



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

# BIOTECHNOLOGICKÁ PRODUKCE POLYHYDROXYALKANOÁTŮ S VYUŽITÍM ODPADŮ KÁVOVÉHO PRŮMYSLU

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATES USING WASTES  
OF COFFEE PRODUCTION

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

MONIKA VAŠÍČKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. STANISLAV OBRUČA, Ph.D.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0950/2014** Akademický rok: **2014/2015**  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Student(ka): **Monika Vašíčková**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie (B2801)  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)  
Vedoucí práce **Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**  
Konzultanti:

### Název bakalářské práce:

Biotechnologická produkce polyhydroxyalkanoátů s využitím odpadů kávového průmyslu

### Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše - využití odpadních produktů potravinářského průmyslu pro biotechnologickou výrobu PHA
2. Experimentální část - využití hydrolyzátů kávové sedliny k biotechnologické produkci PHA

### Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

-----  
Monika Vašíčková  
Student(ka)

-----  
Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
Děkan fakulty

## ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá produkcí polyhydroxyalkanoátů (PHA) kmeny bakterií *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari*. Produkce PHA byla studována s využitím různých způsobů předupravené a hydrolyzované kávové sedliny. V rámci práce byla porovnána standardní metoda hydrolyzy kávové sedliny zředěnou minerální kyselinou a následnou enzymatickou hydrolyzou provedenou pouze pomocí enzymů. Vzniklé hydrolyzáty byly analyzovány se zaměřením na obsah redukujících sacharidů a výtěžnost hydrolyzy. Z výsledků vyplývá, že nejlepší předpoklady pro produkci PHA měly vzorky vyprodukované bakterií *Burkholderia cepacia* a to v kultivačním médiu připraveném hydrolyzou kávové sedliny, která byla vystavena extrakci 60% ethanolem. Výtěžek biomasy v tomto médiu byl 3,553 g/l s procentuálním obsahem PHA 32,472% v biomase. Vzniklý PHA obsahoval 6,09% 3-hydroxyvalerátu. V rámci dalšího experimentu byl ověřen alternativní přístup hydrolyzy kávové sedliny, kde byly použity komerčně dostupné enzymy celulóza, hemicelulóza a extracelulární enzymatický koktejl vyprodukovaný plísní schopnou využít kávovou sedlinu. Hemicelulóza se ukázala být nejefektivnějším hydrolytickým enzymem a proto nejvyšší obsah biomasy 5,708 g/l se také nacházel v médiu připraveného hemicelulózou katalyzovanou hydrolyzou kávové sedliny, která byla extrahovaná 60% ethanolem. Nedošlo zde k produkci kopolymeru P(HB-co-HV), ale jen polymeru PHB, což bylo nejspíše způsobeno tím, že v průběhu enzymatické hydrolyzy nevznikala kyselina levulinová ani žádný jiný potenciální prekurzor 3HV.

## ABSTRACT

This bachelor thesis is focused on study of production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by bacteria *Burkholderia cepacia* and *Burkholderia sacchari*. Production of PHA has been studied using spent coffee grounds hydrolysates which have been prepared by different approaches. In the thesis is compared standard method of coffee ground hydrolysis by mineral acid followed by enzymatic hydrolysis. Hydrolysates which have been produced were analyzed in terms of concentration of saccharides and efficiency of hydrolysis. The best producer of PHA (based on results) was bacterium *Burkholderia cepacia*, in the medium which has been prepared by hydrolysis of spent coffee grounds extracted by 60% solution of ethanol. Biomass yield of this cultivation was 3,553 g/l with 32,472% PHA content. This PHA contained 6,09% 3-hydroxyvalerate. In the other experiment, we verified alternative hydrolysis of spent coffee grounds – by commercially available enzymes. We used cellulase, hemicellulase and the enzymatic cocktail which has been produced by mould. Hemicellulase was the most effective hydrolytic enzyme and its application resulted in production of the highest amount of biomass – 5,708 g/l. In this cultivation, only homopolymer PHB has been which is probably caused by the fact, that during the enzymatic hydrolysis levulinic acid or any other potential precursor of 3HV is formed.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Polyhydroxyalkanoáty, PHA, kyselá hydrolyza, enzymatická hydrolyza, Polyhydroxybutyrát, PHB, kávová sedlina, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia sacchari*

## KEY WORDS

Polyhydroxyalkanoates, PHA, acid hydrolysis, enzymatic hydrolysis, Polyhydroxybutyrate, PHB, spent coffee ground, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia sacchari*

VAŠÍČKOVÁ, M. *Biotechnologická produkce polyhydroxyalkanoátů s využitím odpadů kávového průmyslu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 45 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. 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.

.....  
podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala vedoucímu méj bakalářské práce Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D za pomoc při práci v laboratoři, za vstřícný přístup, ochotu a rady při zpracování tématu a výsledků. Dále bych chtěla poděkovat všem, co se mnou pracovali v laboratoři, za pomoc při obsluze některých přístrojů. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala svojí rodině a přátelům za velkou podporu.



<b>1</b>	<b>OBSAH</b>	
<b>1</b>	<b>OBSAH</b> .....	5
<b>2</b>	<b>ÚVOD</b> .....	8
<b>3</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	9
3.1	Mikroorganismy a polymery.....	9
3.2	Polyhydroxyalkanoáty.....	9
3.2.1	Historie PHA.....	10
3.2.2	Chemická struktura PHA.....	10
3.2.3	Struktura intracelulárních granulí PHA.....	11
3.2.4	Druhy PHA.....	12
3.2.4.1	PHB.....	12
3.2.4.2	PHB -PHV.....	13
3.2.5	Výroba PHA.....	13
3.2.6	Mikroorganismy produkující PHA.....	13
3.2.6.1	Burkholderia cepacia.....	13
3.2.6.2	Burkholderia sacchari.....	13
3.2.7	Využití PHA.....	14
3.3	Káva.....	14
3.3.1	Kávovník.....	15
3.3.2	Techniky na zpracování kávy.....	15
3.3.2.1	Mokrý metoda.....	15
3.3.2.2	Suchá metoda.....	15
3.3.3	Vedlejší produkty kávy.....	16
3.3.3.1	Kávová dužina.....	16
3.3.3.2	Kávová slupka.....	16
3.3.3.3	Kávový stříbrný povlak.....	16
3.3.3.4	Kávová sedlina.....	17
3.3.4	Jejich likvidace a nedostatky.....	17
3.3.5	Jejich využití.....	17
3.3.5.1	Kompost.....	17
3.3.5.2	Vláknina.....	17
3.3.5.3	Pohonné látky.....	17
3.3.5.4	Výroba dřevotřískových desek.....	17
3.3.6	Celulóza a hemicelulóza, jako důležité složky kávy.....	18
3.3.6.1	Celulóza.....	18
3.3.6.2	Hemicelulóza.....	18

3.4	Hydrolyza .....	18
3.4.1	Enzymatická hydrolyza .....	18
3.4.1.1	Enzymy.....	18
3.4.1.2	Enzymatická hydrolyza celulózy.....	19
3.4.1.3	Enzymatická hydrolyza hemicelulózy.....	19
3.4.2	Hydrolyza polysacharidů kávové sedliny.....	19
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>20</b>
4.1	Použité chemikálie, materiál a přístroje .....	20
4.1.1	Použité chemikálie .....	20
4.1.2	Bakteriální kmeny .....	20
4.1.3	Chemikálie pro kultivaci mikroorganismů.....	20
4.1.4	Standardní chemikálie .....	20
4.1.5	Použité enzymy .....	21
4.1.5.1	Celuláza z <i>Aspergillus niger</i> , Sigma-Aldrich.....	21
4.1.5.2	Celuláza z <i>Trichoderma reesei</i> ATCC 26921, Sigma-Aldrich.....	21
4.1.5.3	Hemiceluláza z <i>Aspergillus niger</i> , Sigma-Aldrich.....	21
4.2	Příprava roztoků.....	22
4.2.1	Činidlo 3,5 – dinitrosalicylová kyselina.....	22
4.2.2	Příprava tlumivých roztoků .....	22
4.2.2.1	Citrátový pufr o pH = 4,5 .....	22
4.2.2.2	Fosfátový pufr o pH = 7,4 .....	22
4.2.2.3	Fosfátový pufr o pH = 6,5 .....	22
4.3	Příprava vzorků .....	22
4.3.1	Vzorky pro chemickou hydrolyzu .....	22
4.3.2	Vzorky pro enzymatickou hydrolyzu .....	22
4.4	Použité přístroje.....	22
4.5	Gravimetrické stanovení biomasy v jednotlivých kultivacích .....	23
4.6	Kultivace bakterie <i>Burkholderia cepacia</i> a <i>Burkholderia sacchari</i> .....	23
4.6.1	Příprava inokula a uchování kultury.....	23
4.6.2	Živná média.....	23
4.7	Vzorky kávové sedliny .....	24
4.8	Stanovení koncentrace počátečních a konečných redukujících sacharidů pomocí 3,5-dinitrosalicylové kyseliny.....	24
4.8.1	Stanovení kalibrační křivky.....	24
4.9	Stanovení PHA pomocí plynové chromatografie.....	24
4.9.1	Stanovení kalibrační křivky PHA.....	25

4.9.2	Stanovení PHA v biomase.....	25
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>26</b>
5.1	Kalibrace metod .....	26
5.1.1	Kalibrace stanovení redukujících sacharidů pomocí 3,5 – dinitrosalicylové kyseliny ..	26
5.1.2	Stanovení PHA plynovou chromatografií .....	27
5.1.2.1	Kalibrační křivka 3HB .....	27
5.1.2.2	Kalibrační křivka 3HV .....	28
5.2	Srovnání produkce PHA u dvou druhů bakterií a různých druhů média připravených z kávové sedliny .....	29
5.2.1	Hydrolyza zředěnou minerální kyselinou a následná enzymatická hydrolyza .....	29
5.2.1.1	Stanovení koncentrace počátečních redukujících sacharidů po procesu hydrolyzy ..	29
5.2.1.2	Výtěžky biomasy a PHA .....	31
5.2.2	Enzymatická hydrolyza .....	34
5.2.2.1	Stanovení počátečních redukujících sacharidů.....	34
5.2.2.2	Stanovení PHA v biomase a obsah biomasy .....	35
5.3	Hydrolyza kávové sedliny pomocí vyšší dávky enzymů případně jejich kombinace a následná kultivace .....	37
5.3.1	Stanovení redukujících sacharidů v hydrolyzátech .....	37
5.3.1.1	Obsah biomasy a stanovení PHA v biomase .....	38
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>41</b>
<b>7</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>42</b>

## 2 ÚVOD

Polymery nebo-li plasty jsou materiály, které jsou velmi hojně využívány člověkem a to v celé řadě odvětví po dobu několika desítek let. Nylon, polyethylen a polyurethan jako syntetické polymery mají velkou zásluhu na zlepšení našich životů, ale také mohou i za několik závažných problémů. Jedním z problémů je to, že syntetické polymery jsou vyráběny z neobnovitelných zdrojů. Další problém je v tom, že polymery se velmi nesnadno rozkládají a tím silně znečišťují životní prostředí. Hromadění těchto polymerů v životním prostředí má za následek vážný celosvětový ekologický problém. V rozvinutých zemích se recykluje pouze 16 až 20% z tuhého plastového odpadu (polyethylen a polypropylen) a většina z nich putuje na skládky. Téměř 40% veškerých plastů se vyrábí jako obaly. Ty mají výborné fyzikální vlastnosti, ale opět nastává problém s likvidací tohoto materiálu jako odpadu [1].

V dnešní době je tu několik řešení situace, která se týká likvidace odpadů typu organických plastů. Plasty mohou být ukládány na skládkách, mohou být tepelně rozkládány nebo spalovány. Tato řešení nejsou však šetrná k životnímu prostředí už z toho důvodu, že doba rozkladu polypropylenu a polyethylenu je příliš dlouhá. Recyklace plastů je dalším řešením. Při tomto procesu, který je náročný na práci a také na energii, jsou plasty tříděny od ostatního odpadu. Dále jsou separovány také jednotlivé typy plastů. Plastový materiál je nadále promýván vodou, vysušen a rozmělněn. Poté se tato drť používá k výrobě nových výrobků. Recyklace je ale pouze dočasným řešením, protože recyklovaný plastový materiál posléze musí být spálen nebo umístěn na skládku [1].

Některé syntetické polymery mohou být rozložitelné pomocí mikroorganismů, ale proces je obvykle velmi zdoluhavý. Většina z nich má chemické složení, a proto odolává enzymatickému útoku. To se ale netýká polymerů biologického původu. Jedním důležitým biologicky vyrobeným typem jsou polyhydroxyalkanoáty (PHA) [2].

Polyhydroxyalkanoáty jsou homo- nebo heteropolyestery syntetizované mnohými prokaryoty. Mohou být vyráběny ve velkých množstvích z obnovitelných zdrojů prostřednictvím dobře známých fermentačních procesů. PHA mají vlastnosti podobné některým polyolefinům (jako jsou polypropylen a polyethylen). To, že jsou za vhodných podmínek zcela a rychle biologicky rozloženy, vyvolal velký zájem používat je jako náhražky syntetických polymerů [2].

Cílem práce tedy bylo prozkoumat produkci PHA bakteriemi *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari* s využitím odpadů kávy, tedy kávové sedliny.

## 3 TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 Mikroorganismy a polymery

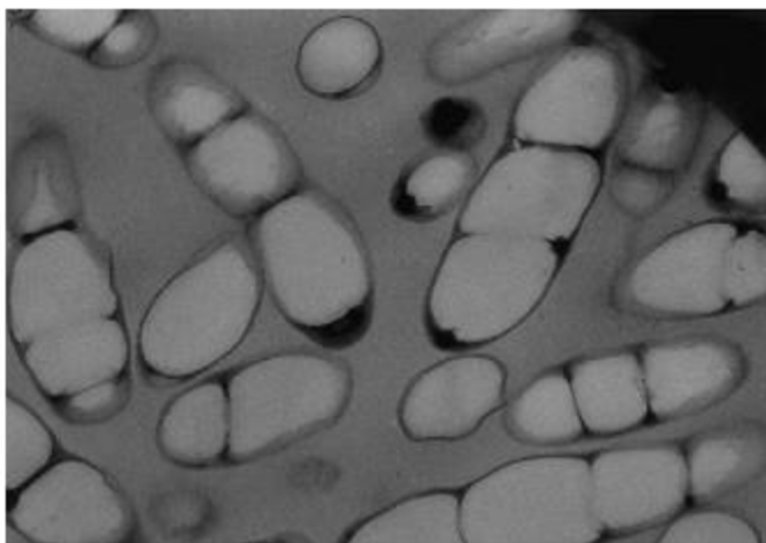
Mikroorganismy jsou jedním z nejdůležitějších činitelů ovlivňující přirozené procesy v životním prostředí. Podílejí se na degradaci a transformaci většiny organických látek, včetně syntetických polymerních materiálů. Proces, kterým se rozkládá materiál, se nazývá biodegradace. Tento proces by mohl vyřešit mnohé problémy životního prostředí, jako je například nahromadění pevného odpadu z původního syntetického polymeru. Hlavními produkty těchto procesů jsou mikroorganismy samy - biomasa. Důležitou součástí biomasy tvoří polymerní materiály. Pravděpodobně nejdůležitější z nich jsou bílkoviny a nukleové kyseliny, které jsou zodpovědné za hlavní část metabolických procesů v buňce. Nicméně, také polymery, jako jsou polyestery, polyamidy nebo polysacharidy, které jsou ukládány uvnitř mikroorganismu, hrají důležitou úlohu, jak v samotných buňkách, tak i v přírodním prostředí. Kromě toho, díky svým mechanickým vlastnostem, které jsou často podobné těm vlastnostem syntetickým polymerům s vyšší biologickou rozložitelností, by tyto bakteriální biopolymery mohly působit jako ekologicky šetrná alternativa k polymerům syntetického původu [3].

### 3.2 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou polyestery přírodního původu syntetizované mnoha bakteriemi. V těchto buňkách jsou shromážděné ve formě intracelulárních zrn - granulí. Můžeme také říct, že se jedná o materiály podobné plasty. Bakterie si ve formě PHA skladují zásoby energie a uhlíku. Svými mechanickými vlastnostmi jsou PHA podobné syntetickým polymerům, jako je například polypropylen. Protože PHA je mikrobiální produkt, existují přírodní enzymy, které ho dovedou rozkládat [4].

Jejich nejdůležitější vlastnosti jsou biodegradabilita a biokompatibilita. *Biodegradabilita*, což znamená biologicky odbouratelný - podléhá přirozenému rozkladu.

*Biokompatibilita* neboli biologická snášenlivost. Rozumí se tím vlastnost materiálu být při specifické aplikaci snášen živým organismem. PHA jsou biologicky odbouratelné polymery, které mohou degradovat, jak za aerobních, tak i za anaerobních podmínek. Mohou také být podrobeny tepelné degradaci a enzymatické hydrolýze. V biologických systémech, může být PHA rozkládána za použití mikrobiálních depolymeráz, stejně jako ne-enzymatickou a enzymatickou hydrolýzou v živočišné tkáni. Je zde mnoho faktorů, které ovlivňují biologickou rozložitelnost PHA, jako je stereoregularita – pravidelné střídání konfigurací, molekulová hmotnost, monomerní složení a krystalinita polymeru [5, 6].



Obrázek 1: Bakterie, která produkuje PHA [6]



Obrázek 2: Některé bakterie si umějí z odpadních látek, které jim slouží jako potrava, vytvořit zásobní polymer PHA. Ten si ukládají na horší časy a v době hladovění jej pak mohou využít jako vnitřní potravu [7]

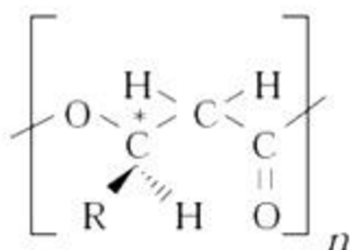
### 3.2.1 Historie PHA

Prvním objeveným polyhydroxyalkanoátem byl polyhydroxybutyrát (P3HB). V roce 1927 byl nalezen Lemoignem, který ho izoloval z bakterie *Bacillus megaterium*. Během příštích 30-ti let byl zájem P3HB velmi malý. Až v roce 1958 přišli Macrae a Wilkinson s myšlenkou, že bakterie si zásobuje P3HB jen v tom případě, pokud médium obsahuje nedostatek dusíku a nadbytek uhlíku. Doposud bylo rozpoznáno asi 100 polyhydroxyalkanoátů [5].

### 3.2.2 Chemická struktura PHA

Fyzikální a materiálové vlastnosti PHA jsou značně ovlivněny jejich složením monomerů a chemickou strukturou, tj. délkou bočních skupin, které vyčnívají z hlavního řetězce polymeru, chemické povaze této skupiny a vzdálenost mezi esterovými vazbami v polymerovém řetězci. Typ monomeru začleněný v rostoucím řetězci polymeru je závislý na použitém mikroorganismu, kultivačních podmínkách a použitém zdroji uhlíku [6].

Obecně platí, že polyhydroxyalkanoáty můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin podle délky jejich řetězce. PHA s krátkým řetězcem, které můžeme označit jako short-chain-length (scl-PHA) a PHA se středně dlouhým řetězcem označované jako medium-chain-length (mcl-PHA). Scl-PHA obsahují monomerní jednotky s 3 - 5 atomy uhlíku, kdežto mcl-PHA se skládají z monomerních jednotek o délce 6 - 18 atomů uhlíku [8].



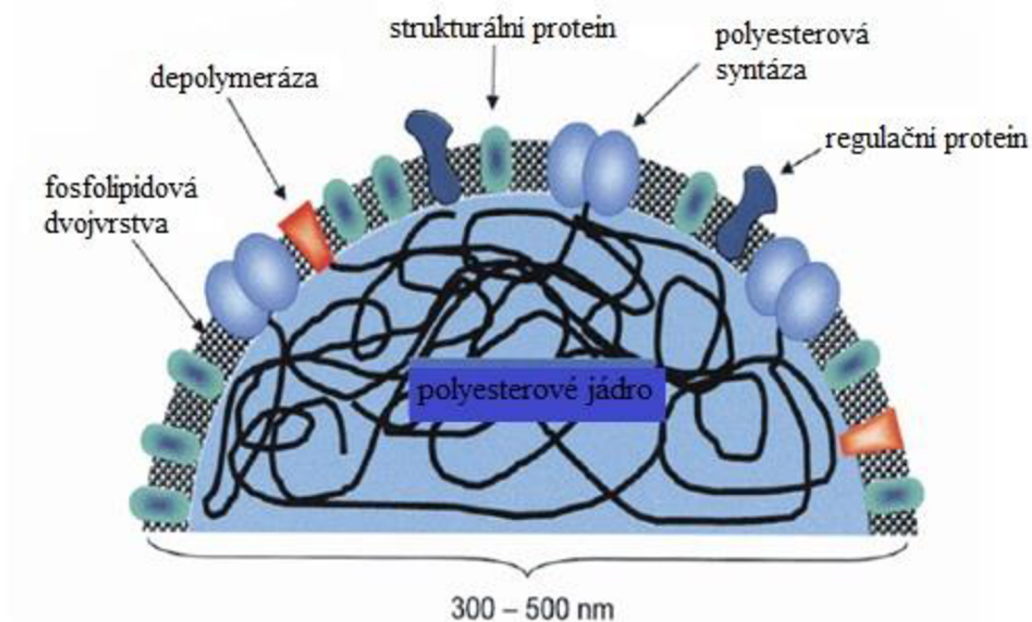
R = CH<sub>3</sub>-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>      PHA s krátkým řetězcem  
R = C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>-C<sub>14</sub>H<sub>29</sub>      PHA se středně dlouhým řetězcem

Obrázek 3: Obecná struktura PHA [3]

### 3.2.3 Struktura intracelulárních granulí PHA

Jak už bylo řečeno, PHA se hromadí v buňkách ve formě intracelulárních granulí - zrn. Bylo jasně prokázáno spektroskopii nukleární magnetické rezonance (NMR), že polyester v buňkách se vyskytuje v metastabilním amorfním stavu. Hustota PHB granulí je asi  $1,18 - 1,24 \text{ g.cm}^{-3}$ . Izolované granule se skládají z polyesterů, proteinů a fosfolipidů. Složení PHB granulí byla stanovena pro granule bakterie *Bacillus megaterium*, které se skládají z 97,7% polyesteru, 1,87% bílkovin a 0,46% tuků nebo fosfolipidů [3].

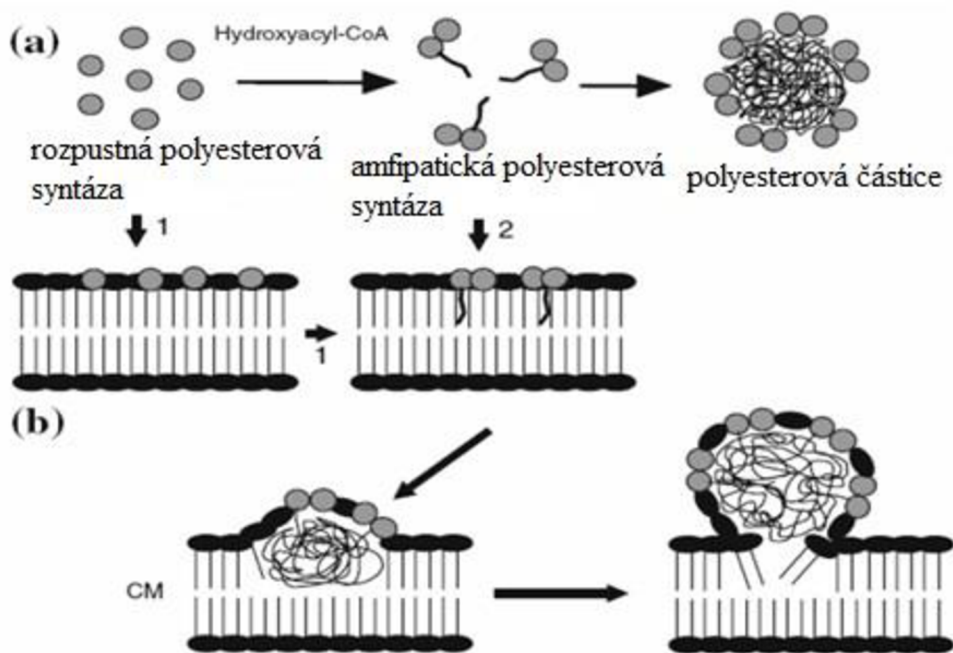
Materiál polyesteru je v PHA granulích obklopen fosfolipidovou dvouvrstvou, ve které jsou obsaženy proteiny. Kvůli silnému hydrofobnímu charakteru PHA jsou přítomny fosfolipidy s proteiny představující rozhraní mezi vrstvou PHA a cytoplazmou. Granule spojené s proteiny, nazývané také jako phasiny, jsou usazeny ve fosfolipidové dvouvrstvě. Obecně platí, že phasiny jsou proteiny s nízkou molekulovou hmotností. Předpokládá se, že tyto molekuly umí vytvořit na povrchu granulí velmi tenkou proteinovou vrstvu. Kromě toho, phasiny se pravděpodobně podílejí na regulaci PHA syntézy, ale mechanismus nebyl doposud jasně vysvětlen [3].



Obrázek 4: Struktura PHA granule [3]

Pánové Gerngross a Martin v pokusech *in vitro* prokázaly, že pro syntézu PHB a samouspořádání granulí jsou potřeba pouze PHA syntázy a substrát. Biosyntéza PHA granulí *in vivo* je popsána dvěma modely. První z nich - tzv. micelární model - je založen na pozorování PHA syntézy *in vitro*, zatímco druhý - tzv. rodící se, nebo také pučící model - je podporován pozorováním membrány jako materiálu obklopující PHA granule. Ty nejsou náhodně rozptýleny v cytoplazmě, jak by se dalo předpokládat, ale naopak jsou umístěny v těsné blízkosti membrány [3].





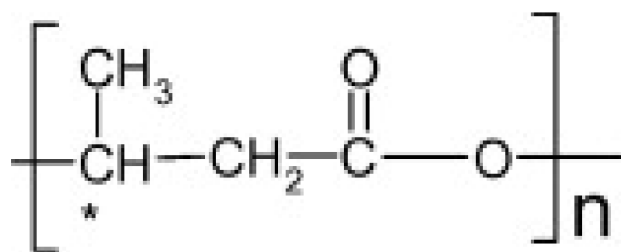
Obrázek 5: Modely pro polyesterové granule samouspořádání. a) In vitro postup shromáždění b) in vivo shromáždění a její dvě možné cesty 1 a 2 [3]

### 3.2.4 Druhy PHA

Syntéza PHA je zcela realizována intracelulárně v rámci jedné konkrétní metabolické dráhy. Je známo více než 150 variant monomerů, a proto mají velmi široké materiálové vlastnosti. Běžnými PHA monomery jsou 3-hydroxybutyrát (3HB), 3-hydroxyvalerát (3HV), 3-hydroxyhexanoát (3HHx), 3-hydroxyoktanoát (3HO), 3-hydroxydekanóat (3HD) a 3-hydroxydodekanoát (3HDD), stejně jako 4-hydroxybutyrát (4HB). Tyto druhy monomerů mohou být využity k vytvoření různých typů polymerů, jako jsou homopolymery, nesystematické kopolymery nebo blokové kopolymery, což vede k rozmanitosti vlastností materiálů [9].

#### 3.2.4.1 PHB

Nejběžnějším polyhydroxyalkanoátem je homopolymer poly 3-hydroxybutyrát (P3HB), který patří do homologické řady alifatických polyesterů a je částečně krystalický, biologicky odbouratelný polymer, který je uložen a biosyntetizován různými kmeny bakterií, jako jsou *Rolstonia eutropha H16*. Vzniká biologickou kondenzací hydroxybutyryl-CoA. Má termoplastické vlastnosti a je používán v plastikařském průmyslu. P3HB může být také využit jako alternativní polymer pro výrobu nosičů léčiv. Polymer je netoxický a zdá se, že je organismy tolerován i v relativně vysokých koncentracích. Bakterie žijící v půdě nebo odpadních vodách umí pomalu rozkládat P3HB na vodu a oxid uhličitý, a to zejména za anaerobních podmínek [10].



Obrázek 6: Struktura opakující se jednotky P3H [10]



### 3.2.4.2 PHB -PHV

Kopolymer poly(-3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) [P(3HB-co-3HV)] neobsahuje jen kyselinu hydroxymáselnou, ale také 3- hydroxyvalerát. A to z tohoto důvodu musí být důkladně testovány toxikologické vlastnosti tohoto materiálu. Od ostatních polyhydroxyalkanoátů se liší výbornými fyzikálními vlastnostmi, jako je odolnost proti nárazu, tuhost, pružnost a další, které se účastní výrobních procesů [11, 12].

### 3.2.5 Výroba PHA

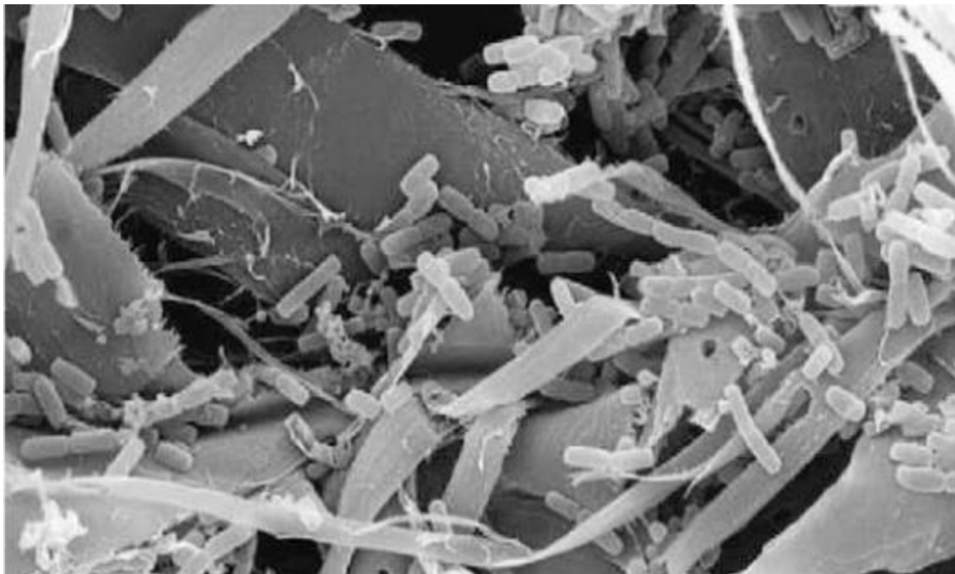
Biosyntetické polymery mohou být vyrobeny mikrobiální nebo rostlinou cestou. Tahle práce se zaměřuje na mikrobiální produkci biopolymerů. Produkce bioplastů mikroorganismy je velmi náročná a to z důvodu obtížného technického uskutečnění a provedení. Značná řada PHA jsou vyráběny s různými vlastnostmi, nízkou produktivitou a vysokými náklady ve srovnání s běžnými plasty a to bývá problémem širokého průmyslového využití [13].

### 3.2.6 Mikroorganismy produkující PHA

#### 3.2.6.1 *Burkholderia cepacia*

*Burkholderia cepacia* je gram-negativní bakterie, která je obecně považována za jednoho z nejperspektivnějších kandidátů pro průmyslovou produkci PHA z hydrolyzátů hemicelulózy a celulózy, protože je schopna zužitkovat různé hexózy a pentózy, a také dokáže snášet antimikrobiální látku [14].

Bakterie může být potenciálně patogenní a to hlavně vůči osobám s poruchou imunitního systému a nebezpečná je především pro pacienty trpící cystickou fibrózou [14].



Obrázek 7: *Burkholderia cepacia* na cukrové třtině [15]

#### 3.2.6.2 *Burkholderia sacchari*

*Burkholderia sacchari* je gram-negativní bakterie izolovatelná z půdy cukrové třtiny v Brazílii. Bylo zjištěno, že dokáže se sacharózou, jako jediným zdrojem uhlíku, shromažďovat až 68% PHB. Jedná se o kmen, který je schopen produkovat biopolymery z xylóz. Ty jsou založené na lignocelulózových hydrolyzátech. *B. sacchari* je schopna produkovat kopolymer P(3HB-co-4HB) po přidání gama-butyrolaktonu (GBL) do média [16, 17].

### 3.2.7 Využití PHA

Polyhydroxyalkanoáty, jako jsou poly(3-hydroxybutyrát) (PHB), poly(4-hydroxybutyrát) (P4HB), kopolymery 3-hydroxybutyrátu a 4-hydroxybutyrátu (P3HB4HB), kopolymer 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu (PHBV), stejně tak jako kopolymer 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyhexanoátu (PHBHHx), se vyrábí ve velké míře. Kromě využití jako biomedicínské implantáty, všechny výše uvedené PHA jsou především vyvinuty jako biologicky odbouratelné obalové materiálu, které jsou šetrné k životnímu prostředí. PHA s velmi vysokou molekulovou hmotností mohou být použity k výrobě ultra silných vláken pro rybářské vlasce a rybářské sítě [9].

V poslední době se PHA začaly využívat nejvíce v lékařství, například jako kardiovaskulární produkty (perikardiální a atriální opravy, záplaty, lešení pro regeneraci tkáňových tepen, cévní štěpy, kardiovaskulární stenty - dlouhá dutá hadička a srdeční chlopně) [13]. Ve formě kapaliny nebo ve formě velmi malých mikročásteček, které jsou rozptýleny, jsou vhodné pro opravu, doplnění a zvětšení měkkých tkání jak u lidí, tak i u zvířat. Další publikace popisuje materiály vhodné pro přípravu součástek, které nám napomáhají k podávání léčiv. Byly charakterizovány metody pro výrobu těchto prostředků. Tyhle komponenty obsahovaly propustné i nepropustné materiály, které mohly být použity k řízení rychlosti uvolňování léčiv a ke kontrole adhezního tlaku. Také je využíváme pro výrobu materiálů, které se uplatňují v medicínské oblasti. Jako jsou například materiály na zašívání otevřených ran - stehy, oční implantáty, kožní a kostní náhražky nebo také obvazy na zjizvenou či poraněnou tkáň [18].

### 3.3 Káva

Káva je jedním ze světově nejoblíbenějších nápojů a v průběhu posledních 150 let neustále roste její obchodní význam. V dnešní době je káva po ropě druhou nejvíce obchodovanou komoditou na světě. Pěstuje se v asi 80 zemích po celém světě. V roce 2010 roční celosvětová produkce kávových zrn přesáhla 8 000 000 t [19, 14].

Slovo KÁVA pochází z arabského slova Quahweh, kdy v průběhu 13. století Arabové přinesli kávové semínka z Etiopie do Jemenu (Arabský poloostrov), a založili první plantáž. Provincie Kaffa v Etiopii je považována za původní stanoviště kávy Arabica. Při výrobě kávového nápoje nebo instantní kávy vzniká na jednu tunu kávy přibližně 650 kg kávové sedliny. Navzdory skutečnosti, že tyto odpady z kávy jsou považovány jako výchozí substrát pro výrobu různých sloučenin, jako jsou polyfenoly, bioetanol, bionafta nebo manooligosacharidy-většina tohoto zbytku zůstává nevyužita, je vypouštěna do životního prostředí nebo spálena, což nelze považovat ani za šetrné k životnímu prostředí, ale ani za ekonomicky rentabilní. V současné době je Brazílie díky rozsáhlému a širokému šíření pěstování kávy největším producentem a vývozcem kávy na světě [19, 14].

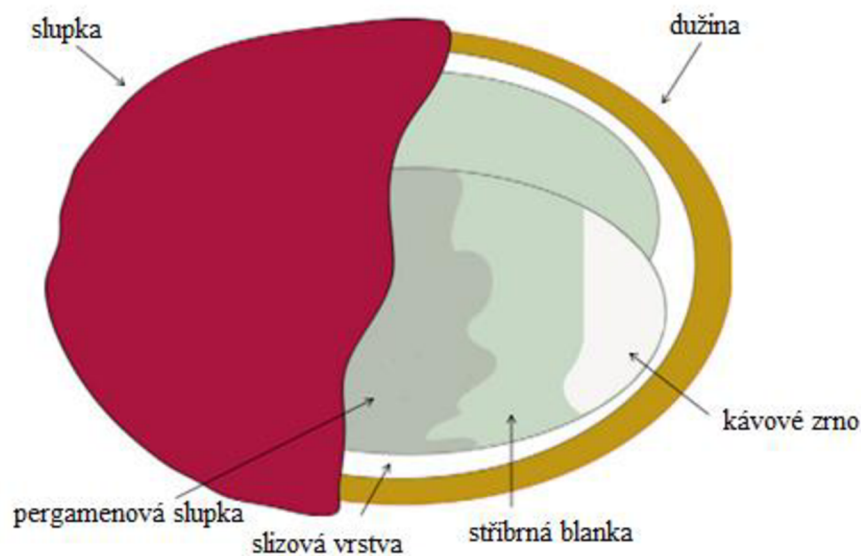


Obrázek 8: Rostlina kávy [19]

### 3.3.1 Kávovník

Kávovník je vytrvalá a stálezelená rostlina, která patří do čeledi *Rubiaceae* (Mořenovité), podčeledi *Cinchonoideae* a kmene *Coffeae*, který obsahuje více než 80 druhů převládající převážně v Africe a na Madagaskaru [19].

Kávový plod (také nazývaný bobule nebo třešeň) se skládá z hladké, tvrdé vnější slupky nebo-li perikarp-oplodí. Obvykle má u nezralých plodů zelenou barvu, ale během dozrávání se mění na červeno-fialovou nebo tmavě červenou barvu. Pod oplodím se nachází měkká, nažloutlá, vláknitá dužina nebo-li zevní mesokarp. Poté následuje průsvitná, tenká, vysoce viskózní a hydratovaná vrstva slizu, nazývaná pektin. Dále se nachází tenký endokarp nažloutlé barvy též nazývaný jako pergamen. A nakonec, stříbrná blanka pokrývá každou polokouli kávového zrna (endospermu) [20].



Obrázek 9: Jednotlivé vrstvy kávového zrna [20]

### 3.3.2 Techniky na zpracování kávy

V kávovém průmyslu je zpracování hlavní činností, které přeměňuje surovou kávu do tekuté formy. Zpracování kávy má dvě základní metody, které se liší složitostí a kvalitou nezpracované kávy od té tekuté formy. Suchá metoda a metoda mokrá [19].

#### 3.3.2.1 Mokrý metoda

Káva zpracovaná mokrou metodou se nazývá umytá nebo pergamenovitá káva. Při mokrému způsobu, ovocná dužina pokrytá semeny je odstraněna rozmělnovačem před tím, než jsou usušeny. Metoda vyžaduje spolehlivé rozmělnovací zařízení a dostatečný přívod čisté vody. Pro získání vysoce kvalitní kávy je konečným cílem zajistit úplné odstranění slizovité vrstvy z obalu pergamenu [19].

#### 3.3.2.2 Suchá metoda

V této metodě, jsou čerstvě sklizené plody rovnoměrně rozprostřeny na čisté prostranství k sušení. Dále se promíchávají asi hodinu. Zrnka kávy jsou považována za vysušená, když jejím zatřesením vydávají chřastivý zvuk. Suchá zrnka nejsou vystavena vlhkému stavu, to proto, aby se zabránilo vzniku plísní, které mohou nepříznivě ovlivnit kvalitu kávy [19].

### 3.3.3 Vedlejší produkty kávy

Káva je druhým nejvíce obchodovaným zbožím na světě a vytváří velké množství vedlejších produktů během jejího zpracování. Průmyslové zpracování kávových zrn se provádí oddělením kávového prášku tak, že je odstraněn plášť a slizovitá část. Kávové slupky / kůra / dužina tvoří téměř 45% zrna. Jsou také hlavními vedlejšími produkty z kávového průmyslu. Používají se pro různé účely, jako je například získání kofeinu a polyfenolů, protože jsou bohaté na živiny. Hlavní chemické složení vedlejších produktů shrnuje *Tabulka 1* [19].

*Tabulka 1: Chemické složení vedlejších produktů kávy [19]*

Složení (%)	dužina	slupka	stříbrná blanka	kávová sedlina
<b>Celulóza</b>	63,0 ± 2,5	43,0 ± 8,0	17,8 ± 6,0	8,6 ± 1,8
<b>Hemicelulóza</b>	2,3 ± 1,0	7,0 ± 3,0	13,1 ± 9,0	36,7 ± 5,0
<b>Proteiny</b>	11,5 ± 2,0	8,0 ± 5,0	18,6 ± 4,0	13,6 ± 3,8
<b>Tuky</b>	2,0 ± 2,6	0,5 ± 5,0	2,2 ± 1,9	neurčeno
<b>Celková vláknina</b>	60,5 ± 2,9	24 ± 5,9	62,4 ± 2,5	neurčeno
<b>Celkové polyfenoly</b>	1,5 ± 1,5	0,8 ± 5,0	1,0 ± 2,0	1,5 ± 1,0
<b>Celkové cukry</b>	14,4 ± 0,9	58,0 ± 20,0	6,65 ± 10,0	8,5 ± 1,2
<b>Pektiny</b>	6,5 ± 1,0	1,6 ± 1,2	0,02 ± 0,1	0,01 ± 0,005
<b>Lignin</b>	17,5 ± 2,2	9,0 ± 1,6	1,0 ± 2,0	0,05 ± 0,05
<b>Taniny</b>	3,0 ± 5,0	5,0 ± 2,0	0,02 ± 0,1	0,02 ± 0,1
<b>Chlorogenová kyselina</b>	2,4 ± 1,0	2,5 ± 0,6	3,0 ± 0,5	2,3 ± 1,0
<b>Kofein</b>	1,5 ± 1,0	1,0 ± 0,5	0,03 ± 0,6	0,02 ± 0,1

#### 3.3.3.1 Kávová dužina

Je první vedlejší produkt získaný při zpracování a představuje asi 29% suché hmotnosti z celé bobule. Dužina je bohatá na sacharidy, bílkoviny a minerály (obzvláště draslík) a také obsahuje významné množství tříslovin, polyfenolů a kofeinu [19].

#### 3.3.3.2 Kávová slupka

Jsou získávány, když se kávové plody zpracovávají suchou metodou. Kávová slupka obklopuje kávová zrna a představuje asi 12% z bobule její suché hmotnosti. Obsahují 24,5% celulózy, 29,7% hemicelulózy, 23,7% ligninu [19].

#### 3.3.3.3 Kávový stříbrný povlak

Je to povlak z kávových zrn, který je získán jako vedlejší produkt při procesu pražení. Hlavními složkami této vláknité tkáně jsou celulóza a hemicelulóza. Glukóza, xylóza, galaktóza, manóza, arabinóza a jsou monosacharidy přítomné v kávovém stříbrném povlaku spolu s proteiny [19].

#### **3.3.3.4 Kávová sedlina**

Téměř 50% celosvětové produkce kávy je využito pro přípravu rozpustné kávy. Asi 1 tuna zelené kávy vyprodukuje 650 kg kávové sedliny a zhruba 2 kg vlhké kávové sedliny jsou získány z každého vyrobeného kilogramu rozpustné kávy. Kávová sedlina je bohatší na cukry, které obsahují manózu a galaktózu spolu s významným podílem bílkovin. Chemické složení se u každé rostliny odlišuje dokonce i v rámci různé části téže rostliny a také záleží, na kterém místě se rostlina nachází, na jejím věku, podnebí a půdních podmínkách [19].

#### **3.3.4 Jejich likvidace a nedostatky**

V zemích produkujících kávu, odpady z kávy a kávové vedlejší produkty představují zdroj silného znečištění a znamenají vážný ekologický problém. Je nebezpečná likvidace kávových dužin, lusků a tekutého odpadu, protože vedou ke znečištění vody a půdy. Kávová dužina je hlavním vedlejším produktem s vysokým obsahem vlhkosti zapříčiňující problémy likvidace kvůli hnilobě. To způsobuje vážné znečištění životního prostředí, pokud není zlikvidována s náležitým předzpracováním. Tradičně, kávové dužiny a slupky našly jen omezené využití jako hnojiva, krmiva pro dobytek, kompost, atd. Tyto aplikace využívají pouze zlomek dostupného množství, které nejsou technicky velmi efektivní [19].

#### **3.3.5 Jejich využití**

Na základě toho, že existují metody pro nakládání s odpady kávy, můžeme říct, že je sníženo znečišťování životního prostředí. Odpady můžeme nějakým způsobem využívat, zpracovávat a recyklovat. Tradičně, dužiny z kávy a slupky našly pouze omezené využití, jako jsou hnojiva, krmivo pro hospodářská zvířata, kompost, atd. Vzhledem k tomu, že tyto odpadní produkty obsahují značné množství zkvasitelných cukrů, znamená to, že jsou vhodnými substráty pro pěstování různých plísní a kvasinek [20].

##### **3.3.5.1 Kompost**

Kávové dužiny jsou dobrým zdrojem humusu a organického uhlíku. Vedlejší produkty z výroby instantní kávy jsou pevné odpady s vysokým obsahem organických látek. Přeměna z 350 tisíc tun kávové dužiny by přinesla přibližně 87 tisíc tun organického hnojiva [19].

##### **3.3.5.2 Vlákna**

Agro odpady jsou velkými zdroji vlákniny, jako je celulóza, hemicelulóza, ligninu, pektinu, pryže a další polysacharidů. Rozpustné a nerozpustné frakce vlákniny (SDF a IDF) jsou známé tím, že uznávají širokou škálu zdravotních výhod, včetně snížení rizika onemocnění zažívacího ústrojí, kardiovaskulárních onemocnění a obezity [19].

##### **3.3.5.3 Pohonné látky**

Upotřebená kávová sedlina se používá jako palivo v průmyslových kotlích stejného odvětví díky své vysoké výhřevnosti, která se přibližně pohybuje kolem 5000 kcal / kg, což je srovnatelné s jinými zemědělsko-průmyslovými zbytky [19].

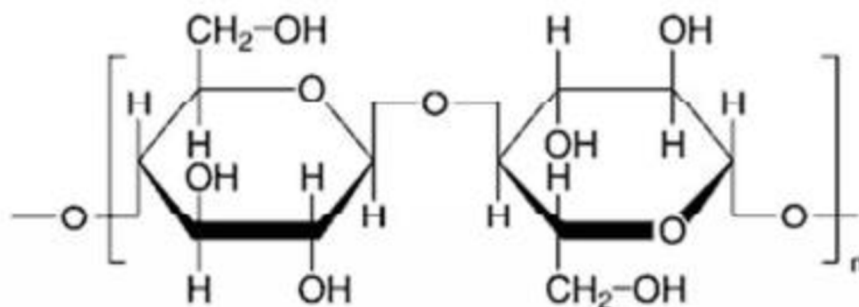
##### **3.3.5.4 Výroba dřevotřískových desek**

Nedávný zájem o materiály šetrné k životnímu prostředí vedl k využití zemědělských vedlejších produktů jako surovina pro výrobu dřevotřískových desek. Kávová slupka je zbytkem při zpracování kávy obsahující velké množství celulózy a hemicelulózy. O těchto dvou polysacharidech můžeme říct, že jsou téměř srovnatelné se dřevem [19].

### 3.3.6 Celulóza a hemicelulóza, jako důležité složky kávy

#### 3.3.6.1 Celulóza

Je to lineární polymer, který se skládá až z několika tisíc jednotek D-glukózy. Ty jsou mezi sebou vázány  $\beta(1,4)$ -glykosidovými vazbami. Základní strukturální opakující se jednotka se nazývá celobióza. Vyskytuje se hlavně v přírodě jako stavební složka rostlin. Celulóza má amorfni a krystalické oblasti. Krystalinita je měřitelná vlastnost, která udává relativní podíl hmotnosti krystalických oblastí v polymeru. Především ovlivňuje jeho enzymatické zpracování. Pokud má celulóza neuspořádanou formu, probíhá u ní hydrolýza značně rychleji, než když se nachází ve formě krystalické [21].



Obrázek 10: Vzorec glukózy [21]

#### 3.3.6.2 Hemicelulóza

Hemicelulóza s pektiny vyplňuje prostory mezi vlákny celulózy. Sacharidy jako jsou např. xylany, glukany a mannany obsahují tzv. cukerný zbytek podle kterého jsou hemicelulózy obvykle charakterizovány. Máme několik druhů hemicelulózy, které se dají rozdělit do dvou skupin. Ty jsou založeny na hydrataci vláken. Arabinoxylany, glukuronoxylany, xyloglukany a lineární mannany patří do skupiny s nízkou hydratační schopností. Tato skupina dokáže ustálit pomocí vodíkového atomu buněčné stěny. Ve druhé skupině s vysokou hydratační schopností vláken, mohou být zařazeny galaktoglukomannany, glukomannany, galaktomannany, které patří mezi základní hemicelulózy kávové sedliny [21].

### 3.4 Hydrolýza

Jedná se o chemickou reakci, při které dochází ke štěpení molekul za přítomnosti molekuly vody a vhodného katalyzátoru. Katalýza může být kyselá nebo také zásaditá. Každý krok zahrnuje spotřebu jedné molekuly vody. Jeden fragment původní molekuly během hydrolýzy získá vodíkový iont vody a druhý fragment hydroxylový iont vody [21].

#### 3.4.1 Enzymatická hydrolýza

##### 3.4.1.1 Enzymy

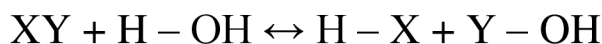
Jsou to vysokomolekulární bílkoviny, které v biochemické reakci působí jako katalyzátory. Nemají vliv na polohu rovnováhy a nevyvolávají reakci, která je jinak nevýhodná. Dokáží urychlovat chemickou reakci tak, že snižují její aktivační energii. Enzymy glykosidázy, které se zúčastňují polysacharidové hydrolýzy, zvyšují reakční rychlost a mění tak dobu reakce z milionů let na milisekundy [22].

Na rozdíl od jiných katalyzátorů jsou enzymy vysoce specifické. To znamená, že katalyzují pouze jednu reakci jedné sloučeniny. Sloučenina se nazývá substrát pro určitý enzym. Enzym se skládá z bílkovinné části - apoenzymu a nebílkovinné části - kofaktoru. Kombinací apoenzymu s kofaktorem vzniká holoenzym, který je biologicky aktivní [22].



Podle druhu katalyzované reakce se enzymy rozdělují do šesti tříd. Hydrolasy - katalýza hydrolytické reakce, isomerasy - katalýza isomerace, ligasy - katalýza vzájemné spojování dvou molekul za přítomnosti adenosin-trofosfátu (ATP), lyasy - katalyzují odštěpení malých molekul ze substrátu, oxidoreduktasy - katalýza redoxních reakcí a transferasy - katalyzují přenášení skupin z jednoho substrátu na jiný [22].

Mechanismus působení hydrolas probíhá tak, že část hydrolyzovaného substrátu (XY) je přenášena na molekulu vody.



Hydrolasy jsou členěny do jednotlivých podtříd podle charakteru hydrolyzované vazby (glykosidové, etherové, esterové, peptidové atd.) [23].

Enzymy jsou získávány prostřednictvím techniky frakcionace a izolace bílkovin přírodním způsobem. Pro získání enzymů se používaly rostlinné a živočišné tkáně jako výchozí materiál. V současnosti převládají mikrobiální zdroje a to hlavně kvůli velkému výběru různých enzymů. Díky rychlému množení a růstu mikroorganismů je produkce rychlejší a vyšší [21].

### 3.4.1.2 Enzymatická hydrolýza celulózy

Enzym, který je potřebný pro štěpení vazeb v celulóзовém řetězci se nazývá celulóza. Může se získávat z enzymatického systému bakterií (např. *C. thermocellum*) nebo celulólytických hub (např. *T. reesei*). Do katabolismu celulózy se u hub a bakterií zapojuje celulózový komplex. Celulóza tvoří v dnešní době největší část odpadu lidské civilizace [21].

Jedná se vlastně o enzym, který obsahuje tři enzymy pracující současně. Je tvořen endoglukanázou,  $\beta$ -D-glukosidázou a exoglukanázou [21].

**Endoglukanáza (endo-1,4- $\beta$ -glukanáza)** ovlivňuje rozpustnost i nerozpustnost 1,4- $\beta$ -D-glukanových substrátů. Ty jsou zpravidla detekovány snížením viskozity nebo redukujících skupin, které jsou uvolněny z karboxymethylcelulózy [21].

**Exoglukanáza (exo-1,4- $\beta$ -glukanáza)** obsahuje 1,4- $\beta$ -D-glukanglukohydrolázu a 1,4- $\beta$ -D-glukancelobiohydrolázu. 1,4- $\beta$ -D-glukanglukohydroláza uvolňuje z 1,4- $\beta$ -D-glukanu D-glukózu a pomalu hydrolyzuje D-celobiózu. 1,4- $\beta$ -D-glukancelobiohydroláza uvolňuje z 1,4- $\beta$ -D-glukanů D-celobiózu. Tyto enzymy jsou významné uvolňováním cukrů z neredučujících nebo redučujících konců celulózového řetězce [21].

**$\beta$ -D-glukozidáza ( $\beta$ -D-glukosidglukohydroláza)** je schopná uvolňovat D-glukóзовé jednotky z celobiózy a nerozpustných celodextrinů [21].

### 3.4.1.3 Enzymatická hydrolýza hemicelulózy

Hemicelulózy jsou enzymy, které jsou potřeba pro štěpení hemicelulózy. Některé houby, bakterie i rostliny jsou schopné produkovat tyto enzymy. V dnešní době se většina hemiceluláz produkuje prostřednictvím geneticky modifikovaných kmenů *Aspergillus* a *Trichoderma* [21].

### 3.4.2 Hydrolýza polysacharidů kávové sedliny

Kávová sedlina tvoří dva polysacharidy - celulózu a hemicelulózu. Nejvýznamnější hemicelulózou kávové sedliny je galaktomanan. V sedlině je zastoupeno malé množství xylanů, arabinanů a galaktanů. Hydrolýza kávové sedliny probíhá zředěnými kyselinami nebo enzymy celulózou, manázami (hlavně galaktomanáza), xylanázami a endoglukanázami. V hlavním řetězci mananů a jeho derivátů (galaktomanany a glukomanany) dochází k rozštěpení  $\beta$ -1,4-manopyranosylových vazeb. Za tuhle katalýzu jsou zodpovědné endomanázy. Celulóza je štěpena třemi enzymy endoglukanázou, exoglukanázou a  $\beta$ -D-glukozidázou [21].

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité chemikálie, materiál a přístroje

#### 4.1.1 Použité chemikálie

Glukóza monohydrát,  $C_6H_{12}O_6$ , lach-ner  
Pyruvát sodný, Lachema  
Dihydrogenfosforečnan draselný,  $KH_2PO_4$ , lach-ner  
Síran hořečnatý heptahydrát,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  lach-ner  
Síran amonný,  $(NH_4)_2SO_4$ , lach-ner  
Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát,  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ , lach-ner  
Chlorid vápenatý dihydrát,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , Lachema  
Citronan amonno-železitý, Fluka  
Hydroxid sodný, NaOH, lach-ner  
Kyselina sirová 96%,  $H_2SO_4$ , lach ner  
Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát,  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ , lach-ner  
Hydrogenfosforečnan sodný dihydrát,  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ , Penta  
3,5-dinitrosalicylová kyselina, SIGMA  
Methanol,  $CH_3OH$ , VWR Prolabo Chemicals  
Chloroform,  $CHCl_3$ , VWR Prolabo Chemicals  
Hexan,  $CH_3(CH_2)_4CH_3$ , lach-ner  
Ethanol,  $CH_3CH_2OH$ , lach-ner  
Kyselina citronová,  $C_6H_8O_7$ , lach-ner  
Citronan sodný,  $C_6H_5O_7Na_3$ , Lachema  
Chlorid sodný, NaCl, Lachema  
Vínan sodno-draselný,  $C_4H_4KNaO_6$ , Lachema  
Kvasnicový extrakt, HIMEDIA  
Proteózový pepton, HIMEDIA  
Hovězí extrakt, HIMEDIA  
Kas aminové kyseliny, SIGMA  
Rozpustný škrob, SIGMA  
Nutrient Broth w/1% Pepton, HIMEDIA

#### 4.1.2 Bakteriální kmeny

V práci byla použita bakterie *Burkholderia cepacia* CCM 2656 (*Buce*), která byla zakoupena z České sbírky mikroorganismů, Brno a *Burkholderia sacchari* DSM 17165 (*Busa*), která byla pořízena ze Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

#### 4.1.3 Chemikálie pro kultivaci mikroorganismů

Nutrient Broth, Himedia  
Agar powder, Himedia

#### 4.1.4 Standardní chemikálie

Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid], Fluka  
Poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) (12% 3HV), Fluka



## 4.1.5 Použité enzymy

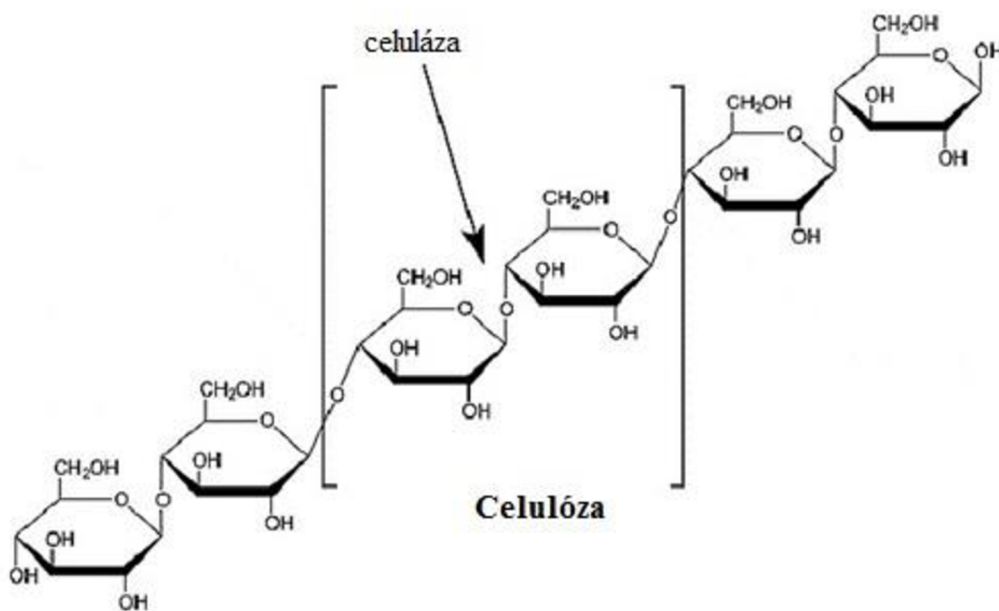
### 4.1.5.1 Celuláza z *Aspergillus niger*, Sigma-Aldrich

Celuláza z *Aspergillus niger* katalyzuje hydrolýzu endo-1,4- $\beta$ -D-glykosidické vazby v celulóze, licheninu - mechový škrob, ječmenných glukanech, a celooligosacharidech (celotrióza na celohexózu).

Štěpí neporušené glykosylaminoglykany z jádra peptidu hydrolýzou xylosyl-serinové vazby, ale neštěpí celobiózu a p-nitrofenyl- $\beta$ -D-glukosidy [24].

### 4.1.5.2 Celuláza z *Trichoderma reesei* ATCC 26921, Sigma-Aldrich

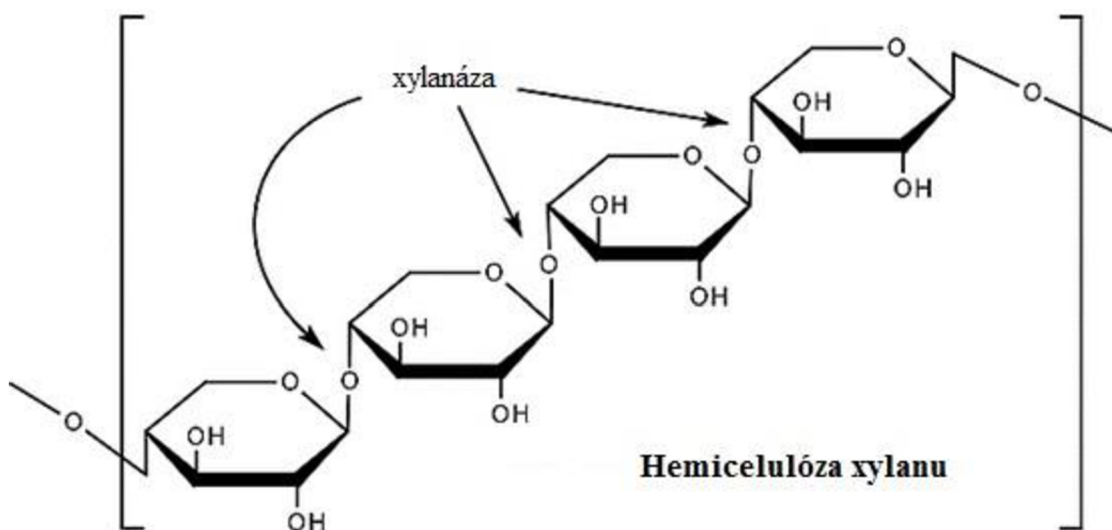
Celuláza z *Trichoderma reesei* katalyzuje rozklad celulózy na glukózu, celobiózu a vyšší polymery glukózy [25].



Obrázek 10: Celuláza z *Aspergillus* a *Trichoderma* [26]

### 4.1.5.3 Hemiceluláza z *Aspergillus niger*, Sigma-Aldrich

Hemiceluláza je směs glykolytických enzymů obsahujících aktivitu xylanázy, mannanázy a další. Pro činnost enzymu je optimální teplota 40°C a pH 4,5 [27].



Obrázek 11: Specifita xylanázy [28]

## 4.2 Příprava roztoků

### 4.2.1 Činidlo 3,5-dinitrosalicylová kyselina

Bylo naváženo 0,2 g 3,5-dinitrosalicylové kyseliny, 60 g vlnanu sodno-draselného a 40 ml 2M hydroxidu sodného. K přípravě 2M NaOH bylo odváženo 8 g. Všechny tyto složky byly doplněny destilovanou vodou na 200 ml.

### 4.2.2 Příprava tlumivých roztoků

#### 4.2.2.1 Citrátový pufr o pH = 4,5

Bylo odváženo 19,3 g kyseliny citronové a 29,57 g citronanu sodného. Navážky byly převedeny do odměrné baňky na 1000 ml a doplněny destilovanou vodou.

#### 4.2.2.2 Fosfátový pufr o pH = 7,4

Bylo odváženo 8 g chloridu sodného, 0,2 g chloridu draselného, 1,44 g hydrogen fosforečnanu sodného a 0,24 g dihydrogen fosforečnanu draselného. Navážky byly rozpuštěny v 1000 ml destilované vody. Fosfátový pufr měl hodnotu pH 7,4.

#### 4.2.2.3 Fosfátový pufr o pH = 6,5

Bylo naváženo 13,72 g dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného a 2,12 g dihydrátu hydrogenfosforečnanu sodného a doplněno destilovanou vodou na 1000 ml.

## 4.3 Příprava vzorků

### 4.3.1 Vzorky pro chemickou hydrolýzu

Bylo naváženo 50 g kávy a smícháno s 250 ml hexanu, 250 ml destilovanou vodou a 250 ml 60% ethanolu. Tyhle tři roztoky byly třepány při 50°C po dobu 30 minut. Tenhle postup byl proveden ještě jedenkrát a dále byla káva sušena v digestoři.

Po vysušení bylo odváženo 37,5 g těchto druhů kávy, smícháno s 300 ml 1% roztoku kyseliny sírové (50 g kávové sedliny na 1 l roztoku kyseliny sírové) a umístěno do autoklávu na 130°C po dobu 90 minut. Dále bylo upraveno pH na hodnotu 4 - 5 a do každého vzorku bylo přidáno 1,3 ml celulózy. Vzorky byly inkubovány po dobu 24 h při teplotě 50°C a následně zfiltrvány pod sníženým tlakem a byla stanovena koncentrace celkových sacharidů.

### 4.3.2 Vzorky pro enzymatickou hydrolýzu

Vzorky byly připraveny tak, že bylo smícháno 100 g kávy s 500 ml hexanu, 500 ml destilované vody a 500 ml 60% ethanolu. Následovalo třepání při 50°C po dobu 30 minut. To se opakovalo ještě jedenkrát a dále byla káva sušena v digestoři. Dále bylo odváženo 25 g z každého druhu kávy. To bylo zalito 170 ml pufru o hodnotě 4,5 a 7,4 a byly přidány tři enzymy do každého vzorku kávy. Byly smíchány 4 ml celulózy a 0,5 g hemicelulózy se vzorkem a pufrem o pH = 4,5 a 10 ml extracelulárního enzymatického preparátu připraveného pomocí izolátu plísně schopné využít kávovou sedlinu (enzym) (přípravou tohoto enzymového preparátu se v rámci své bakalářské práce zabývala Markéta Kovářová) s pufrem o pH = 7,4 a vzorkem.

## 4.4 Použité přístroje

Plynový chromatograf:

Trace GC Ultra FID detector, Finnigan, Thermo

Kolona – DB-WAX 30 m by 0,25 mm pro stanovení

Ostatní přístroje:

Nanofotometr Pearl, Implen

Centrifuga U-32R, Boeco Germany

Analytické váhy BAS 31, Boeco Germany  
Vodní lázeň TW2, Julabo  
Vodní lázeň G7, Transmit  
Biologický inkubátor IP100-U, Scientific  
Termostat blokový SBH-200D, Stuart  
Třepačka Helidolphunimax 1000, inkubátor Helidolphunimax 1010, Labcom s.r.o.  
Vortex TK3S, techno Kartell  
pH metr Sensodirect 200, Lovibond  
Předvážky EW 620, Kern  
Laminární box Aura mini, Bio Air Instruments  
Běžné laboratorní sklo a vybavení

#### 4.5 Gravimetrické stanovení biomasy v jednotlivých kultivacích

Byly odebrány vzorky (10 ml) do předem zvážených zkumavek a následně centrifugovány při 8000 ot/min po dobu 5 minut. Kapalná část byla odebrána pro stanovení cukrů na spektrofotometru. Biomasa byla promyta 5 ml destilované vody a spolu s ní rozsuspendována. Vzorky byly znovu centrifugovány při 8000 ot/min po dobu 5 minut. Kapalná část byla odlita a biomasa byla sušena při 70°C.

#### 4.6 Kultivace bakterie *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari*

##### 4.6.1 Příprava inokula a uchování kultury

Bakterie *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari* byly uchovávány na Petriho miskách obsahující pevné médium Nutrient Broth.

Bylo připravováno 100 ml inokula Nutrient Broth do Erlenmayerových baněk o objemu 250 ml. Dále bylo inokulum třikrát zaočkováno bakteriologickou kličkou nebo 2 ml z tekutého média. Kultivace trvala 24 hodin a následovalo další zaočkování produkčního média tímto médiem.

##### 4.6.2 Živná média

Jako kultivační medium byl použit Nutrient Broth a R2A:

###### Nutrient Broth:

Beef extract	10 g
Pepton	10 g
NaCl	5 g
Destilovaná voda	1000 ml

###### R2A:

Yeast extract	0,5 g
Proteose peptone	0,5 g
Casamino acids	0,5 g
Glukóza	10 g
Soluble starch	0,5 g
Pyruvát sodný	0,3 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,3 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,05 g
Destilovaná voda	1000 ml

Jako produkční médium bylo použito následující minerální medium (MM)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	6,8 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,5 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
$\text{NH}_4\text{Fe(III)}$ citrát	0,06 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
Roztok stopových prvků*	1 ml

\*Roztok stopových prvků 1 ml/1000 ml

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g/l
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,03 g/l
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,3 g/l
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,2 g/l
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,02 g/l
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,02 g/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,03 g/l

#### 4.7 Vzorky kávové sedliny

1. Káva v hexanu
2. Káva v destilované vodě
3. Káva v 60% ethanolu

#### 4.8 Stanovení koncentrace počátečních a konečných redukujících sacharidů pomocí 3,5-dinitrosalicylové kyseliny

Do zkumavek byl pipetován 0,1 ml vzorku kávy, 0,4 ml destilované vody (vzorek tak byl zředěn 5krát) a 0,5 ml činidla 3,5-dinitrosalicylové kyseliny. Poté byly vzorky zahřívány na vodní lázni při 70°C po dobu 10 minut. Dále byly vzorky ponechány ve tmě zchladnout. Následně byly všechny zkumavky doplněny destilovanou vodou na objem 10 ml a vše bylo důkladně promícháno. Vzorky byly analyzovány pomocí spektrofotometru při vlnové délce 540 nm. Slepý vzorek byl současně připravován s ostatními vzorky, kde bylo pipetováno 0,5 ml činidla. Po vyjmutí z vodní lázně (70°C po dobu 10 minut) a následném vychladnutí bylo doplněno na objem 10 ml, tedy 9,5 ml destilované vody. Pomocí rovnice kalibrační křivky sestavené pro dané koncentrace glukózy bylo vypočítáno množství celkových sacharidů ve vzorku.

Každý vzorek byl analyzován čtyřikrát, byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka z naměřených dat pomocí software Microsoft Office Excel.

##### 4.8.1 Stanovení kalibrační křivky

Pro stanovení kalibrační křivky byl připraven roztok glukózy o koncentraci 5g/l. Do připravených zkumavek bylo poté odpipetováno 3,0; 2,7; 2,4; 2,1; 1,8; 1,5; 1,2; 0,9; 0,6; 0,3; 0,1 ml tohoto roztoku. Zkumavky byly doplněny na objem 3 ml destilovanou vodou. Dále bylo odpipetováno 0,5 ml těchto připravených roztoků a k nim přidáno 0,5 ml činidla 3,5-dinitrosalicylové kyseliny. Zkumavky byly umístěny na 10 minut do vodní lázně při 70°C. Poté byly ponechány ve tmě zchladnout a doplněny destilovanou vodou na 10 ml. Byla změřena absorbance spektrofotometricky při 540 nm.

#### 4.9 Stanovení PHA pomocí plynové chromatografie

Princip metody závisí na převedení PHA na těkavé methylester- $\beta$ -hydroxykarboxylové kyseliny pomocí esterifikace, která je kysele katalyzovaná.

#### **4.9.1 Stanovení kalibrační křivky PHA**

Roztok dostupného PHA (standard P3HB nebo P(3HB-co-3HV) o koncentraci 10 mg/ml byl napipetován do vialek v množstvích 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1,0 ml. Byl doplněn chloroform na výsledný objem 1 ml a dále bylo přidáno 0,8 ml 15% kyseliny sírové v methanolu. Před vložením vialek do termostatu při 100°C na 3 hodiny byly uzavřeny víčkem. Po vychladnutí byl celý objem vialek smíchán s 0,5 ml roztoku NaOH. Po protřepání a oddělení fází byla odpipetována spodní chloroformová vrstva a následně převedena do předem připravených vialek, které byly opět uzavřeny víčkem. Poté až byly vialky zchladnuty, byl celkový objem převeden do větších vialek s 0,5 ml 0,05 mol/l NaOH. Po protřepání a oddělení fází bylo odpipetováno 0,05 ml spodní vrstvy, která byla následně převedena spolu s 0,950 ml chloroformu do vialek. Vialky byly uzavřeny a analyzovány pomocí GC.

#### **4.9.2 Stanovení PHA v biomase**

Do vialek bylo přibližně naváženo 10 mg biomasy, která byla stanovena. K biomase byl přidán 1 ml chloroformu a 0,8 ml 15% roztoku kyseliny sírové v methanolu. Než byly vialky umístěny do termostatu při 100°C po dobu 3 h, byly pečlivě uzavřeny víčkem. Poté až byly vialky zchladnuty, byl celkový objem převeden do větších vialek s 0,5 ml 0,05 mol/l NaOH. Po protřepání a oddělení fází bylo odpipetováno 0,05 ml spodní vrstvy, která byla následně převedena spolu s 0,950 ml chloroformu do vialek. Vialky byly uzavřeny a analyzovány pomocí GC.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

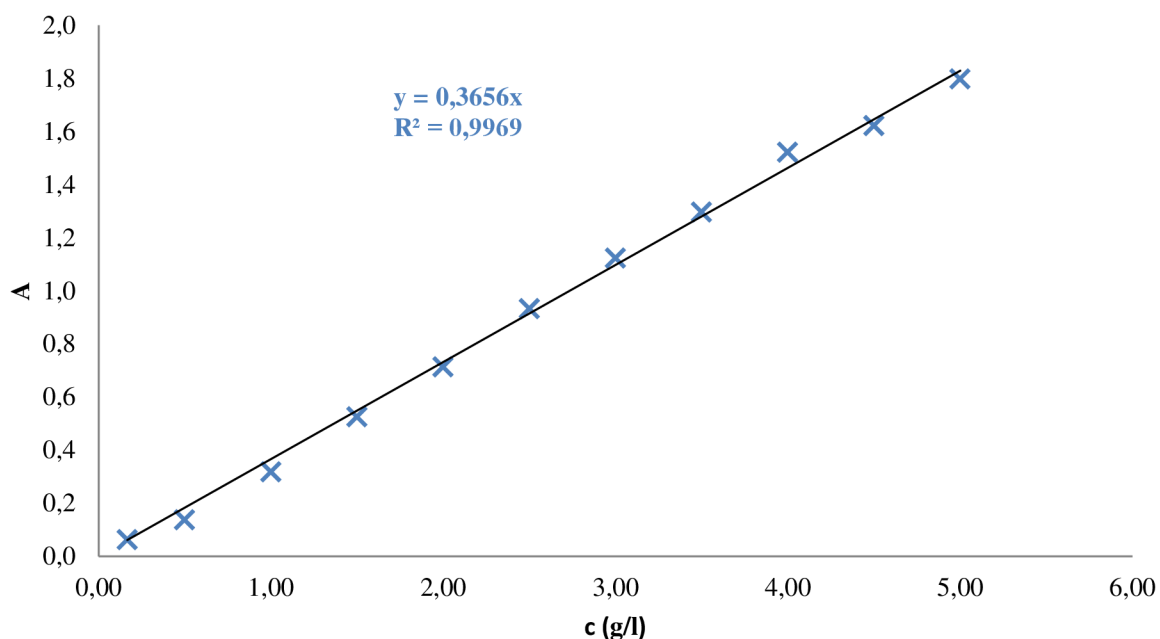
### 5.1 Kalibrace metod

#### 5.1.1 Kalibrace stanovení redukujících sacharidů pomocí 3,5-dinitrosalicylové kyseliny

Data pro stanovení kalibrační závislosti glukózy byla získána spektrofotometrickým měřením roztoků o různých koncentracích při 540 nm.

Tabulka 2: Závislost absorbance při  $\lambda = 540$  nm na koncentraci glukózy

koncentrace glukózy (g/l)	A (540 nm)
0,17	0,062
0,5	0,137
1	0,317
1,5	0,524
2	0,712
2,5	0,932
3	1,122
3,5	1,296
4	1,521
4,5	1,621
5	1,797



Graf 1: Kalibrační závislost glukózy pro stanovení redukujících sacharidů při 540 nm.

Ze závislosti absorbance na koncentraci byla stanovena kalibrační závislost  $y = 0,3656 x$ , která byla použita pro stanovení koncentrace redukujících sacharidů. Regresní koeficient  $R^2 = 0,9969$ .

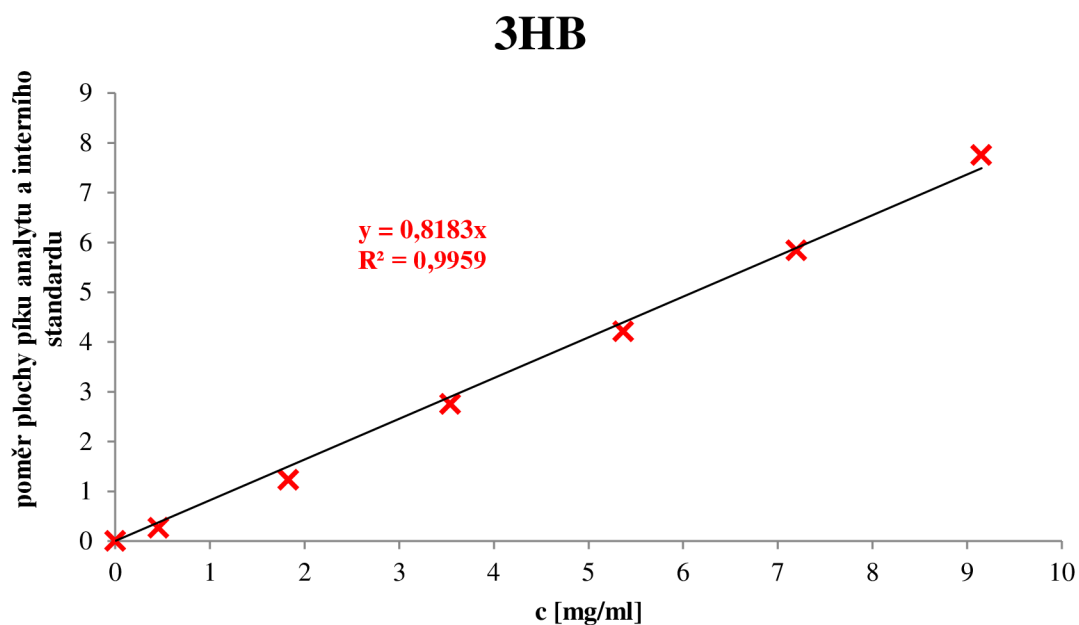
## 5.1.2 Stanovení PHA plynovou chromatografií

### 5.1.2.1 Kalibrační křivka 3HB

Pro kvantitativní stanovení PHB byla stanovena kalibrační přímka. Jedná se o závislost poměru plochy píku analytu a interního standardu na koncentraci 3HB.

Tabulka 3: Závislost koncentrace 3HB na poměru plochy píku analytu a interního standardu

3HB (mg/ml)	Poměr plochy píku analytu a interního standardu
0	0
0,458	0,265
1,830	1,226
3,538	2,748
5,368	4,212
7,198	5,837
9,152	7,754



Graf 2: Kalibrační závislost poměru plochy píku analytu a interního standardu na koncentraci 3HB

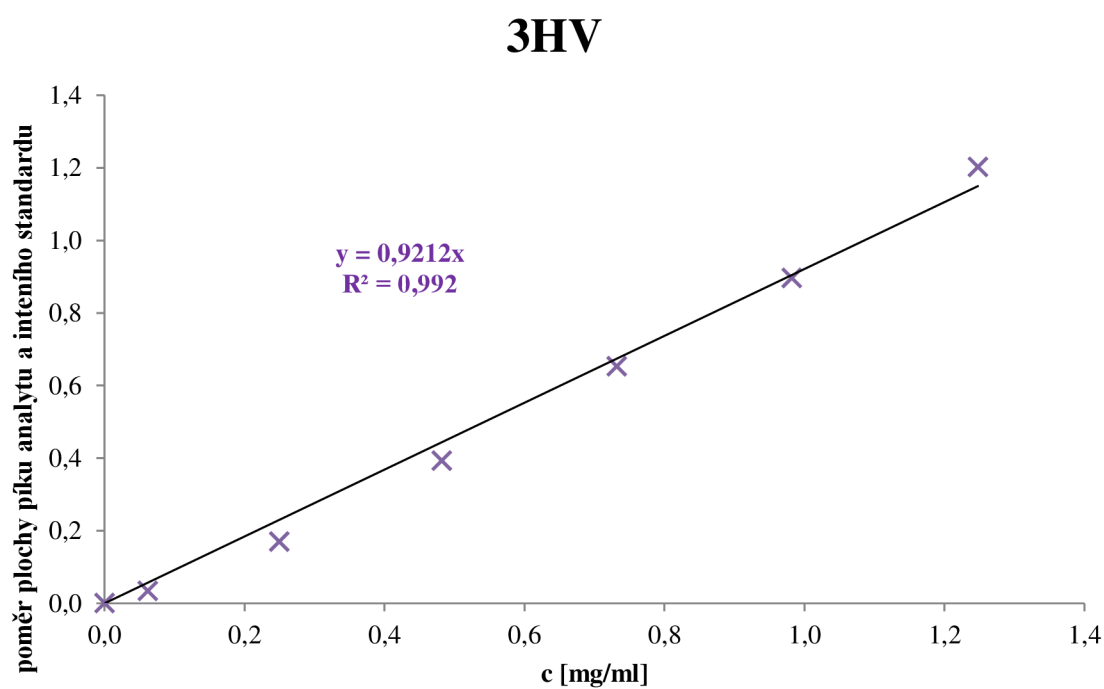
Byla stanovena kalibrační závislost  $y = 0,8183 x$ , regresní koeficient je  $R^2 = 0,9959$ .

### 5.1.2.2 Kalibrační křivka 3HV

Kalibrační přímka je závislost poměru plochy píku analytu a interního standardu na koncentraci 3HV.

Tabulka 4: Závislost koncentrace 3HV na ploše píku analytu a interního standardu

3HV (mg/ml)	Poměr plochy píku analytu a interního standardu
0	0
0,062	0,034
0,250	0,170
0,482	0,393
0,732	0,653
0,982	0,896
1,248	1,202



Graf 3: Kalibrační závislost poměru plochy píku analytu a interního standardu na koncentraci 3HV

Byla stanovena kalibrační závislost  $y = 0,9212 x$ , regresní koeficient je  $R^2 = 0,992$ .



## 5.2 Srovnání produkce PHA u dvou druhů bakterií a různých druhů média připravených z kávové sedliny

Tento experiment se zabýval stanovením nejvhodnějšího produkčního kmene bakterií ve třech různých médiích. Byly porovnávány dva kmeny bakterií: *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari*. Byla provedena kyselá a enzymatická hydrolýza.

### 5.2.1 Hydrolýza zředěnou minerální kyselinou a následná enzymatická hydrolýza

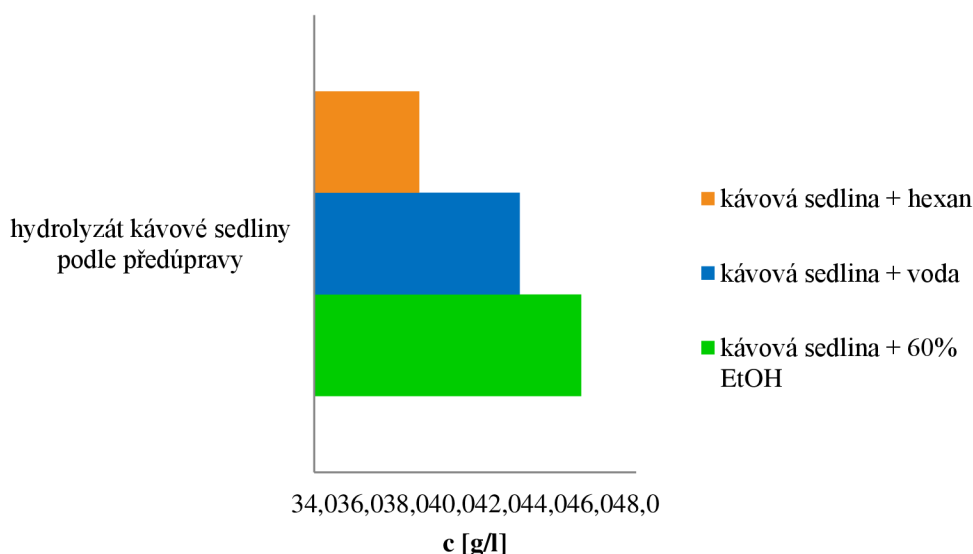
Pro kyselou hydrolýzu byla použita kyselina sírová o koncentraci 1%, jejímž cílem bylo hydrolytické štěpení hemicelulózy a následně byla kávová sedlina vystavena působení celulázy, která měla za cíl katalyzovat hydrolýzu rezistentní celulózy. Tento pracovní postup se nám osvědčil v předchozí práci [[14]]. Před samotnou hydrolýzou byla kávová sedlina vystavena působení 3 extrakčních činidel: hexanu (odstranění lipidů), 60 % roztoku ethanolu (odstranění polyfenolů) a vody (odstranění ve vodě rozpustných polyfenolů a dalších podílů kávové sedliny). Lipidy kávové sedliny a stejně tak i polyfenoly jsou velice zajímavé látky, které nacházejí uplatnění ve farmacii, potravinářském průmyslu anebo kosmetice. Jejich separace z kávové sedliny před hydrolýzou může tedy mít pozitivní ekonomický vliv. Cílem tohoto experimentu bylo ověřit vliv takovéto předúpravy kávové sedliny na výtěžnost biotechnologického procesu. Byla stanovena koncentrace redukujících sacharidů, výtěžek hydrolýzy, obsah biomasy a obsah PHA v biomase.

#### 5.2.1.1 Stanovení koncentrace počátečních redukujících sacharidů po procesu hydrolýzy

Tabulka 5: Výsledky koncentrace počátečních redukujících sacharidů po procesu hydrolýzy a její výtěžnost

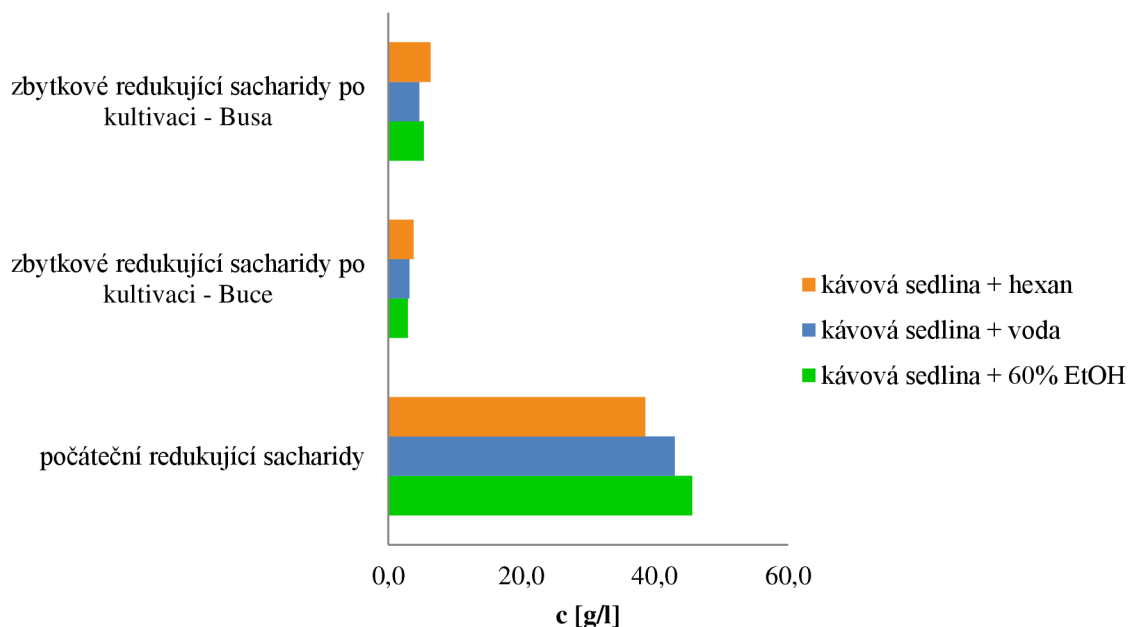
	koncentrace (g/l)	
	počáteční redukující sacharidy po procesu hydrolýzy	výtěžnost hydrolýzy (g/g)
kávová sedlina + voda	42,943 ± 2,128	0,344
kávová sedlina + 60% EtOH	45,610 ± 7,446	0,365
kávová sedlina + hexan	38,567 ± 3,288	0,309

Poznámka: výtěžnost hydrolýzy je udávána v množství redukujících sacharidů (g) získaných z 1 g kávové sedliny.



Graf 4: Obsah počátečních redukujících sacharidů po procesu hydrolýzy

Z grafu je zřejmé, že nejnižší koncentraci počátečních redukujících cukrů mělo médium připravené hydrolyzou kávové sedliny, která byla vystavena působení hexanu (38,567 g/l), dále to bylo připravené hydrolyzou kávové sedliny upravené vodou (42,943 g/l) a nejvyšší zastoupení počátečních redukujících sacharidů se nachází v médiu připraveném hydrolyzou kávové sedliny předupravené 60% ethanolem (45,610 g/l).



Graf 5: Obsah redukujících sacharidů v různých druzích média po kyselé hydrolyze

V grafu 5 jsou zvýrazněny dva druhy bakterií se třemi druhy média. Po zaočkování těchto médií bakteriemi se koncentrace sacharidů snížila a to proto, že každá bakterie spotřebovala určité množství sacharidů.

*Burkholderia cepacia* spotřebovala nejvíce sacharidů v médiu připraveném hydrolyzou kávové sedliny extrahované 60 % ethanolem, kde koncentrace redukujících cukrů po ukončení kultivace dosáhla 2,930 g/l z celkové hodnoty koncentrace 45,610 g/l. V médiu kávová sedlina extrahovaná vodou spotřebovala bakterie o trochu méně sacharidů než v předchozím případě, kde její koncentrace celkových sacharidů 42,943 g/l klesla na koncentraci 3,183 g/l. Nejmenší spotřeba byla v médiu připraveném hydrolyzou kávové sedliny extrahované hexanem, kde koncentrace sacharidů klesla z 38,567 g/l na 3,768 g/l.

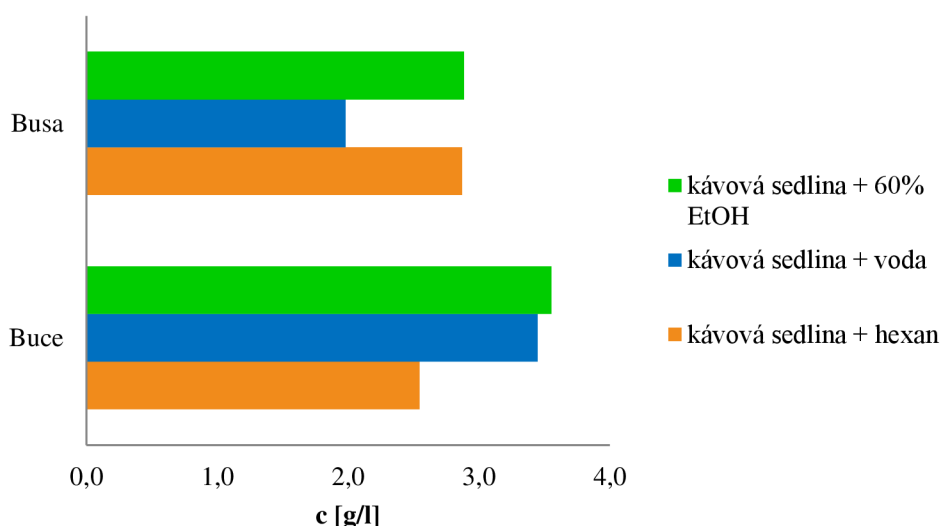
*Burkholderia sacchari* spotřebovala nejvíce sacharidů v médiu připraveném hydrolyzou kávové sedliny extrahované 60% ethanolem, kde koncentrace redukujících cukrů po ukončení kultivace dosáhla 5,320 g/l z celkové hodnoty koncentrace 45,610 g/l. V médiu kávová sedlina extrahovaná vodou spotřebovala jen o velmi malé množství sacharidů než v případě předchozím, kde její koncentrace celkových sacharidů 42,943 g/l klesla na koncentraci 4,664 g/l. Nejmenší množství sacharidů spotřebovala v médiu připraveném hydrolyzou kávové sedliny extrahované hexanem, kde její koncentrace sacharidů klesla z 38,567 g/l na 6,318 g/l.

### 5.2.1.2 Výťažky biomasy a PHA

Tabulka 6: Stanovení obsahu PHA v biomase a obsah biomasy

		Biomasa (g/l)	PHA (%)	3HV (%)	PHA (g/l)	výtěžnostní koef. (g/g)
Buce	kávová sedlina extrahovaná 60 % ethanolom	3,553 ± 0,006	32,472 ± 1,054	6,09	1,154 ± 0,218	0,107
	kávová sedlina extrahovaná hexanem	2,545 ± 0,010	24,748 ± 3,375	7,23	0,630 ± 0,238	0,081
	kávová sedlina extrahovaná vodou	3,448 ± 0,001	26,213 ± 2,878	6,95	0,904 ± 0,099	0,093
Busa	kávová sedlina extrahovaná 60 % ethanolom	2,885 ± 0,003	27,190 ± 3,692	5,38	0,784 ± 0,083	0,094
	kávová sedlina extrahovaná hexanem	2,870 ± 0,001	24,424 ± 1,618	6,12	0,701 ± 0,040	0,133
	kávová sedlina extrahovaná vodou	1,980 ± 0,009	29,325 ± 3,042	5,32	0,581 ± 0,218	0,071

Poznámka: výtěžnostní koeficient (g/g) je dán podílem koncentrace PHA (g/l) ku rozdílu koncentrací počátečních redukujících sacharidů (před kultivací bylo kávové médium ředěno na 30%) a zbytkových redukujících sacharidů po kultivaci

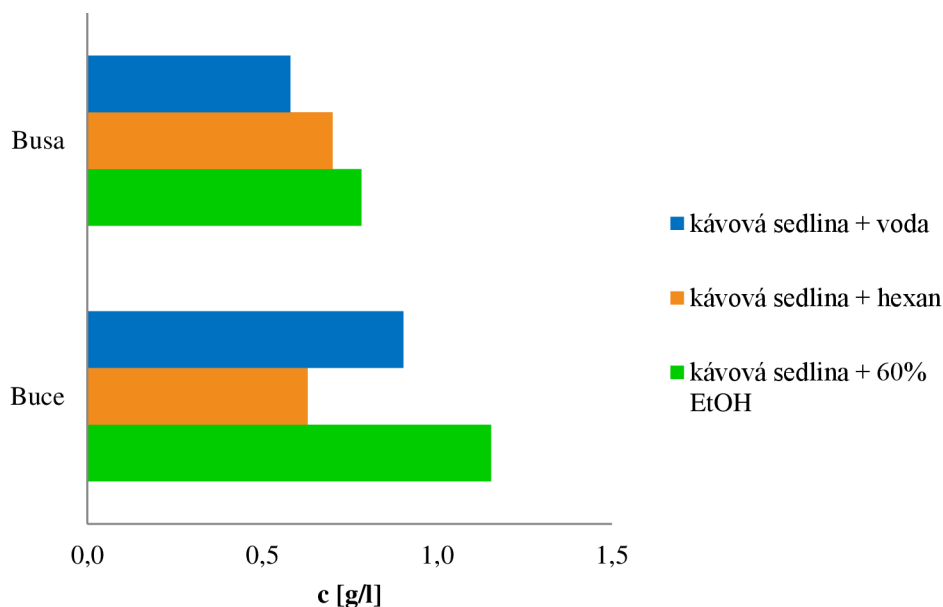


Graf 6: Obsah biomasy u různých producentů PHA v různých druzích média

*Burkholderia cepacia* měla nejvyšší obsah biomasy v médiu kávová sedlina + 60% ethanol o koncentraci 3,553 g/l. V médiu kávová sedlina + voda byl obsah biomasy 3,448 g/l a od média kávová sedlina + 60% ethanol se značně nelišil. Naopak nejnižší obsah biomasy 2,545 g/l mělo médium kávová sedlina + hexan. U tohoto média bylo dosaženo nejnižší efektivity hydrolýzy a navíc je možné, že lipidy, které byly extrahovány pomocí hexanu, mohou pozitivně ovlivňovat růst biomasy.

*Burkholderia sacchari* měla nejvyšší obsah biomasy jak v médiu kávová sedlina + 60% ethanol (2,885 g/l), tak v médiu kávová sedlina + hexan (2,870 g/l), kde jejich hodnoty byly téměř stejné. Nejnižší obsah měla v médiu kávová sedlina + voda s koncentrací biomasy 1,980 g/l.

Z grafu 6 je zřejmé, že největší obsah biomasy měl kmen *Burkholderia cepacia* a to v médiu kávová sedlina + 60% ethanol.

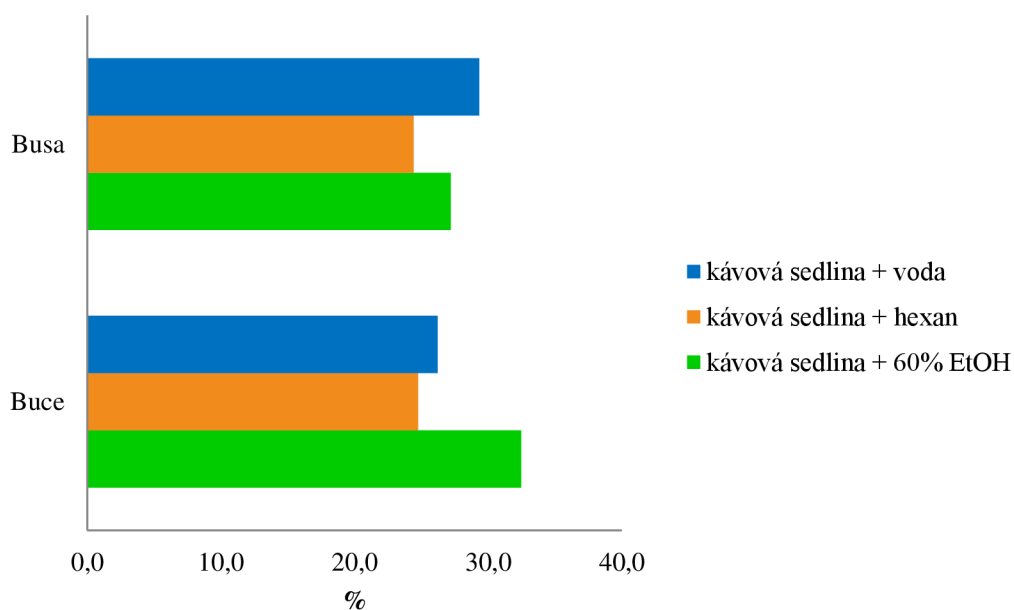


Graf 7: Koncentrace PHA

*Burkholderia cepacia* vyprodukovala nejvyšší obsah PHA v biomase v médiu kávová sedlina + 60% ethanol o koncentraci 1,154 g/l. O trochu méně to bylo v médiu kávová sedlina + voda o koncentraci 0,904 g/l a v médiu káva + hexan vyprodukovala nejnižší obsah PHA v biomase o hodnotě 0,630 g/l.

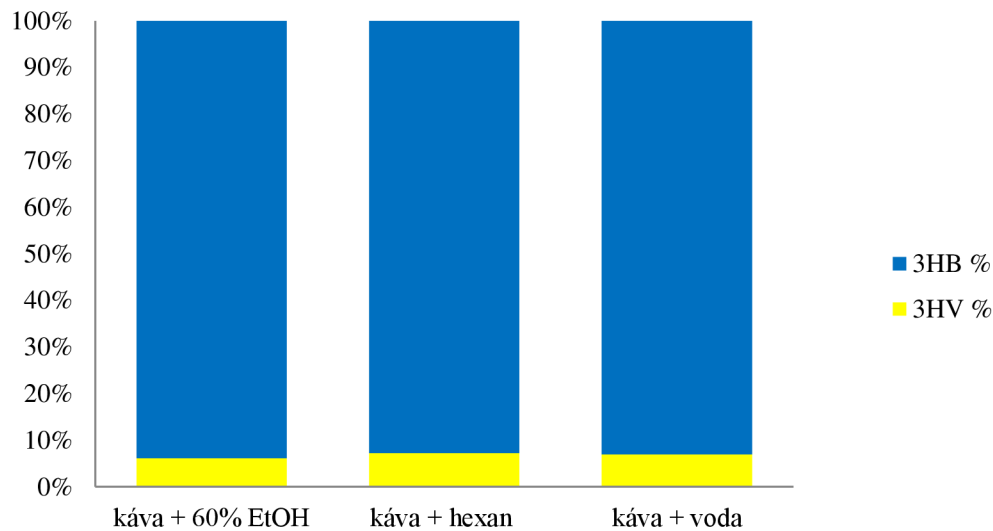
*Burkholderia sacchari* byla nejlepším producentem v médiu kávová sedlina + 60% ethanol, kde obsah PHA byl 0,784 g/l. Obsah PHA v biomase v médiu kávová sedlina + hexan (0,701 g/l) se od média kávová sedlina + 60% ethanol příliš nelišila. Nejnižší obsah PHA měla v médiu kávová sedlina + voda o koncentraci 0,581 g/l.

Graf 7 tedy znázorňuje, že nejlepším producentem PHA je kmen *Burkholderia cepacia* v médiu kávová sedlina + 60% ethanol.

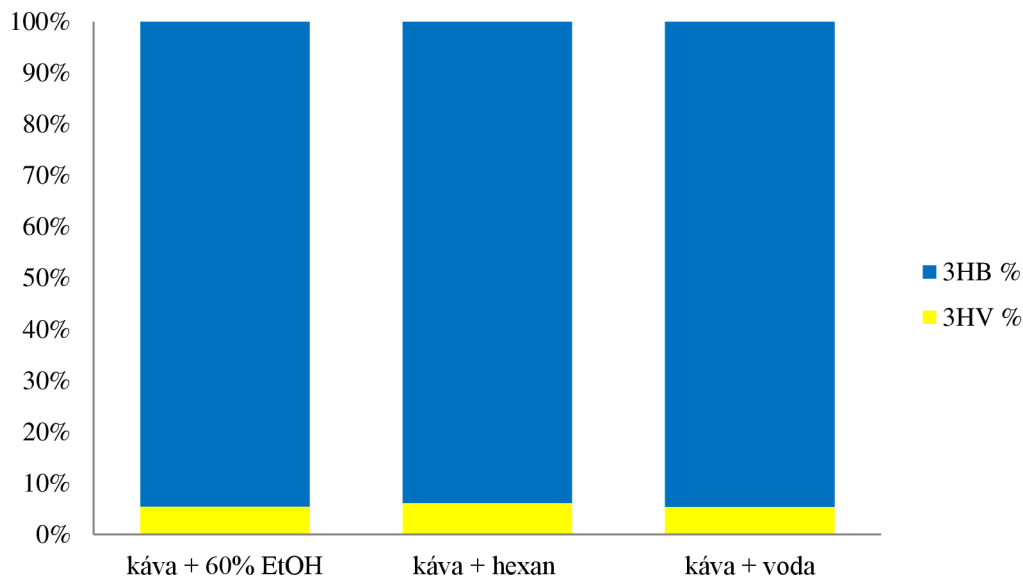


Graf 8: Procentuální zastoupení PHA v biomase

Obecně lze říci, že nejvyšších výtěžků biomasy bylo dosaženo v kultivačním médiu připraveném hydrolyzou kávové sedliny, která byla vystavena extrakci 60 % ethanolem. Tato předúprava odstraní většinu fenolických látek, které mají výrazně antimikrobiální charakter. Proto měla pravděpodobně pozitivní vliv na výtěžky biotechnologického procesu. Navíc ethanolový extrakt kávové sedliny může být využit například při výrobě potravinových doplňků, funkčních potravin anebo kosmetických. Naopak extrakce lipidů pomocí hexanu měla na výtěžky kultivací negativní vliv, je možné že lipidické látky jsou bakterie schopny využít jako alternativní substrát, jejich odstranění tedy spíše redukovalo sledované výtěžnostní parametry.



Graf 9: Složení PHA produkovaných bakterií *Burkholderia cepacia* ve třech různých druzích média



Graf 10: Složení PHA produkovaných bakterií *Burkholderia sacchari* ve třech různých druzích média

Nejvyšší obsah PHA v biomase byl u bakterie *B. cepacia* dosažen v kultivačním médiu s kávovou sedlinou extrahovanou 60% ethanolem o 32,472%. U bakterie *B. sacchari* to pak bylo při kultivaci v médiu připraveném z kávové sedliny extrahované vodou 29,325% měla nejvyšší zastoupení PHA

v médiu kávová sedlina + voda. Na druhé straně procentuální zastoupení PHA v médiu kávová sedlina + hexan je u obou kmenů stejné.

Je zajímavé, že obě bakterie byly při kultivaci na všech médiích testovaných v tomto experimentu schopné produkovat kopolymer 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu. Je pravděpodobné, že jako prekurzor 3-hydroxyvalerátu sloužila levulinová kyselina, která vzniká degradací hexózu za podmínek kyselé hydrolyzy [[14]]. Je nutné poznamenat, že kopolymer má výrazně lepší mechanické i technologické vlastnosti než homopolymer PHB. Z toho důvodu je schopnost akumulace kopolymeru bez přídavku prekurzoru nutné vnímat výrazně pozitivně.

Pro produkci P(H3B-co-3HV) byl vhodným médiem kávová sedlina + hexan v kombinaci s kmenem *Burkholderia cepacia*, protože bylo dosahováno nejvyššího obsahu 3HV (7,23%) v kopolymeru.

## 5.2.2 Enzymatická hydrolyza

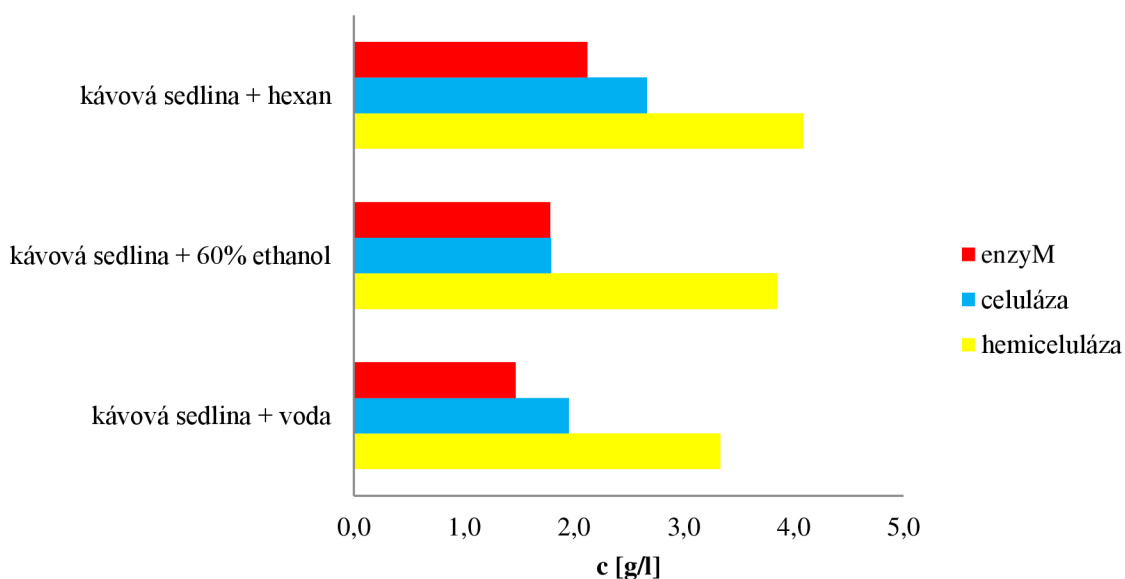
V rámci dalšího experimentu byl ověřen alternativní přístup k hydrolyze kávové sedliny – nebyla provedena hydrolyza zředěnou minerální kyselinou, ale byly použity komerčně dostupné enzymy celulóza a hemicelulóza. Navíc byl použit enzymatický koktejl, jehož přípravě se ve své práci věnovala studentka Markéta Kovářová (enzyM). Byly použity opět tři vzorky kávové sedliny - extrahovaná hexanem, 60% ethanolem a vodou. Hydrolyza byla provedena postupem, který je popsán v kapitole 3.4.1. Enzymatická hydrolyza.

### 5.2.2.1 Stanovení počátečních redukcí sacharidů

Nejprve byly v jednotlivých hydrolyzáttech stanoveny koncentrace redukcí sacharidů.

Tabulka 7: Výsledky počátečních redukcí sacharidů enzymatické hydrolyzy

	Počáteční redukcí sacharidy		
	koncentrace (g/l)		
	celulóza	hemicelulóza	enzyM
Hexan	2,667 ± 0,012	4,089 ± 0,012	2,124 ± 0,010
60% ethanol	1,796 ± 0,015	3,852 ± 0,006	1,787 ± 0,013
Voda	1,956 ± 0,018	3,337 ± 0,008	1,472 ± 0,006



Graf 11: Koncentrace počátečních redukcí sacharidů enzymatické hydrolyzy v různých druzích média

Při pohledu na *graf 11* je zřejmé, že hemiceluláza vyprodukovala nejvíce redukujících sacharidů na všech třech vzorcích kávové sedliny, dále to byl enzym celuláza a v poslední řadě EnzyM.

V kombinaci hemicelulázy a média kávová sedlina + hexan bylo obsaženo nejvyšší koncentrace celkových sacharidů 4,089 g/l, s médiem kávová sedlina + 60 % ethanol 3,852 g/l a nejnižší koncentrace celkových sacharidů mělo médium kávová sedlina + voda 3,337 g/l.

Celuláza se kombinovala s médiem kávová sedlina + hexan, kde byl nejvyšší obsah celkových sacharidů 2,667 g/l, v médiu kávová sedlina + voda 1,956 g/l a nejnižší koncentrace byla v médiu kávová sedlina + 60 % ethanol s hodnotou 1,796 g/l.

EnzyM s médiem kávová sedlina + hexan, kde vyprodukoval nejvíce sacharidů o koncentraci 2,124 g/l, v médiu kávová sedlina + 60 % ethanol vyprodukoval 1,787 g/l a nejnižší obsah celkových sacharidů byl v médiu kávová sedlina + voda 1,472 g/l.

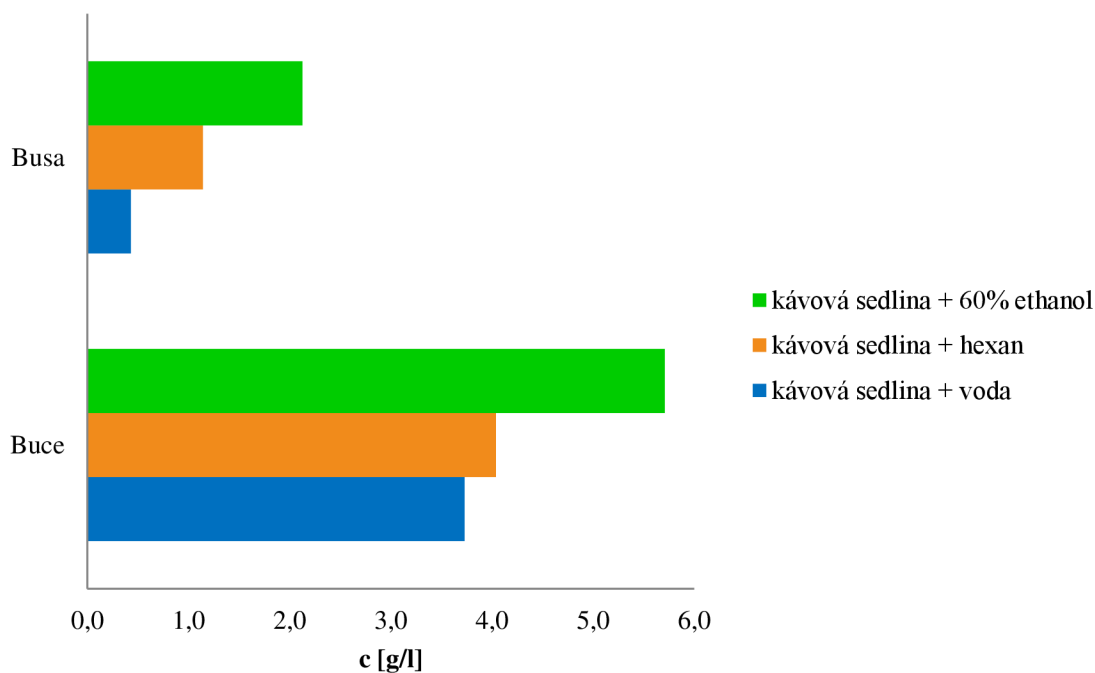
Protože hemiceluláza vytvořila nejvíce sacharidů, byla média vybrána pro produkci PHA.

### 5.2.2.2 Stanovení PHA v biomase a obsah biomasy

Média připravené hydrolyzou kávové sedliny pomocí hemicelulázy byly použity pro kultivaci obou bakteriálních kultur - *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari*.

Tabulka 8: Obsah biomasy v různých druzích média s hemicelulázou a stanovení PHB v biomase

Hemiceluláza	biomasa (g/l)		PHB (%)	PHB (g/l)
	Buce	Busa	Buce	
kávová sedlina + hexan	4,040 ± 0,003	1,140 ± 0,005	23,819 ± 2,356	0,962 ± 0,020
kávová sedlina + 60% ethanol	5,708 ± 0,006	2,125 ± 0,001	26,066 ± 2,781	1,488 ± 0,085
kávová sedlina + voda	3,728 ± 0,004	0,430 ± 0,006	26,554 ± 0,361	0,990 ± 0,074



Graf 12: Obsah biomasy v různých druzích média s hemicelulázou



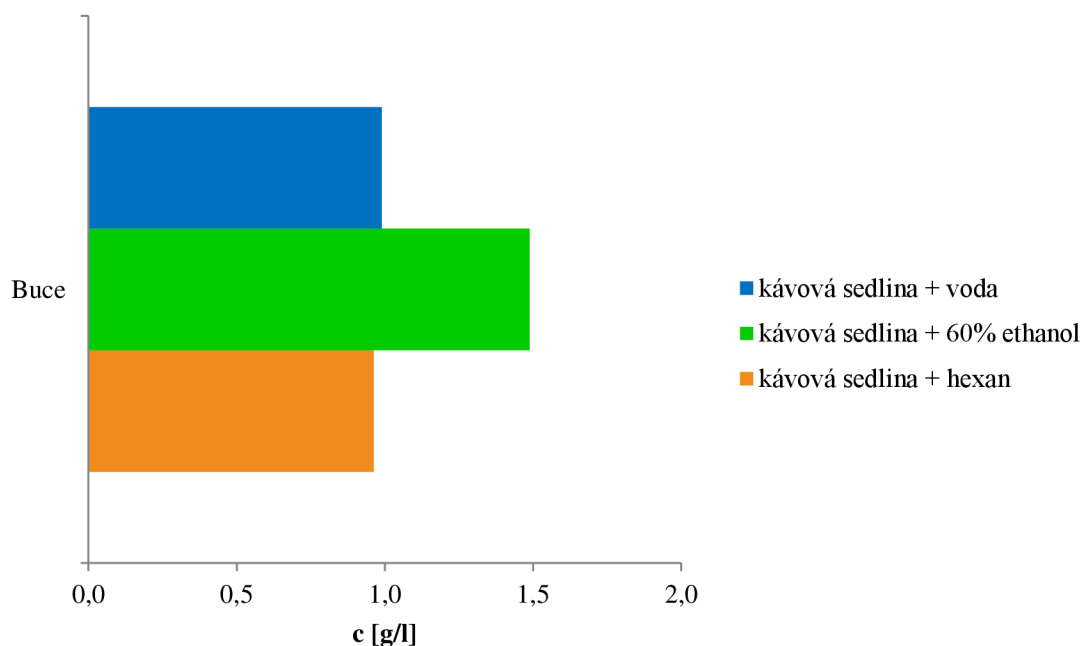
V médiu kávová sedlina + 60 % ethanol byl obsah biomasy u kmene *Burkholderia cepacia* (5,708 g/l) asi třikrát vyšší než u kmene *Burkholderia sacchari* (2,125 g/l).

V médiu kávová sedlina + hexan byl obsah biomasy u kmene *Burkholderia cepacia* (4,040 g/l) téměř čtyřikrát vyšší než u kmene *Burkholderia sacchari* (1,140g/l).

V médiu kávová sedlina + voda byl obsah biomasy u kmene *Burkholderia cepacia* (3,728 g/l) skoro sedmkrát vyšší než u kmene *Burkholderia sacchari* (0,430 g/l).

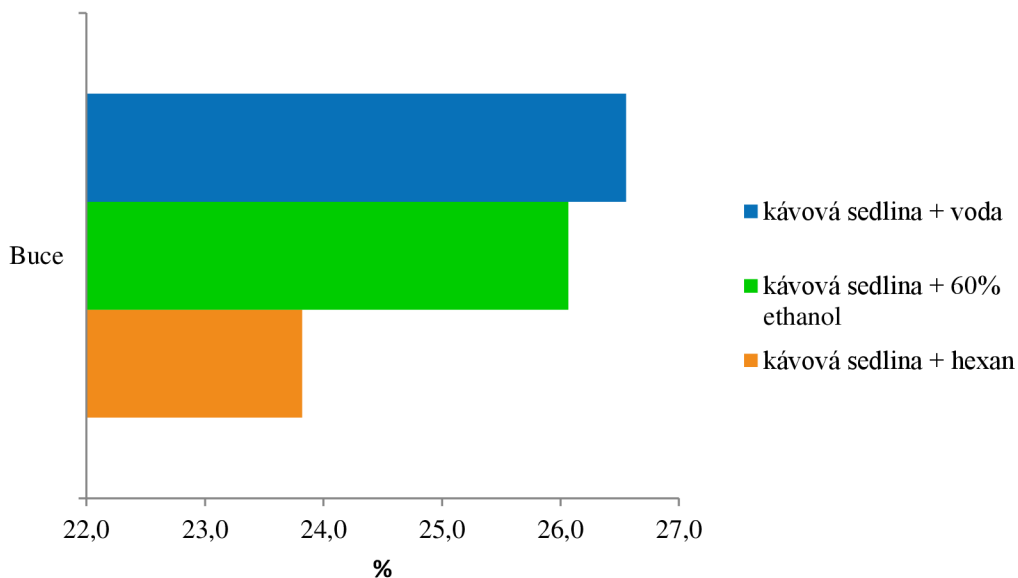
Celkově lze říci, že obě bakterie byly schopny využít média připravená enzymatickou hydrolyzou kávové sedliny, nicméně *B. cepacia* vykazovala výrazně vyšší výtěžky biomasy a na rozdíl od *B. sacchari* byla na testovaných médiích schopna produkovat PHA, přičemž výtěžky dosažené v rámci tohoto experimentu jsou srovnatelné s těmi, kterých bylo dosaženo při kultivaci na hydrolyzátu kávové sedliny připraveného pomocí kombinace chemické a enzymatické hydrolyzy (kapitola 5.2.1 Hydrolyza zředěnou minerální kyselinou a následná enzymatická hydrolyza). Na druhé straně při využití hydrolyzátů připravených pouze pomocí enzymatické hydrolyzy neprodukovala bakteriální kultura kopolymer P(HB-co-HV). To je pravděpodobně způsobeno tím, že v průběhu enzymatické hydrolyzy nevzniká kyselina levulinová ani žádný jiný potenciální prekurzor 3HV.

Je zajímavé, že i přes výrazně nižší účinnost hydrolyzy (max. 4 g/l redukujících sacharidů) dosahovala především kultura *B. cepacia* relativně vysokých výtěžků biomasy i PHA. V případě média připraveného pomocí extrakce 60 % ethanolem a hydrolyzou pomocí hemicelulázy byl výtěžek biomasy (5,708 g/l) dokonce vyšší než počáteční koncentrace sacharidů (3,852 g/l). To naznačuje, že redukující sacharidy nejsou jediným substrátem, který se v průběhu hydrolyzy uvolňuje z kávové sedliny. Důležitou roli mohou hrát také proteiny a případně lipidy.



Graf 13: Koncentrace PHB





Graf 14: Obsah PHB v biomase

### 5.3 Hydrolýza kávové sedliny pomocí vyšší dávky enzymů případně jejich kombinace a následná kultivace

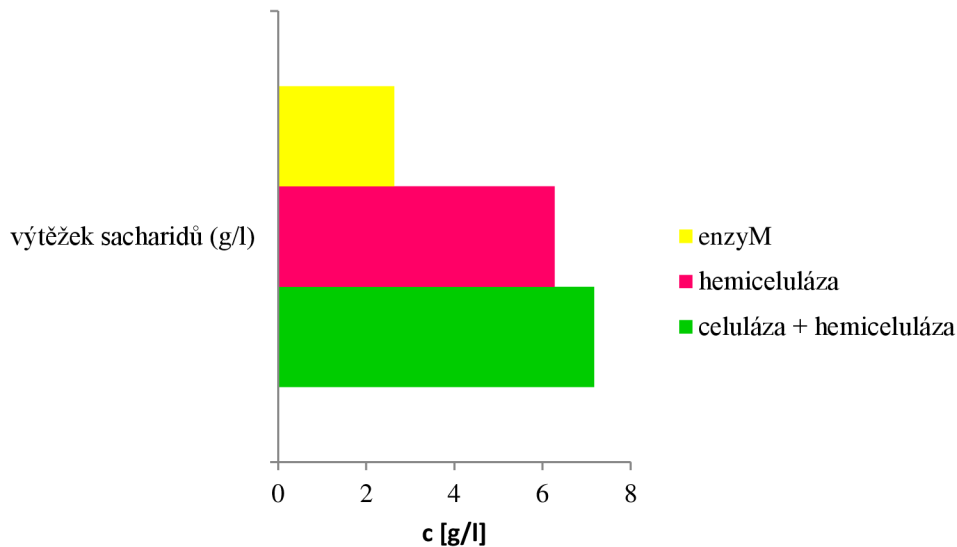
#### 5.3.1 Stanovení redukcujících sacharidů v hydrolyzátech

V dalším experimentu jsme se pokusili zlepšit proces hydrolýzy kávové sedliny tím, že jsme použili kombinaci hemicelulázy a celulózy, v dalším vzorku jsme navýšili koncentraci hemicelulázy na dvojnásobek a také jsme použili enzymatický preparát produkovaný izolátem plísně na kávové sedlině o vyšší celulózové a manázové aktivitě (viz. Bakalářská práce Markéty Kovářové). Hydrolyzována byla opět kávová sedlina, která byla před hydrolýzou extrahována 60 % ethanolom.

Tabulka 9: Zastoupení redukcujících sacharidů

	výtěžek sacharidů (g/l)	výtěžnostní koeficient (g/g)
celulóza + hemicelulóza	7,175 ± 0,241	0,024
hemicelulóza	6,277 ± 0,212	0,126
enzym M	2,637 ± 0,007	0,053

Poznámka: výtěžnost koeficient je udáván v množství redukcujících sacharidů (g) získaných z 1 g kávové sedliny.



Graf 15: Koncentrace redukujících sacharidů

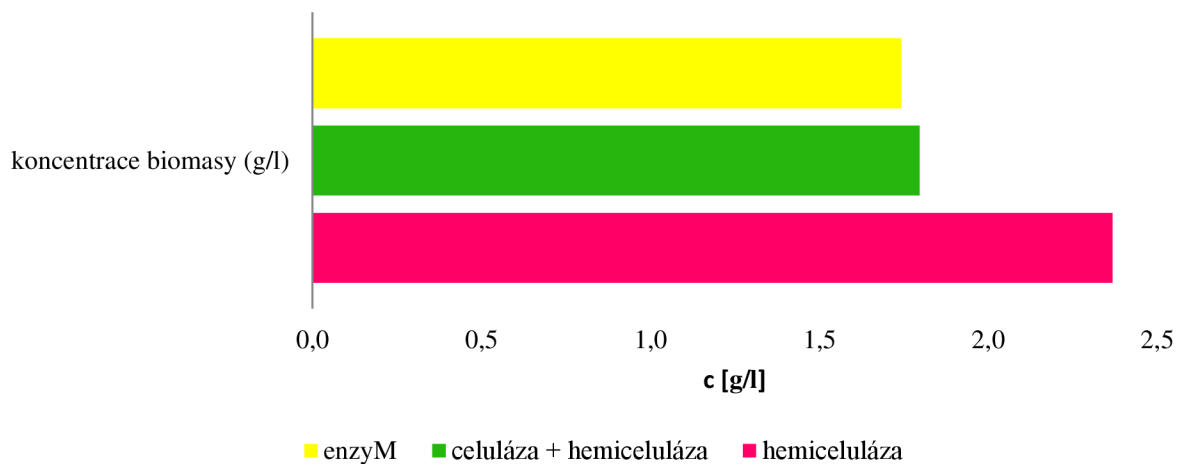
Použití kombinace enzymů anebo navýšení dávky hydrolytického enzymu navýšilo koncentraci redukujících sacharidů, což dokazuje vyšší efektivitu hydrolytického procesu, než bylo v předchozím experimentu. Nicméně ani přesto se při použití pouze enzymatické hydrolýzy nedosáhlo koncentrace sacharidů, kterou umožnila kombinace chemické hydrolýzy (zředěnou minerální kyselinou) a enzymatické hydrolýzy.

### 5.3.1.1 Obsah biomasy a stanovení PHA v biomase

Média připravená pomocí vyšší dávky enzymu anebo kombinací enzymů byla využita ke kultivaci bakterie *B. cepacia*.

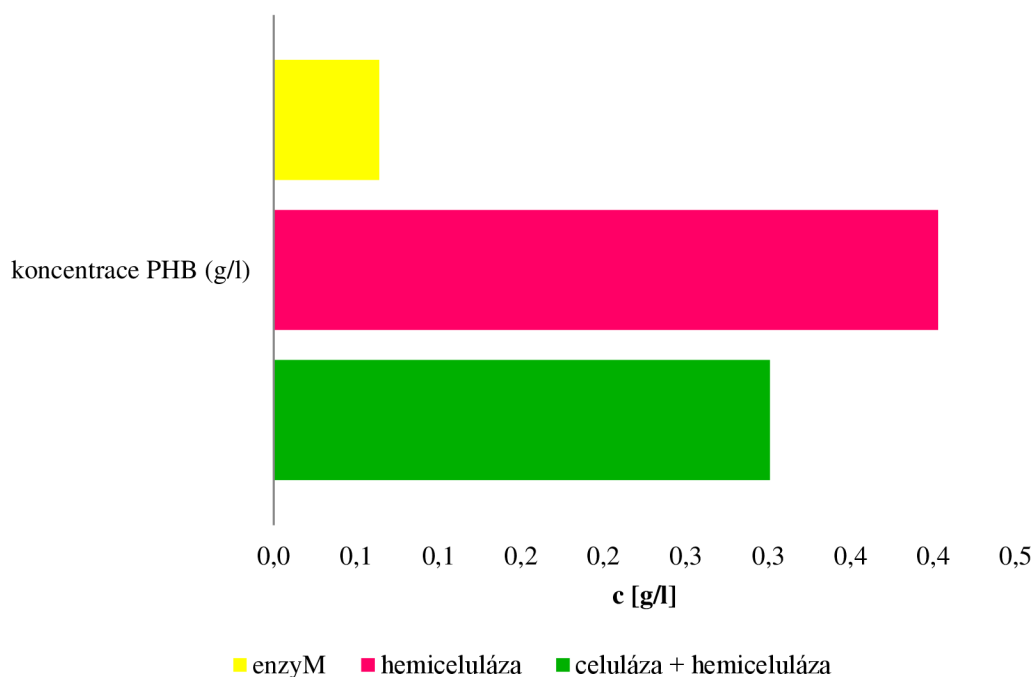
Tabulka 10: Obsah biomasy s různými druhy enzymů a stanovení PHB v biomase

	biomasa (g/l)	PHB (%)	PHB (g/l)
celulóza + hemiceluláza	1,797 ± 0,004	16,72 ± 1,66	0,301 ± 0,072
hemiceluláza	2,368 ± 0,003	16,82 ± 3,40	0,403 ± 0,121
enzyM	1,743 ± 0,001	3,686 ± 0,354	0,064 ± 0,005

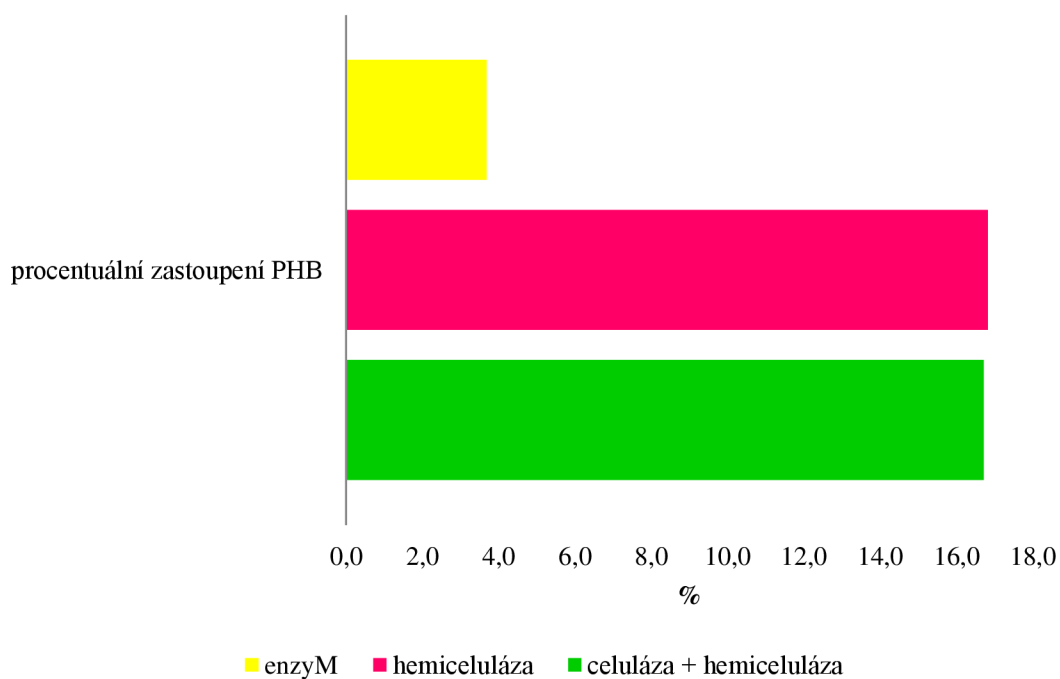


Graf 16: Koncentrace biomasy s použitím tří různých enzymů

Nejvyšší výtěžek biomasy 2,368 g/l se nacházel v médiu připraveném pomocí vyšší dávky enzymu (hemiceluláza). Podobné výtěžky biomasy měly média připravené kombinací enzymů (hemiceluláza + celulóza) o koncentraci 1,797 g/l a enzymatickým preparátem (enzyM) o hodnotě 1,743 g/l.



Graf 17: Výtěžek PHB na hydrolyzátu kávové sedliny připraveném pomocí vyšší dávky případně kombinace enzymů



Graf 18: Obsah PHB v biomase dosažený při kultivaci na hydrolyzátu kávové sedliny připraveném pomocí vyšší dávky případně kombinace enzymů

Nejvyšší produkce polymeru PHB, který vyprodukoval kmen *Burkholderia cepacia* při kultivaci na hydrolyzátu připraveném pomocí vyšší dávky enzymu hemiceluláza – 0,403 g/l PHB s procentuálním zastoupením v biomase 16,82%. Při použití kombinace enzymů hemiceluláza a celuláza se produkce polymeru lišila jen velmi málo. Koncentrace PHB byla 0,301 g/l s obsah PHB v biomase 16,72%. Nejnižších výtěžků pak bylo dosaženo při použití enzymu enzyM, kde byla koncentrace PHB 0,064 g/l s obsahem v biomase 3,686 %.

## 6 ZÁVĚR

- Bakalářská práce byla zaměřena na studium produkce biopolymeru PHA bakteriemi *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari* s využitím různých typů substrátů na bázi kávové sedliny.
- V teoretické části byly shrnuty základní informace o polyhydroxyalkanoátech (PHA), jednotlivých typech PHA, o mikroorganismech produkující tento polymer a využití PHA. Také zde byly uvedeny informace o kávě, o technikách jejího zpracování, využití kávy a jejich důležitých složkách celulóza a hemicelulóza.
- Kávová sedlina byla před hydrolyzou extrahovaná hexanem, 60% ethanolem a vodou-tyto předúpravy měli za cíl odstranit potenciálně především polyfenoly a lipidy. Zároveň tyto extrakty nacházejí řadu potenciálních aplikací v potravinářském průmyslu, kosmetice nebo i farmacii. Hydrolyza byla provedena dvěma různými způsoby: první již předem ověřený způsob se skládal z hydrolyzy hemicelulóz pomocí zředěné minerální kyseliny a následné enzymatické hydrolyzy celulózy. Alternativní přístup spočíval ve vynechání chemického kroku a kávová sedlina byla hydrolyzována pouze enzymaticky. U připravených hydrolyzátů byl spektrofotometricky měřen obsah redukujících sacharidů a byla posouzena výtěžnost hydrolyzy.
- Pokud byl jako substrát pro biotechnologickou produkci PHA využit hydrolyzát kávové sedliny připravený kombinací chemické a enzymatické metody, lepších výtěžků bylo dosaženo u bakterie *B. cepacia*. Jako nejlepší předúprava kávové sedliny před hydrolyzou se pak osvědčila extrakce 60 % ethanolem. Výtěžek biomasy *B. cepacia* v tomto médiu byl velmi vysoký 3,553 g/l. Obsah PHA vyprodukovaný touto bakterií činil 1,154 g/l s procentuálním zastoupením 32,472%. Bakterie byla schopná produkovat kopolymer 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu (6,09 %), bylo to způsobeno nejspíš tím, že jako prekurzor 3-hydroxyvalerátu sloužila levulinová kyselina, která vznikla degradací hexóz za podmínek kyselé hydrolyzy.
- Druhá část práce se zabývala čistě enzymatickou hydrolyzou kávové sedliny, kde byl ověřen postup hydrolyzy kávové sedliny s použitím komerčně dostupných enzymů celulóza, hemicelulóza a enzymatického preparátu produkovaného isolátem plísně na kávové sedlině o vyšší celulózové a manázové aktivitě. Byly stanoveny koncentrace redukujících sacharidů v jednotlivých hydrolyzátech, kde nejvíce sacharidů vytvořila hemicelulóza, která byla vybrána pro produkci PHB. *Burkholderia cepacia* byla vhodnějším producentem tohoto polymeru s výtěžkem biomasy 5,708 g/l v médiu připraveného z kávové sedliny extrahované 60% ethanolem. Koncentrace PHB v biomase byla 1,488 g/l s procentuálním zastoupením 26,066% v tomto médiu.
- Třetí a také poslední část se zabývá zlepšením procesu hydrolyzy kávové sedliny s použitím kombinací hemicelulózy a celulózy, navýšení koncentrace hemicelulózy na dvojnásobek a také použití enzymatického preparátu (enzym). Hydrolyzována byla opět kávová sedlina, která byla před hydrolyzou extrahována 60 % ethanolem. Nejvyšší výtěžek biomasy byl dosažen v médiích připravených pomocí vyšší dávky enzymu (1,797 g/l) a enzymu enzym (1,743 g/l), ale vyšší obsah PHB v biomase byl pozorován u média připraveného pomocí hemicelulózy (0,403 g/l). Procentuální zastoupení PHB měl v tomto médiu 16,82%.

## 7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] ŠNAJDAR, O. Regulovaná produkce polyhydroxyalkanoátů bakterií *Ralstonia eutropha* využitím různých typů substrátů. Brno, 2010. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická
- [2] BRAUNEGG, Gerhart, Gilles LEFEBVRE a Klaus F GENSER. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*. 1998, vol. 65, 2-3, s. 127-161. DOI: 10.1016/S0168-1656(98)00126-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165698001266>
- [3] OBRUČA, S.: Controlled production and degradation of selected biomaterials. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 169 s. Vedoucí dizertační práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
- [4] Polyhydroxyalkanoates from palm oil: biodegradable plastics. New York: Springer Berlin Heidelberg, 2012, p. cm. ISBN 978-364-2335-389.
- [5] VOLOVA, T. Polyhydroxyalkanoates--plastic materials of the 21st century: production, properties, applications. Hauppauge, N.Y.: Nova Science Publishers, c2004, xix, 282 p. ISBN 15-903-3992-4.
- [6] RAI, R., T. KESHAVARZ, J.A. ROETHER, A.R. BOCCACCINI a I. ROY. Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. *Materials Science and Engineering: R: Reports*. 2011, vol. 72, issue 3, s. 29-47. DOI: 10.1016/j.mser.2010.11.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927796X10001671>
- [7] Bakterie a olej od hranolek zachraňují svět. Bakterie a olej od hranolek zachraňují svět [online]. 2015 [cit. 2015-04-23]. Dostupné z: <http://www.mmspektrum.com/clanek/bakterie-a-olej-od-hranolek-zachranuji-svet.html>
- [8] LAYCOCK, Bronwyn, Peter HALLEY, Steven PRATT, Alan WERKER a Paul LANT. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Progress in Polymer Science*. 2014, vol. 39, issue 2, s. 397-442. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2013.06.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670013000798>
- [9] WANG, Ying, Jin YIN a Guo-Qiang CHEN. Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities. *Current Opinion in Biotechnology*. 2014, vol. 30, December, s. 59-65. DOI: 10.1016/j.copbio.2014.06.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166914001037>

- [10] CZERNIECKA, A., A. MAGOŃ, J. SCHLIESSER, B.F. WOODFIELD a M. PYDA. Heat capacity of poly(3-hydroxybutyrate). *The Journal of Chemical Thermodynamics*. 2014, vol. 73, June, s. 76-84. DOI: 10.1016/j.jct.2013.10.020. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196141300387X>
- [11] VOLOVA, Tatiana, Ekaterina SHISHATSKAYA, Viktor SEVASTIANOV, Sergei EFREMOV a Olga MOGILNAYA. Results of biomedical investigations of PHB and PHB/PHV fibers. *Biochemical Engineering Journal*. 2003, vol. 16, issue 2, s. 125-133. DOI: 10.1016/S1369-703X(03)00038-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X0300038X>
- [12] WANG, Yuanpeng, Jiyuan CAI, Jianguang LAN, Zhenggui LIU, Ning HE, Liang SHEN a Qingbiao LI. Biosynthesis of poly(hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) from the acclimated activated sludge and microbial characterization in this process. *Bioresource Technology*. 2013, vol. 148, issue 2, s. 61-69. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.08.102. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852413013539>
- [13] KESHAVARZ, Tajalli a Ipsita ROY. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*. 2010, vol. 13, issue 3, s. 321-326. DOI: 10.1016/j.mib.2010.02.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527410000275>
- [14] OBRUCA, Stanislav, Pavla BENESOVA, Sinisa PETRIK, Jana OBORNA, Radek PRIKRYL a Ivana MAROVA. Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolysate of spent coffee grounds. *Process Biochemistry*. 2014, vol. 49, issue 9, s. 1409-1414. DOI: 10.1016/j.procbio.2014.05.013. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511314003158>
- [15] PLANGKLANG, Pensri a Alissara REUNGSANG. Bioaugmentation of carbofuran residues in soil using *Burkholderia cepacia* PCL3 adsorbed on agricultural residues. *International Biodeterioration* [online]. 2009, vol. 63, issue 4, s. 515-522 [cit. 2015-04-16]. DOI: 10.1016/j.ibiod.2009.02.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830509000407>
- [16] CESÁRIO, M. Teresa, Rodrigo S. RAPOSO, M. Catarina M.D. de ALMEIDA, Frederik VAN KEULEN, Bruno S. FERREIRA, João P. TELO a M. Manuela R. da FONSECA. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Burkholderia sacchari* using wheat straw hydrolysates and gamma-butyrolactone. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2014, vol. 71, November, s. 59-67. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.04.054. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813014002815>

- [17] RODRÍGUEZ-CONTRERAS, Alejandra, Martin KOLLER, Miguel MIRANDA-DE SOUSA DIAS, Margarita CALAFELL-MONFORT, Gehart BRAUNEGG a María Soledad MARQUÉS-CALVO. Influence of glycerol on poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* and *Burkholderia sacchari*. *Biochemical Engineering Journal*. 2015, vol. 94, February, s. 50-57. DOI: 10.1016/j.bej.2014.11.007. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X1400312X>
- [18] EDITED BY ABRAHAM J. DOMB, Edited by Abraham J. Neeraj Kumar. *Biodegradable polymers in clinical use and clinical development*. Hoboken, N.J.: Wiley, 2011. ISBN 978-111-8015-810.
- [19] MURTHY, Pushpa S. a M. MADHAVA NAIDU. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—A review. *Resources, Conservation and Recycling*. 2012, vol. 66, č. 66, s. 45-58. DOI: 10.1016/j.resconrec.2012.06.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921344912000894>
- [20] ESQUIVEL, Patricia a Víctor M. JIMÉNEZ. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*. 2012, vol. 46, issue 2, s. 488-495. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.05.028. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996911003449>
- [21] SKŘIVANOVÁ, Veronika. *Hydrolytické štěpení odpadů po zpracování kávy*. Brno, 2014. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
- [22] MCMURRY, John. *Organická chemie*. Vyd. 1. V Brně: VUTIUM, 2007, xxv, 1176, 61, 31 s. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-214-3291-8.
- [23] VODRÁŽKA, Zdeněk, Jan KÁŠ a Pavel RAUCH. *Enzymologie*. 3. přeprac. vyd. Praha: VŠCHT, 1998, 171 s. ISBN 80-708-0330-4.
- [24] SIGMA-ALDRICH. SIGMA-ALDRICH [online]. 2015 [cit. 2015-04-08]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/22178?lang=en&region=US>
- [25] SIGMA-ALDRICH. SIGMA-ALDRICH [online]. 2015 [cit. 2015-04-08]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c2730?lang=en&region=US>



- [26] SIGMA-ALDRICH. SIGMA-ALDRICH [online]. 2015 [cit. 2015-04-08].  
Dostupné z:  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c2605?lang=en&region=US>
- [27] SIGMA-ALDRICH. SIGMA-ALDRICH [online]. 2015 [cit. 2015-04-08].  
Dostupné z:  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h2125?lang=en&region=US>
- [28] SIGMA-ALDRICH. SIGMA-ALDRICH [online]. 2015 [cit. 2015-04-08].  
Dostupné z:  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/x2629?lang=en&region=US>