií *Lactobacillus*. Z kapalinové chromatografie byl určen obsah sacharidů na 33,7 g/l, proto se hydrolyzát naředil s destilovanou vodou, aby koncentrace sacharidů byla optimálních 20 g/l.

Tabulka 20: Stanovený obsah sacharidů v hydrolyzátu metodami DNS a HPLC

Metoda	Sacharid	c [g/l]
DNS	Všechny redukující	40,7
HPLC	Arabinoxylany	7,7
	Fruktóza	2,0
	Glukóza	24,0
	Celkem	33,7

Stanovil se i obsah fenolických látek po hydrolýze s neutrální předúpravou, který odpovídal 992,31 mg/l.

4.6.2 Stanovení biomasy

Pomocí gravimetrické metody byl stanoven nárůst biomasy. Po kultivaci a následné centrifugaci byl uchován supernatant pro stanovení spotřeby sacharidů kulturou a pro stanovení kyseliny mléčné za pomoci iontové chromatografie. Usazená biomasa se po vysušení zvážila pro určení její koncentrace v médiu. Nejlépe rostl kmen *Lactobacillus rhamnosus*, který dosáhl koncentrace biomasy téměř 4 g/l. Druhá nejvyšší hmotnost biomasy byla u *Lactobacillus casei*, a nejméně narostl kmen *Lactobacillus plantarum*. Až na *Lactobacillus plantarum* se výsledná koncentrace biomasy výrazně neliší.

Tabulka 21: Stanovená koncentrace biomasy gravimetrickou metodou pro kmeny *Lactobacillus*

Kmen	*c* [g/l]
Lactobacillus casei	3,73 ± 0,11
Lactobacillus plantarum	2,67 ± 0,04
Lactobacillus rhamnosus	3,83 ± 0,11

4.6.3 Stanovení optické hustoty

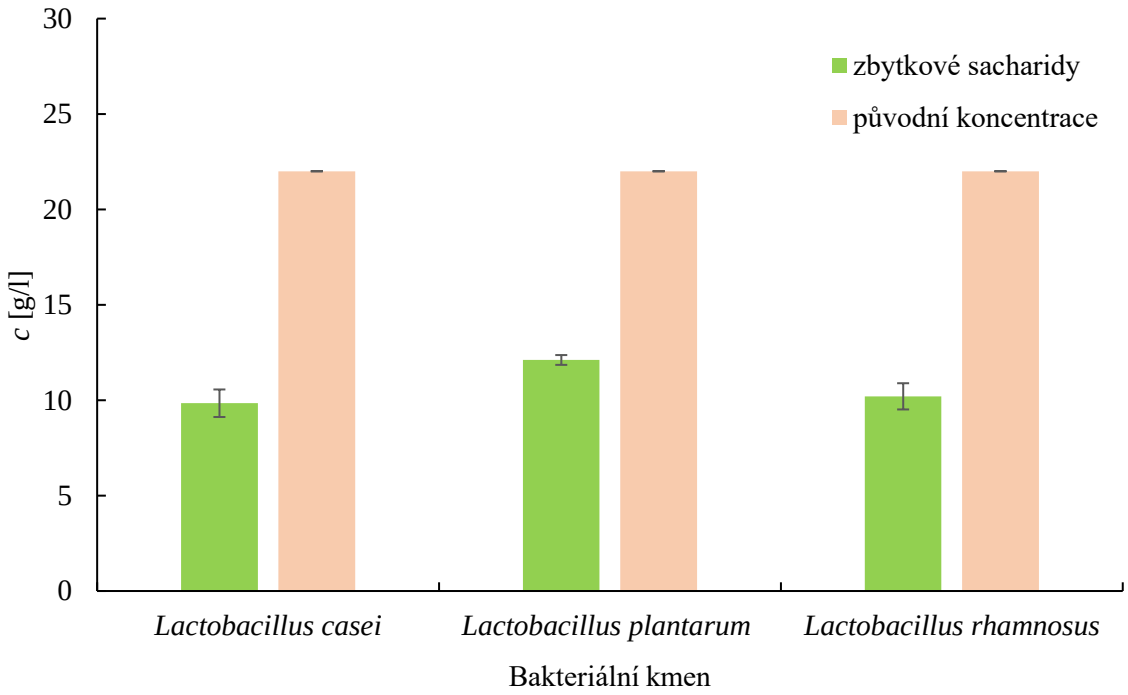
Po 48 hodinách kultivace se stanovila i optická hustota při 630 nm. Hodnoty u všech tří kmenů přesáhly hodnotu 20. Nejvyšší hodnoty dosáhly kmeny *Lactobacillus rhamnosus* a *Lactobacillus casei* jako u gravimetrické metody stanovení biomasy. Nejnižší hodnota optické hustoty byla stanovena u kmene *Lactobacillus plantarum*.

Tabulka 22: Hodnoty naměřené optické hustoty pro kmeny *Lactobacillus*

Kmen	OD [-]
Lactobacillus casei	26,41 ± 1,31
Lactobacillus plantarum	22,70 ± 4,33
Lactobacillus rhamnosus	27,55 ± 0,53

4.6.4 Charakterizace obsahu zbytkových sacharidů po kultivaci

Po kultivaci byla stanovena zbytková koncentrace sacharidů pomocí DNS metody a HPLC, aby byla zjištěna spotřeba na produkci kyseliny mléčné a růst biomasy. Spotřeba sacharidů z původní koncentrace se lišila mezi kmeny pouze mírně. Podle metody DNS, nejvyšší spotřebu sacharidů měl kmen *Lactobacillus casei*. Druhá nejvyšší spotřeba sacharidů z média patří kmeni *Lactobacillus rhamnosus*. Nejmenší spotřebu měl kmen *Lactobacillus plantarum*. Všechny kmeny ale spotřebovaly kolem 10 g/l sacharidů za 48 hodin a výsledné zbytkové koncentrace mezi nimi nejsou příliš rozdílné.



Obrázek 15: Stanovené zbytkové sacharidy pomocí DNS metody podle bakteriálního kmene

Pomocí HPLC bylo zjištěno, že zbytkové sacharidy tvořily pouze arabinoxylany. U *Lactobacillus casei* byla výsledná koncentrace zbytkových arabinoxylanů podobná i u *Lactobacillus rhamnosus*, kdy tato koncentrace nepřekročila 3 g/l. U *Lactobacillus plantarum* byla stanovena nejnižší koncentrace, podobně jako u DNS metody.

Tabulka 23: Stanovené zbytkové sacharidy pomocí HPLC

Kmen	***c* [g/l]**
Lactobacillus casei	2,98 ± 0,64
Lactobacillus plantarum	3,10 ± 0,18
Lactobacillus rhamnosus	2,85 ± 0,01

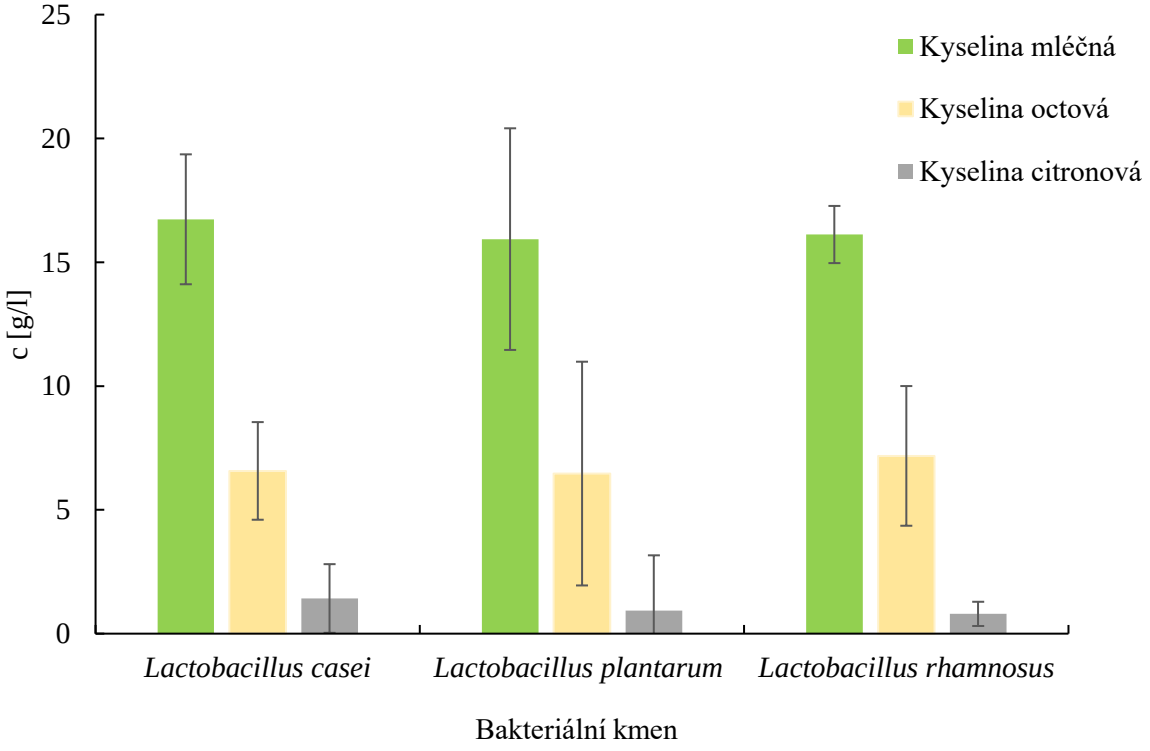
Výsledky z HPLC a DNS metody jsou rozdílné z důvodu možného obsahu dalších redukujících sacharidů, které nebyly na HPLC stanovovány. Ze sledovaných redukujících sacharidů byly glukóza a fruktóza zcela spotřebovány a detekovány byly pouze arabinoxylany, které nebyly bakteriemi mléčného kvašení využity.

4.6.5 Produkce kyseliny mléčné a organických kyselin

Pomocí IC-CD byl stanoven obsah kyseliny mléčné a zároveň byly ve vzorcích detekovány kyselina octová a kyselina citronová. Primárně byla očekávána kyselina mléčná, která byla naprodukována všemi kmeny v koncentraci kolem 16 g/l. Nejvyšší produkce byla detekována u *Lactobacillus casei*. Podobná koncentrace byla stanovena i u *Lactobacillus rhamnosus* a mírně nižší hodnota se objevila u *Lactobacillus plantarum*. U kmene *Lactobacillus plantarum* byla nižší koncentrace kyseliny mléčné očekávána z důvodu nižší spotřeby sacharidů.

Dále byla produkována kyselina octová a kyselina citronová. Nejvyšší obsah kyseliny octové byl stanoven u kmene *Lactobacillus rhamnosus* a nejnižšší u kmene *Lactobacillus casei*. Kyselina octová nemusí být produktem metabolismu bakterií. Během hydrolýzy lignocelulózových materiálů vzniká jako vedlejší produkt [69].

U kyseliny citronové byla koncentrace výrazně nižší než u kyseliny mléčné či octové. Koncentrace naprodukované kyseliny citronové byla nejvyšší u kmene *Lactobacillus casei*, následně nejnižší koncentrace byla stanovena u kmene *Lactobacillus rhamnosus*, kdy koncentrace kyseliny citronové nepřesáhla 1 g/l.



Obrázek 16: Stanovené obsahy organických kyselin pro kmeny *Lactobacillus*

Při srovnání produkce všech zmíněných organických kyselin se jako nejlepší producent jeví *Lactobacillus casei*, který dosahoval nejvyšších koncentrací organických kyselin, kromě kyseliny octové. Koncentrace naprodukovaných kyselin byly pro kmeny podobné a příliš se nelišily, ale méně výhodným producentem na uhlíkovém substrátu z pšeničných hydrolyzovaných otrub se jeví *Lactobacillus plantarum*.

5 ZÁVĚR

V této bakalářské práci se uplatňovaly myšlenky nového směru biotechnologie, Next generation industrial biotechnology. Tento směr má aplikovat využití odpadních materiálů pro snížení výrobní ceny nových materiálů, například PHA produkce pomocí extremofilních mikroorganismů. Jelikož produkce a zpracování PHA je velmi nákladné, byla aplikována myšlenka využití a valorizace odpadu, konkrétně pšeničných otrub, a extremofilních bakteriálních kmenů.

Pšeničné otruby se jeví jako odpadní materiál s velkým potenciálem pro další využití. Po hydrolýzách se tyto extrakty charakterizovaly pomocí vybraných metod. Nejvíce zastoupenými sacharidy byla glukóza, arabinoxylany a v minoritním množství i fruktóza. Stanovovaly se i mikrobiální inhibitory ve formě polyfenolických látek, které prokázaly různé koncentrační zastoupení v hydrolyzátech podle zvolené předúpravy. Z extremofilních bakterií byly zvoleny čtyři kmeny, dva halofilní a dva termofilní, a byla sledována jejich schopnost využít poskytnutý uhlíkový zdroj ve formě sacharidů získaných hydrolýzou odpadního materiálu pro produkci PHA. Nejlepším producentem se ukázala halofilní bakterie *Halomonas organivorans*. Termofilním kmenům tento substrát nevyhovoval, jelikož jejich produkce P3HB byla velmi nízká a, podle výtěžnostních koeficientů, nebyly schopny tento substrát efektivně využít pro P3HB syntézu. Naopak halofilním organismům substrát vyhovoval a byly schopny uhlíkový substrát využít pro produkci PHA.

Následně halofilní kmeny potvrdily, že nejefektivněji je pro ně využitelný uhlíkový substrát, který byl připraven neutrální předúpravou a následnou enzymatickou hydrolýzou. Při kultivaci na tomto substrátu *Halomonas organivorans* dosáhla produkce až 2,82 g/l P3HB. Během neutrální předúpravy se nepoužívají chemikálie, které by zdražovaly průmyslový provoz nebo byly zátěží pro životní prostředí. U neutrální předúpravy je sice nižší výtěžnost sacharidů po hydrolýze ve srovnání s kyselou předúpravou, ale během neutrální předúpravy není produkováno takové množství mikrobiálních inhibitorů, které snižují možnost efektivního využití substrátu. I přes velkou výtěžnost sacharidů je kyselá předúprava s enzymatickou hydrolýzou pro průmyslovou aplikaci méně výhodná. Důvodem je také manipulace s minerálními kyselinami a případná nutnost zařízení kroku detoxikace připraveného hydrolyzátu.

V dalším experimentu byl hydrolyzát po neutrální předúpravě a enzymatické hydrolýze využit ke kultivaci vybraných kmenů *Lactobacillus* za účelem produkce kyseliny mléčné. Ukázalo se, že použitým kmenům zdroj uhlíku vyhovoval a všechny kmeny se ukázaly jako výhodní producenti kyseliny mléčné na tomto substrátu.

Z uvedených výsledků se dá o otrubách uvažovat jako o vhodném zdroji uhlíku pro bakterie za účelem produkce P3HB a kyseliny mléčné. Substrát je výhodný pro halofilní kmeny, konkrétně kmen *Halomonas organivorans*, která se osvědčila pro produkci P3HB z hydrolyzátu pšeničných otrub s neutrální předúpravou. S případnou optimalizací a po scale-up procesu by bylo možné je aplikovat v průmyslu.

6 BIBLIOGRAFIE

[1] DIETRICH, Karolin, Marie-Josée DUMONT, Luis F. DEL RIO a Valérie ORSAT. Sustainable PHA production in integrated lignocellulose biorefineries. *New Biotechnology* [online]. 2019, **49**, 161-168 [cit. 2021-10-28]. ISSN 18716784. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbt.2018.11.004

[2] IBRAHIM, Mohammad I., Diya ALSAFADI, Khalid A. ALAMRY a Mahmoud A. HUSSEIN. Properties and Applications of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Biocomposites. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2021, **29**(4), 1010-1030 [cit. 2021-10-28]. ISSN 1566-2543. Dostupné z: doi:10.1007/s10924-020-01946-x

[3] ZINN, M. a R. HANY. Tailored Material Properties of Polyhydroxyalkanoates through Biosynthesis and Chemical Modification. *Advanced Engineering Materials* [online]. 2005, **7**(5), 408-411 [cit. 2021-10-28]. ISSN 1438-1656. Dostupné z: doi:10.1002/adem.200500053

[4] 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. 2021-10-28]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2021.124791

[5] DOPPALAPUDI, Sindhu, Anjali JAIN, Wahid KHAN a Abraham J. DOMB. Biodegradable polymers-an overview. *Polymers for Advanced Technologies* [online]. 2014, **25**(5), 427-435 [cit. 2021-10-28]. ISSN 10427147. Dostupné z: doi:10.1002/pat.3305

[6] MCMURRY, John. *Organická chemie*. 1st edition. Brno: Vysoké učení technické v Brně, nakladatelství VUTIUM, 2015, s. 780-782. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-214-4769-1.

[7] GALIANO, Francesco, Kelly BRICEñO, Tiziana MARINO, Antonio MOLINO, Knud Villy CHRISTENSEN a Alberto FIGOLI. Advances in biopolymer-based membrane preparation and applications. *Journal of Membrane Science* [online]. 2018, **564**, 562-586 [cit. 2021-10-28]. ISSN 03767388. Dostupné z: doi:10.1016/j.memsci.2018.07.059

[8] LU, Jingnan, Ryan C. TAPPEL a Christopher T. NOMURA. Mini-Review: Biosynthesis of Poly(hydroxyalkanoates). *Polymer Reviews* [online]. 2009, **49**(3), 226-248 [cit. 2021-10-28]. ISSN 1558-3724. Dostupné z: doi:10.1080/15583720903048243

[9] SUDESH, K, H ABE a Y DOI. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science* [online]. 2000, **25**(10), 1503-1555 [cit. 2021-10-28]. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/S0079-6700(00)00035-6

[10] MORYA, Raj, Aditi SHARMA, Madan KUMAR, Bhawna TYAGI, Shashi Shekhar SINGH a Indu Shekhar THAKUR. Polyhydroxyalkanoate synthesis and characterization: A proteogenomic and process optimization study for biovalorization of industrial lignin.

Bioresource Technology [online]. 2021, **320** [cit. 2021-10-28]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2020.124439

[11] YANG, Jung Eun, Yong Jun CHOI, Se Jin LEE et al. Metabolic engineering of Escherichia coli for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from glucose. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2014, **98**(1), 95-104 [cit. 2021-10-28]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-013-5285-z

[12] MENG, De-Chuan, Rui SHEN, Hui YAO, Jin-Chun CHEN, Qiong WU a Guo-Qiang CHEN. Engineering the diversity of polyesters. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2014, **29**, 24-33 [cit. 2021-10-28]. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2014.02.013

[13] DE OLIVEIRA, Rafael David, Vânia NOVELLO, Luiziana Ferreira DA SILVA, José Gregório Cabrera GOMEZ a Galo Antonio Carrillo LE ROUX. Glucose metabolism in Pseudomonas aeruginosa is cyclic when producing Polyhydroxyalkanoates and Rhamnolipids. *Journal of Biotechnology* [online]. 2021, **342**, 54-63 [cit. 2021-11-24]. ISSN 01681656. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiotec.2021.10.007

[14] TRIPATHI, Lakshmi, Lin-Ping WU, Meng DECHUAN, Jinchun CHEN, Qiong WU a Guo-Qiang CHEN. Pseudomonas putida KT2442 as a platform for the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates with adjustable monomer contents and compositions. *Bioresource Technology* [online]. 2013, **142**, 225-231 [cit. 2021-10-28]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2013.05.027

[15] CHEN, Guo-Qiang, Ivan HAJNAL, Hong WU, Li LV a Jianwen YE. Engineering Biosynthesis Mechanisms for Diversifying Polyhydroxyalkanoates. *Trends in Biotechnology* [online]. 2015, **33**(10), 565-574 [cit. 2021-10-28]. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2015.07.007

[16] PRAJAPATI, Karan, Radhika NAYAK, Arpit SHUKLA, Paritosh PARMAR, Dweipayan GOSWAMI a Meenu SARAF. Polyhydroxyalkanoates: An Exotic Gleam in the Gloomy Tale of Plastics. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2021, **29**(7), 2013-2032 [cit. 2022-05-17]. ISSN 1566-2543. Dostupné z: doi:10.1007/s10924-020-02025-x

[17] KOVALCIK, Adriana, Jiri SMILEK, Michal MACHOVSKY et al. Properties and structure of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) filaments for fused deposition modelling. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2021, **183**, 880-889 [cit. 2021-10-28]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.04.183

[18] 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. 2021-10-28]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2020.123885

[19] CHEN, Guo-Qiang a Xiao-Ran JIANG. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2018, **50**, 94-100 [cit. 2021-10-28]. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2017.11.016

[20] AHANGARI, Hossein, Parivar YAZDANI, Vida EBRAHIMI, Saiedeh Razi SOOFIYANI, Robab AZARGUN, Vahideh TARHRIZ a Shirin EYVAZI. An Updated review on production of food derived bioactive peptides; focus on the psychrotrophic bacterial proteases. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* [online]. 2021, **35** [cit. 2021-10-28]. ISSN 18788181. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcab.2021.102051

[21] UDDIN, Md Raihan, Pranab ROY a Sukhendu MANDAL. Production of extracellular lipase from psychrotrophic bacterium Oceanisphaera sp. RSAP17 isolated from arctic soil. *Antonie van Leeuwenhoek* [online]. [cit. 2021-10-28]. ISSN 0003-6072. Dostupné z: doi:10.1007/s10482-021-01671-y

[22] ATALAH, Joaquín, Paulina CÁCERES-MORENO, Giannina ESPINA a Jenny M. BLAMEY. Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts. *Bioresource Technology* [online]. 2019, **280**, 478-488 [cit. 2021-10-28]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2019.02.008

[23] EHSAAN, Muhammad, Jonathan BAKER, Katalin KOVÁCS, Naglis MALYS a Nigel P. MINTON. The pMTL70000 modular, plasmid vector series for strain engineering in Cupriavidus necator H16. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2021, **189** [cit. 2021-10-29]. ISSN 01677012. Dostupné z: doi:10.1016/j.mimet.2021.106323

[24] 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. 2021-10-29]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2021.124704

[25] WENDLANDT, K.-D, M JECHOREK, J HELM a U STOTTMEISTER. Producing poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular mass from methane. *Journal of Biotechnology* [online]. 2001, **86**(2), 127-133 [cit. 2021-10-28]. ISSN 01681656. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-1656(00)00408-9

[26] ZHANG, Yingxin, Jiaying XIN, Linlin CHEN, Hao SONG a Chungu XIA. Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular weight by methanotroph from methane and methanol. *Journal of Natural Gas Chemistry* [online]. 2008, **17**(1), 103-109 [cit. 2021-10-28]. ISSN 10039953. Dostupné z: doi:10.1016/S1003-9953(08)60034-1

[27] OJHA, Purusottam, Narayani Prasad KAR, Shreenath NAYAK, Ashok Kumar PATRA a Khirod Kumar SAHOO. Isolation of a broad spectrum antimicrobial producing thermophilic Bacillus and characterization of its antimicrobial protein. *Archives of Microbiology* [online]. 2021, **203**(5), 2059-2073 [cit. 2021-10-28]. ISSN 0302-8933. Dostupné z: doi:10.1007/s00203-020-02162-w

[28] HITSCHLER, Lisa, Laura Sofie NISSEN, Michelle KUNTZ a Mirko BASEN. Alcohol dehydrogenases AdhE and AdhB with broad substrate ranges are important enzymes for organic acid reduction in Thermoanaerobacter sp. strain X514. *Biotechnology for Biofuels* [online]. 2021, **14**(1) [cit. 2021-10-28]. ISSN 1754-6834. Dostupné z: doi:10.1186/s13068-021-02038-1

[29] HONARBAKHSH, Fatemeh, Shamsozoha ABOLMAALI a Mohammad Ali AMOOZEGAR. Uricase Activity of Halophilic Bacteria from Iranian Salt Lakes. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science* [online]. 2021, **45**(5), 1597-1606 [cit. 2021-10-29]. ISSN 1028-6276. Dostupné z: doi:10.1007/s40995-021-01179-0

[30] KOTHE, Caroline Isabel, Alexander BOLOTIN, Bochra-Farah KRAïEM, Bedis DRIDI a Pierre RENAULT. Unraveling the world of halophilic and halotolerant bacteria in cheese by combining cultural, genomic and metagenomic approaches. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2021, **358** [cit. 2021-10-29]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109312

[31] SIGLIOCCOLO, Alessandro, Alessandro PAIARDINI, Maria PISCITELLI a Stefano PASCARELLA. Structural adaptation of extreme halophilic proteins through decrease of conserved hydrophobic contact surface. *BMC Structural Biology* [online]. 2011, **11**(1) [cit. 2021-10-29]. ISSN 1472-6807. Dostupné z: doi:10.1186/1472-6807-11-50

[32] VENTOSA, Antonio, Joaquín J. NIETO a Aharon OREN. Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 1998, **62**(2), 504-544 [cit. 2021-10-29]. ISSN 1092-2172. Dostupné z: doi:10.1128/MMBR.62.2.504-544.1998

[33] GREENBERG, E. P. a E. CANALE-PAROLA. Spirochaeta halophila sp. n., a facultative anaerobe from a high-salinity pond. *Archives of Microbiology* [online]. 1976, **110**(2-3), 185-194 [cit. 2021-11-27]. ISSN 0302-8933. Dostupné z: doi:10.1007/BF00690227

[34] 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. 2021-10-29]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2018.02.062

[35] VAN THUOC, Doan, Tran Thi HIEN a Kumar SUDESH. Identification and characterization of ectoine-producing bacteria isolated from Can Gio mangrove soil in Vietnam. *Annals of Microbiology* [online]. 2019, **69**(8), 819-828 [cit. 2022-05-11]. ISSN 1590-4261. Dostupné z: doi:10.1007/s13213-019-01474-7

[36] SÁNCHEZ, Carmen. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* [online]. 2009, **27**(2), 185-194 [cit. 2021-10-31]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2008.11.001

[37] Využití odpadních materiálů na bázi lignocelulózy jako suroviny pro výrobu bioetanolu. In: *Http://www.chemagazin.cz/* [online]. [cit. 2021-10-31].

[38] LI, Tian, Chaoji CHEN, Alexandra H. BROZENA et al. Developing fibrillated cellulose as a sustainable technological material. *Nature* [online]. 2021, **590**(7844), 47-56 [cit. 2021-11-07]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/s41586-020-03167-7

[39] KLEMM, Dieter, Brigitte HEUBLEIN, Hans-Peter FINK a Andreas BOHN. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 2005, **44**(22), 3358-3393 [cit. 2021-11-07]. ISSN 1433-7851. Dostupné z: doi:10.1002/anie.200460587

[40] ZHANG, Chunliang, Ruitao CHA, Pai ZHANG, Huize LUO a Xingyu JIANG. Cellulosic substrate materials with multi-scale building blocks: fabrications, properties and applications in bioelectronic devices. *Chemical Engineering Journal* [online]. 2022, **430** [cit. 2021-11-07]. ISSN 13858947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2021.132562

[41] NAIDJONOKA, Polina, Marco FORNASIER, David PåLSSON, Gregor RUDOLPH, Basel AL-RUDAINY, Sergio MURGIA a Tommy NYLANDER. Bicontinuous cubic liquid crystalline phase nanoparticles stabilized by softwood hemicellulose. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2021, **203** [cit. 2021-11-07]. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2021.111753

[42] LEHTONEN, M., M. MERINEN, P.O. KILPELÄINEN, C. XU, S.M. WILLFÖR a K.S. MIKKONEN. Phenolic residues in spruce galactoglucomannans improve stabilization of oil-in-water emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2018, **512**, 536-547 [cit. 2021-11-07]. ISSN 00219797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcis.2017.10.097

[43] LAHTINEN, Maarit H., Fabio VALOPPI, Venla JUNTTI, Sami HEIKKINEN, Petri O. KILPELÄINEN, Ndegwa H. MAINA a Kirsi S. MIKKONEN. Lignin-Rich PHWE Hemicellulose Extracts Responsible for Extended Emulsion Stabilization. *Frontiers in Chemistry* [online]. 2019, **7** [cit. 2021-11-07]. ISSN 2296-2646. Dostupné z: doi:10.3389/fchem.2019.00871

[44] WENG, Caihong, Xiaowei PENG a Yejun HAN. Depolymerization and conversion of lignin to value-added bioproducts by microbial and enzymatic catalysis. *Biotechnology for Biofuels* [online]. 2021, **14**(1) [cit. 2021-11-07]. ISSN 1754-6834. Dostupné z: doi:10.1186/s13068-021-01934-w

[45] GU, Xiangyu, Na PANG, Yaojing QIU, Xiao FU, Yiqing YAO a Shulin CHEN. Systematic evaluation of fractionation and valorization of lignocellulose via two-stage hydrothermal liquefaction. *Fuel* [online]. 2022, **310** [cit. 2021-11-07]. ISSN 00162361. Dostupné z: doi:10.1016/j.fuel.2021.122358

[46] TIAN, Xiaoling, Zhen WANG, Shukai YANG, Xiaoxi WANG, Li LI, Binghua SUN, Sen MA a Shiquan ZHENG. Microstructure observation of multilayers separated from wheat bran. *Grain & Oil Science and Technology* [online]. 2021 [cit. 2021-10-31]. ISSN 25902598. Dostupné z: doi:10.1016/j.gaost.2021.10.002

[47] BURI, Rudolf C., Walter VON REDING a Michel H. GAVIN. Description and Characterization of Wheat Aleurone. *Cereal Foods World* [online]. 2004, **49**(5), 274-278280-282 [cit. 2021-10-31]. ISSN 01466283.

[48] APPRICH, Silvia, Özge TIRPANALAN, Johannes HELL, Michael REISINGER, Stefan BÖHMDORFER, Susanne SIEBENHANDL-EHN, Senad NOVALIN a Wolfgang KNEIFEL. Wheat bran-based biorefinery 2: Valorization of products. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2014, **56**(2), 222-231 [cit. 2022-01-20]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2013.12.003

[49] REQUE, Priscilla Magro, Cristian Mauricio Barreto PINILLA, Federica TINELLO, Viviana CORICH, Anna LANTE, Alessio GIACOMINI a Adriano BRANDELLI. Biochemical and functional properties of wheat middlings bioprocessed by lactic acid

bacteria. *Journal of Food Biochemistry* [online]. 2020, **44**(7) [cit. 2021-10-31]. ISSN 0145-8884. Dostupné z: doi:10.1111/jfbc.13262

[50] MA, Fengyun, Yu Young LEE, Eunhee PARK, Yaguang LUO, Stephen DELWICHE a Byung-Kee BAIK. Influences of hydrothermal and pressure treatments of wheat bran on the quality and sensory attributes of whole wheat Chinese steamed bread and pancakes. *Journal of Cereal Science* [online]. 2021, **102** [cit. 2021-10-31]. ISSN 07335210. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcs.2021.103356

[51] KONG, Feng, Lan WANG, Haifei GAO a Hongzhang CHEN. Process of steam explosion assisted superfine grinding on particle size, chemical composition and physico-chemical properties of wheat bran powder. *Powder Technology* [online]. 2020, **371**, 154-160 [cit. 2021-10-31]. ISSN 00325910. Dostupné z: doi:10.1016/j.powtec.2020.05.067

[52] SISTI, Laura, Claudio GIOIA, Grazia TOTARO, Steven VERSTICHEL, Marco CARTABIA, Serena CAMERE a Annamaria CELLI. Valorization of wheat bran agro-industrial byproduct as an upgrading filler for mycelium-based composite materials. *Industrial Crops and Products* [online]. 2021, **170** [cit. 2021-11-24]. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2021.113742

[53] KOVALCIK, Adriana, Dan KUCERA, Petra MATOUSKOVA, Iva PERNICOVA, Stanislav OBRUCA, Michal KALINA, Vojtěch ENEV a Ivana MAROVA. Influence of removal of microbial inhibitors on PHA production from spent coffee grounds employing Halomonas halophila. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [online]. 2018, **6**(2), 3495-3501 [cit. 2021-11-07]. ISSN 22133437. Dostupné z: doi:10.1016/j.jece.2018.05.028

[54] MAMO, Masresha, Henok KASSA, Lalit INGALE a Stefaan DONDEYNE. Evaluation of compost quality from municipal solid waste integrated with organic additive in Mizan–Aman town, Southwest Ethiopia. *BMC Chemistry* [online]. 2021, **15**(1) [cit. 2021-11-15]. ISSN 2661-801X. Dostupné z: doi:10.1186/s13065-021-00770-1

[55] JACKOWSKI, Mateusz, Łukasz NIEDźWIECKI, Kacper JAGIEłłO, Oliwia UCHAńSKA a Anna TRUSEK. Brewer's Spent Grains—Valuable Beer Industry By-Product. *Biomolecules* [online]. 2020, **10**(12) [cit. 2021-11-15]. ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom10121669

[56] SWART, Lukas J, Abdul M PETERSEN, Oscar KK BEDZO a Johann F GÖRGENS. Techno-economic analysis of the valorization of brewers spent grains: production of xylitol and xylo-oligosaccharides. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* [online]. 2021, **96**(6), 1632-1644 [cit. 2021-11-15]. ISSN 0268-2575. Dostupné z: doi:10.1002/jctb.6683

[57] MARTÍNEZ-AVILA, Oscar, Jordi LLIMÓS a Sergio PONSÁ. Integrated solid-state enzymatic hydrolysis and solid-state fermentation for producing sustainable polyhydroxyalkanoates from low-cost agro-industrial residues. *Food and Bioproducts Processing* [online]. 2021, **126**, 334-344 [cit. 2021-11-15]. ISSN 09603085. Dostupné z: doi:10.1016/j.fbp.2021.01.015

[58] SARAVANAN ARUMUGAMURTHY, Sakthi, Periyasamy SIVANANDI, Sivakumar PANDIAN, Himanshu CHOKSI a Deepalakshmi SUBRAMANIAN. Conversion of a low value industrial waste into biodiesel using a catalyst derived from brewery waste: An activation and deactivation kinetic study. *Waste Management* [online]. 2019, **100**, 318-326 [cit. 2021-11-15]. ISSN 0956053X. Dostupné z: doi:10.1016/j.wasman.2019.09.030

[59] GARCÍA-LOMILLO, Javier a María Luisa GONZÁLEZ-SANJOSÉ. Applications of Wine Pomace in the Food Industry: Approaches and Functions. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2017, **16**(1), 3-22 [cit. 2021-11-07]. ISSN 15414337. Dostupné z: doi:10.1111/1541-4337.12238

[60] KOVALCIK, Adriana, Iva PERNICOVA, Stanislav OBRUCA, Martin SZOTKOWSKI, Vojtech ENEV, Michal KALINA a Ivana MAROVA. Grape winery waste as a promising feedstock for the production of polyhydroxyalkanoates and other value-added products. *Food and Bioproducts Processing* [online]. 2020, **124**, 1-10 [cit. 2021-11-07]. ISSN 09603085. Dostupné z: doi:10.1016/j.fbp.2020.08.003

[61] DURÁN, I., N. ÁLVAREZ-GUTIÉRREZ, F. RUBIERA a C. PEVIDA. Biogas purification by means of adsorption on pine sawdust-based activated carbon: Impact of water vapor. *Chemical Engineering Journal* [online]. 2018, **353**, 197-207 [cit. 2021-11-15]. ISSN 13858947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2018.07.100

[62] NAIEL, Mohammed A.E., Ahmed G.A. GEWIDA, Abdel-Rahman M.A. MERWAD, Eman A.A. ABDEL-HAMID, Samar S. NEGM, Mahmoud ALAGAWANY a Mayada R. FARAG. The effects of various organic fertilizers with or without adsorbents on the productivity, antioxidant status and immune responses of Nile tilapia raised in cement ponds. *Aquaculture* [online]. 2022, **548** [cit. 2021-11-15]. ISSN 00448486. Dostupné z: doi:10.1016/j.aquaculture.2021.737593

[63] MOHAN, Ganesh, Robert Lee JOHNSON a Jian YU. Conversion of Pine Sawdust into Polyhydroxyalkanoate Bioplastics. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* [online]. 2021, **9**(25), 8383-8392 [cit. 2021-11-15]. ISSN 2168-0485. Dostupné z: doi:10.1021/acssuschemeng.1c00009

[64] PERNICOVA, Iva, Dan KUCERA, Jana NEBESAROVA, Michal KALINA, Ivana NOVACKOVA, Martin KOLLER a Stanislav OBRUCA. Production of polyhydroxyalkanoates on waste frying oil employing selected Halomonas strains. *Bioresource Technology* [online]. 2019, **292** [cit. 2022-01-20]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2019.122028

[65] 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. 2022-01-20]. ISSN 18716784. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbt.2021.01.009

[66] LI, Jiawei, Zhihui YANG, Kejing ZHANG, Mingren LIU, Dan LIU, Xu YAN, Mengying SI a Yan SHI. Valorizing waste liquor from dilute acid pretreatment of lignocellulosic biomass by Bacillus megaterium B-10. *Industrial Crops and Products* [online]. 2021, **161** [cit. 2022-03-23]. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2020.113160

[67] ZARDO, Danianni Marinho, Acácio Antonio Ferreira ZIELINSKI, Aline ALBERTI a Alessandro NOGUEIRA. Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Brazilian Apples. *Food and Nutrition Sciences* [online]. 2015, **06**(08), 727-735 [cit. 2022-05-16]. ISSN 2157-944X. Dostupné z: doi:10.4236/fns.2015.68075

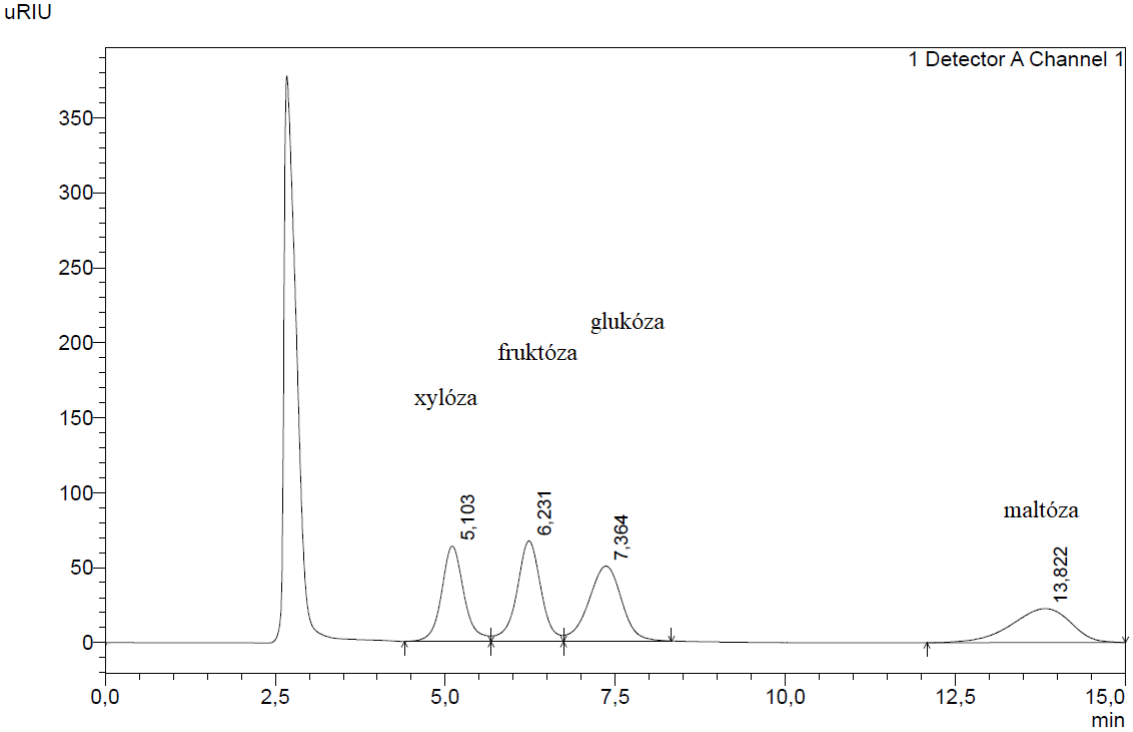
[68] STŘÍŽ, Radim. *Studium produkce bakteriální celulózy za využití hroznových výlisků jako uhlíkového zdroje*. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2019, 37 listů : ilustrace.

[69] MANIKANDAN, N. Arul, Kannan PAKSHIRAJAN a G. PUGAZHENTHI. A novel rotating wide gap annular bioreactor (Taylor-Couette type flow) for polyhydroxybutyrate production by Ralstonia eutropha using carob pod extract. *Journal of Environmental Management* [online]. 2021, **299** [cit. 2021-10-29]. ISSN 03014797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jenvman.2021.113591

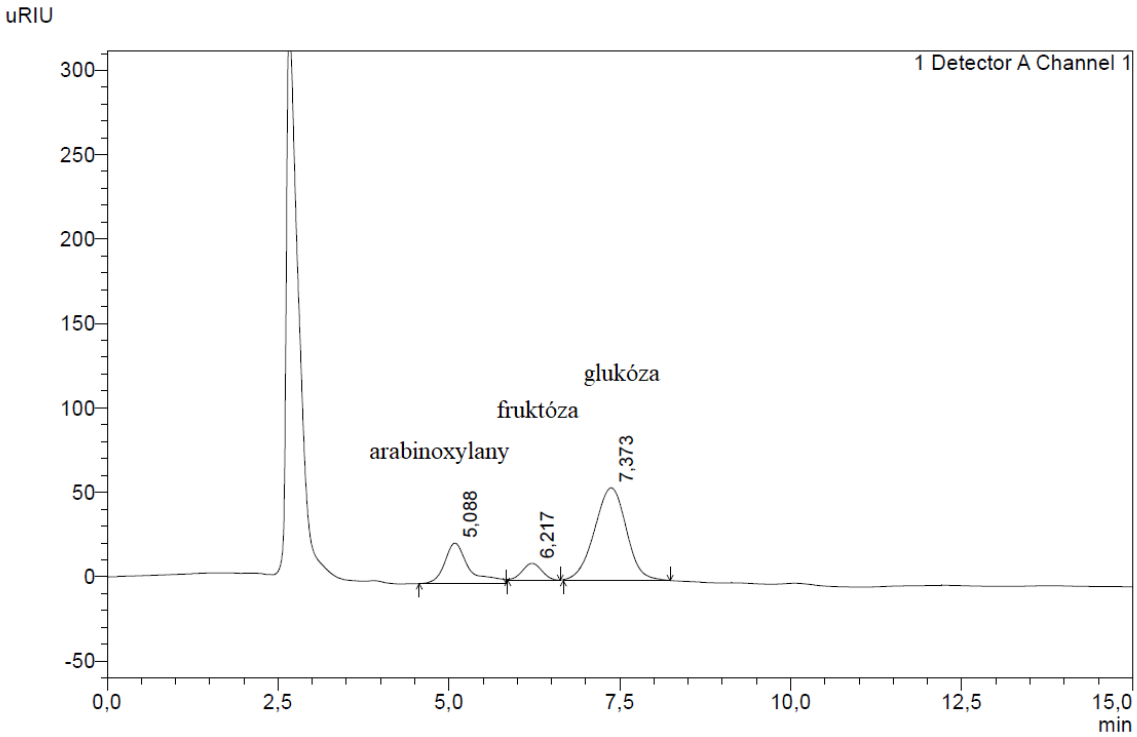
[70] KARUNARATHNA, Menisha S. a Rhett C. SMITH. Valorization of Lignin as a Sustainable Component of Structural Materials and Composites: Advances from 2011 to 2019. *Sustainability* [online]. 2020, **12**(2) [cit. 2022-05-17]. ISSN 2071-1050. Dostupné z: doi:10.3390/su12020734

7 PŘÍLOHY

7.1 Příklady chromatogramů z HPLC-RI



Obrázek 17: Chromatogram stanovovaných sacharidových standardů (*c* = 20 g/l)



Obrázek 18: Chromatogram reálného vzorku otrub po enzymatické hydrolýze s neutrální předúpravou

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

PHA	polyhydroxyalkanoát
scl-PHA	polyhydroxyalkanoát s krátkým řetězcem (short chain length)
mcl-PHA	polyhydroxyalkanoát se střední délkou řetězce (medium chain length)
lcl-PHA	polyhydroxyalkanoát s dlouhým řetězcem (long chain length)
P3HB	poly(3-hydroxybutyrát)
P3HB3HV	poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát)
P3HB3HHx	poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyhexanoát)
PhaA	*β*-ketothioláza
PhaB	acetoacetyl-CoA reduktáza
PhaC	PHA-syntáza
AccA	acetyl-CoA karboxyláza
FabB	enoyl-CoA hydratáza
FabD	mastná acyl-CoA syntáza
FabE	acyl-CoA dehydrogenáza
FabG (PhaG)	3-ketoacyl reduktáza
FabH	3-ketoacyl-ACP syntáza III
PhaJ	(*R*)-3-hydroxyacyl-CoA hydratáza
CDM	suchá hmotnost buňky (cell dry weight)
MRS médium	de Man-Rogosa-Sharp médium
HPLC-RI	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s refraktometrickým detektorem (high performance chromatography with refractive index detector)
DNS	3,5-dinitrosalicylová kyselina
OD	optická hustota
GC-FID	plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem (gas chromatography with flame ionization detector)
IC-CD	iontová chromatografie s konduktometrickým detektorem (ion chromatography with conductivity detector)
HO	*Halomonas organivorans*
HH	*Halomonas halophila*
ST44	*Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344
ST64	*Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15264