

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno, 2021

Bc. Radka Kovářová



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**BIOTECHNOLOGICKÉ PRODUKCE PHA KOPOLYMERŮ
OBSAHUJÍCÍCH 4-HYDROXYBUYTRÁT**

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF PHA COPOLYMERS CONTAINING 4-HYDROXYBUTYRATE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Radka Kovářová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1502/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Radka Kovářová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Biotechnologické produkce PHA kopolymerů obsahujících 4–hydroxybutyrát

Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Screening vhodných mikrobiálních producentů schopných produkce žádaného kopolymeru
3. Studium biotechnologické produkce PHA kopolymerů v baňkách, optimalizace základních kultivačních parametrů
4. Produkce PHA kopolymerů v laboratorním bioreaktoru
5. Charakterizace připravených materiálů

Termín odevzdání diplomové práce: 30.7.2021:

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

Bc. Radka Kovářová
student(ka)

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cílem předložené diplomové práce je studium biotechnologické produkce kopolymeru poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát). V první části práce byl proveden výběr vhodného bakteriálního kmenu z pěti vybraných mikroorganismů s různými prekurzory 4HB. Následně proběhla selekce vhodného substrátu a jeho optimální koncentrace. Mikroorganismy využívané v experimentální části byly *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19416, DSM 19379 a DSM 25816, *Thermomonas hydrothermalis* DSM 14834 a *Aneurinibacillus thermoaerophilus* H1 CCM 8960. Výběr vhodného kandidáta byl proveden pomocí izolace kopolymeru a jeho následné charakterizace prostřednictvím plynové chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem (GC-FID) a SEC-MALS analýzy (vylučovací chromatografie s detektorem měřícím statický rozptyl světla ve více úhlech). Výběr ideálního kandidáta byl posouzen gravimetricky a spektrofotometricky. V rámci experimentální práce bylo důležité zvolit optimální substrát a koncentraci pro akumulaci kopolymeru. Z provedených experimentů vyplývá, že nejvhodnějším kandidátem pro biotechnologickou produkci kopolymeru je bakteriální kmen *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379. V závěru experimentální práce byla prozkoumána biotechnologická produkce kopolymeru v laboratorním fermentoru.

KLÍČOVÁ SLOVA

Polyhydroxyalkanoáty (PHA), P(3HB-co-4HB), *Cupriavidus malaysiensis*, DSM 19379, γ -butyrolakton

ABSTRACT

The proposed diploma thesis aims to study the biotechnological production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer. The subject of the experimental part was first to select a suitable bacterial strain from five selected microorganisms with different carbon precursors applied at various concentrations. The five selected microorganisms used in the experimental part include bacterial strains *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19416, DSM 19379, and DSM 25816. Furthermore, the strain *Thermomonas hydrothermalis* DSM 14834 and *Aneurinibacillus thermoaerophilus* H1 CCM 8960. The experiment shows that the most suitable candidate for biotechnological production is the bacterial microorganism *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379. Finally, the biotechnological production of the copolymer was investigated utilizing a batch cultivation technique in a laboratory bioreactor.

KEY WORDS

Polyhydroxyalkanoates (PHA), P(3HB-co-4HB), *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379, γ -butyrolactone

KOVÁŘOVÁ, Radka. *Biotechnologické produkce PHA kopolymerů obsahujících 4-hydroxybutyrát*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131514>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Stanislav Obruča.

Prohlášení

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

.....
podpis studenta

Poděkování

V této části bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce doc. Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D. za jeho vedení a cenné rady, připomínky při zpracování teoretické a experimentální části. Další poděkování bych chtěla věnovat konzultantce mé diplomové práce Ing. Evě Slaninové, Ph.D. za pomoc v laboratoři a za rady při zpracování práce. V poslední řadě bych chtěla poděkovat také Ing. Michalovi Kalinovi, Ph.D. a Ing. Ivaně Nováčkové. Za pomoc při zpracování dat a také všem, kteří se nějakým způsobem podíleli na zpracování mé experimentální části.

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Polyhydroxyalkanoáty	9
2.1.1	Struktura a vlastnosti.....	9
2.1.2	Složení PHA granule.....	11
2.1.3	Biosyntéza PHA.....	11
2.1.4	Biodegradace PHA.....	14
2.1.5	Využití PHA.....	15
2.2	Mikroorganismy produkující kopolymer obsahující monomerní jednotku 4HB	16
2.2.1	<i>Cupriavidus malaysiensis</i>	16
2.2.2	<i>Thermomonas hydrothermalis</i>	17
2.2.3	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> H1.....	18
2.2.4	<i>Cupriavidus necator</i> H16.....	18
2.2.5	<i>Delftia acidovorans</i>	19
2.3	Biotechnologická produkce kopolymeru P(3HB-co-4HB).....	20
2.3.1	Obecná charakteristika.....	20
2.3.2	Klasifikace fermentorů.....	21
2.3.3	Produkce kopolymeru v současnosti.....	23
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3.1	Použité chemikálie, přístrojová technika a bakteriální kmeny.....	26
3.1.1	Bakteriální kmeny	26
3.1.2	Chemikálie	26
3.1.3	Přístrojová technika	27
3.2	Kultivace vybraných mikroorganismů.....	27
3.2.1	Příprava kryozkumavek	27
3.2.2	Příprava inokula	27
3.2.3	Příprava produkčního minerálního média.....	28
3.3	Screening vybraných mikroorganismů	30
3.3.1	Optická hustota	30
3.3.2	Gravimetrické stanovení biomasy.....	31
3.3.3	Příprava vzorků a kalibrační křivky pro GC-FID analýzu.....	31
3.4	Charakterizace kopolymeru analytickými metodami.....	31
3.4.1	Příprava filmů	31
3.4.2	Příprava vzorků na SEC-MALS analýzu	32
3.4.3	Charakterizace filmu pomocí GC-FID.....	32
3.5	Optimalizace substrátu a koncentrace vybraného kmene.....	32
3.6	Kultivace a produkce PHA ve fermentoru.....	33
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	34
4.1	Screening vybraných mikroorganismů	34
4.1.1	Spektrofotometrické stanovení optické hustoty	34

4.1.2 Gravimetrické stanovení biomasy.....	35
4.1.3 Stanovení PHA pomocí GC-FID	36
4.1.4 Stanovení molekulové hmotnosti polymerů	38
4.2 Optimalizace substrátu vybraného kmene.....	39
4.3 Kultivace a produkce PHA ve fermentoru.....	41
4.3.1 Spektrofotometrického stanovení optické hustoty	41
4.3.2 Gravimetrické stanovení PHA v závislosti na čase	42
4.3.3 GC-FID analýza vzorků kultivovaných v bioreaktoru.....	43
4.3.4 Závislost přítomnosti kyslíku, pH a míchání na kultivační době.....	46
5 ZÁVĚR	48
6 LITERATURA	50
7 SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	59

1 ÚVOD

I přesto, že jsou bakterie řazeny mezi jednoduché prokaryotické mikroorganismy dosahující velikosti jednotek μm , jsou velice důležitou součástí našeho světa. Bakterie tvoří bezpochybně nepostradatelnou součást našeho ekosystému, i když ne všechny jsou prospěšné. Jejich metabolismus lze využít pro mnohé účely, například v biotechnologické produkci lze provádět mikrobiální syntézu mikrobiálních bioplastů – polyhydroxyalkanoátů (PHA) prostřednictvím mikrobiálního metabolismu. Právě tato technologie v sobě schovává obrovský potenciál pro to, aby mohly být PHA zapojeny nejen do běžného provozu v různých průmyslových odvětvích, ale i pro medicínské účely.

Přítomnost plastových hmot, různých obalů a folií patří v dnešní době mezi jedno z nejdiskutovanějších témat globálních problémů. Nicméně ať už chceme nebo ne, tak budou zřejmě ještě dlouhou dobu součástí našeho světa, a to vzhledem k faktu, že se bez ropných produktů neobejde velká řada odvětví průmyslu, ale i velká část populace. Pro většinu populace je nepředstavitelné nemít možnost využívat běžný spotřební materiál, který je vyráběn z ropy. Kvůli nepříznivému dopadu ropných produktů na ekosystém jsou opravdu důležité a potřebné studie zabývající se produkcí alternativních bioplastů, například PHA.

Jak již bylo zmíněno výše, právě prokaryotní organismy jsou schopné produkovat mnohé metabolity, mimo jiné i PHA. V dnešní době je produkce PHA natolik prozkoumána, že jsou vybrané bakteriální kmeny schopny syntetizovat až 90 % hmotnosti suché hmoty buňky ve formě intracelulárních granulí. Takto vysoké bakteriální produkce PHA je dosaženo díky kultivačním podmínkám, konkrétně limitaci živin. Bakterie syntetizují PHA jako sekundární metabolity a slouží jako zásobní zdroj při nadbytku substrátu uhlíkaté povahy a nedostatku potřebných živin.

PHA by měly v budoucnosti nahradit produkty z plastu pocházející z petrochemického průmyslu, jenž jsou považovány za takřka nerozložitelné. PHA taktéž disponují obrovským potenciálem v medicínském a farmaceutickém průmyslu. Dále lze tyto přírodní polyestery složené z hydroxykyselin různě modifikovat, což zajišťuje větší variabilitu mechanických vlastností, která v kombinaci s netoxicitou otevírá širokou škálu aplikačních využití. Dále bylo zjištěno, že PHA produkují stovky bakteriálních kmenů a je díky nim možné syntetizovat více než 150 druhů PHA.

Další možností, jak vylepšit vlastnosti PHA, je tvorba různých kopolymerů. Díky nimž lze dosáhnout žádaných vlastností pro danou aplikaci. Tato práce se zabývá produkcí kopolymeru poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát), který jsou schopny bakteriální organismy akumulovat při zajištění vhodného přísunu prekursoru uhlíku. Výhody kopolymeru jsou například vysoká biokompatibilita, vysoká míra biodegradability nebo zajímavé mechanické vlastnosti (vysoká elasticita). Z tohoto důvodu se s tímto kopolymerem setkáváme ve studiích zabývajících se tkáňovým inženýrstvím, a proto byl tento kopolymer v centru pozornosti předložené diplomové práce.

2 TEORETICKÁ ČÁST

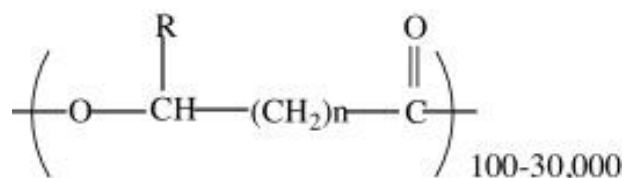
2.1 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty, (PHA), jsou přírodní lineární polyestery mastných hydroxykyselin. Tyto materiály jsou netoxické, biologicky odbouratelné a lze je syntetizovat z běžně dostupných obnovitelných zdrojů, což je velká výhoda v porovnání se synteticky vyráběnými polyestery, které jsou získávány z petrochemického průmyslu. PHA jsou biokompatibilní a lze je dělit dle fyzikálně chemických vlastností v závislosti na složení polyesteru [1; 2; 3; 4].

PHA jsou považovány za vhodnou a ekologicky přijatelnou alternativu pro synteticky vyráběné plasty. Tvoří je bakterie schopné produkovat polyestery ve své buněčné struktuře ve formě tzv. inkluzí (granulí) sloužících jako zásoba uhlíku a energie. Nicméně výroba biopolyesterů je zatím finančně velmi nákladná a vzhledem k tomuto faktu stále není možné zcela nahradit za běžně dostupné plastové produkty. PHA jsou díky svým unikátním vlastnostem předmětem mnoha studií. [1; 2; 3; 4].

2.1.1 Struktura a vlastnosti

Základní jednotkou polymerních hydroxyalkanoátů je 3-hydroxyalkanoát, jak můžeme vidět na Obr. 1. Hydroxylová skupina se vyskytuje v poloze 3, 4, 5 nebo 6 a to výhradně v R konfiguraci. Umístění skupiny je zapříčiněno specificitou enzymů, jenž jsou zapojeny do syntézy PHA. V závislosti na počtu atomů uhlíků v příslušných monomerních jednotkách se přírodní polyestery člení do tří skupin [3].



Obrázek 1: P(3-hydroxyalkanoáty) [5]

První skupina je tzv. short-chain-length (scl-PHA) obsahující 3–5 atomů uhlíku. Běžně jsou tyto polymery popisovány jako vysoce krystalické s nízkou pevností v tahu. Ukázkovým příkladem scl-PHA polymeru je poly(3-hydroxybutyrát) dále jen P(3HB). Druhou skupinou je medium-chain-length (mcl-PHA) složený ze 6–14 atomů uhlíku. Oproti scl-PHA je tato skupina amorfní a vysoce elastická. Třetí a poslední skupinou PHA je tzv. skupina lcl-PHA, jenž tvoří dlouhé řetězce z 15 a více atomů uhlíku [6].

Dále je možné přírodní PHA dělit podle typu monomerní jednotky, která je obsažena ve struktuře polymeru na homopolymery a kopolymery. Všechny výše zmíněné délky řetězců společně s molekulovou hmotností a připojenými postranními řetězci obsahujícími různé funkční skupiny (např. hydroxylové, karboxylové, halogenové, fenoxyllové a epoxyllové) jsou odpovědné za výsledné vlastnosti PHA [6].

Každá výše zmíněná skupina PHA má odlišnou krystalickou povahu v závislosti na délce řetězce. S krystalinitou je úzce spjata hodnota skelného přechodu amorfní fáze a teplota tání krystalické fáze. Na základě provedených experimentů bylo prokázáno, že teplota skelného přechodu se úměrně snižuje s narůstající délkou postranního řetězce, ze kterého je daný polymer

složen. Konkrétně se jedná o řetězce s monomerními jednotkami s počtem atomů uhlíku v rozmezí 1–7. Skupina mcl-PHA je charakteristická nízkou teplotou tání tj. 42–65 °C. Vzhledem k nízké teplotě tání je skupina PHA se středně dlouhými řetězci přiřazovaná do třídy elastomerů [3; 6; 7].

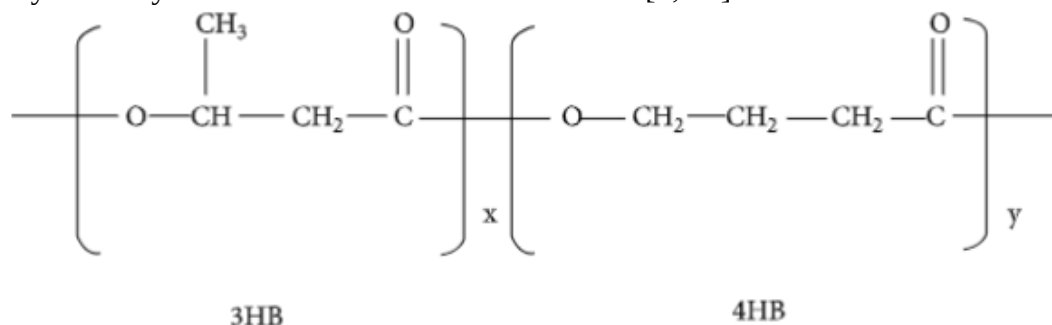
Dále jsou polymery spadající do skupiny mcl-PHA charakteristické svými mechanickými vlastnostmi, tj. elasticita a nízká pevnost v tahu. V porovnání s polymery scl-PHA nejsou tuhé a křehké, jak již bylo řečeno výše, kombinací s různými monomerními jednotkami jsou scl-PHA schopny dosáhnout větší pružnosti. PHA jsou hydrofobní (nerozpustné ve vodě), ale jsou rozpustné v organických rozpouštědlech, které mají ve své struktuře navázaný chlor (například sloučeniny jako chloroform a dichlormethan) [6].

Za nejčastěji se vyskytující monomerní jednotky, které jsou obsaženy ve struktuře PHA, jsou považovány 3-hydroxybutyrát (3HB), 3-hydroxyvalerát (3HV) a 4-hydroxybutyrát (4HB). Při mikrobiální syntéze biopolymerů jsou často spojovány za vzniku kopolymerů s výrazně lepšími fyzikálně-chemickými vlastnostmi [3; 8; 9; 10].

Homopolymer P(3HB) je nejznámějším polymerem ve skupině scl-PHA. Polymer je vysoce krystalický a nerozpustný ve vodě. Dále bylo zjištěno, že je polymer takřka rezistentní vůči hydrolytické degradaci. Nicméně i homopolymer je popisován jako dobrý termoplastický materiál avšak s limitujícími mechanickými vlastnostmi. Mimo jiné je P(3HB) charakteristický křehkostí a zároveň tuhostí [11].

Homopolymer P(4HB) je oproti výše popsanému P(3HB) více tvarově flexibilní a tím pádem je i více elastický. Elasticita homopolymeru P(4HB) je dle provedených experimentů srovnatelná s polyethylenem [11].

Jak již bylo popsáno výše, unikátnost PHA je zejména v počtu možností, kterými lze ovlivnit mechanické vlastnosti PHA. Stejně je tomu tak i v případě kopolymeru zvaném poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát) dále jen P(3HB-co-4HB). Lze tedy říct, že výsledné vlastnosti kopolymeru můžeme ovlivnit prostřednictvím poměru 4HB a 3HB monomerních jednotek. Kopolymer P(3HB-co-4HB) znázorněný na Obr. 2 je také charakteristický svou biokompatibilitou a biodegradabilitou. Dalším typickým znakem je nižší teplota tání, která klesá se zvyšujícím se zastoupením 4HB. S tím je spjata i nižší krystalinita. Kopolymer obsahující ve své struktuře vysoký podíl 4HB je popsán ve studiích jako vysoce elastický termopolyester s vysokou mechanickou odolností v tahu [3; 12].

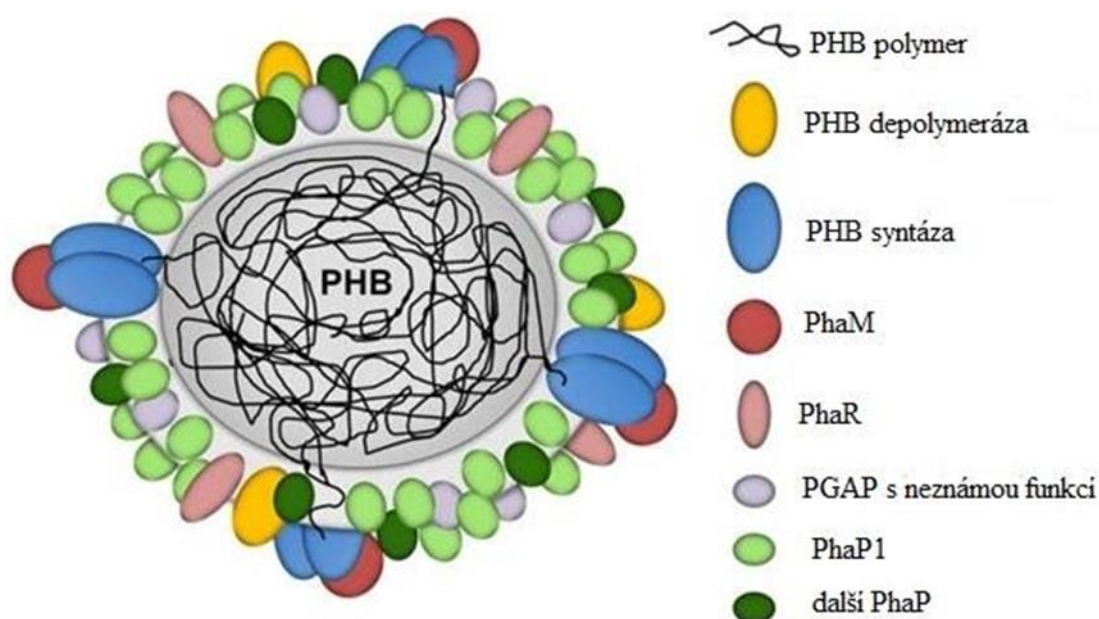


Obrázek 2: Kopolymer P(3HB-co-4HB) [13]

Dalším příkladem kopolymeru je poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) označován jako P(3HB-co-3HV). Je charakteristický nižší krystalinitou, nižší teplotou tání, a naopak má v porovnání s P(3HB) celkově vyšší pružnost a je tvrdší. O výsledných atributech kopolymeru rozhoduje procentuální zastoupení monomerní jednotky 3HV [11].

2.1.2 Složení PHA granule

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.1, PHA jsou akumulovány v případě, že je bakteriální mikroorganismus limitován nějakou důležitou růstovou komponentou (zdrojem N, P, S atd.). Mikroorganismus na zmíněný stres odpovídá tvorbou intracelulárních inkluzí (PHA granule). PHA granule je mimo jiné označována taktéž jako karbonosom, což je multifunkční komplex sestavený z jádra amorfního polymeru PHB, které je ohraničeno povrchovou proteinovou vrstvou. Ta je složena z funkčních a strukturních proteinů (viz Obrázek 3) [14].



Obrázek 3: Složení PHA granule [15]

Prvním z proteinů je PHB syntáza, která sehraává klíčovou roli při syntéze PHA viz v kapitole 2.1.3. Dále je ve struktuře granule obsažen protein zvaný Phasin (PhaPs), jenž tvoří větší část povrchu PHB granule a zabraňuje splynutí granulí. Neméně důležitá je i PHB depolymeráza (PhaZs), která je významná pro mobilizaci polymeru v případě, že daná buňka nedisponuje dostatkem živin. Proteiny PhaRs regulují expresi vybraných phasinových genů a PhaM představuje vzor proteinu asociovaného s PHB granulemi [14].

2.1.3 Biosyntéza PHA

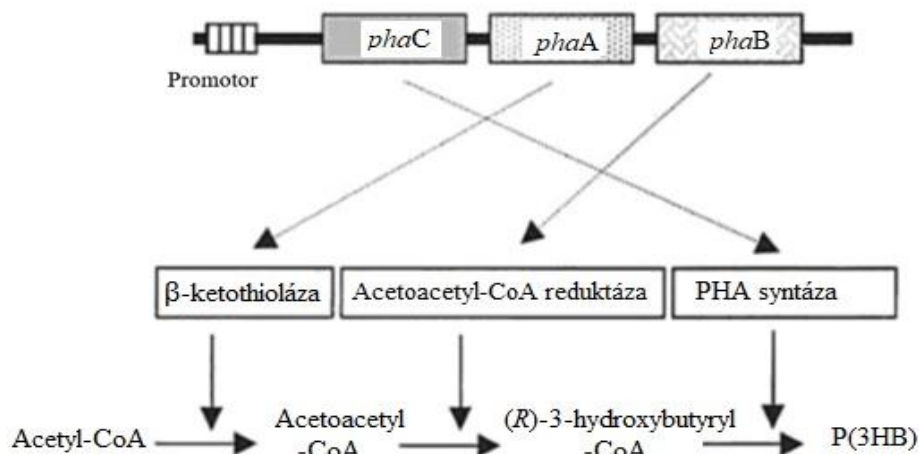
Tzv. „zelené polymery“ jsou intenzivně zkoumány vzhledem k širokému uplatnění a výhodám. Bylo zjištěno, že PHA lze syntetizovat prostřednictvím mnoha mikrobiálních kmenů. Nicméně ani rostlinné buňky nezůstávají pozadu a taktéž spadají do skupiny producentů akumulující PHA. Avšak rostlinní producenti nedosahují takových výsledků jako bakteriální zástupci. Navíc bylo zjištěno, že produkce PHA mnohdy rostlinám škodí v jejich růstu a vývoji. Vzhledem k tomu, že je v průmyslu prioritou dosažení především efektivní syntézy biopolyesterů, jsou upřednostňovány produkce pomocí bakterií [3; 6].

Pro bakteriální organismus je akumulace PHA důležitá a prospěšná v případě, že má daná bakterie přebytečný zdroj uhlíku, a naopak nedostatek potřebných živin. Tím se rozumí například kritická hladina nebo úplné vyčerpání dusíku, fosforu, kyslíku. Jak již bylo řečeno v kapitole 2.1.1 PHA jsou nerozpustné ve vodě, díky čemuž jsou biopolymery shromažďovány v intracelulárním prostředí buňky ve formě granulí. Jsou obaleny proteinovou vrstvou, která tvoří rozhraní buňky mezi hydrofilním prostředím cytoplazmy a hydrofobním jádrem PHA granulí [3].

K tomu, abychom mohli syntetizovat biologicky rozložitelný kopolyester P(3HB-co-4HB), je zapotřebí výběr vhodného producenta. Biotechnologicky významné mikroorganismy, které jsou schopny vysoké akumulace biopolymeru, budou zmíněny v kapitole 2.2 [3].

Sloučeniny 4HB (prekurzory zajišťující produkci kopolymerů), jako jsou γ -butyrolakton, 1,4-butandiol, 4-hydroxymáselná kyselina aj., napomáhají bakteriím k produkci elastického termoplastu. V případě 3HB monomerní jednotky je akumulace polymeru zajištěna prostřednictvím strukturně nezávislého uhlíkatého zdroje např. z glukózy, fruktózy, sacharózy, ale i pomocí kyselin, jako je třeba kyselina máselná nebo octová. U 4HB jednotky je produkce zajištěna vhodnými prekurzory, které jsou již zmíněny výše [9].

Syntéza PHA vychází z centrální metabolické dráhy (β -oxidace mastných kyselin, biosyntéza mastných kyselin a cyklus kyseliny trikarboxylové). Syntéza P(3HB) je obecně popisována ve 3 stěžejních chemických reakcích. Další neméně důležitou součástí biosyntézy PHA je přítomnost kódujících genů k příslušným enzymům, které jsou dále uvedeny v závorkách a znázorněny na Obrázek 4. Jsou to např. *PhaA* (β -ketothioláza), *PhaB* (Acetoacetyl-CoA reduktáza), *PhaC* (PHA syntáza) [16; 17].



Obrázek 4: Biosyntéza P(3HB) [18]

Prvním ze třech hlavních enzymů podílejících se na syntéze P(3HB) je enzym β -ketothioláza. Tímto enzymem je vybavena většina živých buněk všech organismů (eukaryoty, kvasinky, prokaryoty). Existují dva typy popisovaného enzymu – degradativní typ I a biosyntetické Thiolázy typu II. Thiolázy typu I jsou součástí katabolismu mastných kyselin a Thiolázy typu II se podílejí na biosyntéze P(3HB), ketolátek, steroidů, izoprenoidů apod. Bakteriální kmen *Cupriavidus necator* je v odborné literatuře často zmiňován jako modelový kmen, který využívá svůj metabolismus pro produkci PHA a je vybaven geny

kódujícími dvě β -ketoacyl-CoA thiolázy. Enzymy jsou od sebe rozlišovány jako A a B. β -ketoacyl-CoA thioláza A se vyznačuje substrátovou specifitou vůči molekulám acetoacetyl-CoA a 3-ketopentanoyl-CoA. β -ketoacyl-CoA thioláza B nachází svou substrátovou specifitu u acetoacetyl-CoA a 3-ketoalkanoyl-CoA C₅–C₈, C₁₀ [16; 17].

Druhým enzymem, který je nezbytný pro syntézu P(3HB), je acetoacetyl-CoA reduktáza. Enzym katalyzuje stereoselektivní redukci acetoacetyl-CoA na 3-hydroxybutyryl-CoA. Třetím, posledním a nejdůležitějším enzymem sehrávající podstatnou funkci je PHA syntáza, která katalyzuje polymeraci thioesterů 3-(*R*)-hydroxyalkyl CoA na PHA. Enzym je rozdělen do čtyř kategorií v závislosti na sekvenci přítomných aminokyselin, substrátové specifity a konstituce podjednotky [16; 17].

PHA syntáza patřící do kategorie I je tvořena z jediného typu podjednotky o molekulové hmotnosti v rozsahu 61–73 kDa. Přítomnost takovéto PHA syntázy zapříčiní polymeraci thioesteru CoA různých (*R*)-3-hydroxy-mastných kyselin, které jsou složeny z 3–5 atomů uhlíku. Produktem syntézy jsou PHA s krátkými řetězci [16; 17].

Do kategorie II náleží enzym, který je složen taktéž z jediného typu podjednotky. Nicméně daný enzym katalyzuje polymeraci (*R*)-3-hydroxy-mastných kyselin sestavené z 6–14 atomů uhlíku. V tomto případě dochází k syntéze mcl-PHA [16; 17].

Do kategorie III patří PHA syntáza, která je charakteristická dvěma jednotkami. První je katalytická podjednotka *phaC* s molekulovou hmotností a s rozsahem 40–53 kDa a druhá podjednotka je *phaE* s molekulovou hmotností v rozmezí 20–40 kDa [16; 17].

Poslední a zároveň čtvrtou kategorií je PHA syntáza, která je složena taktéž ze dvou podjednotek, první katalytická podjednotka má molekulovou hmotnost 41,5 kDa a druhá podjednotka s molekulovou hmotností 22 kDa, značenou *phaR* [16; 17].

Jak již bylo na úvodu kapitoly zmíněno, biosyntéza PHA může probíhat prostřednictvím tří metabolických drah. V případě první popisované metabolické dráhy je především pro syntézu scl-PHA využíván zdroj uhlíku z cukru, ze kterého je získáván acetyl-CoA. V první fázi metabolické dráhy tedy probíhá tzv. Claisenova kondenzace, kde je zapojen *phaA*. Do reakce tedy vstupují dvě molekuly acetyl-CoA společně s enzymem β -ketothiolázou. To zapříčiní vznik acetoacetyl-CoA. V druhém kroku je metabolit redukován za pomoci *phaB*, čímž vznikne (*R*)-3-hydroxybutyryl-CoA. V poslední fázi syntézy PHA je zapotřebí polymerace produktu získaného v předchozím kroku. Do reakce je zapojena PHA syntáza kódovaná genem *phaC*, ta je zodpovědná za tvorbu esterové vazby a syntézu biopolymeru P(3HB). Biosyntetická dráha byla popsána u modelového kmenu *Cupriavidus necator* [16; 17].

Druhou metabolickou dráhou, která je využívána pro syntézu PHA, je tzv. β -oxidace. Jedná se o metabolickou dráhu, ze které vychází především polymery spadající do skupiny mcl-PHA. Dráha zpracovává metabolity získané z β -oxidací mastných kyselin. Nejdříve je nutné převést mastnou kyselinu na enoyl-CoA a za přítomnosti (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA hydratázy vzniká z enoyl-CoA (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA. Posledním krokem je polymerace vzniklého produktu v předchozím kroku pomocí mcl-PHA syntázy [16; 17].

Třetí a zároveň poslední známou metabolickou dráhou, na jejímž základě jsou schopny mikroorganismy syntetizovat PHA, je cyklus biosyntézy mastných kyselin. Meziprodukt (*R*)-3-hydroxyacyl-ACP je za katalýzy enzymem 3-hydroxyacyl nosným protein-CoA transferázou (*PhaG*) se přemění na 3-hydroxyacyl-ACP a 3-hydroxyacyl-CoA [6].

Bylo zjištěno, že bakteriální kmeny, které disponují přítomností scl-PHA syntázy jsou schopny inkorporace 4HB monomerní jednotky do struktury kopolymeru. Buňka absorbuje do své struktury vybraný prekurzor např. 4-hydroxymáselnou kyselinu, která se dále převádí za přítomnosti genu CoA transferázy na 4HB-CoA. Bakterie schopné výše popsané činnosti obsahují také 3HB jednotku, kterou je možné začlenit do struktury a dochází ke vzniku kopolymeru P(3HB-co-4HB) [19].

2.1.4 Biodegradace PHA

Jak už bylo zmíněno výše, PHA patří mezi biodegradabilní materiály, a tudíž mají velký potenciál jako náhrada v konceptu udržitelného rozvoje tradičních plastů. Výhodou PHA je stabilita na vzduchu a odolnost vůči vlhkosti [7; 20; 21].

PHA jsou mikrobiálně odbourány v přírodě mnohými mikroorganismy produkující enzymy, které jsou schopny degradovat PHA. Jako příklad bakteriálního mikroorganismu degradující PHA lze uvést termofilní aktinomycety, které se vyznačují schopností odbourávat polymer při vysokých teplotách. Dalším příkladem je anaerobní mikroorganismus *Ilyobacter delafieldiithas*, jenž je schopen štěpit PHA na estery s krátkými řetězci (acetát, propionát, butyrát). Při biodegradaci jsou uváděny mikroorganismy rodu *Pseudonocardiaceae*, *Micromonosporaceae*, *Thermomonosporaceae*, *Streptosporangiaceae*. Mikrobiální rody degradují PHA pomocí příslušných enzymů a tím způsobují proces solubilizace přítomných polymerů, následkem čehož dochází ke vzniku rozpustných komponentů, které mikrobi absorbují do svých buněčných stěn [7; 20; 21].

Samotná degradace PHA se odvíjí od enzymatické výbavy mikrobiálního organismu, konkrétně jakými depolymerázami (intracelulární a extracelulární) disponuje a v jakém stavu se PHA nachází (krystalické nebo amorfní). Intracelulární depolymeráza odbourává striktně amorfni PHA, které jsou akumulovány uvnitř mikroorganismu. Při tomto ději dochází k hydrolýze PHA, a to vede k degradaci a k tvorbě nových produktů a zisku energie. Přičemž k intracelulární degradaci PHA dochází simultánně se syntézou PHA [7; 20; 21].

Druhá možná degradace je prostřednictvím extracelulární depolymerázy PHA, která degraduje především krystalické PHA v extracelulárním prostředí. Jde o proces zpracování exogenních PHA, které jsou uvolněny po buněčné smrti a jsou tudíž degradovány pomocí výše zmíněného enzymu – extracelulární PHA depolymeráza (karboxyesteráza). Enzym štěpí polymer PHA na oligomery či monomery [7; 20; 21].

Lze říct, že degradace PHA je obecně popsána ve dvou stěžejních krocích. V první řadě jsou za aerobních podmínek polymery odbourávány na jednotlivé části vždy v závislosti na obsahu monomerních jednotek (monomery, dimery nebo oligomery) a na typu přítomné depolymerázy. Následně jsou rozfragmentované monomerní jednotky metabolizovány v mikrobiálních buňkách, kde jsou za anaerobních podmínek zcela zpracovány na oxid uhličitý a vodu. V případě aerobních podmínek na metan a oxid uhličitý [7; 20; 21].

Výsledkem biodegradace je tedy rozklad PHA na příslušné hydroxykyseliny v biologickém prostředí. Například kopolymer P(3HB-co-4HB) je degradován na 3-hydroxybutyrovou kyselinu a dále na kyselinu 4-hydroxybutyrovou. Obě zmíněné kyseliny jsou přirozenou součástí krve, konkrétně 3-hydroxymáselná kyselina je obsažena v krevní plazmě [7; 9].

Mimo výše zmíněné depolymerázy by dále mohly být využity i další enzymy konkrétně lipáza. Na degradaci kopolyesteru P(3HB-co-4HB) přesněji polymeru P(3HB-co-4HB) s 8,4% zastoupením 4HB s molekulovou hmotností 400 kDa byl proveden experiment pomocí dvou triacylglycerových lipáz. Studie poukazuje na fakt, že degradace katalyzovaná enzymem lipáza vedla ke snížení molekulové hmotnosti kopolymeru [22].

Na samotný proces biodegradace má vliv vnější prostředí např. pH, teplota, vlhkost. S tím je úzce spjata i aktivita zmíněných enzymů, která je podstatná pro biodegradaci. Dalšími faktory, které mají vliv na proces degradace, jsou i daný mikroorganismus a povaha polymeru (krystalinita, povrchová struktura, pevnost apod.). Například v případě, že se polymer vyznačuje vysokou krystalinitou, je průběh degradace zpomalen. Tento děj je zapříčiněn přítomností krystalických struktur, které určují i vyšší teplotu tání PHA. Například v případě polymeru patřících do scl-PHA P(3HB) skupiny bude biodegradace pomalejší, než u skupiny mcl-PHA. P(4HB), které jsou charakteristické elastickou povahou a nízkou teplotou tání. Kopolymer P(3HB-co-4HB) má lepší degradační vlastnosti právě díky tomu, že netvoří krystalickou mřížku vzhledem k různému obsahu monomerních jednotek [7; 20; 21]

2.1.5 Využití PHA

PHA našly díky svým různorodým vlastnostem široké uplatnění v mnoha odvětví průmyslu. Jak již bylo zmíněno v předcházejících kapitolách (1 a 2.1.1), kombinací monomerních jednotek lze dosáhnout žádaných vlastností pro cílené aplikace [23].

Svůj potenciál PHA uplatňují v současné době především v medicínských aplikacích, a to díky schopnosti interagovat s biologickým systémem vzhledem k jejich vysoké imunotoleranci a netoxicitě. S tím je spojena neméně důležitá biokompatibilita určující, jak bude tkáň na zvolený materiál reagovat. Obecně jsou PHA předmětem obrovského zájmu nejen v medicíně, ale i ve farmaceutickém průmyslu a tkáňovém inženýrství [23; 24].

V případě medicínských aplikací výhoda PHA aplikovaného do lidského organismu spočívá ve vstřebatelnosti materiálu, tzn. že jej není potřeba z organismu po aplikaci vyjmout. PHA jsou využitelné např. ve formě stehů, náplastí, implantátů, nervových vodičů a tzv. scaffoldů kostní dřeně. PHA je možné aplikovat i v oblasti kardiovaskulárního systému, kde by mohly přispět k výrobě krevních cév, srdečních chlopní a kardiovaskulárních stentů [6; 9].

Kopolymer P(3HB-co-4HB) je jedním z předmětů zájmu tkáňového inženýrství a medicínských aplikací vzhledem ke srovnatelným mechanickým vlastnostem lidské kůže a hemokompatibilitě (nevyvolávají nežádoucí vedlejší účinky, jako je trombóza, antigenní reakce nebo destrukce krevních složek). Z toho vyplývá, že P(3HB-co-4HB) je vhodný biomateriál na výrobu krevních cév [6; 9; 25; 26; 27].

Výhodou kopolymeru P(3HB-co-4HB) v medicíně je flexibilní doba degradace, která je závislá na obsahu jednotky 4HB. Zde platí pravidlo, že čím vyšší je zastoupení jednotky 4HB, tím rychleji probíhá proces biodegradace. P(3HB-co-4HB) je určen i na dlouhodobější implantaci do lidského organismu. Nastavená rychlost degradace se využívá například u implantátů s antibiotiky, které jsou vhodné pro léčbu osteomyelitidy (chronický zánět kostní dřeně). P(3HB-co-4HB) je dále vhodný i pro řízenou regeneraci kostí ve formě nanovláknenné membrány, která podporuje buněčný růst. Dále při výrobě nanočástic, které obsahují léčivo (docetaxel) s protirakovinotvorným účinkem [6; 9].

Jak už bylo zmíněno výše, vybrané kopolyestery jsou experimentálně posuzovány jak s ohledem na typ monomerních jednotek, tak i na molární podíly monomerních jednotek. Například jsou tyto vlastnosti vhodné v případě tvorby zmíněných nanočástic, které jsou tvořeny z kopolymeru P(3HB-co-4HB) obsahující léčivo proti rakovině prsu, plic, prostaty aj. Kopolymery byly vyzkoušeny v různých poměrech monomerní jednotky 4HB a to, 16% PHB16, 30% PHB30 a 70% PHB70. Z experimentu vyplývá, že nanočástice PHB70, přesněji P(3HB-co-70%4HB), splňuje všechny nároky, čímž je myšlena optimální distribuční velikost a schopnost uvolnit léčivo ze své struktury v požadovaný okamžik do cíleného prostředí v lidském organismu [25].

Dále byl kladně hodnocen kopolymer s procentuálním podílem P(3HB-co-82%4HB) v souvislosti s výrobou obvazů určených na krytí ran. Dle výzkumu dokázal připravený obvaz z kopolymeru zcela zahojit kožní ránu za 16 dní [28].

Další možnou aplikací je výroba náplastí, které se stávají díky elektrostatickému zvláknování kopolymeru a želatiny velice užitečným medicínským materiálem. Ve zveřejněné studii z roku 2019 (Mat Juhon Azuraini & spol.) byly provedeny pokusy s odlišným procentuálním zastoupením 4HB jednotky (27, 50, 82 mol.%). Přičemž dané výsledky korelují s předešlými studiemi, kdy koncentrace 4HB jednotky vysoce ovlivňuje distribuci a elasticitu vláken, jak bylo možné předpokládat vzhledem k charakteristickým vlastnostem monomerní jednotky. Získaná data z experimentu uvádí, že kopolymer P(3HB-co-82%4HB) vykazuje požadované vlastnosti a je tak vhodný pro přípravu biologicky odbouratelných a biokompatibilních náplastí. Náplasti jsou schopné podporovat růst a dělení kožních buněk [29]. Mimo medicínské aplikace je možné PHA využívat v aplikacích, u nichž je výhodné řízené uvolňování pesticidů nebo živin, potahy semen a ochranu rostlin [6; 9; 30].

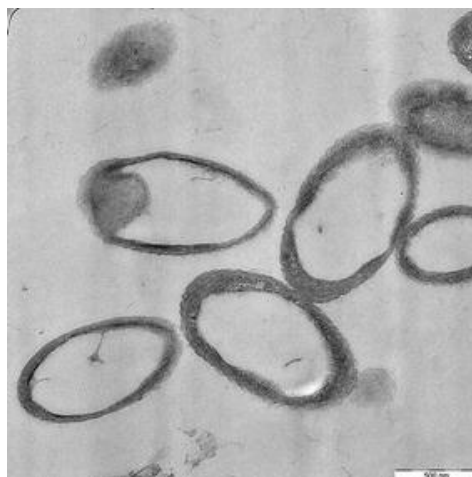
2.2 Mikroorganismy produkující kopolymer obsahující monomerní jednotku 4HB

Bakteriální produkci PHA objevil francouzský mikrobiolog Maurice Lemoigne ve 20. letech 20. století. Mikroorganismy akumulují PHA v rámci intracelulárního prostředí ve formě granulí za určitých podmínek (nadbytek uhlíku a limitace esenciálními prvky). Dnes je známo již několik stovek druhů mikrobiálních producentů PHA. Unikátnost všech mikroorganismů produkujících PHA se tedy projevuje za nepříznivých podmínek, kdy je bakterie schopna adaptovat svůj metabolismus na zmíněné nepříznivé podmínky a dochází k akumulaci PHA. Produkci lineárního polyesteru si mikroorganismus tvoří zásobní zdroj látek, energie a uhlíku. Potřebné živiny jsou dodávány přísunem jednoduchých cukrů nebo rostlinných olejů [9; 31].

Kopolymer P(3HB-co-4HB) byl poprvé izolován v roce 1988 z bakteriálního kmene *Cupriavidus necator* [31].

2.2.1 *Cupriavidus malaysiensis*

Bakteriální kmen *Cupriavidus malaysiensis* viz Obrázek 5 náleží do skupiny gramnegativních, nesporulujících β -proteobakterií, jež jsou schopné akumulace PHA. Bakterie je pohyblivá, tyčinkovitá a nepatogenní. Aerobní organismus byl izolován ze vzorků získaných z oblasti Malajsie, přesněji z jezera Kulim nebo řeky Pinang [32].



Obrázek 5: *Cupriavidus malaysiensis* (Transmisní elektronový mikroskop *Cupriavidus malaysiensis* USMAA1020, 2017) [33].

Tato bakterie je schopná akumulovat kopolymer P(3HB-co-4HB) s vysokým podílem monomeru 4HB [34]. Průzkum poukazuje na to, že pro vysokou produkci kopolymeru je důležitý přísun optimálního poměru uhlíku a dusíku. Dle provedené studie bylo zjištěno, že vhodnými substráty pro cílenou produkci kopolymeru jsou například γ -butyrolakton, 1,4-butandiol, kyselina 4-hydroxybutyrová. Přídavek zmíněných substrátů vede k navýšení koncentrace PHA až na 30,7 g/l. Konstantní doplňování uhlíku a dusíku dokáže navýšit produkci na 92 hm.% celkové biomasy s koncentrací 46 g/l PHA [23; 35].

V rámci produkce kopolymeru P(3HB-co-4HB) jsou v nynější době používány a zkoumány tři bakteriální kmeny rodu *Cupriavidus malaysiensis*. Prvním z nich je bakteriální kmen označovaný ve sbírkách jako DSM 19416 (USMAA1020). Tento mikroorganismus vytváří na agarových plotnách kolonie, které jsou seskupené do kruhu a jsou zbarvené do krémové barvy. Na základě provedených experimentů bylo zjištěno, že bakterie roste i při teplotě 37 °C (optimum 30 °C), avšak při 42 °C už bakterie nejeví známky růstu. Za předpokladu, že je při kultivaci využíván uhlíkový substrát γ -butyrolakton nebo 1,4-butandiol, dokáží tyto bakterie syntetizovat kopolymer se zastoupením monomerní jednotky 4HB od 32 do 51 mol% [32; 36].

Další mikroorganismus schopný syntetizovat kopolymer je označován jako *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379 (USMAA2-4). Tento mezofilní mikroorganismus produkuje P(3HB-co-4HB) za přítomnosti prekurzorů jako jsou např. γ -butyrolakton, 1,4-butandiol, ϵ -kaprolakton nebo 1,4-hexandiol. Poslední kmen klasifikovaný jako *Cupriavidus malaysiensis* DSM 25816 (USMAHM13) je schopný syntézy termopolymeru za přítomnosti 1,4-butandiolu a 1,6-hexandiolu. Navíc kolonie tohoto kmene vykazují antimikrobiální účinky díky žluté pigmentaci [32; 34; 37].

2.2.2 *Thermomonas hydrothermalis*

Bakterie *Thermomonas hydrothermalis* byla poprvé získána z horkého pramene na území Portugalska. Je zástupcem γ -proteobakterií a patří mezi striktně aerobní a organotrofní termofilní organismus [38]. Gramnegativní bakterie žije díky své termofilní povaze v prostředí okolo 50 °C, což odpovídá optimální růstové teplotě [39]. Bakterie je schopná žít v geotermální oblasti především díky struktuře bakteriální buněčné stěny, která je složena z proteinů,

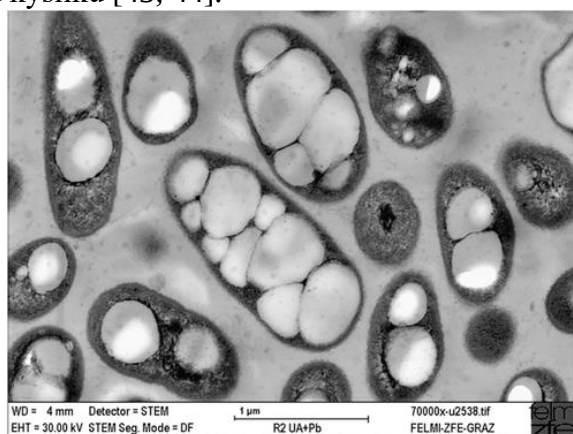
glykolipidů a lipopolysachridů (přednost gramnegativní buňky). Následně bylo zjištěno, že termofilní organismy jsou bohaté na enzymy, jež jsou vhodné pro biotechnologickou produkci, jsou to například amylázy, celulózy, chitinázy, DNA polymerázy, lipázy apod. I tato bakterie produkuje díky vhodně zvoleným substrátům kopolymer P(3HB-co-4HB) [42].

2.2.3 *Aneurinibacillus thermoaerophilus* H1

Dalším kandidátem pro biotechnologickou produkci PHA je mikroorganismus *Aneurinibacillus* sp. H1. Bakteriální kmen CCM 8960 je termofilní organismus vyžadující optimální teplotu pro růst okolo 45 °C. Dříve byla sporulující bakterie zařazována k rodu *Bacillus* avšak s ohledem na její genotypové a fenotypové rysy byla taxonomicky přehodnocena a přeřazena k rodu *Aneurinibacillus*. I přestože není bakteriální kmen zcela prozkoumán, byla u kmene prokázána produkce PHA. Grampozitivní bakterie dosahuje dle provedených studií až 91 mol% produkce 4HB monomerní jednotky v kopolymeru za předpokladu, že byl využit 1,4-butandiol a glycerol na produkci 3HB monomerní jednotky. S ohledem na složení bakteriální membrány je schopný mikroorganismus snižovat rizika u medicínských aplikací, kde jsou zahrnuty interakce s lidským organismem. To je zapříčiněno absencí lipopolysacharidů v bakteriální membráně, jenž mohou mít negativní imunologický dopad [40; 41; 42].

2.2.4 *Cupriavidus necator* H16

Bakteriální kmen *Cupriavidus necator* H16 starším názvem *Rastolnia eutropha* H16 patří do skupiny gramnegativních lithoautotrofních β -proteobakterií produkující PHA. Vyskytuje se v půdách a ve sladkovodním prostředí. Nepatogenní bakterie je považována za metabolicky univerzální mikroorganismus. Za běžných podmínek získává energii a zdroj uhlíku prostřednictvím oxidace anorganických látek (CO_2) a organických látek (H_2). *Cupriavidus necator* využívá dusík jako alternativu anaerobního metabolismu (denitrifikace elektronů dusičnanů) při nedostatku kyslíku [43; 44].



Obrázek 6: *Cupriavidus necator* H16 [45]

Cupriavidus necator H16 (viz Obrázek 6) je často využíváný především pro biotechnologickou produkci PHA vzhledem k jeho vysoké produkci, která dosahuje až 90 % PHA v sušině. *Cupriavidus necator* H16 akumuluje P(3HB-co-4HB) s různým zastoupením monomeru 4HB. Fakultativní anaerobní mikroorganismus je schopný akumulace

PHA z levně dostupných zdrojů uhlíku (např. melasa). I díky tomu se stává bakteriální kmen vhodným pro velkokapacitní produkci PHA [23; 46; 47].

2.2.5 *Delftia acidovorans*

Další tyčinkovitou bakterií, která je ideálním producentem PHA, je *Delftia acidovorans*. V minulosti byla tato β -proteobakterie označovaná pod názvem *Comamonas acidovorans* nebo také *Pseudomonas acidovorans*. Bakterie patří mezi gramnegativní. Je aerobní, nefermentující a nepatogenní. Tento bakteriální kmen je mimo jiné znám kvůli rezistenci na aminoglykosidy a polymyxiny. Bakterie byla izolována z aktivního kalu. Mikroorganismus je významný pro biotechnologickou produkci kopolymeru především díky schopnosti akumulovat vysoký podíl monomerní jednotky 4HB. Produkce kopolymeru je prováděna za přítomnosti směsi glukózy a 1,4-butandiolu, přičemž dosahuje výtěžnosti 4HB frakce až 96 mol.% za předpokladu dvoustupňové kultivace. Na základě sekvenace bylo zjištěno, že vybraný mikroorganismus je vybaven unikátním enzymem PHA syntázou, který je složen ze 40 aminokyselin. Podobné složení enzymu PHA syntázy v takovémto početném zastoupení aminokyselin nebylo zjištěno v žádném dalším případě. Enzym je složen především z prolinu, alaninu a bazických aminokyselin [48; 49; 50; 51; 52]

2.3 Biotechnologická produkce kopolymeru P(3HB-co-4HB)

V následujících kapitolách je přiblížena problematika biotechnologické produkce. Hlavním předmětem kapitoly bude biotechnologická syntéza kopolymeru P(3HB-co-4HB), jenž má obrovský potenciál v široké škále aplikací (blíže popsáno v kapitole 2.1.5). V neposlední řadě jsou zmíněny výhody a nevýhody biotechnologické produkce biopolymeru získaného z mikrobiálních producentů. V závěru kapitoly je popsán současný stav biotechnologické produkce kopolymeru P(3HB-co-4HB).

2.3.1 Obecná charakteristika

Biotechnologie je založena na principu využívání živých organismů, přesněji řečeno jejich metabolismu, k tvorbě produktů s přidanou hodnotou. Biotechnologie je multidisciplinární obor zahrnující obory jako jsou mikrobiologie, molekulová genetika, enzymologie, bioinženýrství, biochemie, fyzikální a analytická chemie [53; 54].

Dobrá znalost metabolických drah není ani zdaleka jedinou podmínkou pro úspěšnou produkci cíleného produktu, jelikož biotechnologická produkce je závislá na vícero faktorech. Prvním a nejvíce důležitým faktorem je správný výběr producenta, od něhož se odvíjí zvolené suroviny pro kultivaci a také zajištění podmínek pro optimální růst. Neméně důležitou součástí biotechnologické produkce je i konstrukce výrobního zařízení [53; 54].

Mimo výše zmíněná fakta je nutné vědět, jaké kroky by samotná produkce PHA měla obsahovat a jak jich lze dosáhnout. Biotechnologická produkce je tedy sestavena ze dvou zcela základních fází. Jedná se o fázi tzv. up-stream, kdy se odehrává proces kultivace mikroorganismu. Po up-streamu následuje druhá fáze tzv. down-stream [53; 54].

V prvním a zcela zásadním kroku produkce PHA (up-stream) je, jak již bylo řečeno, důležitý výběr vhodného mikroorganismu. Podmínky, které vybraný mikroorganismus musí splňovat, jsou popsány v kapitole 2.3.3. S prvotní fází biotechnologické produkce je úzce spjata i metoda fermentace, čímž je myšlen mimo jiné i způsob doplňování živin a substrátů. Způsoby, jak lze provádět fermentaci, jsou zmíněny v kapitole 2.3.2 [53; 54].

Druhou fází biotechnologické produkce je proces zvaný down-stream, který obsahuje vícero kroků a bohužel i možných komplikací, které je potřeba při produkci PHA brát v potaz. Jedním z procesů, které zahrnuje biotechnologická část down-streamu, je izolace samotného PHA. Děj, kdy je oddělena biomasa od kultivačního media, je složitý a nákladný. Každý typ PHA vyžaduje svůj postup sestavený na míru. Například u biopolymeru P(3HB) lze při procesu izolace využít chlorovaná rozpouštědla. Naopak v případě poly(3-hexanoátu) a jeho příslušných kopolymerů je nutné provést izolaci za přítomnosti ketonů s krátkými řetězci. Při izolaci P(3HB-co-4HB) se rovněž jako u homopolymeru P(3HB) nejčastěji využívá chloroform. Organická rozpouštědla jsou nejčastěji používána v izolačním postupu, protože jsou v nich PHA rozpustné a jedná se o tzv. extrakci PHA z biomasy [53; 54; 55].

V rámci této metody vzniká za pomoci chlorovaných rozpouštědel viskózní suspenze, která obsahuje mimo PHA i buněčné komponenty (organely, stěny buněk). Zbytky buněk je potřeba odstranit. Mimo buněčné části některé mikroorganismy produkují i nežádoucí látky, jenž pak výsledný produkt PHA, který je určen pro medicínské aplikace, nesmí obsahovat. Extrakční metodou je však lze odstranit a tím je zaručena i vysoká finální čistota produktu. Nevýhodou

využití extrakce je vysoká toxicita vzhledem k použitým organickým rozpouštědlům a potřeba velkého množství chemikálií, což je spojeno i s vysokými energetickými náklady [55].

Další technikou je digesční izolace, která odpovídá opaku extrakce. Tím je myšleno, že v případě extrakce je nutné převést PHA do kapalné fáze, zatímco u digesce je potřeba polymer ponechat v pevné podobě. Digescními chemikáliemi jsou například chlornan sodný nebo chlornan draselný, díky kterým jsou rozpouštěny buněčné komponenty, jenž je nutno odstranit z biomasy. Výhodou digesční metody je schopnost dosáhnout vysoké čistoty produktu poměrně jednoduchým procesem za využití menšího množství chemikálií. Nicméně nevýhodou této metody je velké množství odpadu a částečná depolymerace [55].

Třetí využívanou metodou je mechanická izolace, která dává možnost získání PHA bez přítomnosti jakékoli chemikálie. Jedná se o proces, který vyžaduje například vysokotlakou homogenizaci získaného produktu. Kultivační médium je vháněno za pomoci trysek a vysokého tlaku do prostoru s nižším tlakem, čímž dochází k lyzi buněk. Vysokotlakou homogenizaci je však nutné opakovat, dokud produkt nedosáhne požadované čistoty. Bylo zjištěno, že se při procesu homogenizace uvolňuje DNA, což vede ke ztížení přečištění. Dalšími možnými využitelnými metodami mechanické izolace jsou mletí, ultrasonifikace anebo drcení na lisech. Výhodou mechanické izolace je nízká spotřeba chemikálií a takřka žádná depolymerace [55].

Poslední izolační metodou je superkritická extrakce. Při této metodě se využívá oxid uhličitý, jenž je považovaný za ekonomicky přijatelný a zároveň je bezpečný. Extrakce je založena na rozpustnosti PHA ve vybraném rozpouštědle v tzv. superkritickém stavu, což je stav, kdy se látka nachází na rozhraní všech skupenství. Metoda je účinná za vhodně nastavených kultivačních podmínek (přídavek toluenu nebo hydroxidu sodného) společně s optimální dobou kultivace. Výhodou superkritické izolace je nízká toxicita a zároveň vysoká čistota [55; 56].

Mimo izolační procesy je do fáze down-streamu v biotechnologické produkci zahrnuto i zakoncentrování produktu získaného z předešlé fáze kultivace, a to před procesem izolace. Jednoduše řečeno se jedná o zahuštění kultivačního média, které lze provést různě, avšak nejčastěji je produkt odstředěn nebo filtrován, čímž mimo jiné dochází i k lyzi buněk. V tomto kroku je nutné zajistit, aby vše probíhalo za běžných podmínek. Je potřeba dále inaktivovat příslušné enzymy, které zapříčiňují degradaci produktu. Pro zamezení činnosti depolymeráz je většinou využíván proces zahřátí na 85 °C. Jako poslední krok down-streamu v biotechnologické produkci je uváděna purifikace získaného produktu PHA, která bývá prováděna za pomoci peroxidu vodíku anebo je získaný produkt purifikován izolačními technikami [55].

2.3.2 Klasifikace fermentorů

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.3.1, pro biotechnologickou produkci je velice důležité zajistit optimální podmínky, které jsou pro každý mikroorganismus jiné. Zabezpečení vhodných podmínek (tj. teplota, pH, koncentrace složek) je potřeba pro efektivní a ekonomicky přijatelnou produkci. Zde je cílem dosáhnout požadovaného výtěžku, kdy je mimo jiné velmi důležitý i výběr vhodného bioreaktoru [53; 54].

Bioreaktor je zařízení, v němž probíhají biochemické reakce ve velkých objemech. Využívají se v průmyslové výrobě pro biotechnologickou produkci ve velkokapacitním

měřítku. Ve většině případů jsou bioreaktory válcovitého tvaru. Každý fermentor je opatřen vstupním zařízením, jenž zprostředkovává přísun potřebných surovin, živin a je-li potřeba, tak i kyslíku. Dále fermentor obsahuje i výstupní jednotku, která odvádí odpadní anebo nežádoucí látky. Využitelná objemová kapacita bioreaktoru dosahuje až 3 000 m³ [53; 54].

Základní rozdělení fermentorů závisí na typu mikroorganismu a jeho požadavků na kyslík. Fermentory jsou tedy děleny na aerobní a anaerobní. Další možností, jak lze dělit bioreaktory, je podle typu kultivační nádoby. Zde mohou být zařazeny například chemostaty (pro určení ideálního počtu buněk), které slouží především pro velkoobjemovou kultivaci buněk rostlinného a živočišného původu. Dále jsou to bioreaktory enzymového charakteru. Bioreaktory lze také dělit z hlediska počtu fází, které jsou obsaženy v kultivačním médiu. Mohou být tedy jednofázové až čtyřfázové [53; 54].

Bioreaktory jsou také děleny v závislosti na doplňování živin – vsádkové, semikontinuální a kontinuální. Princip vsádkové kultivační techniky tzv. batch metody je založen pouze na jednom naplnění veškerých potřebných komponent. Je to metoda, která je považovaná za jednu z nejjednodušších způsobů produkce PHA. Jedná se o uzavřený systém, do něhož se v procesu fermentace nezasahuje. Vzniklé produkty jsou izolovány a čištěny až po ukončení celého procesu. Vsádková fermentace je využívána například v případě bakteriálního kmene *Bacillus shackletoni*, který je schopný dosáhnout až 72,6% produkce PHA v sušině. Výše popisovanou kultivační metodou lze vyprodukovat nejen P(3HB), ale i biopolymer P(3HB-co-4HB) [6; 57].

Kultivační technika batch má i nevýhody, mezi které lze zařadit nízkou produkci PHA, což je zapříčiněno maximální povolenou koncentrací poměru dusíku a uhlíku na začátku fermentační procedury. Samotná fermentace je samozřejmě limitovaná fyziologickým typem vybraného mikroorganismu, jenž je schopný akumulace PHA. Z pravidla jsou zde vybírány substráty jako je glukóza, sacharóza a glycerol. S ohledem na dosažení teoretického výtěžku, který se pohybuje okolo 0,48 g PHA na gram biomasy, lze říct, že tato metoda nebude ekonomicky výhodná [57].

V souvislosti se způsobem fermentace PHA je mimo vsádkovou metodu uváděn i semikontinuální neboli fed-batch kultivační systém. Metoda je v prvním kroku založena na stejném principu, jako batch kultivace. To znamená, že kultivační médium obsahuje všechny potřebné složky. Avšak v procesu, kdy je zaznamenávám mikrobiální růst, je systém dokrmován potřebnými živinami, čímž je zajištěn nepřetržitý růst a akumulace produktu v bakteriálních buňkách. Sklizení biomasy je stejné, jako při batch fermentaci, tedy až dosáhne systém požadovaného objemu s ohledem i na délku kultivace, je proces ukončen a biomasa očištěna a zpracována. Mikroorganismus, který využívá fed-batch fermentace, je například *Bacillus megaterium*. Bylo zjištěno, že v případě navýšení C/N poměru a doplnění substrátu (melasa), je bakterie schopna dosáhnout produkce biomasy v řádu 90,7 g/l [6; 57]. Syntéza PHA prováděna fed-batch metodou je tedy zpravidla nastavena na pulzní přívod vícero prekurzorů uhlíku, např. *Cupriavidus necator* rostoucí na sóji a oleji [57].

Třetí a zároveň poslední možností fermentace je kontinuální metoda. Zakládá si na průběžném doplňování potřebných živin. Znamená to, že do systému je nepřetržitě přiváděn nadbytek substrátu a případně živin dle potřeby. Kontinuální fermentace by mohla být potenciálním kandidátem pro syntézu PHA ve velkém měřítku vzhledem k tomu, že lze

fermentaci snadno a kontrolovaně řídit. Avšak problémem kontinuální fermentace je možná kontaminace v průběhu kultivace, která by mohla být zapříčiněna právě neustálým přívodem potřebných látek. Mimo jiné byla provedena studie, která se zaměřila na možnost využití těžkých mastných kyselin jako substrátu (kyselina máselná, propionová, valerátová). Fermentace je proveditelná za předpokladu využití třístupňové fermentace využívající kontinuální systém prostřednictvím vhodně zvolených mikroorganismů (*Plasticumulans acidivorans*, *Zoogloea sp.*) Bylo dosaženo produkce až 70,4 % PHA v buňce [6; 53; 57; 58].

2.3.3 Produkce kopolymeru v současnosti

Mikrobiální kultury disponují jedinečnou schopností bezprostředně reagovat na zásadní změny ve svém okolí díky svým metabolickým dráhám, na což je pokládán obrovský důraz v biotechnologické produkci PHA. Jak již bylo popsáno výše – nevyhovujícím podmínkám se rozumí nutriční nerovnováha způsobená vlivem nízké hladiny fosforu, dusíku, draslíku, kyslíku, hořčíku a současně nadbytek uhlíku [10; 59; 60].

Nicméně se v praxi ukázalo, že syntéza PHA je vysoce nákladná. Výroba unikátního polyesteru, který je alternativou pro petrochemicky vyráběné materiály je ekonomicky nevýhodná. Tato skutečnost přiměla výzkumné skupiny hledat způsob, jak zajistit efektivní a nízkonákladovou produkci biopolyesterů. Což je úzce spjato s výběrem vhodného mikroorganismu a finančně nenáročného zdroje uhlíku. Dle studií až 50 % nákladů biotechnologické produkce činí zdroj uhlíku, který je nutný pro akumulaci PHA bakteriální činností. Proto byly zkoumány různé alternativy, které zajišťují zdroj uhlíkového substrátu z obnovitelných odpadních produktů například z potravinářského průmyslu (např. melasa, rostlinné oleje) nebo z odpadních vod [10; 59; 60].

Další alternativou, jak cenově zpřístupnit velkokapacitní biotechnologickou produkci PHA v souvislosti se zdrojem substrátu, je například pomocí využití mikroorganismu, jenž je schopný zpracovat snadno dostupné sloučeniny uhlíku. Například organotrofní bakteriální kmen *Cupriavidus necator* je schopný syntetizovat PHA z uhlíkatého zdroje získaného z CO₂. Nebo bakteriální kmen *Rhodospirillum rubrum* S1, který zvládne syntetizovat PHA s krátkým řetězcem ze směsi plynu CO a CO₂ [10; 59; 60].

Výběr mikroorganismu závisí nejen na cenově dostupných zdrojích uhlíku, ale i na mnoha dalších stěžejních faktorech. Mezi klíčové parametry při rozhodování, který producent je vhodný pro biotechnologickou produkci, patří především výtěžnost PHA v biomase. Dále je nutné volit takový mikroorganismus, který je nepatogenní. Výhodnými producenty PHA jsou extrémofilní mikroorganismy, které jsou rezistentní vůči kontaminaci díky vyšší optimální teplotě růstu či navýšení ostatních parametrů (vyšší koncentrace soli, pH apod.) [10; 30].

Pro biotechnologickou produkci ve velkokapacitním měřítku je tak nejvhodnější využít takové extrémofilní mikroorganismy, které jsou schopné akumulovat PHA nejlépe v otevřeném prostředí. Ideálem by bylo zvolit tedy takový mikroorganismus, který by současně kladl jen minimální nároky na samotný proces fermentace upřednostňující kontinuální systém tedy doplňování živin dle potřeby. S ohledem na výše zmíněné skutečnosti jsou využitelné například termofilní mikroorganismy. Příkladem termofilního mikroorganismu, který akumuluje až 73 % PHA v sušině, je *Bacillus shackletonii*. Dle studie (2020, Yang Zheng & spol.) jsou pro tyto požadavky vhodné i halofilní mikroorganismy, například bakterie rodu *Halomonas*

bluephagenesis a *Halomonas campaniensis*. Bylo prokázáno, že bakterie zmíněných rodů jsou schopné akumulovat PHA ve větším měřítku. Zároveň by měl vybraný bakteriální kmen produkovat co nejméně vedlejších produktů, které je nutné v dalších krocích separovat od biomasy. Dalším neméně důležitým požadavkem biotechnologické produkce PHA je schopnost regulace bakteriálního metabolismu, díky které se zabrání metabolizaci žádoucího produktu [10; 30].

Na základě experimentálního výzkumu s bakteriálním kmenem *Halomonas bluephagenesis* lze provádět syntézu kopolymeru P(3HB-co-4HB) za nesterilních podmínek. Kopolyester se ve studii syntetizoval kontinuální fermentací za přítomnosti glukózy. Bylo dosaženo 26,3 g/l suchého buněčného výtěžku, přičemž v něm bylo obsaženo 60,5 % kopolymeru P(3HB-co-4HB) a jeho monomerní jednotka 4HB byla zastoupena ze 17,04 % [61].

Další možností, jak docílit snížení nákladů, je začlenění genů kódující například aquaglyceroporin a glycerolkinázu z bakteriálního kmene *E. coli* do chromozomu bakterie *Cupriavidus necator* H16. Rekombinantní kmen by za pomoci integrovaných genů dosáhl vyšší produkce PHA z glycerolu. Bylo experimentálně potvrzeno, že v případě syntézy kopolymeru P(3HB-co-4HB) bakteriálního rodu *Cupriavidus* s dalším vloženým *PhaC* genem bylo dosaženo též vyšší produkce kopolymeru [10; 62].

Jedna ze studií z roku 2019 prezentuje další alternativu na snížení nákladů a současně zvýšení stability produktu během syntézy, a to za pomoci syntetické biologie a aplikace technik metabolického inženýrství. Neboť malý bakteriální objem, se kterým je spojena i nízká hmotnost buňky, představuje značnou komplikaci pro zpracování biomasy PHA. Prostřednictvím výše zmíněných technik s rekombinantním bakteriálním kmenem *Escherichia coli* by bylo tak možné navýšit objem bakteriální buňky, který vede ke značně vyšší výnosnosti produktu [63].

V současné době se využívají pro biotechnologickou produkci bakteriální kmeny jako jsou například *Cupriavidus malaysiensis* a *Cupriavidus necator* H16 vzhledem k vysoké produkci PHA. V případě *Cupriavidus malaysiensis* bylo dle studie (Norhafini & spol., 2019) prokázáno, že kultivace typu fed-batch (viz podkapitola 2.3.2) je vhodnou strategií pro syntézu kopolymeru P(3HB-co-4HB). Při takto zvolené kultivační metodě je možné dosáhnout akumulace PHA až 74–92 hm.%, kde je hojně zastoupena monomerní jednotka 4HB, přesněji z 92–99 mol% [35].

Další studie z roku 2019 poukazují na integraci molekul do struktury polymeru. Metoda vede ke snížení nákladů a dosahuje vyšší akumulace PHA. Přesněji řečeno se jedná o zavedení funkčních skupin, jenž značně ovlivňují výslednou rozmanitost polymerů. Na příslušné monomerní jednotky jsou například navázány skupiny aminosloučenin, benzenu, epoxidu apod. s nenasyčenými vazbami. Zmíněné funkční skupiny umožňují průchod modifikacím. Díky tomu je možné například regulovat hydrofobicitu polymeru a tvořit zesíťované struktury polymerů [10].

Dále je popisována strategie snižování nákladu prostřednictvím změny separace a čištění granulí PHA. Separace a čištění je nedílnou součástí biotechnologické produkce, která je energeticky náročná, nákladná a mnohdy v tomto kroku vznikají ztráty výtěžku. Příkladem strategie je produkce PHA extracelulárně nebo pomocí purifikace prováděnou zvrátý. Avšak nevýhoda této metody spočívá ve ztrátě až poloviny výtěžku PHA [10].

Existuje tedy mnoho metod a alternativ, které vedou k dostupnější cenové kategorii v biotechnologické produkci PHA, díky kterým by tak PHA mohly reálně konkurovat materiálům vyráběným z ropného zdroje.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie, přístrojová technika a bakteriální kmeny

3.1.1 Bakteriální kmeny

V experimentální části diplomové práce byly využity následující bakteriální organismy. Bakterie *Cupriavidus malaysiensis*, konkrétně kmeny se sbírkovými čísly DSM 19416, DSM 19379 a DSM 25816, jež byly zakoupeny společně s bakterií *Thermomonas hydrothermalis* (DSM 14834) v Německu, Leibnitz Institut DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures. Posledním využívaným mikroorganismem je *Aneurinibacillus thermoaerophilus* H1 (CCM 8960) z České sbírky mikroorganismů, jež byl izolovaný na Fakultě chemické, Vysoké učení technické v Brně.

3.1.2 Chemikálie

γ -butyrolakton, Sigma-Aldrich
1,4-butandiol, Sigma-Aldrich
Citrát železito-amonný, Fluka
Dihydrogenfosforečnan draselný, Sigma-Aldrich
Dihydrát chloridu vápenatého, Lach-Ner
Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného, Sigma-Aldrich
Dusičnan amonný, Lach-Ner
EDTA, Lach-Ner
Glycerol, Lach-Ner
Heptahydrát síranu hořečnatého, Sigma-Aldrich
Hydroxid sodný, Lach-Ner
NutrientBroth, Himedia
Chloroform, VWR International
Chlorid amonný, Lach-Ner
Chlorid draselný, Lach-Ner
Chlorid kobaltnatý hexahydrát, Lach-Ner
Chlorid manganatý hexahydrát, Lach-Ner
Chlorid nikelnatý, Lach-Ner
Chlorid sodný, Lach-Ner
Chlorid vápenatý dihydrát, Lachema
Chlorid zinečnatý, Lach-Ner
Chlorid železitý, Lach-Ner
Kyselina boritá, Penta
Kyselina chlorovodíková
Síran amonný, Sigma-Aldrich
Síran měďnatý pentahydrát, Lachema
Trypron, Sigma-Aldrich
Yeast Extract Powder, Himedia

3.1.3 Přístrojová technika

Analytické váhy, Boeco

Autokláv

Centrifuga vysokorychlostní chlazená, HERMLE, Z 36 HK

Centrifuga, Hettich EBA 20

Fermentor RALF-Bioengineering

Inkubátor, LTE Scientific, IP60

Laboratorní váhy, Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH

Laminární box Aura mini, Bio Air Instruments

Magnetická míchačka bez ohřevu, Kartell, TKO

Plynový chromatograf Trace 1300 GC Ultra FID detector, Finnigan; kolona Agilent J&W

SEC chromatograf s kolonou PLgel mixed-C 5 μ m, 300 by 7,5 mm, Agilent Technologies;

detektory: MALS –DAWN HELEOS II, diferenční refraktometr OPTILAB T-REX, Wyatt

Soxtherm, Gerhardt

Temperovaná třepačka (inkubátor), Biosan ES-20

Temperovaná třepačka, Heidolph, Incubator 1000

Termoblok, Stuart, SBH130D

Termostat, LS-35

Vortex, Heidolph Reax Top

Běžné laboratorní sklo a jiné pomůcky.

3.2 Kultivace vybraných mikroorganismů

3.2.1 Příprava kryozkumavek

Bakteriální kmeny jsou uchovávány v podobě kryokultur v tzv. kryozkumavkách. Do kryozkumavek tedy bylo vždy napipetováno 0,5 ml 30% připraveného roztoku glycerolu. Následně byly zkumavky sterilizovány v tlakovém hrnci. Poté do zkumavek bylo napipetováno ve sterilním prostředí 1,0 ml narostlého inokula dané bakteriální kultury. Bakterie jsou tedy uchovávány v 10% glycerolu. Takto připravené kryozkumavky byly uchovány v mrazícím boxu na -80°C .

3.2.2 Příprava inokula

V prvním kroku byla připravena inokula v Erlenmeyerových baňkách (100 ml) a to vždy ve dvou paralelních provedení pro každý bakteriální kmen viz kapitola 3.1.1. Objem komplexního média připraveného z Nutrient Brothu (NB), pro kultivaci bakteriálních kmenů, byl 50 ml. Roztok NB (složení uvedeno v Tabulka 1) byl sterilizován v tlakovém. Následně byly příslušné mikroorganismy, uchovávané v kryozkumavkách, zaočkovány do připraveného inokula ve sterilním prostředí, které bylo zajištěno laminárním boxem Aura mini. Kultivace probíhala na temperované automatické třepačce nastavené na 180 rpm po dobu 24 hodin za optimálních růstové teploty (viz Tabulka 2), jenž každý bakteriální kmen vyžaduje. Nakultivované mikroorganismy byly dále zaočkovány do produkčního minerálního média.

Tabulka 1: Složení NB média.

Složení NB	Koncentrace [g/l]
Beef extract	10
NaCl	5
Pepton	10

Tabulka 2: Optimální růstové teploty pro vybrané bakterie.

Mikroorganismus	Optimální růstová teplota [°C]
<i>Cupriavidus malaysiensis</i> DSM 19379	30
<i>Cupriavidus malaysiensis</i> DSM 19416	30
<i>Cupriavidus malaysiensis</i> DSM 25816	30
<i>Thermomonas hydrothermalis</i> DSM 14834	50
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> H1 CCM 8960	45

3.2.3 Příprava produkčního minerálního média

Dalším krokem byla příprava produkčního minerálního média. Živné inokulum se liší v závislosti na nutričních potřebách daného mikroorganismu. Pro vybrané bakteriální kmeny byly připraveny vždy dvě paralelní média o daném složení (uvedeno v Tab. 3, Tab. 5 a Tab. 7). V 250 ml Erlenmeyerových baňkách o objemu média 100 ml. Dále před sterilizací byl do roztoku obsahujícího příslušné minerály přidán i předem definovaný prekurzor uhlíku o různých koncentracích. Následně bylo do sterilně zhotoveného minerálního média zaočkováno 5 obj. % inokula. Kultivace mikroorganismů probíhala na temperované třepačce nastavené na optimální růstovou teplotu producenta viz kapitola 3.2.2 a 180 rpm po dobu 72 hodin.

Složení produkčního minerálního média pro bakteriální kmeny:

Tabulka 3: *Cupriavidus malaysiensis* (DSM 19379, DSM 19416, DSM 25816).

Složka	Koncentrace [g/l]
KH ₂ PO ₄	1,02
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	11,1
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0
*MES	1 ml

Tabulka 4: Koncentrace substrátu uhlíku pro *Cupriavidus malaysiensis*.

Substrát	γ-butyrolakton	1,4-butandiol
Koncentrace	8 g/l	8 g/l

Tabulka 5: *Thermomonas hydrothermalis* (DSM 14834).

Složka	Koncentrace [g/l]
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	9,0
KH ₂ PO ₄	1,5
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,02
Fe ^{III} NH ₄ CITRÁT	0,012
NH ₄ Cl	1,0
*TES II	1 ml

Tabulka 6: Koncentrace substrátů pro *Thermomonas hydrothermalis*.

Substrát	γ-butyrolakton	1,4-butandiol
Koncentrace	8 g/l	8 g/l

Tabulka 7: *Aneurinibacillus thermoaerophilus* H1 (CCM 8960).

Složka	Koncentrace [g/l]
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	9,0
KH ₂ PO ₄	1,5
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,02
Fe ^{III} NH ₄ CITRÁT	0,0012
NH ₄ Cl	1,0
NH ₄ NO ₃	1,0
Trypton	0,5
**TES II	1 ml

Tabulka 8: Koncentrace substrátů pro *Aneurinibacillus thermoaerophilus* H1

Substrát	Koncentrace [g/l]				
1,4-butandiol	2	4	6	8	20
Glycerol	2	4	6	8	20

Tabulka 9: ** TES II – roztok stopových prvků složení.

Složka	Koncentrace [g/l]
EDTA	50
FeCl ₃	8,3
ZnCl ₂	0,84
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	0,13
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,1
MnCl ₂ · 6 H ₂ O	0,016
H ₃ BO ₃	0,1

Tabulka 10: *MES – roztok stopových prvků složení.

Složka	Koncentrace [g/l]
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	9,7
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	7,8
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,156
CoCl ₂ · 2 H ₂ O	0,119
NiCl ₂ · 4 H ₂ O	0,118
0,1 M HCl	1000 ml

3.3 Screening vybraných mikroorganismů

3.3.1 Optická hustota

Měření optické hustoty na spektrofotometrickém zařízení slouží jako pomocná metoda ke screeningu modelových producentů PHA. Vzhledem k tomu, že se nejedná o přesnou metodu tak naměřené hodnoty slouží pouze jen pro srovnávání. Stanovení optické hustoty probíhalo při vlnové délce 630 nm. Jako blank byl použit roztok PBS (fosfátový pufr). Každé narostlé kultivační médium bylo proměřeno v křemenné kyvetě ve výsledném objemu 1 ml. Zároveň vzorky byly proměřovány, tak aby výsledná absorbance byla menší než 1,0. Naměřené hodnoty byly zprůměrovány a vynásobeny příslušným faktorem ředění.

Tabulka 11: Složení roztoku PBS (pH= 7,42).

Složka	Koncentrace [g/l]
NaCl	8
KCl	0,2
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	1,44
KH ₂ PO ₄	0,24

3.3.2 Gravimetrické stanovení biomasy

Gravimetrické stanovení biomasy PHA je další metodou pro screening producentů kopolymeru. Do centrifugačních zkumavek bylo odpipetováno 10 ml buněčné suspenze. Poté bylo provedeno stáčení biomasy v centrifuze a to po dobu 15 min při 6 000 rpm. Jakmile byla buněčná suspenze stočená v centrifugačním zařízení. Následovalo slití supernatantů a promytí sedimentu 5 ml destilované vody. Suspenze byla znovu stočena a buď byla kvantitativně převedena na Petriho misky, nebo byly dané vzorky ponechány přímo v centrifugačních zkumavkách, jež byly umístěny do sušárny nastavené na 70 °C do úplného usušení biomasy. Posledním krokem bylo zvážení usušené biomasy na analytických vahách.

3.3.3 Příprava vzorků a kalibrační křivky pro GC-FID analýzu

Na přesné stanovení obsahu monomerních jednotek 3HB a 4HB v získané biomase byla využita plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem (GC-FID). Vzorky se připravují následovně: nejprve dochází ke kysele katalyzované hydrolyze polyesteru a následně esterifikaci příslušných monomerních jednotek obsažených v biomase. Esterifikací vznikají těkavé methylestery, jež je možné stanovit metodou plynové chromatografie.

Nejprve byla vysušená biomasa navážena v rozsahu 8–11 mg, a to vždy ve dvou paralelních pokusech a umístěny do tzv. krimpovacích vialek. Následně bylo k takto připraveným vzorkům přidáno vždy 1,0 ml chloroformu a 0,8 ml transesterifikační směsi. Zmíněná směs (interní standard) byla složena z kyseliny benzoové o koncentraci 5 mg/ml v 15% kyselině sírové v methanolu. Následně byly krimpovací vialky uzavřeny a umístěny do termobloku nastaveného na 94 °C po dobu 3 hodin. Po esterifikaci byla provedena neutralizace a extrakce vzorku pomocí 50 mmol/l NaOH a to tak, že byl vzorek převeden do vialek (4 ml) s 0,5 ml hydroxidu sodného. Vialky byly pečlivě uzavřeny a vzorek byl patřičně protřepán. Po chvíli byly jednotlivé fáze roztoku ve vialce viditelně rozděleny, a bylo tak možné odebrat ze spodní fáze 50 µl organické fáze obsahující methylestery do čistých šroubovacích vialek s 900 µl isopropylalkoholu (IPA). Současně byly se vzorky připraveny i standardy, avšak biomasu nahradil čistý kopolymer v koncentracích 2–10 mg/ml.

3.4 Charakterizace kopolymeru analytickými metodami

Pro charakterizaci kopolymeru byla využita vylučovací chromatografie s detektorem měřícím statický rozptyl světla ve více úhlech. Je to analytická metoda známá pod zkratkou SEC-MALS. Metoda poskytuje údaje o střední molekulové hmotnosti a o stupni polydisperzity vybraného polymeru. Pro charakterizaci kopolymeru pomocí SEC-MALS analýzy musely být nejprve připraveny filmy kopolymeru P(3HB-co-4HB) získaného prostřednictvím vybraných producentů viz v podkapitole 3.4.1. Dále byly vzorky filmů proměřeny pomocí GC-FID.

3.4.1 Příprava filmů

Z vysušené biomasy, jejíž příprava je popsána v kapitole 3.3.2, bylo odebráno a naváženo vždy 200 mg vzorku. Navážená biomasa byla převedena do pyrexových zkumavek se šroubovacím víčkem. Následně bylo do zkumavek napipetováno po 10 ml chloroformu. Dále byla provedena extrakce v termobloku nastaveném na 70 °C po dobu 12 hodin. Po ochlazení

na laboratorní teplotu byl daný roztok přefiltrován přes filtrační papír na Petriho misku. Film kopolymeru byl dál charakterizován po vytěkání veškerého chloroformu v digestoři.

Takto byly připraveny biofilmy z biomasy producentů *Thermomonas hydrothermalis* DSM 14834 a *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379, DSM 19416, DSM 25816.

Další metoda, díky níž se získaly fólie z biomasy producenta *Aneurinibacillus thermoaerophilus* H1, byla extrakce pomocí přístroje Soxtherm. Příprava vzorků pro tuto metodu byla následující, bylo naváženo 5 vzorků biomasy (o různých koncentracích 2, 4, 6, 8, 20 g/l), a to vždy po 1 g. Tyto vzorky byly dány do patrony, kde byly překryty souvislou vrstvou vaty. Patrona se vzorkem a vatou byla vložena do skleněné nádoby přístroje Soxtherm. Poté se do skleněné nádoby nalilo cca 140 ml organického rozpouštědla (chloroform). Po dokončení extrakce byly jednotlivé extrakty převedeny na Petriho misky, kde byly zbytky rozpouštědla odpařeny a došlo ke vzniku filmu.

3.4.2 Příprava vzorků na SEC-MALS analýzu

Připravené filmy (viz kapitola 3.4.1) byly rozpuštěny v chloroformu na výslednou koncentraci 2 mg/ml. Vzorky byly připraveny do vialek o objemu 1,5 ml. Vialky byly pečlivě uzavřeny a umístěny do termobloku po dobu 10 min nebo do doby, kdy byly filmy rozpuštěny. Následně byly roztoky ochlazeny na laboratorní teplotu. Poté byly vzorky přefiltrovány do čistých vialek přes nylonový filtr s přesně definovanou porozitou tj. 0,45 μm .

3.5 Optimalizace substrátu a koncentrace vybraného kmene

Pro následnou kultivaci a produkci PHA v bioreaktoru byl vybrán vhodný bakteriální kmen (*Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379). Dále bylo potřeba zvolit optimální prekursor uhlíku společně s koncentrací. V experimentu byly testovány dva substráty (1,4-butandiol a γ -butyrolakton) v následující koncentrační řadě 4, 8, 12 g/l. Pro výběr optimálního substrátu a koncentrace bylo nejprve připraveno inokulum viz postup uvedený v kapitole 3.2.2. Po 24 hodinách bylo inokulum přeočkováno do předem připraveného minerálního produkčního média dle postupu v kapitole 3.2.3 pro vybraný bakteriální kmen *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379. Po 72 hodinách kultivace byla změřena optická hustota podle kapitoly 3.3.1 a následně bylo odebráno 10 ml kultury do centrifugačních zkumavek pro gravimetrické stanovení biomasy viz kapitola 3.3.2. Následně z vysušené a odebrané biomasy byly naváženy vzorky na plynovou chromatografii dle postupu v kapitole 3.3.3. Vzorky byly zanalyzovány a z výsledků plynové chromatografie byla vybrána koncentrace pro optimální produkci kopolymeru.

3.6 Kultivace a produkce PHA ve fermentoru

Kultivace probíhala v bioreaktoru značky RALF-Bioengineering vsádkovou metodou kultivace. Celkově byla provedena 2 měření za stejných podmínek pro následné srovnání a znázornění opakovatelnosti.

Pro cílenou produkci PHA bylo potřeba nejprve přichystat inokulum, jež bylo připraveno dle postupu uvedeného v kapitole 3.2.2. Inokulum bylo po 24 hodinách zaočkováno do produkčního minerálního média o objemu 0,5 l připraveného dle postupu v kapitole 3.2.3 pro *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379. Použitá koncentrace u γ -butyrolaktonu byla 12 g/l.

Před začátkem měření byla fermentační nádoba vysterilizována v autoklávu společně se všemi potřebnými komponenty, a to včetně předem namíchaného produkčního minerálního média o objemu 4,5 l. Po sterilizaci byly kalibrovány elektrody pro měření pH. Dále byla připojena i teplotní sonda a přívod chladiče společně s přísunem kyslíku. Byly nastaveny veškeré kultivační podmínky. Do fermentační nádoby bylo sterilně přeočkováno 0,45 l předem připraveného narostlého média a dále roztok stopových prvků MES o objemu 4,5 ml.

Kultivace tedy probíhala po dobu 24 hodin, a to při 30 °C a pH 7. Přívod kyslíku byl 300 cm³/min, přičemž obsah rozpuštěného kyslíku činil 20 % a míchadlo zajišťující aeraci bylo zpočátku nastaveno na 450 rpm.

V době, kdy probíhala fermentace, byly prováděny odběry v předem určených časových intervalech tj. 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 22, 24 hodin pro první experiment a pro druhý v intervalech 0, 2, 4, 6, 8, 11, 21, 23, 24 hodin.

V procesu kultivace byly odebírány vždy 2 paralelní vzorky o objemu 10 ml pro stanovení biomasy gravimetrickou metodou. Dále se postupovalo stejně jako v kapitole 3.3.2. Z odebrané a vysušené biomasy byly připraveny vzorky na plynovou chromatografii (postup je shodný s kapitolou 3.3.3).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Screening vybraných mikroorganismů

4.1.1 Spektrofotometrické stanovení optické hustoty

Měření optické hustoty jednotlivých narostlých minerální produkčních médií bylo měřeno při vlnové délce 630 nm. Jako blank byla použita destilovaná voda. Každý vzorek byl vhodně zředěn na objem 1 ml v kyvetě. Vzorky u bakteriálních kmenů *Thermomonas hydrothermalis* a *Aneurinibacillus thermoaerophilus* H1 byly ředěny 50krát a u *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19416, DSM 19379, DSM 25816 20krát. Optická hustota, která byla proměřena u každého vzorku 3krát, byla zprůměrována a následně vynásobena odpovídajícím ředěním. Výsledky měření jsou shrnuty v Tab. 12.

Tabulka 12: Naměřené hodnoty optické hustoty vynásobené faktorem ředění.

Bakteriální kmen	Zdroj uhlíku	c [g/l] substrátu	OD630 [-]
CCM 8960	Glycerol +1,4-butandiol	2 + 4	11,47 ± 0,06
	Glycerol +1,4-butandiol	4 + 4	6,32 ± 0,04
	Glycerol +1,4-butandiol	6 + 4	11,50 ± 0,02
	Glycerol +1,4-butandiol	8 + 4	10,50 ± 0,04
	Glycerol +1,4-butandiol	20 + 4	10,60 ± 0,13
DSM 14834	1,4-butandiol	8	0,21 ± 0,05
	γ-butyrolakton	8	6,60 ± 0,05
DSM 19379	1,4-butandiol	8	46,20 ± 0,02
	γ-butyrolakton	8	45,63 ± 0,01
DSM 19416	1,4-butandiol	8	35,37 ± 0,01
	γ-butyrolakton	8	46,65 ± 0,01
DSM 25816	1,4-butandiol	8	26,65 ± 0,04
	γ-butyrolakton	8	46,82 ± 0,01

Z výsledků vyplývá, že nejmenší nárůst vykazoval bakteriální kmen *Thermomonas hydrothermalis* DSM 14834 s obsahem substrátu 1,4-butandiolu (8 g/l). Bakteriální kmen byl kultivován i s přidavkem γ-butyrolaktonu (8 g/l), kde byla naměřena hodnota optické hustoty 6,60 ± 0,05, nicméně i tak byl nárůst biomasy nízký v porovnání s dalšími producenty.

V případě bakteriálního kmene *Aneurinibacillus thermoaerophilus* H1 CCM 8960 byl nejmenší nárůst kultury zaznamenán v případě prekursoru uhlíku glycerolu (4 g/l) a 1,4-butandiolu (4 g/l), naměřená hodnota byla 6,32 ± 0,04. Nejvyšší nárůst u tohoto kmene byl při koncentraci glycerolu 6 g/l a 1,4-butandiolu (4 g/l), tj. 11,50 ± 0,02.

Z výsledků dále vyplývá, že bakterie rodu *Cupriavidus malaysiensis* dosáhla největšího nárůstu kultury (46,82 ± 0,01), který byl detekován u kmene DSM 25816 s přidavkem γ-butyrolaktonu (8 g/l). Naopak v případě použití substrátu 1,4-butandiolu u stejného kmene byl

nárůst nejmenší ($26,65 \pm 0,04$). Další dva kmeny (DSM 19416 a DSM 19379) se oproti DSM 25816 nijak výrazně od sebe nelišily v případě přidavku γ -butyrolaktonu.

4.1.2 Gravimetrické stanovení biomasy

Vysušená biomasa z odebraných vzorků kultur o objemu 10 ml byla zvážena a to ve 3 paralelních pokusech (viz v podkapitole 3.3.2). Výsledná biomasa byla přepočítána na příslušnou hodnotu v g/l. Výsledné hodnoty biomasy jsou znázorněny v Tab. 13.

Tabulka 13: Naměřené hodnoty pro stanovení biomasy pomocí gravimetrie.

Bakteriální kmen	Zdroj uhlíku	c [g/l] substrátu	Biomasa [g/l]
CCM 8960	Glycerol +1,4-butandiol	2 + 4	$2,17 \pm 0,02$
	Glycerol +1,4-butandiol	4 + 4	$1,37 \pm 0,01$
	Glycerol +1,4-butandiol	6 + 4	$2,19 \pm 0,02$
	Glycerol +1,4-butandiol	8 + 4	$2,07 \pm 0,02$
	Glycerol +1,4-butandiol	20 + 4	$1,62 \pm 0,02$
DSM 14834	1,4-butandiol	8	$1,70 \pm 0,01$
	γ -butyrolakton	8	$0,21 \pm 0,05$
DSM 19379	1,4-butandiol	8	$2,49 \pm 0,02$
	γ -butyrolakton	8	$5,71 \pm 0,06$
DSM 19416	1,4-butandiol	8	$7,01 \pm 0,07$
	γ -butyrolakton	8	$4,15 \pm 0,07$
DSM 25816	1,4-butandiol	8	$5,85 \pm 0,04$
	γ -butyrolakton	8	$1,32 \pm 0,01$

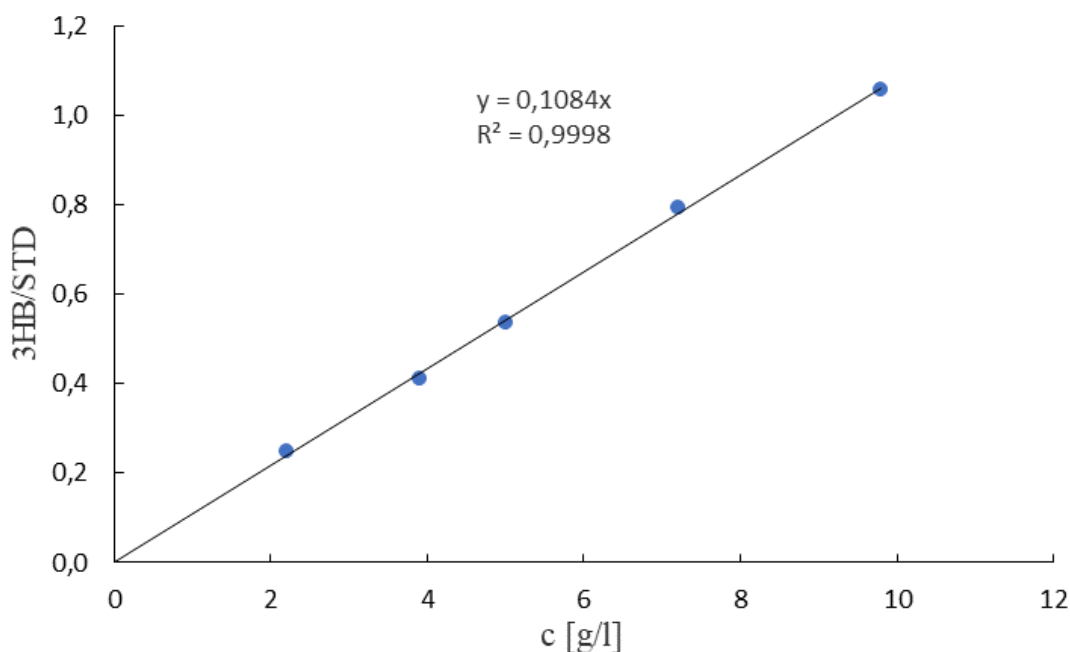
Z naměřených hodnot získaných pomocí gravimetrického stanovení bylo zjištěno, že bakteriální kmen *Thermomonas hydrothermalis* (DSM 14834), který při kultivaci obsahoval prekurzor 4HB γ -butyrolakton, vykazoval téměř nulovou produkci celkové biomasy ($0,21 \pm 0,05$). Tato bakterie celkově dosahuje nízkých hodnot i s 1,4-butandiolem jako zdrojem uhlíku, což se shoduje s výsledky ze spektrofotometrického stanovení biomasy v předešlé kapitole.

Bakteriální kmen *Cupriavidus malaysiensis* DSM 25816 s prekurzorem γ -butyrolaktonem (8 g/l) dosahoval z vybraných producentů také nízké produkce biomasy ($1,32 \pm 0,01$ g/l). Oproti tomu *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19416 s obsahem 1,4-butandiolu dosahoval nejvyšší výtěžnosti biomasy a to $7,01 \pm 0,07$ g/l. Dále bylo zjištěno, že za vhodné kandidáty pro zamýšlený proces lze považovat *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379 s γ -butyrolaktonem ($5,71 \pm 0,06$ g/l) a DSM 25816 při kultivaci na 1,4-butandiolu ($5,85 \pm 0,04$ g/l). Poslední bakterie *Aneurinibacillus thermoaerophilus* H1 CCM 8960 dosahovala celkově nízké produkce biomasy, tj. v rozmezí od $1,37 \pm 0,01$ g/l do $2,19 \pm 0,02$ g/l.

4.1.3 Stanovení PHA pomocí GC-FID

Vzorky získané z vysušené biomasy každého kmene byly charakterizovány pomocí plynové chromatografie. Díky GC-FID analýze bylo zjištěno zastoupení 3HB a 4HB monomerní jednotky v g/l a celková koncentrace PHA (g/l). Výsledky jsou shrnuty v Tab. 14.

Před samotným měřením bylo potřeba proměřit kalibrační řadu (viz Obrázek 7) pro další výpočty na přesné stanovení obsahu monomerních jednotek. Kalibrační řada byla změřena v koncentračním rozmezí 2–10 g/l z komerčního vzorku P(3HB).



Obrázek 7: Kalibrační křivka pro stanovení PHA pomocí GC-FID.

Z naměřených hodnot plynové chromatografie znázorněných v Tab. 14 vyplývá, že nejlepší produkce PHA ($3,08 \pm 1,23$ g/l) dosahovala bakterie *Cupriavidus malaysiensis*, DSM 19379. Bakteriální kmen *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19416 se substrátem 1,4-butandiol sice dosahoval nejvyšší produkce celkové biomasy podle gravimetrického stanovení, nicméně akumulace PHA byla oproti DSM 19379 nízká ($1,34 \pm 0,11$ g/l). Vzorky bakteriálního kmene *Thermomonas hydrothermalis* (DSM 14834) s prekurzorem γ -butyrolaktonem nemohly být proměřeny kvůli nedostatečnému množství izolované biomasy. Stejná bakterie s obsahem substrátu 1,4-butandiolu dosahovala nejnižší produkce PHA ($0,40 \pm 0,11$ g/l).

Bakterie *Thermomonas hydrothermalis* s prekurzorem 1,4-butandiol je dle naměřených hodnot nejlepším producentem monomerní jednotky 4HB v kopolyměru P(3HB-co-4HB), nicméně celková výtěžnost PHA je velice nízká, což bohužel zastiňuje výhodné složení kopolyměru.

Tabulka 14: GC-FID analýza biomasy.

Bakteriální kmen	Zdroj uhlíku	Koncentrace substrátu [g/l]	Biomasa [g/l]	PHA [g/l]	4HB [mol.%]	PHA [hm.%]
CCM 8960	Glycerol +1,4-butandiol	2 + 4	2,17 ± 0,02	0,84 ± 0,04	64,66 ± 4,55	38,71 ± 1,96
	Glycerol +1,4-butandiol	4 + 4	1,37 ± 0,01	0,47 ± 0,05	6,66 ± 1,03	34,58 ± 3,63
	Glycerol +1,4-butandiol	6 + 4	2,19 ± 0,02	0,83 ± 0,14	7,81 ± 8,94	38,04 ± 6,52
	Glycerol +1,4-butandiol	8 + 4	2,07 ± 0,02	0,98 ± 0,04	0,79 ± 0,12	47,20 ± 1,80
	Glycerol +1,4-butandiol	20 + 4	1,62 ± 0,02	0,65 ± 0,09	0,78 ± 0,11	40,04 ± 5,24
DSM 14834	1,4-butandiol	8	1,70 ± 0,01	0,40 ± 0,11	81,14 ± 5,36	23,73 ± 6,54
	γ-butyrolakton	8	0,21 ± 0,05	-	-	-
DSM 19379	1,4-butandiol	8	2,49 ± 0,02	0,77 ± 0,04	18,22 ± 2,02	30,81 ± 1,51
	γ-butyrolakton	8	5,71 ± 0,06	3,08 ± 1,23	9,38 ± 0,07	53,95 ± 21,54
DSM 19416	1,4-butandiol	8	7,01 ± 0,07	1,34 ± 0,11	15,73 ± 1,27	19,17 ± 1,55
	γ-butyrolakton	8	4,15 ± 0,07	1,70 ± 0,12	9,68 ± 1,67	40,95 ± 2,91
DSM 25816	1,4-butandiol	8	5,85 ± 0,04	0,99 ± 0,01	7,65 ± 0,18	16,88 ± 0,10
	γ-butyrolakton	8	1,32 ± 0,01	0,41 ± 0,06	9,59 ± 0,16	30,63 ± 4,26

4.1.4 Stanovení molekulové hmotnosti polymerů

Pomocí SEC-MALS analýzy byly určeny hmotnostní střední a číselně střední molekulové hmotnosti připravených PHA materiálů. Byla zjištěna polydisperzita pomocí podílu molekulových hmotností příslušných polymerů, která definuje velikost makromolekul v daném vzorku získaných z příslušných kultur (M_w/M_n).

Vzorky byly proměřeny ve dvou paralelních provedeních a z výsledných dat byly vypočteny průměrné hodnoty, které jsou přehledně shrnuty v Tab. 15.

Z naměřených hodnot lze vyčíst, že nejlepší výsledek molekulové hmotnosti (M_w) celkově vykazuje fólie bakterie *Cupriavidus malaysiensis* v případě obou substrátů. Přesněji řečeno kmen DSM 19416 s obsahem substrátu γ -butyrolaktonu (8 g/l), a to $676,60 \pm 14,07$ kDa. Oproti tomu nejnižšího výsledku molekulové hmotnosti dosáhl kmen CCM 8960 s přidavkem glycerolu a 1,4-butandiolu o koncentraci 20 g/l ($36,65 \pm 0,57$ kDa). Vzorky získané z bakterie *Aneurinibacillus thermoaerophilus* H1 (mimo vzorek s přidavkem glycerolu ($c=4$ g/l)) vykazují optimální polydisperzitu společně s *Thermomonas hydrothermalis*. Zároveň výsledky získané pomocí bakterie *Aneurinibacillus thermoaerophilus* H1 naznačují, že se zvyšující se koncentrací glycerolu se snižuje hodnota M_w , což potvrzuje pozorování popsané v práci Pernicová & kol. 2020 [42]. Hodnota $222,43 \pm 2,05$ kDa je nejspíše ovlivněna špatnými podmínkami, které byly zapříčiněny automatickou třepačkou. Hodnotu polydisperzity mikrobiálních PHA lze považovat za ideální pro další zpracování do hodnoty 1,5. To znamená, že u vzorků bakterie *Cupriavidus malaysiensis* je tato hodnota vysoká a materiál je tak značně nehomogenní.

Tabulka 15: SEC-MALS analýza vzorků.

Bakteriální kmen	Zdroj uhlíku	Koncentrace substrátu [g/l]	M_w [kDa]	PDI [-]
CCM 8960	Glycerol +1,4-butandiol	2 + 4	$171,43 \pm 0,32$	$1,38 \pm 0,01$
	Glycerol +1,4-butandiol	4 + 4	$222,43 \pm 2,05$	$3,15 \pm 0,14$
	Glycerol +1,4-butandiol	6 + 4	$47,45 \pm 2,69$	$1,15 \pm 0,02$
	Glycerol +1,4-butandiol	8 + 4	$48,60 \pm 1,20$	$1,25 \pm 0,07$
	Glycerol +1,4-butandiol	20 + 4	$36,65 \pm 0,57$	$1,25 \pm 0,04$
DSM 14834	1,4-butandiol	8	$112,98 \pm 0,88$	$1,44 \pm 0,03$
	γ -butyrolakton	8	-	-
DSM 19379	1,4-butandiol	8	$566,30 \pm 4,95$	$3,49 \pm 0,51$
	γ -butyrolakton	8	$572,36 \pm 1,66$	$3,86 \pm 0,55$
DSM 19416	1,4-butandiol	8	$434,25 \pm 1,91$	$2,61 \pm 0,47$
	γ -butyrolakton	8	$676,60 \pm 14,07$	$3,22 \pm 0,20$
DSM 25816	1,4-butandiol	8	$338,10 \pm 12,98$	$6,23 \pm 0,19$
	γ -butyrolakton	8	$494,50 \pm 8,06$	$3,34 \pm 0,18$

4.2 Optimalizace substrátu vybraného kmene

Na základě screeningu vybraných mikroorganismů (viz kapitola 4.1) bylo zjištěno, že nejvhodnějším producentem kopolymeru P(3HB-co-4HB) je bakteriální kmen *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379. Kmen je vhodným kandidátem kvůli vysoké výtěžnosti celkového PHA za současně vysokého nárůstu biomasy, jak již bylo popsáno v kapitole 4.1.3.

Stejně jako u screeningu producentů PHA, bylo potřeba i v případě optimalizace substrátu a jeho koncentrace provést gravimetrické stanovení biomasy a spektrofotometrické stanovení optické hustoty kultury vybraného mikroorganismu. V experimentu proto byly testovány dva prekurzory - 1,4-butandiol a γ -butyrolakton o koncentracích 4, 8, 12 g/l. Stejně jako v kapitole 4.1.1 byla nejprve po 72 hodinách změřena optická hustota kultury a poté bylo odebráno 10 ml kultury do centrifugačních zkumavek pro gravimetrické stanovení biomasy. Z vysušené biomasy byly naváženy vzorky a zanalyzovány pomocí plynové chromatografie.

V Tab. 16 jsou shrnuty naměřené hodnoty optické hustoty kultury, která byla měřená při 630 nm. Jak je patrné z provedeného experimentu, tak největší nárůst ($24,35 \pm 0,01$) byl detekován právě při substrátu γ -butyrolaktonu o koncentraci 12 g/l. V případě tohoto substrátu lze vidět (viz Tab. 16), že nárůst kultur produkčního minerálního média roste se zvyšující se koncentrací uhlíkatého substrátu. Nejvyšší nárůst byl naměřen v případě substrátu 1,4-butandiolu při koncentraci 8 g/l, a to konkrétně $16,60 \pm 0,02$.

Z výsledků plynové chromatografie (znázorněných v Tab. 17) vyplývá, že vybraný bakteriální kmen *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379 produkuje nejvíce PHA v případě využití zdroje uhlíku γ -butyrolaktonu s koncentrací 12 g/l, celkové PHA je $6,06 \pm 0,71$ g/l, což je téměř dvojnásobek oproti prekurzoru 1,4-butandiolu. Porovnáme-li opět naměřené hodnoty z plynové chromatografie u screeningu mikroorganismů (viz podkapitola 4.1.3 v Tab 14) zjistíme, že v případě prekurzoru 4HB 1,4 γ -butyrolakton (8 g/l) se naměřené hodnoty biomasy a PHA od sebe liší cca o 1 g/l v obou případech, dá se tedy říct, že získané hodnoty korelují. U 1,4-butandiolu o stejné koncentraci se výsledky biomasy od sebe liší asi o 2 g/l a u PHA zhruba o 1 g/l.

Prekurzor 4HB 1,4-butandiol (12 g/l) vede sice k vyšší produkci monomerní jednotky 4HB ($14,67 \pm 0,32$ mol.%), nicméně výsledná produkce PHA je pouze $1,74 \pm 0,03$ g/l, což představuje nízkou produkci celkového výtěžku PHA. Z tohoto důvodu nebyl zvolen 1,4-butandiol jako substrát za účelem kultivace polymeru ve fermentoru, ale γ -butyrolakton, který nevykazoval tak vysokou inhibici růstu kultury.

Dle výsledků plynové chromatografie byl tedy vybrán bakteriální kmen *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379 pro cílenou produkci kopolymeru za předpokladu využití uhlíkatého zdroje γ -butyrolaktonu o koncentraci 12 g/l.

Tabulka 16: Gravimetrické stanovení biomasy a optické měření hustoty pro optimalizaci koncentrace substrátu vzorku *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379.

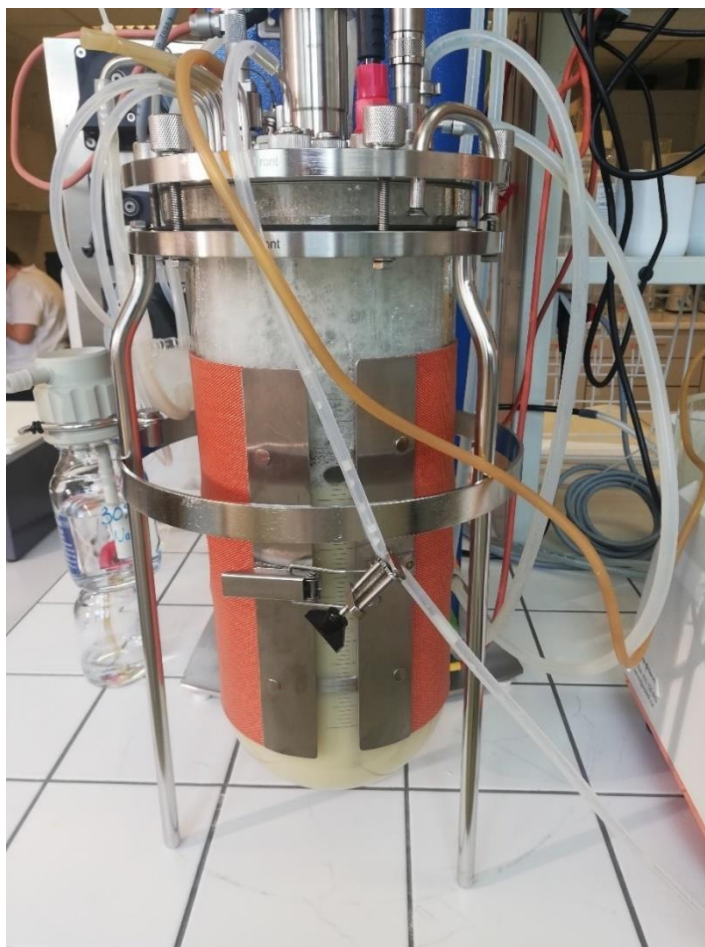
Bakteriální kmen	Zdroj uhlíku	Koncentrace substrátu [g/l]	Biomasa [g/l]	OD630 [-]
DSM 19379	1,4-butandiol	4	2,06 ± 0,00	9,62 ± 0,01
		8	4,95 ± 0,00	16,60 ± 0,02
		12	4,52 ± 0,02	15,47 ± 0,07
	γ-butyrolakton	4	2,66 ± 0,00	8,13 ± 0,01
		8	4,00 ± 0,00	15,82 ± 0,02
		12	4,61 ± 0,00	24,35 ± 0,01

Tabulka 17: GC-FID analýza pro optimalizaci koncentrace substrátu vzorku *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379.

Bakteriální kmen	Zdroj uhlíku	Koncentrace substrátu[g/l]	Biomasa [g/l]	Celkové PHA [g/l]	4HB [mol.%]	PHA [hm.%]
DSM 19379	1,4-butandiol	4	2,06 ± 0,00	0,80 ± 0,12	11,77 ± 0,33	38,75 ± 5,99
		8	4,95 ± 0,00	1,69 ± 0,22	13,68 ± 0,05	34,05 ± 4,46
		12	4,52 ± 0,02	1,74 ± 0,03	14,67 ± 0,32	38,50 ± 0,77
	γ-butyrolakton	4	2,66 ± 0,00	0,68 ± 0,14	8,24 ± 0,03	25,72 ± 5,10
		8	4,00 ± 0,00	1,21 ± 0,73	7,66 ± 0,59	30,38 ± 18,33
		12	4,61 ± 0,00	2,99 ± 0,33	5,85 ± 0,04	64,79 ± 7,15

4.3 Kultivace a produkce PHA ve fermentoru

Kultivace vybraného bakteriálního kmene *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379 pomocí fermentoru RALF-Bioengineering byla provedena celkem dvakrát kvůli ověření opakovatelnosti a reprodukovatelnosti výsledků. Kultivační podmínky jsou popsány v kapitole 3.6. Objem zaočkovaného produkčního minerálního média byl 4,5 l a jako substrát byl zvolen γ -butyrolakton o koncentraci 12 g/l vzhledem k výsledkům v předchozí části experimentu (viz kapitola 4.1). Naměřená data (v Tab. 17) ukázala, že vybraný mikroorganismus je schopný nejvyšší produkce celkových PHA při této koncentraci a prekurzoru uhlíku.

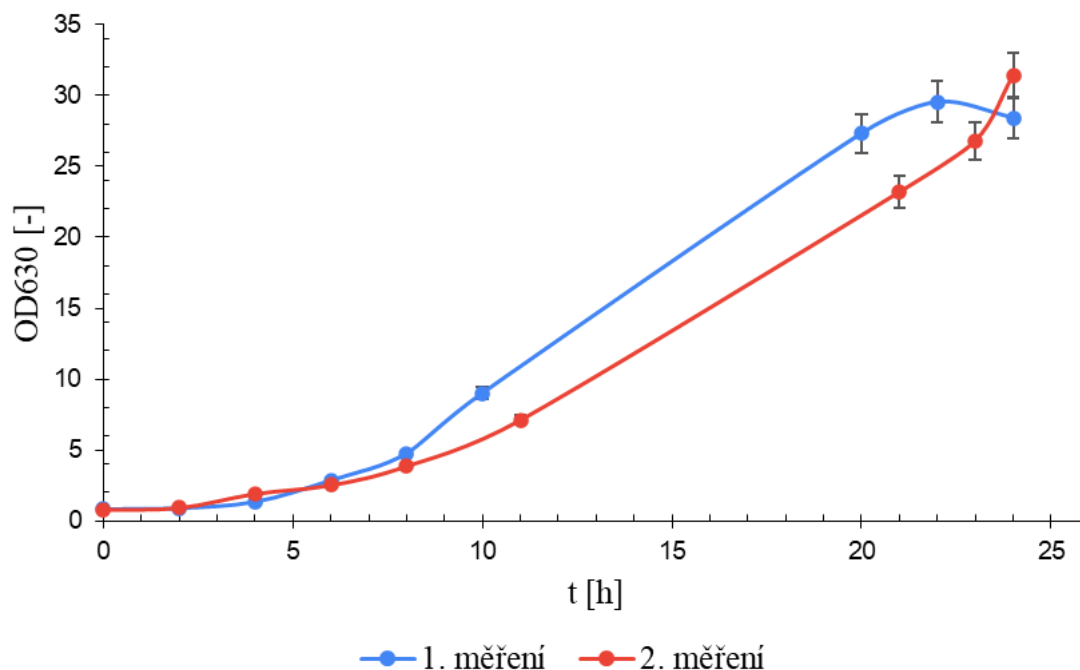


Obrázek 8: Kultivace bakteriálního kmene *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379 po 24 hodinách.

4.3.1 Spektrofotometrického stanovení optické hustoty

Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.6, byly prováděny odběry kultivačního média během experimentu ve stanovených časových intervalech. U každého takto odebraného vzorku se měřila optická hustota při 630 nm. Z grafu na Obr. 9 lze vyčíst, že bakteriální kmen *Cupriavidus malaysiensis* se nachází do 3. hodiny kultivační doby v lag-fázi. V době lag-fáze se bakterie adaptuje na dané kultivační prostředí a podmínky a nedochází tak k cílené akumulaci PHA. Od 10. hodiny kultivační doby nastává doba exponenciální růstové fáze a dochází tak k nejefektivnější produkci PHA v době cca 15.–16. hodiny kultivace. Od 22. hodiny dochází

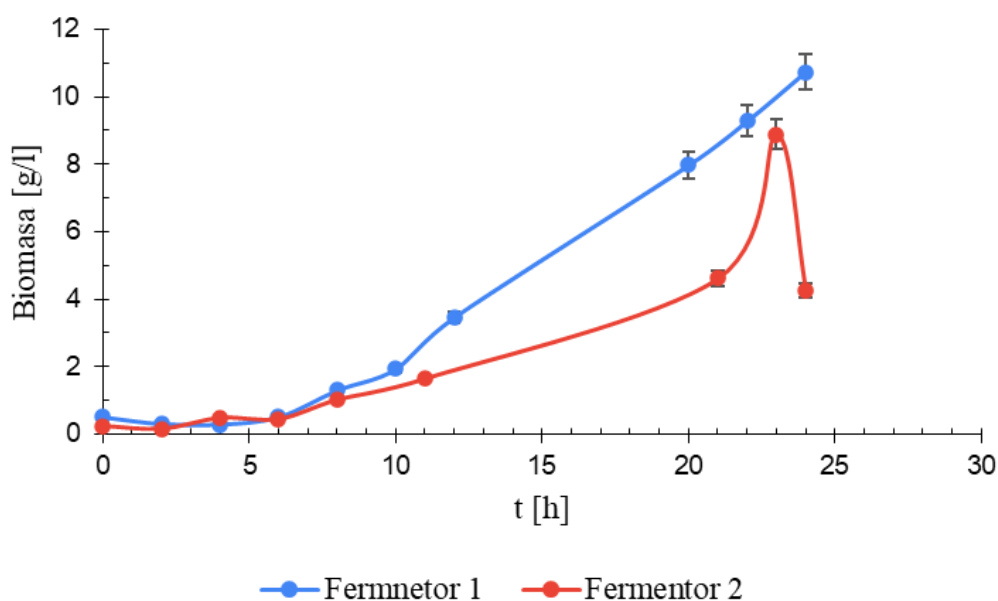
ke stacionární fázi růstové křivky. Růstová křivka nemá klasicky známý esovitý tvar, což je patrně zapříčiněno chybějícími odběry v nočních hodinách experimentu.



Obrázek 9: Růstová křivka v závislosti na čase *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379.

4.3.2 Gravimetrické stanovení PHA v závislosti na čase

Podobně jako v případě výběru vhodného substrátu (viz kapitola 3.5), se i u vzorků, získaných z bioreaktoru během kultivace v přesně daném čase stanovovala biomasa pomocí gravimetrické metody. Vzorky byly proměřeny vždy ve 2 paralelních provedeních. Jak lze vidět v grafu na Obr. 10, tak v případě prvního experimentu provedeného v bioreaktoru dochází od 10. hodiny měření k vyšší produkci celkové biomasy, a to při obou provedených experimentech.



Obrázek 10: Gravimetrické stanovení biomasy získané z bioreaktoru v závislosti na čase.

Jak můžeme vidět na Obr. 10, v případě prvního bioreaktoru došlo okolo 24. hodiny měření k nejvyšší produkci PHA. V druhém experimentu je však nejvyšší hodnota produkce biomasy zaznamenána ve 23. hodině kultivace, jak lze rovněž vidět na Obr. 10. Hodnota je o něco nižší, než je tomu u prvního pokusu, což může být zřejmě zapříčiněno změnami kultivačních podmínek v bioreaktoru. Mimo to změna barvy produkčního média mohla zapříčinit náhlý pokles nárůstu ke konci měření vzhledem k tomu, že médium na konci měření začalo mít nestandardní nazelenalou barvu, viz Obrázek 11.



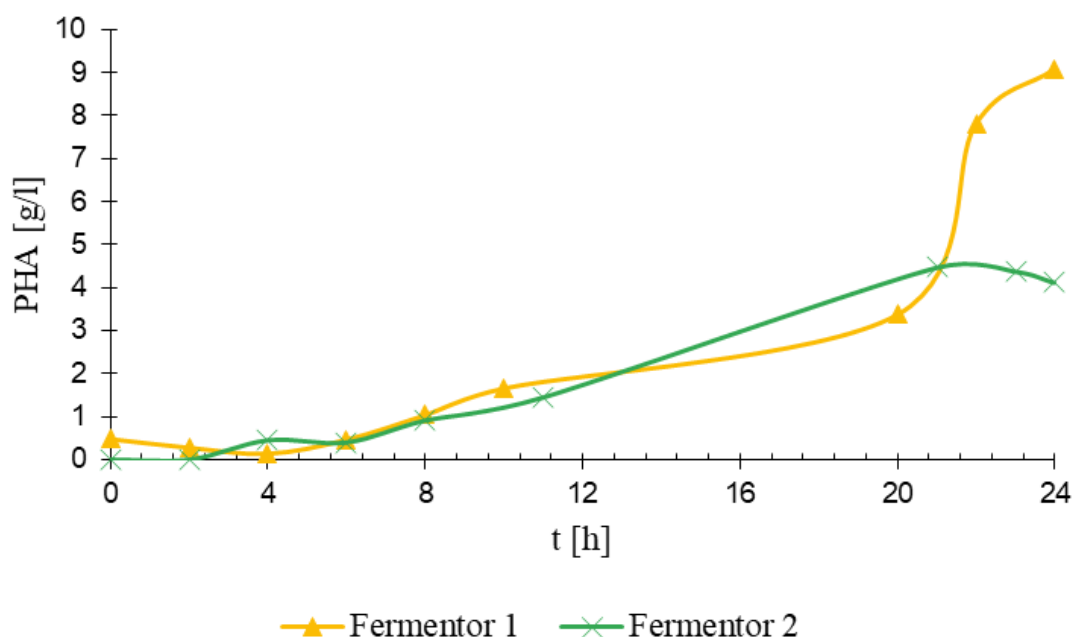
Obrázek 11: Minerální produkční médium po kultivaci 2. experimentu.

4.3.3 GC-FID analýza vzorků kultivovaných v bioreaktoru

Pro stanovení obsahu PHA a monomerních jednotek kopolymeru P(3HB-co-4HB) byla provedena GC-FID analýza vysušené biomasy vyprodukované studovaným kmenem v bioreaktoru. Z Tab. 18, kde jsou shrnuty výsledky prvního fermentoru, je patrné, že nejvyššího výtěžku celkového PHA dosáhl kmen ve 24. hodině kultivační doby (tj. $9,06 \pm 0,02$ g/l), nicméně v tu dobu byla prokázána i nízká produkce monomerní jednotky 4HB $2,41 \pm 0,23$ mol.%. V případě, že je žádoucí kopolymer s vyšším obsahem zmíněného monomeru, tak v 8. hodině kultivační doby je dosaženo nejvyšší produkce 4HB monomerní jednotky ($19,8 \pm 2,94$ mol.%) nicméně výtěžek celkového PHA je v tomto kultivačním čase nízký ($1,04 \pm 0,04$ g/l).

Stejně jako z výsledků u gravimetrického stanovení je v případě naměřených dat pomocí plynové chromatografie vidět, že se produkce PHA zvyšuje až od 20. hodiny měření, do té doby se naměřené hodnoty od sebe výrazně neliší.

Z druhého experimentu vyplývá, že bakteriální kmen *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379 v prvních 2 hodinách dosáhl téměř nulové výtěžnosti polymeru v biomase. Dále tato metoda potvrdila, že nejvyšší výtěžnost PHA byla zaznamenána po 20. hodině kultivace, konkrétně v 21. hodině kultivace, a to $4,47 \pm 0,00$ g/l, jak lze vidět v Tab. 19. Avšak obsah monomerní jednotky 4HB byl nízký $3,22 \pm 0,03$ mol.%. Nejvyššího procentuálního zastoupení 4HB monomerní jednotky je dosaženo v 11. hodině kultivace ($11,32 \pm 7,83$ mol.%). Na Obr. 12 lze přehledně vidět nárůst množství PHA v kultivačním čase obou fermentorů.



Obrázek 12: Závislost produkce PHA na čase.

Tabulka 18: GC-FID analýza vzorků z prvního fermentoru.

Bakteriální kmen	Zdroj uhlíku	t [h]	Biomasa [g/l]	PHA [g/l]	4HB [mol.%]	PHA [hm.l%]
DSM 19379	γ -butyrolakton	0	$0,51 \pm 0,01$	0,48	4,67	95,33
		2	$0,31 \pm 0,00$	0,28	8,59	91,41
		4	$0,29 \pm 0,00$	0,14	51,04	48,96
		6	$0,51 \pm 0,00$	0,47	7,56	92,44
		8	$1,30 \pm 0,00$	$1,04 \pm 0,04$	$19,8 \pm 2,94$	$80,2 \pm 2,94$
		10	$1,93 \pm 0,00$	$1,66 \pm 0,06$	$13,94 \pm 3,12$	$86,06 \pm 3,12$
		20	$7,97 \pm 0,01$	$3,37 \pm 0,01$	$2,56 \pm 0,32$	$42,28 \pm 6,32$
		22	$9,28 \pm 0,01$	$7,80 \pm 0,00$	$2,12 \pm 0,04$	$84,78 \pm 0,04$
		24	$10,74 \pm 0,02$	$9,06 \pm 0,02$	$2,41 \pm 0,23$	$84,35 \pm 0,23$

V případě naměřených hodnot GC-FID analýzou prvního fermentoru vyplývá, že kultura narůstá přímo úměrně s dobou kultivace. Kolem 3. hodiny kultivace byl přidán rostlinný olej kvůli pění média. Další přídavek zmíněného oleje byl ve 21. hodině.

Tabulka 19: GC-FID analýza vzorků z druhého fermentoru.

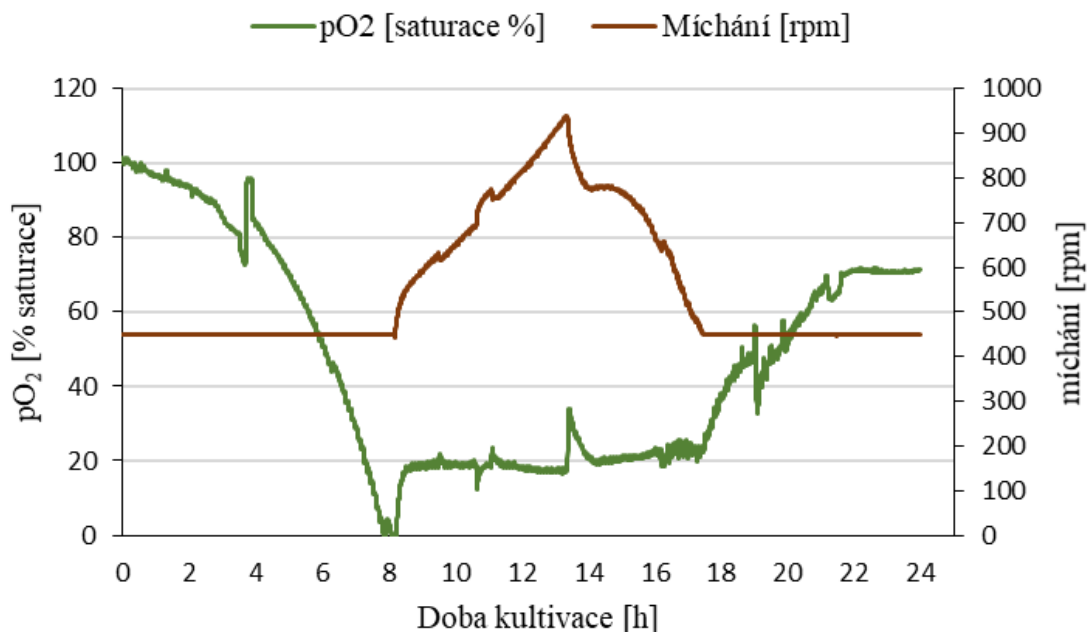
Bakteriální kmen	Zdroj uhlíku	t [h]	Biomasa [g/l]	PHA [g/l]	4HB [mol.%]	PHA [hm.%]
DSM 19379	γ -butyrolakton	0	$0,23 \pm 0,00$	-	-	-
		2	$0,15 \pm 0,00$	-	-	-
		4	$0,48 \pm 0,00$	0,45	$5,72 \pm 0,00$	$94,28 \pm 0,00$
		6	$0,44 \pm 0,00$	0,40	$9,62 \pm 0,00$	$90,37 \pm 0,00$
		8	$1,02 \pm 0,00$	$0,91 \pm 0,00$	$10,03 \pm 0,49$	$89,97 \pm 0,49$
		11	$1,64 \pm 0,01$	$1,45 \pm 0,13$	$11,32 \pm 7,83$	$88,68 \pm 7,83$
		21	$4,62 \pm 0,01$	$4,47 \pm 0,00$	$3,22 \pm 0,03$	$96,79 \pm 0,04$
		23	$8,88 \pm 0,01$	$4,38 \pm 0,01$	$3,08 \pm 0,25$	$49,32 \pm 0,25$
		24	$4,24 \pm 0,02$	$4,12 \pm 0,02$	$2,88 \pm 0,39$	$97,12 \pm 0,39$

Dále můžeme říct, že podle Tab. 19 se opět potvrzuje zvyšující se nárůst biomasy s dobou kultivace stejně jako u prvního fermentoru. Drobné vychýlení tohoto trendu ve 2. a 4. hodině může být zapříčiněno přidavkem rostlinného oleje, který byl přidán za účelem eliminace pěnění dané kultury. Lze tedy říct, že doby přidavků rostlinného oleje se opět shodují s přidavky v rámci prvního experimentu. V případě poklesu hodnoty PHA naměřeného ve 24. hodině experimentu mohlo dojít ke změnám podmínek ve fermentoru, jak již bylo zmíněno v kapitole 4.3.2. Ve 23. hodině kultivace u produkčního média bylo zaznamenáno pouze jemné pění, z toho důvodu olej nebyl přidán. Naměřené hodnoty PHA pomocí plynové chromatografie v prvním fermentoru korelují s hodnotami získanými z druhého fermentoru až na poslední 2 odběrové časy.

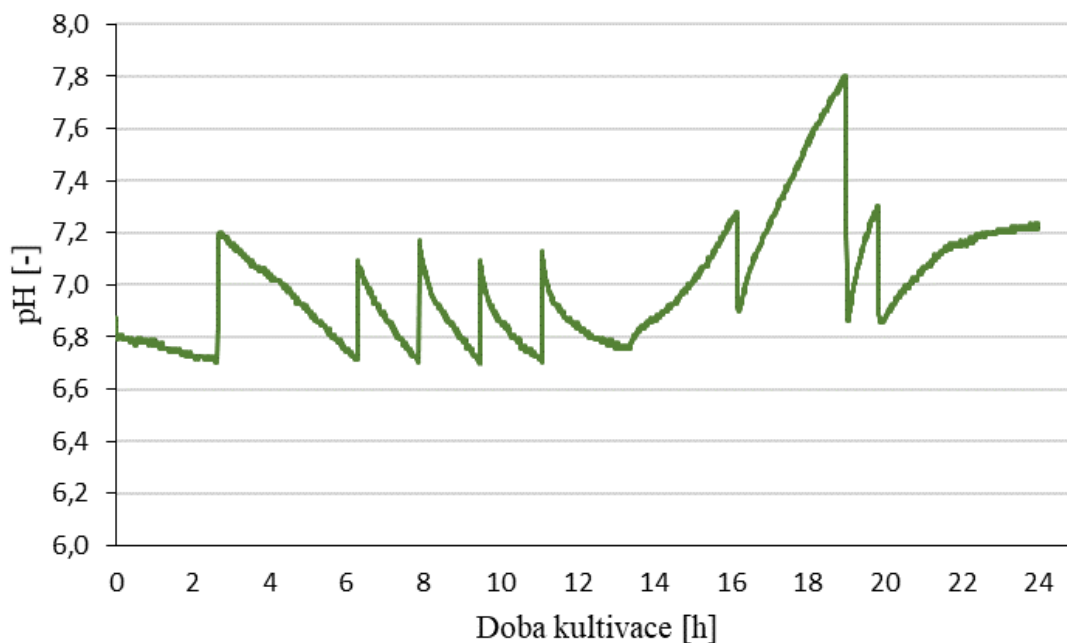
Naměřené hodnoty z GC-FID analýzy biomasy získané pomocí bioreaktoru naznačují, že v porovnání s výsledky plynové chromatografie v rámci optimalizace substrátu a jeho koncentrace (viz kapitola 4.2) je biotechnologická produkce PHA ve fermentoru výhodná. A to z toho důvodu, že v případě kultivace provedené v menších objemech klasickou kultivací (72 hodin) bylo získáno $2,99 \pm 0,33$ g/l PHA a $4,61 \pm 0,00$ g/l (viz Tab. 17) biomasy bakteriálního kmene *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379. Kdežto u vzorků biomasy získaných z fermentoru se stejným přidavkem prekurzoru 4HB je nejvyšší zaznamenaná hodnota PHA $9,06 \pm 0,02$ g/l a hodnota celkové biomasy $10,74 \pm 0,02$ g/l (viz Tab. 18) v rámci 24 hodin kultivace.

4.3.4 Závislost přítomnosti kyslíku, pH a míchání na kultivační době

Na Obr. 13 a Obr. 14 je možné vidět naměřená data poskytnutá softwarem bioreaktoru. Výsledné hodnoty byly zaznamenávány po celou dobu měření a lze tak přesněji stanovit růstové fáze v závislosti na čase.



Obrázek 13: Křivka závislosti míchání a kyslíku na době kultivace z prvního fermentoru.



Obrázek 14: Křivka závislosti pH na kultivační době ve fermentoru I.

Jak lze vidět na Obr. 13, tak nejintenzivnější produkce PHA byla zaznamenána od 8. hodiny do 18. hodiny kultivace. Produkce biomasy a růst mikroorganismu zapříčinili navýšení otáček míchadla v bioreaktoru, který takto kompenzoval pokles parciálního tlaku kyslíku. Dále lze z grafu vyčíst, že pokles kyslíku nastal takéž okolo 8. hodiny kultivace, opět se tedy potvrzuje fakt, že v tuto dobu byl daný mikroorganismus v exponenciální fázi růstu a fázi dělení, a tím byla zvýšena i produkce PHA.

Na Obr. 14 je závislost pH na době kultivace. Křivka v grafu znázorňuje neustálé dávkování kyseliny a zásady v podstatě během celého měření, což může být zapříčiněno i typem použitého fermentoru (RALF-Bioengineering), tedy nastavením podmínek kultivace. Z grafu mimo to můžeme vyčíst, že do 3. hodiny kultivační doby se bakterie pouze adaptovala na dané prostředí a od 22. hodiny došlo ke stacionární fázi. Přídavek kyseliny a zásady se realizuje z toho důvodu, že během kultivace jsou produkovány různé metabolity, které pH systému ovlivňují. Například při přidavku báze do systému značí, že dochází k růstu mikroorganismu a mimo jiné je tak potvrzena exponenciální fáze. Zároveň v této době dochází i k tvorbě vedlejších metabolitů kyselého charakteru, a proto je potřeba dodávat do systému zásadu (NaOH), pro zajištění neutrálního pH. Jakmile se mikroorganismus nachází dle růstové křivky ve stacionární fázi jsou produkovány sekundární metabolity bazické povahy, které jsou také uvolňovány do média, proto je potřeba do média zajistit přívod kyseliny (HCl).

5 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce byl především screening vybraných mikrobiálních producentů, jež jsou schopny akumulovat kopolymer P(3HB-co-4HB). Zvolenými producenty byly *Cupriavidus malaysiensis* se sbírkovými čísly DSM 19379, DSM 19416, DSM 25816, *Aneurinibacillus thermoaerophilus* H1 (CCM 8960) a *Thermomonas hydrothermalis* (DSM 14834). Kultivace byly prováděny za podmínek, které výše zmínění producenti vyžadují (viz kapitola 3.2), a poté byl P(3HB-co-4HB) izolován a následně charakterizován. Po výběru vhodného bakteriálního kmene byla potřeba optimalizovat kultivační podmínky, tzn. zvolit vhodný zdroj uhlíku a zároveň prekursor 4HB, ze kterého je schopný daný mikroorganismus akumulovat cílený kopolymer P(3HB-co-4HB). S výběrem vhodného substrátu je spjata i optimální koncentrace, při které je akumulace PHA nejvyšší. Posledním cílem práce bylo provést přenesení kultivace z baněk do laboratorního bioreaktoru a otestovat produkci kýženého kopolymeru v základním batch kultivačním módu.

Z naměřených dat vyplývá, že pro cílenou biotechnologickou produkci ve fermentoru je nejvhodnějším producentem kopolymeru *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379 a to za předpokladu, že je jako substrát využit γ -butyrolakton. Se zmíněným bakteriálním kmenem bylo dosaženo nejvyššího výtěžku celkového PHA ($3,08 \pm 1,23$ g/l). Dále v této experimentální části práce bylo odhaleno, že bakteriální kmen *Thermomonas hydrothermalis* je vhodným producentem kopolymeru P(3HB-co-4HB) s vysokým obsahem monomerní jednotky 4HB ($81,14 \pm 5,36$ mol.%), avšak bakterie dosahuje nízké celkové výtěžnosti PHA. Izolované kopolymery z jednotlivých producentů byly proměřeny pomocí SEC-MALS metody, která nám poskytla informace o molekulové hmotnosti M_w a indexu polydisperzity (PDI). Z naměřených hodnot lze říct, že nejlepší výsledek M_w celkově vykazuje fólie bakterie *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19416 na substrátu γ -butyrolaktonu, a to $676,60 \pm 14,07$ kDa.

V rámci optimalizace koncentrace substrátu byl pro porovnání posouzen γ -butyrolakton i substrát 1,4-butandiol v koncentrační řadě 4, 8, 12 (stejně jako u γ -butyrolaktonu). Data naznačují, že nejvhodnějším zdrojem uhlíku je γ -butyrolakton o koncentraci 12 g/l ($2,99 \pm 0,33$ g/l PHA). Výsledky se v případě jiných producentů a koncentrací zvolených substrátů pohybovaly v rozmezí od 0,68 do 1,74 g/l PHA.

Pro biotechnologickou produkci byl tedy vybrán bakteriální kmen *Cupriavidus malaysiensis* se sbírkovým číslem DSM 19379, vzhledem k tomu, že bakterie dosahovala optimálních výsledků v každém dílčím kroku experimentu. Testovaný kmen v bioreaktoru dosáhl za aerobních podmínek vsádkovou metodou a za vhodně nastavených podmínek kultivace výtěžku celkové biomasy $10,74 \pm 0,71$ g/l za 24 hodin kultivace. Z naměřených dat získaných z plynové chromatografie zaznamenala nejvyšší celkové PHA $9,06 \pm 0,02$ g/l ve 24. hodině kultivace.

Z provedeného experimentu v rámci scale-up biotechnologické produkce vyplývá, že v laboratorním bioreaktoru lze za kratší časový úsek vyprodukovat vyšší množství PHA i celkové biomasy, než je tomu při kultivaci v Erlenmeyerových baňkách. Dále díky fermentoru lze snížit i náklady na produkci kopolymeru, což je zapříčiněno především tím, že bioreaktor je schopný zkrátit tzv. lag-fázi. V této fázi se totiž mikroorganismus přizpůsobuje daným podmínkám a nedochází k akumulaci PHA a k dělení bakteriálních buněk. Dá se říct,

že v tuto dobu bakterie jen spotřebovává živiny, což je ekonomicky nevýhodné pro průmysl. Bylo zjištěno, že bakteriální kmen *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379 je vhodným producentem PHA za předpokladu kultivace při optimálních podmínek v bioreaktoru. Bylo prokázáno, že produkce při řízených podmínkách navyšuje celkovou výtěžnost PHA a biomasy přibližně 2krát.

6 LITERATURA

- [1] OBRUCA, S., I. MAROVA, Z. SVOBODA a R. MIKULIKOVA. Use of controlled exogenous stress for improvement of poly(3-hydroxybutyrate) production in *Cupriavidus necator*. *Folia Microbiologica* [online]. 2010, **55**(1), 17-22 [cit. 2020-10-04]. ISSN 0015-5632. Dostupné z: doi:10.1007/s12223-010-0003-z
- [2] MICHAEL, F. a D. STEPHEN. *Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation, volumes. 1*. Wiley-Interscience, 1999. ISBN 978-0471138228.
- [3] VERLINDEN, R.A.J., D.J. HILL, M.A. KENWARD, C.D. WILLIAMS a I. RADECKA. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2007, **102**(6), 1437-1449 [cit. 2020-05-01]. ISSN 1364-5072. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x
- [4] RAY, Sanket, Vimal PRAJAPATI, Kamlesh PATEL a Ujjval TRIVEDI. Optimization and characterization of PHA from isolate *Pannonibacter phragmitetus* ERC8 using glycerol waste. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2016, **86**, 741-749 [cit. 2020-10-23]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.02.002
- [5] Obecný vzorec PHA. In: *Sciencedirect* [online]. Institute of Chemistry, Government College University, Faisalabad 38030, Pakistan, 2016 [cit. 2021-02-24]. Dostupné z: <https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0141813016303774-gr1.jpg>
- [6] BALAKRISHNA PILLAI, Aneesh a Hari Krishnan KUMARAPILLAI. Bacterial Polyhydroxyalkanoates: Recent Trends in Production and Applications. *Recent advances in Applied Microbiology* [online]. Singapore: Springer Singapore, 2017, , 19-53 [cit. 2021-02-21]. ISBN 978-981-10-5274-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-10-5275-0_2
- [7] GRIGORE, Mădălina Elena, Ramona Marina GRIGORESCU, Lorena IANCU, Rodica-Mariana ION, Cătălin ZAHARIA a Elena Ramona ANDREI. Methods of synthesis, properties and biomedical applications of polyhydroxyalkanoates: a review. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. 2019, **30**(9), 695-712 [cit. 2021-02-15]. ISSN 0920-5063. Dostupné z: doi:10.1080/09205063.2019.1605866

- [8] KOLLER, Martin, Anna SALERNO, Miguel DIAS, Angelika REITERER a Gerhart BRAUNEGG. *Modern Biotechnological Polymer Synthesis: A Review* [online]. 2010, [cit. 2020-10-04]. ISSN 1330-9862. Dostupné z: <https://core.ac.uk/download/pdf/14427669.pdf>
- [9] VIGNESWARI, S., J. CHAI, K. SHANTINI, K. BHUBALAN a A. AMIRUL. Designing Novel Interfaces via Surface Functionalization of Short-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates. *Advances in Polymer Technology* [online]. 2019, **2019**(3831251), 1-15 [cit. 2020-05-01]. ISSN 0730-6679. Dostupné z: doi:10.1155/2019/3831251
- [10] ZHENG, Yang, Jin-Chun CHEN, Yi-Ming MA a Guo-Qiang CHEN. Engineering biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) for diversity and cost reduction. *Metabolic Engineering* [online]. 2020, **58**, 82-93 [cit. 2020-10-25]. ISSN 10967176. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymben.2019.07.004
- [11] ANJUM, Anbreen, Mohammad ZUBER, Khalid Mahmood ZIA, Aqdas NOREEN, Muhammad Naveed ANJUM a Shazia TABASUM. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2016, **89**, 161-174 [cit. 2021-02-21]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069
- [12] SAITO, Yuji a Yoshiharu DOI. Microbial synthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in Comamonas acidovorans. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 1994, **16**(2), 99-104 [cit. 2020-11-04]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/0141-8130(94)90022-1
- [13] Chemical structure of P(3HB-co-4HB). In: *Hindawi* [online]. *Advances in Polymer Technology*, 2019 [cit. 2020-11-04]. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/apt/2019/3831251/fig2/>
- [14] BRESAN, Stephanie, Anna SZNAJDER, Waldemar HAUF, Daniel PHEIFFER, Karl FORC HAMMER a Dieter JENDROSSEK. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids. *Scientific Reports* [online]. 2016, **6**(1) [cit. 2021-07-22]. Dostupné z: doi:10.1038/srep26612. ISSN 2045-2322
- [15] Model of an in vivo PHB granule in R. eutropha H16. In: *Scientific Reports* [online]. 2016 [cit. 2021-07-22]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/srep26612/figures/8>

- [16] PRIETO, Auxiliadora, Isabel ESCAPA, Virginia MARTÍNEZ, Nina DINJASKI, Cristina HERENCIAS, Fernando DE LA PEÑA, Natalia TARAZONA a Olga REVELLES. A holistic view of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology* [online]. 2016, **18**(2), 341-357 [cit. 2020-11-13]. ISSN 14622912. Dostupné z: doi:10.1111/1462-2920.12760
- [17] REHM, Bernd a Alexander STEINBÜCHEL. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 1999, **25**(1-3), 3-19 [cit. 2020-11-13]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/S0141-8130(99)00010-0
- [18] MAMUN, Abdullah Al a Jonathan Y. CHEN. Biosynthetic pathway of P(3HB): Industrial Applications of Biopolymers and their Environmental Impact. In: *Https://books.google.cz* [online]. ilustrované vydání: CRC Press, 2020 [cit. 2020-11-19]. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=dFABEAAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=cs>
- [19] STEINBÜCHEL, Alexander a Tina LÜTKE-EVERSLOH. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2003, **16**(2), 81-96 [cit. 2020-11-13]. ISSN 1369703X. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-703X(03)00036-6
- [20] LEE, Sang Yup a Jong-il CHOI. Production and degradation of polyhydroxyalkanoates in waste environment. *Waste Management* [online]. 1999, **19**(2), 133-139 [cit. 2020-11-19]. ISSN 0956053X. Dostupné z: doi:10.1016/S0956-053X(99)00005-7
- [21] SAXENA, Anushri a Archana TIWARI. POLYHYDROXYALKONATES: GREEN PLASTICS OF THE FUTURE. *International Journal of Biomedical and Advance Research* [online]. 2011, **2**(9), 356-367 [cit. 2021-02-04]. ISSN 2229-3809. Dostupné z: doi:10.7439/ijbar.v2i9.48
- [22] RODRÍGUEZ-CONTRERAS, Alejandra, Margarita CALAFELL-MONFORT a María Soledad MARQUÉS-CALVO. Enzymatic degradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by commercial lipases. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2012, **97**(4), 597-604 [cit. 2021-03-03]. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2012.01.007

- [23] ISHIDA, Kazuki, Yi WANG a Yoshio INOUE. Comonomer Unit Composition and Thermal Properties of Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)s Biosynthesized by *Ralstonia eutropha*. *Biomacromolecules* [online]. 2001, **2**(4), 1285-1293 [cit. 2020-05-01]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm010115a
- [24] RAMACHANDRAN, Hema, Nur Asilla Hani SHAFIE, Kumar SUDESH, Mohamad Noor AZIZAN, Mohamad Isa Abdul MAJID a Al-Ashraf Abdullah AMIRUL. *Cupriavidus malaysiensis* sp. nov., a novel poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) accumulating bacterium isolated from the Malaysian environment. *Antonie van Leeuwenhoek* [online]. 2018, **111**(3), 361-372 [cit. 2021-02-04]. ISSN 0003-6072. Dostupné z: doi:10.1007/s10482-017-0958-8
- [25] FAISALINA, A.F., Fabio SONVICO, Paolo COLOMBO, A.A. AMIRUL, H.A. WAHAB a Mohamed MAJID. Docetaxel-Loaded Poly(3HB-co-4HB) Biodegradable Nanoparticles: Impact of Copolymer Composition. *Nanomaterials* [online]. 2020, **10**(11) [cit. 2020-11-13]. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano10112123
- [26] WANG, Zetao, Ke MA, Xianfang JIANG et al. Electrospun poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) /Octacalcium phosphate Nanofibrous membranes for effective guided bone regeneration. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2020, **112** [cit. 2020-11-13]. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2020.110763
- [27] CHAI, C.J., A.A. AMIRUL a S. VIGNESWARI. Data on the effect of electrospinning parameters on the morphology of the nanofibrous poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) scaffolds. *Data in Brief* [online]. 2020, **28** [cit. 2020-05-01]. ISSN 23523409. Dostupné z: doi:10.1016/j.dib.2019.104777
- [28] VIGNESWARI, S, V MURUGAIYAH, G KAUR, H P S ABDUL KHALIL a A A AMIRUL. Biomacromolecule immobilization: grafting of fish-scale collagen peptides onto aminolyzed P(3HB-co-4HB) scaffolds as a potential wound dressing. *Biomedical Materials* [online]. 2016, **11**(5) [cit. 2021-02-11]. ISSN 1748-605X. Dostupné z: doi:10.1088/1748-6041/11/5/055009
- [29] AZURAINI, Mat Junoh, Kai-Hee HUONG, H. P. S Abdul KHALIL a A. A. AMIRUL. Fabrication and characterization of P(3HB-co-4HB)/gelatine biomimetic nanofibrous scaffold for tissue engineering application. *Journal of Polymer Research* [online]. 2019, **26**(11) [cit. 2021-02-12]. ISSN 1022-9760. Dostupné z: doi:10.1007/s10965-019-1925-z

- [30] KESSLER, Birgit a Bernard WILHOLT. *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation: Poly(3-Hydroxyalkanoates)*. 1. Ann Arbor (Michigan): Wiley, 1999. ISBN 9780471138228.
- [31] SAITO, Yuji, S. NAKAMURA, M. HIRAMITSU a Y. DOI. Microbial synthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Polymer international* [online]. 1996, **39**(3), 169-174 [cit. 2021-02-24]. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1097-0126(199603)39:3<169::AID-PI453>3.0.CO;2-Z
- [32] SHAFIE, Nur Asilla Hani, Nyok-Sean LAU, Hema RAMACHANDRAN a Al-Ashraf Abdullah AMIRUL. Complete Genome Sequences of Three Cupriavidus Strains Isolated from Various Malaysian Environments. *Genome Announcements* [online]. 2017, **5**(3), 01498-16 [cit. 2021-02-04]. ISSN 2169-8287. Dostupné z: doi:10.1128/genomeA.01498-16
- [33] Transmisní elektronový mikrograf Cupriavidus malaysiensis USMAA1020. In: *SpringerLink* [online]. 2017 [cit. 2020-05-01]. Dostupné z: https://media.springernature.com/lw685/springer-static/image/art%3A10.1007%2Fs10482-017-0998-0/MediaObjects/10482_2017_998_Fig1_HTML.jpg?as=webp
- [34] RAMACHANDRAN, Hema, Nur SHAFIE, Kumar SUDESH, Mohamad AZIZAN, Mohamad MAJID a Al-Ashraf AMIRUL. Cupriavidus malaysiensis sp. nov., a novel poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) accumulating bacterium isolated from the Malaysian environment. *Antonie van Leeuwenhoek* [online]. 2018, **111**(3), 361-372 [cit. 2020-05-01]. ISSN 0003-6072. Dostupné z: doi:10.1007/s10482-017-0958-8
- [35] NORHAFINI, Hambali, Kai-Hee HUONG a A.A. AMIRUL. High PHA density fed-batch cultivation strategies for 4HB-rich P(3HB-co-4HB) copolymer production by transformant Cupriavidus malaysiensis USMAA1020. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2019, **125**, 1024-1032 [cit. 2020-05-01]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.12.121
- [36] AMIRUL, A.A., A.R.M. YAHYA, K. SUDESH, M.N.M. AZIZAN a M.I.A. MAJID. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer by Cupriavidus sp. USMAA1020 isolated from Lake Kulim, Malaysia. *Bioresource Technology* [online]. 2008, **99**(11), 4903-4909 [cit. 2021-02-04]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2007.09.040

- [37] KUCERA, NOVACKOVA, PERNICOVA, SEDLACEK a OBRUCA. Biotechnological Production of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-4-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) Terpolymer by *Cupriavidus* sp. DSM 19379. *Bioengineering* [online]. 2019, **6**(3) [cit. 2021-02-04]. ISSN 2306-5354. Dostupné z: doi:10.3390/bioengineering6030074
- [38] ALVES, Marta P., Fred A. RAINEY, M. Fernanda NOBRE a Milton S. DA COSTA. *Thermomonas hydrothermalis* sp. nov., A New Slightly Thermophilic γ -Proteobacterium Isolated from a Hot Spring in Central Portugal. *Systematic and Applied Microbiology* [online]. 2003, **26**(1), 70-75 [cit. 2020-11-14]. ISSN 07232020. Dostupné z: doi:10.1078/072320203322337335
- [39] DI LORENZO, Flaviana, Ida PACIELLO, Luigi Lembo FAZIO et al. Thermophiles as Potential Source of Novel Endotoxin Antagonists: the Full Structure and Bioactivity of the Lipo-oligosaccharide from *Thermomonas hydrothermalis*. *ChemBioChem* [online]. 2014, **15**(14), 2146-2155 [cit. 2020-11-16]. ISSN 14394227. Dostupné z: doi:10.1002/cbic.201402233
- [40] HEYNDRICKX, M., L. LEBBE, M. VANCANNEYT et al. A Polyphasic Reassessment of the Genus *Aneurinibacillus*, Reclassification of *Bacillus thermoaerophilus* (Meier-Stauffer et al. 1996) as *Aneurinibacillus thermoaerophilus* comb. nov., and Emended Descriptions of *A. aneurinilyticus* corrig., *A. migulanus*, and *A. thermoaerophilus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 1997, **47**(3), 808-817 [cit. 2020-11-18]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/00207713-47-3-808
- [41] XIAO, Zijun, Yu ZHANG, Lijun XI, Fangfang HUO, Jing-yi ZHAO a Jing LI. Thermophilic production of polyhydroxyalkanoates by a novel *Aneurinibacillus* strain isolated from Gudao oilfield, China. *Journal of Basic Microbiology* [online]. 2015, **55**(9), 1125-1133 [cit. 2020-11-18]. ISSN 0233111X. Dostupné z: doi:10.1002/jobm.201400843
- [42] PERNICOVA, Iva, Ivana NOVACKOVA, Petr SEDLACEK et al. Introducing the Newly Isolated Bacterium *Aneurinibacillus* sp. H1 as an Auspicious Thermophilic Producer of Various Polyhydroxyalkanoates (PHA) Copolymers—1. Isolation and Characterization of the Bacterium. *Polymers* [online]. 2020, **12**(6) [cit. 2020-11-21]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym12061235
- [43] TEE, Kang, James GRINHAM, Arona OTHUSITSE, Miriam GONZÁLEZ-VILLANUEVA, Abayomi JOHNSON a Tuck WONG. An Efficient Transformation Method for the Bioplastic-Producing “Knallgas” Bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Biotechnology Journal* [online]. 2017, **12**(11) [cit. 2020-05-01]. ISSN 18606768. Dostupné z: doi:10.1002/biot.201700081
- [44] POHLMANN, Anne, Wolfgang FRICKE, Frank REINECKE et al. Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nature Biotechnology*. 2006, **24**(10), 1257-1262. ISSN 1087-0156. Dostupné z: doi:10.1038/nbt1244

- [45] Elektronové mikroskopické snímky buněk *C. necator* DSM 545 bohatých na PHA kultivovaných v procesu kontinuální fermentace na glukóze. Zvětšení: 1/70 000; 48% PHB v buněčné hmotnosti. Obrázek poskytl Dr. Elisabeth Ingolić, FELMI-ZFE-Graz. In: *Wiley online knihovna* [online]. FELMI-ZFE-Graz: New Biotechnology, 2011 [cit. 2020-05-01]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/cms/asset/50b8e886-8a76-428a-8fc3-f46c3e10fea4/mfig001.jpg>
- [46] REINECKE, Frank a Alexander STEINBUCHER. Kmen *Ralstonia eutropha* H16 jako modelový organismus pro metabolismus PHA a pro biotechnologickou výrobu technicky zajímavých biopolymerů. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* [online]. 2009, **16**, 91-108 [cit. 2020-05-01]. Dostupné z: doi:10.1159/000142897
- [47] Brambory s cyanofycinem. In: *Gate2Biotech* [online]. Gate2Biotech - Biotechnologický portál - Vše o biotechnologiích na jednom místě.: Jihočeská agentura pro podporu inovačního podnikání, 2009 [cit. 2020-05-01]. Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/brambory-s-cyanofycinem/>
- [48] WISPLINGHOFF, Hilmar. *Pseudomonas spp., Acinetobacter spp. and Miscellaneous Gram-Negative Bacilli. Infectious Diseases* [online]. Elsevier, 2017, , 1579-15992 [cit. 2020-11-16]. ISBN 9780702062858. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-7020-6285-8.00181-7
- [49] BILGIN, H., A. SARMIS, E. TIGEN, G. SOYLETIR a L. MULAIZIMOGLU. *Delftia acidovorans*: A rare pathogen in immunocompetent and immunocompromised patients. *Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale / AMMI Canada* [online]. 2015, **5**(26), 277-279 [cit. 2020-11-18]. Dostupné z: doi:10.1155 / 2015/973284
- [50] KHAN, Sadia, Sujatha SISTLA, Rahul DHODAPKAR a Subhash PARIJA. Fatal *Delftia acidovorans* infection in an immunocompetent patient with empyema. *Asian Pac J Trop Biomed* [online]. 2012, **2**(11), 923-924 [cit. 2020-11-18]. Dostupné z: doi:10.1016 / S2221-1691 (12) 60254-8
- [51] CAMARGO, Carlos Henrique, Adriano Martison FERREIRA, Edvaldo JAVARONI, Brígida Aparecida Rosa REIS, Maria Fernanda Campagnari BUENO, Gabriela Rodrigues FRANCISCO, Juliana Failde GALLO a Doroti DE OLIVEIRA GARCIA. Microbiological characterization of *Delftia acidovorans* clinical isolates from patients in an intensive care unit in Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* [online]. 2014, **80**(4), 330-333 [cit. 2021-02-04]. ISSN 07328893. Dostupné z: doi:10.1016/j.diagmicrobio.2014.09.001
- [52] TSUGE, Takeharu, Shin-ichi IMAZU, Kazuma TAKASE, Seiichi TAGUCHI a Yoshiharu DOI. An extra large insertion in the polyhydroxyalkanoate synthase from *Delftia acidovorans* DS-17: its deletion effects and relation to cellular proteolysis. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2004, **231**(1), 77-83 [cit. 2021-02-04]. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-1097(03)00930-3

- [53] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biotechnologie*. 1. Praha: Academia, 1992. Cesta k vědě (Academia). ISBN 80-200-0293-6.
- [54] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biotechnologie*. 2., přeprac. vyd. Praha: VŠCHT, 1991. ISBN 80-708-0121-2.
- [55] IZOLACE POLYHYDROXYALKANOÁTŮ Z MIKROBIÁLNÍ BIOMASY. *Chemické listy* [online]. 2016, **2016**(110), 860-867 [cit. 2020-05-01]. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2016_12_860-867.pdf
- [56] MODERNÍ POSTUPY VYUŽÍVANÉ PŘI PŘÍPRAVĚ VZORKŮ PRO STANOVENÍ ALKOHOLŮ, ESTERŮ A KYSELIN V PIVU. *Chemické listy* [online]. 2010, **2011**(105), 603-610 [cit. 2021-07-18]. Dostupné z: chemicke-listy.cz/docs/full/2011_08_603-610.pdf
- [57] KOLLER, Martin. A Review on Established and Emerging Fermentation Schemes for Microbial Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters. *Fermentation* [online]. 2018, **4**(2) [cit. 2021-02-07]. ISSN 2311-5637. Dostupné z: [doi:10.3390/fermentation4020030](https://doi.org/10.3390/fermentation4020030)
- [58] ALBUQUERQUE, M.G.E., V. MARTINO, E. POLLET, L. AVÉROUS a M.A.M. REIS. Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: Effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties. *Journal of Biotechnology* [online]. 2011, **151**(1), 66-76 [cit. 2021-07-19]. ISSN 01681656. Dostupné z: [doi:10.1016/j.jbiotec.2010.10.070](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.10.070)
- [59] KOLLER, Martin. *The Handbook of Polyhydroxyalkanoates: Microbial Biosynthesis and Feedstocks* [online]. 1. CRC Press: CRC Press, 2020 [cit. 2020-11-19]. ISBN 978-0367275594. Dostupné z: [https://books.google.cz/books?id=MZ_9DwAAQBAJ&dq=biotechnological+production+of+P\(3HB-co-4HB\)&lr=&hl=cs&source=gbp_navlinks_s](https://books.google.cz/books?id=MZ_9DwAAQBAJ&dq=biotechnological+production+of+P(3HB-co-4HB)&lr=&hl=cs&source=gbp_navlinks_s)
- [60] KALIA, Vipin Chandra, Subhasree RAY, Sanjay K. S. PATEL, Mamtesh SINGH a Gajendra Pratap SINGH. The Dawn of Novel Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates* [online]. Singapore: Springer Singapore, 2019, , 1-11 [cit. 2020-11-21]. ISBN 978-981-13-3758-1. Dostupné z: [doi:10.1007/978-981-13-3759-8_1](https://doi.org/10.1007/978-981-13-3759-8_1)

- [61] ZHENG, Yang, Jin-Chun CHEN, Yi-Ming MA a Guo-Qiang CHEN. Engineering biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) for diversity and cost reduction. *Metabolic Engineering* [online]. 2020, **58**, 82-93 [cit. 2021-02-17]. ISSN 10967176. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymben.2019.07.004
- [62] NORHAFINI, Hambali, L. THINAGARAN, K. SHANTINI, Kai-Hee HUONG, Ishak Muhammad SYAFIQ, Kesaven BHUBALAN a A. A. AMIRUL. Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) with high 4HB composition and PHA content using 1,4-butanediol and 1,6-hexanediol for medical application. *Journal of Polymer Research* [online]. 2017, **24**(11) [cit. 2021-02-21]. ISSN 1022-9760. Dostupné z: doi:10.1007/s10965-017-1345-x
- [63] PILLAI, Aneesh Balakrishna, Arjun Jaya KUMAR a Harikrishnan KUMARAPILLAI. Synthetic Biology and Metabolic Engineering Approaches for Improved Production and Recovery of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Next Generation Biomanufacturing Technologies* [online]. Washington, DC: American Chemical Society, 2019, , 181-207 [cit. 2020-11-24]. ACS Symposium Series. ISBN 9780841235007. Dostupné z: doi:10.1021/bk-2019-1329.ch009

7 SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

PHA	polyhydroxyalkanoát
3HB	3-hydroxybutyrát
4HB	4-hydroxybutyrát
P(3HB)	poly(3-hydroxybutyrát)
P(4HB)	poly(4-hydroxybutyrát)
P(3HB-co-4HB)	poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát)
scl-PHA	short-chain-length PHA
mcl-PHA	medium-chain-length PHA
lcl-PHA	long-chain-length PHA
P(3HB-co-3HV)	poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát)
GC-FID	Plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem
SEC-MALS	Vylučovací chromatografie s detektorem měřícím statický rozptyl světla ve více úhlech