

VĚDECKÉ SPISY VYSOKÉHO UČENÍ TECHNICKÉHO V BRNĚ

*Edice Habilitační a inaugurační spisy, sv. 510*

*ISSN 1213-418X*

**Stanislav Obruča**

**VALORIZACE ODPADŮ  
POTRAVINÁŘSKÉHO PRŮMYSLU**

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

Ústav chemie potravin a biotechnologií

**Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**

**VALORIZACE ODPADŮ POTRAVINÁŘSKÉHO PRŮMYSLU**

**VALORISATION OF WASTE PRODUCTS OF FOOD INDUSTRY**

ZKRÁCENÁ VERZE HABILITAČNÍ PRÁCE  
OBOR: CHEMIE A TECHNOLOGIE POTRAVIN



BRNO 2015

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

potravinářské odpady, valorizace, biorafinerie

## **KEYWORDS**

food wastes; valorization; biorefinery

## **MÍSTO ULOŽENÍ PRÁCE:**

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická

# Obsah

PŘEDSTAVENÍ AUTORA.....	4
1 POTRAVINÁŘSTVÍ JAKO PŮVODCE ODPADNÍCH A VEDLEJŠÍCH PRODUKTŮ .....	5
2 MOŽNÉ ZPŮSOBY ELIMINACE A/NEBO VALORIZACE POTRAVINÁŘSKÝCH ODPADŮ .....	5
2.1 Koncept biorafinérie .....	6
3 KONCEPCE A PŘEHLED CÍLŮ PŘEDLOŽENÉ HABILITAČNÍ PRÁCE .....	7
4 BIOTECHNOLOGICKÁ PRODUKCE POLYHYDROXYALKANOÁTŮ.....	8
4.1 Vliv vybraných stresových faktorů na produkci PHA .....	9
4.2 Vliv aplikace ethanolu a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> na biosyntetickou dráhu PHB .....	10
4.3 Biotechnologická produkce PHA ze syrovátky .....	12
4.4 Využití odpadních fritovacích olejů jako substrátu pro výrobu PHA.....	13
4.4.1 Využití odpadních fritovacích olejů a propanolu k produkci PHA.....	13
4.4.2 Aplikace náhodné mutagenese k vylepšení biotechnologické konverze odpadních fritovacích olejů na PHA.....	15
4.4.3 Použití hydrolyzátu syrovátky jako komplexního zdroje dusíku .....	17
4.5 Kávová sedlina jako surovina pro biotechnologickou výrobu PHA.....	19
4.5.1 Využití kávového oleje k produkci PHA.....	19
4.5.2 Využití hydrolyzátu kávové sedliny k produkci PHA .....	20
4.6 Produkce karotenoidů .....	22
4.6.1 Využití hydrolyzátu kávové sedliny k produkci karotenoidů.....	22
4.6.2 Koncepte „Coffee –BioRaf“ .....	23
4.7 Produkce ENZYMŮ degradujících LIGNOCELULÓZU .....	24
4.8 Využití plísně <i>Fusarium solani</i> pro produkci ENZYMŮ degradujících lignocelulózu.....	25
4.9 Biodegradace polyurethanových materiálů.....	26
4.9.1 Studium biodegradability modifikovaných polyurethanových elastomerů .....	27
5 NEJVÝZNAMNĚJŠÍ ZÁVĚRY PRÁCE .....	28
6 SEZNAM POUŽITÝCH LITERÁRNÍCH ZDROJŮ .....	29
7 ABSTRACT .....	32



**Stanislav Obruča** se narodil v roce 1982 ve Valašském Meziříčí. V roce 2007 absolvoval studium oboru Chemie potravin a biotechnologie na Fakultě chemické VUT v Brně. Poté nastoupil na doktorské studium v oboru Chemie a technologie ochrany životního prostředí kde pod vedením prof. Ivany Márové vypracoval a v roce 2010 obhájil disertační práci na téma „Řízená produkce a degradace vybraných materiálů.“

Od roku 2010 je zaměstnán na Centru materiálového výzkumu Fakulty chemické VUT v Brně, nejprve jako vědecký a poté také jako akademický pracovník. V roce 2015 se pak stává také zaměstnancem Ústavu chemie potravin a biotechnologií. Je garantem a vyučujícím předmětů Metody analýzy biologických systémů, Praktický úvod do nanotechnologií a Praktikum z instrumentální a strukturní analýzy. V oblasti výzkumu se zabývá možnostmi využití a zhodnocení odpadních surovin především potravinářského průmyslu pomocí mikrobiálních biotechnologií, stresovou odpovědí mikroorganismů a studiem biodegradace polymerních materiálů. Je spoluautorem několika odborných monografií, skript a řady článků v mezinárodních vědeckých časopisech. Podílel se také na vývoji patentované technologie pro zpracování odpadního fritovacího oleje.

# 1 POTRAVINÁŘSTVÍ JAKO PŮVODCE ODPADNÍCH A VEDLEJŠÍCH PRODUKTŮ

Potravinářský průmysl a zemědělství (souhrnně často označovány jako potravinářství) jsou jednou z nejvýznamnějších oblastí lidské činnosti, jejichž cílem je zajistit výživu obyvatelstva. Během posledních staletí prodělaly obě odvětví, především na západní polokouli, obrovský posun, kdy došlo k jejich automatizaci, centralizaci, intenzifikaci a industrializaci. To umožnilo výrazné navýšení efektivity práce, takže, i přes stále se snižující procentuální podíl obyvatel pracujících v obou odvětvích, je potravinářství schopno zajistit výživu pro zbývající populaci. Lze konstatovat, že právě tento fakt je jedním ze silných motorů umožňující výrazný postup v dalších odvětvích lidské činnosti, ze kterých pak opět obory zabývající se produkcí a výrobou potravin mohou těžit. Nicméně intenzifikace a industrializace potravinářství má i své stinné stránky. Především ne vždy efektivní využívání surovin a z toho plynoucí vznik řady vedlejších produktů, které nemají významné využití a často představují spíše odpad. Vzhledem k centralizaci potravinářských procesů a tedy velkým objemům zpracovávaným v rámci jednotlivých závodů, představují odpadní produkty potenciální ekologickou zátěž pro životní prostředí, případně spíše ekonomickou zátěž vyplývající z nákladů nutných na jejich eliminaci.

Na tomto místě je vhodné poznamenat, že ani zdánlivě jednoduchý termín „potravinářský odpad“ (anglicky „food waste“) nemá jednoznačný výklad a různé autority jej vykládají různě. Tato skutečnost může komplikovat především interpretaci některých statistických dat. Například Organizace pro výživu a zemědělství pod OSN (Food and Agriculture Organisation, dále FAO) potravinářský odpad definuje jako: „jakékoliv jedlé substance, které místo toho aby byly využity k výživě lidí, jsou znehodnoceny, ztraceny, degradovány nebo zkonsumovány parazity v kterékoliv části potravinového řetězce“. Často je ale (a to i v případě této práce) využíván širší význam termínu „potravinářský odpad“, který výše uvedenou definici rozšiřuje také o jakýkoliv organický materiál, který není vhodný k přímé lidské spotřebě, ale vzniká v kterékoliv fázi produkce a distribuce potravin.

Celosvětově množství odpadů generovaných potravinářským průmyslem a zemědělstvím za jeden rok přesahuje miliardu tun (např. pro rok 2012 hovořil odhad FAO o  $1,3 \cdot 10^9$  t)<sup>1</sup>. Samozřejmě potravinářský průmysl a zemědělství není jediným zdrojem odpadu spojeného se zpracováním a využitím potravin. Podle odhadů Evropské komise je přibližně 42 % odpadu vyprodukováno domácnostmi, 39 % je vygenerováno v průběhu výroby potravin v průmyslových podnicích, 14 % odpadu připadá na restaurační zařízení a podniky hromadného stravování, 5 % je pak důsledkem chyb v distribučním řetězci (tato kalkulace nebrala v potaz odpady vznikající v zemědělství)<sup>2</sup>.

Vznik odpadních a vedlejších produktů v potravinářství je problémem, který přesahuje hranice jednoho průmyslového odvětví. Stejně tak neexistuje jednoduché obecné řešení, ale je potřeba využít komplexní přístup, kdy je jednak minimalizován vznik odpadu v průběhu procesu a následných operací a zároveň je nutné najít a optimalizovat potenciální možnosti valorizace odpadů tak, aby se spíše než za odpad daly považovat za vstupní surovinu dalších procesů.

## 2 MOŽNÉ ZPŮSOBY ELIMINACE A/NEBO VALORIZACE POTRAVINÁŘSKÝCH ODPADŮ

Možnosti odstranění, případně dalšího zpracování potravinářských odpadů, jsou samozřejmě závislé na původu a charakteru konkrétních odpadů. Z praktických důvodů je velmi komplikovaná především likvidace komunálních odpadů. Problém představuje už samotný sběr odpadu, separace a další logistické aspekty. Odpad je však také velice heterogenní co do kvality i kvantity. Tyto

skutečnosti významně omezují ekonomickou viabilitu procesů využívajících komunální potravinářský odpad jako vstupní surovinu<sup>3,4</sup>.

Mnohem širší možnosti zpracování nabízí odpad pocházející z průmyslových a zemědělských výrob. Díky centralizaci těchto procesů je výrazně usnadněná logistická část zpracování, odpad je výrazně homogennější co do složení i kvality a v řadě případů je odpad konstantně dostupný v průběhu celého roku (např. syrovátka, kávová sedlina, aj.). Navíc potenciální postupy zpracování odpadních produktů by bylo možné integrovat do již stávajících výrob v rámci jednoho industriálního celku, což by mohlo výrazně snížit investiční náklady.

Obecně lze říci, že mikrobiální biotechnologie jsou jednou z nejslibnějších odvětví, které je možné využít k valorizaci potravinářských odpadů. Mikroorganismy jsou díky svému enzymatickému vybavení schopny využít široké spektrum organických látek a to včetně odpadů vznikajících v průběhu procesu výroby potravin. Zároveň metabolické produkty mikroorganismů jsou v řadě případů velice zajímavé chemikálie a materiály, které nacházejí uplatnění v celé řadě oblastí. Jednou z nejjednodušších metod zpracování organických odpadních materiálů, kterou lze zařadit do kategorie mikrobiálních technologií, je kompostování<sup>6</sup>. Podobně jednoduchý proces využívající přirozenou směsnou mikroflóru, ovšem vedený v anaerobním módu, je podstatou výroby bioplynu<sup>7</sup>.

Spektrum procesů i potenciálních produktů, které lze vyrobit s využitím potravinářských odpadů je mnohem širší, nicméně ve většině případů je nutná alespoň částečná předúprava odpadu tak, aby jej bylo možné využít pro přípravu kultivačního média<sup>3</sup>.

*Tabulka 1. Charakteristika vybraných typů potravinářských odpadů a hmotnostního podílu sacharidů, proteinů a tuků/olejů<sup>5</sup>.*

<b>Typ odpadu</b>	<b>Vlhkost (%)</b>	<b>Sacharidy (%)</b>	<b>Proteiny (%)</b>	<b>Tuky/oleje (%)</b>
<i>i. Odpady bohaté na sacharidy</i>				
Melasa	23	65	6,7	-
Pivovarské mláto	80-83	9-11,6	3,2-4,6	1,5-2,4
Syrovátka	92,7	4,9	0,9	0,9
Jablečná vláknina	3,9-10,8	48-62	2,9-5,7	1,2-3,9
Odpaní chleba	33-42	41-51	8.13	3
Pšeničné otruby	11	64,5	15,5	4,2
Rajčatová vláknina		35,4-50	15,4-23,7	5,4-20,5
Bramborové slupky	83,3	12,5	2,6	0,1
<i>ii. Odpady bohaté na proteiny a/nebo</i>				
Odpad zpracování masa	41	-	24,6	69,9
Odpad zpracování ryb	73,9	-	57	19,1
Odpad zpracování sójových bobů	10	29,9	42	4
Pivovarnické kvasinky	5	39,5	43	1,5
Sušené výpalky	8	45	26	9
Krev	86	-	12	0,3

## 2.1 KONCEPT BIORAFINERIE

Valorizace potravinářských odpadů pomocí mikrobiálních biotechnologií při výrobě jednoho produktu je z řady důvodů často na pomezí finanční rentability případně i pod ní. Z toho důvodu směřuje současný trend k maximalizaci využití odpadních substrátů za současné generace několika produktů. Tento koncept naplňují tzv. biorafinerie – tedy komplexní průmyslové zařízení, které

vstupní surovinu - biomasu - využívají k současné výrobě řady produktů – paliv, chemikálií, materiálů, energie, potravin a krmiv.

Analogií jsou samozřejmě petrochemické rafinerie, které podobným způsobem zpracovávají ropu. Koncept petrochemické rafinerie byl započat v 60 letech 19. století, kdy byl vyvinut postup atmosférické destilace petroleje využívaného jako palivo do lamp. K původně jednoduchému procesu se postupně přidaly další technologické kroky, jako jsou například vakuová destilace, krakování nebo katalytická polymerace. Postupně se rozšiřovalo spektrum produktů a v současné době představují petrochemické rafinerie materiální a energetický základ moderní civilizace, neboť poskytují kromě paliv také základní i speciální chemikálie a materiály pro všechna odvětví chemického průmyslu.

Klesající zásoby ropy, její rostoucí cena a často i politické důvody však vedou ke vzrůstajícímu zájmu o další alternativní suroviny, jejichž využití by mohlo pokrýt poptávku po palivech, chemikáliích a materiálech. Takovýmto substrátem by mohla být biomasa a to třeba právě biomasa obsažená v odpadních produktech zemědělských a potravinářských výrobních. V roce 2011 dosahovala denní spotřeba ropy 12 milionů tun z toho cca 7 % je použito jako surovina pro výrobu materiálů a chemikálií. Vzhledem k objemům, ve kterých jsou produkovány potravinářské odpady, je možné uvažovat, že i tento typ biomasy by mohl v budoucnu alespoň částečně pokrýt poptávku po chemikáliích, které jsou v současné době produkovány z fosilních surovin. Navíc se obecně předpokládá, že množství odpadu produkovaného potravinářstvím dále poroste. K dispozici je například odhad pro Asijské země, kde v roce 2005 potravinářský průmysl generoval 278 milionů tun odpadu, v roce 2025 to má být až 416 milionů tun<sup>8</sup>.

Z ekonomických i ekologických důvodů spoléhá koncept biorafinerie (stejně jako petrochemické rafinerie) na maximální valorizaci vstupní suroviny. Například pokud uvažujeme jako vstupní surovinu odpadní rostlinný materiál, může její zpracování v biorafinerii zahrnovat extrakci látek s vysokou přidanou hodnotou (flavonoidy, katechiny, alkaloidy atd.). Tyto látky mohou být využity k výrobě potravinových doplňků nebo funkčních potravin, nacházejí také své uplatnění ve farmacii a kosmetice. V řadě případů se také jedná o mikrobiální inhibitory, proto je jejich odstranění žádoucí i z pohledu dalších technologických kroků, které často zahrnují mikrobiální kultivaci. Zbývající pevný podíl po extrakci často obsahuje mono-, di- a polysacharidy, které mohou být přímo anebo po příslušné předúpravě (enzymatické, případně chemické hydrolýze) využity jako uhlíkatý substrát pro biotechnologickou výrobu celé řady produktů. Před samotnou kultivací je možné navýšit výtěžnost fermentačního procesu zařazením tzv. detoxifikace, tedy cíleným odstraněním toxických látek, které se často uvolňují v průběhu předúpravy komplexního substrátu na kultivační médium. Především při využívání odpadních substrátů na bázi lignocelulózy zůstávají i po hydrolytické úpravě materiálu pevné podíly, které lze následně využít jako palivo, přičemž energie a teplo generována jeho spalováním může alespoň částečně pokrýt energetické náklady provozu biorafinerie<sup>3,9</sup>.

O tom, že koncept biorafinerie je velice aktuální a vzbuzuje zájem nejen v oblasti průmyslu a zemědělství, ale má také výrazné sociální, ekologické a v neposlední řadě politické aspekty, svědčí například zájem Evropské komise a její doporučení Evropskému parlamentu datované do roku 2012 (bio-economy communication) a stejně tak řada aktuálně otevřených výzkumných výzev v rámci programů Horizont 2020 nebo Bio-Based Industries (BBI).

### **3 KONCEPCE A PŘEHLED CÍLŮ PŘEDLOŽENÉ HABILITAČNÍ PRÁCE**

Předložená habilitační práce se zabývá využitím vybraných potravinářských odpadů jako substrátů pro výrobu produktů s vysokou přidanou hodnotou – především polyhydroxyalkanoátů, ale také karotenoidů a nebo lignocelulózu degradujících enzymů. V současné době roste společenská potřeba alespoň částečně snížit naši závislost na fosilních surovinách a zároveň je čím



dál výrazněji apelován environmentální aspekt rozličných průmyslových technologií. Proto je valorizace odpadních produktů potravinářských a zemědělských výrob nejen v souladu se současnými výzkumnými trendy, ale má svou oporu i v aktuálních potřebách moderní společnosti. Stejně tak v poslední době vystupuje do popředí problematika týkající akumulace pevných odpadů na bázi syntetických polymerů. Tato habilitační práce se dotýká i tohoto tématu, protože jsou to právě polyhydroxyalkanoáty, které představují ekologicky šetrnou alternativu syntetickým polymerům. Zároveň je okrajovým tématem předložené habilitační práce také studium biodegradability polyurethanových materiálů.

Habilitační práce je koncipována jako komentář k článkům, které byly publikovány v mezinárodních impaktovaných odborných časopisech, patentům, kapitolám v knihách a také konferenčním příspěvkům, které byly předneseny na národních a mezinárodních vědeckých konferencích ve formě přednášek anebo plakátových sdělení.

V rámci práce bylo vytyčeno několik parciálních cílů (často navzájem propojených), přičemž každému cíli je v rámci tematické struktury práce věnováno několik kapitol.

*Vytyčené cíle byly následující:*

- Otestovat cílené využití stresových podmínek k navýšení výtěžků výroby PHA
- Ověřit možnost využití potravinářských odpadů k biotechnologické produkci PHA
- Experimentálně otestovat možnost produkce karotenoidů s využitím odpadních potravinářských produktů
- Prozkoumat mikrobiální produkci lignocelulózu degradujících enzymů
- Otestovat biodegradaci modifikovaných polyurethanových materiálů

Významná část habilitační práce se zabývá možnostmi využití exogenního stresu jako nástroje pro vylepšení výtěžnostních parametrů vybraných biotechnologických procesů, nicméně těžiště práce představuje studium valorizace relativně širokého spektra potravinářských odpadů. Jednotlivé odpadní substráty se pochopitelně výrazně liší ve svém chemickém složení a také základních fyzikálně-chemických vlastnostech, a proto byly v rámci práce použity a vyvinuty různé způsoby předúpravy odpadních materiálů. Předložená habilitační práce se především zabývá valorizační následujících odpadních substrátů:

- Syrovátka – byla použita jako zdroj uhlíku i komplexní zdroj dusíku pro biotechnologickou produkci polyhydroxyalkanoátů
- Odpadní fritovací oleje – využity jako uhlíkatý substrát pro výrobu polyhydroxyalkanoátů.
- Olej extrahovaný z kávové sedliny – aplikován jako substrát při produkci polyhydroxyalkanoátů.
- Hydrolyzát kávové sedliny – byl použit jako zdroj uhlíku při produkci polyhydroxyalkanoátů, ale také karotenoidů
- Otruby vybraných obilovin – byly využity jako induktory při produkci lignocelulózu degradujících enzymů.

## **4 BIOTECHNOLOGICKÁ PRODUKCE POLYHYDROXYALKANOÁTŮ**

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou polyestery bakteriálního původu. Schopnost produkce a akumulace PHA byla objevena u celé řady bakterií, ale také u některých zástupců Archae. Mikroorganismy syntetizují PHA jako zásobní formu uhlíku, energie a redukční síly, a to nejčastěji při nadbytku uhlíkatého zdroje a současné limitaci jiným důležitým prvkem. Po

vyčerpání uhlíkatého substrátu v prostředí dokáží bakteriální buňky PHA hydrolyzovat a opět využít jako zdroj uhlíku a energie ke svým metabolickým pochodům. Kromě své metabolické role jsou polyhydroxyalkanoáty zajímavé ještě z dalšího a to praktičtějšího důvodu – díky svým mechanickým vlastnostem představují alternativu syntetickým polymerům vyrobených z fosilních surovin. Navíc jsou PHA plně biodegradovatelné, biokompatibilní a k jejich výrobě lze využít obnovitelné nebo dokonce odpadní substráty<sup>10</sup>.

Bakteriální PHA jsou polyestery hydroxykyselin, přičemž hydroxylová skupina PHA monomerů se nejčastěji nachází v poloze 3, ale jsou známy i monomery s hydroxylovou skupinou v poloze 2 až 6. Monomery PHA jsou, díky stereospecifitě enzymů zapojených do jejich syntézy, vždy v R-konfiguraci. V závislosti na délce řetězce hydroxykyseliny se PHA dělí do dvou podskupin. Polyestery obsahující monomery o délce 3-5 atomů uhlíku se označují jako „short-chain-length“ (scl-PHA), zatímco PHA obsahující hydroxykyseliny o délce 6-14 atomů uhlíku se klasifikují jako „medium-chain-length“ (mcl-PHA). V současné době je známo více než 100 hydroxykyselin, které slouží jako PHA monomery<sup>11</sup>.

Mechanické vlastnosti PHA závisí především na zastoupení jednotlivých monomerů. Jednoznačně nejrozšířenějším zástupcem skupiny PHA je homopolymer 3-hydroxybutyrátu, polyhydroxybutyrát (PHB), který vykazuje vysokou míru krystaličnosti (asi 50-80 %), díky čemuž je tuhý a křehký. Teplota skelného přechodu PHB je 5-9 °C, teplota tání 173-180 °C. Na druhou stranu PHB při 200 °C degraduje, což je z hlediska průmyslového zpracování materiálu nepříjemné, neboť při tavení materiálu může docházet k jeho znehodnocení. Pokud je však biotechnologickou cestou s využitím prekurzoru do struktury polymeru zabudován 3-hydroxyvalerát (nebo jiný monomer), mechanické i technologické vlastnosti se výrazně zlepší. Bod tání kopolymeru klesá, v závislosti na obsahu 3-hydroxyvalerátu, až k hodnotě 130 °C. Díky tomu může být kopolymer taven, aniž by došlo k jeho rozkladu. Stejně tak roste i elasticita materiálu a klesá Youngův modul pružnosti, přičemž platí, že oba jevy jsou výraznější se zvyšujícím se podílem 3-hydroxyvalerátu v kopolymeru<sup>10,12</sup>.

Jak již bylo uvedeno výše, především díky svým mechanickým vlastnostem jsou PHA často považovány za ekologickou alternativu syntetických polymerů. Mohou být využity k výrobě jednorázových plně kompostovatelných obalů, ale díky své biokompatibilitě mají také řadu aplikací v oblasti medicíny a zdravotní péče. Relativně širokou škálu dalších aplikací PHA v oblasti elektroniky umožňují jejich piezoelektrické vlastnosti. A v neposlední řadě se nabízí využití PHA v zemědělství a to především ve formě plně biodegradovatelných mulčovací fólií<sup>13</sup>.

#### 4.1 VLIV VYBRANÝCH STRESOVÝCH FAKTORŮ NA PRODUKCI PHA

Vzhledem k potenciálnímu využití aplikace exogenního stresu jako kultivační strategie vedoucí k navýšení produkčních parametrů při biotechnologické výrobě PHA byly provedeny screeningové studie vlivu vybraných stresových faktorů na akumulaci PHA.

Naše další studie tedy byla provedena s bakteriálním kmenem *Cupriavidus necator* H16, který je, díky své schopnosti akumulovat vysoké množství polymeru, považován za modelový organismus pro metabolismus scl-PHA. Jedná se o Gram-negativní bakterii schopnou využít relativně širokou skupinu substrátů, nicméně z cukrů jsou to pouze fruktóza a kyselina glukonová. V rámci laboratorních experimentů dosahovala bakterie výrazně vyšších výtěžků biomasy a také vyšších obsahů PHA než *B. megaterium*, proto se zdála být vhodnějším systémem pro ověření vlivu aplikace stresových podmínek na produkci PHA. Nejprve byl vybrán alkohol o koncentraci 1 obj. %, aby byl ověřen vliv času aplikace stresu. Pokud byl stres aplikován od počátku kultivace, došlo k výraznému zpomalení růstu kultury, což mělo nepříznivý vliv na výslednou koncentraci biomasy po ukončení kultivace (kultivace probíhala po dobu 120 h v Erlenmeyerových baňkách). Pokud byl stres aplikován později, tedy ve 30, 60 nebo 90 h kultivace, neměla jeho aplikace výrazný vliv na růst bakteriální kultury. Aplikace stresu v 60 h výrazně navýšila akumulaci PHB v

buňkách oproti kontrolní kultuře, která nebyla vystavena stresovému faktoru. Není bez zajímavosti, že v 60 h kultura také vyčerpala amonné ionty, které sloužily jako zdroj dusíku. Zdá se tedy, že aplikace vhodného stresového faktoru může mít společně se současně indukovanou limitací dusíkem synergický efekt vzhledem k akumulaci PHB.

V rámci skriningové studie byla bakteriální kultura vystavena následujícím stresovým faktorům: ethanol (testovány byly následující koncentrace stresového faktoru v kultivačním médiu: 1; 3 a 10 obj. %), peroxid vodíku (0,5; 1 a 5 mmol/l), NaCl (0,5; 2 a 5 hm. %), NiCl<sub>2</sub> (0,02; 0,1 a 0,2 mmol/l) a CoCl<sub>2</sub> (0,02; 0,1 a 0,02 mmol/l), které pak byly všechny aplikovány v 60 h kultivace. Reakce bakteriální kultury vůči působení stresu podle očekávání výrazně závisela jak na použitém stresovém faktoru, tak na jeho koncentraci. Zatímco v řadě případů měly nízké dávky stresových faktorů na intracelulární obsah PHB pozitivní vliv, vysoké koncentrace vykazovaly z pohledu akumulace PHB spíše inhibiční charakter. Produkci PHB v porovnání s kontrolní kultivací (výtěžek PHB 8,50 ± 0,14 g/l) nejvýznamněji podpořila aplikace 1 obj. % etanolu (9,64 ± 0,09 g/l) a oxidačního stresu ve formě peroxidu vodíku o koncentraci 1 mmol/l (10,50 ± 0,31 g/l) a také 5 mmol/l (9,89 ± 0,18 g/l). Pozitivní vliv měla také aplikace mírného osmotického tlaku pomocí NaCl o koncentraci 5 g/l (9,37 ± 0,29 g/l) a také CoCl<sub>2</sub> v koncentraci 0,02 mmol/l (9,18 ± 0,20 g/l)<sup>1</sup>.

V další práci jsme se věnovali detailnějšímu studiu metabolických konsekvencí expozice buněk ethanolu a peroxidu vodíku – tedy dvou stresových faktorů, které navýšily produkci PHB nejvýrazněji ze všech testovaných stresů. Nicméně je zajímavé, že využití i dalších námi použitých stresových faktorů jako stimulátorů PHB biosyntézy bylo v nedávné době publikováno dalšími autory. Pal a kol. využili aplikace niklu k navýšení syntézy PHB u bakterie *Cupriavidus pauculus*<sup>14</sup>. Passanha a kol. nedávno publikovali využití osmotického stresu k biotechnologické produkci PHA pomocí bakterie *Cupriavidus necator*. Přestože tato studie byla provedena v bioreaktoru (zatímco naše skriningová měření probíhala pouze v Erlenmeyerových baňkách), dosáhli autoři závěrů konzistentních s našimi. Nejvyšší produktivita systému byla dosažena při aplikaci nižší dávky NaCl (9 g/l), která navýšila produktivitu procesu oproti kontrolní kultivaci (bez přídavku NaCl) o 30 %. Aplikace NaCl o koncentraci 15 g/l a více pak měla na výtěžky PHA negativní vliv<sup>15</sup>. Také Khare a kol. využili osmotického stresu k navýšení produkce mcl-PHA u bakterií *Pseudomonas fluorescens*<sup>16</sup>. Celkově lze říci, že aplikace stresových podmínek k navýšení produkce PHA je v současné době zajímavým tématem, přičemž spektrum využitelných stresů je širší než jsme v rámci naší skriningové studie mohli postihnout. K navýšení produkce mcl-PHA u bakterie *Pseudomonas putida* KT2440 je například možné jednoduše využít přetlak v bioreaktoru<sup>17</sup>.

## 4.2 VLIV APLIKACE ETHANOLU A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> NA BIOSYNTETICKOU DRÁHU PHB

Jak bylo uvedeno výše, přídavek nízkých koncentrací ethanolu a peroxidu vodíku má u bakterie *Cupriavidus necator* H16 pozitivní vliv na výtěžek PHB. Ze všech testovaných stresových faktorů se právě ethanol a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zdály být nejlepšími aktivátory PHB biosyntetické dráhy. Je tedy teoreticky možné, že přídavek levné a netoxické látky může výrazně navýšit efektivitu biotechnologického procesu. Jak ethanol, tak peroxid vodíku jsou navíc zajímavé i z dalšího důvodu – na rozdíl od těžkých kovů anebo soli jako induktorů osmotického stresu, nepředstavují jejich potenciální rezidua v odpadní vodě po fermentaci a separaci buněk výrazný problém. Z těchto důvodů jsme si pro podrobnější studium vybrali právě ethanol a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a pokusili jsme se prozkoumat jejich vliv na metabolickou dráhu biosyntézy PHB.

<sup>1</sup> OBRUČA, S.; MÁROVÁ, I.; SVOBODA, Z.; MIKULÍKOVÁ, R. Use of controlled exogenous stress for improvement of poly(3-hydroxybutyrate) production in *Wautersia eutropha*: a preliminary study. *Folia Microbiologica*, 2010, roč. 55, č. 1, s. 17-22.

Abychom pochopili vliv ethanolu a peroxidu vodíku na metabolickou dráhu PHB syntézy u bakterie *Cupriavidus necator*, byly oba stresové faktory aplikovány v množství a čase optimalizovaných v předchozí práci. Po aplikaci stresových faktorů (60 hodina kultivace) pak byly stanoveny specifické aktivity enzymů zapojených do metabolizace stresových faktorů a také jednotlivých enzymů biosyntézy PHA. Přídavek ethanolu i peroxidu vodíku v porovnání s kontrolní kulturou výrazně navýšil aktivitu  $\beta$ -ketothiolázy a acetoacetyl-Co-reduktázy. Naopak na specifickou aktivitu PHA syntázy neměla aplikace stresu žádný vliv.

Přítomností reaktivních forem kyslíku může mít pro buňky fatální následky. Proto si prakticky všechny živé systémy vytvořily účinné obrané strategie vůči oxidačnímu stresu. Jedním z obecných principů je navýšení intracelulární koncentrace antioxidantů jako jsou  $\beta$ -karoten, kyselina askorbová, tokoferol anebo glutathion (GSH). Právě GSH, za oxidačního stresu přítomný ve zvýšených koncentracích, je schopen eliminovat nežádoucí oxidační reaktivní formy kyslíku. Při této reakci se sám oxiduje, regenerace je pak zprostředkována skrz enzym glutathion reduktázu. Ta využívá k regeneraci oxidovaného GSH NADPH. Proto je jednou z důležitých strategií buněk vystavených oxidačnímu stresu navýšení poměru NADPH/NADP<sup>+</sup>. NADPH je v rámci metabolismu generováno v několika metabolických drahách, za jednu z nejdůležitějších pak můžeme považovat pentózový cyklus, kde je NADP<sup>+</sup> redukováno na NADPH při oxidaci glukóza-6-fosfátu na 6-fosfoglukonát katalyzované glukosa-6-fosfát dehydrogenázou. Další reakce pentózového cyklu, tedy oxidativní dekarboxylace 6-fosfoglukonátu na ribózu-5-fosfát je také zdrojem NADPH.

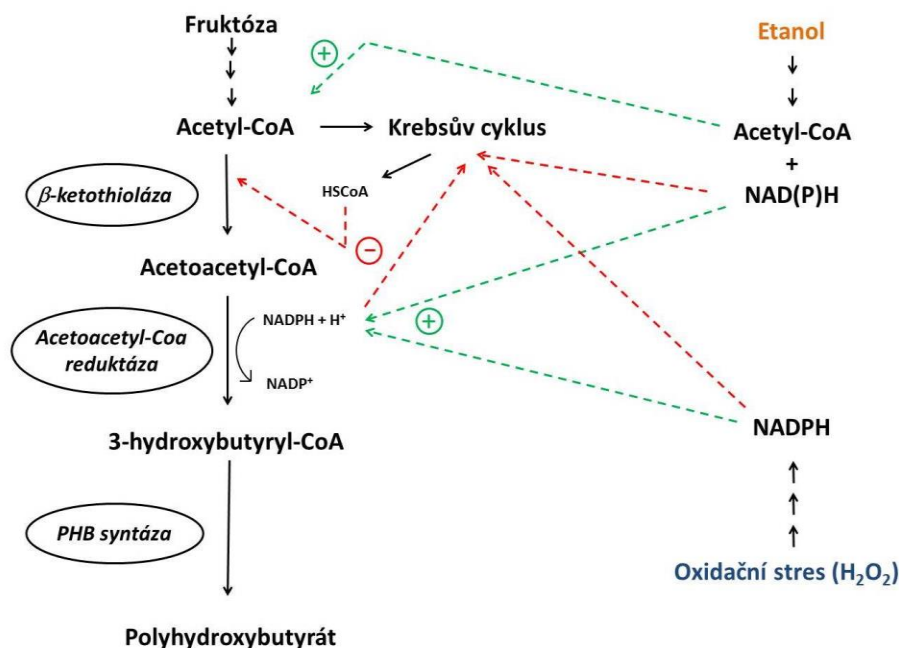
Proto jsme v buňkách vystavených stresovým faktorům stanovili specifickou aktivitu glukóza-6-fosfát dehydrogenázy. Navýšená aktivita tohoto enzymu byla pozorována pouze u buněk, které byly exponovány peroxidu vodíku. Můžeme tedy předpokládat, že stresová odpověď vůči peroxidu vodíku vede k navýšení poměru NADPH/NADP<sup>+</sup>, což, jak bylo uvedeno výše, má aktivační vliv vůči prvním dvěma enzymům PHB syntetické dráhy –  $\beta$ -ketothioláze a acetoacetyl-Coa-reduktáze a tento efekt byl ověřen i experimentálně. Právě navýšení poměru NADPH/NADP<sup>+</sup> je pravděpodobně hlavním důvodem aktivace PHB syntetické dráhy a následného navýšení výtěžků při aplikaci nízkých koncentrací peroxidu vodíku.

Ethanol je v buňkách metabolizován skrz oxidaci katalyzovanou nejprve alkohol dehydrogenázou a následně aldehyd dehydrogenázou. Oba enzymy využívají jako oxidační činidla NAD(P)<sup>+</sup>, takže výsledným produktem metabolizace ethanolu jsou vedle acetátu také redukované koenzymy NAD(P)H. V rámci našich experimentů jsme stanovili specifickou aktivitu alkohol dehydrogenázy u bakterií exponovaných jednotlivým stresům i u kontrolní kultury. Výrazně vyšší aktivita byla pozorována, podle očekávání, pouze u buněk vystavených ethanolu. Je tedy možné předpokládat, že (podobně jako tomu bylo u peroxidu vodíku) metabolizace ethanolu vede k navýšení poměru NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>. Navíc produkt metabolizace ethanolu – acetát, může být ve formě acetyl-CoA využit jako substrát pro biosyntézu PHA.

Jak ethanol, tak peroxid vodíku mají tedy pravděpodobně částečně podobný efekt – navyšují koncentraci redukovaných koenzymů a tím aktivují PHB syntetickou dráhu. Zároveň redukované koenzymy parciálně inhibují Krebsův cyklus a tím i částečně navýší tok acetyl-CoA do PHB biosyntetické dráhy. Pravděpodobně právě v důsledku nižší aktivity Krebsova cyklu jsme pozorovali u bakteriálních kultur exponovaných jak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tak ethanolu nižší intracelulární koncentraci volného CoA. Ten je známým inhibitorem  $\beta$ -ketothiolázy, a proto i pokles koncentrace volného CoA může mít z pohledu PHB biosyntézy pozitivní vliv<sup>II</sup>. Celkové schéma možného vlivu ethanolu a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na metabolickou dráhu biosyntézy PHB je znázorněn na obrázku 1.

---

<sup>II</sup> OBRUČA, S.; MÁROVÁ, I.; STAŇKOVÁ, M.; MRAVCOVÁ, L.; SVOBODA, Z. Effect of ethanol and hydrogen peroxide on poly(3-hydroxybutyrate) biosynthetic pathway in *Cupriavidus necator* H16. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2010, roč. 26, č. 7, s. 1261-1267.



Obrázek 1. Schematické znázornění možného propojení metabolismu PHB a stresové odpovědi vůči ethanolu a peroxidu vodíku.

### 4.3 BIOTECHNOLOGICKÁ PRODUKCE PHA ZE SYROVÁTKY

Velkou nevýhodou PHA v soutěži se syntetickými polymery jsou vysoké náklady na jejich produkci. Vzhledem k tomu, že PHA se v současné době vyrábí především z glukózy případně hydrolyzátů škrobu, velkou část těchto nákladů představuje cena uhlíkatého substrátu. Podle některých odhadů se tak cena vstupní suroviny podílí na celkové ceně PHA až z 50 %<sup>19</sup>. Je proto pochopitelné, že je v současné době intenzivně studována produkce PHA s využitím levných, případně odpadních substrátů. Použití takovýchto surovin by mělo na ekonomiku produkce PHA výrazně pozitivní vliv a otevřelo by dveře masovějšímu rozšíření těchto ekologicky šetrných materiálů.

Jedním z odpadních potravinářských substrátů, který je často uvažován jako vstupní surovina nejen pro produkci PHA, ale také pro další biotechnologické procesy, je syrovátka. Jedná se o vedlejší produkt výroby sýrů, tvarohu a kaseinů, kdy syrovátka představuje 80-90 obj. % použitého mléka. Syrovátka je bohatá na laktózu, která představuje dominantní organický podíl, zanedbatelný ale není ani obsah proteinů a anorganických složek. Díky tomu je syrovátka velice atraktivním kultivačním médiem pro řadu mikroorganismů. To je na jedné straně biotechnologicky velice zajímavé, protože ji lze využít jako substrát k řadě procesů, na druhé straně je syrovátka značně mikrobiálně nestabilní, což komplikuje její úschovu a transport.

Syrovátka je v současné době generována v enormních množstvích. Odhady celosvětové produkce syrovátky hovoří o  $1,15 \cdot 10^8$  až  $1,40 \cdot 10^8$  tun, kdy největšími „producenty“ syrovátky jsou USA a EU. V roce 2008 bylo v USA vyprodukováno  $4,0 \times 10^7$  tun a v EU pak dokonce  $5,0 \times 10^7$  tun syrovátky<sup>20</sup>.

Proto jsme se pokusili využít syrovátku získanou ze závodu Pribina Přibyslav (jednalo se o vedlejší produkt výroby sýru Hermelín) jako substrát pro biotechnologickou výrobu PHB pomocí bakterie *Bacillus megaterium*. Je zajímavé, že i když existuje řada mikroorganismů schopných produkce PHA na různých cukernatých substrátech, jen omezené množství bakterií je schopno přirozeně produkovat PHA na laktóze. V naší předchozí práci jsme si ověřili, že *Bacillus*

*Bacillus megaterium* CCM 2037 má schopnost využít laktózu a současně akumulovat PHB. Zvolená bakteriální kultura byla schopná přímo využívat samotnou syrovátku, nicméně přidavek některých minerálních solí podpořil růst bakteriální kultury a především výtěžek PHB byl při přidavku solí přibližně 10× vyšší.

V dalším kroku byl tedy optimalizován přidavek solí za účelem maximalizace produkce PHB. Jako optimalizační přístup byl zvolen experimentální design dle Placket-Burmana. Tento statistický nástroj umožňuje identifikovat faktory, které významně ovlivňují optimalizovaný proces. Pouze ředění syrovátky se ukázalo být faktorem, který statisticky významně ovlivňoval všechny sledované parametry – růst biomasy, akumulaci i výtěžek PHB. Při optimalizaci ředění syrovátky se nejlépe osvědčilo ředění syrovátky vodou v poměru 1:1, kdy koncentrace laktózy v kultivačním médiu dosáhla přibližně 20 g/l. Při těchto podmínkách bylo dosaženo výtěžku biomasy 2,51 g/l a výtěžku PHB pak 0,79 g/l<sup>III</sup>.

Syrovátka je stále považována za jeden z nejslibnějších odpadních substrátů pro biotechnologickou výrobu PHB, proto je tomuto tématu věnována řada publikací. Zdá se, že žádný z přirozených producentů PHB schopných využít laktózu není ideálním kandidátem pro průmyslovou výrobu PHB ze syrovátky, a proto zde přichází ke slovu nástroje genového inženýrství. V literatuře je popsána genetická manipulace PHB produkujících kmenů, které takto získaly schopnost využít laktózu. Například Povolo a kol. vnesli lac-operon z bakterie *Escherichia coli* do PHB produkující bakterie *Cupriavidus necator* DSM 54540. Druhý možný přístup pak spočívá v klonování genů PHB biosyntetické dráhy do bakteriálního kmene schopného využít laktózy<sup>21</sup>. Velice perspektivně se jeví proces popsaný Ahn a kol., kteří využili rekombinantní *E. coli* nesoucí pha operon bakterie *Azohydromonas lata* k biotechnologické produkci PHB v kultivačním režimu fed-batch, kdy jako příkrm byla použita zkoncentrovaná syrovátka. V rámci tohoto procesu bylo dosaženo velice vysokého výtěžku biomasy (194 g/l) i PHB (168 g/l)<sup>22</sup>..

#### 4.4 VYUŽITÍ ODPADNÍCH FRITOVACÍCH OLEJŮ JAKO SUBSTRÁTU PRO VÝROBU PHA

Dalším perspektivním substrátem pro biotechnologickou produkci PHA jsou odpadní (použitá) fritovací oleje. Ty jsou generovány v obrovských množstvích především v restauracích, podnicích hromadného stravování a také některých dalších segmentech potravinářského průmyslu. V současnosti nejsou dostupná žádná konkrétní data týkající se produkce odpadních fritovacích olejů, ale dá se předpokládat, že se jedná o desítky milionů tun ročně. Jen v EU dosahuje roční spotřeba rostlinných olejů více než 17 milionů tun, z čehož velká část je využita právě ke smažení pokrmů nebo potravinářských polotovarů. Použitá fritovací oleje jsou odpadem, který v současné době nemá výrazné využití. Jejich použití pro krmivářské účely je z bezpečnostního hlediska problematické a například v zemích EU je od roku 2001 zakázáno. Proto většina odpadních fritovacích olejů končí ve spalovnách anebo je jiným způsobem prakticky bez užitku likvidována. Velice často se v poslední době zmiňuje možnost využití odpadních fritovacích olejů jako suroviny pro výrobu bionafty, ale v průběhu smažení dochází k částečnému znehodnocení oleje, takže odpadní fritovací oleje jsou pro tuto technologii velice problematickou surovinou<sup>23</sup>.

##### 4.4.1 Využití odpadních fritovacích olejů a propanolu k produkci PHA

V naší další práci jsme se věnovali biotechnologické konverzi odpadních fritovacích olejů na PHA. Jako produkční kmen jsme zvolili již zmíněnou bakterii *Cupriavidus necator* H16. Podle

<sup>III</sup> OBRUČA, S.; MÁROVÁ, I.; MELUŠOVÁ, S.; MRAVCOVÁ, L. Production of polyhydroxyalkanoates from cheese whey employing *Bacillus megaterium* CCM 2037. *Annals of Microbiology*, 2011, roč. 61, č. 4, s. 947-953.

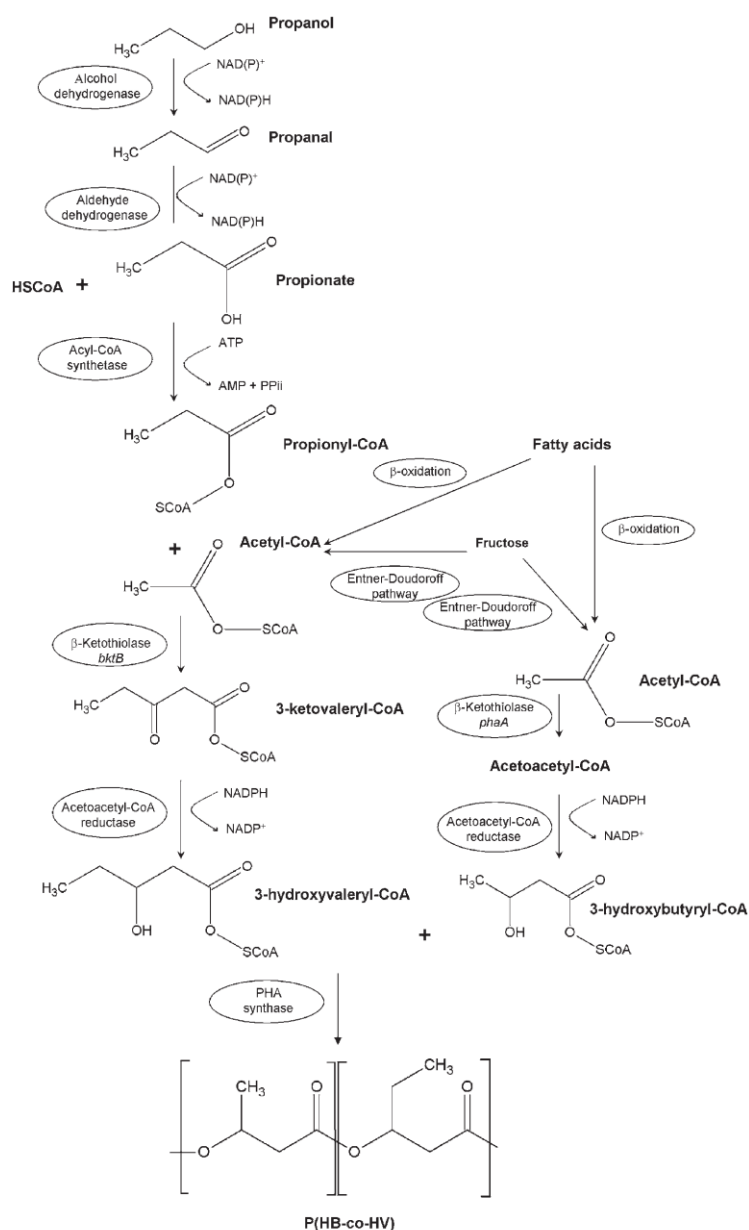
našich skriningových experimentů byla tato bakterie schopna efektivně využívat rostlinné oleje. V rámci prvních experimentů jsme porovnali několik olejů – do studie byly zahrnuty jednak nepoužité rostlinné oleje, ale také odpadní fritovací oleje z různých zdrojů (z restaurace, univerzitní menzy, domácnosti i podniku vyrábějící bramborové lupínky). Je zajímavé, že prakticky ve všech případech bylo vyšších výtěžků biomasy i PHB dosaženo při kultivaci na odpadních fritovacích olejích. Zdá se tedy pro biotechnologickou produkci PHA jsou změny, ke kterým dochází v průběhu smažení, spíše žádoucí. Je možné, že přítomnost volných mastných kyselin usnadňuje bakteriální kulturu a využití oleje. S ohledem na naše předchozí experimenty zaměřené na využití exogenního stresu při produkci PHB jsme i v této práci otestovali možnost aplikace alkoholů jako stresových faktorů. Celkově byly otestovány tři alkoholy – methanol, ethanol a propanol. Přídavek propanolu nejvýrazněji navýšil výtěžky měl i další pozitivní dopad. V jeho přítomnosti bakteriální kultura produkovala kopolymer 3-hydroxybutyrátu (3HB) a 3-hydroxyvalerátu (3HV) – poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) [P(HB-co-HV)]. Možná metabolická cesta inkorporace propanolu do struktury polymeru je představena na obrázku 2.

Jelikož se možnost biotechnologické produkce PHA z odpadního fritovacího oleje a využití propanolu jako prekurzoru 3HV zdály být zajímavé, pokusili jsme se otestovat tuto strategii v laboratorním bioreaktoru s využitím fed-batch kultivačního módu. Na konci kultivace bylo docíleno koncentrace sušiny buněk 138 g/l, intracelulární obsah PHA byl 76 %. Celkový výtěžek PHA tak dosáhl 105 g/l, podíl 3HV v polymeru představoval 8 mol. %. V rámci procesu bylo dosaženo produkčního koeficientu  $Y_{\text{PHA/S}}$  0,83 g PHA na 1 g oleje a objemového produkčního koeficientu 1,46 g/(lh). Tyto hodnoty patřily mezi nejvyšší dosažené v rámci biotechnologické konverze rostlinných olejů na PHA. Kahar a kol. dospěli při fed-batch kultivaci na sójovém oleji s využitím stejného bakteriálního kmene k výtěžnostnímu koeficientu 0,76 g PHA na 1 g oleje a objemovému produkčnímu koeficientu 1 g/(lh)<sup>24</sup>. Námí otestovaný koncept má vedle lepších produkčních parametrů také další výhody – i. jako surovina byl použit substrát, který žádným způsobem nekonkuruje lidskému potravinovému řetězci; ii. technologie nabízí možnost odbourání problematického odpadu a jeho konverzi na produkt s vysokou přidanou hodnotou<sup>IV</sup>.

Na základě práce popsané výše byla v roce 2012 zahájena spolupráce se společností NAFIGATE Corporation, a.s. V rámci této spolupráce jsme vypracovali patent týkající se koprodukce PHA a lipolytických enzymů s využitím odpadních fritovacích olejů jako substrátu, který je již v současné době přijatý Úřadem průmyslového vlastnictví a společnost NAFIGATE Corporation, a.s. odkoupila licenci k námi patentovanému postupu<sup>V</sup>. Odpadní fritovací oleje představují významný ekologický problém především v Číně, proto se pozornost společnosti NAFIGATE obrací právě zde. Díky spolupráci s firmou Jiangsu Clean Environment Technology Co., Ltd., která se zabývá sběrem a zpracováním odpadního fritovacího oleje, bude brzy v provincii Suzhou otevřena poloprovozní linka pro biotechnologickou konverzi odpadního fritovacího oleje na PHA.

<sup>IV</sup> OBRUČA, S.; MÁROVÁ, I.; ŠNAJDAR, O.; MRAVCOVÁ, L.; SVOBODA, Z. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* from waste rapeseed oil using propanol as a precursor of 3-hydroxyvalerate. *Biotechnology Letters*, 2010, roč. 32, č. 12, s. 1925-1932.

<sup>V</sup> MÁROVÁ, I.; OBRUČA, S.; PŘIKRYL, R. Způsob produkce polyhydroxyalkanoátů (PHA) na olejovém substrátu. Český patent CZ 304183 B6, přidělen 30.10.2013.



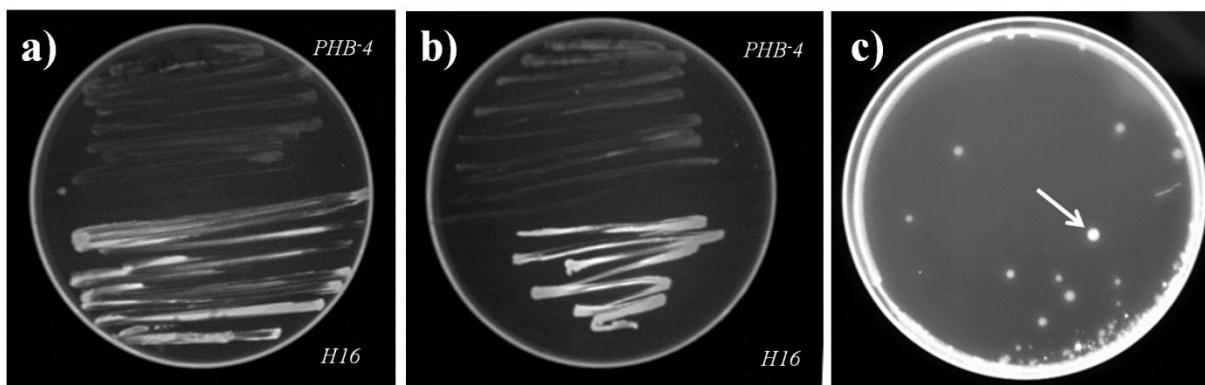
Obrázek 2. Pravděpodobný mechanismus inkorporace propanolu do struktury polymeru.

#### 4.4.2 Aplikace náhodné mutagenese k vylepšení biotechnologické konverze odpadních fritovacích olejů na PHA

Cest k navýšení ekonomické rentability produkce PHA existuje několik. Jak již bylo několikrát uvedeno, ta nejčastěji zmiňovaná spočívá ve využití cenově nenáročných (v ideálním případě odpadních) substrátů. Další možností je pak vylepšení kultivačních strategií a také je možné zlepšit biotechnologický proces pomocí výběru vhodného produkčního kmene. Samozřejmě je možné jít cestou izolace nových produkčních kmenů, ale nabízí se také úprava kmenů, které již k produkci PHA používány jsou. Jejich produkční potenciál může být navýšen pomocí cílených genetických manipulací anebo také prostřednictvím náhodné mutagenese. Obecně lze říci, že náhodná mutagenese je v současné době ve stínu cílených genetických manipulací, nicméně i tato metoda nabízí některé výhody. Pomocí náhodné mutagenese je možné odhalit a využít nové a neočekávané metabolické konsekvence a propojení.



V rámci naší práce jsme se pokusili využít náhodné mutagenese k přípravě mutantního kmene bakterie *Cupriavidus necator* H16, který by měl lepší produkční vlastnosti při kultivaci na odpadním fritovacím oleji než divoký kmen. Při náhodné mutagenesi může dojít k řadě změn v rámci genomu, přičemž ne všechny jsou samozřejmě žádoucí nebo pozitivní. Proto je obvykle experimentální problém selekce zajímavých mutantů v přítomnosti výrazného nadbytku buněk s nižším nebo žádným produkčním potenciálem. V našem případě jsme proto pro skrínink zajímavých mutantních kmenů využili barvení PHA granulí pomocí Nilské červeně, která byla přidána do pevného kultivačního média (viz. obrázek 3).



Obrázek 3. Princip barvení Nilskou červení na pevném kultivačním médiu. 4a kmen schopný produkce PHA 4b) PHA neprodukujícím kmenem, 4c kolonie označená šipkou byla vybrána k dalšímu testování.

Pro následující kultivační testy bylo vybráno 54 mutantních kmenů, jejichž PHB produkční potenciál byl v rámci kultivačních experimentů porovnán s divokým typem. Bohužel řada mutantů ztratila schopnost růstu v minerálním médiu s odpadním fritovacím olejem jako jediným uhlíkatým zdrojem. Nicméně 4 mutantní kmeny se ukázaly být významně lepšími producenty PHB než divoký kmen a vůbec k nejvyššímu navýšení produkce PHB došlo u mutantního kmene označeného jako EO1, který byl na odpadním fritovacím oleji schopen dosáhnout o 35 % vyššího výtěžku než divoký typ.

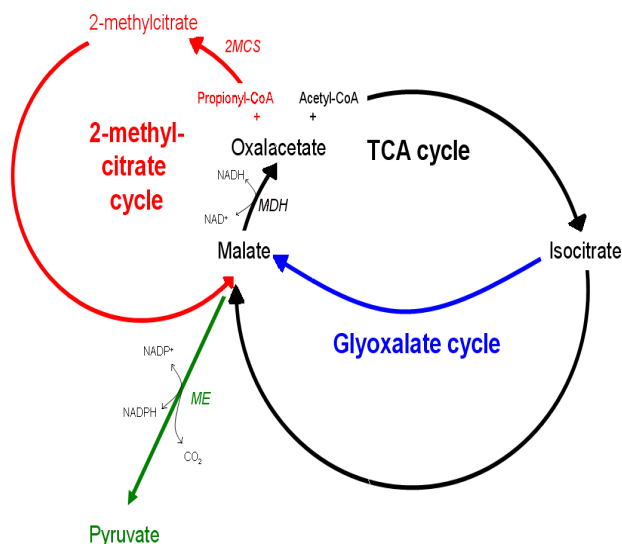
V dalším experimentu jsme pak stanovili specifické enzymové aktivity některých klíčových intracelulárních enzymů jak u mutantního kmene, tak u divokého kmene. Mutantní kmen vykazoval významně vyšší aktivitu NADP-dependentní isocitrát dehydrogenázy, NADP-dependentní malát dehydrogenázy, glukóza-6-fosfát dehydrogenázy a glutamát dehydrogenázy. Tyto enzymy jsou významné tím, že kromě svých specifických rolí v rámci jednotlivých metabolických drah, poskytují redukovaný koenzym NADPH. Proto jsou považovány za jedny z klíčových enzymů zapojených do odezvy vůči oxidačnímu stresu<sup>44</sup>. Pravděpodobně v důsledku zvýšené aktivity výše uvedených enzymů pak vykazoval mutantní kmen EO1 vyšší poměr NADPH/NADP<sup>+</sup> než divoký typ. Jak bylo uvedeno dříve, právě tento faktor je jedním z klíčových parametrů ovlivňujících tok acetyl-CoA metabolismem a aktivitu enzymů PHA syntetické dráhy..

Zdá se tedy, že mutantní kmen vykazoval známky adaptace vůči oxidačnímu stresu, přičemž posílení PHA biosyntetické dráhy bylo vedlejším efektem tohoto jevu. Abychom ověřili tuto hypotézu, vystavili jsme jak mutantní kmen, tak divoký typ působení silnému oxidačnímu stresu a stanovili viabilitu obou bakteriálních kultur. Viabilita byla výrazně vyšší u mutantního kmene, což nasvědčuje, že naše hypotéza týkající se změny metabolismu mutantního kmene byla správná.

V dalším experimentu jsme otestovali potenciál mutantního kmene produkovat kopolymer P(BH-co-HV), jako prekurzory byly použity propanol a propionát. Oba prekurzory jsou postupně přeměněny na propionyl-CoA, který může být následně metabolizován dvěma způsoby. První spočívá v jeho kondenzaci s acetyl-CoA a následné inkorporaci do struktury polymeru. Tímto způsobem je však v buňce metabolizováno jen cca 15 % propionyl-CoA, zbytek vstupuje jako

substrát do 2-methylcitrátového cyklu<sup>25</sup>. Metabolizace propionátu ve 2-methylcitrátovém cyklu je z pohledu produkce P(HB-co-HV) nežádoucí, protože výrazně snižuje efektivitu inkorporace prekurzoru do struktury kopolymeru, což ve svém důsledku má nežádoucí efekt na ekonomickou bilanci biotechnologického procesu.

Při použití propanolu jako prekurzoru byl obsah 3HV v kopolymeru u mutantního i divokého kmene přibližně stejný, efektivita inkorporace prekurzoru do struktury polymeru ( $Y_{3HV/prec}$ ) pak byla o něco vyšší u divokého kmene. Situace se však výrazně změnila při aplikaci propionátu. V tomto případě byl obsah 3HV v kopolymeru (19,5 mol. %) i efektivita inkorporace prekurzoru do struktury polymeru ( $Y_{3HV/prec} = 0,29$ ) výrazně vyšší u mutantního než u divokého kmene. Je otázkou, co může být příčinou výrazně vyšší efektivitu inkorporace propionátu do struktury polymeru u mutantního kmene EO1. Obecně je za klíčový bod C3/C4 metabolismu považován malát<sup>26</sup>. Podle naší hypotézy, je možné uvažovat, že vyšší aktivita NADP-dependentní malát dehydrogenázy, která katalyzuje oxidativní dekarboxylaci malátu za vzniku pyruvátu, sniží u mutantního kmene intracelulární hladinu oxalacetátu, což následně parciálně inhibuje 2-methylcitrátový cyklus. NADP-dependentní malát dehydrogenáza je proto podle našeho názoru možné považovat za zajímavý cíl pro genetické inženýrství<sup>VI</sup>.



Obr. 4 Význam malátu jako klíčového bodu několika metabolických drah.

#### 4.4.3 Použití hydrolyzátu syrovátky jako komplexního zdroje dusíku

Při produkci PHA s použitím rozličných substrátů, především pak rostlinných olejů jsou používána minerální kultivační média, kdy jako zdroj dusíku slouží nejčastěji amonné ionty ve formě  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  nebo  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , případně je dusík aplikován ve formě močoviny. Na druhou stranu je známo, že použití komplexních dusíkatých zdrojů bohatých na aminokyseliny, oligopeptidy a další organické formy dusíku má pozitivní vliv na rychlost růstu bakteriální kultury i výtěžek PHB a také zkracuje délku lag-fáze. Problém představuje cena tradičně používaných komplexních dusíkatých zdrojů, jako jsou kvasničný autolyzát, kvasničný extrakt nebo rozličné peptony. Zlepšení procesu, které tyto komplexní dusíkaté zdroje poskytují, obvykle nekompenzuje zvýšené ekonomické nároky na kultivační médium. Proto jsme se v naší práci pokusili vylepšit proces výroby PHA z odpadního fritovacího oleje pomocí bakteriálního kmene *Cupriavidus necator*

<sup>VI</sup> OBRUČA, S.; ŠNAJDAR, O.; SVOBODA, Z.; MÁROVÁ, I. Application of random mutagenesis to enhance the production of polyhydroxyalkanoates by *Cupriavidus necator* H16 on waste frying oil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2013, roč. 29, č. 12, s. 2417-2428.

aplikací finančně nenáročného komplexního dusíkatého zdroje – hydrolyzátu syrovátkových proteinů.

V rámci prvního experimentu byl proteolytický hydrolyzát syrovátky (PHS) porovnán s dalšími komplexními dusíkatými zdroji jako jsou sójový pepton, kvasničný extrakt nebo hydrolyzát kaseinů. Koncentrace komerčně dostupných dusíkatých zdrojů byla 3 g/l, PHS byl použit v množství představujícím 10 obj. % kultivačního média. Podle očekávání aplikace všech komplexních dusíkatých zdrojů navýšila růst biomasy v porovnání s kultivací pouze na minerálním médiu. Tento efekt však byl jednoznačně nejvýraznější právě u PHS, který podpořil růst kultury o více než 250 %. Protože PHB je intracelulárním metabolitem a výtěžek biomasy je tedy jedním z klíčových parametrů ovlivňujících výtěžek PHB, je takto silná podpora růstu bakteriální kultury z biotechnologického hlediska velice zajímavá. Intracelulární obsah PHB se v rámci experimentu pohyboval v rozmezí 50 – 69 %, nejvyšší pak byl právě u kultivace s použitím PHS. Celkově tedy aplikace PHS navýšila výtěžek PHB oproti kultuře kultivované pouze na minerálním médiu přibližně 3,3×.

Hydrolyza proteinů syrovátky pomocí proteolytických enzymů vede ke vzniku volných aminokyselin a oligopeptidů, které mohou být bakteriální kulturou snadno využity. Biosyntéza aminokyselin je pro bakterii kultivovanou v minerálním médiu energeticky velice náročný proces, proto přídavek PHS (ale i dalších komplexních zdrojů dusíku) do minerálního média významně podpořil růst bakteriální kultury. Pozitivní vliv mohly mít i další látky přítomné v syrovátce, jako jsou například puriny a vitamíny. Dále je možné předpokládat, že aplikace PHS také napomohla emulgaci odpadního fritovacího oleje a tím usnadnila jeho utilizaci bakteriální kulturou. Na druhou stranu námi používaná bakterie *C. necator* není schopna využívat cukry přítomné v syrovátce – laktózu a glukózu, takže tyto podíly syrovátky zůstanou nevyužity.

Je zajímavé, že přídavek PHS nejen navýšil růst biomasy (což se dalo předpokládat), ale také akumulaci PHB v buňkách. Zdá se, že tento efekt je důsledkem profilu aminokyselin obsažených v PHS. V literatuře je popsán pozitivní efekt některých aminokyselin na PHB biosyntetickou dráhu. Cystein, metionin, izoleucin a prolin měly pozitivní vliv na akumulaci PHB u transgenní bakterie *Escherichia coli*<sup>26</sup>, aplikace leucinu pak navyšovala intracelulární poměr NADPH/NADP<sup>+</sup> a tedy i akumulaci PHB u bakterie *C. necator*<sup>27</sup>. Podle našich analýz je PHS bohatý na leucin a izoleucin a obsahuje také významné množství prolinu a metioninu. Suma těchto aminokyselin, které mají podle literatury pozitivní vliv na akumulaci PHB, aplikovaná v rámci prvního experimentu byla u PHS nejvyšší ze všech testovaných komplexních dusíkatých zdrojů. Zdá se tedy, že profil aminokyselin dělá z PHS ideální komplexní dusíkatý zdroj pro biotechnologickou produkci PHA.

V dalším kroku jsme optimalizovali koncentraci (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a PHS v kultivačním médiu. PHS může při aplikaci v množství 10 obj. % sloužit jako jediný zdroj dusíku pro bakteriální kulturu, přičemž intracelulární obsah PHB v tomto případě dosáhl velice vysoké hodnoty 95 hm. %. Celkově nejvyšších výtěžků ale bylo dosaženo při použití (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o koncentraci 1 g/l a PHS v množství odpovídajícím 10 obj. % kultivačního média. V tomto případě dosáhl výtěžek PHB při kultivaci v Erlenmeyerových baňkách 16,3 g/l. Pro porovnání – v kontrolní kultivaci s minerálním médiem bez přídavku PHS byl výtěžek PHB 3,4 g/l.

Jelikož se aplikace PHS zdála být velice efektivní strategií pro produkci PHB s využitím odpadního fritovacího oleje jako substrátu, byly provedeny ověřovací experimenty v laboratorním bioreaktoru. Oba zdroje dusíku – (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i PHS byly aplikovány v množství, které bylo zoptimalizováno v předchozích experimentech. I v rámci těchto kultivací byl potvrzen pozitivní vliv PHS na výtěžnost procesu. Přídavek relativně malého množství cenově nenáročného dusíkatého zdroje navýšil výtěžek PHB o přibližně 40 % a měl také výrazně pozitivní vliv na efektivitu přeměny odpadního oleje na PHB, kdy produkční koeficient Y<sub>PHB/S</sub> dosáhl vysoké hodnoty 0,93 g PHB na 1 g oleje. Také intracelulární obsah PHB byl při kultivaci s použitím PHS vysoký – 90 hm. %. Obsah PHB v biomase je důležitý faktor, který ovlivňuje cenu izolace a purifikace PHB. Lze tedy konstatovat, že použití PHS jako komplexního zdroje dusíku je velice

slibnou strategií, která má pozitivní dopad nejen na samotnou biotechnologickou výrobu PHB z odpadního fritovacího oleje, ale také usnadní další kritickou část procesu – izolaci polymeru z bakteriálních buněk<sup>VII</sup>.

#### 4.5 KÁVOVÁ SEDLINA JAKO SUROVINA PRO BIOTECHNOLOGICKOU VÝROBU PHA

Káva je jedním z nejpobulárnějších nápojů současnosti. Objem produkce kávových bobů v průběhu posledních 150 let konstantně roste, přičemž v roce 2010 překonal 8 miliónů tun za rok. Není bez zajímavosti, že káva je na burzách po ropě druhou nejvíce obchodovanou komoditou a mezi zemědělskými produkty jí tedy pochopitelně patří první místo. Zemědělská produkce kávy je samozřejmě lokalizována v oblastech s příhodným. Na druhou stranu nejvyšší spotřeba kávy je v evropských zemích (především Skandinávii), v USA a Austrálii. Nicméně průmyslové zpracování kávy není omezeno jen na producentské země, ale například i Evropská unie je regionem se silným segmentem zabývajícím se zpracováním kávy – např. v roce 2012 bylo do Evropské unie dovezeno 3,12 miliónů tun kávy, tedy přibližně 40 % celosvětové produkce<sup>28</sup>.

Stinnou stránku zpracování kávy představuje vznik odpadních produktů (pevných i kapalných), které ve svém důsledku představují ekologický problém. Mezi nejvýznamnější odpady patří kávová sedlina – pevný podíl po přípravě kávy. Tento odpadní produkt vzniká při přípravě nápoje, ale také při výrobě instantní kávy, kdy na 1 kg vyrobené instantní kávy připadá cca 0,91 – 1,2 kg kávové sedliny. Uvážíme-li, že přibližně 50 % světové produkce kávy je zpracováno právě na výrobu instantní kávy, je zřejmé, že tento odpadní produkt kávového průmyslu je generován v enormních množstvích a zároveň z velké části lokalizován v kávu zpracujících závodech<sup>48</sup>.

V současné době je v literatuře popsáno několik možných přístupů k valorizaci kávové sedliny. Především se uvažuje o extrakci oleje a jeho využití pro výrobu bionafty<sup>29,30</sup>. Další možností je využití kávové sedliny k produkci ethanolu<sup>31,32</sup>, zajímavým produktem jsou i biologicky aktivní kávové polyfenoly, které mohou být z kávové sedliny relativně snadno vyextrahovány vhodným rozpouštědlem<sup>33,34</sup> a použity pro výrobu funkčních potravin anebo potravinových doplňků. V rámci naší práce jsme se pokusili vyvinout postup využití kávové sedliny k biotechnologické produkci polyhydroxyalkanoátů.

##### 4.5.1 Využití kávového oleje k produkci PHA

Nejprve jsme se rozhodli ověřit možnost extrakce oleje z kávové sedliny a jeho následného využití pro biotechnologickou produkci PHA. Olej jsme extrahovali pomocí Soxhletova extraktoru a n-hexanu jako rozpouštědla, kdy obsah oleje v kávové sedlině byl přibližně 15 hm. %. Vyextrahovaný olej jsme následně charakterizovali co do profilu mastných kyselin i základních charakteristik. V souladu s literárními zdroji obsahoval olej vyextrahovaný z kávové sedliny relativně vysoké množství volných mastných kyselin, čemuž odpovídalo vysoké číslo kyselosti.

Kávový olej byl následně otestován jako substrát pro biotechnologickou produkci PHA s využitím bakterie *Cupriavidus necator* H16 a porovnán s dalšími odpadními a/nebo levnými rostlinnými oleji. Olej vyextrahovaný z kávové sedliny se ukázal být ze všech testovaných olejů nejvhodnějším substrátem pro biotechnologickou produkci PHA – bakteriální kultura na něm dosáhla nejvyššího výtěžku biomasy i polymeru. Je zajímavé, že výtěžek PHB koreloval číslem kyselosti oleje (korelační koeficient  $R^2 = 0,9058$ ). Právě přítomnost volných mastných kyselin je jedním z faktorů, které výrazně komplikují využití oleje z kávové sedliny pro výrobu bionafty. Na

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

druhou stranu při využití oleje k biotechnologické produkci PHA mají volné mastné kyseliny naopak pozitivní vliv. Zatímco metabolizace triacylglycerolů (TAG) bakterií *C. necator* vyžaduje jejich předchozí hydrolýzu pomocí extracelulární lipázy, volné mastné kyseliny mohou být využívány přímo, což může být důležité především v počáteční fázi kultivace. Zároveň volné mastné kyseliny mohou, díky svému emulgačnímu potenciálu, zpřístupnit TAG hydrolytickému působení lipázy. A v neposlední řadě volné mastné kyseliny pravděpodobně slouží i jako induktory exprese genů kódujících extracelulární lipázy.

V dalších experimentech byl olej extrahovaný z kávové sedliny využit jako substrát při kultivaci bakteriální kultury v laboratorním bioreaktoru. Kultivace byly provedeny v režimu batch i fed-batch. Intracelulární obsah PHB byl podobný pro oba kultivační módy, batch kultivace pak poskytla vyšší výtěžnostní koeficient. Nicméně celkově se lepší a efektivnější zdá být kultivace ve fed-batch módu, kdy bylo dosaženo vyšších výtěžků PHB i biomasy a také výrazně narostl objemový produkční koeficient.

Produkční parametry dosažené v rámci laboratorních experimentů byly použity k odhadu produkčních objemů PHB v modelovém průmyslovém bioreaktoru o celkovém objemu 100 m<sup>3</sup>. Pokud by bylo dosaženo stejných parametrů jako při laboratorních experimentech, bylo by v pomoci fed-batch kultivace možno ročně vyrobit 668,8 tun PHB, k čemuž (za předpokladu obsahu oleje 15 hm. %) by bylo zapotřebí 5 573,3 tun kávové sedliny.

Kromě oleje obsahuje kávová sedlina také hemicelulózy (37 hm. %), celulózu (9 hm. %), proteiny (13 hm. %) a lignin (29 hm. %). Nabízí se tedy otázka dalšího využití pevného podílu kávové sedliny po extrakci kávového oleje. Je známo, že kávová sedlina může být použita jako palivo v průmyslových kotlích, kde produktem spalovacího procesu je energie a teplo. Podle našich experimentů snižuje vyextrahování oleje spalovací teplo kávové sedliny o cca 9 %, kdy pevný podíl po extrakci kávy vykazoval spalné teplo 18,86 MJ/kg. Tato hodnota je porovnatelná s dalšími odpady zemědělských výrob. Je tedy možné uvažovat o využití pevného podílu kávové sedliny jako paliva. Podle našich výpočtů by spálení pevného podílu kávové sedliny použité pro výrobu PHB v modelovém 100 m<sup>3</sup> bioreaktoru v režimu fed-batch poskytlo přibližně 85 TJ (2,3 · 10<sup>7</sup> kWh) energie. Reálný výtěžek energie by samozřejmě byl nižší, protože je potřeba počítat s poklesem spalného tepla v důsledku nedokonalého vysušení pevného podílu kávové sedliny a také je potřeba vzít v potaz efektivitu spalovacích kotlů pro biomasu, která se obvykle pohybuje v rozmezí 65 – 85 %. Každopádně je ale možné uvažovat, že spálení pevného podílu kávové sedliny po extrakci kávového oleje může poskytnout energii a teplo, které alespoň částečně pokryje energetické náklady spojené s extrakcí oleje, přípravou a sterilací fermentačního média, samotnou kultivací a případně také izolací polymeru z bakteriální biomasy. V ideálním případě by tak mohla být kávová sedlina kompletně využita pro výrobu produktu s vysokou přidanou hodnotou<sup>VIII</sup>.

#### 4.5.2 Využití hydrolyzátu kávové sedliny k produkci PHA

Pevný podíl kávové sedliny po extrakci kávového oleje tedy může být jednoduše využit jako zdroj energie. Na druhou stranu jeho chemické složení umožňuje i alternativní cestu jeho valorizace, kdy polysacharidy pevného podílu mohou být chemicky a/nebo enzymaticky hydrolyzovány, přičemž hydrolyzát obsahuje fermentovatelné sacharidy, což otevírá jeho možné využití jako kultivačního média pro řadu biotechnologických procesů. My jsme se nejprve pokusili využít hydrolyzát kávové sedliny (HKS) jako substrát pro produkci PHA.

Hydrolyzát delipidizované kávové sedliny byl připraven pomocí kombinace chemické a enzymatické hydrolýzy. Hydrolyzát kávové sedliny obsahoval přibližně 50 g/l sacharidů. Kávová

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

sedlina je velice zajímavá složením hemicelulóz. Na rozdíl od jiných lignocelulózových materiálů jsou její hemicelulózy tvořeny především hexózami a to manózou a galaktózou. Díky tomu byly tyto dva sacharidy nejvíce zastoupenými cukry hydrolyzátu, který také obsahoval glukózu, arabinózu a celobiózu.

Kromě sacharidů obsahoval hydrolyzát kávové sedliny také některé látky, které mohou mít na biotechnologický proces nežádoucí vliv. Vysoký obsah solí může indukovat osmotický šok a tím inhibovat růst bakteriální kultury. Dalšími významnými antimikrobiálními látkami v kultivačním médiu jsou pak produkty degradace hexóz – kyselina levulinová a 5-hydroxymethyl furfural (5HMF). A nakonec hydrolyzát kávové sedliny obsahoval relativně vysoké množství polyfenolů, které také mohou negativně ovlivnit růst a metabolickou aktivitu mikroorganismů.

Jako produkční kmen jsme vybrali bakterii *Burkholderia cepacia*, která dokáže využít široké spektrum sacharidů a zároveň je schopna tolerovat relativně vysoké koncentrace antimikrobiálních látek přítomných v hydrolyzátech lignocelulóz. Tato bakterie byla, podle našich předpokladů, schopna využívat hydrolyzát kávové sedliny a zároveň produkovat PHA. V prvním experimentu jsme optimalizovali ředění hydrolyzátu kávové sedliny. Nejvyšších výtěžků PHA bylo dosaženo, když hydrolyzát představoval 30 obj. % kultivačního média. Nižší dávka hydrolyzátu pravděpodobně neposkytovala dostatek živin, při použití vyšší dávky měla pravděpodobně koncentrace mikrobiálních inhibitorů již negativní vliv.

Zajímavé je, že bakteriální kultura při použití hydrolyzátu kávové sedliny produkovala kopolymer P(HB-co-HV) bez nutnosti přídavku prekurzoru 3HV. Je velice pravděpodobné, že roli prekurzoru v tomto případě sehrála kyselina levulinová.

V dalším experimentu byla proměřena růstová a produkční křivka při kultivaci bakterie *B. cepacia* na hydrolyzátu kávové sedliny v Erlenmeyerových baňkách. Kyselina levulinová byla kompletně využita v průběhu prvních 48 h kultivace, podíl 3HV v kopolymeru pak s rostoucím časem klesal. Lze tedy předpokládat, že bakterie nejdříve akumulovala kopolymer P(HB-co-HV), poté co však vyčerpala prekurzor 3HV, docházelo již k akumulaci pouze PHB, čemuž nasvědčuje i klesající obsah 3HV v kopolymeru. Výsledný materiál je tedy pravděpodobně blendem dvou polymerů – kopolymeru P(HB-co-HV), který byl syntetizován v první fázi kultivace, a homopolymeru PHB, který byl akumulován po vyčerpání prekurzoru. Tuto naši teorii potvrdily i výsledky termické analýzy, které odhalily dvě teploty tání materiálu: 162,3°C a 170,2°C. Nižší teplota pravděpodobně odpovídá kopolymeru, vyšší pak homopolymeru PHB.

V průběhu kultivace byly současně využívány všechny přítomné sacharidy, glukóza a arabinóza (které byly přítomny v nejnižší koncentraci) byly spotřebovány nejdříve. Je tedy možné předpokládat, že při použití fed-batch kultivační strategie nehrozí akutní problém s hromaděním pentóz anebo jiných sacharidů v kultivačním médiu a následné katabolické represí substrátem.

Jak již bylo uvedeno, hydrolyzát kávové sedliny (stejně jako další hydrolyzáty lignocelulózových materiálů) obsahuje řadu antimikrobiálních látek, které mají negativní vliv na kultivační proces. V rámci dalších experimentů jsme se pokusili využít některé detoxifikační postupy, abychom snížili obsah těchto látek v hydrolyzátu a tím jej zpřístupnili bakteriální kultuře. Jednak byla otestována sorpce inhibitorů z hydrolyzátu na aktivní uhlí a také procedura zvaná „overliming“. Obě tyto detoxifikační metody vykazovaly vysokou účinnost odstranění polyfenolů, levulinové kyseliny i 5HMF, nicméně v průběhu detoxifikačního procesu došlo také k nežádoucímu snížení koncentrace redukcujících sacharidů. Další testovanou detoxifikační metodou byla extrakce polyfenolů (podle našeho předpokladu nejvýznamnějších inhibitorů hydrolyzátu) z kávové sedliny pomocí ethanolu před samotnou hydrolýzou. Tento postup snížil obsah polyfenolů v hydrolyzátu kávové sedliny o přibližně 30 % bez negativního dopadu na koncentraci redukcujících cukrů. Tato skutečnost se pozitivně projevila při následné kultivaci, kdy při kultivaci na hydrolyzátu kávové sedliny, z níž byly před hydrolýzou extrahovány polyfenoly pomocí ethanolu, bylo dosaženo o přibližně 30 % vyšších výtěžků než u kontrolní kultivace. Zároveň vedlejší produkt detoxifikačního procesu (kávové polyfenoly) jsou velice zajímavou skupinou

látek. Jedná se především o kyselinu chlorogenovou a její deriváty, které dokáže lidský organismus snadno vstřebat a následně mají velice pozitivní dopad na lidské zdraví – jedná se o antioxidanty, u kterých byl popsán například neuroprotektivní efekt<sup>35</sup>. Proto by mohly být použity jako složka funkčních potravin nebo potravinových doplňků.

Káвовá sedlina je tedy velice zajímavým substrátem, který může být převeden na PHA ve dvou na sebe navazujících krocích. Prvním krokem je biotechnologická konverze oleje extrahovaného z kávové sedliny na PHB s využitím bakterie *Cupriavidus necator*. Pevný podíl kávové sedliny po extrakci oleje může být hydrolyzován a kapalný hydrolyzáta pak může být využit jako substrát pro biotechnologickou výrobu P(HB-co-HV) pomocí bakterie *Burkholderia cepacia*. Výtěžnostní koeficient prvního kroku při kalkulaci kávové sedliny jako substrátu byl  $Y_{PHA/SCG} = 0,13$ , při utilizaci hydrolyzáta kávové sedliny pak bylo dosaženo výtěžnostního koeficientu  $Y_{PHA/SCG} = 0,07$ . Při kombinaci obou přístupů je tedy možné dosáhnout přibližně 20 % konverze kávové sedliny na PHA. Pevné podíly po extrakci anebo i po hydrolyze vykazují relativně vysoké spalné teplo, takže by je bylo možné využít k pokrytí části energetických nákladů spojených s jednotlivými kroky procesu. Zároveň jeden z vedlejších produktů, ethanolový extrakt kávové sedliny obsahující hodnotné kávové polyfenoly, lze také považovat za produkt s vysokou přidanou hodnotou<sup>IX</sup>.

## 4.6 PRODUKCE KAROTENOIDŮ

Karotenoidy jsou žluté, oranžové a červené, výjimečně také žlutozelené, převážně lipofilní barviva, které se nachází v rostlinách, houbách, řasách mikroorganismech, ale též živočíchů. Chemicky se karotenoidy řadí mezi terpenoidy, obsahují celkem osm izoprenových jednotek, přičemž za barevnost jsou zodpovědné řetězce konjugovaných dvojných vazeb. Karotenoidy se dělí na dvě hlavní skupiny: karoteny a jejich kyslíkaté deriváty označované jako xantofyly. Karotenoidy jsou součástí fotosyntetických systémů rostlin, řas a fototrofních bakterií. V organismech neschopných fotosyntézy jsou důležitou složkou ochrany vůči foto-oxidativním procesům a zároveň slouží jako antioxidanty chránící buněčné membrány vůči reaktivním formám kyslíku<sup>36</sup>.

Karotenoidy nacházejí uplatnění v řadě oblastí – v potravinářství se jich využívá jako barviv, jsou často přidávány do krmných směsí pro zemědělská zvířata, používají se pochopitelně v kosmetice a roste jejich význam také ve farmaceutickém průmyslu. V současné době je karotenoidům připisována schopnost preventivně bránit rozvoji rakoviny a také některých dalších chorob. Z těchto důvodů lze očekávat, že poptávka trhu po karotenoidech v příštích letech významně poroste. Biotechnologická výroba karotenoidů tedy může být řešením rostoucích nároků trhu, nicméně aby mohla být tato cesta ekonomicky rentabilní, je nutné snížit výrobní cenu produktu například využitím levné vstupní suroviny<sup>37</sup>.

### 4.6.1 Využití hydrolyzáta kávové sedliny k produkci karotenoidů

V rámci naší práce jsme se rozhodli otestovat možnost využití hydrolyzáta kávové sedliny také jako vstupní suroviny pro biotechnologickou produkci karotenoidů pomocí vybraných kmenů karotenogenních kvasinek – *Sporobolomyces roseus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula glutinis* a *Cystofilobasidium capitatum*. Všechny testované karotenogenní kvasinky dokázaly využívat hydrolyzáta kávové sedliny jako růstové médium, nicméně suverénně nejvyšších výtěžků biomasy i karotenoidů bylo dosaženo u kvasinky *Sp. roseus*. Tato kvasinka dokázala dokonce

<sup>IX</sup> OBRUČA, S.; BENEŠOVÁ, P.; PETRIK, S.; OBORNÁ, J.; PŘIKRYL, R.; MÁROVÁ, I. Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolysate of spent coffee grounds. *Process Biochemistry*, 2014, roč. 49, č. 9, s. 1409-1414.

využívat hydrolyzáty kávové sedliny efektivněji než bazální minerální médium s glukózou. Kvasinka vykazoval při kultivaci na hydrolyzátu kávové sedliny nejvyšší výtěžky biomasy a karotenoidů, profil karotenoidů u tohoto kmene obsahoval nejvyšší množství (62 %)  $\beta$ -karotenu, který je považován za vysoce hodnotný karotenoid s nejvyšší aktivitou vitamínu A.

Jelikož se *Sp. roseus* zdál být výrazně nejlepším produkčním kmenem při použití hydrolyzátu kávové sedliny jako kultivačního média, v dalších experimentech jsme ověřili potenciál této kvasinky v sérii kultivací v laboratorním fermentoru. Nejprve byla provedena kultivace v batch kultivačním módu, nejvyšších výtěžků biomasy i karotenoidů bylo dosaženo v čase 48 h, kdy koncentrace biomasy dosáhla 14,2 g/l a celkový výtěžek karotenoidů 15,7 mg/l. Následně byla aplikována fed-batch kultivační strategie, kdy jako příkrm byl použit hydrolyzát kávové sedliny, který byl šetrným odpařením zakonzervován na celkovou koncentraci sacharidů 370 g/l (původní objem 1 l, konečný objem 180 ml). V rámci předchozí kultivace jsme si experimentálně ověřili, že vyčerpání cukrů z kultivačního média je doprovázeno nárůstem pH. Kultura pravděpodobně začne využívat aminokyseliny, peptidy a proteiny jako zdroj uhlíku, což je doprovázeno sekrecí zásaditých dusíkatých metabolitů. Této skutečnosti jsme využili při fed-batch kultivaci, kdy byl přídavek substrátu realizován ve třech dávkách při nárůstu pH. Nejvyšší produktivity systému bylo dosaženo v 72 h kultivace, kdy koncentrace biomasy v reaktoru byla 36,8 g/l a koncentrace karotenoidů pak 29,9 mg/l. S použitím fed-batch kultivace tedy bylo dosaženo přibližně dvojnásobných výtěžků oproti jednoduchému vsádkovému režimu<sup>X</sup>.

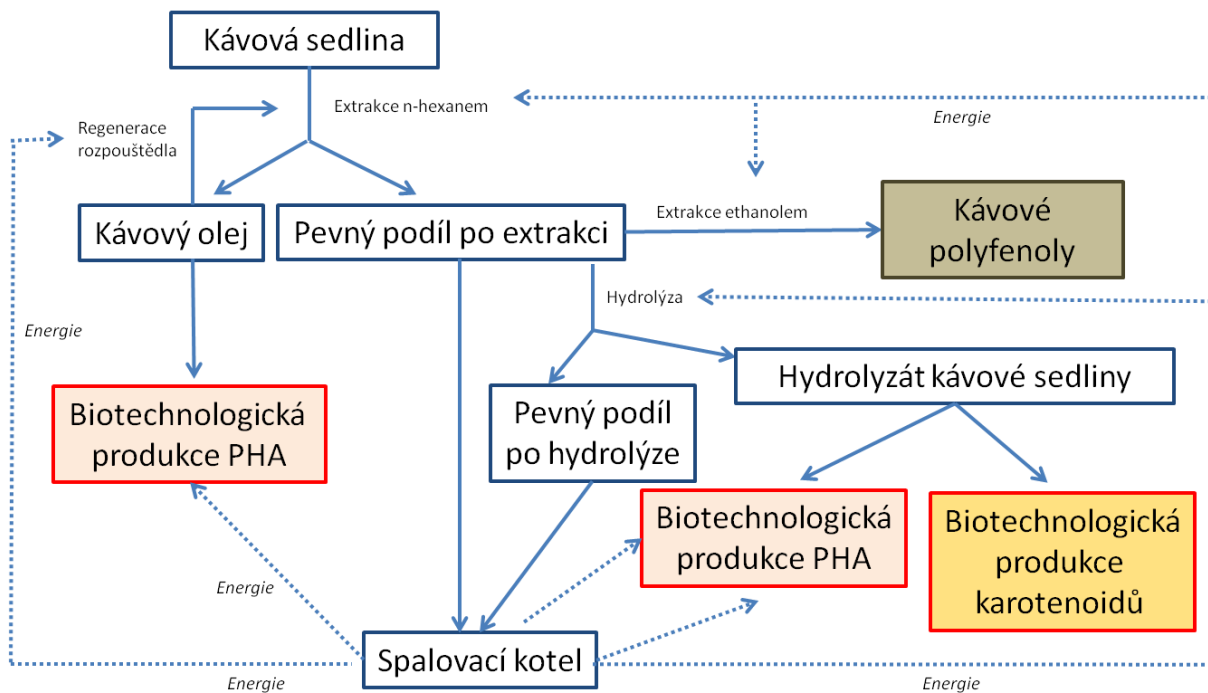
#### 4.6.2 Koncepce „Coffee –BioRaf“

Celá studie týkající se využití kávové sedliny k biotechnologické produkci PHA a/nebo karotenoidů je v souladu s moderním trendem maximální valorizace potravinářských odpadů prostřednictvím principu označovaného jako biorafinerie. Kávová sedlina je významný potravinářský odpad, jehož velká část je vedlejším produktem výroby instantní kávy, takže odpad je pak lokalizován ve výrobních závodech. To významně usnadňuje logistickou část potenciálního zpracování kávové sedliny – provoz zabývající se její valorizací by mohl být přímo součástí závodu pro výrobu a zpracování instantní kávy. Další velké množství kávové sedliny pak vzniká při přípravě nápoje ať už v restauracích, kavárnách, podnicích hromadného stravování anebo v domácnostech. Problematikou sběru kávové sedliny z těchto zdrojů se zabývali Zuorro a Lavecchia, kteří odhadují, že jen v oblasti Říma je reálně možné nashromáždit ročně více než 10 000 tun kávové sedliny<sup>38</sup>.

Námi uvažovaná technologie je pak schematicky znázorněna na obrázku 5. Kávová sedlina je nejprve využita jako zdroj oleje, který je následně využit jako substrát pro biotechnologickou produkci PHA s využitím bakterie *C. necator* H16. Pevný podíl kávové sedliny po extrakci kávové sedliny je pak podroben druhému extrakčnímu kroku, kdy jsou pomocí vodného roztoku etanolu (30 obj. %) extrahovány kávové polyfenoly. Motivací k tomuto kroku jsou nejen zajímavé vlastnosti kávových polyfenolů, ale také snaha o odstranění těchto antimikrobiálních látek a s tím související navýšení výtěžností dalších biotechnologických kroků zamýšlené technologie. Pevný podíl kávové sedliny je dále možno hydrolyzovat, jako optimální se jeví kombinace chemické a enzymatické hydrolýzy, kdy kapalný hydrolyzát může být využit jako substrát pro biotechnologickou výrobu PHA pomocí bakterie *B. cepacia*, anebo pro produkci karotenoidů pomocí basidiomycetní kvasinky *Sp. roseus*. Pevný podíl po hydrolýze, případně i pevný podíl po první nebo druhé extrakci, je pak díky vysokému spalnému teplu možné využít jako palivo, které může částečně pokrýt energetické a tepelné nároky uvažovaných procesů.

<sup>X</sup> PETRIK, S.; OBRUČA, S.; BENEŠOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. Bioconversion of spent coffee grounds into carotenoids and other valuable metabolites by selected red yeast strains. *Biochemical Engineering Journal*, 2014, roč. 90, s. 307-315. ISSN: 1369- 703X.





Obrázek 5. Schéma biorafinerie zabývající se zpracováním kávové sedliny

Výše popsaná komplexní technologie pracovně nazvaná „Coffee Bio-Raf“ byla formou zvané přednášky představena na mezinárodní konferenci BioTech 2014 & 6th Czech-Swiss Symposium (Praha) a také formou přednášky presentována na mezinárodní konferenci 16th European Congress on Biotechnology (Edinburgh, Velká Británie). Naše původní myšlenka je také předmětem patentové přihlášky, která byla podána Úřadu průmyslového vlastnictví (číslo patentové přihlášky 2013-1002). Zároveň byla komplexní technologie publikována v mezinárodním impaktovaném časopise<sup>XI</sup>. Problematice biotechnologické konverze lignocelulóзовých materiálů na polyhydroxyalkanoáty, ale také další hodnotné produkty, se v současné době intenzivně věnujeme. Důkazem je nedávno publikovaný přehledový článek, který shrnuje současný stav poznání v oblasti výroby polyhydroxyalkanoátů z lignocelulózy<sup>XII</sup>.

#### 4.7 PRODUKCE ENZYMŮ DEGRADUJÍCÍCH LIGNOCELULÓZU

Jak již bylo uvedeno výše, lignocelulóзовé materiály, a to včetně odpadů potravinářského průmyslu, představují perspektivní substráty pro řadu nejen biotechnologických výrob. V současné době není ani zdaleka využit potenciál, který se v těchto snadno dostupných materiálech ukrývá. Nejčastěji uvažovaná strategie valorizace těchto odpadů zahrnuje krok sacharifikace – tedy převedení celulózy a případně hemicelulózy na snadno utilizovatelné cukry. V řadě případů se k tomuto účelu využívá enzymatická hydrolyza glykosidických vazeb polysacharidů, které obvykle předchází mechanická a chemická úprava materiálu, která má za cíl usnadnit enzymatickou hydrolyzu a navýšit její efektivitu zvýšením dostupnosti polysacharidů. Z ekonomického hlediska představují největší problém enzymy, jejichž cena je stále vysoká. Proto je v současné době věnována velká pozornost biotechnologické přípravě enzymů schopných hydrolyzy a/nebo degradace lignocelulózy – jsou stále izolovány a charakterizovány nové mikrobiální kmeny schopné

<sup>XI</sup> OBRUCA, S.; BENESOVA, P.; KUCERA, D.; PETRIK, S.; MAROVA, I. Biotechnological conversion of spent coffee grounds into polyhydroxyalkanoates and carotenoids. *New Biotechnology*. DOI: 10.1016/j.nbt.2015.02.008

<sup>XII</sup> OBRUCA, S.; BENESOVA, P.; MARSALEK, L.; MAROVA, I. Use of lignocellulosic materials for PHA production. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, roč. 29, č. 2. 135-144 s.

exkrece těchto enzymů, stejně tak jsou i testovány nejrůznější kultivační strategie pro maximalizaci výtěžků enzymů<sup>39</sup>.

Mikroorganismy schopné utilizace lignocelulózových materiálů obvykle extracelulárně produkují komplexní enzymové koktejly, které se skládají z hydrolytických enzymů schopných katalyzovat hydrolýzu rostlinných polysacharidů (celulózy a hemicelulózy), proteinů a často i lipidů. Především některé mikroskopické houby jsou ale schopné produkovat také enzymy katalyzující degradaci ligninu. Všechny tyto enzymy mají řadu aplikací v různých odvětvích průmyslu. Samozřejmě se ve formě komplexních nepurifikovaných nebo jen částečně purifikovaných enzymových preparátů používají při valorizaci lignocelulóz. Ale například lakáza se také využívá k bioremediaci odpadních vod, stabilizaci vína a piva nebo výrobě ovocných šťáv<sup>40</sup>.

#### 4.8 VYUŽITÍ PLÍSNĚ *FUSARIUM SOLANI* PRO PRODUKCI ENZYMŮ DEGRADUJÍCÍCH LIGNOCELULÓZU

V rámci našich experimentů zaměřených na využití rozličných odpadních potravinářských substrátů jsme se věnovali i biotechnologické výrobě enzymů schopných hydrolýzy lignocelulóz pomocí vybraných hub. Podle výsledků našich experimentů je v tomto kontextu zajímavá plíseň *Fusarium solani* F-552, která je doposud poněkud stranou zájmu biotechnologů věnujícím se produkci enzymů pro hydrolýzu lignocelulóz. Nicméně námi testovaný kmen je schopný produkce nejen hydrolytických enzymů – celulózy, xylanázy, proteázy i lipázy, ale také tří z nejdůležitějších enzymů zapojených do degradace ligninu – mangan dependentní peroxidázy, lignin peroxidázy a extracelulární lakázy. Je zajímavé, že současná produkce všech třech lignin degradujících enzymů byla u *F. solani* pozorována pouze námi u kmene F-552. Saparrat a kolektiv pozorovali u pěti isolátů *F. solani* produkci mangan dependentní peroxidázy a lakázy<sup>41</sup>, naopak *F. solani* f. sp. *glycines* bylo schopno exkrece lakázy a lignin peroxidázy, produkce mangan dependentní peroxidázy nebyla pozorována<sup>42</sup>. Zdá se tedy, že schopnost extracelulární produkce oxidáz podílejících se na degradaci ligninu je významně kmenově specifická a jednotlivé kmeny téhož druhu se mohou lišit nejen co do množství exkretovaných enzymů, ale existují i významné rozdíly ve složení enzymových koktejlů i u relativně blízkých kmenů.

K našemu překvapení kmen *F. solani* produkoval některé námi sledované extracelulární enzymy (celulózy, xylanázy, proteázy, mangan dependentní peroxidázy a lignin peroxidázy) i při kultivaci v minerálním médiu s glukózou jako jediným zdrojem uhlíku. Nicméně výrazně vyšších výtěžků bylo dosaženo, pokud byl do kultivačního média přidán lignocelulózový odpadní produkt potravinářských výrob. U hydrolytických enzymů (celulózy, xylanázy a proteázy) bylo výrazně nejvyšších výtěžků dosaženo při aplikaci kukuřičných otrub. Výtěžky enzymů byly v tomto případě 10× až 20× vyšší než v samotném minerálním médiu.

Přídavek odpadních materiálů dle očekávání navýšil také produkci lignin degradujících enzymů. Je zajímavé, že typ použitého odpadního materiálu neměl dopad jen na výtěžek těchto enzymů, ale i na složení enzymového koktejlů. Například při kultivaci s použitím kukuřičných otrub byla v kultivačním médiu detekována vysoká aktivita nejen hydrolytických enzymů, ale také mangan dependentní peroxidázy a lignin peroxidázy, nicméně žádná aktivita lakázy. Naopak použití pšeničných otrub vedlo ke spíše nižší produkci hydrolytických enzymů i obou sledovaných peroxidáz, ale zároveň nejvýrazněji ze všech testovaných odpadních materiálů navýšilo výtěžek lakázy.

Efektivita procesu produkce enzymů schopných hydrolýzy a degradace lignocelulóz může být tedy výrazně navýšena použitím potravinářských odpadů, kdy typ použitého odpadu má výrazný vliv nejen na výtěžky jednotlivých enzymů, ale ovlivňuje také složení enzymového koktejlů. Kromě lignocelulózových materiálů byly jako induktory lignin degradujících enzymů otestovány také vybrané chemikálie, konkrétně pak rostlinné polyfenoly (kyseliny ferulová, gallová a p-

hydroxybenzoová, (+)-katechin) a také chemikálie, které se obvykle používají jako substráty při stanovení enzymových aktivit peroxidáz a lakázy (fenolická červeň, veratrylalkohol a 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina (ABTS)).

Poslední testovanou strategií pro navýšení výtěžku lignin degradujících enzymů byl přídavek peroxidu vodíku. Ten pochopitelně hraje klíčovou roli při enzymatické oxidaci ligninu katalyzovanou mangan dependentní peroxidázou a lignin peroxidázou, proto by jeho přídavek mohl mít pozitivní vliv i na produkci těchto enzymů. Role  $H_2O_2$  při oxidativní degradaci ligninu je však ještě důležitější. Zdá se, že především v počáteční fázi biodegradace ligninu nemohou lignin degradující enzymy účinně penetrovat resistantní materiál. Pravděpodobně je to právě  $H_2O_2$ , který narušuje povrchové struktury ligninu a zpřístupní materiál enzymům s lignin degradační aktivitou. Proto řada lignin degradujících plísní produkuje enzymy schopné generovat  $H_2O_2$ <sup>43</sup>. Peroxid vodíku výrazně navýšil produkci především obou peroxidáz i v samotném minerálním médiu, je tedy možné předpokládat, že extracelulární peroxidázy jsou nějakým způsobem zapojeny do stresové odpovědi vůči peroxidu vodíku. Výraznější navýšení produkce peroxidáz i lakázy bylo pozorováno při použití peroxidu vodíku a gallové kyseliny a ještě více pak při aplikaci  $H_2O_2$  a kukuřičných otrub. Přídavek peroxidu vodíku je tedy zajímavou a originální kultivační strategií, která má pozitivní dopad nejen na produkci PHB, ale lze ji také využít při biotechnologické produkci enzymů schopných degradace lignocelulózových materiálů<sup>XIII</sup>.

#### 4.9 BIODEGRADACE POLYURETHANOVÝCH MATERIÁLŮ

Biodegradace polymerních materiálů je procesem, při kterém dochází k postupnému rozkladu polymerů působením živých organismů, především mikroorganismů, a to jak bakterií, tak i plísní a kvasinek. Ve své podstatě se jedná o přirozený a ekologicky šetrný způsob eliminace materiálu. Proces biodegradace ovlivňuje řada faktorů. Především jsou to fyzikální a chemické parametry degradovaného materiálu, které jsou klíčovým faktorem ovlivňujícím kinetiku biodegradačního procesu. Proces biodegradace ale ovlivňují i další činitelé - přítomnost mikrobiální populace s příslušným degradačním potenciálem a v neposlední řadě abiotické ale i biotické parametry ovlivňující růst mikroorganismů<sup>10</sup>.

Obecný mechanismus biodegradace jakéhokoliv polymerního materiálu předpokládá, že extracelulární depolymerázy mikroorganismů štěpí polymer na menší jednotky (oligomery, dimery a monomery), jejichž velikost již umožní jejich transport do buňky, kde jsou poté využity jako zdroj uhlíku (ale i dalších prvků) a energie<sup>44</sup>.

Ne všechny procesy, kterým je polymer v přírodě vystaven, jsou spojeny s činností mikroorganismů. Často dochází k tzv. rozpouštění polymeru, případně k jeho fragmentaci (tj. k rozpadu na menší částice), přičemž tyto procesy jsou čistě abiotické povahy<sup>45</sup>.

Polyurethany (PUR) jsou širokou skupinou syntetických polymerních materiálů, které nacházejí uplatnění v mnoha oblastech života moderní spotřební společnosti. PUR se vyrábějí polyadící vícefunkčních izokyanátů a vhodných vícefunkčních alkoholů (tzv. polyolů).<sup>46</sup> Obecně lze říci, že PUR materiály jsou přístupné mikrobiální degradaci. Biodegradační aktivita byla pozorována u řady mikroorganismů, nicméně velká většina těchto studií byla vedena potřebou zamezit biodegradaci PUR materiálů a tím zabránit změně jejich vlastností v průběhu používání. V dnešní době, kdy se bere více na zřetel environmentální hledisko produkce PUR, se řada výzkumných prací zabývá studiem biodegradace z pohledu zvýšení biodegradability materiálu. Předmětem studia řady výzkumníků jsou také enzymatické a biochemické pochody doprovázející proces biodegradace<sup>47</sup>.

<sup>XIII</sup> OBRUČA, S.; MÁROVÁ, I.; MATOUŠKOVÁ, P.; HÁRONIKOVÁ, A.; LICHNOVÁ, A. Production of lignocellulose-degrading enzymes employing *Fusarium solani* F- 552. *Folia Microbiologica*, 2012, roč. 57, č. 3, s. 221-227. ISSN: 0015- 5632.

#### 4.9.1 Studium biodegradability modifikovaných polyurethanových elastomerů

V rámci naší práce jsme studovali biodegradabilitu modifikovaných polyurethanových elastomerů, které byly připraveny z polyolu na bázi polyetheru (Slovaprop G48, Gumotex, Břeclav) a aromatického diizokyanátu (směs toluen-2,4-diisokyanátu a toluen-2,6-diisokyanátu v poměru 4:1, Gumotex, Břeclav). Modifikace spočívala v parciálním (10 hm. %) nahrazení polyolu modifikovanými biopolymery na bázi rostlinných polysacharidů. PUR materiály byly připraveny zaměstnanci Ústavu chemie materiálů, jejich syntéza a vlastnosti jsou podrobně popsány v práci Vojtova a kol.<sup>48</sup>. Biodegradabilita výše popsaných materiálů byla testována s použitím směsné termofilní bakteriální kultury, která nachází své uplatnění při čištění odpadních vod.

Biodegradační test spočíval v submerzní kultivaci bakteriální kultury v přítomnosti testovaných PUR materiálů. Použito bylo minerální syntetické médium obsahující glukózu jako jediný organický zdroj uhlíku. V průběhu experimentu byl monitorován růst bakteriální kultury, po ukončení kultivace pak byl stanoven hmotnostní úbytek materiálu a provedena analýza povrchu materiálu pomocí optické mikroskopie. V prvním experimentu byl porovnán referenční (nemodifikovaný) PUR elastomer s referenční PUR pěnou, která byla připravena z totožných surovin, napěnění bylo realizováno přidávkem malého množství vody v průběhu syntetického procesu. Bylo zajímavé, že v přítomnosti PUR elastomeru vykazovala bakteriální kultura neobvykle dlouhou lag-fázi (150 h), která však u PUR pěny nebyla pozorována. Zdá se, že PUR elastomer obsahoval toxické látky, které se z něj v průběhu expozice vodnímu prostředí uvolnily a následně inhibovaly růst bakteriální kultury. V dalším experimentu jsme se pokusili identifikovat suroviny použité pro syntézu PUR elastomerů, které mohly být zodpovědné za neobvykle dlouhou lag-fázi při kultivaci bakteriální kultury. Otestovány byly jak jednotlivé chemikálie, tak také jejich kombinace. Pokud byly v kultivačním médiu přítomné jednotlivé suroviny, růst bakteriální kultury byl pomalejší, nicméně nebyla pozorována výrazná lag-fáze. Tento efekt se dostavil, až když v médiu byla přítomna kombinace polyolu a použitého katalyzátoru (dibutylcindilaurát). Je to tedy právě kombinace obou chemikálií, které je zodpovědná za neobvykle dlouhou lag-fázi.

Dále jsme se zaměřili na studium biodegradability modifikovaných PUR elastomerů, u kterých bylo 10 hm. % potenciálně toxického polyolu nahrazeno biopolymerem na bázi rostlinných polysacharidů. Tato modifikace ve většině případů výrazně zkrátila lag-fázi, která byla typickým jevem doprovázející kultivace směsné termofilní bakteriální kultury v přítomnosti PUR elastomerů. Nejvýraznější zkrácení lag-fáze (více než 3× oproti referenčnímu materiálu) bylo pozorováno u materiálu, který byl modifikován acetylovaným škrobem. Modifikace materiálu zároveň výrazně napomohla růstu kultury, takže obsah biomasy byl při kultivaci v přítomnosti všech modifikovaných materiálů vyšší než u kontrolní kultivace (bez PUR) anebo v přítomnosti referenčního nemodifikovaného materiálu.

Lze tedy konstatovat, že modifikace PUR materiálů spočívající v parciálním nahrazení polyolu, jsou perspektivní strategií s několika pozitivními ekologickými dopady. Dochází k částečnému nahrazení petrochemické neobnovitelné suroviny za surovinu obnovitelnou, substituce redukuje toxicitu materiálů a zároveň vhodná substituce také navyšuje biodegradabilitu jinak velice rezistentních PUR materiálů na bázi polyetherových polyolů<sup>XIV</sup>.

<sup>XIV</sup> OBRUČA, S.; MÁROVÁ, I.; VOJTOVÁ, L. Biodegradation of polyether polyol based polyurethane elastomeric films influence of partial replacement of polyether polyol by biopolymers of renewable origin. *Environmental Technology*, 2011, roč. 31, č. 9, s. 1043-1052.

## 5 NEJVÝZNAMNĚJŠÍ ZÁVĚRY PRÁCE

Původní výsledky předložené habilitační práce je možné shrnout do několika závěrů.

- Aplikace peroxidu vodíku a ethanolu jako stresových činidel je zajímavou inovativní strategií, která může navýšit akumulaci PHA v buňkách a díky tomu i zlepšit výtěžnostní parametry biotechnologické produkce PHA. Nicméně čas přidavku stresového faktoru a také jeho koncentrace musí být optimalizovány tak, aby nepůsobil na bakteriální buňky výrazně toxicky. Součástí habilitační práce byli i objasnění metabolických souvislostí navýšení akumulace PHA v bakteriálních buňkách a konkrétní stresové odpovědi vůči obou vybraným stresovým faktorům.
- Syrovátka byla v rámci práce využita jako cenově nenáročný uhlíkatý substrát při biotechnologické produkci PHB při použití bakterie *Bacillus megaterium* CCM 2037 jako produkčního kmene.
- Odpadní fritovací oleje byly v rámci práce identifikovány jako velice perspektivní substrát pro biotechnologickou produkci PHA s využitím bakteriálního kmene *Cupriavidus necator* H16. Propanol pak může být použit jako prekurzor 3-hydroxyvalerátu, což ve svém důsledku vede k akumulaci kopolymeru P(HB-co-HV), který vykazuje lepší mechanické a procesní charakteristiky, než homopolymer PHB.
- Náhodná mutagenese je zajímavý nástroj k navýšení produkčního potenciálu PHA akumulujícího kmene. Námí připravený mutant bakterie *C. necator* H16 vykazoval znaky adaptace vůči oxidačnímu stresu, což pravděpodobně bylo příčinou posílení PHA biosyntetické dráhy a výrazně vylepšeného produkčního potenciálu tohoto mutantního kmene při kultivaci na odpadním fritovacím oleji.
- V rámci práce byla vyvinuta originální kultivační strategie, kdy syrovátka hydrolyzovaná komerční proteázou slouží jako cenově nenáročný komplexní dusíkatý zdroj, jehož aplikace výrazně navyšuje výtěžky při biotechnologické výrobě PHB na odpadním fritovacím oleji.
- Kávová sedlina je zajímavým odpadním substrátem, který může být kompletně využit jako substrát pro biotechnologickou produkci PHA. Námí navržená strategie valorizace kávové sedliny spočívá v extrakci oleje z kávové sedliny a jeho použití jako substrátu pro biotechnologickou výrobu PHA obdobně, jako tomu bylo u odpadních fritovacích olejů. Pevný podíl po extrakci oleje může být hydrolyzován a kapalný podíl po hydrolýze pak může být využit jako substrát pro biotechnologickou výrobu PHA pomocí bakterie *Burkholderia cepacia* CCM 2656. Pevný podíl po hydrolýze (ale i po extrakci oleje) může být využit jako palivo, jehož spálením může být alespoň částečně pokryta energetická náročnost výše popsaného procesu.
- Zároveň byl vyvinut alternativní způsob využití hydrolyzátu kávové sedliny. Ten může být použit jako substrát pro produkci karotenoidů pomocí karotenogenní kvasinky *Sporobolomyces roseus* CCY 19-6-4.
- Byla vypracována komplexní strategie valorizace kávové sedliny, která byla pod pracovním názvem „Coffee- BioRaf“ prezentována na významných vědeckých konferencích a zároveň je obsahem podané patentové přihlášky.
- Plíseň *Fusarium solani* F-552 je zajímavým producentem hydrolytických enzymů pro sacharifikaci rostlinné biomasy (celuláz, xylanáz, proteáz i lipáz) a stejně tak je schopna exkrece lignin degradujících enzymů. Enzymatické aktivity těchto významných enzymů v kultivačním médiu mohou být navýšeny současnou aplikací dvou induktorů - kukuřičných otrub a peroxidu vodíku.

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH LITERÁRNÍCH ZDROJŮ

1. Towards the future we want: End of hunger and make the transition to sustainable agricultural and food systems. Food and agriculture organization of the United Nations, Rome, 2012.
2. MIRABELLA, N., V. CASTELLANI a S. SALA. Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal of Cleaner Production*. 2014, roč. 65, s. 28-41.
3. KOUTINAS, A., A. VLYSIDIS, D. PLEISSNER, N. KOPSAHELIS, I. LOPEZ GARCIA, I.K. KOOKOS, S. PAPANIKOLAOU, T. H. KWAN a C. S. K. LIN. Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers. *Chemical Society Reviews*. 2014, roč. 43, č. 8, s. 2587-2627.
4. UÇKUN KIRAN, E., A. P. TRZCINSKI, W. J. NG a Y. LIU. Bioconversion of food waste to energy: A review. *Fuel*. 2014, roč. 134, s. 389-399.
5. LIN, C. S. K., L. A. PFALTZGRAFF, L. HERRERO-DAVILA, E. B. MUBOFU, S. ABDERRAHIM, J. H. CLARK, A. A. KOUTINAS, N. KOPSAHELIS, K. STAMATELATOU, F. DICKSON, S. THANKAPPAN, Z. MOHAMED, R. BROCKLESBY a R. LUQUE. Food waste as a valuable resource for the production of chemicals, materials and fuels. Current situation and global perspective. *Energy*. 2013, roč. 6, č. 2, s. 426-464.
6. MUKTADIRUL BARI CHOWDHURY, A. K. Md., C. S. AKRATOS, D. V. VAYENAS a S. PAVLOU. Olive mill waste composting: A review. *International Biodeterioration*. 2013, roč. 85, s. 108-119.
7. MUHAMMAD N., I. T. I. MOHD GHAZI a R. OMAR. Production of biogas from solid organic wastes through anaerobic digestion: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012, roč. 95, č. 2, s. 321-329.
8. MELIKOGLU M., C. S. K. LIN a C. WEBB. Analysing global food waste problem: pinpointing the facts and estimating the energy content. *Central European Journal of Engineering*. 2013, roč. 3, č. 2, s. 157-164.
9. OBAYASHI, H. a A. FUKUOKA. Synthesis and utilisation of sugar compounds derived from lignocellulosic biomass. *Green Chemistry*. 2013, roč. 15, č. 7, s. 1740-1763.
10. STEINBÜCHEL, A. a H. E. VALENTIN. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters*. 1995, roč. 128, č. 3, s. 219-228.
11. SUDESH, K., .H ABE a Y. DOI. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*. 2000, roč. 25, č. 10, s. 1503-1555.
12. KESSLER, B. a B. WITHOLT. Encyclopedia of bioprocess technology fermentation, biocatalysis, and bioseparation: Poly(3-hydroxyalkanoates). New York: J. Wiley, 1999, s. 2024-2040. ISBN 15912-44579.
13. PHILIP, S., T. KESHAVARZ a I. ROY. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology*. 2007, roč. 82, č. 3, s. 233-247.
14. PAL, A. a A. K. PAUL. Accumulation of Polyhydroxyalkanoates by Rhizobacteria Underneath Nickel-Hyperaccumulators from Serpentine Ecosystem. *Journal of Polymers and the Environment*. 2012, roč. 20, č. 1, s. 10-16.
15. PASSANHA, P., G. KEDIA, R. M. DINSDALE, A. J. GUWY a S. R. ESTEVES. The use of NaCl addition for the improvement of polyhydroxyalkanoate production by *Cupriavidus necator*. *Bioresource Technology*. 2014, roč. 163, s. 287-294.
16. KHARE, E., J. CHOPRA a N. K. ARORA. Screening for MCL-PHA-Producing Fluorescent *Pseudomonads* and Comparison of MCL-PHA Production Under Iso-osmotic

- Conditions Induced by PEG and NaCl. *Current Microbiology*. 2014, roč. 68, č. 4, s. 457-462.
17. FOLLONIER, S., B. HENES, S. PANKE a M. ZINN. Putting cells under pressure: A simple and efficient way to enhance the productivity of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate in processes with *Pseudomonas putida* KT2440. *Biotechnology and Bioengineering*. 2012, roč. 109, č. 2, s. 451-461.
  18. KICHISE, T., T. FUKUI, Y. YOSHIDA a Y. DOI. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) by recombinant *Ralstonia eutropha* and effects of PHA synthase activity on in vivo PHA biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1999, roč. 25, č. 1-3, s. 69-77.
  19. CHOI, J.-il. a S. Y. LEE. Process analysis and economic evaluation for poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation. *Bioprocess Engineering*. 1997, roč. 17, č. 6, s. 335-342.
  20. ORTERO, Editors: Rafael Mauro Benitez and Gustavo M. Whey types, composition and health implications. Hauppauge, N.Y: Nova Science Publishers, 2012. ISBN 978-161-9428-881.
  21. POVOLO, S., P. TOFFANO, M. BASAGLIA a S. CASELLA. Polyhydroxyalkanoates production by engineered *Cupriavidus necator* from waste material containing lactose. *Bioresource Technology*. 2010, roč. 101, č. 20, s. 7902-7907.
  22. AHN, W. S., S. J. PARK a S. Y. LEE. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from whey by cell recycle fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters* 2001. roč. 23, č. 3, s. 235-240.
  23. SABUDAK, T. a M. YILDIZ. Biodiesel production from waste frying oils and its quality control. *Waste Management*. 2010, roč. 30, č. 5, s. 799-803
  24. KAHAR, P., T. TSUGE, K. TAGUCHI a Y. DOI. High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. *Polymer Degradation and Stability*. 2004, roč. 83, č. 1, s. 79-86.
  25. YU, J. a Y. SI. Metabolic Carbon Fluxes and Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates in *Ralstonia eutropha* on Short Chain Fatty Acids. *Biotechnology Progress*. 2004, roč. 20, č. 4, s. 1015-1024.
  26. LEE, S. Y., Y. K. LEE a H. N. CHANG. Stimulatory effects of amino acids and oleic acid on poly(3-hydroxybutyric acid) synthesis by recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1995, roč. 79, č. 2, s. 177-180.
  27. KIM, M. K., I. Y. LEE a Y. H. PARK. Metabolites and amino acids affecting cellular cofactor concentrations and Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnology Letters*. 1996, roč. 18, č. 5, s. 559-564.
  28. MUSSATTO, S. I., Ercília M. S. MACHADO, S. MARTINS a J. A. TEIXEIRA. Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. *Food and Bioprocess Technology*. 2011, roč. 4, č. 5, s. 661-672.
  29. KONDAMUDI, N., S. K. MOHAPATRA a M. MISRA. Spent Coffee Grounds as a Versatile Source of Green Energy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, roč. 56, č. 24, s. 11757-11760.
  30. AL-HAMAMRE, Z., S. FOERSTER, F. HARTMANN, M. KRÖGER a M. KALTSCHMITT. Oil extracted from spent coffee grounds as a renewable source for fatty acid methyl ester manufacturing. *Fuel*. 2012, roč. 96, s. 70-76.
  31. MUSSATTO, S. I., E. M.S. MACHADO, L. M. CARNEIRO a J. A. TEIXEIRA. Sugars metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates. *Applied Energy*. 2012, roč. 92, s. 763-768.
  32. KWON, E. E., Haakrho Y. a Y. J. JEON. Sequential co-production of biodiesel and bioethanol with spent coffee grounds. *Bioresource Technology*. 2013, roč. 136, s. 475-480.

33. ZUORRO, A. a R. LAVECCHIA. Spent coffee grounds as a valuable source of phenolic compounds and bioenergy. *Journal of Cleaner Production*. 2012, roč. 34, s. 49-56.
34. MUSSATTO, S. I., L. F. BALLESTEROS, S. MARTINS a J. A. TEIXEIRA. Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and Purification Technology*. 2011, roč. 83, s. 173-179.
35. EONG, Chang-Ho, Hee Rok JEONG, Gwi Nam CHOI, Dae-Ok KIM, Uk LEE a Ho Jin HEO. Neuroprotective and anti-oxidant effects of caffeic acid isolated from *Erigeron annuus* leaf. *Chinese Medicine*. 2011, roč. 6, i č., s. 1-9.
36. AUSICH, R. L. Commercial opportunities for carotenoid production by biotechnology. *Pure and Applied Chemistry*. 1997, roč. 69, č. 10, s. 2169-2174.
37. P., L. a Schmidt-Dannert C. Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002, roč. 60, č. 1-2, s. 1-11.
38. ZUORRO, A. a R. LAVECCHIA. Spent coffee grounds as a valuable source of phenolic compounds and bioenergy. *Journal of Cleaner Production*. 2012, roč. 34, s. 49-56.
39. BHALLA, A., N. BANSAL, S. KUMAR, K. M. BISCHOFF a R. K. SANI. Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. *Bioresource Technology*. 2013, roč. 128, s. 751-759..
40. CHANDEL, A. K., G. CHANDRASEKHAR, M. B. SILVA a S. SILVÉRIO DA SILVA. The realm of cellulases in biorefinery development. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2012, roč. 32, č. 3, s. 187-202.
41. SAPARRAT, M. C. N., M. J. MARTÍNEZ, H. A. TOURNIER, M. N. CABELLO a A. M. ARAMBARRI. Production of ligninolytic enzymes by *Fusarium solani* strains isolated from different substrata. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012, roč. 16, č. 8, s. 799-803.
42. LOZOVAYA, V. V., A. V. LYGIN, O. V. ZERNOVA, S. LI, J. M. WIDHOLM a G. L. HARTMAN. Lignin Degradation by *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. *Plant Disease*. 2006, roč. 90, č. 1, s. 77-82.
43. MEHDI, D., HEIDI, TARRANUM a WNSCHENG. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2010, roč. 1, č. 1, s. 36-50.
44. Winston R. Uhlig's Corrosion Handbook (2nd Edition). R. John Wiley and Sons, 2000. 439-454 s. ISBN 0-471-15777-5.
45. CHIellini, E. Biorelated polymers sustainable polymer science and technology. New York: Kluwer Academic/Plenum, 2001. ISBN 1-59124-649-0.
46. MLEZIVA, J. Polymery: výroba, struktura, vlastnosti a použití. 2. přeprac. vyd. Praha: Sobotáles, 2000, 537 s. ISBN 80-85920-72-7.
47. NAKAJIMA-KAMBE, T., Y. SHIGENO-AKUTSU, N. NOMURA, F. ONUMA a T. NAKAHARA. Microbial degradation of polyurethane, polyester polyurethanes and polyether polyurethanes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1999, roč. 51, č. 2, s. 134-140.
48. VOJTOVA, L., M. NOVOTNY, S. OBRUCA, J. PIECHOVA, I. MAROVA a J. JANCAR. Polysaccharides modified elastomeric polyurethane. *Chemické Listy*. 2008, roč. 102, 15, s1279-s1281.



## 7 ABSTRACT

Proposed work deals with characterization and utilization of selected wastes of food industry and agriculture – cheese whey, waste frying oils and spent coffee grounds. All these waste materials can be used as substrates for production of polyhydroxyalkanoates, biodegradable and biocompatible alternatives to petrochemical synthetic polymers. Furthermore, we investigated several novel strategies to enhance yields of the process of the PHA production – application of optimized dose of selected stress factor, random mutagenesis and utilization of complex nitrogen source. Carotenoids can be also considered as a very promising product which can be generated from waste substrates. In this work, carotenoids were produced employing carotenogenic yeasts using hydrolysate of spent coffee grounds. Furthermore, also lignocellulose degrading enzymes are very valuable product which can be gained utilizing food wastes. *Fusarium solani* F-552 was identified as a candidate for production of several hydrolases as well as lignin degrading enzymes. The activity of the enzymes in cultivation media can be increased by addition of selected food wastes, in particular corn bran. Finally, also biodegradability of the modified PUR elastomers was tested; partial replacement of polyether polyol by biopolymers reduced negative environmental impact of the materials and slightly increased their biodegradability.