



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**BIOTECHNOLOGICKÁ PRODUKCE PHB POMOCÍ
NETRADIČNÍCH UHLÍKOVÝCH ZDROJŮ**

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF PHB USING NON-TRADITIONAL CARBON SOURCES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Tereza Fialová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1709/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Tereza Fialová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Biotechnologická produkce PHB pomocí netradičních uhlíkových zdrojů

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na zadané téma (využití odpadních zdrojů jako uhlíkových zdrojů pro produkci polyhydroxyalkanoátů).
2. Produkce poly(3–hydroxybutyrátu) (PHB) pomocí bakterie *Cupriavidus necator* H16 za použití fruktózy jako uhlíkového zdroje a její zhodnocení.
3. Porovnání produkce PHB pomocí *Cupriavidus necator* H16 za využití uhlíkového zdroje získaného z odpadů z plodu růže šípkové.
4. Vyhodnocení výsledků, jejich diskuze a závěr práce.

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

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

Tereza Fialová
student(ka)

doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Bakalářská práce byla zaměřena na studium možností využití odpadních produktů růže šípkové získaných po výrobě likérů jako sekundárních uhlíkových zdrojů pro produkci poly(3-hydroxybutyrátu) (PHB). Pro biosyntézu PHB byla použita bakterie *Cupriavidus necator*. Veškeré kultivace byly vedeny jako submerzní batch kultivace v minerálním médiu s obsahem mikroelementů v erlenmeyerových baňkách po dobu 72 hodin. Jako sekundární zdroj uhlíku se použil šípkový olej získaný extrakcí hexanem ze zrníček plodu šípku a enzymatický hydrolyzát připravený z odpadní dužiny plodu šípku.

Výtěžky po 72-hodinové fermentaci ukázaly, že šípkový olej je porovnatelným uhlíkovým zdrojem s fruktózou pro kultivaci bakterie *C. necator*, na rozdíl od enzymatického hydrolyzátu. Fermentací za použití 20 g/l šípkového oleje bylo vyprodukováno 10,82 g/l biomasy a 6,20 g/l PHB, což bylo o 21,6 % víc biomasy a o 13,1 % víc PHB v porovnání s fermentací za použití 20 g/l fruktózy. Fermentací *C. necator* za použití enzymatického hydrolyzátu o koncentraci redukujících cukrů 20 g/l se získalo jenom 2,92 g/l biomasy a 0,12 g/l PHB. Ani kombinace enzymatického hydrolyzátu s fruktózou se neukázala vhodná pro produkci PHB.

V rámci této bakalářské práce byl dále v likéru, šípkovém oleji a enzymatickém hydrolyzátu stanoven obsah celkových redukujících cukrů, fenolických látek, a celková antioxidační aktivita. V šípkovém oleji byl také stanoven profil mastných kyselin a obsah barviv. Výsledky ukázali, že všechny stanovované vzorky vykazovali významný obsah celkových polyfenolů (2,04 – 12,4 g GAE/l vzorku) a antioxidační aktivitu (1,3 – 2,0 mmol TE /l vzorku).

KLÍČOVÁ SLOVA

poly-3-hydroxybutyrát (PHB), *Cupriavidus necator*, šípkový olej, enzymatický hydrolyzát

ABSTRACT

The bachelor thesis was focused on studying the possibilities of using waste rosehip by-products obtained after the production of liqueurs as secondary carbon sources for the production of poly (3-hydroxybutyrate) (PHB). *Cupriavidus necator* was used for PHB biosynthesis. All cultures were run as submerged batch cultures in mineral media containing microelements in Erlenmeyer flasks for 72 hours. Rosehip oil obtained by hexane extraction from rosehip seeds and an enzymatic hydrolysate prepared from rosehip waste pulp were used as secondary carbon sources.

After 72 hours of fermentation, yields showed that rosehip oil is a comparable carbon source to fructose for culturing of *C. necator*, in contrast to the enzymatic hydrolysate. Fermentation using 20 g / l rosehip oil produced 10.82 g / l biomass and 6.20 g / l PHB. This is about 21.6% more biomass and 13.1% more PHB than was received by fermentation using 20 g / l fructose. Fermentation of *C. necator* using an enzymatic hydrolysate with a reducing sugar concentration of 20 g / l gave only 2.92 g / l biomass and 0.12 g / l PHB. Even the combination of enzymatic hydrolysate with fructose did not prove satisfying yields for the production of PHB.

Next, in liqueur, rosehip oil and enzymatic hydrolysate was also determined the content of total reducing sugars, phenolics, and total antioxidant activity. Moreover, the fatty acid profile and the content of dyes was determined in rosehip oil. The results showed that all selected rosehip products showed a significant range of total polyphenols (2.04 - 12.4 g GAE / l sample) and antioxidant activity (1.3 - 2.0 mmol TE / l sample).

KEY WORDS

poly-3-hydroxybutyrate (PHB), *Cupriavidus necator*, rosehip oil, enzymatic hydrolysate

FIALOVÁ, Tereza. Biotechnologická produkce PHB pomocí netradičních uhlíkových zdrojů [online]. Brno, 2021 [cit. 2021-07-22]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/129947>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Adriána Kovalčík.

PROHLÁŠENÍ

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

podpis autora

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat především své vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Adriáně Kovalčík, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu a čas, který mi během práce věnovala. Dále bych ráda poděkovala Ing. Pavlovi Vostrejšovi za jeho ochotu, čas a pomoc při práci v laboratoři. A v neposlední řadě bych chtěla poděkovat Ing. Martinovi Szotkowskému, Ph.D. a doc. Ing. Pavlovi Divišovi, Ph.D. za jejich ochotu a pomoc při analýze vzorků.

OBSAH

1 ÚVOD	8
2 TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 Polyhydroxyalkanoáty	9
2.1.1 Struktura a vlastnosti.....	9
2.2 Poly-3-hydroxybutyrát.....	10
2.2.1 <i>Cupriavidus necator</i>	11
2.2.2 Biosyntéza PHB	11
2.2.3 Vlastnosti PHB.....	12
2.3 Využití alternativních uhlíkových zdrojů	13
2.3.1 Syrovátka	13
2.3.2 Lignocelulózové materiály.....	13
2.3.3 Oleje.....	14
2.3.4 Materiály obsahující škrob.....	14
2.3.5 Odpadní glycerol.....	14
2.3.6 Šípkový olej	15
2.4 Downstream.....	16
2.4.1 Zakoncentrování biomasy	17
2.4.2 Izolace a purifikace	17
2.4.2.1 Extrakce	18
2.4.2.2 Chemická digesce buněčných komponent	19
2.4.2.3 Mechanická izolace.....	19
2.4.2.4 Ostatní metody	19
3 CÍLE PRÁCE.....	20
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
4.1 Použité mikroorganismy, chemikálie a přístroje	21
4.1.1 Použité mikroorganismy	21
4.1.2 Použité chemikálie	21
4.1.3 Použité přístroje	22
4.2 Příprava a charakterizace vzorků z plodu šípku	22
4.2.1 Stanovení obsahu cukrů pomocí HPLC	23
4.2.2 Stanovení celkových polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteuova činidla.....	23
4.2.3 Stanovení celkových flavonoidů pomocí chloridu hlinitého	24
4.2.4 Stanovení antioxidační aktivity.....	24
4.2.5 Stanovení obsahu barviv	25

4.2.6 Stanovení obsahu mastných kyselin	25
4.2.7 Stanovení obsahu minerálních látek	25
4.3 Kultivace mikroorganismu <i>Cupriavidus necator</i> za využití meziproductů z plodu šípku	26
4.4 Vyhodnocování kultivací.....	28
4.5 Izolace a charakterizace PHA z biomasy	29
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	30
5.1 Charakteristika uhlíkových zdrojů.....	30
5.1.1 Obsah cukrů	30
5.1.2 Obsah celkových polyfenolů a flavonoidů	30
5.1.3 Antioxidační aktivita.....	31
5.1.4 Obsah barviv	32
5.1.5 Obsah mastných kyselin	32
5.1.6 Obsah minerálních látek	33
5.2 Kultivace na odpadních uhlíkových zdrojích ze šípku.....	34
5.3 Chemická analýza PHB získaného z kultivace na oleji.....	36
5.4 Kultivace na fruktóze v různém poměru s enzymatickým hydrolyzátem	37
6 ZÁVĚR	40
7 ZDROJE.....	42
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	49

1 ÚVOD

Plastový odpad je v současnosti jeden z nejdůležitějších ekologických problémů. Plasty se staly neodmyslitelnou součástí našich životů a jejich produkce ve světě neustále roste. Ročně jejich produkce činí až 300 milionů tun. Velká část z nich je po použití vyhozena do přírody, kde se několik desítek let rozkládají a uvolňují toxické látky do okolí. Tento stále narůstající problém zvýšil zájem vědců o vývoj ekologicky šetrnějších variant, například bioplastů, které by jednou mohly zcela nahradit plasty syntetické. V současné době se ve spojení s touto problematikou nejvíce studuje polykyselina mléčná, polybutylén sukcinát, polykaprolakton a polyhydroxyalkanoáty (PHA).

Polyhydroxyalkanoáty jsou biodegradabilní a biokompatibilní biopolymery s podobnými mechanickými vlastnostmi jako mají plasty produkované petrochemickým průmyslem. Díky svým vlastnostem mají celou řadu využití, např. v zemědělství, v lékařství, v kosmetice, jako biopaliva nebo obalové materiály.

Tyto biopolymery je schopna produkovat celá řada mikroorganismů jako sekundární produkty. Avšak jejich biosyntéza je časově i technologicky náročnější a několikanásobně dražší než produkce plastů založených na ropě. Tyto důvody jsou asi největší překážkou jejich širšího využití. A proto se objevuje snaha snížit jejich cenu. Náklady spojené s produkcí bioplastů závisí především na druhu substrátu a druhu mikroorganismu. V současné době se upíná pozornost vědců k využití levných uhlíkatých zdrojů.

Tato bakalářská práce se zabývá využitím odpadů z plodů růže šípkové vzniklých po jejich zpracování k výrobě likérů. Plody šípků jsou bohaté na obsah vitamínu C, fenolických látek, karotenu, vitamínu B a pektinu. Šípková zrníčka jsou odpadním produktem při výrobě džemů, čajů a džusů. Tato zrníčka obsahují 5–18 % oleje, který je bohatý na vysoce nutriční látky. Proto hypotézou je, že by mohl být vhodným substrátem pro bakterie produkující PHA. Dále se otestuje, jestli hydrolyzát meziprojektu plodu šípku získaného po výrobě likéru by mohl sloužit jako uhlíkový zdroj pro *Cupriavidus necator*, který je nejprozkoumanějším producentem poly-3-hydroxybutyrátu (PHB).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Polyhydroxyalkanoáty

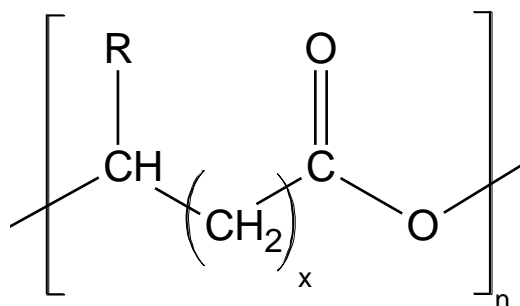
Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou biodegradabilní a biokompatibilní polyestery. Tyto biopolymery jsou produkovány značným množstvím mikroorganismů za určitých podmínek, jako je nadbytek uhlíku a limitní množství ostatních živin, jako je dusík, síra nebo fosfor. PHA jsou v buňkách ukládány ve formě zásobních granulí (obrázek č. 1), které slouží jako zásobní zdroj uhlíku a energie za nepříznivých podmínek. Další výhodou produkce PHA je zvýšená rezistence mikroorganismů proti různým stresovým faktorům (nízká nebo vysoká teplota, zamrzání, UV záření, osmotický tlak atd.) [1;2;3].



Obrázek 1: Mikroskopická fotografie *Cupriavidus necator* syntetizující PHB, převzata z [4]

2.1.1 Struktura a vlastnosti

Všechny polyhydroxyalkanoáty mají stejnou základní strukturu (obrázek č. 2). Jsou to polyestery, jejichž základem jsou hydroxyalkanové kyseliny. Jednotlivé monomery se liší počtem uhlíků a různým typem vedlejšího řetězce. Polymery se obvykle skládají ze 100–30 000 jednotek [5].



Obrázek 2: Obecná struktura PHA

PHA jsou děleny podle počtu uhlíků monomeru do tří skupin:

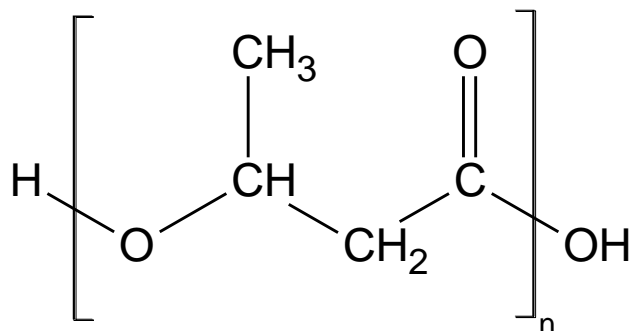
- 1) s krátkým řetězcem (scl-PHA, short-chain length PHA) 3–5 atomů uhlíku
- 2) se středně dlouhým řetězcem (mcl-PHA, medium-chain length PHA) 6–14 atomů uhlíku
- 3) s dlouhým řetězcem (lcl-PHA, long-chain length PHA) nad 14 atomů uhlíku [5]

Struktura monomeru závisí na charakteru substrátu a druhu producenta. Od struktury monomeru se dále odvíjejí mechanické vlastnosti, a tím pádem i využití konkrétních polymerů. Obecně jsou to semikrystalické látky se stupněm krystalinity 60–80 %. V buňce se nacházejí v amorfním stavu, ale jakmile jsou vyextrahovány, začnou krystalizovat. PHA jsou ve vodě nerozpustné, rozpouštějí se v chloroformu a dalších chlorovaných rozpouštědlech [3;5;6;7].

Polyhydroxyalkanoáty mají podobné vlastnosti jako plasty produkované petrochemickým průmyslem. Na rozdíl od těchto plastů jsou 100% rozložitelné a při jejich rozkladu nevznikají žádné toxické látky. Za aerobních podmínek se rozkládají na vodu a oxid uhličitý. Proto by byly vhodnou náhradou syntetických plastů. To by mohlo vyřešit problém s hromaděním plastů a znečištěním naší planety. Avšak kvůli vysoké ceně a složité výrobě, nejsou zatím bioplasty v běžném životě rozšířené [3;6;8].

2.2 Poly-3-hydroxybutyrát

Poly-3-hydroxybutyrát (PHB nebo P3HB) byl prvním izolovaným a nejvíce studovaným polyhydroxyalkanoátem. Tento biopolymer produkuje mnoho mikroorganismů, avšak nejvíce využívaným producentem je bakterie *Cupriavidus necator* [5]. Struktura PHB je zobrazena na obrázku č. 3.



Obrázek 3: Struktura PHB

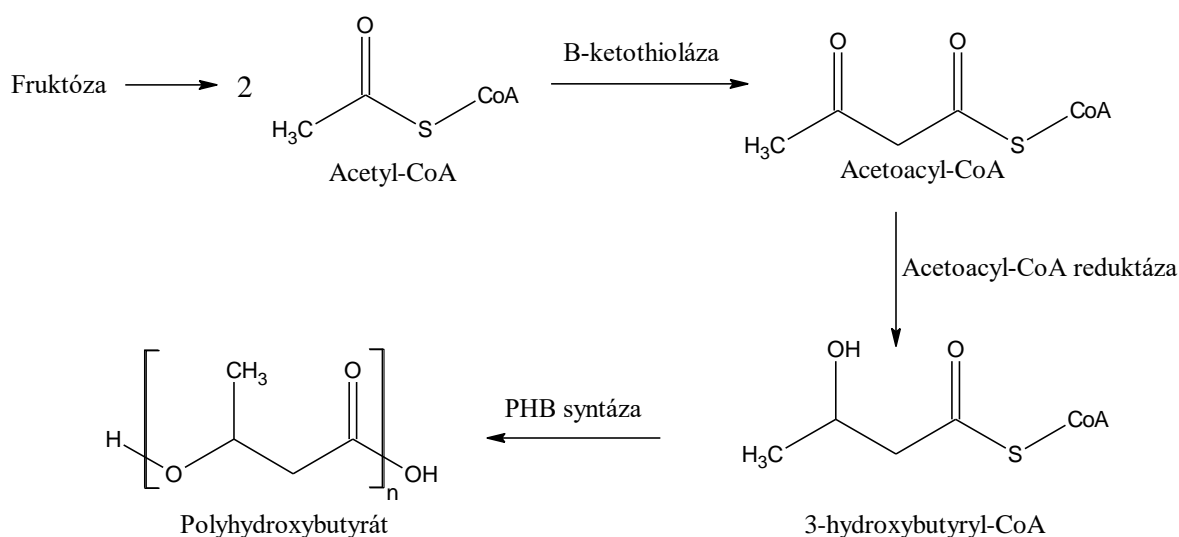
2.2.1 *Cupriavidus necator*

Cupriavidus necator nebo také *Ralstonia eutropha* je gramnegativní půdní bakterie, která byla poprvé izolována v 60. letech 20. století v německém Göttingenu. Dokáže ve své buňce syntetizovat celou řadu polyhydroxyalkanoátů s krátkým řetězcem. Je to biotechnologicky velmi významný mikroorganismus, a to díky schopnosti akumulovat až 90 % suché váhy PHB [9;10;11].

Další užitečnou vlastností této bakterie je schopnost utilizace různých organických substrátů (fruktóza, kyselina glukonová a další organické kyseliny). *Cupriavidus necator* je dokonce schopen fixace oxidu uhličitého ze vzduchu, ten mu slouží jako zdroj uhlíku. Toho se snaží vědci využít v souvislosti s vysokými emisemi oxidu uhličitého. Aby mohl *Cupriavidus necator* zpracovávat CO₂, potřebuje vodík jako zdroj energie. Bylo zjištěno, že akumulace PHB je u tohoto mikroorganismu vyšší za limitní koncentrace kyslíku, naopak růst je výrazně omezen. Je proto nutné najít vhodnou koncentraci kyslíku, která zajistí dostatečně vysokou produkci PHB a zároveň dostatečný růst buněk [9;12].

2.2.2 Biosyntéza PHB

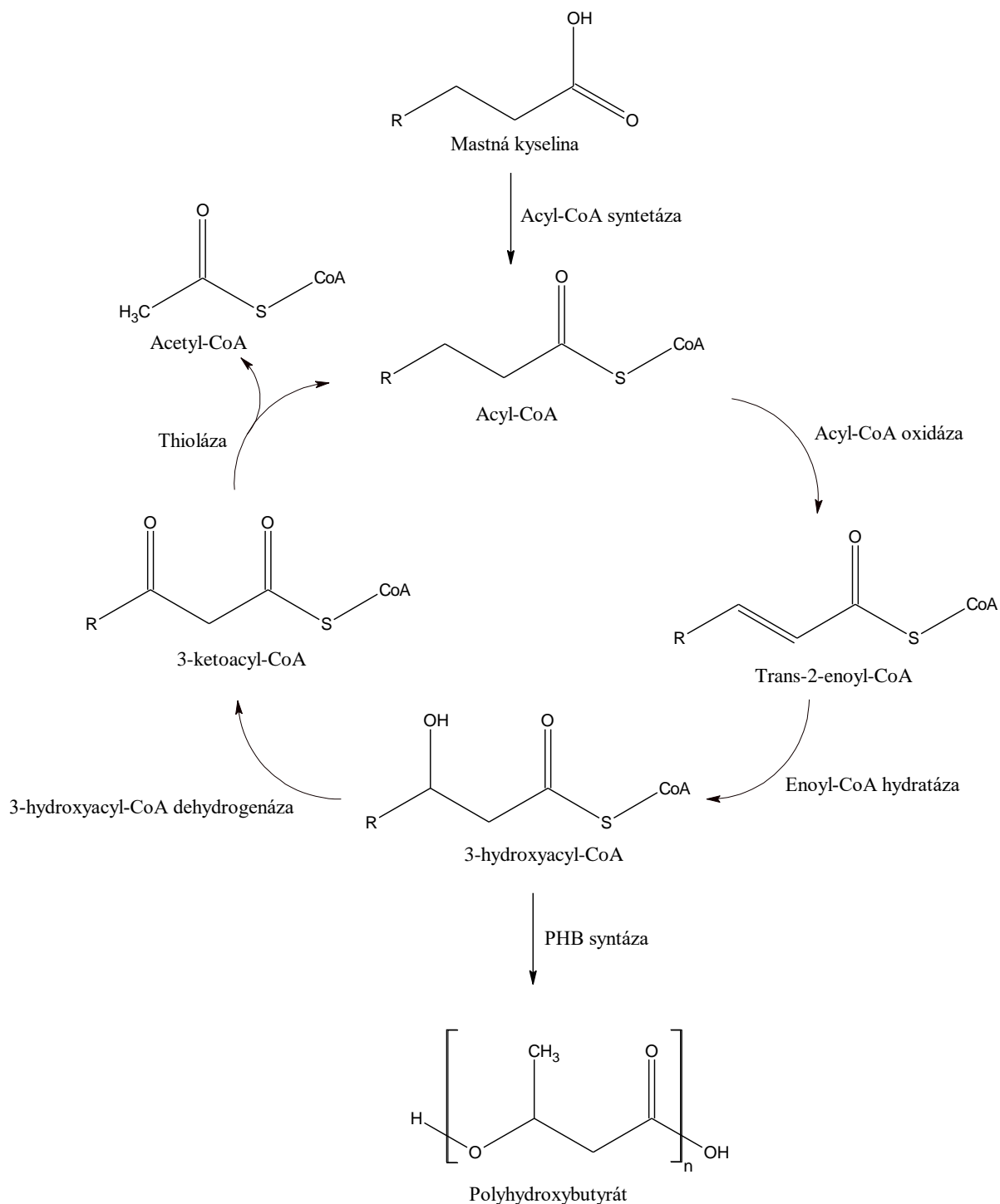
Existuje více možností biosyntézy PHB, přičemž daná metabolická dráha závisí především na druhu substrátu. Syntéza PHB z cukru se skládá ze tří na sebe navazujících reakcí (obrázek č. 4). V prvním kroku dochází za přítomnosti enzymu β-ketothioláza ke kondenzaci dvou molekul acetyl-CoA za vzniku acetoacetyl-CoA. V dalším kroku nastává redukce pomocí acetoacetyl-CoA reduktázy za vzniku 3-hydroxybutyryl-CoA. Ve třetím a zároveň posledním kroku nastává polymerace za přítomnosti PHB syntázy a vzniká PHB [6].



Obrázek 4: Biosyntéza PHB z fruktózy

Při využití oleje jako uhlíkového zdroje je PHB syntetizováno z mastných kyselin přes β-oxidaci. Tato cesta se skládá ze čtyř kroků (obrázek č. 5). V prvním kroku dochází k aktivaci mastné kyseliny pomocí enzymu acyl-CoA syntetáza. V dalším kroku je aktivovaná mastná kyselina za přítomnosti enzymu acyl-CoA oxidáza oxidována na nenasycenou mastnou kyselinu (trans-2-enoyl-CoA). Ve třetím kroku dochází k hydrataci za přítomnosti enzymu

enoyl-CoA hydratáza a vzniká 3-hydroxyacyl-CoA. V posledním kroku nastává polymerace pomocí PHB syntázy a vzniká PHB [13;14].



Obrázek 5: Biosyntéza PHB z mastné kyseliny

2.2.3 Vlastnosti PHB

PHB je, stejně jako ostatní polyhydroxyalkanoáty, biokompatibilní a biodegradabilní polymer. Jeho molekulární hmotnost se pohybuje v rozmezí 10 000–3 000 000 Da. Je to termoplastický a hydrofobní materiál s podobnými mechanickými vlastnostmi jako polypropylen. Proto by

mohl být vhodný pro výrobu obalových materiálů. Hodnota pevnosti v tahu a teploty tání je u tohoto polymeru podobná jako u polypropylenu. Naopak modul pružnosti v tahu je u PHB o něco vyšší a délkové prodloužení při přetržení několikanásobně nižší. Díky tomu je PHB tužší a po několika dnech vystavení okolním podmínkám se stává křehčím. Všechny tyto hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 1 [6;15;16;17].

Tabulka 1: Porovnání fyzikálních vlastností PHB a polypropylenu [6]

Polymer	Teplota tání [°C]	Modul pružnosti v tahu [GPa]	Pevnost v tahu [Mpa]	Délkové prodloužení při přetržení [%]
PHB	179	3,5	40	5
Polypropylen	170	1,7	34,5	400

2.3 Využití alternativních uhlíkových zdrojů

Limitním faktorem širšího využití polyhydroxyalkanoátů, jakožto bioplastů, jsou příliš vysoké vstupní náklady. Zatímco cena syntetických plastů, jako je polypropylen nebo polyethylen, se pohybuje mezi \$0,23–0,48/kg, cena bioplastů dosahuje až \$6–15/kg. Jednoznačně nejvyšší podíl nákladů při výrobě bioplastů tvoří uhlíkový zdroj. Tyto důvody vedly vědce k vývoji technologií využívajících alternativních uhlíkových zdrojů, jako jsou odpady z potravinářství nebo ze zemědělství [8;18].

2.3.1 Syrovátka

Syrovátka tvoří 80–90 % objemu mléka a vzniká jako vedlejší produkt při výrobě sýrů. Roční produkce syrovátky činí $1,15 \cdot 10^8$ – $1,40 \cdot 10^8$ tun. Kvůli vysoké chemické a biologické spotřebě kyslíku je rozložení syrovátky v přírodě poměrně problematické. Z tohoto důvodu a díky vysokým objemům je to ideální substrát pro mikrobiální fermentaci a produkci PHA [8;19].

Syrovátka je bohatá na laktózu, lipidy a proteiny. Dále také obsahuje kyselinu mléčnou, vitaminy a různé soli. Laktóza je zde hlavním zdrojem uhlíku, ale ne všechny mikroorganismy ji dokážou zpracovat. Proto je v některých případech nutné laktózu enzymaticky nebo chemicky hydrolyzovat na glukózu a galaktózu. Tyto monosacharidy následně slouží jako zdroj uhlíku [8;19].

2.3.2 Lignocelulózové materiály

Lignocelulózové materiály patří mezi nejrozšířenější materiály na zemi. Bývají odpadem především ze zemědělství a lesnictví. Jejich struktura je tvořena celulózou, hemicelulózou a ligninem. Strukturu ligninu tvoří aromatické sloučeniny. Celulóza je polysacharid tvořený jednotkami glukóz spojených $\alpha(1-4)$ glykosidickými vazbami. Hemicelulóza je složena z různých pentóz, především pak xylózy, manózy, galaktózy, arabinózy a rhamnózy. Lignocelulózy jsou pro většinu mikroorganismů nevyužitelné, proto je potřeba je před samotnou fermentací upravit. To se ve většině případů provádí chemickou a následně enzymatickou hydrolyzou. Chemická hydrolyza se realizuje pomocí ozonolýzy, zředěných minerálních kyselin (HCl, H₂SO₄), hydroxidů (NaOH), peroxidu vodíku nebo organických rozpouštědel. Enzymatická hydrolyza se uskutečňuje pomocí hub a bakterií produkujících

příslušné enzymy. Dostaneme tak směs jednoduchých cukrů, které mohou sloužit jako prekurzory pro syntézu PHA. [8;20;21].

Jako substrát pro produkci PHA byly úspěšně použity např. rýžová sláma, dřevěná sláma, slupky od slunečnicových semínek, sójová sláma, bagasa z cukrové třtiny, noviny, kukuřičné slupky nebo pšeničné otruby [22;23;24]

2.3.3 Oleje

Mezi vhodné substráty k produkci PHA se řadí použité (odpadní) i nepoužité, rostlinné i živočišné oleje. Z nepoužitých olejů jsme schopni dostat vyšší výtěžky než z olejů použitých. Je to zřejmě způsobeno různými příměsemi, které odpadní oleje obsahují. Navzdory tomuto faktu se pozornost upíná spíše k olejům odpadním, a to proto že jejich cena je nižší a zároveň to řeší problém s jejich likvidací. Mastné kyseliny, které jsou v olejích přítomny, slouží pro mikroorganismy jako zdroj uhlíku [21;25].

Jako vhodné oleje k produkci PHA se ukázaly být např. odpadní rybí olej, odpadní slunečnicový, palmový a řepkový olej po smažení, olej získaný z kávové sedliny nebo olej sójový. [26;27;28].

2.3.4 Materiály obsahující škrob

Škrob je zásobní polysacharid rostlin. Najdeme ho zejména v zrnech (pšenice, kukuřice, rýže) a v hlízách (brambory, sladké brambory), kde je uložen ve formě škrobových zrn. Skládá se ze dvou polymerů – amylozy a amylopektinu. Oba polymery jsou tvořeny jednotkami glukóz. V amyloze jsou glukózy spojeny $\alpha(1-4)$ glykosidickými vazbami a v amylopektinu $\alpha(1-4)$ a $\alpha(1-6)$ glykosidickými vazbami. Před samotnou fermentací je potřeba škrob hydrolyzovat na jednoduché cukry. Hydrolýza se uskutečňuje pomocí enzymů (amylázy) a probíhá ve dvou krocích – ztekucení škrobu a zcukření škrobu [8].

K produkci PHA byla úspěšně použita např. zlomková rýže, cereální kaše, maniok nebo pšenice [29;30;31;32].

2.3.5 Odpadní glycerol

Tzv. surový glycerol vzniká jako hlavní odpadní produkt při výrobě bionafty. Bionafta se běžně získává z rostlinných olejů procesem zvaným transesterifikace, při kterém triacylglycerol reaguje s methanolem za přítomnosti katalyzátoru a vzniká glycerol a methylestery mastných kyselin (= bionafta). Glycerol tvoří přibližně 10 % hmotnosti bionafty a obsahuje různé příměsi jako methanol, různé soli, methylestery mastných kyselin a volné mastné kyseliny. Čistý glycerol se hojně využívá v kosmetickém, potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Avšak jeho purifikace je příliš drahá. Proto se začalo o surovém glycerolu uvažovat spíše jako o zdroji uhlíku pro mikrobiální fermentaci a začal se využívat k výrobě různých látek, např. PHA [19;21;33].

2.3.6 Šípkový olej

O šípkovém oleji, jako alternativním uhlíkovém zdroji pro produkci PHA, se sice v žádné literatuře nepíše, ale jelikož bude v této práci jako alternativní uhlíkový zdroj využit, zařazuji ho do této kapitoly.

Růže šípková je keřovitá rostlina, která se vyskytuje v Evropě, severozápadní Africe a Asii. Středem zájmu jsou především její plody, které jsou zdrojem vitamínu C, esenciálních mastných kyselin, polyfenolů, tokoferolů a dalších nutričně významných látek. Některé studie prokázaly, že šípky mají protizánětlivé, protistárnoucí, antiproliferativní, antioxidační, obezitu a diabetes potlačující účinky. Proto se šípky hojně využívají v potravinářství, kosmetice i ve farmacii. [34;35]

Přibližně 30 % plodu tvoří zrníčka. Ty vznikají jako odpadní produkt při výrobě džusů, marmelád nebo čajů. 5–18 % hmotnosti zrníček tvoří olej, který je taktéž bohatý na nutričně významné látky [34;36]. Na obrázku č. 6 je zobrazeno schéma zpracování šípku.



Obrázek 6: Zpracování šípků, převzato a upraveno z [34]

Olej se ze semínek standardně dostává lisováním za studena, nebo extrakcí pomocí rozpouštědel. Obecně je preferováno lisování za studena. Tento způsob totiž nezahrnuje operace s teplem nebo s chemikáliemi, a tak všechny důležité látky zůstanou zachovány a výsledkem je olej o vysoké kvalitě. Tato metoda má ale jednu nevýhodu a tou je nízká výtěžnost. Další možností je extrakce pomocí organických rozpouštědel (např. hexan). Tato metoda vyžaduje vysokých teplot a velkého množství rozpouštědel. Sice tak lze dosáhnout vyšších výtěžků, ale některé důležité látky nemusí zůstat zachovány. Vhodnou alternativou se ukázala být extrakce pomocí superkritického CO₂. Tento způsob spojuje výhody předchozích dvou metod. Dostaneme tedy kvalitní olej se všemi důležitými komponenty a zároveň dosáhneme vysokých výtěžků [34;37].

Existují studie, které se zabírají složením šípkového oleje, jejich výsledky se však značně liší. Velkou roli zde hraje především způsob, jakým byl olej získán. Šípkové oleje jsou zdrojem nenasycených mastných kyselin, především pak kyseliny linolové, linolenové a olejové. V tabulce č. 2 jsou uvedeny obsahy mastných kyselin v oleji získaných různým způsobem.

Tabulka 2: Obsah nenasycených mastných kyselin v šípkovém oleji

	Obsah [%]	
	lisování za studena [36]	extrakce methanolem [35]
Linolová	51.7 ± 0.9	54,05
Linolenová	21.5 ± 0.1	19,37
Olejová	16.3 ± 0.3	19,50

Dále v šípkovém oleji najdeme například karotenoidy, polyfenoly, fosfolipidy, steroly, z nichž nejvíce je zastoupen β -Sitosterol a tokoferoly, z čehož největší část tvoří γ -tokoferoly. V tabulce č. 3 je uvedeno přibližné složení šípkového oleje.

Tabulka 3: Složení šípkového oleje

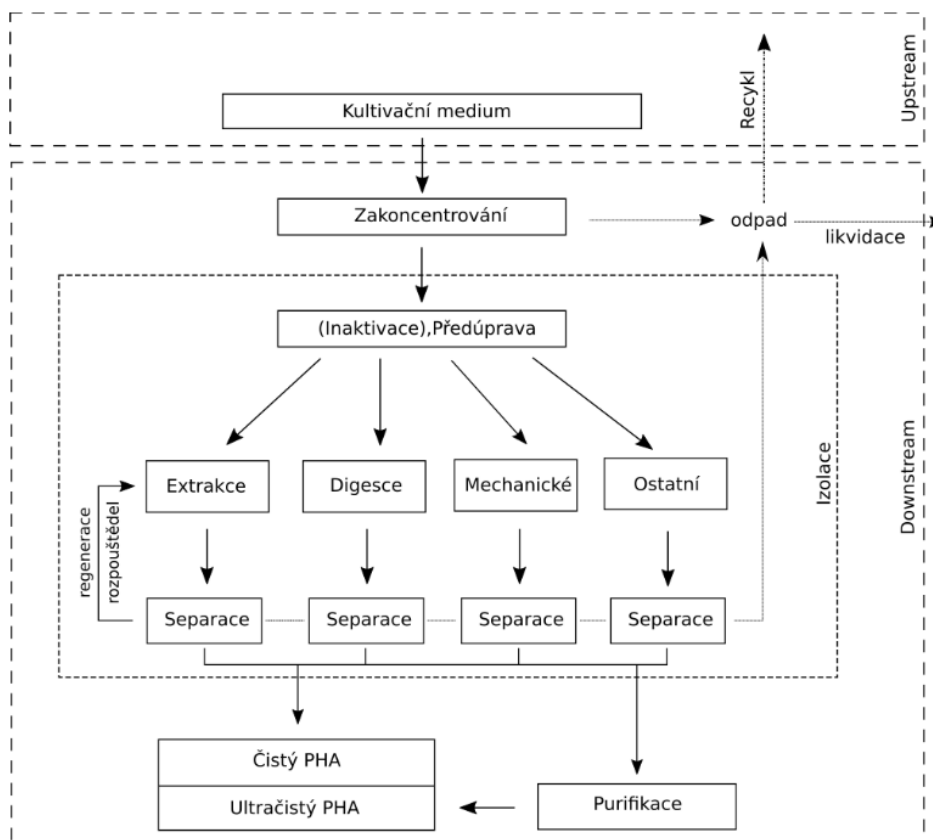
látka	obsah [g/kg]		
	lisování za studena [36]	extrakce methanolem [35]	extrakce hexanem [38]
Steroly	6,49 ± 0,32	6,63 ± 0,48	0,40
β -Sitosterol	5,30 ± 0,31	5,44 ± 0,368	81,50
Skvalen	$(1,11 \pm 0,11) \cdot 10^{-1}$		
Tokoferoly	1,12 ± 0,02		$8,94 \cdot 10^{-2}$
γ -Tokoferoly	$(7,77 \pm 0,09) \cdot 10^{-1}$		71,00
Karotenoidy	$(1,08 \pm 0,07) \cdot 10^{-1}$	$(8,63 \pm 0,53) \cdot 10^{-2}$	
Polyfenoly	$(7,84 \pm 0,36) \cdot 10^{-4}$	$(2,15 \pm 0,28) \cdot 10^{-1}$	
Fosfolipidy			1,40

2.4 Downstream

Technologie downstreamu je kromě substrátu dalším faktorem, který znemožňuje širší využití polyhydroxyalkanoátů. Jednak je tento proces technologicky náročný (vysoké požadavky na výtěžnost a čistotu) a jednak tvoří značnou část vysoké ceny produktu (vysoká energetická náročnost, velké množství rozpouštědel). Obecně se downstream skládá ze tří kroků: [25;39]

- 1) zakoncentrování biomasy
- 2) izolace PHA
- 3) přečištění produktu [25]

Na obrázku č. 7 je zobrazeno obecné schéma downstream procesu.



Obrázek 7: Obecné schéma downstream procesu, převzato z [25]

2.4.1 Zakoncentrování biomasy

Na počátku procesu je třeba zahustit fermentační kapalinu. To se nejčastěji provádí odstředováním, dále také filtrací nebo lyofilizací. Pokud má být kultivační kapalina delší dobu přechovávána, je potřeba ji inaktivovat, aby nedocházelo k rozkladu PHA. Čehož dosáhneme rychlým zahřátím na teploty kolem 85 °C. Zároveň tak dojde k narušení membrán a díky tomu je následná izolace snadnější [25].

2.4.2 Izolace a purifikace

Existuje celá řada metod izolace PHA. Ty lze obecně rozdělit do čtyř skupin – extrakce PHA, chemická digesce buněčných komponent, mechanická izolace a ostatní. Na obrázku č. 8 jsou stručně uvedeny základní charakteristiky těchto metod [25].

Izolační metody	Výhody	Nevýhody	Chemikálie/metoda
Extrakční	vysoká čistota, nízký rozsah depolymerace, odstranění endotoxinů	velké množství chemikálií, vysoké energetické náklady, toxicita	chloroform, jiná chlorovaná rozpouštědla, alkoholy, ketony ^a
Digesční	vysoká čistota, procesně jednodušší, menší množství chemikálií	velký rozsah depolymerace ^b , množství odpadů	chlornan sodný, SDS, NaOH, minerální kyseliny, enzymy (alkaláza, lysozym)
Mechanické	malé množství chemikálií, zanedbatelný rozsah depolymerace	nízká čistota, nízká účinnost	homogenizace, mletí, mechanická izolace, chloroform ^c
Superkritické extrakce	nízká toxicita, levné, vysoká čistota	nízká účinnost	superkritický CO ₂ , toluen, NaOH ^d

^a V závislosti na typu PHA, ^b s výjimkou enzymů, ^c pro přečištění PHA, ^d kosolventy

Obrázek 8: Porovnání různých izolačních metod, převzato z [25]

2.4.2.1 Extrakce

Při extrakci dochází k rozpadu buněk a rozpuštění PHA do vhodného rozpouštědla. Tímto dostaneme NPCM (non-PHA cell material, buněčné zbytky neobsahující PHA) v roztoku PHA. Prvními využívanými rozpouštědly byla rozpouštědla chlorovaná. Ta narušují buněčnou stěnu bakterií a zpřístupňují tak granule PHA. Výhodou těchto rozpouštědel je vysoká výtěžnost a nepoškození polymerních řetězců. Avšak z ekologických a bezpečnostních důvodů začala být chlorovaná rozpouštědla nahrazována méně toxickými alternativy. Jako vhodná rozpouštědla pro PHB se jeví dioly, trioly a estery kyseliny malonové [25;39;40].

Následně je třeba oddělit NPCM od roztoku PHA. Tyto roztoky mají vysokou viskozitu, proto je tento proces poměrně problematický. Obvykle se volí odstředování za velmi vysokých hodnot G. Získáme tak dvě fáze – organickou fází obsahující PHA a vodnou fází buněk. Po oddělení fází zůstávají ve vodné fázi zbytky extrakčního činidla, proto je nutné ji dále zpracovat. Obvyklým způsobem je vyvaření tohoto podílu ve vodě. Rozpouštědlo z kondenzátu se následně regeneruje např. rektifikací [25].

Existuje několik způsobů získání PHA z organické fáze. Jedním z nich je přidání precipitantu do roztoku a vysrážení PHA. Vhodným srážecím činidlem pro PHB v chloroformu může být třeba ethanol, aceton nebo voda. Nevýhodou tohoto procesu je použití velkého množství precipitantu a nutnost jeho regenerace. Další variantou je odpaření rozpouštědla. To se provádí nastříkáním do sprejové sušárny nebo pod hladinu vroucí vody v zásobníku [25].

Hlavní nevýhodou extrakčních metod je vysoká spotřeba rozpouštědel a s nimi spojená ekologická a bezpečnostní rizika. Dalším problémem je extrakce endotoxinů a zbytků neutilizovaných živin společně s PHA, ty snižují čistotu výsledného produktu. Proto jsou ještě před samotnou extrakcí PHA zařazovány extrakční kroky pro jejich odstranění. Někdy těmto krokům ještě předchází dezintegrace buněk. Dále je tu riziko degradace PHA během procesu.

Aby k tomu nedocházelo, je třeba udržovat teplotu v rozumných mezích a celý proces by neměl trvat příliš dlouho [25].

2.4.2.2 Chemická digesce buněčných komponent

Účelem této metody je zachování PHA v pevné fázi a rozpuštění NPCM pomocí chemikálií. Nejčastěji používanou chemikálií je chlornan sodný. Je to silné oxidační činidlo schopné rozpouštět proteiny, lipidy, sacharidy a nukleové kyseliny. Další možností jsou hydroxidy nebo minerální kyseliny. Pokud jsou ale jejich roztoky příliš koncentrované, může dojít k rozkladu nejen NPCM, ale i PHA. Tyto metody byly později nahrazeny aniontovými (SDS), kationtovými (CTAB), neionogenní tenzidy (Triton X-100) a proteolytickými enzymy. Molekuly tenzidů se začlení do buněčné membrány, s jejichž rostoucí koncentrací se zvyšuje objem membrány, která nakonec praskne. Detergenty zároveň denaturují nebo rozpouštějí proteiny, to usnadňuje rozpad buněčných membrán [25;39;41].

Získáme tak suspenzi vodného roztoku činidel, rozpuštěných buněčných složek, enzymů a volných granulí PHA. PHA lze z roztoku oddělit odstředováním, filtrací, nebo samovolným usazováním granulí. Výsledkem je produkt o nízké čistotě, který je potřeba pročistit. K dosažení co nejvyšší efektivity, je možné všechny zmíněné postupy vzájemně kombinovat [25].

2.4.2.3 Mechanická izolace

Mechanická izolace umožňuje získání PHA bez použití chemikálií. Samotné izolaci předchází vždy dezintegrace buněk. To se provádí vysokotlakou homogenizací, mletím, drcením, nebo ultrasonikací. Získáme tak suspenzi PHA v kapalině, ze které dostaneme PHA například pomocí deskového separátoru, kde se oddělí pevná fáze od kapaliny. [25]

Touto metodou lze dosáhnout vysokých výtěžků s nízkou čistotou. Proto je nutné získaný produkt přečistit, a to se provádí extrakčními metodami. [25]

2.4.2.4 Ostatní metody

Mezi ostatní metody se řadí zejména superkritická extrakce oxidem uhličitým. Při této metodě jsou buňky vystaveny superkritickému CO₂, pod jehož vlivem dojde k prasknutí buněčné membrány. Dostaneme tak suspenzi granulí PHA a NPCM, ze které se PHA vyextrahuje příslušným rozpouštědlem. Množství konečného produktu závisí na podmínkách extrakce (teplota, tlak, množství rozpouštědla) a délce kultivace. Pro extrakci PHB z *Cupriavidus necator* se ukázal být nejvýhodnější tlak o velikosti 200 atm, teplota 40 °C, extrakce 0,2 ml chloroformu a 44h kultivace. Při těchto podmínkách bylo dosaženo 89% výtěžku. Výhodou této metody je malá spotřeba organických rozpouštědel, nízká cena a bezpečnost [25;42].

3 CÍLE PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je zjistit, zda lze využít odpad z plodu růže šípkové k produkci polyhydroxyalkanoátů. V rámci práce byly plněny jednotlivé úlohy:

- 1) Literární rešerše na zadané téma (využití odpadních zdrojů pro produkci polyhydroxyalkanoátů).
- 2) Produkce poly(3-hydroxybutyrátu) (PHB) pomocí bakterie *Cupriavidus necator* H16 za použití fruktózy jako uhlíkového zdroje a její zhodnocení.
- 3) Porovnání produkce PHB pomocí *Cupriavidus necator* H16 za využití uhlíkového zdroje získaného z odpadů z plodu růže šípkové.
- 4) Vyhodnocení výsledků, jejich diskuze a závěr práce.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité mikroorganismy, chemikálie a přístroje

4.1.1 Použité mikroorganismy

V experimentální části bakalářské práce byl využit mikroorganismus *Cupriavidus necator* H16 (CCM 3726) – Česká sbírka mikroorganismů, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika.

4.1.2 Použité chemikálie

- ABTS (Sigma-Aldrich)
- Agar powder (Carl Roth GmbH)
- Cellulase from *Trichoderma* sp. ($\geq 5\ 000$ units/g) (Sigma Aldrich)
- D-fruktóza, p.a. (Lach-Ner)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner)
- Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného, p.a. (Lach-Ner)
- Dusitan sodný (Lachema)
- Ethanol (Penta)
- Folin-Ciocalteuovo činidlo (Serva)
- Glycerin bezvodý, p.a. (Lach-Ner)
- Heptahydrát síranu hořečnatého, p.a. (Lach-Ner)
- Hexan (Penta)
- Hydroxid sodný, p.a. (Lach-Ner)
- Chlorid hlinitý (Lach-Ner)
- Chloroform, p.a. (Lach-Ner)
- Izopropanol
- Katechin (Verkon)
- Kyselina dusičná
- Kyselina gallová (Loba Chemie)
- Nutrient broth (Himedia)
- Peroxodisíran draselný
- Síran amonný, p.a. (Lach-Ner)
- Trolox (Sigma-Aldrich)
- Uhličitan sodný (Lach-Ner)

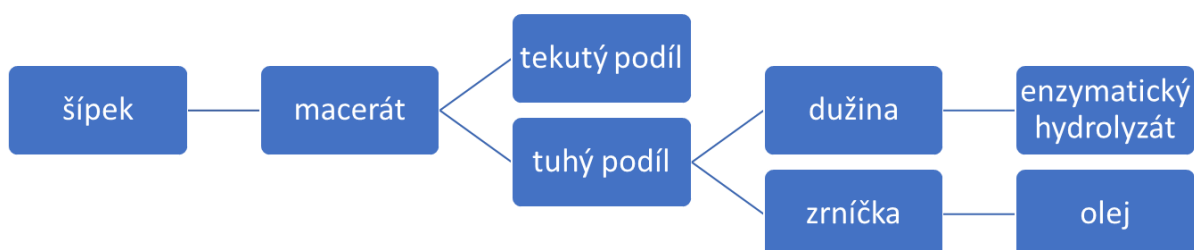
4.1.3 Použité přístroje

- Centrifuga EBA 200 (Hettich)
- Elektrická pec (Lac)
- Kapalinový chromatograf
- Magnetická míchačka
- Očkovací box Aura Mini (BioAir)
- Optický emisní spektrometr ultima 2 (Horiba Scientific)
- Orbitální třepačka s inkubací ES-20 (Biosan)
- pH metr InoLab 720 SET (WTW)
- Plynový chromatograf s plamenovým ionizačním detektorem (GC-FID)
- Soxtherm
- Spektrofotometr Spekol 1300 (Analytik Jena)
- Spektrometr Nicolet iS50 (Thermo Fisher Scientific)
- Termoblok
- Váhy analytické Pioneer (Ohaus)
- Váhy laboratorní
- Vodní lázeň
- Běžné laboratorní sklo a vybavení

4.2 Příprava a charakterizace vzorků z plodu šípku

Likér

400 g očištěných, nesušených a odstokovaných šípků zbavených zbytků květu (tzv. bubák) bylo dáno do 1 l 40% vodky a po měsíci macerace byl obsah scezen a do filtrátu bylo přidáno 100 ml medu. Odpad z macerace se vysušil při 50 °C a pro další využití se oddělili dvě frakce zrníčka a dužina (obrázek č. 9).



Obrázek 9: Schéma znázorňující zpracování šípku

Příprava enzymatického hydrolyzátu

Suchá dužina z odpadu šípku po výrobě likéru se enzymaticky hydrolyzovala pomocí enzymu celulóza následovně: ke 103,41 g suché dužiny získaného po výrobě likéru bylo přidáno 5 ml enzymu a 460 ml vody. Poté byla tato směs umístěna na třepačku, kde byla ponechána 24 hodin při teplotě 42 °C a 180 rpm. Po uplynutí tohoto času byla směs přeceděna, označena jako enzymatický hydrolyzát a zamrzena k dalšímu použití.

Příprava šípkového oleje

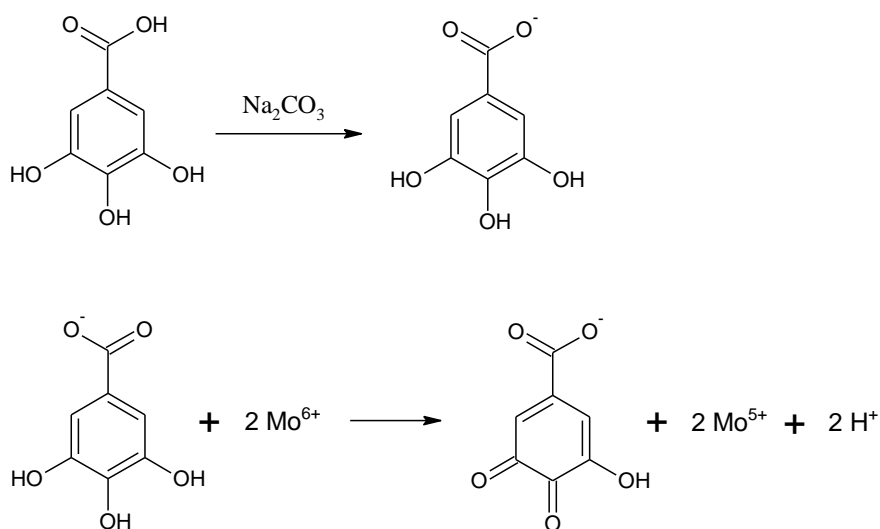
Šípková zrníčka byla rozemleta v mixéru a následně z nich byl extrakcí hexanem získán olej. Rozemletá zrníčka byla extrahována v hexanu při teplotě 170 °C po dobu 1 hodiny v Soxthermu. Po extrakci byl na vakuové odparce z oleje odpařen hexan. Aby došlo k dokonalému odpaření hexanu, byl olej ponechán ještě 24 hodin v digestoři.

4.2.1 Stanovení obsahu cukrů pomocí HPLC

Analyzované vzorky byly přefiltrovány přes stříkačkový filtr s velikostí pórů 0,45 mm a vhodně zředěny. Takto připravené vzorky byly analyzovány na kapalinovém chromatografu s refraktometrickým detektorem na koloně Waters, Carbohydrate Analysis, 3,9x300 mm. Jako mobilní fáze byl použit acetonitril a voda v poměru 80:20. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1,2 ml/min. Izokratická separace probíhala při 40 °C a detekce při 30 °C.

4.2.2 Stanovení celkových polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteuova činidla

Folin-Ciocalteuovo činidlo je směs fosfomolybdenanu a fosfowolframenu. Principem metody je oxidace hydroxyskupin polyfenolů a současná redukce molybdenového kationtu (Mo^{6+}) na molybdeničný (Mo^{5+}) za vzniku molybdeno-wolframového komplexu modré barvy (obrázek č. 10). Do směsi se také přidává uhličitan sodný k vytvoření alkalického prostředí, které podporuje reakci [43].

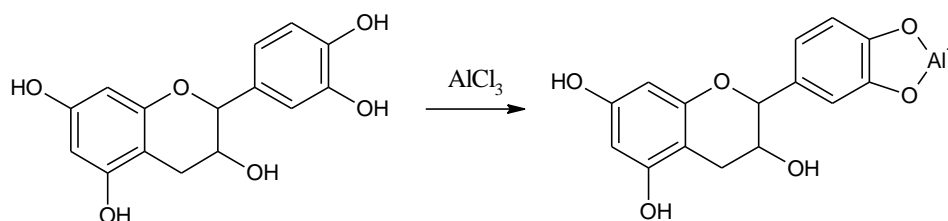


Obrázek 10: Důkaz kyseliny gallové pomocí Folin-Ciocalteuova činidla

Postup byl realizován podle skript *Praktikum z biochemie: Pracovní sešit* [44]. Do zkumavky byl napipetován 1 ml Folin-Ciocalteuova činidla zředěného v poměru 1:9 s vodou a 1 ml destilované vody. K tomu bylo přidáno 100 μ l vhodně zředěného vzorku a obsah zkumavky byl promíchán. Po pěti minutách stání při laboratorní teplotě byl do zkumavky přidán 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného. Po promíchání se nechala tato směs 15 minut stát při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby byla změřena absorbance při 750 nm proti slepému vzorku. Pro sestavení kalibrační křivky byl místo vzorku použit roztok kyseliny gallové o různých koncentracích.

4.2.3 Stanovení celkových flavonoidů pomocí chloridu hlinitého

Principem této metody je tvorba komplexů stabilních v kyselém prostředí, které vznikají reakcí chloridu hlinitého s C-4 ketoskupinami a s C-3 nebo C-5 hydroxyskupinami flavonů a flavonolů. Chlorid hlinitý tvoří také komplexy s ortho-dihydroxylovými skupinami v α - nebo β - kruhu flavonoidů, které jsou v kyselém prostředí nestabilní [45]. Průběh reakce je znázorněn na obrázku č. 11.



Obrázek 11: Důkaz katechinu pomocí $AlCl_3$

Postup stanovení flavonoidů byl též realizován podle skript *Praktikum z biochemie: Pracovní sešit* [44]. Do zkumavky se napipetovalo 0,5 ml vhodně zředěného vzorku, 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5% roztoku $NaNO_2$. Po promíchání se roztok nechal 5 minut stát při laboratorní teplotě. Následně bylo do zkumavky napipetováno 0,2 ml 10% roztoku $AlCl_3$. Obsah zkumavky byl opět promíchán a ponechán 5 minut stát. Poté byl přidán 1,5 ml 1M $NaOH$ a 1 ml destilované vody. Po promíchání a následném patnáctiminutovém stání při laboratorní teplotě byla změřena absorbance při 510 nm oproti slepému vzorku. Při měření kalibrační křivky bylo postupováno stejným způsobem s tím rozdílem, že místo vzorku byl použit roztok katechinu o koncentracích 0,05–0,3 g/l.

4.2.4 Stanovení antioxidační aktivity

Tato metoda je založena na schopnosti vzorku zhášet kation-radikál $ABTS^{+}$. Výsledná antioxidační aktivita vzorku se srovnává s antioxidační aktivitou standardní látky – Trolox (kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová) [44].

Postup byl proveden podle skript *Praktikum z biochemie: Pracovní sešit* [44]. Radikálový kation $ABTS^{+}$ byl získán reakcí 7mM roztoku ABTS s 2,45mM peroxodisíranem draselným. Získaný roztok byl ponechán 12 hodin ve tmě. Před samotným měřením byl roztok naředěn ethanolem pro UV/VIS na absorbanci $0,70 \pm 0,02$ při 734 nm. Jako blank byl použit ethanol pro UV/VIS. Při samotném měření bylo do zúžené kyvety napipetováno 1 ml roztoku $ABTS^{+}$ a 10 μ l vzorku. Vzorek byl promíchán a po 10 minutách byla změřena absorbance. Absorbance

vzorku byla odečtena od absorbance substrátu (1 ml ABTS^{•+} a 10 µl vody, měřeno v čase 0 minut).

Kalibrační křivka byla sestavena pomocí Troloxu o koncentracích v rozmezí 50–400 µg/ml. Trolox byl ředěn 60% ethanolem. U měření kalibrační křivky bylo postupováno stejně jako u měření vzorků. S tím rozdílem že jako blank byl použit 60% ethanol. Absorbance Troloxu byla odečítána od absorbance substrátu (1 ml ABTS^{•+} a 10 µl 60% ethanolu, měřeno v čase 0 minut).

4.2.5 Stanovení obsahu barviv

Z důvodu náročnosti byl obsah barviv stanoven pouze v šípkovém oleji. Tato analýza byla provedena pomocí kapalinové chromatografie. Vzorek byl před samotnou analýzou upraven následujícím způsobem. K oleji byl přidán hexan a byl odpařen ve tmě při 40 °C. Následně k tomu byly přidány 2 ml směsi ethylacetát-acetonitril v poměru 1:2. Tato směs byla přefiltrována přes PTFE filtr do vialky a následně proběhla analýza.

4.2.6 Stanovení obsahu mastných kyselin

Obsah mastných kyselin byl stanoven na kapalinovém chromatografu. Příprava vzorku byla následující. Ke 2 ml oleje byly přidány 2 ml hexanu. Tato směs byla po dobu 5 minut třepána na vortexu a následně byla zcentrifugována. Horní hexanová fáze byla odpipetována do vialky a následně odpařena. Potom k tomu bylo přidáno 1,8 ml transesterifikační směsi a nechalo se to 2 hodiny při 87 °C. Po 2 hodinách byla směs přelita do 5ml vialky s 0,5 ml NaOH a 1 ml hexanu na HPLC. Vzorek byl opět protřepán na vortexu a 0,1 ml horní fáze bylo odebráno do vialky, kam bylo ještě přidáno 0,9 ml hexanu.

4.2.7 Stanovení obsahu minerálních látek

Obsah minerálních látek byl stanoven pomocí optického emisního spektrometru s koncentrickým zmlžovačem typu mainhard a s cyklónovou mlžnou komorou. Jako pracovní plyn byl použit argon. V tomto případě byla kvůli náročnosti přípravy vzorků provedena analýza pouze šípkových zrníček a šípkové dužiny se slupkou.

Před samotnou analýzou byly plody šípku vysušeny a po vysušení byly odděleny zrníčka od dužiny. Do vyžíhaných žihacích kelímků (byly žihány 30 minut při 550 °C) bylo naváženo přibližně 1,5 g zrníček anebo dužiny. Následně byl obsah kelímků spálen v elektrické peci při 550 °C po dobu 4 hodin. Získaný popel byl kvantitativně převeden do 25ml odměrných baněk s 1M kyselinou dusičnou. Takto připravené vzorky byly ponechány 15 minut pod ultrazvukem, aby se obsažený popel zcela rozrušil. Po uplynutí této doby byly vzorky ještě přefiltrovány a následně proběhla samotná analýza.

Při sestavování kalibrační křivky byly připraveny roztoky minerálů v 1M kyselině dusičné. V případě některých makroprvků (Mg, Na, P) byly nachystány roztoky o koncentracích 1; 2,5 a 5 mg/l, u zbylých makroprvků (Ca, K) to bylo 25; 50 a 100 mg/l. V případě mikroprvků (Cu, Fe, Mn, Zn) měly kalibrační roztoky koncentrace 0,25; 0,5 a 1 mg/l.

Vlnové délky, při kterých byly jednotlivé prvky analyzovány a nastavení spektrometru jsou uvedeny v následujících tabulkách.

Tabulka 4: Vlnové délky pro detekci jednotlivých prvků

prvek	vlnová délka [nm]
vápník	393,366
draslík	766,490
hořčík	258,213
sodík	588,995
fosfor	214,914
zinek	206,191
mangan	257,610
železo	259,940
měď	327,396

Tabulka 5: Nastavení spektrometru

společné nastavení	
rychlost otáček pumpy	16 rpm
tlak ve zmlžovači	2,98 bar
průtok plynu ve zmlžovači	0,83 ml/min
mikroprvky	
průtok plazmového plynu	14 l/min
průtok stínícího plynu	0,25 l/min
průtok pomocného plynu	0,20 l/min
příkon	1300 W
makroprvky	
průtok plazmového plynu	14 l/min
průtok stínícího plynu	0,80 l/min
průtok pomocného plynu	0,20 l/min
příkon	1100 W

4.3 Kultivace mikroorganismu *Cupriavidus necator* za využití meziproductů z plodu šípku

Veškerá práce s mikroorganismy probíhala asepticky v laminárním boxu. Všechna použitá média byla sterilizována v parním hrnci při teplotě 120 °C po dobu 20 minut. Média obsahující redukující sacharidy, byla sterilizována při teplotě 100 °C po dobu 30 minut.

Uchovávání

Cupriavidus necator byl uchováván v kryozkumavkách a na agarových plotnách. K přípravě agarových ploten bylo připraveno médium s obsahem následujících složek:

Nutrient Broth	25 g/l
Agar powder	17 g/l

Tato směs byla vylita do Petriho misek a po ztuhnutí byly misky naočkovány. Takto připravené misky byly ponechány 24 h v inkubátoru při teplotě 30 °C. Po uplynutí této doby byly skladovány v lednici.

Při přípravě kryozkumavek se postupovalo následovně. Do kryozkumavky bylo napipetováno 0,5 ml 30% roztoku glycerolu a k tomu byl přidán 1 ml inokula narostlého za 24 hodin. Kryozkumavky byly poté uchovávány v mrazáku při teplotě -80 °C.

Médium pro přípravu inokula

K přípravě 100 ml inokula bylo použito 2,5 g komplexního média Nutrient Broth (NB) with 1% Peptone, které obsahuje:

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

Produkční médium

K produkční kultivaci bylo připraveno minerální médium s obsahem těchto látek:

(NH ₄) ₂ SO ₄	3 g/l
KH ₂ PO ₄	1,02 g/l
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	11,1 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g/l
Roztok mikroelementů	1 ml/l

Roztok mikroelementů obsahoval v 0,1M HCl následující:

FeCl ₃	9,7 g/l
CaCl ₂	7,8 g/l
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,156 g/l
CoCl ₂	0,119 g/l
NiCl ₂	0,118 g/l
CrCl ₂	0,062 g/l

Jako zdroj uhlíku byla použita fruktóza, šípkový olej, enzymatický šípkový hydrolyzát, nebo hydrolyzát v kombinaci s fruktózou v různých poměrech. Konkrétní koncentrace uhlíkových zdrojů v jednotlivých experimentech jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 6: Koncentrace uhlíkových zdrojů v jednotlivých experimentech

experiment	fruktóza [g/l]	šípkový olej [g/l]	cukry v enzymatickém hydrolyzátu [g/l]
1	20	-	-
2	-	20	-
3	-	-	20
4	10	-	5
5	10	-	10
6	10	-	15
7	10	-	20

Kultivace

Veškeré kultivace byly vedeny jako submerzní batch kultivace. K vysterilizovanému minerálnímu médiu byl asepticky přidán roztok mikroelementů a uhlíkový zdroj tak, aby konečný objem činil 100 ml. Následně bylo k takto připravenému médiu přidáno 10 ml inokula.

Kultivace inokula i kultivace produkční probíhala v objemu 100 ml média ve 250ml Erlenmayerových baňkách na třepačce za stejných podmínek, a to při teplotě 30 °C a otáčkách 180 rpm. Jen doba kultivace byla různá. Inokulum se kultivovalo 24 h a produkční kultivace byla ukončena po 72 h.

4.4 Vyhodnocování kultivací

Stanovení množství biomasy spektrofotometricky

Abychom zjistili hustotu kultury, byly v průběhu kultivace každých 24 hodin odebírány vzorky. Ty byly vhodně zředěny a byla změřena jejich absorbance při 630 nm proti destilované vodě.

Stanovení množství biomasy gravimetricky

Pro přesnější výsledky bylo množství biomasy určeno gravimetricky. Na konci každé kultivace bylo odebráno přesně 10 ml vzorku. Vzorek byl zcentrifugován při 5000 rpm po dobu 5 minut a přečištěn destilovanou vodou a znovu zcentrifugován. Následně byl tuhý podíl po centrifugaci sušen v sušárně při teplotě 70 °C, po usušení byl vzorek zvážen na analytických vahách.

Množství PHA

Koncentrace PHA v biomase byla určena pomocí plynového chromatografu s plamenovým ionizačním detektorem (GC-FID). Před samotnou analýzou bylo nutné vzorek upravit. Nejprve bylo na analytických vahách naváženo 8–11 mg biomasy do krimpovacích vialek. K biomase byl přidán 1 ml chloroformu a 0,8 ml esterifikační směsi (15% kyselina sírová v methanolu) s vnitřním standardem (5 mg/ml kyseliny benzoové). Tato směs byla v uzavřených vialkách esterifikována v termobloku po dobu 3 hodin při 94 °C. Po esterifikaci byl obsah převeden do velké šroubovací vialky, do které bylo přidáno 0,5 ml 50mM NaOH. Po protřepání se ve vialce oddělily dvě fáze. Ze spodní chloroformové fáze bylo odebráno 50 µl do malé šroubovací vialky s 900 µl izopropanolu. Takto připravené vzorky byly podrobeny analýze [46].

Množství zbytkového cukru

V průběhu kultivací byly každých 24 hodin odebírány vzorky, ve kterých byla stanovena koncentrace redukcujících sacharidů. Z toho bylo možno pozorovat, jak bakterie spotřebovávají uhlíkový zdroj. Zbytkový cukr byl stanoven stejným způsobem jako cukr v šípkových produktech. Postup je uveden v kapitole 4.2.1.

4.5 Izolace a charakterizace PHA z biomasy

PHA bylo z vysušené biomasy extrahováno chloroformem, postup byl následující. Biomasa byla převedena do Erlenmeyerovy baňky a k tomu byl přidán chloroform v množství odpovídající 200 ml chloroformu na 1 g biomasy. Takto připravená směs byla 1 hodinu míchána na magnetické míchačce při 60 °C. Po uplynutí 1 hodiny, byla směs přefiltrována a filtrát byl postupně nalit do studeného ethanolu, kde se vysrážel polymer. Precipitát polymeru byl přefiltrován a zlyofilizován.

K identifikaci strukturních jednotek a funkčních skupin polymeru byla využita infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR – Fourier-transform infrared spectroscopy). Měření bylo provedeno za laboratorní teploty na ATR krystalu. FTIR spektrum bylo měřeno v rozmezí 4000–400 cm^{-1} se spektrálním rozlišením 4 cm^{-1} a celkovým počtem akumulovaných skenů 128.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Charakteristika uhlíkových zdrojů

Jako zdroj uhlíku byl použit 1) olej z šípkových zrníček (olej) a 2) enzymatický hydrolyzát (hydrolyzát) zbylých částí šípků, které byly použité pro výrobu. Veškeré výsledky v následujících kapitolách jsou vztaženy na 100 g suchého plodu šípku.

Šípky, které byly použity, obsahovaly v suchém stavu 49,60 hm. % zrníček. 6,96 % hmotnostního obsahu těchto zrníček tvořil olej, což se moc neliší od toho, co ve své práci uvádí Zlatanov [38]. Zlatanov [38] provedla extrakci oleje pomocí organického rozpouštědla (hexanu), tedy stejně jako bylo provedeno v této práci. Olej, který Zlatanov [38] získala, tvořil 8,2 hm. % šípkových zrníček. Například ale Szentmihályi *et al.* [47] provedla taktéž extrakci pomocí hexanu a olej, který dostala, tvořil pouze 4,85 hm. % šípkových zrníček. Všechny tyto oleje byly sice získány pomocí hexanu, ale extrakční podmínky nebyly úplně stejné, a to je pravděpodobně hlavní důvod, proč se procentuální zastoupení oleje v zrníčkách liší. Rozdíly by také mohly být způsobeny tím, že šípky pochází z různých lokalit.

5.1.1 Obsah cukrů

Obsah cukrů v šípkových produktech byl stanoven pomocí HPLC. V tomto případě byly analyzovány pouze enzymatický hydrolyzát a likér. Bylo zjištěno, že v šípkových produktech se nachází fruktóza a glukóza. Výsledky jsou zobrazeny v tabulce č. 7.

Tabulka 7: Obsah cukrů v šípkovém hydrolyzátu a likéru

		hydrolyzát	likér
fruktóza	[g/l vzorku]	8,5	46,1
	[g/100 g suchého plodu šípku]	3,8	10,4
glukóza	[g/l vzorku]	11,5	42,9
	[g/100 g suchého plodu šípku]	5,1	9,7
celkem	[g/l vzorku]	20,0	89,0
	[g/100 g suchého plodu šípku]	9,0	20,0

Celkově je na cukry bohatší likér než hydrolyzát. likér obsahuje 89,0 g/l cukrů a hydrolyzát 20,0 g/l. Po přepočítání na 100 g šípku je to 20,0 g/100 g sacharidů v likéru a 9,0 g/100 g v hydrolyzátu. Zároveň se analyzované produkty liší ve více zastoupeném sacharidu. Zatímco hydrolyzát obsahuje více glukózy než fruktózy, u likéru je tomu naopak. Obsah cukrů v obou produktech je o něco nižší než v plodu růže šípkové podle Cunja *et al.* [48] (25,9–48,0 g/100 g). Obsah cukru závisí především na fázi zralosti, ve které se plody nachází.

5.1.2 Obsah celkových polyfenolů a flavonoidů

Obsah polyfenolů a flavonoidů byl stanoven spektrofotometricky. Obsah těchto látek byl stanoven ve všech šípkových produktech. Výsledky jsou zobrazeny v následující tabulce.

Tabulka 8: Obsah celkových polyfenolů a flavonoidů v šípkovém oleji, hydrolyzátu a likéru

		olej	hydrolyzát	likér
polyfenoly	[g GAE/l vzorku]	2,04±0,97	6,05±0,27	12,36±0,79
	[g GAE/100 g suchého plodu šípku]	0,01±0,00	2,72±0,12	2,78±0,20
flavonoidy	[g CAE/l vzorku]	1,56±0,47	1,55±0,21	4,57±0,05
	[g CAE/100 g suchého plodu šípku]	0,01±0,00	0,70±0,10	1,10±0,01

Nejvíce polyfenolů obsahuje likér (12,36 g GAE/l), asi o polovinu méně jich najdeme v hydrolyzátu (6,05 g GAE/l) a nejméně v oleji (2,04 g GAE/l). Když vztáhneme obsah polyfenolů na 100 g bezvodého šípku, bude mít likér přibližně stejné hodnoty jako hydrolyzát. Jejich obsah v oleji bude stále nejnižší. Skoro stejné množství polyfenolů v oleji stanovil i Grajzer *et al.* [49], konkrétně 0,00868 g GAE/100 g. Olej, se kterým pracoval Ilyasoğlu [35], byl na polyfenoly o něco bohatší. Jeho olej obsahoval 0,02154 g GAE/100 g celkových polyfenolů. Cunja *et al.* [48] stanovil obsah polyfenolů v plodech šípku na 1,23–1,57 g GAE/100 g, což je asi o polovinu méně, než obsahoval hydrolyzát likér. Zároveň je to ale několikanásobně více než v oleji.

Co se týče flavonoidů, jejich obsah v oleji (1,56 g CAE/l) je téměř stejný jako v hydrolyzátu (1,55 g CAE/l). Likér je na flavonoidy o něco bohatší (4,57 g CAE/l). Po přepočítání na 100 g bezvodého šípku, činí obsah flavonoidů v oleji 0,01 g CAE/100 g. To je o něco více, než uvádí Grajzer *et al.* [49] (0,00116 g CAE/100 g). Po přepočítání činí obsah flavonoidů v hydrolyzátu 0,70 g CAE/100 g a v likéru 1,10 g CAE/100 g. Cunja *et al.* [48] ve své práci uvádí, že plody růže šípkové obsahují 0,01180–0,03094 g CAE/100 g flavonoidů, což je opět menší hodnota než u hydrolyzátu a likéru, ale je to více než u oleje.

5.1.3 Antioxidační aktivita

Protože šípek obsahuje různé látky, které mají antioxidační účinky (polyfenoly, flavonoidy, karotenoidy, kyselina askorbová a některé enzymy), byla stanovena antioxidační aktivita šípkových produktů [44]. Antioxidační aktivita byla vztažena na ekvivalentní množství standardu (Troloxu, TE). Výsledky jsou zobrazeny v tabulce č. 9.

Tabulka 9: Antioxidační aktivita šípkového oleje, hydrolyzátu a likéru

	olej	hydrolyzát	likér
antioxidační aktivita [mmol TE/l vzorku]	1,93±0,01	2,03±0,01	1,25±0,01
antioxidační aktivita [mg TE/100 g suchého plodu šípku]	1,96±0,01	227,97±1,47	70,18±0,61

Největší antioxidační aktivitu vykazuje hydrolyzát (2,03 mmol TE/l), následuje olej (1,93 mmol TE/l) a nakonec likér (1,25 mmol TE/l). Vzhledem k tomu, že na polyfenoly a flavonoidy je likér bohatší než ostatní dva produkty, je pravděpodobné, že ostatní látky způsobující antioxidační vlastnosti, jako je kyselina askorbová nebo karotenoidy, zůstaly z větší části v šípku, tedy nepřešly při maceraci do ethanolu. Když však výsledky přepočítáme na 100 g suchého šípku, zjistíme, že i tak nejvyšší aktivitu vykazuje enzymatický hydrolyzát (227,97 mg TE/100 g), ale za ním je likér (70,18 mg TE/100 g) a nakonec olej (1,96 mg TE/100 g). Z toho vyplývá, že dužina se slupkou, ze kterých byl vyroben hydrolyzát, obsahuje více aktivních látek než šípková zrníčka, ze kterých byl získán olej. Přepočítáme-li antioxidační aktivitu oleje na mmol TE/kg oleje, dostaneme hodnotu 2,27 mmol TE/kg, což je

skoro stejná hodnota jako stanovil Grajzer *et al.* [36]. Ten stanovil antioxidační aktivitu šípkového oleje na 2,53 mmol TE/kg a 3,00 mmol TE/kg. Protože je antioxidační aktivita daná obsahem látek jako jsou například celkové polyfenoly nebo karotenoidy, jejichž obsah v šípku závisí na oblasti, ve které šípek rostl, budou pravděpodobně rozdíly způsobeny právě tím.

5.1.4 Obsah barviv

Obsah barviv v šípkovém oleji byl stanoven pomocí kapalinové chromatografie. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 10.

Tabulka 10: Obsah barviv v šípkovém oleji

	[mg/g oleje]	[mg/100 g suchého plodu šípku]
betakaroten	1,71	8,13
neoxanthin	0,53	2,50
violaxanthin	0,15	0,70
lutein	1,23	5,83
celkové karotenoidy	4,47	21,27
ubiquinon	1,17	5,58
chlorofyl A	0,04	0,19

Co se týče barviv, je šípkový olej nejvíce bohatý na betakaroten (1,71 mg/g oleje) a lutein (1,23 mg/g oleje). Obě tyto látky se řadí mezi karotenoidy, jejichž celková koncentrace činí 4,47 mg/g oleje. Šípkový olej obsahuje také poměrně dost ubiquinonu (1,17 mg/g oleje). Tento olej obsahuje více karotenoidů než olej Szentmihályi *et al.* [47], jehož koncentrace celkových karotenoidů byla stanovena na 0,1375 mg/g. Podobné je to s obsahem chlorofylů. V našem oleji byl detekován pouze chlorofyl A, jehož obsah činí 0,039 mg/g. Grajzer *et al.* [49] stanovil obsah chlorofylů v šípkovém oleji na 0,00086 mg/g, což je o poznání méně. Obsah pigmentů v šípku opět závisí na podmínkách, ve kterých šípek vyrostl a kdy byly jeho plody sklizeny.

5.1.5 Obsah mastných kyselin

Jednotlivé mastné kyseliny a jejich zastoupení v šípkovém oleji je zobrazeno v tabulce č. 11. Celkový obsah mastných kyselin v oleji byl stanoven na 8518 mg/l (34,05 mg/100 g šípku).

Tabulka 11: Obsah mastných kyselin v šípkovém oleji

	[mg/l oleje]	[%]	[mg/100 g suchého plodu šípku]
SFA			
kaprinová	26,09	0,31	0,11
palmitová	67,82	0,80	0,27
stearová	269,12	3,16	1,09
SFA celkem	363,03	4,26	1,47
MUFA			
palmitolejová	86,07	1,01	0,35
olejová	1387,87	16,29	5,62
MUFA celkem	1473,95	17,30	5,97
PUFA			
linolová	4148,68	48,70	16,80
alfa-linolenová	2532,34	29,73	10,26
PUFA celkem	6681,03	78,43	27,06

Nejvíce jsou v šípkovém oleji zastoupeny polynenasycené mastné kyseliny (PUFA), které tvoří 78,43 % celkového obsahu mastných kyselin. Následují mononenasycené mastné kyseliny (MUFA), kterých je v oleji 17,30 %. A nejméně je v oleji nasycených mastných kyselin (SFA), těch tam najdeme 4,26 %. Šípkový olej je bohatý především na kyselinu olejovou (16,29 %), linolovou (48,70 %) a alfa-linolenovou (29,73 %). Stejně to bylo u olejů, které analyzovali Ilyasoğlu [35] a Grajzer *et al.* [49]. Poměr těchto tří kyselin nebyl sice stejný, ale nejvíce obsaženou kyselinou je ve všech třech případech kyselina linolová. U Ilyasoğlu [35] je to 54,05 % a u Grajzer *et al.* [49] 51,7 %. Druhou nejzastoupenější kyselinou je v mém případě, a i v případě Grajzer *et al.* [49], kyselina linolenová. Jeho olej obsahoval 21,5 % kyseliny linolenové a 16,3 % kyseliny olejové. Ilyasoğlu [35] detekoval ve svém oleji 19,37 % kyseliny linolenové a 19,50 % kyseliny olejové, což je jen o trochu více. Tyto rozdíly budou pravděpodobně způsobeny tím, že šípky, ze kterých byl olej získán, pochází z různých oblastí. Obsah mastných kyselin závisí na podmínkách, ve kterých daný šípek vyrostl.

5.1.6 Obsah minerálních látek

Šípek je bohatý i na různé minerální látky. V této práci byl stanoven obsah pouze některých (Ca, K, Mg, Na, P, Cu, Fe, Mn, Zn), výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 12.

Tabulka 12: Obsah minerálních látek v šípkových zrníčkách a dužině se slupkou

	zrníčka	dužina+slupka
vápník [mg/100 g suchého plodu šípku]	337,3±14,8	674,8±27,7
draslík [mg/100 g suchého plodu šípku]	393,3±8,8	1414,1±10,9
hořčík [mg/100 g suchého plodu šípku]	137,8±2,0	276,2±34,8
sodík [mg/100 g suchého plodu šípku]	11,1±2,7	19,0±0,3
fosfor [mg/100 g suchého plodu šípku]	198,6±13,2	150,2±39,3
měď [mg/100 g suchého plodu šípku]	0,6±0,1	0,3±0,1
železo [mg/100 g suchého plodu šípku]	1,6±0,1	0,3±0,0
mangan [mg/100 g suchého plodu šípku]	1,3±0,1	2,1±0,2
zinek [mg/100 g suchého plodu šípku]	0,4±0,1	0,2±0,00

Celkový obsah minerálů je v dužině se slupkou vyšší než v zrníčkách. Ale koncentrace některých prvků je vyšší v zrníčkách než ve zbytku šípku. Konkrétně se jedná o fosfor, měď, železo a zinek. Nejvíce zastoupeným prvkem je v obou případech draslík. V zrníčkách ho je přítomno 137,8 mg/100 g a v dužině se slupkou 1414,1 mg/100 g. Popović-Djordjević *et al.* [50] a Kazaz *et al.* [51] ve svých pracích uvádí, že nejvíce zastoupeným prvkem v dužině se slupkou je draslík a potom vápník, ale v zrníčkách je to vápník a za ním draslík. Co se týče obsahu mikroprvků, tak tam už se zastoupení mezi jednotlivými částmi šípku liší. Zatímco v zrníčkách je nejvíce obsaženo železo (1,6 mg/100 g), v dužině se slupkou je to mangan (2,1 mg/100 g). V zrníčkách je potom mangan s koncentrací 1,3 mg/100 g na druhém místě. V dužině se slupkou je druhým nejvíce zastoupeným mikroprvkem železo (0,3 mg/100 g). To se opět liší s tím, co zjistili Popović-Djordjević *et al.* [50] a Kazaz *et al.* [51]. Podle nich je v zrníčkách i v dužině se slupkou nejvíce zastoupeným mikroprvkem mangan. Kazaz *et al.* [51] potom určil železo jako druhé nejzastoupenější. Popović-Djordjević *et al.* [50] taktéž stanovil koncentraci železa v zrníčkách jako druhou největší. V dužině se slupkou byl ale vyšší obsah boru, který v této práci nebyl stanoven a železo je až po něm. Výsledky od Popović-Djordjević *et al.* [50] a Kazaz *et al.* [51] jsou pro porovnání uvedeny v tabulce č. 13.

Tabulka 13: Výsledky z prací od Popović-Djordjević *et al.* [50] a Kazaz *et al.* [51]

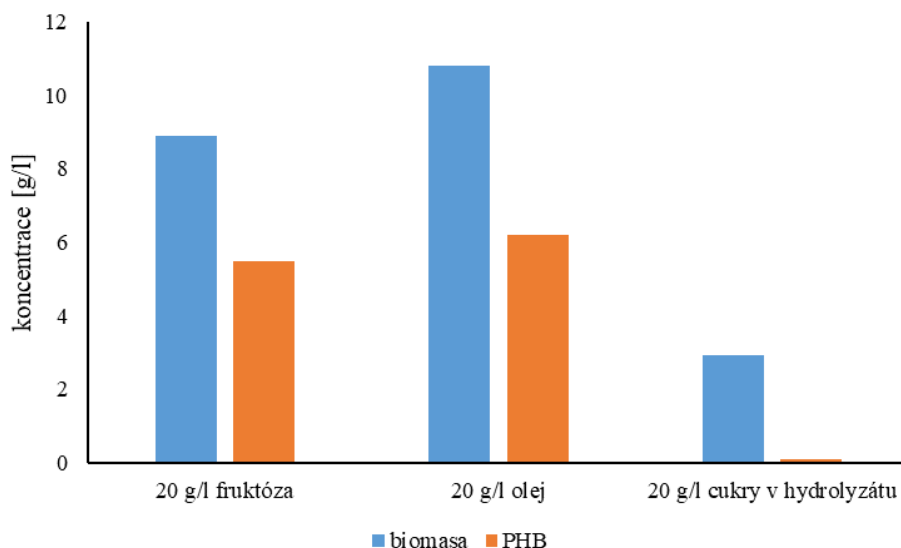
	Popović-Djordjević <i>et al.</i> [50]		Kazaz <i>et al.</i> [51]	
	zrníčka	dužina+slupka	zrníčka	dužina+slupka
vápník [mg/100 g]	356,70±56,40	504,20±165,50	380,00±10,05	630,10±12,33
draslík [mg/100 g]	249,40±39,30	895,30±211,80	323,10±7,34	914,00±14,36
hořčík [mg/100 g]	84,80±12,70	167,00±65,50	96,50±2,35	165,20±5,35
sodík [mg/100 g]	-	-	9,80±0,31	14,90±0,53
fosfor [mg/100 g]	117,80±18,60	87,20±36,10	128,20±3,90	101,00±2,82
měď [mg/100 g]	0,42±0,02	0,16±0,10	0,60±0,02	0,40±0,01
železo [mg/100 g]	1,59±0,26	0,39±0,18	1,50±0,02	2,70±0,09
mangan [mg/100 g]	1,78±0,64	2,55±0,79	1,90±0,05	3,20±0,01
zinek [mg/100 g]	0,35±0,49	0,11±0,08	1,40±0,03	1,00±0,03

5.2 Kultivace na odpadních uhlíkových zdrojích ze šípku

V první sérii kultivací byl jako zdroj uhlíku použit olej, hydrolyzát a pro porovnání fruktóza, která se používá standardně pro kultivaci bakterie *Cupriavidus necator* H16. Kultivace probíhaly ve 250ml Erlenmeyerových baňkách po dobu 72 hodin. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 14 a grafické znázornění je zobrazeno na obrázku č. 12. Nejvíce biomasy a PHB bylo vyprodukováno z oleje. Konkrétně bylo z oleje získáno 6,20 g/l produktu. Olej se tedy v tomto případě ukázal být nejvhodnějším substrátem pro produkci PHB. Naopak nejnižší výtěžky (0,12 g/l PHB) byly získány z hydrolyzáta, a to až několikanásobně nižší v porovnání s fruktózou a olejem. Je zajímavé, že z oleje bylo vyprodukováno i malé množství hydroxyvalerátu.

Tabulka 14: Výsledky kultivací na odpadních šípkových vzorcích

uhlíkový zdroj	biomasa [g/l]	PHB [%]	PHB [g/l]	HV [g/l]	PHBV [g/l]
20 g/l fruktóza	8,90±0,37	61,58±2,3	5,48±0,07	-	-
20 g/l olej	10,82±0,44	57,3±9,94	6,20±0,82	0,03±0,01	6,23±0,82
20 g/l cukry v hydrolyzátu	2,92±0,40	3,96±1,19	0,12±0,05	-	-

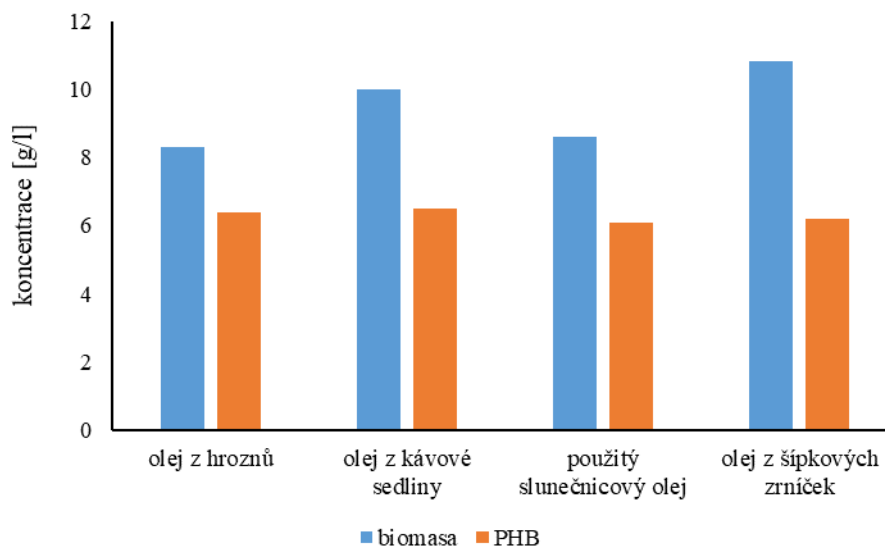


Obrázek 12: Grafické znázornění výsledků kultivací na odpadních šípkových produktech

V tabulce č. 15 jsou pro porovnání olejů jako uhlíkových zdrojů uvedeny výsledky kultivace na šípkovém oleji a výsledky kultivací od Kovalčík *et al.* [52], kde byl jako zdroj uhlíku použit olej z hroznových zrníček, olej z kávové sedliny a slunečnicový olej po smažení. Na obrázku č. 13 je zobrazeno grafické znázornění tohoto porovnání. Kultivace od Kovalčík *et al.* [52] probíhaly za stejných podmínek jako kultivace v této práci. Když tedy porovnáme tyto výsledky, zjistíme, že co se množství vyprodukovaného PHB týče, jsou na tom všechny oleje velmi podobně. Koncentrace získaného produktu se ve všech případech pohybuje v rozmezí 6,1–6,4 g/l. Dá se tedy říct, že olej z šípkových zrníček se jako substrát od ostatních olejů příliš neliší a je tedy vhodným zdrojem uhlíku pro produkci PHB.

Tabulka 15: Porovnání olejů jako uhlíkových zdrojů

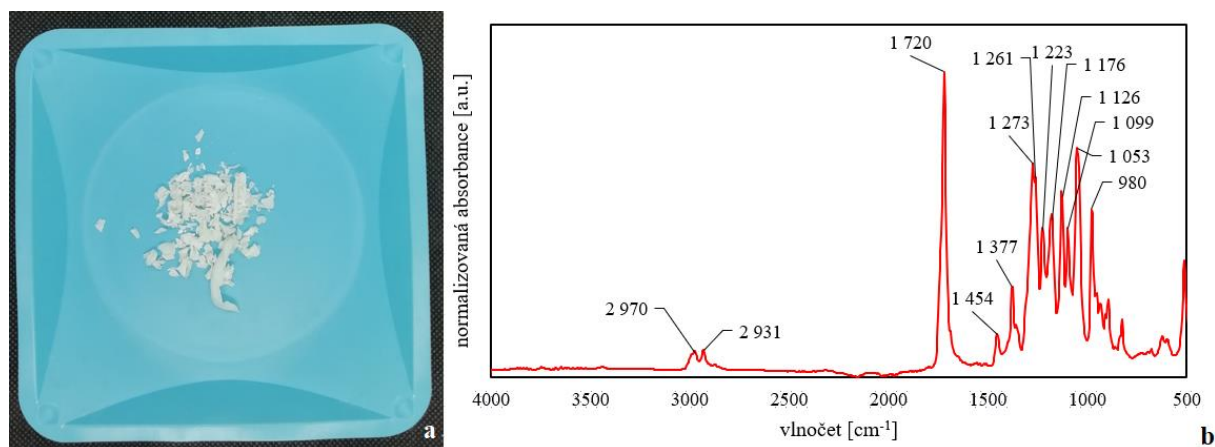
	biomasa [g/l]	PHB [%]	PHB [g/l]
olej z hroznových zrníček	8,3±0,1	76,8±5,8	6,4±1,9
olej z kávové sedliny	10,0±0,4	65,3±1,0	6,5±0,7
slunečnicový olej po smažení	8,6±0,2	70,4±2,4	6,1±0,1
olej z šípkových zrníček	10,8±0,4	57,3±0,0	6,2±0,8



Obrázek 13: Grafické znázornění výsledků kultivací na různých olejích jako zdrojích uhlíku

5.3 Chemická analýza PHB získaného z kultivace na oleji

Získaný produkt byl podroben analýze pomocí FTIR. Tato analýza potvrdila, že se opravdu jedná o PHB. Na obrázku č. 14 je zobrazena fotografie vyprodukovaného PHB a grafické znázornění FTIR spektroskopie. Charakteristické píky byly porovnány s literaturou [53].



Obrázek 14: a – získané PHB, b – grafické znázornění FTIR spektrometrie pro PHB

Veškeré charakteristické píky a k nim náležející vazby jsou uvedeny v tabulce č. 16. Nejvíce intenzivní je absorpční pás lokalizovaný okolo 1720 cm^{-1} , ten odpovídá symetrické vibraci vazeb C=O v alifatických esterech. Poměrně dost intenzivní je také pás nacházející se v oblasti kolem 1053 cm^{-1} , této oblasti se přiřazuje vibrace vazeb O-C-C nasycených alifatických esterů. O trochu méně intenzivní pás v oblasti 1273 cm^{-1} se připisuje symetrické vibraci C-O vazeb alifatických esterů.

Tabulka 16: Hodnoty vlnočtů a jejich odpovídající vazby

vlnočet [cm ⁻¹]	odpovídající vazba
2970	symetrická C-H vazba methylových skupin
2931	asymetrická C-H vazba methylových skupin
1720	symetrická C=O vazba alifatických esterů (krystalická forma PHB)
1454	asymetrická C-H vazba methylových a methylenových skupin
1377	symetrická C-H vazba methylových skupin (deštníkový efekt -CH ₃ skupin)
1273	symetrická C-O skupina alifatických esterů (krystalická forma PHB)
1261	symetrická C-O skupina alifatických esterů
1223	symetrická C-O skupina alifatických esterů (krystalická forma PHB)
1176	asymetrická C-O-C skupina alifatických esterů (amorfní forma PHB)
1126	symetrická C-O-C skupina alifatických esterů
1099	asymetrická O-C-C skupina nasycených alifatických esterů
1053	O-C-C vazby nasycených alifatických esterů
980	C-C vazby tvořící základní řetězec (krystalická forma PHB)

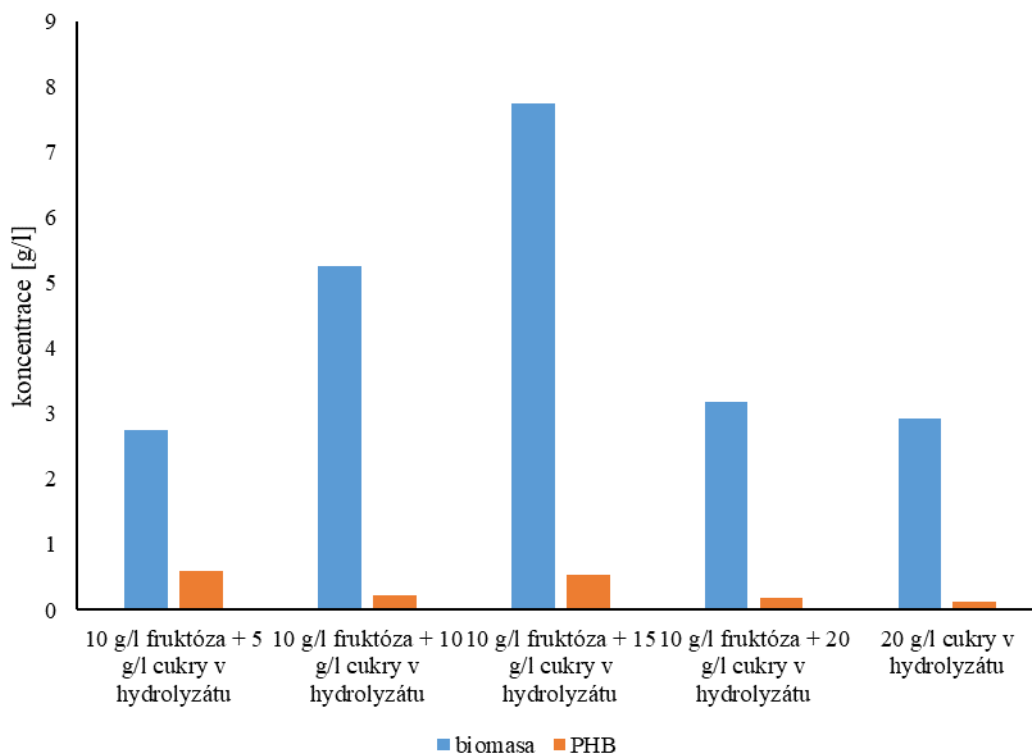
Absorpční pásy lokalizované kolem hodnot vlnočtu 1720, 1273, 1223 a 980 cm⁻¹ se přiřazují krystalické formě PHB. Absorpční pásy nacházející se při hodnotách 1184 a 1126 cm⁻¹ se naopak přiřazují PHB, které se nachází ve formě amorfní. Z poměru I_{C-O}/I_{-CH₂} (poměr intenzity při vlnočtu 1226 cm⁻¹ a 1454 cm⁻¹), lze vypočítat index krystalinity, jehož hodnota je v tomto případě 3,36. PHB, které analyzovala Kovalčík *et al.* [53], mělo index krystalinity 3,87. Tyto dvě hodnoty se příliš neliší.

5.4 Kultivace na fruktóze v různém poměru s enzymatickým hydrolyzátem

Kvůli nízkým výtěžkům z hydrolyzátu byla v další sérii kultivací použita jako uhlíkový zdroj fruktóza v různém poměru s enzymatickým hydrolyzátem. Kultivace probíhaly za stejných podmínek jako kultivace v první sérii. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 17 a grafické znázornění je na obrázku č. 15. Nejvíce PHB bylo vyprodukováno z média obsahující 10 g/l fruktózy a 5 g/l cukrů z hydrolyzátu. Konkrétně bylo z tohoto média získáno 0,60 g/l PHB. I když je to v této sérii nejúspěšnější experiment, i tak je množství získaného produktu velmi malé. Můžeme také vidět, že v tomto médiu vyrostlo nejméně biomasy. Naopak nejvíce biomasy bylo vyprodukováno v médiu s 10 g/l fruktózy a 15 g/l cukrů z hydrolyzátu. Zároveň byl tento experiment z hlediska výtěžnosti produktu druhý nejúspěšnější, z tohoto média bylo získáno 0,54 g/l PHB. Když tyto výsledky porovnáme s kultivací, kde byl jako zdroj uhlíku použit pouze enzymatický hydrolyzát, zjistíme, že z hlediska výtěžnosti produktu i biomasy, je na tom samotný hydrolyzát nejhůře. I když je na tom kombinace hydrolyzátu s fruktózou o něco lépe než samotný hydrolyzát, získané výtěžky jsou i tak příliš nízké.

Tabulka 17: Výsledky kultivací na fruktóze v různém poměru s enzymatickým hydrolyzátem

uhlíkový zdroj	biomasa [g/l]	PHB [%]	PHB [g/l]
10 g/l fruktóza + 5 g/l cukry v hydrolyzátu	2,75±0,30	21,48±8,6	0,60±0,30
10 g/l fruktóza + 10 g/l cukry v hydrolyzátu	5,26±0,23	4,21±0,82	0,22±0,03
10 g/l fruktóza + 15 g/l cukry v hydrolyzátu	7,74±0,58	6,58±0,00	0,54±0,00
10 g/l fruktóza + 20 g/l cukry v hydrolyzátu	3,18±0,01	5,49±0,22	0,17±0,01
20 g/l cukry v hydrolyzátu	2,92±0,40	3,96±1,19	0,12±0,05



Obrázek 15: Grafické znázornění výsledků kultivací na fruktóze v různém poměru s enzymatickým hydrolyzátem

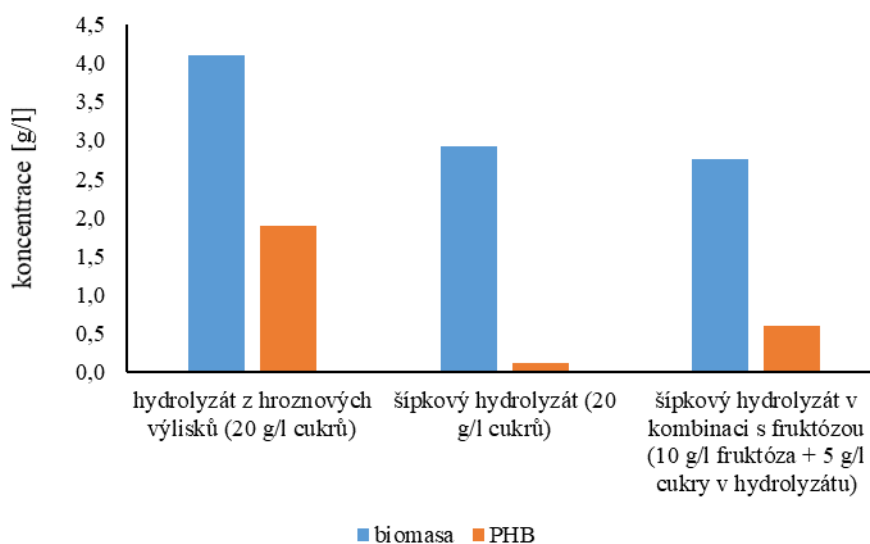
Na obrázku č. 15 můžeme vidět, že koncentrace biomasy nejprve roste až do koncentrace 15 g/l cukrů v hydrolyzátu a poté klesá. Je možné, že od vyšší koncentrace má enzymatický hydrolyzáat vůči *Cupriavidus necator* inhibiční účinky. Na to by ale byly potřeba provést další analýzy. Ačkoliv šípkový hydrolyzáat není vhodným substrátem pro *Cupriavidus necator* H16, mohl by být dobrým substrátem pro jiné bakterie produkující PHA, například bakterie rodu *Halomonas*. Také je možné, že nebylo dosaženo přesné homogenity hydrolyzátu, protože když se podíváme do grafu na množství vyprodukovaného PHB, vidíme, že koncentrace PHB s rostoucí koncentrací hydrolyzátu neroste ani neklesá, ale je různá. Pravděpodobně tedy při koncentraci 10 g/l cukrů v hydrolyzátu, bylo v médiu ve skutečnosti o něco menší koncentrace redukujících cukrů, než bylo míněno a bakterie tedy začaly spotřebovávat PHB jako uhlíkový zdroj.

V tabulce č. 18 je uvedeno porovnání výsledků mých kultivací na samotném šípkovém hydrolyzátu a na nejúspěšnější kombinaci hydrolyzátu s fruktózou s kultivacemi od Kovalčík *et al.* [52], kde byl jako zdroj uhlíku využit enzymatický hydrolyzáat z hroznových výlisků. Kultivace provedené Kovalčík *et al.* [52] proběhly opět za stejných podmínek jako kultivace v této práci. Grafické znázornění tohoto porovnání je zobrazeno na obrázku č. 16. Kovalčík *et al.* [52] ve své práci použila takové dávkování hydrolyzátu, aby médium obsahovalo 20 g/l celkových cukrů. Z tabulky i z grafu můžeme vidět, že z média obsahující šípkový hydrolyzáat bylo získáno několikanásobně méně produktu než z média s hydrolyzátem z hroznových výlisků, a to i v případě kdy byl jako substrát použit hydrolyzáat v kombinaci s fruktózou. Když ale porovnáme množství biomasy, zjistíme, že v médiu s šípkovým hydrolyzátem vyrostlo sice biomasy méně než v médiu s hydrolyzátem z hroznových výlisků, ale ne o tolik. To znamená,

že šípkový hydrolyzát není špatným substrátem pro růst bakterie *Cupriavidus necator* H16. Je možné, že šípkový hydrolyzát obsahuje živiny, které podporují růst bakterie, ale nevytvářejí dostatečný stres pro tvorbu a akumulaci PHB. To by se dalo zjistit dalšími analýzami. Následnými optimalizacemi by se potom mohlo produkční médium upravit tak, aby pro bakterie vytvářelo dostatečně stresující prostředí a my bychom získali vyšší výtěžky námi žádaného produktu.

Tabulka 18: Porovnání hydrolyzátů jako uhlíkových zdrojů

uhlíkový zdroj	biomasa [g/l]	PHB [%]	PHB [g/l]
hydrolyzát z hroznových výlisků (20 g/l cukrů)	4,10±0,00	47,20±2,10	1,90±1,50
šípkový hydrolyzát (20 g/l cukrů)	2,92±0,40	3,96±1,19	0,118±0,051
šípkový hydrolyzát v kombinaci s fruktózou (10 g/l fruktóza + 5 g/l cukry v hydrolyzátu)	2,75±0,30	21,48±8,67	0,603±0,302



Obrázek 16: Grafické znázornění porovnání hydrolyzátů jako uhlíkových zdrojů

6 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce byla produkce PHB z odpadních produktů růže šípkové po výrobě likérů a nahrazení drahých uhlíkových zdrojů levnějšími variantami. V rámci této práce byla také provedena charakteristika těchto uhlíkových zdrojů (olej a enzymatický hydrolyzát), likéru, ze kterého byly získány šípkové odpady a samotného šípku.

Likér, ze kterého byly získány šípkové odpady, byl získán macerací plodů šípku ve 40% vodce. Po scezení likéru byly tuhé části odděleny na dužinu a zrníčka. Z dužiny byl enzymatickou hydrolýzou vyroben hydrolyzát a ze zrníček byl vyextrahován olej. Protože byl hydrolyzát používán jako uhlíkový zdroj, byl v něm stanoven obsah redukujících cukrů. Obsah cukru byl stanoven i v likéru, do kterého byl ale při výrobě přidán med. V obou produktech byl zjištěn obsah fruktózy a glukózy. Likér obsahoval cukru více (89,0 g/l) než hydrolyzát (20 g/l). Dále byl ve všech produktech stanoven obsah celkových polyfenolů a flavonoidů. Nejvíce bohatý na tyto látky byl likér (12,36 g GAE/l polyfenolů a 4,57 g CAE/l flavonoidů). Jako druhý byl hydrolyzát (6,05 g GAE/l polyfenolů a 1,55 g CAE/l flavonoidů) a nakonec olej (2,04 g GAE/l polyfenolů a 1,56 g CAE/l flavonoidů). S obsahem těchto látek souvisí antioxidační aktivita. Ačkoli měl likér nejvyšší obsah polyfenolů, jeho antioxidační aktivita byla nejnižší (1,25 mmol TE/l). Nejvyšší antioxidační aktivitu vykazoval hydrolyzát (2,03 g TE/l). Antioxidační aktivita oleje byla stanovena na 1,93 mmol TE/l. Antioxidační aktivita ale není daná pouze obsahem polyfenolů, ale také karotenoidů, kyselinou askorbovou a některých enzymů. Obsah těchto látek nebyl v této práci stanoven, takže je možné, že hydrolyzát a olej obsahovali těchto látek více než likér. Obsah karotenoidů a jiných barviv stanoven byl, ale pouze v oleji. Analýzou bylo zjištěno, že olej obsahoval 4,47 mg/g oleje celkových karotenoidů. Nejvíce obsaženým barvivem byl betakaroten, jehož koncentrace činila 1,71 mg/g oleje. Součástí analýzy oleje bylo i stanovení obsahu mastných kyselin. Celkový obsah mastných kyselin byl stanoven na 8518 mg/l oleje. Nejvíce zastoupené byly polynenasycené mastné kyseliny (78,43 %), poté mononenasycené mastné kyseliny (17,30 %) a nejméně se v oleji nacházelo nasycených mastných kyselin (4,26 %). Hlavními zástupci mastných kyselin v šípkovém oleji byly kyselina linolová (48,70 %), alfa-linolenová (29,73 %) a olejová (16,29 %). Dále byla provedena analýza na přítomnost minerálních látek. Tato analýza byla z důvodu vysoké náročnosti přípravy vzorků provedena pouze na samotném šípku. Byly analyzovány zvláště dužina se slupkou a zvláště zrníčka. Obsah jednotlivých minerálů se v obou částech šípku lišil. Celkový obsah minerálů byl v dužině se slupkou vyšší než v zrníčkách. Nejvíce zastoupeným prvkem byl v obou případech draslík (1414,1 mg/100 g suchého plodu šípku v dužině se slupkou a 393,3 mg/100 g suchého plodu v zrníčkách). Z mikroprvků byl v dužině se slupkou nejvíce zastoupen mangan (2,1 mg/100 g) a v zrníčkách železo (1,6 mg/100 g). V dužině se slupkou se obecně nacházela vyšší koncentrace makroprvků, konkrétně vápníku, draslíku, hořčíku a sodíku. Avšak fosforu najdeme více v zrníčkách. Naopak zrníčka obsahovala vyšší koncentrace mikroprvků než dužina se slupkou. Jsou to teda měď, železo a zinek. Ale manganu, který se též řadí mezi mikroprvky najdeme více v dužině se slupkou než v zrníčkách.

Jak už bylo řečeno, šípkové produkty byly využity jako uhlíkové zdroje pro produkci PHB pomocí bakterie *Cupriavidus necator*. Tato bakterie byla kultivována v minerálním médiu

s obsahem mikroelementů po dobu 72 hodin a jako uhlíkový zdroj byl použit šípkový olej, enzymatický hydrolyzát z šípku a fruktóza. Fruktóza se ke kultivaci *Cupriavidus necator* používá běžně, posloužila nám tedy jako referenční uhlíkový zdroj. Z média obsahující 20 g/l oleje, bylo získáno 10,82 g/l biomasy a 6,20 g/l PHB. Množství získaného produktu bylo v tomto případě o 11,61 % vyšší než z média s 20 g/l fruktózy (5,48 g/l PHB). Na oleji vyrostlo i více biomasy a to o 17,74 % více než na fruktóze (8,90 g/l biomasy). V tomto médiu se také po ukončení kultivace vyskytovalo 0,03 g/l HV. Naopak z média obsahující 20 g/l cukrů v hydrolyzátu bylo vyprodukováno pouhých 0,12 g/l PHB, což je až o 97,85 % méně než z fruktózy. Celkový obsah biomasy v médiu činil 2,92 g/l, a to je o 67,25 % méně než v médiu s fruktózou. Kvůli nízkým výtěžkům z hydrolyzátu, byla provedena další série kultivací, kde byla uhlíkovým zdrojem fruktóza v různém poměru s enzymatickým hydrolyzátem. Nejvíce PHB bylo v této sérii vyprodukováno v médiu s 10 g/l fruktózou a 5 g/l cukrů v hydrolyzátu. Obsah PHB v médiu činil 0,60 g/l, což je o 89,00 % méně než v médiu s 20 g/l fruktózy. Co se týče biomasy, činil její obsah v médiu po ukončení kultivace 2,75 g/l, to je o 69,10 % méně než v médiu s fruktózou. Z hlediska množství biomasy na tom byla v této sérii nejlépe kombinace 10 g/l fruktózy a 15 g/l cukrů v hydrolyzátu. Za 72 hodin zde vyrostlo 7,74 g/l biomasy, což je o 13,03 % méně, než vyrostlo na samotné fruktóze. Co se ale týče produktu, bylo zde získáno o 90,22 % PHB méně než z fruktózy, což je 0,54 g/l PHB. V této sérii to byl z hlediska množství produktu druhý nejméně úspěšný experiment.

Enzymatický hydrolyzát, jak samotný, tak v kombinaci s fruktózou, se na rozdíl od oleje neukázal být příliš efektivní jako uhlíkový zdroj pro *Cupriavidus necator*. V žádné literatuře nejsou popsány experimenty a jejich výsledky kultivací na enzymatickém hydrolyzátu z šípku nebo šípkovém oleji. Šípkový olej ale vykazuje podobné výsledky jako olej z hroznových zrníček, olej z kávové sedliny nebo slunečnicový olej po smažení. Dá se tedy říct, že šípkový olej je výborným substrátem pro *Cupriavidus necator*. Je ale třeba zvážit jeho dostupnost. Jeho výtěžky jsou poměrně nízké, ze 100 g suchého šípku bylo získáno pouhých 4,05 ml oleje. Také je zde otázka, zda nemá šípkový olej vzhledem k jeho zajímavému složení lepší využití, například v kosmetice nebo jako aktivní doplněk stravy. Hydrolyzát z šípku můžeme porovnat s hydrolyzátem z hroznových výlisků. Oproti hydrolyzátu z hroznových výlisků bylo z hydrolyzátu z šípku vyprodukováno velmi malé množství PHB. Co se ale týče množství biomasy, nebyl mezi hydrolyzáty až tak velký rozdíl jako u PHB. Je několik možností, proč byly z hydrolyzátu získány tak nízké výtěžky. Mohlo to být tím, že hydrolyzát má vůči *Cupriavidus necator* inhibiční účinky, nebo nebylo při jeho dávkování dosaženo homogenity, anebo nevytváří pro tuto bakterii dostatečně stresující prostředí, a tak nedošlo k produkci PHB.

7 ZDROJE

- [1] EL-MALEK, Fady Abd, Aida FARAG, Sanaa OMAR a Heba KHAIRY. Polyhydroxyalkanoates (PHA) from *Halomonas pacifica* ASL10 and *Halomonas salifodiane* ASL11 isolated from Mariout salt lakes. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, **161**, 1318-1328 [cit. 2020-11-01]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.258. ISSN 01418130. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813020340216>
- [2] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Eva SLANINOVA, Ines FRITZ, Christina DAFFERT, Katharina MEIXNER, Zuzana SEDRLOVA a Martin KOLLER. Novel unexpected functions of PHA granules. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2020, **104**(11), 4795-4810 [cit. 2020-11-01]. DOI: 10.1007/s00253-020-10568-1. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-020-10568-1>
- [3] VEGA-CASTRO, Oscar, Emilson LEÓN, Mario ARIAS, et al. Characterization and Production of a Polyhydroxyalkanoate from Cassava Peel Waste: Manufacture of Biopolymer Microfibers by Electrospinning. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. [cit. 2020-11-01]. DOI: 10.1007/s10924-020-01861-1. ISSN 1566-2543. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10924-020-01861-1>
- [4] Cupriavidus necator. In: *Alchetron* [online]. [cit. 2020-11-22]. Dostupné z: <https://alchetron.com/Cupriavidus-necator#cupriavidus-necator-fa6a0b7a-7274-46e9-9d91-206c4fb2b20-resize-750.jpeg>
- [5] MUNEER, Faizan, Ijaz RASUL, Farrukh AZEEM, Muhammad Hussnain SIDDIQUE, Muhammad ZUBAIR a Habibullah NADEEM. Microbial Polyhydroxyalkanoates (PHAs): Efficient Replacement of Synthetic Polymers. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2020, **28**(9), 2301-2323 [cit. 2020-11-01]. DOI: 10.1007/s10924-020-01772-1. ISSN 1566-2543. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10924-020-01772-1>
- [6] KHANNA, Shilpi a Ashok K. SRIVASTAVA. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry* [online]. 2005, **40**(2), 607-619 [cit. 2020-11-01]. DOI: 10.1016/j.procbio.2004.01.053. ISSN 13595113. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959204000949>
- [7] RAZA, Zulfiqar Ali, Sharjeel ABID a Ibrahim M. BANAT. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation* [online]. 2018, **126**, 45-56 [cit. 2020-11-06]. DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.10.001. ISSN 09648305. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830517300276>
- [8] SIROHI, Ranjna, Jai PRAKASH PANDEY, Vivek KUMAR GAUR, Edgard GNANSOUNOU a Raveendran SINDHU. Critical overview of biomass feedstocks as sustainable substrates for the production of polyhydroxybutyrate (PHB). *Bioresource Technology* [online]. 2020, **311** [cit. 2020-11-01]. DOI:

- 10.1016/j.biortech.2020.123536. ISSN 09608524. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852420308087>
- [9] REINECKE, Frank a Alexander STEINB&UUML; CHEL. IRalstonia eutropha/i Strain H16 as Model Organism for PHA Metabolism and for Biotechnological Production of Technically Interesting Biopolymers. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* [online]. 2009, **16**(1-2), 91-108 [cit. 2020-11-06]. DOI: 10.1159/000142897. ISSN 1660-2412. Dostupné také z:
<https://www.karger.com/Article/FullText/142897>
- [10] RIEDEL, Sebastian L., Stefan JAHNS, Steven KOENIG, Martina C.E. BOCK, Christopher J. BRIGHAM, Johannes BADER a Ulf STAHL. Polyhydroxyalkanoates production with Ralstonia eutropha from low quality waste animal fats. *Journal of Biotechnology* [online]. 2015, **214**, 119-127 [cit. 2020-11-06]. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.09.002. ISSN 01681656. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165615301085>
- [11] SUN, Chenhao, Cristina PÉREZ-RIVERO, Colin WEBB a Constantinos THEODOROPOULOS. Dynamic Metabolic Analysis of Cupriavidus necator DSM545 Producing Poly(3-hydroxybutyric acid) from Glycerol. *Processes* [online]. 2020, **8**(6) [cit. 2020-11-02]. DOI: 10.3390/pr8060657. ISSN 2227-9717. Dostupné také z: <https://www.mdpi.com/2227-9717/8/6/657>
- [12] TANG, Ruohao, Caihong WENG, Xiaowei PENG a Yejun HAN. Metabolic engineering of Cupriavidus necator H16 for improved chemoautotrophic growth and PHB production under oxygen-limiting conditions. *Metabolic Engineering* [online]. 2020, **61**, 11-23 [cit. 2020-11-06]. DOI: 10.1016/j.ymben.2020.04.009. ISSN 10967176. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096717620300781>
- [13] ZHANG, Bo, Ross CARLSON a Friedrich SRIENC. Engineering the Monomer Composition of Polyhydroxyalkanoates Synthesized in Saccharomyces cerevisiae. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2006, **72**(1), 536-543 [cit. 2021-02-25]. DOI:10.1128/AEM.72.1.536-543.2006. ISSN 0099-2240. Dostupné také z: <https://AEM.asm.org/content/72/1/536>
- [14] FLORES-SÁNCHEZ, Araceli, Ma. del Rocío LÓPEZ-CUELLAR, Fermín PÉREZ-GUEVARA, Ulises FIGUEROA LÓPEZ, José Mauricio MARTÍN-BUFÁJER a Berenice VERGARA-PORRAS. Synthesis of Poly-(R-hydroxyalkanoates) by Cupriavidus necator ATCC 17699 Using Mexican Avocado (Persea americana) Oil as a Carbon Source. *International Journal of Polymer Science* [online]. 2017, **2017**, 1-10 [cit. 2021-02-25]. DOI:10.1155/2017/6942950. ISSN 1687-9422. Dostupné také z:
<https://www.hindawi.com/journals/ijps/2017/6942950/>
- [15] NARANJO, Javier M., Carlos A. CARDONA a Juan C. HIGUITA. Use of residual banana for polyhydroxybutyrate (PHB) production: Case of study in an integrated biorefinery. *Waste Management* [online]. 2014, **34**(12), 2634-2640 [cit. 2020-11-01].

- DOI: 10.1016/j.wasman.2014.09.007. ISSN 0956053X. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956053X14004292>
- [16] MACRAE, R. M. a J. F. WILKINSON. Poly-*-*hydroxybutyrate Metabolism in Washed Suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. *Journal of General Microbiology* [online]. 1958, **19**(1), 210-222 [cit. 2020-11-06]. DOI: 10.1099/00221287-19-1-210. ISSN 0022-1287. Dostupné také z:
<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-19-1-210>
- [17] DE KONING, G.J.M, P.J LEMSTRA, D.J.T HILL, T.G CARSWELL a J.H O'DONNELL. Ageing phenomena in bacterial poly[(R)-3-hydroxybutyrate]. *Polymer* [online]. 1992, **33**(15), 3295-3297 [cit. 2020-11-06]. DOI: 10.1016/0032-3861(92)90250-Z. ISSN 00323861. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/003238619290250Z>
- [18] REDDY, C.S.K, R GHAI, RASHMI a V.C KALIA. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology* [online]. 2003, **87**(2), 137-146 [cit. 2020-11-07]. DOI: 10.1016/S0960-8524(02)00212-2. ISSN 09608524. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852402002122>
- [19] YADAV, Bhoomika, Aishwarya PANDEY, Lalit R. KUMAR a R.D. TYAGI. Bioconversion of waste (water)/residues to bioplastics- A circular bioeconomy approach. *Bioresource Technology* [online]. 2020, **298** [cit. 2020-12-30]. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.122584. ISSN 09608524. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852419318140>
- [20] SUN, Ye a Jiayang CHENG. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* [online]. 2002, **83**(1), 1-11 [cit. 2021-01-01]. DOI: 10.1016/S0960-8524(01)00212-7. ISSN 09608524. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852401002127>
- [21] ADELEYE, Aderemi T., Chuks Kenneth ODOH, Obieze Christian ENUDI, Oluwakemi Oluwabunmi BANJOKO, Osigbeminiyi Oludare OSIBOYE, Emmanuel TOLUWALOPE ODEDIRAN a Hitler LOUIS. Sustainable synthesis and applications of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from biomass. *Process Biochemistry* [online]. 2020, **96**, 174-193 [cit. 2021-01-02]. DOI: 10.1016/j.procbio.2020.05.032. ISSN 13595113. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511320304955>
- [22] SARATALE, Ganesh D. a Min-Kyu OH. Characterization of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) produced from *Ralstonia eutropha* using an alkali-pretreated biomass feedstock. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2015, **80**, 627-635 [cit. 2021-01-01]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.07.034. ISSN 01418130. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014181301500505X>
- [23] SAKTHISELVAN, Punniavan a Ramasamy MADHUMATHI. Kinetic evaluation on cell growth and biosynthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Bacillus safensis* EBT1 from sugarcane bagasse. *Engineering in Agriculture, Environment and Food* [online].

- 2018, **11**(3), 145-152 [cit. 2021-01-01]. DOI: 10.1016/j.eaef.2018.03.003. ISSN 18818366. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1881836617300186>
- [24] DE SOUZA, Larissa, Manasa Y. a Srividya SHIVAKUMAR. Bioconversion of lignocellulosic substrates for the production of polyhydroxyalkanoates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* [online]. 2020, **28** [cit. 2021-01-01]. DOI: 10.1016/j.bcab.2020.101754. ISSN 18788181. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S187881812031015X>
- [25] ZAPLETAL, M. a J. TREJBAL. Izolace polyhydroxyalkanoátů z mikrobiální biomasy. *Chemické listy*. 2016, 110(12), 860-867.
- [26] VAN THUOC, Doan, Dam Ngoc MY, Tran Thi LOAN a Kumar SUDESH. Utilization of waste fish oil and glycerol as carbon sources for polyhydroxyalkanoate production by *Salinivibrio* sp. M318. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2019, **141**, 885-892 [cit. 2021-01-02]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.063. ISSN 01418130. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813019347270>
- [27] OBRUCA, Stanislav, Sinisa PETRIK, Pavla BENESOVA, Zdenek SVOBODA, Libor EREMKA a Ivana MAROVA. Utilization of oil extracted from spent coffee grounds for sustainable production of polyhydroxyalkanoates. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2014, **98**(13), 5883-5890 [cit. 2021-01-02]. DOI: 10.1007/s00253-014-5653-3. ISSN 0175-7598. Dostupné také z:
<http://link.springer.com/10.1007/s00253-014-5653-3>
- [28] KAHAR, Prihardi, Takeharu TSUGE, Kazunori TAGUCHI a Yoshiharu DOI. High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2004 **83**(1), 79-86 [cit. 2021-01-02]. DOI: 10.1016/S0141-3910(03)00227-1. ISSN 01413910. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391003002271>
- [29] UGWU, Charles U., Yutaka TOKIWA a Hideki AOYAGI. Utilization of Broken Rice for the Production of Poly(3-hydroxybutyrate). *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2012, **20**(1), 254-257 [cit. 2021-01-02]. DOI: 10.1007/s10924-011-0392-3. ISSN 1566-2543. Dostupné také z:
<http://link.springer.com/10.1007/s10924-011-0392-3>
- [30] GARCÍA-TORREIRO, María, María LÓPEZ-ABELAIRAS, Thelmo A. LU-CHAU a Juan M. LEMA. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by simultaneous saccharification and fermentation of cereal mash using *Halomonas boliviensis*. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2016, **114**, 140-146 [cit. 2021-01-02]. DOI: 10.1016/j.bej.2016.07.002. ISSN 1369703X. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X16301930>
- [31] POOMIPUK, Natthaporn, Alissara REUNGSANG a Pensri PLANGKLANG. Poly- β -hydroxyalkanoates production from cassava starch hydrolysate by *Cupriavidus* sp.

- KKU38. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2014, **65**, 51-64 [cit. 2021-01-02]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.01.002. ISSN 01418130. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813014000038>
- [32] XU, Y., R.-H. WANG, A.A. KOUTINAS a C. WEBB. Microbial biodegradable plastic production from a wheat-based biorefining strategy. *Process Biochemistry* [online]. 2010, **45**(2), 153-163 [cit. 2021-01-02]. DOI: 10.1016/j.procbio.2009.09.001. ISSN 13595113. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511309002797>
- [33] ZHU, Chengjun, Steven CHIU, James P. NAKAS a Christopher T. NOMURA. Bioplastics from waste glycerol derived from biodiesel industry. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2013, **130**(1), 1-13 [cit. 2021-01-08]. DOI: 10.1002/app.39157. ISSN 00218995. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.39157>
- [34] SALGIN, ULur, Sema SALGIN, Derya Dinçyürek EKICI a Gamze ULUDAL. Oil recovery in rosehip seeds from food plant waste products using supercritical CO₂ extraction. *The Journal of Supercritical Fluids* [online]. 2016, **118**, 194-202 [cit. 2020-11-07]. DOI: 10.1016/j.supflu.2016.08.011. ISSN 08968446. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844616302546>
- [35] ILYASOĞLU, Huri. Characterization of Rosehip (*Rosa canina* L.) Seed and Seed Oil. *International Journal of Food Properties* [online]. 2014 **17**(7), 1591-1598 [cit. 2020-11-28]. DOI:10.1080/10942912.2013.777075. ISSN 1094-2912. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10942912.2013.777075>
- [36] GRAJZER, Magdalena, Anna PRESCHA, Katarzyna KORZONEK, Anna WOJAKOWSKA, Mariusz DZIADAS, Anna KULMA a Halina GRAJETA. Characteristics of rose hip (*Rosa canina* L.) cold-pressed oil and its oxidative stability studied by the differential scanning calorimetry method. *Food Chemistry* [online]. 2015, **188**, 459-466 [cit. 2020-11-08]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.05.034. ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814615007657>
- [37] DAŹBROWSKA, Mariola, Ewa MACIEJCZYK a Danuta KALEMBA. Rose Hip Seed Oil: Methods of Extraction and Chemical Composition. *European Journal of Lipid Science and Technology* [online]. 2019, **121**(8) [cit. 2020-11-09]. DOI: 10.1002/ejlt.201800440. ISSN 1438-7697. Dostupné také z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ejlt.201800440>
- [38] ZLATANOV, Magdalen. Lipid composition of Bulgarian chokeberry, black currant and rose hip seed oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 1999, **79**(12), 1620-1624 [cit. 2020-11-28]. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010(199909)79:12<1620::AID-JSFA410>3.0.CO;2-G. ISSN:1097-0010. Dostupné také z: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199909\)79:12<1620::AID-JSFA410>3.0.CO;2-G](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/(SICI)1097-0010(199909)79:12<1620::AID-JSFA410>3.0.CO;2-G)

- [39] COLOMBO, Bianca, Joana PEREIRA, Margarida MARTINS, et al.. Recovering PHA from mixed microbial biomass: Using non-ionic surfactants as a pretreatment step. *Separation and Purification Technology* [online]. 2020, **253** [cit. 2020-11-10]. DOI: 10.1016/j.seppur.2020.117521. ISSN 13835866. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S138358662031995X>
- [40] SAMORÌ, Chiara, Federica ABBONDANZI, Paola GALLETTI, Loris GIORGINI, Laura MAZZOCCHETTI, Cristian TORRI a Emilio TAGLIAVINI. Extraction of polyhydroxyalkanoates from mixed microbial cultures: Impact on polymer quality and recovery. *Bioresource Technology* [online]. 2015, **189**, 195-202 [cit. 2020-11-11]. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.03.062. ISSN 09608524. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852415003946>
- [41] PÉREZ-RIVERO, Cristina, J. Pablo LÓPEZ-GÓMEZ a Ipsita ROY. A sustainable approach for the downstream processing of bacterial polyhydroxyalkanoates: State-of-the-art and latest developments. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2019, **150** [cit. 2020-11-29]. DOI: 10.1016/j.bej.2019.107283. ISSN 1369703X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X19302177>
- [42] HEJAZI, P., E. VASHEGHANI-FARAHANI a Y. YAMINI. Supercritical Fluid Disruption of *Ralstonia eutropha* for Poly(β -hydroxybutyrate) Recovery. *Biotechnology Progress* [online]. 2003, **19**(5), 1519-1523 [cit. 2020-11-29]. DOI:10.1021/bp034010q. ISSN 8756-7938. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1021/bp034010q>
- [43] MARTONO, Y, F F YANUARSIH, N R AMINU a J MUNINGGAR. Fractionation and determination of phenolic and flavonoid compound from *Moringa oleifera* leaves. *Journal of Physics: Conference Series* [online]. 2019, **1307** [cit. 2021-02-24]. DOI:10.1088/1742-6596/1307/1/012014. ISSN 1742-6588. Dostupné také z: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/1307/1/012014>
- [44] MÁROVÁ, Ivana a Dana VRÁNOVÁ. *Praktikum z biochemie: Pracovní sešit* [online]. Brno: Ústav chemie potravin a biotechnologií FCH VUT v Brně, 2016 [cit. 2021-02-21]. Dostupné z: https://moodle.vutbr.cz/pluginfile.php/252878/mod_resource/content/1/Pracovní%20sesit%20-%20praktikum%20z%20biochemie%20aktualizované%20návody.pdf
- [45] CHANG, C.-C., M.-H. YANG, H.-M. WEN a J.-C. CHERN. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* [online]. 2002, **10**(3) [cit. 2021-02-22]. DOI:10.38212/2224-6614.2748. ISSN 2224-6614. Dostupné také z: <https://www.jfda-online.com/journal/vol10/iss3/3>
- [46] NOVACKOVA, Ivana, Dan KUCERA, Jaromir PORIZKA, Iva PERNICOVA, Petr SEDLACEK, Martin KOLLER, Adriana KOVALCIK a Stanislav OBRUCA. Adaptation of *Cupriavidus necator* to levulinic acid for enhanced production of P(3HB-co-3HV) copolyesters. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2019,

- 151** [cit. 2021-04-11]. DOI:10.1016/j.bej.2019.107350. ISSN 1369703X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X19302876>
- [47] SZENTMIHÁLYI, Klára, Péter VINKLER, Béla LAKATOS, Vendel ILLÉS a Mária THEN. Rose hip (*Rosa canina* L.) oil obtained from waste hip seeds by different extraction methods. *Bioresource Technology* [online]. 82(2), 195-201 [cit. 2021-4-28]. 2002, DOI:10.1016/S0960-8524(01)00161-4. ISSN 09608524. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852401001614>
- [48] CUNJA, Vlasta, Maja MIKULIC-PETKOVSEK, Anka ZUPAN, Franci STAMPAR a Valentina SCHMITZER. Frost decreases content of sugars, ascorbic acid and some quercetin glycosides but stimulates selected carotenes in *Rosa canina* hips. *Journal of Plant Physiology* [online]. 2015, 178, 55-63 [cit. 2021-4-28]. DOI:10.1016/j.jplph.2015.01.014. ISSN 01761617. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0176161715000310>
- [49] GRAJZER, Magdalena, Karolina SZMALCEL, Łukasz KUŹMIŃSKI, Mateusz WITKOWSKI, Anna KULMA a Anna PRESCHA. Characteristics and Antioxidant Potential of Cold-Pressed Oils—Possible Strategies to Improve Oil Stability. *Foods* [online]. 9(11) [cit. 2021-4-28]. 2020, DOI:10.3390/foods9111630. ISSN 2304-8158. Dostupné také z: <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/11/1630>
- [50] POPOVIĆ-DJORDJEVIĆ, Jelena, Dragana PAUNOVIĆ, Aleksandra MILIĆ, Đurđa KRSTIĆ, Sina SIAVASH MOGHADDAM a Vibor ROJE. Multi-elemental Analysis, Pattern Recognition Techniques of Wild and Cultivated Rosehips from Serbia, and Nutritional Aspect. *Biological Trace Element Research* [online]. 2021, **199**(3), 1110-1122 [cit. 2021-4-29]. DOI:10.1007/s12011-020-02199-4. ISSN 0163-4984. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s12011-020-02199-4>
- [51] KAZAZ, S., H. BAYDAR a S. ERBAS. Variations in chemical compositions of *Rosa damascena* Mill. and *Rosa canina* L. fruits. *Czech Journal of Food Sciences* [online]. 27(3), 178-184 [cit. 2021-4-29]. 2009, DOI:10.17221/5/2009-CJFS. ISSN 12121800. Dostupné také z: https://www.agriculturejournals.cz/web/cjfs.htm?type=article&id=5_2009-CJFS
- [52] KOVALCIK, Adriana, Iva PERNICOVA, Stanislav OBRUCA, Martin SZOTKOWSKI, Vojtech ENEV, Michal KALINA a Ivana MAROVA. Grape winery waste as a promising feedstock for the production of polyhydroxyalkanoates and other value-added products. *Food and Bioprocess Processing* [online]. 2020, **124**, 1-10 [cit. 2021-04-18]. DOI:10.1016/j.fbp.2020.08.003. ISSN 09603085. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960308520304880>
- [53] KOVALCIK, Adriana, Stanislav OBRUCA, Michal KALINA, Michal MACHOVSKY, Vojtech ENEV, Michaela JAKESOVA, Marketa SOBKOVA a Ivana MAROVA. Enzymatic Hydrolysis of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) Scaffolds. *Materials* [online]. 2020, 13(13) [cit. 2021-7-14]. DOI:10.3390/ma13132992. ISSN 1996-1944. Dostupné také z: <https://www.mdpi.com/1996-1944/13/13/2992>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

PHA	polyhydroxyalkanoát(y)
PHB	poly-3-hydroxybutyrát
P3HB	poly-3-hydroxybutyrát
HV	hydroxyvalerát
PHBV	poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát)
scl-PHA	short-chain length PHA (PHA s krátkým řetězcem)
mcl-PHA	medium-chain length PHA (PHA se středně dlouhým řetězcem)
lcl-PHA	long-chain length PHA (PHA s dlouhým řetězcem)
NPCM	non-PHA cell material
DNS	3,5-dinitrosalicylová kyselina
SDS	dodecylsírán sodný
CTAB	cetrimoniumbromid
NB	Nutrient Broth
SFA	saturated fatty acids (nasycené mastné kyseliny)
MUFA	monosaturated fatty acids (mononenasycené mastné kyseliny)
PUFA	polysaturated fatty acids (polynenasycené mastné kyseliny)