



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

FRAKCIONACE A VALORIZACE VYBRANÝCH
ODPADŮ POTRAVINÁŘSKÝCH VÝROB

FRACTIONATION AND VALORISATION OF SELECTED FOOD INDUSTRY WASTES

AUTOREFERÁT DIZERTAČNÍ PRÁCE

PHD THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Vendula Hrabalová

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

prof. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2025

Abstrakt

Předložená teze dizertační práce se zaměřuje na využití lignocelulózových odpadních materiálů k produkci látek s přidanou hodnotou. V úvodní části je podrobně popsáno složení lignocelulózy, možnosti její předúpravy a zpracování, a také mikrobiální inhibitory, které zpomalují fermentační procesy. Mezi tyto inhibitory se řadí i kyselina ferulová, kterou lze pomocí mikroorganismů biotransformovat na senzoricky aktivní látky, jako je vanilin, vanilylalkohol, kyselina vanilová a další. Dále se práce zaměřuje na polyhydroxyalkanoáty (PHA): jejich biosyntézu, biodegradaci, využití a možnosti snížení finančních nákladů výrobního procesu těchto biopolymerů. V experimentální části je pozornost věnována optimalizaci hydrolytického postupu lignocelulózových materiálů, konkrétně pšeničných otrub a pivovarského mláta. Z hlediska dosažení optimální koncentrace sacharidů a minimalizace obsahu fenolických látek (mikrobiálních inhibitorů) byla vybrána neutrální hydrolýza následovaná enzymatickou hydrolýzou. Na získaných hydrolyzátech byly následně kultivovány vybrané bakteriální kmeny. Nejvyšší produkce PHA byla zaznamenána u halofilních bakteriálních kmenů (*Halomonas halophila* a *Halomonas organivorans*). Druhá část práce se zaměřuje na biotransformaci ferulové kyseliny na senzoricky aktivní látky (zejména vanilovou kyselinu a vanilylalkohol) za využití různých bakteriálních kmenů. Nejlepší biotransformační potenciál vykazaly termofilní bakterie *Caldimonas thermodepolymerans* a halofilní bakterie *Halomonas neptunia*, se kterými byly provedeny další podrobnější experimenty.

Klíčová slova

Lignocelulóza, pšeničné otruby, pivovarské mláto, polyhydroxyalkanoáty, hydrolýza, biotransformace, ferulová kyselina, vanilová kyselina, vanilylalkohol, 4-vinylguaiaiol.

Abstract

The thesis focuses on the use of lignocellulosic waste materials for the production of value-added substances. In the first part, the composition of lignocellulose, its pretreatment and processing options, and microbial inhibitors that slow down fermentation processes are described in detail. Among these inhibitors is ferulic acid, which some microorganisms can biotransform into sensory active substances such as vanillin, vanillyl alcohol, vanillic acid, and others. Furthermore, the thesis focuses on polyhydroxyalkanoates (PHAs): their biosynthesis, biodegradation, utilization, and the possibility of cheapening the production process of these biopolymers. The experimental part focuses on the optimization of the hydrolysis process of lignocellulosic materials, specifically wheat bran and brew spent grains. Neutral hydrolysis followed by enzymatic hydrolysis was selected to achieve high saccharides concentration and to minimize the content of phenolic compounds (microbial inhibitors). Selected bacterial strains were subsequently cultivated on the hydrolysates. The highest PHA production was observed in halophilic bacterial strains (*Halomonas halophila* and *Halomonas organivorans*). The second part of the work focuses on the biotransformation of ferulic acid to sensory active substances (mainly vanillic acid and vanillyl alcohol) using different bacterial strains. The highest biotransformation potential was observed with the thermophilic bacterium *Caldimonas thermodepolymerans* and the halophilic bacterium *Halomonas neptunia*, and further detailed experiments were performed with these strains.

Key words

Lignocellulose, wheat bran, brew spent grain, polyhydroxyalkanoates, hydrolysis, biotransformation, ferulic acid, vanillic acid, vanillyl alcohol, 4-vinylguaiacol.

OBSAH

1	ÚVOD.....	5
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	7
2.1	Lignocelulóza.....	7
2.1.1	Složení	7
2.1.2	Předúpravy při zpracování lignocelulózových materiálů	7
2.1.3	Mikrobiální inhibitory po zpracování lignocelulózových materiálů	8
2.2	Polyhydroxyalkanoáty.....	8
2.2.1	Vybrané strategie snížení produkčních nákladů PHA	9
2.3	Biotransformace fenolických sloučenin na senzory aktivní látky.....	10
2.3.1	Ferulová kyselina.....	10
2.3.2	Mechanismy transformace a vzniklé produkty	11
3	NEJVÝZNAMĚJŠÍ VÝSLEDKY A JEJICH DISKUZE	12
3.1	Výběr vhodného hydrolytického postupu pro zpracování pšeničných otrub.....	12
3.2	Biotechnologické využití hydrolyzátu z otrub	14
3.2.1	Kultivace bakterií na hydrolyzátech z pšeničných otrub v baňkách.....	16
3.2.2	Kultivace bakterií na hydrolyzátech z pšeničných otrub v laboratorních bioreaktorech.....	18
3.3	Biotechnologické využití hydrolyzátu z mláta.....	20
3.3.1	Použité mláto	21
3.3.2	Stanovení sacharidů a fenolických látek v hydrolyzátech z mláta	21
3.3.3	Kultivace vybraných bakteriálních kmenů na hydrolyzátech z pivovarského mláta	22
3.4	Biotransformace ferulové kyseliny s využitím vybraných bakteriálních kmenů.....	23
3.4.1	Představení <i>Caldimonas thermodepolymerans</i>	24
3.4.2	Biotransformace FA s využitím <i>Halomonas neptunia</i>	27
4	ZÁVĚR.....	36
5	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	37
6	ŽIVOTOPIS A PUBLIKAČNÍ ČINNOST	44

1 ÚVOD

Množství plastového odpadu dramaticky narůstá již několik desetiletí. V roce 1950 bylo vyprodukováno 1,5 milionu tun plastového odpadu, zatímco v roce 2018 tato hodnota vzrostla na 359 milionů tun. Výroba plastů sice v první polovině roku 2020 dočasně poklesla kvůli pandemii koronaviru SARS-CoV-2, ale v druhé polovině téhož roku se opět vrátila na předchozí úroveň. V zemích Evropské unie se 42,6 % plastového odpadu využívá k energetickým účelům, 24,9 % končí na skládkách a 32,5 % je recyklováno. Nízké procento recyklace plastů má negativní dopad na životní prostředí a způsobuje ekonomické ztráty. Spalování plastů navíc vede k uvolňování skleníkových plynů, které poškozují atmosféru. Odhaduje se, že v roce 2019 bylo takto vypuštěno více než 850 milionů tun skleníkových plynů, a do roku 2050 by tento počet mohl vzrůst na 2,8 miliardy tun [1]. Řešením tohoto problému by mohly být polyhydroxyalkanoáty (PHA), které jsou biologicky odbouratelné a pocházejí z obnovitelných zdrojů. Na rozdíl od synteticky vyrobených plastů se PHA přirozeně rozkládají, aniž by produkovaly škodlivé emise. Díky svým vlastnostem nabízejí udržitelnou alternativu k běžným plastům, což by mohlo výrazně snížit zátěž na životní prostředí. Dalším problémem dnešního světa je komunální odpad, kterého je každoročně globálně vyprodukováno více než dvě miliardy tun a odhaduje se, že do roku 2050 vzroste toto množství o zhruba 70 %. Největší producenti pevného komunálního odpadu jsou Spojené státy, Čína a Indie. USA ročně vyprodukují přibližně 239 milionů tun odpadu, což odpovídá nejvyšší produkci na obyvatele (asi 4,5 kg denně), zatímco Čína a Indie produkují méně na obyvatele (1,1 kg a 0,5 kg denně), ale jejich celkové objemy odpadu rychle rostou s urbanizací a zvyšující se životní úrovní. Evropská unie jako celek produkuje podobné množství odpadu jako USA, avšak s vyšší mírou recyklace (kolem 45 %) [2, 3].

Zemědělský odpad se po sklizni tradičně kompostoval nebo spaloval, což mělo negativní dopady na lidské zdraví a životní prostředí [4]. Proto se začaly hledat různé alternativy pro zpracování a valorizaci, zejména u lignocelulózových zemědělských odpadů [5]. V souladu s novými energetickými předpisy se podporuje využití těchto odpadů k produkci látek s přidanou hodnotou, jako jsou polyhydroxyalkanoáty, biovodík, bioetanol, bioplyn a další. To nejenže přispívá k efektivnímu zpracování odpadních substrátů, ale také napomáhá dosažení neutrální uhlíkové stopy a ochraně životního prostředí [6].

S využitím lignocelulózových materiálů lze produkovat polyhydroxyalkanoáty (PHA), jež patří do skupiny biopolymerů s unikátními vlastnostmi. Některými svými vlastnostmi se podobají polypropylenu, ale na rozdíl od něj jsou biokompatibilní a biodegradabilní. PHA se v buňkách mikroorganismů vyskytují ve formě intracelulárních granulí. Zastupují zde funkci zásoby uhlíku a energie. K jejich produkci dochází při nadbytku uhlíku a nedostatku jiné esenciální živiny (fosfor, dusík). Nevýhodou PHA jsou vysoké výrobní náklady. Právě využití odpadních lignocelulózových materiálů k produkci PHA je jednou z možných cest, které činí PHA cenově dostupnějšími [7].

Součástí lignocelulózových materiálů je také ferulová kyselina, která pomocí metabolických cest některých mikroorganismů může být přeměněna na látky s přidanou hodnotou. Lignocelulózové materiály představují cenný zdroj pro výrobu látek, jako jsou vanilin, vanilová

kyselina nebo vanilylalkohol. Tyto aromatické látky jsou využitelné v potravinářství, kosmetickém průmyslu nebo při výrobě farmaceutik [8]. K biotransformačním experimentům lze využít extremofilní bakterie. Extremofilní bakterie jsou mikroorganismy schopné přežít v extrémních podmínkách, jako jsou vysoké teploty, salinita, acidita/alkalita nebo tlak. Patří mezi ně termofilní bakterie, které prosperují při teplotách nad 45 °C a produkují enzymy využívané v biotechnologiích. Dalšími zástupci jsou halofilní bakterie, které se adaptovaly na prostředí s vysokým obsahem soli, zatímco acidofilní a alkalifilní druhy zvládají extrémně kyselé či zásadité prostředí. Tyto organismy jsou ceněny pro unikátní enzymy, které jsou stabilní v extrémních podmínkách a nacházejí využití při syntéze léčivých přípravků, degradaci lignocelulózy, výrobě bioplastů nebo v těžebním průmyslu. Jedinečné vlastnosti těchto mikroorganismů umožňují jejich využití v inovativních průmyslových procesech, které jsou šetrné k životnímu prostředí a podporují udržitelný rozvoj [9].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Lignocelulóza

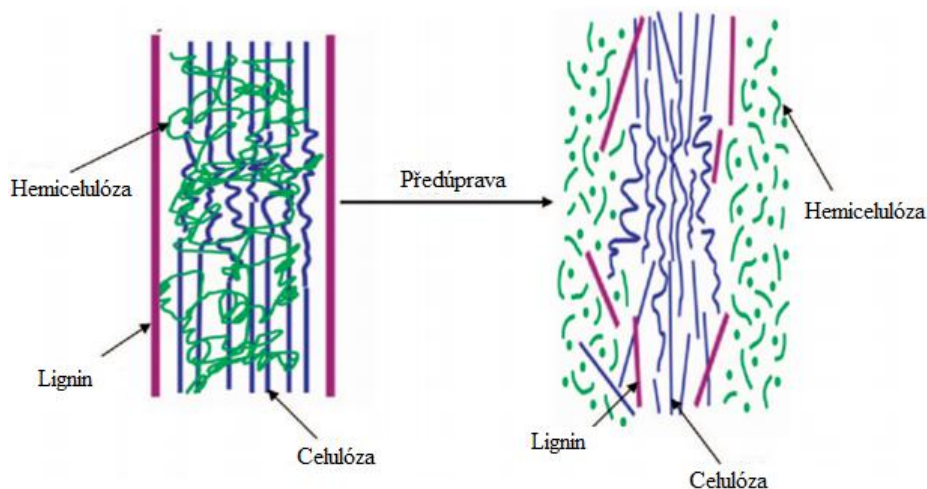
V celosvětovém měřítku jsou lignocelulóзовé materiály produkovány ve velkých objemech, přičemž primárně pocházejí ze zemědělství a lesnictví. [10]. Zemědělské odpady na bázi lignocelulózy se často využívají jako krmiva pro hospodářská zvířata. Jejich nutriční hodnota je však omezená – jsou obtížně stravitelné, obsahují málo dusíku a vysoké množství antinutričních látek, jako je lignin a oxid křemičitý. Na druhou stranu díky vysokému obsahu uhlíku představují lignocelulóзовé materiály slibnou surovinu pro výrobu produktů s přidanou hodnotou, například biopaliv, polyhydroxyalkanoátů nebo různých chemických látek [6, 11, 12, 13].

2.1.1 Složení

Lignocelulóзовé materiály jsou složeny ze tří hlavních komponent: celulózy, hemicelulózy a ligninu. Vazbu mezi celulózou a hemicelulózami zajišťují vodíkové můstky, a mezi hemicelulózami a ligninem kovalentní vazby (esterové, etherové).

2.1.2 Předúpravy při zpracování lignocelulóзовých materiálů

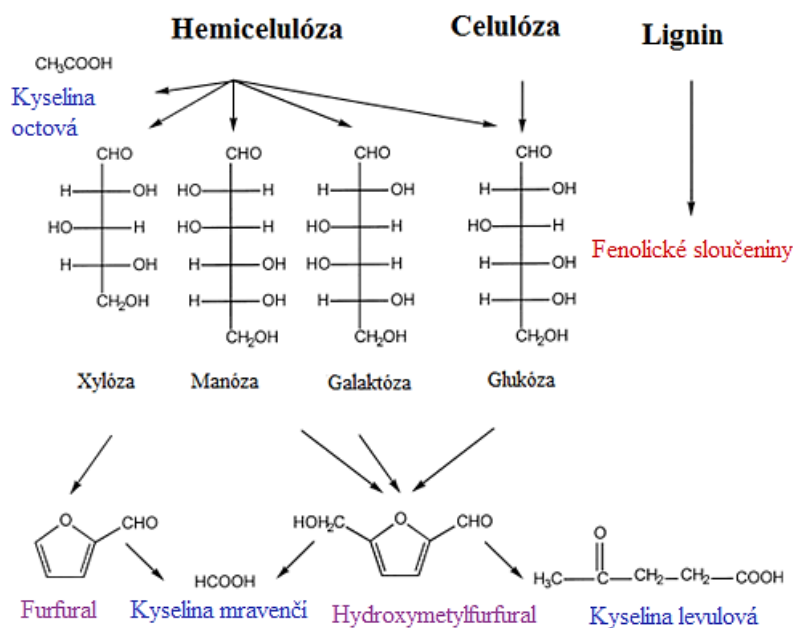
Na výběr předúpravy lignocelulóзовých materiálů má vliv celá řada faktorů, například stavba buněčné stěny, krystalinita celulózy či procentuální zastoupení jednotlivých komponent, zejména ligninu. Samotná předúprava se stala klíčovým krokem k překonání zmíněných překážek a následném využití lignocelulóзовého materiálu v praxi. Během tohoto kroku klesá polymerační stupeň celulózy, čímž dochází porušení její komplexní a rigidní struktury. Dále dochází k degradaci hemicelulózy a celkovému rozrušení lignocelulóзовé struktury (viz Obr. 1). Jedná se o nákladný, ale nezbytný krok, který v rámci klasického schématu valorizace lignocelulóзовých materiálů pomocí nástrojů mikrobiálních biotechnologií zajistí hydrolytickým enzymům dostupnost k polysacharidům a efektivní tvorbu fermentovatelných sacharidů. Předúpravy lignocelulóзовých materiálů se dají rozdělit do tří hlavních skupin: fyzikální, chemické a biologické [14, 15].



Obrázek 1: Znáznornění rozrušení vazeb v lignocelulóзовých materiálech [16]

2.1.3 Mikrobiální inhibitory po zpracování lignocelulózových materiálů

Během předúpravy lignocelulózových materiálů vzniká nezanedbatelné množství inhibitorů, které mají negativní dopad na následnou fermentaci. Inhibitory se rozdělují podle své funkční skupiny na aldehydy odvozené od sacharidů, aromatické sloučeniny, a organické kyseliny a aldehydy s krátkým řetězcem. Mají vliv na růst mikroorganismů a s tím spojenou produkci požadovaných metabolitů. Pravděpodobnost jejich tvorby zvyšují vysoké teploty, reaktivní chemikálie nebo dlouho trvající předúpravy. Pro každý mikroorganismus je toxicita inhibitoru jiná. Při degradaci celulózy a hemicelulózy vznikají monosacharidy, ze kterých, za zmíněných podmínek, mohou vznikat inhibitory furfural a hydroxymethylfurfural. V případě rozpadu těchto inhibitorů dochází ke vzniku kyseliny mravenčí a levulové (viz Obr. 2). Jako inhibiční látky mohou působit i sacharidy a ionty kovů. Sacharidy ve vyšších koncentracích jsou schopny inhibice celuláz během předúpravy, proto je důležité kontrolovat jejich koncentrace. Ionty kovů (měď, nikl, chrom a železo) inhibují mikroorganismy. Vyskytují se v minerálních látkách v lignocelulóze a jsou nejčastěji uvolňovány během kyselých předúprav [17, 18]. Mikrobiální inhibitory tvoří hlavní překážku ve využití lignocelulózových materiálů v průmyslovém měřítku, a mnoho prací se zabývá jejich redukcí či úplným odstraněním (tzv. detoxifikací) [19, 20, 21].



Obrázek 2: Přehled nejčastěji se vyskytujících mikrobiálních inhibitorů [21].

2.2 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou biopolymery, které mají potenciál nahradit konvenční petrochemické plasty. Produkují je mikroorganismy ve formě intracelulárních granulí. Jejich největší výhodou je biokompatibilita a biodegradabilita. Překážkou v globálním využití PHA představuje jejich cena, proto se hledají různé strategie vedoucí ke zlevnění těchto biopolymerů. Efektivní řešení bylo objeveno ve využití konceptu průmyslových biotechnologií nové generace (NGIB = next-generation industrial biotechnology). NGIB jsou založeny na propojení

využití levných odpadních materiálů (např. lignocelulózy) a extrémofilních mikroorganismů, které nepodléhají snadno kontaminacím [22, 23].

2.2.1 Vybrané strategie snížení produkčních nákladů PHA

Jak již bylo zmíněno, největší překážku ve výrobě PHA v průmyslovém měřítku činí jejich vysoká výrobní cena. Proto se hledají různé možnosti vedoucí ke snížení nákladů na výrobu. Řešení bylo nalezeno ve spojení levných odpadních substrátů jako zdroje uhlíku a extrémofilních mikroorganismů.

2.2.1.1 Levné odpadní substráty

Vysoké náklady syntézy PHA úzce souvisí s cenou substrátů, která činí 30–40 % celkových produkčních nákladů. Mnoho studií se zabývá syntézou PHA na levných substrátech (lignocelulózové materiály, odpadní produkty potravinářského průmyslu) [24].

Linger a kol. studovali produkci mcl-PHA pomocí bakterie *Pseudomonas putida* KT2440 na lignocelulózových materiálech. Bylo dokázáno, že bakterie je schopna využít uhlík z aromatického kruhu ligninu a díky svým degradačním drahám syntetizovat mcl-PHA [25]. Riedel a spol. využili odpadní zvířecí tuk nejnižší dostupné kvality k produkci kopolymeru P3HB3HHx. Ke kultivaci byl použit rekombinantní kmen *Cupriavidus necator* (starším názvem *Ralstonia eutropha*), který produkoval kopolymer až do 60 % suché hmoty buňky [26]. Ward a spol. zjistili, že bakterie *Pseudomonas putida* CA-3 je schopna využít styren. Styren je výchozí látkou pro přípravu polystyrenu a kvůli své toxicitě způsobuje znečištění životního prostředí. Bakterie byla schopna na tomto substrátu produkovat PHA [27]. S novějším výzkumem přišli Heinrich a kol., kteří kultivovali fotosyntetizující bakterii *Rhodospirillum rubrum* S1 produkující PHA s využitím oxidu uhelnatého nebo uhličitého jako zdroje uhlíku. *R. rubrum* byla schopna akumulovat mcl-PHA až do 7,1 % suché hmotnosti buňky [28]. Další možnost zlevnění produkce PHA bylo využití rekombinantního kmenu *Cupriavidus necator*. Ten byl upraven tak, aby mohl k produkci P3HB využívat xylózu i glukózu získanou ze slunečnicové slámy [29].

2.2.1.2 Využití extrémofilních bakterií

Aby se vyplatilo vyrábět PHA, je potřeba převést výrobu do průmyslového měřítko. Jedná se o nákladný proces, při kterém je nutné zabránit kontaminaci vybraných bakteriálních kmenů. Aby se předešlo kontaminacím, začaly se využívat extrémofilní bakterie, které žijí v podmínkách, jež jsou pro většinu ostatních mikroorganismů neslučitelné se životem. Extremofily jsou schopni přežít v extrémních tlacích (až 130 MPa, např. *Thermococcus piezophilus*), teplotách (-25 °C pro *Planococcus halocryophilus*, či 122 °C pro *Methanopyrus kandleri*), pH (např. *Picrophilus torridus* s optimální hodnotou pH 0,06, nebo *Bacillus pseudofirmus* s pH 11,4), salinitě (*Haloarcula marismortui* – 200 g/l NaCl), radiaci (např. *Deinococcus radiodurans*, který přežije dávku gama záření o intenzitě 15 000 grayů), suchých místech (např. *Streptomyces bulli*), či v prostředí s toxickými kovy (*Cupriavidus necator*, která má název odvozený od mědi = copper) [30]. Adaptace na zmíněné extrémy umožňují mikroorganismům nejen přežít v těchto prostředích, ale i produkovat látky s přidanými hodnotami (např. PHA) [31]. Archaea (zejména za hypertermofilních podmínek), bakterie,

houby a řasy se přizpůsobily životu v extrémních podmínkách [32]. PHA tvoří u extremofilů zásobu energie a uhlíku. Existuje hypotéza, že zde PHA působí i jako protektanty vůči oxidačnímu a teplotnímu stresu, a vysoké salinitě [33].

Mikroorganismy vyžadující vysoké koncentrace soli v prostředí se nazývají halofily. Tan a kol. použili bakteriální kmen *Halomonas* TD01 izolovaný ze solného jezera Xinjiang v Číně ke kontinuální a nesterilní produkci P3HB, kterého bylo dosaženo z 80 % suché hmotnosti buňky. Jako zdroj uhlíku sloužila glukóza [34]. Další studii využití halofilů provedli Mahansaria a kol., kteří kultivovali extrémně halofilní *Nastrinemu ajinwuensis* RM-G10, která žije v prostředí o koncentraci 200 g/l NaCl. Produkce PHA dosáhla hodnoty kolem 61 hm. % sušiny [35].

Dalšími zajímavými producenty PHA ze skupiny extremofilů jsou termofilní mikroorganismy, které přežívají v extrémních teplotách. Podle nároků na teploty se rozdělují do tří skupin: střední termofily (45–65 °C), extrémní termofily (65–79 °C) a hypertermofily (nad 80 °C) [36]. Právě teploty mimo optima ostatních mikroorganismů brání možným kontaminacím. Příkladem může být termofilní grampozitivní bakterie *Bacillus shackletonii* K5, která dokáže syntetizovat P3HB až do 73 % suché hmoty buňky, za využití glukózy jako zdroje uhlíku při 45 °C [37]. Také u termofilní skupiny bakterií z druhu *Cupriavidus* byla dokázána schopnost syntetizovat P3HB z glukózového substrátu při 50 °C. *Cupriavidus* sp. jsou odolné vůči mědi, což je v kombinaci s teplotní odolností činí o to zajímavějšími [38, 39]. Dalším významným termofilním producentem PHA je bakteriální kmen *Caldimonas* (dříve *Schlegelella*) *thermodepolymerans*, který byl izolován v roce 2003 [40]. Bakterie roste a produkuje PHA při teplotách 50 °C a vyšších. Je schopna využívat jako zdroj uhlíku řadu sacharidů, např. xylózu a glukózu, které se nachází v lignocelulózových materiálech. Bakterie *C. thermodepolymerans* splňuje požadavky NGIB, tzn. že ji lze kultivovat na levných substrátech za extrémních podmínek zabráňujících kontaminacím jinými mikroorganismy [41].

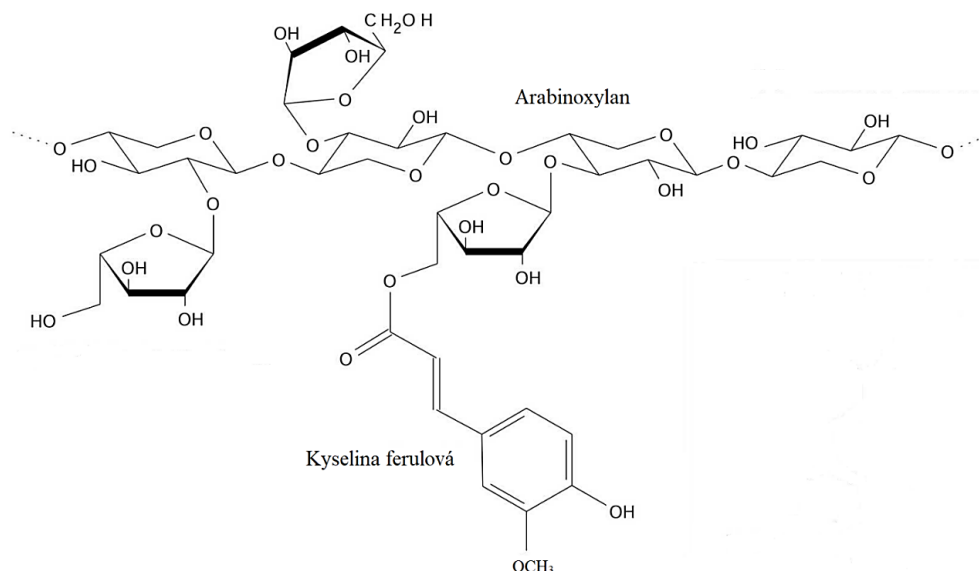
2.3 Biotransformace fenolických sloučenin na senzoricky aktivní látky

Biotransformace rostlinných fenolických látek je proces chemické přeměny těchto sloučenin za pomoci enzymů, mikroorganismů nebo jiných biologických systémů. Tento proces zvyšuje biologickou dostupnost a bioaktivitu fenolických látek, které zahrnují flavonoidy, lignany nebo fenolické kyseliny. Biotransformace se často využívá k úpravě přirozených vlastností těchto sloučenin, například ke zlepšení jejich antioxidačních, protizánětlivých či farmakologických vlastností, což se využívá v potravinářství, farmacii a kosmetickém průmyslu. Mezi běžné mechanismy biotransformace patří hydroxylace, methylace a glykosylace. Tento proces je také šetrnější k životnímu prostředí, protože umožňuje vyrábět deriváty přírodních látek s menší ekologickou stopou oproti syntetickým metodám [42].

2.3.1 Ferulová kyselina

Fenolické látky, do kterých se řadí ferulová kyselina (FA), tvoří významnou složku lignocelulózových materiálů popsanych v předchozích kapitolách. Kyselina ferulová (3-(4-hydroxy-3-metoxyfenyl)prop-2-enová) je fenolická sloučenina patřící do skupiny hydroxysořicových kyselin. V lignocelulóze se FA váže především esterovou vazbou

na polysacharidy, konkrétně na arabinoxylany v hemicelulózách. Tato vazba umožňuje FA působit jako přírodní "cross-linker," který zpevňuje strukturu buněčné stěny prostřednictvím tvorby kovalentních vazeb s ligninem [43]. Kyselina byla poprvé izolovaná v roce 1866 z rostliny *Ferula foetida*, po které nese název. FA existuje v izomeraci *cis* i *trans*, v *trans* se vyskytuje častěji. Byla u ní potvrzena celá řada žádoucích účinků, např. antioxidační, protizánětlivé, antibakteriální, antikarcinogenní či neuroprotektivní [44, 45].



Obrázek 3: FA navázaná na arabinoxylany [46].

2.3.2 Mechanismy transformace a vzniklé produkty

FA lze s využitím enzymového a metabolického inženýrství transformovat na různé sloučeniny s vysokou přidanou hodnotou, které jsou následně využitelné ve farmaceutickém, potravinářském, či kosmetickém průmyslu [47]. Jednou z nejrozšířenějších aromatických sloučenin, využívaných ve zmíněných typech průmyslů, je vanilin. Může být připraven pomocí chemické syntézy, nicméně tato cesta je ekonomicky náročná, a zároveň produkt nevykazuje kvalitu a bezpečnost srovnatelnou s látkami získanými přirozenou cestou. Proto se hledají různé alternativní způsoby výroby vanilinu. Bylo zjištěno, že s využitím bakterií a hub lze přeměnit FA na vanilin. Belgická firma Solvay uvedla od roku 2018 na trh jako první přírodní vanilin (obchodní značka Rhovanil) vzniklý biotransformací z FA v průmyslovém měřítku [48, 49]. Hlavní metabolické cesty mikrobiální biotransformace FA na vanilin se liší počáteční reakcí. Jedná se o neoxidativní dekarboxylaci, redukci postranního řetězce, a deacetylaci závislou a nezávislou na koenzymu A [50, 51].

3 NEJVÝZNAMĚJŠÍ VÝSLEDKY A JEJICH DISKUZE

Dizertační práce se zaměřuje na dva hlavní výzkumné směry: optimalizaci hydrolytického zpracování lignocelulózových odpadů (pšeničné otruby, pivovarské mláto) a následnou produkci PHA pomocí bakterií, a dále na biotransformaci ferulové kyseliny na senzoricky aktivní látky s využitím extremofilních kmenů.

3.1 Výběr vhodného hydrolytického postupu pro zpracování pšeničných otrub

Bakterie vyžadují ke svému růstu zdroj uhlíku, kterým mohou být monosacharidy z lignocelulózových materiálů. Tato část práce se zaměřila na optimalizaci hydrolyzy pšeničných otrub tak, aby bylo dosaženo maximálního zisku zkvasitelných sacharidů. Byly testovány tři různé fyzikálně-chemické metody předúpravy: alkalická, kyselá a neutrální. Tyto postupy efektivně rozkládají především hemicelulózy a narušují strukturu lignocelulózového materiálu, což zvyšuje dostupnost substrátu pro následnou enzymatickou hydrolyzu celulózy případně dalších frakcí [52]. Optimalizace byla zaměřena nejen na maximální výtěžnost procesu, ale i na minimalizaci obsahu možných mikrobiálních inhibitorů, především pak fenolických látek.

3.1.1.1 Alkalická předúprava

Ve vybraných časových intervalech byly provedeny odběry hydrolyzátu, který byl dále analyzován z hlediska obsahu sacharidů.

Tabulka 1: Naměřené koncentrace monosacharidů po alkalické předúpravě a následné enzymatické hydrolyze za použití směsi amyloglukosidázy a celulózy (enzyme blend), koncentrace otrub 50 g/L.

Čas hydrolyzy [hod]	Enzym	Xylóza [g/L]	Fruktóza [g/L]	Glukóza [g/L]	Σ HPLC [g/L]	DNS [g/L]	Dubois [g/L]
4	Směs Amyloglukosidázy a Celulózy (enzyme blend)	3,1±0,4	1,7 ±0,3	18,1 ±1,1	22,9	39,7 ±4,1	15,1 ±0,9
8		2,8 ±0,4	1,4 ±0,3	15,1 ±0,3	19,3	40,6 ±1,9	44,9 ±4,2
12		3,6 ±0,2	1,7 ±0,4	19,3 ±2,1	24,6	35,2 ±2,2	51,2 ±4,9
24		4,1 ±0,4	1,8 ±0,4	20,0 ±3,1	25,9	38,5 ±3,1	29,2 ±1,7
32		4,2 ±1,1	1,6 ±0,4	17,2 ±2,5	23,0	34,1 ±1,6	48,3 ±2,0
48		3,8 ±0,3	1,4 ±0,4	18,4 ±3,2	23,6	39,5 ±2,1	43,7 ±3,9

Výsledkem těchto analýz je nalezení optimální doby trvání enzymatické hydrolyzy, směsi a vstupní koncentrace pšeničných otrub, což je 24 hodin, enzymatická směs amyloglukosidázy s celulázou (enzyme blend), a 100 g/L otrub. Vyšší výtěžky monosacharidů byly potvrzeny u použití vyšších koncentrací otrub, což by mohlo pozitivně zefektivnit využití potravinářského odpadu – pšeničných otrub.

3.1.1.2 Kyselé předúprava

Tento typ chemického rozkladu následovaného hydrolyzou enzymatickou se již prováděl s částečně optimalizovanými podmínkami.

Tabulka 2: Naměřené koncentrace monosacharidů po kyselé předúpravě a následné enzymatické hydrolyze.

	Xylóza	Fruktóza	Glukóza	Σ HPLC	DNS	Dubois
<i>c</i> [g/L]	18,7 ±0,8	4,1 ±0,4	32,2 ±1,5	55,0 ±0,9	65,4 ±1,9	56,3 ±2,8

Z výsledků je evidentní, že kyselé předúprava vykazovala výrazně vyšší výtěžky sacharidů v porovnání s předúpravou alkalickou. Kyselé cesta, zejména při použití silných kyselin, jako je sírová nebo chlorovodíková, je obecně považována za „drastičtější“ metodu než alkalická, protože při ní dochází k výraznější degradaci ligninu a dalších komplexních struktur v biomase [53]. Nevýhodou je, že kyselé předúprava může generovat větší množství vedlejších produktů, které mohou ovlivnit následné fermentační procesy, což je důležité brát v úvahu při aplikaci této metody v biotechnologických procesech [54].

3.1.1.3 Neutrální předúprava

V rámci testování rozkladných postupů pšeničných otrub byla také provedena neutrální předúprava. Tato metoda, při které se nepoužívají žádné extrémní podmínky pH, je šetrnější k materiálu, což obecně vede k nižšímu obsahu nežádoucích vedlejších produktů [55]. Výsledné hydrolyzáty byly podrobeny stejným analytickým charakteristikám jako v případě kyselé a alkalické hydrolyzy.

Tabulka 3: Naměřené koncentrace monosacharidů po neutrální předúpravě a následné enzymatické hydrolyze.

	Xylóza	Fruktóza	Glukóza	Σ HPLC	DNS	Dubois
<i>c</i> [g/L]	2,5 ±0,9	1,4 ±0,1	21,8 ±0,7	25,6 ±0,5	30,6 ±0,9	26,1 ±0,8

Neutrální hydrolyza nebyla tak efektivní jako alkalická nebo kyselé metoda, pokud jde o výtěžnost monosacharidů. Nicméně výhodou této metody je nižší produkce nežádoucích vedlejších produktů (viz Kap. 3.1.1.4), které inhibují následné mikrobiální procesy.

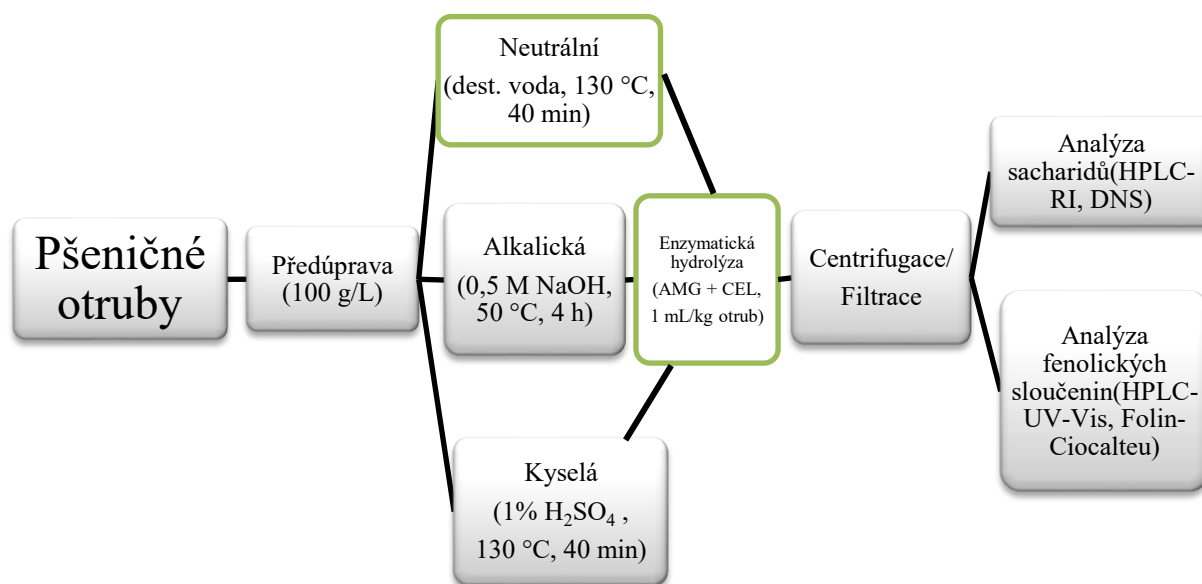
3.1.1.4 Stanovení fenolických látek v hydrolyzátech

Fenolické látky působí ve vyšších koncentracích inhibičním efektem, a proto bylo důležité sledovat jejich koncentraci v hydrolyzátech.

Tabulka 4: Naměřené koncentrace fenolických kyselin po chemických předúpravách následovaných enzymatickou hydrolyzou.

Předúprava	ferulová [mg/l]	sinapová [mg/l]	<i>p</i> -kumarová [mg/l]	Σ HPLC [mg/L]	F.-C. [mg/L]
Alkalická	30,1 ±2,1	1,2 ±0,1	0,9 ±0,1	32,2	1130,8 ±5,4
Kyselé	18,8 ±0,7	0,2 ±0,1	0,8 ±0,1	19,8	1164,1 ±6,0
Neutrální	14,2 ±0,5	x	x	14,2	461,5 ±2,8

Byly provedeny analýzy koncentrací fenolických sloučenin po vybraných chemických rozkladech následovaných enzymatickými hydrolyzami pšeničných otrub, přičemž neutrální předúprava vykázala nejnižší obsah fenolických kyselin ve srovnání s alkalickou a kyselou metodou. Tento výsledek naznačuje, že neutrální hydrolyza by mohla být výhodným postupem předúpravy v biotechnologických procesech, kde je nezbytné minimalizovat inhibiční účinky fenolických sloučenin, které mohou negativně ovlivnit růst mikroorganismů.



Obrázek 4: Výsledné schéma hydrolytického postupu

Na základě provedených experimentů byla jako nejvhodnější metoda zvolena neutrální předúprava (viz Obr. 4) následovaná enzymatickou hydrolyzou s použitím enzymatické směsi amyloglukosidázy a celulózy (enzyme blend). Tento postup poskytl optimální poměr koncentrací zkvasitelných sacharidů a fenolických látek, což je výhodné pro následné mikrobiální procesy. Obrovská výhoda neutrální předúpravy spočívá v tom, že nevyžaduje regulaci pH. To představuje významné úspory z hlediska nákladů na chemikálie i samotný proces. Oproti kyselé nebo alkalické cestě zde odpadá potřeba pracovat s korozivními látkami nebo instalovat speciální zařízení na kontrolu pH, což zjednodušuje technologické nároky i logistiku. Tento přístup je zároveň environmentálně udržitelný a přispívá k efektivnímu využívání odpadních produktů potravinářského průmyslu.

3.2 Biotechnologické využití hydrolyzátu z otrub

Pšeničné otruby jsou vedlejším produktem při mletí pšenice. V kontextu potravinářského průmyslu představují významný vedlejší produkt, který se v minulosti často považoval spíše za odpad nebo se využíval pouze jako krmivo pro zvířata [56]. Dnes se však s rostoucím důrazem na udržitelnost objevují nové způsoby jejich využití. Pšeničné otruby jsou bohaté na vlákninu, minerály a antioxidanty, a mohou se přidávat do pečiva nebo cereálních výrobků. Výzkum také ukazuje jejich potenciál při výrobě bioplastů a jiných ekologických materiálů, což významně přispívá ke snižování odpadu a efektivnějšímu využití surovin [57]. Van-Thuoc

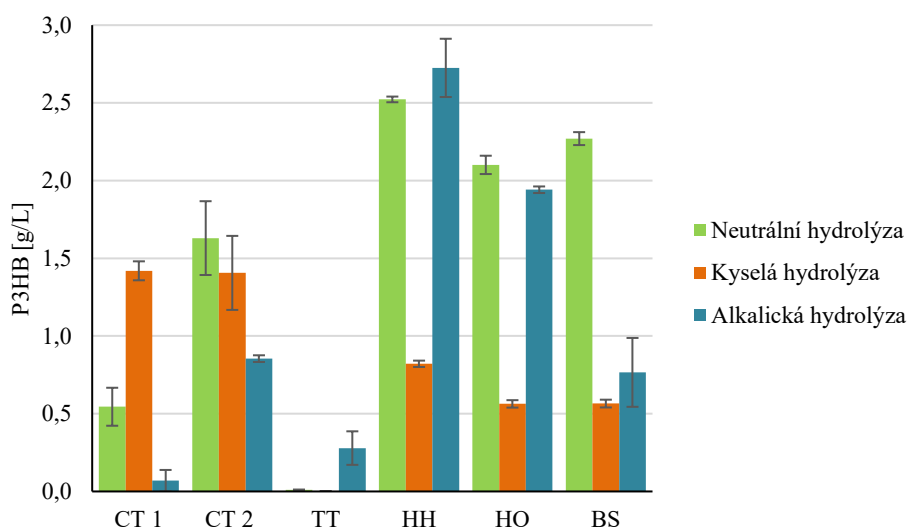
a kol. [58] využili hydrolyzát z pšeničných otrub ke kultivaci bakteriálního kmenu *Halomonas boliviensis*. Tímto postupem získali 34 hm.% P3HB v biomase. Výtěžek navýšili přidáním kyseliny máselné a octanu sodného na 50 hm. % P3HB v biomase, celková koncentrace produktu dosáhla 4 g/L.

Pšeničné otruby využitě v této práci byly dodávány od společnosti Mlýny J. Voženílek, s. r. o., se kterými byla navázána spolupráce v rámci projektu TAČR (Technologická agentura České republiky). V předložené práci byly získané hydrolyzáty využity jako základ média pro biotechnologickou výrobu PHA s využitím vybraných bakteriálních kmenů, které jsou uvedeny v Tab. 5. Většina z vybraných kmenů jsou extrémofilní bakterie (halofily nebo termofily), a to z důvodu, aby bylo možné proces valorizace pšeničných otrub realizovat v souladu s konceptem biotechnologií nové generace (Next Generation Industrial Biotechnology = NGIB). Během screeningu byly použity sbírkové mikroorganismy, u kterých se předpokládá, že jsou schopné využívat hydrolyzát z otrub. Tyto bakterie mají schopnost využít jak pentózy, tak hexózy, mají minimální nutriční požadavky, a jsou do jisté míry odolné vůči různým mikrobiálním inhibitorům [59–62]. Kromě toho jsou schopné efektivně produkovat cílový metabolit, P3HB. Během screeningu byl otestován každý získaný hydrolyzát a posuzován z hlediska výtěžnosti produkce P3HB.

Tabulka 5: Seznam vybraných bakteriálních kmenů.

Bakteriální kmen + sbírkové číslo	Optimální teplota růstu [°C]	NaCl v médiu [g/L]	Označení v textu
<i>Caldimonas thermodepolymerans</i> DSM 15344	50	-	CT 1
<i>Caldimonas thermodepolymerans</i> DSM 15264	50	-	CT 2
<i>Tepidimonas taiwanensis</i> LMG 22826	50	-	TT
<i>Halomonas halophila</i> CCM 3662	30	66	HH
<i>Halomonas organivorans</i> CCM 7142T	30	81	HO
<i>Burkholderia sacchari</i> DSM 17165	30	-	BS

3.2.1 Kultivace bakterií na hydrolyzátech z pšeničných otrub v baňkách



Obrázek 5: Porovnání jednotlivých výtěžků P3HB v biomase po vybraných chemických předúpravách a enzymatických hydrolyzách.

Nejvyšší koncentrace P3HB byla naměřena po alkalické a neutrální předúpravě pšeničných otrub. Nejlepšími producenty P3HB byly bakterie rodu *Halomonas*, které produkovaly PHA až do 62 hm. % suché hmotnosti buňky. Tyto kmeny využívají glukózu, které bylo pomocí vybraných metod ke stanovení redukujících sacharidů naměřeno majoritní množství. I přesto, že po kyselé předúpravě byla vyšší výtěžnost fermentovatelných monosacharidů, byly naměřeny vyšší koncentrace P3HB u neutrální a alkalické předúpravě. Výjimkou byla kultivace termofilních bakteriálních kmenů na hydrolyzátech získaných kyselou cestou. Kmen *C. thermodepolymerans* DSM 15344 dokonce vykazoval nejvyšší obsah P3HB právě po tomto typu předúpravy. Toto zjištění naznačuje, že jsou vybrané termofilní bakterie vůči fenolickým látkám tolerantní. Tento poznatek je také součástí následující části této práce – biotransformace ferulové kyseliny s využitím bakteriálního kmenu *C. thermodepolymerans* DSM 15344. U ostatních kmenů byly získány vyšší koncentrace P3HB v biomase po kultivaci v médiích s nižším obsahem fenolických látek, které působí obecně inhibičním efektem. Jako optimální kultivační médium pro bakterie byly pro navazující experimenty vybrány hydrolyzáty získané po neutrální předúpravě, následované enzymatickou hydrolyzou.

Tabulka 6: Shrnutí získaných výsledků po kultivacích vybraných bakterií na hydrolyzátu získaném po **alkalické předúpravě** a enzymatické hydrolyze z pšeničných otrub, a výtěžnostní bilance. Původní koncentrace redukujících sacharidů metodou DNS v hydrolyzátu byla $38,5 \pm 3,1$ g/L, pro kultivační experimenty byla naředěna destilovanou vodou na optimální koncentraci 20 g/L, konkrétně $23,9 \pm 2,8$ g/L (stanoveno DNS metodou).

Kmen	C_{biomasa} [g/L]	P3HB [hm.%]	P3HB [g/L]	OD ₆₃₀ [-]	DNS před [g/L]	DNS po [g/L]	$Y_{\text{P/S}}$	$Y_{\text{X/S}}$	P3HB/g otrub [g/g]
CT 1	$3,1 \pm 0,6$	$5,6 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,0$	$2,4 \pm 0,2$	$23,9 \pm 2,8$	$7,1 \pm 0,2$	0,01	0,18	0,001
CT 2	$3,6 \pm 0,2$	$24,2 \pm 2,1$	$0,9 \pm 0,1$	$8,8 \pm 1,4$		$8,1 \pm 0,8$	0,06	0,23	0,009

Kmen	C_{biomasa} [g/L]	P3HB [hm.%]	P3HB [g/L]	OD ₆₃₀ [-]	DNS před [g/L]	DNS po [g/L]	$Y_{P/S}$	$Y_{X/S}$	P3HB/g otrüb [g/g]
TT	1,9 ±0,3	13,7 ±3,5	0,3 ±0,1	8,0 ±0,8	23,9 ±2,8	9,1 ±0,5	0,02	0,13	0,003
HH	5,8 ±0,5	47,1 ±0,4	2,7 ±0,2	22,5 ±0,3		7,9 ±0,9	0,17	0,36	0,027
HO	5,9 ±0,1	33,7 ±2,3	1,9 ±0,1	19,0 ±0,1		6,7 ±0,2	0,11	0,34	0,019
BS	7,8 ±1,4	10,7 ±2,7	0,8 ±0,2	10,3 ±1,9		9,8 ±0,7	0,06	0,55	0,080

Tabulka 7: Shrnutí získaných výsledků po kultivacích vybraných bakterií na hydrolyzátu získaném po **kyselé předúpravě** a enzymatické hydrolyze z pšeničných otrub, a výtěžnostní bilance. Původní koncentrace redukujících sacharidů v hydrolyzátu byla 65,4 ±1,9 g/L, pro kultivační experimenty byla naředěna destilovanou vodou na optimální koncentraci 20 g/L, konkrétně 19,3 ±0,9 g/L (stanoveno DNS metodou).

Kmen	C_{biomasa} [g/L]	P3HB [hm.%]	P3HB [g/L]	OD ₆₃₀ [-]	DNS před [g/L]	DNS po [g/L]	$Y_{P/S}$	$Y_{X/S}$	P3HB/g otrüb [g/g]
CT 1	4,2 ±0,1	33,5 ±0,7	1,4 ±0,1	13,9 ±0,4	19,3 ±0,9	5,5 ±0,2	0,10	0,30	0,014
CT 2	3,1 ±0,1	45,9 ±7,1	1,4 ±0,2	10,3 ±0,6		6,7 ±1,2	0,11	0,25	0,014
TT	x	x	x	0,4 ±0,1		x	x	x	x
HH	2,0 ±0,1	40,6 ±0,1	0,8 ±0,1	7,2 ±0,1		5,5 ±1,0	0,06	0,14	0,008
HO	1,9 ±0,1	30,4 ±1,0	0,6 ±0,1	7,4 ±0,1		7,2 ±0,4	0,05	0,16	0,006
BS	3,9 ±0,1	14,5 ±0,8	0,6 ±0,1	12,1 ±0,4		6,9 ±0,2	0,05	0,31	0,006

Tabulka 8: Shrnutí získaných výsledků po kultivacích vybraných bakterií na hydrolyzátu získaném po **neutrální předúpravě** a enzymatické hydrolyze z pšeničných otrub, a výtěžnostní bilance. Původní koncentrace redukujících sacharidů v hydrolyzátu byla 30,6 ±0,9g/L, pro kultivační experimenty byla naředěna destilovanou vodou na optimální koncentraci 20 g/L, konkrétně 21,6 ±1,2 g/L (stanoveno DNS metodou).

Kmen	C_{biomasa} [g/L]	P3HB [hm.%]	P3HB [g/L]	OD ₆₃₀ [-]	DNS před [g/L]	DNS po [g/L]	$Y_{P/S}$	$Y_{X/S}$	P3HB/g otrüb [g/g]
CT 1	2,5 ±0,1	31,8 ±5,9	0,5 ±0,1	11,3 ±0,1	21,6 ±1,2	5,3 ±0,4	0,03	0,15	0,005
CT 2	3,7 ±0,1	44,5 ±5,2	1,6 ±0,2	13,9 ±0,1		4,5 ±0,3	0,09	0,22	0,016
TT	0,4 ±0,1	2,8 ±0,1	x	1,9 ±0,1		x	x	x	x
HH	4,1 ±0,1	62,1 ±1,0	2,5 ±0,1	19,7 ±0,2		4,1 ±0,8	0,14	0,23	0,025
HO	4,0 ±0,1	52,5 ±0,2	2,1 ±0,1	19,6 ±0,1		5,2 ±0,2	0,13	0,24	0,021
BS	5,1 ±0,3	44,8 ±1,7	2,3 ±0,1	18,2 ±0,2		5,8 ±0,3	0,14	0,32	0,023

Nejvyšší koncentrace P3HB byla naměřena u bakteriálních kmenů *Halomonas*, které vykázaly nejlepší schopnost produkce tohoto biopolymeru. I z naměřených zbytkových redukujících

sacharidů je zřejmé, že tyto bakterie po neutrální hydrolýze byly schopny nejúčinněji využít fermentovatelné sacharidy z hydrolyzátů. Neutrální hydrolýza je ekologicky i ekonomicky výhodná, protože nevyžaduje použití silně kyselých nebo zásaditých chemikálií, což šetří náklady a snižuje environmentální zátěž procesu. Výťažnostní koeficienty $Y_{P/S}$ (množství produktu P vytvořeného z daného množství substrátu S), a $Y_{X/S}$ (množství biomasy X vytvořené z daného množství substrátu S) naměřené pro kmeny *Halomonas* ukazují, že tyto kmeny jsou velmi efektivní v přeměně substrátu na produkt P3HB i na růst biomasy. To potvrzuje, že bakteriální kmeny *H. halophila* a *H. organivorans* jsou ideální pro biotechnologické aplikace, kde je kladen důraz na vysokou produktivitu a efektivní využití surovin. Na základě těchto pozitivních poznatků byly halofilní bakterie vybrány pro další kultivační experimenty v laboratorních bioreaktorech.

3.2.2 Kultivace bakterií na hydrolyzátech z pšeničných otrub v laboratorních bioreaktorech

Kultivační experimenty byly z Erlenmeyerových baněk převedeny do laboratorních bioreaktorů. Na hydrolyzátech z pšeničných otrub, získaných pomocí neutrální předúpravy následované enzymatickou hydrolýzou, byly provedeny kultivace vybraných halofilních bakterií schopných nejvyšší produkce PHA v baňkových experimentech popsanych v předchozí kapitole. Tyto kultivace byly realizovány v laboratorních bioreaktorech v rámci zahraniční stáže v Poznani v Polsku (Poznan University of Life Sciences, Department of Biotechnology and Food Microbiology).

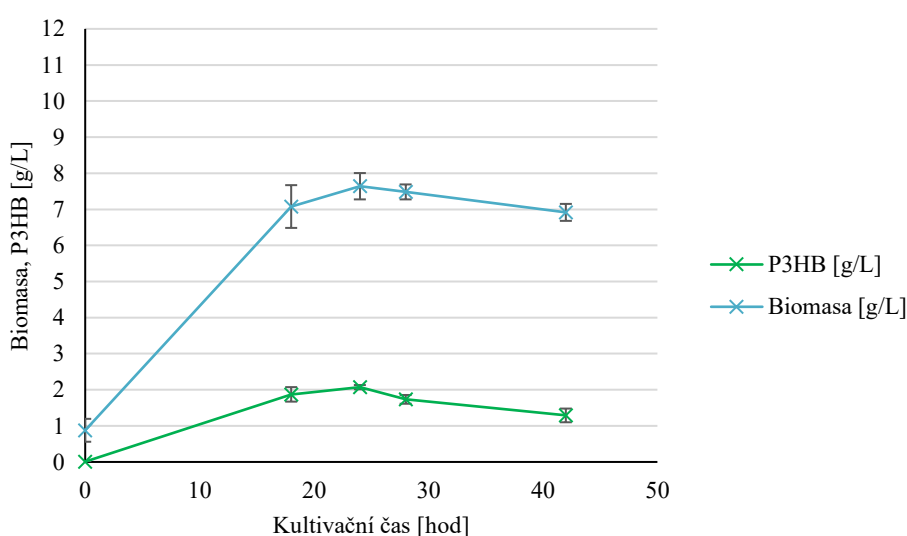
Provedeny byly kultivace dvou halofilních sbírkových bakteriálních kmenů *H. halophila* a *H. organivorans*, u nichž byla na základě předchozích screeningových experimentů v baňkách potvrzena schopnost utilizace hydrolyzátu otrub.

Kultivace s bakterií Halomonas halophila

Tento mikroorganismus je známý svou schopností přežít v extrémně slaných podmínkách, což z něj činí cenný model pro studium mikrobiálních adaptací na osmotický stres [41]. *H. halophila* je také zajímavá pro biotechnologické aplikace, jako je produkce P3HB [63].

Tabulka 9: Naměřené hodnoty optické hustoty, pH, zbytkových redukujících sacharidů, koncentrace biomasy a P3HB u kmenu HH po dvou paralelních kultivacích, n.d. = nedetekováno.

Čas [h]	OD ₆₃₀ [-]	pH [-]	Redukující sacharidy [g/L]	c _{biomasa} [g/L]	P3HB [hm. %]	P3HB [g/L]	Y _{P/S}	Y _{X/S}	P3HB [g/L/h]
0	3,8 ± 0,6	7,07 ± 0,03	23,3 ± 2,1	0,9 ± 0,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
18	18,2 ± 1,4	7,07 ± 0,04	4,5 ± 0,2	7,1 ± 0,6	26,2 ± 0,5	1,9 ± 0,2	0,10	0,38	0,10
24	19,6 ± 1,7	7,08 ± 0,03	4,4 ± 0,1	7,7 ± 0,4	27,2 ± 0,5	2,1 ± 0,1	0,11	0,41	0,09
28	17,8 ± 1,1	7,07 ± 0,04	4,5 ± 0,2	7,5 ± 0,2	23,2 ± 1,0	1,7 ± 0,1	0,09	0,39	0,06
42	17,3 ± 0,8	7,08 ± 0,03	4,1 ± 0,1	6,9 ± 0,2	18,6 ± 2,0	1,3 ± 0,2	0,07	0,36	0,03



Obrázek 6: Znáznornění výsledných koncentrací biomasy a P3HB u kmenu HH získaných ze dvou paralelních kultivačních experimentů.

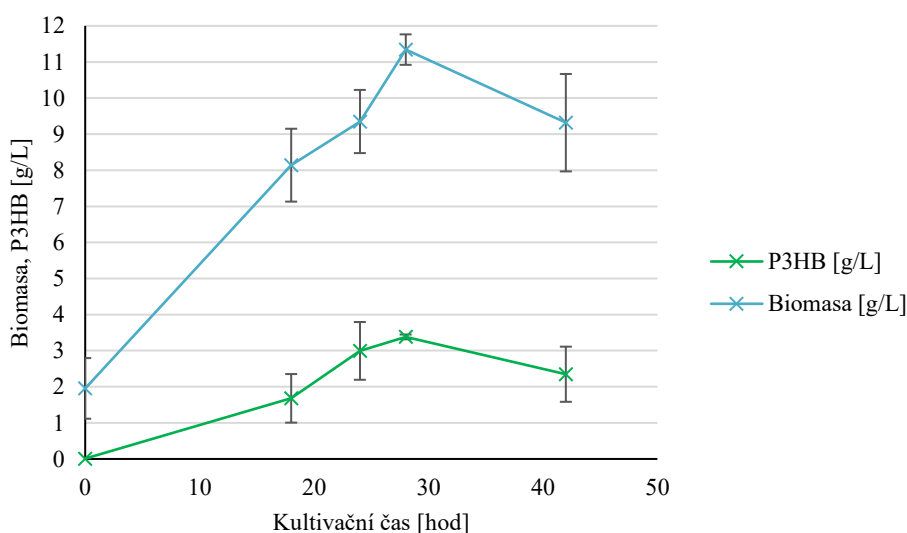
Bakteriální kmen *Halomonas halophila* byl schopen nejvyšší produkce PHA na hydrolyzátu z pšeničných otrub po 24 hodinách kultivace, poté začal obsah P3HB a biomasy klesat. Obě provedené kultivace probíhaly za stejných podmínek, přičemž i získané výsledky jsou srovnatelné a v prezentovaných výsledcích zprůměrované. V průměru kultivace bylo dosaženo obsahu P3HB v biomase blížíci se koncentraci 30 hm. % sušiny, výsledná koncentrace produktu byla 2,1 g/L.

Kultivace s bakterií *Halomonas organivorans*

Tato bakterie se vyznačuje schopností degradovat organické sloučeniny, což ji činí užitečnou v bioremediaci, zejména pro znečištěné prostředí s vysokým obsahem soli. *H. organivorans* se používá také v biotechnologiích, kde může přispět k rozkladu organických kontaminantů a produkci biopolymerů, jako je P3HB [63].

Tabulka 10: Naměřené hodnoty optické hustoty, pH, zbytkových redukujících sacharidů, koncentrace biomasy a P3HB u kmenu HO po dvou paralelních kultivacích, n.d. = nedetekováno.

Čas [h]	OD ₆₃₀ [-]	pH [-]	Redukující sacharidy [g/L]	C _{biomasa} [g/L]	P3HB [hm. %]	P3HB [g/L]	Y _{P/S}	Y _{X/S}	P3HB [g/L/h]
0	5,2 ±1,5	7,03 ±0,04	25,7 ±0,1	1,9 ±0,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
18	20,3±5,3	6,99 ±0,06	7,7 ±2,7	8,1 ±1,1	19,9 ±5,8	1,7 ±0,7	0,09	0,45	0,09
24	30,2 ±2,0	7,06 ±0,01	4,5 ±0,9	9,4 ±0,9	31,3 ±5,8	2,9 ±0,8	0,14	0,44	0,12
28	29,9 ±2,7	7,07 ±0,01	3,9 ±0,1	11,4 ±0,4	29,8 ±0,5	3,4 ±0,1	0,16	0,52	0,12
42	21,1 ±3,4	7,06 ±0,01	3,7 ±0,5	9,3 ±1,4	25,8 ±1,2	1,4 ±0,4	0,06	0,42	0,03



Obrázek 7: Znáznornění výsledných koncentrací biomasy a P3HB u kmenu HO získaných ze dvou paralelních kultivačních experimentů.

Bakteriální kmen *Halomonas organivorans* kultivovaný na hydrolyzátu z otrub byl schopen vyprodukovat více P3HB v porovnání s HH. Po kultivaci HO na hydrolyzátu bylo v průměru získáno po 24 hodinách 31 hm. % P3HB v sušině (2,9 g/L), což je nejvyšší výtěžek ze všech provedených kultivací. Uvedené výsledky jsou zprůměrovány ze dvou kultivačních experimentů.

Studované halofilní bakterie *Halomonas halophila* a *Halomonas organivorans* vykázaly stabilní růst a adaptaci na kultivačního prostředí ve formě hydrolyzátů z pšeničných otrub. Kultivační experimenty byly nejprve provedeny v baňkách, odkud byly následně převedeny do laboratorních bioreaktorů za kontrolovaných podmínek. Všechny realizované kultivace proběhly úspěšně, což potvrzuje reprodukovatelnost experimentů a vhodnost zvolených podmínek pro jejich další optimalizaci a aplikaci.

3.3 Biotechnologické využití hydrolyzátu z mláta

Pivovarské mláto je hlavním odpadním produktem pivovarského průmyslu, který tvoří přibližně 85 % všech vedlejších produktů vznikajících při výrobě piva. Vstupní surovinou je

zrní ječmene, ze kterého se po naklíčení vyrábí slad. Po rmutování a scezování zůstane jako odpad mláto, které vyžaduje rychlé zpracování. Jedná se o lignocelulózový materiál obsahující přibližně 17 % celulózy, 28 % necelulózových polysacharidů, především arabinoxylanů, a 28 % ligninu. Mláto je produkováno při výrobě piva celoročně a využívá se zejména jako krmivo pro hospodářská zvířata. Nicméně díky vysokému obsahu bílkovin a vlákniny (přibližně 20 %, resp. 70 % sušiny) může sloužit také jako doplněk lidské výživy. V poslední době se mláto hojně využívá v biotechnologických procesech, např. při kultivaci hub a bakterií, které slouží jako zdroje produktů s přidanou hodnotou [64]. Příkladem je nově izolovaný bakteriální kmen *Komagataeibacter rhaeticus* UNIWA AAK2, který byl schopen z pivovarského mláta produkovat bakteriální celulózu. Ze 30 g/L sacharidů byla bakterie schopna vytvořit 4 g/L bakteriální celulózy z vodného extraktu pšeničných otrub [65].

3.3.1 Použité mláto

Na hydrolytické experimenty byly použity různé druhy pivovarských mlát z výroby rozdílných druhů piva:

- mláto z domácího vaření piva typu ALE
- mláto z průmyslového procesu výroby plzeňského ležáku – (Hausrecht – neupravené a také pomleté)
- mláto z průmyslového procesu výroby piva typu Amber ALE (Španělsko, mláto bylo dodáno v rámci projektu H2020)

3.3.2 Stanovení sacharidů a fenolických látek v hydrolyzátech z mláta

Na úpravu a zisk fermentovatelných sacharidů byly, stejně jako u pšeničných otrub, vyzkoušeny tři typy chemické předúpravy: alkalická, kyselé a neutrální. Zmíněné přístupy byly následovány hydrolýzou enzymatickou za použití vybraných směsí enzymů.

3.3.2.1 Mláto z domácího vaření piva typu ALE

V domácím prostředí nemusí být sladování a extrakce sacharidů tak efektivní jako v průmyslových podmínkách. Mnoho domácích pivovarníků používá jednodušší techniky a vybavení, což vede k tomu, že v mlátě může zůstat více zkvasitelných sacharidů. Tento obsah závisí na konkrétních podmínkách vaření piva, jako je teplota rmutování, délka extrakce a pH, ale obecně může být zkvasitelných monosacharidů v mlátě zbylém po doma vařeném pivu o něco více než v mlátě z průmyslového pivovaru s optimalizovaným procesem scezování a vyslazování mláta [66].

Pro enzymatickou hydrolýzu tohoto typu mláta byla použita směs enzymů Celuláza (enzyme blend) a Viskozyne.

Tabulka 11: Koncentrace sacharidů v hydrolyzátech domácího mláta stanovené pomocí HPLC a DNS, a fenolických látek s využitím metody Folin-Ciocalteu, n.d. = nedetekováno.

Předúprava	Arabinoxylany [g/L]	Fruktóza [g/L]	Glukóza [g/L]	Σ HPLC [g/L]	DNS [g/L]	Folin-Ciocalteu [mg/L]
Alkalická	5,2 ±0,3	n.d.	15,0 ±0,2	20,2 ±0,3	46,2 ±0,9	535,9 ±0,3
Kyselá	15,1 ±4,0	1,9 ±0,1	41,5 ±3,1	58,5 ±2,0	57,8 ±0,1	1054,8 ±1,1
Neutrální	0,9 ±0,1	0,7 ±0,1	29,2 ±0,4	30,8 ±0,2	23,9 ±0,1	202,6 ±0,1

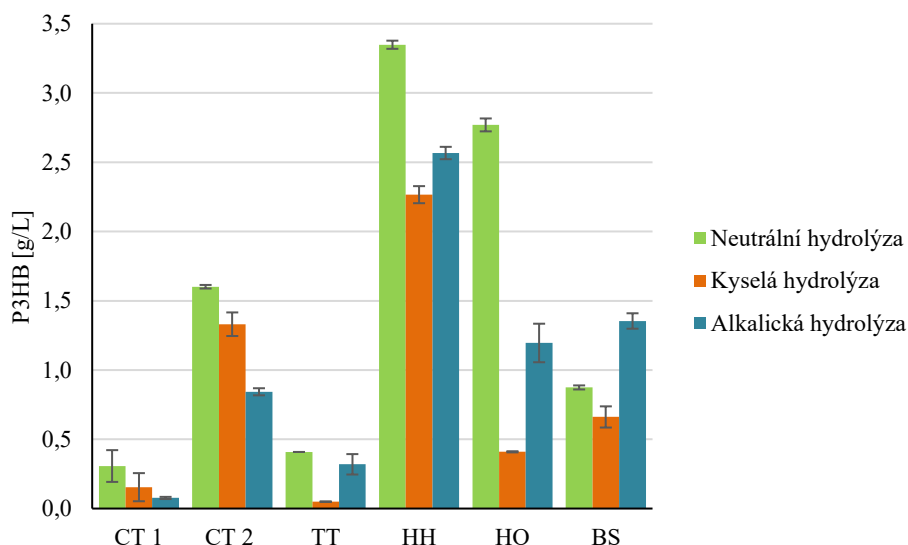
Získané výsledky korespondují s výsledky naměřených sacharidů a fenolických látek u pšeničných otrub. Nejvyšší obsah sacharidů byl získán po kyselé předúpravě, nicméně u této předúpravy byl spektrofotometricky zjištěn i nejvyšší obsah fenolických látek. Z hlediska optimálního poměru obsahu sacharidů a fenolických látek byl i v tomto případě stanoven postup neutrální předúpravy za vysoké teploty a tlaku.

3.3.3 Kultivace vybraných bakteriálních kmenů na hydrolyzátech z pivovarského mláta

Získané hydrolyzáty sloužily jako minerální médium pro vybrané bakteriální kmeny, které jsou uvedeny v Tab. 5. Principiálně byly testovány stejné bakteriální kmeny jako v případě pšeničných otrub. Skoro všechny vybrané kmeny patří mezi extremofilní bakterie, které mají nižší požadavky na sterilitu prostředí, což snižuje riziko kontaminace mezofilními bakteriemi.

3.3.3.1 Kultivace vybraných bakterií na hydrolyzátech z domácího mláta (ALE)

Porovnání naměřených koncentrací P3HB po hydrolyzách



Obrázek 8: Porovnání jednotlivých výtěžků P3HB v biomase získaných při různých způsobech předúprav a hydrolyz mláta.

Výsledky těchto experimentů ukazují, že neutrální hydrolyza pivovarnického mláta podporuje produkci P3HB více než hydrolyza kyselá nebo alkalická, a to i přestože kyselá hydrolyza poskytuje více fermentovatelných sacharidů. Nejvyšší koncentrace P3HB, téměř 70 hm. %

obsahu biomasy, byla dosažena u bakterií rodu *Halomonas*. Pravděpodobným důvodem je vyšší dostupnost sacharidů a nižší koncentrace fenolických inhibitorů po neutrální hydrolýze, což podporuje růst a metabolickou aktivitu těchto bakterií.

Tyto výsledky podtrhují potenciál *Halomonas* jako vhodného producenta P3HB, což může mít praktické využití v průmyslu, kde neutrální hydrolýza umožňuje získat substrát s minimem inhibitorů. Výzkum přispívá k udržitelným biotechnologickým procesům, podporujícím cirkulární ekonomiku.

3.4 Biotransformace ferulové kyseliny s využitím vybraných bakteriálních kmenů

Biotransformace představuje účinnou strategii pro získávání přírodních látek s vysokou přidanou hodnotou, která se stále více uplatňuje v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Na rozdíl od chemické syntézy umožňují biokatalytické procesy výrobu cílových metabolitů za mírných reakčních podmínek, s vyšší specifitou a často i ekologičtější cestou [67]. Využití mikroorganismů ke konverzi přírodních prekurzorů, jako je ferulová kyselina (FA), představuje udržitelnou alternativu pro produkci cenných sensoricky a biologicky aktivních sloučenin, mezi něž patří například vanilová kyselina (VA), vanilylalkohol (VOH), vanilin (VAN), či 4-vinylguajakol (4VG).

Byl realizován screening různých kmenů (viz Tab. 12), ze kterých byly vybrány bakterie, které prokázaly nejvyšší biotransformační potenciál v kontextu schopnosti konvertovat FA na VAN a jeho deriváty, případně 4VG.

Tabulka 12: Screening vybraných bakteriálních kmenů v kontextu jejich schopnosti metabolizace FA a její konverze na vybrané metabolity – VA a 4VG

Bakterie	Kmen	Úbytek FA [%]	VA*	4VG*
Mezofilní	<i>Cupriavidus necator</i> H16 (CCM 3726)	82		
	<i>Cupriavidus</i> sp. (DSM 19379)	71		
	<i>Cupriavidus</i> sp. (DSM 19416)	72		
	<i>Cupriavidus</i> sp. (DSM 25816)	78		
Halofilní	<i>H. halophila</i> (CCM 3662)	2		
	<i>H. organivorans</i> (CCM 7142T)	98		
	<i>H. elongata</i> (CCM 3756)	58		
	<i>H. neptunia</i> (CCM 7107)	100		
	<i>H. hydrothermalis</i> (CCM 7104)	60		
Termofilní	<i>Caldimonas thermodepolymerans</i> (DSM 15344)	100		
	<i>Caldimonas thermodepolymerans</i> (LMG 21645)	100		
	<i>Caldimonas thermodepolymerans</i> (DSM 15264)	98		
	<i>Tepidimonas taiwanensis</i> (LMG 22826)	75		

Bakterie	Kmen	Úbytek FA [%]	VA*	4VG*
Termofilní	<i>Rubrobacter xylophilus</i> (DSM 9941)	67		

* **zelená** barva značí kmeny, které byly schopny biotransformovat FA o původní koncentraci 500 mg/L na látku s přidanou hodnotou o koncentraci >50 mg/L (10 %)

3.4.1 Představení *Caldimonas thermodepolymerans*

Caldimonas thermodepolymerans (dříve *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344) je termofilní gramnegativní bakterie patřící do třídy betaproteobakterií. Prosperuje při vysokých teplotách, její optimální růstová teplota se pohybuje kolem 50–55 °C. Vysoká kultivační teplota *C. thermodepolymerans* snižuje riziko kontaminace, takže je vhodná pro průmyslové procesy prováděné v nesterilních podmínkách [68, 69].

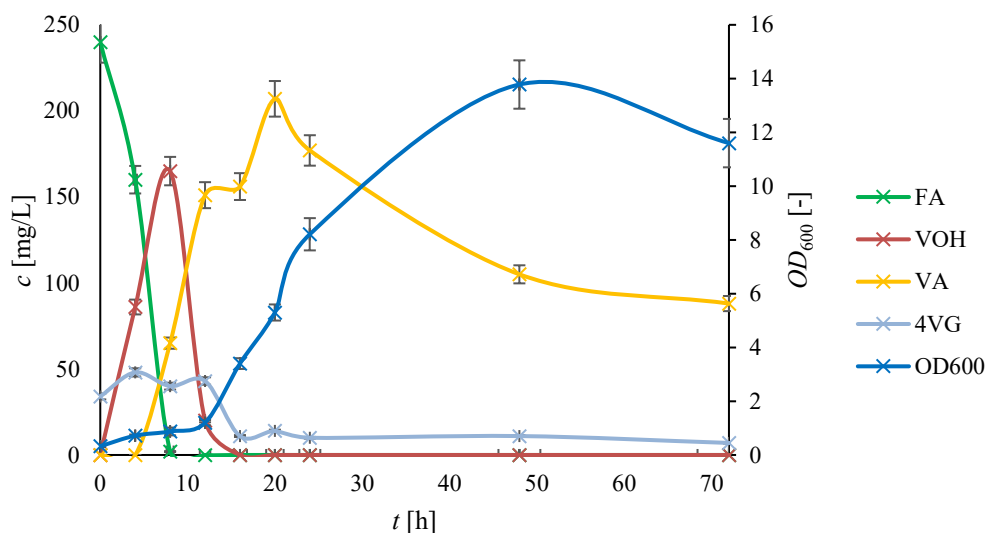
V našich experimentech bakterie poprvé prokázala schopnost účinně a rychle biotransformovat FA na vysoce hodnotné metabolity, konkrétně VOH a VA.

3.4.1.1 Biokonverze kyseliny ferulové pomocí *Caldimonas thermodepolymerans*

V nedávné době byl sestaven a publikován kompletní genom bakterie *Caldimonas thermodepolymerans* [69]. Díky tomu bylo možné provést ve spolupráci s kolegy z Fakulty elektrotechniky a komunikačních technologií VUT v Brně biotransformatickou analýzu genomu, která odhalila přítomnost několika potenciálních enzymů, které mohou být zapojeny do metabolismu kyseliny ferulové. Gen *fcs* (KO číslo K12508), kódující enzym feruloyl-CoA syntázu, který katalyzuje přeměnu FA na feruloyl-CoA, byl identifikován pomocí KEGG anotace ve všech třech analyzovaných genomech (lokusy IS481_07640, ONS87_09160 a ONZ46_07990 u kmenů DSM 15344, DSM 15264 a LMG 21645). I když gen *ech* (K07511), kódující enoyl-CoA hydratázu/aldolázu, důležitý enzym potřebný pro metabolizaci FA, nebyl přímo anotován pomocí KEGG, je zde domněnka, že tento gen je přítomen ve všech analyzovaných genomech jako další gen up-stream od *fcs* ve stejném operonu (lokusy IS481_07635, ONS87_09155 a ONZ46_07985). Přestože kódované proteiny sdílejí pouze 24% podobnost v sekvenci aminokyselin s dostupnými ortology, tyto referenční sekvence pocházejí z mezofilů, zatímco pro extremofily nejsou v tomto kontextu dostatečně popsány. Zdá se, že termostabilní verze těchto enzymů vyžadují značně odlišnou strukturu, což by mohlo vysvětlovat pozorované rozdíly v primární struktuře. Navíc enzymy *fcs* a *ech* katalyzují následné reakce, což naznačuje, že přítomnost jejich genů ve stejném operonu je pravděpodobná. Bohužel gen *vdh* kódující vanilin dehydrogenázu, jen z dalších enzymů často zapojených do biotransformace ferulové kyseliny, identifikován nebyl. Přesto bylo v analyzovaných genomech nalezeno přibližně 10 homologních sekvencí, které by mohly odpovídat termostabilním verzím tohoto enzymu. Zároveň geny *fcs* a *ech* nebyly nalezeny v genomu příbuzného kmenu *Caldimonas aquatica* LMG 23380T [59], což naznačuje, že schopnost metabolizovat FA je unikátní vlastností druhu *C. thermodepolymerans*.

3.4.1.2 Posouzení vlivu vybraných kultivačních podmínek

V rámci identifikace vlivu vybraných kultivačních podmínek vedoucích k co nejvyšší produkci látek s přidanou hodnotou pomocí *C. thermodepolymerans* DSM15344 byly na počátku experimentů vyzkoušeny různé vstupní koncentrace FA. Byly vybrány koncentrace 100; 250; 500; 750 a 1000 mg/L.



Obrázek 9: Časový průběh přeměny FA na její metabolity pomocí bakteriálního kmenu *C. thermodepolymerans* DSM 15344. Byla měřena korelace s optickou hustotou (růst) při 600 nm [70].

Bakterie *C. thermodepolymerans* byla kultivována v přítomnosti 250 mg/L FA a rychle ji během prvních 8 hodin zcela metabolizovala. Prvním detekovaným metabolitem byl VOH, následně přeměněný na VA – hlavní produkt biotransformace za daných podmínek. Podle délky kultivace lze řídit, zda bude výsledkem VOH (kratší doba), nebo VA (delší doba). Oba metabolity jsou cenné pro použití v doplňcích stravy, kosmetice a farmacii [70].

V médiu byl detekován i 4VG, jehož vznik byl pravděpodobně abiotický, ale kultura jej dokázala přeměnit na VA. Po 12 hodinách kultivace byl zaznamenán pokles 4VG a nárůst VA.

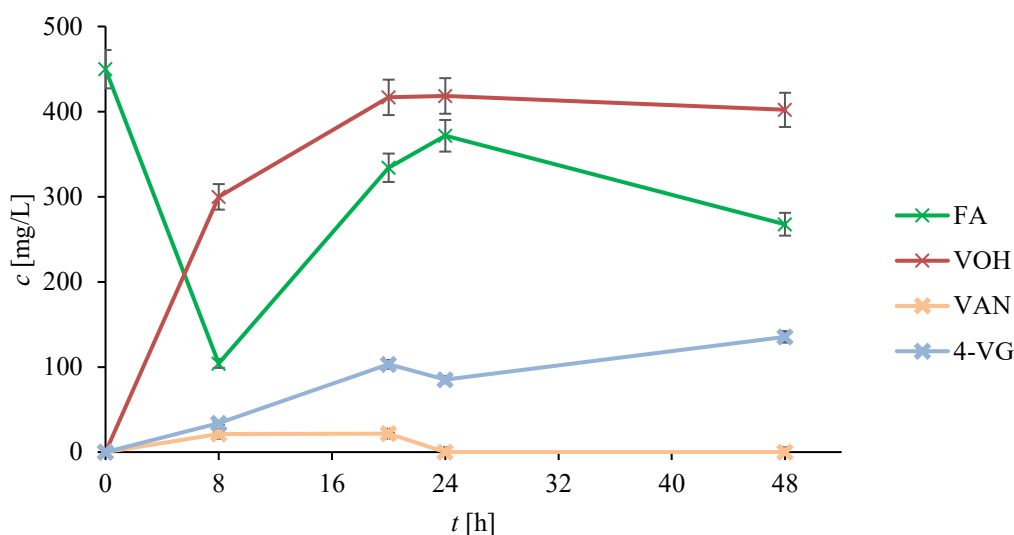
C. thermodepolymerans prokázala jedinečnou schopností rychle a účinně přeměňovat FA na látky s přidanou hodnotou, především VA a VOH. Ve srovnání s jinými termofilními mikroorganismy, jako jsou *Sporotrichum thermophile* [71], který po 3 dnech při 45 °C biotransformoval 35 mol % FA na VA, a *Alicyclobacillus acidoterrestris* [72], který dosáhl 60,1 mol % 4VG z VA po 24 hodinách při 45 °C, ukázala *C. thermodepolymerans* výrazně rychlejší metabolizaci FA. Po 8 hodinách kultivace dosáhla konverze FA na VOH 68,8 mol % a po 20 hodinách konverze FA na VA 86,3 mol %.

Vyšších koncentrací VA (261 mg/L) bylo dosaženo za použití nižších vstupních koncentrací FA, zatímco vyšší koncentrace VOH (383 mg/L) byly naměřeny po využití vyšších počátečních koncentrací FA. Výsledky těchto experimentů potvrzují, že počáteční koncentrace FA hraje klíčovou roli v určování směru biotransformace, a že bakterie *C. thermodepolymerans* je

schopna flexibilně reagovat na různé podmínky, což umožňuje optimalizovat produkci cílových metabolitů podle požadovaných výstupů.

3.4.1.3 Další přístupy k transformaci FA pomocí *C. thermodepolymerans*

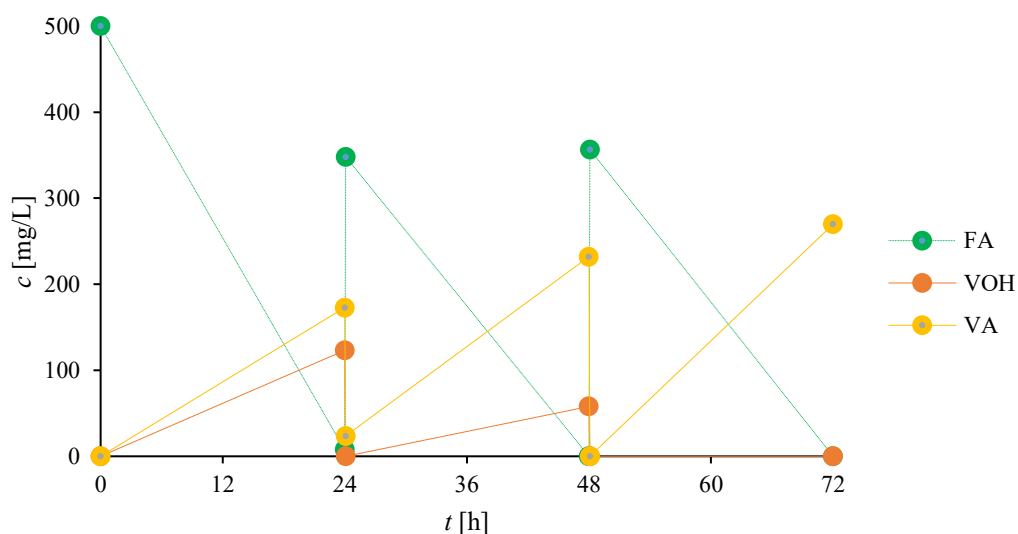
Vzhledem k tomu, že experimenty ukázaly efektivní a rychlé metabolizování FA bakteriálním kmenem *C. thermodepolymerans*, byla vyzkoušena možnost zvýšení výtěžnosti procesu přidáním druhé dávky FA po 8. hodině, kdy dochází k vyčerpání počáteční dávky FA. Byla provedena kultivace s počáteční koncentrací 500 mg/L FA a druhá dávka (také 500 mg/L) byla přidána po 8 hodinách kultivace, jak je znázorněno na Obr. 10. Tento přístup sice vedl k vyšším koncentracím VOH (418 mg/L po 24 hodinách kultivace), ale účinnost konverze FA na požadované metabolity nebyla optimální. Druhá dávka FA způsobila nízkou transformační účinnost, přičemž značná část FA zůstala nevyužita (reziduální koncentrace FA byla 267 mg/L). Tento výsledek naznačuje, že přidání další dávky FA není efektivní strategií vedoucí k navýšení koncentrace vznikajících produktů.



Obrázek 10: Nový přístup biotransformačního procesu – přidání nové dávky FA po 8 hodinách kultivace, kdy bakteriální kultura podle předchozích experimentů vyčerpá veškerou FA [70].

Druhým možným přístupem byla tzv. repeated batch kultivace. Repeated batch je semikontinuální metoda kultivace, při níž se opakovaně odstraňuje část média s odpadními produkty a současně se doplňuje čerstvé médium tak, aby se udržely optimální podmínky pro růst buněk a produkci žádaných metabolitů. Často se používá při výrobě biotechnologických produktů, jako jsou enzymy nebo antibiotika, kde je dlouhodobá kultivace klíčová [73]. V experimentu bylo opakovaně odstraňováno 70 obj. % fermentovaného kultivačního média a nahrazováno stejným objemem čerstvého média (počáteční dávka FA v médiu byla 500 mg/L), jak je znázorněno na Obr. 11. Tato strategie prokázala efektivní konverzi FA za vzniku VA. Koncentrace VOH během postupných kultivací klesala, přičemž u poslední kultivace už nebyla téměř detekována. Vzhledem k tomu, že VA se zdá být konečným metabolitem v procesu biotransformace FA v *C. thermodepolymerans*, tato pozorování naznačují postupnou adaptaci bakteriální kultury na FA, což zvyšuje efektivitu její konverze na požadovaný metabolit. Účinnost konverze FA na VA se s opakováními zvyšovala, z přibližně 36 mol. % na 54 mol. %. Tento nárůst výtěžku požadovaného metabolitu potvrzuje

schopnost bakterie *C. thermodepolymerans* efektivně zpracovávat ferulovou kyselinu, což je zásadní pro úspěšné využití tohoto procesu v průmyslu.



Obrázek 11: Průběh repeated-batch kultivace po dvou přidáních 70 obj.% čerstvého média s FA [188].

Termofilní bakterie *Caldimonas thermodepolymerans* prokázala výrazný biotechnologický potenciál pro biotransformaci FA na cenné produkty, jako jsou VA a VOH. Experimenty ukázaly, že tato bakterie je schopna rychlé a účinné přeměny FA při zvýšené teplotě (50 °C). Byly identifikovány klíčové geny zodpovědné za metabolismus FA, což otevírá cestu k dalšímu zkoumání těchto procesů a potenciálnímu genetickému inženýrství za účelem zvýšení výtěžků konkrétních metabolitů.

Rovněž bylo zjištěno, že koncentrace FA a doba trvání procesu a pravděpodobně také dostupnost kyslíku výrazně ovlivňují směr biotransformace a výtěžky jednotlivých produktů. Tyto poznatky jsou klíčové pro další optimalizaci procesů založených na konceptu NGIB a pro využití mikroorganismu *C. thermodepolymerans* v průmyslové výrobě hodnotných fenolických látek.

Úpravou klíčových kultivačních parametrů, jako je počáteční koncentrace FA a doba kultivace, bylo možné směřovat produkci cílených metabolitů. Vyšší koncentrace FA a kratší doba kultivace podporují produkci VOH, zatímco nižší koncentrace a delší doba kultivace vedou ke zvýšení výtěžku VA. Kromě toho lze proces provádět v systému repeat batch, což podtrhuje průmyslový potenciál *C. thermodepolymerans* pro biotransformaci FA. To tuto bakterii staví do pozice nadějněho kandidáta pro praktické aplikace v biotechnologiích.

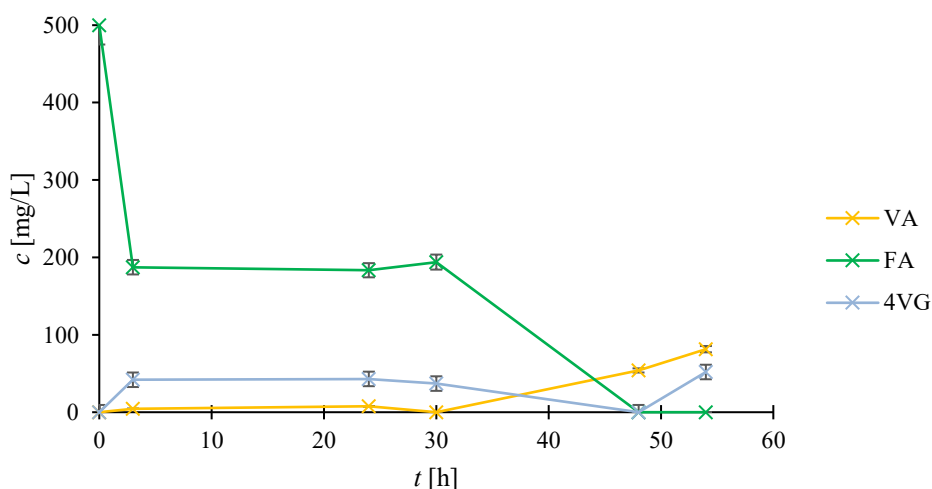
3.4.2 Biotransformace FA s využitím *Halomonas neptunia*

Halomonas neptunia je gramnegativní haloofilní bakterie patřící do rodu *Halomonas*. Prosperuje v prostředí s vysokou salinitou, jako jsou solné pláně a hyperslaná jezera. Tento kmen se vyznačuje schopností produkovat různé enzymy a metabolity, které mají potenciální využití v biotechnologiích, včetně bioremediace a výroby bioaktivních sloučenin [74]. *H. neptunia* je schopna využít odpadní fritovací olej k produkci PHA [75], ale informace o její schopnosti

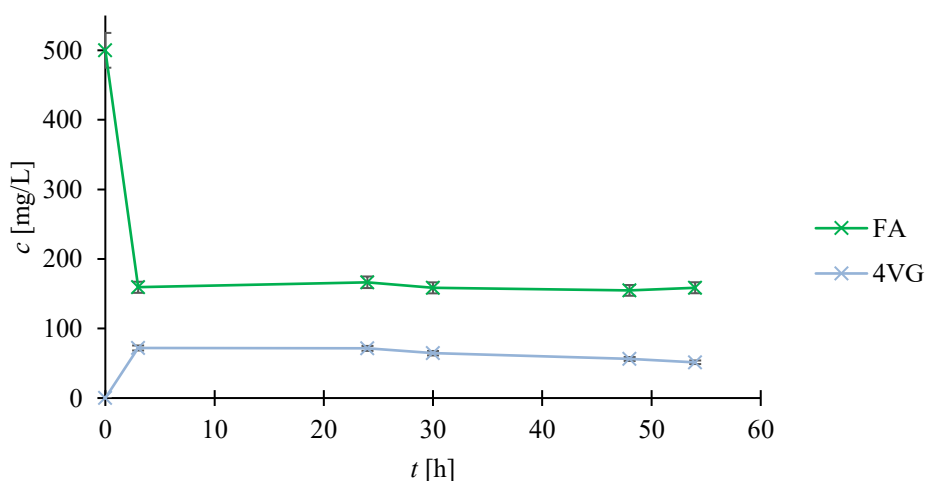
biotransformace FA v dostupné literatuře zatím chybí. Doposud jsou ve vědecké literatuře dostupné informace o schopnosti příbuzného kmenu *Halomonas elongata* biotransformovat FA na VA [76]. Také kmen *Halomonas* sp. B15, izolovaný ze slané jezera Larnaka na Kypru, byl schopný biotransformovat FA na VAN a VA [77], což naznačuje, že i další příbuzné kmeny by mohly mít podobné schopnosti. V rámci experimentální části dizertační práce bylo zjištěno, že *H. neptunia* je schopna účinně biotransformovat FA na látky s přidanou hodnotou, zejména VA a 4VG (viz Tab. 12).

3.4.2.1 Identifikace klíčových parametrů biotransformačního procesu

Aby bylo dosaženo co nejvyšších výtěžků biotransformačního procesu, bylo nutné identifikovat a nastavit hlavní kultivační podmínky.



Obrázek 12: Naměřené výsledky koncentrací jednotlivých analytů po kultivaci *H. neptunia* v **komplexním médiu** s přidavkem 500 mg/L FA.



Obrázek 13: Naměřené výsledky koncentrací jednotlivých analytů po kultivaci *H. neptunia* v **minerálním médiu** s přidavkem 500 mg/L FA.

Z porovnávaných médií (viz Obr. 12 a 13) bylo vybráno pro další biotransformační experimenty médium komplexní. Molární výtěžek VA a 4VG dosáhl po 54 hodinách kultivace

v komplexním médiu hodnot 18,8 mol. % pro VA a 13,4 mol. % pro 4VG. Naproti tomu při použití minerálního média se koncentrace FA snižovala pouze v počáteční fázi a poté zůstávala téměř beze změny po zbytek experimentu. Vznikalo pouze 4VG, které po následných provedených kultivačních experimentech bakteriálního kmenu v médiu bez přidané FA vznikalo abioticky. Možným vysvětlením je, že některé enzymy podílející se na metabolismu FA mohou vyžadovat specifické kofaktory (např. ionty kovů, vitaminy), které jsou v komplexním médiu běžně dostupné, avšak v minerálním médiu chybí nebo jsou přítomny jen v omezeném množství. To by mohlo být příčinou neúplného metabolismu FA v minerálním prostředí. Kromě toho, protože přeměna FA je typicky redoxně řízený proces [78], mohou k rozdílům v účinnosti metabolismu přispívat i odlišnosti v redoxní rovnováze mezi oběma typy médií. Některé metabolické dráhy totiž vyžadují donory nebo akceptory elektronů (např. NADH, FADH₂), které jsou v komplexních médiích dostupnější, což může zvýšit míru přeměny FA. Všechny následné experimenty proto byly prováděny v komplexním médiu.

*Tabulka 13: Výběr optimální doby biotransformace (*n. d. = nebylo detekováno).*

Čas [hod]	Ferulová kyselina [mg/L]	Vanilová kyselina [mg/L]	4-vinylguaiakol [mg/L]
0	500,0 ±2,0	n. d.	n. d.
6	319,0 ±1,0	n. d.	n. d.
24	284,8 ±3,2	8,8 ±1,2	43,3 ±1,2
48	277,9 ±1,3	35,3 ±2,0	18,6 ±0,9
72	9,2 ±0,6	322,9 ±3,8	14,2 ±0,7
78	4,5 ±0,3	308,5 ±1,8	n. d.
144	n. d.*	144,2 ±0,9	n. d.

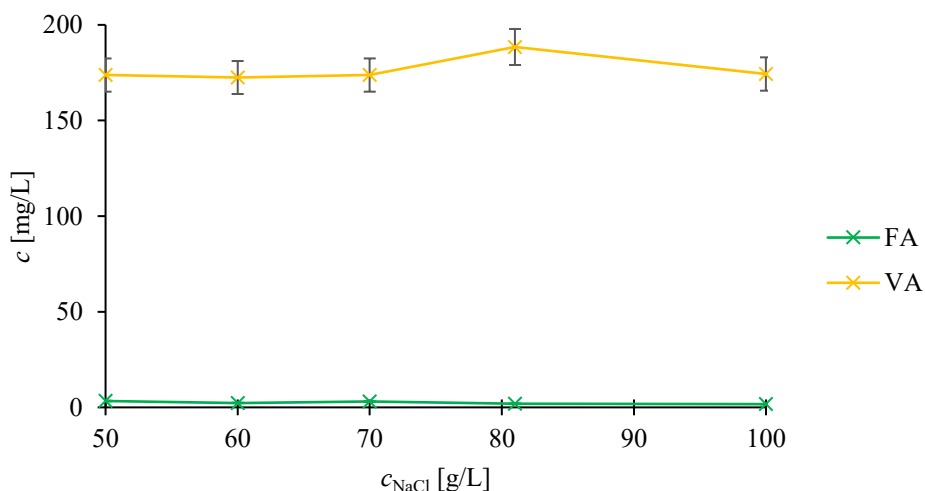
Jedním z klíčových parametrů ovlivňujících efektivitu biotransformace byla doba kultivace. V další fázi experimentu byl sledován časový průběh biotransformace FA na látky s přidanou hodnotou. Vývoj koncentrací jednotlivých analytů byl sledován v časovém intervalu od počátku kultivace až do 144 hodin. Na základě časového průběhu koncentrací jednotlivých analytů byla jako optimální doba biotransformace zvolena 72. hodina kultivace. V tomto čase došlo k téměř úplnému vyčerpání ferulové kyseliny (9,2 ±0,6 mg/L) a současně k dosažení maximální koncentrace vanilové kyseliny (322,9 ±3,8 mg/L). Tato hodnota představuje nejvyšší výtěžek VA v celém sledovaném časovém intervalu, což naznačuje, že k hlavní přeměně FA na VA dochází právě v tomto bodě. Po 72. hodině již nedocházelo k významnému nárůstu koncentrace VA, naopak byl zaznamenán pokles VA. Z těchto důvodů byla 72. hodina identifikována jako klíčový bod pro ukončení kultivace s ohledem na maximalizaci výtěžku vanilové kyseliny.

Tabulka 14: Výběr optimální vstupní koncentrace ferulové kyseliny (po 72 hodinách).

	$C(\text{ferulová kyselina}) \text{ [mg/L]}$				
	300	500	600	800	1000
Vanilová kyselina [mg/L]	85 ±5	120 ±4	26,9 ±0,8	48 ±2	2,8 ±0,1
Ferulová kyselina [mg/L]	6,3 ±0,4	2,8 ±0,2	167 ±11	194 ±13	246 ±15
4-vinylguaiakol [mg/L]	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	208 ±21

Dále byl zkoumán vliv počáteční koncentrace FA na účinnost biotransformace pomocí *H. neptunia*. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 14. Počáteční koncentrace FA byla testována v rozmezí 300–1000 mg/L. Nejvyšší biotransformační účinnost byla dosažena při koncentraci 500 mg/L, kdy byl zaznamenán nejvyšší výtěžek vanilové kyseliny (27,7 mol. %).

Další zvyšování koncentrace FA vedlo k neúplné metabolizaci, což bylo patrné z vysokého zbytkového množství FA v kultivačním médiu a snížení výtěžků VA. Při nejvyšší testované počáteční koncentraci FA došlo k posunu bakteriálního metabolismu, přičemž byl ve vysokých koncentracích produkován i 4VG (26,9 mol. % přeměny). Podobný jev byl pozorován také u bakterie *C. thermodepolymerans* (viz Kap. 3.4.1.1), kde vysoké koncentrace FA vedly primárně k tvorbě VOH, zatímco nižší dávky FA způsobily vyšší produkci VA. Lze tedy předpokládat, že v případě *H. neptunia* může nadměrná koncentrace FA způsobit posun biotransformační dráhy.



Obrázek 14: Výběr vhodné koncentrace NaCl přidávané do produkčního média, výsledky byly naměřeny po 72 hodinách kultivace za použití vstupní koncentrace FA 500 mg/L.

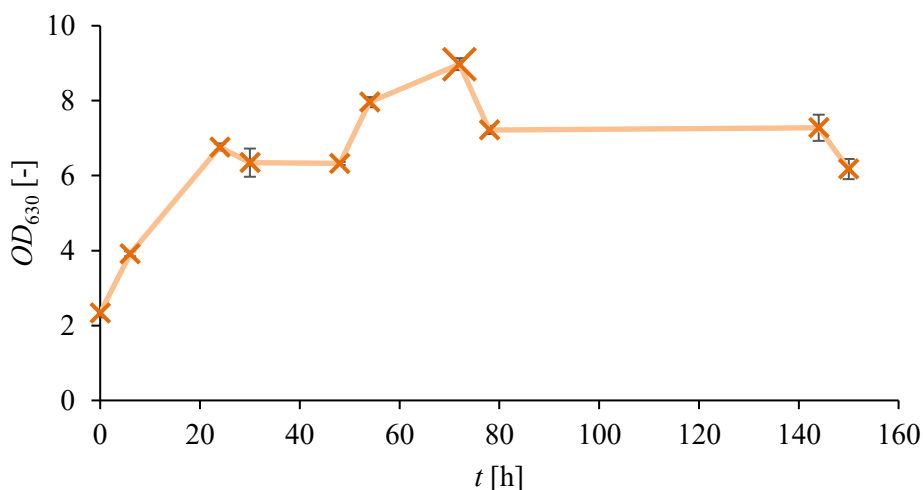
Dalším klíčovým kultivačním parametrem zkoumaným v souvislosti s biotransformací FA byla koncentrace NaCl v kultivačním médiu. Přítomnost NaCl je nezbytná pro přežití halofilního bakteriálního kmene a zároveň pomáhá předcházet kontaminaci běžnými mezofilními mikroorganismy z okolního prostředí [79]. Jak lze vidět na Obr. 14, salinita v rozmezí 50 až 100 g/L neměla zásadní vliv na biotransformaci FA, jelikož FA byla téměř úplně metabolizována a přeměněna na VA. Z biotechnologického a průmyslového hlediska je tato skutečnost výhodná, neboť koncentrace soli může být upravována podle vnějších podmínek, aniž by byl narušen biotransformační proces. Z ekonomického pohledu je navíc proces efektivnější díky nižším nárokům na přísadek soli, při současném zachování vysokých výtěžků

a zvýšené odolnosti vůči kontaminaci. Pro další experimenty byla zvolena koncentrace NaCl 81 g/L, která byla identifikována jako optimální pro daný kmen v předchozích pracích [80].

Ze získaných výsledků výběru vhodných kultivačních a biotransformačních podmínek lze shrnout, že nejvyšší výtěžek vanilové kyseliny (323 mg/L) byl dosažen po 72 hodinách kultivace při teplotě 30 °C a počáteční koncentraci FA 500 mg/L. Salinita v rozmezí 50–100 g/L NaCl neměla zásadní vliv na efektivitu biotransformace, což umožňuje flexibilní úpravu podmínek bez negativního dopadu na výtěžnost. Jako vhodná byla vybrána koncentrace 81 g/L NaCl, která zároveň přispívá ke snížení rizika kontaminace a provozních nákladů. Následující experimenty probíhaly za těchto optimalizovaných podmínek.

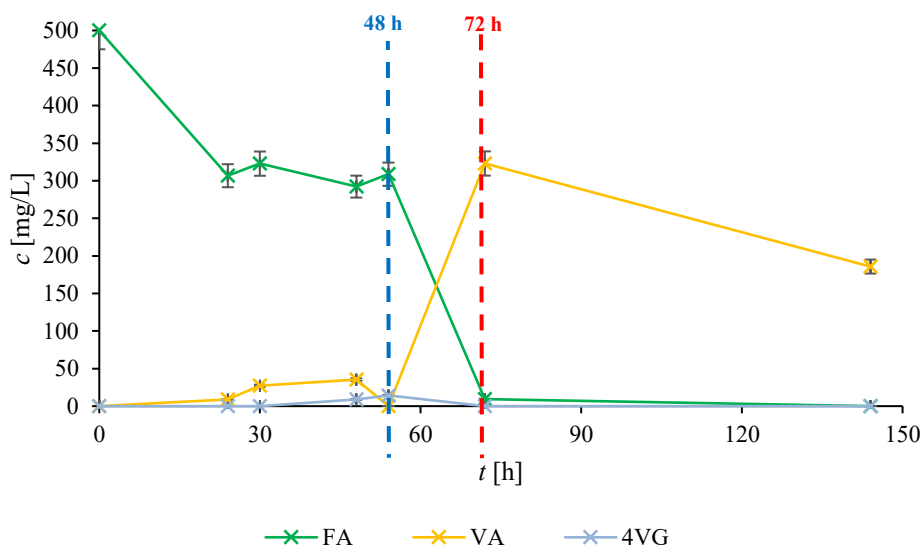
3.4.2.2 Růstová křivka v přítomnosti FA

Za účelem sledování růstu bakteriálního kmene *H. neptunia* byla stanovena růstová křivka bakterie v komplexním kultivačním médiu v přítomnosti FA. Kultivace probíhala za optimalizovaných podmínek z Kap. 3.4.2.1. Růst byl monitorován spektrofotometricky měřením optické hustoty při vlnové délce 630 nm ve vybraných časových intervalech.



Obrázek 15: Naměřená růstová křivka bakteriálního kmene.

Na počátku růstové křivky lze na základě naměřených dat zaznamenat exponenciální nárůst, což naznačuje, že bakterie využívala uhlíkaté zdroje obsažené v komplexním kultivačním médiu. Poté přechází růstová křivka do stacionární fáze, která trvá do 48. hodiny. Po tomto časovém úseku optická hustota bakteriální kultura opět narůstá. Maximální hodnota optické hustoty byla zaznamenána v 72. hodině kultivace, což potvrzuje optimalizovanou dobu trvání biotransformačního procesu z předchozích experimentů.



Obrázek 16: Růstová křivka v přítomnosti FA naměřená u bakterie *H. neptunia*.

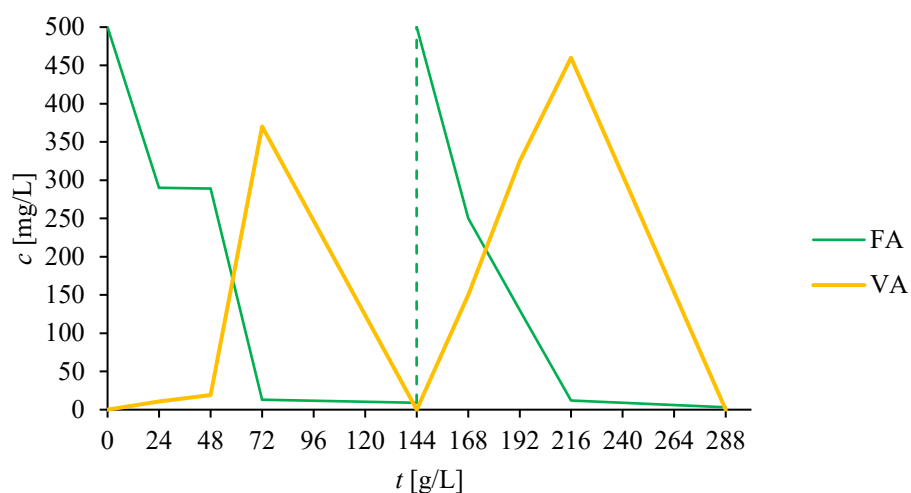
Růstová křivka v přítomnosti FA byla sestavena na základě měření koncentrací fenolických látek s využitím HPLC s UV-Vis detekcí. Získaná data korespondují s růstovou křivkou bakterie. V časovém úseku 48–72 hodin prokázala *H. neptunia* nejvyšší biotransformační potenciál. FA byla v tomto čase bakterií částečně metabolizována a transformována na VA. Od 72. hodiny je zřejmý pokles optické hustoty i naměřených koncentrací VA, v tomto čase byla veškerá FA metabolizována a nastala fáze odumírání buněk. Úspěšnost konverzního procesu FA na VA byla téměř 79 mol. %, což potvrzuje vysokou biotransformační schopnost vybrané bakterie a její potenciální budoucí využití v průmyslových technologiích. V porovnání s biotransformační schopností termofilního kmene *C. thermodepolymerans* (viz Kap. 3.4.1.1) vykazala *H. neptunia* vyšší schopnost přeměny FA na VA při stejné vstupní koncentraci FA. Z 500 mg/L FA byla *C. thermodepolymerans* schopna dosáhnout výtěžku 60,2 mol. %, zatímco *H. neptunia* dosáhla vyšší konverze. Je však třeba zohlednit, že tohoto výsledku *C. thermodepolymerans* dosáhla již po 24 hodinách kultivace, což svědčí o vysoké efektivitě obou testovaných mikroorganismů v kontextu biotransformace FA.

3.4.2.3 Biotransformace FA s využitím enkapsulované kultury

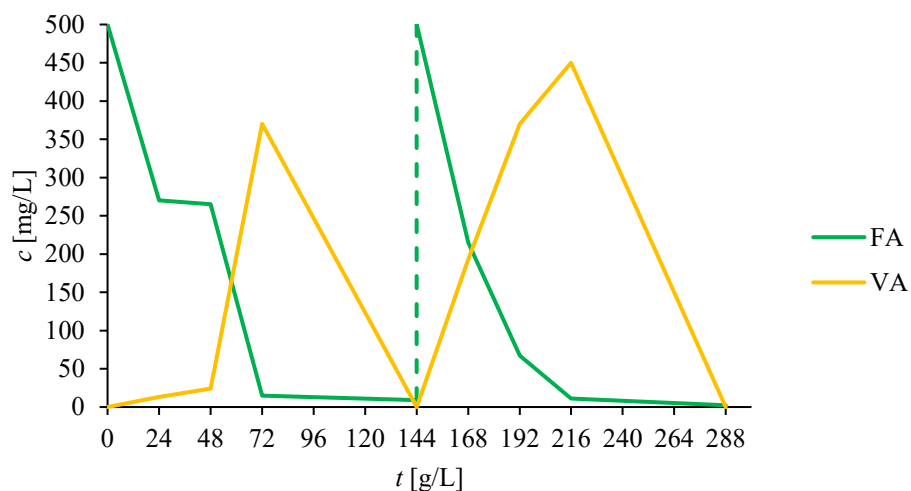
Zachycení mikrobiálních buněk v hydrogelu je považováno za slibný přístup, protože je vůči buňkám šetrné a současně poskytuje žádoucí vlastnosti a efektivitu. Alginát je široce uznáván jako účinný materiál pro enkapsulaci mikroorganismů a nabízí řadu výhod v různých aplikacích. Například enkapsulace *Bifidobacterium animalis* v alginátových hydrogelech ukázala, že tyto materiály vytvářejí stabilní a uspořádané mikročástice, které bakterie chrání a zároveň umožňují jejich kontrolované uvolňování pomocí difúze. Díky tomu je tento bakteriální kmen vhodný pro použití při fermentaci mléčných výrobků i pro orální podání [81]. Podobně v zemědělských aplikacích bylo prokázáno, že alginátové obaly zvyšují skladovatelnost mikrobiálních inokulantů a chrání je před vlivy vnějšího prostředí [82].

Na základě těchto poznatků byl navržen a optimalizován postup pro enkapsulaci *H. neptunia* do alginátu pomocí poloautomatického enkapsulátoru. Enkapsulovaná kultura byla následně inkubována v komplexním médiu doplněném o 500 mg/L FA s přísadkou 50 g/L NaCl a bez

NaCl. V průběhu kultivace byly v definovaných časových intervalech odebírány vzorky. Po 144 hodinách byla enkapsulovaná kultura z média odfiltrována a přenesena do čerstvého komplexního média s identickým složením pro zahájení druhého kultivačního cyklu. Všechny odebrané vzorky byly analyzovány pomocí HPLC-UV-Vis za účelem stanovení zbytkové koncentrace FA a množství vzniklé VA.



Obrázek 17: Výsledné koncentrace naměřených fenolických sloučenin po kultivaci s bakterií v enkapsulovaném stavu s přidavkem NaCl.



Obrázek 18: Výsledné koncentrace naměřených fenolických sloučenin po kultivaci s bakterií v enkapsulovaném stavu bez přidavku NaCl.

Kultivační experimenty s enkapsulovanou *H. neptunia* ukázaly slibné výsledky – enkapsulace v alginátovém hydrogelu významně zvýšila efektivitu přeměny FA na VA. Po 72 hodinách inkubace v prvním cyklu dosáhla koncentrace VA hodnoty 370 mg/L, což odpovídá konverznímu poměru 85,5 mol. %. Ve druhém kultivačním cyklu byla účinnost procesu ještě vyšší – po 72 hodinách bylo dosaženo koncentrace VA 460 mg/L, což odpovídá prakticky úplné konverzi FA na VA. Tento výrazný rozdíl ve výtěžnosti mezi prvním a druhým cyklem lze přičíst adaptaci *H. neptunia* na přítomnost FA a aktivaci příslušných metabolických drah.

Získané výsledky jednoznačně prokazují, že enkapsulace *H. neptunia* do alginátové matrice významně zvyšuje efektivitu biotransformace FA. Navíc tento proces může být provozován v semi-kontinuálním cyklickém režimu a potenciálně i ve zcela kontinuálním toku s vysokou účinností. Halofilní charakter použitého mikroorganismu a vysoká koncentrace NaCl navíc poskytují účinnou ochranu proti kontaminaci běžnou mezofilní mikroflórou.

3.4.2.4 Využití odpadních pšeničných otrub jako zdroje FA

Pšeničné otruby (popsané v Kap. 3.2) po hydrolytickém procesu obsahují nejen zkvasitelné monosacharidy sloužící jako zdroj uhlíku k produkci PHA, ale i FA. Ta se váže esterovou vazbou k arabinózovým zbytkům v řetězci hemicelulózy a přes své fenolické jádro se může kovalentně vázat na lignin [44]. FA byla z materiálu izolována alkalickou hydrolyzou za použití hydroxidu sodného [83], čímž byl získán kapalný hydrolyzát s obsahem FA o koncentraci 640 ± 20 mg/L. Tento hydrolyzát byl následně využit jako kultivační médium pro bakterii *H. neptunia* v optimalizovaných podmínkách. Kultivace byla realizována ve dvou variantách: přímo na získaném hydrolyzátu, a na hydrolyzátu obohaceném o složky komplexního média.

Tabulka 15: Výsledné koncentrace vznikajících sensoricky aktivních sloučenin z kultivace na neupraveném hydrolyzátu z pšeničných otrub.

	čas [hod]			
	0	48	72	144
Ferulová kyselina [mg/L]	640 ± 20	$9,7 \pm 0,2$	$9,5 \pm 0,5$	$6,9 \pm 0,2$
Vanilová kyselina [mg/L]	n. d.	$2,8 \pm 0,2$	$3,4 \pm 0,4$	$2,8 \pm 0,1$
Vanilin [mg/L]	n. d.	$4,9 \pm 0,1$	$4,4 \pm 0,8$	$5,5 \pm 0,5$
4-vinylguaiakol [mg/L]	n. d.	n. d.	160 ± 20	n. d.

Tabulka 16: Výsledné koncentrace vznikajících sensoricky aktivních sloučenin z kultivace na hydrolyzátu z pšeničných otrub doplněném o složky komplexního média.

	čas [hod]			
	0	48	72	144
Ferulová kyselina [mg/L]	640 ±20	200 ±16	n. d.	4 ±1
Vanilová kyselina [mg/L]	n. d.	n. d.	92 ±1	n. d.
Vanilin [mg/L]	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
4-vinylguaiaiol [mg/L]	n. d.	160 ±20	170 ±30	150 ±10

Z kultivace na hydrolyzátu, který nebyl obohacený o složky komplexního média (viz Tab. 15) byl získán po 72 hodinách nejvyšší molární výtěžek 4-VG – 33 mol. %. Detekovány byly i další fenolické sloučeniny (VA, VAN), ale pouze v minoritních množstvích. Bakterie velmi rychle zpracovala téměř veškerou FA, ale pravděpodobně ji z velké části využila spíše ke svým metabolickým a energetickým pochodům než k biotransformaci na ostatní fenolické sloučeniny.

U kultivačního experimentu se získaným hydrolyzátem doplněným o složky komplexního média byla získána ve vyšších koncentracích i VA. Bakteriální kmen evidentně využil přidané složky média ke svým metabolickým a energetickým pochodům, a byl tak schopný přeměnit FA i na jiné metabolity.

Na základě získaných výsledků lze potvrdit možnou metabolickou dráhu přeměny ferulové kyseliny. V počáteční fázi biotransformace vzniká převážně 4VG, což naznačuje, že probíhá dekarboxylace, která je pravděpodobně rychlejší než tvorba VA. Další teoretický krok zahrnuje přeměnu 4VG na VAN, který následně může podléhat oxidační nebo redukční reakci, čímž vznikají další produkty. Redukcí se tvoří VOH, zatímco oxidací se získává klíčový produkt tohoto experimentu – VA.

Navržená metabolická dráha se shoduje s experimentálními výsledky. Při kratších časových intervalech a vyšších počátečních koncentracích FA převažuje 4VG nad VA. Naopak delší reakční doby a nižší koncentrace FA podporují tvorbu vyšších koncentrací VA.

4 ZÁVĚR

Dizertační práce detailně zkoumá možnosti optimalizace biotechnologických procesů pro využití lignocelulózových odpadů, konkrétně pšeničných otrub a pivovarského mláta, s cílem produkce látek s vysokou přidanou hodnotou, jako jsou polyhydroxyalkanoáty (PHA) a fenolické látky (vanilová kyselina, vanilylalcohol, vanilin a 4-vinylguaiakol).

Z hlavních poznatků vyplývá několik důležitých závěrů. Předně se ukázalo, že nejefektivnější metodou předúpravy lignocelulózových materiálů je neutrální hydrolýza následovaná enzymatickou hydrolýzou. Tento postup umožňuje dosáhnout optimální koncentrace fermentovatelných cukrů a zároveň snižuje množství fenolických inhibitorů, což výrazně zlepšuje efektivitu následných fermentačních procesů.

Dalším významným zjištěním je produkce polyhydroxyalkanoátů (konkrétně P3HB), zejména za použití halofilních kmenů *Halomonas halophila* a *Halomonas organivorans*. Při kultivaci na hydrolyzátech získaných výše uvedeným postupem bylo dosaženo obsahu P3HB téměř 70 hm. % suché hmotnosti biomasy. Kombinace neutrální a enzymatické hydrolýzy se tak ukázala jako klíčová nejen pro podporu růstu mikroorganismů, ale i pro dosažení ekologičtějšího a ekonomičtějšího procesu díky nižšímu obsahu mikrobiálních inhibitorů a snazšímu zpracování materiálu.

Důležité výsledky byly také zjištěny v experimentální části zabývající se biotransformací ferulové kyseliny. Termofilní bakterie *Caldimonas thermodepolymerans* DSM 15344 a halofilní kmen *Halomonas neptunia* CCM 7107 prokázaly schopnost přeměňovat ferulovou kyselinu na sensoricky aktivní látky. *Caldimonas thermodepolymerans* prokázala velký potenciál pro biotechnologickou přeměnu kyseliny ferulové na hodnotné látky, jako je vanilová kyselina a vanilylalcohol, přičemž směr a výtěžnost této přeměny lze řídit úpravou koncentrace FA a dobou trvání kultivace. Díky identifikaci klíčových genů a možnosti opakovaného dávkování substrátu (repeated-batch) se *C. thermodepolymerans* jeví jako slibný kandidát pro průmyslovou výrobu fenolických sloučenin.

Halomonas neptunia také potvrdila svůj biotechnologický potenciál, zejména díky schopnosti efektivně biotransformovat ferulovou kyselinu na cenné fenolické sloučeniny, jako je vanilová kyselina a 4-vinylguajakol. Optimalizací kultivačních podmínek a využitím enkapsulovaných buněk bylo dosaženo vysoké výtěžnosti a stability procesu, což podporuje uplatnění této bakterie v udržitelných výrobních postupech zaměřených na valorizaci odpadních lignocelulózových materiálů. Tento postup byl patentován pod názvem „Způsob výroby metabolitů kyseliny ferulové s využitím halofilního bakteriálního kmene *Halomonas neptunia* CCM 7107“ (CZ 2023330 A3).

5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Plastový odpad a jeho recyklace v EU (infografika), 2018. Online. Témata Evropský parlament. 19. 12. 2018. Available at: <https://www.europarl.europa.eu/topics/cs/article/20181212STO21610/plastovy-odpad-a-jeho-recyklace-v-eu-infografika>.
- [2] TISEO, Ian. Global waste generation - statistics & facts. In: Statista [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-04-12]. Dostupné z: https://www.statista.com/topics/4983/waste-generation-worldwide/#topicHeader__wrapper
- [3] What a Waste 2.0: A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050. Urban Development, 2018. Online. In: KAZA, Silpa; YAO, Lisa C.; BHADA-TATA, Perinaz and VAN WOERDEN, Frank. © Washington, DC: World Bank.. Available at: <https://hdl.handle.net/10986/30317>.
- [4] LU, Qian, Yue ZHAO, Xintong GAO, Junqiu WU, Haixuan ZHOU, Pengfei TANG, Qingbin WEI a Zimin WEI. Effect of tricarboxylic acid cycle regulator on carbon retention and organic component transformation during food waste composting. *Bioresource Technology*. 2018, 256, 128-136. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2018.01.142
- [5] OKOLIE, Jude, Sonil NANDA, Ajay DALAI a Janusz KOZINSKI. Chemistry and Specialty Industrial Applications of Lignocellulosic Biomass. *Waste and Biomass Valorization*. 2021, 12(5), 2145-2169. ISSN 1877-2641. Dostupné z: doi:10.1007/s12649-020-01123-0
- [6] ZHAO, Lei, Zhong-Fang SUN, Cheng-Cheng ZHANG, Jun NAN, Nan-Qi REN, Duu-Jong LEE a Chuan CHEN. Advances in pretreatment of lignocellulosic biomass for bioenergy production: Challenges and perspectives. *Bioresource Technology*. 2022, 343. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2021.126123
- [7] SABAPATHY, Poorna Chandrika, Sabarinathan DEVARAJ, Katharina MEIXNER, Parthiban ANBURAJAN, Preethi KATHIRVEL, Yuvaraj RAVIKUMAR, Hossain M. ZABED a Xianghui QI. Recent developments in Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production – A review. *Bioresource Technology*. 2020, 306. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2020.123132
- [8] MARTÍNKOVÁ, Ludmila; GRULICH, Michal; PÁTEK, Miroslav; KŘÍSTKOVÁ, Barbora and WINKLER, Margit, 2023. Bio-Based Valorization of Lignin-Derived Phenolic Compounds: A Review. Online. *Biomolecules*. Roč. 13, č. 5. ISSN 2218-273X. Available at: <https://doi.org/10.3390/biom13050717>.
- [9] BHATIA, Tanya; MISHRA, Ms. Jahanvi and KALRA, Dr. Aakanksha, 2024. FUTURISTIC TRENDS OF EXTREMOPHILIC BACTERIA IN INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY. Online. *Futuristic Trends in Biotechnology Volume 3 Book 9*. 2024-03-06, pp. 89-115. ISBN 9789362525253. Available at: <https://doi.org/10.58532/V3BBBT9P1CH8>.
- [10] UFODIKE, Chukwuzubelu, Vincent EZE, Mohammad AHMED, Abiodun OLUWALOWO, Jin PARK, Zhiyong LIANG a Hui WANG. Investigation of molecular and supramolecular assemblies of cellulose and lignin of lignocellulosic materials by spectroscopy and thermal analysis. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020, 146, 916-921. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.09.214
- [11] HARINDINTWALI, Jean, Jianli ZHOU a Xiaobin YU. Lignocellulosic crop residue composting by cellulolytic nitrogen-fixing bacteria: A novel tool for environmental sustainability. *Science of The Total Environment*. 2020, 715. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2020.136912
- [12] KIM OANH, Nguyen, Didin PERMADI, Philip HOPKE, Kirk SMITH, Nguyen DONG a Anh DANG. Annual emissions of air toxics emitted from crop residue open burning in Southeast Asia over the period of 2010–2015. *Atmospheric Environment*. 2018, 187, 163-173. ISSN 13522310. Dostupné z: doi:10.1016/j.atmosenv.2018.05.061
- [13] QASEEM, Mirza, Humaira SHAHEEN a Ai-Min WU. Cell wall hemicellulose for sustainable industrial utilization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2021, 144. ISSN 13640321. Dostupné z: doi:10.1016/j.rser.2021.110996

- [14] USMANI, Zeba, Minaxi SHARMA, Pratishtha GUPTA, Yevgen KARPICHEV, Nicholas GATHERGOOD, Rajeev BHAT a Vijai GUPTA. Ionic liquid based pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced bioconversion. *Bioresource Technology*. 2020, 304. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2020.123003
- [15] CHEN, Hongyan, Jinbao LIU, Xing CHANG, Daming CHEN, Yuan XUE, Ping LIU, Hualin LIN a Sheng HAN. A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. *Fuel Processing Technology*. 2017, 160, 196-206. ISSN 03783820. Dostupné z: doi:10.1016/j.fuproc.2016.12.007
- [16] KUMAR, Parveen, Diane BARRETT, Michael DELWICHE a Pieter STROEVE. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. 2009, 48(8), 3713-3729. ISSN 0888-5885. Dostupné z: doi:10.1021/ie801542g
- [17] KIM, Youngmi, Eduardo XIMENES, Nathan MOSIER a Michael LADISCH. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. *Enzyme and Microbial Technology*. 2011a, 48(4-5), 408-415. ISSN 01410229. Dostupné z: doi:10.1016/j.enzmitec.2011.01.007
- [18] JÖNSSON, Leif a Carlos MARTÍN. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*. 2016, 199, 103-112. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2015.10.009
- [19] CHEN, Hongzhang. *Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice*. 1. Dordrecht: Springer, 2014b. ISBN 978-94-007-6897-0.
- [20] SJULANDER, Nikki a Timo KIKAS. Origin, Impact and Control of Lignocellulosic Inhibitors in Bioethanol Production—A Review. *Energies*. 2020, 13(18). ISSN 1996-1073. Dostupné z: doi:10.3390/en13184751
- [21] PALMQVIST, Eva a Bärbel HAHN-HÄGERDAL. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*. 2000, 74(1), 25-33. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/S0960-8524(99)00161-3
- [22] CHEN, Guo-Qiang a Xiao-Ran JIANG. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. 2018, 50, 94-100. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2017.11.016
- [23] TAN, Dan, Qiong WU, Jin-Chun CHEN a Guo-Qiang CHEN. Engineering *Halomonas* TD01 for the low-cost production of polyhydroxyalkanoates. *Metabolic Engineering*. 2014a, 26, 34-47. ISSN 10967176. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymben.2014.09.001
- [24] ANDLER, Rodrigo, Robin VIVOD a Alexander STEINBÜCHEL. Synthesis of polyhydroxyalkanoates through the biodegradation of poly(cis-1,4-isoprene) rubber. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2019, 127(3), 360-365. ISSN 13891723. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiosc.2018.08.015
- [25] LINGER, Jeffrey, Derek VARDON, Michael GUARNIERI et al. Lignin valorization through integrated biological funneling and chemical catalysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014, 111(33), 12013-12018. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1410657111
- [26] RIEDEL, Sebastian, Stefan JAHNS, Steven KOENIG, Martina BOCK, Christopher BRIGHAM, Johannes BADER a Ulf STAHL. Polyhydroxyalkanoates production with *Ralstonia eutropha* from low quality waste animal fats. *Journal of Biotechnology*. 2015, 214, 119-127. ISSN 01681656. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiotec.2015.09.002
- [27] WARD, Patrick, Guy DE ROO a Kevin O'CONNOR. Accumulation of Polyhydroxyalkanoate from Styrene and Phenylacetic Acid by *Pseudomonas putida* CA-3. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, 71(4), 2046-2052. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.71.4.2046-2052.2005
- [28] HEINRICH, Daniel, Matthias RABERG, Philipp FRICKE et al. Synthesis Gas (Syngas)-Derived Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate Synthesis in Engineered *Rhodospirillum rubrum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2016, 82(20), 6132-6140. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.01744-16

- [29] KIM, Hee, Young OH, Young-Ah JANG et al. Recombinant *Ralstonia eutropha* engineered to utilize xylose and its use for the production of poly(3-hydroxybutyrate) from sunflower stalk hydrolysate solution. *Microbial Cell Factories*. 2016b, 15(1). ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/s12934-016-0495-6
- [30] OBULISAMY, Parthiba a Sanjeet MEHARIYA. Polyhydroxyalkanoates from extremophiles: A review. *Bioresource Technology*. 2021, 325. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2020.124653
- [31] POLI, Annarita, Paola DI DONATO, Gennaro ABBAMONDI a Barbara NICOLAUS. Synthesis, Production, and Biotechnological Applications of Exopolysaccharides and Polyhydroxyalkanoates by *Archaea*. *Archaea*. 2011, 2011, 1-13. ISSN 1472-3646. Dostupné z: doi:10.1155/2011/693253
- [32] RAMPELOTTO, Pabulo. Extremophiles and Extreme Environments. *Life*. 2013, 3(3), 482-485. ISSN 2075-1729. Dostupné z: doi:10.3390/life3030482
- [33] MITRA, Ruchira, Tong XU, Hua XIANG a Jing HAN. Current developments on polyhydroxyalkanoates synthesis by using halophiles as a promising cell factory. *Microbial Cell Factories*. 2020, 19(1). ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/s12934-020-01342-z
- [34] TAN, Dan, Yuan-Sheng XUE, Gulsimay AIBAI DULA a Guo-Qiang CHEN. Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrate by *Halomonas* TD01. *Bioresource Technology*. 2011, 102(17), 8130-8136. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2011.05.068
- [35] MAHANSARIA, Riddhi, Anusua DHARA, Amit SAHA, Saubhik HALDAR a Joydeep MUKHERJEE. Production enhancement and characterization of the polyhydroxyalkanoate produced by *Natrinema ajinwuenensis* (as synonym) $\equiv$ *Natrinema altunense* strain RM-G10. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, 107, 1480-1490. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.10.009
- [36] OBRUČA, Stanislav, Pavel DVOŘÁK, Petr SEDLÁČEK, Martin KOLLER, Karel SEDLÁŘ, Iva PERNICOVÁ a David ŠAFRÁNEK. Polyhydroxyalkanoates synthesis by halophiles and thermophiles: towards sustainable production of microbial bioplastics. *Biotechnology Advances*. 2022. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2022.107906
- [37] LIU, Yong, Shaobin HUANG, Yongqing ZHANG a Fuqian XU. Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus shackletonii* K5 from a biotrickling filter for the production of polyhydroxybutyrate. *Journal of Environmental Sciences*. 2014, 26(7), 1453-1462. ISSN 10010742. Dostupné z: doi:10.1016/j.jes.2014.05.011
- [38] SHEU, D.-S., W.-M. CHEN, Y.-W. LAI a R.-C. CHANG. Mutations Derived from the Thermophilic Polyhydroxyalkanoate Synthase PhaC Enhance the Thermostability and Activity of PhaC from *Cupriavidus necator* H16. *Journal of Bacteriology*. 2012, 194(10), 2620-2629. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.06543-11
- [39] PIEJA, Allison, Katherine ROSTKOWSKI a Craig CRIDDLE. Distribution and Selection of Poly-3-Hydroxybutyrate Production Capacity in Methanotrophic Proteobacteria. *Microbial Ecology*. 2011, 62(3), 564-573. ISSN 0095-3628. Dostupné z: doi:10.1007/s00248-011-9873-0
- [40] ELBANNA, Khaled, Tina LÜTKE-EVERSLOH, Stefanie VAN TRAPPEN, Joris MERGAERT, Jean SWINGS a Alexander STEINBÜCHEL. *Schlegelella thermodepolymerans* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic bacterium that degrades poly(3-hydroxybutyrate-co-3-mercaptopropionate). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003, 53(4), 1165-1168. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.02562-0
- [41] KOURILOVA, Xenie, Ivana NOVACKOVA, Martin KOLLER a Stanislav OBRUČA. Evaluation of mesophilic *Burkholderia sacchari*, thermophilic *Schlegelella thermodepolymerans* and halophilic *Halomonas halophila* for polyhydroxyalkanoates production on model media mimicking lignocellulose hydrolysates. *Bioresource Technology*. 2021, 325. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2021.124704
- [42] LIN, Derong; XIAO, Mengshi; ZHAO, Jingjing; LI, Zhuohao; XING, Baoshan et al., 2016. An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2

- Diabetes. Online. *Molecules*. Roč. 21, č. 10. ISSN 1420-3049. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules21101374>
- [43] MORRIS, Phillip; DALTON, Sue; LANGDON, Tim; HAUCK, Barbara and DE BUANAFINA, Marcia M. O., 2017. Expression of a fungal ferulic acid esterase in suspension cultures of tall fescue (*Festuca arundinacea*) decreases cell wall feruloylation and increases rates of cell wall digestion. Online. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. Roč. 129, č. 2, pp. 181-193. ISSN 0167-6857. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1168-9>.
- [44] DE OLIVEIRA, Dyoni Matias, Aline FINGER-TEIXEIRA, Thatiane RODRIGUES MOTA et al. Ferulic acid: a key component in grass lignocellulose recalcitrance to hydrolysis. *Plant Biotechnology Journal*. 2015, 13(9), 1224-1232. ISSN 14677644. Dostupné z: doi:10.1111/pbi.12292
- [45] KUMAR, Naresh a Vikas PRUTHI. Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports*. 2014, 4, 86-93. ISSN 2215017X. Dostupné z: doi:10.1016/j.btre.2014.09.002
- [46] MCAULEY, Katherine E., Allan SVENDSEN, Shamkant A. PATKAR a Keith S. WILSON. Structure of a feruloyl esterase from *Aspergillus niger*. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*. 2004, 60(5), 878-887. ISSN 0907-4449. Dostupné z: doi:10.1107/S0907444904004937
- [47] TINIKUL, Ruchanok, Pirom CHENPRAKHON, Somchart MAENPUEN a Pimchai CHAIYEN. Biotransformation of Plant-Derived Phenolic Acids. *Biotechnology Journal*. ISSN 18606768. Dostupné z: doi:10.1002/biot.201700632
- [48] GALLAGE, Nethaji J. a Birger Lindberg MøLLER. Vanillin–Bioconversion and Bioengineering of the Most Popular Plant Flavor and Its De Novo Biosynthesis in the Vanilla Orchid. *Molecular Plant*. 2015, 8(1), 40-57. ISSN 16742052. Dostupné z: doi:10.1016/j.molp.2014.11.008
- [49] Vanillin, natural and on trend. In: Medium [online]. 2019 [cit. 2022-04-26]. Dostupné z: <https://medium.com/@SolvayGroup/vanillin-natural-and-on-trend-10bea3b1a440>
- [50] PRIEFERT, H., J. RABENHORST a A. STEINBÜCHEL. Biotechnological production of vanillin. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001, 56(3-4), 296-314. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s002530100687
- [51] MATHEW, Sindhu a T. Emilia ABRAHAM. Bioconversions of Ferulic Acid, an Hydroxycinnamic Acid. *Critical Reviews in Microbiology*. 2008, 32(3), 115-125. ISSN 1040-841X. Dostupné z: doi:10.1080/10408410600709628
- [52] PAESANI, Candela; LAMMERS, Tamy C.G.L.; SCARINI, Lorena S.; MOIRAGHI, Malena; PÉREZ, Gabriela T. et al., 2024. Effect of chemical, thermal, and enzymatic processing of wheat bran on the solubilization, technological and biological properties of non-starch polysaccharides. Online. *Carbohydrate Polymers*. Roč. 328. ISSN 01448617. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121747>
- [53] SHAKEEL, Usama; ZHANG, Yu; TOPAKAS, Evangelos; WANG, Wen; LIANG, Cuiyi et al., 2024. Unraveling interplay between lignocellulosic structures caused by chemical pretreatments in enhancing enzymatic hydrolysis. Online. *Carbohydrate Polymers*. Roč. 334. ISSN 01448617. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.122037>.
- [54] PHAM, Van Toi; GUAN, Chung-Yu; HAN, Po-Chun; MATSAGAR, Babasaheb M.; WU, Kevin C. W. et al., 2023. Acid-catalyzed hydrothermal treatment of sewage sludge: effects of reaction temperature and acid concentration on the production of hydrolysis by-products. Online. *Biomass Conversion and Biorefinery*. Roč. 13, č. 9, pp. 7533-7546. ISSN 2190-6815. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01495-w>.
- [55] MERALI, Zara; COLLINS, Samuel R A; ELLISTON, Adam; WILSON, David R; KÄSPER, Andres et al., 2015. Characterization of cell wall components of wheat bran following hydrothermal pretreatment and fractionation. Online. *Biotechnology for Biofuels*. Roč. 8, č. 1. ISSN 1754-6834. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0207-1>.

- [56] SKŘIVAN, Pavel; SLUKOVÁ, Marcela; STÝBLOVÁ, Barbora; TRUSOVÁ, Šárka; SINICA, Andrej et al., 2024. Utilization of the Nutritional Potential of Wheat Bran Using Different Fractionation Techniques. Online. Applied Sciences. Roč. 14, č. 16. ISSN 2076-3417. Available at: <https://doi.org/10.3390/app14167222>.
- [57] BLASI, Alessandro; VERARDI, Alessandra; LOPRESTO, Catia Giovanna; SICILIANO, Sarah and SANGIORGIO, Paola, 2023. Lignocellulosic Agricultural Waste Valorization to Obtain Valuable Products: An Overview. Online. Recycling. Roč. 8, č. 4. ISSN 2313-4321. Available at: <https://doi.org/10.3390/recycling8040061>
- [58] VAN-THUOC, D.; QUILLAGUAMÁN, J.; MAMO, G. and MATTIASSON, B., 2007. Utilization of agricultural residues for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1. Online. Journal of Applied Microbiology. 2007-09-21, p. 071003000434003-??? ISSN 1364-5072. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03553.x>.
- [59] MUSILOVA, Jana; KOURILOVA, Xenie; HERMANKOVA, Kristyna; BEZDICEK, Matej; IEREMENKO, Anastasiia et al., 2023. Genomic and phenotypic comparison of polyhydroxyalkanoates producing strains of genus *Caldimonas*/Schlegelella. Online. Computational and Structural Biotechnology Journal. Roč. 21, pp. 5372-5381. ISSN 20010370. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2023.10.051>
- [60] KOURILOVA, Xenie; PERNICOVA, Iva; VIDLAKOVA, Michaela; KREJCIRIK, Roman; MRAZOVA, Katerina et al., 2021. Biotechnological Conversion of Grape Pomace to Poly(3-hydroxybutyrate) by Moderately Thermophilic Bacterium *Tepidimonas taiwanensis*. Online. Bioengineering. Roč. 8, č. 10. ISSN 2306-5354. Available at: <https://doi.org/10.3390/bioengineering8100141>.
- [61] GETINO, Luis; MARTÍN, José Luis and CHAMIZO-AMPUDIA, Alejandro, 2024. A Review of Polyhydroxyalkanoates: Characterization, Production, and Application from Waste. Online. Microorganisms. Roč. 12, č. 10. ISSN 2076-2607. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms12102028>.
- [62] OLIVEIRA-FILHO, Edmar Ramos; GOMEZ, José Gregório Cabrera; TACIRO, Marilda Keico and SILVA, Luiziana Ferreira, 2021. *Burkholderia sacchari* (synonym *Paraburkholderia sacchari*): An industrial and versatile bacterial chassis for sustainable biosynthesis of polyhydroxyalkanoates and other bioproducts. Online. Bioresource Technology. Roč. 337. ISSN 09608524. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125472>.
- [63] Ventosa, A., Oren, A., & Ma, Y. (Eds.). (2011). *Halophiles and Hypersaline Environments*. doi:10.1007/978-3-642-20198-1
- [64] MUSSATTO, S.I.; DRAGONE, G. and ROBERTO, I.C., 2006. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. Online. Journal of Cereal Science. Roč. 43, č. 1, pp. 1-14. ISSN 07335210. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.06.001>.
- [65] TSOUKO, Erminta; PILAFIDIS, Sotirios; DIMOPOULOU, Maria; KOURMENTZA, Konstantina and SARRIS, Dimitris, 2023. Bioconversion of underutilized brewing by-products into bacterial cellulose by a newly isolated *Komagataeibacter rhaeticus* strain: A preliminary evaluation of the bioprocess environmental impact. Online. Bioresource Technology. Roč. 387. ISSN 09608524. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129667>
- [66] PELTER, Michael W. and MCQUADE, Jennifer, 2005. Brewing Science in the Chemistry Laboratory: A "Mashing" Investigation of Starch and Carbohydrates. Online. Journal of Chemical Education. Roč. 82, č. 12. ISSN 0021-9584. Available at: <https://doi.org/10.1021/ed082p1811>
- [67] ZAINURIN ZUBAIDAH and LATIFFAH KARIM, 2024. Production of Vanillin from Pineapple Peels Using Alkaline Hydrolysis and Microbial Fermentation. Online. 2024-04-01, roč. 10, č. 1, pp. 58-68. ISSN 2601-0003. Available at: <https://doi.org/10.33102/mjosht.v10i1.361>.
- [68] Kanehisa, M., & Goto, S. (2024). *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344. KEGG. Retrieved from <https://www.kegg.jp/entry/sthm>

- [69] MUSILOVA, Jana; KOURILOVA, Xenie; BEZDICEK, Matej; LENGEROVA, Martina; OBRUCA, Stanislav et al., 2021. First Complete Genome of the Thermophilic Polyhydroxyalkanoates-Producing Bacterium *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344. Online. *Genome Biology and Evolution*. 2021-04-01, roč. 13, č. 4. ISSN 1759-6653. Available at: <https://doi.org/10.1093/gbe/evab007>.
- [70] HRABALOVÁ, Vendula; OPIAL, Tomáš; MUSILOVÁ, Jana; SEDLÁŘ, Karel and OBRUČA, Stanislav, 2024. Biotransformation of ferulic acid into vanillyl alcohol and vanillic acid employing thermophilic bacterium *Caldimonas thermodepolymerans*. Online. *Enzyme and Microbial Technology*. Roč. 179. ISSN 01410229. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2024.110475>.
- [71] TOPAKAS, E.; KALOGERIS, E.; KEKOS, D.; MACRIS, B.J. and CHRISTAKOPOULOS, P., 2003. Bioconversion of ferulic acid into vanillic acid by the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. Online. *LWT - Food Science and Technology*. Roč. 36, č. 6, pp. 561-565. ISSN 00236438. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(03\)00060-4](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(03)00060-4).
- [72] WITTHUHN, R. Corli; VAN DER MERWE, Enette; VENTER, Pierre and CAMERON, Michelle, 2012. Guaiacol production from ferulic acid, vanillin and vanillic acid by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Online. *International Journal of Food Microbiology*. Roč. 157, č. 1, pp. 113-117. ISSN 01681605. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.022>.
- [73] QU, Liang; REN, Lu-Jing; SUN, Guan-Nan; JI, Xiao-Jun; NIE, Zhi-Kui et al., 2013. Batch, fed-batch and repeated fed-batch fermentation processes of the marine thraustochytrid *Schizochytrium* sp. for producing docosahexaenoic acid. Online. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. Roč. 36, č. 12, pp. 1905-1912. ISSN 1615-7591. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00449-013-0966-7>.
- [74] ORHAN, Furkan and CEYRAN, Ertuğrul, 2024. Valorisation of cheese whey for ectoine production by *Halomonas neptunia*. Online. *International Journal of Dairy Technology*. Roč. 77, č. 1, pp. 146-155. ISSN 1364-727X. Available at: <https://doi.org/10.1111/1471-0307.13008>.
- [75] PERNICOVA, Iva; KUCERA, Dan; NEBESAROVA, Jana; KALINA, Michal; NOVACKOVA, Ivana et al., 2019. Production of polyhydroxyalkanoates on waste frying oil employing selected *Halomonas* strains. Online. *Bioresource Technology*. Roč. 292. ISSN 09608524. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122028>.
- [76] ABDELKAFI, Slim; SAYADI, Sami; ALI GAM, Zouhaier Ben; CASALOT, Laurence and LABAT, Marc, 2006. Bioconversion of ferulic acid to vanillic acid by *Halomonas elongata* isolated from table-olive fermentation. Online. *FEMS Microbiology Letters*. Roč. 262, č. 1, pp. 115-120. ISSN 03781097. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00381.x>.
- [77] VYRIDES, Ioannis; AGATHANGELOU, Maria; DIMITRIOU, Rodothea; SOUROULLAS, Konstantinos; SALAMEX, Anastasia et al., 2015. Novel *Halomonas* sp. B15 isolated from Larnaca Salt Lake in Cyprus that generates vanillin and vanillic acid from ferulic acid. Online. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Roč. 31, č. 8, pp. 1291-1296. ISSN 0959-3993.
- [78] XU, Lingxia; LIAQAT, Fakhra; SUN, Jianzhong; KHAZI, Mahammed Ilyas; XIE, Rongrong et al., 2024. Advances in the vanillin synthesis and biotransformation: A review. Online. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Roč. 189. ISSN 13640321. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2023.113905>.
- [79] DUTTA, Bhramar and BANDOPADHYAY, Rajib, 2022. Biotechnological potentials of halophilic microorganisms and their impact on mankind. Online. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. Roč. 11, č. 1. ISSN 2314-8543. Available at: <https://doi.org/10.1186/s43088-022-00252-w>.
- [80] ORHAN, Furkan and CEYRAN, Ertuğrul, 2024. Valorisation of cheese whey for ectoine production by *Halomonas neptunia*. Online. *International Journal of Dairy Technology*. Roč. 77, č. 1, pp. 146-155. ISSN 1364-727X. Available at: <https://doi.org/10.1111/1471-0307.13008>.
- [81] VINCEKOVIĆ, Marko; ŽIVKOVIĆ, Lana; TURKEYEVA, Elmira; MUTALIYEVA, Botagoz; MADYBEKOVA, Galiya et al., 2024. Development of Alginate Composite Microparticles for Encapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Online. *Gels*. Roč. 10, č. 11. ISSN 2310-2861. Available at: <https://doi.org/10.3390/gels10110752>.
- [82] KUCHARZYK, Katarzyna H.; FULWIDER, Veronica M.; DUONG, Anthony; DUFFY, Mark; CAFMEYER, Jeff et al., 2023. Assessment of Long-Term Stability of Encapsulated Agricultural Biologicals

in Lipid-Coated Alginate Beads. Online. 2023-05-15, roč. 3, č. 5, pp. 389-398. ISSN 2692-1952. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsagscitech.2c00273>.

- [83] NÁBĚLEK, Jakub. Vývoj a validace postupu pro izolaci kyseliny ferulové z pšeničných otrub [online]. Brno, 2020 [cit. 2022-04-28]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/195123>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Jaromír Pořízka.

6 ŽIVOTOPIS A PUBLIKAČNÍ ČINNOST

Životopis

Osobní údaje

Jméno a příjmení: **Ing. Vendula Hrabalová**
Datum a místo narození: 9. 9. 1995, Boskovice
Adresa trvalého bydliště: Nachová 2242/8, Brno Řečkovice a Mokrá Hora, 621 00
Telefonní číslo: +420 606 139 710

Vzdělání

2020–nyní **Doktorské studium, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická**
Ústav: Chemie potravin a biotechnologií
Obor: Biofyzikální chemie

2018–2020 **Magisterské studium, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická**
Ústav: Fyzikální a spotřební chemie
Obor: Chemie pro medicínské aplikace
Diplomová práce: Charakterizace vybraných bakteriálních kmenů získaných během evolučních experimentů

2015–2018 **Bakalářské studium, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická**
Ústav: Fyzikální a spotřební chemie
Obor: Chemie pro medicínské aplikace
Bakalářská práce: Vliv schopnosti akumulace PHA na odolnost bakterií vůči bakteriocidním léčivům

2011–2015 **Gymnázium Boskovice**
Obor: Všeobecné gymnázium

Pracovní zkušenosti

Červenec 2023 – nyní **Delong Instruments a. s.:** Aplikační specialista

Říjen 2020 – Prosinec 2024 **Centrum materiálového výzkumu, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická**
Vědecký pracovník, laboratoř biotechnologie

Září – Listopad 2022 **Poznan University of Life Sciences, Department of Biotechnology and Food Microbiology**
Zahraniční stáž, práce s bioreaktory, HPLC, GC

Říjen 2019 – Březen 2020 **Ústav analytické chemie, Akademie věd České republiky:**
Praxe a brigáda na oddělení elektromigračních metod.

Listopad – Prosinec 2019 **Centrum materiálového výzkumu, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická:** Práce na projektu: Řízená evoluce bakterií produkujících polyhydroxyalkanoáty.

Červenec 2017 **Nemocnice Boskovice s. r. o.**
Praxe v laboratořích klinické biochemie a hematologie, a na mikrobiologickém oddělení.

Certifikovaná školení

Studium pedagogických věd – Učitelství odborných předmětů pro střední školy (2023)

Publikační činnost

Recenzované publikace v časopisech:

HRABALOVÁ, Vendula; ČERNAYOVÁ, Diana; NÁBĚLEK, Jakub; MATĚJKA, Filip; POŘÍZKA, Jaromír et al., 2025. Biotransformation of ferulic acid into valuable products employing halophilic bacterium *Halomonas neptunia*. Online. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. Roč. 66. ISSN 18788181. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2025.103586>.

HRABALOVÁ, V.; OPIAL, T.; MUSILOVÁ, J.; SEDLÁŘ, K.; OBRUČA, S. Biotransformation of ferulic acid into vanillyl alcohol and vanillic acid employing thermophilic bacterium *Caldimonas thermodepolymerans*. ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, 2024, roč. 179, č. 9, s. 1-6. ISSN: 0141-0229.

NOVACKOVA, Ivana, **Vendula HRABALOVA**, Eva SLANINOVA, et al., 2022. The role of polyhydroxyalkanoates in adaptation of *Cupriavidus necator* to osmotic pressure and high concentration of copper ions. International Journal of Biological Macromolecules. 206, 977-989. ISSN 01418130. Dostupné z: [doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.03.102](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.102)

Publikace v časopisech:

DIVIŠ, P.; POŘÍZKA, J.; NÁBĚLEK, J.; **HRABALOVÁ, V.**; SLAVÍKOVÁ, Z. COMPARISON OF SACCHARIFICATION METHODS FOR BIOTECHNOLOGICAL UTILIZATION OF WHEAT BRAN. Agriculture & Food, 2023, č. 11, s. 96-102. ISSN: 1314-8591.

Patent:

OBRUČA, S.; POŘÍZKA, J.; DIVIŠ, P.; **HRABALOVÁ, V.**; CHOTAŠ, J. et al. (Česká Republika). Způsob výroby metabolitů kyseliny ferulové s využitím halofilního bakteriálního kmene *Halomonas neptunia* CCM 7107. Přihl.: 30.08.2023. Uděl.: 12.03.2025. CZ 2023330 A3.

Ověřená technologie:

OBRUČA, S.; POŘÍZKA, J.; DIVIŠ, P.; **HRABALOVÁ, V.**; VYMĚTALOVÁ, M.: Produkce polyhydroxyalkanoátů z otrub; Ověřená technologie pro produkci polyhydroxyalkanoátů z otrub. Technolgie má v plánu realizovat společnost Mlýny J. Voženílek spol. s r.o.. (ověřená technologie)

Konferenční příspěvky:

HRABALOVÁ, V.; KOUŘILOVÁ, X.; NOVÁČKOVÁ, I.; POŘÍZKA, J.; DIVIŠ, P.; OBRUČA, S. Synthesizing Polyhydroxyalkanoates from Wheat Bran Hydrolysates via Halophilic Bacteria. ICCT 2024 - Book of abstracts. 1. Mikulov: AMCA, spol. s r. o., 2024. s. 202-202. ISBN: 978-80-88214-48-9.

HRABALOVÁ, V.; OPIAL, T.; MUSILOVÁ, J.; SEDLÁŘ, K.; POŘÍZKA, J.; DIVIŠ, P.; OBRUČA, S. Conversion of Ferulic Acid by Extremophilic Bacteria. Book of Abstracts. Brno: 2024.

HRABALOVÁ, V.; OPIAL, T.; POŘÍZKA, J.; DIVIŠ, P.; OBRUČA, S. Biotransformace ferulové kyseliny pomocí extremofilních bakterií. ICCT 2023 - Book of abstracts. 1. Mikulov: AMCA, spol. s r. o., 2023. s. 34-34. ISBN: 978-80-88214-40-3.

HRABALOVÁ, V.; OPIAL, T.; OBRUČA, S. Biotransformation of ferulic acid by using bacteria *Caldimonas thermodepolymerans*. Abstracts 16th International Congress "Thermophiles-2023". 1. Wales, United Kingdom: Bangor University, 2023. s. 11-11.

HRABALOVÁ, V.; KOUŘILOVÁ, X.; NOVÁČKOVÁ, I.; POŘÍZKA, J.; DIVIŠ, P.; OBRUČA, S. Production of Polyhydroxyalkanoates from Wheat Bran Hydrolysates Using Halophilic

Bacteria. 11th European Symposium on Biopolymers Book of Abstracts. 1. Brno: 11th European Symposium on Biopolymers, 2023.

HRABALOVÁ, V.; KOUŘILOVÁ, X.; PERNICOVÁ, I.; NOVÁČKOVÁ, I.; POŘÍZKA, J.; OBRUČA, S. Valorizace odpadních produktů na bázi lignocelulózy. ICCT 2022 - Book of abstracts. 2022.

NOVÁČKOVÁ, I.; **HRABALOVÁ, V.**; SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; SAMEK, O.; KOLLER, M.; KRZYZANEK, V.; HRUBANOVÁ, K.; MRÁZOVÁ, K.; NEBESÁŘOVÁ, J.; OBRUČA, S. The role of polyhydroxyalkanoates in adaptation of *Cupriavidus necator* to osmotic pressure and high concentration of copper ions. INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES, 2022, roč. 206, č. 5, s. 977-189. ISSN: 0141-8130.

HRABALOVÁ, V.; KOUŘILOVÁ, X.; PERNICOVÁ, I.; NOVÁČKOVÁ, I.; POŘÍZKA, J.; OBRUČA, S. Production of Polyhydroxyalkanoates Using Hydrolyzates of Lignocellulosic Materials. The Biomania Student Scientific Meeting 2022. 1. Brno: Masarykova univerzita, 2022. s. 114-114. ISBN: 978-80-280-0040-0.

NOVÁČKOVÁ, I.; **HRABALOVÁ, V.**; SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. The role of polyhydroxyalkanoates in adaptation process of *Cupriavidus necator* under stress conditions. The Biomania Student Scientific Meeting 2022 - Book of Abstracts. 1. Brno: MUNI PRESS, 2022. s. 133-133. ISBN: 9788028000400.

NOVÁČKOVÁ, I.; **HRABALOVÁ, V.**; SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. Involvement of polyhydroxyalkanoates in the adaptation process of bacterial strain *Cupriavidus necator*. ICCT 2022 - Book of abstracts. 2022. s. 1 (1 s.).

NOVÁČKOVÁ, I.; **HRABALOVÁ, V.**; SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; POŘÍZKA, J.; KALINA, M.; SAMEK, O.; OBRUČA, S. *Evolutionary Engineering of Selected Polyhydroxyalkanoate Producing Strains to Biotechnologically Relevant Stressors*. World Academy of Science, Engineering and Technology. 2021. s. 76-76. ISSN: 1307-6892.

CHATRNÁ, V.; KOUŘILOVÁ, X.; PERNICOVÁ, I.; NOVÁČKOVÁ, I.; POŘÍZKA, J.; OBRUČA, S. *Využití lignocelulózových materiálů k produkci polyhydroxyalkanoátů*. XXX. konference mladých mikrobiologů Tomáškovy dny 2021. 1. Brno: Masarykova univerzita, 2021. s. 41-41. ISBN: 978-80-210-9882-4.

NOVÁČKOVÁ, I.; **CHATRNÁ, V.**; SLANINOVÁ, E.; POŘÍZKA, J.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. *Evolutionary engineering approach for adaptation of PHA producing strain Halomonas halophila to levulinic and acetic acid*. Biotechnology and Biotechnological Equipment. 2021. s. 25-25. ISSN: 1314-3530.

CHATRNÁ, V.; NOVÁČKOVÁ, I.; OBRUČA, S. *Characterization of Bacterial Strains Obtained in Evolutionary Engineering*. Studentská odborná konference CHEMIE JE ŽIVOT 2020 Sborník abstraktů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2020. s. 75-76. ISBN: 978-80-214-5920-0.

NOVÁČKOVÁ, I.; **CHATRNÁ, V.**; SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; SAMEK, O.; OBRUČA, S. *Approaches of evolutionary engineering for adaptation of Cupriavidus necator H16 to biotechnologically relevant stressors*. XXIX. konference mladých mikrobiologů TOMÁŠKOVY DNY 2020. 1. Brno: Masarykova univerzita, 2020. s. 45-45. ISBN: 978-80-210-9611-0.