

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Brno, 2017

Ing. Pavla Benešová



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

BIOPRODUKCE, CHARAKTERIZACE A APLIKACE VYBRANÝCH BIOPOLYMERŮ

BIOPRODUCTION, CHARACTERIZATION AND APPLICATION OF SELECTED BIOPOLYMERS

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Pavla Benešová

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2017

Zadání dizertační práce

Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Ing. Pavla Benešová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**
Akademický rok: 2016/17

Název dizertační práce:

Bioprodukce, charakterizace a aplikace vybraných biopolymerů

Zadání dizertační práce:

V průběhu dizertační práce budou řešeny následující dílčí kroky:

- 1) Zpracování literární rešerše zaměřené na biotechnologickou produkci a charakterizaci přírodních polymerů - PHA, pullulanu, PMLA
- 2) Vývoj a optimalizaci metod zaměřených na:
 - řízenou kultivaci mikrobiálních producentů PHA, pullulanu a PMLA za účelem dosažení maximální produkce
 - optimalizaci kultivačních podmínek a typů substrátů
 - přípravu a charakterizaci biomateriálů na bázi přírodních polymerů
 - přípravu nanovláken
- 3) Aplikace mikrobiálních biopolymerů:
 - optimalizace biotechnologického procesu za účelem dosažení vysokého výtěžku polymerů s charakteristickými vlastnostmi,
 - příprava funkcionalizovaných částic a nanovláken, testování vlastností
 - stabilita a biodegradabilita polymerů a aplikačních forem v modelových i reálných podmínkách

Termín odevzdání dizertační práce: 31.3.2017

Ing. Pavla Benešová
student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 12.6.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
děkan

ABSTRAKT

Předložená dizertační práce je zaměřena na mikrobiální produkci biopolymerů s využitím obnovitelných zdrojů, jako zdroje uhlíku a dusíku. Mikrobiálně byly produkovány polysacharidy a polyestery. S využitím především odpadních substrátů byl produkován pullulan a polymer kyseliny jablečné jako extracelulární metabolity polymorfního mikroorganismu *Aureobasidium pullulans*. Další část práce je věnována biotechnologické produkci bakteriálních plastů – polyhydroxyakanoátů (PHA), které jsou bakteriemi produkovány ve formě intracelulárních granulí. Produkce biodegradabilních PHA je zaměřena jak na produkci poly(3-hydroxybutyrátu), tak také na biosyntézu technologicky významného kopolymeru poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerátu), s důrazem na možnost využití odpadních substrátů v rámci konceptu biorafinerie. Do konceptu biorafinerie zapadá zejména využití kávové sedliny pro produkci PHA. Hydrolyzát kávové sedliny byl využit jako substrát pro *Burkholderia cepacia*, akumulován byl P(3HB-co-3HV) bez nutnosti přídavku prekurzoru. Další kávový odpad představoval olej extrahovaný z kávové sedliny, který byl taktéž využit pro produkci PHA bakterií *Cupriavidus necator*. Optimalizován byl proces hydrolyzy odpadních materiálů, které byly využity pro produkci biopolymerů, s důrazem na finální obsah sacharidů a polyfenolů. Odpadní materiály nebyly využity pouze jako zdroje uhlíku, ale také jako komplexní zdroj dusíku. Hydrolyzáty syrovátky a kuřecího peří byly použity, jako komplexní zdroj dusíku pro produkci PHA *C. necator*, pro kultivaci byl jako zdroj uhlíku využit odpadní fritovací olej.

V rámci předložené dizertační práce byla snaha využít zejména PHA pro přípravu různých aplikačních forem. Připraveny byly lipozomy s přídavkem PHB a odpadním kávovým olejem, které vykazovaly antioxidační a antimikrobiální efekt. Nano- (mikro)vláknenné materiály z PHB byly připraveny za účelem filtrace mikrobiálních suspenzí. Pro zlepšení filtračních schopností byly připraveny kompozitní PHB vláknenné materiály s přídavkem aktivního uhlí a oxidů kovů. Součástí této práce je také studium degradace polyhydroxyalkanoátů, kdy byla studována produkce PHA depolymeráz u vybraných mikroorganismů. Testována byla také biodegradabilita různých PHA forem standardním kompostovacím testem IS/ISO 20200. Tento test byl také použit pro studium mechanických vlastností polyuretanu s parciálním obsahem PHB v závislosti na délce působení kompostovacích podmínek.

Klíčová slova: Biopolymery, odpadní substráty, polyhydroxyalkanoáty, pullulan, polymer kyseliny jablečné, degradace

ABSTRACT

Proposed doctoral thesis deals with microbial production of biopolymers (polysaccharides and polyesters) using renewable inexpensive resources as carbon and nitrogen source. At first, production of extracellular metabolites, mainly pullulan and poly-L-malic acid, by polymorphic microorganism *Aureobasidium pullulans* was studied. Further part of thesis was focused on production of bacterial biopolyesters polyhydroxyalkanoates (PHA). PHA are produced in the form of intracellular granules by various bacteria species. During the study of PHA production, synthesis of poly(3-hydroxybutyrate) and technologically significant copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) was investigated as well with regard to waste substrate utilization in biorefinery concept. Spent coffee ground seemed to be applicable waste in biorefinery process. One of the coffee wastes used for PHA production was spent coffee ground hydrolysate which was converted to PHA by *Burkholderia cepacia*. Moreover, copolymer of 3HB and 3HV was accumulated when SCGH was used as a sole carbon source, no precursor had to be added. Another coffee waste, which was utilized by *Cupriavidus necator* H16, is represented by oil extracted from spent coffee grounds. Hydrolysis process of waste substrates had to be optimized, to reach the highest possible saccharide concentration. Due to the hydrolysis process several toxic compounds can be formed, hence, influence of hydrolysis processes on polyphenols content in hydrolysates was monitored. Waste substrates were also tested as potential complex nitrogen source for PHA production. Hydrolysates of cheese whey and chicken feather were used as inexpensive complex nitrogen source for PHA production by *C. necator*, when waste frying oil was used as a carbon substrate.

The final part of the thesis is dealing with possibilities how the PHA can be processed into attractive application forms. Liposomes with partial content of PHB had been prepared, moreover, for improving of antioxidant activity and antimicrobial effect the waste coffee oil was added. Micro-fibrous PHB materials were prepared for the purposes of water filtration. Higher filtration effectivity was observed when composite PHB fibrous material containing active charcoal or metal oxides was used. Important part of thesis is represented by study of degradation processes of prepared PHA-based application forms. Various microorganisms were tested on PHA depolymerases production. Biodegradability of PHA materials was tested in of composting conditions by standard composting test IS/ISO 20200. Changes in mechanical properties of polyurethane, where polyol was partially replaced by PHB, were tested depending on the exposure of composting condition.

Key words: Biopolymers, waste substrates, polyhydroxyalkanoates, pullulan, polymalic acid, degradation

BENEŠOVÁ, P. *Bioprodukce, charakterizace a aplikace vybraných biopolymerů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 147 s. Vedoucí dizertační práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc..

PROHLÁŠENÍ: Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Dizertační práce je z hlediska obsahu majetkem fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem školitele dizertační práce a děkana FCH VUT.

.....podpis studentky

PODĚKOVÁNÍ:

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé dizertační práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za všestrannou pomoc a podporu během celé doby studia. Dále pak mé velké díky patří doc. Ing. Stanislavu Obručovi Ph.D. za veškerou pomoc a ochotu, ráda bych také poděkovala kolegům a spolužákům se kterými jsme sdíleli nejen laboratoře a kancelář. V neposlední řadě patří velké díky mé rodině, která mi byla vždy oporou.

OBSAH

ÚVOD.....	9
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	10
1.1 BIOPOLYMERY.....	10
1.1.1 Rozdělení biopolymerů.....	10
1.1.2 Mikrobiální produkce biopolymerů.....	14
1.2 VYBRANÉ VLASTNOSTI BIOPOLYMERŮ.....	16
1.2.1 Biodegradabilita.....	16
1.2.2 Biokompatibilita.....	18
1.3 PULLULAN.....	19
1.3.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti.....	19
1.3.2 Produkce.....	20
1.3.3 Degradace pullulanu.....	22
1.3.4 Aplikace.....	22
1.4 POLYMER KYSELINY JABLEČNÉ.....	24
1.4.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti.....	24
1.4.2 Produkce.....	25
1.4.3 Degradace polymeru kyseliny jablečné.....	26
1.4.4 Aplikace.....	26
1.5 POLYHYDROXYALKANOÁTY.....	27
1.5.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti.....	27
1.5.2 Produkce PHA.....	29
1.5.3 Biodegradace PHA.....	46
1.5.4 Izolace PHA.....	47
1.5.5 Aplikace PHA.....	49
2 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE.....	53
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	54
3.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE.....	54
3.1.1 Použité chemikálie.....	54
3.1.2 Použité přístroje.....	55
3.2 POUŽITÉ MIKROORGANISMY.....	56
3.3 METODY POUŽITÉ KE STANOVENÍ SKUPINOVÝCH PARAMETRŮ.....	57

3.3.1	<i>Metody předúpravy substrátů</i>	57
3.3.2	<i>Celkové polyfenoly</i>	58
3.3.3	<i>Flavonoidy</i>	58
3.3.4	<i>Celkové sacharidy dle Duboise</i>	59
3.3.5	<i>Redukující sacharidy</i>	59
3.3.6	<i>Celkové proteiny</i>	59
3.4	ANALÝZA JEDNOTLIVÝCH LÁTEK	60
3.4.1	<i>Stanovení mono- a oligosacharidů metodou HPLC</i>	60
3.4.2	<i>Stanovení profilu aminokyselin</i>	60
3.4.3	<i>Stanovení profilu mastných kyselin</i>	60
3.5	KULTIVACE MIKROORGANISMŮ	60
3.5.1	<i>Mikroorganismy produkující EPS, PMLA</i>	60
3.5.2	<i>PHA produkující mikroorganismy</i>	61
3.6	METODY ANALÝZY MIKROBIÁLNÍCH PRODUKTŮ	63
3.6.1	<i>Analýza extracelulárních polymerů</i>	63
3.6.2	<i>Analýza polyhydroxyalkanoátů</i>	64
3.7	PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE ČÁSTIC	65
3.7.1	<i>Příprava lipozomů (s PHB)</i>	65
3.7.2	<i>Příprava PHB částic</i>	65
3.7.3	<i>Charakterizace částic z hlediska stability a velikosti</i>	65
3.7.4	<i>Stanovení antioxidační aktivity</i>	65
3.7.5	<i>Stanovení antimikrobiální aktivity</i>	65
3.8	PŘÍPRAVA PHB FILTRAČNÍCH MATERIÁLŮ	66
3.8.1	<i>Filtrační PHB vlákna</i>	66
3.8.2	<i>Stanovení filtrační účinnosti</i>	66
3.9	STUDIUM DEGRADAČNÍCH PROCESŮ PHA	66
3.9.1	<i>Příprava PHB materiálů za účelem testování degradace</i>	66
3.9.2	<i>Testování depolymerázové aktivity</i>	67
3.9.3	<i>Stanovení molekulové hmotnosti</i>	67
3.9.4	<i>Standardní kompostovací test</i>	67
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	68
4.1	CHARAKTERIZACE SUBSTRÁTŮ POUŽITÝCH PRO PRODUKCI BIOPOLYMERŮ	68
4.1.1	<i>Substráty pro produkci PMLA a pullulanu</i>	68

4.1.2	<i>Kávová sedlina, jako substrát pro produkci PHA</i>	69
4.1.3	<i>Olej z kávové sedliny, jako substrát pro produkci PHA</i>	74
4.1.4	<i>Syrovátka jako substrát pro produkci PHA, pullulanu a PMLA</i>	75
4.1.5	<i>Peří jako komplexní zdroj dusíku pro produkci PHA</i>	76
4.2	PRODUKCE PULLULANU A POLYMERU KYSELINY JABLEČNÉ	77
4.2.1	<i>Testování substrátů pro kultivaci A. pullulans</i>	77
4.2.2	<i>Produkce pullulanu a PMLA v laboratorním fermentoru</i>	82
4.2.3	<i>Vliv osmotického stresu na produkci pullulanu</i>	85
4.3	PRODUKCE POLYHYDROXYALKANOÁTŮ	87
4.3.1	<i>Produkce PHA s využitím kávového odpadu</i>	87
4.3.2	<i>Produkce PHA s využitím syrovátky jako zdroje dusíku</i>	95
4.3.3	<i>Produkce PHA s využitím hydrolyzátu peří jako zdroje dusíku</i>	98
4.4	APLIKACE PHA	102
4.4.1	<i>Vliv kávového oleje na antioxidační a antimikrobiální účinek částic</i>	102
4.4.2	<i>Příprava a využití PHB mikro- a nanovláken jako filtračního materiálu</i>	107
4.4.3	<i>Studium degradace PHA</i>	112
4.4.4	<i>Studium degradace modifikovaných polyuretanů s využitím PHB jako parciální náhrady polyetherového poyolu</i>	117
5	ZÁVĚR	120
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	124
7	REFERENCE	125
8	ŽIVOTOPIS	144
9	SEZNAM PUBLIKAČNÍ ČINOSTI	145

ÚVOD

Přes 67 milionů tun obalových materiálů je ročně produkováno v EU, z toho jedna třetina je tvořena komunálním odpadem. Stále větší objem obalů je recyklován, ale u plastů je proces recyklace komplikován přítomností směsi různých typů polymerů a s tím je spojený i obsah různých příměsí. Díky omezeným zásobám ropy, ale také vysoké ekologické zátěži vznikající v důsledku znečištění zejména plastickými materiály je nutno hledat vhodné alternativy k těmto materiálům.

Biopolymery jsou považovány za ekologicky přijatelnou alternativu k materiálům pocházejícím z petrochemického průmyslu, a to především díky jejich schopnosti podléhat přirozenému rozkladu. Jako velice slibné se v budoucnu jeví použití mikrobiálně produkovaných polymerních materiálů. Jedna z největších výhod takto produkovaných polymerů je, že k syntéze mohou být využity odpadní materiály pocházející zejména z agroindustriálních zdrojů. Tyto obnovitelné zdroje jsou tak biotechnologicky přeměněny na produkty s vysokou přidanou hodnotou.

Nejvýznamnější skupina zásobních mikrobiálních polymerů je tvořena polyhydroxyalkanoáty, které jsou též nazývány jako bakteriální plasty. Značnou výhodou polyhydroxyalkanoátů je možnost jejich produkce za použití obnovitelných zdrojů, jako jsou například lignocelulóznové materiály nebo odpadní rostlinné oleje, přičemž mechanické a technologické vlastnosti polyhydroxyalkanoátů jsou velice podobné polymerům připravovaným chemickou cestou z fosilních surovin.

V posledních letech je velice aktuální využití biopolymerů v oblasti lékařských aplikací, a to především díky jejich biokompatibilitě. Mikrobiálně produkované polyhydroxyalkanoáty, pullulan, polymer kyseliny jablečné a další mikrobiální polymery mohou díky svým unikátním vlastnostem sloužit jako přenašeče pro cílenou přepravu léčiv, a v dalších medicínských aplikacích. Vedle již výše zmíněné biokompatibility je další velice významnou vlastností většiny biopolymerů schopnost podléhat biodegradaci. K tomuto procesu dochází působením mikroorganismů nacházejících se v přirozeném prostředí, doba rozkladu se odvíjí od podmínek okolního prostředí.

Cílem této práce je zpracování literárního přehledu zaměřeného na produkci a charakterizaci vybraných biopolymerních materiálů produkovaných mikrobiální cestou. Za účelem biotechnologické produkce je diskutována možnost využití vhodných odpadních substrátů pro syntézu mikrobiálních polymerů. Dále pak je práce zaměřena na aplikace vybraných mikrobiálních biopolymerů. Součástí práce je také přehled testů biodegradability materiálů.

1 TEORETICKÁ ČÁST

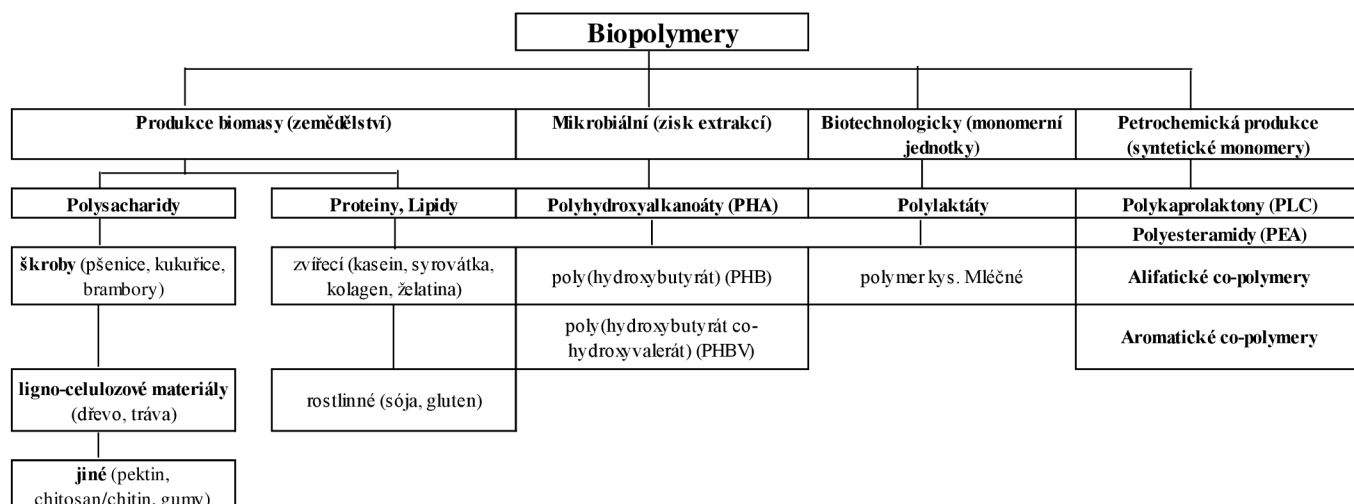
1.1 Biopolymery

Přírodní polymery jsou označovány jako *biopolymery*. Jedná se o makromolekuly složené z jedné nebo více se opakujících jednotek, jejichž charakter má zásadní vliv na vlastnosti materiálu jako je tvrdost, krystalinita, nebo bariérové vlastnosti. Pro biopolymery je velmi typická vysoká molekulová hmotnost. Termín *biopolymery* je velmi široký a zahrnuje jak základní biologické molekuly (proteiny, polysacharidy, nukleové kyseliny), tak i specifické polymery tvořené či akumulované různými typy organismů. Uplatnění pak nacházejí například jako biomateriály především v oblasti medicínských aplikací, kosmetice, farmacii nebo jako obalové materiály v potravinářství (Francis, 2013).

Biopolymery lze tedy definovat jako polymery produkované z biologicky obnovitelných zdrojů a syntetizované chemickou nebo biologickou cestou. V podstatě se jedná o vysokomolekulární organické látky, které jsou syntetizovány biochemickými reakcemi (celulóza, škrob, proteiny, PHA) (Steinbüchel, 2001a). Jejich syntéza zahrnuje především enzymatickou katalýzu a růst řetězce polymerizační reakcí aktivovaných monomerů (Chandra, 1998).

1.1.1 Rozdělení biopolymerů

Biopolymery mohou být rozděleny do skupin v závislosti na zvoleném parametru (chemická struktura, původ, degradovatelnost). Velice obecně lze biopolymery rozdělit na základě jejich schopnosti rozkládat se na biodegradovatelné a nepodléhající biodegradaci (Niaounakis, 2013). Dalším možným způsobem, jak rozdělit biopolymery, je klasifikace podle způsobu jejich produkce:



Obrázek 1: Rozdělení biopolymerů (Avérous, 2012)

a) *Biopolymery pocházející ze zemědělské produkce*, jsou označovány jako agropolymery. Do této skupiny jsou řazeny polymery izolované ze zemědělských komodit. Proteiny, lipidy a polysacharidy jsou hlavními biopolymery vyskytujícími se v zemědělské biomase.

b) *Mikrobiální polymery*, jedná se o polymery, které jsou produkovány ve fermentačním médiu za použití mikroorganismů, schopných produkce těchto biopolymerů. Nejvýznamnějším zástupcem těchto mikrobiálních biopolymerů je skupina polyhydroxyalkanoátů (PHB, PHBV) a některé extracelulární polysacharidy (xanthan, pullulan ...).

c) Další skupinou biopolymerů jsou *biotechnologicky* produkované bio-monomerní jednotky (mléčná kyselina), které jsou dále chemickou polymerizací upraveny do formy biopolymeru (polymer kyseliny mléčné).

d) Poslední kategorii tvoří polymery získané z *fosilních zdrojů*, avšak materiály spadající do této skupiny nejsou získávány z obnovitelných zdrojů (Avérous, 2012).

Biopolymery je také možno rozčlenit na základě jejich chemické struktury do osmi tříd (Steinbüchel, 2001b):

Tabulka 1: Třídy biopolymerů (Steinbüchel, 2001b)

	Třída	Eukaryota	Prokaryota
1	Polynukleotidy	ano	ano
2	Polyamidy	ano	ano
3	Polysacharidy	ano	ano
4	Polyoxoestery	ano	ano
5	Polythioestery	ne	ano
6	Polyfosfáty	ne	ano
7	Polyisoprenoidy	rostliny/houby	ne
8	Polyfenoly	rostliny/houby	ne

První třídu biopolymerů zastupují **polynukleotidy**, které jsou tvořeny dlouhým polymerním řetězcem složeným z 13 a více monomerních jednotek. Polynukleotidy jsou tedy makromolekulární látky skládající se z mononukleotidů navzájem spojených fosfodiesterovými vazbami (Thomas, 2013).

Polyamidy jsou polymery obsahující amidovou skupinu jako součást hlavního polymerního řetězce. Bio-polyamidy mohou být syntetizovány polykondenzací: i) diaminů a dikarboxylových kyselin, ii) amino karboxylových kyselin (Niaounakis, 2013). Spolu s polysacharidy, polyestery a polyfosfáty tvoří polyamidy skupinu biopolymerů, kterou lze syntetizovat mikrobiálně. Extracelulárně produkované polyamidy jsou poly- γ -glutamát a

poly-L-lysin, intracelulárně pak cyanofycin. Bakteriální polyamidy mohou sloužit jako netoxická a biodegradovatelná alternativa polyakrylátů (Rehm, 2010).

Polysacharidy jsou další velice významnou skupinou biopolymerů, které mohou být syntetizovány mikrobiálně. Mikroorganismy mohou syntetizovat polysacharidy jako extracelulární produkt (xanthan, pullulan, aginát, hyaluronová kyselina ...), nebo intracelulárně (glykogen) (Rehm, 2010).

Jedná se o polymery o vysoké molekulové hmotnosti ($10^4 - 10^5$ Da) složené z monomerních jednotek sacharidů. Pro polysacharidy je typická strukturní rozmanitost související s typem opakujících se jednotek, glykosidických vazeb a stupně větvení. Mezi nejčastěji vyskytující polysacharidy patří celulóza – strukturní celistvost rostlin, škrob – zdroj energie u rostlin, glykogen – zdroj energie u živočichů, nebo chitin – ochranné schránky hmyzu a korýšů. Polysacharidy často tvoří terciální struktury spojené intra- a intermolekulárními nekovalentními vazbami, což způsobuje větší pevnost makromolekul a rovněž hraje důležitou roli při zkoumání vlastností polymerů a to jak v pevném stavu, tak v roztoku (Niaounakis, 2013).

Mikrobiální polysacharidy nacházejí své využití v chemickém, potravinářském nebo farmaceutickém průmyslu i přes to, že jejich cena je mnohonásobně vyšší než cena tradičních polysacharidů (kukuřičný škrob, celulóza ...). Mikrobiální polysacharidy jsou ve vodě rozpustné biopolymery a díky jejich charakteristickým reologickým vlastnostem jsou využívány jako emulzifikátory, gelovací činidla, stabilizátory, koagulanty nebo maziva. Xanthan patří mezi nejběžněji mikrobiálně produkované polysacharidy, a to především díky jeho širokému uplatnění v potravinářství. Nejrozšířeněji používaným producentem xanthanu je bakterie *Xanthomonas campestris*. Další velice rozšířeným mikrobiálním polysacharidem je dextran, syntetizovaný bakterií *Leuconostoc mesenteroides*. Rody *Hansenula*, *Pichia* a *Pachysolen* jsou producenty polysacharidů na bázi fosforylovaných manóz, jejichž výhodou ve srovnání s ostatními mikrobiálními polysacharidy je odolnost vůči mikrobiální degradaci. Pullulan je další mikrobiálně produkovaný polysacharid hojně využívaný v potravinářském průmyslu. Hlavním producentem pullulanu je *Aureobasidium pullulans*. Fyzikálně chemickými vlastnostmi, produkcí a možnými aplikacemi pullulanu se zabývá kapitola 1.3. V menší míře je také mikrobiálně syntetizována celulóza, producentem je bakterie *Acetobacter xylium* (Yang, 2007).

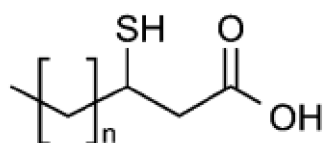
Polyestery, a to zejména alifatické, jsou nejvíce prozkoumanou třídou biopolymerů. Existují dvě skupiny polyesterů, jež dělíme na základě vazeb jednotlivých monomerů. Do první skupiny řadíme polyhydroxyalkanoáty (PHA). Jedná se polyestery syntetizované z hydroxykyselin, esterů nebo polymerizací otevřeného kruhu cyklických esterů. Další skupinu představují polyalkyleny dikarboxylátu (PADC) a polyestery vzniklé polykondenzací diolů a dikarboxylových kyselin jako je například poly(butylen sukcinát) (Niaounakis, 2013).

Polyestery se přirozeně vyskytují ve vyšších rostlinách jako strukturní materiál kutikul. Nejběžněji vyskytujícím se polyesterem rostlin je degradovatelný kutin, suberin a jejich deriváty. Dalšími producenty polyesterů jsou mikroorganismy. Polyhydroxyalkanoáty představují skupinu biodegradabilních intracelulárních polyesterů, syntetizovaných celou řadou prokaryotických mikroorganismů – bakterií (Kim, 2001). V současné době se s nimi počítá jako s možnou alternativou k ropným plastům, značnou výhodou je možnost produkce na odpadních substrátech (odpadní olej, syrovátka, lignocelulozové odpadní produkty - Kap.1.5.2.5). Mezi nejznámější zástupce skupiny PHA je řazen poly(3-hydroxybutyrát),

případně kopolymer 3-hydroxybutyrátu s 3-hydroxyvalerátem (Du, 2012). Kapitola 1.5 je zaměřena na vlastnosti, produkci a aplikace polyhydroxyalkanoátů.

Polymer kyseliny jablečné (PMLA) je jediným ve vodě rozpustným polyesterem, který je často řazen do skupiny polyhydroxyalakoátů. Jedná se o polymer, který je možno produkovat chemickou syntézou nebo mikrobiálně. Hlavními mikrobiálními producenty tohoto biopolymeru je *Aureobasidium pullulans* a *Physarum polycephalum* (Steinbüchel, 2001b). Polymeru kyseliny jablečné je věnována kapitola 1.4.

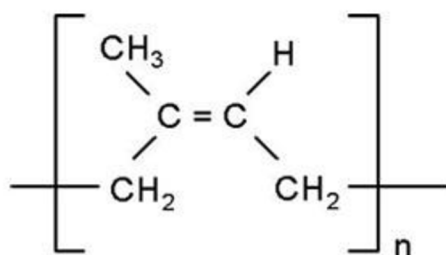
Úzce spjatou skupinou s PHA jsou **polythioestery**. Polythioestery (PTE) představují nejmladší skupinu biopolymerů, objeveny byly teprve v roce 2001 (Lütke-Eversloh, 2001). Tyto biopolymery jsou syntetizovány mikrobiální cestou stejně jako polyhydroxyalkanoáty – bakteriemi. Pro syntézu je využívána stejná polymeráza jako při syntéze PHA. Prvním identifikovaným PTE byl kopolymer 3-hydroxybutyrátu a 3-merkaptopropionátu produkovaný bakterií *Cupriavidus necator*. Na rozdíl od PHA nejsou homopolymery PTE biodegradovatelné (Steinbüchel, 2005), (Lütke-Eversloh, 2004).



Obrázek 2: Obecná struktura 3-merkptoalkanoátu (Lütke-Eversloh, 2004)

Anorganické **polyfosfáty** jsou jediné polyanhydridy přítomné v živých buňkách. Polymerní řetězec je tvořen z desítek až stovek fosfátových monomerů, které jsou spojené vysoce energetickou fosfoanhydridovou vazbou (Wang, 2013).

Polyisoprenoidy představují další třídu biopolymerů, kterou lze syntetizovat živými organismy. Díky jejich unikátní struktuře a vlastnostem, jako je elasticita, jsou polyisoprenoidy využívány pro mnoho aplikací. Více než 2500 různých druhů rostlin produkuje přírodní gumy, jedná se o *cis*-1,4-polyisopreny (Obrázek 3) různých molekulových hmotností. Jedním z nejrozšířenějších rostlinných producentů přírodních gum je kaučovník *Hevea brasiliensis* (Steinbüchel, 2001b).



Obrázek 3: *cis*-1,4-polyisopren (Joseph, 2010)

Poslední třídu biopolymerů představují **polyfenoly**, které se stejně jako polyisoprenoidy přirozeně vyskytují v rostlinách a ochraňují je před vnějšími vlivy. Nejhojněji vyskytujícím se polyfenolem v přírodě je lignin, který se přirozeně vyskytuje ve stromech a vyšších rostlinách. Lignin je polymer tvořený fenylypropanovými jednotkami a v rostlinách plní funkci základního polymeru zodpovědného za dřevnatění buněčných stěn. Dalším poměrně rozšířeným rostlinným polyfenolem je tanin, známý především pro svou svíravou chuť (Smidsrød, 2008).

1.1.2 Mikrobiální produkce biopolymerů

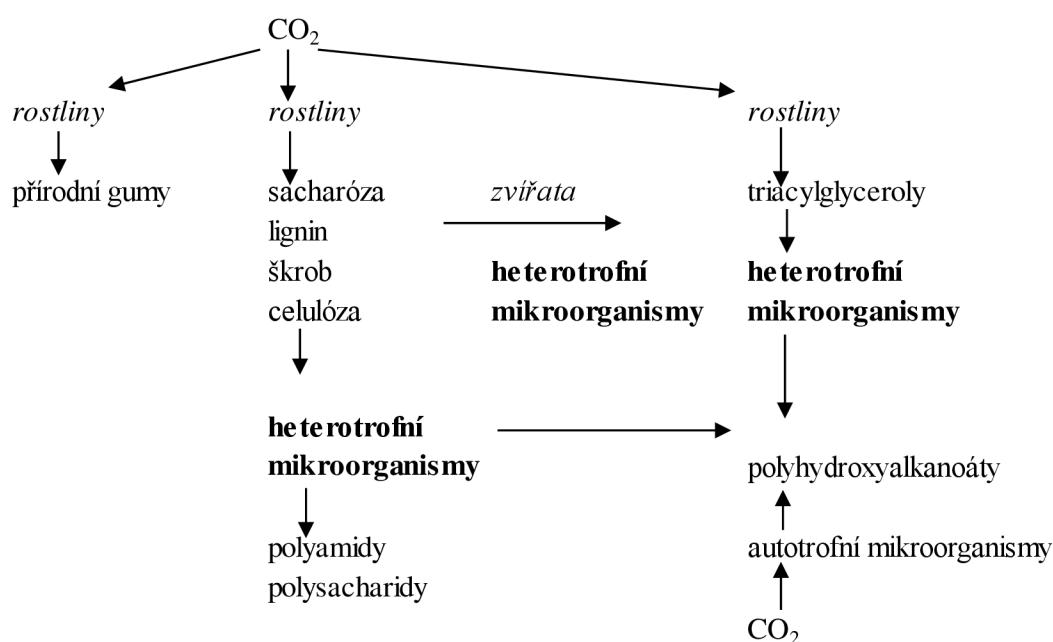
Samotný vývoj průmyslové produkce a zpracování mikrobiálních biopolymerních materiálů začal přibližně v roce 1970, kdy svět zasáhla světová ropná krize a z obavy nad nedostatkem ropy propukl zájem o alternativní materiály vyrobené biotechnologickou cestou (Tucker, 2004). Ovšem již v roce 1926 byl objeven poly-3-hydroxybutyrát jako bakteriální produkt. Následovala kyselina poly- γ -glutamová v roce 1937. V roce 1950 byl popsán xanthan, o 7 let později celulóza produkována bakterií *Azetobacter xylium*. Od roku 1976 je pullulan produkován průmyslově. V roce 1992 byl produkován PHB na odpadním substrátu – syrovátce za použití rekombinantní *E. coli* (Lee, 2005).

Biopolymery plní v buňce celou řadu základních funkcí jako je konzervace a exprese genetické informace, katalýzu reakcí, slouží jako zdroj uhlíku/energie nebo jiných živin. Polymery zajišťují u mikroorganismů také určitou formu ochrany před vnějšími vlivy – biotickými a abiotickými stresovými faktory, umožňují komunikaci s prostředím nebo přilnavost k povrchům. Biotechnologická produkce těchto polymerů je zajištěna fermentací - činností mikroorganismů v bioreaktorech. Biopolymery mohou být produkovány jako extracelulární produkty (třída 3. - polysacharidy, Tabulka 1) nebo uvnitř buňky jako intracelulární produkt (třída 4. – polyhydroxyalkanoáty, Tabulka 1) (Steinbüchel 2001b).

Obecně mohou být biopolymery syntetizovány za pomoci enzymatické katalýzy v cytoplazmě, jednotlivých organelách buňky, v cytoplazmatické membráně nebo jejich komponentech, na povrchu buňky nebo dokonce extracelulárně. Proces syntézy biopolymeru může být iniciován v jiné části, než ve které je syntéza dokončena (Steinbüchel, 2001a). Hlavními výhodami mikrobiální produkce polymerních materiálů je rychlý růst produkčních buněk a především možnost využití levných substrátů – ve většině případů se jedná o odpadní produkty jiných průmyslových výroby nebo zemědělství (Harzevili, 2014).

Mikrobiální biopolymery vzbuzují zájem společnosti a průmyslové sféry. Biopolymery produkové za použití obnovitelných zdrojů jsou vhodné jako náhrada ropných produktů, ale využitelné jsou také jako biokompatibilní biomateriály s vlastnostmi vhodnými pro aplikace v oblasti medicíny (Rehm, 2009). Kromě běžně používaných zdrojů uhlíku – glukóza a škrob, je užitečné a často i nezbytné využívat také jiné, především odpadní uhlíkové substráty. Celosvětově je produkováno velké množství odpadních produktů pocházejících především ze zemědělství (Busch, 2006).

Plodiny jako je kukuřice, pšenice, rýže a další obilniny, cukrová třtina a řepa, brambory a jiné zemědělské plodiny jsou zpracovávány na škrob a cukr a dále využívány především v potravinářském průmyslu, ale také pro biotechnologické a chemické procesy. Biotechnologickým procesem můžou být tyto agro-suroviny přeměněny na produkty s vysokou přidanou hodnotou (biopaliva, bioethanol, organické látky). Olejnatá semena (sója, řepka, slunečnice), ale také odpadní rostlinné oleje a živočišné tuky, jsou v posledních letech zpracovávány především na biopaliva (bionaftu). Využití zemědělských plodin v biotechnologiích jako zdroje uhlíku má ale také řadu nevýhod. Jako zásadní se jeví zásah do potravinového řetězce a tím vznikající „soutěž“ o suroviny. Vzhledem k stále rostoucí populaci a tím zvyšujícím se nárokům na objem potravin, roste zájem o využití agro-industriálních odpadů, jako jsou sláma, otruby, řepné řízky, kukuřičné odpadní produkty, řepkové pokrutiny vznikající při výrobě olejů, nebo dřevní odpad. Jedná se o odpady bohaté převážně na lignocelulózové materiály (celulóza, hemicelulóza, lignin), které nevstupují do lidského potravního řetězce a mohou být využity pro výrobu chemikálií, materiálů, nebo biopaliv (Nigam, 2009).



Obrázek 4: Hlavní obnovitelné zdroje uhlíku z rostlin a autotrofních mikroorganismů (Steinbüchel, 2001a)

Faktory ovlivňující konečnou cenu biotechnologicky připravených polymerů jsou zejména cena substrátu, poměr výtěžku polymeru k substrátu a efektivita separačního („downstream“) procesu. Rapidního snížení ceny biopolymerů lze dosáhnout nahrazením konvenčních uhlíkatých zdrojů obnovitelnými - levnými zdroji. Objem odpadní biomasy se stále zvětšuje v důsledku růstu počtu obyvatelstva a s tím spojené vyšší spotřeby potravin, ale také díky zvyšujícím se životním nárokům společnosti. Biomasa je velmi heterogenní a chemicky komplexní obnovitelný zdroj, složený především z C, H, O a N (Lee, 2013). Využitelné odpadní biomasy mohou být děleny na základě svého původu:

- Zemědělské a zemědělsko-průmyslové odpady - zbytkové stonky, sláma, listí, odpadní dřevo, káva, kukuřice, cukrová řepa
- Zvířecí zemědělské odpady – hnůj
- Odpady ze zpracování potravin – ovocné výlisky a odpadní šťávy, použitý chmel, syrovátka
- Lesní odpady – piliny, štěpka, řezivo, kůra
- Komunální odpady – odpadní papír, pevné komunální odpady, odpadní voda
- Mořské odpady – odpady ze zpracování ryb
- Biotechnologické odpady – plísně, bakterie, kvasinky, řasy
- Odpady z výroby biopaliv – glycerol (Brar, 2014).

Během posledních dvou desetiletí byl zaznamenán významný pokrok ve vývoji mikrobiálních biodegradabilních biopolymerů. Polymerní biomateriály jsou vhodnými kandidáty pro uplatnění především v biomedicínských aplikacích. K terapeutickým účelům jsou využívány biopolymery ve formě dočasných protéz, 3D nosných struktur, tzv. „scaffoldů“ pro tkáňové inženýrství nebo jako specifické přenašeče léků (Nair, 2007).

1.2 Vybrané vlastnosti biopolymerů

1.2.1 Biodegradabilita

Plasty produkované z ropných frakcí mají celou řadu zajímavých vlastností, a proto v dnešní době nahrazují stále více „tradičních“ materiálů v různých aplikacích. Hlavními pozitivními vlastnostmi petrochemických polymerů v porovnání s kovy anebo dřevem jsou nízká hmotnost, odolnost vůči korozi a nízká energetická náročnost výrobního procesu. Na druhou stranu jsou petrochemické plasty velkou hrozbou pro životní prostředí (Yates, 2013).

Jednou s nesporných výhod většiny biopolymerů, oproti klasickým polymerům vyrobeným z ropy, je biodegradabilita. Za degradaci těchto polymerů jsou převážně zodpovědné prokaryotické a eukaryotické mikroorganismy nacházející se v prostředí, respektive jejich extracelulární enzymy. Obvykle nejprve dochází k fragmentaci polymeru na produkty o nižší molekulové hmotnosti účinkem abiotických reakcí, jako jsou oxidace, fotodegradace, hydrolýza a další, následně dochází k odbourávání polymerů prostřednictvím biotických procesů. Za pomoci extracelulárních mikrobiálních enzymů obecně označovaných jako depolymerázy jsou polymery hydrolyzovány a výsledné produkty využívány mikroorganismy jako zdroj živin. V konečné fázi mohou být jednotlivé složky zpracovány na obnovitelné zdroje – CO₂ a biomasu (Hiraishi, 2009), (Vroman, 2009). Vlhkost, teplota, pH, obsah minerálů, kyslíku a obsah živin jsou parametry ovlivňující mikrobiální degradaci biopolymerů (Müller, 2005).

Polymery obecně mohou být označeny jako *biodegradovatelné*, ale také *kompostovatelné*, při splnění podmínek popsanych v nařízeních EU. Dle Evropské normy EN 13432 a ASTM (D-5488-94d) znamená pojem „biodegradabilní“ schopný rozkladu na oxid uhličitý, vodu, anorganické sloučeniny a biomasu (Avérous, 2012).

Metody pro standardní hodnocení biodegradabilních plastů jsou odvozeny od jejich definic. ISO označuje plast za biodegradabilní, pokud proběhne chemická změna (oxidace) materiálu působením mikroorganismů, zatímco CEN (European Committee for Standardization) požadují v rámci své definice přeměnu plastických materiálů na mikrobiální metabolické produkty. Na základě výše uvedených definic nemusí být biodegradovatelný plast zároveň vhodný pro kompostování (Müller, 2005), (Bastioli, 2005).

Kompostování je proces, při kterém dochází k rozkladu organického odpadu mikrobiální činností za vzniku kompostu. Při procesu kompostování je nutno dodržovat požadavky na teplotu, vlhkost a obsah kyslíku. Dle Evropského Standardu EN 13432 musí kompostovatelné materiály splňovat následující podmínky (Niaounakis, 2013):

Biodegradovatelnost – je stanovena monitorováním metabolických přeměn kompostovatelných materiálů na oxid uhličitý. K měření tohoto parametru je nutno využívat standardních testovacích metod popsanych v EN 14046, za přijatelnou je považována hodnota 90 % ztráty hmotnosti, které je nutno dosáhnout v průběhu 6 měsíců.

Desintegradovatelnost – testovaný materiál je fragmentován během tří měsíců tak, že není po uplynutí této doby okem viditelný. Kompost je po uplynutí této doby kontrolován prosetím před síto o velikosti ok 2 mm. Frakce testovaného materiálu, jenž je po 3 měsících větší než 2 mm nesmí být více než 10 %.

Testovaný materiál nesmí mít žádný negativní efekt na průběh kompostovacího procesu. V kompostu také nesmí být zvýšená koncentrace těžkých kovů. Po kompostování testovaného materiálu je prováděn test růstu rostlin (OECD test 208), kde je pro porovnání použit kontrolní kompost. Pro úspěšnost testu je nezbytné, aby výsledky byly identické. Také další fyzikálně-chemické parametry (pH, obsah minerálů, těkavých pevných látek, N, P, Mg, K) musí být ve shodě s kontrolním kompostem. Pro označení materiálu jako kompostovatelného je nezbytné, aby byly splněny veškeré výše uvedené podmínky.

Změny vlastností polymeru způsobené fyzikálními, chemickými nebo biologickými reakcemi vedoucí ke štěpení vazeb polymeru a následné chemické přeměně lze popsat jako degradace polymerů. Jednotlivé typy degradací mohou být děleny podle mechanismů rozkladu nebo na základě vlivů zodpovědných za degradaci. Hlavní mechanismy degradace jsou:

1. Depolymerizace
2. Náhodné štěpení
3. Eliminace

Činidla přispívající degradaci:

1. Teplo (tepelná degradace)
2. Světlo, UV (fotodegradace) – degradace způsobená světlem, polymer je exponován UV záření, které je absorbováno karbonylovými skupinami nacházejícími se v polymeru.
3. Mechanická degradace – může vznikat v důsledku vzniku stříhových sil, napětí nebo komprese. Míchání, mletí nebo extruze jsou hlavní faktory způsobující mechanickou degradaci, během zpracování polymerů, vedoucí především k snížení jejich molekulových hmotností.
4. Chemická degradace – jeden z nejběžnějších mechanismů degradace polymerů je hydrolyza, která je nejčastěji uplatňována v případě polymerů obsahujících esterovou vazbu. Prvním krokem hydrolytické degradace je hydrolyza polymerů na oligomery s nižší molekulovou hmotností. V případě, že jsou přítomny změkčovadla, dochází k jejich uvolnění. Další krok vede ke ztrátě fyzikálních vlastností polymeru, jako je pevnost v tahu, ale také k viditelným změnám ve struktuře polymeru, související se změnou molekulové hmotnosti. V závěrečné fázi degradace dochází k viditelné ztrátě hmotnosti polymeru a oligomery jsou hydrolyzovány na monomerní jednotky. K hydrolytickému štěpení polymerů lze použít jak chemickou hydrolyzu (pasivní degradace) tak enzymatické reakce (aktivní).
5. Mikrobiální degradace – jinak také biodegradace, je enzymaticky katalyzovaná reakce ve vodném prostředí. Biopolymery obsahující hydrolyzovatelnou vazbu, jako například polyestery, proteiny a polysacharidy jsou obecně degradovatelné činností hydrolytických enzymů. Hydrofilita/hydrofobita polymeru ovlivňuje degradabilitu, přičemž polymery s polárním charakterem jsou snáze rozložitelné. Dalšími faktory ovlivňujícími degradabilitu je stupeň krystalinity a flexibilita řetězce. Biodegradace polymeru je započata kolonizací povrchu polymeru mikroorganismy, které jsou vhodně enzymaticky vybavené a jsou schopny rozkládat polymer na oligomerní, případně monomerní jednotky. Výsledný monomer může být pro mikroorganismy důležitým zdrojem uhlíku, který je využit pro jejich růst. Během aerobních podmínek degradace je biopolymer degradován na oxid uhličitý a vodu, zatímco v anaerobních

podmínkách jsou koncovými produkty degradace oxid uhličitý a methan (Niaounakis, 2013).

1.2.2 Biokompatibilita

Vedle již výše zmíněné biodegradability je další velice důležitou vlastností biopolymerních materiálů *biokompatibilita*. Tento termín bývá velice často používán v souvislosti s novými materiály (biopolymery) vyvinutými pro aplikace v tkáňovém inženýrství nebo cílený transport léčiv. Klasifikace materiálu jako biokompatibilní znamená, že během testování materiálu standardizovanou metodou nesmí mít daný materiál negativní dopad na živé organismy nebo životní prostředí. Test je podrobně popsán v certifikaci splňující normy ISO 10993 (Koller, 2012). V mnoha případech *in vitro* testovacích metod jsou pro testování použity buněčné kultury a biomateriál jako testovací vzorek. U pozitivního výsledku buňky zůstávají viabilní a materiál lze považovat za biokompatibilní. Jestliže dojde k odumření buněk, nebo byl zaznamenán nepříznivý vliv na buněčný materiál během testování, nemůže být materiál považován za biokompatibilní. Biokompatibilita ale není výsledek pouze jedné akce nebo jevu, jedná se o soubor procesů zahrnující různé na sobě nezávislé reakce mezi testovaným materiálem a tkání. Biokompatibilita je spojena s funkční stránkou materiálu, což je ovlivněno nejen interakcemi s buňkami, ale také mechanickými a fyzikálními vlastnostmi materiálu (Narayan 2009).

U testu biokompatibility jednotlivých materiálů používaných především pro medicínské účely mohou být testovány následující vlastnosti:

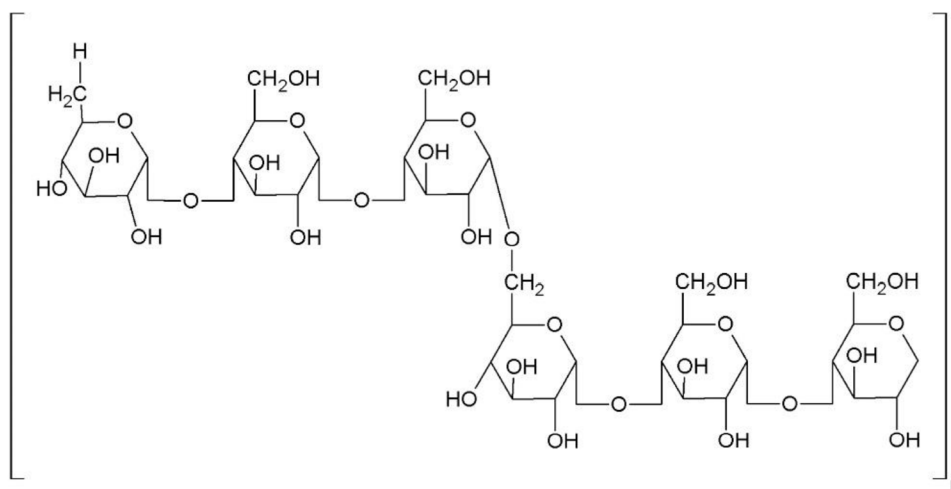
- Cytotoxicita – posouzení účinku chemických látek na buňky
- Senzibilizace – určuje alergickou nebo hypersensitivní reakci pokožky/tkáně při styku s testovaným materiálem.
- Podráždění – posouzení, zda materiál, nebo jeho extrakty, způsobují vratné lokální poškození kůže po expozici testovaného materiálu na pokožku.
- Systémová akutní toxicita – test zaměřený na toxický efekt extraktů a vliv na různé tělesné systémy. Veškeré materiály, které přijdou do styku s krví nebo krevními složkami musí být testovány na akutní toxicitu.
- Subchronická toxicita – tato toxicita bývá testována u veškerých implantátů a to buď intraperitoneálně anebo intravenózně.
- Genotoxicita – hodnocení genetického poškození vlivem působení testovaného materiálu. Test je vyžadován pro veškeré implantáty, produkty přicházející do kontaktu s tkání či orgány po dobu více než 24 hodin.
- Implantace – testování materiálu určeného pro implantaci.
- Hemokompatibilita – test zahrnuje hodnocení materiálu při styku s krví a krevními komponenty (Sastri, 2010).

1.3 Pullulan

Pullulan je mikrobiální exopolysacharid, spadající do skupiny biodegradabilních biopolymerů. Jedná se o jeden z nejběžněji mikrobiálně produkovaných polysacharidů s využitím v potravinářství a nově také v medicínských a farmaceutických aplikacích (Singh, 2008).

1.3.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Z chemického hlediska se jedná o homopolysacharid, lineární α -D-glukan složený z maltotriózových jednotek spojených vazbou α -(1,6). Tento ve vodě-rozpustný, lineární polysacharid je produkován extracelulárně polymorfní mikromycetou *Aureobasidium pullulans* (Chi, 2009). Tři glukozové jednotky jsou spojené α -1,4 glykosidickou vazbou, zatímco maltotriózové jednotky spojuje α -1,6 glykosidická vazba (Rehm, 2009). Lineární řetězce pullulanu mohou obsahovat maltotetrózové podjednotky, jež jsou náhodně rozmístěny po celé molekule (Singh, 2008).



Obrázek 5: Chemická struktura pullulanu (Ferreira, 2015)

Pullulan tvoří v roztoku velmi viskózní, pseudoplastickou kapalinu (Dumitriu, 1996), přičemž míru viskozity ovlivňuje molekulová hmotnost polysacharidu (Singh, 2008). Molekulová hmotnost pullulanu bývá v rozmezí od 10 do 3 000 kDa a je ovlivněna především nastavením kultivačních podmínek jako je doba kultivace, pH a složení média (Phillips, 2009). Vazby (1 \rightarrow 6) dodávají molekule pullulanu flexibilitu a jsou zodpovědné za jeho dobrou rozpustnost (Buliga, 1987). Pullulan je bílý prášek snadno rozpustný ve studené i horké vodě, je netoxický, nemutagení, bez chuti a zápachu. Rozpustný ovšem není v organických rozpouštědlech s výjimkou dimethylformamidu a dimethylsulfoxidu. Ve vodných roztocích je viskózní, ale ne gelotvorný. Značnou výhodou je jeho stabilita v širokém rozmezí pH (Singh, 2008). Ze struktury pullulanu vyplývají také jeho fyzikální vlastnosti, jako jsou například adhezní vlastnosti, schopnost zvlákňování a tvorby filmů nepropustných pro kyslík, čehož se využívá v obalových technologiích (Steinbüchel, 2001b).

1.3.2 Produkce

Pullulan poprvé identifikoval R. Bauer v roce 1938 (Cheng, 2011). Izolován a charakterizován byl však pullulan poprvé v roce 1958 (Bernier, 1958). Nejznámějším a zároveň nejvýznamnějším mikrobiálním producentem pullulanu je polymorfní plíseň *Aureobasidium pullulans*. Pullulan byl také izolován ze saprofytické plísně *Tremella mesenterica*, parazitických hub napadající především stromy *Cytaria hariatii* a *C. darwinii* a plísně vyskytující se na kaštanech *Cryphonectria parasitica* (Tabulka 2), (Singh 2008).

Předpokládá se, že hlavním důvodem produkce exopolysacharidů mikroorganismy je především jejich ochranná funkce. Vysoce hydratovaná vrstva exopolysacharidů chrání buňku před vysycháním a dalšími vnějšími nepříznivými vlivy. Obsah extracelulárních polysacharidů (pullulanu) do jisté míry ovlivňuje schopnost transportních vlastností buňky. (Cheng 2011).

Tabulka 2: Mikrobiální producenti pullulanu (Singh, 2008)

Mikrobiální producenti	Reference
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Bauer (1938), Cooke (1959), Leathers (2003)
<i>Tremella mesenterica</i>	Fraser a Jennings (1971)
<i>Cytaria hariatii</i>	Waksman a kol. (1977), Oliva a kol. (1986)
<i>Cytaria darwinii</i>	Waksman a kol. (1977), Oliva a kol. (1986)
<i>Cryphonectria parasitica</i>	Corsaro a kol. (1998), Forabosco a kol. (2006), Delben a kol. (2006)
<i>Teloschistes flavicans</i>	Reis a kol. (2002)
<i>Rhodotorula bacarum</i>	Chi a Zhao (2003)

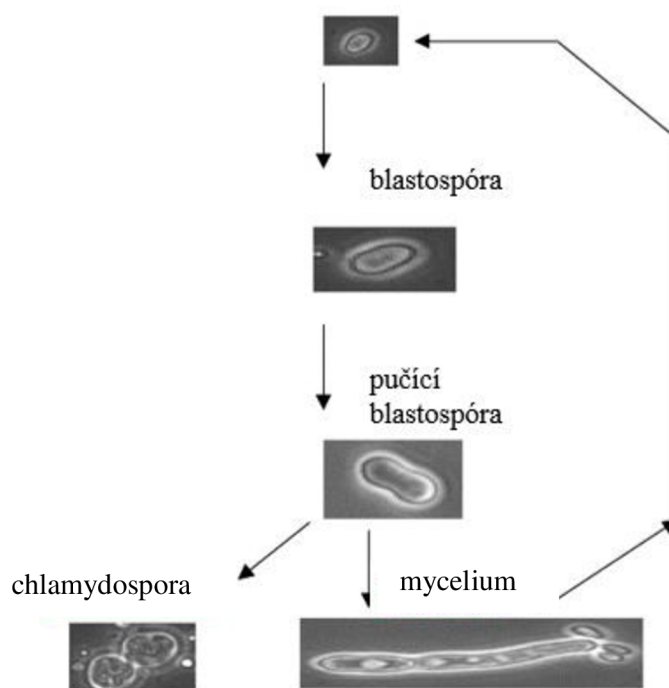
A. pullulans je velice hojně rozšířeným mikroorganismem, jenž bývá součástí většiny ekologických systémů. Nachází se především v půdě, vodách, ale také na květenství tropických rostlin. *A. pullulans* je vysoce tolerantní k zvýšené koncentraci sacharidů a neutrálních solí, ale také k širokému rozmezí pH a ultrafialovému záření (Dumitriu, 1996), (Cheng, 2011). *A. pullulans* často přispívá degradaci barevných pigmentů barev, kolonizuje papírenské mlýny a kontaktní čočky (Webb, 2000).

A. pullulans má mnoho synonym, nejběžněji používaná jsou *Pullularia pullulans* a *Dematium pullulans* (Dumitriu, 1996) a vyskytuje se ve třech variacích *A. pullulans* var. *pullulans*, *A. pullulans* var. *melanogenum* a *A. pullulans* var. *aubasidani* (Yurlova, 1997). Často se také *A. pullulans* označuje jako „černá kvasinka“ díky specifické produkci černého pigmentu-melaninu (Cheng, 2011).

Melanin je produkován v závislosti na daném kmenu, jedná se o látky s vysokou molekulovou hmotností vzniklé oxidační polymerizací fenolických a indolových sloučenin. Melanin zajišťuje buňce ochranu před vnějšími vlivy a slouží především jako extracelulární

redoxní purf, který je schopen neutralizovat oxidanty produkované enviromentálním stresem (Goncalves, 2005).

A. pullulans se může vyskytovat v pěti různých buněčných morfologiích v závislosti na okolních podmínkách: i. kvasinka ii. blastospóra iii. klíčící blastospóra iv. chlamydospóra v. mycelium. Buněčný cyklus je zobrazen na Obrázek 6. (Ronen, 2002).



Obrázek 6: Morfologie – *A. pullulans* (Ronen, 2002)

A. pullulans produkuje celou řadu industriálně významných metabolitů. Kromě pullulanu jde především o celou řadu enzymů, zejména lipáz, proteáz a amyláz, xylanáz, mannáz. Významná je také produkce cyklických depsipeptidů jako antimykotických antibiotik, sideroforů a také alkoholů a ketonů (Chi, 2009), (Dumitriu, 1996).

Pullulan je syntetizován intracelulárně, následně je polymer vyloučen na povrch buňky, kde tvoří pullulan viskózní obal. I přes intenzivní zkoumání cytologických a fyziologických dějů *A. pullulans* spojených s produkcí pullulanu nebyl doposud mechanismus biosyntézy dosud zcela objasněn. V metabolické dráze hrají hlavní roli tři enzymy, jejichž činností je katalyzovat přeměnu glukózy na pullulan – fosfoglukomutáza, UDPG-fosforyláza a glukosyltransferáza. Přítomnost hexokinázy a isomerázy je nezbytná pro konverzi jiných uhlíkatých zdrojů na prekurzor pullulanu, UDPG. UDPG iniciuje připojení D-glukózového zbytku k molekule lipidu. Následná reakce s UDPG zajistí navázání další molekuly glukózy za vzniku isomaltosylu. V dalším kroku metabolické dráhy dochází k reakci molekuly lipid-glukóza s isomaltosylem za vzniku isopanosylu jako prekurzoru. Poslední reakcí je polymerizace isopanosylu za vzniku pullulanového řetězce. Předpokládá se také, že *A. pullulans* nepřeměňuje glukózu přímo na polysacharid, ale nejprve dojde k nahromadění sacharidu a v pozdějším stádiu buněčného cyklu k produkci polysacharidu (Simon, 1998), (Steinbüchel, 2001b).

Stejně jako u biotechnologické produkce polyhydroxyalkanoátů, tak i u pullulanu je silná tendence využívat jako vstupní surovinu biotechnologické výroby odpadní substráty. Jedná se především o lignocelulózové odpadní materiály, které jsou po hydrolyze bohaté na sacharidy (Kap 1.5.2.5).

Poměrně mnoho prací se zabývá využitelností odpadních substrátů pro produkci pullulanu. Cukrová melasa, karobový lusk, kukuřičné hydrolyzáty, kukuřičný sirup, hroznové výlisky nebo mláto patří mezi odpadní substráty vhodné pro produkci pullulanu (Singh, 2008). Přehled produkcí na levných obnovitelných substrátech pomocí *A. pullulans* je uveden v Tabulka 3.

Tabulka 3: Přehled produkcí pullulanu na vybraných odpadních substrátech

Substrát	Mikrobiální producent	Pullulan [g/l]	Reference
Melasa	<i>A. pullulans</i>	35,0	(Sharma, 2013)
Hydrolyzovaný odpadní bramborový škrob	<i>A. pullulans</i>	19,2	(Sharma, 2013)
Hydrolyzát sladkých brambor	<i>A. pullulans</i>	29,43	(Wu, 2009)
Rýžové slupky	<i>A. pullulans</i>	15,11	(Wang, 2014)
Sojové výlisky	<i>A. pullulans</i>	7,5	(Seo, 2004)
Karobové lusky	<i>A. pullulans</i>	9,5	(Roukas, 1995)
Výlisky z hroznů	<i>A. pullulans</i>	22,3	(Israilides, 1998)
Mláto	<i>A. pullulans</i>	11,0	(Roukas, 1999)

1.3.3 Degradace pullulanu

Na mikrobiální degradaci pullulanu se podílí enzymy spadající do skupiny glykosylhydroláz, které jsou velmi bohatě zastoupeny v přírodě a produkovány celou řadou mikroorganismů. Speciálně pak některé termofilní a mezofilní bakterie produkují tyto enzymy ve větší míře. Enzymy schopné degradovat pullulan lze rozdělit do 13 skupin glykosylhydroláz, jinak známých jako α -amylázy. Mimo bakterie se tyto enzymy nacházejí také u zvířat, rostlin, hub nebo kvasinek. Enzymy degradující pullulan mohou degradovat také jiné polysacharidy, ale za použití jiného mechanismu (Dumitriu, 1996).

Pullulan je enzymaticky hydrolyzován (1,6)- α -D a (1,4)- α -D-pullulanázou, kdy (1,6)- α -D-pullulanáza může hydrolyzovat pouze vazby (1,6)- α -D. Působením (1,6)- α -D-pullulanázy dochází tedy k tvorbě maltotriózových jednotek jako hlavního produktu. Při ataku (1,4)- α -D-glykosidických vazeb na jejich redukujícím konci, (1,4)- α -D-pullulanázou je výsledným produktem ispanóza. Enzymy degradující pullulan lze tedy rozřadit do 4 skupin:

i) *glukoamylázy* hydrolyzující pullulan od neredukujícího konce, výsledným produktem degradace je glukóza; ii) pullulanáza nebo α -dextrin 6-glukanohydroláza, hydrolyzující α -(1,6)-glykosidové vazby za tvorby maltotrióz; iii) *isopullulanáza* štěpí α -(1,4)-glykosidické vazby za vzniku isopanózy (6-0- α -maltosyl-glukóza) iv) *neopullulanáza* hydrolyzující α -(1,4)-glykosidové vazby, kdy výsledný produkt je panóza (6-0- α -glukosylmaltóza) (Domaň-Pytka, 2004), (Dumitriu, 1996).

1.3.4 Aplikace

Pullulan je bílý prášek, bez chuti a zápachu, ve vodě tvořící bezbarvé roztoky. Díky těmto vlastnostem je vhodným kandidátem pro použití v potravinářském průmyslu. V Japonsku byl pullulan zařazen na seznam přídatných potravinářských látek již v roce 1996. V USA je

pullulan zařazen mezi bezpečná aditiva úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) od roku 2002. Evropská unie schválila tento polysacharid jako potravinářské aditivum E1204 pro použití ve formě kapslí, tablet a filmů nařízením 2006/52/EC. Další výhodou pullulanu je jeho nízká kalorická hodnota způsobená odolností k savčím amylázám. Pullulan je dalším polymerem využívaným v biomedicině, a to především díky jeho netoxicitě, neimunogenitě, biokompatibilitě a inertnímu charakteru. Využití pullulanu stále stoupá vzhledem k jeho stále se snižující ceně, která je schopna konkurovat přírodním gumám pocházejícím z rostlin, především z mořských řas (Mishra, 2011).

Pullulan může být poměrně snadno derivatizován, k tomuto účelu je možno využít chemických modifikací, karboxymethylací nebo sulfatací. V případě chemických modifikací jsou na pullulanový řetězec roubovány různé chemické skupiny. Pullulan obsahuje poměrně velké množství hydroxylových skupin, které umožňují substituci, jejichž modifikací lze ovlivňovat hydrofilitu pullulanového derivátu. Jednotlivé substituenty jsou k pullulanovému řetězci navázány pomocí různých typů reakcí (esterifikace, etherifikace, chlorace, oxidace). Karboxymethylace je nejrozšířenějším typem reakce používané pro chemickou modifikaci neutrálních polysacharidů. Hydroxylové skupiny pullulanu jsou aktivovány přítomností alkoholu v zásaditém prostředí, případně nukleofilní substitucí chloridu z monochloroctové kyseliny. Jako alternativa heparinu byl vyvinut sulfatovaný pullulan, jehož vlastnosti se odvíjí od teploty, rozpouštědla a doby reakce (Prajapati, 2013).

Tabulka 4: Přehled možností aplikace pullulanu (Cheng, 2011)

Pullulan produkt/derivát	Aplikace
Pullulanová aditiva	náhrada krevní plazmy
Potravinářské aditivum	dietní a funkční potraviny
Pullulanové blendy	cílený transpor léčiv
Pullulanový gel	elektroforéza
Antibakteriální film	úchova potravin
Konjugát s heparinem	tkáňové inženýrství
Karboxymethyl-pullulanový gel	antimikrobiální medicínský přípravek
Aniontově modifikovaný pullulan	náhrada krevní plasmy
2-Nitroalkyl-pullulan ester	funkcionalizovaný pullulan
Siloxanový pullulan	silikonový komposit
Npcaps®	obalový materiál pro kapsle

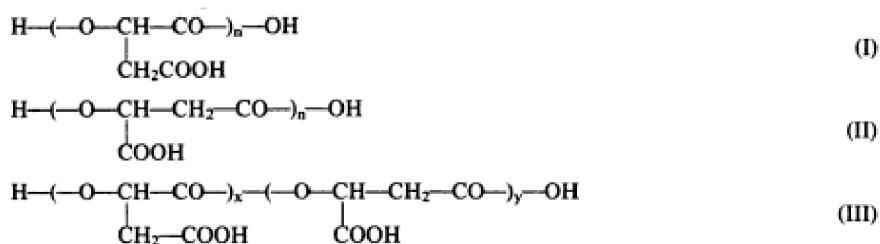
1.4 Polymer kyseliny jablečné

Polymer kyseliny jablečné je poměrně nový biopolymer řadící se do skupiny polyesterů. Díky jeho unikátním vlastnostem o něj vzrůstá v posledních letech zájem, uplatnění nachází především jako přenašeč pro cílený transport léčiv (Ding, 2011).

1.4.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Polymer kyseliny jablečné (PMLA) je polyester kyseliny hydroxybutandiové, jedná se o polymer, který je často řazen do skupiny polyhydroxyalkanoátů (Steinbüchel, 2001a). PMLA je polyaniont s molekulovou hmotností v rozmezí od 5 kDa do několika set kDa (Willibald, 1999). Jedná se o jediný ve vodě rozpustný polyester produkovaný živými organismy (Holler, 1992). Strukturu PMLA tvoří jednotky L-jablečnanu navzájem spojené esterovou vazbou mezi hydroxylovou skupinou a karboxylovou skupinou. Odlišný od ostatních polyesterů je také tím, že má postranní karboxylovou skupinu vázanou na α -uhlíku, který se tak stává asymetrickým. Jsou známy tři typy PMLA, jež byly syntetizovány různými chemickými metodami. Jednotlivé typy se liší v pozicích esterových vazeb:

α -typ (I), β -typ (II) a α , β smíšený typ (III), (Obrázek 7) (Cheremisinoff, 1997), (Nagata, 2014).



Obrázek 7. Chemická struktura PMLA (Cheremisinoff, 1997)

Jednou z možností chemické výroby polymeru kyseliny jablečné je hydratace kyseliny fumarové a maleinové při vysoké teplotě a tlaku za zisku racemické směsi. Nevýhodou tohoto způsobu výroby je nutnost použití petrochemických derivátů jako výchozích sloučenin (Ma, 2013), (Zou, 2013).

Kromě chemické syntézy lze pro produkci PMLA využít biotechnologické produkce (Kap 1.4.2). PMLA produkovan plasmidiem *Physarium polycephalum* je křehký, semikrystalický prášek s bodem tání přibližně 192 °C. K rozkladu dochází již při 200 °C, což je kritické z hlediska zpracování. Depolymerizací vzniká kyselina fumarová. Vlastnosti materiálu se mohou lišit v závislosti na mikrobiálním producentu, ale také na podmínkách kultivace. Polymer produkovaný *Aureobasidium pullulans* má teplotu tání 100 °C a rozkladu 170 °C (Portilla-Arias, 2006), (Steinbüchel, 2003). PMLA je slabou kyselinou pK_a 3 – 4. Díky boční karboxylové skupině vykazuje polymer polyelektrolytický charakter. Volná karboxylová skupina také umožňuje tento polymer chemicky modifikovat a měnit tak jeho fyzikálně-chemické vlastnosti, což je zásadní výhodou pro řadu aplikací (Kap.1.4.4) (Cheremisinoff, 1997).

1.4.2 Produkce

PMLA je ve vodě rozpustný biopolymer, který je možno produkovat, kromě již dříve zmíněné chemické syntézy (Kap.1.4.1), také mikrobiální cestou (Steinbüchel, 2001b).

Produkčními mikroorganismy jsou převážně myxomycety a mikromycety (Steinbüchel, 2003). Vůbec prvním mikroorganismem, u kterého byla zaznamenána schopnost produkce PMLA, bylo *Penicillium cyclospium* v roce 1969 (Shimada, 1969).

Mezi nejčastěji využívané mikroorganismy, které jsou schopny produkce PMLA o relativně vysoké koncentraci, se řadí *Aureobasidium pullulans* a *Physarium polycephalum*. *A. pullulans* produkuje rozvětvenou PMLA ve formě konjugátu s poly(glukanem). Činností enzymů dochází k uvolnění PMLA od polyglukanových residuí. Molekulová hmotnost polymeru jablečné kyseliny syntetizované *A. pullulans*, je v rozmezí 5–10 kDa. Plasmodium *P. polycephalum* je schopno syntetizovat vysoce čistý lineární polymer o molekulové hmotnosti v rozmezí 50–300 kDa. Výťažnost PMLA u *A. pullulans* je poměrně vysoká, až 123,7 g/l (Zou, 2013) a odvíjí se především od použitého kmenu. V porovnání s *A. pullulans* je schopnost produkce *P. polycephalum* výrazně nižší (3,3 g/l) a je také výrazně limitována nutričními nároky plasmodia, kde vhodný zdroj uhlíku představují substráty obsahující D-glukózu (Zan, 2013). Díky širokému enzymatickému vybavení *A. pullulans* je tento producent schopný využít širokou škálu uhlíkových substrátů obsahujících především glukózu, sacharózu, fruktózu (Steinbüchel, 2001b).

Dalšími významnými producenty jablečné kyseliny jsou například *Aspergillus flavus* (113 g/l), nebo *Aspergillus niger* (19 g/l). Velice slibnými producenty jsou geneticky upravené kmeny bakterie *E. coli* a kvasinky *S. cerevisiae* (Tabulka 5). Uhlíkatým substrátem, vhodným pro výše zmíněné produkční kmeny, je glukosa a další sacharidy (Zou, 2013).

Tabulka 5: Porovnání produkce PMLA různými produkčními kmeny (Zou, 2013)

Produkční mikroorganismus	Kultivační nádoba	PMLA [g/l]
<i>Aspergillus flavus</i>	Fermentor	113
<i>Aspergillus niger</i>	Erlenmayerova baňka	19
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Zkumavka	75
<i>Monascus araneosus</i>	Erlenmayerova baňka	28
<i>Schizophyllum commune</i>	Fermentor	18
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Fermentor	65,7
Geneticky upravené		
<i>Escherichia coli</i>	Fermentor	34
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Erlenmayerova baňka	59

Metabolická dráha syntézy polymeru kyseliny jablečné u *A. pullulans* ani u *P. polycephalum* není zcela objasněna. U metabolické dráhy produkce PMLA *P. polycephalum* bylo použitím ¹⁴C značení glukózy (zdroj uhlíku) a L-malátu a následným měřením radioaktivity objasněno, že PMLA je polymerizována z monomerních jednotek kyseliny jablečné, jež jsou syntetizovány z glukózy v citrátovém cyklu. Produkce polymeru začíná v buněčném jádru, odkud je poté přes cytosol uvolňován do produkčního média jako extracelulární produkt. (Lee, 2000). Bylo prokázáno, že mikrobiální produkci PMLA výrazně pozitivně ovlivňuje přítomnost CaCO₃ (Lee, 1999).

Také u PMLA je snaha produkce na odpadních substrátech. Pro tento účel byly využity především lignocelulózové substráty (Tabulka 6), které jsou po hydrolýze výborným zdrojem sacharidů (Kap.1.5.2).

Tabulka 6: Přehled produkce PMLA na vybraných odpadních substrátech

Substrát	Produkční mikroorganismus	Výtěžnost [g/l]	Reference
Hydrolyzát sladkých brambor	<i>Aureobasidium pullulans</i>	55,7	(Zan, 2013)
Kukuřičná vláknina	<i>Aureobasidium pullulans</i>	10,9	(Leathers, 2013)
Pšeničná sláma	<i>Aureobasidium pullulans</i>	11,2	

1.4.3 Degradace polymeru kyseliny jablečné

Ve vodných roztocích dochází k hydrolytické degradaci polymeru kyseliny jablečné. Hydrolytickým štěpením v prostředí neutrálního pH dochází ke vzniku oligomerů, jejichž esterové vazby jsou následně náhodně štěpeny na koncový produkt – monomer kyseliny jablečné. Rychlost degradace se odvíjí od původu polymeru. V případě syntetické PMLA je rychlost degradace výrazně pomalejší. Obecně ale platí, že v roztocích s nízkým nebo naopak vysokým pH dochází k hydrolýze velmi rychle. Ke kompletní degradaci na monomerní jednotky kyseliny jablečné dojde již za 2 h při teplotě 90 °C v přítomnosti 1 M kyseliny sírové (Steinbüchel, 2003).

Degradace PMLA je také možná mikrobiální cestou. L-jablečná kyselina je jedním z intermediátů citrátového cyklu, proto může být asimilována organismy. Mnoho mikroorganismů je schopno produkce hydroláz potřebných k užití PMLA jako extracelulárního zdroje uhlíku. Specifické enzymy štěpící PMLA byly objeveny jak u bakteriálních kmenů, tak u plísní. Hydrolázy produkované *Comamonas acidovorans* a *P. polycephalum* byly izolovány a detailně popsány (Gasslmaier, 2000), (Gödde, 1999). PMLA hydrolázy *P. polycephalum* mohou být extra-/intracelulární na rozdíl od *C. acidovorans* jejíž hydrolázy se nacházejí na vnější membráně. PMLA je tak hydrolyzována na povrchu vnější buněčné membrány a vznikající monomer kyseliny jablečné je přenašen přes membránu do buňky, kde je metabolizován. Optimální pH pro výše zmíněné hydrolázy je odlišné; pro *C. acidovorans* – pH 8, kdežto pro *P. polycephalum* – pH 3,5 (Steinbüchel, 2003).

1.4.4 Aplikace

Polyanionty, jako jsou například polymery kyseliny jablečné, glutamové nebo askorbové, jsou velice atraktivními polymery pro tvorbu nano-konjugátů s možností uplatnění jako cílené přenašeče léků. Pro toto využití je předurčují vhodné vlastnosti těchto materiálů: vysoký počet chemicky „aktivních“ karboxylových skupin, vysoká kapacita pro navázání léčiv nebo biologicky funkčních skupin, v neposlední řadě rozpustnost ve vodném prostředí a biodegradabilita (Ding, 2011).

Díky chemickým modifikacím volné karboxylové skupiny ve struktuře PMLA je možno také upravovat hydrofobicitu. PMLA obsahuje tři skupiny které lze modifikovat i) karboxylová skupina – je reaktivní v přítomnosti karboimidů, které působí jako reakční činidlo ii) terminální hydroxylová skupina která je „aktivní“ působením isokyanátů

iii) β -karboxyl hlavního řetězce v přítomnosti nukleofilního činidla jako jsou aminy a diaminy (Holler, 2002). Hygroskopicitata a tendence hydrolyzovat ve vodném prostředí jsou faktory, díky nimž jsou vyvíjeny nové deriváty PMLA s lepší stabilitou a nižší tendencí k degradaci (Fernández, 2006). V systému pro cílenou přepravu léků je na PMLA kovalentně vázaná nebo fyzikálně uchycena aktivní látka. Takto připravené konjugáty jsou zpracovávány do podoby pelet, filmů, mikro- a nanočástic (Patil, 2012). Dalším velice slibným využitím PMLA je v oblasti medicínských materiálů, kde může nacházet uplatnění především jako chirurgické nitě, obvazy nebo různá krytí pro povrchová poranění (Vasile, 2009).

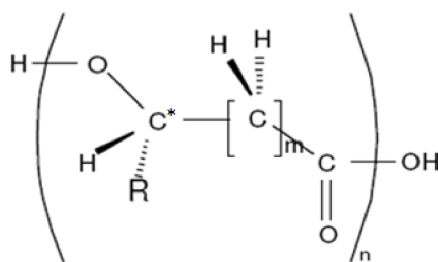
1.5 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou mikrobiálně produkované polyestery, často označovány jako bakteriální plasty. S PHA se v budoucnu počítá jako s potenciálním materiálem, který by mohl nahradit petrochemické plasty. Na rozdíl od tradičních plastů (polyethylen, polypropylen ...) jsou PHA biodegradabilní, biokompatibilní a lze k jejich produkci využít obnovitelné zdroje (Urtuvia, 2014).

1.5.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Jednotlivé polymery patřící do skupiny PHA sdílí některé společné materiálové vlastnosti, které předurčují zájem o tyto materiály jako možné náhrady konvenčních plastů. Jedná se o termoplastické a elastomerní polymery, které mohou být zpracovány v běžném zpracovatelském provozu. Dalšími společnými vlastnostmi je jejich nerozpustnost ve vodě a vysoký stupeň polymerizace (10^5 - 10^7 Da). Typické pro PHA je jejich enantiomerní čistota – vyskytují se pouze ve formě R-stereoisomerů. Jde o biokompatibilní netoxické materiály vykazující piezoelektrické vlastnosti a nezanedbatelná je také jejich schopnost rozkládat se v životním prostředí. (Jendrossek, 1996).

Z chemického hlediska jsou PHA lineární polyestery hydroxyalkanových kyselin (Obrázek 8). Monomerní jednotky hydroxyalkanových kyselin jsou vzájemně spojeny esterovou vazbou, která je tvořena reakcí karboxylové skupiny kyseliny s hydroxylovou skupinou sousedního monomeru (Madison, 1999). Poly(3-hydroxyalkanové kyseliny) patří do skupiny bakteriálních bipolymerů, produkovaných řadou gram-pozitivních a gram-negativních bakterií (Steinbüchel, 2001a). Složení monomerů v PHA je závislé na produkční bakterii, zdroji uhlíku a kultivačních podmínkách (Jendrossek, 1996). V závislosti na počtu uhlíků v monomerní jednotce mohou být PHA děleny do dvou skupin. První skupina scl-PHA (short chain lenght) jsou polyhydroxyalkanoáty, jejichž monomerní jednotka je tvořena R-3-hydroxy kyselinami obsahující 3 – 5 atomů uhlíků v molekule. Mezi nejprostudovanější scl-PHA patří poly(3-hydroxybutyrát) (PHB), případně jeho kopolymer obsahující také 3-hydroxyvalerátové monomerní jednotky. Druhou skupinou jsou mcl-PHA (medium chain lenght), kdy jsou polymery tvořeny z C_6 až C_{14} 3-hydroxyalkanových kyselin. Typickými představiteli mlc-PHA jsou polymery obsahující 3-hydroxyoktanoátové a 3-hydroxydekanoátové jednotky (Sudesh, 2013).



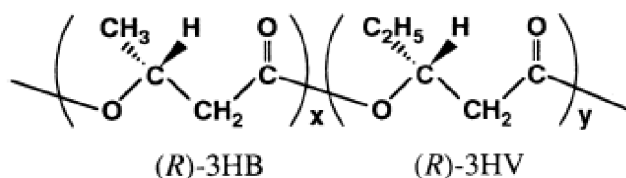
Obrázek 8: Obecná chemická struktura polyhydroxyalkanoátu (Koller, 2012)

Poly(3-hydroxybutyrát) (PHB) byl prvním objeveným polyesterem patřící do skupiny polyhydroxyalkanoátů. Existence dalších monomerních jednotek, 3-hydroxyvalerátu a 3-hydroxyhexanoátu, byla objevena až o 50 let později. V dnešní době je známo více než 150 různých monomerních složek patřících do skupiny PHA (Sudesh, 2013). Čistý PHB je křehký a během tepelného zpracování a tavení termálně nestabilní což značně ovlivňuje možnosti aplikace tohoto polymeru. Odhalení možnosti syntetizovat heteropolymerní PHA mikrobiálně vedlo ke zvýšení zájmu a intenzivnějšímu zkoumání polyhydroxyalkanoátů. Z technologického hlediska se stal velmi zajímavým kopolymer tvořený monomerními jednotkami 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu, a to především z důvodu nižší krystalinity, vyšší flexibility a nižšího bodu tání (Volova, 2004).

Poly(3-hydroxybutyrát) je homopolyester složený výhradně z monomerních jednotek 3-hydroxybutyrátu. Typickou materiálovou vlastností PHB je vysoký stupeň krystalinity a s tím související omezená zpracovatelnost. Molekulová hmotnost PHB se pohybuje v rozmezí od $1 \cdot 10^4$ – $3 \cdot 10^6$ g/mol s polydisperzitou okolo dvou. Relativně malý rozdíl mezi bodem

tání ($180\text{ }^\circ\text{C}$) a teplotou rozkladu ($200\text{ }^\circ\text{C}$) výrazně omezuje průmyslové zpracování PHB. Youngův modul ($3,5\text{ GPa}$) a pevnost v tahu (43 MPa) dávají PHB podobné mechanické vlastnosti jako má polypropylen, ačkoliv v porovnání s propylenem je PHB křehčí a tužší (Sudesh, 2000).

Krystalická struktura PHB může být změněna inkorporací dalších monomerních jednotek ze skupiny PHA, jako je například 3-hydroxyvalerát (3HV) (Obrázek 9). Vzniklý kopolyester má v porovnání s čistým PHB výrazně lepší mechanické vlastnosti, podobné polypropylenu (Tabulka 7) (Koller, 2012).



Obrázek 9: Struktura kopolyesteru poly(3-hydroxybutydrátvalerát) (Sudesh, 2000)

Hodnota Youngova modulu v případě poly(3-hydroxybutyrátu-co-valerátu) klesne pod $0,7$ a sníží se taky pevnost v tahu (30 MPa). Bod tání kopolymeru je výrazně nižší ($130\text{ }^\circ\text{C}$), v závislosti na obsahu 3HV. Tento fakt pozitivně ovlivňuje zpracovatelnost polymeru, větší rozdíl teplot tání a degradace kopolymeru umožňuje zpracovávat materiál bez rizika degradace (Flickinger, 1999).

Tabulka 7: Srovnání materiálových vlastností PHA a polypropyleny (Ienczak, 2011)

Polymer	Bod tání [°C]	Skelný přechod [°C]	Youngův modul [GPa]	Pevnost v tahu [MPa]	Prodloužení k zlomu [%]
P(3HB)	180	4	3,5	40	5
P(3HB)-co-20 mol% 3HV)	145	-1	0,8	20	50
P(3HB)-co-6 mol% 3HV)	133	-8	0,2	17	680
Polypropylen	176	-10	1,7	38	400
LD polypropylen	130	-30	0,2	10	620

1.5.2 Produkce PHA

Poly(3-hydroxybutyrát) byl poprvé objeven v roce 1925 francouzským mikrobiologem Maurice Lemoignem jako metabolit bakterie *Bacillus megaterium* (Steinbüchel, 2001b). Avšak další publikace byla vydána až po 40 letech od objevení PHA. Důvodem byl nezáměr společnosti o biopolymery, a to především díky nízké ceně ropy a s tím související dostupnosti petrochemických plastů. Ropná krize v roce 1973 způsobila prudké zvýšení cen ropy a odstartovala tak vzestup zájmu o polymery, které by byly vhodnou náhradou klasických (ropných) plastů (Volova, 2004).

Celá řada bakterií je schopna syntetizovat PHA, z tohoto důvodu jsou tyto biopolymery také označovány jako „bakteriální plasty“. Schopnost syntézy jednotlivých polyesterů byla zaznamenána u eubakterií, ale také u některých archeí (Antranikiana 1996). Více než 300 různých mikroorganismů je schopných syntézy PHA, ovšem jen některé bakterie jsou vhodné pro produkci PHA. Mezi tyto bakterie patří *Cupriavidus necator*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas oleovorans*, rekombinantní *E. coli*. a *Klebsiella aerogenes*. Výše uvedené bakterie jsou schopny produkovat PHA ve vysoké koncentraci za relativně krátký čas (Volova, 2004). Další možností produkce PHA je využitím transgenních rostlin. Pro tento účel byla jako modelová rostlina zvolena *Arabidopsis thaliana*. PHB biosyntetická dráha u této rostliny byla vytvořena použitím genu pocházejícího z bakterie *Cupriavidus necator* (Snell, 2002), (Lindsey, 1998).

Za syntézu PHA jsou v bakteriích zodpovědné PHA syntázy, které můžeme klasifikovat do čtyř tříd dle jejich struktury a typu substrátu. První třída představuje syntázu skládající se pouze z jednoho typu podjednotky (PhaC) o molekulové hmotnosti 60–73 kDa. PHA syntázy první třídy jsou zodpovědné za syntézu scl-PHA, kdy dochází k inkorporaci převážně tří, čtyř nebo pěti uhlíkatých hydroxyalkanových kyselin do molekuly PHA. Tento typ PHA syntázy je typický pro bakterie *C. necator* a *Burkholderia sp.*

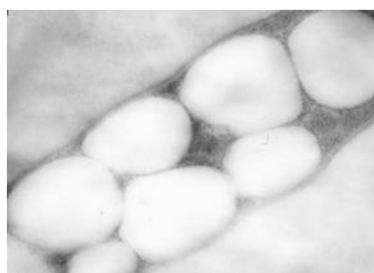
Druhou třídu zastupuje PHA syntáza obsahující také pouze jeden typ podjednotky (PhaC) s molekulovou hmotností podobnou syntáze I. třídy. Specifita PHA syntázy se ovšem liší v inkorporaci mlc 3-hydroxyalkanových kyselin (6 – 14 uhlíků) do PHA. Tento typ PHA syntázy se vyskytuje u bakterie *Pseudomonas aeruginosa*.

Do třetí třídy je zařazena PHA syntáza složená ze dvou různých typů podjednotek (PhaC./ PhaE), jejichž molekulová hmotnost je přibližně 40 kDa. Jedna podjednotka vykazuje významnou shodnost s PHA syntázami 1. a 2. třídy. Nejvýznamnějšími mikrobiálními zástupci obsahujícími tuto třídu PHA syntázy jsou *Chromatium vinosum* a *Thiocapsa pfennigii*. Poslední třída syntáz je typická pro rod *Bacillus* a je opět tvořena dvěma podjednotkami (PhaC/PhaR) (Steinbüchel, 2001a), (Sudesh, 2013).

Nejvíce prozkoumaným mikroorganismem produkujícím PHA je bakterie *Cupriavidus necator*, dříve také známá jako *Rastolnia eutropha*, *Wautersia eutropha* nebo *Alcaligenes eutrophus* (Reinecke, 2009). Jedná se o gram-negativní bakterii, přirozeně se vyskytující v prostředí. Bakterie je schopna využívat různé organické substráty při aerobních podmínkách. Pokud při biotechnologickém procesu nastane limitace jinými živinami než uhlíkatým substrátem, dochází k zvýšení produkce PHA, které jsou uloženy v intracelulárních granulích. Tohoto faktu je využíváno při produkci PHA v průmyslovém měřítku, kdy je *C. necator* využíván jako mikrobiální producent těchto biopolymerních plastů (Muller, 2013).

PHA jsou syntetizovány v buněčné cytoplazmě ve formě inkluzí (Obrázek 10). Počet granulí se pohybuje v rozmezí od 2 do 12 o velikosti 100 až 800 μm . Polymer zaujímá v granulích 98 %, zbytek je tvořen membránou složenou z fosfolipidů a proteinů.

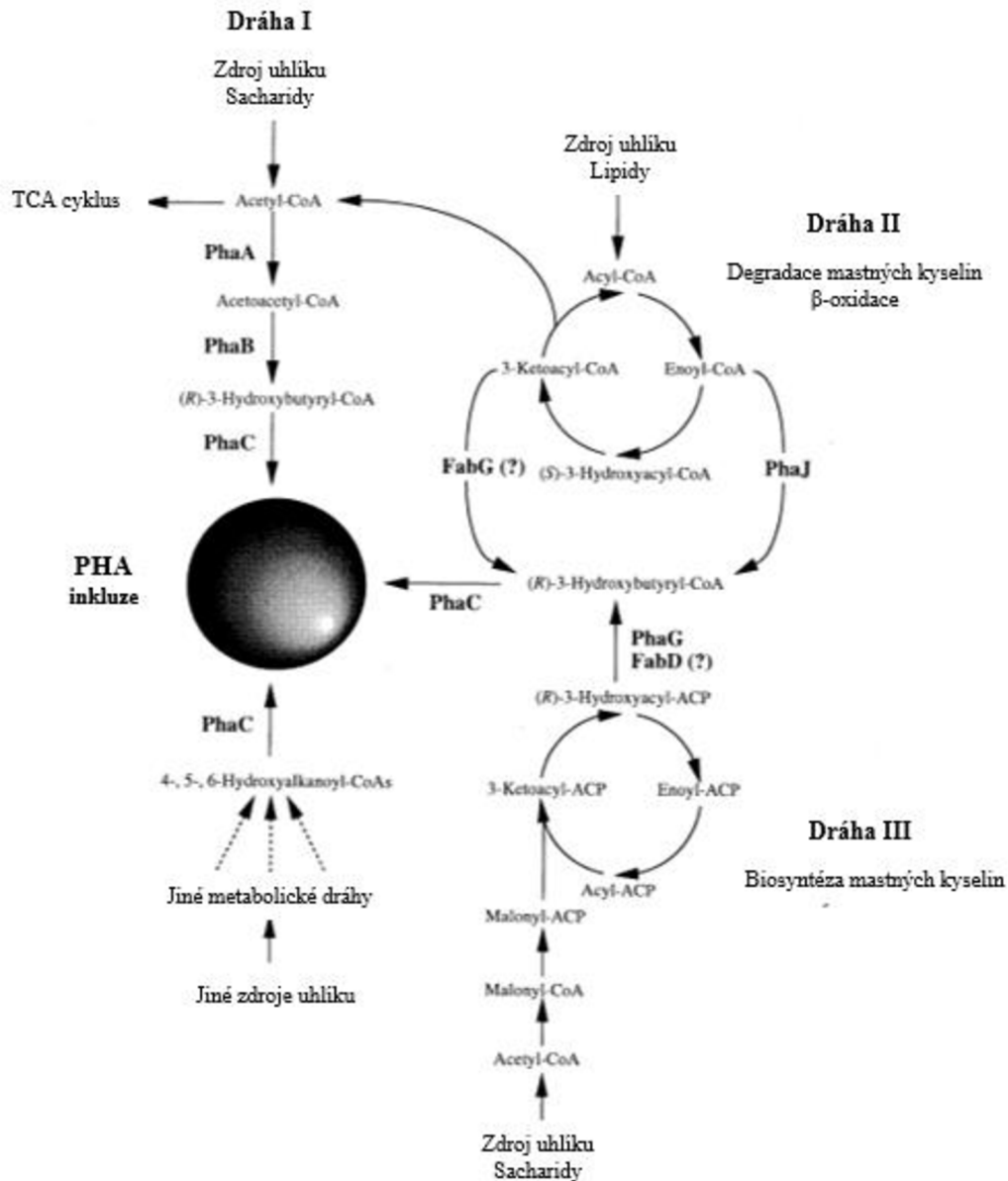
Phasiny, třída nízkomolekulárních proteinů, je hlavní látkou nacházející se na rozhraní granulí. Jedná se o proteiny ovlivňující počet a velikost polymerních granulí (Sudesh, 2000), (Verlinden, 2007).



Obrázek 10: PHA inkluze – *Cupriavidus necator*H16 (Pötter, 2002)

Syntéza polyhydroxybutyrátu bakterií *Cupriavidus necator* se skládá ze tří enzymaticky katalyzovaných reakcí, kde dochází k přeměně výchozího acetyl-CoA na polyhydroxyalkanoát (Obrázek 11). V prvním kroku dojde za přítomnosti enzymu β -ketoacylCoA thiolasy (PhaA) ke kondenzaci dvou molekul acetyl-CoA a vzniká acetoacetyl-CoA. V druhé reakci dochází k redukci acetoacetyl-CoA, na (R)-3-hydroxybutyryl-CoA, reakce je katalyzovaná enzymem acetoacetyl-CoA reduktázou (PhaB). Závěrečný krok zahrnuje polymerizaci (R)-3-hydroxybutyryl-CoA monomerů a je katalyzován PHB polymerázou za vzniku PHB granulí uvnitř buňky (Volova, 2004). Úspěšnost PHA syntézy je ovlivněna poměrem NADH k NAD^+ . Během bakteriálního růstu je 3-ketothiolasa inhibována volným Co-A vznikajícím v citrátovém cyklu. V okamžiku, kdy dojde k limitaci bakterie živinami a vstup acetyl-CoA do citrátového cyklu je omezen, dochází ke zvýšení poměru NADH/ NAD^+ a inhibici enzymů citrátového cyklu. Snížení rychlosti metabolizace acetyl-CoA v Krebsově cyklu vede ke snížení koncentrace CoA a odstranění inhibice β -ketothiolasy. Přebytek acetyl-CoA je využit pro syntézu PHB (Verlinden, 2007), (Shrivastav, 2013). Složení monomerů PHA může být do jisté míry regulováno. Například přidáním propionové nebo valerové kyseliny do produkčního média lze ovlivnit výsledné složení polymeru, vzniká tak kopolymer 3-hydroxybutyrátu

a 3-hydroxyvalerátu (3HV). Monomer 3HV je produkován enzymaticky katalyzovanou reakcí acetyl-CoA a propionyl-CoA, který vzniká z kyseliny propionové nebo valerové přes β -oxidaci nebo deacetylaci. Díky toxicitě kyseliny propionové dochází ovšem k poklesu výtěžků PHA (Kim, 2001).



Obrázek 11: Metabolické dráhy pro syntézu monomerů hydroxyalkanoátu, *Cupriavidus necator* (Sudesh, 2000)

1.5.2.1 Biologická role PHA u bakterií

Růst a životaschopnost bakterií je ovlivněna obsahem živin – uhlíku, dusíku, fosforu v prostředí, ve kterém se nacházejí. Na základě dostupnosti živin, dochází k adaptaci metabolismu jednotlivých mikroorganismů tak, aby přežily. Těmito metabolickými změnami je mikroorganismus adaptován na stresové podmínky, jejichž spouštěčem bývá již zmiňovaný

nedostatek živin, nebo změny fyzikálně-chemických podmínek okolního prostředí (Pavez, 2009).

Intracelulární granule PHA jsou mikroorganismy syntetizovány v období, kdy je v okolním prostředí dostatečné množství živin, naopak spotřebovávány jsou zásobní látky v období „hladovění“ (Gadd, 2015). Během tohoto období slouží PHA pro svého producenta, jako zdroj uhlíku a energie. PHA hraje pro bakterie hlavní roli v případě reakce na stresové podmínky, jako je osmotický stres, vysoušení nebo UV radiace. Dále může hrát významnou roli při procesu sporulace bakterií (Kadouri, 2005). V případě sporulujících bakterií *Bacillus cereus* a *Clostridium botulinum* byla koncentrace PHA v buňce nejvyšší, těsně před počátkem sporulace. Během procesu sporulace byl polymer degradován, předpokládá se, že PHA slouží jako zdroj uhlíku a energie během sporulačního procesu (Chen, 2010).

Jestliže slouží PHA jako zásobní látka, pak je pro její utilizaci producentem nutné, aby byl vybaven systémem depolymeráz, pomocí kterých může tento zdroj uhlíku využívat. Studie prokázaly, že degradace PHB u bakterie *C. necator* je velice pomalý proces. Ukázalo se, že proces degradace je 10krát pomalejší než jeho syntéza (Sudesh, 2000). Za intracelulární degradaci PHB je u *C. necator* zodpovědná depolymeráza PhaZa1 (Chen, 2009). Eggers a spol. ve své studii uvádí, že degradace PHB granulí intracelulárními depolymerázami PhaZ1, vede ke zvýšení koncentrace 3HB-CoA v buňce, který není uvolněn, ale je převeden na krotonyl-CoA. Krotonyl-CoA představuje klíčový meziprodukt spojující degradaci PHB a β -oxidaci. Může být převeden působením enoyl-CoA hydratázy na (S)-3HB-CoA, který je později přeměněn na acetoacetyl-CoA 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenázou v NAD-dependentní reakci. Acetoacetyl-CoA je rozštěpen 3-ketoacyl-CoA thiolázou na dvě molekuly acetyl-CoA, které mohou vstupovat do hlavních metabolických drah, pokud je buňka limitována uhlíkovým substrátem (Eggers, 2013).

Studiem PHA produkujících mikroorganismů bylo prokázáno, že polymer neplní jen roli zásobní látky pro buňku v období hladovění. Intracelulární akumulace PHA umožňuje bakteriím přežít v stresových podmínkách okolního prostředí (Chen, 2010). Za stresovou odezvu jsou u bakterií primárně zodpovědné fosforylačné závislé dvousložkové regulační systémy. Systém je složen z kinázy a regulátoru odpovědi. Autofosforylací histidinu kinázou, po přijetí stresového signálu, dochází k aktivaci latentní biologické funkce. Širokospektrálním regulátorem stresové odpovědi jsou transkripční aktivátory, které regulují a stimulují iniciaci transkripce konkrétních genů prostřednictvím sigma faktorů RNA polymerázy (Marles-Wright, 2007). Různé stresové podmínky aktivují transkripci specifických sigma faktorů, z nichž každý vede k expresi jiného genu, obvykle zapojených do stresové odezvy vůči konkrétnímu faktoru. Například sigma faktor RpoS poskytuje obecné odpovědi na různé druhy stresu, zatímco sigma faktory RpoE a RpoH reagují na stresové odpovědi způsobené extrémními teplotními podmínkami (Nies, 2004).

Existuje řada studií zabývajících se výzkumem zaměřeným na odolnosti PHA producentů vůči externím stresovým podmínkám (Kadouri, 2005). PHA produkující bakterie *P. oleovorans* a její PHA neprodukující mutant byly exponovány prostředí s obsahem 20% ethanolu. Vyšší viabilita byla zaznamenána u kmene schopného produkce PHA. Taktéž vystavení bakterií teplotnímu stresu (47 °C) potvrdilo vyšší odolnost PHA produkujícího kmenu. PHB produkující bakterie *Azospirillum brasilense* prokázala vyšší odolnost vůči limitaci živinami, než její neprodukující mutant (phaC minus mutant). U *Sinorhizobium meliloti* a *Pseudomonas* sp., byla prokázána souvislost mezi obsahem PHA v buňce a ochranou před vnějšími vlivy (salinita, UV záření, teplotní a oxidační stres, vysychání nebo

osmotický tlak). Kultivací proteobakterie *Aromatoleum aromaticum* v přítomnosti polutantů (toulén a ethylbenzen) byla zjištěna schopnost akumulace PHB i v těchto nepříznivých podmínkách (Ayub, 2007). Lze tedy obecně shrnout, že bakterie s vyšším obsahem PHA jsou odolnější vůči stresovým podmínkám než bakterie s nižším nebo žádným intracelulárním PHA (Kadouri, 2005).

Bakterie se vlivem střídání ročních období a s tím související měnící se klimatické podmínky musí velice často vyrovnat s měnícími se teplotami – teplotním stresem. Jedním z hlavních účinků nízké teploty je zvýšená produkce toxické reaktivní formy kyslíku (ROS), která v kombinaci s biochemickými změnami omezuje bakteriální buněčné pochody (Gadd, 2015). Vystavení mikroorganismu nízkým teplotám má dále za následek pokles rychlosti syntézy proteinů, snížení fluidity membrány, denaturaci proteinů, tvorba krystalů ledu, nebo zpomalení difuzních procesů přes membránu (Ayub, 2007). Produkci specifických proteinů reaguje buňka na nepříznivé teplotní změny. Působením nízkých teplot jsou produkovány CSPs – „cold shock proteins“. V případě, že se jedná o buněčnou odpověď na působení vysokých teplot, dochází k indukci specifických proteinů (HSPs – „heat shock proteins“). HSPs často slouží jako molekulární chaperony nebo ATP-dependentní proteázy, hrající hlavní roli při obnově skládání proteinů a degradaci proteinů vlivem stresových podmínek (Barria, 2013).

Většina mikroorganismů na zemi jsou součástí mikrobiálních filmů. Produkce PHA v těchto mikrobiálních společenstvích není zanedbatelná, především díky potřebě vyrovnávat se s fyzikálním a chemickým stresem a nutností adaptace na stále se měnící podmínky prostředí. Biofilmy jsou mnohobuněčná konsorcia, jejichž uskupení je výhodné pro jednotlivé buňky, zejména z pohledu ochrany před podmínkami okolního prostředí (Ayub, 2007). Také někteří PHA producenti jsou schopni tvořit biofilm. Schopnost tvorby biofilmu byla například prokázána u *P. aeruginosa*, která je schopna produkovat jak PHA, tak alginát. V rámci tvorby biofilmu dochází k soutěži mezi těmito dvěma biosyntézami v souvislosti s odolností vůči stresu (PHA) a tvorbě biofilmu (alginát). Větší mikrobiální diverzita PHA producentů byla zjištěna u mořských biofilmů, vystavených environmentálnímu stresu organickými polutanty. Syntéza PHA je spojena s metabolismem lipidů, PHA producenti jsou konkurenceschopní právě v prostředí s výskytem mastných kyselin, jako je například aktivovaný kal (Chen, 2010). Stresových podmínek je také využíváno při selekci PHA produkujících kmenů u smíšené mikrobiální kultury z aktivovaného kalu (Kap.1.5.2.3).

1.5.2.2 Extrémofilní producenti PHA

Největší počet mikroorganismů se nachází v podmínkách „mírného“ prostředí. Na zemi existují ale také místa, kde převládají extrémní podmínky, které jsou na první pohled se životem mnohdy neslučitelné. Environmentální podmínky vyskytující se na těchto územích, jsou charakteristické hraničními hodnotami pH, teploty, tlaku a koncentrace soli. Extrémofilové představují skupinu mikroorganismů, u kterých došlo k adaptaci a vytvoření ochranných mechanismů vůči jednotlivým extrémním podmínkám. V závislosti na podmínkách, na které se jednotlivé mikroorganismy adaptovaly, tvoří skupinu alkalofilů, halofilů, thermophilů, psychofilů nebo acidofilů. Schopnost akumulace PHA byla zjištěna především u Gram-negativních extrémofilních bakterií (Tan, 2014).

Mikroorganismy vyskytující se v zásaditém prostředí, jsou alkalofilové a mohou být rozřazeni do dvou skupin na základě toho, jaké hodnoty pH jsou schopny akceptovat. Alkalotolerantní mikroorganismy mohou růst v prostředí pH 9–10, ale optimální podmínky

pro růst jsou při neutrálním pH. Na druhou stranu, alkalofilové vyžadují pro svůj růst zásaditější prostředí, optimální hodnota pH pro růst je 9, při nižších hodnotách pH blízcí se neutrálnímu prostředí nerostou. Sodná jezera nebo pouště představují stabilní přírodní zdroj alkalického prostředí. Bakterie izolována ze sodného jezera Lonar lake, byla popsána jako haloalkalofilní producent PHA (Joshi, 2008). pH pohybující se v sodných jezerech dosahuje hodnot 10–12, což je způsobené vysokou koncentrací uhličitanu sodného. Kromě alkalického prostředí, je zde také poměrně vysoká koncentrace solí (Kulkarni, 2010), (Thomas, 2015).

Také některé metanotrofní bakterie mohou syntetizovat PHB homopolymer z methanu v podmínkách, kdy jsou limitovány živinami (Strong, 2014). Pieja a spol. uvedl studii zabývající se produkcí PHB methanotrofními bakteriemi v podmínkách nízkých hodnot pH. Methanotrofní bakterie typu I, *Methylocystis* a *Methylosinus*, byly schopné syntézy PHB v médiu obsahujícím 1 mM uhličitanu o pH 4 (Pieja, 2011).

Halofilní mikroorganismy vyžadují pro svůj růst relativně vysoké koncentrace soli v okolním prostředí. Mezi halofilními mikroorganismy je řada heterotrofních, fotosyntetických a litotrofních bakterií a archeí. Poměrně rozšířená je například archbakterie *Halobacterium* sp., kyanobakterie a modro-zelená řasa *Dunaliella salina*. Skupina mírných halofilů vyžaduje pro svůj růst 5–20 % NaCl, optimální koncentrace soli pro extrémní halofily je 20 – 30 %. Halotolerantní mikroorganismy mohou růst v prostředí s vysokou salinitou, ale není pro ně nezbytná. Mírné halofilní bakterie kolonizují prostředí slaných jezer, pouští, půd, nebo jídel, a jsou schopny se adaptovat na prostředí s obsahem soli v rozmezí od 0,2 – 4,5 M NaCl, ale také přežijí v širokém rozsahu pH (6-12). Mezi nejznámější rody halofilních archeí patří *Haloferax*, *Haloarcula*, *Natrialba*, *Haloterrigena*, *Halococcus*, *Haloquadratum*, *Halorubrum*, *Natronobacterium*, *Natronococcus* a *Halobacterium* (Thomas, 2015). Halofilní producenti syntetizují *scl*-PHA, PHB a kopolymer poly- β -hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerátu ve formě intracelulárních granulí, které slouží v buňce jako zdroj uhlíku a energie. První případ akumulace PHB halofilní archeou byl zaznamenán v roce 1970, kdy byl izolován *Halobacterium marismortui* z Mrtvého moře (Saharan 2014). Mezi nejlépe prostudované halofilní producenty PHA patří *Haloferax mediterranei*, který je schopen akumulovat kopolymer P(3HB-co-3HV) v relativně vysoké koncentraci, bez nutnosti přídavku prekurzoru. Mimo PHA je schopen syntetizovat také extracelulární polysacharidy a C50 karotenoidní pigmenty, napomáhající regulaci fluidity membrány, adaptaci na vysokou koncentraci soli a teplotu. *H. mediterranei* patří do skupiny extrémních halofilů a dokáže přežít v prostředí s téměř nasyceného roztoku NaCl.

Teplotní rozsah pro růst *H. mediterranei* je také poměrně široký 20–55 °C. Dalším významným zástupcem halofilních PHA producentů je *Halomonas boliviensis*, patřící do rodu *Halomonadaceae*. Rozsah koncentrace soli okolního prostředí by se měl optimálně pohybovat od 5–25 %, teplotní rozsah pro růst této bakterie je 0 – 45 °C a pH 6 – 11. Kmen využívá glukózu, xylózu a sacharózu, a je schopen produkce PHB o vysoké molekulové hmotnosti 1,100 kDa. Využití halofilních mikroorganismů k produkci PHA může mít pozitivní vliv na cenu biotechnologického a izolačního procesu. PHA granule lze snadno izolovat převedením buněk z kultivačního média do hypotonického prostředí, kde dochází k porušení buněčných stěn vlivem změny osmotického tlaku. Navíc jsou, díky extrémně vysokým koncentracím soli jsou při kultivaci halofilních PHA producentů snižované požadavky na sterilitu procesu, což výrazně snižuje náklady na up-stream proces. Další z výhod je možnost použití mořské vody a různých odpadních materiálů, jako substrátu pro produkci

PHA (Tabulka 8). Veškeré výše uvedené výhody se podílejí na snížení celkové ceny procesu produkce PHA halofilními mikroorganismy (Yin, 2015).

Tabulka 8: Přehled produkci PHA halofilními producenty

Kmen	Odpadní substrát	Biomasa [g/l]	PHA [g/l]	PHA [%]	Ref.
<i>H. mediterranei</i>	extrudované rýžové otruby + ECS	140	77,8	55,6	(Huang, 2006)
	extrudovaný kukuřičný škrob (ECS)	62,6	24,2	38,7	
	extrudované pšeničné otruby + ECS	131	52,7	40,2	
	pšeničné otruby + ECS	68,4	28	40,9	
<i>H. mediterranei</i>	enzym. upravený extrud. škrob	39,4	20	50,8	(Chen, 2006)
<i>H. mediterranei</i>	hydrolyzovaná syrovátka		5,5	50	(Koller, 2007)
<i>H. mediterranei</i>	laktóza ze syrovátky		12,2	73	(Koller, 2008)
<i>H. mediterranei</i>	hydrolyzovaná syrovátka	5,69	9,86	65	(Pais, 2016)
<i>Haloarcula marismortui</i>	Vináza	15	4,5	30	(Pramanik, 2012)
<i>Halomonas boliviensis LCI</i>	hydrolyzát škrobu	0,92	0,55	58,8	(Quillaguamán, 2005)

ECS – extrudovaný kukuřičný škrob

Třída extrémofilů adaptovaných na extrémně vysoké teploty lze rozřadit do dvou skupin, termofilové a hypertermofilové, jejichž mikrobiálními zástupci jsou bakterie a archea, optimální teplota pro růst může přesahovat 80 °C. Na druhé straně jsou psychofilní mikroorganismy, které naopak odolávají nízkým teplotám. *Phylobus fumarii* je dosud nejodolnějším extrémním termofilem, který přežívá při teplotách 90–113 °C. Naopak mikroorganismy přežívající v podmínkách -20 °C byly nalezeny v ledových krách na moři, viabilita buněk byla zachována i při teplotě -196 °C (Kalia, 2015). Popsáno je v současnosti pouze několik psychofilních producentů PHA. U Antarktické bakterie *Pseudomonas sp.* 14-3 byla zjištěna schopnost produkce PHB při teplotě 10 °C (Ayub, 2007). Goh a spol. také studovali možnost produkce PHA u bakterií rodu *Pseudomonas* v teplotním rozsahu od 5–30 °C. Nejvyšších výtěžků mcl-PHA bylo dosaženo při teplotě 5 °C. Využitím oktanoátu a palmového oleje, jako substrátu, byl obsah PHA v biomase až 48 % (Goh, 2012).

PHA jsou ve většině případů syntetizovány mezofilními bakteriálními kmeny, což může vést často ke kontaminacím. Použitím některých termofilních mikroorganismů (T_{opt} 50-60 °C) lze snížit riziko bakteriální kontaminace, které znesnadňuje scale-up proces. (Poli, 2011). Další výhodou je také rychlejší růst buněk a s tím související kratší celkový čas kultivace, ve srovnání s mezofilní kultivací. Například, doba kultivace mezofilní bakterie *Cupriavidus necator* je 48-72 h při teplotě 30 °C, zatímco termofilní *C. taiwanensis* dosáhne nejvyšší koncentrace PHB v buňce po 14 hodinách při teplotě 55 °C (Sheu, 2009).

I přes to, že bylo doposud popsáno více než 300 producentů PHA, jen velmi málo z nich jsou bakterie termofilního charakteru (Tabulka 9). V porovnání s Gram-negativními bakteriemi, mají extrémofilní mikroorganismy výhodu nižší nároků na sterilitu prostředí (Tan, 2014). Extrémofilní producenti PHA jsou vzhledem k již zmíněným nízkým nárokům na sterilitu prostředí a schopnosti využít odpadní substráty, velmi perspektivní z hlediska průmyslové produkce PHA (Saharan 2014).

Tabulka 9: Přehled produkce PHA termofilními producenty

Producent	Substrát	Biomasa [g/l]	PHA [g/l]	PHA [%]	Ref.
<i>Aneurinibacillus sp. XH2</i>	Glukóza		0,11	12	(Xiao, 2015)
<i>Chelatococcus daeguensis</i>	Glycerol	2,5	2,0	80,8	(Xu, 2014)
<i>Chelatococcus sp.</i>	Glycerol	4,8		73	(Ibrahim, 2010)
<i>Caldimonas taiwanensis</i>	pšeničný škrob + 0,05% valerát	4,1		42	(Sheu, 2009)
	kasava škrob + 0,05% valerát	2,8		67	
<i>Pseudomonas sp.</i>	odpad z produkce biodieslu	1,5	0,61	40,6	(Satoh, 2011)
<i>Thermus thermophiles</i>	Syrovátka	2,1	0,51	24,4	(Pantazaki, 2009)

1.5.2.3 Produkce PHA směsnými mikrobiálními kulturami

Další možností produkce PHA s minimálními náklady na biotechnologický proces, je využití směsných mikrobiálních kultur. Produkce PHA směsnou mikrobiální kulturou (mixed microbial culture-MMC) se jeví být pro průmyslové aplikace jako velmi slibná a to především díky eliminaci požadavků na sterilní podmínky a možnosti využití odpadních produktů jako substrátu, což vede k rapidnímu snížení koncové ceny produktu (Villano, 2014). MMC mohou využívat celé škály odpadních substrátů, průmyslový a komunální odpad, lignocelulózní odpady, ale také například glycerol. Častým zdrojem mikrobiální producentů bývá aktivovaný kal z čistíček odpadních vod. Ovšem ne všechny mikroorganismy nacházející se v mikrobiální směsi jsou schopny produkce PHA a je nutno získat co největší podíl PHA produkujících mikroorganismů v MMC, za účelem dosažení maximální možné produkce PHA (Saharan 2014). Producenti PHA jsou ze směsné mikrobiální kultury získány nastavením podmínek, tak aby byly ostatní mikrobiální populace potlačeny (Queirós, 2014). Efektivita produkce PHA směsnými kulturami je ovlivněna podmínkami kultivačního procesu v bioreaktoru tak, aby bylo dosaženo optimálních podmínek pro organismy schopné akumulace PHA (Valentino, 2015). Za účelem selekce mikrobiálních PHA producentů je využíván sekvenční vsádkový fermentor. Aplikovány jsou zde dva možné přístupy výběru PHA producentů; aerobní dynamické krmení (ADF – aerobic dynamic feeding) nebo použití alternativního anaerobního a aerobního systému (AN/AE) (Moralejo-Gárate, 2014), (Saharan 2014). Zisk PHA produkující populace je zásadní pro celý proces biotechnologické produkce. Nicméně snaha zvýšit schopnost akumulace, může vést k zisku nestabilní populace. Ideálně by mělo dojít k vytvoření homogenní směsné mikrobiální kultury, s relativně vysokou a stabilní schopností akumulovat polymer (Serafim, 2008).

K produkci PHA, využitím směsných mikrobiálních kultur, jsou jako substráty využívány především průmyslové odpadní vody z potravinářských nebo papírenských výrobníků (Albuquerque, 2011). Odpadní materiály jsou z pravidla bohaté na obsah organických látek,

méně na obsah živin. Tento nevyvážený stav přísunu živin podporuje růst PHA produkujících mikroorganismů, nicméně dochází k minimální utilizaci substrátu a produkci PHA. Z tohoto důvodu se přistoupilo k úpravě odpadních materiálů, enzymaticky, teplem, nebo mechanicky. Cílem předúpravy odpadních materiálů je získání těkavých mastných kyselin a sacharidů, které mohou být lehce využívány jako substrát pro PHA producenty. V případě, kdy je substrátem zvolen odpad bohatý na živiny, které může MMC využít přímo (např. volné mastné kyseliny), je využit dvoustupňový proces produkce PHA. V prvním kroku je vybrána PHA produkující směsná kultura a v následujícím kroku maximalizována akumulace PHA v daném mikroorganismu (Queirós, 2014). Jestliže nemůže být odpadní substrát utilizován přímo, využíván je třístupňový proces produkce PHA. V prvním kroku dochází k předúpravě odpadních materiálů, další stupeň představuje selekci PHA producentů (ADF, AN/EN) a v posledním kroku dochází k samotné produkci PHA. Vlastností polyesteru jsou ovlivněny substrátem, který je generován během acidogeneze. Charakter získaných těkavých mastných kyselin je zásadní pro složení a strukturu polymeru (Moralejo-Gárate, 2014)

Výběr kultury s vysokou schopností akumulace PHA je jednou z největších výzev v procesu produkce PHA MMC. Nejprve je získána stabilní a homogenní kultura, u které je následně zkoumána schopnost akumulace PHA. Studie zabývající se mikrobiálním složením MMC PHA producentů potvrdily poměrně širokou fylogenetickou diverzitu. Mikroorganismy rodu *Thauera*, *Azoarcus*, *Amaricooccus*, *Zooglea*, *Meganema* a *Paracoccus* byly identifikovány jako nejčastěji vyskytující se producenti PHA nacházející se v MMC (Reis, 2003), (Albuquerque, 2012).

Jedna z neefektivnějších metod selekce PHA produkujících MMC je aerobní dynamický krmný systém (ADF – aerobic dynamic feeding strategy), také známý jako „hlad/hody“ (F/F – feast and famine). Principem této metody je střídání fáze limitace/přebytek substrátu. V případě fáze přebytku substrátu, je v médiu přítomen nadbytek zdroje uhlíku, který je střídán se stavem, kdy je naopak kultura substrátem limitována a dochází tak k využití uloženého polymeru pro zajištění základních pochodů PHA produkujících kmenů. Snížení koncentrace substrátu vede ke zpomalení metabolismu a enzymatické aktivity buňky. Po přechodu z fáze limitace do fáze přebytku dochází k rapidnímu zvýšení akumulace PHA v buňkách (Saharan 2014), (Reis, 2003). Schopnost akumulace PHA jako zásobního polymeru, představuje pro PHA producenty konkurenční výhodu v porovnání s mikroorganismy, které nejsou schopny akumulovat intracelulární PHA (Reis, 2003).

Alternativní metodou pro selekci PHA producentů je aerobní/anaerobní proces. Tímto přístupem mohou být selektovány dvě skupiny organismů, mikroorganismy akumulující fosfor (PAO) a glykogen (GAO) (Serfim, 2008). PAO jsou mikroorganismy schopny akumulace fosforu ve formě intracelulárního polyfosfátu. Těkavé mastné kyseliny mohou být PAO využívány jako zdroj uhlíku, za anaerobních podmínek a tyto mikroorganismy je dokáží následně akumulovat jako intracelulární PHA. Energie nezbytná pro procesy biotransformace je získávána štěpením polyfosfátu. Glykogen akumulující organismy využívají glykogen jako primární zdroj pro anaerobní zpracování volných mastných kyselin a tvorbu PHA, zatímco PHA je oxidováno aerobně což vede k růstu biomasy a tvorbě glykogenu (Oehmen, 2007). Zásobní glykogen je spotřebováván za aerobních i anaerobních podmínek, mění se pouze stechiometrie. GAO jsou v porovnání s PAO méně efektivní ve využívání energie (z glykogenu). GAO musí využívat větší množství glykogenu pro udržení redoxní rovnováhy odsunutím části glykolytických meziproductů pro produkci propionyl-CoA, zároveň dochází k zvýšené produkci PHA při anaerobních podmínkách (Serfim, 2008).

Možností využití xylózy jako zdroje uhlíku pro MMC se zabýval Huang a spol. Pro výběr vhodných PHA producentů byla zvolena metoda ADF. V takto získané MMC byly nejvíce zastoupeny *Proteobakterie*, *Celvibrio sp.* a *P. putida* (Huang, 2016). Dalším možným substrátem pro produkci PHA směsnou mikrobiální kulturou je syrovátka, jejímž využitím se zabývá několik studií (Duque, 2014), (Valentino, 2015b), (Colombo, 2016). Jak bylo uvedeno výše, velice slibnou skupinou substrátů jsou odpadní vody pocházející především z potravinářských výrob. Tento fakt dokládají studie zabývající se využitím odpadních vod pro produkci PHA pomocí MMC (Fernández-Dacosta, 2015), (Elain, 2016), (Ntaikou, 2014). V případě využití odpadní vody jako substrátu, je z důvodu mnohdy nízkých koncentrací živin nutné převést organické látky přítomné ve vodě na těkavé mastné kyseliny v acidofikačním reaktoru (Jiang, 2012). Tamis a spol. využívá ve své studii, pro zavedení pilotní jednotky odpadní vody z potravinářské výroby bonbónů a čokoládových tyčinek Mars. Selektce MMC byla uskutečněna aplikací systému ADF. Takto získaná kultura byla schopna akumulace 0,7 g PHA/g těkavých nerozpustných látek (Tamis, 2014).

1.5.2.4 Produkce PHA v konceptu biorafinerie

Fosilní paliva jsou v dnešní době nezbytnou součástí každodenního života, spotřeba ropných produktů neustále roste, ale zásoby ropy se zmenšují. Prokázán byl negativní vliv emisí na zemské klima, které vznikají spalováním fosilních paliv představující hlavní produkt ropné rafinerie. Více než 4 % z celkového množství celosvětově získané ropy, je využito v procesu rafinerie pro produkci chemikálií a plastických materiálů. V rámci ekologie a zmírnění změn klimatu je snaha omezit využívání ropy jako vstupní suroviny pro produkci paliv a dalších petrochemických produktů. Z hlediska trvale udržitelné ekonomiky se zdá být využití obnovitelných zdrojů v procesu biorafinerie velice slibnou alternativou ropných rafinerií. Rostlinná biomasa má velký potenciál být alternativou k fosilním zdrojům a nachází uplatnění při průmyslové výrobě chemikálií a plastů. Klimatické změny, energetická bezpečnost a rozvoj venkova jsou třemi hlavními hnacími silami pro využití biomasy v procesu biorafinerie (Cherubini, 2010). Při procesu biorafinerie dochází ke zpracování biomasy a produkci biopaliv, energie a celé škály chemikálií a materiálů. Analogicky funguje ropná rafinerie, pomocí které je ze vstupní suroviny-ropy získána celá řada petrochemických produktů. Uplatnění biorafinerie v průmyslovém měřítku je slibným způsobem výroby řady produktů, s ohledem na životní prostředí (Nigam, 2009). Existuje celá řada definic biorafinerie, pravděpodobně tou nejkomplexnější je definice vytvořena mezinárodní agenturou pro energii (IEA-Task 42). IEA definovala **biofarinefii** jako udržitelné zpracování biomasy za vzniku energie a řady produktů, které jsou určeny k prodeji (De Jong, 2015). Koncept biorafinerie zahrnuje širokou škálu technologií využívaných pro zpracování biomasy na suroviny, které mohou být následně přeměněny na produkty s přidanou hodnotou (materiály, chemikálie, paliva) (Cherubini, 2010). Biorafinerie představuje integrovaný „upstream, midstream, downstream“ proces zpracování obnovitelných surovin. Využívána je celá řada surovin, pocházejících z lesnictví, zemědělství, vodohospodářství, průmyslový nebo komunální odpad. Koncept biorafinerie není nový, řada stávajících technologií využívající jako výchozí surovinu biomasu (cukr, škrob, dřevo) může být do jisté míry označena jako „biorafinerie“. Avšak díky ekonomickým a environmentálním aspektům je nutné převedení těchto výrob do konceptu biorafinerie v pravém slova smyslu. Produkty biorafinačního procesu mohou být jak produkty koncové, tak i meziprodukty (jídlo, krmivo, materiály, chemikálie, energie). Biorafinerie může být rozdělena do různých platforem (De Jong, 2015):

1. „Whole crop“ – využívající suroviny jako jsou cereálie nebo kukuřice
2. Zelená biorafinerie – materiály které obsahují vysoký obsah vody-tráva, fytořemeslační rostliny, vodní hyacinty
3. Lignocelulózové biomasy – zdroj sacharidů, využívající materiálů s vysokým obsahem celulózy – sláma, dřevo, odpadní papír
4. Bioplyn – díky přirozeným mikrobiálním konsorciím dochází v anaerobním prostředí k produkci methanu, jako vstupní biomasa může být využíván organický odpad
5. Obnova olejů – využití procesu transesterifikace pro úpravu rostlinných olejů, zvířecích tuků, použitých kuchyňských olejů za účelem získu methylesterů mastných kyselin, biodieslu.
6. Geneticky upravené rostliny – využití geneticky upravených rostlin za účelem zvýšení produkce biomasy, chemických látek, nebo dokonce sloučenin, které by přirozeně neprodukovaly (Doelle, 2009).

Biorafinerie uplatňuje dva způsoby zpracování vstupní suroviny. První způsob je biochemický, využívající především sacharidy, druhý je termochemický, kde dochází k zplynění biomasy a syntéze kapalných paliv Fisher-Tropschových procesem. Ve smyslu moderní biorafinerie je často jako vstupní surovina využívána směs odpadních biomas (Boneberg, 2016). Existují dva hlavní termochemické procesy přeměňující biomasu na energii a chemické produkty. Ke zplynění biomasy dochází působením vysoké teploty ($>700\text{ }^{\circ}\text{C}$), v prostředí se sníženým obsahem kyslíku, za vzniku **syntézního plynu** tvořeného z H_2 , CO , CO_2 a CH_4 . Takto generovaný syntézní plyn lze přímo využít jako biopalivo, nebo může sloužit jako surovina pro produkci paliv a chemikálií. Pyrolýza je dalším procesem využívajícím se ke konverzi biomasy. V procesu pyrolýzy je použita teplota $300\text{--}600\text{ }^{\circ}\text{C}$, kdy za anaerobních podmínek vzniká pyrolyzní olej, uhlí a plyny podobné syntéznímu plynu. Uhlí je spolu se syntézním plynem využito pro produkci elektrické energie v elektrárnách, nicméně využití pyrolyzního oleje je problematické a v současné době se touto problematikou zabývá řada studií.

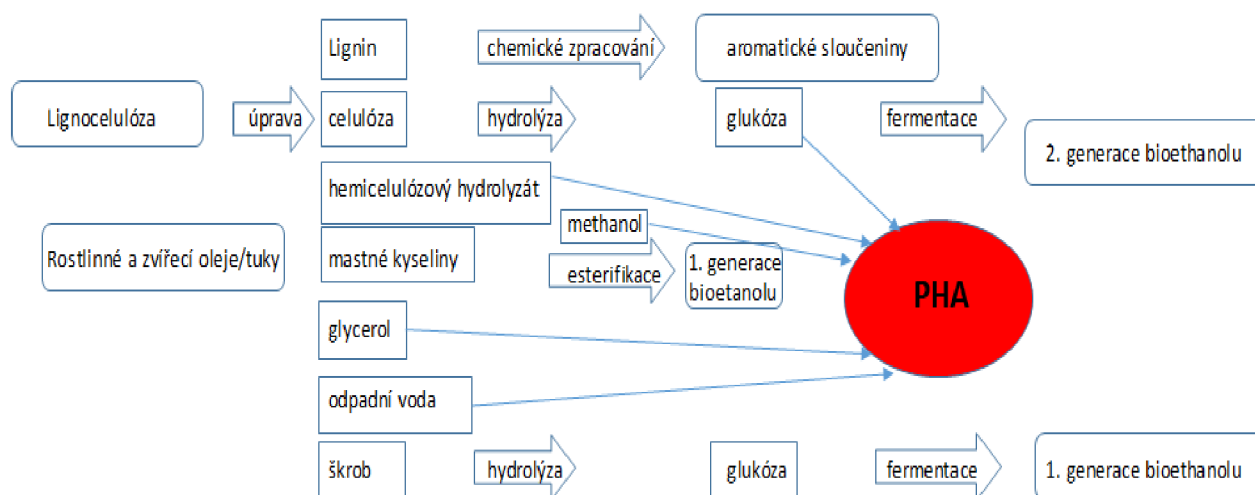
Na rozdíl od termochemických procesů probíhá biochemický proces zpracování biomasy při nízkých teplotách a má výrazně nižší reakční rychlost. Mikroorganismy jsou zde využívány v procesu fermentace biomasy, za účelem získu produktů s přidanou hodnotou (rozpouštěla, organické kyseliny, bioplasty). Biomasa je použita surová nebo předupravená, v závislosti na enzymatickém vybavení daného mikrobiálního producenta (Cherubini, 2010).

Pokročilé biorafinerie představují aplikaci konceptu biorafinerie na již existující průmyslové infrastruktury. Zcela nové koncepty biorafinerií jsou prozatím uskutečňovány pouze v malých objemech a na pilotních linkách. IEA předpokládá, že realizace uplatnění biorafinerie v průmyslovém měřítku, by se mohla uskutečnit do roku 2025 (De Jong, 2015).

Substráty, využívané v současné době pro produkci PHA, jsou primárně získávány ze zdrojů, které by mohly být využity jako potraviny. Využívány jsou například cukrová třtina, kukuřice, nebo rostlinné oleje, spotřebou těchto komodit pro produkci PHA dochází k soutěži s potravním řetězcem. V případě, že je pro produkci PHA použita kukuřice (sacharidy) jako zdroj uhlíku, z 1 kg kukuřice je možno získat 0,67 kg glukózy, ze které je možno syntetizovat 0,27 kg PHA. Pro výrobu 34 000 tun PHA by bylo za potřebí 126 000 tun kukuřice. Je tedy nezbytné využívat v první řadě zdrojů, které nemají využití v potravním řetězci a nezasahují do něj (Jiang, 2016). Substráty vhodné pro produkci PHA jsou voleny na základě schopnosti bakterie využívat jednotlivé živiny a zároveň produkovat PHA ve vysokých koncentracích.

Pro produkci PHA je možné zvolit tři skupiny substrátů; monosacharidy, triacylglyceroly a uhlovodíky (Obrázek 12). Utilizovat jednoduché sacharidy jako zdroj uhlíku je schopna většina PHA produkujících mikroorganismů, zatímco olejnaté substráty dokáží metabolizovat pouze vybraní bakteriální PHA producenti. Možnost využít uhlovodíky jako zdroj uhlíku, byla popsána pro bakterie rodu *Pseudomonas*, které jsou schopny produkce *mcl*-PHA (Sun, 2007), (Kato, 1996).

Využití odpadních surovin, jako je glycerol, lignocelulózové substráty nebo odpadní oleje je slibným způsobem produkce PHA v rámci konceptu biorafinerie/udržitelnosti (Jiang, 2016).



Obrázek 12: Schéma produkce PHA v konceptu biorafinerie (Jiang, 2016)

Příkladným konceptem biorafinerie v rámci produkce PHA může být využití lignocelulózové biomasy. Zpracováním lignocelulózových materiálů je vedle sacharidů, které mohou být využity pro produkci PHA, generováno také velké množství hemicelulóz. Hydrolyzou celulózy vzniká glukóza, která může být využita k biotechnologické produkci bioethanolu. Hemicelulózy mohou být hydrolyzou přeměny na C5 sacharidy, zejména xylózu, která může být využita nejen pro produkci PHA (Kap.1.5.2.5) (Lopes, 2009), (Jiang, 2016).

Integrace PHA produkce do systému biorafinerie je slibným konceptem vedoucím ke snížení výsledné ceny polymeru s možností paralelní produkce biopaliv, bioethanolu a biodieslu (Jiang, 2016), (Mohan, 2016). Obruca a spol uvedl studii zabývající se možností využití kávové sedliny pro produkci PHA ve smyslu biorafinerie. Pro produkci PHA byl využit olej extrahovaný z kávové sedliny, který byl přímo utilizován *C. necator*. Kávová sedlina zbavená oleje může být využita pro získání energie spaláním, které by mohly pokrýt energetické nároky na extrakci, sterilizaci reaktoru, a samotnou produkci PHA, případně jeho izolaci (Obruca, 2014).

Silva a spol. uvádí možnost produkce PHA v konceptu biorafinerie vycházející ze zpracování cukrové třtiny. Hlavním produktem je cukr, díky vysoké koncentraci zbytkových hexóz může být v rámci biorafinerie produkován ethanol 1. generace. Fermentací sacharidů získaných z předupravené odpadní třtinové biomasy může být získán také ethanol 2. generace. Nadbytek pentóz lze využít pro produkci PHA. Kromě PHB je možná produkce P(3HB-co-3HV), kdy je jako prekurzor využita kyselina levulová, která vznikla jako vedlejší produkt hydrolyzy odpadní třtinové biomasy (Silva, 2014). Studii zabývající se zpracováním slunečnice v procesu biorafinerie publikoval Kachrimanidou a spol. Vedle hlavního produktu

– slunečnicového oleje, je využíván odpadní glycerol a hydrolyzáty slunečnicových výlisků jako obnovitelný zdroj živin pro produkci PHB nebo P(3HB-co-3HV) využívající jako prekurzor opět kyselinu levulovou. Zároveň je optimalizován proces frakcionace slunečnicových výlisků pro získání proteinů, antioxidantů a již zmíněných substrátů pro produkci PHA (Kachrimanidou, 2014).

1.5.2.5 Produkce PHA na odpadních substrátech

Ze schématu (Obrázek 11) vyplývá, že je pro produkci PHA možné využít substráty s obsahem sacharidů, ale i mastných kyselin. Tohoto faktu se využívá při hledání nových uhlíkatých substrátů pocházejících z obnovitelných zdrojů. Jak již bylo zmíněno dříve (Kap.1.1.2), cena uhlíkatého substrátu a živin je zásadní pro cenu koncového biopolymeru, výrazně ovlivňuje ekonomickou náročnost celého procesu, ale také konkurenceschopnost vůči tradičním/fosilním plastům. Průmyslové a zemědělské odpadní produkty často slouží jako levné zdroje živin, vhodné pro produkci PHA, jedná se především o lignocelulózy materiály, odpadní oleje, syrovátku, melasu, nebo glycerol (Du, 2012).

Lignocelulózy materiály jsou hlavní strukturální složkou rostlin a představují primární zdroj obnovitelné organické hmoty na zemi. Lignocelulózy biomasa je díky produkci přes 80 bilionu tun ročně nadějnou surovinou pro produkci řady průmyslových produktů, jako je papír, bioethanol, chemikálie nebo polymery (PHA). Výhoda lignocelulózy biomasy spočívá především v dostupnosti a nízké ceně. Na druhou stranu, její využití pro biotechnologické produkce vyžaduje předúpravu v podobě hydrolýzy, tak aby došlo ke zvýšení koncentrace sacharidů. Problémem bývá také přítomnost toxických látek v hydrolyzátech a s tím spojené poměrně nákladné odstraňování. Hlavními složkami rostlinné biomasy jsou celulóza (45 %), hemicelulóza (30 %) a lignin (25 %), zastoupeny jsou také proteiny, organické kyseliny, soli a minerály (Wyman, 2004). Celulóza a hemicelulóza jsou polysacharidy, které mohou být působením hydrolýzy převedeny na sacharidy. Hydrolýza může být uskutečněna aplikací fyzikálních metod, chemicky (působením kyseliny/zásady) nebo enzymaticky. Kombinace celulózy, hemicelulózy a ligninu zajišťuje materiál poměrně vysokou odolnost proti působení hydrolýzy zvláště pak enzymů (Peters, 2007). Nejvíce odolává působení hydrolýzy lignin, naopak hemicelulóza je v porovnání s celulózou snadněji hydrolyzovatelná (Wyman, 2004), (Kumar, 2008). Předúprava lignocelulózy materiálů před aplikací celulózy výrazně zvyšuje úspěšnost hydrolýzy a výtěžek glukózy. Celulózy představují skupinu enzymů, které působí na lignocelulózy matici a hydrolyzují celulózu. Enzymatickou hydrolýzou celulózy může být získán až 100% výtěžek glukózy. Celulolytické enzymy mohou být rozděleny do tří skupin: i) endoglukanázy, působící na vnitřní vazby celulózy řetězce, ii) celobiohydrolázy štěpí konce řetězce, produktem je celobióza, iii) β -glukosidázy působí na celo-oligosacharidy a celobiózu, kdy výsledným produktem je glukóza (Wyman, 2004), (Kumar, 2008). Hlavními producenty celulolytických enzymů jsou houby a vybrané mikroorganismy. Celulózy produkují především plísně, ale také některé aktinomycety. Průmyslově jsou celulózy vyráběny biotechnologicky, kultivací mikroorganismů rodu *Trichoderma* a *Aspergillus* (Mizamoto, 1997).

Hemicelulóza představuje druhou nejvíce rozšířenou obnovitelnou surovinu, chemicky se jedná o polymer složený z pentóz, hexóz a cukerných kyselin. Kyselá hydrolýza lignocelulózy je obvykle uskutečněna použitím minerálních kyselin, jejichž působením dojde k narušení dlouhého řetězce a získání oligo- a monomerních jednotek sacharidů. Výhoda kyselé hydrolýzy

spočívá v tom, že kyselina může na lignocelulózu působit bez nutnosti odstranění ligninu. Kyselá hydrolyza probíhá za zvýšené teploty pro lepší výtěžnost procesu, což může vést k tvorbě toxických vedlejších produktů rozkladu sacharidů. (Lenihan, 2010), (Verardi, 2012). Vedle sacharidů mohou být ale produkovány také látky inhibičně působící na biotechnologicky významné mikroorganismy. Na základě jejich původu je lze rozdělit do tří skupin: i. slabé organické kyseliny, ii. deriváty furanu, iii. fenolické látky. Zdroj fenolických a aromatických sloučenin je především lignin. Jeden z možných mechanismů působení fenolických látek na mikroorganismy, je narušení funkce buněčné membrány, změnou zastoupení protein/lipid. Fenolické látky také negativně působí na enzymy účastníci se hydrolyz, předpokládá se jejich precipitace v důsledku zvýšené koncentrace těchto látek (Wyman, 2004), (Mizamoto, 1997), (Jönsson, 2013). Dalšími látkami, které se také vyskytují v linocelulózovém hydrolyzátu, jsou alifatické kyseliny (octová, mravenčí, levulová). Kyselina octová primárně vzniká hydrolyzou acetylových skupin hemicelulóz, zatímco kyselina mravenčí a levulová jsou produkty termochemické degradace polysacharidů. Nedisociované kyseliny vstupují do buněk difuzí přes buněčnou stěnu a následně disociují díky neutrálnímu pH prostředí cytosolu. Disociace kyselin může vést ke snížení intracelulárního pH, které vede k buněčné smrti. Deriváty furanu, furfural a hydroxymethylfurfural jsou produkovány dehydratací pentóz a hexóz (Chandel, 2011), (Jönsson, 2013).

K odstranění inhibitorů z hydrolyzátu lze využít celou řadu technik. V rámci aplikace fyzikálních metod je využívána evaporace nebo membránová separace. Evaporace je účinná metoda pro odstranění těkavých látek jako je kyselina octová a furany, účinnost zde může dosahovat až 100 % (Wilson, 1989). Membránovou separací lze odstranit kyselinu levulovou nebo octovou (Grzenia, 2010). Hydroxid sodný a vápenatý jsou nejčastěji využívanými zásadami pro neutralizaci případně eliminaci kyselin. Hojně rozšířené je také využití „over-liming“ procesu k odstranění těkavých látek. Hydroxid vápenatý reaguje s kyselinami přítomnými v lignocelulózovém hydrolyzátu, dochází k vysrážení síranu vápenatého. Nevýhodou této metody je možná reakce hydroxidu se sacharidy a snížení koncentrace fermentovatelných sacharidů v hydrolyzátu (Chandel, 2011), (Persson, 2002). Velice efektivní metodou detoxifikace hydrolyzáatů, je aplikace aktivního uhlí, pomocí kterého může být odstraněno velké množství inhibitorů. Nevýhodou je poměrně vysoká cena aktivního uhlí. Efektivita procesu se odvíjí od použité koncentrace aktivního uhlí, teploty a době celého procesu (Parawira, 2011). Pro detoxifikaci lze také využít biologických metod, kdy jsou použity mikroorganismy, respektive jejich enzymatické vybavení. Oproti výše uvedeným metodám je tento detoxifikační proces pomalý a díky přítomným mikroorganismům dochází ke ztrátě části fermentovatelných sacharidů, které jsou mikroorganismy využívány jako zdroj uhlíku (Parawira, 2011), (Chandel, 2013). *Ureibacillus thermosphaericus* nebo *Trichoderma reesei* jsou mikroorganismy, u kterých byla popsána schopnost degradace furfuralů (HMF), aromatických sloučenin, slabých kyselin (Parawira, 2011). Dalším možným přístupem k detoxifikaci, je adaptace mikroorganismů na látky nacházející se v lignocelulózovém hydrolyzátu. Mikroorganismus je vystavován vzrůstající koncentraci inhibitorů, až dojde k vytvoření mechanismu, pomocí kterého je buňka chráněna před působením inhibitoru. Mechanismus adaptace může být vytvořen změnou enzymatické specifity anebo fyziologie buňky. (Chandel, 2011), (Parawira, 2011), (Chandel, 2013).

Pro biotechnologickou produkci PHA byly využívány odpadní materiály pocházející především ze zemědělské biomasy – dřevo, rostlinná biomasa, kávová sedlina atd. (Tabulka 10).

Tabulka 10: Přehled produkce PHA na lignocelulózových substrátech (Obruca, 2015)

Produkční mikororganismus	Substrát	Typ PHA	Typ kultivace	PHA [g/l]
<i>Burkholderia cepacia</i>	xylóza	PHB	baňka, batch	1,6
<i>Pseudomonas strains</i>	rostlinná biomasa	mcl-PHA	baňka, batch	0,3
<i>Azotobacter beijerinickii</i>	kokosové výlisky	PHB	baňka, batch	2,4
<i>Burkholderia sacchari</i>	hydrolyzát pšeničné slámy	PHB	fermentor, Fed-batch	105,0
Recombinant <i>E. coli</i>		P(LA-co-3HB)	baňka, batch	3,6
<i>Burkholderia cepacia</i>	hydrolyzát dřeva	PHB	baňka, batch	n.d.*
<i>Ralstonia eutropha</i>	lignocelulózoý hydrolyzát	PHB	baňka, batch	6,3
<i>Bacillus firmus</i>	hydrolyzát rýžové slámy	PHB	baňka, batch	1,7
<i>Burkholderia cepacia</i>	hydrolyzát dřeva	P(3HB-co-3HV)	baňka, batch	2,0
Recombinant <i>E. coli</i>	hydrolyzát celulózy + propionát	P(3HB-co-3HV)	baňka, batch	2,1
<i>Bacillus megaterium</i>	odpad ze zpracování palmového	PHB	baňka, batch	12,5
<i>Burkholderia cepacia</i>	hydrolyzát dřeva	PHB	fermentor	8,7
<i>Sacharophagus degradans</i>	lignocelulózoý odpad z Agáve	PHA	baňka, batch	n.d.*
<i>Burkholderia cepacia</i>	lignocelulózoý hydrolyzát	PHB	baňka, batch	2,3
<i>Burkholderia sacchari</i>	lignocelulózoý hydrolyzát	PHB	baňka, batch	2,7
<i>Halomonas boliviensis</i>	pšeničné otruby + hydrolyzát bramborového odpadu	PHB	baňka, batch	4,0
<i>Ralstonia eutropha</i>	hydrolyzát vodního hyacintu	PHB	fermentor, batch	7,0
<i>Burkholderia sacchari</i>	xylóza	PHB	baňka, batch	3,2
<i>Burkholderia sacchari</i>	xylóza	PHB	baňka, batch	2,7
<i>Ralstonia eutropha</i>	enzymaticky hydrolyzovaná buničina	PHB	baňka, batch	2,8
<i>Sphingobium scionense</i>	enzymaticky hydrolyzované měkké dřevo	PHB	baňka, batch	0,4
<i>Burkholderia cepacia</i>	hydrolyzovaná kávová sedlina	P(3HB-co-3HV)	baňka, batch	3,1
<i>Brevundimona svesicularis</i>	hydrolyzované piliny	P(LA-co-3HB-co-HV)	baňka, batch	0,3
<i>Bacillus thuringiensis</i>	lignocelulózoý hydrolyzát	PHB	baňka, batch	4,2

* n.d. – koncentrace neuvedena

Produkce olejů a tuků z rostlinných a živočišných zdrojů byla v roce 2000 více než 3 milióny tun, z toho 75 % byly oleje pocházející z rostlin. Lipidické substráty jsou považovány za velmi slibné, z hlediska produkce PHA. β -oxidací je získán acetyl-CoA, který slouží jako výchozí molekula pro biosyntézu polyhydroxyalkanoátů. Další výhodou je relativně nízký obsah vody v lipidických materiálech a s tím související odolnost vůči mikrobiální kontaminaci. Mimo zpracování rostlinných olejů je možné použít pro kultivaci odpadní oleje, například z potravinářských výrob. Jedna z hlavních výhod využití odpadních olejů jako

substrátu pro produkci PHA je fakt, že odpadní oleje nezasahují, na rozdíl od surových rostlinných olejů a dalších především škrobnatých surovin, do potravního řetězce (Obruca, 2010).

Využití nacházejí oleje při produkci biodieslu, kdy dochází k transesterifikaci triacylglycerolů rostlinných olejů a živočišných tuků. V Evropě je nejrozšířeněji využívaným olejem pro produkci biopaliva slunečnicový olej sójový olej v USA, řepkový v Kanadě a palmový v Jihovýchodní Asii (Ciesielski, 2015). Odpadní oleje však nejsou pro produkci biodieslu optimální, především díky vysoké hodnotě peroxidového čísla a čísla kyselosti. Vysoký obsah volných mastných kyselin negativně ovlivňuje transesterifikační proces a dochází k produkci velkého množství vedlejších produktů, v rámci alkalicky katalyzované transesterifikace. Aplikací kyselých katalýz dojde v případě vysoké koncentrace volných mastných kyselin, ke zvýšení kinematické viskozity oleje, což vede k vyšší spotřebě energie při procesu esterifikace (Sharma, 2008), (Obruca, 2014a), (Meher, 2006).

Rostlinné oleje jsou díky svému komplexnímu složení triacylglycerolů vhodným substrátem pro PHA produkující mikroorganismy (Tabulka 11). Studie navíc prokázaly, že použití oleje jako substrátu zlepšuje výtěžnost procesu biosyntézy (Lee, 2008). Paradoxně bylo prokázáno, že pro produkci PHA, může mít použití značně znehodnoceného lipidického substrátu pozitivní efekt na akumulaci PHA. Tepelnou námahou oleje dojde k zvýšení koncentrace volných mastných kyselin, možná je také přítomnost proteinů, sacharidu, které se do oleje dostanou smažením potravin (Obruca, 2010). Volné mastné kyseliny jsou pro bakterie substrátem, který mohou lépe absorbovat a využít bez nutnosti enzymatické úpravy. Volné mastné kyseliny mohou navíc v médiu působit jako surfaktanty, z oleje se stává emulze a triacylglyceroly jsou přístupné lipázám. Negativní vlastnosti odpadních olejů pro produkci biodieslu jsou pozitivními ve smyslu produkce PHA (Ciesielski, 2015). Výtěžek PHB, kde byl jako substrát použit rostlinný olej, byl téměř dvojnásobný ve srovnání s produkcí na sacharidovém substrátu (Akiyama, 2003). Vedle rostlinných olejů lze pro produkci PHA použít také odpadní fritovací olej (Verlinden, 2011). Odpadní oleje mají tu výhodu, stejně jako některé zemědělské biomasy, že nedochází k interferenci s potravním řetězcem. Jedná se tedy o efektivní zpracování odpadního materiálu (Vactor, 2010). Káвовá sedlina obsahuje také relativně velké množství kávového oleje 11–20 %. Díky vysokému obsahu ligninu, polyfenolů a reziduí kofeinu je nemožné využít kávu na zkrmování dobytka. (Kwon, 2013). Olej obsažený z kávového odpadu však lze využít pro biosyntézu polyhydroxyalkanoátů (Obruca, 2014a).

Tabulka 11: Přehled produkce PHA na olejnatých substrátech

Produkční mikroorganismus	Substrát	PHA [g/l]	Reference
<i>C. necator H16</i>	sojový olej	95,7	(Kahar, 2004)
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	dávivec černý olej	n.d*	(Allen, 2010)
<i>C. necator H16</i>	kokosový olej	1,3	(Wong, 2012)
<i>Pseudomonas putida</i>	palmový jádrový olej	1,1	(Tan, 1997)
	olivový olej	1,5	
<i>Pseudomonas resinovorans</i>	slunečnicový olej	1,3	(Ashby, 1998)
	kokosový olej	1,9	
	sojový olej	1,3	
<i>C. necator H16</i>	odpadní kuchyňský olej	3,2	(Lee, 2008)
<i>C. necator</i>	odpadní palmový olej	4,4	(Rao, 2010)

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	odpadní kuchyňský olej	7,6	(Haba, 2007)
<i>Pseudomonas sp.</i>	odpadní řepkový olej	2,0	(Mozejko, 2014)
<i>C. necator</i>	kávový olej	10,0	(Obruca, 2014a)
<i>C. necator</i>	odpadní fritovací olej	1,2	(Verlinden, 2011)

* n.d. – koncentrace neuvedena

Syrovátka je odpadní produkt vznikající při výrobě sýra po vysrážení kaseinu a tuku z mléka. Při výrobě 1 kg sýru vzniká přibližně 9 kilogramů syrovátky. Složení syrovátky se odvíjí od typu mléka. Nejvíce zastoupenými je mléčný cukr laktóza (5 %), rozpustné proteiny (0,8 %), lipidy (0,5 %) a minerální soli - převážně NaCl a KCl (10 %). Minoritně jsou v syrovátce zastoupeny další složky, jako například kyselina mléčná (0,05 %), močovina, nebo vitamíny skupiny B (Siso, 1996), (Moulin, 1984). Syrovátka představuje relativně velký environmentální problém - jestliže není před vypuštěním do odpadních vod upravena, vykazuje chemickou spotřebu kyslíku v rozmezí od 60 000 do 80 000 ppm (Hadiyanto, 2014). Během posledních 50 let je syrovátka využívána pro různé biokonverze. Příkladem je biotechnologická produkce krmiv a bioplynu pomocí methanogenních bakterií anebo ethanolu prostřednictvím kvasinky *Kluyveromyces marxianus* využívající laktózu. Se stále se zvyšujícím zájmem o biopolymery, a to zejména o bioplasty, může být syrovátka velmi slibným odpadním substrátem pro mikrobiální produkci těchto materiálů. Bylo publikováno několik studií zabývajících se mikrobiální produkcí PHA, polysacharidů, ale také antimikrobiálních peptidů a enzymů (Mollea, 2013). Přehled publikací věnujících se produkci PHA, kdy jako substrát byla použita syrovátka, je uveden v Tabulka 12.

Objem vyprodukovaného odpadního glycerolu každým rokem stoupá, a to zejména díky stále se zvyšující produkci bionafty. V roce 2013 byly celosvětově vyprodukovány 2 miliony tun odpadního glycerolu jen z produkce bionafty, kdy na 10 kg bionafty připadá 1 kg odpadního glycerolu. Při výrobě bionafty vzniká odpadní glycerol po zásadité případně enzymatické deesterifikaci odpadních složek. Glycerol získaný touto cestou je silně alkalický (Kobayashi, 2015), (Manosak, 2011). Čistota glycerolu se v tomto případě pohybuje v rozmezí od 65–85 %, hlavními znečišťujícími složkami jsou mastné kyseliny, diglycerol nebo anorganické soli. Další způsob vzniku odpadního glycerolu je při rafinačním procesu palmového oleje. Glycerol získaný touto cestou obsahuje nečistoty v podobě neesterifikovaných mastných kyselin, např. palmitovou, olejovou, linolovou a stearovou kyselinu (Chee, 2010). I tento „odpadní“ glycerol je v posledních letech často zmiňován jako možná surovina pro řadu biotechnologických výrob včetně produkce PHA (Tabulka 12).

Tabulka 12: Přehled produkce PHA na vybraných odpadních substrátech

Ostatní odpadní substráty	Produkční mikroorganismus	PHA [g/l]	Reference
Syrovátka	<i>Pseudomonas hydrogenovora</i>	1,3	(Koller, 2008)
	<i>Methylobacterium</i>	3,91	(Nath, 2008)
	<i>Thermus thermophilus</i>	0,57	(Pantazaki, 2009)
	<i>Bacillus megaterium</i>	1,5	(Obruca, 2011)
	Směsná mikrobiální kultura	0,24	(Moita, 2014)
Glycerol	<i>E. coli</i>	0,6	(Phithakrotchanakoon, 2015)
	<i>C.necator</i>	38,1	(Cavalheiro, 2009)

1.5.3 Biodegradace PHA

Vlastnost odlišující PHA od klasických plastů pocházejících z ropy je především jejich biodegradabilita. PHA jsou biopolymery schopné rozkládat se v přirozených prostředích, průběh degradace je ovlivněn vnějšími faktory jako je mikrobiální aktivita, prostředí, vlhkost, teplota, pH nebo molekulová hmotnost polymeru. Polyhydroxyalkanoáty mohou být degradovány mikrobiálně činností enzymů a to jak intracelulárně, tak extracelulárně. V případě intracelulární degradace jsou při nedostatečném množství exogenního uhlíku produkčním bakteriálním kmenem exprimovány intracelulární depolymerázy, které hydrolyzují PHA uvnitř buňky. Za extracelulární degradaci jsou zodpovědné extracelulární depolymerázy produkované celou řadou mikroorganismů nacházejících se přirozeně v různých prostředích (půda, kompost, sladkovodní zdroje) za účelem utilizace PHA jako zdroje živin (Müller, 2005).

Velmi důležité je rozlišovat extra- a intracelulární degradace, a to především proto, že polyhydroxyalkanoáty přítomné v bakteriálních buňkách ve formě granulí a materiály nacházející se mimo buňky představují dva různé fyzikální stavy. Intracelulární PHA granulě s vysokou molekulovou hmotností (10^5 - 10^6 Da) mají amorfni charakter a jejich vnější granulová vrstva je pokryta fosfolipidovou vrstvou obsahující proteiny (Jendrossek, 2005). Fosfolipidová vrstva je poměrně citlivá na fyzikální a chemické namáhání, uvolněním PHA granulí z buněk do prostředí dochází (po desintegraci buněčné membrány) k denaturaci polymeru a přeměně jeho amorfni formy na krystalickou. Intracelulární depolymerázy nejsou schopny hydrolyzovat extracelulární PHA a opačně, což je způsobeno právě různým charakterem polymeru v přirozeném a denaturovaném stavu (Osswald, 2011), (Jendrossek, 2002).

Z doposud izolovaných a charakterizovaných extracelulárních depolymeráz většina vykazovala velmi podobné vlastnosti: i) vysokou stabilitu v širokém rozmezí pH, teploty a iontové síly; ii) relativně nízkou M_r (<70 kDa), přičemž převážná většina depolymeráz byla složena pouze z jednoho polypeptidu; iii) zásadité pH optimum (7,5 – 9,8); iv) mnoho testovaných depolymeráz má silnou afinitu k hydrofobním materiálům v) aktivita může být inhibována přítomností redukujících látek (DTT) (Jendrossek, 2002). PHA depolymerázy, které byly doposud testovány, jsou specifické pro estery 3-hydroxyalkanových kyselin nacházející se v přirozené (R)-konfiguraci (Osswald, 2011). PHA depolymerázy mají různou specifitu k jednotlivým polyhydroxyalkanoátům. Polymer samotný také ovlivňuje proces degradace v následujících směrech:

- a) *Stereoregularita PHA*: PHA depolymerázy hydrolyzují pouze esterové vazby v (R) konfiguraci
- b) *Krystalinita PHA*: PHA s vyšším stupněm krystalinity bude hůře degradovatelné
- c) *Molekulová hmotnost PHA*: polymer o nižší molekulové hmotnosti bude degradován rychleji, než polymer o větší molekulové hmotnosti
- d) *Monomerní složení PHA*: složení polymeru bude ovlivňovat degradační proces, čím víc komplexní materiál tím vyšší rezistence k degradaci (Osswald, 2011).

1.5.4 Izolace PHA

Polyhydroxyalkanoáty jsou syntetizovány jako intracelulární metabolit PHA produkujícími bakteriemi. Intracelulární PHA granule mají na svém povrchu vrstvu tvořenou řadou polypeptidů, které jsou specifické pro jejich syntézu a degradaci. Na povrchu granulí se nachází také fosfolipidová vrstva, která obsahuje výše zmíněné metabolicky významné proteiny (Jendrossek, 2009). Odhaduje se, že až 50 % z celkové ceny PHA může být tvořeno náklady, které jsou spojené s izolací a purifikací polymeru. Je proto nutné vyvinout efektivní metodu izolace a purifikace PHA z biomasy, tak aby byla výsledná cena co nejnižší a mohla konkurovat ceně tradičních polymerů pocházejících z ropy (López-Abelairas, 2015). Izolace produktu by měla být vysoce efektivní, ale také by měl být získán polymer o dostatečné čistotě. Dalšími parametry ovlivňujícími proces izolace jsou cena, toxicita chemikálií použitých při izolačním procesu a vliv izolačního postupu na výslednou kvalitu polymeru (Jambunathan, 2016).

Polymer může být z buněk získáván dvěma možnými cestami i) rozpuštění PHA vhodným rozpouštědlem, nebo ii) porušením buněčných stěn a uvolněním intracelulárních granulí PHA (Samorì, 2015). Extrakce rozpouštědly je momentálně nejrozšířenější metodou používanou pro izolaci PHA z buněk. Principem je rozpuštění PHA granulí a jejich následná precipitace. (Jambunathan, 2016). Halogenovaná rozpouštědla patří mezi nejběžněji využívaná rozpouštědla pro izolaci PHA v průmyslovém měřítku (López-Abelairas, 2015). Rozpustnost PHA je ovlivněna krystalinitou, složením polymeru a jeho molekulovou hmotností. Ve většině případů je nutné zařadit před samotnou izolační metodu také předúpravu biomasy v podobě sušení pro zlepšení efektivity izolačního procesu. Zbytková voda obsažená v biomase může negativně ovlivnit účinnost extrakčního procesu a snížit výslednou molární hmotnost PHA. Jako alternativu k odstranění vody sušením lze použít lyofilizaci. Po odstranění vody z biomasy je přidáno polární rozpouštědlo a odstraněny jsou také lipidické látky. Opakovaným rozpouštěním a srážením polymeru může být výrazně ovlivněna konečná čistota produktu (Koller, 2013a). Chloroform a dichlormethan jsou považovány za nejefektivnější rozpouštědla PHA. Na druhou stranu, díky jejich toxicitě pro člověka a životní prostředí nese jejich použití v průmyslovém měřítku mnoho rizik (Samorì, 2015). Použitím halogenovaných rozpouštědel mohou být extrahovány jak scl-, tak mlc-PHA s relativně dobrou účinností a o vysoké čistotě. Výše zmíněná rozpouštědla rozpouštějí mimo PHA granulí pouze lipidy pocházející z buněčných stěn, které mohou být snadno odstraněny před samotnou PHA extrakcí. Přidáním nízkomolekulového alkoholu (ethanol, methanol) po extrakci PHA, dochází k značnému snížení rozpustnosti PHA a následně k jeho precipitaci. Díky zdravotním a environmentálním rizikům spojeným s používáním halogenovaných rozpouštědel je snaha využívat rozpouštědla, která lze snadno recyklovat a která jsou relativně bezpečná pro okolní prostředí. Příkladem takových látek, které mohou být využity pro extrakci PHB je kyselina octová, n-methylpyrrolidon nebo tetrahydrofuran. V případě, že je při procesu extrakce aplikována zvýšená teplota a tlak, mohou být použity také C1 – C6 alkoholy (Koller, 2013a). Další možností extrakce PHA z biomasy je použití superkritické extrakce CO₂, která je považována za velmi vhodnou a bezpečnou metodu pro izolaci řady látek. Existují studie zkoumající možnost aplikace superkritické extrakce CO₂ pro izolaci PHA (Hejazi, 2003), (Khosravi-Darani, 2004). Samorì a spol. testoval nová rozpouštědla, dimethylkarbonát a laurát amonný, jako ekologické alternativy již výše zmíněných toxických rozpouštědel. Dimethylkarbonát (DMC) je acyklický alkylní karbonát průmyslově vyráběn katalytickou oxidativní karboxylací methanolu. DMC je látka málo toxická a plně

biodegradovatelná. Použitím tohoto ekologického rozpouštědla, bez nutnosti zařazení předúpravy biomasy, bylo izolováno PHA z buněk o vysoké koncentraci a čistotě. Termofyzikální charakteristika izolovaných polymerů zůstala díky použití nízké teploty během extrakce beze změn. Výsledná čistota polymeru je vysoká, nicméně průmyslovým aplikacím brání vysoká cena ekologických rozpouštědel (Samori, 2015).

V případě druhého přístupu, rozrušení buněčné stěny mikrobiálních producentů PHA, lze k tomuto účelu využít povrchově aktivních látek. Surfaktanty mohou být rozděleny do skupin dle nesoucího náboje i) aniontové (SDS), ii) kationtové (CTAB), iii) bez náboje (Tween 20 a Triton X-100). Výše zmíněné látky mohou být aplikovány na buněčnou suspenzi o vysoké hustotě (50-300 g/L). Výhodou je zisk nedegradovaného polymeru, značná nevýhoda této metody je produkce velkého množství znečištěné odpadní vody, kterou je nutno regenerovat. Často je také polymer izolován v nedostatečné čistotě a je nutno zařadit další purifikační kroky (Koller, 2013a), (Samori, 2015). Pro rozrušení buněčných stěn lze využít také enzymy, pomocí kterých lze narušit buňku a získat uvolněný polymer. Biomasa musí být nejprve podrobena tepelné předúpravě (např. expozici teplotě 150 °C), tak aby došlo k denuraci nukleových kyselin a iniciaci buněčné lyze. Následuje přidavek pepsinu, trypsinu a papainu, jejichž působením dojde k dezintegraci buněčných stěn. Aniontové povrchově aktivní látky rozpustí zbylou biomasu. Především díky finanční náročnosti procesu je tato metoda méně perspektivní, na druhou stranu jde o ekologickou cestu zisku PHA bez nutnosti použití chlorovaných rozpouštědel (Koller, 2013a). Další látkou, které je možno využít pro dezintegraci buněčných stěn je laurát amonný. Jedná se o karboxylovou kyselinu tvořenou dlouhým řetězcem, kterou lze zařadit mezi přepínatelné aniontové povrchově aktivní látky (SAS - switchable anionic surfactants). SAS je možno reverzibilně přeměnit změnou pH z neutrální formy, která není rozpustná ve vodě, na aniontovou ve vodě rozpustnou formu. Jako nejjednodušší a zároveň nejefektivnější metoda pro regulaci pH je přidavek/odstranění CO₂. Použitím laurátu amonného na buněčnou suspenzi byl získán vysoce čistý polymer, bez nutnosti zařazení kroku předúpravy biomasy. Pozitivní je také možnost regenerace až 98 % použitého surfaktantu. Nevýhodou je fyzikální změna polymeru zapříčiněná rozdílným pH prostředí během procesu izolace (Samori, 2015). Narušení buněčné stěny PHA produkujících mikroorganismů použitím chemických metod není jedinou možností, jak izolovat PHA z intracelulárního prostředí. Další možností je využití mechanických prostředků (vysokotlaká homogenizace, ultrazvuk nebo kulové mlýny). U halofilních producentů PHA (Kap.1.5.2.2) lze pro lyzi buněk využít změn osmotického tlaku prostředí. Po transferu buněk z prostředí o vysokém osmotickém tlaku do prostředí s velmi nízkým obsahem minerálů, dojde k narušení buněčné stěny v závislosti na vysokém intracelulárním tlaku buňky. Pro zvýšení čistoty polymeru může být aplikována povrchově aktivní látka SDS, díky které dojde k odstranění hydrofilních a lipofilních nečistot (Koller, 2013a).

Pro vybrané *in vivo* aplikace, je vyžadována velmi vysoká čistota polymeru, vzhledem k možné negativní reakci lidského organismu na nečistoty obsažené v produktu. Charakter nečistot a jejich množství, se odvíjí především od zvoleného mikrobiálního producenta, samotného procesu fermentace, a metod používaných pro downstream proces. V případě produkce PHA Gram-negativními producenty, může být výsledný izolát znečištěn endotoxiny, případně biologicky aktivními proteiny. Endotoxiny jsou teplotně odolné látky nacházející se na vnější straně buněčné stěny a mohou být zodpovědné za vznik zánětlivé reakce. Endotoxiny mohou být z polymeru odstraňovány peroxidem vodíku, ozonem, chlornanem sodným nebo hydroxidem sodným, případně opakovanou filtrací přes aktivní

uhlí, nicméně ani takovéto purifikační kroky často neumožňují získat produkt o čistotě, která by byla vhodná pro aplikace *in vivo* (Furrer, 2007), (Koller, 2013a).

1.5.5 Aplikace PHA

PHA mají díky biokompatibilitě a biodegradabilitě široké uplatnění v kosmetice, obalovém průmyslu, farmacii nebo medicíně. Tyto biopolymerní materiály byly například testovány pro přípravu scaffoldů pro tkáňové inženýrství, jak pro měkké, tak i tvrdé tkáně. PHA našlo uplatnění při enkapsulaci léčiv pro systémy cíleného transportu, ale také jako materiál vhodný pro přípravu medicínských zařízení (Osswald, 2011). V dnešní době je PHA produkováno několika významnými firmami po celém světě, Telles (USA); Biomer Biotechnology (Německo), PHA Industrial (Brazílie), Mitsubishi Gas Chemical (Japonsko), Kaneka (Japonsko), Biomatera (Itálie), Jiangsu Nantian Group (Čína), Tianan Biologic Material (Čína) a Lianyi Biotech (Čína), Bio-on (Itálie), Metabolix (USA), P&G Chemicals (USA/Japonsko), Telles LLC (USA) (Bugnicourt, 2014), (Kushwah, 2016). Jako první PHA byl průmyslově vyráběn polymer pod názvem „Biopol“. Biopol byl původně produkován firmou Imperial Chemical Industries, Velká Británie (1970). Výrobní patenty byly prodány firmě Zeneca, dále pak Monsanto, v současné době je Biopol vyráběn firmou Metabolic (USA). Biopol je kopolymer P(3HB-*co*-3HV) s bodem tání v rozmezí 140-180 °C. Využití má v řadě produktů, jako jsou obalové materiály, obaly na šampón, jednorázové nádoby, chirurgické nitě, tkané náplasti, nebo plenkové vložky. Dalším průmyslově vyráběným polyhydroxyalkanoátem je Nodax, jedná se o kopolymer PHA, skládající se z PHB a monomerů se střední délkou řetězce (3-hydroxyhexanoát, 3-hydroxyoktanoát a 3-hydroxydekanoát). Nodax byl vyvinut firmou Procter a Gamble. Na trhu je k dostání ve formě pěnových materiálů, netkaných textilií, filmů. Degra Pol je polyester-uretan, tvořený dvěma bloky polymeru, jehož fyzikálně-mechanické vlastnosti jsou odlišné od charakteristiky výsledného produktu. Jedná se o chemicky syntetizovaný polyhydroxybutyrát-diol a α , ω -dihydroxy-poly (D-kaprolakton-blok-diethyleneglykol-blok-D-kaprolakton) (Anjum, 2016).

Tabulka 13: Přehled aplikací polyhydroxyalkanoátů (Gumel, 2013)

Polymer	Forma	Aplikace
PCL/PHA blend	Scaffold	kardiovaskulární tkáňové inženýrství
P(3HB- <i>co</i> -3HHx)	Nanočástice	nosiče pro cytostatika
	Scaffoldy	regenerace tkáně očního víčka
P(3HB- <i>co</i> -3HVHx)	Scaffoldy	diferenciace lymfocytů
PHB/(RGD4C)	Nanočástice	léčba rakoviny prsu
PHB/45S5	Mikrosféra	tkáňové inženýrství
PHA	Koloidy	stabilizace stříbrných nanočástic
PHA methyl ester		aditivum do (bio)paliv
P(3HB- <i>co</i> -3HV)	Film	obalový materiál inhibitor růstu patogenních bakterií
PHB	Granule	
	mikro(nano)-částice	řízené uvolňování herbicidů
PHA	Granule	klížení papíru

Velký potenciál uplatnění PHA jsou především obalové materiály, a to jak v oblasti kosmetiky, tak pro balení potravin. Nahrazení tradičních skleněných a kovových obalových materiálů plastovými materiály je způsobeno především jejich lepšími materiálovými vlastnostmi a nízkou cenou. Tradiční plastové obalové materiály jsou produkty petrochemického průmyslu, jejich nevýhody spočívají především v obtížné rozložitelnosti (akumulaci) v přírodě a výrobě z neobnovitelných zdrojů – ropy. Recyklace plastových obalů je často ekonomicky nevýhodná a pro účely balení potravin nevhodná z důvodu možné kontaminace baleného produktu (Khosravi-Darani, 2015). Vysoké nároky na mechanickou odolnost a bariérové vlastnosti obalových materiálů jsou výzvou pro aplikaci biopolymerů v tomto odvětví. Ke splnění požadavků, které jsou kladeny na obalové materiály, je používána řada technik zlepšující vlastnosti biopolymerů jako obalového materiálu. Využívány jsou především chemické modifikace, aplikace plastifikátorů nebo tvorba blendů – smícháním dvou různých biopolymerů pro zlepšení výsledných vlastností materiálu. Kompostovatelné obaly jsou vhodné především pro potraviny s krátkou dobou trvanlivosti, kde při použití klasických/fosilních plastů dochází k hromadění velkého objemu odpadu. Příznivým faktorem, který nahrává použití PHA jako obalových materiálů pro potraviny, je vysoká odolnost vůči prostupu kyslíku, který přispívá k ochraně balené potraviny před oxidací. P(3HB-co-3HV) je možno v Evropě používat jako obalový materiál pro potraviny od roku 1996. Limitujícím faktorem používání PHA jako obalového materiálu je především jeho cena, která je pro potravinářský průmysl klíčová (Tang, 2012), (Bugnicourt, 2014), (Kabasci, 2014).

Díky horším mechanickým vlastnostem PHB (Kap.1.5.1) je snaha využívat kopolymery P(3HB-co-3HV), P(3HB-co-3HHx). Mechanické vlastnosti kopolymerů se odvíjí od jejich složení. V porovnání s PHB je komopolymer PHB s obsahem 3-hydroxyvalerátu méně tuhý a tvrdý, je tedy vhodnější pro aplikaci v podobě obalového materiálu. Výhodou je především nižší teplota tání kopolymeru a s tím lepší možnost zpracování. Se zvyšujícím se podílem 3HV se stává kopolymer tvrdším a pružnějším s nižší pevností v tahu (Khosravi-Darani, 2015). Použití plastifikátorů a nukleačních činidel obvykle vede ke snížení teploty skelného přechodu a nižší krystalinitě, díky tvorbě řady malých krystalů polymeru. Jako plastifikátory mohou být využity materiály přírodního původu, které jsou levné a lehce dostupné, jako je například glycerol a jeho deriváty, acetyltributylcitrát, estery kyseliny salicylové, sojový olej, triethyl citrát, mastné alkoholy, polyethylen glykol a další. Vytvořením blendu PHB s polyethylen glykolem (PEG400) je zvýšena hodnota prodloužení až čtyřnásobně, v porovnání s čistým PHB. Jako vhodná strategie úpravy PHA se zdá být tvorba PHA blendů s jinými polymery. PHB lze kombinovat s celou řadou polymerů, jako je poly(ethylen oxid), poly(vinyl acetát) nebo polykaprolakton. Velice zajímavá možnost, je využití esterifikované celulózy. Dřevěný prášek a lignin byly také využity jako plnivo pro přípravu PHA kompozitních materiálů (Kushwah, 2016). Jedním z nejvíce prostudovaných blendů je PHA/PLA. Chemická struktura a zpracovatelnost PHB a kopolymeru P(3HB-co-3HV) je velmi blízká PLA. Publikovány byly také možnosti přípravy blendů PHA s polysacharidy, celulóza, škrob a jejich deriváty. Zkoumány byly také vlastnosti lignin/PHB blendů a vliv ligninu na proces degradace (Anjum, 2016).

PHA fólie nacházejí uplatnění v zemědělství, jako biodegradabilní nosiče herbicidů a hnojiv (Vijayendra, 2014). Prudnikova a spol. představila ve své studii možnost inkorporace herbicidu Zellek Super do PHA, které sloužilo jako nosič. Polymerní nosič byl tvořen kopolymerem PHB s 10 % 3-hydroxyvalerátu, a vytvořeny byly dva nosné

systemy – mikrogranule a fólie. Aplikace herbicidu v podobě mikrogranulí a fólie byla prokázána jako efektivnější metoda, v porovnání s klasickým sprejováním půdy herbicidem (Prudnikova, 2013). Vlastnosti jako jsou hydrofilita/hydrofobicita, biokompatibilita, biodegradabilita, molekulová hmotnost, toxicita, povrchové vlastnosti, porozita a schopnost degradace jsou zásadní pro výběr polymeru, jako materiálu využívaného v medicíně (Masood, 2015). Biopolymery patřící do skupiny polyhydroxyalkanoátů, PHB, P(3HB-co-3HV), P(3HB-co-4HB), P(3HB-co-HHx) a P(3HB-co-3VHHx), jsou vhodnými materiály stimulující proliferaci buněk nebo tkání. Díky kompatibilitě PHB s krví lze tento biopolymer využít v aplikacích v oblasti medicíny. Monomer PHB je přirozeným metabolitem vyskytujícím se v krvi. Snadná absorpce monomerních jednotek 3-hydroxybutyrátu umožňuje využít PHB jako chirurgické implantáty, kryty pro lepší hojení ran nebo chirurgické nitě (Bugnicourt, 2014). Polymery využívané jako chirurgické nitě musí vykazovat mimořádnou pevnost v tahu, aby byly stehy pevné. Vlákná připravená z P4HB prokázaly větší pevnost, než vlákna vyrobená z polypropylenu. Také hodnota Youngova modulu pružnosti šicích vláken z P4HB je nižší než u ostatních šicích materiálů dostupných na trhu. Tepha (USA) vyrábí řadu produktů s využitím pro medicínské aplikace. Nejrozšířenějším produktem schváleným Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) je TephaFLEX® vyrobený z P4HB, sloužící pro chirurgické šití. Dalšími produkty Tepha jsou chirurgické síťky a filmy vyrobené z PHA (Brigham, 2012).

PHA jsou hydrofobní biokompatibilní polyestery, které mohou být zpracovány do fólií, porézních matic, mikro(nano)částic, nebo mikrosfér. Mikro- a nanočástice představují obrovský potenciál pro přepravu léčiv podávaných ať už intravenózně, podkožně nebo inhalačně. Také za tímto účelem byly testovány PHA materiály, a to zejména PHB, P(3HB-co-3HV), P(3HB-co-4HB). Uvolňování léků z PHA částic je tím rychlejší, čím více léčiva je v nosné matici obsaženo, tento fakt je pravděpodobně způsoben vyšší porozitou materiálu, způsobenou vyšším obsahem léčiva v matici. Chemické složení nosné matrice ovlivňuje výslednou strukturu nosiče a také kinetiku uvolňování. Hlavním principem regulace uvolňování léčiva je změna složení nosné matrice. Využívány jsou především PHA kopolymery, jejich blendy případně blendy s jinými biodegradovatelnými polymery (Nigmatullin, 2015). Jedna z novodobých atraktivních medicínských aplikací, kde mohou být využity PHA, jsou částice pro cílenou přepravu léčiv. PHA mikrosféry byly například použity pro přenos steroidů. PHB a jeho kopolymer obsahující 3-hydroxyvalerát byl testován na přenos progesteronu, jako modelového léčiva. Úspěšnost inkorporace progesteronu do mikrosfér přesahovala 80 %. (Shrivastav, 2013).

Další možná aplikace PHA je ve formě vláknenných materiálů. Využití nacházejí například jako filtrační nebo ochranné materiály, scaffoldy a senzory. Vlákná připravená elektrospinningem mají optimální vlastnosti pro využití v podobě scaffoldů a medicínských produktů, jakými mohou být krycí rány, bariérové membrány pro řízenou regeneraci tkáně. Velký potenciál vláken připravených elektrospinningem je také v tkáňovém inženýrství. Díky tomuto faktu se stává elektrospinning technikou, která je pro přípravu vláken využívaná stále častěji. Například, kopolymer P(3HB-co-3HV), (5 mol.% 3HV) byl zpracován elektrospinningem na vlákna, která sloužila jako nosič buněk. Vláknenné PHA materiály byly testovány jako nosiče fibroblastů a osteoblastů (Volova, 2013). Využitelný je také hydrolyzovaný PHA, vzniklé vysoce opticky čisté R konfigurované hydroxykyseliny, mohou být využity jako počáteční materiál pro syntézu dalších chemických látek (feromony, vitamíny, antibiotika). 3HB a jeho oligomery mají terapeutické účinky, podporují proliferaci

buněk (Koller, 2013b). Nejnovější výzkumy se zaměřují na možné využití methylesteru 3-hydroxybutyrátu při léčbě Alzheimerovy choroby (Zhang, 2013).

2 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Zaměřením práce je řízená biotechnologická produkce vybraných biopolymerů na bázi polyhydroxyalkanoátů, pullulanu, případně PMLA (poly-L-malic acid) a jejich potenciální aplikace. Cílem práce je regulace kultivačních podmínek za účelem cíleného ovlivnění složení a mechanických vlastností PHA. Další fáze práce je zaměřena na charakterizaci fyzikálně-chemických vlastností polymerů na bázi PHA a testování jejich stability v různých modelových fyziologických podmínkách. Jako aplikace byly testovány možnosti využití PHA k produkci biodegradabilních mikro- a nanočástic a hydrofobních vláken.

V průběhu dizertační práce byly řešeny následující dílčí kroky:

1) Zpracování literární rešerše

- biotechnologická produkce přírodních polymerů - PHA, pullulanu, PMLA
- vliv podmínek kultivace na složení a vlastnosti polymerů
- fyzikálně - chemické charakteristiky
- aplikace připravených polymerů

2) Vývoj a optimalizace metod zaměřených na:

- optimalizace a řízení kultivace mikrobiálních producentů PHA (*C.necator*) a pullulanu a PMLA (*A. pullulans*)

3) Aplikace mikrobiálních biopolymerů:

- dosažení optimálního výtěžku polymerů s charakteristickými vlastnostmi, optimalizace biotechnologického procesu
- příprava funkcionalizovaných částic a vláken, testování vlastností
- stabilita a biodegradabilita polymerů a aplikačních forem v modelových i reálných podmínkách.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité přístroje a chemikálie

3.1.1 Použité chemikálie

Standardy: Glukóza monohydrát, p.a., Lach-Ner, (CZE) Fruktóza, p.a., Lach-Ner, (CZE) Laktóza p.a., Lach-Ner, (CZE) Maltóza p.a., Lach-Ner, (CZE), Galaktóza Sigma Aldrich (DE), Manóza, Sigma Aldrich (DE), Kyselina L-jablečná, Sigma-Aldrich, (DE) Bovine serum albumin, Sigma-Aldrich, (DE) Pullulan, Sigma-Aldrich, (DE) P(3HB-co-3HV) (Sigma Aldrich, HV obsah 12 mol. %) (DE), benzoová kyselina Lach-Ner, (CZE), Katechin, Sigma-Aldrich (DE), Kyselina L-askorbová, Sigma-Aldrich (DE), Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (DE).

Média: Pepton, Himedia (IND), Nutrient Broth, Himedia (IND), Agar Powder, Himedia (IND), Síran amonný p.a., Lach-Ner (CZE), Síran hořečnatý heptahydrát p.a., Lachema (CZE), Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-Ner (CZE), Kvasničný autolyzát, Himedia (IND), Glukóza, Lach-Ner (CZE), Močovina, Lachema, (CZE), Chlorid draselný, Lach-Ner (CZE), Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, Lach-ner (CZE), Dusičnan amonný, Lach-Ner (CZE), Dusičnan sodný, Lach-Ner (CZE).

Chemikálie použité k hydrolýze: Kyselina octová 98%, Lach-Ner (CZE), Kyselina chlorovodíková 35%, Lach-Ner (CZE), Hydroxid sodný, Lach-Ner (CZE), Kyselina sírová 96%, Lach-Ner (CZE).

Enzymy: Viscozyme L cellulotic enzyme mixture, Sigma Aldrich (DE), Xylanáza z *Trichoderma viride* Sigma Aldrich (DE), Celulóza z *Trichoderma reesei* (Cellulast), Sigma Aldrich (DE), Proteáza z *Bacillus licheniformis*, Sigma Aldrich (DE).

Činidla: Fenol p.a., Lach-Ner, (CZE), Molybdenan amonný p.a., Mach Chemikálie, (CZE), Hydroxid sodný, Lach-Ner (CZE), Hydrogenuhlíčan sodný, Lach-Ner (CZE), Chlorid hlinitý, Lach-Ner (CZE), Peroxodisíran draselný, Sigma-Aldrich (DE), Síran měďnatý, pentahydrát, Lach-Ner (CZE), Trolox-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-dikarboxylová kyselina, Sigma-Aldrich (DE), Uhlíčan sodný bezvodý, Lach-Ner (CZE); Vinan sodno-draselný, Lach-Ner (CZE), 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonoová kyselina)-(ABTS), Folin-Ciocalteuovo činidlo, Penta (CZE), Hydrogenarseničnan sodný heptahydrát, 98%, Sigma-Aldrich (DE), Bicinchoninová kyselina, Sigma Aldrich (DE), 3,5-dinitrosalicylová kyselina, Sigma Aldrich (DE), Octan zinečnatý, Lach-Ner (CZE), Hexakvanoželeznatan draselný, Sigma Aldrich (CZE)

Ostatní: Chlorid sodný, Lach-Ner (CZE), Chloroform, VWR Chemicals BDH PROLABO (USA), Lecithin vaječný, Serva (DE), Methanol pro HPLC, VWR Chemicals BDH PROLABO (UK), n-hexan pro HPLC, VWR (USA), Ethanol pro UV-VIS, Lachema (CZE), Izopropylalkohol, Lach-Ner (CZE), Hydroxid vápenatý, p.a. Lach-ner (CZE).

Odpadní substráty:

Jablečné výlisky byly získány ze společnosti Obřanská moštárna, Brno-Obřany (CZE)

Pohankové otruby byly získány z podniku Pohankový mlýn Šmajstrla, Frenštát p. R (CZE)

Pšeničné otruby byly získány z: Evit, (CZE)

Odpadní glycerol byl získán z: VictoriaOil a.d., Šid (SRB)

Kávovalá sedlina byla získána z kávomatu umístěného na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně

Syrovátka byla získána z mlékárny Pribina, Příbyslav (CZE)

Kuřecí peří bylo získáno z podniku zpracovávajícího drůbež Rabbit, Štěpánov (CZE)

Odpadní fritovací olej byl získán z menzy na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně (CZE)

Další substráty:

Těstoviny (vaječné) Ideal Slovakia (SR)

Jablečná vláknina byla získána z: Provita, Frýdek-Místek (CZE)

3.1.2 Použité přístroje

ELISA ReaderBioTek ELx808Biotek (DE)

Nanofotometr, IMPLN (DE)

Spektrofotometr UV-VIS, Helios α – Unicam (UK)

Mikroskop Intraco Micro LM 666 PC/ ∞ 40x-1600x LED, Software Dino-Capture 2.0 (CZE)

Skenovací elektronový mikroskop JEOL JSM-7600F (USA)

Laminární box Aura mini Bioair Instruments, (UK)

Ultrazvukový homogenizátor Sonopuls HS3200, Bandeline (DE)

Ultrazvuková lázeň PS02000 (CZE)

Mikrocentrifuga Mikro 200 Hettich Zentrifugen (SRN)

Mikrocentrifuga Sartorius, Sigma (DE)

Centrifuga Laboratzentrifugen 3-15, Sigma (DE)

Centrifuga Boeco U-32R, Hettich Zentrifugen (DE)

Koloidní DLS analyzátor ZetaSizer Nano ZS, Malvern (UK)

Magnetická míchačka, Lavat (CZE)

Mikrovlnná trouba Samsung (CZE)

LUMiSizer – Dispersion analyzer – Lum (USA)

Vortex, TK3S, Kartell spa (USA)

Vortex, Genius 3, IKA Vortex (DE)

Analytické váhy, Boeco (DE)

Předvážky Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH (DE)

Předvážky Scout Pro, OHAUS (USA)

pH metrSENSODIRECT pH200, Lovibond (UK)

Fermentor Sartorius BIOSTAT B® plus 2L, 5L (DE)

Termostat IP 60, LTE Scientific, (Německo)
Temperovaná třepačka Heidolph Unimax 1010, Labicom (CZE)
Termostat Raven 2 Incubator (USA)
Termostat Memmert GmbH Co. KG (DE)
Vodní lázeň TW2, Julabo (DE)
Vodní lázeň W620E, LaboPlay (POL)
Vakuová odparka Werke RV06-ML: IKA (DE)
Sušárna – LS-35 (CZE)
Lyofilizátor – BenchTop 4K ZL, VirTis (USA)
Fermentor – Biostat B-plus, objem 5 L, Sartorius Stedim Biotech (DE)
Sestava HPLC/PDA/RI ThermoFisher Scientific (USA):
Programátor gradientu UltiMate 3000 Fotometrický detektor: UltiMate 3000 DAD,
Refraktometrický detektor: RefractoMax 520, Pumpa: LPG-3400SD, Vyhodnocovací software: Chromeleon 7
Sestava HPLC, Ecom spol. s.r.o. (CZE), Vysokotlaké čerpadlo LCP 4020 (Pumpa - Beta 10),
Dávkovací analytický ventil smyčkový C R54157, Termostat kolon LCO 101 43 (LCO 102 LONG), Vyhodnocovací software: Clarity
Kolony: Rezex Roa organic acid H⁺, 300 mm x 7,8 mm, zrnitost 8 µm, Phenomenex company, (USA); SUPELCOSIL LC-NH₂, 250 mm x 4,6 mm, zrnitost 5 µm, Supelco Analytical (Sigma Aldrich, SRN); Restek C18 Ultra Aqueous, 250 mm x 4.6 mm; zrnitost 5 µm; Restek corporation (USA); Zorbax Eclipse XDB C18, 250 mm x 4,6 mm; zrnitost 5 µm, Agilent technologies (USA).
Plynový chromatograf Trace 1300 GC Ultra FID detector, Finnigan (USA);
kolona Agilent J&W DB-WAX 30 m by 0,25 mm, Agilent Technologies (USA);
vyhodnocovací software: Thermo Software Xcalibur

Dále bylo pro práci využito běžné laboratorní sklo a vybavení.

3.2 Použité mikroorganismy

Mikroorganismy použité za účelem studia produkce extracelulárních polysacharidů a polymeru kyseliny jablečné:

Aureobasidium pullulans CCM 8182

Aureobasidium pullulans CCM F148

Mikroorganismy použité pro studium produkce PHA:

Cupriavidus necator H16 CCM 3726

Bacillus megaterium CCM 2037
Burkholderia cepacia CCM 2656

Mikroorganismy, které byly použity pro produkci biopolymerů, byly pořízeny v České sbírce mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

Mikroorganismy využitě pro studium produkce PHA depolymeráz:

Delftia acidovorans CCM 283
Aureobasidium pullulans CCM 8182, F148
Aureobasidium pullulan CCY 27-1-115 Zbierka kultúr a kvasiniek
Aspergillus fumigatus izolace na Fakultě chemické VUT v Brně

Mikroorganismy použité pro antimikrobiální test:

Echerichia coli CCM 7395
Candida glabrata CCM 8270
Micrococcus luteus CCM 1569

Mikroorganismy použité pro testování filtrační účinnosti vláknenných materiálů:

Bacillus subtilis CCM 2794
Echerichia coli CCM 7395
Micrococcus luteus CCM 1569
Saccharomyces cerevisiae CNCTC 6646, Česká národní sbírka typových kultur

3.3 Metody použité ke stanovení skupinových parametrů

3.3.1 Metody předúpravy substrátů

Pro produkci mikrobiálních polymerů pullulan, polymer kyseliny jablečné a PHA, bylo využíváno především odpadních substrátů, které sloužily jako zdroj uhlíku pro jednotlivé produkce. Pro zvýšení obsahu sacharidů v médiu, bylo nutno využít chemických a enzymatických hydrolyz.

3.3.1.1 Produkce pullulanu a polymeru kyseliny polyjablečné (PMLA)

Pro potřeby kyselé hydrolyzy níže uvedených materiálů, byla použita kyselina sírová 2 obj. %. Hydrolyza probíhala 15 minut/121 °C, výchozí koncentrace hydrolyzovaných materiálů byla 50 g/l. Po filtraci a upravení pH, byly hydrolyzáty použity pro produkci extracelulárních polymerů.

- Pšeničné otruby
- Pohankové otruby
- Jablečné výlisky
- Jablečná vláknina
- Těstoviny (vaječné)

3.3.1.2 Produkce PHA

○ Kávová sedlina

Po extrakci oleje z kávové sedliny byla kávová sedlina vysušena a podrobena hydrolyze. Hydrolyza kávové sedliny byla prováděna jak chemicky, tak enzymaticky, případně kombinací obou metod (Kap.4.1.2.1). Pro produkci PHA byla použita kávová sedlina, která

byla chemicky hydrolyzována kyselinou sírovou (2,5 obj. %), 121 °C/15 minut. Po upravení pH na hodnotu 4,5 bylo přidáno 0,5 obj. % celulózy (Cellulast), enzymatická hydrolyza probíhala při 50 °C po dobu 24 h. Po odstranění pevných složek a úpravě pH, byl hydrolyzát použit jako kultivační médium pro produkci PHA.

○ *Detoxifikace hydrolyzátu kávové sedliny*

K detoxifikaci hydrolyzátu kávové sedliny bylo použito aktivní uhlí, extrakce rozpouštědly a „overliming“. Rozpouštědla o příslušné koncentraci byla k hydrolyzátu kávové sedliny (SCGH) přidána v poměru 1:2, extrakce probíhala při teplotě 50 °C po dobu 2 h. Pro detoxifikaci SCGH metodou „overliming“ byl přidán hydroxid vápenatý tak, aby bylo dosaženo pH 10 a následně byl roztok neutralizován kyselinou sírovou. Nakonec byla vysrážena frakce odstraněna centrifugací. Aktivní uhlí bylo pro potřeby detoxifikace SCGH přidáno v poměru 1:20, detoxifikace probíhala vsádkově při teplotě 60 °C po dobu 1 h. Po filtraci a upravení pH byly detoxifikované hydrolyzáty použity pro produkci PHA (Kap.4.3.1.1).

• *Syrovátka*

Pro produkci pullulanu a PMLA byla syrovátka pouze zbavena nerozpustných proteinů centrifugací 8000 rpm/5 minut a po úpravě pH a doplnění minerálních solí použita jako médium pro kultivaci *A. pullulans*.

Za účelem produkce PHA s využitím syrovátky jako komplexního zdroje dusíku byl tento odpadní materiál hydrolyzován přídatkem 0,5 obj. % proteázy (*Bacillus licheniformis*). Enzymatická hydrolyza probíhala při teplotě 50 °C po dobu 24 h.

• *Kuřecí peří*

Peří bylo podrobena alkalické hydrolyze v kombinaci s mikrovlnným ohřevem. Vysušené peří bylo hydrolyzováno v přítomnosti 0,5 M NaOH. Celková doba mikrovlnného ohřevu (600 W) byla 10 minut s krokem 1 min/zapnuto 1 min/vypnuto. Po filtraci a neutralizaci mohl být hydrolyzát peří použit jako komplexní zdroj dusíku pro produkci PHA.

3.3.2 Celkové polyfenoly

Ke stanovení je využito Folin-Ciocalteuovo činidlo. Fenoly jsou oxidovány v zásaditém prostředí a v činidle přítomné molybdenany a wolframany jsou redukovány na směs modrých oxidů wolframu a molybdenanu. Vzniklé modré zbarvení je úměrné celkovému množství původně přítomných fenolických sloučenin, které je možno spektrofotometricky stanovit při 750 nm. Získané výsledky lze interpretovat jako množství celkových polyfenolů ve vzorku, případně jako ekvivalent kyseliny gallové (GAE, Gallic Acid Equivalent), protože kyselina gallová je zde použita jako standard (Singleton, 1965). Pro sestrojení kalibrační křivky byla připravena kalibrační řada kyseliny gallové od 0,1 do 0,7 mg/ml. Z naměřených hodnot byl následně sestrojen graf kalibrační závislosti, kde $A = 1,4402 \cdot c$ (mg/ml).

3.3.3 Flavonoidy

Chlorid hlinitý tvoří stabilní kyselé komplexy s C4 ketoskupinou a s C3 nebo C5 hydroxylovou skupinou flavonoidů, roztok tak získává oranžové zbarvení, které je měřeno spektrofotometricky při vlnové délce 510 nm (Chang, 2002). Koncentrace neznámého vzorku je poté vypočítána z rovnice z kalibračního grafu závislosti absorbance na koncentraci

standardu, kterým je katechin. Závislost absorbance na koncentraci byla v případě katechinu proměřena v intervalu od 0,05-0,3 mg/ml. Z naměřených hodnot byl následně sestrojen graf kalibrační závislosti, $A = 2,6250 \cdot c$ (mg/ml).

3.3.4 Celkové sacharidy dle Duboise

Pro stanovení celkového množství sacharidů se využívá jejich rozkladu v silně kyselém prostředí. Metoda je založena na dehydrataci sacharidů koncentrovanou kyselinou sírovou a následné kondenzaci vzniklých derivátů s reakčním činidlem (fenol) za vzniku barevných kondenzačních produktů, které lze stanovit spektrofotometricky (Čopíková, 1997). K 1 ml vzorku bylo přidáno 5 ml koncentrované kyseliny sírové a 1 ml před připraveného roztoku 5% fenolu. Zkumavky byly promíchány a 30 minut temperovány při laboratorní teplotě. Následně byla spektrofotometricky pro měřena absorbance při vlnové délce 490 nm. Závislost absorbance na koncentraci byla v případě glukózy proměřena v intervalu od 10 – 100 mg/l. Z naměřených hodnot byl následně sestrojen graf kalibrační závislosti ve tvaru $A=8,7032 \cdot c$ (mg/ml).

3.3.5 Redukující sacharidy

Metoda pro stanovení redukujících sacharidů využívající 3,5-dinitrosalicylovou (DNS) je založena na oxidaci aldehydu příslušného redukujícího sacharidu. Reakcí dochází k redukci DNS na 3-amino,5-nitrosalicylovou kyselinu (Miller, 1959). Do zkumavek bylo napipetováno 0,5 ml vzorku a 0,5 ml činidla (1 g 3,5-dinitrosalicylové kyseliny, 20 ml hydroxidu sodného o koncentraci 2 mol/l, 50 ml destilované vody, 30 g vinanu sodnodraselného). Poté byly vzorky zahřívány ve vodní lázni po dobu 10 minut při teplotě 70°C. Po vyjmutí z lázně byly vzorky temperovány na laboratorní teplotu. Následně bylo k vzorkům přidáno 10 ml destilované vody a pomocí spektrofotometru byly změřeny absorbance při vlnové délce $\lambda=540$ nm proti slepému vzorku. Závislost absorbance na koncentraci byla v případě glukózy proměřena v intervalu 0,5 – 4 mg/ml. Z naměřených hodnot byl následně sestrojen graf kalibrační závislosti $A=0,3085 \cdot c$ (mg/ml).

3.3.6 Celkové proteiny

3.3.6.1 Spektrofotometrické stanovení proteinů - metoda dle Hartree – Lowry

Jedná se o kolorimetrické stanovení, založené na dvousložkovém činidle. Metoda je založena na reakci měďnatých iontů s peptidovými vazbami. Spektrofotometrické stanovení se provádí při vlnové délce $\lambda = 650$ nm proti blanku (Lowry, 1951). Pro sestrojení kalibrační křivky byl použit roztok albuminu, z něhož byla připravena kalibrační řada o koncentraci 0,15 až 0,75 mg/ml. Rovnice kalibračních křivek: albumin $A=2,7992 \cdot c$ (mg/ml).

3.3.6.2 Bicinchoninová metoda

Metoda je založena reakci BCA činidla se vzorky při 50 °C. Nejprve dochází k redukci měďnatých iontů reakcí s peptidickými vazbami. Následně dojde k reakci bicinchoninové kyseliny s měďným iontem a vytvoření barevného komplexu. Změna absorbance je poté měřena při 562 nm proti slepému vzorku (Walker, 1994). Kalibrační řada albuminu byla připravena o koncentraci 125-2000 μ g/ml. Rovnice kalibrační křivky: $A=1,9058 \cdot c$ (mg/ml).

3.4 Analýza jednotlivých látek

3.4.1 Stanovení mono- a oligosacharidů metodou HPLC

Kvalitativní i kvantitativní analýza jednotlivých monosacharidů probíhala s využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie s refraktometrickým detektorem. Rezex-ROA organic acid H⁺ (8%) je chromatografická kolona určena pro analýzu organických kyselin a sacharidů. Jako mobilní fáze byla pro analýzu sacharidů použita 5 mM H₂SO₄. Teplota separace byla nastavena na 60 °C a průtok mobilní fáze 0,5 ml/min. Kvantifikace byla provedena pomocí externí kalibrace s využitím příslušných standardů, které byly rozpuštěny v mobilní fázi a analyzovány za stejných podmínek jako vzorky. Jednotlivé analýzy byly vyhodnocovány na základě získaných kalibračních kalibračních křivek v programu Chromeleon.

3.4.2 Stanovení profilu aminokyselin

Analýza zastoupení jednotlivých aminokyselin byla provedena po aplikaci kyselé hydrolyzy, 6 M HCl, 110 °C, 24 h. K analýze byl využit automatický analyzátor aminokyselin AAA 400, Ingos, analýza byla provedena ve spolupráci s Veterinární a farmaceutickou univerzitou v Brně.

3.4.3 Stanovení profilu mastných kyselin

Složení mastných kyselin v olejích bylo stanoveno plynovou chromatografií po převedení mastných kyselin na příslušné methylestery. Olej byl transesterifikován použitím methanolu na příslušné methylestery které byly analyzovány GC-FID (Trace GC Ultra, Thermo Scientific). Separace probíhala na koloně SLB-IL100 (Supelco) (60 m × 0.25 mm x 0,20 μm) (Obruca, 2013).

3.5 Kultivace mikroorganismů

3.5.1 Mikroorganismy produkující EPS, PMLA

Aureobasidium pullulans: Pro veškeré kmeny *A. pullulans* byly využity níže popsána média

Agarové plotny:

Médium obsahující agar bylo po sterilizaci (121 °C/15 minut) nalito na Petriho misky. Na tuhé agarové plotny byl následně křížovým roztěrem rozočkován příslušný kmen, po 48 hodinách temperace při 30 °C v termostatu byly agarové plotny uchovávány při teplotě 4 °C v lednici.

Kvasničný autolyzát	10 g/l
Pepton	20 g/l
Glukóza	20 g/l
Agar	15 g/l

Inokulum:

Do sterilního inokulačního média byla přidána kultura z agarové plotny. Kultivace probíhala při teplotě 30 °C, 180 rpm, 24 h.

Kvasničný autolyzát	10 g/l
Pepton	20 g/l
Glukóza	20 g/l

Minerální médium:

Produkční minerální médium bylo zaočkováno 10 % 24 hodinového inokula příslušného mikroorganismu. Produkce probíhala při pH 6, 30 °C, 180 rpm, 96 hodin.

NaNO ₃	2,0 g/l
KH ₂ PO ₄	0,1 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g/l
KCl	0,5 g/l
Glukóza	80 g/l

3.5.2 PHA produkující mikroorganismy

Agarové plotny:

Veškeré níže uvedené bakteriální kmeny byly uchovávány na agarových plotnách jejichž složení je uvedeno níže. Médium obsahující agar bylo po sterilizaci (121 °C/15 minut) nalito na Petriho misky. Na tuhé agarové plotny byl následně křížovým roztěrem rozočkován příslušný kmen, po 48 hodinách temperace při 30 °C v termostatu byly agarové plotny uchovány při teplotě 4 °C.

Nutrien Broth (NB)	25 g/l
Agar	15 g/l

Inokulum:

Inokulum bylo po všechny níže uvedené bakteriální kmeny připraveno následujícím způsobem. Do sterilního inokulačního média byla přidána kultura z agarové plotny, Kultivace probíhala při teplotě 30 °C, 180 rpm, 24 h.

Nutrient Broth	25 g/l
----------------	--------

Cupriavidus necator H16, *Bacillus megaterium*

Minerální médium:

Produkční minerální médium bylo zaočkováno 10 % 24 hodinového inokula příslušného mikroorganismu. Produkce probíhala při pH 7, 30 °C, 180 rpm.

KH ₂ PO ₄	1,02 g/l
Na ₂ HPO ₄	11,1 g/l
MgSO ₄	0,2 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,02 g/l
Fruktóza	20 g/l

V případě *C. necator* byl jako zdroj uhlíku kromě fruktózy použit olej 20 g/l, pokud není uvedeno jinak.

MES (roztok stopových prvků) 1 ml/l

FeCl ₃	9,7 g
CaCl ₂	7,8 g

CuSO ₄	0,156 g
CoCl ₂	0,119 g
NiCl ₂	0,118 g
CrCl ₂	0,062 g

0,1 M HCl 1000 ml

Burkholderia cepacia

Minerální médium:

Produkční minerální médium bylo zaočkováno 10 % 24 hodinového inokula příslušného mikroorganismu. Produkce probíhala při pH 7, 30 °C, 180 rpm.

(NH ₄) ₂ SO ₄	0,75 g/l
KH ₂ PO ₄	1,5 g/l
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	9,082 g/l
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2 g/l
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,1 g/l
NH ₄ -Fe(III) citrát	0,06 g/l
Glukóza	20,0 g/l

Roztok stopových prvků 1 ml/l:

ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,1 g/l
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	0,03 g/l
H ₃ BO ₃	0,3 g/l
CoCl ₂	0,2 g/l
CuSO ₄ · 7 H ₂ O	0,02 g/l
NiCl ₂ · 6 H ₂ O	0,02 g/l
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,03 g/l

Mikroorganismy použité pro degradaci PHA

Delftia acidovorans

Minerální médium:

Produkční minerální médium bylo zaočkováno 10 % 24 hodinového inokula příslušného mikroorganismu. Produkce probíhala při teplotě 30 °C, 180 rpm.

KH ₂ PO ₄	4,6 g/l
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	11,6 g/l
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 g/l
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	0,1 g/l
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,05 g/l
NH ₄ Cl	1,0 g/l

Aspergillus fumigatus

Minerální médium:

Produkční minerální médium bylo zaočkováno 10 % 24 hodinového inokula příslušného mikroorganismu. Produkce probíhala při teplotě 30 °C, 180 rpm.

NaNO ₃	2,0 g/l
KH ₂ PO ₄	0,1 g/l

MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,1 g/l
KCl	0,5 g/l

Mikroorganismy použité pro antimikrobiální test

Mikroorganismy, které byly použity pro antimikrobiální test byly z agarových ploten převedeny do níže uvedených sterilních médií. Kultivace probíhala po dobu 24 h při 37 °C.

Echerichia coli, Micrococcus luteus

Hovězí extrakt	10 g/l
Pepton	10 g/l
NaCl	5 g/l

Candida glabrata

Kvasničný autolyzát	10 g/l
Pepton	20 g/l
Glukóza	20 g/l

Mikroorganismy použité pro filtraci

Mikroorganismy použité pro účely filtrace byly z agarových ploten převedeny do níže popsanych sterilních médií. Kultivace probíhala po dobu 32 hodin při teplotě optimální pro daný mikroorganismus.

Saccharomyces cerevisiae (30 °C)

Kvasničný autolyzát	10 g/l
Pepton	20 g/l
Glukóza	20 g/l

Echerichia coli (37 °C)

Kvasničný autolyzát	10 g/l
Trypton	10 g/l
NaCl	5 g/l

Bacillus subtilis, Micrococcus luteus (30 °C)

Hovězí extrakt	10 g/l
Pepton	10 g/l
NaCl	5 g/l

3.6 Metody analýzy mikrobiálních produktů

3.6.1 Analýza extracelulárních polymerů

3.6.1.1 Gravimetrické stanovení biomasy

Produkční médium po kultivaci bylo centrifugováno 10000 rpm/8 minut. Po oddělení supernatantu byla biomasa promyta destilovanou vodou. Získána biomasa byla sušena do

konstantní hmotnosti při teplotě 80 °C. Následně byla gravimetricky stanovena koncentrace biomasy.

3.6.1.2 Extrakce a úprava extracelulárních polymerů

Polymer kyseliny jablečné a pullulan, jako extracelulární metabolity, byly z média vysráženy studeným ethanolem, který byl smíchán se supernatantem získaným centrifugací produkčního média po 96 h kultivace (8000 rpm/10 minut) v poměru 2:1. Sraženina byla po 20 minutách inkubace při 4 °C centrifugována (8000 rpm/10 minut) a po vysušení do konstantní hmotnosti (70 °C) gravimetricky stanovena koncentrace extracelulárních polymerů.

Monomer pullulanu – glukóza a PMLA – kyselina jablečná byly získány kyselou hydrolyzou supernatantu. Pro tento účel byla využita kyselina sírová (2 M), která byla k supernatantu přidána v poměru 1:1, hydrolyza probíhala při teplotě 90 °C po dobu 12 hodin. U takto připraveného vzorku byl analyzován obsah glukózy a kyseliny jablečné použitím HPLC.

3.6.1.3 Stanovení celkových a redukujících sacharidů

Metody stanovení jsou uvedeny v kapitole 3.3.4 a 3.3.5.

3.6.1.4 Stanovení glukózy HPLC/RI

Hydrolyzovaný supernatant byl zcentrifugován a zfiltrován a po příslušném zředění byl použit pro stanovení koncentrace glukózy ve vzorku (Kap.3.4.1).

3.6.1.5 Stanovení kyseliny jablečné HPLC/UV-VIS

Hydrolyzovaný supernatant byl zcentrifugován a zfiltrován a po příslušném zředění byl použit pro stanovení koncentrace kyseliny jablečné ve vzorku (Kap.3.4.1). Kyselina jablečná byla detekována na UV/VIS detektoru, při vlnové délce 210 nm.

3.6.2 Analýza polyhydroxyalkanoátů

3.6.2.1 Gravimetrické stanovení biomasy

Produkční médium po kultivaci bylo centrifugováno 10000 rpm/8 minut. Po oddělení supernatantu byla biomasa promyta, v případě cukerných substrátů destilovanou vodou, jestliže byl použit olej, pro promytí byl použit 5% roztok Tritonu X-100. Získána biomasa byla sušena do konstantní hmotnosti při teplotě 80 °C.

3.6.2.2 Analýza polyhydroxyalkanoátů GC/FID

Standard o příslušné koncentraci byl rozpuštěn v chloroformu při teplotě 70 °C po dobu 20 minut, aby došlo k rozpuštění granulátu. Z rozpuštěného standardu byla připravena kalibrační řada. V případě reálného vzorku bylo do vialek naváženo přibližně přesně 10 mg suché biomasy. K vzorkům byl přidán 1 ml chloroformu a 0,8 ml 15% kyseliny sírové v methanolu s interním standardem kyselinou benzoovou. Vialky byly uzavřeny a vloženy do termostatu, kde proběhla esterifikace při teplotě 100 °C po dobu 3 hodiny. Po ochlazení a odstranění nečistot 0,05 M NaOH, byly vzorky vhodně naředěny chloroformem. U takto připravených vzorků mohl být analyzován obsah PHA plynovou chromatografií s FID detektorem.

3.7 Příprava a charakterizace částic

3.7.1 Příprava lipozomů (s PHB)

Lipozomy s přídavkem nebo bez přídavku PHB byly připraveny ze směsi fosfolipidů (lecithinu 90 mg a cholesterolu 10 mg) metodou ultrasonifikace použitím ultrazvukového homogenizátoru. Postup přípravy lipozomů byl shodný s přípravou PHB částic, použité množství chloroformu bylo 1 ml. V případě přípravy lipozomů s PHB byl ke směsi fosfolipidů přidán PHB, tak aby jeho zastoupení ve směsi představovalo 10 %.

3.7.2 Příprava PHB částic

Připravený 1 ml 2% roztoku PHB v chloroformu byl nejprve přidán k 10 ml destilované vody a následně po dobu několika minut ultrazvukován pomocí ultrazvukového homogenizátoru do vzniku emulze. Na závěr byl z emulze na magnetické míchačce při 50 °C odpařen chloroform za vzniku PHB částic.

3.7.3 Charakterizace částic z hlediska stability a velikosti

Velikost částic různě připravených vzorků byla stanovena na přístroji Zetasizer Nanoseries, který využívá dynamického rozptylu světla. Měří se zde časová závislost kolísání intenzity rozptýleného světla dané Brownovým pohybem částic. Analýza intenzity rozptýleného světla umožňuje určit difúzní koeficient částic a vypočítat distribuci velikosti částic v daném vzorku. Připravené částice byly vhodně zředěny Mili-Q vodou a analyzovány. Měření zeta potenciálu bylo provedeno rovněž na přístroji Zetasizer Nanoseries. Měření je založeno na technice „Laser Doppler Velocimetry“, tedy na tom, jak rychle se pohybují částice v kapalině za působení elektrického pole. Zeta potenciál je rozdíl potenciálů na pohybovém rozhraní, který se ustavuje při relativním pohybu tuhé fáze s elektrickou dvojrivrstvou vůči roztoku. Znaménko je opačné než znaménko iontů vnější vrstvy elektrické dvojrivrstvy. Čím větší náboj částice nese, tím je stabilnější. Vzorky byly opět vhodně zředěny a proměřeny (Matoušková, 2015).

3.7.4 Stanovení antioxidační aktivity

Ke stanovení antioxidační aktivity byla v této práci použita metoda využívající ABTS⁺⁺ (Re, 1999). Tato metoda patří mezi základní pro stanovení antioxidační kapacity. Kalibrační křivka byla sestavena pro standardní roztok Troloxu rozpuštěném v 60% ethanolu. Rozmezí koncentrací bylo 50-400 ng/ml. Do rovnice byla dosazována hodnota ΔA ($A_0 - A_{10}$). Hodnota antioxidační aktivity byla vyjádřena jako hodnota antioxidační aktivity vzorku ve stejné míře, jako by vzorek obsahoval dané množství Troloxu. Rovnice kalibrační křivky: $A = 1,389 \cdot 10^{-3} \cdot c$ ($\mu\text{g/ml}$).

3.7.5 Stanovení antimikrobiální aktivity

Při této metodě byl měřením zákalu sledován růst mikroorganismu na mikrotitrační destičce. K objemu 150 μl suspenze buněk v médiu bylo pipetováno 50 μl antimikrobiální látky. Jako blank byla použita kultura s přídavkem 50 μl vody, případně jiného použitého rozpouštědla. Růst byl sledován v čase 0, 3 a 24 hodin.

3.8 Příprava PHB filtračních materiálů

3.8.1 Filtrační PHB vlákna

PHB (2 g) o molární hmotnosti přibližně 200 kDa byl rozpuštěn za intenzivního míchání při 60 °C ve 100 ml chloroformu. Do vzniklého viskózního roztoku bylo přidáno aktivní uhlí, případně oxidy kovů, o středním průměru částic 7 μm a směs byla intenzivně míchána až do vzniku rovnoměrně rozdispergované heterogenní směsi. Následně byl roztok zkoncentrován na 5 hm. % obsah polyhydroxybutyrátu. Směs byla přikapávána injekční stříkačkou na rotující disk o rychlosti 20000 otáček za minutu. Vzniklá vlákna byla sbírána záchytným kotoučem o průměru 30 cm a výšce 10 cm postaveném kolem disku.

3.8.2 Stanovení filtrační účinnosti

Průtoková cytometrie je technika, pomocí níž lze analyzovat fyzikální charakteristiky jednotlivých částic (buněk). V průběhu měření jsou buňky unášeny proudem nosné kapaliny (voda), kdy dochází k „seřazení“ buněk v systému tak, aby každá jednotlivá buňka procházela optickou částí, kde je osvětlena zdrojem světla. Rozptyl světla a případná fluorescence, emitována buňkou při excitaci zdrojem, jsou zaznamenány. Analýza je založena na relativní velikosti buněk, granulitě, a případné intenzitě fluorescence. Cytometrie je řazena mezi nejcitlivější metody pro stanovení počtu a charakteristik buněk (Givan, 1992). Průtoková cytometrie byla využita ke kvantifikaci buněk v permeátů, počet buněk byl odečten pomocí ROI (region of interest) v scategramu.

3.9 Studium degradačních procesů PHA

3.9.1 Příprava PHB materiálů za účelem testování degradace

3.9.1.1 PHB fólie

PHB prášek byl rozpuštěn v chloroformu a ponechán ve vodní lázni při 60 °C do úplného rozpuštění PHB. Fólie byly připraveny evaporací chloroformu za použití Petriho misek při laboratorní teplotě. Po úplném odpaření rozpouštědla byly fólie zváženy a použity k testování enzymové aktivity PHA depolymeráz.

Tvrzená fólie byla připravena metodou extruze na Ústavu chemie materiálů Fakulty chemické VUT v Brně. Jako vstupní surovina posloužil PHB materiál naprodukovaný bakteriální kulturou *Cupriavidus necator* H16 s využitím odpadního fritovacího oleje jako substrátu.

3.9.1.2 PUR-PHB

Polyuretan s parciálním obsahem PHB byl připraven pracovníky Ústavu chemie materiálů Fakulty chemické VUT v Brně. Jednalo se o polyuretan, kdy část polyesterového polyolu byla nahrazena PHB. Detailní popis syntézy materiálů a stejně tak i jejich mechanických vlastností je shrnut v publikaci (Vojtová, 2012).

3.9.2 Testování depolymerázové aktivity

Jako substrát byly pro účely testování depolymerázové aktivity použity krystalické PHB granule a depolymerázová aktivity byla monitorována měřením absorbance suspenze PHB. Reakce probíhala v prostředí 50 mM fosfátového pufru o příslušném pH. Roztok se substrátem, byl připraven smícháním Tris-HCl pufru a PHB prášku tak, aby koncentrace PHB v roztoku činila 0,4 mg/ml. Tento roztok byl sonifikován po dobu 1 minuty. Připravené roztoky byly pipetovány na mikrotitrační destičku v poměru 3:1 (substrát:enzymu). Přidavkem enzymu byla započata reakce a odečtená hodnota absorbance, měřená při vlnové délce 630 nm, byla brána jako počáteční. Časový interval měření absorbance byl 5 minut. Celkový čas měření byl 1 hodina (Scherer, 1999).

3.9.3 Stanovení molekulové hmotnosti

Navážka PHB materiálu se pohybovaly v rozmezí 3-5 mg/ml chloroformu. Vzorky byly rozpouštěny při teplotě 60 °C pod dobu 12 h. Molekulová hmotnost byla stanovena ve spolupráci s Ústavem chemie a technologie ochrany životního prostředí Fakulty chemické VUT v Brně, pomocí gelové permeační chromatografie na přístroji Agilent 1100 Series s využitím chromatografické kolony PL gel Mixed B (300 x 7.5 mm; 10 µm) (Obruca, 2010).

3.9.4 Standardní kompostovací test

U materiálů obsahující PHB byla testována biodegradabilita normovaným kompostovacím testem IS/ISO 20200. Test zaměřený na dezintegraci materiálu probíhal při termofilních podmínkách 58°C. Vzorky byly vystaveny umělému kompostu po dobu potřebnou k rozložení materiálu (ISO 20200:2004(E), 2004).

Tabulka 14: Složení umělého kompostu pro test IS/ISO 20200

Materiál	Obsah [hm. %]
Piliny	40
Králičí krmivo	30
Čerstvý kompost	10
Kukuřičný škrob	10
Sacharóza	5
Kukuřičný olej	4
Močovina	1

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Charakterizace substrátů použitých pro produkci biopolymerů

4.1.1 Substráty pro produkci PMLA a pullulanu

K produkci polymeru kyseliny jablečné a pullulanu pomocí *A. pullulans* byla testována řada potencionálních substrátů. Kultivace ve všech případech proběhly s využitím jak neupravených, tak kyselou hydrolyzou upravených substrátů. Výchozí koncentrace substrátů byla 50 g/l. V prvním případě byl materiál vystaven pouze sterilizačním podmínkám (121 °C/15 min) ve druhém případě byla k úpravě zvolena kyselá hydrolyza kyselinou sírovou (2 obj. %), v kombinaci s tepelnou úpravou 121 °C/15 minut. Po odstranění pevných podílů z hydrolyzátu bylo pH upraveno na hodnotu 7 a takto připravený hydrolyzáat byl použit pro kultivaci *A. pullulans*. Připravená média byla charakterizována především z hlediska obsahu sacharidů (Tabulka 15). Analyzován byl obsah celkových sacharidů, redukujících sacharidů a glukózy a to jak u hydrolyzovaných tak neupravených materiálů.

Tabulka 15: Charakterizace médií (50 g/l substrátu) použitých pro kultivaci *A. pullulans*

Substrát	Redukující sacharidy		Celkové sacharidy		Glukóza	
	$c_{\text{předH}}$ [g/l]	c_{poH} [g/l]	$c_{\text{předH}}$ [g/l]	c_{poH} [g/l]	$c_{\text{předH}}$ [g/l]	c_{poH} [g/l]
Těstoviny	1,38 ± 0,04	14,55 ± 0,08	2,16 ± 0,04	17,70 ± 0,26	0,99 ± 0,01	15,42 ± 0,35
Těstoviny vaječné	8,41 ± 0,01	20,00 ± 0,09	9,31 ± 0,08	22,56 ± 1,25	6,83 ± 0,32	20,90 ± 1,24
Jablečná vláknina	3,35 ± 0,05	14,42 ± 0,14	9,20 ± 0,06	28,05 ± 2,56	0,17 ± 0,01	3,51 ± 0,34
Jablečné výlisky	4,45 ± 0,06	7,05 ± 0,05	11,84 ± 0,02	32,16 ± 1,24	<i>n.d.</i>	3,73 ± 0,08
Pšeničné otruby	0,72 ± 0,01	5,20 ± 0,09	4,45 ± 0,07	7,41 ± 0,86	0,65 ± 0,02	3,81 ± 0,68
Pohankové otruby	9,38 ± 0,12	22,16 ± 0,15	10,69 ± 0,14	33,56 ± 4,52	7,24 ± 0,13	13,46 ± 1,02

n.d. – nebyla detekována

$c_{\text{předH}}$ – koncentrace před hydrolyzou

c_{poH} – koncentrace po hydrolyze.

Nejvyšší koncentrace celkových sacharidů před kyselou hydrolyzou byla zjištěna u jablečných výlisků a pohankových otrub, což také korespondovalo s hodnotami celkových sacharidů, které byly získány po kyselé hydrolyze. Poměrně velký nárůst koncentrace celkových sacharidů po aplikaci kyselé hydrolyzy byl zaznamenán u obou druhů těstovin a jablečné vlákniny. Z hlediska obsahu sacharidů byly nejnižší koncentrace, jak před hydrolyzou, tak po jejím působení, naměřeny u vzorků pšeničných otrub.

Vaječné těstoviny a pohankové otruby měly nejvyšší obsah redukujících sacharidů před i po kyselé hydrolyze. Poměrně vysoká účinnost hydrolyzy, z hlediska zisku redukujících sacharidů, byla zaznamenána u vzorků bezvaječných těstovin a jablečné vlákniny.

Ve standardním minerálním médiu, které je používáno pro kultivaci *A. pullulans* (Kap.3.5.1), je jako zdroj uhlíku použita glukóza. Pro porovnání obsahu tohoto sacharidu,

s obsahem v jednotlivých hydrolyzátech, byla analyzována koncentrace glukózy u jednotlivých roztoků médií připravených z výše uvedených substrátů. Nejvyšší koncentrace glukózy před hydrolyzou byla detekována u vaječných těstovin (6,83 g/l) a u pohankových otrub (7,26 g/l). Po aplikaci kyselé hydrolyzy došlo ke zvýšení koncentrace glukózy v případě vaječných těstovin až na 20,9 g/l. Nejvyšší nárůst koncentrace glukózy po kyselé hydrolyze byl zaznamenán u bezvaječných těstovin, koncentrace v tomto případě vzrostla o 14 g/l.

Z hlediska produkce pullulanu a polymeru kyseliny jablečné, kdy *A. pullulans* využívá sacharidy, především glukózu, jako zdroj uhlíku, jsou nejvhodnějším substráty vzhledem k obsahu sacharidů pohankové otruby a těstoviny.

Dále byla pro produkci pullulanu a polyjablečné kyseliny použita syrovátka, jejíž parametry jsou specifikovány v (Kap.4.1.4).

4.1.2 Kávová sedlina, jako substrát pro produkci PHA

Káva je pěstována ve více než 80 zemích světa a patří mezi jeden z vůbec nejoblíbenějších nápojů. Díky čím dál vyšší poptávce, vzrostla celosvětová produkce kávy v letech 2000–2012 o téměř 17 %. Při přípravě kávy vzniká řada odpadních materiálů, přičemž kávová sedlina tvoří největší podíl. Kávová sedlina je odpad generovaný při přípravě kávy v relativně velkém množství, což může především pro producenty rozpustných káv představovat problém. Velké množství pevného kávového odpadu musí být zpracováno v souladu s platnou legislativou. Jedna z největších potravinářských firem Nestlé se zavázala do roku 2020 významně snížit celkový objem vyprodukovaného odpadu. Jeden z pilotních projektů je zaměřen na využití kávové sedliny k produkci energie pro více než 20 závodů Nestlé.

Kávová sedlina obsahuje velké množství organických sloučenin jako jsou mastné kyseliny, lignin, hemicelulózu, celulózu, aminokyseliny, polyfenoly a minerály, které mohou být využity pro získání produktů v konceptu bioafinerie (Campos-Vega, 2015).

Pro účely produkce PHA byl jako substrát použit hydrolyzát kávové sedliny (SCGH – „spent coffee ground hydrolysate“). Testovány byly různé koncentrace kávové sedliny, optimalizován byl také proces hydrolyzy v závislosti na výtěžku zkvasitelných sacharidů a obsahu toxických vedlejších produktů hydrolyzy (polyfenolické látky, furfuraly, alifatické kyseliny). K odstranění potenciálních inhibitorů růstu mikroorganismů byla aplikována řada detoxifikačních metod.

4.1.2.1 Optimalizace procesu hydrolyzy kávové sedliny

Pro proces hydrolyzy byla zvolena výchozí koncentrace kávové sedliny 50 g/l. Testována byla z hlediska výtěžnosti redukujících sacharidů hydrolyza kyselá, zásaditá, enzymatická, ale také jejich kombinace. Zkoumán byl také vliv použití ultrazvukového homogenizátoru na průběh hydrolyzy ve smyslu výtěžku sacharidů a polyfenolických látek.

Pro účely kyselé hydrolyzy byla testována kyselina sírová, chlorovodíková a octová v rozmezí koncentrací 0,5 – 2,5 obj. %. Kyselá hydrolyza probíhala při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. U vzorků s obsahem 2,5 obj. % kyseliny byl zkoumán vliv aplikace ultrazvukové homogenizace před samotným procesem kyselé hydrolyzy na výtěžnost procesu. Monitorován byl také obsah polyfenolů v jednotlivých hydrolyzátech, které mohou mít inhibiční účinek na růst mikroorganismů (Kap.1.5.2.5).

Pro větší přehlednost výsledků byl zaveden **faktor K** (Tabulka 16), jedná se o poměr koncentrace redukujících sacharidů jako hlavního substrátu v hydrolyzátech a koncentrace celkových polyfenolů. Výtěžnost hydrolyzy představuje zisk redukujících sacharidů z 1 g substrátu.

Tabulka 16: Přehled výsledků kyselé hydrolyzy kávové sedliny (50 g/l)

Kyselina	Koncentrace [obj. %]	Redukující sacharidy [g/l]	Polyfenoly [g/l]	Faktor K -	Výtěžnost hydrolyzy -
H ₂ SO ₄	1	8,00 ± 0,01	3,47 ± 0,01	2,30	0,16
	2,5	11,34 ± 0,03	3,89 ± 0,02	2,92	0,23
	2,5 (UH)	26,83 ± 0,02	0,73 ± 0,01	36,97	0,54
HCl	1	8,60 ± 0,01	4,37 ± 0,01	1,97	0,17
	2,5	10,96 ± 0,01	2,08 ± 0,01	5,28	0,22
	2,5 (UH)	25,29 ± 0,02	1,62 ± 0,02	15,59	0,51
CH ₃ COOH	1	4,60 ± 0,02	1,76 ± 0,01	2,61	0,09
	2,5	6,45 ± 0,07	1,24 ± 0,01	5,21	0,13
	2,5 (UH)	6,76 ± 0,02	0,50 ± 0,01	13,56	0,14
voda	-	0,46 ± 0,05	2,62 ± 0,01	0,18	0,01

UH – ultrazvukový homogenizátor

Bezespornu nejvyšších výtěžností redukujících sacharidů bylo dosaženo předúpravou kávové sedliny ultrazvukovým homogenizátorem s následnou aplikací 2,5 obj. % kyseliny (Tabulka 16). Mezi kyselinami bylo z hlediska zisku redukujících sacharidů nejefektivnější použití kyseliny sírové (26,83 g/l). Další výhodou použití této hydrolyzy je relativně nízký obsah polyfenolických látek (0,73 g/l). Podobné koncentrace redukujících sacharidů bylo dosaženo použitím kyseliny chlorovodíkové (25,29 g/l), nicméně v porovnání s kyselinou sírovou byla koncentrace získaných polyfenolů vyšší (1,62 g/l). Zajímavé je, že použitím ultrazvukového homogenizátoru před procesem kyselé hydrolyzy byla ve všech případech výrazně snížena výsledná koncentrace polyfenolických látek v hydrolyzátu.

Tabulka 17: Přehled výsledků zásadité hydrolyzy kávové sedliny (50 g/l)

Zásada	Koncentrace [hmot. %]	Redukující sacharidy [g/l]	Polyfenoly [g/l]	Faktor K -	Výtěžnost hydrolyzy -
NaOH	1,5 (UH)	0,36 ± 0,05	1,79 ± 0,01	0,20	0,01
voda	-	0,49 ± 0,03	2,74 ± 0,03	1,78	0,01

Alkalická hydrolýza byla stejně jako kyselá hydrolýza využita k produkci fermentovatelných sacharidů z kávové sedliny. Hydroxid sodný v koncentracích 0,5 – 1,5 hmot. % byl kombinován se zvýšenou teplotou (121 °C/15 min). Nejvyšších výtěžků redukujících sacharidů, bylo dosaženo použitím koncentrace 1,5 hmot. %, nicméně v porovnání s kontrolním vzorkem (bez obsahu hydroxidu sodného) neměla přítomnost hydroxidu významný hydrolytický efekt (Tabulka 17).

Tabulka 18: Přehled výsledků enzymatické hydrolýzy kávové sedliny (50 g/l)

Enzym	Koncentrace [hmot. %]	Redukující	Polyfenoly	Faktor	Výtěžnost
		sacharidy [g/l]	[g/l]	K	hydrolýzy
				-	-
celuláza	0,5	1,74 ± 0,01	2,05 ± 0,07	0,85	0,05
hemiceluláza	0,5	1,30 ± 0,05	1,48 ± 0,03	0,87	0,04
celul. + hemicelul.	0,5	1,42 ± 0,03	1,59 ± 0,06	0,89	0,04
voda	-	0,64 ± 0,08	2,71 ± 0,06	0,24	0,01

Celuláza – *Trichoderma reesei*

Hemiceluláza – *Aspergillus niger*

Použitím specifických celulólytických enzymů k hydrolýze kávové sedliny nebylo dosaženo zdaleka tak dobré výtěžnosti jako u předchozí kyselé hydrolýzy. Koncentrace redukujících sacharidů se pohybovala v rozmezí od 1,30 – 1,74 g/l, naopak došlo k uvolnění poměrně vysoké koncentrace polyfenolů (1,48 – 2,05 g/l). Přímé použití enzymů pro hydrolýzu kávové sedliny nebylo úspěšné a výtěžek fermentovatelných sacharidů byl nízký.

Jednoznačně nejúspěšnější hydrolýzou byla kyselá hydrolýza s kyselinou sírovou (2,5 obj. %) s předúpravou kávové sedliny ultrazvukovým homogemizátorem. Velice dobrých výsledků bylo také dosaženo použitím kyseliny chlorovodíkové (2,5 obj. %). Na základě těchto výsledků, bylo v dalším experimentu přistoupeno k optimalizaci výchozí koncentrace kávové sedliny používané k hydrolýze. Kávová sedlina byla použita v koncentracích 50, 100 a 150 g/l, hydrolyzovaná byla kyselinou sírovou, chlorovodíkovou (2,5 obj. %) a celulázou (Tabulka 19).

Úspěšnost kyselé hydrolýzy kávové sedliny byla potvrzena i v případě, že k hydrolýze bylo použito různých navážek vstupní suroviny (50, 100, 150 g/l). Nicméně, navážka kávové sedliny neměla na výslednou koncentraci redukujících sacharidů významný vliv, koncentrace u všech tří vzorků dosahovaly podobných hodnot (24,01 – 28,25 g/l). Nejvyšší hodnoty faktoru K, u všech případů hydrolýz, bylo dosaženo použitím navážky 150 g/l kávové sedliny. V případě použití kyseliny sírové bylo získáno 28,25 g/l redukujících sacharidů, překvapivě byla koncentrace polyfenolů v porovnání s navážkami 50 a 100 g/l nejnižší (0,56 g/l). Co se týče výtěžnosti hydrolýzy, nejvyššího výtěžku redukujících sacharidů na 1 g kávové sedliny bylo dosaženo aplikací kyseliny sírové na navážku kávové sedliny 50 g/l.

Tabulka 19: Přehled výsledků hydrolyzy kávové sedliny v závislosti na výchozí koncentraci

Kávová sedlina [g/l]	Typ hydrolyzy [obj. %]	Redukující sacharidy [g/l]	Polyfenoly [g/l]	Faktor K -	Výtěžnost hydrolyzy -
50	H ₂ SO ₄ (2,5%)	27,41 ± 0,42	1,50 ± 0,02	18,31	0,55
	HCl (2,5%)	24,05 ± 0,33	1,38 ± 0,01	17,84	0,49
	Celuláza	10,72 ± 0,16	4,05 ± 0,07	2,65	0,21
100	H ₂ SO ₄ (2,5%)	24,01 ± 0,27	0,71 ± 0,01	33,82	0,24
	HCl (2,5%)	18,25 ± 0,31	1,15 ± 0,01	15,89	0,18
	Celuláza	6,76 ± 0,08	0,43 ± 0,02	15,74	0,07
150	H ₂ SO ₄ (2,5%)	28,25 ± 0,56	0,56 ± 0,01	50,19	0,19
	HCl (2,5%)	17,76 ± 0,11	0,95 ± 0,03	18,71	0,12
	Celuláza	6,20 ± 0,08	0,32 ± 0,01	19,68	0,04

V případě použití enzymatické hydrolyzy nebylo opět zdaleka dosaženo tak dobrých výsledků výtěžnosti hydrolyzy jako u hydrolyz chemických. Na druhou stranu, koncentrace redukujících sacharidů u enzymaticky připravených hydrolyzátů kávové sedliny byly až 10krát vyšší v porovnání s předchozím experimentem (Tabulka 18). Vyšších koncentrací redukujících sacharidů bylo pravděpodobně dosaženo prodloužením doby inkubace z předchozích 2 hodin na dobu 24 hodin.

Kávová sedlina (150 g/l) byla na základě předchozích výsledků hydrolyzována kyselinou sírovou 2,5 obj. % v kombinaci s následnou enzymatickou hydrolyzou. Celuláza byla po provedení kyselé hydrolyzy a následné úpravě pH přidána v koncentraci 0,5 obj. %, enzymatická hydrolyza probíhala při teplotě 50 °C po dobu 24 hodin. Takto připravený hydrolyzát kávové sedliny byl analyzován z hlediska složení jednotlivých sacharidů, inhibitorů a dalších parametrů uvedených v Tabulka 20. Kávový hydrolyzát byl použit pro produkce polyhydroxyalkanoátů popsaných v kapitole 4.3.1.1.

Tabulka 20: Charakterizace hydrolyzátu kávové sedliny (150 g/l) po kombinované kyselé a enzymatické hydrolyze

Parametr	Koncentrace/hodnota
Sušina [g/l]	98,4 ± 0,1
Popel [g/l]	27,6 ± 0,8
PO ₄ ³⁻ [g/l]	0,32 ± 0,03
Celkový obsah dusíku [hmot. %]	0,16 ± 0,03
Proteiny (N x 6,25) [g/l]	10,2 ± 0,6

Olej [hmot. %]	15,2 ± 2,3
Polyfenoly [g/l]	3,6 ± 0,1
Levulová kyselina [g/l]	1,72 ± 0,19
5-hydroxymethylfurfural [g/l]	0,15 ± 0,03
Furfural [g/l]	<i>n.d.</i>
Celkové sacharidy [g/l]	50,1 ± 2,2
Celobióza [g/l]	2,7 ± 0,3
Galaktóza [g/l]	17,3 ± 0,3
Manóza [g/l]	23,6 ± 0,6
Arabinóza [g/l]	2,8 ± 0,2
Glukóza [g/l]	3,9 ± 0,2

n.d. – nebylo detekováno

4.1.2.2 Detoxifikace hydrolyzátu kávové sedliny

Vzhledem k poměrně vysokým koncentracím polyfenolických látek, které mohou mít zásadní inhibiční efekt na mikrobiální producenty, byly testovány možnosti detoxifikace SCGH. Nejprve byla vyzkoušena extrakce potenciálně inhibičních polyfenolů z kávové sedliny před samotnou hydrolyzou. K extrakci polyfenolických látek byly využity rozpouštědla ethylacetát, ethyllaktát a ethanol (50%, 75%). Dále byla testována účinnost detoxifikace již připravených hydrolyzátů použitím aktivního uhlí a metodou „overliming“ (Kap.3.3.1.2).

Tabulka 21: Detoxifikace SCG hydrolyzátu extrakcí polyfenolů před hydrolyzou

Typ detoxifikace	Polyfenoly		Úbytek
	$c_{\text{před}}$ [g/l]	c_{po} [g/l]	[%]
Ethylacetát		2,06 ± 0,05	0,81
Ethyllaktát	2,08 ± 0,02	1,69 ± 0,03	18,55
Ethanol 50%		1,21 ± 0,01	41,08
Ethanol 75%		1,61 ± 0,03	22,43

$c_{\text{před}}$ – koncentrace polyfenolů v hydrolyzátu kávové sedliny před extrakcí

c_{po} – koncentrace polyfenolů v hydrolyzátu kávové sedliny po extrakci

Jako nejefektivnější se ukázalo být použití 50% ethanolu, kde byla účinnost eliminace polyfenolů v hydrolyzátech oproti kontrolnímu vzorku více než 41 % (Tabulka 21). Extrakcí ethyllaktátem a 75% ethanolem bylo odstraněno přibližně 20 % polyfenolů z hydrolyzátu.

Naprosto nevyhovující pro účely extrakce byl ethylacetát, pomocí něhož nedošlo k odstranění téměř žádných inhibičních látek.

Na základě experimentů, u kterých byla extrakce polyfenolů nejúspěšnější (využitím 50% ethanolu), byla optimalizována koncentrace ethanolu (0 – 60%). Zároveň byly ověřeny alternativní postupy detoxifikace hydrolyzátů založené na sorpci mikrobiálních inhibitorů z již připravených hydrolyzátů pomocí aplikace aktivního uhlí a procesu „overliming“ (Kap.3.3.1.2). Nejvyšší účinnost detoxifikace byla zjištěna, pokud bylo použito aktivní uhlí (55 %). Velice dobrých výsledků bylo dosaženo extrakcí ethanolom o koncentracích 45 a 60 % (Tabulka 22). Takto detoxifikované hydrolyzáty kávové sedliny byly použity pro produkci PHA *B. cepacia* (Kap.4.3.1.1).

Tabulka 22: Detoxifikace SCG hydrolyzátu ethanolom, aktivním uhlím a procesem „overliming“

Typ Detoxifikace	Polyfenoly		Úbytek [%]
	$c_{\text{před}}$ [g/l]	c_{po} [g/l]	
Voda (EtOH 0%)		3,01 ± 0,04	18,3
EtOH 30%		2,84 ± 0,11	22,7
EtOH 45%	3,68 ± 0,05	2,41 ± 0,01	34,5
EtOH 60%		2,32 ± 0,06	36,9
Aktivní uhlí		1,66 ± 0,02	55,0
Overliming		2,96 ± 0,08	19,7

4.1.3 Olej z kávové sedliny, jako substrát pro produkci PHA

Díky předchozí charakterizaci kávové sedliny, bylo zjištěno, že olej se v kávové sedlině vyskytuje v relativně vysokém množství 15–20 hmot. %. Kávový olej je možné z kávové sedliny extrahovat vhodným organickým rozpouštědlem (Al-Hamamre, 2012). Pro naše účely byl pro extrakci použit hexan. Profil mastných kyselin kávového oleje a další jeho kvalitativní parametry jsou uvedeny v Tabulka 23.

Tabulka 23: Charakterizace oleje získaného z kávové sedliny

Mastná kyselina	Obsah [%]
Palmitová kyselina (C16:1)	35,7
Stearová kyselina (C18:0)	7,1
Olejová kyselina (C18:2n6c)	9,4
Linolová kyselina (C18:2n6c)	43,7
Arachidonová kyselina (C20:0)	2,2
α -linolenová kyselina (C18:3n3)	1,1
cis-11-eikosenová kyselina (C20:1)	0,3
Behenová kyselina (C22:0)	0,4
Parametr	Hodnota

Číslo zmydlení	166,1
Číslo kyselosti	7,1
Jodové číslo	70,3
Esterové číslo	158,9

Kyselina palmitová a linolová jsou hlavními mastnými kyselinami obsaženými v oleji extrahovaném z kávové sedliny, představují zde až 80 % z celkového obsahu mastných kyselin. Významně jsou zastoupeny také kyselina stearová (7,1 %) a olejová (9,4 %). Další mastné kyseliny jsou v kávovém oleji přítomny pouze v minoritním množství. Podobný profil mastných kyselin byl uveden ve studii zabývající se složením oleje získaného z čerstvých kávových bobů. Kyselina linolová, palmitová a olejová představovaly majoritně zastoupené mastné kyseliny v kávovém oleji z čerstvých kávových zrn (Dong, 2015). Je tedy zřejmé, že profil složení mastných kyselin není technologickými kroky vedoucími od surových zrn ke kávové sedlině výrazně ovlivněn. Relativně vysoké hodnoty čísla kyselosti ukazují, že kávový olej získaný z kávové sedliny obsahuje poměrně velké množství volných mastných kyselin, což pozitivně ovlivnilo produkci PHA (Kap.4.3.1.2). Izolovaný kávový olej byl také použit jako aktivní složka ovlivňující antioxidační a antimikrobiální efekt lipozomů a lipozomů s obsahem PHB, do kterých byl tento olej přidán (Kap.4.4.1).

4.1.4 Syrovátka jako substrát pro produkci PHA, pullulanu a PMLA

Syrovátka je vedlejším produktem vznikajícím při výrobě sýra, tvoří 80 - 90 % objemu mléka a obsahuje až 55 % látek, které se nacházejí v mléce. Hlavní komponenty syrovátky jsou vedle vody především mléčný cukr – laktóza a syrovátkové proteiny (Obruča, 2011). Pro účely produkce pullulanu, polymeru kyseliny jablečné a PHA, byla syrovátka testována jako možný zdroj uhlíku (Kap.4.2.1) a dusíku (Kap.4.3.2). Vedle celkové koncentrace proteinů byl také analyzován aminokyselinový profil syrovátky, která byla enzymaticky hydrolyzována proteázou Alcalase®. Proteolytická předúprava syrovátky nejen navyšuje koloidní stabilitu syrovátky během sterilizace, ale produkty proteolýzy (volné aminokyseliny a peptidy) představují velice zajímavý komplexní dusíkatý substrát pro řadu mikroorganismů (Jeewanthi, 2015).

Obsah proteinů hydrolyzované syrovátky představoval 16 % z celkové syrovátkové sušiny. Kyselina glutamová a asparagová se v syrovátce nacházely v nejvyšší koncentraci (Kap.3.4.2). Dalšími poměrně významně zastoupenými aminokyselinami byl leucin, lysin a isoleucin (Tabulka 24). Ve vysoké koncentraci byla v syrovátce zastoupena laktóza (38,2 g/l).

Tabulka 24: Charakterizace složení syrovátky po proteolytickém štěpení syrovátkových proteinů

Parametr	Koncentrace [g/l]
Sušina	59,1 ± 0,5
Popel	12,2 ± 0,2
Laktóza	38,2 ± 0,5
Glukóza	0,94 ± 0,1
PO ₄ ³⁻	0,06 ± 0,01

Celkový dusík	9,5 ± 0,1
Koncentrace jednotlivých aminokyselin [g/l]	
Asparagová kyselina	1,11 ± 0,08
Threonin	0,51 ± 0,04
Serin	0,33 ± 0,01
Glutamová kyselina	1,10 ± 0,10
Prolin	0,54 ± 0,04
Glycin	0,33 ± 0,02
Alanin	0,51 ± 0,08
Valin	0,48 ± 0,07
Methionin	0,11 ± 0,01
Isoleucin	0,69 ± 0,07
Leucin	0,86 ± 0,10
Tyrosin	0,21 ± 0,03
Fenylalanin	0,24 ± 0,02
Histidin	0,27 ± 0,05
Lysin	0,78 ± 0,05
Arginin	0,28 ± 0,04

4.1.5 Peří jako komplexní zdroj dusíku pro produkci PHA

Podobně jako syrovátka byl jako komplexní zdroj dusíku pro produkci PHA použit rovněž hydrolyzát kuřecího peří (Kap.4.3.3). Optimalizací procesu hydrolýzy byla jako nejlepší, z hlediska zisku proteinů zvolena metoda alkalické hydrolýzy v kombinaci s mikrovlnným ohřevem. Směs peří s hydroxidem sodným (0,5 M) byla mikrovlnně ohřívána (600 W) po dobu 10 minut, s krokem 1 minuta ohřev/1 minuta pauza. Testovány byly koncentrace peří v rozsahu od 20 do 60 g/l. Z hlediska obsahu aminokyselin a proteinů byl charakterizován hydrolyzát s výchozí koncentrací peří 60 g/l (Tabulka 25). Elementární analýzou hydrolyzátu peří byl zjištěn obsah 9,44 % N, 30,84 % C, 4,89 % H a 0,68 % S.

Tabulka 25: Charakterizace složení hydrolyzátu peří (60 g/l)

Parametr	Koncentrace [g/l]
Sušina	76,9 ± 0,5
Popel	27,5 ± 0,6
Celkové proteiny	33,1 ± 0,5
Celkový dusík	45,7 ± 0,3
Koncentrace jednotlivých aminokyselin [g/l]	
Asparagová kyselina	2,84 ± 0,26
Threonin	0,66 ± 0,13
Serin	3,09 ± 0,32
Glutamová kyselina	4,59 ± 0,11
Prolin	4,43 ± 0,41
Glycin	4,10 ± 0,26
Alanin	2,12 ± 0,30
Valin	3,81 ± 0,23

Methionin	0,36 ± 0,14
Isoleucin	1,95 ± 0,35
Leucin	3,65 ± 0,16
Tyrosin	0,85 ± 0,08
Fenylalanin	2,32 ± 0,16
Histidin	1,82 ± 0,14
Lysin	1,21 ± 0,09
Arginin	1,22 ± 0,08

4.2 Produkce pullulanu a polymeru kyseliny jablečné

V první fázi proběhly experimenty, které byly zaměřeny na optimalizaci podmínek kultivace (pH, zdroj uhlíku, doba kultivace) a výběru vhodného kmenu *A. pullulans*. Na základě těchto výsledků byl pro následující produkce využit kmen *A. pullulans* CCM F148 podmínky kultivace byly nastaveny na teplotu 30 °C, pH 6, po dobu 96 hodin. Pro standardní kultivaci bylo použito minerální médium obsahující glukózu jako zdroj uhlíku (Kap.3.5.1). V dalším kroku bylo přistoupeno k testování možnosti využití obnovitelných typů biomasy, jako substrátů pro produkci extracelulárních polymerů (EP). Pro zvýšení koncentrace sacharidů v médiu byla aplikována kyselá hydrolýza, přičemž monitorován byl také vliv hydrolýzy na produkci biopolymerů. Po testování celé škály substrátů byly na základě výsledků z baňkových kultivací provedeny kultivace ve 2l laboratorním fermentoru.

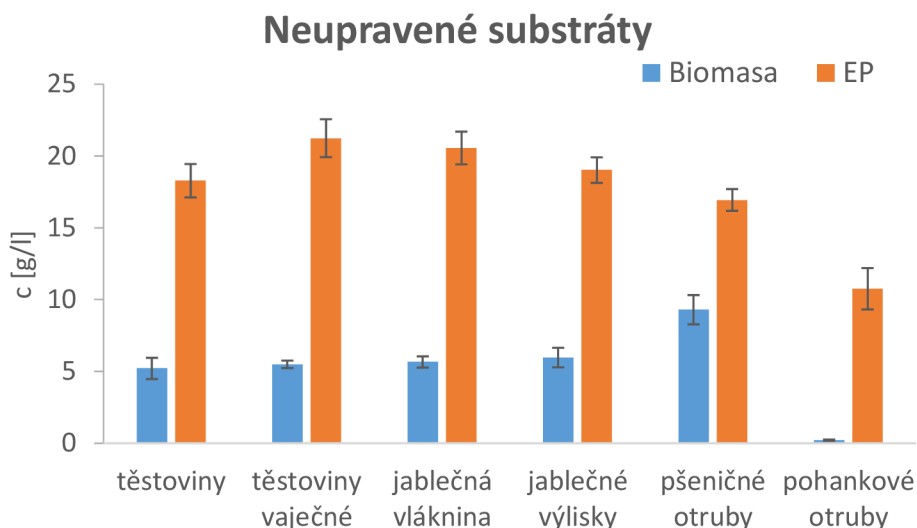
4.2.1 Testování substrátů pro kultivaci *A. pullulans*

Polysacharid pullulan je extracelulárním produktem polymorfní kvasinky *A. pullulans* (Kap.1.3.2). Kromě pullulanu je *A. pullulans* biotechnologicky významným producentem celé řady enzymů jako jsou amyláza, proteáza, lipáza, celulóza, xylanáza, a další (Singh, 2008). Řada studií se také zabývá možností produkce polymeru kyseliny jablečné pomocí *A. pullulans* (Nagata, 2014), (Zan, 2013), (Leathers, 2013). Na základě širokého enzymatického vybavení *A. pullulans* byly jako zdroje uhlíku pro produkci pullulanu použity především odpadní substráty. Vzhledem ke schopnosti *A. pullulans* produkovat celulólytické enzymy (Leite, 2007) byla pro kultivaci využita celá řada lignocelulózových substrátů; pšeničné a pohankové otruby, jablečné výlisky. Dalšími odpadními materiály použitými pro produkci pullulanu byla syrovátka a glycerol. Pullulan a polymer kyseliny jablečné byly produkovány paralelně jako extracelulární produkty. Polymery byly z média extrahovány vysrážením ethanolom a následně gravimetricky stanoveny jako celkové extracelulární polymery.

Substráty, které jsou pro kultivaci *A. pullulans* použity jako zdroj uhlíku, byly do média přidány bez předúpravy v koncentraci 50 g/l (Graf 1). Biomasa a vysrážené extracelulární polymery byly stanoveny gravimetricky.

Jak je z Graf 1 patrné kromě pohanových otrub byly veškeré substráty použité ke kultivaci *A. pullulans* užitelné. Nejvyšší koncentrace biomasy bylo dosaženo použitím pšeničných otrub (9,3 g/l), nicméně koncentrace extracelulárních polymerů byla nejvyšší v případě, kdy byly jako substrát použity vaječné těstoviny. Obsah biomasy dosahoval s výjimkou pohankových otrub velice podobných koncentrací (5,21-5,97 g/l). Poměrně vysokých výtěžků extracelulárních polymerů bylo dosaženo v případě, že byla jako zdroj uhlíku použita jablečná vláknina (20,56 g/l). I přes relativně vysoký obsah redukujících

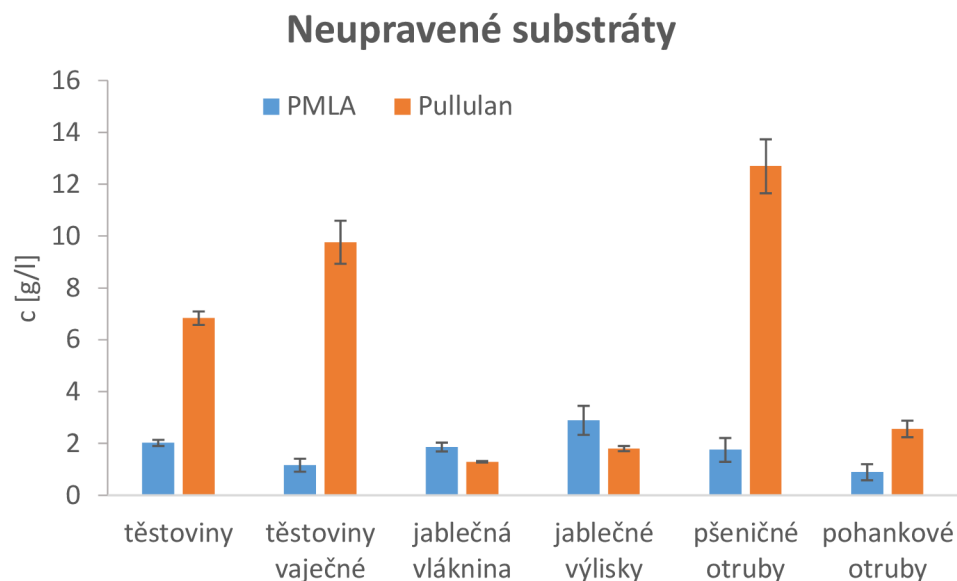
sacharidů obsažených v pohankových otrubách před hydrolyzou (Tabulka 15), nedošlo k téměř žádné produkci biomasy. Jedním z možných vysvětlení je vysoký obsah flavonoidů v pohankových otrubách, který může mít inhibiční efekt na růst biomasy (Kim, 2006).



*Graf 1: Produkce biomasy a celkových extracelulárních polymerů (EP) *A. pullulans* s využitím nehydrolyzovaných materiálů*

Vzhledem k relativně vysokému výtěžku vysrážených extracelulárních polymerů i v případě pohankových otrub, je pravděpodobné, že výsledky mohou být zkresleny vysrážením dalších komponent, které byly uvolněny do média z použitých substrátů. Z tohoto důvodu bylo přistoupeno k charakterizaci vysrážených biopolymerů, pullulanu a polymeru kyseliny jablečné, použitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Polymer kyseliny jablečné (PMLA) je polyester složený z monomerních jednotek kyseliny 2-hydroxybutandiové. Kyselou hydrolyzou (kyselina sírová 2 M/12 h/90 °C) dochází k rozštěpení polymeru na monomerní jednotky kyseliny jablečné (Cao, 2012). Polysacharid pullulan je lineární homopolymer složený z maltotriózových jednotek, které jsou spojeny α -(1,6) glykosidickou vazbou. Působením kyselé hydrolyzy, je možné z maltotriózových jednotek získat glukózu (Rehm, 2009). Výsledné produkty (monomery) obou reakcí je možné za použití vhodné kolony kvantifikovat pomocí HPLC v rámci jedné analýzy (Kap.3.6.1.4).

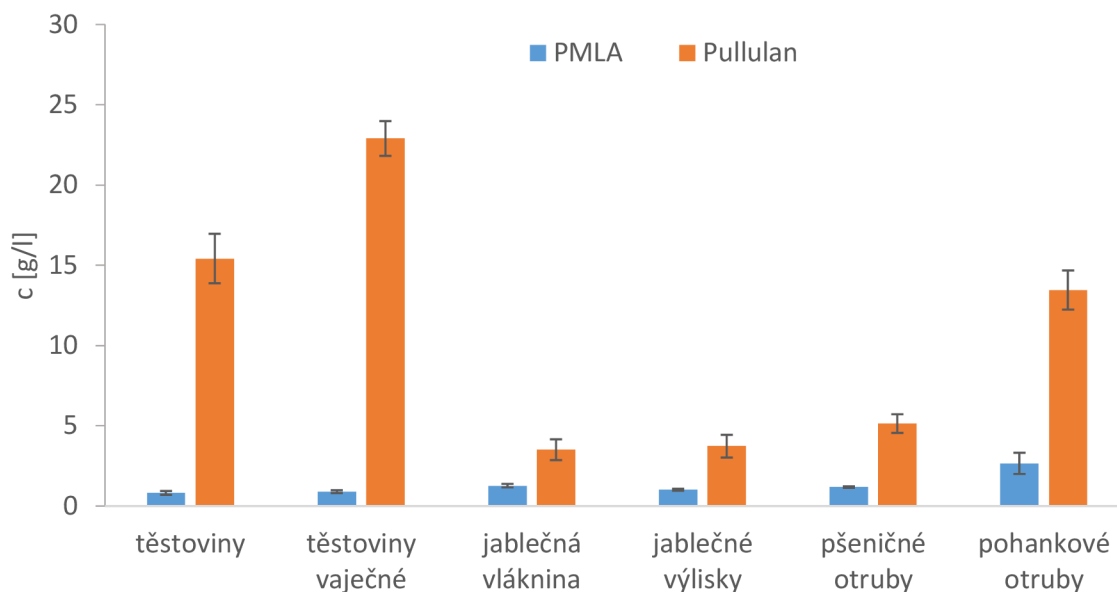


Graf 2: Produkce PMLA a pullulanu na neupravených substrátech

Vzorky média byly hydrolyzovány tak, aby došlo k rozštěpení polymeru na příslušné monomerní jednotky. Obsah příslušných monomerních jednotek byl v médiu stanoven jak před, tak po hydrolyze. Nejvyšší obsah glukózy (pullulanu), byl stanoven v případě, kdy byly pro kultivaci použity pšeničné otruby 12,69 g/l (Graf 2), koncentrace kyseliny jablečné v této kultivaci dosahovala koncentrace pouze 1,75 g/l. Další, relativně vysoký obsah pullulanu byl stanoven v případě použití obou druhů těstovin (bezvaječné těstoviny 6,80 g/l, vaječné těstoviny 9,76 g/l). Naopak u jablečných výlisků a vlákniny nebyl potvrzen trend z Graf 1 a produkce pullulanu zde byla zanedbatelná (1,80, 1,29 g/l). Dle získaných výsledků lze tedy konstatovat, že v případě gravimetrického stanovení EP došlo k ovlivnění výtěžku látkami pocházejícími z použitých substrátů, které se do kultivačního média uvolnily pravděpodobně především při jeho sterilizaci.

Výsledky získané analýzou kyseliny jablečné potvrzují, že PMLA nebyla v těchto kultivacích produkována ve významných koncentracích (výtěžky dosahovaly 0,89 – 2,89 g/l), nicméně kyselina jablečná byla detekována ve všech případech. Nejvyšší koncentrace kyseliny jablečné byla zaznamenána, pokud byly jako substrát použity jablečné výlisky, 2,89 g/l. Kyselina jablečná a glukóza byly stanoveny u vzorků před a po hydrolyze, aby byla vyloučena možnost uvolnění daného produktu z použitého substrátu. Kyselina jablečná byla detekována pouze po hydrolyze média, můžeme tedy soudit, že stanovená kyselina jablečná je produktem hydrolyzy polymeru kyseliny jablečné. V případě glukózy byla zbytková glukóza z média odečtena od koncentrace naměřené po hydrolyze vzorků.

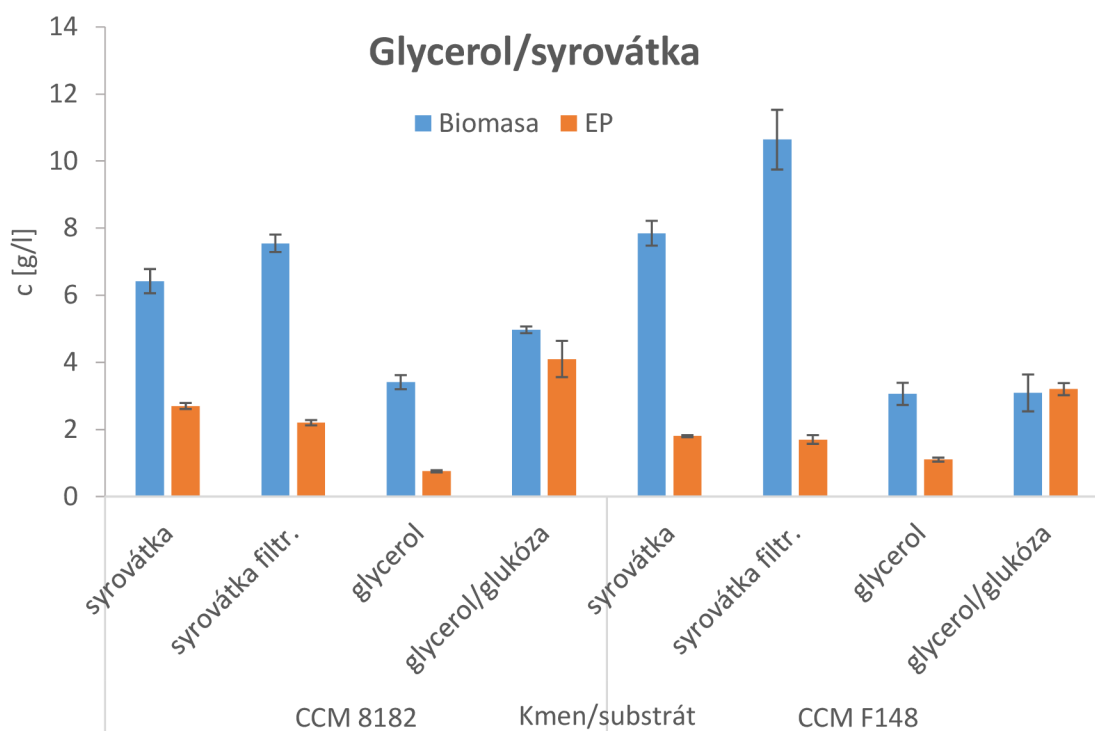
Pullulan, PMLA - hydrolyzované substráty



Graf 3: Produkce pullulanu a PMLA na hydrolyzovaných substrátech

V dalším kroku byly použity substráty pro kultivace v Erlenmeyerových baňkách hydrolyzovány kyselinou sírovou 2 obj. % (121 °C/15 minut) za účelem zisku vyšší koncentrace fermentovatelných sacharidů v médiu (Tabulka 15). Největší vliv hydrolyzy se projevil u pohankových otrub, kdy bylo hydrolyzou získáno 22,16 g/l redukujících sacharidů (Tabulka 15). Vyšší koncentrace sacharidů v médiu se pozitivně projevila na produkci pullulanu, kdy bylo detekováno 13,46 g/l glukózy (Graf 3). Kyselou hydrolyzou těstovin byl navýšen obsah redukujících sacharidů, v případě bezvaječných těstovin o 13,17 g/l a vaječných těstovin o 11,59 g/l. Vyšší koncentrace redukujících sacharidů v médiu se opět pozitivně odrazila v produkci pullulanu, 15,42 g/l pro bezvaječné těstoviny, 22,9 g/l vaječné těstoviny. V případě kyseliny jablečné narostla výrazněji produkce PMLA pouze v případě pohankových otrub (2,66 g/l). Lze tedy konstatovat, že největší efekt na produkci extracelulárních polymerů měla hydrolyza pohankových otrub, kde došlo k navýšení produkce jak polymeru kyseliny jablečné, tak i pullulanu.

Vedle výše uvedených substrátů byl testován pro experimenty v Erlenmeyerových baňkách také odpadní glycerol a syrovátka. V experimentu byla porovnávána schopnost produkce extracelulárních biopolymerů dvěma různými kmeny *A. pullulans* CCM 8182 a CCM F148. V případě glycerolu bylo testováno několik variant produkcí: odpadní glycerol jako jediný zdroj uhlíku, směs glycerolu a glukózy v různých poměrech. Z výsledků vyplývá, že použití směsi glycerolu a glukózy v různých poměrech může příznivě ovlivňovat produkci EP, ale také růst biomasy. Optimalizací bylo zjištěno, že nejvhodnější poměr glukóza-glycerol je 1:1.



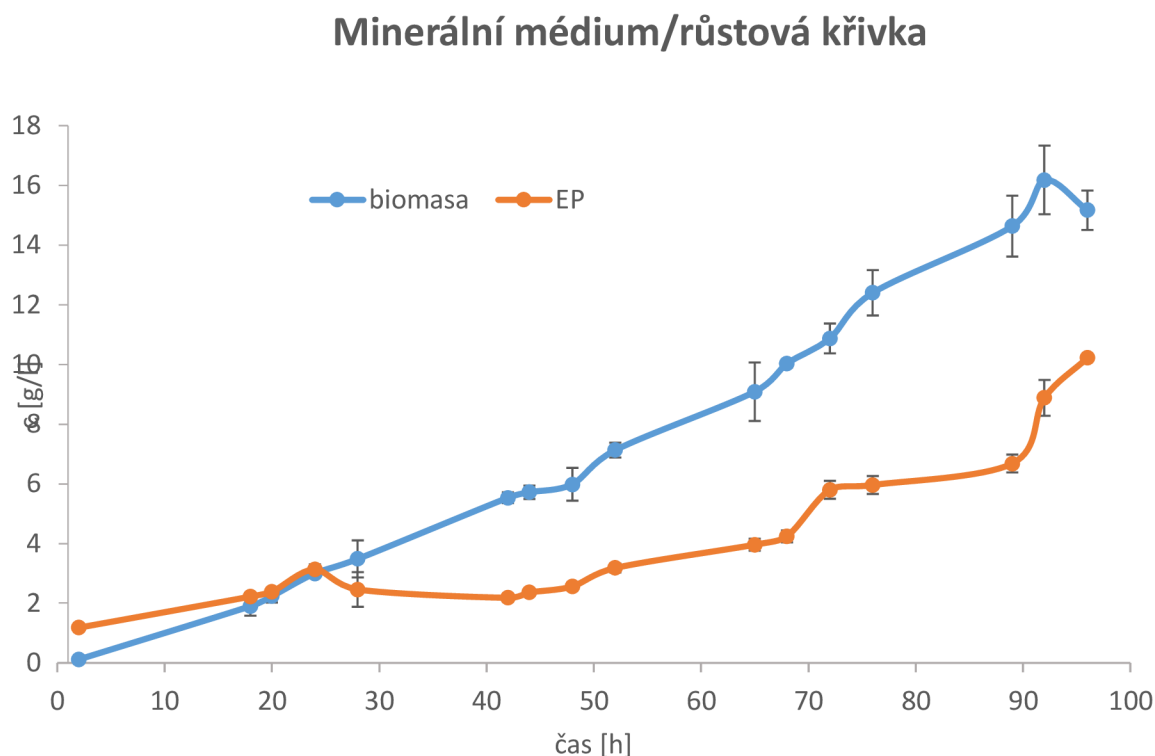
Graf 4: Produkce biomasy a extracelulárních biopolymerů *A. pullulans* s využitím syrovátky a glycerolu

Použitím odpadního glycerolu jako jediného zdroje uhlíku (60 g/l) v médiu byla koncentrace biomasy/EP pro oba kmeny *A. pullulans* přibližně stejná, 3,41 g/l a 1,075 g/l pro kmen CCM 8182 a 3,06 g/l a 1,1 g/l pro kmen F 148 (Graf 4). Přidáním glukózy (30 g/l) do minerálního média s glycerolem (30 g/l) v poměru 1:1 došlo k výraznému nárůstu produkce EP (4,1 g/l) a biomasy (4,47 g/l) u kmene CCM 8182. Použití glukózy u kmene F148 nemělo téměř žádný vliv na nárůst biomasy, produkce EP se zvýšila o 2,1 g/l. V případě syrovátky byla pro kultivaci využita neupravená syrovátka a syrovátka, ze které byly filtrací odstraněny vysrážené syrovátkové proteiny. Z hlediska porovnání biomasy u obou kmenů bylo vyšších koncentrací dosaženo v případě, kdy byla použita centrifugovaná syrovátka (7,55 g/l CCM 8182 a 10,64 g/l F148). Koncentrace biomasy u obou kmenů byla výrazně vyšší než v případě, kdy byl pro kultivaci využit glycerol. V rámci stanovení koncentrace EP bylo vyšších koncentrací dosaženo kultivací kmene CCM 8182. Na druhou stranu vyšší koncentrace biomasy byla stanovena po kultivaci kmene F148 na syrovátce. Malý rozdíl v koncentraci EP byl zaznamenán v případě neupravené a zfiltrované syrovátky (2,7 g/l a 2,2 g/l) u kmene CCM 8182, podobný trend byl také potvrzen u kmene F148 (1,8 g/l a 1,7 g/l).

Výše uvedené baňkové experimenty sloužily především jako screeningové testy produkce pullulanu a PMLA *A. pullulans* testující alternativní substráty pro účely dalších kultivací v laboratorním fermentoru (Kap.4.2.2).

4.2.2 Produkce pullulanu a PMLA v laboratorním fermentoru

Po testování alternativních substrátů, použitých pro kultivaci *Aureobasidium pullulans*, s cílem produkce extracelulárních polymerů (pullulan, polymer kyseliny jablečné) bylo přistoupeno k produkci v laboratorním bioreaktoru. Pro produkci byl vzhledem k předchozím experimentům použit odpadní glycerol s glukózou a kmen *A. pullulans* CCM 8182. Pro zjištění růstových vlastností *A. pullulans* a nastavení parametrů kultivace byla nejprve provedena kontrolní kultivace s minerálním médiem, kde byl jako zdroj uhlíku použita glukóza (60 g/l).

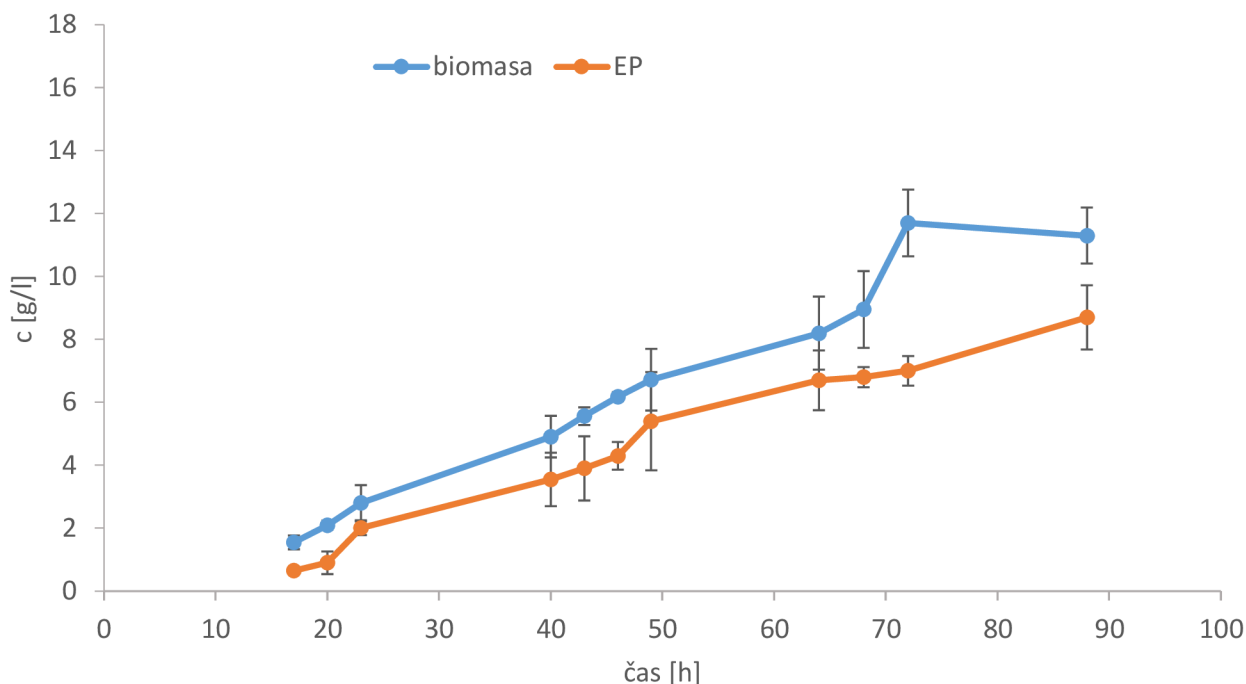


Graf 5: Růstová křivka *A. pullulans*

Kultivace probíhala v laboratorním fermentoru o maximálním pracovním objemu 1,5 l po dobu 96 h (Graf 5), při teplotě 30 °C a pH 6, vsádkově s 60 g/l glukózy v minerálním médiu popsáném v kapitole 3.2. K výraznému nárůstu biomasy došlo po 28. hodině kultivace. Nejvyšší koncentrace biomasy v médiu byla zaznamenána v 92 hodině kultivace (16,17 g/l), po této době byla koncentrace biomasy konstantní. Produkce EP se zvýšila po 60. hodině kultivace, zároveň se zvyšovala také koncentrace biomasy v médiu. Maximální dosažená koncentrace extracelulárních polymerů byla 10,22 g/l v 96 hodině kultivace.

Díky relativně slibným výsledkům z baňkových experimentů (Graf 4), kde byl jako zdroj uhlíku použit glycerol v kombinaci a glukózou v hmotnostním poměru 1:1 (30 g glukózy a 30 g glycerolu na 1 l kultivačního média), byla kultivace převedena do 2l laboratorního fermentoru. Vzhledem k přebytkům odpadního glycerolu způsobeným stále se zvyšujícím objemem produkce bionafty, kde je glycerol generován jako vedlejší/odpadní produkt, se jedná se o velmi levný substrát, který je navíc produkován v obrovských množstvích (García, 2013).

Fermentor glycerol/glukóza

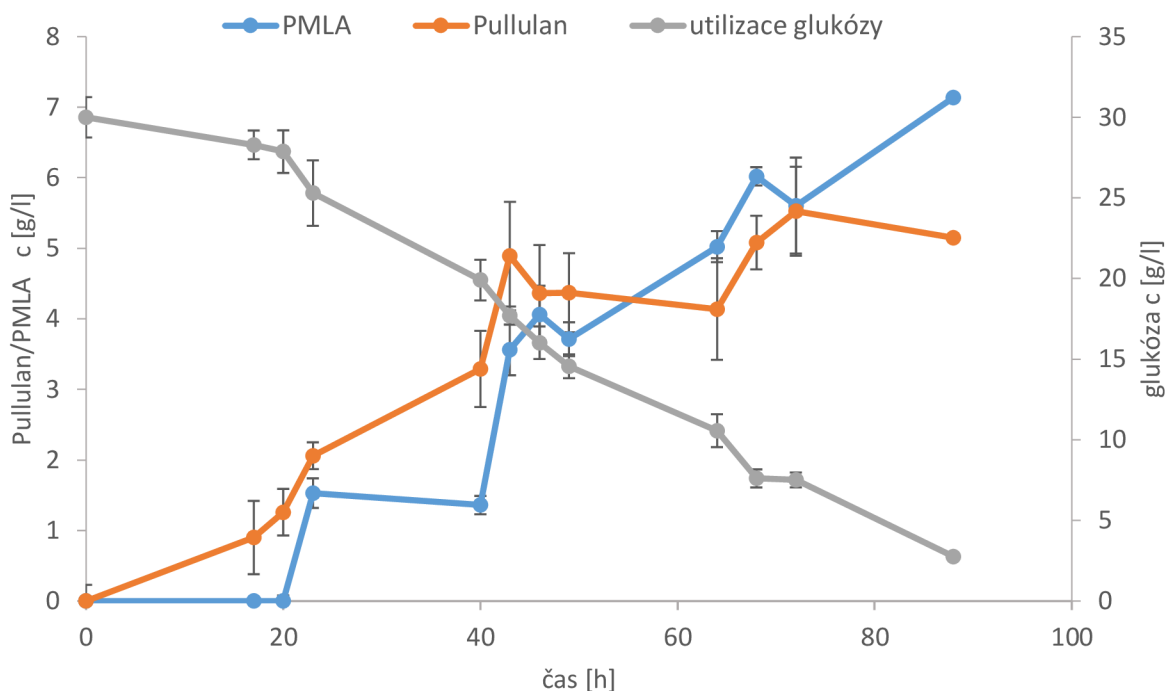


Graf 6: Průběh kultivace *A. pullulans* s využitím glycerolu jako substrátu v 2l fermentoru

V porovnání s baňkovými experimenty vzrostla při kultivaci ve fermentoru produkce biomasy dvojnásobně. Pozitivní vliv obsahu glycerolu v médiu byl zaznamenán také z hlediska produkce EP kdy ve fermentoru došlo k zvýšení koncentrace, oproti baňkovým experimentům, o více než 50 %. Produkce biomasy a EP vzrostla zejména po 23. hodině kultivace (Graf 6). Nejvyšší koncentrace biomasy byla zaznamenána v 72. hodině (11,7 g/l), v případě EP bylo nejvyšší koncentrace dosaženo v 96. hodině (8,7 g/l). V porovnání se standardní kultivací, kde byla jako zdroj uhlíku použita glukóza (Graf 5) došlo při její částečné náhradě glycerolem k výrazně nižšímu nárůstu biomasy. Také v případě produkce EP byla dosažená koncentrace nižší při porovnání se standardní kultivací s glukózou, nicméně rozdíl zde nebyl tak markantní jako u koncentrace biomasy.

Extracelulární produkty kultivace *A. pullulans*, kde byl jako substrát použita směs glukózy a glycerolu byly podrobeny hydrolýze tak, aby mohla být stanovena koncentrace jejich monomerů – kyseliny jablečné (PMLA) a glukózy (pullulan). Zároveň byla monitorována spotřeba glukózy z média v průběhu kultivace (Graf 7). Významná utilizace glukózy začala po 23. hodině kultivace, následně byla glukóza spotřebovávána prakticky konstantní rychlostí. Tento trend také odpovídá zvýšení produkce extracelulárních metabolitů po 23. hodině kultivace, což koresponduje s výsledky výtěžků biomasy a EP (Graf 6).

Fermentor glycerol/glukóza



Graf 7: Produkce extracelulárních biopolymerů v závislosti na spotřebě glukózy *A. pullulans*

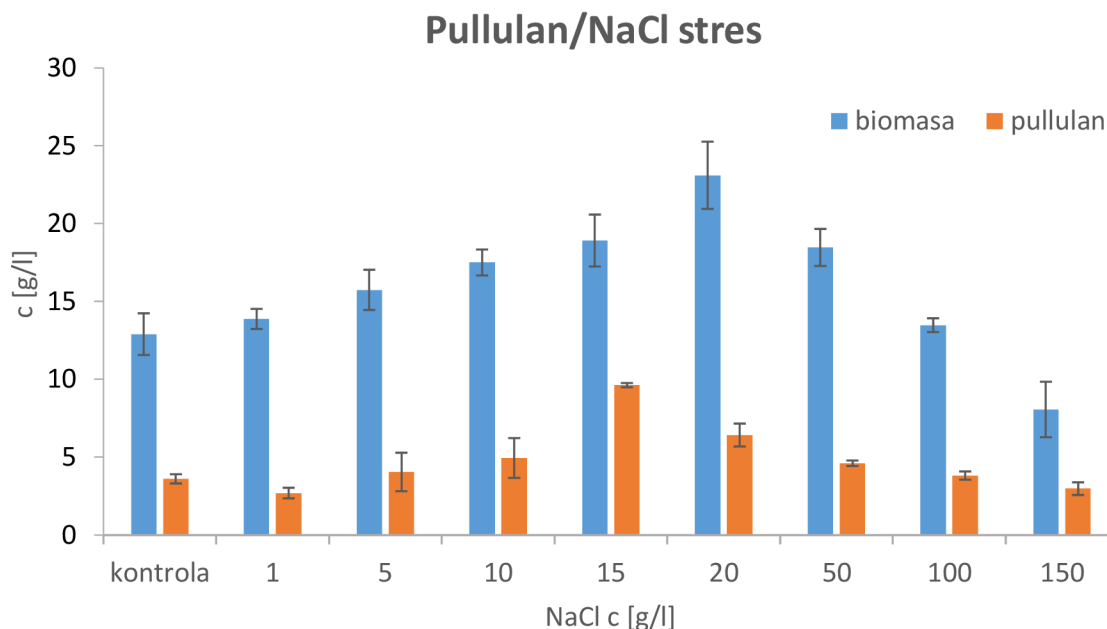
Výrazný nárůst obsahu pullulanu byl detekován v rozmezí od 23. hodiny (2,06 g/l) do 43. hodiny (4,88 g/l), poté se koncentrace pullulanu v médiu zvyšovala jen velmi pomalu. Konečná koncentrace pullulanu v 88. hodině byla 5,15 g/l, což není příliš vysoká hodnota.

Při kultivaci *A. pullulans* na médiu obsahujícím směs glukózy a glycerolu bylo dosaženo poměrně vysoké koncentrace PMLA. Produkce polymeru kyseliny jablečné měla podobný průběh, jako tomu bylo u produkce pullulanu, k nejvyššímu nárůstu koncentrace kyseliny jablečné došlo v rozmezí od 20. – 43. hodiny kultivace (0,0 – 3,56 g/l). Nejvyšší koncentrace kyseliny jablečné byla stanovena v 88. hodině kultivace, a to 7,13 g/l.

Přídavkem glycerolu k minerálnímu médiu obsahujícímu 30 g/l glukózy byl polymer kyseliny jablečné produkován v poměrně vysoké koncentraci. Možnost využití glycerolu jako uhlíkatého substrátu při produkci EP *A. pullulans* nebyla doposud jinými autory popsána. Podle našich výsledků by tato strategie mohla být velice zajímavá, protože při 50 % úspoře glukózy bylo dosaženo velice podobných výtěžků sledovaných polymerů. Kromě toho, že glycerol plní funkci uhlíkatého substrátu, měla jeho aplikace pravděpodobně jeden vedlejší efekt – jeho přídavek zvýšil osmotickou sílu média, což následně pozitivně ovlivnilo produkční parametry. Pozitivní efekt osmotického tlaku na produkci pullulanu byl potvrzen také v následujících experimentech, kdy byl k vytvoření osmotického stresu použit chlorid sodný (Kap.4.2.3). Na druhou stranu je nutné si uvědomit, že glycerol není, na rozdíl od glukózy, přímým prekurzorem pullulanu, což může být důvodem dosažení nižších výtěžků tohoto polysacharidu při nahrazení části glukózy glycerolem. Na druhou stranu glycerol pozitivně stimuloval extracelulární produkci PMLA, což naznačuje, že by mohl být využit jako faktor stimulující preferenční produkci tohoto polyesteru.

4.2.3 Vliv osmotického stresu na produkci pullulanu

V rámci testování produkce pullulanu v přítomnosti stresových faktorů, byl použit chlorid sodný pro vytvoření osmotického stresu během kultivace *A. pullulans* F148. Různé koncentrace soli a s tím související různá síla osmotického stresu byly testovány v souvislosti s produkcí pullulanu v baňkových experimentech (Graf 8).

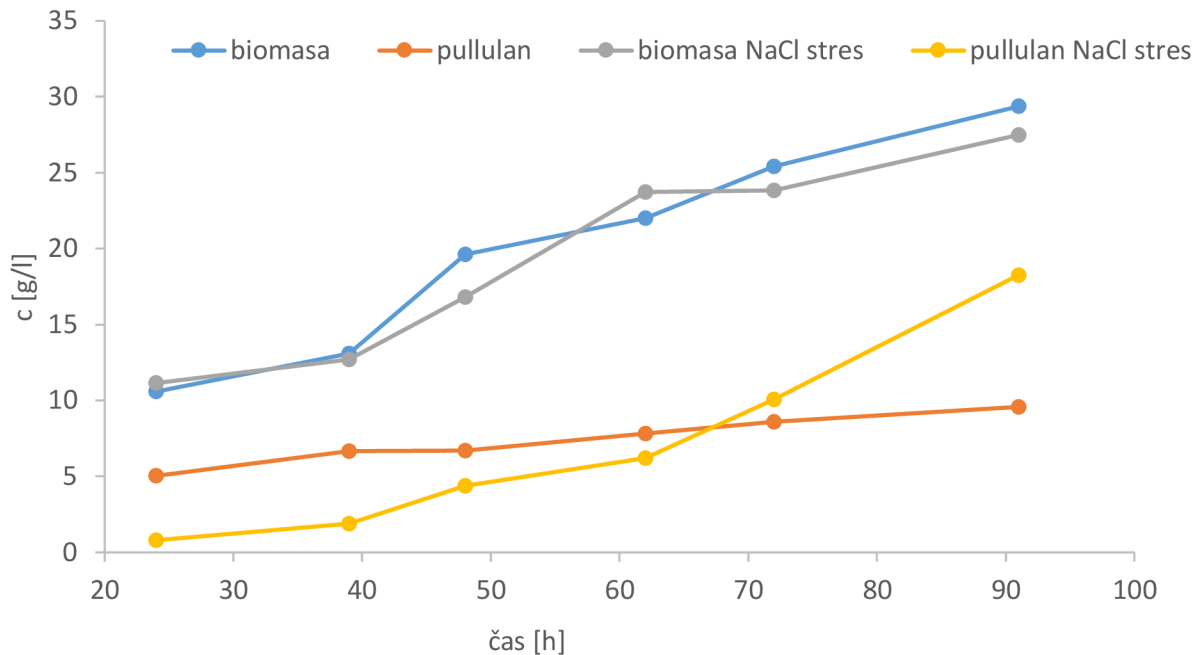


Graf 8: Vliv různé koncentrace NaCl v minerálním médiu na produkci biomasy a pullulanu

Jako optimální se zdá být koncentrace 15 g/l NaCl, kdy došlo k zisku nejvyšší koncentrace pullulanu 9,63 g/l, což je 2,6násobně více oproti kontrolní kultivaci bez obsahu soli (3,62 g/l). Z hlediska produkce biomasy bylo nejvyšší koncentrace dosaženo použitím 20 g/l NaCl, nicméně ve srovnání s 15 g/l je zde výrazně nižší výtěžek pullulanu. Další optimalizace solného stresu zahrnovala adaptaci mikroorganismu na osmotický stres již v inokulu. Do inokula II byl přidán NaCl v koncentraci 1 a 5 g/l, nicméně na výslednou koncentraci pullulanu v médiu neměl tento experiment téměř žádný vliv. Je možné, že adaptací *A. pullulans* na osmotický stres již od inokula došlo k aktivaci jiné metabolické dráhy, která má souvislost se stresovou odpovědí buněk (trehalóza, manitol, glycerol) (Torzilli, 1997).

Produkce pullulanu se zvýšeným obsahem NaCl v médiu byla testována také v 2l laboratorním fermentoru. Koncentrace soli byla vybrána na základě výsledků z baňkového experimentu (Graf 8), 15 g/l NaCl.

Pullulan/NaCl stres 15 g/l



Graf 9: Průběh produkce pullulanu v laboratorním fermentoru, za přítomnosti 15 g/l NaCl v minerálním médiu

Výtěžek biomasy u kultivace, kde byl aplikován solný stres, byl v porovnání s klasickou kultivací téměř stejný, rapidní rozdíl byl zaznamenán ve výtěžcích pullulanu. Kultivací v přítomnosti zvýšené koncentrace chloridu sodného bylo dosaženo nejvyššího výtěžku pullulanu 18,26 g/l, zatímco produkce pullulanu bez osmotického stresu dosahovala koncentrace téměř poloviční, 9,58 g/l.

Koncentrace pullulanu byla v klasickém minerálním médiu (bez NaCl) již v 24. hodině 5,04 g/l, zatímco v přítomnosti osmotického stresu začala produkce později až po 39. hodině. Výrazný nárůst koncentrace pullulanu v přítomnosti NaCl byl zaznamenán zejména po 62. hodině kultivace. Lze tedy předpokládat, že v případě aplikace osmotického stresu mohlo být určité zpoždění produkce pullulanu s největší pravděpodobností způsobeno nutností adaptace *A. pullulans* na stresové podmínky prostředí. Tozilli ve své studii prokázal produkci stresových proteinů u *A. pullulans*, který byl vystaven prostředí s vysokou koncentrací soli a vysokou teplotou (Torzilli, 1997). Existují studie zabývající se produkcí pullulanu osmotolerantními kmeny *A. pullulans* (Choudhury, 2011), řada kmenů byla izolována z prostředí mírně osmotického a v prostředí se zvýšenou koncentrací soli (Gostinčar, 2014).

Jedním z možných vysvětlení zvýšené produkce EPS v přítomnosti zvýšeného osmotického tlaku nabízí studie Yanwisetpakdee a spol. Předpokládá se, že v přítomnosti zvýšeného osmotického tlaku prostředí, může adaptační mechanismus využívat právě uvolnění EPS ke snížení vodního potenciálu okolního média (Yanwisetpakdee, 2016).

4.3 Produkce polyhydroxyalkanoátů

Pro produkci PHA byly využity zejména odpadní substráty, z hlediska produkce PHA bylo testováno několik produkčních kmenů v závislosti na preferenci typu substrátu (sacharid/olej). Testována byla také možnost produkce technologicky významného kopolymeru P(3HB-co-3HV), na základě použití různých prekurzorů. Některé z prekurzorů (kyselina levulová) se přirozeně vyskytovaly v médiu, jako vedlejší produkty hydrolýzy (Kap.4.1.2.1), jiné byly přidávány cíleně v průběhu kultivace. Část experimentů byla zaměřena na nahrazení zdroje dusíku z minerálního média levným (odpadním) komplexním zdrojem dusíku, jako je syrovátka a kuřecí peří (Kap.4.3.2 a 4.3.3).

4.3.1 Produkce PHA s využitím kávového odpadu

Přípravou kávového nápoje vzniká poměrně velké množství odpadu, který je označován jako kávová sedlina. Ve své podstatě je kávová sedlina lignocelulózovým odpadním materiálem obsahující 12 % celulózy, 39 % hemicelulózy a 24 % ligninu (Ballesteros, 2014). V kapitole 4.1 byl popsán optimalizovaný proces hydrolýzy kávové sedliny za účelem zisku redukujících sacharidů v co nejvyšší koncentraci. Naopak nežádoucí bylo uvolnění polyfenolických látek během procesu hydrolýzy a to především z lignitu. K produkci PHA byl využit hydrolyzát kávové sedliny (Kap.4.1.2.1), testováni byli producenti *Bacillus megaterium* a *Burkholderia cepacia*. Vzhledem k poměrně vysokému obsahu oleje, který se nachází v kávové sedlině, byl tento olej využit také k produkci PHA u *Cupriavidus necator* (Kap.4.3.1.2).

4.3.1.1 Hydrolyzát kávové sedliny

Jeden z vůbec prvních popsaných producentů PHA, *Bacillus megaterium*, byl využit ke kultivaci na hydrolyzátu kávové sedliny (SCGH). Hydrolýzou kávové sedliny došlo k uvolnění značného množství redukujících sacharidů do média, které mohly být příslušnými PHA producenty využity jako zdroj uhlíku. Pro přípravu kávového hydrolyzátu byla použita kombinace kyselé a enzymové hydrolýzy (Kap.4.1). V prvním experimentu byly testovány různé objemy hydrolyzátu kávové sedliny v minerálním médiu, pro produkci PHA zde byla použita bakterie *B. megaterium* (Tab. 26).

Tabulka 26: Produkce PHA bakterií *B. megaterium* s využitím různých koncentrací SCGH (navážka kávové sedliny na přípravu hydrolyzátu byla 150 g/l) v minerálním médiu

SCGH [obj. %]	Biomasa [g/l]	PHA [hmot. %]	PHA [g/l]	Y _{P/S}
25	1,51 ± 0,12	2,34 ± 0,34	0,04 ± 0,04	0
50	2,55 ± 0,16	21,77 ± 0,61	0,56 ± 0,04	0,03
75	3,24 ± 0,21	46,37 ± 0,37	1,50 ± 0,10	0,04
100	3,41 ± 0,08	51,06 ± 3,88	1,74 ± 0,14	0,04

Obsah biomasy, stejně jako PHA, rostl se zvyšujícím se obsahem hydrolyzátu v médiu (Tabulka 26). Nicméně i přesto, že v případě použití čistého hydrolyzátu byl obsah PHA v biomase více než 51 hmot. %, koncentrace biomasy dosahuje relativně nízkých hodnot. Nejvyšší koncentrace biomasy a PHA bylo dosaženo po 72 h kultivace (3,41 g/l a 1,74 g/l), pokud byl SCGH zastoupen 100 obj. %. I přes relativně nízké výtěžky je zřejmé, že se zvyšujícím se podílem SCGH v minerálním médiu roste výtěžnost kultivace *B. megaterium*. Při kultivaci na hydrolyzátu kávové sedliny produkoval *B. megaterium* homopolymer 3-hydroxybutyrát – PHB.

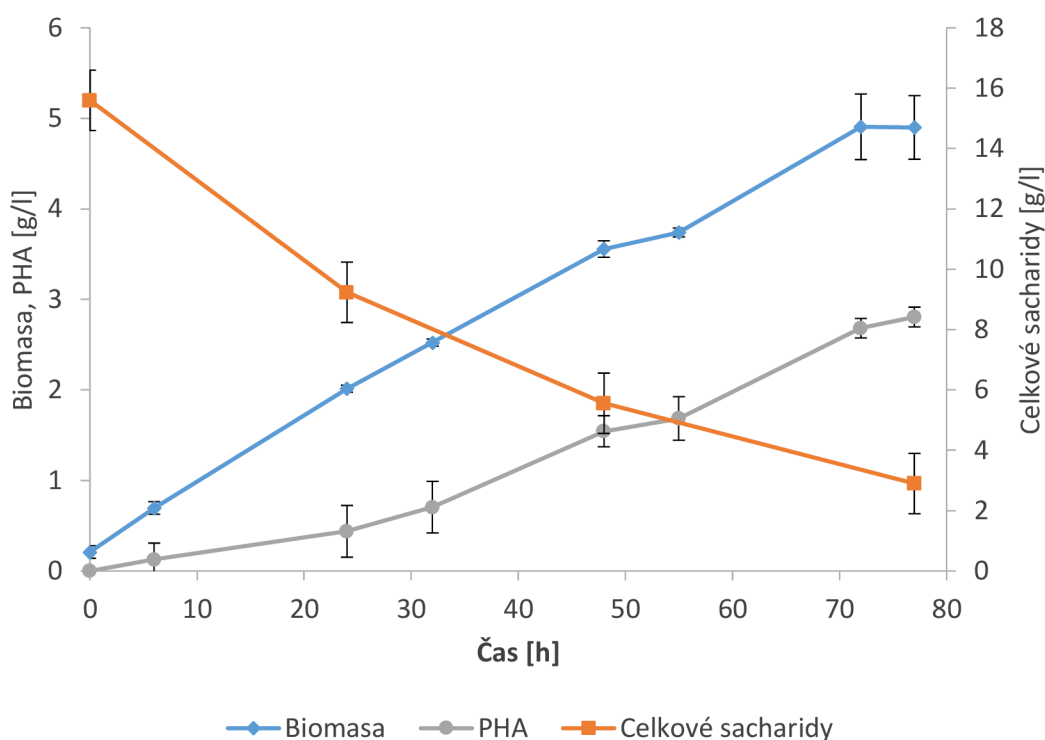
Vzhledem k předchozím výsledkům, kde bylo dosaženo poměrně nízkých výtěžků, byl pro produkci PHA s využitím SCGH testován další producent. Další experiment byl zaměřen na kultivaci *Burkholderia cepacia* za účelem produkce PHA, jako substrát byl využit hydrolyzát kávové sedliny v minerálním médiu v různých objemech. V rámci tohoto experimentu bylo, stejně jako u *B. megaterium*, optimalizováno ředění hydrolyzátu kávové sedliny minerálním médiem (Tabulka 27). Kultivace probíhala v Erlenmeyerových baňkách po dobu 72 h.

Tabulka 27: Produkce PHB *B. cepacia* s různým obsahem SCGH (150 g/l) v minerálním médiu

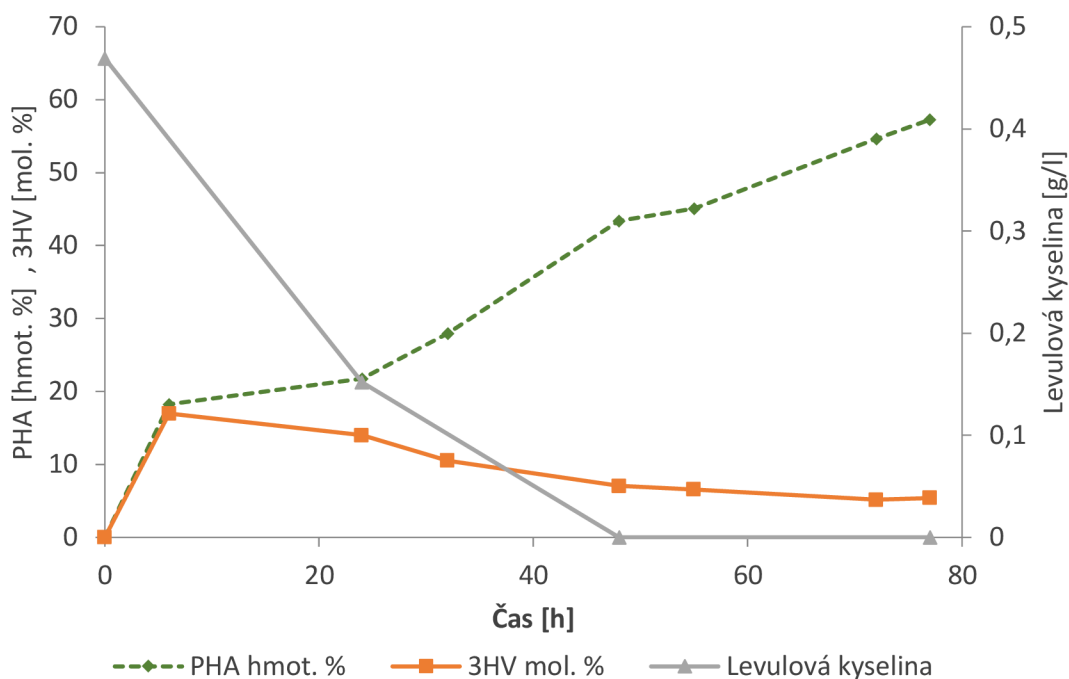
SCGH [obj. %]	Biomasa [g/l]	PHA [hmot. %]	PHA [g/l]	3HV [mol. %]	Spotřebované Sacharidy [g/l]	Y _{P/S}
15	3,24 ± 0,34	25,36 ± 1,61	0,82 ± 0,10	4,5 ± 0,1	7,52	0,11
30	4,91 ± 0,10	54,79 ± 1,23	2,69 ± 0,07	5,0 ± 0,2	11,93	0,23
50	2,78 ± 0,27	34,04 ± 0,10	0,94 ± 0,08	8,7 ± 0,1	16,85	0,06
65	2,71 ± 0,11	29,74 ± 3,21	0,81 ± 0,09	9,4 ± 0,4	18,37	0,04

Nejvyšších výtěžků biomasy a PHA (4,91 a 2,96 g/l) bylo dosaženo v případě, že médium obsahovalo 30 obj. % kávového hydrolyzátu. Kultivace s nižším obsahem kávového hydrolyzátu pravděpodobně neobsahovala dostatečné množství živin a výsledná koncentrace biomasy a PHA byla nižší (3,24 a 0,82 g/l). Nicméně ani v případě kdy obsah hydrolyzátu v médiu představoval 50 a 65 obj. % nedošlo ke zlepšení produkce biomasy a PHA. Důvodem relativně nízkého zisku biomasy (2,78 a 2,71 g/l) a produkce PHA (0,94 a 0,81 g/l) může být inhibiční vliv toxických látek vyskytujících se v hydrolyzátu (Kap.4.1.2) na růst biomasy, potažmo produkci PHA. Kyselina levulová ani 5-hydroxymethylfurfural nejsou v kávovém hydrolyzátu zastoupeny v takovém množství (1,75 g/l a 0,15 g/l), aby mohla být v důsledku jejich přítomnosti předpokládána inhibice růstu buněk. Nicméně hydrolyzát obsahuje relativně vysoké množství polyfenolických látek (3,6 g/l), což je pravděpodobně příčina inhibičního efektu na růst a produkci *B. cepacia*, při jejichž kultivaci bylo využito 50 a 65 obj. % hydrolyzátu kávové sedliny. Velice zajímavý je fakt, že na rozdíl od *B. megaterium* produkovala kultura *B. cepacia* přímo na hydrolyzátu kávové sedliny kopolymer obsahující jak 3-hydroxybutyrát tak 3-hydroxyvalerát P(3HB-co-3HV). Bakterie *B. cepacia* je tedy schopna syntetizovat kopolymer P(3HB-co-3HV) bez nutnosti přidání prekurzoru, jestliže je jako substrát využit hydrolyzát kávové sedliny.

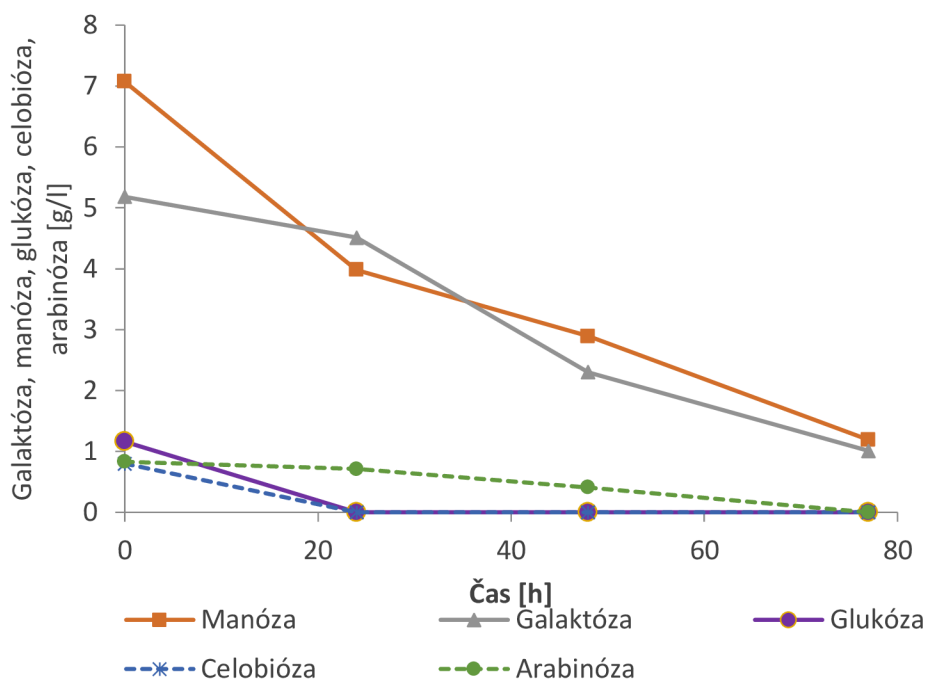
Kopolymer P(3HB-co-3HV) vykazuje řadu lepších vlastností oproti homopolymeru PHB. Především je to nižší krystalinita a z toho vyplývající flexibilita (Tabulka 7), ale také nižší teplota tání kopolymeru při zachování stejné teploty degradace. Tento pokles teploty tání má příznivý technologický dopad, protože rozšiřuje technologické okno pro práci s taveninou a zároveň snižuje možnost nežádoucí degradace polymeru během tavení. Příčinou tvorby kopolymeru v médiu obsahujícím SCGH je pravděpodobně utilizace kyseliny levulové (vedlejší produkt hydrolyzy), která mohla být bakterií využita jako prekurzor syntézy P(3HB-co-HV) (Wang, 2013). Koncentrace 3HV se zvyšovala se zvyšujícím se obsahem hydrolyzátu kávové sedliny v médiu. Lze tedy předpokládat, že současně roste také koncentrace prekurzoru v médiu. Nejvyšších výtěžků i nejlepšího výtěžnostního koeficientu $Y_{P/S}$ bylo dosaženo kultivací *B. cepacia* s 30 obj. % SCGH. Výtěžky získané s *B. cepacia* jsou významně vyšší než ty, kterých bylo dosaženo s využitím *B. megaterium*. Z toho důvodu byla k další práci využita již pouze kultura *B. cepacia*, v experimentu bylo využito média obsahujícího 30 obj. % SCGH, kultivace probíhala po dobu 77 hodin. Kromě výtěžků biomasy a obsahu a složení PHA byly v rámci této kultivace také analyzovány koncentrace jednotlivých sacharidů a koncentrace kyseliny levulové (Graf 10, Graf 11, Graf 12).



Graf 10: Růstové a produkční parametry *B. cepacia* během kultivace s 30 obj. % SCGH



Graf 11: Průběh spotřeby kyseliny levulové v závislosti na produkci kopolymeru P(3HB-co-3HV)



Graf 12: Spotřeba jednotlivých sacharidů z SCGH během kultivace *B. cepacia*

Se zvyšujícím se časem kultivace docházelo k růstu koncentrace biomasy, která byla doprovázena zvyšujícím se obsahem PHA. Na konci kultivace, po 77 hodinách, dosáhla koncentrace biomasy 4,90 g/l, obsah PHA byl 57,26 hmot. % a výtěžek PHA činil 2,81 g/l. Již v 48. hodině kultivace došlo k vyčerpání veškeré kyseliny levulové, což odpovídá složení kopolymeru. Obsah 3HV v polymeru v průběhu kultivace klesal, což mohlo být způsobeno syntézou kopolymeru s vysokým obsahem 3HV na začátku kultivace.

Po kompletní utilizaci kyseliny levulové byl dále syntetizován pouze homopolymer PHB, v důsledku čehož klesalo procentuální zastoupení 3HV v kopolymeru. Růst a produkce *B. cepacia* na hydrolyzátu kávové sedliny byla doprovázena spotřebou sacharidů, které byly získány hydrolyzou kávové sedliny. Jednotlivé sacharidy byly spotřebovávány *B. cepacia* postupně, nicméně glukóza a celobióza byly bakterií využívány nejrychleji.

Po ukončení kultivace byla provedena základní charakterizace připraveného polymeru. Molekulová hmotnost izolovaného polymeru byla $2,62 \cdot 10^5$ s indexem polydisperzity 3,33. Teplota tání polymeru získaného kultivací *B. cepacia* na kávovém hydrolyzátu byla 170,2 a 162,3 °C, což odpovídá charakteristikám kopolymeru P(3HB-co-3HV) (Kap.1.5.1). Dvě teploty tání svědčí o tom, že je získaný biopolymer tvořen z blendy PHB a kopolymeru P(3HB-co-3HV).

V souvislosti s předchozími experimenty, kdy byla zjištěna schopnost akumulace kopolymeru P(3HB-co-3HV) u *B. cepacia* v přítomnosti kyseliny levulové, bylo přistoupeno k dalším experimentům zaměřených na testování dalších prekurzorů. Vzhledem k výraznému zlepšení mechanických a technologických vlastností PHA se zvyšujícím se zastoupením 3HV v kopolymeru, byla snaha zvýšit obsah 3HV použitím následujících prekurzorů: kyselina levulová, propanol a propionát sodný. Vybrané prekurzory byly do média přidány v koncentraci 5 g/l. K produkci bylo využito SCGH (150 g/l). Monitorována byla produkce kopolymeru, obsah 3HV v polymeru, růst biomasy, ale také spotřeba sacharidů z média a tedy i vliv přídavku prekurzoru na klíčový biotechnologický parametr – výtěžnostní koeficient $Y_{P/S}$.

Tabulka 28: Produkce PHA *B. cepacia* s využitím SCGH a prekurzorů pro produkci 3HV

Prekurzor	Biomasa [g/l]	PHA	PHA	3HV	Spotřeba sacharidů	$Y_{P/S}$
		[hmot. %]	[g/l]	[mol. %]	[g/l]	
Kontrola	4,82 ± 0,39	61,89 ± 0,17	2,98 ± 0,31	4,2 ± 0,1	11,2	0,27
Levulová kys.	1,72 ± 0,08	56,65 ± 4,34	0,97 ± 0,09	30,4 ± 0,1	7,82	0,12
Propionát	1,35 ± 0,10	45,00 ± 3,75	0,61 ± 0,15	56,8 ± 2,0	8,71	0,07
Propanol	1,00 ± 0,08	36,06 ± 0,79	0,36 ± 0,03	45,2 ± 1,9	6,72	0,05

Přídavkem prekurzorů k médiu obsahující 30 obj. % SCGH došlo k výraznému zvýšení obsahu 3HV v kopolymeru, zejména pak v případě propionátu, kde dosáhla koncentrace 3HV až 56,8 mol. %. Na druhou stranu, vzhledem k nízkým výtěžkům biomasy lze předpokládat, že použité prekurzory v koncentraci 5 g/l jsou v tomto množství pro *B. cepacia* toxické a výrazně inhibují její růst. Nejvyšší míra inhibice byla zaznamenána v případě, kdy byl jako prekurzor použit propanol (Tabulka 28). Výtěžek PHA klesl více než 8násobně (0,36 g/l) v porovnání s kontrolní kultivací (2,98 g/l). Naopak nejnižší toxický efekt byl zaznamenán při použití kyseliny levulové, ale i v tomto případě byly výtěžky významně nižší, v porovnání s kontrolní kultivací. Použitím prekurzorů v koncentraci 5 g/l lze dosáhnout akumulace polymeru, který obsahuje relativně vysoký podíl 3HV, což bezesporu významně zlepšuje mechanické vlastnosti kopolymeru. Na druhou stranu, díky inhibičnímu efektu použitých prekurzorů na růst biomasy a produkci PHA je otázkou, zda může vysoký obsah 3HV kompenzovat až 8násobně nižší výtěžky polymeru.

Díky výsledkům získaným z předchozího experimentu (Tabulka 27), kdy byl růst buněk inhibován vysokou koncentrací polyfenolických látek v médiu, byly další experimenty zaměřeny na detoxifikaci kávového hydrolyzátu. Možnosti detoxifikace lignocelulóзовých materiálu jsou popsány v kapitole 1.5.2.5. Hydrolyzát kávové sedliny byl detoxifikován několika způsoby, i) pomocí extrakce polyfenolů před hydrolyzou kávové sedliny, ii) postupem „overliming“ z již připraveného hydrolyzátu, iii) aplikací aktivního uhlí v již připraveném hydrolyzátu. Účinnost eliminace polyfenolických látek pro jednotlivé detoxifikační postupy je uvedena v Tabulka 22. Kromě odstranění polyfenolických látek z média byl zkoumán vliv detoxifikace na obsah celkových sacharidů v hydrolyzátu. Veškeré detoxifikované hydrolyzáty kávové sedliny byly použity stejně jako v předchozích experimentech k produkci PHA. Produkční médium obsahovalo 30 obj. % SCGH, k produkci byla použita *B. cepacia*.

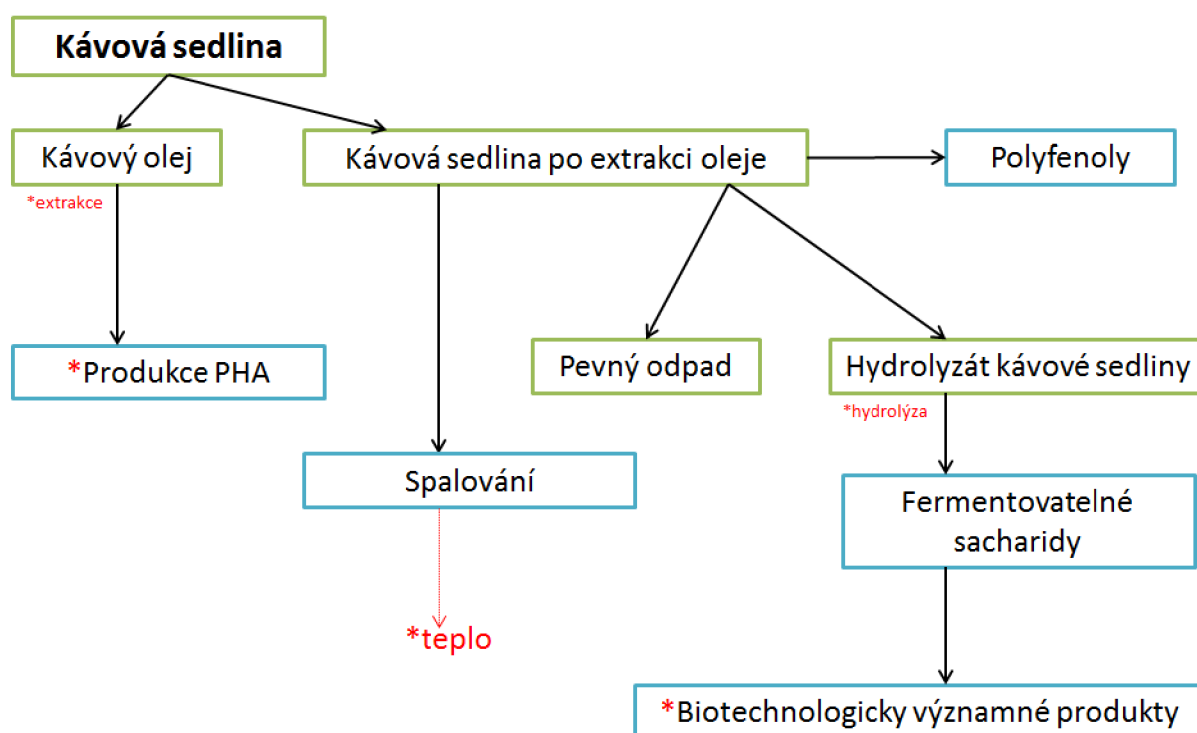
Tabulka 29: Vliv detoxifikace SCGH na produkci PHA u *B. cepacia*

	Biomasa [g /l]	PHA [hmot. %]	PHA [g/l]	3HV [mol. %]	Spotřeba sacharidů [g /l]	Y _{PHS}
Kontrola	5,42 ± 0,48	49,08 ± 0,70	2,66 ± 0,24	8,1 ± 0,8	9,77	0,27
EtOH 0%	4,86 ± 0,23	52,37 ± 2,47	2,54 ± 0,17	5,6 ± 0,4	12,83	0,2
EtOH 30%	5,49 ± 0,40	56,01 ± 1,79	3,08 ± 0,24	4,2 ± 0,2	12,97	0,24
EtOH 45%	5,20 ± 0,32	49,99 ± 3,20	2,60 ± 0,23	6,0 ± 0,7	10,83	0,24
EtOH 60%	5,02 ± 0,32	51,33 ± 4,80	2,58 ± 0,29	5,1 ± 0,6	10,45	0,25
Aktivní uhlí	4,78 ± 0,34	56,79 ± 0,54	2,72 ± 0,19	6,1 ± 0,5	10,45	0,26
Overliming	7,40 ± 0,47	23,47 ± 6,56	1,74 ± 0,50	11,6 ± 0,5	6,77	0,26

Aplikací detoxifikačních metod na hydrolyzát kávové sedliny došlo k výraznému snížení koncentrace polyfenolů u všech použitých postupů, nicméně nejúčinnější metoda pro detoxifikaci hydrolyzátu bylo použití aktivního uhlí (Tabulka 29). Na druhou stranu, po detoxifikaci SCGH touto metodou byl v hydrolyzátu detekován rapidní úbytek sacharidů 19,3 – 34,6 %. Je pravděpodobné, že kromě extrakce inhibičně působících látek došlo k extrakci také části sacharidů z SCGH. Extrakce polyfenolů z kávové sedliny před samotnou hydrolyzou ethanolem o koncentraci v rozmezí od 30-60 % proběhla s účinností eliminace od 18,3 % do 36,9 %. Veškeré uvedené metody detoxifikace snížily také obsah kyseliny levulové (od 5,2 % do 64,8 %) a 5HMF (od 10,2 % do 84,3 %). Detoxifikované kávové hydrolyzáty byly použity jako substrát pro kultivaci *B. cepacia* v baňkových experimentech. Použitím hydrolyzátu, kde byly polyfenoly extrahovány z kávové sedliny před její hydrolyzou 30% ethanolem, došlo k zvýšení produkce biomasy (5,49 g/l) a PHA (3,08 g/l) oproti kontrolní kultivaci až o 25 %. Možnost extrakce polyfenolických látek z kávové sedliny před samotnou hydrolyzou není pozitivní jen v souvislosti navýšení produkce PHA na takto připraveném médiu. Navíc během detoxifikace vzniká cenný produkt - ethanolový extrakt bohatý zejména na kávové polyfenoly. Polyfenoly kávy jsou bohaté především na kyselinu chlorogenovou a její deriváty a nachází řadu potenciálních aplikací především v oblasti medicíny a kosmetiky. Vliv kyseliny chlorogenové a jejích derivátů na zdraví je spojeno především se snížením rizika kardiovaskulárních onemocnění, preventivně působí také proti onemocněním cukrovkou (typ 2), nebo Alzheimerovou chorobou (Farah, 2008).

Polyfenolické látky jsou v kosmetickém průmyslu mimo jiné využívány ve formě krémů a emulzí, které chrání pokožku před vnějšími vlivy a zlepšují její stav. Přítomnost polyfenolických látek může zároveň pozitivně působit na stabilitu a trvanlivost kosmetických produktů, zvláště pak emulzí. Vedle výživy pokožky jsou polyfenolické látky zodpovědné za fotoprotektivní účinky, některé studie se zabývají také vlivem polyfenolických látek proti stárnutí pokožky (Zillich, 2015).

Kávová sedlina je odpadním materiálem, který zapadá do konceptu biorafinérie. Vstupní surovina (kávová sedlina) by měla být zpracována vhodným způsobem tak aby došlo k produkci řady produktů s přidanou hodnotou a zároveň generaci energie (Kap.1.5.2.4). Využití kávové sedliny jako substrátu pro biotechnologické produkce, představuje možnost zpracování odpadní biomasy do atraktivních produktů, jakými mohou být právě PHA (Obrázek 13).



Obrázek 13: Zpracování kávové sedliny v konceptu biorafinérie

Odpad v podobě kávové sedliny je ve velkém množství získáván zejména při přípravě instantní kávy. Extrakcí oleje z kávové sedliny, který může sloužit jako substrát pro produkci PHA (Kap.4.3.1.2) získáme kávový odpad, jehož hydrolýzou je možno generovat celou řadu produktů. Hydrolyzát je bohatý zejména na sacharidy, produkty vedlejších reakcí mohou být také kyselina levulová nebo furfuraly. Dalším produktem generovaným při zpracování kávové sedliny mohou být polyfenoly, které se ve vysokých koncentracích uvolňují při hydrolýze (Zuorro, 2012). Díky inhibičnímu účinku polyfenolů na většinu mikroorganismů je jejich odstranění z hydrolyzátu žádoucí a získává se tak atraktivní produkt s možným využitím v oblasti farmacie a kosmetologie. Hydrolyzát kávové sedliny může být využit pro produkci PHA, jak bylo uvedeno výše (Kap.4.3.1.1), ale také pro celou řadu dalších biotechnologických produkcí využívající jako zdroj uhlíku sacharidy. Hydrolyzovaná kávová sedlina může například sloužit jako zdroj uhlíku pro produkci karotenoidů kvasinkami (Petrik, 2014). Možná je také produkce bioethanolu a biodieslu (Kwon, 2013).

Díky vysokému spalnému teplu kávové sedliny lze generovat také velké množství energie (Silva, 1998). Pevný odpad představující kávovou sedlinu zbavenou oleje a po hydrolyze může být využit k zisku energie spálením, která může do určité míry pokrýt energetické nároky technologického procesu.

4.3.1.2 *Produkce PHA s využitím oleje z kávové sedliny*

Díky analýzám, které byly provedeny v rámci charakterizace kávové sedliny (Kap.4.1.2), byl zjištěn překvapivě vysoký obsah oleje v kávové sedlině (15–20 %). Vzhledem k schopnosti *C. necator* produkovat PHA v relativně velkých výtěžcích pokud je jako substrát použit olej (Tabulka 11), byl za tímto účelem testován olej získaný extrakcí z kávové sedliny. K extrakci oleje z kávové sedliny byl jako rozpouštědlo použit hexan. Charakterizace získaného oleje včetně profilu složení mastných kyselin je uvedena v kapitole 4.1.3.

Tabulka 30: Porovnání produkci PHA *C. necator* s využitím různých rostlinných olejů

	Biomasa [g/l]	PHA [hmot. %]	PHA [g/l]	Číslo kyselosti
Odpadní fritovací řepkový olej	10,8 ± 0,2	67,9 ± 1,9	7,3 ± 0,2	3
Odpadní fritovací palmový olej	11,9 ± 0,6	58,0 ± 0,7	6,9 ± 0,4	3,4
Odpadní fritovací slunečnicový olej	10,8 ± 1,7	52,4 ± 3,5	5,7 ± 1,0	2,7
Řepkový olej	13,4 ± 0,2	61,8 ± 1,9	8,3 ± 0,3	5,6
Olej z kávové sedliny	14,2 ± 0,5	70,3 ± 0,8	10,0 ± 0,3	7,1

V rámci dalšího experimentu byl olej vyextrahovaný z kávové sedliny porovnán s dalšími levnými rostlinnými oleji co do vhodnosti využití jako substrátu pro produkci PHA pomocí *C. necator* H16. (Tabulka 30). Kultivace byly provedeny v Erlenmeyerových baňkách. Z hlediska biomasy byla nejvyšší koncentrace zaznamenána v případě, kdy byl jako substrát použit olej z odpadní kávy (14,2 g/l), v tomto případě došlo také k zisku nejvyšších výtěžků PHA. Relativně vysoká koncentrace biomasy byla získána kultivací s řepkovým olejem. Při použití odpadních fritovacích olejů se koncentraci biomasy pohyboval od 10,8 – 11,9 g/l. Zdá se, že produkce biomasy může souviset s číslem kyselosti, respektive přítomností volných mastných kyselin. Tedy čím vyšší bylo číslo kyselosti, tím vyšší koncentrace biomasy, respektive PHA bylo dosaženo (Kap.1.5.2.5). V dalším experimentu byl proto kávový olej míchán s odpadním fritovacím řepkovým olejem v různých poměrech. Koncentrace biomasy a PHA rostla se zvyšujícím se zastoupením kávového oleje (10,1 – 13,6 g/l). Podobný trend jako u biomasy byl zaznamenán také u produkce PHA, koncentrace PHA se zvyšovala se zvyšujícím se obsahem kávového oleje v médiu (Tabulka 31).

Z experimentu je patrné, že pro produkci lze kombinovat různé zdroje olejů, které mohou sloužit jako slibný substrát pro produkci PHA. Vzhledem k relativně vysokým výtěžkům biomasy a PHA, byla kultivace *C. necator* s využitím kávového oleje jako zdroje uhlíku otestována v 2l laboratorním fermentoru.

Pro vsádkovou produkci PHA, byl jako substrát využit kávový olej v koncentraci 30 g/l. Po 40 hodinách kultivace dosáhla koncentrace biomasy v médiu 29,4 g/l. Obsah PHA v biomase byl 90,1 hmot. %, koncentrace PHA dosáhla 26,5 g/l.

Tabulka 31: Přehled produkce PHA *C. necator* s využitím směsi kávového a odpadního řepkového oleje jako zdroje uhlíku v různých poměrech

Odpadní fritovací řepkový olej [hmot. %]	Kávový olej [hmot. %]	Biomasa [g/l]	Obsah PHA [hmot. %]	PHA [g/l]
100	0	10,1 ± 0,2	69,2 ± 1,5	7,0 ± 0,2
75	25	11,4 ± 0,3	67,4 ± 2,3	7,7 ± 0,3
50	50	11,3 ± 0,2	73,8 ± 1,4	8,4 ± 0,2
25	75	12,4 ± 0,3	71,2 ± 2,3	8,9 ± 0,4
0	100	13,6 ± 0,1	75,6 ± 0,8	10,3 ± 0,1

V laboratorním fermentoru byla také testována možnost fed-batch kultivace, a to za účelem zvýšení produktivity biotechnologického procesu. Na počátku kultivace bylo do reaktoru přivedeno, tak jako v předchozím případě, 30 g/l kávového oleje. Po 14 hodinách kultivace byl přidán olej v koncentraci 20 g/l, zároveň se zdrojem dusíku – síranem amonným (3 g/l). Poslední dávka oleje byla přidána v 20. hodině kultivace, olej byl přidán v koncentraci 10 g/l. Celková koncentrace substrátu v reaktoru tvořila 60 g/l. Výtěžek biomasy u takto nastaveného procesu kultivace dosáhl 55 g/l s obsahem PHA 89,1 %, o koncentraci PHA 49,4 g/l.

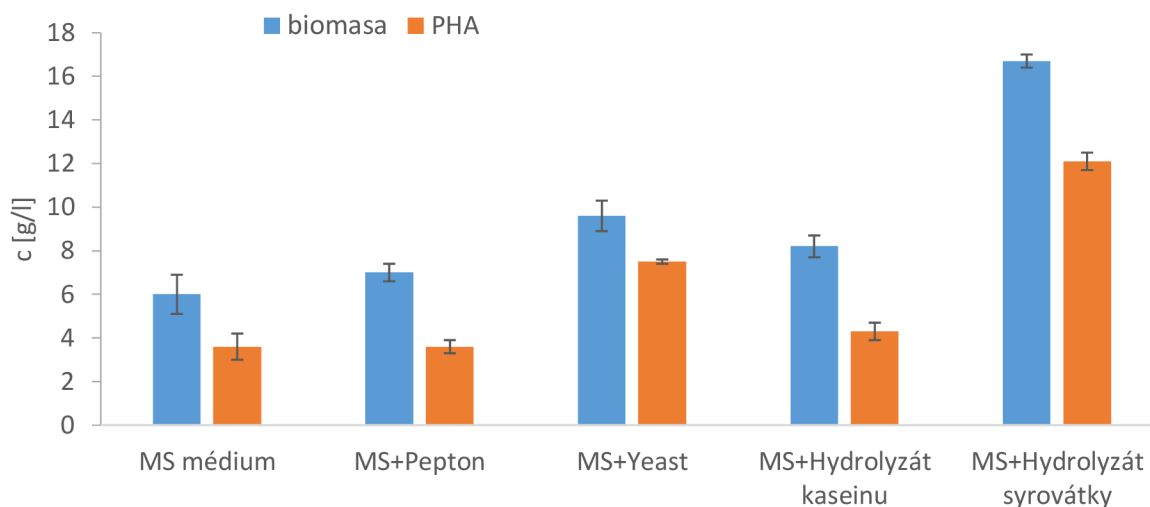
Vsádkovou kultivací bylo dosaženo vyššího výtěžku biomasy oproti fed-batch modu. Na druhou stranu, fed-batch kultivací bylo dosaženo výrazně vyššího výtěžku PHA a také objemové produktivity (0,66 g/(l.h) vsádkově, 1,33 g/(l.h) fed-batch). PHB z fed-batch kultivace mělo také vyšší molekulovou hmotnost ($M_w=4,74 \cdot 10^5$) v porovnání s vsádkovou kultivací ($M_w=4,27 \cdot 10^5$) (Obruca, 2014).

4.3.2 Produkce PHA s využitím syrovátky jako zdroje dusíku

Syrovátka představuje, jako odpad potravinářského průmyslu, závažný ekologický problém. Z celkového objemu mléka použitého k výrobě sýra tvoří syrovátka až 90 %. V suchém stavu obsahuje především laktózu, je také významným zdrojem proteinů (Kap.4.1.4). Hydrolýzou syrovátkových proteinů je možné získat relativně vysokou koncentraci aminokyselin (Mollea, 2013).

Na základě vysokého obsahu proteinů byla syrovátka v následujících experimentech využita jako alternativní komplexní zdroj dusíku pro produkci PHA na odpadním fritovacím oleji. V prvním experimentu byl zkoumán vliv syrovátky na růst biomasy *C. necator* a produkci PHA, v porovnání s ostatními použitými komplexními zdroji dusíku jako je pepton, kvasničný extrakt, nebo enzymaticky hydrolyzovaný kasein. Přidáním všech komplexních zdrojů dusíku do minerálního média (MS) došlo ke zvýšení produkce biomasy ve srovnání s minerálním médiem bez obsahu dusíku (Kap.3.5.2).

Vliv zdroje dusíku

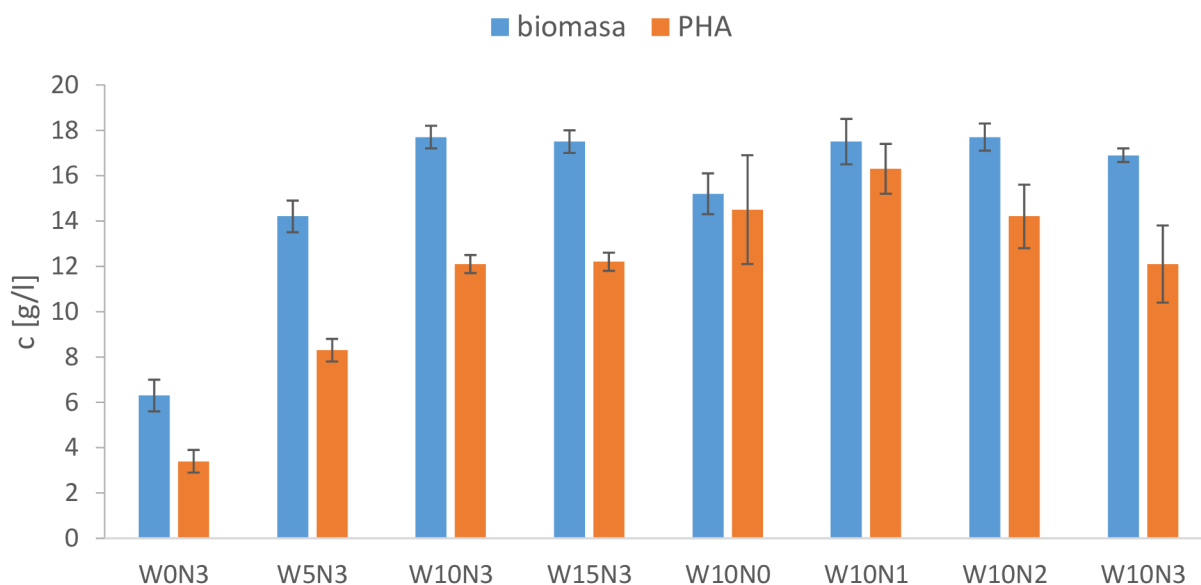


Graf 13: Přehled produkce PHA *C. necator* s využitím různých zdrojů dusíku

Přídavkem všech testovaných komplexních zdrojů dusíku došlo k podpoře růstu biomasy, v porovnání s MS médiem. Nejvyšší koncentrace biomasy byla stanovena v médiu obsahujícím proteolyticky hydrolyzovanou syrovátku jako komplexní zdroj dusíku (16,7 g/l). Z hlediska produkce PHA bylo taktéž dosaženo nejlepších výtěžků použitím hydrolyzátu syrovátky (12,1 g/l), kdy produkce PHA byla až 2,5násobně vyšší, v porovnání s MS médiem (Graf 13). Ve srovnání s ostatními zdroji dusíku je syrovátka také z ekonomického hlediska nejvýhodnější, jelikož se jedná o odpadní látku vznikající při výrobě sýra a je produkována v dostatečném objemu (Mollea, 2013).

Další experimenty byly zaměřeny na optimalizaci obsahu syrovátky v MS médiu, s využitím odpadního fritovacího oleje jako zdroje uhlíku o koncentraci 20 g/l. Proteázou hydrolyzovaná syrovátka byla do MS média přidávána v množství 5, 10 a 15 obj. %. Nejvyšší výtěžek biomasy (17,7 g/l) byl získán, pokud bylo nahrazeno 10 % média proteolyticky hydrolyzovanou syrovátkou. Přídavek syrovátky zvýšil produkci nejen biomasy, ale také výrazně podpořil produkci PHB, a to více než 3,5krát. Na základě těchto kultivací, byla testována možnost využití syrovátky jako náhrady části síranu amonného z MS média.

Syrovátka/síran amonný



W0 – 15 – procentuální objem syrovátky, kterou byla nahrazena část MS média (0 – 15 obj. %)

N1 – 3 koncentrace použitého síranu amonného v MS médiu (1 – 3 g/l)

Graf 14: Růst a produkce PHA C. necator, MS médium obohaceno různým obsahem syrovátky a síranu amonného

Dle výsledků experimentů v Graf 14 lze konstatovat, že syrovátka je vhodným komplexním zdrojem dusíku pro produkci PHA, kde byl odpadní olej využit jako zdroj uhlíku. Kultivací bez přítomnosti síranu amonného v MS médiu a s přidavkem 10 obj. % syrovátky, bylo dosaženo koncentrace biomasy 15,2 g/l s obsahem PHA 95 % a výtěžkem PHA 14,5 g/l. V případě, kdy byl k syrovátce (10 obj. %) přidán 1 g/l síranu amonného, došlo k dalšímu zvýšení produkce biomasy na 17,2 g/l s obsahem PHA 92,9 %, výtěžek PHA byl 16,3 g/l. V případě přidání 3 a 2 g/l síranu amonného k minerálnímu médiu obsahujícímu 10 obj. % syrovátky, došlo naopak k poklesu produkce PHA v porovnání s aplikací 1 g/l síranu amonného. Minerální médium obsahující 1 g/l síranu amonného, kde bylo 10 % objemu média nahrazeno proteázou hydrolyzovanou syrovátkou, bylo vzhledem k produkci PHA (Graf 14) vyhodnoceno jako optimální.

Vliv syrovátky na inkorporaci PHA byl testován také v laboratorním fermentoru. Podobně jako v baňkových experimentech došlo k výrazné podpoře růstu biomasy a produkci PHA, přidáním 10 obj. % syrovátky do média se sníženou koncentrací síranu amonného 1 g/l, v porovnání s kontrolní kultivací (bez syrovátky, síran amonný 3 g/l). Přidáním syrovátky do média došlo k zvýšení výtěžku PHA až o 40 % (Tabulka 32). Výtěžnostní koeficient produktu byl u kontrolní kultivace 0,67 g PHA na g odpadního oleje, přítomnost syrovátky zlepšila efektivitu utilizace oleje, výtěžnostní koeficient produktu dosáhl 0,94 g PHA na g odpadního oleje.

Tabulka 32: Výtěžky kultivace *C. necator* ve fermentoru s obsahem 10 % hydrolyzátu syrovátky

	Kontrola	Syrovátka 10 %
biomasa [g/l]	25,4 ± 0,9	31,0 ± 0,7
PHB [hmot. %]	79,2 ± 4,2	90,5 ± 1,9
PHB [g/l]	20,1 ± 1,2	28,1 ± 0,9
M_w	5,77 · 10 ⁵	5,57 · 10 ⁵
M_w/M_n	1	2,4
Y_{X/S}	0,85	1,3
Y_{P/S}	0,67	0,94
objemová produktivita [g/ (l h)]	0,69	0,96

Kontrola – síran amonný 3 g/l, 30 g/l odpadní fritovací olej

Syrovátka 10 % - síran amonný 1 g/l, hydrolyzovaná syrovátka 10 obj. %, 30 g/l odpadní fritovací olej

Proteolyticky hydrolyzovaná syrovátka může být využita jako vynikající komplexní zdroj dusíku, výrazně zlepšující produkci PHA na odpadním oleji. Jelikož *C. necator* není schopen využít sacharidy, které jsou přítomny v hydrolyzátu syrovátky, můžeme předpokládat, že za pozitivní vliv na bakteriální růst jsou především zodpovědné aminokyseliny a oligopeptidy, představující komplexní zdroj dusíku. Dalšími složkami pozitivně ovlivňujícími produkci PHA a biomasy mohou být vitamíny, které se v syrovátce také nacházejí (Davoodi, 2013). Syrovátkový hydrolyzát také působí jako emulzifikátor oleje, což pozitivně ovlivňuje možnost využití oleje lipázami (Budde, 2011).

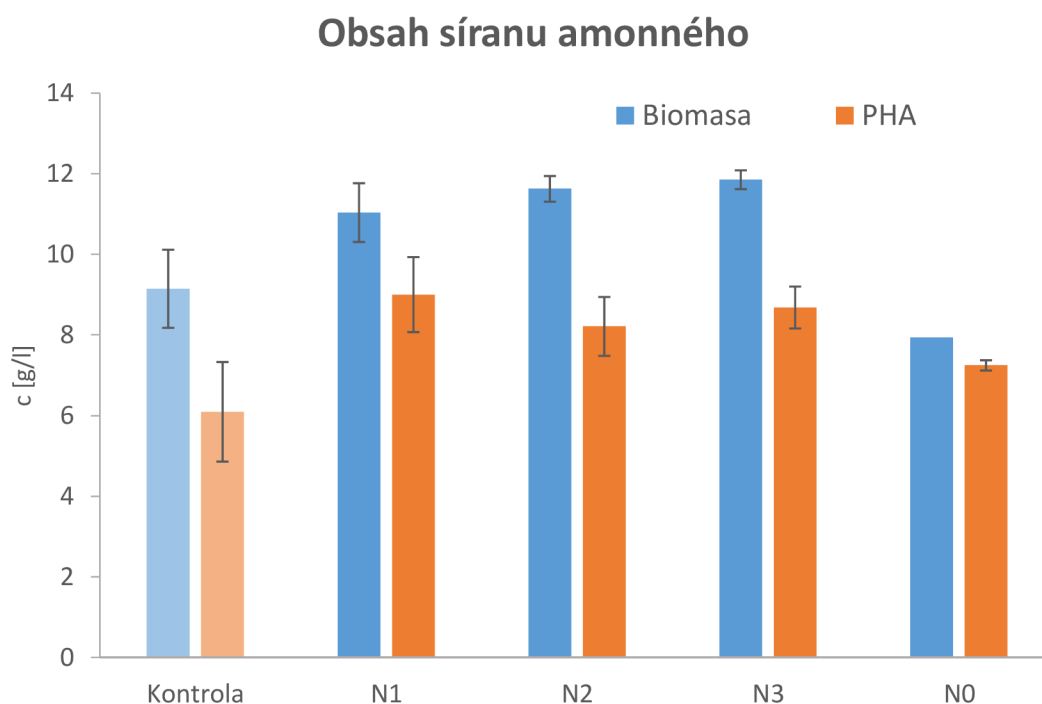
4.3.3 Produkce PHA s využitím hydrolyzátu peří jako zdroje dusíku

Pro snížení celkové ceny biotechnologické produkce celé řady produktů je snaha využívat odpadních materiálů, které slouží především jako zdroj uhlíku. Další významné náklady jsou spojeny s cenou minerálního média, zvláště pak zdrojem dusíku (Chen, 2010).

Kuřecí peří je složeno z více než 90 % z proteinů, jeho hlavní složky jsou keratin, fibrilární nerozpustné proteiny propojené disulfidickými můstky (Gessesse, 2003). Peří představuje až 10 % z celkové váhy kuřete. Ročně je celosvětově produkováno 7,7 x 10⁸ kg peří jako odpad pocházející z jatek (Taskin, 2011). Jedním z možných využití peří je jeho uplatnění pro zemědělské účely, jako hnojivo (Jayathilakan 2012). Hydrolyzáty peří mohou být využity pro výrobu methanu nebo palivových pelet, možné je také využití jako doplňku krmiva pro zvířata (Dudynski 2012). Další možnost využití peří je pro mikrobiální produkci keratináz. Pouze několik studií se zabývá využitím hydrolyzátu peří jako možné náhrady dusíkatého zdroje kultivačních médií (Taskin, 2011b). Vzhledem k nízké ceně a omezeným možnostem průmyslových aplikací peří je s tímto materiálem nakládáno převážně jako s odpadem, který je často likvidován ve spalovnách (Reddy, 2015).

V následujících experimentech byla testována možnost využití hydrolyzátu kuřecího peří (FH) podobně jako v předchozích experimentech s proteolyticky hydrolyzovanou syrovátkou, tedy jako komplexního zdroje dusíku pro produkci PHA pomocí *C. necator* přičemž jako uhlíkatý substrát byl opět využit odpadní fritovací olej. V prvním experimentu připravený hydrolyzát peří (Kap.3.3.1.2) zaujímal 10 obj. % minerálního média a zároveň byl testován

přídavek různého množství anorganického zdroje dusíku – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Kultivace probíhaly standardně v Erlenmeyerových baňkách (Kap.3.5.2).



N (0 – 3) – množství síranu amonného v minerálním médiu (g/l)

Graf 15: Produkce PHA a biomasy C. necator v minerálním médiu obsahující 10 obj. % hydrolyzátu peří (40 g/l) a odpadní fritovací olej (30 g/l)

Kultivací *C. necator*, s přidavkem hydrolyzátu peří bylo dosaženo výrazně vyšší koncentrace biomasy (11,85 g/l) v porovnání s kultivací kontrolní (9,15 g/l), tj. bez přidavku hydrolyzátu peří. Přítomností hydrolyzátu peří v médiu došlo také ke zvýšení produkce PHA až na 8,68 g/l, koncentrace PHA u kontrolní kultivace byla 6,09 g/l. V případě, kdy byl obsah síranu amonného z minerálního média snižen na koncentraci 1 a 2 g/l a přidáno 10 obj. % hydrolyzátu peří (přípraveného hydrolyzou 40 g/l peří), došlo k nárůstu koncentrace biomasy a PHA. Nejvyšší produkce PHA byla zaznamenána v případě, kdy byl snižen obsah síranu amonného v minerálním médiu na 1 g/l (9,0 g/l), výtěžek biomasy dosáhl 11,04 g/l s obsahem PHA 81,46 %. Obdobných výsledků bylo dosaženo přidavkem 3 g/l síranu amonného, nicméně vzhledem k vyšším výtěžkům PHA byla pro další experimenty zvolena koncentrace síranu amonného 1 g/l. Velice podobný výsledek byl získán v předchozím experimentu uvedeném v kapitole 4.3.2, kdy byla do produkčního média přidávána proteázou hydrolyzovaná syrovátka (10 obj. %). Nejvyššího výtěžku PHA bylo taktéž dosaženo, pokud byl v médiu obohaceném o proteázou hydrolyzovanou syrovátku snižen obsah síranu amonného na koncentraci 1 g/l. Zdá se, že pokud je produkční médium pro *C. necator* obohaceno komplexním zdrojem dusíku, je z hlediska produkce PHA optimální obsah anorganického dusíku v médiu 1 g/l.

Pro předchozí experimenty byl použit hydrolyzát peří o koncentraci 40 g/l, bylo tedy nutné zaměřit se na vliv koncentrace peří v hydrolyzátu na produkci PHA. Pro tento účel byly

připraveny hydrolyzáty s obsahem peří v rozmezí od 20 – 60 g/l, které byly využity jako komplexní zdroj dusíku v minerálním médiu. Experimenty byly prováděny se sníženým obsahem síranu amonného (1 g/l) a bez jeho přidavku, hydrolyzát peří byl do média přidáván v množství 10 obj. %.

Tabulka 33: Vliv koncentrace peří použitého pro hydrolyzu na produkci PHA *C. necator*

(NH ₄) ₂ SO ₄ /FH	Biomasa [g/l]	PHA [%]	PHA [g/l]
N1/20	10,35 ± 1,02	86,23 ± 3,29	8,93 ± 0,23
N1/30	11,92 ± 1,25	84,42 ± 0,56	10,06 ± 0,05
N1/40	10,40 ± 0,96	80,13 ± 5,89	8,33 ± 0,43
N1/50	12,77 ± 1,54	80,27 ± 2,03	10,25 ± 0,18
N1/60	12,45 ± 0,87	85,08 ± 0,34	10,59 ± 0,03
N1/0	8,54 ± 0,88	90,73 ± 0,90	7,75 ± 0,05
N0/20	5,93 ± 0,26	83,37 ± 6,19	4,94 ± 0,34
N0/30	6,36 ± 0,78	92,24 ± 1,52	5,86 ± 0,07
N0/40	8,28 ± 1,04	87,94 ± 0,27	7,28 ± 0,02
N0/50	7,05 ± 0,64	94,00 ± 5,41	6,62 ± 0,27
N0/60	9,45 ± 1,31	86,33 ± 0,85	8,15 ± 0,06
N3/0	9,63 ± 0,89	71,79 ± 2,30	6,91 ± 0,16

N (0 – 1) – množství síranu amonného v minerálním médiu (0 – 1 g/l)

FH – „feather hydrolysate“, hydrolyzát peří

Výrazně lepších výsledků bylo dosaženo v případě, kdy byl do minerálního média přidán 1 g/l síranu amonného. Zvyšující se koncentrace peří použitá pro přípravu hydrolyzátů, pozitivně ovlivňovala růst biomasy a produkci PHA (Tabulka 33). Nejvyšších výtěžků biomasy a PHA bylo dosaženo použitím 10 obj. % hydrolyzátu peří o koncentraci 60 g/l a to 12,45 g/l biomasy a 10,59 g/l PHA. Přídavkem hydrolyzátu peří o koncentraci 60 g/l k médiu bez obsahu jiného zdroje dusíku, bylo dosaženo stejné koncentrace biomasy a vyššího výtěžku PHA 8,15 g/l, v porovnání se standardní kontrolní kultivací (6,91 g/l PHA) (bez peří, 3 g/l síranu amonného).

V předchozích studiích produkce PHA na kávovém odpadním oleji (Kap.4.3.1.2, Tabulka 28) byl testován vliv prekurzorů na inkorporaci kopolymeru P(3HB-co-3HV) v buňce. Možnost produkce kopolymeru byla zkoumána v případě kultivace *C. necator* na odpadním fritovacím oleji, kde byla část síranu amonného v médiu nahrazena hydrolyzátem peří. Jako prekurzor byl zvolen propionát sodný, kyselina valerová a propanol, které byly do média přidávány v koncentraci 3 g/l ve 24. hodině kultivace v produkčním médiu. Obsah síranu amonného v minerálním médiu byl dle předchozí optimalizace snížen na 1 g/l a do produkčního média bylo přidáno 10 obj. % hydrolyzátu peří s výchozí koncentrací 60 g/l (Tabulka 33).

Přítomnost peří jako zdroje dusíku v minerálním médiu měl pozitivní efekt na inkorporaci 3HV v případě, kdy byla jako prekurzor využita kyselina valerová (Tabulka 34). V kontrolní kultivaci (bez peří) nebyl, v případě použití kyseliny valerové jako prekurzoru, 3HV detekován vůbec.

Tabulka 34: Vliv hydrolyzátu kuřecího peří na akumulaci 3HV v přítomnosti prekurzorů

	Prekurzor	Biomasa [g/l]	PHA [%]	PHA [g/l]	3HV [mol. %]
FH (10 %)/N1	kontrola	12,12 ± 0,24	91,61 ± 1,14	9,53 ± 0,07	<i>n.d.</i>
	propanol	4,24 ± 0,18	79,38 ± 2,06	3,27 ± 0,06	12,72 ± 0,21
	kys, valerová	8,79 ± 0,16	68,34 ± 3,21	5,98 ± 0,28	6,93 ± 0,15
	propionát sodný	10,24 ± 0,01	85,67 ± 0,76	10,42 ± 0,40	37,68 ± 0,56
N3	kontrola	10,48 ± 0,33	69,65 ± 1,08	7,28 ± 0,25	<i>n.d.</i>
	propanol	4,72 ± 0,03	74,56 ± 3,41	3,50 ± 0,14	14,85 ± 0,74
	kys, valerová	8,21 ± 0,10	63,17 ± 1,26	5,19 ± 0,03	<i>n.d.</i>
	propionát sodný	8,40 ± 0,33	75,68 ± 0,46	6,41 ± 0,39	23,21 ± 1,02

n.d. – nebylo detekováno

Dále bylo dosaženo velice dobrých výtěžků kopolymeru P(3HB-co-3HV) s použitím propionátu sodného a 10 obj. % hydrolyzátu kuřecího peří. Výtěžek biomasy v tomto případě dosahoval podobných hodnot, jako u kontrolní kultivace bez hydrolyzátu kuřecího peří. Nicméně nejvyšší výtěžek PHA byl získán použitím propionátu sodného s hydrolyzátem peří (10,42 g/l), jehož přítomností došlo k zvýšení efektivity utilizace propionátu a s tím související syntézy 3HV. V případě použití propionátu bylo dosaženo koncentrace 37,68 mol. % 3HV. Na závěr lze konstatovat, že přítomnost hydrolyzátu peří v produkčním médiu obsahující prekurzory stimuluje inkorporaci 3HV, přičemž dochází k vzniku kopolymeru P(3HB-co-3HV) jehož vlastnosti jsou z technologického hlediska lepší (pružnost, pevnost, teplota tání) než u homopolymeru PHB. Obecně došlo k zisku vyšších výtěžků PHA v médiu obsahujícím hydrolyzáty peří a prekurzory, propionát a kyselinu valerovou. Je velmi pravděpodobné, že přítomnost komplexního zdroje dusíku v podobě hydrolyzátu peří v médiu snižuje toxický efekt prekurzorů.

Hydrolyzáty peří, bohatý zdroj minerálů a dusíkatých látek v podobě proteinů a aminokyselin, je vhodným komplexním zdrojem dusíku, s pozitivním efektem na produkci biomasy a PHA. Tento trend, kdy bylo použitím hydrolyzátu kuřecího peří jako komplexního zdroje dusíku dosaženo vyšších výtěžků v některých biotechnologických procesech jako jsou například produkce xylanáz, kyseliny mléčné nebo glutathionu, byl potvrzen v několika studiích (Prakash, 2009), (Taskin, 2012), (Taskin, 2013). V porovnání s ostatními zdroji dusíku je peří odpadním materiálem snižujícím celkové náklady na biotechnologický proces, zároveň dochází k valorizaci odpadního materiálu (peří), který má jen omezené možnosti využití. Naopak, jeho eliminace představuje spíše ekologický, ekonomický i hygienický problém. V současnosti je peří využíváno především jako hnojivo, případně jako substrát pro produkci keratináz. Dále je peří využíváno k přípravě kompozitních materiálů – především pro stavební účely, vláken, scaffoldů, případně nano- a mikročástic. Nevýhodou jsou špatné termoplastické vlastnosti peří a obtížná rozpustnost keratinu, které limitují použití peří ve větším měřítku (Reddy, 2015). Naopak nízká cena, dobrá dostupnost a vhodné složení nahrávají využití peří jako komplexního zdroje dusíku pro biotechnologické účely.

4.4 Aplikace PHA

4.4.1 Vliv kávového oleje na antioxidační a antimikrobiální účinek částic

Na základě analýzy kávové sedliny (Tabulka 20), bylo zjištěno, že kávová sedlina obsahuje přibližně 15 – 20 % oleje. Extrahovaný olej byl mimo jiné použit také pro kultivaci *C. necator* a produkci PHA (Kap.4.3.1.2). Nicméně, v posledních letech rapidně vzrostl zájem o kávové produkty, zejména v oblasti kosmetiky a zdravé výživy. Jedním s atraktivních produktů je právě kávový olej, který je ceněn především pro obsah mastných kyselin, které mohou působit hydratačně, ale také jako ochrana před slunečním zářením. Relativně vysoký je také obsah diterpenů, které mohou mít protinádorové účinky (Esquivel, 2012). Vzhledem k relativně vysoké koncentraci polyfenolů a také oleje v kávové sedlině byl extrahovaný olej charakterizován z hlediska antioxidační aktivity (Tabulka 35) a také byl testován jeho antimikrobiální efekt (Tabulka 39). Z výše uvedených důvodů byla další část práce zaměřena na studium vlivu kávového oleje obsaženého v lipozomech na jejich antioxidační kapacitu a antimikrobiální účinky.

Tabulka 35: Antioxidační aktivita kávového oleje a oleje získaného z kávové sedliny

Vzorek	w(AA/TE)/(μg/ml)
olej - kávová sedlina	1170.6±6.7
olej - káva	1218.3±4.4

Charakterizován byl olej získaný z kávové sedliny, ale také olej extrahovaný z čerstvé kávy. Rozdíl hodnot antioxidačních aktivit byl u kávových olejů minimální (Tabulka 35).

V rámci přípravy částic, které neobsahovaly kávový olej, byly připraveny lipozomové částice a lipozomy obsahující 10 hmot. % PHB, pro porovnání byly připraveny také PHB částice. Srovnání bylo provedeno s důrazem na výslednou velikost a stabilitu částic.

Tabulka 36: Charakterizace lipozomů a PHB částic z hlediska stability a velikosti

Typ částic	d/nm	ζ-potenciál/mV
PHB	274,0	-44,6
Lipozomy-PHB	212,9	-46,3
Lipozomy	157,5	-35,2

Dle očekávání byla naměřena nejmenší průměrná velikost u lipozomů (157,5 nm), takto připravené částice byly také relativně stabilní, ale hodnota zeta potenciálu byla v porovnání s ostatními typy částic nejnižší (Tabulka 36). Zeta potenciál definuje elektroforetickou pohyblivost suspendovaných částic v roztoku. Dle obecného pravidla značí absolutní hodnota zeta potenciálu nad 60 mV vynikající stabilitu částic, hodnota v intervalu 60 - 30 mV pak udává dobrou stabilitu, hodnota 20 mV je přijatelná v případě krátkodobé stability a hodnoty menší než 5 mV značí již vysokou nestabilitu částic (Wu, 2011). Přídavkem PHB do lipozomů došlo k významnému zvýšení stability, a to nejen v porovnání s lipozomy, ale také v porovnání se samotnými PHB částicemi. Vlivem obsahu PHB došlo rovněž k mírnému

navýšení průměrné velikosti těchto částic na 212,9 nm. Hodnoty velikosti částic jsou uvedeny jako průměrná velikost částic z měření základní distribuce velikostí dle intenzity.

Na základě předchozích experimentů byly použity lipozomy a lipozomy s 10% obsahem PHB, u kterých byla zjištěna největší stabilita, k přípravě částic s obsahem kávového oleje. K oběma typům částic byl přidán kávový (odpadní) olej za účelem zvýšení antioxidační aktivity, testován byl také vliv oleje na antimikrobiální účinky částic (Tabulka 39).

Tabulka 37: Vliv typu částic a obsahu kávového (odpadního) oleje na jejich velikost a stabilitu

Typ částic	d/nm	PDI	ζ-potenciál/mV
lipozomy	182.3±0.6	0.238±0.007	-45.3±2.1
lipozomy-PHB částice	154.2±0.7	0.175±0.011	-47.8±0.9
lipozomy, 10% kávový olej	158.1±0.7	0.128±0.024	-27.6±1.2
lipozomy-PHB částice, 10% odpadní kávový olej	214.2±1.8	0.175±0.031	-40.2±0.3
lipozomy, 10% odpadní kávový olej	162.8±0.7	0.110±0.013	-26.3±0.9
lipozomy, 20% odpadní kávový olej	242.3±1.8	0.261±0.014	-50.2±0.5
lipozomy, 30% odpadní kávový olej	162.3±2.7	0.109±0.005	-30.1±0.0

U připravených částic s obsahem kávového oleje byla nejprve sledována jejich velikost společně s indexem polydisperzity (PDI). Hodnoty PDI 0,1 až 0,25 indikují úzké rozdělení velikosti, zatímco PDI větší než 0,5 naopak poukazuje na velmi širokou distribuci velikostí částic. Dle naměřených výsledků lze konstatovat, že obsah oleje na velikost částic nemá významný vliv (Tabulka 37). Průměrná velikost částic obsahující kávový olej se pohybovala v rozmezí od 158,1 – 242,3 nm. Lipozomy s obsahem PHB byly menší (154,2 nm) než částice, do kterých bylo přidáno 10 % oleje (214,2 nm). Z hlediska velikosti lipozomů s různým obsahem kávového oleje byly největší částice připraveny tehdy, pokud byl podíl oleje v lipozomu 20 %.

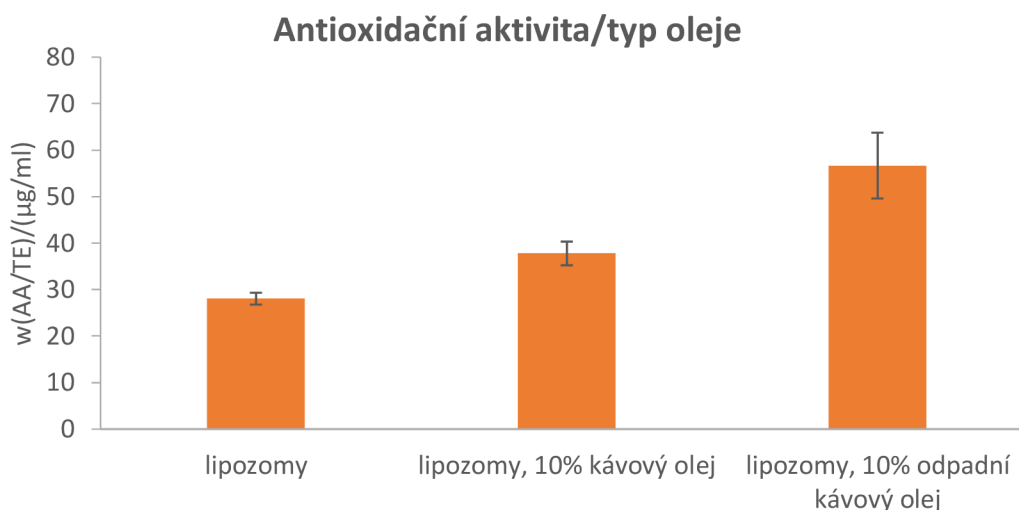
Částice byly testovány také z hlediska jejich koloidní stability, která byla stanovena hodnotou zeta potenciálu (Tabulka 37). Obecně lze říct, že u všech připravených částic bylo dosaženo dobré nebo velmi dobré stability. Při porovnání částic s obsahem oleje s částicemi bez kávového oleje byla většina připravených částic s olejem méně stabilní. Pouze v případě lipozomů obsahující 20 % odpadního kávového oleje, bylo ve srovnání s částicemi bez oleje (-45,3), dosaženo vyšší hodnoty zeta potenciálu (-50,2). Tyto lipozomy tak byly vyhodnoceny jako nejstabilnější. Nejméně stabilní byly naopak lipozomy s 10% přídavkem kávového oleje (-27,6) a s 10% přídavkem odpadního kávového oleje (-26,3). Z výsledků je dále jasně patrné, že lipozomy s obsahem PHB byly ve srovnání s částicemi bez jeho obsahu stabilnější. Lze tedy konstatovat, že 10% přídavek PHB do lipozomů obsahující 10 % kávového oleje má pozitivní vliv na jejich výslednou stabilitu.

U připravených částic s obsahem kávového oleje byla rovněž sledována enkapsulační účinnost, která byla monitorována analýzou polyfenolických látek. Po přípravě byly částice vždy centrifugovány při 14 800 rpm/min, následně byly částice promyty destilovanou vodou a opět centrifugovány. Na závěr byly částice dezintegrovány a uvolněné složky byly stanoveny spektrofotometricky (Kap.3.3.2). Sledován byl obsah polyfenolů, stejně tak jako ve vzorku před enkapsulací. Z těchto dvou hodnot byla poté vypočítána enkapsulační účinnost dané metody (Tabulka 38).

Tabulka 38: Enkapsulační účinnost kávového oleje do lipozomů na základě sledování koncentrace polyfenolů

Typ částic	$w(\text{TPC/GAE})/(\mu\text{g/ml})$	Enkapsulační účinnost (%)
lipozomy, 10% kávový olej	7.08 ± 0.23	87,95
PHB částice, 10% odpadní kávový olej	5.19 ± 0.20	99,00
lipozomy, 10% odpadní kávový olej	4.19 ± 0.15	82,97
lipozomy, 20% odpadní kávový olej	9.44 ± 0.95	93,47
lipozomy, 30% odpadní kávový olej	13.95 ± 1.11	92,08

Z výsledků je patrné, že bylo dosaženo velmi dobré enkapsulační účinnosti u všech připravených částic, enkapsulační účinnosti polyfenolů se pohybovaly v rozmezí od 83 % do 99 %. Nejvyšší enkapsulační účinnost byla stanovena u lipozomových částic s přidavkem PHB a obsahem 10 % odpadního oleje. PHB tedy mělo nejen pozitivní vliv na stabilitu připravených částic, ale rovněž na enkapsulační kapacitu testovaných částic.

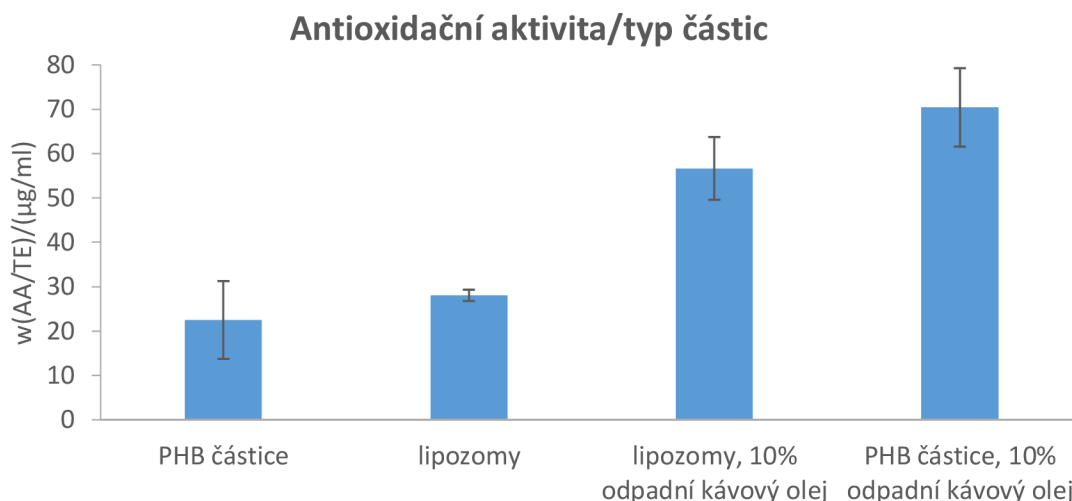


Graf 16: Antioxidační aktivita lipozomů v závislosti na typu použitého oleje

Antioxidační aktivita jednotlivých částic byla porovnávána z hlediska typu použitého oleje, typu částic a množství oleje v částicích.

Výrazný nárůst antioxidační aktivity byl naměřen u lipozomů s obsahem 10% odpadního kávového oleje - 56,7 $\mu\text{g/ml}$. Naopak minimálně se zvýšila antioxidační aktivita lipozomů s 10% obsahem kávového oleje v porovnání s prázdnými lipozomy (Graf 16).

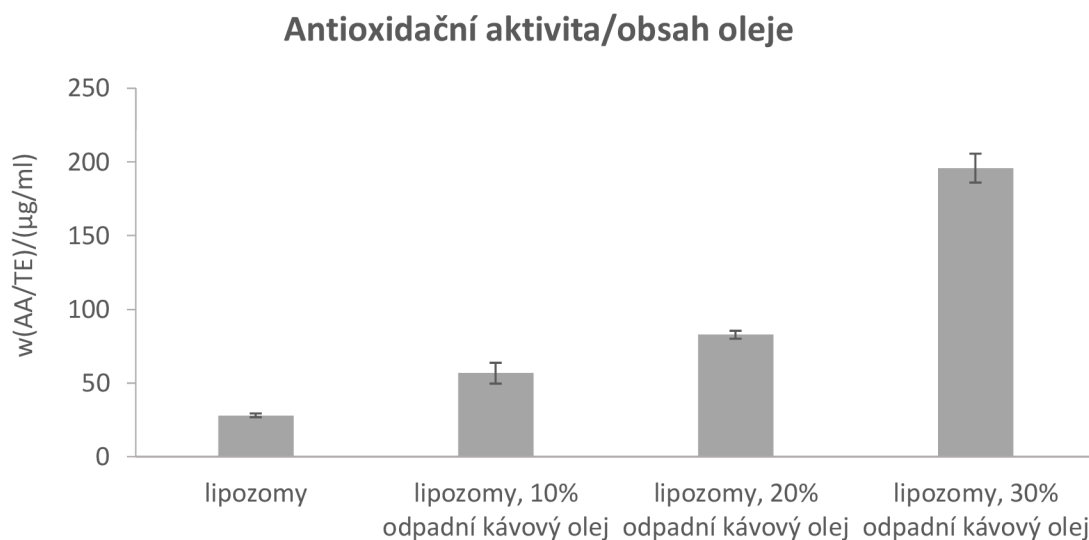
Jelikož byla u lipozomů s odpadním kávovým olejem prokázána vyšší antioxidační aktivita než u částic s kávovým olejem, byl pro další experimenty použit pouze olej získaný z kávové sedliny. V dalším experimentu byla porovnávána antioxidační aktivita různých druhů částic. Hodnoty antioxidačních aktivit u prázdných lipozomů s 10% obsahem PHB a lipozomů byly téměř stejné. Přidáním odpadního oleje do těchto částic vzrostly hodnoty antioxidačních aktivit u obou druhů částic (Graf 17).



Graf 17: Antioxidační aktivita částic v závislosti na jejich typu a obsahu kávového oleje

Výrazně vyšší antioxidační aktivita byla naměřena u lipozomů obsahující PHB a odpadní kávový olej (70,4 µg/ml), vysoká antioxidační aktivita byla také naměřena u lipozomů obsahující 10 % odpadního kávového oleje. Rozdíl aktivit mezi lipozomy s PHB a lipozomy bez obsahu oleje byl minimální.

Stanovena byla antioxidační aktivita připravených lipozomů v závislosti na obsahu kávového oleje v částicích (Graf 18). Testován byl přírůstek odpadního kávového oleje s obsahem 10, 20 a 30 hmot. %.



Graf 18: Antioxidační aktivita lipozomů v závislosti na obsahu kávového oleje

Jednoznačně nejvyšší antioxidační aktivita byla naměřena u lipozomů obsahujících 30 % kávového oleje. Zdá se, že vzrůstající obsah oleje v lipozomech má významný vliv na hodnotu antioxidační aktivity. Lipozomy obsahující 30 % kávového oleje měly přibližně dvojnásobně vyšší antioxidační aktivitu než částice s obsahem 20 % odpadního kávového oleje.

Vzhledem k dobrým výsledkům antioxidačních kapacit u jednotlivých druhů částic byly tyto částice testovány na antimikrobiální účinky (Kap.3.7.5). K testování statických antimikrobiálních účinků byla použita Gram pozitivní bakterie *Micrococcus luteus*, Gram negativní bakterie *Escherichia coli*, a kvasinka *Candida glabrata*.

Tabulka 39: Studium antimikrobiálních účinků jednotlivých typů částic

Typ částic	Počet buněk [%] ($A_{630\text{ nm}}/t$ (inkubace))		
	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida glabrata</i>
negativní kontrola	100	100	100
lipozomy	100	100	98
PHB částice	100	100	100
odpadní kávový olej	77,5	42,3	83,5
lipozomy, 10% kávový olej	72,2	60,4	67,3
PHB částice, 10% odpadní kávový olej	37,3	89,6	94,9
lipozomy, 10% odpadní kávový olej	96,1	84,9	90,2
lipozomy, 20% odpadní kávový olej	21,6	15,1	71,6
lipozomy, 30% odpadní kávový olej	46,7	75,8	97,8

Největší antimikrobiální účinek byl zaznamenán u lipozomů, které obsahovaly 20 % odpadního kávového oleje (Tabulka 39). Největší antibakteriální účinek těchto částic měly připravené lipozomy na *E. coli*, kde došlo k inhibici růstu buněk o více než 85 % v porovnání s kontrolou. Relativně dobrého antimikrobiálního efektu bylo dosaženo použitím lipozomů které obsahovaly 30 % oleje a 10 % čerstvého kávového oleje. Naopak částice, které neobsahovaly kávový olej, neměly žádnou antimikrobiální aktivitu. Největší inhibiční účinek vykazovaly částice obsahující kávový (odpadní) olej na Gram pozitivní a Gram negativní *Micrococcus luteus* a *E. coli*. Naopak téměř zanedbatelná byla antimykotická aktivita částic, v případě kvasinky *Candida glabrata*. Za antimikrobiální charakter kávového oleje jsou pravděpodobně do značné míry zodpovědné melanoidiny, které vznikají v poslední fázi Maillardových reakcí při pražení kávových bobů (Rufián-Henares, 2009). Na druhou stranu použitím kávového oleje extrahovaného z kávové sedliny jako substrátu pro produkci PHA s využitím *C. necator* bylo dosaženo relativně vysokých výtěžků PHA a biomasy (Kap.4.3.1.2), antibakteriální účinek tohoto oleje nebude pravděpodobně až tak výrazný.

V závěru lze shrnout, že z hlediska kombinace parametrů stability, antioxidačního a antimikrobiálního účinku bylo nejlepších výsledků dosaženo u lipozomů obsahujících 20 % oleje extrahovaného z kávové sedliny. Přídavkem PHB do částic s odpadním olejem byla navíc zvýšena jejich koloidní stabilita a částice rovněž vykazovaly vyšší enkapsulační kapacitu obsažených polyfenolů. Lipozomové částice s obsahem odpadního kávového oleje a přídavkem PHB vykazovaly také relativně vysokou antioxidační aktivitu a rovněž antimikrobiální aktivitu vůči Gram pozitivním bakteriálním kmenům.

Připravené částice s obsahem odpadního kávového oleje mohou nalézt uplatnění zejména v kosmetickém průmyslu. Především díky schopnosti lipozomů prostupovat pokožkou a vnášet aktivní látky do hlubších vrstev kůže. Navíc díky své povaze jsou lipozomy schopny hydratace, a mohou se tak podílet na zpomalení stárnutí kůže. Také díky vysoké antioxidační aktivitě (dané především obsahem odpadního kávového oleje) mohou částice chránit buňky pokožky proti UV záření (Akbarzadeh, 2013).

4.4.2 Příprava a využití PHB mikro- a nanovláken jako filtračního materiálu

Celá řada (bio)polymerů může být zpracována do podoby vláken, které jsou v dnešní době velice žádané. Zejména nanovlákná představují velice slibnou formu materiálu, která může nacházet uplatnění v celé řadě aplikací, například pro filtraci různých typů suspenzí (Qin, 2017). Mikro- a nanovláknenné filtrační materiály mohou být využity ve formě membrán, nebo textilií. Čištění odpadních vod je aktuálně řešeno mikrobiální dekontaminací (Mazzucotelli, 2014). Použitím nanofiltračních materiálů je možné oddělit mikroorganismy, pevné částice, proteiny, nebo jednotlivé molekuly, vláknenné filtrační materiály můžou představovat alternativní metodu pro čištění odpadních vod.

Polyhydroxyalkanoáty představují skupinu biopolymerů vyráběných z obnovitelných zdrojů, existuje řada studií zabývajících se možnostmi aplikací PHA vláknenných forem (Volova, 2014).

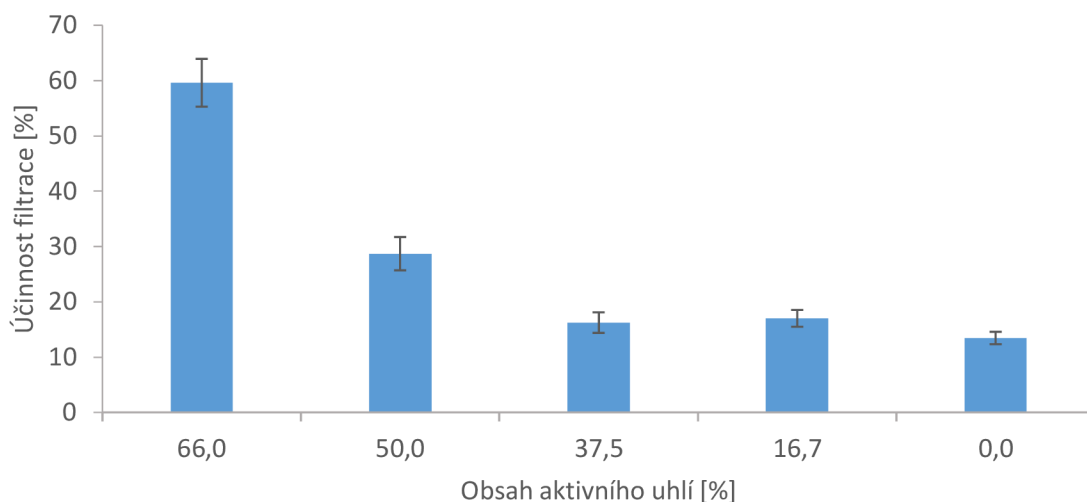
Pro účely filtrace byly ve spolupráci s Mgr. Vojtěchem Kunderátem připraveny kompozitní nano-/mikrovláknenné filtrační materiály s obsahem různých druhů sorbentů. Pro přípravu vláken bylo použito centrifugální bezjehlové zvláknění a elektrostatické zvláknění (Kap.3.8.1). Filtrační účinnost byla posuzována použitím průtokového cytometru, po filtraci buněčné suspenze za definovaných podmínek.

4.4.2.1 PHB vláknenné materiály s obsahem aktivního uhlí

Pro filtraci byl použit mikro-/nanovláknenný kompozitní materiál tvořený PHB a aktivním uhlím v různém procentuálním zastoupení, připraveným podle postupu v kapitole 3.8. Procentuální podíl aktivního uhlí v PHB „vatě“ byl 66, 50, 37,5, 16,7, 0 hmot. %. Filtrační vrstva měla výšku 10 cm o průměru 1 cm. Suspenze obsahující $5 \cdot 10^5$ /ml buněk bakterií *Bacillus subtilis* byla filtrována přes filtrační vrstvu za působení tlaku 0,25 MPa. Po filtraci suspenze o objemu 50 ml byl z filtrátu odebrán vzorek pro stanovení koncentrace mikrobiálních buněk průtokovou cytometrií.

Z výše uvedených materiálů měl prokazatelně nejvyšší filtrační účinnost materiál obsahující 66 % aktivního uhlí, kdy došlo k odstranění téměř 60 % buněk *B. subtilis* z buněčné suspenze. Relativně uspokojivých výsledků bylo dosaženo použitím PHB vláken, které obsahovaly 50 % aktivního uhlí, úspěšnost filtrace zde dosahovala 28 %. Se snižujícím se obsahem aktivního uhlí ve filtračním materiálu docházelo ke snížení filtrační účinnosti a to až o 55 %. Z výše uvedených výsledků (Graf 19) také vyplývá, že obsah aktivního uhlí v PHB má vliv na lepší filtrační vlastnosti pouze v případě, kdy je procentuální zastoupení aktivního uhlí ve filtračním materiálu nad 50 %. U materiálů obsahující 37, 50 % a 16,70 % byla účinnost filtrace srovnatelná s filtračním materiálem bez přídavku aktivního uhlí ~ 15 %.

B. subtilis



Graf 19: Filtrační účinnost PHB – aktivní uhlí (průtoková cytometrie)

4.4.2.2 PHB vláknenný filtrační materiál s obsahem oxidů kovů

Další materiál připravený pro testování filtrační účinnosti byl kompozit PHB s oxidy kovů v poměru 1:1. Filtrace byla provedena ve standardním modulu (výška sloupce 10 cm, průměr 1 cm). Pro filtraci byla připravena suspenze buněk *B. subtilis* o koncentraci $4 \cdot 10^5$ buněk/ml. Celkový objem filtrovaného materiálu tvořil 50 ml a tento objem byl filtrován přes filtrační vrstvu 10 cm za působení tlaku 0,25MPa.

Filtrační účinnost kompozitních materiálů byla ověřena filtrací buněčné suspenze *B. subtilis*. Vysoká filtrační účinnost byla dokázána u filtračních materiálů s obsahem TiO_2 (84 %), ale i čistého PHB (82 %). Všeobecně je ale filtrace PHB vlákny s obsahem jednotlivých kovů účinnější, než tomu bylo v případě aktivního uhlí. V případě použití vláken s oxidem titaničitým by mohl být pozitivní, několika studiemi prokázaný, případný antimikrobiální efekt tohoto oxidu (Kubacka 2014), (Visai 2011).

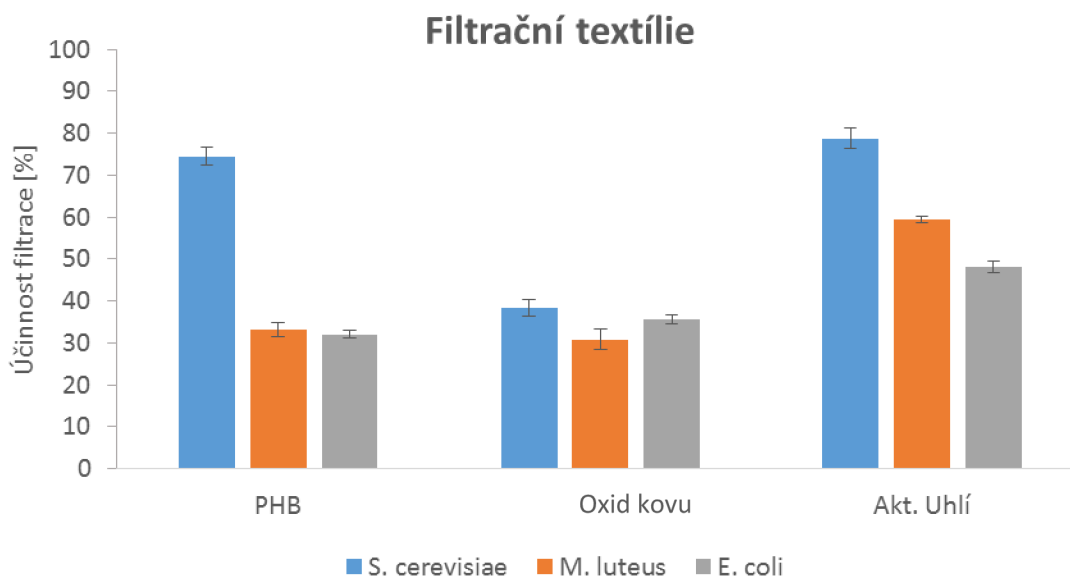
4.4.2.3 PHB filtrační textilie

Pro účely filtrace mikroorganismů byla vyrobena mikro (nano)-vláknenná textilie (membrána) z PHB s příměsí:

- i) aktivního uhlí (1:1)
- ii) oxidu kovu (1:1)
- iii) bez příměsí.

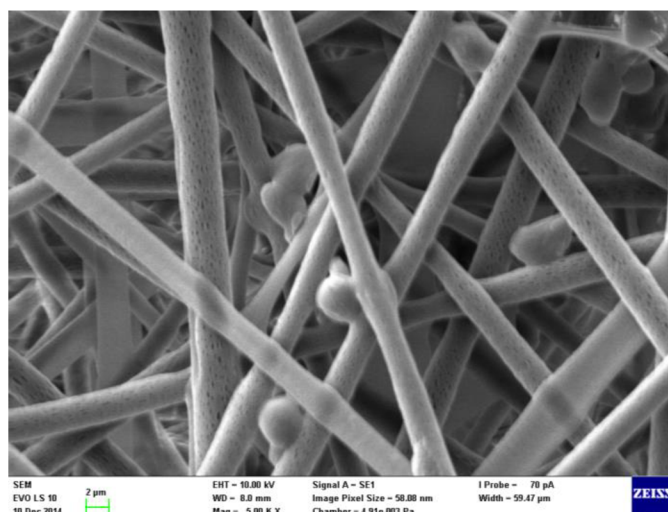
Vzhledem k výborným výsledkům dosaženým filtrací buněčné suspenze přes PHB vlákna s obsahem aktivního uhlí jako sorbentu, byla tato matrice použita také pro přípravu vláknenné textilie. Oxid kovu byl použit pro přípravu vláknenné textilie z důvodu malého průměru velikosti částic, díky kterému byly připravená vlákna uniformní a bez výrazné porézní struktury. Pro porovnání účinnosti filtrace vláknenných textilií se sorbentem byla připravena textilie tvořena pouze PHB. Samotný proces filtrace byl prováděn přes textilií za sníženého

tlaku pomocí Büchnerovy nálevky o průměru 77 mm. Bakterie *E. coli*, *Micrococcus luteus* a kvasinka *S. cerevisiae* byly použity pro přípravu buněčných suspenzí určených pro filtraci. Suspenze o objemu 50 ml a koncentraci buněk $5 \cdot 10^5$ byla filtrována přes filtrační textilii.

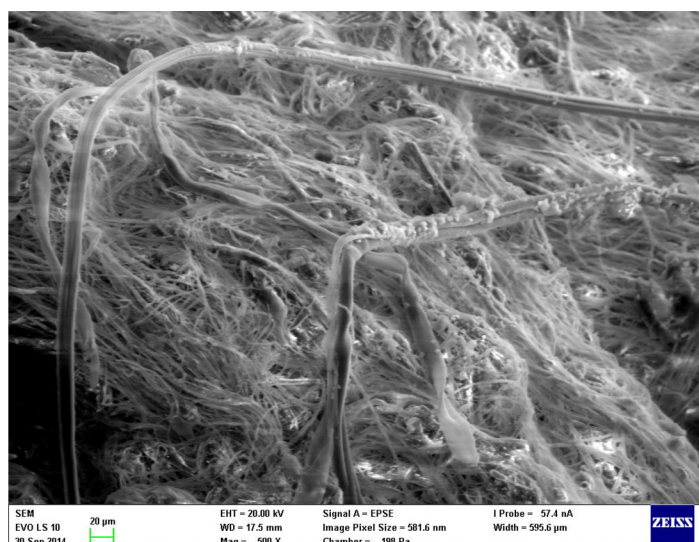


Graf 20: Filtrační účinnost PHB, PHB –oxid kovu, PHB – akt. uhlí (průtoková cytometrie)

Jako další aplikační forma kompozitního materiálu pro účely filtrace, byla zvolena vláknenná textilie PHB s příměsí aktivního uhlí, oxid kovu a čistá PHB o průměru 6 cm. Pro filtraci byly použity tři různé buněčné suspenze - *S. cerevisiae*, *M. luteus* a *E. coli*. Nejvyšší filtrační účinnost byla dosažena použitím kompozitní textilie PHB s aktivním uhlím, v případě filtrace buněčné suspenze tvořené *S. cerevisiae* (78 %). Všeobecně bylo u všech tří materiálů dosaženo nejvyšší účinnosti filtrace právě při filtraci suspenze *S. cerevisiae*, což může být způsobeno právě velikostí buňky, která dosahuje velikosti až 10 μm (Klis, 2014). Filtrace vláknennou textilií PHB-oxid kovu se v porovnání s čistým PHB a PHB s aktivním uhlím zdá být nejméně účinná. Po filtraci buněčných suspenzí byl odebrán vzorek vláknenné textilie a připraven mikroskopický preparát vhodný pro skenovací elektronový mikroskop (SEM). U takto upravených vzorků byl zkoumán princip/mechanismus absorpčních vlastností jednotlivých materiálů při mikrobiální filtraci (Obrázek 14).



Obrázek 14: Snímek (SEM) PHB vlákněného filtračního materiálu po filtraci *S. cerevisiae*



Obrázek 15: Snímek (SEM) PHB vlákněného filtračního materiálu s obsahem oxidu kovu po filtraci *B. subtilis*

Ze snímků pořízených na SEM je patrné, že dochází k přilnutí mikroorganismu na kompozitním vlákněném materiálu, což je s největší pravděpodobností také principem filtrace buněčných suspenzí přes vlákněné materiály.

4.4.2.4 Testování biodegradovatelnosti PHB vlákněných filtračních materiálů

Materiály použité k filtraci jsou vyrobeny z biodegradabilního biopolymeru PHB. Pro ověření, zda i po vytvoření kompozitu s jednotlivými sorbenty bude tato vlastnost zachována, byl použit normovaný test IS/ISO 20200. Testovány byly PHB textilie s příměsí oxidu kovu, aktivního uhlí a také vlákněná textilie z PHB. Test zaměřený na dezintegraci materiálu probíhal při termofilních podmínkách 58°C. Textilie byly degradovány v podmínkách umělého kompostu (Tabulka 40) po dobu potřebnou k rozložení materiálu (15 dnů).

Tabulka 40: Průběh degradace vlákněných textilií

Den	PHB - oxid kovu	PHB - aktivní uhlí	PHB
0	zahájení biodegradačního testu		
1			
2			
3	počátek dezintegrace materiálu	počátek dezintegrace materiálu	beze změn
4			
5			
6	pokročilý stupeň dezintegrace	pokročilý stupeň dezintegrace	beze změn
7			
8	rozpad materiálu	pokročilý stupeň dezintegrace	pokročilý stupeň dezintegrace
9			
10		rozpad materiálu	pokročilý stupeň dezintegrace
11			
12			
13			rozpad materiálu
14			
15			

Ze všech tří materiálů byl kompozit tvořený PHB – oxid kovu (1:1) nejrychleji dezintegrováným materiálem, ke kompletnímu rozpadu došlo již 8. den testování. Kompozitní vlákněná textilie PHB – aktivní uhlí byla zcela rozložena po 10 dnech od začátku testu. V porovnání s výše uvedenými materiály byla PHB vlákněná textilie nejvíce odolnou a ke kompletní dezintegraci došlo po 13 dnech (Obrázek 16). Můžeme konstatovat, že k rozpadu všech tří testovaných vlákněných textilií došlo ve velice krátkém časovém úseku, intervalu 8 – 13 dní. Jedním z důvodů relativně rychlé degradace kompozitních vlákněných materiálů může být fakt, že sorbent obsažený v PHB vlákně může narušovat celistvost vlákna a napomáhat tak biodegradaci filtračních materiálů.

Vlákná textilie PHB – Oxid kovu, T=0 den



Vlákná textilie PHB – Oxid kovu, T=6 den



Vlákná textilie PHB - Akt. uhlí, T= 0 den



Vlákná textilie PHB - Akt. uhlí, T= 6 den



Vlákná textilie PHB, T= 0 den



Vlákná textilie PHB, T= 10 den



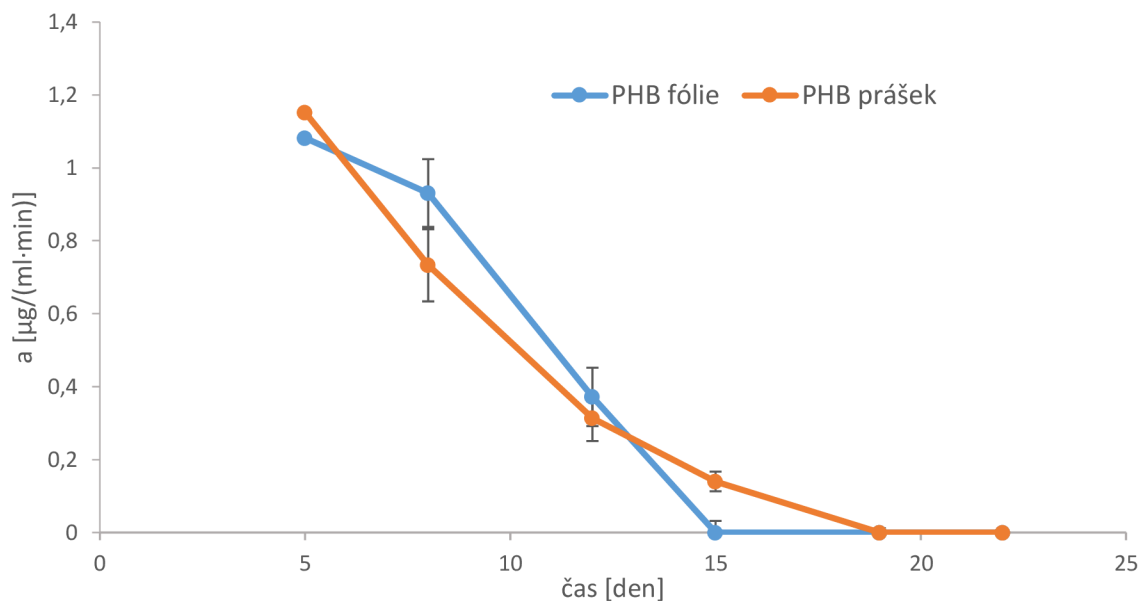
Obrázek 16: Průběh degradace vlákných textilií

4.4.3 Studium degradace PHA

Polyhydroxyalkanoáty mohou být degradovány jak intracelulárně, tak extracelulárně. Intracelulární PHA depolymerázy hydrolyzují PHA v době, kdy je buňka limitována živinami, PHA ve formě amorfních intracelulárních granulí ohraničených vrstvou proteinů a fosfolipidů slouží jako zásobárna uhlíku/energie. Působením extracelulárních depolymeráz dochází k degradaci částečně krystalických extracelulárních PHA granulí. Mikroorganismy produkující extracelulární PHA depolymerázy využívají polymer jako zdroj uhlíku (Jendrossek, 2005).

Pro účely degradace PHB (prášku a fólie) byly vybrány mikroorganismy potencionálně schopné produkce PHA depolymeráz. Jedním z nich je bakterie *Delftia acidovorans*, u které byla v řadě studií potvrzena schopnost produkce extracelulárních depolymeráz, ale také schopnost produkce PHA a s tím související přítomnost intracelulárních depolymeráz (Zhang, 2010). Plíseň *Aspergillus fumigatus* je také v řadě studií popsána jako mikroorganismus podílející se na degradaci PHA (Iyer, 2000), (Bhatt, 2010). Díky širokému spektru enzymů produkovaných polymorfním mikroorganismem *Aureobasidium pullulans* (Kap.1.3.2) byla testována možnost produkce PHA depolymeráz také u toho mikroorganismu. Vybrané mikroorganismy byly kultivovány v minerálním médiu, kde PHB představoval jediný zdroj uhlíku. Během kultivace byly odebírány vzorky tekutého média a testována aktivita extracelulárních PHA depolymeráz. Materiály, sloužící jako zdroj uhlíku pro PHA depolymerázu produkující mikroorganismy, byly přidávány do média v podobě PHB fólií a ve formě PHB prášku.

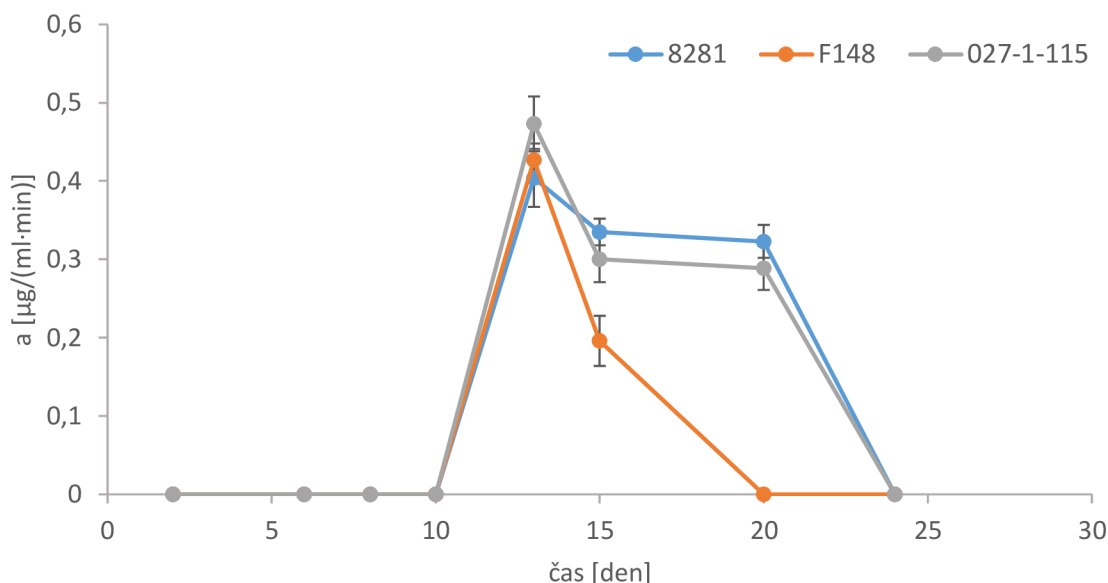
D. acidovorans PHA depolymerázova aktivita



Graf 21: Depolymerázová aktivita PHA depolymeráz *D. acidovorans*

Pro stanovení aktivity PHA depolymeráz produkovaných bakterií *D. acidovorans* byly optimalizovány podmínky stanovení, zahrnující stanovení vhodného pH a teplotního optima depolymerázy. Z testovaného pH rozmezí 4 – 10 se ukázalo být nejvhodnější pH s hodnotou 7, kde byla citlivost pro měření PHA depolymerázové aktivity nejvyšší. Teplotní optimum bylo 50 °C. K testování byly využity PHB fólie o hmotnosti $0,11 \pm 0,01$ g a PHB prášek, který se v minerálním médiu nacházel v koncentraci 5 g/l. Vzorky byly odebírány v pravidelných časových intervalech po celou dobu kultivace (22 dní), po každém odběru byla také měřena depolymerázová aktivita (Kap.3.9.2). Naměřené aktivity PHA depolymeráz u *D. acidovorans* dosáhly svého maxima právě v 5. dni kultivace. Reálných maxim mohlo být dosaženo již dříve, nicméně první měření proběhlo až 5. den kultivace. V průběhu kultivace docházelo pouze ke snižování aktivity enzymu. 20. den kultivace již nebyla detekována žádná aktivita PHA depolymerázy. Pravděpodobně zde došlo k limitaci živinami a buňka nebyla schopna další produkce PHA depolymeráz. Průběh produkce PHA depolymeráz v závislosti na použité formě PHB (prášek, fólie) byl velice podobný. U PHB fólie byla nulová aktivita naměřena již 15. den kultivace, zatímco v případě, kdy byl použit PHB prášek, bylo i 15. den kultivace možné detekovat PHA depolymerázovou aktivitu (Graf 21). Molekulová hmotnost testovaných materiálů se změnila zejména u práškové formy PHB $M_w 4,9 \cdot 10^4$. U PHB fólie došlo k minimální změně molekulové hmotnosti $M_w 2,6 \cdot 10^5$, v porovnání s referenční fólií ($M_w 2,7 \cdot 10^5$). Bylo potvrzeno, že *D. acidovorans* je schopna produkce PHA depolymeráz, nicméně schopnost degradace PHB materiálu je závislá na formě degradovaného materiálu. Větší povrch PHB prášku pravděpodobně usnadnil kolonizaci *D. acidovorans* na svém povrchu a bakterie měla lepší přístup ke zdroji uhlíku, než tomu bylo u PHB fólie.

A. pullulans PHA depolymerázova aktivita



Graf 22: Depolymerázová aktivita PHA depolymeráz *A. pullulans*

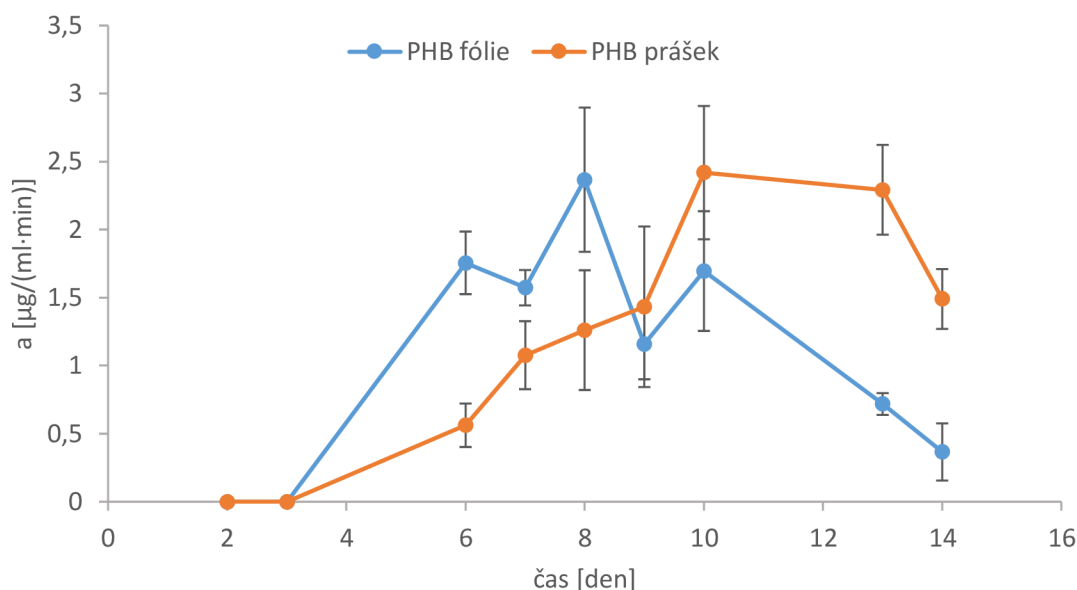
Schopnost produkce PHA degradujících enzymů byla testována pro *A. pullulans* CCM F148 a CCM 8182 a *A. pullulans* CCY 27-1-115. PHB fólie byla využita jako zdroj uhlíku v minerálním médiu pro produkci PHA depolymeráz *Aureobasidium pullulans*. Optimální hodnota pH pro stanovení depolymerázové aktivity byla pH 6.

U všech kmenů *A. pullulans* byla zaznamenána produkce PHA depolymeráz až ve 13. dnu kultivace (Graf 22). Hodnoty naměřených aktivit u všech kmenů byly podobné a pohybovaly se v rozmezí od 0,404 – 0,473 µg/(ml.min). Podobný trend byl zaznamenán také v 15. dni kultivace, kdy u kmenů CCM 8182 a CCY 27-1-115 byly naměřeny podobné hodnoty aktivit, 0,335 a 0,3 µg/(ml.min). Na druhou stranu u kmenu CCM F148 byl v 15. dni zaznamenán výrazný pokles depolymerázové aktivity 0,196 µg/(ml.min). Aktivity kmenů CCM 8182 a CCY 27-1-115 v 20. dnů kultivace zůstaly prakticky stejné jako v předchozím odběru (15. dni). U kmenu CCM F148 ovšem v 20. dni kultivace nebyla detekována žádná depolymerázová aktivita. Po 24 dnech kultivace nebyla zjištěna depolymerázová aktivita ani u jednoho s testovaných kmenů. Z výsledků naměřených aktivit vyplývá, že *A. pullulans* je pravděpodobně schopný produkce PHA depolymeráz, ale v porovnání s *D. acidovorans* jsou enzymy zodpovědné za degradaci PHA v médiu produkovány později, až po 10. dni kultivace.

Z výsledků měření úbytků hmotností a změn v molekulových hmotnostech u jednotlivých vzorků vyplývá, že *A. pullulans* produkuje depolymerázy v malém množství a vliv na PHB fólii byl minimální. U všech tří vzorků došlo k úbytku hmotností PHB fólií o $3,0 \pm 0,4$ %, a k minimálním změnám v rámci měření molekulových hmotností testovaných fólií a referenčního materiálu. Hodnoty naměřených aktivit PHA depolymeráz v médiu s PHB fólií u *A. pullulans* jsou však v porovnání s aktivitami *D. acidovorans* vyšší.

Také u plísně *Aspergillus fumigatus* byla testována schopnost produkce extracelulárních PHA depolymeráz zodpovědných za degradaci polyhydroxyalkanoátů. PHB fólie a práškové PHB byly využity pro účely degradace a sloužily, stejně jako v předchozích experimentech, jako jediný uhlíkový zdroj obsažený v minerálním médiu.

A. fumigatus PHA depolymerázova aktivita



Graf 23: Depolymerázová aktivita PHA depolymeráz *A. fumigatus*

Optimální pH pro stanovení depolymerázové aktivity u *A. fumigatus* bylo pH 8. Depolymerázová aktivita byla měřena v jednotlivých časových intervalech v průběhu kultivace trvající 14 dní. Jak je z Graf 23 patrné, produkce PHA depolymeráz *A. fumigatus* začala již od 3. dne kultivace. Výsledky získané měřením aktivit v průběhu času korespondují se způsobem degradace jednotlivých forem PHB. V případě PHB fólie došlo ke kolonizaci plísně na jejím povrchu a její degradaci, což odpovídá vysoké aktivitě, která byla naměřena již v 6. dni kultivace 1,76 µg/(ml.min). Naopak rychlý průběh degradace fólie, která byla okem pozorovatelná, způsobil pokles aktivity depolymerázy již 9. den kultivace.

Mechanismus degradace PHB prášku byl v porovnání s PHB fólií odlišný, nejprve došlo k nárůstu mycelia do shluků, do kterých byl následně PHB prášek „uzavřen“ a degradován. K produkci PHA depolymeráz zde docházelo pozvolna, aktivita depolymeráz se zvyšovala s dobou kultivace. Maximální hodnota aktivity byla naměřena 10. den kultivace 2,15 µg/(ml.min). Důsledkem úplné degradace PHB prášku poté docházelo k snižování aktivity PHA depolymerázy v médiu. *Aspergillus fumigatus* je jako jediný z testovaných mikroorganismů schopen produkce PHA depolymeráz ve vysoké koncentraci a efektivně tak využívat PHA jako zdroj uhlíku/energie. Vzhledem k výsledkům lze konstatovat, že plísně jsou pravděpodobně důležitými mikroorganismy podílejícími se na degradaci PHA v přírodě.

Kromě testování produkce depolymeráz a sledování stupně degradace PHB vybranými mikrobiálními kulturami byla také testována biodegradabilita PHB materiálů standardním kompostovacím testem IS/ISO 20200. Během testování byl u jednotlivých materiálů zjišťován stupeň rozkladu. Testování proběhlo v termofilních podmínkách při 58 °C. Tímto testem byla stanovena rychlost degradace u PHB fólií, nanovláknenné textilie, a tvrzené PHB fólie (Tabulka 41).

Tabulka 41: Průběh kompostovacího testu PHB fólií a textílie

den	PHB fólie	PHB tvrzená fólie	PHB nanotextilie	
1	začátek experimentu			
5	konec degradačního procesu		konec degradačního procesu	
10				
15				
19				
23				
24				
30				
38				
46				konec degradačního procesu
57				

Nejrychleji došlo k degradaci PHB nanotextilie, a to již v 10. dni testu. Na Obrázek 17 je vidět průběh degradace nanotextilie v čase, kdy již 3. den testování je viditelná mikrobiální kolonizace na povrchu nanotextilie (b). Obrázek 17 (c) představuje vliv kompostovacích podmínek na nanotextilii po 8 dnech testu, kdy je viditelný pokročilý stupeň degradace materiálu. Extrémně rychlou degradaci nanovláknenné textílie pravděpodobně pozitivně ovlivnila velikost povrchu, který mohly mikroorganismy kolonizovat, v porovnání s PHB fólií, kde byl proces degradace delší. PHB fólie byla degradována v průběhu 15 dní. Nejobtížněji probíhala degradace tvrzené PHB fólie, k úplné degradaci došlo v průběhu 38 dní. Dle výsledků degradačního testu můžeme předpokládat, že v případě PHA materiálu hraje hlavní roli velikost a dostupnost povrchu testovaného materiálu. Lze ale konstatovat, že PHB materiály jsou relativně snadno degradovatelné v termofilních kompostovacích podmínkách.



Obrázek 17: Průběh degradace PHB nanotextilie; a) 0 den b) 3. den c) 8. den testování

4.4.4 Studium degradace modifikovaných polyuretanů s využitím PHB jako parciální náhrady polyetherového polyolu

Biodegradace biopolymerů, která je jednou z pozitivních vlastností těchto materiálů, může být problematická z hlediska aplikací vyžadující stálý materiál (Steinbüchel, 2005).

Polyuretany představují třídu polymerů, která díky svým velice dobrým mechanickým vlastnostem a možnostem zpracování nachází široké uplatnění zejména v medicínském, automobilovém a průmyslovém využití. Z chemického hlediska je polyuretan materiálem, který vzniká kondenzací polyisokyanátu a polyolu vytvářející intramolekulové uretanové vazby (Krol, 2007). Následující experimenty jsou zaměřeny na zkoumání vlivu nahrazení části syntetického polyetherového polyolu biodegradabilním PHB na mechanické vlastnosti materiálů. Materiál byl vystaven kompostovacím podmínkám (IS/ISO 20200) po dobu 2 měsíců, po 3 týdnech a na konci testování byly provedeny testy mechanických vlastností materiálů.

V tomto experimentu byl pro přípravu polyuretanu použit poly(3-hydroxybutyrát), kterým byla nahrazena část petrochemického materiálu používaného pro přípravu polyuretanu (PUR). PHB bylo použito v různých koncentracích (1, 5, 10 %) a porovnáván byl také rozdíl použitých PHB. K přípravě bylo použito PHB komerčně dodávané Sigma Aldrich a PHB připravené na Chemické fakultě Vysokého učení technického. U takto připravených materiálů byl testován vliv kompostovacích podmínek na změnu mechanických vlastností v průběhu 2 měsíců. Příprava a testování mechanických vlastností materiálů proběhla ve spolupráci s Ing. Vojtěchem Kupkou Ph.D. z Ústavu chemie materiálů FCH-VUT. Materiály byly připraveny dle postupů uvedených v publikaci Vojtová a spol. (2012).

Tabulka 42: Mechanické charakteristiky vzorků PUR-PHB před testováním

Vzorek	E_y (MPa)	σ_B (MPa)	ϵ_B (%)
REF	1.6 ± 0.1	1.0 ± 0.1	80 ± 8
Sigma 1 %	1.7 ± 0.1	1.1 ± 0.1	97 ± 11
Sigma 5 %	1.7 ± 0.1	1.50 ± 0.04	147 ± 9
Sigma 10 %	2.0 ± 0.04	1.8 ± 0.2	161 ± 25
VUT PHB 1 %	1.6 ± 0.1	1.0 ± 0.1	87 ± 5
VUT PHB 5 %	1.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	66 ± 10
VUT PHB 10 %	2.4 ± 0.1	1.1 ± 0.1	65 ± 7

Porovnáním připravených vzorků PUR-PHB, obsahující různé koncentrace PHB pocházející z VUT a komerčně prodávaného Sigma, bylo zjištěno, že použitím PHB-VUT vzrostly hodnoty Youngova modulu pružnosti, materiál byl tužší. Hodnoty Youngova modulu rostly se zvyšujícím se obsahem PHB v PUR, znamená to tedy, že přídavek PHB významně ovlivňuje tuhost výsledného materiálu. Také hodnoty napětí v tahu a elasticita rostou v závislosti na zvyšující se koncentraci PHB-Sigma (Tabulka 42), tento trend ale nebyl potvrzen v případě použití PHB-VUT, kdy se s rostoucím obsahem PHB hodnoty elasticity spíše snižovaly.

Tabulka 43: Mechanické vlastnosti vzorků po 3 týdnech kompostovacího testu

Vzorek	E_y (MPa)	σ_B (MPa)	ε_B (%)
Sigma 1 %	1.4 ± 0.2	$1,1 \pm 0.1$	104 ± 8
Sigma 5 %	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.1	155 ± 18
Sigma 10 %	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	184 ± 25
VUT PHB 1 %	1.4 ± 0.3	1.0 ± 0.1	93 ± 7
VUT PHB 5 %	1.6 ± 0.2	0.9 ± 0.1	83 ± 8
VUT PHB 10 %	1.7 ± 0.2	0.9 ± 0.1	77 ± 17

Vzorky PUR-PHB po třech týdnech v prostředí kompostovacích podmínek vykazovaly ve všech případech snížení hodnot Youngova modulu pružnosti. Hodnoty napětí v tahu a při přetržení jsou i po vystavení vzorků kompostovacím podmínkám beze změn. Z hlediska elasticity byl největší rozdíl zaznamenán mezi vzorky připravenými z PHB-Sigma a PHB-VUT, kdy vzorky kde byl použit PHB z VUT vykazovaly výrazně nižší elasticitu než PHB-Sigma (Tabulka 42). Po 3 týdnech testování došlo především u PUR-PHB(VUT) k zvýšení hodnot elasticity. U vzorků PUR-PHB (Sigma) byla naměřena vyšší elasticita pouze v případě, kdy vzorek obsahoval 10 % PHB (Tabulka 43). Důvodem těchto změn může být relativně špatná homogenita PUR-PHB, která se zhoršovala se zvyšujícím se obsahem PHB v materiálu.

Tabulka 44: Mechanické vlastnosti vzorků po 2 měsících kompostovacího testu

Vzorek	E_y (MPa)	σ_B (MPa)	ε_B (%)
Sigma 1 %	1.35 ± 0.09	1.09 ± 0.12	115 ± 12
Sigma 5 %	1.41 ± 0.08	1.38 ± 0.04	149 ± 12
Sigma 10 %	$1,56 \pm 0.05$	1.5 ± 0.16	183 ± 26
VUT PHB 1 %	1.2 ± 0.2	0.79 ± 0.08	91 ± 6
VUT PHB 5 %	1.4 ± 0.1	0.79 ± 0.08	79 ± 9
VUT PHB 10 %	$1,5 \pm 0.1$	1.85 ± 0.03	94 ± 7

Na konci degradačního testu, po uplynutí 2 měsíců, došlo k dalšímu snížení hodnot Youngova modulu pružnosti v porovnání s referenčními (nedegradovanými) vzorky (Tabulka 42). Na rozdíl od testování po 3 týdnech, kdy byly hodnoty napětí v tahu a při přetržení téměř stejné jako před začátkem testu, po 2 měsících inkubace vzorků v kompostovacích podmínkách došlo k snížení hodnot těchto parametrů.

Měření napětí v tahu u vzorků PUR-PHB(Sigma) potvrdilo trend z předchozího měření, kdy materiál obsahující 1 % PHB měl nejnižší hodnoty napětí v tahu při přetržení, ale také elasticity. Se zvyšujícím obsahem PHB ve vzorku, byly hodnoty napětí v tahu a elasticity vyšší (Tabulka 44).

Všeobecně došlo vlivem působení kompostovacích testů a degradace PHB ke zvýšení elasticity, naopak hodnoty Youngova modulu pružnosti se s časem degradace snižovaly. Znamená to tedy, že materiál se vlivem degradace PHB stává méně tuhým, přičemž bez ohledu na druh použitého PHB byl zachován trend, kdy se zvyšujícím se obsahem PHB v PUR rostla tuhost materiálu.

Celkově byl materiál obsahující různé koncentrace PHB po degradaci více elastický a méně tuhý. Jedno z možných vysvětlení může být, že vlivem fyzikálních a biochemických pochodů došlo k rozpadu kratších řetězců PHB a tím ke snížení hodnot Youngova modulu pružnosti. Naopak delší řetězce schopné reflexe nebyly okolním prostředím narušeny a jsou s nejvyšší pravděpodobností zodpovědné za zvyšování elasticity materiálů v průběhu testu. U vzorků, kde byl použit PHB (VUT) jsou trendy testování mechanických vlastností v průběhu kompostovacího testu podobné jako u PHB (Sigma).

5 ZÁVĚR

- Předložená dizertační práce se zabývá především mikrobiální produkcí biopolymerů, s využitím obnovitelných (odpadních) biomas jako zdroje uhlíku a dusíku. Produkce byla zaměřena na biosyntézu extracelulárního polysacharidu – pullulanu a polymeru kyseliny jablečné polymorfním producentem *A. pullulans*. Dále je poměrně značná část věnována produkci polyesterů – polyhydroxyalkanoátů (PHA). Pro tyto produkce byla jako odpadní substrát využita především kávová sedlina a olej extrahovaný z kávové sedliny. Studována byla také možnost produkce PHA s využitím proteolyticky hydrolyzované syrovátky a chemického hydrolyzátu kuřecího peří jako levných komplexních zdrojů dusíku, přičemž jako uhlíkový substrát byl použit odpadní fritovací olej. Další část práce je zaměřena na aplikační možnosti polyhydroxyalkanoátů. Studován byl vliv přídavku PHB k lipozomům především na velikost a stabilitu takto připravených částic. U lipozomů obsahující kávový olej byl zkoumán vliv na výslednou antioxidační aktivitu a antimikrobiální efekt částic. Část práce je věnována testování kompozitních PHB vláken pro možnosti filtrace mikrobiálních suspenzí. Poslední část práce se věnuje degradaci PHB vybranými mikrobiálními kmeny a studiu degradace PHB v modelových kompostovacích podmínkách. Testován byl také vliv kompostovacích podmínek na mechanické vlastnosti polyuretanu s PHB.
- První část práce je věnována charakterizaci substrátů, které byly použity pro produkci biopolymerů (pullulan, PMLA, PHA). Odpadní materiály byly charakterizovány zejména z hlediska obsahu redukujících sacharidů. Testovány byly také možnosti chemické a enzymatické hydrolýzy, sledován byl vliv předúpravy a typu hydrolýzy na uvolnění utilizovatelných sacharidů. Nejlepší efekt na produkci pullulanu a PMLA u *A. pullulans* měla kyselá hydrolýza.
- Optimalizován byl též proces hydrolýzy kávové sedliny, aplikována byla chemická i enzymatická hydrolýza. Sledován byl vliv hydrolýzy na koncentraci redukujících sacharidů, ale také na přítomnost polyfenolů v hydrolyzátu. Nejvyšších výtěžků redukujících sacharidů bylo dosaženo kyselou hydrolýzou kávové sedliny (2,5 obj. % kyselina sírová), pokud byla kávová sedlina před samotnou hydrolýzou upravena ultrazvukovým homogenizátorem. Jako nejvhodnější výchozí koncentrace kávové sedliny byla stanovena 150 g/l, kdy po kyselé hydrolýze (2,5 obj. % kyselina sírová) bylo dosaženo nejvýhodnějšího poměru koncentrace redukujících sacharidů a polyfenolu. Z důvodu relativně vysoké koncentrace polyfenolů v hydrolyzátu, bylo testováno několik metod pro jejich odstranění. Velice efektivně probíhala detoxifikace hydrolyzátu kávové sedliny pomocí aktivního uhlí, relativně vysoké účinnosti extrakce polyfenolických látek před hydrolýzou kávové sedliny bylo dosaženo použitím 50% ethanolu.
Z kávové sedliny byl dále extrahován olej, u kterého byl stanoven profil mastných kyselin, přičemž nejvíc zastoupená byla kyselina palmitová a linolová.
- K produkci pullulanu a PMLA byla využita řada hydrolyzovaných i nehydrolyzovaných substrátů. Nejvyšší výtěžky pullulanu byly získány kultivací *A. pullulans* na nehydrolyzovaných pšeničných otrubách. V případě PMLA bylo jednoznačně nejlepšího výsledku dosaženo kultivací *A. pullulans* na jablečných výliscích. Pro produkci extracelulárních polymerů bylo využito také hydrolyzovaných substrátů,

kde byl nejvyšší nárůst produkce pullulanu zaznamenán u pohankových otrub. Z hlediska produkce PMLA nedošlo použitím hydrolyzovaných substrátů k výraznému zvýšení produkce s výjimkou pohankových otrub. Jako velice slibná se zdá být kultivace *A. pullulans* s použitím odpadního glycerolu ve směsi s glukózou, kdy bylo dosaženo poměrně dobrých výtěžků jak biomasy, tak extracelulárních polymerů, zvláště pak PMLA.

- V rámci kultivace *A. pullulans* byl dále testován vliv osmotického stresu na produkci extracelulárních polysacharidů a růst biomasy. Přidáním chloridu sodného došlo k zvýšení produkce pullulanu v závislosti na osmotické síle. Koncentrace 15 g/l NaCl byla použita pro kultivaci v laboratorním fermentoru. Produkce pullulanu v přítomnosti NaCl vzrostla až dvojnásobně, oproti kontrolní kultivaci.
- K produkci PHA byl jako substrát využit hydrolyzát kávové sedliny (SCGH). V rámci optimalizace množství SCGH v minerálním médiu pro kultivaci *B. megaterium* bylo dosaženo nejlepších výtěžků PHA a biomasy v případě, pokud byl použit 100% hydrolyzát. Pro produkci PHA s využitím SCGH byla použita také *B. cepacia*, kdy jako optimální z hlediska produkce PHA a biomasy je použití 30 obj. % SCGH připraveného kombinovanou enzymatickou a chemickou hydrolyzou 150 g/l kávové sedliny. Překvapivě došlo v tomto případě k akumulaci kopolymeru P(3HB-co-3HV) s poměrně významným množstvím 3HV, a to bez nutnosti přidavku prekurzoru. Díky poměrně vysoké koncentraci kyseliny levulové v SCGH lze předpokládat, že právě levulová kyselina sloužila jako prekurzor pro syntézu kopolymeru.
- Detoxifikaci SCGH rozpouštědly, aktivním uhlím a metodou „overliming“ byla odstraněna značná část polyfenolických látek, bohužel došlo také k snížení koncentrace sacharidů. Nejvyšší účinnost detoxifikace byla dosažena aplikací aktivního uhlí, kdy došlo k největšímu poklesu koncentrace polyfenolických látek. Nicméně nejvyšších výtěžků biomasy a PHA bylo dosaženo po použití SCGH, u kterého byl pro detoxifikaci použit 30% ethanol, jímž byly vyextrahovány polyfenoly před samotnou hydrolyzou kávové sedliny. Přidáním prekurzorů do SCGH došlo k akumulaci poměrně vysoké koncentrace 3HV. Na druhou stranu, inhibice růstu *B. cepacia* vlivem toxicity vysoké koncentrace prekurzorů byla poměrně významná a výtěžky biomasy i polymeru byly velmi nízké. Nejnižší inhibiční efekt byl zaznamenán při použití kyseliny levulové. Vysoký obsah 3HV byl v P(3HB-co-3HV) akumulován na úkor buněčného růstu a produkce PHA.
- Další významnou komponentou kávové sedliny, která může být využita k produkci PHA, je kávový olej. Použitím oleje extrahovaného z kávové sedliny ke kultivaci *C. necator* bylo dosaženo vyšších koncentrací biomasy a PHA než u jiných rostlinných olejů. Se zvyšujícím se číslem kyselosti jednotlivých olejů rostla výtěžnost kultivačního procesu. Volné mastné kyseliny v oleji pozitivně ovlivňují růst *C. necator* a produkci PHA. Díky poměrně dobrým výsledkům, kterých bylo dosaženo při použití odpadního fritovacího řepkového oleje, byl tento olej míchan v různých poměrech s kávovým olejem. Nicméně nejvyšších výtěžků PHA a biomasy bylo dosaženo použitím 100% oleje z kávové sedliny. Využití kávového oleje bylo testováno ve vsádkové a fed-batch kultivaci. Fed-batch kultivací bylo dosaženo výrazně vyššího výtěžku PHB a také objemové produktivity. PHB získané z fed-batch kultivace mělo také vyšší molekulovou hmotnost v porovnání s vsádkovou kultivací.

Vzhledem k úspěšné produkci PHA, včetně kopolymeru P(3HB-*co*-3HV), z kávového odpadu, lze kávovou sedlinu považovat za vhodnou surovinu pro proces biorafinerie.

- Proteolyticky hydrolyzovaná syrovátka byla testována pro produkci PHA pomocí *C. necator* jako komplexní zdroj dusíku s využitím odpadního fritovacího oleje jako substrátu. V porovnání s jinými komplexními zdroji dusíku (pepton, kvasničný extrakt, hydrolyzát kaseinu) bylo dosaženo nejlepších výtěžků při použití proteolytického syrovátkového hydrolyzátu. Pokud bylo ke standardní kultivaci s minerálním médiem přidáno 10 obj. % hydrolyzované syrovátky, výtěžky biomasy a PHA výrazně vzrostly. Z hlediska produkce PHA byla ovšem jako nejlepší vyhodnocena kultivace se sníženým obsahem síranu amonného v minerálním médiu a přídatkem 10 obj. % syrovátky. Dle hodnot výtěžnostních koeficientů, došlo přídatkem syrovátky ke zlepšení utilizace oleje jako substrátu.
- Podobně jako syrovátka byl použit alkalickou hydrolyzou připravený hydrolyzát kuřecího peří, jenž byl do minerálního média přidán jako komplexní zdroj dusíku pro produkci PHA u *C. necator* na odpadním fritovacím oleji. Přidáním 10 obj. % hydrolyzátu peří došlo k zvýšení koncentrace biomasy ale také produkce PHA. Nejvyšších výtěžků biomasy a PHA bylo, podobně jako u syrovátky, dosaženo kultivací se sníženým obsahem síranu amonného v minerálním médiu a 10 obj. % hydrolyzátu peří. Zkoumán byl také vliv peří na inkorporaci 3HV do PHA v závislosti na použitém prekurzoru. Přítomnost hydrolyzátu peří v médiu pozitivně ovlivňovala inkorporaci 3HV. Největší rozdíl, oproti standardní kultivaci bez peří, byl zaznamenán v případě použití kyseliny valerové a propionátu.
- Vzhledem k překvapivě vysoké koncentraci oleje v kávové sedlině, byl tento olej použit pro přípravu lipozomů a lipozomů s obsahem PHB. Připravené částice byly testovány z hlediska stability a velikosti. Zkoumán byl také vliv obsahu kávového oleje v lipozomech na antioxidační aktivitu a antimikrobiální efekt, stanovena byla také enkapsulační účinnost částic s kávovým olejem. Vyšší antioxidační aktivita byla zjištěna u lipozomů s obsahem odpadního kávového oleje. Z hlediska kombinace parametrů stability, antioxidačního a antimikrobiálního účinku bylo nejlepších výsledků dosaženo u lipozomů obsahující 20 % oleje extrahovaného z kávové sedliny. Přídatkem PHB do částic s odpadním olejem byla navíc zvýšena jejich stabilita a částice rovněž vykazovaly vyšší enkapsulační kapacitu vůči polyfenolům. Lipozomové částice s obsahem odpadního kávového oleje a přídatkem PHB vykazovaly také relativně vysokou antioxidační aktivitu a rovněž antimikrobiální efekt vůči Gram pozitivním bakteriím.
- Další možnost využití PHB bylo ve formě vláknitých kompozitních materiálů pro účely filtrace mikrobiálních suspenzí. Dobrých účinností filtrace bylo dosaženo při obsahu aktivního uhlí více než 50 %. Pro účely filtrace byla také testována filtrace PHB textilií, která byla připravena z PHB s přídatkem aktivního uhlí, nebo oxidu kovu. Filtrovány byly suspenze o různé velikosti buněk, přičemž nejvyšší filtrační úspěšnosti bylo dosaženo použitím PHB textilie s aktivním uhlím. Zkoumány byly také možnosti degradace kompozitních filtračních materiálů v podmínkách kompostu. K rozpadu vzorků došlo velice rychle, příměs sorbentů neměla významný vliv na biodegradabilitu výsledného filtračního materiálu.
- Další část práce byla zaměřena na studium degradace polyhydroxyalkanoátů. Jednak byla testována produkce PHA depolymeráz vybranými mikrobiálními kmeny, kde

PHB ve formě prášku a fólie sloužilo jako jediný zdroj uhlíku pro vybrané mikroorganismy. Produkce PHA depolymeráz byla testována v průběhu přibližně tří týdnů. Jako neúspěšnější byla vyhodnocena degradace PHB plísní *A. fumigatus*, kdy došlo k produkci PHA depolymerázy v nejkratším čase. V tomto případě byly také naměřeny jednoznačně nejvyšší hodnoty PHA depolymerázové aktivity.

- V dalším experimentu byl prostudován vliv kompostovacích podmínek na polyuretan s parciálním nahrazením polyetherového polyolu PHB. Nahrazením části polyolu v polyuretanu PHB došlo k významnému zvýšení tuhosti PUR-PHB. Po dvou měsících testování bylo zjištěno, že se zvyšujícím obsahem PHB ve vzorku, byly hodnoty napětí v tahu a elasticity vyšší. Všeobecně došlo vlivem působení kompostovacích podmínek k zvýšení elasticity PUR-PHB, naopak hodnoty Youngova modulu pružnosti se s prodlužujícím časem kompostovacího testu snižovaly. Celkově byl materiál obsahující různé koncentrace PHB po degradaci více elastický a méně tuhý. Nicméně žádný z testovaných materiálů nepodléhal během kompostovacího testu významné biodegradaci, hmotnostní úbytky materiálů byly i během dlouhodobé inkubace zanedbatelné.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ASTM	American Society for Testing and Materials
DTT	dithiotreitol
EP	Extracelulární polysacharidy
EPS	Extracelulární polysacharidy
EU	Evropská Unie
FDA	Food and Drug Administration
FH	Feather hydrolysate
FID	Flame ionization detector
GC	Gas chromatography
HMF	Hydroxymethylfurfural
HPLC	High-performance liquid chromatography
ISO	International Organization for Standardization
MCL	medium-chain-length
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
PADC	polyalkylen dikarboxylát
PDI	Polydispersity index
PHA	Polyhydroxyalkanoáty
PHB	polyhydroxybutyrát
PHBV	kopolymer poly 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu
PMLA	polymer kyseliny jablečné
PTE	poly(thioestery)
PUR	Polyuretan
SCG	Spent coffee ground
SCGH	Spent coffee ground hydrolysate
SCL	short-chain-length
SEM	Scanning electron microscope
UDPG	uridindifosfátglukóza
UH	Ultrazvukový homogenizátor
3HV	3-hydroxyvalerát

7 REFERENCE

- AKBARZADEH, A., R. REZAEI-SADABADY, S. DAVARAN, et al. 2013. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*. **8**(1), 102-111.
- AKIYAMA, M., T. TSUGE a Y. DOI. 2003. Environmental life cycle comparison of polyhydroxyalkanoates produced from renewable carbon resources by bacterial fermentation. *Polymer Degradation and Stability*. **80**(1), 183-194.
- AL-HAMAMRE, Z., S. FOERSTER, F. HARTMANN, M. KRÖGER a M. KALTSCHMITT. 2012. Oil extracted from spent coffee grounds as a renewable source for fatty acid methyl ester manufacturing. *Fuel*. **96**, 70-76.
- ALBUQUERQUE, M. G. E., V. MARTINO, E. POLLET, L. AVÉROUS a M. A. M. REIS. 2011. Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: Effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties. *Journal of Biotechnology*. **151**(1), 66-76.
- ALBUQUERQUE, M. G. E., G. CARVALHO, C. KRAGELUND, A. F. SILVA, M. T. BARRETO CRESPO, M. A. M. REIS a P. H. NIELSEN. 2012. Link between microbial composition and carbon substrate-uptake preferences in a PHA-storing community. *The ISME Journal*. **7**(1), 1-12.
- ALLEN, A. D., W. A. ANDERSON, F. O. AYORINDE a B. E. ERIBO. 2010. Biosynthesis and characterization of copolymer poly(3HB-co-3HV) from saponified *Jatropha curcas* oil by *Pseudomonas oleovorans*. *Journal of Industrial Microbiology*. **37**(8), 849-856.
- ANJUM, A., M. ZUBER, K. M. ZIA, A. NOREEN, M. N. ANJUM a S. TABASUM. 2016. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*. **89**, 161-174.
- ANTRANIKIANA, G. 1996. *Biotechnology*. 2nd rev. ed. Weinheim: VCH, xiii, 739 s. ISBN 35-272-8316-1.
- AVÉROUS, L. a E. POLLET. 2012. *Environmental silicate nano-biocomposites*. London: Springer, vi, 447 pages. ISBN 978-144-7141-013.
- ASHBY, R. D. a T. A. FOGLIA. 1998. Poly(hydroxyalkanoate) biosynthesis from triglyceride substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **49**(4), 431-437.
- AYUB, N. D., M. J. PETTINARI, B. S. MÉNDEZ a N. I. LÓPEZ. 2007. The polyhydroxyalkanoate genes of a stress resistant *Antarctic Pseudomonas* are situated within a genomic island. *Plasmid*. **58**, 240-248.
- BALLESTEROS, L. F., J. A. TEIXEIRA a S. I. MUSSATTO. 2014. Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin. *Food and Bioprocess Technology*. **7**(12), 3493-3503.
- BARRIA, C., M. MALECKI a C. M. ARRAIANO. 2013. Bacterial adaptation to cold. *Microbiology*. **159**(12), 2437-2443.
- BASTIOLI, C.. 2005. *Handbook of biodegradable polymers*. Shrewsbury: Rapra Technology, xviii, 534 p. ISBN 978-3-527-32441-5.

- BERNIER, B. 1958. The production of polysaccharides by fungi active in the decomposition of wood and forest litter. *Canadian Journal of Microbiology*. **4**(3), 195-204.
- BHATT, R., K. C. PATEL a U. TRIVEDI. 2010. Purification and Properties of Extracellular Poly(3-hydroxybutyrate) Depolymerase Produced by *Aspergillus fumigatus* 202. *Journal of Polymers and the Environment*. **18**(2), 141-147.
- BONEBERG, B. S., G. D. MACHADO, D. F. SANTOS, F. GOMES, D. J. FARIA, L. A. GOMES a F. A. SANTOS. 2016. Biorefinery of Lignocellulosic Biopolymers. *Revista Eletrônica Científica da UERGS*. **2**(1), 79-100.
- BRAR, S., G. DHILLON a C. SOCCOL. 2014. *Biotransformation of waste biomass into high value biochemicals*. London: Springer. ISBN 978-146-1480-044.
- BRIGHAM, CH. a A. SINSKEY. 2012. Applications of Polyhydroxyalkanoates in the Medical Industry. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*. **1**(1), 53-60.
- BUDDE, CH. F., S. L. RIEDEL, F. HÜBNER, S. RISCH, M. K. POPOVIĆ, CH. RHA a A. J. SINSKEY. 2011. Growth and polyhydroxybutyrate production by *Ralstonia eutropha* in emulsified plant oil medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **89**(5), 1611-1619.
- BUGNICOURT, E. 2014. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *EXPRESS Polymer Letters*. **8**(11), 791–808.
- BULIGA, G. S. a D. A. BRANT. 1987. Temperature and molecular weight dependence of the unperturbed dimensions of aqueous pullulan. *International Journal of Biological Macromolecules*. **9**(2), 71-76.
- BUSCH, R., T. HIRTH, A. LIESE, et al. 2006. The utilization of renewable resources in German industrial production. *Biotechnology Journal*. **1**(7-8), 770-776.
- CAMPOS-VEGA, R., G. LOARCA-PIÑA, H. A. VERGARA-CASTAÑEDA a B. D. OOMAH. 2015. Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects. *Trends in Food Science & Technology*. **45**(1), 24-36.
- CAO, W., J. LUO, J. ZHAO, CH. QIAO, L. DING, B. QI, Y. SU a Y. WAN. 2012. Intensification of β -poly(l-malic acid) production by *Aureobasidium pullulans* ipe-1 in the late exponential growth phase. *Journal of Industrial Microbiology*. **39**(7), 1073-1080.
- CAVALHEIRO, J. M. B. T., M. D. DE ALMEIDA, CH. GRANDFILS a M.M.R. DA FONSECA. 2009. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Process Biochemistry*. **44**(5), 509-515.
- CIESIELSKI, S., J. MOŻEJKO a N. PISUTPAISAL. 2015. Plant oils as promising substrates for polyhydroxyalkanoates production. *Journal of Cleaner Production*. **106**, 408–421.
- COLOMBO, B., T. PEPE SCIARRIA, M. REIS, B. SCAGLIA a F. ADANI. 2016. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from fermented cheese whey by using a mixed microbial culture. *Bioresource Technology*. **218**, 692-9.
- ČOPIKOVÁ, J.. 1997. *Chemie a analytika sacharidů*. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 8070803061.

- DAVOODI, H., S. ESMAEILI a A. M. MORTAZAVIAN. 2013. Effects of Milk and Milk Products Consumption on Cancer: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **12**(3), 249-264.
- DE JONG, Ed a G. JUNGMEIER. 2015. Biorefinery Concepts in Comparison to Petrochemical Refineries. *Industrial Biorefineries & White Biotechnology*. 1. Elsevier, s. 3.
- DING, H., J. PORTILLA-ARIAS, R. PATIL, K. L. BLACK, J. Y. LJUBIMOVA a E. HOLLER, 2011. The optimization of polymeric acid peptide copolymers for endosomal drug delivery. *Biomaterials*. **32**(22), 5269-5278.
- DOELLE, H. W, ed. 2009. Biorefinery Concept for Sustainability and Human Development. ROKEM, S. a M. BEROVIC, DOELLE, H. W, ed. *Encyclopedia of life support system Biotechnology-Vol.II*. 7. Oxford: Eolss Publishers, s. 1-12. ISBN 978-1-84826-705-3.
- DOMAŃ-PYTKA, M. a J. BARDOWSKI. 2004. Pullulan Degrading Enzymes of Bacterial Origin. *Critical Reviews in Microbiology*. **30**(2), 107-121.
- DONG, W., L. TAN, J. ZHAO, R. HU a M. LU. 2015. Characterization of Fatty Acid, Amino Acid and Volatile Compound Compositions and Bioactive Components of Seven Coffee (*Coffea robusta*) Cultivars Grown in Hainan Province, China. *Molecules*. **20**(9), 16687-16708.
- DU, CH., J. SABIROVA, W. SOETAERT a S. KI CAROL LIN. 2012. Polyhydroxyalkanoates Production From Low-cost Sustainable Raw Materials. *Current Chemical Biology*. **6**(1), 14-25.
- DUDYŃSKI, M., K. KWIATKOWSKI a K. BAJER. 2012. From feathers to syngas – Technologies and devices. *Waste Management*. **32**(4), 685-691.
- DUMITRIU, S.. 1996. *Polysaccharides in medicinal applications*. New York: M. Dekker, viii, 794 p. ISBN 08-247-9540-7.
- DUQUE, A. F., C. S. S. OLIVEIRA, I. T. D. CARMO, A. R. GOUVEIA, F. PARDELHA, A. M. RAMOS a M. A. M. REIS. 2014. Response of a three-stage process for PHA production by mixed microbial cultures to feedstock shift: impact on polymer composition. *New Biotechnology*. **31**(4), 276-288.
- EGGERS, J. a A. STEINBUHEL. 2013. Poly(3-Hydroxybutyrate) Degradation in *Ralstonia eutropha* H16 Is Mediated Stereoselectively to (S)-3-Hydroxybutyryl Coenzyme A (CoA) via Crotonyl-CoA. *Journal of Bacteriology*. (14), 3213–3223.
- ELAIN, A., A. LE GRAND, Y. CORRE, et al. 2016. Valorisation of local agro-industrial processing waters as growth media for polyhydroxyalkanoates (PHA) production. *Industrial Crops and Products*. **80**, 1-5.
- ESQUIVEL, P. a V. M. JIMÉNEZ. 2012. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*. **46**(2), 488-495.
- FARAH, A., M. MONTEIRO, C. DONANGELO a S. LAFAY. 2008. Chlorogenic Acids from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans. *The Journal of Nutrition*. **138**(12), 2309-2315.
- FERNÁNDEZ-DACOSTA, C., J. A. POSADA, R. KLEEREBEZEM, M. C. CUELLAR a A. RAMIREZ. 2015. Microbial community-based polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from wastewater: Techno-economic analysis and ex-ante environmental assessment. *Bioresource Technology*. **185**, 368-377.

- FERNÁNDEZ, C. E., M. MANCERA, E. HOLLER, J. A. GALBIS a S. MUÑOZ-GUERRA. 2006. High molecular weight methyl ester of microbial poly(β ,l-malic acid): Synthesis and crystallization. *Polymer*. **47**(19), 6501-6508.
- FERREIRA, L. M., A. VELASQUEZ, S. R. SCHAFFAZICK a L. CRUZ. 2015. Pullulan: an advantageous natural polysaccharide excipient to formulate tablets of alendronate-loaded microparticles. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. **51**(1), 27-33.
- FLICKINGER, M. C. a S. DREW. 1999. *Encyclopedia of bioprocess technology fermentation, biocatalysis, and bioseparation*. New York: J. Wiley. ISBN 15-912-4457-9.
- FRANCIS, R., S. SASIKUMAR a G. P. GOPALAN. 2013. Synthesis, Structure, and Properties of Biopolymers (Natural and Synthetic). *Polymer Composites*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag, s. 11.
- FURRER, P., S. PANKE a M. ZINN. 2007. Efficient recovery of low endotoxin medium-chain-length poly([R]-3-hydroxyalkanoate) from bacterial biomass. *Journal of Microbiological Methods*. **69**(1), 206-213.
- GADD, G. M. a S. SARIASLANI, eds. 2015. *Advances in Applied Microbiology*. 93. Academic Press, 190 s. ISBN 978-0128022511.
- GARCÍA, I. L., J. A. LÓPEZ, M. P. DORADO, N. KOPSAHELIS, M. ALEXANDRI, S. PAPANIKOLAOU, M.A. VILLAR a A.A. KOUTINAS. 2013. Evaluation of by-products from the biodiesel industry as fermentation feedstock for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Cupriavidus necator*. *Bioresource Technology*. (130), 16-22.
- GASSLMAIER, B., CH. M. KRELL, D. SEEBACH a E. HOLLER. 2000. Synthetic substrates and inhibitors of β -poly(L-malate)-hydrolase (polymalataze). *European Journal of Biochemistry*. **267**(16), 5101-5105.
- GESSESSE, A., R. HATTI-KAUL, B. A GASHE a B. MATTIASSON. 2003. Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. *Enzyme and Microbial Technology*. **32**(5), 519-524.
- GIVAN, A. L.. 1992. *Flow cytometry: first principles*. 2nd ed. New York: Wiley-Liss, xiv, 202 p. ISBN 04-715-6095-2.
- GÖDDE, C., M. LIEBERGESELL a A. STEINBÜCHEL. 1999. Isolation of poly(l-malic acid)-degrading bacteria and purification and characterization of the PMA hydrolase from *Comamonas acidovorans* strain 7789. *FEMS Microbiology Letters*. **173**(2), 365-372.
- GOH, Y. S. a I. K. P. TAN. 2012. Polyhydroxyalkanoate production by antarctic soil bacteria isolated from Casey Station and Signy Island. *Microbiological Research*. **167**(4), 211-219.
- GONCALVES, R. C. R. a S. R. POMBEIRO-SPONCHIADO. 2005. Antioxidant Activity of the Melanin Pigment Extracted from *Aspergillus nidulans*. *Biological*. **28**(6), 1129-1131.
- GOSTINČAR, C., R. A OHM, T. KOGEJ, et al. 2014. Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. *BMC Genomics*. **15**(1), 549-577.
- GRZENIA, D. L., D. J. SCHELL a S. RANIL WICKRAMSINGHE. 2010. Detoxification of biomass hydrolysates by reactive membrane extraction. *Journal of Membrane Science*. **348**(1-2), 6-12.

- GUMEL, A. M., M. S. M. ANNUAR a Y. CHISTI. 2013. Recent Advances in the Production, Recovery and Applications of Polyhydroxyalkanoates. *Journal of Polymers and the Environment*. **21**(2), 580-605.
- HABA, E., J. VIDAL-MAS, M. BASSAS, M.J. ESPUNY, J. LLORENS a A. MANRESA. 2007. Poly 3-(hydroxyalkanoates) produced from oily substrates by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 (NCBIM 40044): Effect of nutrients and incubation temperature on polymer composition. *Biochemical Engineering Journal*. **35**(2), 99-106.
- HADIYANTO, D. ARIYANTI, A. P. AINI a D. S. PINUNDI. 2014. Optimization of Ethanol Production from Whey Through Fed-batch Fermentation Using *Kluyveromyces Marxianus*. *Energy Procedia*. (47), 108-112.
- HARZEVILI, F. D. a H. CHEN. 2014. *Microbial biotechnology: progress and trends*. CRC Press, xiv, 365 pages. ISBN 9781482245202.
- HEJAZI, P., E. VASHEGHANI-FARAHANI a Y. YAMINI. 2003. Supercritical Fluid Disruption of *Ralstonia eutropha* for Poly(β -hydroxybutyrate) Recovery. *Biotechnology Progress*. **19**(15), 1519-1523.
- HIRAISHI, T. a S. TAGUCHI. 2009. Enzyme-catalyzed Synthesis and Degradation of Biopolymers. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*. **6**(1), 44-54.
- HOLLER, E., B. ANGERER, G. ACHHAMMER, S. MILLER a CH. WINDISCH. 1992. Biological and biosynthetic properties of poly-l-malate: the origin, evolution, and impact of doi moi. *FEMS Microbiology Letters*. **103**(2-4), 109-118.
- HOLLER, E. a B. S. LEE. 2002. Analysis of poly(β -l-malic acid) in tissue and solution. *Recent Res. Dev. Anal. Chem.* (2), 177-192.
- HUANG, T., K. DUAN, S. HUANG a C. W. CHEN. 2006. Production of polyhydroxyalkanoates from inexpensive extruded rice bran and starch by *Haloferax mediterranei*. *Journal of Industrial Microbiology*. **33**(8), 701-706.
- HUANG, L., CH. LIU, Y. LIU a X. JIA. 2016. The composition analysis and preliminary cultivation optimization of a PHA-producing microbial consortium with xylose as a sole carbon source. *Waste Management*. **52**, 77-85.
- CHANDEL, A. K. a O. V. SINGH. 2011. Weedy lignocellulosic feedstock and microbial metabolic engineering: advancing the generation of 'Biofuel'. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **89**(5), 1289-1303.
- CHANDEL, A. K., S. S. DA SILVA a O. V. SINGH. 2013. Detoxification of Lignocellulose Hydrolysates: Biochemical and Metabolic Engineering Toward White Biotechnology. *BioEnergy Research*. **6**(1), 388-401.
- CHANDRA, R. a R. RUSTGI. 1998. Biodegradable polymers. *Progress in polymer science*. New York: Pergamon Press, (27), 1273-1335.
- CHANG, C.C, M.H. YANG, H.M. WEN a J.C. CHERN. 2002. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*. **10**(3), 178-182.

- CHEE, J. Y., Y. TAN, M. SAMIAN a K. SUDESH. 2010. Isolation and Characterization of a *Burkholderia* sp. USM (JCM15050) Capable of Producing Polyhydroxyalkanoate (PHA) from Triglycerides, Fatty Acids and Glycerols. *Journal of Polymers and the Environment*. **18**(4), 584-592.
- CHEN, C. W., T. M. DON a H. F. YEN. 2006. Enzymatic extruded starch as a carbon source for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. *Process Biochemistry*. **41**(11), 2289-2296.
- CHEN, H. J., S. C. PAN a G. C. SHAW. 2009. Identification and Characterization of a Novel Intracellular Poly(3-Hydroxybutyrate) Depolymerase from *Bacillus megaterium*. *Applied and environmental microbiology*. **75**(16), 5290–5299.
- CHEN, G. Q., ed. 2010. *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*. 1. Berlin: Springer. ISBN 9783642032875.
- CHENG, K. CH., A. DEMIRCI aj. M. CATCHMARK. 2011. Pullulan: biosynthesis, production, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **92**(1), 29-44.
- CHEREMISINOFF, N. P. 1997. *Handbook of engineering polymeric materials*. New York: Marcel Dekker, xii, 881 p. ISBN 08-247-9799-X.
- CHERUBINI, F.. 2010. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*. **51**, 1412–1421.
- CHI, Z., F. WANG, Z. CHI, L. YUE, G. LIU a T. ZHANG. 2009. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **82**(5), 793-804.
- CHOUDHURY, A. R., P. SALUJA a G.S. PRASAD. 2011. Pullulan production by an osmotolerant *Aureobasidium pullulans* RBF-4A3 isolated from flowers of *Caesulia axillaris*. *Carbohydrate Polymers*. **83**(4), 1547-1552.
- IBRAHIM, M. H. A., A. WILLEMS a A. STEINBÜCHEL. 2010. Isolation and characterization of new poly(3HB)-accumulating star-shaped cell-aggregates-forming thermophilic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. **109**, 1579-1590.
- IENCZAK, J. L. a G. M. F. DE ARAGÃO. 2011. Biotechnologically Produced Biodegradable Polyesters: synthesis, characterization, and applications. *Handbook of Biodegradable Polymers*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag, s. 23.
- ISRAILIDES, C. J., A. SMITH, J. E. HARTHILL, C. BARNETT, G. BAMBALOV a B. SCANLON. 1998. Pullulan content of the ethanol precipitate from fermented agro-industrial wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **49**(5), 613-617.
- IYER, S., R. SHAH, A. SHARMA, D. JENDROSSEK a A. DESAI. 2000. Purification of *Aspergillus fumigatus* (Pdf1) Poly(b-hydroxybutyrate) (PHB) Depolymerase Using a New, Single-Step Substrate Affinity Chromatography Method: Characterization of the PHB Depolymerase Exhibiting Novel Self-Aggregation Behavior. *Journal of Polymers and the Environment*. **8**(4), 197-203.
- JAMBUNATHAN, P. a K. ZHANG. 2016. Engineered biosynthesis of biodegradable polymers. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **43**, 1037–1058.
- JAYATHILAKAN, K., K. SULTANA, K. RADHAKRISHNA a A. S. BAWA. 2012. Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. *Journal of Food Science and Technology*. **49**(3), 278-293.

- JEEWANTHI, R. K. CH., N. LEE a H. D. PAIK. 2015. Improved Functional Characteristics of Whey Protein Hydrolysates in Food Industry. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. **35**(3), 350-359.
- JENDROSSEK, D. 2009. Polyhydroxyalkanoate Granules Are Complex Subcellular Organelles (Carbonosomes). *Journal of Bacteriology*. **191**(10), 3195–3202.
- JENDROSSEK, D., A. SCHIRMER a H. G. SCHLEGEL. 1996. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **46**(5-6), 451-463.
- JENDROSSEK, D., Y. DOI a A. STEINBÜCHEL. 2005. Extracellular Polyhydroxyalkanoate (PHA) Depolymerases: The Key Enzymes of PHA Degradation. *Biopolymers Online*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag.
- JENDROSSEK, D. a R. HANDRICK. 2002. Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates. *Annual Review of Microbiology*. **56**(1), 403-432.
- JIANG, G., D. HILL, M. KOWALCZUK, B. JOHNSTON, G. ADAMUS, V. IRORERE a I. RADECKA. 2016. Carbon Sources for Polyhydroxyalkanoates and an Integrated Biorefinery. *International Journal of Molecular Sciences*. **17**(7), 1157-1178.
- JIANG, Y., L. MARANG, J. TAMIS, M. C. M. VAN LOOSDRECHT, H. DIJKMAN a R. KLEEREBEZEM. 2012. Waste to resource: Converting paper mill wastewater to bioplastic. *Water research*. **46**(17), 5517-30.
- JÖNSSON, L. J, B. ALRIKSSON a N. O. NILVEBRANT. 2013. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*. **6**(1), 1-16.
- JOSEPH, S., M. J. JOHN, L. A. POTHEN a S. THOMAS. 2010. Raw and Renewable Polymers. JOSEPH, S., M. J. JOHN, L. A. P. a S. THOMAS. *Raw and renewable polymers. Polymers - Opportunities and Risks II The Handbook of Environmental Chemistry*. Berlin: Springer, s. 55-80.. ISBN 978-3-642-02796-3.
- JOSHI, A. A., P. P. KANEKAR, A. S. KELKAR, Y. S. SHOUCHE, A. A. VANI, S. B. BORGAVE a S. S. SARNAIK. 2008. Cultivable Bacterial Diversity of Alkaline Lonar Lake, India. *Microbial Ecology*. **55**(2), 163-172.
- KABASCI, S.. 2014. *Bio-based plastics: materials and applications*. Chichester, West Sussex, United Kingdom: John Wiley, (389 pages). Wiley series in renewable resources. ISBN 978-1-118-67678-3.
- KADOURI, D., E. JURKEVITCH, Y. OKON a S. CASTRO-SOWINSKI. 2005. Ecological and Agricultural Significance of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Critical Reviews in Microbiology*. **31**(2), 55-67.
- KAHAR, P., T. TSUGE, K. TAGUCHI a Y. DOI. 2004. High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. *Polymer Degradation and Stability*. **83**(1), 79-86.
- KACHRIMANIDOU, V., N. KOPSAHELIS, S. PAPANIKOLAOU, I. K. KOOKOS, M. DE BRUYN, J. H. CLARK a A. A. KOUTINAS. 2014. Sunflower-based biorefinery: Poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production from crude glycerol, sunflower meal and levulinic acid. *Bioresource Technology*. **172**, 121-30.
- KALIA, V. CH.. 2015. *Microbial factories: biodiversity, biopolymers, bioactive molecules*. 1. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg. ISBN 9788132225942.

- KATO, M., H. J. BAO, C.-K. KANG, T. FUKUI a Y. DOI. 1996. Production of a novel copolyester of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids by *Pseudomonas* sp. 61-3 from sugars. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **45**(3), 363–370.
- KHOSRAVI-DARANI, K.. 2015. Application of Poly(hydroxyalkanoate) In Food Packaging: Improvements by Nanotechnology. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. **29**(2), 275–285.
- KHOSRAVI-DARANI, K., S. ABBAS a S. A. SHOJAOSADATI. 2004. Application of the Taguchi Design for Production of Poly(β -hydroxybutyrate) by *Ralstonia eutropha*. *Iranian Journal Of Chemistry & Chemical Engineering*. **23**(1), 131-136.
- KIM, K, R TSAO, R YANG a S CUI. 2006. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry*. **95**(3), 466-473.
- KIM, Y. B. a R. W. LENZ. 2001. Polyesters from Microorganisms. KIM, Y. B. a R. LENZ. *Biopolyesters: Polyesters from Microorganisms*. Berlin: Springer, s. 51-79.
- KLIS, F. M., C. G. DE KOSTER a S. BRUL. 2014. Cell Wall-Related Bionumbers and Bioestimates of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*. **13**(1), 2-9.
- KOBAYASHI, Y., H. IWATA, D. MIZUSHIMA, J. OGIHARA a T. KASUMI. 2015. Erythritol production by *Moniliella megachiliensis* using nonrefined glycerol waste as carbon source. *Letters in Applied Microbiology*. **60**(5), 475-480.
- KOLLER, M., A. ATLIĆ, Y. GONZALEZ-GARCIA, CH. KUTSCHERA a G. BRAUNEGG. 2008. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biosynthesis from Whey Lactose. *Macromolecular Symposia*. **272**(1), 87-92.
- KOLLER, M., P. HESSE, R. BONA, CH. KUTSCHERA, A. ATLIĆ a G. BRAUNEGG. 2007. Potential of Various Archae and Eubacterial Strains as Industrial Polyhydroxyalkanoate Producers from Whey. *Macromolecular Bioscience*. **7**(2), 218-226.
- KOLLER, M., H. NIEBELSCHÜTZ a G. BRAUNEGG. 2013a. Strategies for recovery and purification of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] (PHA) biopolyesters from surrounding biomass. *Engineering in Life Sciences*. **13**(6), 549–562.
- KOLLER, M., A. SALERNO a G. BRAUNEGG. 2013b. Polyhydroxyalkanoates: Basics, Production and Applications of Microbial Biopolyesters. *Bio-Based Plastics*. Chichester, UK: John Wiley, s. 137.
- KOLLER, M., A. SALERNO, A. MUHR, A. REITERER, E. CHIellini, S. CASELLA, P. HORVAT a G. BRAUNEGG. 2012. Whey Lactose as a Raw Material for Microbial Production of Biodegradable Polyesters. *Polyester*. InTech. ISBN 978-953-51-0770-5.
- KROL, P. 2007. Synthesis methods, chemical structures and phase structures of linear polyurethanes. Properties and applications of linear polyurethanes in polyurethane elastomers, copolymers and ionomers. *Progress in Materials Science*. **52**(6), 915-1015.
- KUBACKA, A., M. S. DIEZ, D. ROJO, et al. 2014. Understanding the antimicrobial mechanism of TiO₂-based nanocomposite films in a pathogenic bacterium. *Scientific Reports*. **4**,1-9.
- KULKARNI, S.O., P.P. KANEKAR, S.S. NILEGAONKAR, S.S. SARNAIK a J.P. JOG. 2010. Production and characterization of a biodegradable poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHB-co-PHV) copolymer by moderately haloalkalitolerant *Halomonas campisalis* MCM B-1027 isolated from Lonar Lake, India. *Bioresource Technology*. **101**(24), 9765-71.

- KUMAR, R., S. SINGH a O. V. SINGH. 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology*. **35**(5), 377-391.
- KUSHWAH, B. S., A. V. S. KUSHWAH a V. SINGH. 2016. Towards understanding polyhydroxyalkanoates and their use. *Journal of Polymer Research*. **23**, 1-14.
- KWON, E. E., H. YI a Y. J. JEON. 2013. Sequential co-production of biodiesel and bioethanol with spent coffee grounds. *Bioresource Technology*. **136**, 475-480.
- LEATHERS, T. D. a P. MANITCHOTPISIT. 2013. Production of poly(β -l-malic acid) (PMA) from agricultural biomass substrates by *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnology Letters*. **35**(1), 83-89.
- LEE, B. 2000. B-Poly(L-malate) production by non-growing microplasmidia of *Physarum polycephalum* Effects of metabolic intermediates and inhibitors. *FEMS Microbiology Letters*. **193**(1), 69-74.
- LEE, B. S. a E. HOLLER. 1999. Effects of culture conditions on β -poly(l -malate) production by *Physarum polycephalum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **51**(5), 647-652.
- LEE, G., J. NA, R. C. FULLER a B. H. A. REHM. 2013. Future of microbial polyesters: Past, Present and Future. *Microbial Cell Factories*. **12**(1), 47-72.
- LEE, S. Y., S. J. PARK, J. P. PARK, Y. LEE, S. H. LEE a A. STEINBÜCHEL. 2005. Economic Aspects of Biopolymer Production. *Biopolymers Online*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag.
- LEE, W. H., CH. Y. LOO, CH. T. NOMURA a K. SUDESH. 2008. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors. *Bioresource Technology*. **99**(15), 6844-6851.
- LEITE, R. S. R., D. A. BOCCHINI, E. S. MARTINS, D. SILVA, E. GOMES a R. DA SILVA. 2007. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pullulans* on solid state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **137-140**(1-12), 281-288.
- LENIHAN, P., A. OROZCO, E. O'NEILL, M.N.M. AHMAD, D.W. ROONEY a G.M. WALKER. 2010. Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Chemical Engineering Journal*. **156**(2), 395-403.
- LINDSEY, K. 1998. *Transgenic plant research*. Australia: Harwood Academic Publishers, s. 201-218.
- LOPES, M. S. G., R. C. S. ROCHA, S. P. ZANOTTO, J. G. C. GOMEZ a L. F. SILVA. 2009. Screening of bacteria to produce polyhydroxyalkanoates from xylose. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **25**(10), 1751-1756.
- LOWRY, O., N. ROSEBROUGH, L. FARR a R. RANDALL. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. **193**(1), 265-275.
- LÓPEZ-ABELAIRAS, M., M. GARCÍA-TORREIRO, T. LÚ-CHAU, J.M. LEMA a A. STEINBÜCHEL. 2015. Comparison of several methods for the separation of poly(3-hydroxybutyrate) from *Cupriavidus necator* H16 cultures. *Biochemical Engineering Journal*. **93**, 250-259.
- LÜTKE-EVERSLOH, T., K. BERGANDER, H. LUFTMANN a A. STEINBÜCHEL. 2001. Biosynthesis of Poly(3-hydroxybutyrate- c o -3-mercaptoputyrate) as a Sulfur Analogue to Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB). *Biomacromolecules*. **2**(3), 1061-1065.
- LÜTKE-EVERSLOH, T. a A. STEINBÜCHEL. 2004. Microbial Polythioesters. *Macromolecular Bioscience*. **4**(3), 165-174.

- MA, Y., G. Y. WANG, G. L. LIU, Z. P. WANG a Z. M. CHI. 2013. Overproduction of poly(β -malic acid) (PMA) from glucose by a novel *Aureobasidium* sp. P6 strain isolated from mangrove system. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **97**(20), 8931-8939.
- MADISON, L. L. a G. W. HUISMAN. 1999. Metabolic Engineering of Poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Washington: American Society for Microbiology, **63**(1), 21-53.
- MANOSAK, R., S. LIMPATTAYANATE a M. HUNSOM. 2011. Sequential-refining of crude glycerol derived from waste used-oil methyl ester plant via a combined process of chemical and adsorption. *Fuel Processing Technology*. **92**(1), 92-99.
- MARLES-WRIGHT, J. a R. J LEWIS. 2007. Stress responses of bacteria. *Current Opinion in Structural Biology*. **17**(6), 755-760.
- MÁROVÁ, I.. 2012. *Praktikum z biochemie*. 2. Brno: VUTIUM.
- MASOOD, F., T. YASIN a A. HAMEED. 2015. Polyhydroxyalkanoates – what are the uses? Current challenges and perspectives. *Journal Critical Reviews in Biotechnology*. **35**(4), 514-521.
- MATOUŠKOVÁ, P.. 2015. *Využití různých technik enkapsulace k řízenému uvolňování aktivních látek v potravinářských a kosmetických přípravcích*. Brno.
- MAZZUCOTELLI, C. A., I. DURRUTY, C. E. KOTLAR, M. R. MOREIRA, A. G. PONCE a S. I. ROURA. 2014. Development of a microbial consortium for dairy wastewater treatment. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. **19**(2), 221-230.
- MEHER, L, D VIDYASAGAR a S NAIK. 2006. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **10**(3), 248-268.
- MILLER, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. **31**(3), 426-428.
- MISHRA, B., S. VUPPU a K. RATH. 2011. The role of microbial pullulan, a biopolymer in pharmaceutical approaches: A review. *Journal of applied pharmaceutical science*. (6), 45-50.
- MIZAMOTO, K. 1997. *Renewable biological systems for alternative sustainable energy production*. FAO. ISBN 92-5-104059-1. Dostupné z: <http://www.fao.org/docrep/w7241e/w7241e00.HTM>.
- MOHAN, S., G.N. NIKHIL, P. CHIRANJEEVI, C. REDDY, M.V. ROHIT, A. Naresh KUMAR a Omprakash SARKAR. 2016. Waste biorefinery models towards sustainable circular bioeconomy: Critical review and future perspectives. *Bioresource Technology*. **215**, 2–12.
- MOITA, R., A. FRECHES a P.C. LEMOS. 2014. Crude glycerol as feedstock for polyhydroxyalkanoates production by mixed microbial cultures. *Water Research*. (58), 9-20.
- MOLLEA, CH., L. MARMO a F. BOSCO. 2013. Valorisation of Cheese Whey, a By-Product from the Dairy Industry. *Food Industry*. InTech, s. 549-588.
- MORALEJO-GÁRATE, H., R. KLEEREBEZEM, A. MOSQUERA-CORRAL, J. L. CAMPOS, T. PALMEIRO-SÁNCHEZ a M. C. M. VAN LOOSDRECHT. 2014. Substrate versatility of polyhydroxyalkanoate producing glycerol grown bacterial enrichment culture. *Water research*. **66**, 190 -198.
- MOULIN, G. a P. GALZY. 1984. Whey, a Potential Substrate for Biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. **1**(1), 347-374.

- MOŽEJKO, J. a S. CIESIELSKI. 2014. Pulsed feeding strategy is more favorable to medium-chain-length polyhydroxyalkanoates production from waste rapeseed oil. *Biotechnology Progress*. **30**(5), 1243-1246.
- MULLER, J., D. MACEACHRAN, H. BURD, et al. 2013. Engineering of *Ralstonia eutropha* H16 for Autotrophic and Heterotrophic Production of Methyl Ketones. *Applied and Environmental Microbiology*. **79**(14), 4433-4439.
- MÜLLER, R. J. a A. STEINBÜCHEL. 2005. Biodegradability of Polymers: Regulations and Methods for Testing. *Biopolymers Online*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag. ISBN 3527600035.
- NAGATA, N., T. NAKAHARA a T. TABUCHI. 2014. Fermentative Production of Poly(β - L -malic acid), a Polyelectrolytic Biopolyester, by *Aureobasidium* sp. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. **57**(4), 638-642.
- NAIR, L. S. a C. T. LAURENCIN. 2007. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*. **32**(8-9), 762-798. ISSN 00796700.
- NARAYAN, Roger, ed. 2009. *Biomedical materials*. New York: Springer. ISBN 978-0387848716.
- NATH, A., M. DIXIT, A. BANDIYA, S. CHAVDA a A.J. DESAI. 2008. Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24. *Bioresource Technology*. **99**(13), 5749-5755.
- NIAOUNAKIS, M.. 2013. *Biopolymers: reuse, recycling, and disposal*. Waltham, MA: Elsevier/WA, xviii, 413 p. ISBN 14-557-3145-5.
- NIES, D. H. 2004. Incidence and function of sigma factors in *Ralstonia metallidurans* and other bacteria. *Archives of Microbiology*. **181**(4), 255-268.
- NIGAM, P. S. a A. PANDEY. 2009. *Biotechnology for agro-industrial residues utilisation: utilisation of agro-residues*. Netherlands: Springer, xvii, 466 p. ISBN 9781402099427.
- NIGMATULLIN, R., P. THOMAS, B. LUKASIEWICZ, H. PUTHUSSERY a I. ROY. 2015. Polyhydroxyalkanoates, a family of natural polymers, and their applications in drug delivery. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **90**(7), 1209–1221.
- NTAIKOU, I., C. VALENCIA PERONI, C. KOURMENTZA, V.I. ILIEVA, A. MORELLI, E. CHIELLINI a G. LYBERATOS. 2014. Microbial bio-based plastics from olive-mill wastewater: Generation and properties of polyhydroxyalkanoates from mixed cultures in a two-stage pilot scale system. *Journal of Biotechnology*. **188**, 138-147.
- OBRUCA, S., P. BENESOVA, L. MARSALEK a I. MAROVA. 2015. Use of Lignocellulosic Materials for PHA Production. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. **29**(2), 135-144.
- OBRUCA, S., P. BENESOVA, S. PETRIK, J. OBORNA, R. PRIKRYL a I. MAROVA. 2014. Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolysate of spent coffee grounds. *Process Biochemistry*. **49**(9), 1409-1414.
- OBRUCA, S., I. MAROVA, O. SNAJDAR, L. MRAVCOVA a Z. SVOBODA. 2010. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* from waste rapeseed oil using propanol as a precursor of 3-hydroxyvalerate. *Biotechnology Letters*. **32**(12), 1925-32.

- OBRUCA, S., I. MAROVA, S. MELUSOVA a L. MRAVCOVA. 2011. Production of polyhydroxyalkanoates from cheese whey employing *Bacillus megaterium* CCM 2037. *Annals of Microbiology*. **61**(4), 947-953.
- OBRUCA, S., S. PETRIK, P. BENESOVA, Z. SVOBODA, L. EREMKA a I. MAROVA. 2014a. Utilization of oil extracted from spent coffee grounds for sustainable production of polyhydroxyalkanoates. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **98**(13), 5883-5890.
- OBRUCA, Stanislav, Ondrej SNAJDAR, Zdenek SVOBODA a Ivana MAROVA. 2013. Application of random mutagenesis to enhance the production of polyhydroxyalkanoates by *Cupriavidus necator* H16 on waste frying oil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **29**(12), 2417-2428.
- OEHMEN, A., P. LEMOS, G. CARVALHO, Z. YUAN, J. KELLER, L. BLACKALL a M. REIS. 2007. Advances in enhanced biological phosphorus removal: From micro to macro scale. *Water research*. **41**(11), 2271 – 2300.
- OSSWALD, T. A. 2011. *A Handbook of Applied Biopolymer Technology: Synthesis, Degradation and Applications*. S.l.: Royal Society of Chemistry. ISBN 978-184-9731-515.
- PAIS, J., L. S. SERAFIM, F. FREITAS a M. A.M. REIS. 2016. Conversion of cheese whey into poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. *New Biotechnology*. **33**(1), 224-230.
- PANTAZAKI, A. A., CH. P. PAPANEOPHYTOU, A. G. PRITSA, M. LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES a D. A. KYRIAKIDIS. 2009. Production of polyhydroxyalkanoates from whey by *Thermus thermophilus* HB8. *Process Biochemistry*. **44**(8), 847-853.
- PARAWIRA, W. a M. TEKERE. 2011. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. *Critical Reviews in Biotechnology*. **31**(1), 20-31.
- PATIL, R., J. PORTILLA-ARIAS, H. DING, et al. 2012. Cellular Delivery of Doxorubicin via pH-Controlled Hydrazone Linkage Using Multifunctional Nano Vehicle Based on Poly(β -L-Malic Acid). *International Journal of Molecular Sciences*. **13**(12), 11681-11693.
- PAVEZ, P., J. L. CASTILLO, C. GONZÁLEZ a Miguel MARTÍNEZ. 2009. Poly- β -Hydroxyalkanoate Exert a Protective Effect Against Carbon Starvation and Frozen Conditions in *Sphingopyxis chilensis*. *Current Microbiology*. **59**, 636–640.
- PERSSON, P, J. ANDERSSON, L. GORTON, S. LARSSON, N. O. NILVEBRANT a L. J. JÖNSSON. 2002. Effect of Different Forms of Alkali Treatment on Specific Fermentation Inhibitors and on the Fermentability of Lignocellulose Hydrolysates for Production of Fuel Ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **50**(19), 5318-5325.
- PETERS, D.. 2007. Raw Materials. *White Biotechnology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, (105), s. 1-30.
- PETRIK, S., S. OBRUČA, P. BENEŠOVÁ a I. MÁROVÁ. 2014. Bioconversion of spent coffee grounds into carotenoids and other valuable metabolites by selected red yeast strains. *Biochemical Engineering Journal*. **90**, 307-315.
- PHILLIPS, G. 2009. *Handbook of Hydrocolloids (2nd Edition)*. 2nd ed. S.l.: Woodhead Pub. ISBN 978-184-5694-142.

- PHITHAKROTCHANAKOON, CH., V. CHAMPREDA, S. AIBA, K. POOTANAKIT a S. TANAPONGPIPAT. 2015. Production of Polyhydroxyalkanoates from Crude Glycerol Using Recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Polymers and the Environment*. **23**(1), 38-44.
- PIEJA, A. J., K. H. ROSTKOWSKI a C. S. CRIDDLE. 2011. Distribution and Selection of Poly-3-Hydroxybutyrate Production Capacity in Methanotrophic Proteobacteria. *Microbial Ecology*. **62**(3), 564-73.
- POLI, A., P. DI DONATO, G. R. ABBAMONDI a B. NICOLAUS. 2011. Synthesis, Production, and Biotechnological Applications of Exopolysaccharides and Polyhydroxyalkanoates by Archaea. *Publishing Corporation Archaea*. **2011**, 1-13.
- PORTILLA-ARIAS, J. A., M. GARCÍA-ALVAREZ, A. MARTÍNEZ DE ILARDUYA, E. HOLLER a S. MUÑOZ-GUERRA. 2006. Thermal Decomposition of Fungal Poly(β , 1 -malic acid) and Poly(β , 1 -malate)s. *Biomacromolecules*. **7**(11), 3283-3290.
- PÖTTER, M., M. MADKOUR, F. MAYER a A. STEINBÜCHEL. 2002. Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. BLACK, J. G a L. J. BLACK. *Microbiology*. Hoboken: Wiley, (148), 2413-2426. ISBN 978-1-118-74316-4.
- PRAJAPATI, V. D., G. K. JANI a S. M. KHANDA. 2013. Pullulan: An exopolysaccharide and its various applications. *Carbohydrate Polymers*. **95**(1), 540-549.
- PRAKASH, S., Y. VEERANAGOUDA, L. KYOUNG a K. SREERAMULU. 2009. Xylanase production using inexpensive agricultural wastes and its partial characterization from a halophilic *Chromohalobacter* sp. TPSV 101. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **25**(2), 197-204.
- PRAMANIK, A., A. MITRA, M. ARUMUGAM, et al. 2012. Utilization of vinasse for the production of polyhydroxybutyrate by *Haloarcula marismortui*. *Folia Microbiologica*. **57**(1), 71-79.
- PRUDNIKOVA, S. V., A. N. BOYANDIN, G. S. KALACHEVA a A. J. SINSKEY. 2013. Degradable Polyhydroxyalkanoates as Herbicide Carriers. *Journal of Polymers and the Environment*. **21**(3), 675-682.
- QIN, X. a S. SUBIANTO. 2017. Electrospun nanofibers for filtration applications. *Electrospun Nanofibers*. 1. Elsevier, s. 449.
- QUEIRÓS, D., S. ROSSETTI a L. S. SERAFIM. 2014. PHA production by mixed cultures: A way to valorize wastes from pulp industry. *Bioresource Technology*. **157**, 197-205.
- QUILLAGUAMÁN, J., S. HASHIM, F. BENTO, B. MATTIASSON a R. HATTI-KAUL. 2005. Poly(β -hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1 using starch hydrolysate as substrate. *Journal of Applied Microbiology*. **99**(1), 151-157.
- RAO, U., R. SRIDHAR a P. K. SEHGAL. 2010. Biosynthesis and biocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* from spent palm oil. *Biochemical Engineering Journal*. **49**(1), 13-20.
- RE, R., N. PELLEGRINI, A. PROTEGGENTE, A. PANNALA, M. YANG a C. RICE-EVANS. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. **26**(9-10), 1231-1237.
- REDDY, N.. 2015. Non-food industrial applications of poultry feathers. *Waste Management*. **45**, 91-107.

- REHM, B.. 2009. *Microbial production of biopolymers and polymer precursors: applications and perspectives*. Wymondham: Caister Academic, viii, 293 p.. ISBN 19-044-5536-0.
- REHM, B. H. A. 2010. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nature Reviews Microbiology*. **8**(8), 578-592.
- REINECKE, F. a A. STEINBÜCHEL. 2009. *Ralstonia eutropha* Strain H16 as Model Organism for PHA Metabolism and for Biotechnological Production of Technically Interesting Biopolymers. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*. **16**(1-2), 91-108.
- REIS, M. A. M., L. S. SERAFIM, P. C. LEMOS, A. M. RAMOS, F. R. AGUIAR a M. C. M. VAN LOOSDRECHT. 2003. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. **25**(6), 377–385.
- RONEN, M, H GUTERMAN a Y SHABTAI. 2002. Monitoring and control of pullulan production using vision sensor. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **51**(3), 243-249.
- ROUKAS, T. a C. G. BILIADERIS. 1995. Evaluation of carob pod as a substrate for pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **55**(1), 27-44.
- ROUKAS, T. 1999. Pullulan production from brewery wastes by *Aureobasidium pullulans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **15**(4), 447-450.
- RUFÍAN-HENARES, J. A. a S. P. DE LA CUEVA. 2009. Antimicrobial Activity of Coffee Melanoidins A Study of Their Metal-Chelating Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **57**(2), 432-438.
- SAHARAN, B. S., A. GREWAL a P. KUMAR. 2014. Biotechnological Production of Polyhydroxyalkanoates: A Review on Trends and Latest Developments. *Chinese Journal of Biology*. 1-18.
- SAMORÌ, CH., M. BASAGLIA, S. CASELLA, et al. 2015. Dimethyl carbonate and switchable anionic surfactants: two effective tools for the extraction of polyhydroxyalkanoates from microbial biomass. *Green chemistry*. **17**(2), 1047-1056.
- SASTRI, V. R. 2010. *Plastics in medical devices: properties, requirements, and applications*. Amsterdam: Elsevier/William Andrew. ISBN 978-081-5520-276.
- SATOH, Y., K. TAJIMA, S. NAKAMOTO, et al. 2011. Isolation of a thermotolerant bacterium producing medium-chain-length polyhydroxyalkanoate. *Journal of Applied Microbiology*. **111**(4), 811-817.
- SEO, H. 2004. Production of high molecular weight pullulan by *Aureobasidium pullulans* HP-2001 with soybean pomace as a nitrogen source. *Bioresource Technology*. **95**(3), 293-299.
- SERAFIM, L S., P. C. LEMOS, C. TORRES, M. A. M. REIS a A. M. RAMOS. 2008. The Influence of Process Parameters on the Characteristics of Polyhydroxyalkanoates Produced by Mixed Cultures. *Macromolecular Bioscience*. **8**(4), 355–366.
- SHARMA, N., G. S. PRASAD a A. R. CHOUDHURY. 2013. Utilization of corn steep liquor for biosynthesis of pullulan, an important exopolysaccharide. *Carbohydrate Polymers*. **93**(1), 95-101.
- SHARMA, Y. C., B. SINGH a S. N. UPADHYAY. 2008. Advancements in development and characterization of biodiesel: A review. *Fuel*. **87**(12), 2355–2373.

- SHEU, D. S., W. M. CHEN, J. YANG a R. CH. CHANG. 2009. Thermophilic bacterium *Caldimonas taiwanensis* produces poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from starch and valerate as carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology*. **44**, 289–294.
- SHIMADA, K., K. MATSUSHIMA, J. FUKUMOTO a T. YAMAMOTO. 1969. Poly-(L)-malic acid; A new protease inhibitor from. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **35**(5), 619-624.
- SHRIVASTAV, A., H. Y. KIM a Y. R. KIM. 2013. Advances in the Applications of Polyhydroxyalkanoate Nanoparticles for Novel Drug Delivery System. *BioMed Research International*. **2013**, 1-12.
- SCHERER, T. M, R. C. FULLER, R. W. LENZ a S. GOODWIN. 1999. Hydrolase activity of an extracellular depolymerase from *Aspergillus fumigatus* with bacterial and synthetic polyesters. *Polymer Degradation and Stability*. **64**(2), 267-275.
- SILVA, L. F., M. K. TACIRO, G. RAICHER, R. A. M. PICCOLI, T. T. MENDONÇA, M. Schreiner G. LOPES a J. G. C. GOMEZ. 2014. Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in biorefineries associated with the production of sugar and ethanol. *International Journal of Biological Macromolecules*. **71**, 2-7.
- SILVA, M. A., S. A. NEBRA, M. J. MACHADO SILVA a C. G. SANCHEZ. 1998. The use of biomass residues in the brazilian soluble coffee. *Biomass and Bioenergy*. **14**(5-6), 457-467.
- SIMON, L., B. BOUCHET, K. BREMOND, D. J. GALLANT a M. BOUCHONNEAU. 1998. Studies on pullulan extracellular production and glycogen intracellular content in *Aureobasidium pullulans*. *Canadian Journal of Microbiology*. **44**(12), 1193-1199.
- SINGH, R. S., G. K. SAINI, J. F. KENNEDY, et al. 2008. Pullulan: Microbial sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*. **73**(4), 1-13.
- SINGLETON, V. L. a J. A. ROSSI. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. **16**(3), 144-158.
- SISO, M. I.González. 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresource Technology*. **57**(1), 1-11.
- SMIDSRØD, O. a S. T MOE. 2008. *Biopolymer chemistry*. Trondheim: Tapir Academic Press, 398 s. ISBN 978-82-519-2384-2.
- SNELL, K. D. a O. P. PEOPLES. 2002. Polyhydroxyalkanoate Polymers and Their Production in Transgenic Plants. *Metabolic Engineering*. **4**(1), 29-40.
- STEINBÜCHEL, A. 2005. Non-biodegradable biopolymers from renewable resources: perspectives and impacts. *Current Opinion in Biotechnology*. **16**(6), 607-613.
- STEINBÜCHEL, A. a M. HOFRICHTER. 2003. *Biopolymers: Volume 3a, Polyesters I - Biological Systems and Biotechnological Production*. Chichester: Wiley-VCH, 10 v. in 11. ISBN 3527302301X-.
- STEINBÜCHEL, A. 2001a. Perspectives for Biotechnological Production and Utilization of Biopolymers: Metabolic Engineering of Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Pathways as a Successful Example. *Macromolecular Bioscience*. **1**(1), 1-24.
- STEINBÜCHEL, A. M. 2001b. *Biopolymers*. Weinheim: Wiley-VCH. ISBN 978-352-7302-901.

- STRONG, P., B. LAYCOCK, S. MAHAMUD, P. JENSEN, P. LANT, G. TYSON a S. PRATT. 2014. The Opportunity for High-Performance Biomaterials from Methane. *Microorganisms*. **4**(1).
- SUDESH, K.. 2013. *Polyhydroxyalkanoates from palm oil biodegradable plastics*. 1. Heidelberg: Springer. ISBN 978-364-2335-396.
- SUDESH, K., H. ABE, Y. DOI a Ch. ZHANG. 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*. **25**(10), 1-24.
- SUN, Z., J. A. RAMSAY, M. GUAY a B. A. RAMSAY. 2007. Fermentation process development for the production of medium-chain-length poly-3-hydroxyalkanoates. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **75**(3), 475-85.
- TAMIS, J., K. LUŽKOV, Y. JIANG, M. C. M. LOOSDRECHT a R. KLEEREBEZEM. 2014. Enrichment of *Plasticumulans acidivorans* at pilot-scale for PHA production on industrial wastewater. *Journal of Biotechnology*. **192**, 161-169.
- TAN, G. Y., CH. L. CHEN, L. LI, et al. 2014. Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. *Polymers*. (6), 706-754.
- TAN, I. K. P., K. S. KUMAR, M. THEANMALAR, S. N. GAN a B. GORDON. 1997. Saponified palm kernel oil and its major free fatty acids as carbon substrates for the production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* PGA1. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **47**(3), 207-211.
- TANG, X. Z., P. KUMAR, S. ALAVI a K. P. SANDEEP. 2012. Recent Advances in Biopolymers and Biopolymer-Based Nanocomposites for Food Packaging Materials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **52**(5), 426-42.
- TASKIN, M., B. OZKAN, O. ATICI a M. N. AYDOGAN. 2011. Utilization of chicken feather hydrolysate as a novel fermentation substrate for production of exopolysaccharide and mycelial biomass from edible mushroom *Morchella esculenta*. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. **63**(5), 597-602.
- TASKIN, M. a E. B. KURBANOGLU. 2011b. Evaluation of waste chicken feathers as peptone source for bacterial growth. *Journal of Applied Microbiology*. **111**(4), 826-834.
- TASKIN, M.. 2013. A new strategy for improved glutathione production from *Saccharomyces cerevisiae*: use of cystein and glycine-rich chicken feather protein hydrolysate as a new cheap substrate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **93**(3), 535-541.
- TASKIN, M., N. ESIM a S. ORTUCU. 2012. Efficient production of l-lactic acid from chicken feather protein hydrolysate and sugar beet molasses by the newly isolated *Rhizopus oryzae* TS-61. *Food and Bioproducts Processing*. **90**(4), 773-779.
- THOMAS, S.. 2013. *Natural polymers, biopolymers, biomaterials, and their composites, blends, and IPNs*. Toronto: Apple Academic Press, xxii, 422 pages. Advances in materials science, volume 2. ISBN 19-268-9516-9.
- THOMAS, S., K. P. SANDEEP, N. KALARIKKAL, S. ALAVI, J. VARGHESE a S. YARAGALLA. 2015. *Polymers for packaging applications*. 1. Toronto: Apple Academic Press. ISBN 1926895770.
- TORZILLI, A. P. 1997. Tolerance to High Temperature and Salt Stress by a Salt Marsh Isolate of *Aureobasidium pullulans*. *Mycologia*. **89**(5), 786-792.

- TUCKER, N. a M. JOHNSON. 2004. *Low environmental impact polymers*. Shrewsbury, Shropshire, United Kingdom: Rapra Technology, xiv, 340 p. ISBN 18-595-7384-3.
- URTUVIA, V., P. VILLEGAS, M. GONZÁLEZ a M. SEEGER. 2014. Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules*. **70**, 208-213.
- VACTOR, S. A.. 2010. *Introduction to the global oil*. Tulsa, Okla: PennWell. ISBN 15-937-0214-0.
- VALENTINO, F., F. MORGAN-SAGASTUME, S. FRARACCIO, G. CORSI, G. ZANAROLI, A. WERKER a M. MAJONE. 2015. Sludge minimization in municipal wastewater treatment by polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Environmental Science and Pollution Research*. **22**, 7281–7294.
- VALENTINO, F., L. KARABEGOVIĆ, M. MAJONE, F. MORGAN-SAGASTUME a A. WERKER. 2015b. Polyhydroxyalkanoate (PHA) storage within a mixed-culture biomass with simultaneous growth as a function of accumulation substrate nitrogen and phosphorus levels. *Water Research*. **77**, 49-63.
- VASILE, C. a G. ZAIKOV. 2009. *Environmentally degradable materials based on multicomponent polymeric systems*. Boston: Brill, vi, 654 p. ISBN 978-900-4164-109.
- VERARDI, A., I. DE, E. RICCA a V. CALABR. 2012. Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Current Status of Processes and Technologies and Future Perspectives. *Bioethanol*. InTech, s. 95-122. ISBN 978-953-51-0008-9.
- VERLINDEN, R. A. J., D. J. HILL, M. A. KENWARD, C. D. WILLIAMS a I. RADECKA. 2007. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*. **102**(6), 1437-1449.
- VERLINDEN, R. A. J., D. J. HILL, M. A. KENWARD, C. D. WILLIAMS, Z. PIOTROWSKA-SEGET a I. K. RADECKA. 2011. Production of polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by *Cupriavidus necator*. *AMB Express*. **1**(1), 11-19.
- VIJAYENDRA, S. V. N. a T. R. SHAMALA. 2014. Film forming microbial biopolymers for commercial applications—A review. *Critical Reviews in Biotechnology*. **34**(4), 338-57.
- VILLANO, M., F. VALENTINO, A. BARBETTA, L. MARTINO, M. SCANDOLA a M. MAJONE. 2014. Polyhydroxyalkanoates production with mixed microbial cultures: from culture selection to polymer recovery in a high-rate continuous process. *New Biotechnology*. (4), 289-296.
- VISAI, L., L. DE NARDO, C. PUNTA, L. MELONE, A. CIGADA, M. IMBRIANI a C. R. ARCIOLA. 2011. Titanium oxide antibacterial surfaces in biomedical devices. *The International Journal of Artificial Organs*. **34**(9), 929-946.
- VOJTOVÁ, L., V. KUPKA, J. ŽÍDEK, J. WASSERBAUER, P. SEDLÁČEK a J. JANČÁŘ. 2012. Biodegradable polyhydroxybutyrate as a polyol for elastomeric polyurethanes. *Chemical Papers*. **66**(9), 869–874.
- VOLOVA, T. 2004. *Polyhydroxyalkanoates--plastic materials of the 21st century: production, properties, applications*. 1. Hauppauge, N.Y.: Nova Science Publishers, xix, 282 p. ISBN 15-903-3992-4.

- VOLOVA, T. G., N. O. ZHILA, E. I. SHISHATSKAYA, P. V. MIRONOV, A. D. VASIL'EV, A. G. SUKOVATYI a A. J. SINSKEY. 2013. The physicochemical properties of polyhydroxyalkanoates with different chemical structures. *Polymer Science Series A*. **15**(7), 427–437.
- VOLOVA, T., D. GONCHAROV, A. SUKOVATYI, A. SHABANOV, E. NIKOLAEVA a E. SHISHATSKAYA. 2014. Electrospinning of polyhydroxyalkanoate fibrous scaffolds: effects on electrospinning parameters on structure and properties. *Journal of Biomaterials Science*. **25**(4), 370-393.
- VROMAN, I. a L. TIGHZERT. 2009. Biodegradable Polymers. *Materials*. **2**(2), 307-344.
- WALKER, J. M. 1994. The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation. *Basic Protein and Peptide Protocols*. 1. New Jersey: Humana Press, s. 5-8. ISBN 089603268X.
- WANG, D., X. JU, D. ZHOU a G. WEI. 2014. Efficient production of pullulan using rice hull hydrolysate by adaptive laboratory evolution of *Aureobasidium pullulans*. *Bioresource Technology*. (164), 12-19.
- WANG, X., H. C. SCHRÖDER, U. SCHLOßMACHER a W. E. G. MÜLLER, 2013. *Inorganic Polyphosphates: Biologically Active Biopolymers for Biomedical Applications*. s. 261-294.
- WANG, Y., R. CHEN, J. CAI, et al. 2013. Biosynthesis and Thermal Properties of PHBV Produced from Levulinic Acid by *Ralstonia eutropha*. *PLoS ONE*. **8**(4), 318-326.
- WEBB, J. S., M. NIXON, I. M. EASTWOOD, M. GREENHALGH, G. D. ROBSON a P. S. HANDLEY. 2000. Fungal Colonization and Biodeterioration of Plasticized Polyvinyl Chloride. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**(8), 3194-3200.
- WILLIBALD, B., W. BILDL, B. S. LEE a E. HOLLER. 1999. Is beta-poly(L-malate) synthesis catalysed by a combination of beta-L-malyl-AMP-ligase and beta-poly(L-malate) polymerase? *European Journal of Biochemistry*. **265**(3), 1085-1090.
- WILSON, J. J., L. DESCHATELETS a N. K. NISHIKAWA. 1989. Comparative fermentability of enzymatic and acid hydrolysates of steam-pretreated aspenwood hemicellulose by *Pichia stipitis* CBS 5776. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **31**(5-6), 592-596.
- WONG, Y. M., CH. J. BRIGHAM, CH. RHA, A. J. SINSKEY a K. SUDESH. 2012. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoate containing high 3-hydroxyhexanoate monomer fraction from crude palm kernel oil by recombinant *Cupriavidus necator*. *Bioresource Technology*. **121**, 320-327.
- WU, S., Z. JIN, Q. TONG a H. CHEN. 2009. Sweet potato: A novel substrate for pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydrate Polymers*. **76**(4), 645-649.
- WU, L., J. ZHANG a W. WATANABE. 2011. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **63**(6), 456-469.
- WYMAN, CH., S. DECKER, M. HIMMEL, J. BRADY, C. SKOPEC a L. VIKARI. 2004. Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose. *Polysaccharides*. CRC Press, 5-92. ISBN 978-0-8247-5480-8.
- XIAO, Z., Y. ZHANG, L. XI, F. HUO, J. ZHAO a J. LI. 2015. Thermophilic production of polyhydroxyalkanoates by a novel *Aneurinibacillus* strain isolated from Gudao oilfield, China. *Journal of Basic Microbiology*. **55**, 1125–1133.

- XU, F., S. HUANG, Y. LIU, Y. ZHANG a S. CHEN. 2014. Comparative study on the production of poly(3-hydroxybutyrate) by thermophilic *Chelatococcus daeguensis* TAD1: a good candidate for large-scale production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **98**(9), 3965-3974.
- YANG, S. T.. 2007. *Bioprocessing for value-added products from renewable resources: new technologies and applications*. Boston: Elsevier, xiv, 670 p. ISBN 04-445-2114-3.
- YANWISSETPAKDEE, B., P. LOTRAKUL, S. PRASONGSUK a T. SEELANAN. 2016. Associations among halotolerance, osmotolerance and exopolysaccharide production of *Aureobasidium melanogenum* strains from habitats under salt stress. *Pakistan Journal of Botany*. **48**(3), 1229-1239.
- YATES, M. R. a C. Y. BARLOW. 2013. Life cycle assessments of biodegradable, commercial biopolymers—A critical review. *Resources, Conservation and Recycling*. (78), 54-66.
- YIN, J., J. CHEN, Q. WU a G. CHEN. 2015. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Biotechnology Advances*. **33**(7), 1433-1442.
- YURLOVA, N. A. a G. S. HOOG. 1997. A new variety of *Aureobasidium pullulans* characterized by exopolysaccharide structure, nutritional physiology and molecular features. *Antonie van Leeuwenhoek*. **72**(2), 141-147.
- ZAN, Z. a X. ZOU. 2013. Efficient production of polymalic acid from raw sweet potato hydrolysate with immobilized cells of *Aureobasidium pullulans* CCTCC M2012223 in aerobic fibrous bed bioreactor. *Journal of Chemical Technology*. **88**(10), 1822-1827.
- ZHANG, J., Q. CAO, S. LI, et al. 2013. 3-Hydroxybutyrate methyl ester as a potential drug against Alzheimer's disease via mitochondria protection mechanism. *Biomaterials*. **34**(30), 7552-7562.
- ZHANG, T., M. T. CHAUDHRY a Z. LIU. 2010. Genetic and biochemical characterization of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Diaphorobacter* sp. PCA039. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **26**(10), 1803-1811.
- ZILLICH, O. V., U. SCHWEIGGERT-WEISZ, P. EISNER a M. KERSCHER. 2015. Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. *International Journal of Cosmetic Science*. **37**(5), 455-464.
- ZOU, X., Y. ZHOU a S. T. YANG. 2013. Production of polymalic acid and malic acid by *Aureobasidium pullulans* fermentation and acid hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*. **110**(8), 2105-2113.
- ZUORRO, A. a R. LAVECCHIA. 2012. Spent coffee grounds as a valuable source of phenolic compounds and bioenergy. *Journal of Cleaner Production*. **34**, 49-56.

8 ŽIVOTOPIS

OSOBNÍ ÚDAJE

Jméno a příjmení: Pavla Benešová
Datum narození: 19. 10. 1987
Místo narození: Ústí nad Labem
Národnost: česká
Trvalé bydliště: Sídl. Beskydské 1210, 74401 Frenštát p.R.
Telefon: +420 728889894
E-mail: pavla.benesova@vutbr.cz

VZDĚLÁNÍ

2003 – 2007 SPŠCH ak. Heyrovského Ostrava
2007 – 2010 VUT Brno, Fakulta chemická, bakalářské studium zakončeno státní zkouškou, titul Bc., téma bakalářské práce: „[Charakterizace aktivních látek v různých druzích piva](#)“
2010 – 2012 VUT Brno, Fakulta chemická, magisterské studium zakončeno státní zkouškou, titul Ing., téma diplomové práce: „[Příprava a charakterizace nealkoholického piva s různou příchutí](#)„
2012 - Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, doktorské studium

PRACOVNÍ ZKUŠENOSTI

2012 - Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Centrum materiálového výzkumu, technicko-hospodářsky pracovník
2016 - Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Centrum materiálového výzkumu, vědecký pracovník

Zahraniční stáž

Místo: Norwegian University of Science and Technology, [Department of Biotechnology and Food Science](#) – Biopol, Norway

Doba: 11.2.2015 - 30.7.2015

Projekt:

- 1) Preparation of pure oligosaccharides from parent polysaccharides and optimization of hydrazide activation protocol
- 2) Preparation and characterization of hydrazide-activated oligosaccharides

Pedagogická činnost

2014/2015, 2015/2016, 2016/2017 zimní semestr - Praktikum z instrumentální a strukturní analýzy

9 SEZNAM PUBLIKAČNÍ ČINOSTI

Časopisy s IF

BENEŠOVÁ, P., KUČERA, D., MÁROVÁ, I., OBRUČA, S., Chicken feather hydrolysate as inexpensive complex nitrogen source for PHA production by *Cupriavidus necator* on waste frying oils. *Letters in Applied Microbiology*. **Recenzní řízení**

OBRUČA, S., SEDLÁČEK, P., MRAVEC, F., KRZYZANEK, V., NEBESAROVA, J., SAMEK, O., KUCERA, D., BENEŠOVA, P., HRUBANOVA, K., MILEROVA, M., MAROVA, I., The presence of PHB granules in cytoplasm protects non-halophilic bacterial cells against the harmful impact of hypertonic environments. *New Biotechnology*. **Recenzní řízení**

SAMEK, O., OBRUČA, S., ŠILER, M., P., SEDLÁČEK, P., **BENEŠOVÁ, D.**, KUČERA, I., MÁROVÁ, J., JEŽEK, S., BERNÁTOVÁ, P., ZEMÁNEK. 2016. Quantitative Raman Spectroscopy Analysis of Polyhydroxyalkanoates Produced by *Cupriavidus necator* H16. *Sensors*. **16**(12), 1808-. ISSN 14248220.

MATOUŠKOVÁ, P.; MÁROVÁ, I.; BOKROVÁ, J.; **BENEŠOVÁ, P.** Effect of encapsulation of antimicrobial activity of herbal extracts with lysozyme. *Food Technology and Biotechnology*, 2016, roč. 54, č. 3, s. 304-316. ISSN: 1330-9862.

MRAVEC, F.; OBRUČA, S.; KRZYŽÁNEK, V.; SEDLÁČEK, P.; HRUBANOVÁ, K.; SAMEK, O.; KUČERA, D.; **BENEŠOVÁ, P.**; NEBESÁŘOVÁ, J. Accumulation of PHA granules in *Cupriavidus necator* as seen by confocal fluorescence microscopy. *FEMS Microbiology Letters*, 2016, roč. 363, č. 10, s. 1-6. ISSN: 0378-1097.

OBRUČA, S.; **BENEŠOVÁ, P.**; MARŠÁLEK, L.; MÁROVÁ, I. Use of Lignocellulosic Materials for PHA production. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 2015, roč. 29, č. 2, s. 133-144. ISSN: 0352-9568.

OBRUČA, S.; **BENEŠOVÁ, P.**; KUČERA, D.; PETRIK, S.; MÁROVÁ, I. Biotechnological conversion of spent coffee grounds into polyhydroxyalkanoates and carotenoids. *New Biotechnology*, 2015, roč. 32, č. 6, s. 569-574. ISSN: 1871-6784.

OBRUČA, S.; **BENEŠOVÁ, P.**; PETRIK, S.; KUČERA, D.; MÁROVÁ, I. Biotechnological conversion of spent coffee grounds into polyhydroxyalkanoates. *New Biotechnology*. Elsevier, 2014. s. S39 (S40 s.)ISSN: 1871- 6784.

OBRUČA, S.; **BENEŠOVÁ, P.**; PETRIK, S.; OBORNÁ, J.; PŘIKRYL, R.; MÁROVÁ, I. Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolysate of spent coffee grounds. *Process Biochemistry*, 2014, roč. 49, č. 9, s. 1409-1414. ISSN: 1359- 5113.

OBRUČA, S.; **BENEŠOVÁ, P.**; PETRIK, S.; OBORNÁ, J.; PŘIKRYL, R.; MÁROVÁ, I. Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolysate of spent coffee grounds. *Process Biochemistry*, 2014, roč. 49, č. 9, s. 1409-1414. ISSN: 1359- 5113.

OBRUČA, S.; PETRIK, S.; **BENEŠOVÁ, P.**; SVOBODA, Z.; EREMKA, L.; MÁROVÁ, I. Utilization of oil extracted from spent coffee grounds for sustainable production of polyhydroxyalkanoates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, roč. 98, č. 13, s. 5883-5890. ISSN: 0175- 7598.

PETRIK, S.; OBRUČA, S.; **BENEŠOVÁ, P.**; MÁROVÁ, I. Bioconversion of spent coffee grounds into carotenoids and other valuable metabolites by selected red yeast strains. *Biochemical Engineering Journal*, 2014, roč. 90, č. 15, s. 307-315. ISSN: 1369-73.

OBRUČA, S.; BENEŠOVÁ, P.; OBORNÁ, J.; MÁROVÁ, I. Application of protease-hydrolyzed whey as a complex nitrogen source to increase poly(3-hydroxybutyrate) production from oils by *Cupriavidus necator*. *Biotechnology Letters*, 2014, roč. 36, č. 4, s. 775-781. ISSN: 0141- 5492.

Sborníky s plným uvedením textu

BENEŠOVÁ, P.; KUČERA, D.; OBRUČA, S.; MATOUŠKOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. Usage of waste materials as the potential substrate for production of microbial biopolymers. *In Proceedings of the 4th International Conference on Chemical Technology*. 1. Prague: Ocean Design, 2016. s. 483-487. ISBN: 978-80-86238-94- 4.

MATOUŠKOVÁ, P.; HAZUCHOVÁ, E.; BOKROVÁ, J.; **BENEŠOVÁ, P.**; MÁROVÁ, I. Production of hydrolytic enzymes and improvement of enzyme activity and stability using encapsulation techniques. *In Proceedings of the 4th International Conference on Chemical Technology*. 1. Prague: Ocean Design, 2016. s. 452-456. ISBN: 978-80-86238-94- 4.

OBRUČA, S.; KUČERA, D.; DINGOVÁ, T.; **BENEŠOVÁ, P.**; POŘÍZKA, J.; MÁROVÁ, I. Biotechnological production of polyhydroxyalkanoates on various lignocellulose- based agricultural wastes. *Czech Chemical Society Symposium Series*, 2015, roč. 13, č. 2, s. 114-116. ISSN: 2336-7210

MATOUŠKOVÁ, P.; VYSKOČILOVÁ, T.; **BENEŠOVÁ, P.**; HURTOVÁ, J.; LICHNOVÁ, A.; VRTNÁ, M.; MÁROVÁ, I. Co- encapsulation of probiotics with prebiotics into polysaccharide particles and its effect on viability in simulated gastrointestinal fluid. *NANOCON 2014 - Conference Proceedings*. 2014. Ostrava: TANGER Ltd., 2014. 1-6. ISBN: 978-80-87294-55- 0.

MATOUŠKOVÁ, P.; HURTOVÁ, J.; LICHNOVÁ, A.; **BENEŠOVÁ, P.**; OBRUČA, S.; MÁROVÁ, I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacter breve* encapsulated into different polysaccharide particles. Industrial, medical and environmental applications of microorganisms. *The Netherlands: Wageningen Academic Publishers*, 2014. 391-396. ISBN 978-90-8686-243-6.

BENEŠOVÁ, P.; OBRUČA, S.; WURSTOVÁ, A.; KUNDRÁT, V.; MÁROVÁ, I. Biodegradability testing of modified PHA-based nanomaterials by standard test. *NANOCON 2014 - Conference Proceedings*. 2014. Ostrava: TANGER Ltd., 2014. 1-6. ISBN: 978-80-87294-55- 0

BENEŠOVÁ, P.; OBRUČA, S.; KUPKA, V.; KUNDRÁT, V.; MÁROVÁ, I. From PHA production to its biodegradation. *In Studentská odborná konference Chemie je život 2014 Sborník příspěvků*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta Chemická, 2014. s. 179-185. ISBN: 978-80-214-5078- 3.

BENEŠOVÁ, P.; ONDRUŠKA, V.; OBRUČA, S.; HORÁČEK, P.; MÁROVÁ, I. Production of extracellular polymers from inexpensive substrates employing *Aureobasidium pullulans*. *In 1st International Conference on Chemical Technology ICCT 2013 Sborník příspěvků*. Mikulov: 2013. s. 1-4. ISBN: 978-80-86238-37- 1.

BENEŠOVÁ, P.; OBRUČA, S.; ONDRUŠKA, V.; MATOUŠKOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. Controlled simultaneous production of pullulan and poly-L- malate by *Aureobasidium pullulans*. Industrial, medical and environmental applications of microorganisms. *The Netherlands: Wageningen Academic Publishers*, 2014. 414-418. ISBN 978-90-8686-243-6.

OBRUČA, S.; EREMKA, L.; ŠNAJDAR, O.; PETRIK, S.; **BENEŠOVÁ, P.**; MÁROVÁ, I. Biotechnological conversion of food industry waste products into biodegradable polyesters. *In 1st International Conference on Chemical Technology ICCT 2013 Sborník příspěvků*. 1. Mikulov: 2013. s. 1-4. ISBN: 978-80-86238-37- 1.

HÁRONIKOVÁ, A.; **BENEŠOVÁ, P.**; KOSTOVOVÁ, I.; PETRIK, S.; MÁROVÁ, I. The possibilities of using carotenoid- rich yeast biomass cultivated on whey substrates. *In Hygiene a technologie potravin, XLIII. Lenfeldovy a Hoklovy dny - Sborník přednášek a posterů.* Brno: 2013. s. 136-139. ISBN: 978-80-7305-664- 3.

MATOUŠKOVÁ, P.; LICHNOVÁ, A.; PATOČKOVÁ, K.; **BENEŠOVÁ, P.**; HURTOVÁ, J.; OBRUČA, S.; MÁROVÁ, I. Use of physical-chemical methods ot analysis of organic- and nanoparticles with encapsulated caffeine. *In CECE 2012. Brno: 2012.* s. 295-299. ISBN: 978-80-904959-1- 3.