



# 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

# VYUŽITÍ MOUČNÝCH ČERVŮ (TENEBRIO MOLITOR) K ISOLACI POLYHYDROXYALKANOÁTŮ Z BAKTERIÁLNÍCH BIOMAS A SOUČASNÉ PRODUKCI POTRAVIN

USE OF MEALWORM (TENEBRIO MOLITOR) FOR ISOLATION OF POLYHYDROXYALKANOATES FROM  
BACTERIAL BIOMASS AND SIMULTANEOUS PRODUCTION OF FOOD

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Johana Najbrtová

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2022

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1746/2021 Akademický rok: 2021/22  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Johana Najbrtová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a technologie  
Vedoucí práce: **prof. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Využití moučných červů (*Tenebrio molitor*) k izolaci polyhydroxyalkanoátů z bakteriálních biomas a současné produkci potravin

### Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Kultivace vybraných kultur producentů PHA
3. Lyofilizace získané bakteriální biomasy
4. Studium možností využití bakteriální biomasy s obsahem PHA jako krmiva pro moučné červy
5. Charakterizace získaných PHA granulí v kontextu jejich materiálových vlastností
6. Charakterizace moučných červů krměných bakteriální biomasou s ohledem na jejich využití v potravinářství a krmivářství

### Termín odevzdání bakalářské práce: 27.5.2022:

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

-----  
Johana Najbrtová  
studentka

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

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

-----  
prof. Ing. Michal Veselý, CSc.  
děkan

## ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá využitím moučného červa (*Tenebrio molitor*) k izolaci polyhydroxyalkanoátů z bakteriálních biomas a současné produkci potravin. Bakterie *Cupravidus necator* H16 a *Schlegelella thermodepolymerans* byly použity k přípravě polyhydroxyalkanoáty (PHA) obsahující bakteriální biomasy. V rámci práce byla zjišťována schopnost moučných červů izolovat PHA z bakteriální biomasy různých typů. Nejprve byl zjištěn obsah PHA a hrubých bílkovin v jednotlivých typech biomasy. Následně byly provedeny dva pokusy biologické izolace, v obou případech byly výsledky porovnány s kontrolním vzorkem, který konzumoval otruby. Sledována byla konverze krmiva do formy fekálních pelet, kde nejlepší výsledky měl vzorek moučných červů krmených sušenou biomasou *C. necator* H16. Dále byl hodnocen úbytek hmotnosti za dobu pokusu, procento přeživších, množství nezkonsumovaného krmiva a počet zakuklených jedinců. Fekální pelety získané biologickou izolací měly nízký obsah PHA, a proto byly podrobeny přečištění. Činidlo s nejlepšími výsledky bylo 0,1 M NaOH. Další částí této práce bylo určit obsah hrubých bílkovin v červí moučce vyrobené z moučných červů z pokusu dvě. Nejvyšší zastoupení bílkovin měl vzorek krmený biomasou vyprodukovanou bakterií *Schlegelella thermodepolymerans*.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Polyhydroxyalkanoáty, moučný červ (*Tenebrio molitor*), biologická izolace, fekální pelety, bakteriální biomasa, *Cupravidus necator* H16, *Schlegelella thermodepolymerans*

## ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the use of mealworms (*Tenebrio molitor*) to isolate polyhydroxyalkanoates from bacterial biomass and current food production. *Cupravidus necator* H16 and *Schlegelella thermodepolymerans* were used to prepare bacterial biomass containing polyhydroxyalkanoates (PHA). The ability of mealworms to isolate PHA from bacterial biomass of various types was determined. First, the content of PHA and crude proteins in individual types of biomasses was determined. Subsequently, two biological isolation experiments were performed, in both cases the results were compared with a control sample that consumed bran. The conversion of feed into the form of fecal pellets was monitored, where the best results were obtained from a sample of mealworms fed with dried biomass *C. necator* H16. Furthermore, the weight loss during the experiment, the percentage of survivors, the amount of feed not consumed, and the number of pupae were evaluated. The fecal pellets obtained by biological isolation had a low PHA content and were therefore subjected to purification. The reagent with the best results was 0,1 M NaOH. Another part of this work was to determine the crude protein content of mealworm flour made from mealworms from experiment two. The sample fed with biomass produced by *Schlegelella thermodepolymerans* had the highest protein content.

## KEYWORDS

Polyhydroxyalkanoates, mealworm (*Tenebrio molitor*), biological isolation, fecal pellets, bacterial biomass, *Cupravidus necator* H16, *Schlegelella thermodepolymerans*

NAJBRTOVÁ, Johana. *Využití moučných červů (Tenebrio molitor) k izolaci polyhydroxyalkanoátů z bakteriálních biomas a současné produkci potravin* [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-05-26]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/138825>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Stanislav Obruča.

## PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce panu prof. Ing. Stanislavovi Obručovi Ph.D. za odborné vedení a věnovaný čas. Také bych ráda poděkovala své konzultantce Ing. Xenii Kouřilové za pomoc při zpracování praktické i teoretické části bakalářské práce. Poděkování patří také panu Ing. Petru Sedláčkovi Ph.D. za změření FTIR spekter. Velký dík náleží také mé rodině a přátelům za podporu po dobu mého studia.

## OBSAH

1	ÚVOD .....	9
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1	Polyhydroxyalkanoáty .....	10
2.1.1	Charakterizace .....	10
2.1.2	Vlastnosti.....	10
2.1.3	Syntéza PHA .....	10
2.1.4	Degradace PHA.....	11
2.1.5	Využití PHA .....	11
2.1.6	Substráty pro syntézu PHA .....	12
2.1.7	Metody izolace PHA z bakteriálních buněk.....	12
2.2	Biologická izolace PHA .....	13
2.2.1	Biologická izolace pomocí laboratorních krys.....	14
2.2.2	Biologická izolace moučnými červy .....	15
2.3	Potemník moučný ( <i>Tenebrio molitor</i> ) .....	17
2.3.1	Charakteristika .....	17
2.3.2	Trávicí systém <i>Tenebrio molitor</i> .....	17
2.3.3	Důležité živiny pro <i>Tenebrio molitor</i> .....	18
2.3.4	Degradace plastu pomocí <i>Tenebrio molitor</i> .....	18
2.4	Jedlý hmyz.....	19
2.4.1	Využití moučného červa v potravě.....	20
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	21
3.1.1	Použité chemikálie .....	21
3.1.2	Použité přístroje.....	21
3.1.3	Použité organismy .....	22
3.2	Příprava médií.....	22

3.2.1	Příprava produkčního média .....	22
3.2.2	Příprava inokula .....	24
3.3	Stanovení obsahu PHB v bakteriální biomase.....	24
3.4	Plynová chromatografie s FID detekcí .....	24
3.5	Příprava krmiva pro moučné červy .....	25
3.6	Biologická izolace moučnými červy .....	25
3.6.1	První experiment s moučnými červy.....	25
3.6.2	Přečištění fekálních pelet.....	26
3.6.3	Druhý experiment s moučnými červy .....	26
3.6.4	Obsah vody v červí moučce .....	27
3.7	Izolace PHB.....	27
3.7.1	Stanovení molekulové hmotnosti.....	28
3.8	Pozorování vzorků fekálních pelet stereomikroskopem.....	28
3.9	Kjeldahlova metoda .....	28
3.9.1	Mineralizace vzorku .....	28
3.9.2	Standardizace roztoků .....	28
3.9.3	Stanovení celkového dusíku.....	29
3.10	FTIR analýza krmiv a fekálních pelet.....	29
4	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	30
4.1	Obsah PHB v bakteriální biomase.....	30
4.2	První experiment s moučnými červy .....	30
4.2.1	Přečištění fekálních pelet .....	32
4.3	Druhý experiment s moučnými červy .....	32
4.3.1	Přečištění .....	35
4.4	Obsah hrubých bílkovin.....	35
4.4.1	Obsah hrubých bílkovin v krmivu.....	35

4.4.2	Obsah hrubých bílkovin v červí moučce.....	36
4.5	Obsah vody v moučných červech.....	36
4.6	Mikroskopické pozorování.....	37
4.7	Stanovení molekulové hmotnosti.....	40
4.8	FTIR analýza.....	41
5	ZÁVĚR.....	45
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	47
7	CITACE.....	48



# 1 ÚVOD

Plasty jsou všude kolem nás, využíváme je každý den. Jejich produkce neustále stoupá a s tím souvisí i zvyšující se počet nerozložitelného odpadu. V dnešní době je trendem recyklace těchto odpadů, anebo náhrada jinými rozložitelnými materiály. Jednou z možných náhrad fosilních plastů jsou polyhydroxyalkanoáty (PHA). Jedná se o biopolymery syntetizované různými typy mikroorganismů při stresových podmínkách vyvolaných nedostatkem živin. Tyto polymery mají podobné vlastnosti jako fosilní plasty a již se využívají v řadě průmyslových odvětví. Produkce PHA je však drahá a náročná. Ve snaze o snížení ceny PHA se začalo využívat průmyslových odpadních materiálů k jeho produkci např. použitý fritovací olej. Další z náročných procesů při produkci PHA je izolace materiálu z bakteriálních buněk. U každého druhu izolace PHA jsou určité nedostatky v podobě vysoké ceny, nízkých výtěžků, využití chemikálií škodlivých pro životní prostředí či změny vlastností polymerů. Nejčastěji používané metody izolace využívají rozpouštědel či chemického trávení buněčných materiálů. Poměrně novou metodou je biologická izolace, která využívá trávicího traktu živočichů k izolaci PHA z lyofilizované bakteriální biomasy. Poprvé byla tato metoda vyzkoušena na laboratorních krysách. Z etických důvodů se hledal lepší živočišný model pro biologickou izolaci a bylo vybráno larvální stadium potměníka moučného neboli moučný červ. Mouční červi patří mezi hmyz s nenáročným chovem a s poměrně vysokým využitím díky vysokému obsahu proteinů. Používají se v krmivářském průmyslu a v poslední době se začali začleňovat i do potravinářského průmyslu například jako červí moučka [1, 2].

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Polyhydroxyalkanoáty

#### 2.1.1 Charakterizace

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou biopolymery produkované mnohými mikroorganismy. Slouží mikroorganismům jako zásobárna energie a uhlíku. Začne se hromadit v buňce při stresových podmínkách, které jsou vyvolány tím, že chybí nějaká ze základních živin (např. fosfor, dusík, kyslík) a zároveň má buňka dostatek uhlíku. Složeny jsou z monomerních řetězců 3-hydroxy substituovaných mastných kyselin. Velikost a struktura PHA přímo souvisí s druhem mikroorganismu ve kterém je syntetizován a na dostatku zdrojů pro syntézu PHA. Kvůli rozlišnosti mikroorganismů stále roste počet rozličných monomerních jednotek nyní již více než 150 typů monomerů. Tyto monomery se mohou spojovat do různých kopolymerů, které mají odlišné vlastnosti. PHA se dělí podle délky řetězce monomeru na tři skupiny. S krátkým bočním řetězcem, který obsahují monomery s 3-5 uhlíky, s středně dlouhým bočním řetězcem, které jsou složeny z 6-14 uhlíku a s dlouhým bočním řetězcem s více než 14 uhlíky. V buňce je PHA uloženo ve formě granulí. Na jejich povrchu je uložena řada enzymů jako je PHA syntáza či PHA depolymeráza [3, 4, 5, 6].

#### 2.1.2 Vlastnosti

Délka řetězce monomerů a jejich struktura ovlivňují vlastnosti PHA jako např. teplotu skelného přechodu, teplotu tání, krystalinitu. Pro porovnání, polymery s krátkým bočním řetězcem jsou tužší, křehčí a mají vyšší hodnotu krystalinity, naopak polymery se středně dlouhým bočním řetězcem jsou elastické, flexibilní a s nízkou hodnotou krystalinity. Teplota tání je od 30 °C do 180 °C, proto se řadí mezi termoplasty. K jejich dalším vlastnostem patří odolnost vůči UV záření a nehydrolyzovatelnost v kapalném mediu. Molekulová hmotnost je v rozmezí  $5 \cdot 10^4$ - $2 \cdot 10^7$  Da. Mikrobiální monomery mají vždy konfiguraci *D*, což je důsledkem enzymové stereospecifity při syntéze. Vlastnosti PHA mohou být změněny a to fyzikálními, chemickými nebo biologickými metodami např. smícháním s jinými polymery, použitím anorganických látek či enzymů, tvorbou nových kopolymerů, změnou funkčních skupin či povrchu polymeru. Nejlépe popsane vlastnosti má polymer poly-3-hydroxybutyrátu (PHB). Jedná se o PHA polymer, který je nejčastěji syntetizován bakteriemi. Díky vysoké krystalinitě je špatně zpracovatelný, křehký a tuhý. Jeho struktura je velice podobná polypropylenu [7, 8, 9].

#### 2.1.3 Syntéza PHA

Syntéza PHA je přímo napojena na metabolické dráhy v bakteriální buňce, jako jsou glykolýza,  $\beta$ -oxidace a Krebsův cyklus. Toto propojení je uskutečněno přes acetyl-CoA, který vzniká rozkladem substrátu. Substrát pro syntézu musí obsahovat velké množství uhlíku, např. škrob, celulóza, glycerol, kyselina propionová. Díky rozmanitosti producentů a živin, které přijímají, vznikají různě dlouhé řetězce monomerních jednotek, různými způsoby. Nejlépe popsane a nejčastější je syntéza PHB, která má tři kroky. Jde o enzymatické reakce a v každém kroku je využit jiný enzym, pro který má buňka genetické dispozice. Geny kódující enzymy

jsou PhaA, PhaB, PhaC. První krok je katalyzován enzymem 3-ketothiolázou (PhaA) a dojde ke kondenzaci dvou molekul acetyl-CoA za vzniku acetoacetyl-CoA. Acetoacetyl-CoA je dále redukován na (R)-3-hydroxybutyryl-CoA pomocí NADH-dependentní acetoacetyl-CoA dehydrogenázy (PhaB). Posledním krokem je polymerace (R)-3-hydroxybutyryl-CoA na PHB enzymem PHB polymerázy (PhaC). Acetyl-CoA nutný pro tvorbu PHA může být zároveň i inhibítozem této reakce, pokud dojde k uvolnění skupiny CoA. A to, pokud je dostatek všech živin i uhlíku, v tom případě se acetyl-CoA spálí v TCA a vzniká volný CoA, který inhibuje PhaA. Pro průmyslovou syntézu PHA se využívají jak čisté bakteriální kultury, tak i směsné. Průmyslová výroba probíhá v reaktoru ve dvou fázích. V první růstové fázi dochází k zmnožení bakteriálních buněk při dostatku živin. Omezením přísunu živin (dusík) nastává druhá fáze, produkční. V produkční fázi dojde k pozastavení dělení a růstu buněk a je zahájena syntéza PHA [5, 7, 10, 11].

#### **2.1.4 Degradace PHA**

K degradaci PHA dochází, když buňka potřebuje uvolnit uloženou energii nebo uhlík. Proces degradace může mít dvě části, a to intracelulární a extracelulární. V intracelulární fázi dochází k rozkladu zásobních polymerů dle potřeby buňky. Polymer se začne při působení enzymu PHA depolymerázy štěpit na monomerní jednotky D-3-hydroxybutyrátu. Tyto jednotky jsou dále oxidovány na acetoacetát 3-hydroxybutyrátem dehydrogenázou. Acetoacetyl-CoA syntetáza esterifikuje acetoacetát na acetoacetyl-CoA, který je dále hydrolyzován 3-ketothiolázou, za vzniku acetyl-CoA. Uvolněný acetyl-CoA dále pokračuje do Krebsova cyklu, kde je dále zpracován. Extracelulární fáze je využívána, pokud se PHA uvolní z buňky do extracelulárního prostoru. Uvolněná PHA je rozložena extracelulární PHA depolymerázou, která je odlišná od intracelulární PHA depolymerázy. Extracelulární degradace má využití při průmyslové biodegradaci PHA. Bakteriální buňka však nedokáže přijmout tento vysokomolekulární pevný polymer a musí ho rozložit extracelulární depolymerázou na nízkomolekulární látky. Tyto nízkomolekulární látky jsou ve vodě rozpustné a projdou přes membránu do vnitřního prostředí buňky, kde jsou dále zpracovány za uvolnění energie a uhlíku [9, 12].

#### **2.1.5 Využití PHA**

Polyhydroxyalkanoáty jsou považovány za náhradu některých plastů, protože mají podobné fyzikální i chemické vlastnosti a zároveň jsou netoxické a biodegradabilní. Nevýhodou ovšem je vysoká produkční cena. Tato cena je vysoká hlavně kvůli substrátu bohatému na uhlík. V dnešní době je snaha o využívání substrátů, které vznikají jako odpadní materiály potravinářské či zemědělské produkce např. fermentovaná melasa, výlisky při produkci olivového oleje, použitý kuchyňský olej [13].

PHA má nyní využití v medicíně, zemědělství, akvakultuře, potravinářském a textilním průmyslu. V medicíně bývají použity jako nosiče léků, implantáty, rozložitelné stehy. Využívá se zde jejich biokompatibility. V zemědělství se z PHA vyrábí mulčovací folie či sítě na ochranu rostlin před větrem. Kromě ochranných sítí se v zemědělství využívají i polymery PHA na roznášení pesticidů, které poté působí jen na danou část rostliny tudíž se snižuje celková intoxikace rostlin. Akvakultura využívá PHA na čištění vody od patogenních látek.

V potravinářském průmyslu se PHA využívá na výrobu obalových materiálů. Obaly vyrobené z PHA polymerů jsou odolné vůči vodě, světlu, UV záření, oxidačním procesům. Tyto obaly mohou být použity pro různé druhy potravin např. potraviny s vysokým obsahem tuku, potraviny s nízkou životností či pro nápoje [14, 15].

### 2.1.6 Substráty pro syntézu PHA

Jedním z možných způsobů snížení produkční ceny PHA, je využívání odpadních materiálů z jiných průmyslových odvětví jakožto substrátu. Tyto materiály jsou celosvětově rozšířené a levné. Využívají se odpadní látky bohaté na uhlík např. melasa, mléčné produkty, glycerol. Jako jeden z těchto zdrojů se dá využít odpadní potravinářský olej. Zde je však problém, kvůli vystavení oleje vysoké teplotě, vzduchu a jídlu po delší časový úsek. Tím může dojít k změně konzistence a heterogenity oleje. Dokonce při smažení může dojít ke vzniku látek toxických pro PHA producenty. I přes to je složení použitých olejů optimální pro syntézu PHA. Obsahují mastné kyseliny, které svým rozložením uvolní více energie než sacharidy. Bakterie *Cupriavidus necator* H16 je schopná efektivně využívat triacylglyceroly a má vysoké výtěžky PHA. Například při použití oleje z kávové sedliny jakožto substrátu byl obsah PHB až 89,1 % [16, 17].

### 2.1.7 Metody izolace PHA z bakteriálních buněk

Izolace PHA je složitý vícekrokový proces. Výběr vhodné metody je ovlivněn požadavky na kvalitu polymeru. Typ metody může ovlivnit změnu fyzikálních a mechanických vlastností PHA např. molekulovou hmotnost či změnu formy PHA z amorfnní na krystalickou. Další faktory ovlivňující tento proces jsou typ a obsah PHA v buňce, požadovaná čistota získaného polymeru či druh mikroorganismu a jeho kultivační podmínky. K izolaci PHA z bakteriálních buněk se využívá řady rozpouštědel i enzymů.

Extrakce rozpouštědlem je ovlivněna dvěma zásadními faktory, a to typem rozpouštědla a teplotou procesu. Pro zlepšení extrakčního procesu může dojít k předúpravě a to chemicky (přidáním oxidantů, alkalických sloučenin) či fyzikálně (změnou teploty). Úpravou dochází k narušení buněk tudíž k lepšímu průniku rozpouštědla k PHA granulím. K extrakci se mohou používat halogenová rozpouštědla, která v kombinaci s alkoholy dosahují nejvyšší čistoty vyizolovaného PHA. Halogenová rozpouštědla jsou nebezpečná životnímu prostředí, a tak se začala hledat jiná vhodná rozpouštědla např. alkoholy, estery, ketony [18, 19, 20].

Studie Aramvash et. al z roku 2018 se zabývala možností izolace PHB z buněk *C. necator* H16 nehalogenovými činidly [21]. Použitá činidla byla kyselina octová, hexan, propanol, methanol, ethylenkarbonát, dimethylformamid a dimethylsulfoxid. Každé rozpouštědlo bylo podrobeno třem pokusům se třemi rozdílnými teplotami vždy po dobu 60 min. Nejlepších výsledků bylo dosaženo činidlem ethylenkarbonát při teplotě 150 °C z vlhké biomasy. Výtěžek této extrakce byl 98,6 % a čistota získaného PHB 98 %. Tyto výsledky jsou porovnatelné s chloroformovou extrakcí PHB. Ethylenkarbonát je sloučenina s nízkou toxicitou a vysokým bodem varu díky němuž může být ethylenkarbonát opakovaně použit bez dalšího přečištění. PHB získané touto extrakcí má stejnou molekulovou hmotnost a tepelnou stabilitu jako komerční PHB [21].

Druhou metodou izolace PHA je rozpuštění či strávení buněčného materiálu. Používané látky zde jsou oxidanty, enzymy, kyseliny, zásady, nebo povrchově aktivní látky. Silně oxidační látkou je například chlornan sodný, který rozkládá buněčné struktury. Při použití tohoto činidla můžeme získat poměrně čistý produkt. Avšak jeho použitím zredukujeme molekulovou hmotnost polymeru. Toto činidlo není vhodné také proto, že obsahuje chlór [1].

Zásady jako je NaOH či KOH jsou látky, díky nimž dojde k zmýdelnění buněčných membrán a tím se zvýší jejich propustnost. Získaný produkt má vysokou čistotu a díky nízké teplotě se ani jeho molekulová hmotnost výrazně nemění. Použitím kyselin např. kyseliny sírové, je také dosaženo vysoké čistoty produktu, ale je pozměněna molekulová hmotnost [18, 20].

Enzymy (proteázy, glykosidázy) umožňují extrakci PHA s vysokou čistotou, protože lyzační účinek enzymu je selektivní. Po rozpuštění buněčných struktur, je PHA extrahováno centrifugací či použitím organických solventů. Centrifugací však docílíme vyšší výtěžnosti. Použití enzymů pro průmyslovou výrobu je však nevhodné kvůli jejich vysoké ceně a složitosti procesu extrakce [18, 19].

Další variantou je použití povrchově aktivních látek, které se začlení do fosfolipidové membrány buňky až dojde k její lyzi, a následně se uvolní PHA. Povrchově aktivní látky se dělí na aniontové (dodecylsulfát sodný, alkylbenzensulfonáty) a kationtové (palmitoylkarnitin, benzalkoniumchlorid). Použitím aniontových látek často dostaneme náhodné výsledky z pohledu čistoty či molekulové hmotnosti. I přes tuto skutečnost jsou aniontové látky používány více než kationtové. Kationtové látky totiž snižují molekulovou hmotnost polymeru [22].

## 2.2 Biologická izolace PHA

Biologická izolace byla poprvé objevena náhodně, ale následné studie prokázali, že PHA projde trávicím traktem bez poškození, a i zvířata mohou být krmena mikrobiálními proteiny neboli SCP. Tyto jednobuněčné proteiny obsahují 50-80 % bílkovin, 8-10 % tuků a další důležité látky jako například vitamíny či minerály. Celkové složení záleží na použitém substrátu a bakteriální kultuře pro kultivaci. Zájem o využití SCP jako krmiva pro zvířata vzrostl hlavně po použití *C. neactor* H16 pro kultivaci biomasy. Tento kmen má vysoký obsah kvalitního proteinu. Analýzou této biomasy bylo zjištěno, že koncentrace určitých aminokyselin z biomasy je možné porovnat s koncentracemi aminokyselin v kaseinu. Avšak byla vnesena otázka, jestli PHA má pro krmená zvířata nějaký přínos, protože většina PHA byla zvířaty vyloučena. Proto bylo navrženo, že by se syntéza PHA v bakterii *C. neactor* H16 měla potlačit. Avšak v posledních letech se navrátilo k myšlence krmení zvířat SCP, a to proto že by se mohlo využít obsaženého PHA k navýšení metabolizované energie, slouží totiž jako zásobárna uhlíku a energie. Následné studie prokázali, že PHA může sloužit jako prebiotikum. Napomáhá zlepšení střevní mikroflóry, dodáváním mastných kyselin s krátkými řetězci jako je kyselina 3-hydroxymáselná. Pro lepší strávení je před krmením biomasa s PHA upravována máčením v NaOH. Výhodou biologické izolace je nižší potřeba chemických látek, oproti jiným metodám, a také možnost dalšího využití živočichů použitých na izolaci PHA. Využití takto získaného PHA záleží na tom, jakou bude mít čistotu [2, 23, 24].

Při biologické izolaci PHA je kladen veliký důraz na etickou stránku, jelikož se pracuje s živými tvory. Což znamená, že jim nesmí být nijak ublíženo v průběhu pokusu. Bylo prokázáno že bakteriální biomasa obsahující PHA není pro živočichy toxická, dokonce může mít i příznivý efekt na jejich vývoj. Dalším z důležitých aspektů je následné využití použitých živočichů a také jejich cena. Výběru živočicha je také ovlivněn nároky na jeho výživu, životní prostor a na tom, aby PHA granule prošly trávicím traktem co nejméně poškozeny. Jedním z aspektů pro výběr správného živočicha je i to, že ne všechny mohou konzumovat SCP, kvůli vysokému obsahu RNA v rostoucích buňkách. Také jsou nevhodní živočichové ze skupiny přežvýkavců, jelikož mají složitý trávicí systém, který může poškodit PHA [2, 25].

### 2.2.1 Biologická izolace pomocí laboratorních kryš

Poprvé byla izolace PHA pomocí živočichů použita ve studii Kunasundari et al. v roce 2013 [26]. Jako izolační systém byly použity Sprague-Dawley krysy, druh přímo pro laboratorní pokusy, staré 8-12 týdnů o váze 150–200 g. V této studii izolovali PHB, syntetizovaný bakterií *C. neactor* H16. Tato bakterie byla použita z důvodu schopnosti syntetizovat velké množství PHB a také byla dříve použita ke krmným účelům, jelikož má dobré složení SCP. Bylo extrahováno 90 % PHB z fekálních pelet. Vyloučení PHB trávicím traktem kryš trvalo 9-15 hodin, pelety měly bílou barvu a jejich rozměry byly 1 cm. Při normální stravě trvá trávicí proces 12-35 hodin. Čas trávení záleží na složení a velikosti krmiva či dostatku vody. PHB bylo získáno ve formě granulí, připomínajících jeho nativní formu v bakteriální buňce. Takto získané PHB však mělo nižší čistotu než to získané chloroformovou extrakcí. Obsah nečistot byl zjištěn porovnáním hmotnosti fekálních pelet s hmotnostním obsahem PHB ve lyofilizované bakteriální biomase. Bakteriální biomasa celkově obsahovala 39 % PHB, avšak poměr fekálních pelet ku zkonsumované biomase byl 40-44 %, což převyšuje obsah polymeru o 1-5 %. Molární hmotnost takto izolovaného PHB jsou srovnatelné s chloroformovou izolací, trávicí trakt kryš tedy nepoškozuje PHB. Pro zvýšení čistoty, byly fekální pelety přečištěny vodou, 2% dodecylsulfátem sodným (SDS) a 2% dodecylbenzensulfonátem (SDBS). Po přečištění se snížila molekulová hmotnost, což mohlo být způsobeno 24 h hydrolyzou vzorku, při které mohlo dojít k reakci povrchových látek na peletách s činidlem. Toto snížení molekulové hmotnosti by však nemělo zásadně ovlivnit vlastnosti polymeru. Dynamická viskozita u vodou přečištěného vzorku zůstala nezměněna, tedy vysoká. Po přečištění zbylými dvěma činidly byly vlastnosti porovnatelné s polymerem získaným chloroformovou metodou. Přečištění vodou tedy není dostačující. Výsledný materiál by mohl být použit v zemědělství pro výrobu hnojiv [26].

Biologický stav kryš po krmení bakteriální biomasou byl porovnán s kryšami krmenými komerčním krmivem. Krysy krmené biomasou měly nižší hmotností přírůstek oproti kontrolnímu vzorku a potřebovali dvakrát více vody. Nižší přírůstek hmotnosti, i přes stejné množství potravy 12-25 g/den pro obě skupiny, byl způsoben obsahem PHB v bakteriální biomase. Biomasa obsahovala znatelně více proteinů, a to ovlivnilo metabolismus kryš. Vyšší příjem vody byl z důvodu odvodu většího množství močoviny z těla, a i vyšší koncentrace červených krvinek byla způsobena vyšším příjmem aminokyselin [26, 27].

Laboratorní krysy mají ovšem vyšší nároky na chov, jsou to přenašeči různých nemocí a jejich další využití je také malé. Také potrava pouze ve formě bakteriální biomasy je pro výživu krys nedostatečná. Tento nedostatek se projevil nižšími hmotnostními přírůstky oproti kontrolnímu vzorku a také vyšším výskytem ledvinových kamenů [26].

### 2.2.2 Biologická izolace moučnými červy

V současné době se studie zaměřili na menší živočichy, a to zejména na hmyz. Tento záměr má hned několik důvodů. Hmyz může být dobrý bílkovinný zdroj pro zvířata i člověka. A také bylo prokázáno, že po konzumaci lyofilizované bakteriální biomasy vylučují některé druhy hmyzu bílé fekální pelety obsahující PHA. Toto bylo vyzkoušeno s moučnými červy, cvrčky či šváby. Další z výhod použití hmyzu jakožto izolačního systému, je jeho nenáročný chov a nízké nároky na výživu a životní prostor. A také je dále využitelný jako krmivo [2].

Mouční červi byli využiti pro izolaci PHA ve studii od Murugan et al. v roce 2016 [28]. V této studii bylo použito 50 g moučných červů starých 30-35 dní. Byli krmeni po dobu 16 dní 5 % své hmotnosti. Jako krmivo sloužila lyofilizovaná biomasa *Cupriavidus necator* Re2058/pCB113 a pro kontrolní vzorek oves. Tato bakterie byla kultivována v minerálním médiu s palmovým olejem jakožto uhlíkovým substrátem. Biomasa obsahovala 54 % kopolymeru poly(3-hydroxybutyrátu-co-3-hydroxyhexanoátu), 3-hydroxyhexanoát tvořil 25 mol. %. Fekální pelety měly bílou barvu a jejich velikost byla v rozmezí 0,05-0,02 mm. Byly získány přesíváním přes 0,5 mm síto, tím byly získány nejen pelety, ale i zbytky biomasy a červích svleček. Na přečištění byla použita voda a SDS. Vodou přečištěný kopolymer měl čistotu 89 %. To dokazuje, že trávicí systém moučných červů dokáže rozložit bakteriální biomasu, a přitom vyloučit PHA. Nečistoty byly převážně proteiny, které byly detekovány pomocí SDS-PAGE a FTIR metody a analyzovány LC-MS/MS. Pomocí LC-MS/MS bylo zjištěno, že obsažené proteiny jsou enzymy z trávicího traktu moučného červa, proteiny potřebné k syntéze PHA a zbytky proteinů z bakteriální buňky. Velké množství těchto nečistot bylo odstraněno přečištěním roztokem SDS. Po tomto procesu byla opět provedena plynová chromatografie a čistota kopolymeru byla 100 %. V dřívějších studiích bylo zjištěno, že granule PHA v bakteriální buňce mohou obsahovat molekuly vody navázané vodíkovými můstky. To by mohlo mít za následek jiné vlastnosti PHA ve formě granulí a po chloroformové extrakci. Molekulová hmotnost kopolymeru byla však u obou typů porovnatelná. Dalším z poznatků bylo, že mouční červi krmení bakteriální biomasou mohou dokončit životní cyklus a mají vyšší obsah proteinu oproti kontrolnímu vzorku [28, 29].

Druhá studie na toto téma z roku 2018 od Ong et al. se zabývá metodou izolace kopolymeru P(3HB-co-3HHx) z buněk *C. necator* Re2058/pCB113 a také změnou mikrobiomu v trávicím traktu moučného červa v závislosti na potravě [30]. Biosyntéza kopolymeru byla realizovaná bakterií *C. necator* Re2058/pCB113 a bylo využito dvou substrátů, a to palmového oleje a odpadního živočišného tuku. Kopolymer zde měl 55-60 % zastoupení. Studie vycházela z výše popsané práce Murugan et al. z roku 2016. Pokus měl tři skupiny červů, rozdělených dle typu krmiva. První skupina byla živena bakteriální biomasou, vyprodukovanou na palmovém oleji, druhá biomasou, vyprodukovanou na odpadním živočišném tuku a třetí skupina sloužila jako kontrolní vzorek, krmený pšeničnými otrubami. Červi byli každý den

krmení 2,5 g potravy a před dalším krmením byli vždy přesíváni sítí o velikosti ok 0,5 mm a 0,2 mm. Přesívání každý den a dvěma typy sítí, bylo z důvodu zvýšení čistoty izolovaného materiálu. Získaný materiál měl hmotnost okolo 2 g. Takto izolovaný kopolymer byl dále přečištěn destilovanou vodou a roztokem NaOH buď 0,05 M nebo 0,1 M. Výsledná čistota byla vyšší než 90 %. Nejlepší způsob přečištění byl vodou a poté 0,1 M NaOH, kde čistota byla až 94 %. Tato čistota je porovnatelná s tou po chloroformové extrakci, a i vlastnosti jsou srovnatelné. Metoda alkalického čištění se projevila jako účinná a také méně nebezpečná. Z pohledu krmiva pro červy nebyl žádný rozdíl v konzumaci bakteriální biomasy z palmového oleje a odpadního živočišného tuku. Pro zlepšení biologické izolace je nutné snížit hodnotu obsažených nečistot, aby přečištění nebylo nutné [30].

Zkoumáním mikrobiomu v těle moučného červa bylo zjištěno, že jeho složení a diverzita závisí na druhu potravy, který přijímá. Dřívější studie prokázali, že tato diverzita není nijak významná a tento výzkum to potvrdil. V mikrobiomu moučného červa se nacházejí tři hlavní kmény a to *Tenericutes*, *Firmicutes* a *Proteobacteria*. Analýzou červů krmených otrubami a biomasou kultivovanou na živočišném tuku bylo zjištěno, že mají stejné a nejvyšší zastoupení kmenu *Firmicutes*. Tento kmen se vyskytuje ve zdravém trávicím traktu, tudíž otruby a zmíněná biomasa mají dostačující nutriční hodnotu. Zvýšený výskyt tohoto kmene mohl být způsoben vyšším kalorickým příjmem. U červů krmených biomasou kultivovanou na palmovém oleji převládal kmen *Proteobacteria*, do kterého se řadí bakterie *Cupriavidus necator* [30, 31, 32].

Nedávná studie z roku 2019 od Zainab-L et. al. se zaměřila nejen na zlepšení procesu biologické izolace PHA, ale i na analýzu nutričních hodnot moučných červů po konci experimentu [33]. Bakterie *C. necator* H16 byla kultivována na palmovém oleji s vyšším obsahem močoviny. Obsah PHB byl 68 %. Před začátkem krmení, byla média změřena pro obsah soli, jelikož vyšší obsah soli může mít špatný vliv na růst hmyzích larev a následný vývoj. Proto byla část kultur zředěna vodou 1:1, to výrazně snížilo obsah soli. Následný experiment byl uskutečněn ve třech paralelních skupinách. Obsah červů byl 200 g a byli krmeni 12,5 % své váhy, a to nepromytou biomasou, promytou biomasou a pšeničnými otrubami. Celkově bylo za den zkonsumováno 125 g promyté biomasy a pouze 63 g nepromyté biomasy, a to 1 kg červů. Důvodem těchto výsledků může být vyšší obsah soli v nepromyté biomase. Také obsah PHA byl vyšší u promytých buněk, červi vyloučili 87 g fekálních pelet z nichž byl obsah PHB 82 % a u nepromyté biomasy vyloučené pelety o hmotnosti 43 g obsahovali 72 %. V této studii bylo dosaženo vyššího výtěžku než v předchozích studiích. Ani promytí buněk nijak neovlivnilo vlastnosti izolovaného PHB, jako v předchozích studiích. [33]

Během experimentu byl také porovnáván úbytek larev v jednotlivých experimentech a také jejich hmotnostní přírůstky. Celkově bylo přeživších larev nad 90 % a lišilo se podle stravy. Největší úbytek larev byl u nepromyté biomasy pouhých 90 %, je možné, že vyšší obsah soli vedl ke kanibalismu. Největší hmotnostní přírůstky měly larvy krmené otrubami, a to díky vyššímu příjmu sacharidů, které si ukládaly ve formě lipidů. Larvy krmené nepromytlými buňkami byly z dalších analýz vyřazeny kvůli malým přírůstkům. Je zde tedy velice patrný vliv soli na vývoj moučných červů. U všech typů krmiva byly stanoveny jejich nutriční hodnoty. Obsah sušiny a bílkovin v bakteriální biomase byl 95 % a 24 % na rozdíl od otrub, kde byl 88 % a 17 %. Bakteriální biomasa měla nižší obsah lipidů a vlákniny. Je zřejmé, že krmivo ovlivní nutriční hodnotu moučného červa. Larvy krmené bakteriálními buňkami



měly vyšší nutriční hodnoty než ty krmené otrubami, jediný rozdíl byl v menším obsahu tuku u těchto jedinců. Obsah proteinů zde byl od 68 % do 79 % a obsah lipidů od 6,3 % do 17,8 %. Larvy krmené otrubami měly nutriční hodnoty od 61 % do 68 % proteinů a od 17,8 % do 30 % lipidů. Tyto výsledky odpovídají předchozí studii o krmení moučných červů pšeničnými otrubami [33, 34].

Biologická izolace s použitím moučného červa *Tenebrio molitor* je momentálně nejlepší možnost pro tento typ izolace. Bylo prokázáno, že červi mohou konzumovat bakteriální biomasu a dokončit při této potravě svůj vývojový cyklus bez problémů. Takto získané PHA má sice nižší čistotu než u chloroformové extrakce, avšak tato čistota záleží na mnoha faktorech. Vyšší čistota produktu se dá získat zvýšením obsahu PHA v krmné biomase nebo přečištěním různými činidly, kde nejlepší výsledky má použití vody a 0,1 M NaOH. Také bylo zjištěno, že obsah soli má velký vliv jak na izolaci PHA, tak i na nutriční hodnoty červů. Promyté krmivo má lepší výsledky v obojím. Výhodou pro další využití je, že mouční červi krmení touto biomasou mají vysoký obsah proteinů. Mají vyšší nutriční hodnotu a slouží jako dobré krmivo pro další živočichy [28, 30, 33].

## 2.3 Potemník moučný (*Tenebrio molitor*)

### 2.3.1 Charakteristika

Potemník moučný je dospělec od larvy moučného červa. Jedná se o potravinářského škůdce, žijícího ve skladištích sypkých potravin či domácnostech. Dospělý brouk i larva žijí na stejném místě. Patří do rodu *Tenebrio*, u tohoto rodu je pohlavní dimorfismus, samci se od samic liší se zahnutím přední holeně. Tento druh je celosvětově rozšířen a řadí se mezi všežravý hmyz s proměnou dokonalou. Jeho životní cyklus trvá 4-5 měsíců v závislosti na podmínkách růstu, zvláště na teplotě. Dospělec je 1,5 cm veliký, tmavý brouk. Samice klade až 500 kusů vajíček. Z vajíček bílé barvy se po dvou týdnech líhnou bílé larvy. Z bílé larvy se stává žluto-hnědá, pokrývá ji chitínová pokožka (exoskelet), kterou několikrát svlékne a to 9-20×, v závislosti na podmínkách růstu. Larva se vysvléká, kvůli svému růstu, exoskelet totiž neroste s larvou. Po každém svléknutí je larva bílá, dokud se jí opět nevytvoří chitínový exoskelet. Tento exoskelet je velice pevný, protože chitínové jednotky jsou k sobě poutány vodíkovými můstky. Larvální stadium je nejdelší stadium života u potemníků. Larva dosahuje 2-2,5 cm při posledním svléknutí se z ní stává kukla. Kukla je nepohyblivé vývojové stadium, z kterého se vylíhne již dospělý brouk cca po 6 dnech. Páření probíhá pár dní po vylíhnutí a po celý život dospělce. Stáří dospělce při páření ovlivňuje larvální stadium potemníka. Čím je dospělec starší při kladení vajec tím má larva kratší vývojové stadium. Pro chov moučných červů je důležitá průměrná teplota mezi 20-30 °C a vlhkost vzduchu okolo 65-70 %. Také je pro chov červů důležité mít dostatek prostoru. Chov je snadný, protože mouční červi jsou velmi nenáročni. Mohou být chováni v plastových nádobách s prodyšným víkem [2, 35, 36].

### 2.3.2 Trávicí systém *Tenebrio molitor*

Příjem potravy probíhá ústním ústrojím, potrava je drcena kusadly a poté čelistmi, které posunují potravu dále do trávicího traktu. Žaludek je složen ze tří částí a to přední,

prostřední a zadní. Přední žaludek slouží jako zásobní část a potrava je v ní také drcena. V prostředním žaludku dochází k vylučování trávicích enzymů (lipázy, proteázy) a vstřebávání živin. Prostřední žaludek je rozdělen dle hodnoty pH na dvě části kyselý a alkalický. První část je kyselá s pH okolo 5,6, kde probíhá trávení sacharidů. Druhá část je mírně alkalická s pH 7,9 a rozkládají se zde bílkoviny. Nejdříve dojde k rozštěpení peptidů exopeptidázou na oligopeptidy, poté ke štěpení na dipeptidy pomocí endopeptidáz. V zadním žaludku dochází k absorpci vody a solí z natráveniny. K vylučování slouží Malpighiova trubice, vylučovány jsou nestrávitelné zbytky a konečné metabolity [2, 36].

### 2.3.3 Důležité živiny pro *Tenerbio molitor*

Potemník moučný je všežravý brouk. V přírodě se jeho larvy živí na substrátech rostlinného původu, zejména na jejich tlejících či plesnivějících částech, ale i na ostatních tlejících organismech např. hmyz, zvířata. U domácích chovů jsou larvy často krmeny pšeničnými otrubami, ovesnými vločkami, moukou obohacenou o kasein či zeleninou. Ke krmným účelům můžou sloužit i odpadní látky jako jsou výše zmíněné otruby nebo zbytky pekárenských výrobků, pivovarské kvasnice, a dokonce i polystyren. Ideální složkové zastoupení v potravě by mělo obsahovat 80-85 % sacharidů a lipidů. Lipidy jsou pro larvy podstatné z hlediska obsahu linolové a linolenové kyseliny. Pro růst larev je nejdůležitější dostatek proteinů, ale i vitamíny, a to zejména vitamín B a C. Voda je přijímána z potravy, důležitá je tedy i její vlhkost [2, 35].

### 2.3.4 Degradace plastu pomocí *Tenerbio molitor*

Larvy potemníka moučného byly použity k degradaci a mineralizaci polystyrenu, a to v práci od Yang et. al z roku 2015 [37]. V trávicím traktu moučného červa dojde k rozštěpení dlouhých řetězců polystyrenu (PS) na nízkomolekulární metabolity vyloučené z těla. Proces začíná rozžvýkáním PS čelistmi červů. Dojde k zvětšení povrchu a tím k lepšímu přístupu extracelulárních trávicích enzymů a mikroflóry k rozkládané látce. Rozžvýkaný PS dále projde do žaludku, kde dochází k samotnému rozštěpení na nízkomolekulární fragmenty, díky enzymům bakteriální mikroflóry zde přítomným. PS byl degradován a zkonsumován za méně než 24 hodin. Za 16 dní byl uhlík z molekuly PS přeměněn až z 47,7 % na oxid uhličitý, ale pouze z 0,5 % byl začleněn do syntetizovaných molekul mastných kyselin. Takto krmené larvy ztratily 24,9 % ze své původní hmotnosti. Z pohledu přeživších larev nebyl žádný rozdíl mezi kontrolním vzorkem krmeným otrubami a vzorkem krmeným PS [37].

Správné složení bakteriální mikroflóry v trávicím traktu moučného červa je velice důležité pro schopnost degradovat PS. Je však nutné poznamenat, že dosud není jisté, zda degradační schopnost je pouze zapříčiněna mikroflórou a namáháním při konzumaci, nebo je zde ještě nějaký jiný faktor. Podáváním antibiotik červům byla zjištěna snížená schopnost degradace a mineralizace PS. Z trávicího traktu červa krmeného PS byla izolována bakterie *Exiguobacterium sp.* YT2 schopná degradace PS. Tento izolovaný kmen za dobu 60 dní rozložil 7,4 % PS, což je menší účinnost degradace než u moučných červů. Z těchto výsledků je patrné, že soužití mezi mikroflórou trávicího traktu a moučným červem je důležitá pro rozklad PS. Degradální schopnost larev byla dále vyzkoušena s jinými druhy plastů.

Pozitivní výsledky byly při konzumaci polyethylenu s nízkou hustotou (LDPE), ne však u polyvinylchloridu (PVC). Zajímavé je, že mikroflóra u larev krmených PS je jiná než ta u larev krmených LDPE. Z toho plyne, že složení potravy výrazně ovlivňuje bakteriální zastoupení v trávicím traktu, jako to bylo i u biologické izolace PHA. Pro zlepšení vlastností plastů jsou používána různá aditiva. Tato aditiva často přispívají k vyšší kontaminaci prostředí. Byl zkoumán vliv příměsi hexabromcyklododekanu, nejčastější příměsi u PS, na moučné červy a jejich konzumenty krevety. Avšak toxicita ani akumulace tohoto aditiva nebyla zaznamenána v tomto potravním řetězci. Ani při analýze moučných červů po sedmidenním krmení, nebyly nalezeny žádné závadné látky, pouze monomery a oligomery PS, které ještě nebyly degradovány na CO<sub>2</sub> [37].

Jedním z dalších problémů by se mohl zdát nedostatečný příjem živin nutných pro vývoj larev. U larev krmených PS byl zpozorován úbytek hmotnosti stejný jako u larev, které hladověly. Přimícháním sóji nebo jiného krmiva bohatého na živiny, může být dosaženo lepšího růstu, a dokonce i vyšší schopnosti rozkladu PS. Při optimálním poměru PS a otrub bylo dosaženo kompletního životního cyklu potměníka moučného. Přidáním otrub bylo také sníženo požívání larev mezi sebou. Používání moučných červů pro degradaci plastů není udržitelný způsob. Avšak důležité je dále studovat jejich mikroflóru po konzumaci plastů. Izolace a následné použití bakterií schopných rozkládat plasty, by mohlo mít veliký přínos pro ekologický rozklad plastů [37, 38].

## 2.4 Jedlý hmyz

Se zvyšující se světovou populací, bude nutné zajistit dostatek potravy pro všechny. Hmyz je jednou z možností, jak toto zajistit. Má dobré nutriční hodnoty a jde chovat na malé ploše ve velkém množství. Ne veškerý hmyz je však vhodný pro tyto účely a také ne všechna vývojová stadia jsou stejně výživná. Některé druhy jsou i jedovaté. Hmyz je dobrý zdroj nejen proteinů, lipidů a sacharidů, ale i vitamínů a minerálů. Důležitý je také i obsah polynenasycených a mononenasycených mastných kyselin, které jsou důležité pro prevenci kardiovaskulárních onemocnění. Dokonce slouží i jako dobrý zdroj esenciálních aminokyselin nejen pro zvířata, ale i pro lidskou populaci. Obsah těchto látek je však závislý na krmivu, které hmyz přijímá. Jedlý hmyz je také zdroj různých stopových prvků jako je železo, hořčík, měď či zinek. Nutriční složení některých druhů bylo porovnáno s typickými zdroji živin jako je hovězí, vepřové a drůbeží maso. Zkoumán byl obsah vápníku a železa u larev potměníka moučného, dále u cvrčků a sarančat v dospělém stadiu. Obsah vápníku u vyjmenovaných druhů hmyzu byl 40, 130 a 70 mg na 100 g sušiny. V porovnání zastoupení vápníku u hovězího je 4-27 mg, vepřového 5-28 mg a u drůbežího 5-14 mg na 100 g sušiny. Z moučných červů a cvrčků se vyrábí tzv. hmyzí moučka. Obsah železa v této moučce je u moučných červů 4,82 mg na 100 g a u cvrčků 6,66 mg na 100 g sušiny [39].

Kromě nutričních hodnot je také důležité, jakou texturu dodává hmyz či výrobky z něj pokrmu. Pro velkovýrobu hmyzích produktu je důležitý výběr druhu hmyzu. Tento druh by měl mít dobrý poměr biomasy a proteinu a také by měl být vhodný pro další zpracování například na hmyzí moučku. Jak bylo zmíněno, krmivo pro tyto druhy velice ovlivňuje jejich

výsledné složení. Trend je využívání nízkonákladového krmiva, jako jsou organické odpadní materiály a vedlejší produkty např. otruby. Vlastnosti krmiva jsou takové, aby maximalizovali růst a reprodukci hmyzu, nehledě na nutriční hodnotu. Pro zlepšení nutriční hodnoty se mohou do krmné složky přidávat látky zvyšující tuto hodnotu jako je ovoce, sušené mléko atd. to však zvyšuje cenu výsledného produktu. Proto je důležité najít vhodný odpadní produkt, popřípadě ho upravit tak, aby měl všechny vlastnosti pro efektivní chov [39, 40].

Využití hmyzu jakožto potravy nejen pro zvířata, ale i pro lidskou populaci se jeví ekologičtější než chov hospodářských zvířat. A to nejen díky nižší produkci skleníkových plynů, ale i nižšími nároky na spotřebu vody, chovné půdy a využití odpadních organických látek k jejich výživě. Jedlý hmyz není lidmi vnímán nejlépe, je nutné tento pohled změnit a zdůraznit všechny výhody konzumace hmyzu. Pro průmyslovou produkci hmyzu je také nutné zajistit normy, které budou muset plnit hmyzí výrobky. Důležitým aspektem je i zabránění kontaminace, jak v průběhu chovu, tak i konečného výrobku. Velice důležitá je inaktivace střevní mikroflóry [40].

### **2.4.1 Využití moučného červa v potravě**

Mouční červi jsou bohatí na protein a oproti jiným druhům hmyzu jsou velcí. Výhodou je, že se jedná o larvální stadium tohoto brouka, sklizeň tedy probíhá dříve ve vývojovém cyklu než například u cvrčků, kde se čeká až jsou plně vyvinutí. Nejlepší doba pro sklizeň těchto larev je předtím, než začne přeměna v kuklu. Před touto přeměnou začnou larvy ztrácet část své hmotnosti, omezí se příjem potravy. Ranné stádium larvy je tedy nejlepší pro sklizeň. Larvy rychle přibývají na váze. Váha by měla být mezi 100-120 mg. Problémem u pěstování moučných červů může být zvýšený obsah vlhkosti. Dospělí brouci potřebují vlhkost, aby mohli prospívat a poté naklást vejce, ale u larev vyšší vlhkost způsobuje mikrobiální kontaminaci. Nutriční složení moučného červa se liší podle typu krmiva. Ve studii z roku 2004 od Ghaly et. al. byli červi krmeni moukou s přísadkou brambor jako zdrojem vody [35]. Takto krmení mouční červi měli zastoupení proteinů 24,3-27,6 %, tuků 12-12,5 % obsah vlhkosti byl 58,1–65,1 %, také zde byl zaznamenán obsah vitamínů E a B2. Mouční červi mohou být kmeni řadou různých krmiv. Jejich přizpůsobivost pro různé typy krmiva se dá využít např. na zpracování organických odpadů nebo vedlejších produktů potravinářského průmyslu. Jedná se například o otruby, pivovarské mláto, hroznové či jablečné výlisky. Larvy mají exoskelet složený z chitinu, který může být při vyšší konzumaci červích produktů problematický [35, 41, 42].

Vysoký obsah vlhkosti by mohl znamenat problém při skladování. Proto je lepší larvy usušit a rozemlít na tzv. červí moučku. Červí moučka má lehkou přípravu. Jednou z možností je nechat larvy dva dny vyhladovět, aby se vyčistil jejich trávicí trakt. Poté jsou zaživa zmrazeni po dobu 48 hodin při -20 °C a zlyofilizovány. Nakonec se mrazem usušené larvy rozemelou na moučku a ta je přesívána. Tato moučka může částečně nahradit normální obilnou mouku při pečení koláčů, muffinů. Výsledný produkt má vyšší obsah proteinu a je v přijatelnější formě pro konzumenta. Přidání červí moučky také zvyšuje antioxidační kapacitu výrobku a dopomáhá k nižšímu glykemickému indexu. Tato informace je důležitá z důvodu výroby produktů pro osoby trpící cukrovkou, obezitou či inzulínovou rezistencí [35, 43].

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1.1 Použité chemikálie

- Citronan amonno-železity (Fluka, CHE)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, CZE)
- Dodecylsíran sodný (Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd., JPN)
- Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (Lach-Ner, CZE)
- Hydroxid sodný (Lach-Ner, CZE)
- Chlorid amonný (Lach-Ner, CZE)
- Chlorid vápenatý (Lach-Ner, CZE)
- Chloroform, stabilizovaný v 2-methyl-2-butene (VWR Chemicals, USA)
- Izopropylalkohol (PENTA, CZE)
- Kvasničný extrakt (HiMedia, IND)
- Kyselina sírová (Lach-Ner, CZE)
- Nutrien broth (HiMedia, IND)
- Síran amonný (Lachema, CZE)
- Síran hořečnatý heptahydrát (Lach-Ner, CZE)
- Wieningerův katalyzátor (VWR Chemicals, USA)
- Xylan (VWR Chemicals, USA)

### 3.1.2 Použité přístroje

- Analytické váhy, OHAUS Pioneer model PA224C
- ATR-FTIR, Thermo Scientific, Waltham iS50
- Centrifuga, Hettich EBA 200
- Centrifuga, Hettich ROTINA 420R
- Destilační přístroj, VAPODEST 200
- Váhy, Kern EW 620-3NM
- Laminární box, Euroclone BioAir Auro mini
- Magnetická míchačka, Biosan MMS-3000
- Mineralizační jednotka, KT-8s
- Plynový chromatograf s FID, Thermo Scientific Trace 1300
- SEC-MALS-dRI, Wyatt Technology
- Stereomikroskop, Zeiss Stemi 2000-C s připojenou kamerou Zeiss AxioCam ERc 5 s
- Soustava síť VUSTAH
- Termoblok, Bibby Scientific Stuart SBH 200D
- Termoblok, Bibby Scientific Stuart SBH 130D
- Termostat, LTE IP100U
- Temperovaná třepačka, LABWIT ZWYR-D2401
- Temperovaná třepačka, IKA KS4000 i control
- Vortex, Benchmark BenchMixer
- Laboratorní vybavení

### 3.1.3 Použité organismy

V této práci byly použity mikroorganismy získané z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně (CCM) a německé sbírky Leibniz Institut – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ). Jednalo se o bakterie *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344 a *Cupriavidus necator* H16 CCM 3726. Mimo jiné bylo také využito larvální stádium potměníka moučného – moučný červ zakoupeného v chovatelských potřebách Akva-Exo.

## 3.2 Příprava médií

### 3.2.1 Příprava produkčního média

Na přípravu produkčního neboli minerálního média bylo naváženo dané množství látek, které udává tabulka 1 či tabulka 2. Byla přidána destilovaná voda, a roztok byl míchán do úplného rozpuštění. Poté byl rozlit po 200 ml do půllitrových Erlenmeyerových baněk a vysterilizován v autoklávu. U bakterie *Cupriavidus necator* H16 byl před sterilací do média přidán zdroj uhlíku, a to použitý fritovací olej v koncentraci 20 g/l. V případě bakterie *Schlegelella thermodepolymerans* představovala zdroj uhlíku xylóza, také o koncentraci 20 g/l, která byla do média přidána až po sterilizaci. Do médií byly dále přidány roztoky stopových prvků (MES, TES II) jejichž složení je uvedeno v tabulce 3 a tabulce 4. Kultivace byla ukončena po 72 hodinách.

Tabulka 1, složení produkčního média pro bakterii *Schlegelella thermodepolymerans*

látka	koncentrace [g/l]
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	9
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,5
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2
$\text{CaCl}_2$	0,015
$\text{NH}_4\text{Fe}^{\text{III}}$ citrát	0,0012
Kvasničný extrakt	0,5
TES II	1 ml/l

Tabulka 2, složení produkčního media pro bakterii *Cupriavidus necator* H16

<b>látka</b>	<b>koncentrace [g/l]</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,02
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O	11,1
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,2
MES	1 ml/l

Tabulka 3, složení roztoku MES

<b>látka</b>	<b>koncentrace [g/l]</b>
FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	9,7
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	7,8
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,156
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,119
NiCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,118
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,1
0,1 M HCl	1000 ml

Tabulka 4, složení roztoku TES II

<b>látka</b>	<b>koncentrace [g/l]</b>
EDTA	50
FeCl <sub>3</sub>	8,3
ZnCl <sub>2</sub>	0,84
CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,13
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,1
MnCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,016
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,1

### 3.2.2 Příprava inokula

Bylo naváženo komplexní médium v koncentraci 25 g/l a rozpuštěno v destilované vodě. Po rozpuštění byl roztok rozlité do 100 ml Erlenmeyerových baněk po 50 ml. Baňky byly poté vysterilizovány. Následně byla média pro *Schlegelella thermodepolymerans* vyhřáta na 50 °C a pro *C. necator* H16 ochlazena. Poté byla média zaočkována v laminárním očkovacím boxu bakteriální kulturou z kryozkumavky. Kultura byla před použitím rozmrazena. Po zaočkování byly baňky umístěny na 24 h na třepačku vyhřátou na optimální teplotu pro danou bakterii. U bakterie *Cupriavidus necator* H16 30 °C a 50 °C u *Schlegelella thermodepolymerans*. Kultivace probíhaly za konstantního míchání 180 rpm. Po 24 hodinách bylo inokulum přeočkováno do produkčního média.

Tabulka 5, složení komplexního média nutrien broth použitého na přípravu inokula

látka	koncentrace [g/l]
Pepton	10
Hovězí extrakt	10
Chlorid sodný	5

### 3.3 Stanovení obsahu PHB v bakteriální biomase

Po ukončení kultivace byly z Erlenmeyerových baněk odebrány dva vzorky po 10 ml. Tyto vzorky byly zcentrifugovány po dobu 5 minut při 6000 rpm. Poté byl odlit supernatant a k usazené biomase bylo přidáno 10 ml vody. Biomasa byla rozsuspendována za pomoci vortexu a opět zcentrifugována. Po odlití promývací vody byly vzorky sušeny při 70 °C do konstantní hmotnosti. Usušená biomasa byla zvážena a byly z ní připraveny vzorky pro plynovou chromatografii s FID detekcí.

### 3.4 Plynová chromatografie s FID detekcí

Pro určení obsahu PHB v průběhu celé práce byl použit následující postup. Ze vzorku bylo naváženo 8-11 mg do 2 ml krimpovacích vialek. Dále byla do vialek přidána esterifikační směs o složení 1 ml chloroformu a 0,8 ml vnitřního standartu, jedná se o směs 15% kyseliny sírové v methanolu a 5 mg/l kyseliny benzoové. Vialky byly zakrimpovány a zahřívány 3 h na 94 °C v termobloku. Po třech hodinách byla esterifikace ukončena a vzorky vyjmuty. Po zchladnutí byl celý obsah přelit do 4 ml vialek, které obsahovaly 0,5 ml 0,05 M NaOH, a protřepány. Došlo k oddělení fází na horní vodnou a spodní organickou. Ze spodní fáze bylo napipetováno 50 µl do 2 ml šroubovacích vialek obsahujících 0,9 ml izopropylalkoholu. Takto připravené vzorky byly hotovy pro analýzu.



### 3.5 Příprava krmiva pro moučné červy

Naprodukované biomasy představovaly krmiva pro moučné červy. Dále jsou označeny dle druhu bakterie a způsobu sušení.

Tabulka 6, přehled jednotlivých typů krmiv

typ krmiva	označení
Lyofilizovaná biomasa <i>Cupriavidus necator</i> H16	H16L
Sušená biomasa <i>Cupriavidus necator</i> H16	H16S
Lyofilizovaná biomasa <i>Schlegelella thermodepolymerans</i>	STL
Otruby	otruby

Po ukončení kultivace byly odebrány dva vzorky pro určení obsahu PHB a zbylý objem byl slit do kádinky. Následný postup se lišil dle typu připravovaného krmiva. Pro H16L byl celý objem rozdělen do dvou kádinek a zahříván na 60 °C po dobu 1 h. Poté byl celý objem zcentrifugován při 4800 rpm, promyt vodou a následně zlyofilizován. U H16S byl počáteční postup totožný s H16L. Nicméně získaná biomasa byla přemístěna na Petriho misku a sušena při 70 °C do konstantní hmotnosti a poté rozemleta na menší částice. Krmivo připravené z bakteriální biomasy STL bylo zcentrifugováno a promyto jako u předchozího typu a poté zlyofilizováno. Pro krmení kontrolního vzorku byly použity otruby.

### 3.6 Biologická izolace moučnými červy

Mouční červi byli zakoupeni v chovatelských potřebách, jejichž stáří se pohybovalo v rozmezí 1-3 měsíců. Byli chováni v plastové nádobě o rozměrech 21×14×6 cm zakryté gázou na okenním parapetu. Průměrná teplota po dobu chovu moučných červů byla 24 °C. Před zahájením pokusu byli mouční červi ponecháni 24 h bez krmiva, aby se vyprázdnil jejich trávicí trakt. Pokus byl veden podle studie od Murugan et al. z roku 2016 [28].

#### 3.6.1 První experiment s moučnými červy

První experiment byl proveden s dvěma typy krmiva, H16L a otrubami. Červi byli naváženi do dvou nádob po 50 g a krmeni po deset dní dávkami odpovídajícími 5 % své hmotnosti. Každý den probíhalo pozorování a krmení ve stejný čas. Také byli každý den odstraněni mrtví či zakuklení jedinci. Po uplynutí 10 dní byl pokus ukončen. Bylo odstraněno zbylé krmivo a zváženo. Červi byli vybráni a zváženi. Dále byl celý obsah nádoby přesíván přes soustavu sít VUSTAH o velikosti ok 0,5-0,1 mm. Každá frakce byla zvážena a poté sušena 24 h při 50 °C. Červi byli 48 h krmeni otrubami, pro pročištění jejich trávicího traktu od bakteriální biomasy s PHB. Po této době byli opět vybráni a zlikvidováni. Po usušení byly frakce zváženy a uchovány pro další analýzy. U fekálních pelet červů krmených biomasou byl určen obsah PHB v každé frakci, dle postupu 3.4.



Obrázek 1, chovné nádoby s moučnými červy v průběhu pokusu

### 3.6.2 Přečišťování fekálních pelet

Kvůli nízkému obsahu PHB ve fekálních peletách byla frakce s nejvyšším obsahem PHB podrobena přečištění. K tomuto účelu byly použity dva roztoky, a to roztok NaOH o koncentraci 0,05 a 0,1 mol/l a SDS 1% a 2%. Navážené množství frakce 2 bylo převedeno do Erlenmeyerovy baňky a byl přidán daný roztok, aby výsledný poměr byl 1:100. Takto připravené baňky byly hodinu míchány při 50 °C. Po hodině byly baňky ochlazeny a jejich obsah zcentrifugován při 6000 rpm po dobu 5 minut. Poté bylo do každé zkumavky přidáno 10 ml vody a usazená suspenze byla rozmíchána na vortexu a následně zcentrifugována. Vzorky byly poté dány do sušárny na 70 °C a sušeny do konstantní hmotnosti. Následně byly přečištěné pelety zváženy a byly připraveny vzorky na plynovou chromatografii viz 3.4.

### 3.6.3 Druhý experiment s moučnými červy

Druhý experiment probíhal se čtyřmi typy krmiva, jako krmivo pro kontrolní vzorek byly opět použity otruby. Ostatní krmiva byla H16L, H16S a STL. Červi byli chováni po dobu deseti dní a krmeni 5 % své váhy. Pro každé krmivo bylo naváženo průměrně 28 g moučných červů. Denně probíhalo pozorování a krmení ve stejný čas. Každý den byla vybrána zbylá biomasa, zvážena a vrácena zpět, stejně tak i červi. Také byl celý obsah plastové nádoby přesíván přes síto s velikostí ok 0,5 mm. Takto získané fekální pelety byly zváženy a následně vráceny do chovné nádoby. Mrtví či zakuklení jedinci byli zváženi a zlikvidováni.

Po deseti dnech byl pokus ukončen. Po vybrání zbylé biomasy a moučných červů z chovné nádoby, byl její obsah přesíván přes soustavu sít o velikosti ok 0,5-0,1 mm. Jednotlivé frakce byly zváženy a dále sušeny na Petriho miskách při 50 °C do konstantní hmotnosti. Zbývá krmná biomasa a mouční červi byli zváženi. Červi byli poté necháni 24 h bez potravy. Následně byli rozděleni na dvě stejné části. První část byla zamrazena na teplotu -20 °C, a ponechána v mrazáku do další analýzy. Druhá část byla usušena a rozemleta na červí moučku.



*Obrázek 2, chovné nádoby s moučnými červy první den pokusu*

### **3.6.4 Obsah vody v červí moučce**

Obsah vody v červí moučce byl stanoven sušením červů a jejich následným rozemletím. Průměrně 5 g červů bylo sušeno 72 h při 70 °C, poté pomleto a dále sušeno 72 h při 50 °C. Obsah vody byl určen z rozdílu původní navážky a usušené červí moučky.

### **3.7 Izolace PHB**

K izolaci PHB byli použity krmné bakteriální biomasy H16L, H16S, STL, dále fekální pelety z frakce 2 a přečištěné fekální pelety z pokusu 2. Z každého vzorku bylo naváženo dvakrát 200 mg do uzavíratelných zkumavek. Poté bylo přidáno 10 ml chloroformu a zkumavky byly uzavřeny. Takto připravené vzorky byly dány na 12 h do termobloku vyhřátého na teplotu 70 °C. Po uplynutí této doby byl celý objem zfiltrován přes filtrační papír do Petriho misky. Po odpaření rozpouštědla byla vzniklá fólie přemístěna do sterilní Petriho misky, zalepena a uchována ve tmě pro následnou analýzu.

### **3.7.1 Stanovení molekulové hmotnosti**

Z připravených fólií byly poté připraveny vzorky na SEC-MALS. Vzorky byly připraveny v koncentraci 2 mg/ml. Objem rozpouštědla byl 1,5 ml. Vzorky byly nachystány do vialek a poté zahřáty na 70 °C. Po rozpuštění fólie byl vzorek přefiltrován pomocí stříkačkového filtru do čisté vialky a připraven na analýzu. Molekulová hmotnost byla měřena přístrojem SEC-MALS. Pro každý vzorek bylo měření provedeno třikrát, metodou 0,6 ml/min chloroform, nástřik 50 ml, kolona: PL gel mixed-C.

### **3.8 Pozorování vzorků fekálních pelet stereomikroskopem**

Vzorky fekálních pelet z prvního i druhého pokusu byly pozorovány stereomikroskopem Zeiss Stemi 2000-C s připojenou kamerou Zeiss AxioCam ERc 5 s. Vzorky byly vybrány z druhé frakce, kvůli nejvyššímu obsahu PHB. Jedná se o částice velikosti přibližně 0,4 mm. Po nanesení na podložní sklíčko byly částice pozorovány s přiblížením 500 µm. Byly pořízeny snímky jednotlivých vzorků.

### **3.9 Kjeldahlova metoda**

#### **3.9.1 Mineralizace vzorku**

Bylo naváženo 0,5 g vzorku. Navážka byla zabalena do filtračního papíru, aby bylo zabráněno ulpění vzorku na stěnách trubice. Takto připravený vzorek byl vložen do mineralizační trubice. Poté byly přidány 2 g katalyzátoru a 10 ml koncentrované kyseliny sírové. Následně byly mineralizační trubice vloženy do mineralizační jednotky KT-8s. Mineralizace trvala 3 h. Nejprve došlo k zahřátí na teplotu 460 °C, tato teplotu byla udržována po dobu jedné hodiny, a poté následovalo půlhodinové chlazení. V průběhu mineralizace byl veškerý přítomný dusík převeden na síran amonný.

#### **3.9.2 Standardizace roztoků**

Byl připraven 0,1 M roztok NaOH. Pro stanovení jeho přesné koncentrace byla provedena standardizace tohoto odměrného roztoku. Byl připraven roztok dihydrátu kyseliny šťavelanové o koncentraci 0,5 M. Navážka 0,6306 g byla kvantitativně převedena do odměrné baňky na 100 ml. Z tohoto roztoku bylo odpipetováno 10 ml do titrační baňky, přidány tři kapky 1% fenolftaleinu a titrováno NaOH do slabě růžového zbarvení. Standardizace byla provedena třikrát.

Roztok kyseliny sírové byl připraven o koncentraci 0,05 M. Tento roztok byl standardizován NaOH. Do titrační baňky bylo napipetováno 10 ml 0,05 M roztoku kyseliny sírové a byl přidán Tashiruv indikátor. Titrováno bylo do zeleného zbarvení. Standardizace byla provedena třikrát.

### 3.9.3 Stanovení celkového dusíku

Mineralizát byl z mineralizační trubice kvantitativně převeden do odměrné baňky na 100 ml a doplněn destilovanou vodou po rysku. Baňka byla dobře promíchána, a poté z ní bylo odebráno 10 ml do destilační trubice. Dále bylo přidáno pár kapek 1% fenolftaleinu a trubice byla vložena do destilačního přístroje VAPODEST 200. K mineralizátu bylo automaticky přidáno 80 ml 33% hydroxidu sodného. Po přidání došlo k uvolnění amoniaku, který byl predestilován s vodní parou do předlohy, která obsahovala 25 ml standardizovaného roztoku kyseliny sírové. Po ukončení destilace byl k destilátu přidán Tashirův indikátor a destilát byl titrován standardizovaným roztokem hydroxidu sodného do zeleného zbarvení. Obsah celkového dusíku byl stanoven dle rovnice 1. Tato hodnota však zahrnuje i dusíkaté látky nebílkovinné povahy. Obsah hrubých bílkovin byl stanoven pomocí univerzálního přepočtového koeficientu 6,25.

$$w_N = \frac{2 \cdot M_N \cdot (V_{H_2SO_4} \cdot c_{H_2SO_4} - \frac{V_{NaOH} \cdot c_{NaOH}}{2})}{m_{vzorek}} \cdot 100 \% \quad (1)$$

### 3.10 FTIR analýza krmiv a fekálních pelet

Analýza byla provedena se všemi typy krmiv a fekálních pelet z obou pokusů metodou zeslabeného úplného odrazu infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací. Vzorek byl nanesen na zabudovaný krystal a proměřen spektrometrem iS50 FTIR.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Obsah PHB v bakteriální biomase

Po každé kultivaci byl stanoven obsah PHB v bakteriální biomase, a to dle postupu popsaného v kapitole 3.3 a 3.4. Kultivace proběhly v celkovém objemu 8 l. Pro následné využití biomasy jakožto krmiva bylo nutné, aby obsah PHB byl v rozmezí 50-70 % a to z důvodu potřeby živin pro růst červů. Nami vyprodukovaná biomasa do tohoto rozpětí spadá, je tedy pro tento účel vhodná. Obsah PHB v krmivech je uveden v tabulce 7.

Tabulka 7, hmotnost připravené biomasy, obsah PHB v biomase, koncentrace biomasy v g/l bez PHB

kultivace	celková hmotnost [g]	PHB [%]	biomasa [g/l]
H16L 3 l	22,404	61,35 ± 10,30	2,69 ± 0,96
H16L 5 l	42,717	62,68 ± 5,30	3,85 ± 0,70
H16S 5 l	44,386	51,36 ± 11,30	4,64 ± 1,30
STL 5 l	15,226	68,25 ± 2,06	1,41 ± 0,09

### 4.2 První experiment s moučnými červy

První experiment s moučnými červy byl popsán v kapitole 3.6.1. V průběhu deseti dní byli mouční červi pozorováni a krmeni otrubami a biomasou H16L. Důvodem tohoto pokusu bylo zjistit, zda a jak bude probíhat biologická izolace PHB pomocí moučných červů starších 30 dnů. V předchozích studiích byli vždy použiti červi staří 30-35 dní [28, 30, 33]. Stáří červů je důležitý faktor, čím starší jsou tím méně přijímají krmiva a začínají se chystat na další fázi svého vývoje, a to na zakuklení. Nami zakoupení červi byli staří 1-3 měsíce. Po dobu pokusu jsme sledovali hlavně proces přetvoření krmiva ve fekální pelety. U pozorování červů jsme se zaměřili na zakuklení či úmrtí jedinců, nebo na možné známky kanibalismu. V této části jsme červy pouze sledovali, ale nedošlo k žádnému přesnému vyhodnocení změn v jejich složení či hmotnosti, k tomuto došlo až u druhého pokusu.

Po dobu trvání prvního pokusu bylo zaznamenáno zakuklení celkem 4 jedinců z kontrolního vzorku. Také došlo k úmrtí několika jedinců, ale nebyly pozorovány žádné známky kanibalismu. Je zajímavé, že k zakuklení došlo pouze u červů krmených otrubami, to mohlo být způsobeno pouze náhodným přerozdělením červů před začátkem pokusu, nebo typem krmiva. Vývoj moučného červa jde ovlivnit zvýšením teploty a krmením potravou s vyšším obsahem vody. Oba vzorky byly chovány při stejných podmínkách, tudíž by důvodem mohl být vyšší obsah vody v otrubách. Avšak první kukla se vyskytla již čtvrtý den pokusu a je velmi nepravděpodobné, že by za tuto dobu typ krmiva ovlivnil vývoj červů do takové míry. Pravděpodobnější je, že mezi zakoupenými jedinci byli již červi v pozdní fázi larválního vývoje, a náhodným rozdělením se vyskytli ve stejné chovné nádobě.

Po deseti dnech byli červi zváženi a také bylo zváženo zbylé krmivo. U kontrolního vzorku bylo červy zkrmeno veškeré krmivo u H16L zbylo 13,63 % celkové navážky. Za dobu našeho pokusu došlo také k úbytku hmotnosti u červů krmených H16L o 13,62 % a u kontrolního vzorku o 15,11 %.

Při pozorování jsme se zaměřili i na vznik fekálních pelet, a to hlavně u vzorku krmeného H16L. U tohoto vzorku byl třetího dne zaznamenán výskyt bílých pelet. Barva krmné biomasy byla růžovošedá, na Obrázek 3 můžeme vidět vedle růžovošedých pelet i pelety čistě bílé. Barva krystalického PHB je bílá, je tedy možné že čistě bílé pelety by mohly obsahovat především PHB. Po uplynutí deseti dní byly fekální pelety přesívány přes soustavu sít s velikostí ok 0,5-0,1 mm. Vzniklo tak pět frakcí podle velikosti pelet. V tabulce 8 jsou uvedeny hmotnosti jednotlivých frakcí, nejvyšší zastoupení u krmiva H16L má frakce 3 o velikosti pelet 0,3 mm u otrub frakce 4 s velikostí 0,4 mm.



Obrázek 3, fekální pelety v průběhu prvního pokusu

Tabulka 8, hmotnosti jednotlivých frakcí po přesívání soustavou sít s velikostí ok 0,5-0,1 mm, obsah PHB ve frakcích získaných od vzorku krmeného H16L

frakce	$m_{\text{otruby}}$ [g]	$m_{\text{H16L}}$ [g]	$\text{PHB}_{\text{krmivo H16L}}$ [%]	$\text{PHB}_{\text{pelety H16L}}$ [%]
Frakce 1	1,474	0,8904	$62,01 \pm 0,95$	$43,85 \pm 1,9$
Frakce 2	4,448	4,8806		$54,02 \pm 0,8$
Frakce 3	6,041	5,7577		$48,06 \pm 0,4$
Frakce 4	6,942	4,9573		$42,27 \pm 7,4$
Frakce 5	0,065	2,5329		$44,18 \pm 0,2$

### 4.2.1 Přečištění fekálních pelet

Tabulce 8 ukazuje obsah PHB v jednotlivých frakcích fekálních pelet. Tento obsah je nižší než původní obsah PHB v krmivu H16L. Z tohoto důvodu bylo provedeno přečištění, a to u frakce 2, která má nejvyšší obsah PHB. Jako činidla byly použity NaOH 0,5 M, NaOH 1 M a SDS 1% a SDS 2%, a to na základě jejich použití ve studiích Kunasundari et al. v roce 2013 [26], Murugan et al. v roce 2016 [28] a Ong et al. v roce 2018 [30]. Postup přečištění byl dle kapitoly 3.6.2. V tabulce 9 můžeme vidět výsledky přečištění jednotlivými činidly. Nejvyšší čistoty bylo dosaženo použitím NaOH 1 M.

Tabulka 9, schopnost jednotlivých činidel odstranit nečistoty z fekálních pelet.

činidlo	obsah PHB před přečištěním [%]	obsah PHB po přečištění [%]
NaOH 0,5 M	54,02 ± 0,8	88,98 ± 0,30
NaOH 1 M		91,06 ± 0,30
SDS 1%		84,46 ± 0,80
SDS 2%		82,07 ± 1,95

### 4.3 Druhý experiment s moučnými červy

V tomto pokusu byli mouční červi krmeni čtyřmi typy krmiva a to H16L, H16S, STL a otrubami. Počáteční navážka červů byla průměrně 28 g a byli krmeni 5 % své hmotnosti. Každý den byli červi zvaženi stejně tak fekální pelety a zbylé krmivo. I v průběhu tohoto pokusu došlo k zakuklení celkem 17 jedinců. V tabulce 10 je uveden počet kukel v jednotlivých vzorcích, nejvyšší počet zakuklení byl u vzorku krmeného otrubami a nejmenší u vzorku H16S. Procento přeživších bylo ve všech případech nad 96 %, ale různilo se dle typu krmiva. K mrtvým jedincům byli přidáni i jedinci zakuklení, protože ti byli také odstraněni z chovné nádoby. U kontrolního vzorku byl zaznamenán kanibalismus, ale pouze sedmého dne a u dvou jedinců. V průběhu pokusu byl pozorován úbytek hmotnosti krmených červů stejně jako u pokusu jedna. Tento úbytek byl vyjádřen v procentech a je uveden v tabulce 10.

Ve předchozích studiích byl vždy zaznamenán nárůst v hmotnosti červů, je zde tedy jasný vliv stáří červů, jelikož námi použítí byli 1-3 měsíce staří [30, 33]. Jak bylo již zmíněno červi, kteří se chystají na zakuklení přijímají méně potravy a v důsledku toho ztrácí část své hmotnosti. Také by důvodem snížení hmotnosti mohl být nedostatečný přísun krmiva či jeho složení. Avšak oba tyto důvody vyvrací fakt, že u všech vzorků zbylo krmivo u H16L 41,63 %, H16S 44,20 %, STL 23,00 % a u otrub 0,94 %.



Tabulka 10, získaná data z průběhu experimentu dvě s moučnými červy

vzorek	počet kukel	procento přeživších [%]	úbytek hmotnosti [%]	zbylé krmivo [%]
otruby	7	96,07	8,14	0,94
H16L	5	97,84	13,38	41,63
H16S	1	98,62	12,54	44,20
STL	4	98,28	10,37	23,00

Dále byla pozorována konverze krmiva na fekální pelety. Tabulka 11 udává průměrné množství pelet vyprodukovaných každý den, celkový zisk pelet a také každodenní vstřebanou část krmiva neboli přírůstek hmotnosti červů. Z dat vyplývá, že nejvíce pelet bylo získáno u vzorku STL a to 7,267 g poté u otrub 6,389 g, H16L 5,3 g a nejméně u H16S 4,906 g. I když vzorek STL vyprodukoval nejvíce pelet neměl nejvyšší přírůstek hmotnosti za den, ten měl kontrolní vzorek. To souvisí se složením krmiva. Zásadní složkou krmiva, které může zásadně ovlivnit výslednou výživovou hodnotu, jsou u bakteriální biomasy PHB, jehož obsah v biomase je u STL nejvyšší, a to 68,25 %. U dalších typů krmiv obsah PHB tvořil 62,01 % H16L a 51,36 % u H16S. Dalším faktorem ovlivňujícím krmivo jsou bílkoviny viz tabulka 14. U otrub jsou důležitou složkou bílkoviny a polysacharidy. Námí stanovený obsah bílkovin byl 17,29 % dle tabulky 14 a obsah polysacharidů byl převzat ze studie Beaugrand et al. z roku 2004, kde byl stanoven na 56,8 % [44]. Jedinci konzumující biomasu měli vyšší příjem proteinů než jedinci krmení otrubami. A přes to byl přírůstek hmotnosti u otrubového vzorku vyšší. Z toho lze usuzovat, že použití mouční červi preferují stravu bohatou na polysacharidy. Dalším důkazem tohoto tvrzení je také fakt, že vzorek krmený otrubami má nejméně zbylého krmiva. Po dobu trvání experimentu byl zaznamenán stoupající trend ve zbylém krmivu u všech vzorků. U otrub a STL začalo krmivo zůstat až od sedmého dne u H16L a H16S již od prvního. K produkci bakteriální biomasy STL byla použita jako uhlíkový zdroj xylóza. Právě použití sacharidu k produkci biomasy je možný důvod, proč toto krmivo bylo červy preferováno.

Tabulka 11, množství poskytnutého krmiva, získaných fekálních pelet a zbylého krmiva. Pátý sloupec udává průměrnou každodenní konverzi krmiva ve fekální pelety a šestý každodenní průměrné množství vstřebaného krmiva, vztaženo na hodnotu zkonsumovaného krmiva

vzorek	$m_{\text{krmivo}}$ [g]	$m_{\text{pelety}}$ [g]	$m_{\text{zbylé krmivo}}$ [g]	konverze v pelety [g]	přírůstek $m_{\text{červů}}$ [g]
otruby	14,045	6,389	0,146	$0,788 \pm 0,09$	$0,601 \pm 0,102$
H16L	14,032	5,300	5,842	$0,589 \pm 0,20$	$0,172 \pm 0,500$
H16S	14,028	4,906	6,201	$0,545 \pm 0,30$	$0,169 \pm 0,130$
STL	14,046	7,267	3,231	$0,807 \pm 0,30$	$0,238 \pm 0,200$

Získané fekální pelety byly přesívány přes soustavu sít. Vzniklo tak pět frakcí o velikosti částic 0,5-0,1 mm. Velikost pelet závisí na velikosti červů, a ta na jejich stáří. U vzorku H16L, H16S a otrub je nejvíce částic o velikosti 0,3 mm u STL o velikosti 0,4 mm. Z toho vyplývá, že červi krmení STL byli starší. Dále byl u jednotlivých frakcí stanoven obsah PHB dle postupu v kapitole 3.4. Nejvyšší obsah byl stanoven u všech typů ve frakci 2. U krmiva H16L a STL byl u pelet stanoven nižší obsah PHB než v původní biomasě viz Tabulka 12. U frakce 2 byl rozdíl mezi původní biomasou a peletami pouze 1,12 % u H16L a u STL 0,46 %. Nejlepšího výsledku dosáhl vzorek H16S, u kterého byl ve všech frakcích stanoven obsah PHB vyšší než v krmivu (51,36 %) u frakce 2 až 63,73 %. Rozdíl mezi krmivy je ve způsobu sušení a také obsahu PHB. H16S byl jako jediný typ krmiva sušen nikoli lyofilizován a také obsah PHB v tomto krmivu je o více než 10 % nižší. Ve studii od Ong et. al z roku 2018 byl zaznamenán vyšší obsah PHA po biologické izolaci, a to z 55 % na 59 % a ve studii od Zainab-L et. al z roku 2019 také [30, 33]. V této práci byly použity dva typy biomasy, a to promytá a nepromytá. U nepromyté byl obsah PHA 68 % a u fekálních pelet 72 %. Promytá biomasa měla lepší výsledky, z původních 70 % bylo dosaženo 82 % PHA po biologické izolaci [33]. V obou studiích byla použita biomasa lyofilizována.

*Tabulka 12, hmotnosti získaných frakcí a obsah PHB po biologické izolaci*

<b>krmivo</b>	<b>PHB [%]</b>	<b>frakce</b>	<b>m<sub>frakce</sub> [g]</b>	<b>PHB [%]</b>
H16L	62,01 ± 0,95	F2	1,3836	60,89 ± 1,9
		F3	2,6805	59,68 ± 0,0
		F4	0,8042	59,11 ± 2,9
		F5	0,4833	56,66 ± 2,9
		F2 po 24 h	0,0650	37,87 ± 1,9
H16S	51,36 ± 11,30	F2	2,4083	63,73 ± 0,04
		F3	2,7733	59,19 ± 0,95
		F4 +F5	0,4203	58,47 ± 0,60
		F2 po 24 h	0,0891	46,41 ± 1,70
STL	68,25 ± 2,06	F1	0,2561	58,22 ± 0,0
		F2	4,6781	67,79 ± 0,0
		F3+F4	2,9182	66,96 ± 1,8
		F2 po 24 h	0,112	48,73 ± 9,7

Po ukončení pokusu byli červi ponecháni 24 h bez krmiva. Po uplynutí této doby byli červi dále zpracováni dle kapitoly 3.6.3 a 3.6.4. Obsah chovné nádoby byl přesíván přes síto s velikostí ok 0,5 mm, u takto získaných pelet byl určen obsah PHB dle postupu v kapitole 3.4. Obsah PHB byl stanovován z důvodu bílého zbarvení těchto pelet. Důvodem tohoto stanovení bylo zjistit, zda bíle zbarvené pelety mají vyšší obsah PHB než pelety růžové. Předpoklad pro toto tvrzení byl, že barva krystalického PHB je bílá. To však bylo vyvráceno, obsah PHB byl stanoven u H16L 37,87 %, H16S 46,41 %, STL 48,73 %. Bílé zbarvení pelet nemusí znamenat, že se jedná o pelety s vyšším obsahem PHB.

### 4.3.1 Přečištění

V prvním pokusu s červy bylo určeno jako nejlepší činidlo k přečištění 0,1 M NaOH. Tímto roztokem bylo provedeno přečištění dle postupu v kapitole 3.6.2 také u dalších bakteriálních biomas. Tabulka 13 ukazuje obsah PHB před a po přečištění. U prvního pokusu bylo tímto procesem dosaženo čistoty 91,06 % z původních 54,02 %. V tomto stanovení jsme získali čistotu u H16L 82,12 %, H16S 78,66 % a STL 87,61 %. Získaná čistota je nižší než u prvního pokusu, to mohlo být způsobeno špatným zhomogenizováním získaného materiálu před přípravou vzorku na plynovou chromatografii. Čistota PHB při použití 0,1 M NaOH byla 92-93 % ve studii z roku 2018 od Ong et. al. Proces přečištění byl však komplikovanější a pro uplatnění ve větším měřítku špatně realizovatelný. V našem postupu byly pelety míchány 1 h v NaOH při 50 °C. V porovnání bylo naším postupem docíleno stejného výsledku jako u Ong et. Al z roku 2018, alespoň u prvního pokusu [30]. Nízká čistota pelet je způsobena zbytky biomasy, kusy červích svleček a obsahem proteinů ve fekálních peletách.

Tabulka 13, přečištění fekálních pelet roztokem NaOH 0,1 M

frakce 2	obsah PHB před přečištěním [%]	obsah PHB po přečištění [%]
H16L	60,89 ± 1,90	82,12 ± 2,7
H16S	63,73 ± 0,04	78,66 ± 1,5
STL	67,79 ± 0,00	87,61 ± 0,4

## 4.4 Obsah hrubých bílkovin

### 4.4.1 Obsah hrubých bílkovin v krmivu

Obsah hrubých bílkovin byl určen dle postupu v kapitole 3.9. Jako přepočtový koeficient byla pro obě stanovení použita univerzální hodnota 6,25. Tabulka 14 ukazuje procentuální obsah hrubých bílkovin v jednotlivých typech krmiva. H16L a H16S mají zastoupení bílkovin totožné a to 27,99 %. Nižší obsah má STL 21,87 %, zde se však jedná o jiný druh bakterie, a to *Schlegelella thermodepolymerans*. Důvodem rozdílného obsahu bílkovin by mohl být i obsah PHB, v našem případě je však zastoupení bílkovin ve vzorcích H16L a H16S stejné

a obsah PHB se různí o 10,56 %. Z výsledků vyplývá, že obsah bílkovin závisí na druhu bakterie i na obsahu PHB, ale pouze u větších rozdílů v obsahu PHB. Záleží tedy na syntéze a produkci biomasy. Obsah hrubých bílkovin v otrubách byl stanoven na 17,29 % což spadá do rozmezí 13,2–18,4 % [45].

#### 4.4.2 Obsah hrubých bílkovin v červí moučce

V kapitola 3.9 je popsán postup mineralizace a následné stanovení obsahu hrubých bílkovin ve vzorcích červí moučky vyrobené usušením a rozemletím červů z pokusu dva. V tabulce 14 můžeme nalézt procentuální zastoupení bílkovin v červí moučce. Nejvyšší obsah bílkovin byl stanoven u vzorku STL 65,47 %, dále u vzorků H16S 57,53 %, H16L 56,66 % a nejnižší u kontrolního vzorku 52,27 %. Obsah hrubých bílkovin v moučce je dán složením a množstvím přijatého krmiva. Vzorek STL má nižší zastoupení bílkovin v krmivu, ale červy bylo pozřeno 73,00 % krmiva v porovnání s H16L a H16S, které mají obsah bílkovin 27,99 %, ale červi pozřeli pouze 58,37 % H16L a 55,80 % H16S.

U kontrolního vzorku bylo zkrmeno 99,06 %, obsah bílkovin byl u otrub stanoven na 17,29 % a v červí moučce na 52,27 %. Nižší obsah bílkovin je způsoben vyšším obsahem lipidů, kvůli stravě bohaté na polysacharidy např. ve studii od Hong et al. z roku 2020 byl obsah stanoven na 53,22 % [46] či u Cho et al. z roku 2021 na 54,88 % [47]. Složení se různí i stářím jedinců, ve studii od Zainab-L et al. z roku 2019, kde byli použiti jedinci staří 30 dní a bylo dosaženo 79,00 % proteinů u červů krmených promytou biomasou *C. necator* H16 a 62,00 % u červů krmených otrubami [33].

Tabulka 14, obsah hrubých bílkovin v krmivu a červí moučce

vzorek	obsah hrubých bílkovin v krmivu [%]	obsah hrubých bílkovin v červí moučce [%]
STL	21,87 ± 1,20	65,47 ± 1,20
H16L	27,99 ± 2,50	56,66 ± 1,30
H16S	27,99 ± 2,50	57,53 ± 0,02
Otruby	17,29 ± 0,07	52,27 ± 0,00

#### 4.5 Obsah vody v moučných červech

Obsah vody v červí moučce byl stanoven sušením červů a jejich následným rozemletím. Průměrně 5 g červů bylo sušeno 72 h při 70 °C, poté pomleto a dále sušeno 72 h při 50 °C. Obsah vody byl určen z rozdílu původní navážky a usušené červí moučky. Obsah vody u červů krmených bakteriální biomasou STL, H16S, H16L je podobný a vyšší než u kontrolního vzorku. Mouční červi přijímají vodu z potravy, rozdíl v obsahu vody způsobuje tedy typ krmiva.

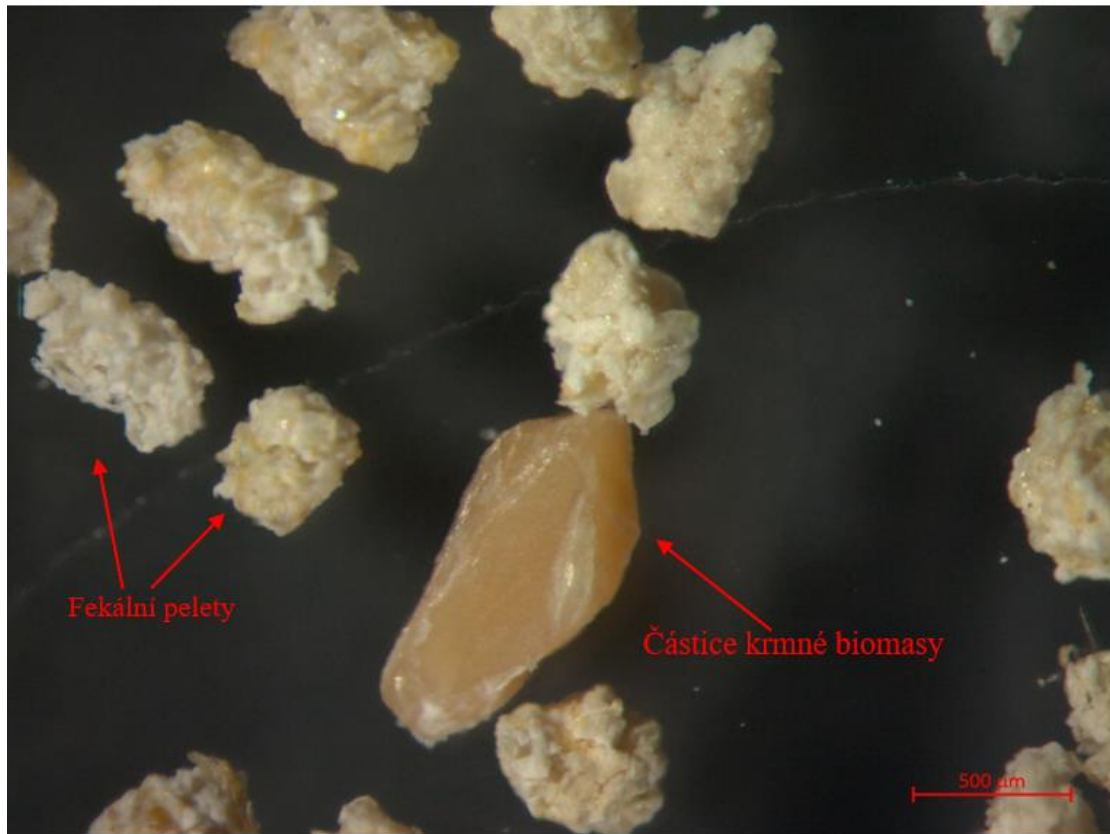
Tabulka 15, obsah vody v červí moučce po 72 h sušení při 70 °C a 72 h sušení při 50 °C

vzorek	$m_{\text{před sušením}} [\text{g}]$	$m_{\text{po sušení}} [\text{g}]$	obsah vody [%]
H16L	5,007	1,8264	64,21 ± 0,97
	5,005	1,7575	
H16S	5,004	1,7899	64,71 ± 0,70
	4,999	1,7413	
STL	5,006	1,7885	63,91 ± 0,50
	5,000	1,8225	
Otruby	5,000	2,0239	59,33 ± 0,30
	5,003	2,0440	

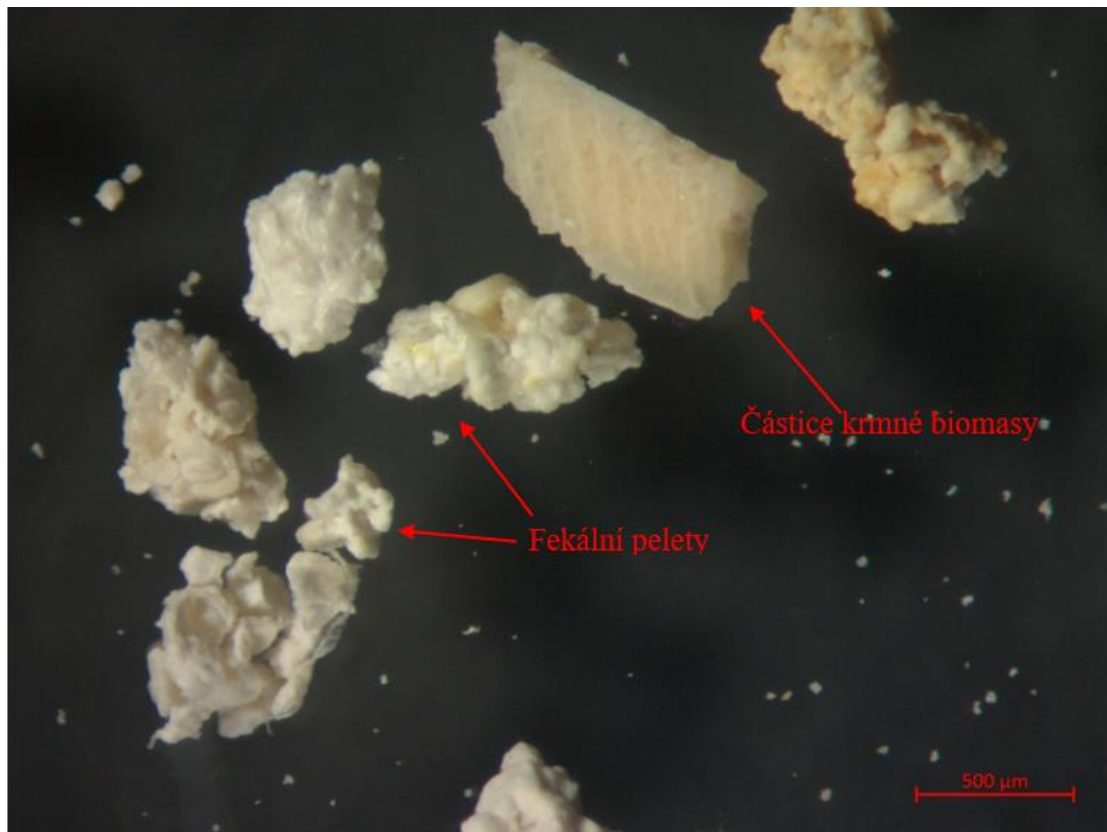
#### 4.6 Mikroskopické pozorování

Bylo provedeno mikroskopické pozorování fekálních pelet moučných červů krmených všemi typy krmiva, jedná se o vzorky H16S, otruby, STL a H16L z obou pokusů. Fekální pelety byly u všech vzorků z frakce 2 tedy velikosti 0,4 mm. Tato metoda byla provedena z důvodu porovnání fekálních pelet získaných od červů konzumujících otruby a biomasu, zjištění jejich tvaru a případné přítomnosti jiných částic, pořízené snímky jsou na obrázcích 4-8. Fekální pelety všech typů mají nepravidelný tvar podobný oválu se členitým povrchem. Zbarvení pelet se odvíjí od barvy krmiva, také místy můžeme najít hnědo-oranžové lesklé kusy svleček. Rozdílem mezi peletami červů krmených biomasou a těch krmených otrubami je zejména v barvě a v menší členitosti u pelet od otrubového vzorku, avšak tento rozdíl může být způsoben právě tmavší barvou, na které nejde členění dobře rozpoznat. U obrázků 4, 5, 6, 7 můžeme pozorovat výskyt částic s hladkým povrchem. Jedná se o částice zbylé biomasy o stejné velikosti jako pelety.

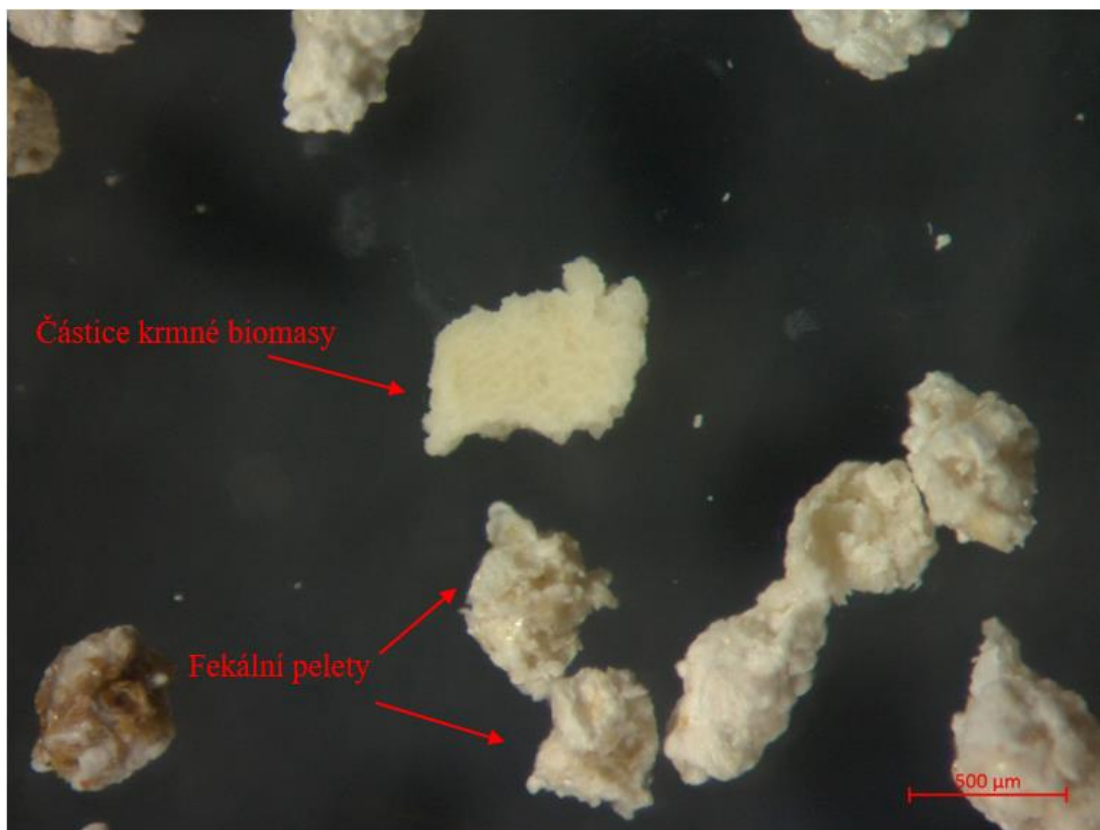
Na obrázku 4 můžeme vidět fekální pelety vzorku H16S, také se zde nachází hladká lesklá částice oranžové barvy, jedná se o zbylé krmivo. Na samotných fekálních peletách si můžeme povšimnout různého zbarvení. Toto zbarvení nám může pomoci rozdělit jednotlivé složky fekálních pelet. Bílá barva je PHB, oranžová nestrávená biomasa, oranžovo-hnědé lesklé kousky jsou části červích svleček.



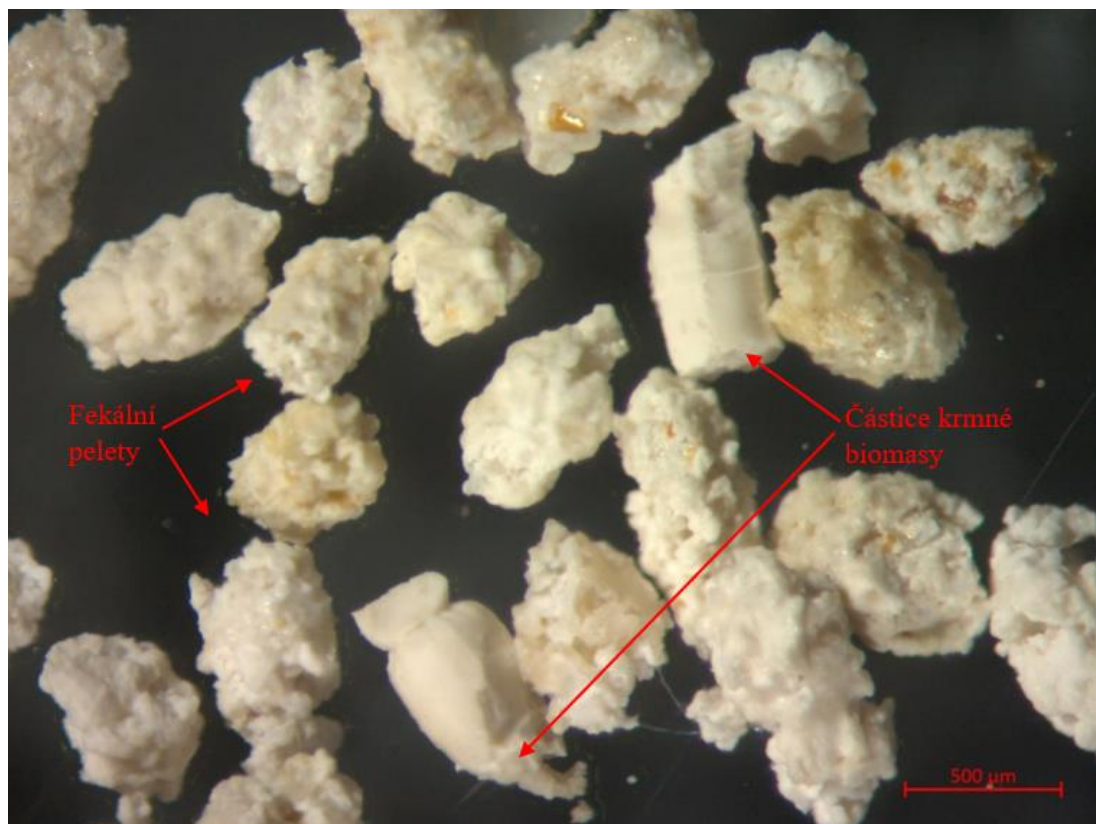
Obrázek 4, snímek fekálních pelet vzorku H16S



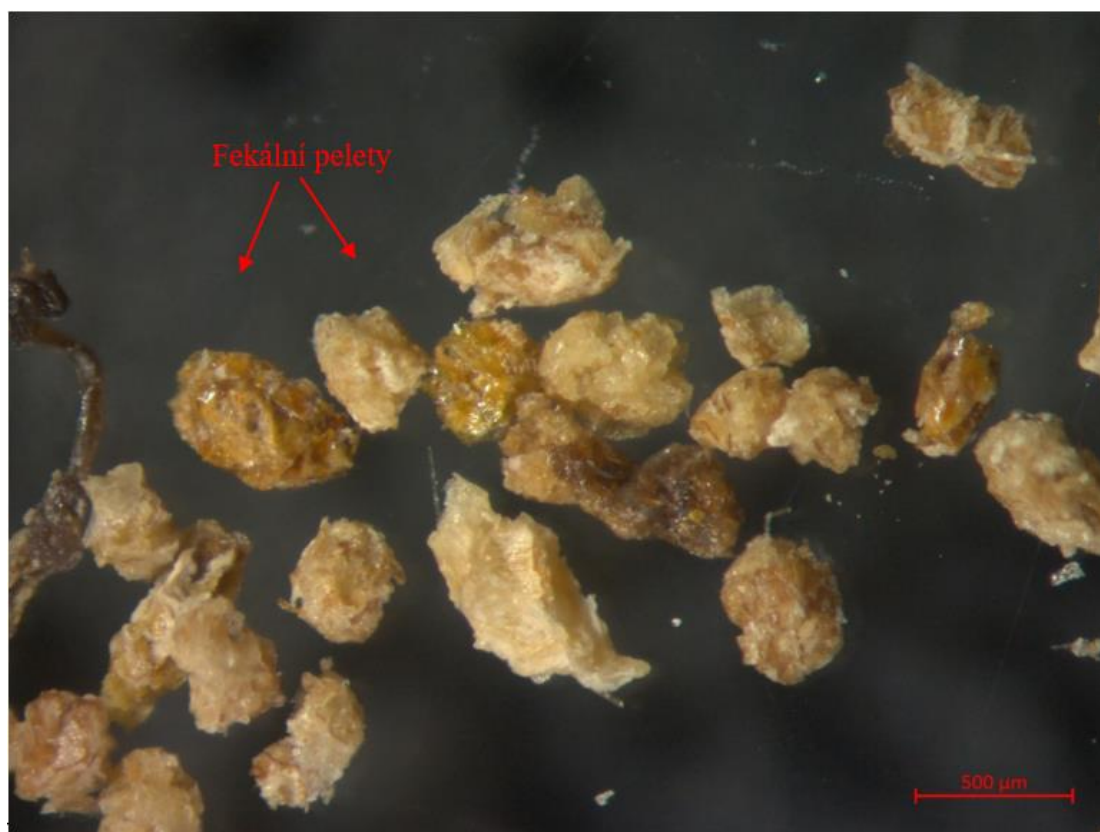
Obrázek 5, snímek fekálních pelet vzorku H16L z prvního pokusu



Obrázek 6, snímek fekálních pelet vzorku H16L z druhého pokusu



Obrázek 7, snímek fekálních pelet vzorku STL.



Obrázek 8, snímek fekálních pelet kontrolního vzorku

#### 4.7 Stanovení molekulové hmotnosti

Molekulová hmotnost byla změřena dle postupu v kapitole 3.7.1, každý vzorek byl proměřen třikrát a zprůměrován. Molekulová hmotnost PHB by měla být v rozmezí  $10^4$ – $3 \cdot 10^6$  Da, stanovené hodnoty spadají do tohoto rozmezí [48]. U vzorků H16S a STL se molekulová hmotnost snižuje s procesem biologické izolace a přečištěním. Avšak u H16L dojde k zvýšení Mw po biologické izolaci a poté k snížení po přečištění. Z dat vyplývá, že po přečištění dochází k výraznější ztrátě molekulové hmotnosti než po samotné biologické izolaci PHB. To je způsobeno procesem čištění, který zahrnuje ztrátu původní granulové formy pelet a také vystavení teplotě 50 °C.

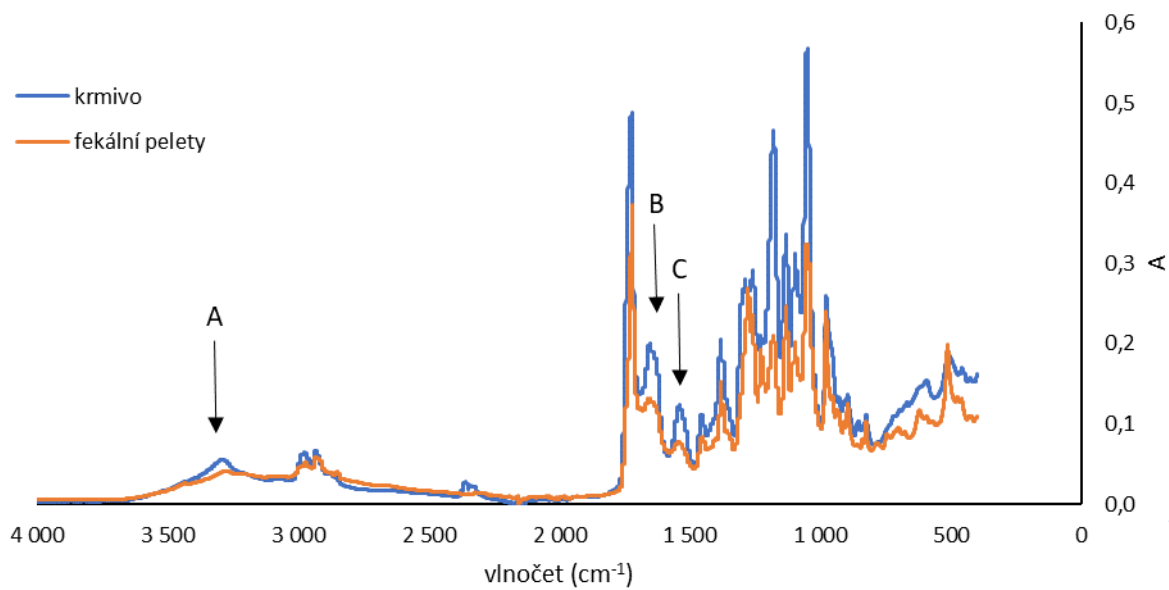


Tabulka 16, molekulové hmotnosti ( $M_w$ ) PHB v biomase, fekálních peletách a přečištěných fekálních peletách., hodnota indexu polydisperzity  $\bar{D}$

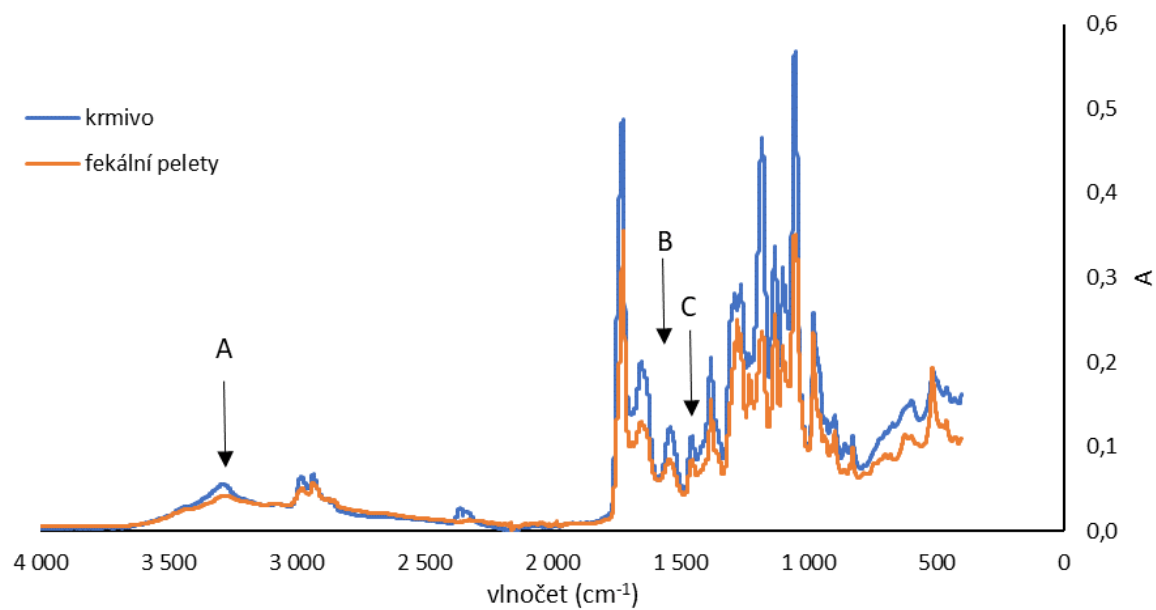
vzorek	$M_w$ [kDa]	$\bar{D}$
H16L biomasa	193,3 ± 4,9	1,19 ± 0,04
H16L1 fekální pelety	451,87 ± 1,3	1,22 ± 0,04
H162 pelety druhý pokus	278,17 ± 11,6	1,26 ± 0,02
H16L1 přečištěné pelety	232,63 ± 7,5	1,44 ± 0,11
H16S biomasa	343,67 ± 9,4	1,29 ± 0,06
H16S fekální pelety	335,47 ± 5,8	1,29 ± 0,05
H16S přečištěné pelety	227,63 ± 5,8	1,44 ± 0,03
STL biomasa	1327,07 ± 24,4	1,13 ± 0,01
STL fekální pelety	1136,00 ± 24,9	1,26 ± 0,08
STL přečištěné pelety	750,43 ± 10,1	1,33 ± 0,07

#### 4.8 FTIR analýza

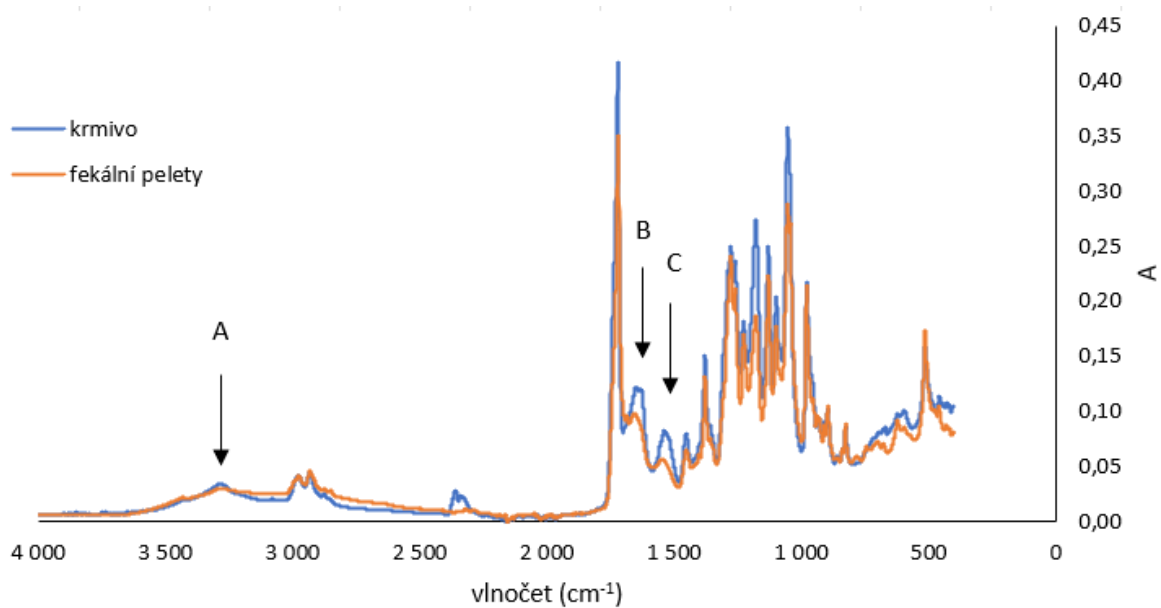
FTIR analýza byla provedena pro zjištění míry úspěšnosti biologické izolace. V průběhu biologické izolace by mělo dojít ke snížení obsahu proteinů. U FTIR spekter odpovídají proteinům tři píky. První pík je okolo hodnoty  $3300\text{ cm}^{-1}$  (A) zaznamenává absorpci amidové A vazby, k absorpci amidové I vazby dochází u hodnoty  $1640\text{ cm}^{-1}$  (B) a hodnota  $1540\text{ cm}^{-1}$  (C) odpovídá amidové vazbě II [49]. Obrázky 9-13 znázorňují FTIR spektra použitého krmiva a získaných fekálních pelet a jsou zde zaznačeny i výše popsané píky proteinů. U všech druhů spekter došlo ke snížení píku A, B a C. Obsah proteinů je po průchodu trávicím traktem moučného červa nižší než v jeho krmivu.



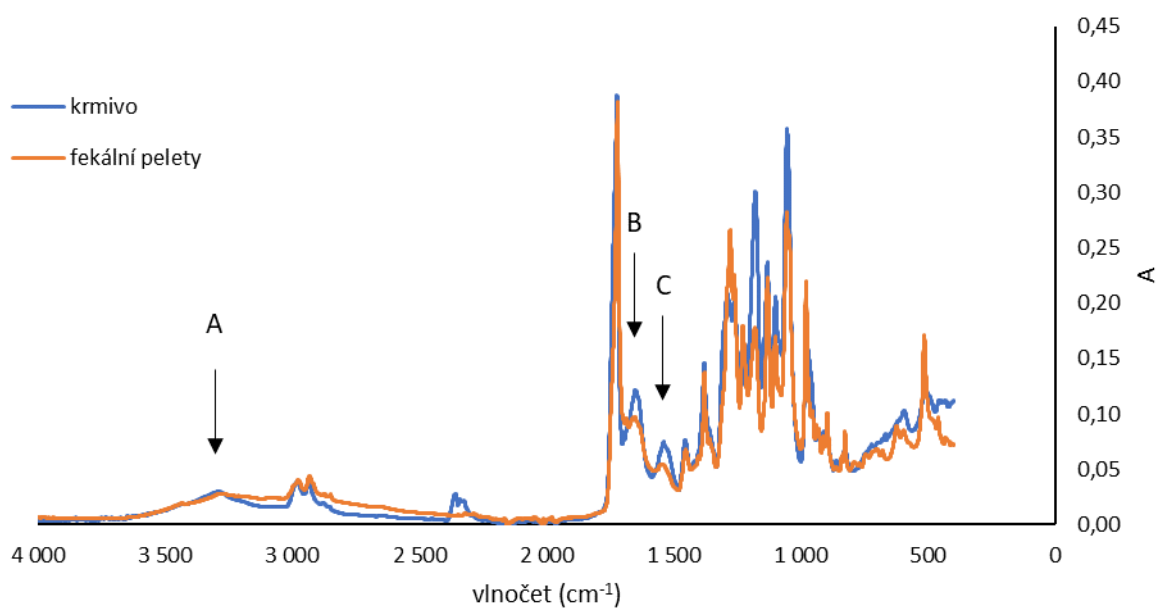
Obrázek 9, FTIR spektrum vzorku H16L z prvního pokusu



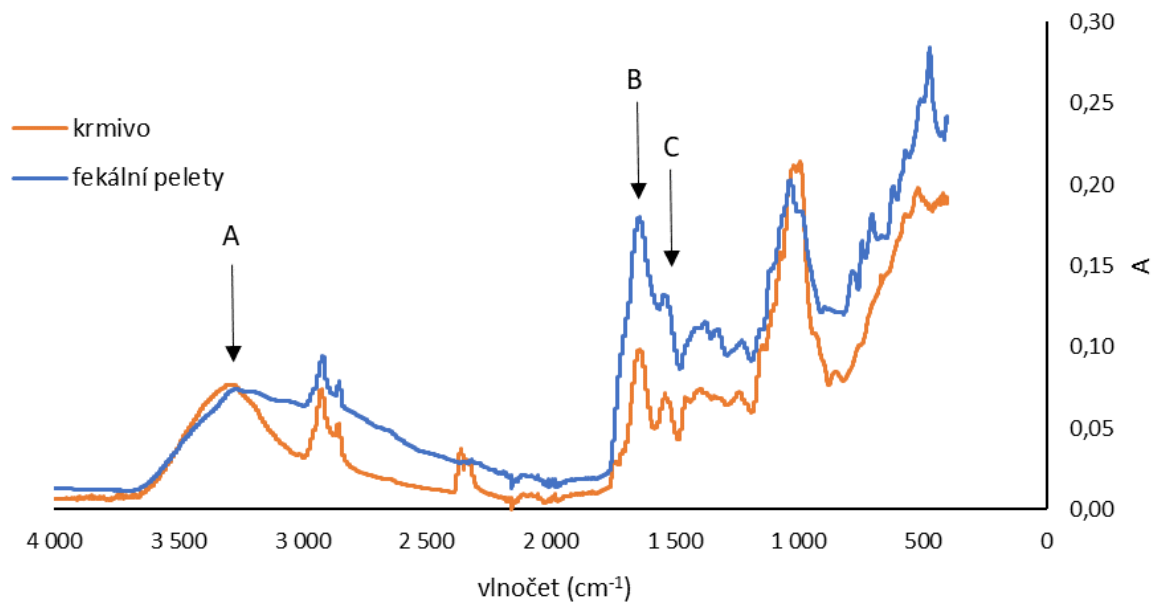
Obrázek 10, FTIR spektrum vzorku H16L z druhého pokusu



Obrázek 11, FTIR spektrum vzorku H16S



Obrázek 12, FTIR spektrum vzorku STL



Obrázek 13, FTIR spektrum vzorku otrub

## 5 ZÁVĚR

Tato práce se zabývá metodou biologické izolace PHA moučnými červy. Jedná se o metodu, kde dochází k oddělení PHA od zbytku buněčných struktur průchodem trávicím traktem moučného červa. V této práci byly použity dvě bakterie pro produkci bakteriální biomasy s obsahem PHA, a to *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344 a *Cupravidus necator* H16 CCM 3726.

Nejprve byly připraveny jednotlivé typy krmiva pro moučné červi. Kultivace bakteriální biomasy se lišila dle druhu bakterie. Vyprodukovaná biomasa byla následně analyzována pro zjištění obsahu PHB a zpracována na krmivo lyofilizací či sušením. Obsah PHB v jednotlivých typech krmiva byl určen v rozmezí 50–70 %. Experiment s moučnými červy proběhl dvakrát za stejných podmínek a trval deseti dní. V prvním pokusu byla jako krmivo použita lyofilizovaná biomasa H16L a pro kontrolní vzorek otruby. V průběhu deseti dní byla pozorována konverze krmiva do formy fekálních pelet. Získané fekální pelety byly po ukončení pokusu přesívány přes soustavu sít pro určení jejich velikosti a následně byl určen obsah PHB v každé frakci. Obsah PHB v získaných frakcích byl nižší než v původní bakteriální biomase. Po dobu trvání pokusu také došlo k zakuklení 4 jedinců, úbytku hmotnosti moučných červů a u vzorku krmeného H16L nebylo zkonsumováno 13,63 % krmiva. V druhém experimentu s moučnými červy bylo použito stejné krmivo H16L a otruby jako v předchozím pokusu a také sušená biomasa H16S a lyofilizovaná biomasa STL. Fekální pelety získané v tomto pokusu od vzorku krmeného H16L a STL měly nižší obsah PHB než původní biomasa. Vzorek červů krmených H16S měl jako jediný vyšší obsah PHB ve fekálních peletách, a to až o 12,37 %. Procento přeživších bylo u všech vzorků vyšší než 96 %, a odvíjelo se především od počtu zakuklených jedinců. Také u tohoto pokusu byl pozorován úbytek hmotnosti a u všech vzorků nebylo zkonsumováno veškeré krmivo u H16S 44,20 %, H16L 41,63 %, STL 23,00 %, otrub 0,94 %.

Mouční červi v obou pokusech byli staří 1-3 měsíce. Stáří červů a složení krmiva jsou důvody, proč nebylo zkonsumováno veškeré krmivo. Mouční červi ve fázi před zakuklením přijímají méně potravy. Z pohledu použitého krmiva a jeho složení preferovali červi krmivo s nižším obsahem proteinů. Mikroskopickým pozorováním fekálních pelet bylo zjištěno, že u vzorků krmených biomasou se mezi fekálními peletami vyskytují i částice zbylé biomasy. Pozorováním bylo také zjištěno, že získané pelety mají různé barvy, které značí různé složení fekálních pelet. Pelety obsahují PHB i proteiny, v některých případech i kusy červích svleček. Obsah proteinů v peletách byl prokázán i FTIR analýzou. Nečistoty v biologicky izolovaném PHB jsou způsobeny zbylou biomasou, červími svlečkami a obsahem bílkovin v peletách. Vyšší čistoty bylo docíleno přečištěním fekálních pelet. K tomuto účelu bylo použito více činidel, ale nejlepší výsledky měl 0,1 M NaOH a to až 91,06 % u prvního pokusu.

Po ukončení pokusu dvě byla z moučných červů vyrobena červí moučka. Moučka byla analyzována na obsah hrubých bílkovin Kjeldahlovou metodou. Nejvyšší zastoupení hrubých bílkovin bylo stanoveno u vzorku STL nejnižší u kontrolního vzorku. Obsah bílkovin je ovlivněn množstvím zkonsumovaného krmiva a původním obsahem bílkovin.

Závěr této práce je, že biologická izolace je vhodná pro izolaci PHB, ale získané fekální pelety vyžadují přečištění například 0,1 M NaOH. Hlavní faktor, který ovlivňuje výsledek izolace je stáří červů. Zajímavé je, že nejlepšího výsledku z pohledu izolace PHB dosáhl vzorek H16S, kde při přípravě krmiva došlo k sušení nikoli k lyofilizaci. Jedním z cílů této práce měla být také charakterizace použitých červu pro další využití. Vyrobená červí moučka obsahovala vyšší množství bílkovin u vzorků krmených biomasou než u kontrolního vzorku krmeného otrubami. Také nebyl v červí moučce určen žádný obsah PHB. Červí moučka získaná z moučných červů použitých k biologické izolaci má dobré výživové hodnoty pro další využití v krmivářském či potravinářském průmyslu. Bakterie *Schlegelella thermodepolymerans* byla v této práci poprvé použita jako krmivo pro moučné červy a z výsledků je patrné, že mouční červi tuto biomasu preferují před bakteriální biomasou *C. necator* H16. Při produkci *C. necator* H16 byl použit fritovací olej, což je levnější zdroj uhlíku než xyulóza používaná u kultivace bakterie *Schlegelella thermodepolymerans*. Pro další práci na toto téma by bylo vhodné, kdyby stáří použitých moučných červů bylo maximálně jeden měsíc, nebo by případně byla snížena krmná dávka. Dále by bylo vhodné zaměřit se na sušení biomasy místo lyofilizace, a tím snížit cenu procesu. Cenu procesu také snižuje použitý fritovací olej využívaný pro kultivaci *C. necator* H16.

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

A	absorbance
Đ	index polydisperzity
FTIR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
H16L	lyofilizovaná biomasa <i>Cupravidus necator</i> H16
H16S	sušená biomasa <i>Cupravidus necator</i> H16
LDPE	polyethylen s nízkou hustotou
M <sub>w</sub>	molekulová hmotnost
PHA	polyhydroxyalkanoáty
PHB	poly(3-hydroxybutyrát)
PS	polystyren
PVC	polyvinylchlorid
SCP	mikrobiální protein
SDS	dodecylsírán sodný
STL	lyofilizovaná biomasa <i>Schlegelella thermodepolymerans</i>

## 7 CITACE

- [1] MIU, Dana-Maria, Mihaela Carmen EREMIA a Misu MOSCOVICI. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) as Biomaterials in Tissue Engineering: Production, Isolation, Characterization. *Materials* [online]. 2022, 15(4) [cit. 2022-05-21]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma15041410
- [2] ONG, Su Yean, Idris ZAINAB-L, Somarajan PYARY a Kumar SUDESH. A novel biological recovery approach for PHA employing selective digestion of bacterial biomass in animals. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2018, 102(5), 2117-2127 [cit. 2022-05-21]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-018-8788-9
- [3] ANDERSON, A J a E A DAWES. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews* [online]. 1990, 54(4), 450-472 [cit. 2022-05-19]. ISSN 0146-0749. Dostupné z: doi:10.1128/mr.54.4.450-472.1990
- [4] KESHAVARZ, Tajalli a Ipsita ROY. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 2010, 13(3), 321-326 [cit. 2022-05-19]. ISSN 13695274. Dostupné z: doi:10.1016/j.mib.2010.02.006
- [5] TAN, Giin-Yu, Chia-Lung CHEN, Ling LI, et al. Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. *Polymers* [online]. 2014, 6(3), 706-754 [cit. 2022-05-21]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym6030706
- [6] FURRER, Patrick, Roland HANY, Daniel RENTSCH, Andreas GRUBELNIK, Katinka RUTH, Sven PANKE a Manfred ZINN. Quantitative analysis of bacterial medium-chain-length poly([R]-3-hydroxyalkanoates) by gas chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, 1143(1-2), 199-206 [cit. 2022-05-19]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2007.01.002
- [7] SILVA, Juliana B., João R. PEREIRA, Bruno C. MARREIROS, Maria A.M. REIS a Filomena FREITAS. Microbial production of medium-chain length polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry* [online]. 2021, 102, 393-407 [cit. 2022-05-19]. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2021.01.020
- [8] SINGH, Mamtesh, Prasun KUMAR, Subhasree RAY a Vipin C. KALIA. Challenges and Opportunities for Customizing Polyhydroxyalkanoates. *Indian Journal of Microbiology* [online]. 2015, 55(3), 235-249 [cit. 2022-05-19]. ISSN 0046-8991. Dostupné z: doi:10.1007/s12088-015-0528-6
- [9] SHAHID, Salma, Sadia RAZZAQ, Robina FAROOQ a Zill-i-Huma NAZLI. Polyhydroxyalkanoates: Next generation natural biomolecules and a solution for the world's future economy. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2021, 166, 297-321 [cit. 2022-05-19]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.10.187



- [10] STEINBÜCHEL, A. a H. G. SCHLEGEL. Physiology and molecular genetics of poly(?-hydroxyalkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. *Molecular Microbiology* [online]. 1991, 5(3), 535-542 [cit. 2022-05-19]. ISSN 0950-382X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2958.1991.tb00725.x
- [11] PÖTTER, Markus a Alexander STEINBÜCHEL. Poly(3-hydroxybutyrate) Granule-Associated Proteins: Impacts on Poly(3-hydroxybutyrate) Synthesis and Degradation. *Biomacromolecules* [online]. 2005, 6(2), 552-560 [cit. 2022-05-19]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm049401n
- [12] JENDROSSEK, Dieter a René HANDRICK. Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates. *Annual Review of Microbiology* [online]. 2002, 56(1), 403-432 [cit. 2022-05-19]. ISSN 0066-4227. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.160838
- [13] RAY, Subhasree a Vipin Chandra KALIA. Biomedical Applications of Polyhydroxyalkanoates. *Indian Journal of Microbiology* [online]. 2017, 57(3), 261-269 [cit. 2022-05-19]. ISSN 0046-8991. Dostupné z: doi:10.1007/s12088-017-0651-7
- [14] KALIA, Vipin Chandra, Sanjay Kumar SINGH PATEL, Ramasamy SHANMUGAM a Jung-Kul LEE. Polyhydroxyalkanoates: Trends and advances toward biotechnological applications. *Bioresource Technology* [online]. 2021, 326 [cit. 2022-05-19]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2021.124737
- [15] PRAJAPATI, Karan, Radhika NAYAK, Arpit SHUKLA, Paritosh PARMAR, Dweipayan GOSWAMI a Meenu SARAF. Polyhydroxyalkanoates: An Exotic Gleam in the Gloomy Tale of Plastics. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2021, 29(7), 2013-2032 [cit. 2022-05-17]. ISSN 1566-2543. Dostupné z: doi:10.1007/s10924-020-02025-x
- [16] MARCINIAK, Paulina a Justyna MOŹEJKO-CIESIELSKA. What Is New in the Field of Industrial Wastes Conversion into Polyhydroxyalkanoates by Bacteria?. *Polymers* [online]. 2021, 13(11) [cit. 2022-05-19]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym13111731
- [17] OBRUCA, Stanislav, Sinisa PETRIK, Pavla BENESOVA, Zdenek a Libor EREMKA. Utilization of oil extracted from spent coffee grounds for sustainable production of polyhydroxyalkanoates. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2014, 98(13) [cit. 2022-05-19]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-014-5653-3
- [18] 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. 2022-05-19]. ISSN 1369703X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2019.107283

- [19] KOSSEVA, Maria R. a Edy RUSBANDI. Trends in the biomanufacture of polyhydroxyalkanoates with focus on downstream processing. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2018, 107(11), 762-778 [cit. 2022-05-21]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.3390/ma15041410
- [20] KURIAN, Neethu Sheri, Bannhi DAS, Arpit SHUKLA, Paritosh PARMAR, Dweipayan GOSWAMI a Meenu SARAF. Comparative analysis of various extraction processes based on economy, eco-friendly, purity and recovery of polyhydroxyalkanoate: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2021, 183(7), 1881-1890 [cit. 2022-05-17]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.06.007
- [21] ARAMVASH, Asieh, Fatemeh MOAZZENI ZAVAREH a Narges GHOLAMI BANADKUKI. Comparison of different solvents for extraction of polyhydroxybutyrate from *Cupriavidus necator*: State-of-the-art and latest developments. *Engineering in Life Sciences* [online]. 2018, 18(1), 20-28 [cit. 2022-05-17]. ISSN 16180240. Dostupné z: doi:10.1002/elsc.201700102
- [22] MANNINA, Giorgio, Dario PRESTI, Gabriela MONTIEL-JARILLO, Julián CARRERA a María Eugenia SUÁREZ-OJEDA. Recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from wastewater: A review. *Bioresource Technology* [online]. 2020, 297 [cit. 2022-05-21]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2019.122478
- [23] TUSÉ, Daniel, Martin W. MILLER, Somarajan PYARY, Kumar SUDESH a María Eugenia SUÁREZ-OJEDA. Single-cell protein: Current status and future prospects. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2009, 19(4), 273-325 [cit. 2022-05-21]. ISSN 0099-0248. Dostupné z: doi:10.1080/10408398409527379
- [24] ANUPAMA a P. RAVINDRA. Value-added food: Single cell protein. *Biotechnology Advances* [online]. 2000, 18(6), 459-479 [cit. 2022-05-21]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/S0734-9750(00)00045-8
- [25] EDOZIEN, J. C., U. U. UDO, V. R. YOUNG a N. S. SCRIMSHAW. Effects of High Levels of Yeast Feeding on Uric Acid Metabolism of Young Men. *Nature* [online]. 1970, 228(5267), 180-180 [cit. 2022-05-21]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/228180a0
- [26] KUNASUNDARI, Balakrishnan, Vikneswaran MURUGAIYAH, Gurjeet KAUR, Frans H. J. MAURER, Kumar SUDESH a Vasu D. APPANNA. Revisiting the Single Cell Protein Application of *Cupriavidus necator* H16 and Recovering Bioplastic Granules Simultaneously. *PLoS ONE* [online]. 2013, 8(10) [cit. 2022-05-21]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0078528
- [27] KUNASUNDARI, Balakrishnan, Carlos Rodriguez ARZA, Frans H.J. MAURER, Vikneswaran MURUGAIYAH, Gurjeet KAUR a Kumar SUDESH. Biological recovery and properties of poly(3-hydroxybutyrate) from *Cupriavidus necator* H16. *Separation and Purification Technology* [online]. 2017, 172(10), 1-6 [cit. 2022-05-21]. ISSN 13835866. Dostupné z: doi:10.1016/j.seppur.2016.07.043

- [28] MURUGAN, Paramasivam, Lizhu HAN, Chee-Yuen GAN, Frans H.J. MAURER a Kumar SUDESH. A new biological recovery approach for PHA using mealworm, *Tenebrio molitor*. *Journal of Biotechnology* [online]. 2016, 239, 98-105 [cit. 2022-05-21]. ISSN 01681656. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiotec.2016.10.012
- [29] BARNARD, G N a J K M SANDERS. The Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate Granule in vivo. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1989, 264(6), 3286-3291 [cit. 2022-05-21]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(18)94064-0
- [30] ONG, Su Yean, Hui-Pheng KHO, Sebastian L. RIEDEL, Seok-Won KIM, Chee-Yuen GAN, Todd D. TAYLOR a Kumar SUDESH. An integrative study on biologically recovered polyhydroxyalkanoates (PHAs) and simultaneous assessment of gut microbiome in yellow mealworm. *Journal of Biotechnology* [online]. 2018, 265, 31-39 [cit. 2022-05-21]. ISSN 01681656. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiotec.2017.10.017
- [31] SEMOVA, Ivana, Juliana D. CARTEN, Jesse STOMBAUGH, Lantz C. MACKEY, Rob KNIGHT, Steven A. FARBER a John F. RAWLS. Microbiota Regulate Intestinal Absorption and Metabolism of Fatty Acids in the Zebrafish [online]. 2012, 12(3), 277-288 [cit. 2022-05-21]. ISSN 19313128. Dostupné z: doi:10.1016/j.chom.2012.08.003
- [32] COLMAN, D. R., E. C. TOOLSON a C. D. TAKACS-VESBACH. Do diet and taxonomy influence insect gut bacterial communities?. *Molecular Ecology* [online]. 2012, 21(20), 5124-5137 [cit. 2022-05-21]. ISSN 09621083. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05752.x
- [33] ZAINAB-L, Idris a Kumar SUDESH. High cell density culture of *Cupriavidus necator* H16 and improved biological recovery of polyhydroxyalkanoates using mealworms. *Journal of Biotechnology*. 2019, 305, 35-42. ISSN 01681656. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiotec.2019.09.001
- [34] OONINCX, D. G. A. B. a A. F. B. VAN DER POEL. Effects of diet on the chemical composition of migratory locusts (*Locusta migratoria*). *Zoo Biology* [online]. 2010, n/a-n/a [cit. 2022-05-21]. ISSN 07333188. Dostupné z: doi:10.1002/zoo.20308
- [35] GHALY, A.E. a F.N. ALKOAİK. The Yellow Mealworm as a Novel Source of Protein. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* [online]. 2009, 4(4), 319-331 [cit. 2022-05-21]. ISSN 15574989. Dostupné z: doi:10.3844/ajabssp.2009.319.331
- [36] NOVÁK, Vladimír. Brouci čeledi potemníkovití (Tenebrionidae) střední Evropy: Beetles of the family Tenebrionidae of Central Europe. Praha: Academia, 2014. Zoologické klíče. ISBN 978-80-200-2338-4.
- [37] YANG, Yu, Jun YANG, Wei-Min WU, Jiao ZHAO, Yiling SONG, Longcheng GAO, Ruifu YANG a Lei JIANG. Biodegradation and Mineralization of Polystyrene by Plastic-Eating Mealworms: Part 1. Chemical and Physical Characterization and Isotopic Tests [online]. 2015, 49(20), 12080-12086 [cit. 2022-05-21]. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.5b02661

- [38] SANGIORGIO, Paola, Alessandra VERARDI, Salvatore DIMATTEO, Anna SPAGNOLETTA, Stefania MOLITERNI a Simona ERRICO. *Tenebrio molitor* in the circular economy: a novel approach for plastic valorisation and PHA biological recovery. *Environmental Science and Pollution Research*. 2021, 28(38), 52689-52701. ISSN 0944-1344. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-021-15944-6
- [39] SILVA, Luciana Barboza, Reneton Gomes DE SOUZA, Sandra Ribeiro DA SILVA, et al. Development of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) on Poultry Litter-Based Diets. *Journal of Insect Science*. 2021, 21(1). ISSN 1536-2442. Dostupné z: doi:10.1093/jisesa/ieaa145
- [40] RUMPOLD, Birgit A., Oliver K. SCHLÜTER, Salvatore DIMATTEO, Anna SPAGNOLETTA, Stefania MOLITERNI a Simona ERRICO. Potential and challenges of insects as an innovative source for food and feed production: a novel approach for plastic valorisation and PHA biological recovery. *Environmental Science and Pollution Research*. 2013, 17(38), 1-11. ISSN 14668564. Dostupné z: doi:10.1016/j.ifset.2012.11.005
- [41] VAN BROEKHOVEN, Sarah, Dennis G.A.B. OONINCX, Arnold VAN HUIS, Joop J.A. VAN LOON, Stefania MOLITERNI a Simona ERRICO. Growth performance and feed conversion efficiency of three edible mealworm species (Coleoptera: Tenebrionidae) on diets composed of organic by-products. *Journal of Insect Physiology*. 2015, 73(38), 1-10. ISSN 00221910. Dostupné z: doi:10.1016/j.jinsphys.2014.12.005
- [42] DERLER, Hartmut, Andrea LIENHARD, Simon BERNER, Monika GRASSER, Alfred POSCH a René REHORSKA. Use Them for What They Are Good at: Mealworms in Circular Food Systems. *Insects* [online]. 2021, 12(1) [cit. 2022-05-21]. ISSN 2075-4450. Dostupné z: doi:10.3390/insects12010040
- [43] ZIELIŃSKA, Ewelina, Urszula PANKIEWICZ a Monika SUJKA. Nutritional, Physiochemical, and Biological Value of Muffins Enriched with Edible Insects Flour. *Antioxidants* [online]. 2021, 10(7) [cit. 2022-05-21]. ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox10071122
- [44] BEAUGRAND, J., D. CRÔNIER, P. DEBEIRE a B. CHABBERT. Arabinoxylan and hydroxycinnamate content of wheat bran in relation to endoxylanase susceptibility: A Review. *Journal of Cereal Science* [online]. 2004, 40(3), 223-230 [cit. 2022-05-14]. ISSN 07335210. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcs.2004.05.003
- [45] DORNEZ, Emmie, Kurt GEBRUERS, Stefan WIAME, Jan A. DELCOUR a Christophe M. COURTIN. Insight into the Distribution of Arabinoxylans, Endoxylanases, and Endoxylanase Inhibitors in Industrial Wheat Roller Mill Streams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2006, 54(22), 8521-8529 [cit. 2022-05-21]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf061728n
- [46] HONG, Jinsu, Taehee HAN a Yoo Yong KIM. Mealworm (*Tenebrio molitor* Larvae) as an Alternative Protein Source for Monogastric Animal: A Review. *Animals* [online]. 2020, 10(11) [cit. 2022-05-14]. ISSN 2076-2615. Dostupné z: doi:10.3390/ani10112068

- [47] CHO, Sun Young, Gi Hyung RYU, Eleni MENTE, Pier PSOFAKIS a Christos G. ATHANASSIOU. Effects of mealworm larva composition and selected process parameters on the physicochemical properties of extruded meat analog: A Review. *Scientific Reports* [online]. 2021, 9(8), 4408-4419 [cit. 2022-05-14]. ISSN 2048-7177. Dostupné z: doi:10.1002/fsn3.2414
- [48] KHANNA, Shilpi a Ashok K. SRIVASTAVA. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry* [online]. 2005, 40(2), 607-619 [cit. 2022-05-17]. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2004.01.053
- [49] NOVACKOVA, Ivana, Xenie KOURILOVA, Katerina MRAZOVA, Petr SEDLACEK, Michal KALINA, Vladislav KRZYZANEK, Martin KOLLER a Stanislav OBRUCA. Combination of Hypotonic Lysis and Application of Detergent for Isolation of Polyhydroxyalkanoates from Extremophiles. *Polymers* [online]. 2022, 14(9) [cit. 2022-05-21]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym14091761