



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# KOPRODUKCE POLYHYDROXYALKANOÁTŮ A VIOLACEINU S VYUŽITÍM VYBRANÝCH ZÁSTUPCŮ RODU JANTHINOBACTERIUM

COPRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATES AND VIOLACEIN EMPLOYING MEMBERS OF THE  
GENUS JANTHINOBACTERIUM

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kateřina Uhrová

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2023

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1826/2022 Akademický rok: 2022/23  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Kateřina Uhrová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a technologie  
Vedoucí práce: **prof. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Koprodukce polyhydroxyalkanoátů a violaceinu s využitím vybraných zástupců rodu *Janthinobacterium*

### Zadání bakalářské práce:

- Literární rešerše na zadané téma
- Využití PCR k detekci phaC genu u vybraných kmenů rodu *Janthinobacterium*
- Posouzení vlivu použitých substrátů a kultivačních podmínek na koprodukcí obou sledovaných metabolitů

### Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2023:

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

-----  
Kateřina Uhrová  
studentka

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

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

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

## **ABSTRAKT**

Bakalářská práce se zabývá studiem vhodných podmínek pro kultivaci bakterií vybraných rodů *Janthinobacterium*, konkrétně kmene CCM 160 a CCM 1888 a rodu *Iodobacter fluvialis* kmene CCM 3308 z České sbírky mikroorganismů. Byly zkoumány nejideálnější podmínky pro růst bakterií. Cílem práce bylo nalézt nejideálnější produkční médium, kultivační objem, teplotu a podmínky v podobě submerzní a statické kultivace. Zároveň byl z používaných kmenů vybrán jeden, který se jevil jako nejlepší producent sledovaných metabolitů. Při kultivaci byla pozorována produkce fialového pigmentu violaceinu a polyhydroxyalkanoátů. Violacein byl extrahován pomocí methanolu a koncentrace obsahu vyprodukovaného violaceinu se měřila pomocí UV/VIS spektrofotometrie. Obsah PHA byl zjišťován pomocí plynové chromatografie. Údaje se mezi sebou porovnávaly a bylo zjišťováno, zdali se produkce obou metabolitů navzájem ovlivňuje. Dále byla provedena kultivace na pevném nosiči, která se v produkci violaceinu osvědčila více než v tekutém médiu. Tento typ kultivace by mohl v budoucnu vést ke komerční produkci violaceinu, který má řadu zajímavých vlastností. Pomocí multiplexní PCR byly u studovaných kmenů identifikovány geny *16S rRNA* a *phaC*.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

bakterie; violacein; polyhydroxyalkanoáty; plynová chromatografie; spektrofotometrie; PCR

## **ABSTRACT**

This bachelor's thesis deals with the study of appropriate conditions for the cultivation of bacteria of selected genera *Janthinobacterium*, specifically strains CCM 160 and CCM 1888 and the genus *Iodobacter fluviatilis* strain CCM 3308 from the Czech collection of microorganisms. The most suitable conditions for bacterial growth were investigated. The aim was to identify ideal production medium, cultivation volume, temperature and conditions in the form of submerged and static cultivation. At the same time, one of the strains used was chosen, which appeared to be the best producer of metabolites. Production of the purple pigment violacein and polyhydroxyalkanoates (PHA) was observed during the cultivations. Violacein was extracted using methanol and the concentration of the produced violacein content was measured using UV/VIS spectrophotometry. The PHA content was determined using gas chromatography. The obtained data were compared with each other and it was determined whether the production of both metabolites is mutually affected. Furthermore, cultivation on a solid carrier was carried out, which proved more effective in the production of violacein than in a liquid medium. This type of cultivation could in the future lead to the commercial production of violacein, which has a number of positive properties. The *16S rRNA* and *phaC* genes were detected using the multiplex PCR method.

## **KEY WORDS**

Bacteria; violacein; polyhydroxyalkanoates; gas chromatography; spectrophotometry; PCR

UHROVÁ, Kateřina. *Koprodukce polyhydroxyalkanoátů a violaceinu s využitím vybraných zástupců rodu Janthinobacterium* [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-05-21]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/148622>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Stanislav Obruča.

## PROHLÁŠENÍ

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

.....  
Kateřina Uhrová

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala mému vedoucímu prof. Ing. Stanislavovi Obručovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady. Velké poděkování patří také mé konzultantce Mgr. Zuzaně Šedrlové za pomoc v laboratoři a při tvorbě celé této závěrečné práce. Dále děkuji i ostatním kolegům laboratoře za ochotu vždy pomoci a poradit. V neposlední řadě patří dík i mé rodině, přátelům a partnerovi za podporu.

## OBSAH

1	ÚVOD .....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	9
2.1	Violacein .....	9
2.1.1	Struktura a vlastnosti .....	9
2.1.2	Biosyntéza .....	10
2.1.3	Využití violaceinu .....	11
2.1.3.1	Potencionální komerční využití .....	11
2.1.3.2	Antibiotikum a protirakovinné vlastnosti .....	12
2.2	Violacein tvořící bakterie .....	12
2.2.1	Bakteriální pigmenty .....	12
2.2.2	<i>Iodobacter</i> .....	13
2.2.3	<i>Duganella</i> .....	13
2.3	<i>Janthinobacterium</i> .....	13
2.3.1	Výskyt .....	13
2.3.2	Vybraní zástupci rodu <i>Janthinobacterium</i> .....	14
2.3.2.1	<i>Janthinobacterium lividum</i> .....	14
2.3.2.2	<i>Janthinobacterium svalbardensis</i> .....	14
2.3.2.3	Možští zástupci <i>Janthinobacterium</i> .....	14
2.4	Polyhydroxyalkanoáty .....	15
2.4.1	Struktura PHA .....	15
2.4.2	Biosyntéza PHA .....	16
2.4.3	PHA syntáza .....	17
2.4.4	Produkce PHA a koprodukce PHA a violaceinu .....	17
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	19
3.1	Použité mikroorganismy, chemikálie a přístroje .....	19
3.1.1	Použité mikroorganismy .....	19
3.1.2	Použité chemikálie .....	19
3.1.3	Komponenty pro PCR, gelovou elektroforézu a přečištění DNA .....	19
3.1.4	Použité přístroje .....	19
3.2	Příprava kryo konzerv .....	20
3.3	Kultivace bakterií .....	20
3.4	Optimalizace produkčního média .....	20
3.4.1	PHA .....	21
3.4.2	Esterifikace .....	21
3.4.3	Extrakce violaceinu a spektrofotometrické stanovení violaceinu .....	22
3.5	Optimalizace produkčního média Kanelli s glycerolem .....	22
3.6	Kultivace při třepání a stání .....	23
3.7	Kultivace ve tmě, statická a následně submerzní s různými objemy .....	24
3.8	Kultivace na pevném podkladu .....	24
3.9	PCR .....	24
3.9.1	Izolace DNA .....	24
3.9.2	Agarózová gelová elektroforéza .....	25
4	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	26
4.1	Optimalizace produkčního média .....	26
4.1.1	Produkce PHA v různých médiích .....	26
4.1.2	Stanovení violaceinu .....	28

4.1.3	Vizuální analýza.....	28
4.2	Optimalizace produkčního média Kanelli s glycerolem.....	32
4.2.1	Produkce PHA na optimalizovaném médiu .....	32
4.2.2	Produkce violaceinu .....	33
4.2.3	Vizuální analýza.....	33
4.3	Kultivace při třepání a stání.....	35
4.3.1	Stanovení violaceinu při statické a dynamické kultivaci .....	35
4.3.2	Stanovení PHA .....	36
4.3.3	Vizuální analýza.....	37
4.4	Kultivace při stání a následném třepání.....	38
4.4.1	Stanovení PHA .....	39
4.4.2	Vizuální analýza.....	41
4.5	Statická kultivace na pevném podkladu .....	42
4.5.1	Vizuální analýza.....	43
4.6	PCR detekce genu <i>phaC</i> .....	44
5	ZÁVĚR .....	45
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	46
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	51

# 1 ÚVOD

Využití biomolekul si v posledních letech moderní civilizace získalo velkou pozornost. Polyhydroxybutyrát (PHB) a violacein jsou průmyslově významné biomolekuly s širokou škálou využití. PHB je lineární polyester 3-hydroxybutyrátu, který je syntetizován mnoha druhy bakterií, jako je například *Cupriavidus necator*. Společně s mnoha dalšími bakteriemi ukládá uhlík ve formě PHB granulí jakožto zásobárnu energie. Polyhydroxyalkanoáty (PHA), pod které spadají PHB, mají elastomerní vlastnosti a jsou biodegradabilní. Proto mají potenciál pro využití ve formě náhražek běžných petrochemických plastů a také jako biomateriál pro medicínský a farmaceutický průmysl [1].

Violacein je derivát indolu, jedná se o fialově zbarvený sekundární metabolit, který je produkován bakteriemi jako je například *Chromobacterium violaceum* nebo *Janthinobacterium lividum*. Tento modro-fialový pigment je tvořen violaceinem a deoxyviolaceinem. Violacein je látka disponující širokou biologickou aktivitou, zejména antioxidační, protinádorovou, antibakteriální, antivirotickou apod. Také má řadu využití v kosmetice (je součástí opalovacích krémů), v textilním průmyslu a v medicíně [1].

*Janthinobacterium* patří mezi aerobní Gram-negativní bakterie, které jsou schopny produkovat pigment violacein, ten je zodpovědný za jejich fialovou barvu. Přežívají v extrémních podmínkách za nízkých teplot a za vlivu UV záření v antarktických prostředích [2].



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Violacein

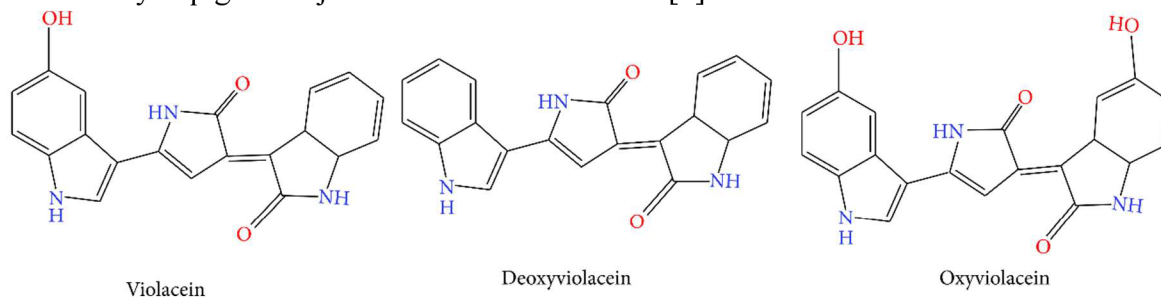
Violacein je typ univerzálního pigmentu, který se každým rokem víc a víc využívá v kosmetickém, potravinářském, tkaninovém průmyslu a v medicíně [2]. Jedná se o indolový derivát fialové barvy, který je produkován v rámci sekundárního metabolismu [1]. Vzniká kondenzací dvou molekul tryptofanu působením pěti proteinů – vioABCDE [3]. Nejčastěji je získáván z bakterie *Chromobacterium violaceum*, ale dá se získat i z jiných mikroorganismů rodu *Janthinobacterium*, *Pseudoaltermonas*, apod. Producenti violaceinu se liší fylogeneticky a produkce závisí od místa, kde se bakterie nachází [2]. V tabulce č. 1 jsou vypsány mikroorganismy, které violacein produkují a také místo, kde byly poprvé izolovány [3].

Tabulka 1: Kmeny bakterií produkující violacein a místo, kde byly izolovány [3]

Kmen	Místo izolace	Reference
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Řeka, odpadní voda, čistička odpadních vod	[4], [5]
<i>Collimonas sp.</i>	Pobřeží arktických vod	[6]
<i>Duganella sp.</i>	Zemědělské půdy (olivovníky)	[7]
<i>D. violaceinigra</i>	Lesní půdy	[8]
<i>Janthinobacterium lividum</i>	Ledovec	[9]
<i>J. svalbardensis</i>	Ledovec	[10]
<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	Hloubky mořských vod (320 m)	[11]
<i>P. luteoviolacea</i>	Povrch mořských hub	[12]

#### 2.1.1 Struktura a vlastnosti

Studium violaceinu probíhá v různých částech světa, využívá se rozdílných aspektů bakterií jako je aspekt mikrobiologický, fyziologický a genetický [2]. Chemická struktura violaceinových pigmentů je zobrazena na Obrázku 1 [3].



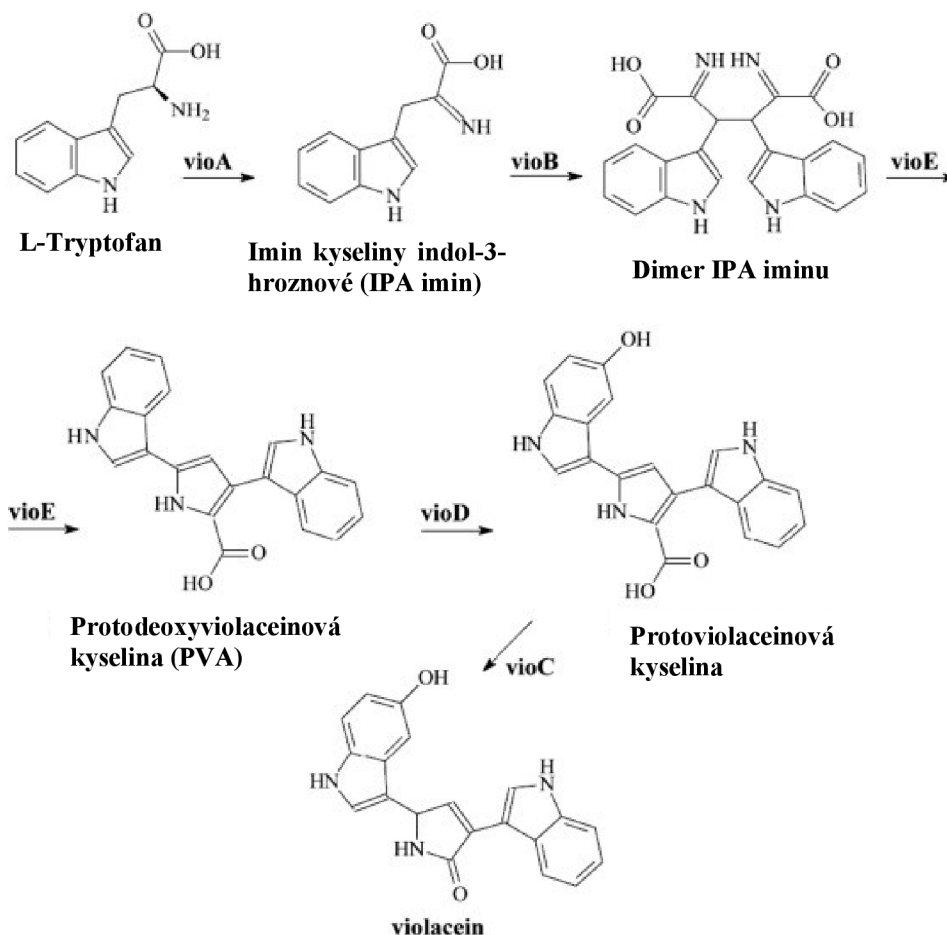
Obrázek 1: Chemická struktura violaceinu, deoxyviolaceinu a oxyviolaceinu vykazující přítomnost nebo nepřítomnost hydroxylových skupin [3]

Violacein vykazuje schopnost inhibovat růst Gram-pozitivních bakterií, nikoliv růst Gram-negativních bakterií a hub. Například bakterie *Duganella violaceinigra* z lesní půdy vykazuje schopnost produkce violaceinu. V porovnání s běžnými živinami je nejefektivnější produkce violaceinu zdroj z doplňků na bázi cukru s L-tryptofanem [2].

Violaceinový pigment se skládá z violaceinu a z deoxyviolaceinu. Vykazuje různé biologické aktivity [1]. Nutno zmínit jeho protirakovinné účinky a účinky antibiotické proti *Staphylococcus aureus* a dalším gram-pozitivním patogenům [3].

### 2.1.2 Biosyntéza

Biosyntéza modro-fialového pigmentu je spojována se sekundární metabolickou drahou zahrnující tryptofan, který je studován od roku 1934. Efektivní izolace violaceinu může být dosaženo v pěti krocích biosyntetické dráhy, která je zobrazena na Obrázku 2. Dráha zahrnuje transformaci dvou L-tryptofanových residuí. [2].



Obrázek 2: Metabolická dráha syntézy violaceinu, převzato, upraveno [2]

Dráha začíná u L-tryptofanu, který je katalyzován enzymem *vioA* (flavin-dependentní tryptofan-2-monooxygenáza) a zoxidován na imin kyseliny indol-3-pyrohroznové (IPA). Reakční krok je doprovázen kofaktorem FAD, který se redukuje na  $\text{FADH}_2$ . V druhém reakčním kroku enzym *VioB* přemění IPA dimerizačním procesem na imin-dimer, což je molekula s krátkodobou životností. Tato molekula je následně katalyzována enzymem *VioE* za vzniku kyseliny prodeoxyviolaceinové (PVA). Dále dochází ke koordinované akci dvou oxygenáz. První z nich je *VioD*, který je schopný hydroxylovat PVA na pozici pátého indolového kruhu za vzniku proviolaceinu. Druhou oxygenázou je *VioC* a ten oxiduje zbylé indolové kruhy na druhé pozici za vzniku oxindolu, který je finálně produkován na violacein [2].

1,2-sigmatropní přesmyk na indolovém jádru na levé straně violaceinové struktury je považován za nejatraktivnější biosyntetický mechanismus v celé navrhované biosyntetické dráze, jelikož biosyntéza žádného jiného pigmentu nezáleží na tomto přesmyku a ani se nevyskytuje v žádném jiném známém přírodním produktu syntetické dráhy [2].

Tato dráha vyžaduje přítomnost pěti enzymů – *vioA*, *vioB*, *vioC*, *vioD* a *vioE*. Tyto enzymy byly klonovány a studovány *in vitro*. DNA fragment kódování těchto enzymů je 7,3 kb a jsou složeny z pěti genů jménem *vioA*, *vioB*, *vioC*, *vioD*, *vioE*, které jsou zásadní v produkci violaceinu v bakteriích *C. violaceum* [2].



Obrázek 3: Pět genů DNA fragmentu kódující enzymy violaceinu [2]

### 2.1.3 Využití violaceinu

Využití violaceinu je široké, protože vykazuje leishmanicidické, trypanocidické, antifungicidní, antivirotické, antibakteriální, antioxidační, antiprotozoální a protinádorové aktivity [2].

Violacein slouží jako antimikrobiální ochrana chránící před různými bakteriálními mikroorganismy a dalšími konkurenty. Jeho široká buněčná toxicita se ukazuje užitečná jako terapeutikum proti různými patogenními a endogenními buněčnými poškozeními. V souvislosti s tímto faktem se violaceinu připisovalo mnoho farmakologických vlastností [3].

Bakterie *J. lividum* dokáže produkovat violacein, který je stabilní v kyselých i alkalických roztocích (pH 2-11) a to i při zahřívání ve vodní lázni na teplotu 55 °C po dobu jedné hodiny. Díky této vlastnosti může být violacein použit jako přírodní barvivo pro bavlněné látky. Dále se používá pro rostliny jakožto prevence před škůdci. Vyznačuje schopnost inhibovat růst patogenních hub a parazitických háďátek, proto je užíván jako efektivní kontrola rostlin před antraknózou, hnilobou stonku a plísněmi. Také je známo, že violacein a jeho deriváty se používají jako složka insekticidů a fungicidů a využívají se proti plísním trávy, plísním sazenic fazolových klíčků a proti parazitickým háďátkům, které napadají vodní melouny [2].

Violacein produkovaný bakterií *J. lividum* pomáhá k přežití svému vlastnímu hostiteli, kterým může být například mločik popelavý. Tento plaz je globálně ohrožen infekčním kožním onemocněním zvaným chytridiomykóza. Toto onemocnění má na svědomí houbový patogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *J. lividum* pomáhá mločikům přežít toto kožní onemocnění, nachází se na jejich kůži a produkuje antifungicidní molekuly violaceinu, které dokážou bránit růstu patogenu, nebo jej úplně usmrtit. Tímto způsobem se dokáže mločik popelavý chránit a přežít tato kožní onemocnění [13].

#### 2.1.3.1 Potencionální komerční využití

Violacein by mohl být využíván v kosmetickém průmyslu společně s jeho deriváty v kombinaci s lipofilními a hydrofilními látkami. Kosmetické produkty obsahují přírodní mikrobicidy zahrnující violacein získaný z bakterie *C. violaceum*. Violacein vykazuje důležitou antibiotickou aktivitu proti *S. aureus* a také antioxidačního efektu na kyselině linoleové [2].

Další významná potenciální oblast komerčního využití violaceinu je v přípravcích pro ochranu lidské pokožky proti slunci. Využívalo by se antioxidační a antimikrobiální fotoprotektivní aktivity violaceinu. Tyto aktivity byly pozorovány při doplnění violaceinu k extraktům okurky a listů aloe vera. Violacein také dokáže zvýšit účinnost ochranného faktoru (SPF) opalovacího krému. Potenciálním využitím tohoto pigmentu je výroba nových opalovacích krémů na bázi biologických materiálů [14]. U opalovacích krémů, do kterých byl přidán violacein, se zlepšila absorpce UV v rozmezí 290-320 nm [15], díky toho je možno zvýšit ochranný faktor společně s kombinací dalších složek využívajících se při výrobě opalovacích krémů. Toto využití přineslo myšlenku použití violaceinu jakožto fotoprotektiva [14].

V textilním průmyslu by se aplikace violaceinu, jakožto fialového pigmentu, dala využít například u světlo stálých barevných vláken [16].

### 2.1.3.2 Antibiotikum a protirakovinné vlastnosti

Violacein má antibakteriální potenciál, jelikož má schopnost působit patogenně na některé organismy, konkrétně je schopen usmrtit bakterie rodu *Staphylococcus* a *Escherichia*, které se vyskytují u krav a způsobují záněty vemene. Tyto dvě bakterie jsou nejčastějším problémem u krav a také v mlékárenském průmyslu, jelikož jsou zodpovědné za vážné ekonomické ztráty způsobené záněty mléčných žláz krav. Vyhodnocení antibakteriální aktivity violaceinu za využití druhu *S. aureus* nevykazuje různé stupně rezistence vůči antibiotikům. Indikovaná citlivost na violacein vykazuje minimální koncentrace pro inhibici v rozsahu od 6,25 do 25  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Deriváty violaceinu mají synergické efekty, společně v kombinaci s jinými antibiotiky, zejména Penicilinem, jsou účinnější vůči velice odolným kmenům bakterií, včetně těch multirezistentních [2]. Tato vlastnost by se mohla uplatnit proti patogenním bakteriím odolných vůči antibiotikům, jako je MRSA [3].

Pigment violaceinu byl také testován pro své protirakovinné vlastnosti proti různým lidským rakovinným liniím, jmenovitě mezi ně patří rakovina jater, plic, kůže, nosní přepážky. Buňky byly ošetřeny různými koncentracemi pigmentu během logaritmické růstové fáze. Pro stanovení antimikrobiální aktivity se violaceinový pigment přidal v různých koncentracích. Výsledky zkoumání vedou k závěru, že violaceinový pigment dokáže vykazovat cytotoxickou aktivitu proti všem testovaným rakovinovým buněčným liniím. Všechny zde testované rakovinové buněčné linie jsou citlivé na violaceinový pigment s více než 50 % buněčnou smrtí nad 100  $\mu\text{M}$  koncentrací [1]. Vzhledem k tomu, že violacein je cytotoxický i vůči nerakovinovým buňkám [17], kritickým faktorem pro jeho klinické využití je fakt, že je toxičtější pro rakovinné buňky než pro buňky zdravé [3].

## 2.2 Violacein tvořící bakterie

Všechny v současnosti známé bakteriální druhy produkující violacein jsou heterotrofní a byly objeveny převážně ve vodním prostředí. Mnoho zástupců bylo izolováno z chladného prostředí, jako jsou arktické ledovce, sladkovodní i mořské oblasti [3].

### 2.2.1 Bakteriální pigmenty

Přírodní pigmenty pocházející z rud, hmyzu, rostlin a zvířat byly používány už od prehistorického období. Syntetická barviva, která v polovině 19. století přírodní pigmenty nahradila, jsou stále častěji využívána i přes jejich nebezpečný vliv na člověka a životní prostředí [18]. Bakteriální pigmenty, na rozdíl od syntetických barviv, nabízejí lepší biologickou rozložitelnost a vyšší kompatibilitu s životním prostředím. Toho lze využít v mnoha aplikacích pro obory jako je potravinářství, textil, medicína, farmacie či kosmetologie [19].

Bakteriální pigmentace se běžně používá pro taxonomickou identifikaci a zařazení druhu. Fototrofní bakterie lze identifikovat podle červeného, růžového, žlutého a oranžového pigmentu, jejichž charakteristický vzhled je způsoben syntézou karotenoidů [20]. Zelená pigmentace je spojována s produkcí chlorofylu u sinic nebo se současnou přítomností karotenoidů a bakteriochlorofylu u některých bezkyslíkatých fototrofů [21]. Fialové pigmenty jsou běžné především u anaerobních fototrofních fialových sirných a nesirných bakterií [22]. Ve vzácných případech je fialová pigmentace připisována produkci violaceinu u gram negativních beta proteobakterií z rodu *Oxalobacter* včetně rodů *Janthinobacterium*, *Collimonas* a *Duganella* stejně jako *Chromobacterium* [23].

### 2.2.2 *Iodobacter*

Zástupci rodu *Iodobacter* jsou Gram-negativní bakterie tyčinkovitého tvaru. Vyskytují se jednotlivě, v párech a někdy i v řetězcích. Patří mezi fakultativně anaerobní bakterie. Jak napovídá jejich jméno, *ioeides* je z řečtiny fialový. Byly takto pojmenovány po své schopnosti vytvářet fialovou pigmentaci [24]. Charakteristická modro-fialová pigmentace se objevuje především v centru kolonií [1]. Někdy se lze setkat i s kmeny, které vytváří nepigmentové kolonie. Pěstují se na běžných peptonových médiích při 4-30 °C, ideální růst se ale uvádí při 25 °C. Mezi druhy této bakterie patří *Iodobacter fluviatilis* [24].

### 2.2.3 *Duganella*

Bakterie mají vyvinuté mechanismy, které jim umožňují růst a přežití i v nepříznivém prostředí půdy a rhizosféry [7]. Rhizosféra divokých dlouhověkých dřevin by mohla být dobrým zdrojem pro nové bioaktivní sloučeniny produkující bakterie. Mezi pěstovanými a divokými stromy, olivovník patří mezi druhy se značnou dlouhověkostí a nejbohatší genetickou rozmanitostí [25], [26]. Díky tomu byla izolována a poprvé identifikována *Duganella spp.* v rhizosféře dřevin ve středomořském prostředí, která dokáže produkovat modrofialový sekundární metabolit violacein [7].

Izolát z rodu *Duganella* z čínského ledovce Tianshan produkuje modro-fialový pigment violaceinu a deoxyviolaceinu [27].

### 2.3 *Janthinobacterium*

*Janthinobacterium* patří mezi aerobní Gram-negativní bakterie, které žijí v extrémních podmínkách, zejména v místech chladného a suchého prostředí za přítomnosti UV záření. Mají tmavě fialovou barvu díky své schopnosti produkovat fialový violacein, který lze vidět na Obrázku 4 [2].



Obrázek 4: *Janthinobacterium lividum* [37]

#### 2.3.1 Výskyt

Antarktický kmen *Janthinobacterium sp.* byl izolován roku 2014 ze vzorků ledovců [28]. Tento kmen označovaný jako SMN 33.6 byl definován morfologicky, biochemicky a fylogeneticky stejně jako jeho ethanolový extrakt obsahující violacein. Tento ethanolový extrakt byl studován proti multi-resistentním Gram-negativním bakteriím *Acinetobacter baumannii* a *Pseudomonas aeruginosa* [2], [28]. Byly získány hodnoty MIC (nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která dokáže inhibovat viditelný růst mikroorganismů přes noc [29]) a to v rozmezí od 0,5 do 16 µg/ml [28].

*Janthinobacterium sp.* B9-8 byl izolován z nízkoteplotních odpadních vod čínského města Xinjiang. Také dokáže produkovat violacein. V nedávné době byla sestavena celá genomová sekvence této bakterie, což v budoucnu povede k lepší průmyslové produkci violaceinu a také k lepšímu pochopení celého mechanismu jeho biosyntézy. Tato bakterie dokáže růst velmi

rychle a dosáhnout vysokého množství buněk a obsahu violaceinu za 24 hodin při teplotě 25 °C [30].

*Janthinobacterium* sp. Ant5-2-1, který byl izolován ze sezóně zamrzlého preglaciálního jezera Podprudnoye v Schirmacher Oasis ve východní Antarktidě, je psychrotolerantní a Gram-negativní bakterie, které se daří v extrémně chladných a suchých podmínkách s vysokými hodnotami ultrafialového záření (UV). Dříve bylo uváděno, že fialový pigment podobný violaceinu (PVP) produkovaný Ant5-2 dokáže absorbovat UVA, UVB a UVC záření a projevuje silnou antimikrobiální a protirakovinnou aktivitu [31].

## 2.3.2 Vybraní zástupci rodu *Janthinobacterium*

### 2.3.2.1 *Janthinobacterium lividum*

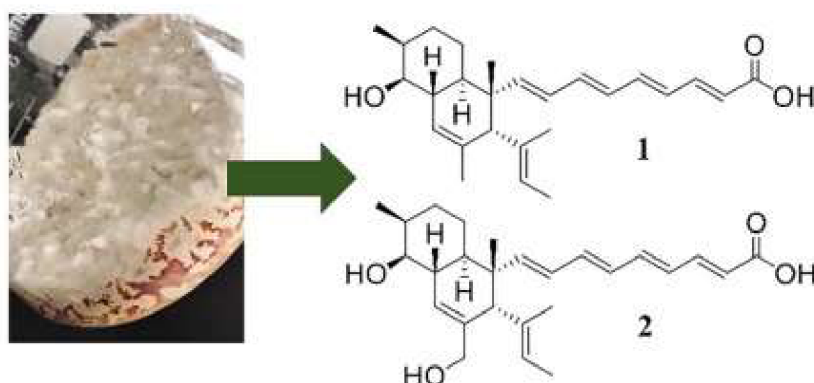
*J. lividum* je bakterie běžně izolovatelná z mikroflóry půdy a vody řek, jezer a pramenů. Tento kmen je jedním z nejběžnějších fialově pigmentovaných druhů, které produkují fialový, ve vodě nerozpustný, pigment, který je rozpustný v alkoholech jako je methanol a ethanol a v acetonu. Tento kmen se po kontaminaci může podílet na kažení pasterizovaného mléka, příležitostně je schopen způsobit oportunní infekce, které mohou vést ke septikémii [32]. Tento kmen je také schopný produkce polyhydroxyalkanoátů za využití glukózy. [33]

### 2.3.2.2 *Janthinobacterium svalbardensis*

Tento kmen izolovaný ze vzorků ledovce z Arktidy je příbuzný *Janthinobacterium lividum*, ale představuje novou linii odlišnou od doposud známých druhů tohoto rodu. Kmen byl testován na fenotypové znaky a bylo zjištěno, že je schopen produkovat tmavě červenohnědé až černé pigmenty, které jsou od fialového pigmentu produkovaného rody *Janthinobacterium*, *Chromobacterium* a *Iodobacter* odlišné. Izolát jsou psychrotrofní, gramnegativní bakterie tyčinkovitého tvaru [10].

### 2.3.2.3 Mořští zástupci *Janthinobacterium*

Mořské mikroorganismy jsou důležitými zdroji pro objev nových přírodních produktů s unikátní strukturou a rozmanitou škálou bioaktivit. Dva vzácné polyketidy, pojmenované jako janthinopolyenemycin A a janthinopolyenemycin B byly izolovány ze společné kultury dvou mořských bakterií *Janthinobacterium* spp. ZZ145 a ZZ148. Jejich struktury byly stanoveny kombinací rozsáhlých NMR spektroskopických analýz. Oba janthinopolyenemyciny A i B (Obr. 5) vykazují aktivitu při inhibici růstu bakterií *Candida albicans* [34].



Obrázek 5: Struktury janthinopolyenemycin A a B [19]

Oba kmene ZZ145 a ZZ148 byly izolovány ze vzorku mořského dna. Zpočátku byly kultivovány nezávisle za použití různých typů médií. Chemická analýza a test antifungální aktivity ukázaly, že kmen ZZ145 v médiu EY produkoval některé sekundární metabolity se slabou antifungální aktivitou a kmen ZZ148 v médiu B produkoval méně metabolitů se

silnější antifungální aktivitou. Jelikož získané výsledky nebyly uspokojivé, byly zahájeny pokusy kokultivace těchto dvou kmenů v různých médiích, aby se vyvolala produkce nových přírodních produktů. Zajímavostí je, že, že společná kultivace kmenů ZZ145 a ZZ148 na pevném médiu výrazně produkovala sekundární metabolity se silnější biologickou aktivitou. Chemické zkoumání surového extraktu připraveného z rozsáhlé společné kultury obou kmenů v rýžovém médiu vedlo k izolaci dvou nových polyketidů, které jsou uvedené výše [34].

## 2.4 Polyhydroxyalkanoáty

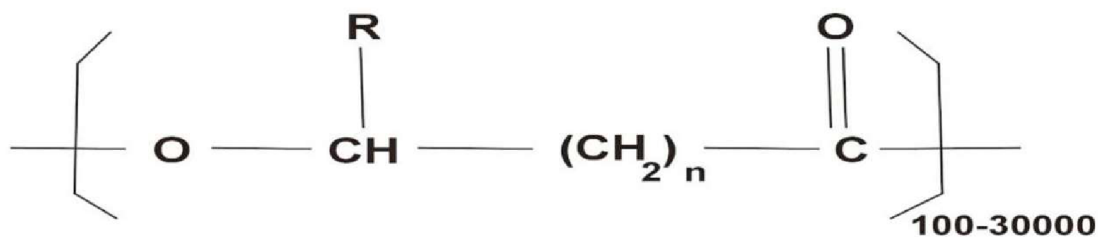
Polyhydroxyalkanoáty (PHA) byly objeveny francouzským vědcem Maurice Lemoignem roku 1925 v kultuře *Bacillus megaterium* ve formě poly(3-hydroxybutyrátu). PHA jsou skupina biopolymerů, která je produkována celou řadou prokaryotických mikroorganismů jakožto subcelulární zdroj energie a taktéž jako zásobárna uhlíku ve formě lipofilních granulí. Tyto granule se od sebe mohou lišit chemickým složením a uspořádáním, to závisí na typu mikroorganismu, který produkuje konkrétní granuli. Více než 90 rodů gram-pozitivních i gram-negativních bakterií dokážou produkovat PHA za aerobních i anaerobních podmínek. Tyto bakterie se dají rozdělit do dvou hlavních skupin. V první skupině jsou bakterie, které vyžadují pouze omezený přísun živin (fosfor, dusík, kyslík, hořčík) a neakumulují vzniklý PHA v průběhu růstové fáze. Do této skupiny můžeme zařadit například *C. necator*. Do druhé skupiny patří bakterie (např. rekombinantní *E. coli*), které akumulují PHA během růstové fáze a nevyžadují omezení v přísunu živin [35].

Biodegradabilita a biokompatibilita jsou vlastnosti, které dělají z PHA látky se širokým využitím v odvětvích, jako je biomedicína, bioinženýrství či farmacie, vyrábí se z nich například bio-implantátové náplasti nebo obvazy. PHA jsou ekologicky šetrné materiály, které mají, na rozdíl od běžných plastů, pozitivní sociální a environmentální dopad [35].

### 2.4.1 Struktura PHA

PHA jsou biopolymery obvykle se skládající z opakujících se  $\beta$ -hydroxyalkanových kyselin, mezi karboxylovou skupinou jednoho monomeru a hydroxylovou skupinou sousedního monomeru se uplatňují esterové vazby [33]. Monomery jsou složeny ze 3 až 16 atomů uhlíku s různými nasycenými nebo nenasycenými, lineárními nebo rozvětvenými řetězci, které obsahující alifatické nebo aromatické postranní skupiny [36]. Obecně se dají PHA rozdělit do tří základních skupin na základě délky uhlíkového řetězce. První skupinou jsou PHA s krátkým řetězcem (scl-PHA = short chain length), ty mají 3-5 uhlíků [37]. Mezi tyto krátko řetězcové polymery patří například polyhydroxybutyrát (PHB), což je homopolymer obsahující monomery o čtyřech uhlících [33]. Druhou skupinou jsou PHA se středně dlouhým uhlíkatým řetězcem (mcl-PHA = medium chain length), skládá se z monomerů o 6-14 uhlících a většinou existují jakožto kopolymery v bakteriích. Třetí skupinou jsou PHA s dlouhým uhlíkatým řetězcem o obsahu více než 14 atomů uhlíku (lcl-PHA = long chain length). Další možné dělení rozděluje PHA na homopolymery obsahující pouze jeden typ monomerní jednotky a na heteropolymery (kopolymery), které jsou složeny z dvou a více než jednoho stejného typu monomerní jednotky. Kopolymery jsou složeny buď jen ze scl-PHA/mcl-PHA, nebo jejich kombinací [37]. Monomerní strukturu PHA udává několik faktorů, mezi které patří především typ PHA-syntáz (klíčové enzymy zapojené do polymeračního kroku biosyntetické dráhy PHA), typem mikroorganismu, uhlíkovým zdrojem, který je využíván bakterií během procesu fermentace a metabolické cesty vedoucí k produkci PHA [33].

Obecná struktura polyhydroxyalkanoátů je uvedena na Obrázku 6 [35].

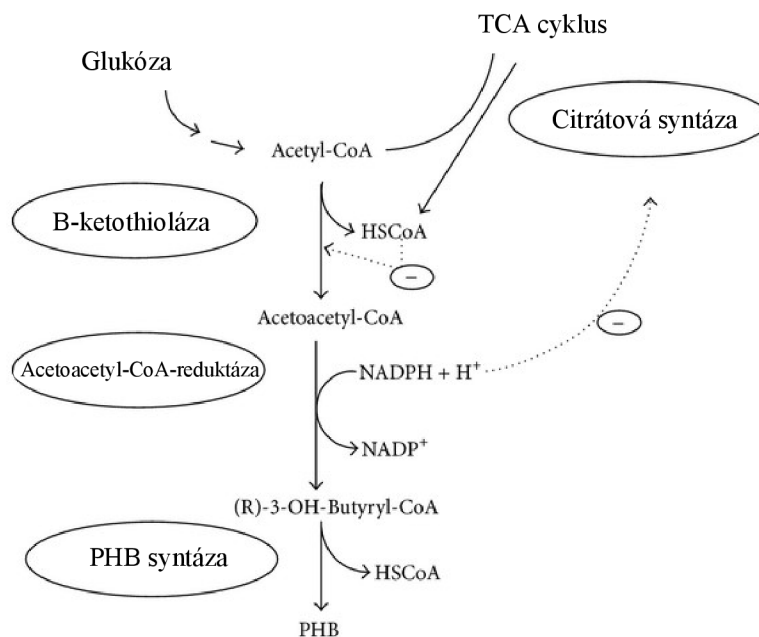


Obrázek 6: obecná struktura PHA [35]

## 2.4.2 Biosyntéza PHA

PHA biosyntéza je přímo nebo nepřímo spojena s mnoha centrálními metabolickými drahami, jako je glykolýza nebo Krebsův cyklus. Existuje 14 druhů biosyntetických drah PHA, ve všech se uplatňuje acetyl-CoA, který je velice důležitým prekursorem pro biosyntézu scl-PHA a mcl-PHA. Detailně popsanou dráhou je syntéza poly(3-hydroxybutyrátu), neboli PHB u druhu *C. necator*. Tato dráha se skládá ze tří reakčních kroků, za které jsou zodpovědné tři různé enzymy: acetyl-CoA-acetyltransferáza (*PhaA*), acetoacetyl-CoA-reduktáza (*PhaB*) a PHA-syntáza (*PhaC*) [38].

Glukózou vzniklý Acetyl-CoA se naváže do aktivního místa enzymu, což vede ke kovalentní vazbě acetylu na enzym pomocí thiol-esterické vazby a k odstoupení volného CoA. Následně do aktivního místa přichází další acetyl-CoA, který kondenzuje s acylem na acetoacetyl-CoA. První krok metabolické dráhy je tedy dvoukrokový. V druhém kroku acetoacetyl-CoA-reduktáza (*PhaB*) redukuje acetoacetyl-CoA na (R)-3-hydroxybutyryl-CoA, jako kofaktor se zde uplatňuje NADPH. V posledním kroku dráhy PHA-syntáza (*PhaC*) polymerizuje hydroxyalkanolové kyseliny, z dráhy odchází HSCoA a vzniká PHB. Celá tato metabolická dráha je popsána na Obrázku 7 [38]. V současné době bylo popsáno více než 60 různých genů kódujících různé formy *PhaC* [39].



Obrázek 7: Metabolická dráha syntézy PHB u *Cupravidus necator*, převzato, upraveno [40]



### 2.4.3 PHA syntáza

PHA syntáza (*phaC*) je klíčovým enzymem v biosyntéze PHA kde polymeruje monomery na PHA polymery. Typy monomerů začleněných do dlouhého řetězce PHA jsou určeny substrátovou specifitou *phaC*. V současné době existují dva *phaC* s úspěšně prozkoumanou strukturou katalytické domény jedná se o PHA syntázy *C. necator* a *Chromobacterium sp.* USM2 [41].

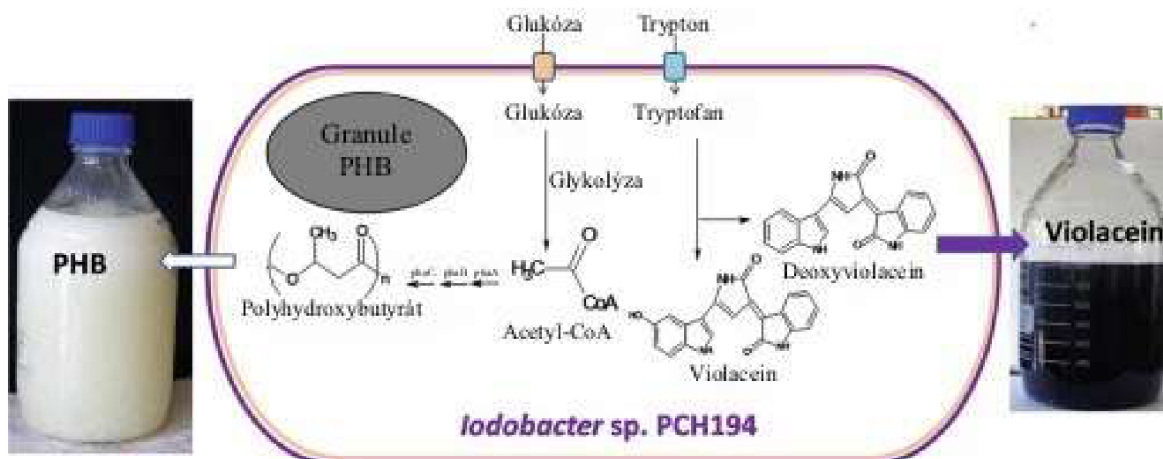
Existují čtyři třídy *phaC*, kmenovitě jsou to Třída I, Třída II, Třída I a Třída IV. Pro každou z nich jsou typické určité vlastnosti. Jsou rozděleny na základě primární struktury odvozené z aminokyselinových sekvencí, substrátové specifity a složení podjednotek [42]. Syntázy I. Třídy jsou schopny používat CoA-thioester hydroxyalkanoátů, které mají jako substrát uhlík o 3-5 atomech [43]. Jsou to strukturované enzymy s jednou jednotkou do dvou domén (N-terminální dominantní doména a C-terminální katalytická doména) [41]. PHA syntáza II. Třídy zahrnují jednotkové enzymy obecně menší než u I. Třídy. Jsou schopny využívat CoA-thioestery hydroxyalkanoátů s 6 až 14 atomy uhlíku jako substrát [43]. Vyskytují se hlavně u rodu pseudomonád, například v případě *P. aeruginosa*, která kóduje dva *phaC* [41]. III. Třída vyžaduje dvě podjednotky, aby byla funkční – katalytickou podjednotku kódovanou genem *phaC* a druhou *phaE*, jehož funkce ale zatím zůstává neznámá. Třída IV se také skládá ze dvou podjednotkových enzymů, avšak k funkčnosti je potřeba katalytickou podjednotku kódovanou *phaC* a *phaR*, jejíž funkce také zůstává neznámá. Tato třída převládá u organismů rodu *Bacillus* [44].

### 2.4.4 Produkce PHA a koprodukce PHA a violaceinu

Polyhydroxyalkanoáty jsou produkovány velkým počtem mikroorganismů jakožto zásobní zdroje energie. Tyto mikroorganismy dokážou díky PHA žít v různorodém prostředí, jako jsou slané i sladké vody, půda, čistíčky odpadních vod, i v extrémních prostředích za nízkých teplot a působením UV [1].

Koprodukce průmyslově relevantních biopolymerů a biomolekul pomocí mikroorganismů mají biotechnologický význam. Zde se uplatňuje neobvyklá bakterie kmene *Iodobacter sp.* PCH 194 z ledovcových jezer západních Himalájí. Dokáže koprodukovat biopolymery PHA s biomolekulami pigmentu violaceinu. Statická optimalizace poskytla oba produkty v médiu obsahující glukózu a trypton jakožto zdroje uhlíku a dusíku. Purifikované PHA byl polyhydroxybutyrát (PHB) a pigment tvořen violaceinem (50-60 %) a deoxyviolaceinem (40-50 %). Bioprocés ve 22 litrech fermentoru s 20 % rozpuštěného O<sub>2</sub> vyprodukuje 11±1 g/l PHB, což činí 58 % suché buněčné hmoty a violaceinový pigment o 1,5±0,08 g/l. Získané PHB bylo použito pro výrobu bioplastického filmu [1].

Kolonie bakterií *Iodobacter sp.* PCH 194 byly izolovány ze vzorku sedimentu ledovcového jezera v Sach Pass v západních Himalájích. Vzorek sedimentu byl sériově zředěn a nanesen na médium tvořené antarktickými bakteriemi (0,5% pepton, 0,2% kvasinky a 2% agar) a inkubován po dobu 5 dnů při teplotě 20 °C. Všechny jednotlivé kolonie byly dále odebrány a purifikovány nanesením na ABM destičky. Bakteriální izolát byl zkontrolován na potenciál produkce PHA na biochemické úrovni na agarovém médiu, které je určeno pro produkci PHA. Toto médium obsahuje barvivo nilská červeň. Morfologie kolonií byla pozorována na AMB destičkách po dobu 48 až 72 hodin inkubace při stálé teplotě 20 °C. Bakteriální izoláty byly testovány na potenciální produkci PHA a na přítomnost genu *phaC*. [1].



Obrázek 8: Koprodukce PHA a violaceinu, převzato, upraveno [1]

*Iodobacter sp. PCH 194* má fialovou pigmentaci a patří mezi Gram-negativní kmeny. Charakteristické modro-fialové zbarvení se objevuje především v centru kolonií, kdy rostou při teplotě 20 °C po dobu 48 hodin. Bakteriální buňky mají toto zbarvení v tekutém živném médiu po 30-36 hodinách inkubace při teplotě 20 °C. Tyto bakterie mají pozitivní výsledky při syntéze PHA [1].

Některé kmeny *Janthinobacterium* (konkrétně UMAB-56 a UMAB-60) společně s dalšími dvěma kmeny *Pseudomonas* (UMAB-08 a UMAB-40), které byly společně izolovány z Antarktiky, jsou schopné produkovat PHA. Bylo zjištěno, že *Pseudomonas* nesou geny PHA-syntáz, které spadají do dvou různých genových klastrů PHA – třídy I a třídy II, které jsou zodpovědné za biosyntézu PHA s krátkým a se středně dlouhým řetězcem. Na druhé straně, *Janthinobacterium* nesou třídu I a blíže necharakterizované geny podílející se na syntéze PHA. Izoláty *Janthinobacterium*, spadají do samostatného kladu z běžných tříd I, II, III a IV fylogenetického stromu PHA-syntázy (*PhaC*). Vícenásobné srovnání sekvencí ukázalo, že blíže necharakterizované geny PHA-syntázy obsahují všechny vysoce konzervované aminokyselinové zbytky a také katalytickou třídu PHA-syntázy. Výsledky biosyntézy PHA a *in vitro PhaC* enzymatického testu ukázaly, že tato blíže necharakterizovaná PHA-syntáza z *Janthinobacterium sp. UMAB-60* je funkční [39].

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Použité mikroorganismy, chemikálie a přístroje

##### 3.1.1 Použité mikroorganismy

V této práci se pracovalo s kmeny *Janthinobacterium lividum* CCM 160 [45], *Janthinobacterium lividum* CCM 1888 [45] a *Iodobacter fluviatilis* CCM 3308 [46] zakoupenými z České sbírky mikroorganismů.

Kmen CCM 160 byl izolován z půdy [47], kmen CCM 1888 z jezerní vody [48] a kmen CCM 3308 z řeky Wey, Velká Británie [46].

##### 3.1.2 Použité chemikálie

Destilovaná voda

Dihydrogenfosforečnan draselný, Lach-Ner, s. r. o.

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, Lach-Ner, s. r. o.

Glukóza, Lach-Ner, s. r. o.

Glycerol, Lach-Ner, s. r. o.

Hovězí extrakt, HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, Lach-Ner, s. r. o.

Chlorid sodný, Lach-Ner, s. r. o.

Kvasnicový extrakt, HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.

L-tryptofan, PanReac AppliChem

Pepton, HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.

Síran amonný, LACHEMA, a. s.

Síran hořečnatý heptahydrát, Lach-Ner, s. r. o.

Všechny použité chemikálie byly v čistotě p. a. a vyšší.

Trypton, HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.

##### 3.1.3 Komponenty pro PCR, gelovou elektroforézu a přečištění DNA

Master Mix OneTaq Hot Start (2x koncentrovaný) se standardním pufrem (složení: 20 mM Tris-HCl (pH 8,9), 1,8 mM MgCl<sub>2</sub>, 22 mM NH<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>, 22 mM KCl, 0,2 mM dNTPs, 5% glycerol, 0,06% IGEPAL CA-630, 0,05% Tween 20, 25 jednotek/ml OneTaq Hot Start DNA polymeráza (New England Bio Labs, UK)

25 mM MgCl<sub>2</sub> (ThermoScientific, USA)

Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics Europe, EU)

Sterilní voda Aqua pro injectione (B.BraunMedical, SRN)

Primery (Generi-Biotech, ČR)

Agaróza (Sigma-Aldrich, SRN)

DNA žebříček s fragmenty o délce 3000, 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 a 100 bp (Nippon Genetics Europe, EU)

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, SRN)

##### 3.1.4 Použité přístroje

Analytické váhy, Boeco

Centrifuga MIKRO 200, Hettich

Centrifuga Hettich EBA 20, Maneko

Laminární box Aura mini, BioAir-Euroclone

Magnetická míchačka Magnetic Stirrer MMS-3000, BioSan  
Microspin FV-2400, BioSan  
Plynový chromatograf Trace GC Ultra, Thermo Scientific, kolona DB-WAX 30 m by 0.25 mm  
Předvážky EW 620-3NM, Kern  
Termoblok SBH200D, Stuart equipment  
Termocyklér Biorad MyCycler  
Třepačka SHO-2D, Witeg Germany  
UV/VIS Spektrofotometr „Nanophotometer Pearl“, Implen  
Vortex, Heidolph Reax Top  
Běžné laboratorní sklo a vybavení

### 3.2 Příprava kryo konzerv

Byl připraven 30% vodný roztok glycerolu, který se následně rozpipetoval po 0,5 ml do připravených kryozkumavek. Kryozkumavky byly vysterilovány. Do takto připravených zchlazených kryozkumavek bylo napipetováno po 1 ml dané kultury. Kultury v kryokonzervách byly uchovávány v mrazícím boxu při teplotě -70 °C.

### 3.3 Kultivace bakterií

Kultury vybraných tří bakteriálních kmenů *Janthinobacterium* a *Iodobacter* byly kultivovány v Erlenmayerových baňkách o objemu 100 ml v 50 ml živného média NB w/1% pepton. Před každým naočkováním kultury byly Erlenmayerovy baňky spolu s médiem vysterilizovány. Po vychladnutí bylo následně do média naočkováno 1,5 ml kultury. Očkovalo se v sterilním prostředí laminárního boxu. Erlenmayerova baňka byla sterilně uzavřena a umístěna na třepačku nastavenou na 145 rpm. Růst bakterií probíhal za laboratorní teploty (23 až 26 °C) po dobu 24 h.

*Médium NB (komerčně dostupné)*

Hovězí extrakt	1 g/l
Pepton	1 g/l
NaCl	0,5 g/l
Agar	0,2 g/l

### 3.4 Optimalizace produkčního média

Na optimalizaci byla použita tato produkční média:

*Dantas et al.* [49]

Glukóza	5 g/l
Pepton	5 g/l
Kvasnicový extrakt	2,5 g/l
L-tryptofan	0,3 g/l
Destilovaná voda	1000 ml

*Kumar et al.* [1]

Glukóza	40 g/l
Trypton	5 g/l
NaCl	1 g/l
Destilovaná voda	1000 ml

### **Kanelli** [50]

Glukóza/glycerol	10 g/l
Hovězí extrakt	3 g/l
Pepton	5 g/l
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	5,72 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	11,3 g/l
Destilovaná voda	1000 ml

### **H16**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,02 g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1/3 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	11,1 g/l
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,2 g/l
L-tryptofan	0,3 g/l
Glycerol	20 g/l
Destilovaná voda	1000 ml
MES	1 ml/l

Po uplynutí 24 h byly kmeny použitých bakterií přeočkovány do výše uvedených produkčních médií. Ty byly připraveny tak, že byly použity Erlenmayerovy baňky o objemu 250 ml a celkový objem média činil 95 ml. Baňky s médiem byly vysterilovány. Po vychladnutí bylo do média napipetováno 5 ml původní kultury. Tento krok se prováděl sterilně v prostředí laminárního boxu. Erlenmayerova baňka s přeočkovanou kulturou se umístila na třepačku při intenzitě třepání 145 rpm. Kultivace probíhala při laboratorní teplotě (23-25 °C) po dobu 72 hodin.

#### **3.4.1 PHA**

Po uplynutí 72 h byla ukončena kultivace. Z každé Erlenmayerovy baňky se 100 ml kultury v daném produkčním médiu se odebralo dvakrát po 10 ml roztoku. Roztok se centrifugoval 10 minut při otáčkách 6000 rpm. Následně se supernatant odpipetoval a k biomase usazené na dně zkumavky se přidalo 5 ml destilované vody pro promytí vzorku. Na vortexu se usedlina rozsuspendovala a následně se opět centrifugovalo 10 minut na otáčky 6000 rpm. Supernatant se opět odpipetoval a pelet se umístil do sušárny nastavené na 70 °C. Po úplném vysušení se pelet zvážil na analytických váhách s přesností na 4 desetinná místa. Následně se navážilo 12-18 mg biomasy na následnou analýzu do krimpovacích vialek.

#### **3.4.2 Esterifikace**

Do krimpovacích vialek s naváženou biomasou se napipetovalo po 1 ml chloroformu a 0,8 ml směsi interního standartu ISTD (skládá se z 15 hm.% kyseliny sírové v methanolu a kyseliny benzoové o koncentraci 5 mg/ml), vialky se uzavřely zátkou pomocí krimpovacích kleští. Takto připravené vzorky se umístily do termobloku, který byl předehřátý na 94 °C. Esterifikace vzorku probíhala po dobu 3 h. Po tuto dobu se vzorky pravidelně kontrolovaly, zda z nich neuniká vzorek. Do velkých šroubovacích vialek se napipetovalo 0,5 ml 50 mM NaOH, vychladlý obsah po esterifikaci se do ní přelil a vialka se pořádně protřepala. Po ustálení fází se ze spodní organické fáze odpipetovalo 50 µl do šroubovací vialky, ve které bylo přichystáno 900 µl izopropylalkoholu. Přichystané vzorky byly připraveny na analýzu na plynový chromatograf s plamenovým ionizačním detektorem (GC-FID).

### 3.4.3 Extrakce violaceinu a spektrofotometrické stanovení violaceinu

Pro stanovení violaceinu byl převzatý a upravený postup ze studie zaměřené na koprodukcí PHB a violaceinu publikovaného výzkumným týmem *Kumar a kol.* (viz kapitola 2.4.3) [1]. Z každé Erlenmayerovy baňky se 100 ml kultury v daném produkčním médiu se odebralo dvakrát po 10 ml roztoku. Roztok se centrifugoval 10 minut při otáčkách 6000 rpm. Následně se supernatant odpipetoval a k biomase usazené na dně zkumavky se přidalo 5 ml methanolu. Na vortexu se usedlina rozsuspendovala a následně se opět centrifugovala 10 minut na otáčky 6000 rpm. Supernatant se odpipetoval do nových, čistých plastových zkumavek. Pokud byl pelet stále fialový, krok se zopakoval a přidalo se další množství methanolu.

Takto připravené vzorky byly měřeny na spektrofotometru v plastových kyvetách při vlnové délce 570 nm, blankem je methanol.

Výpočet koncentrace a hmotnosti violaceinu ze vzorku kultury:

$$c_{\text{methanol}} = \frac{A}{0,0734} \text{ [mg/l]}$$
$$c = \frac{c_{\text{methanol}}}{2} \text{ [mg/l]}$$
$$m = c \cdot \frac{V}{1000} \text{ [mg]}$$

Kalibrační křivka pro fialový pigment měřený při 570 nm byla přebrána z publikované práce týmu *Kumar a kol.* V článku byla připravena rozpuštěním známého množství komerčního violaceinu v methanolu. [1].

### 3.5 Optimalizace produkčního média Kanelli s glycerolem

Při další kultivaci se pracovalo pouze s produkčním médiem Kanelli s glycerolem, kterému se upravilo složení viz Tabulka 2. A) byla zopakována kultivace média s původním složením, za B) místo peptonu byl použit trypton, a to ve stejném množství (5 g/l) a za C) bylo k původnímu složení přidáno 0,3 g/l L- tryptofanu. Přehledně zobrazuje tabulka č. 2:

Tabulka 2: Optimalizace produkčního média Kanelli s glycerolem

Chemikálie	Navážka	A	B	C
glycerol	10,0 g/l	✓	✓	✓
hovězí extrakt	3,0 g/l	✓	✓	✓
pepton	5,0 g/l	✓	-	✓
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	5,7 g/l	✓	✓	✓
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12 H <sub>2</sub> O	11,3 g/l	✓	✓	✓
L-tryptofan	0,3 g/l	-	-	✓
Trypton	5,0 g/l	-	✓	-

Jednotlivě byly naváženy všechny složky zvolených variant produkčního média. Následně bylo médium rozlito po 95 ml do 250 ml skleněných Erlenmayerových baněk, které se uzavřely zátkou a překryly alobalem a baňky se vysterilovaly. Po vychladnutí bylo následně do média napipetováno 5 ml původní kultury CCM 160, CCM 1888 a CCM 3308. Tento krok se prováděl sterilně v prostředí laminárního boxu. Erlenmayerova baňka s přeočkovanou kulturou se umístila na třepačku při intenzitě třepání 145 rpm. Kultivace probíhala pod lampou při teplotě 30 °C po dobu 72 hodin.

Po uplynutí časového intervalu se stejným způsobem jako u optimalizace produkčního média odebraly vzorky na určení množství PHA a na extrakci violaceinu.

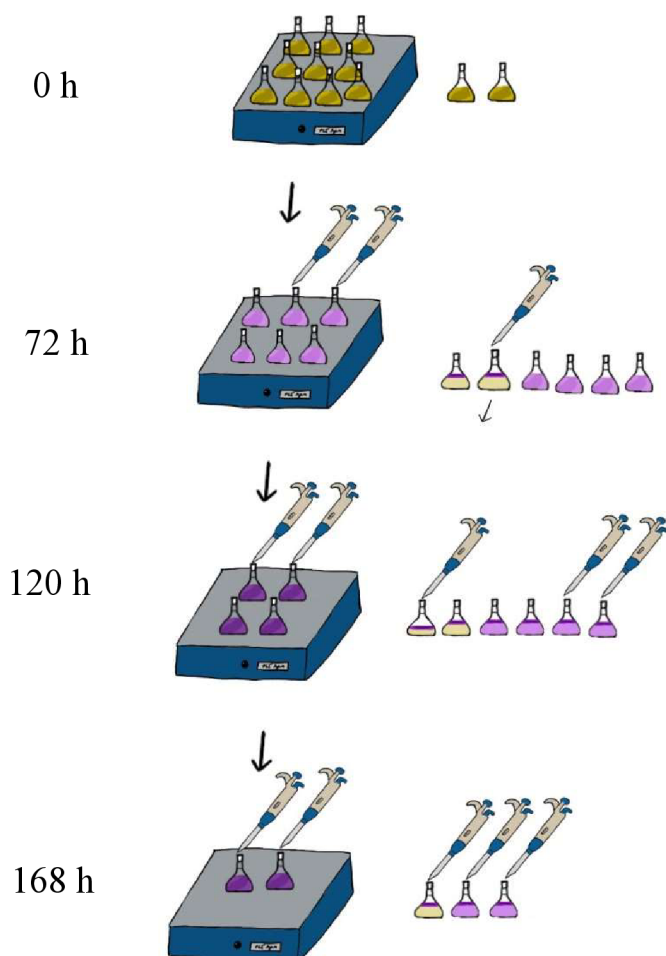
### 3.6 Kultivace při třepání a stání

Na kultivaci bylo stejným způsobem jako u optimalizací připraveno produkční médium, pracovalo se s médiem Kanelli s glycerolem a s bakteriálním kmenem CCM 160. Bylo připraveno 12 Erlenmayerových baněk o objemu 250 ml s 95 ml produkčního média, do kterého bylo následně přidáno 5 ml původní kultury. Tento krok se prováděl sterilně v prostředí laminárního boxu. Průběh celého experimentu je graficky znázorněn na Obrázku 9.

10 Erlenmayerových baněk bylo umístěno na třepačku a submerzně kultivováno při intenzitě třepání 145 rpm za laboratorních podmínek (teplota 23-25 °C), zbylé 2 Erlenmayerovy baňky se postavily na pracovní desku vedle třepačky a kultivovaly se staticky za stejných laboratorních podmínek. Po uplynutí 72 h se zanalyzovaly 2 Erlenmayerovy baňky z třepačky a jedna ze statické kultivace, která byla před odebráním vzorku promíchána. Bylo odebráno 10 ml na biomasu a 10 ml na extrakci violaceinu. Postup byl stejný jako je uveden výše. Erlenmayerova baňka, která se doposud kultivovala staticky a bylo z ní právě odebráno se opět umístila zpět na pracovní desku. Zbylé dvě se po odebrání vylily. Jiné 4 Erlenmayerovy baňky byly také postaveny na pracovní desku na statickou kultivaci.

Po uplynutí 120 h od začátku kultivace byly zanalyzovány 2 Erlenmayerovy baňky z třepačky, 2 Erlenmayerovy baňky, které se staticky kultivovaly po dobu 48 h a jedna, která stála od začátku kultivace a bylo z ní před 48 h odebráno. Opět se odebraly vzorky pro stanovení biomasy a extrakci violaceinu. Po odebrání vzorků se Erlenmayerovy baňky vylily a dále se s nimi už nepracovalo. Na třepačce zůstaly 2 a na pracovní desce 3 baňky (dvě stály 48 h, jedna 120 h).

Po uplynutí 168 h od začátku kultivace byly zanalyzovány 2 zbylé Erlenmayerovy baňky z třepačky a zbylé 3 Erlenmayerovy baňky z pracovní desky. Opět bylo odebráno pro stanovení biomasy a extrakci violaceinu. Po odebrání vzorků se už dále s baňkami nepokračovalo a experiment byl ukončen.



Obrázek 9: Schéma experimentu kultivace při třepání a následném stání produkčního média s naočkovanou kulturou CCM 160

### 3.7 Kultivace ve tmě, statická a následně submerzní s různými objemy

Během předchozích kultivací bylo upozorováno, že bakterie reagují na světlo, proto byla tato kultivace prováděna za tmy.

Bylo připraveno 8 Erlenmayerových baňek s produkčním médiem Kanelli s glycerolem. Médium bylo rozlito do baňek následně: 2x 30 ml, 2x 50 ml, 2x 75 ml a 2x 95 ml. Podle objemu média bylo přidáno množství bakteriální kultury CCM 160 tak, aby bylo médium stále obsahovalo 5 % kultury. Takto připravené Erlenmayerovy baňky se umístily na vypnutou a zatemněnou třepačku. Kultivace probíhala 72 h za laboratorní teploty (23-25 °C). Po uplynutí této doby se zanalyzovala polovina vzorků (vždy jeden vzorek od každého objemu), druhá půlka vzorků zůstala na třepačce, která se zapnula na intenzitu třepání 145 rpm a opět byla zakryta. Kultivace pokračovala následujících 48 h. Po uplynutí 120 hodin od začátku kultivace se odebralo 2x 10 ml pro stanovení biomasy a 2x 5 ml na extrakci violaceinu, postupovalo se stejným způsobem, který je uveden výše.

### 3.8 Kultivace na pevném podkladu

Pro tento experiment byla vybrána buněčná kultura CCM 160 a produkční médium Kanelli s glycerolem. Bylo použito 6 plastových Petriho misek, do kterých byla nastříhána buničitá vata a filtrační papír přesně na velikost dna Petriho misky. Buničité vaty byly použity 3 vrstvy a filtračního papíru 4 vrstvy, které byly před umístěním do Petriho misek vysterilovány. Sterilně v prostředí laminárního boxu se kultura z inokula naočkovala do produkčního média a z něj byly následně napipetovány 4 ml do každé Petriho misky s filtračním papírem a 10 ml do Petriho misky s buničitou vatou. Petriho misky se upevnili parafinovým filmem. Dvě Petriho misky s filtračním papírem a dvě s buničitou vatou se umístily na pracovní desku a jedna a jedna se umístily do tmy. Kultivace probíhala 120 h při laboratorní teplotě (23-25 °C).

Po uplynutí této doby byl extrahován violacein v methanolu a to tak, že se obsah z Petriho misky vylouhoval v 10-15 ml methanolu a následně se pořádně vymačkal. Tento krok se opakoval třikrát, aby bylo dosaženo maximálního výtěžku violaceinu. Následně se vzorky měřily na spektrofotometru při 570 nm oproti methanolu.

### 3.9 PCR

24 hodin před zahájením experimentu polymerázové řetězové reakce bylo naočkováno inokulum všemi třemi používanými bakteriálními kmeny CCM 160, CCM 1888 a CCM 3308. Všechny tyto kmeny spadají do genových klastrů PHA - I. bakteriální třídy.

#### 3.9.1 Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena z tekutých kultur. Na přípravu hrubého lyzátu bylo odebráno 300 µl z každé kultury, která se sterilně v prostředí laminárního boxu napipetovala do 1,5 ml sterilní Eppendorfovy zkumavky, které se následně centrifugovaly po dobu 5 minut na 4000 rpm. Supernatant se odpipetoval a k peletu se napipetovalo 100 µl lyzačního pufru. Eppendorfovy zkumavky se zabalily do košílky z alobalu a umístily se na 10 minut do termostatu přehřátého na 94 °C. Po uplynutí této doby se vzorky zcentrifugovaly na 10 minut na 10000 rpm. Ze zcentrifugovaného vzorku se opatrně odebralo 60 µl supernatantu tak, aby se nenabral žádný pelet. Příprava na samotné PCR spočívala v pipetování všech nezbytných složek. Do nových, 0,5 ml Eppendorfových zkumavek se podle schématu napipetovalo:

Master mix	12,5 µl
Mg <sub>2</sub> Cl	2,6 µl
Primer	4x1 µl
DNA	1 µl
H <sub>2</sub> O	4,9 µl



Bylo připraveno 5 vzorků, vzorek s kulturou CCM 160, CCM 1888 a CCM 3308, dále vzorek s DNA na pozitivní kontrolu a vzorek s destilovanou vodou na negativní kontrolu. Vzorky se umístily do PCR termocykléru na 2 hodiny a 15 minut.

### 3.9.2 Agarózová gelová elektroforéza

Posledním krokem celého experimentu byla elektroforéza, na kterou byl použit 1,5% agarózový gel, který se připravil rozpuštěním 1,5 g agarózy v 100 ml destilované vody.

Následně se připravil TBE pufr 1x koncentrovaný:

Tris(hydroxymethyl)aminomethan	108 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	55 g
EDTA	9,3 g
Destilovaná voda	1000 ml

Nakonec byl připraven unášecí pufr, který obsahoval barvivo a glycerol:

Bromfenolová modř	20 mg
Glycerol	3 ml
Destilovaná voda	1000 ml

Na kousku parafinového filmu se smíchaly pipetou 3  $\mu$ l unášecího pufru a 10  $\mu$ l vzorku, z kterého se po promíchání odebralo 10  $\mu$ l, které se napipetovaly do jamky v gelu. Následně se napipetovalo 5  $\mu$ l žebříčku (ladder). Po napipetování všech vzorků do příslušných jamek se gel zalil TBE pufrem a spustila se elektroforéza na 40 minut při 90 V. Po uplynutí této doby se gel nafotil a vyhodnotil.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Optimalizace produkčního média

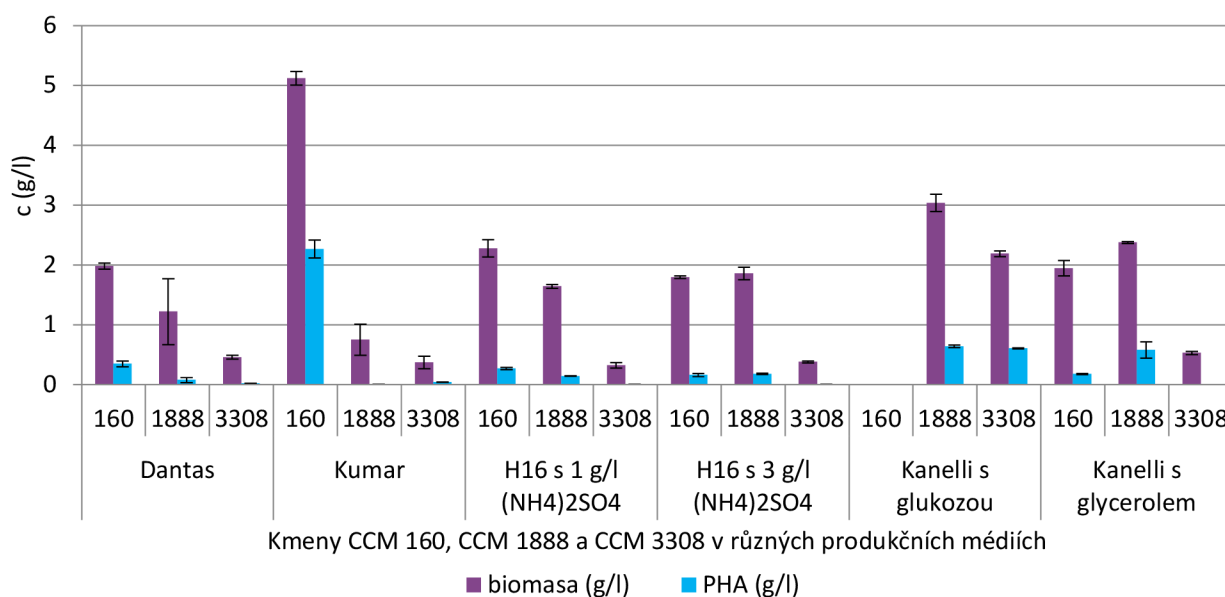
*Janthinobacteria* patří mezi aerobní mikroorganismy [2], proto byly během optimalizace produkčního média kultivovány na třepačce, aby jim byla zajištěna dostatečná aerace. Cílem experimentu bylo najít nejideálnější produkční médium pro kultivaci testovaných kmenů, ve kterém budou bakterie produkovat co nejvíce violaceinu. Zároveň se také sledovala produkce PHA a zjišťovalo se, zdali se produkce obou metabolitů navzájem ovlivňuje. Dalším úkolem bylo vybrat jeden ze tří studovaných kmenů, který je schopen nejúčinnější produkce violaceinu, a se kterým se bude pokračovat v následujících experimentech. Během tohoto experimentu se zkoušela produkční média Dantas, Kumar, H16 a Kanelli, jejichž přesné složky a navážky jsou uvedeny výše v kapitole 3.4.

#### 4.1.1 Produkce PHA v různých médiích

V Tabulce 3 jsou přehledně vypsány naměřené a vypočítané hodnoty pro dané produkční média a pro jednotlivé kmeny v nich kultivované. Hodnoty byly taktéž vyneseny do grafu, který je zobrazen na Obrázku 10.

Tabulka 3: Naměřené a vypočítané hodnoty z GC pro optimalizaci produkčního média

Médium	Kultura	biomasa (g/l)	odchylka	% PHA	PHB (g/l)
Dantas	160	1,98	0,05	17,67	0,350
	1888	1,22	0,55	6,42	0,076
	3308	0,46	0,03	4,68	0,021
Kumar	160	4,22	1,24	44,27	1,837
	1888	0,75	0,26	0,44	0,003
	3308	0,37	0,10	10,69	0,040
H16 s 1 g/l (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	160	2,28	0,14	11,84	0,269
	1888	1,64	0,03	8,79	0,144
	3308	0,93	0,91	1,22	0,013
H16 s 3 g/l (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	160	1,80	0,02	9,01	0,162
	1888	1,86	0,10	9,74	0,181
	3308	0,38	0,01	1,71	0,006
Kanelli s glukózou	160	-	-	-	-
	1888	3,04	0,14	21,37	0,640
	3308	2,19	0,05	27,78	0,607
Kanelli s glycerolem	160	1,95	0,13	9,21	0,178
	1888	2,38	0,01	24,39	0,579
	3308	0,53	0,03	-	-



Obrázek 10: Graf obsahu biomasy a PHA v g/l získané během optimalizace produkčního média

Polyhydroxyalkanoáty jsou produkovány mikroorganismy jakožto zásobní zdroj energie a uhlíku [1], tudíž vyšší produkce tohoto metabolitu nastává v případě, kdy mají bakterie nevhodné nebo nepříznivé podmínky. Z Tabulky 3 a grafu na Obrázku 10 lze vyčíst, že nejvíce biomasy vyprodukoval kmen CCM 160 v produkčním médiu Kumar. Biomasa zároveň obsahovala největší podíl PHA (44,27 %), kterého bylo při optimalizaci dosaženo. Dle České sbírky mikroorganismů jsou pro všechny tři použité kmeny používány podmínky kultivace při 25 °C v produkčním médiu 30 (chromobacterium médium) o hodně pH 7,2, které obsahuje [51]:

Pepton	10 g/l
NaCl	5 g/l
Agar	20 g/l
Destilovaná voda	1000 ml

Lze si všimnout, že toto produkční médium je podobné médiu Kumar, které bylo použito pro optimalizaci produkčního média v této práci. Akorát s tím rozdílem, že médium Kumar obsahuje místo peptonu trypton, a navíc obsahuje glukózu. To je důvod, proč bakterie kmene CCM 160 v tomto médiu vyprodukovala nejvíce PHA, jelikož podle literatury je glukóza při produkci PHA *J. lividum* potřebná [33].

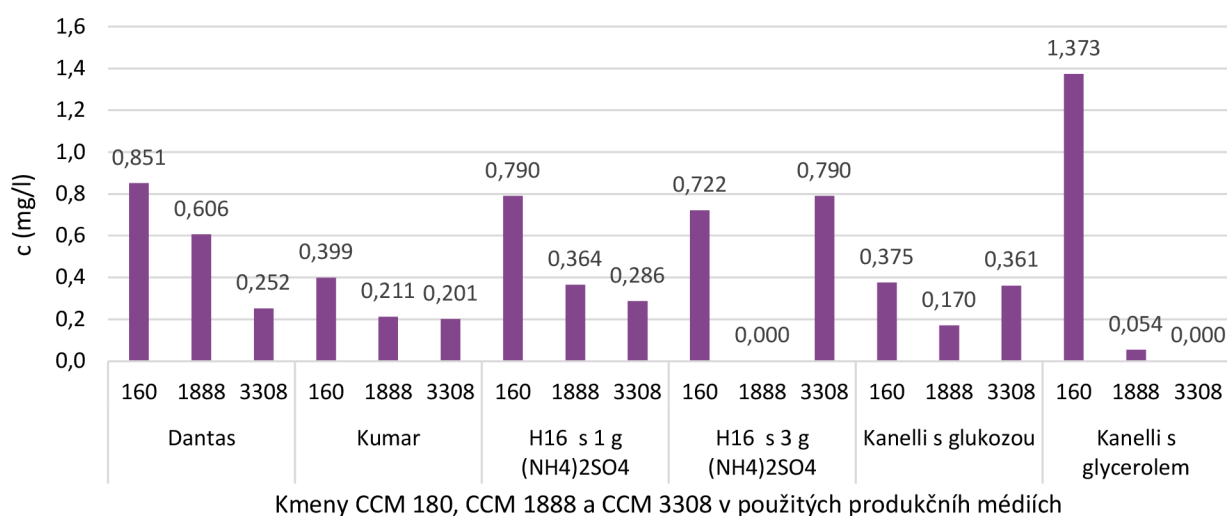
Bakterie kmene CCM 3308 s produkcí PHA oproti dvěma zbývajícím kmenům neuspěly. Jejich vyprodukovaná biomasa obsahovala velice malé množství PHA, jedinou výjimkou je kultivace v produkčním médiu Kanelli s glukózou. Zde kmen CCM 3308 vyprodukoval 27,78 % PHA z vyprodukované biomasy.

Produkční médium H16 bylo vyzkoušeno s různými navážkami síranu amonného, konkrétně s 1 g a se 3 g. Jak si lze z grafu všimnout, procentuální obsah PHA z biomasy se u jednotlivých kmenů nijak zásadně neliší, tudíž lze říct, že síran amonný není hlavní složkou média, která by ovlivňovala produkci PHA.

#### 4.1.2 Stanovení violaceinu

Vyextrahovaný violacein byl změřen na spektrofotometru při vlnové délce 570 nm, z hodnot absorbance byla následně vypočítána koncentrace v mg/l, která je graficky znázorněna na Obrázku 11. Na jejich základě bylo rozhodnuto, že se následující kultivace bude provádět s produkčním médiem Kanelli s glycerolem, jelikož koncentrace vyprodukovaného violaceinu byla u kmene CCM 160 nejvyšší – 1,373 mg/l.

V porovnání s běžnými živinami je neefektivnější produkce violaceinu na substrátech na bázi cukru s L-tryptofanem [2]. Produkční médium Dantas splňuje oboje tyto podmínky, proto je produkce violaceinu druhá nejvyšší u kmene CCM 160, u kmene CCM 1888 je dokonce nejvyšší a u kmene CCM 3308 také patří k těm nejvyšším. Média Kumar a Kanelli s glukózou obsahují glukózu, což by mělo vést k vysokým výtěžkům violaceinu. Jak jde ale vidět z grafu, produkce v těchto dvou produkčních médiích nepatří k těm nejvyšším.



Obrázek 11: Koncentrace obsahu violaceinu pro optimalizaci produkčního média

#### 4.1.3 Vizuální analýza

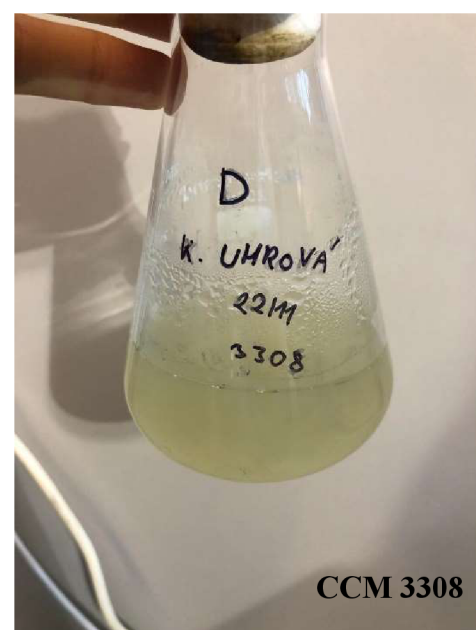
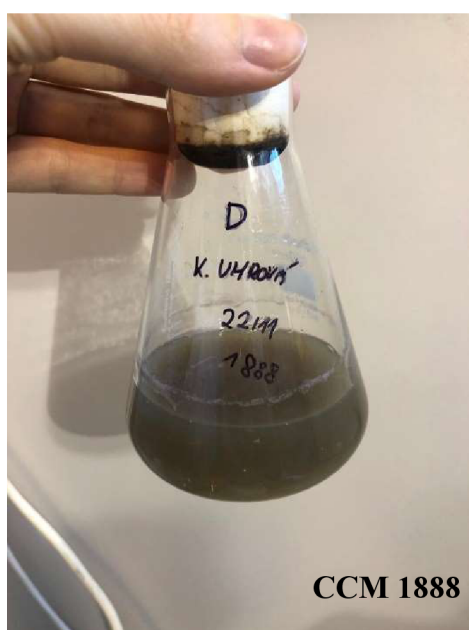
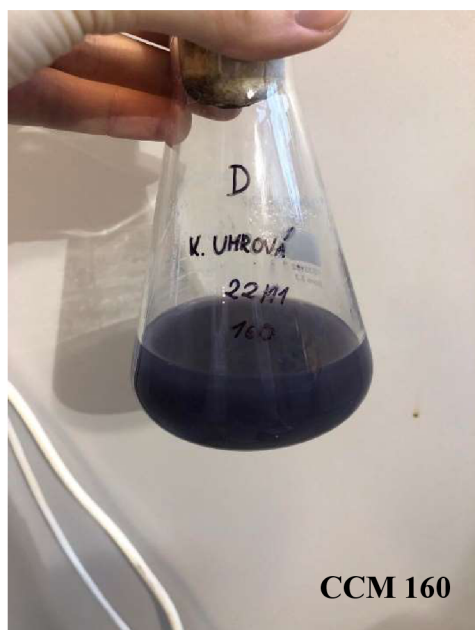
Na Obrázku 12-17 vidíme fotografie baněk obsahující bakteriální kmeny CCM 160, CCM 1888 a CCM 3308 ve všech typech produkčních medií, se kterými bylo pracováno.

Z níže uvedených obrázků lze vidět, že bakterie rodu *Janthinobacterium* vyprodukovaly v produkčním médiu Kanelli s glycerolem nejvíce violaceinu, jelikož je produkční médium sytě zbarveno do fialova. Na základě získaných dat spektrofotometrickou analýzou a vizuální analýzou se v dalších experimentech pracovalo s médiem Kanelli s glycerolem. Následně byl ze všech použitých kmenů vybrán kmen CCM 160, jelikož v téměř všech případech všech použitých medií byla produkce violaceinu u tohoto bakteriálního kmene nejvyšší.

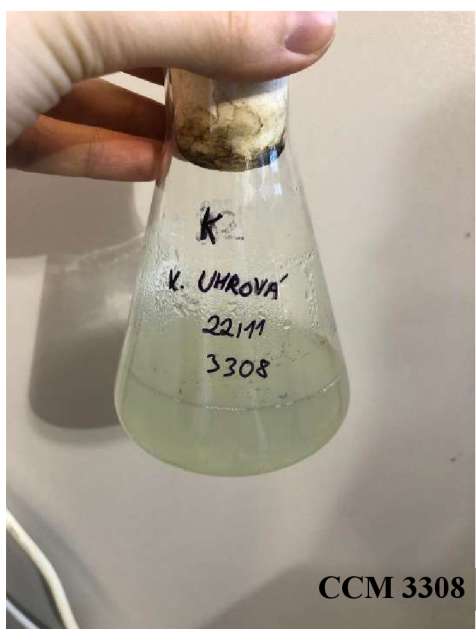
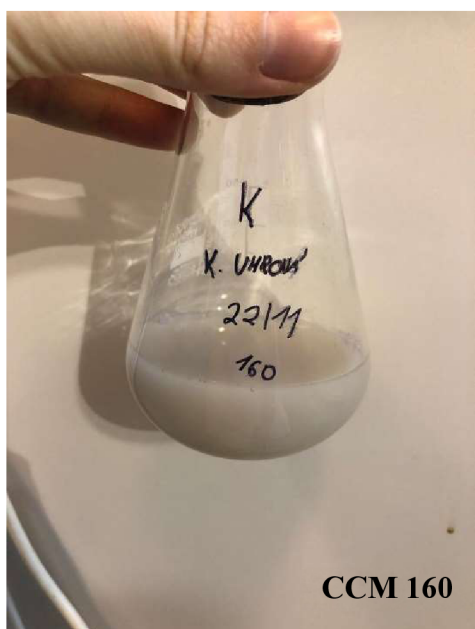
Na některých obrázcích si můžeme všimnout, že se v médiu vyskytují barevné sraženiny pigmentů (např. Obrázek 15, kmen CCM 1888 v produkčním médiu Kanelli s glukózou). Jedná se o shluky bakterií, které se snaží si vytvořit biofilm, o kterém je více popsáno v kapitole 4.4.2. Vlivem míchání na třepačce je schopnost produkce biofilmu znemožněna.

Obrázky nám slouží při odhadu množství vyprodukovaného violaceinu před jeho samotnou extrakcí a měřením. Podle fotek si také můžeme ověřit získaná data.

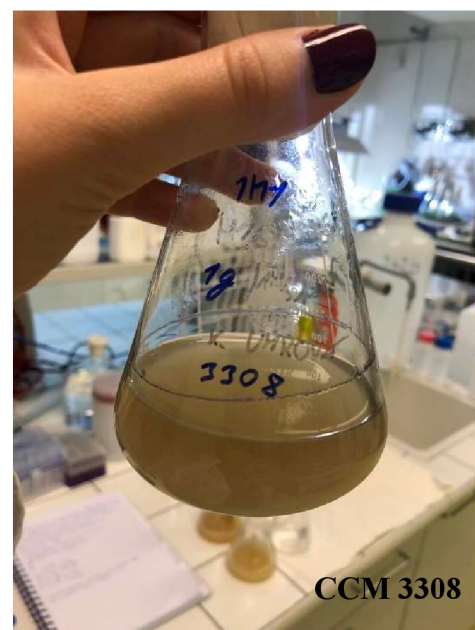
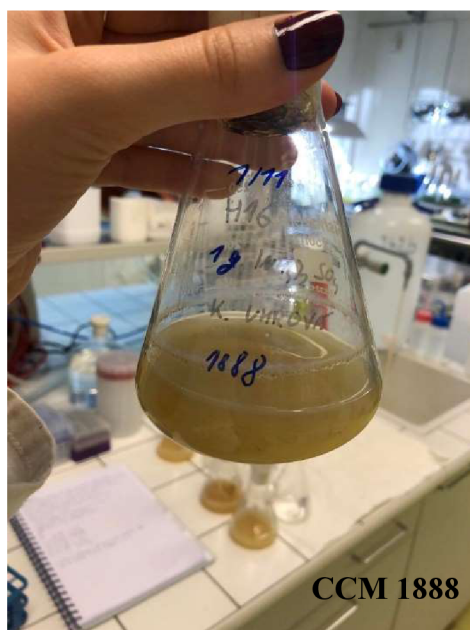
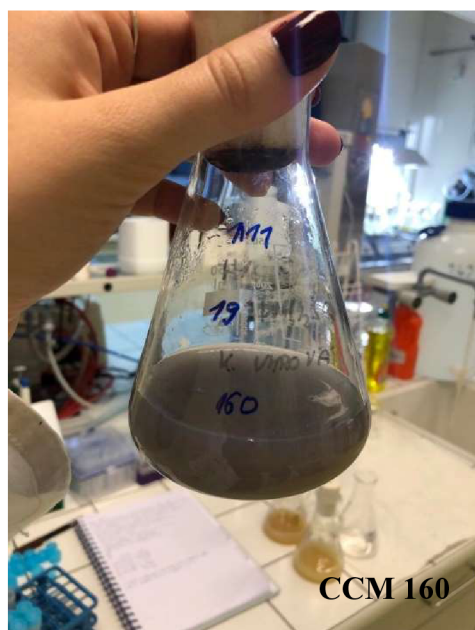
Obrázek 12: Kmeny CCM 160, CCM 1888 a CCM 3308 v produkčním médiu Dantas po 72 h kultivaci



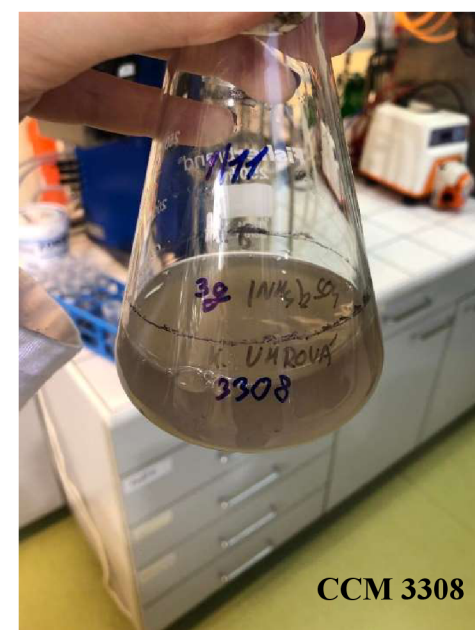
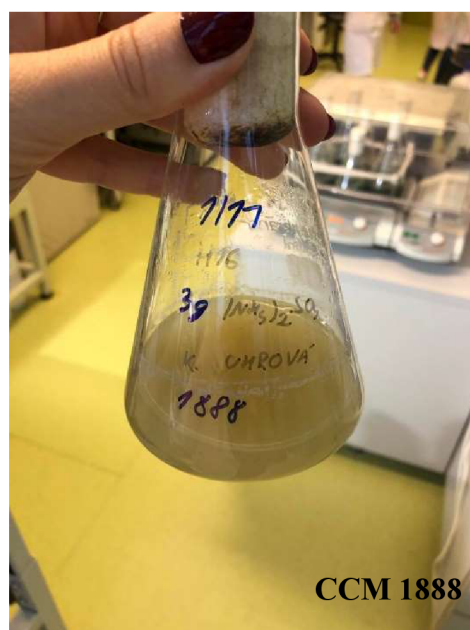
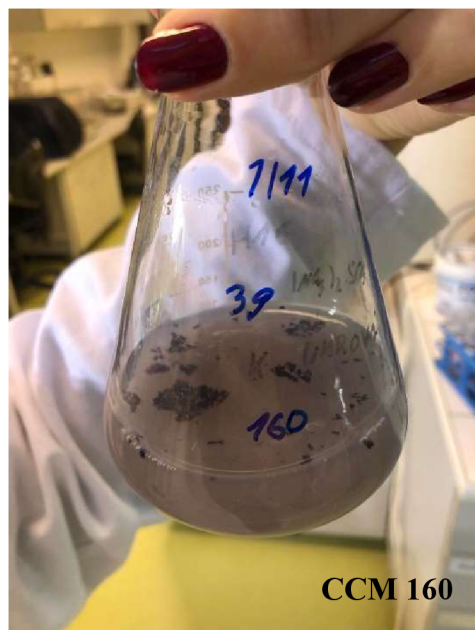
Obrázek 13: Kmeny CCM 160, CCM 1888 a CCM 3308 v produkčním médiu Kumar po 72 h kultivaci



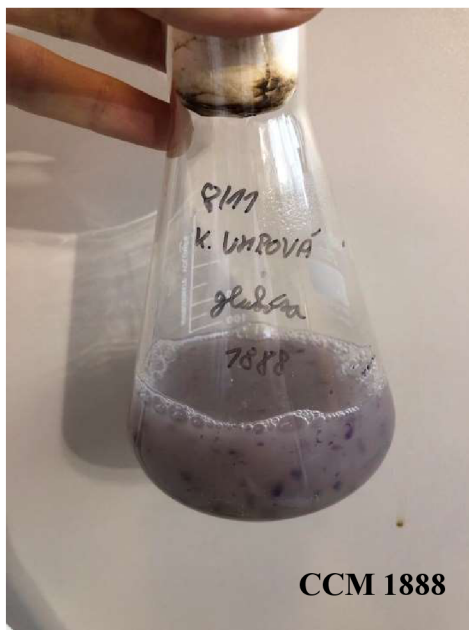
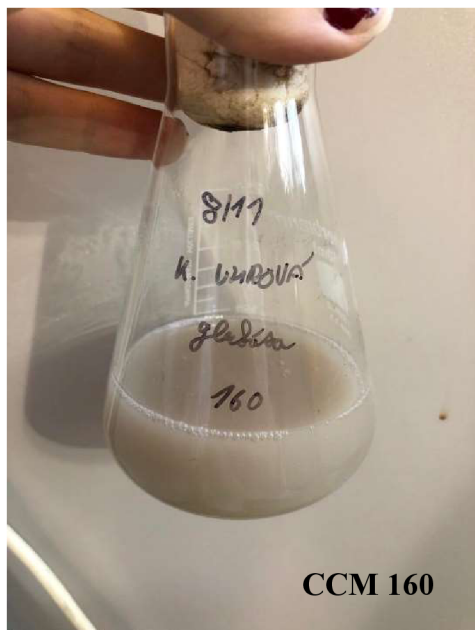
Obrázek 14: Kmeny CCM 160, CCM 1888 a CCM 3308 v produkčním médiu H16 s 1 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  po 72 h kultivaci



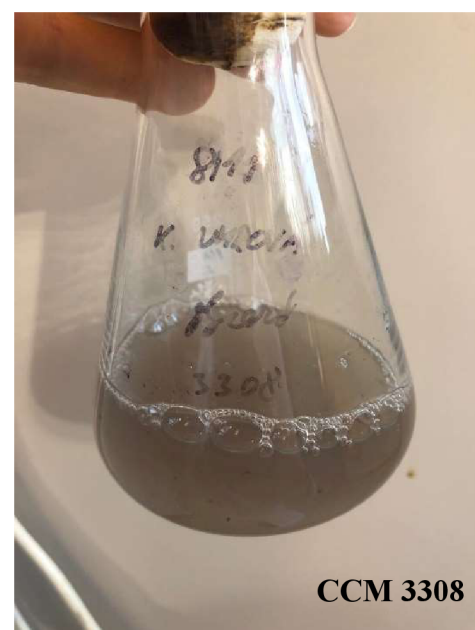
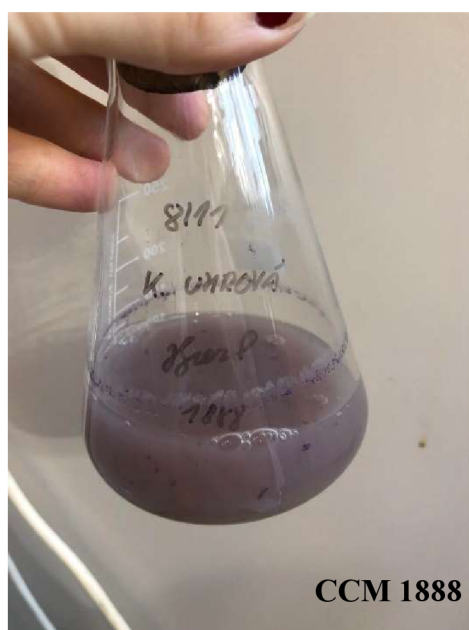
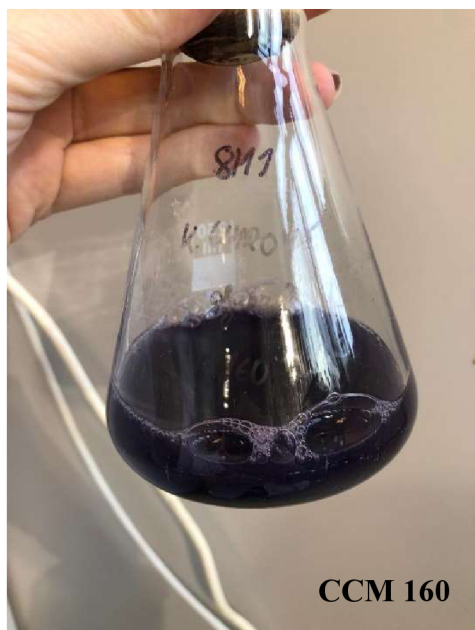
Obrázek 15: Kmeny CCM 160, CCM 1888 a CCM 3308 v produkčním médiu H16 s 3 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  po 72 h kultivaci



Obrázek 16: Kmeny CCM 160 a CCM 1888 v produkčním médiu Kanelli s glukózou po 72 h kultivaci



Obrázek 17: Kmeny CCM 160, CCM 1888 a CCM 3308 v produkčním médiu Kanelli s glycerolem po 72 h kultivaci



## 4.2 Optimalizace produkčního média Kanelli s glycerolem

Jak již bylo zmíněno, na základě dat obsahu vyprodukovaného množství violaceinu bylo rozhodnuto, že se zoptimalizuje produkční médium Kanelli s glycerolem. Lehce se pozměnilo složení a to tak, že se v jednom případě použil trypton místo peptonu, v druhém případě bylo k původnímu složení přidáno 0,3 g/l L-tryptofanu a v třetím případě zůstalo médium v původním složení. Kultivace byla provedena pro všechny 3 kmeny – CCM 160, CCM 1888, CCM 3308. Pepton je směs polypeptidů a aminokyselin tvořená částečnou hydrolyzou bílkovin, působí jako zdroj dusíku pro růst mikroorganismů [52]. Na druhou stranu trypton je směs peptidů vytvořena štěpením kaseinu. Z tohoto důvodu se využívá jako zdroj dusíku v kultivačních médiích, kde je vyžadován enzymaticky hydrolyzovaný kasein [53]. Na základě toho se předpokládalo, že po záměně peptonu za trypton by mohlo být množství vyprodukovaného violaceinu vyšší. To bohužel potvrzeno nebylo, viz kapitola 4.2.2.

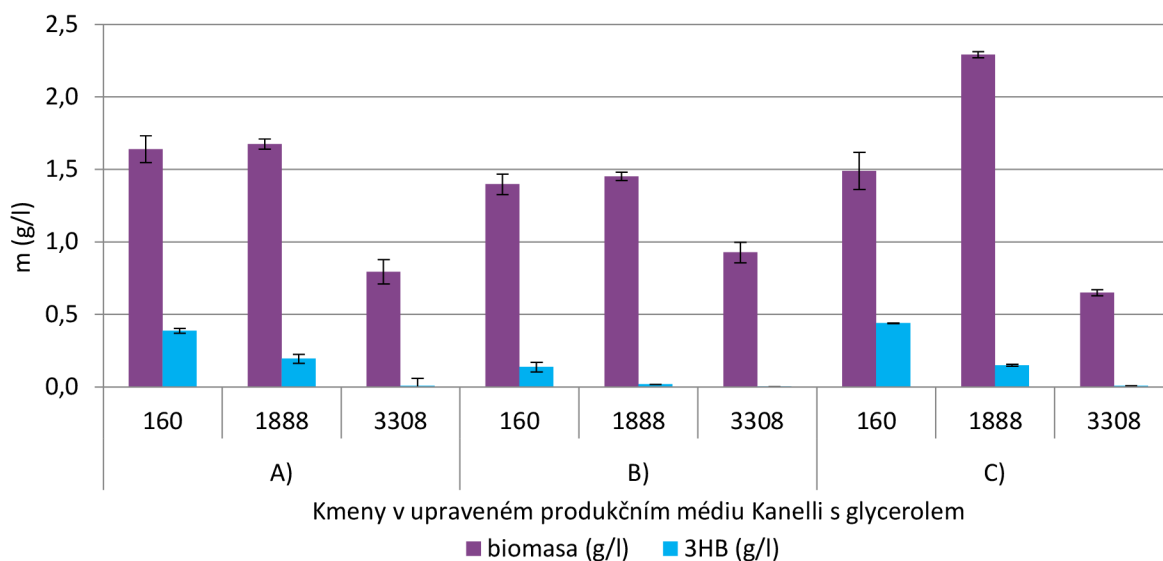
### 4.2.1 Produkce PHA na optimalizovaném médiu

Stejným způsobem jako v kapitole 3.4.1. byly odebrány, připraveny, analyzovány a vyhodnoceny vzorky, pro upravené produkční médium Kanelli s glycerolem podle Tabulky 2. Výsledky jsou zaznamenány v Tabulce 4 a graficky na Obrázku 18. Nejvíce biomasy bylo vyprodukováno kmenem CCM 1888 během kultivace v médiu Kanelli s glycerolem obohaceném o L-tryptofan. Obsah PHA byl však pouze 6,54 %, což mohlo být způsobeno tím, že bakterie v médiu měly dobré podmínky pro růst, tudíž se jejich počet snadno zvětšoval a díky vyhovujícím kultivačním podmínkám se nepotřebovaly soustředit na produkci PHA. Naopak největší množství PHA vyprodukoval kmen CCM 160 v základním složení produkčního média Kanelli s glycerolem a v médiu obohaceném o L-tryptofan, což se dle složení média a vhodných kultivačních podmínek dalo očekávat. Nejhuř na tom s produkcí PHA je zástupce rodu *Iodobacter*, jelikož vyžaduje odlišné kultivační podmínky než rod *Janthinobacterium*, kmen se více soustředil na produkci violaceinu jak si lze potvrdit z Obrázků 19-21.

Tabulka 4: Naměřené a vypočítané hodnoty z GC pro optimalizaci produkčního média Kanelli s glycerolem

	Kmen	biomasa (g/l)	odchylka	% PHA	PHB (g/l)
A)	160	1,64	0,06	23,63	0,388
	1888	1,68	0,08	11,34	0,195
	3308	0,80	0,05	0,99	0,008
B)	160	1,40	0,07	9,86	0,138
	1888	1,45	0,02	1,17	0,019
	3308	0,93	0,03	0,39	0,004
C)	160	1,49	0,13	29,83	0,440
	1888	2,29	0,28	6,54	0,150
	3308	0,65	0,08	1,18	0,008





Obrázek 18: Graf obsahu biomasy a PHA v g/l pro optimalizaci produkčního média Kanelli s glycerolem

#### 4.2.2 Produkce violaceinu

Stejným způsobem jako v kapitole č. 3.4.2. byly odebrány a vyextrahovány vzorky pro upravené produkční médium Kanelli s glycerolem podle Tabulky 2. Žádných výsledků ale nebylo dosaženo, jelikož byly bakterie kultivovány na třepačce pod lampou, která dokázala produkční médium zahřát na 30 °C, což bylo zjištěno, že je pro produkci violaceinu nevhodná, až inhibiční teplota. Naopak si z grafu na Obrázku 10 můžeme všimnout, že oproti výsledku, z optimalizace produkčního média je obsah PHA mnohem vyšší.

Z pohledu kultivace vedoucí k produkci violaceinu byla tato kultivace nezdařená, ale na druhou stranu přinesla nové poznatky, co se týče kultivační teploty. Teplota 30 °C je pro zástupce rodu *Janthinobacterium* vhodným stresovým faktorem, který vedl k tvorbě PHA. Naopak si můžeme všimnout, že kmen CCM 3308, tudíž patřící do rodu *Iodobacter*, vyšší kultivační teplotu toleruje či možná i preferuje a během kultivace za zvýšené teploty vyprodukoval více violaceinu než při kultivaci za laboratorní teploty. To lze usoudit pouze vizuálně z Obrázků 19-21 podle fialové pigmentace.

#### 4.2.3 Vizuální analýza

Už na první pohled z Obrázku 19 až 21 je viditelné, že bakterie za pro ně neoptimálních podmínek nevyprodukovaly v podstatě žádný violacein. Produkční média jsou žluto-hnědá. Jediný nádech fialové pigmentace lze být vidět u bakteriálního kmene CCM 3308, jehož požadavky pro růst se od *Janthinobacterium* lehce liší.

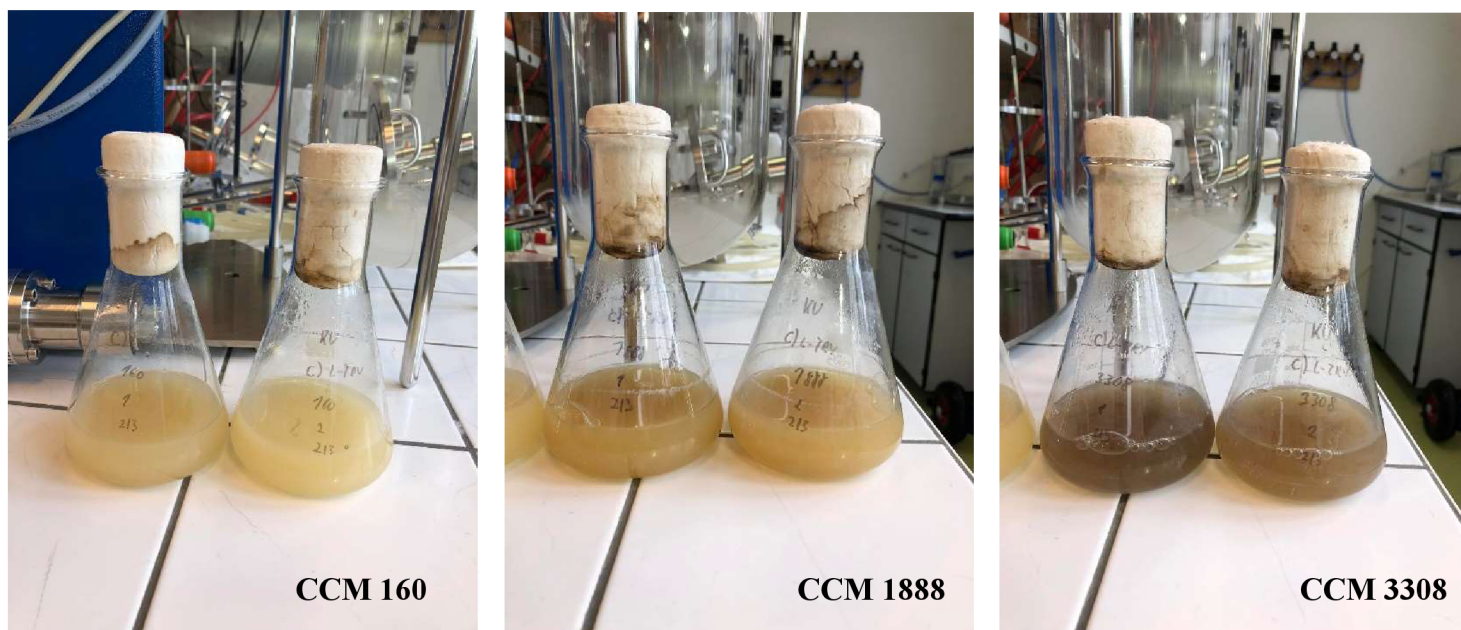
Obrázek 19: Kmeny CCM 160, CCM 1888 a CCM 3308 v produkčním médiu Kanelli s glycerolem po 72 h kultivaci pod lampou



Obrázek 20: Kmeny CCM 160, CCM 1888 a CCM 3308 v produkčním médiu Kanelli s glycerolem, náhrada tryptonu za pepton po 72 h kultivaci pod lampou



Obrázek 21: Kmeny CCM 160, CCM 1888 a CCM 3308 v produkčním médiu Kanelli s glycerolem s přidavkem L-tryptofanu po 72 h kultivaci pod lampou

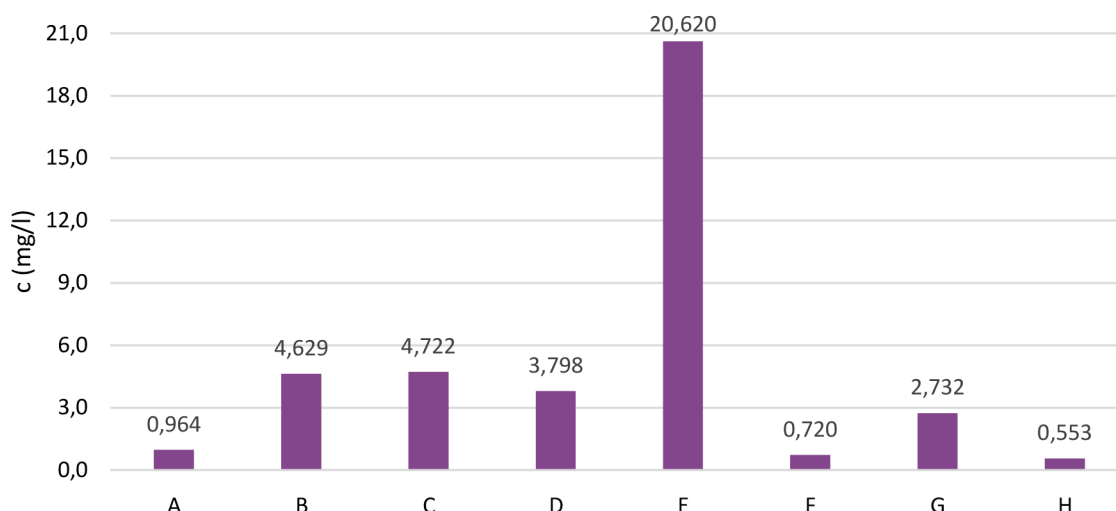


### 4.3 Kultivace při třepání a stání

Pro tuto kultivaci bylo vybráno produkční médium Kanelli s glycerolem a kmen CCM 160. Erlenmayerovy baňky s naočkovaným produkčním médiem byly různou dobu třepány a následně postaveny na pracovní desku, kde kultivace pokračovala dále ve stabilní poloze. Jelikož bakterie ve statické poloze uplatňují schopnost tzv. quorum sensing (tato vlastnost je podrobně sepsaná v kapitole 4.4.2), která má na svědomí produkci biofilmu, čekala se vyšší výtěžnost violaceinu. Doba třepání-stání probíhala různě dlouho, výsledky byly mezi sebou porovnány.

#### 4.3.1 Stanovení violaceinu při statické a dynamické kultivaci

Bylo zjištěno, že bakterie potřebují delší kultivační čas, než je 72 h, proto byly pro porovnání kultivovány po dobu 120 a 168 hodin. Jak můžeme vidět v grafu na Obrázku 22, nejvíce violaceinu vyprodukovaly bakterie v Erlenmayerově baňce, která stála 120 h a po této době z ní bylo i odebráno. Když se baňka nechala stát déle, 168 h, produkce violaceinu rapidně klesla, jelikož provzdušnění kultury vlivem statické kultivace bylo nedostatečné. Druhou nejvyšší produkci má na svědomí kultura v Erlenmayerově baňce, která se třepala po dobu 120 h. Kultura měla dostatek času pro produkci violaceinu. Na základě tohoto faktu bylo rozhodnuto, že kultivační čas 120 h je pro bakterie nejvýhodnější. Třetí místo v produkci violaceinu obstarala Erlenmayerova baňka, která byla třepána a zanalyzována po 168 hodinách. Důvodem je, že z baňky již bylo po 72 h odebráno, takže baňka měla menší objem produkčního média, a taktéž se po celou dobu třepala, takže jí byla zajištěna dostatečná aerace. Toto zjištění vedlo k následnému experimentu, při kterém se optimalizoval objem produkčního média. Nejhuře na tom s produkcí violaceinu byly bakterie, které byly třepány 72 h a následně byly z třepačky sundány a byly postaveny na pracovní desku, kde kultivace pokračovala staticky. Bakterie se zřejmě adaptovaly na třepání a přístup kyslíku, který jim byl po 72 h odebrán a kultura začala vlivem nedostatku kyslíku a umírat. Ve všech případech, kdy kultivace probíhala při třepání po dobu 72 h je produkce violaceinu nejnižší. Bylo zjištěno, že za 72 h bakterie vyprodukovaly více violaceinu ve stabilní poloze bez třepání. Bakterie mohly držet u sebe, ale zároveň nestrádaly nedostatkem kyslíku.



Obrázek 22: Koncentrace obsahu violaceinu pro kmen CCM 160 při kultivaci za třepání a následného stání

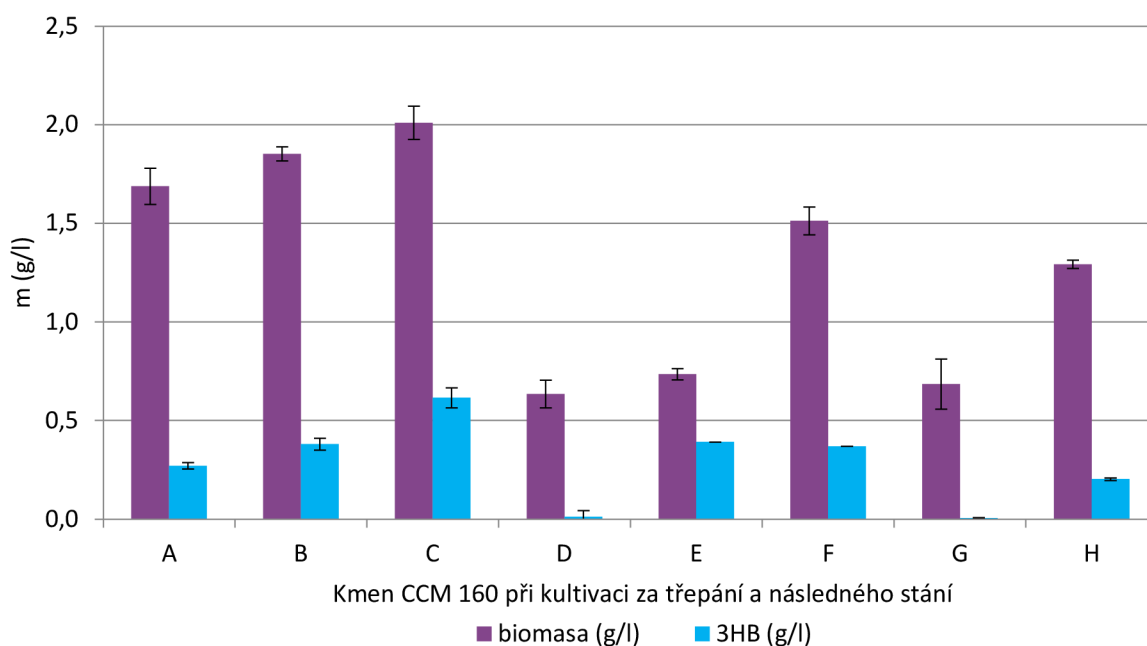
#### 4.3.2 Stanovení PHA

Nejvíce biomasy, která obsahovala zároveň nejvyšší podíl PHA - 32,09 %, vyprodukovaly bakterie, které se 168 h třepaly a po této době byly i zanalyzovány (Tabulka 5). V porovnání s ostatními vzorky, měly tyto bakterie více času na produkci biomasy a zároveň byly dostatečně aerovány díky třepání na rozdíl od vzorku G, jehož bakterie byly kultivovány po stejný čas, ale s rozdílem, že kultivace probíhala staticky. Bakterie vyprodukovaly jedno z nejmenších naměřených množství biomasy, v níž byl procentuální obsah PHA pouze 1,02 %. Bakterie vlivem nedostatečného provzdušování přešly do fáze odumírání.

Dalším zajímavým faktem je, že u vzorků B, E a F vyšlo množství PHA v g/l dost podobně (s odchylkou 0,008 g/l). Všechny 3 vzorky byly kultivovány stejnou dobu, akorát s rozdílem, že vzorek B byl po celou dobu třepán, vzorek E se celou dobu kultivoval při statické poloze a vzorek F se nejprve 72 h třepal a následně 48 h stál. To ukazuje, že při kultivaci nehraje velkou roli to, jak jsou bakterie kultivovány – zda se třepou, stojí anebo oboje dohromady. Změnil se ale procentuální obsah vyprodukovaného PHA, který je u vzorku B a F podobný, ale u vzorku E je jeho hodnota dvakrát větší. Důležitějším faktorem kultivace je čas, který jak vidíme z Obrázku 23 je nejideálnější při 120 h. Při kratším kultivačním čase nemají bakterie dostatek času vyprodukovat metabolity, jelikož mají při statické kultivaci prodloužený generační čas vlivem nehomogenního pokrytí kyslíku v médiu. Při delším čase, pokud není baňka s kulturou třepána, bakterie umírají. Oproti vzorku G byl kultivační čas u vzorku E o 48 h kratší, tudíž i když oba vzorky při kultivaci stály, ještě nedošlo k přechodu ze stacionární fáze do fáze odumírání.

Tabulka 5: Naměřené a vypočítané hodnoty z GC pro kmen CCM 160 při kultivaci za třepání a následného stání

	Označení na Obr. 22 a 23	biomasa (g/l)	odchylka	% PHA	PHB (g/l)
třepána 72 h, odebráno po 72 h	A	1,69	0,13	15,11	0,270
třepána 120 h, odebráno po 120 h	B	1,85	0,02	20,06	0,380
třepána 168 h, odebráno po 168 h	C	2,01	0,01	32,09	0,616
stála 72 h, odebráno po 72 h	D	0,64	0,05	0,00	0,011
stála 120 h, odebráno po 120 h	E	0,74	0,02	52,53	0,391
třepána 72 h, stála 48 h, odebráno po 120 h	F	1,5	0,1	25,2	0,369
stála 168 h, odebráno po 168 h	G	0,69	0,01	1,02	0,006
třepána 72 h, stála 96 h, odebráno po 168 h	H	1,29	0,05	16,07	0,203



Obrázek 23: Graf obsahu biomasy a PHA v g/l kmene CCM 160 při kultivaci za třepání a následného stání

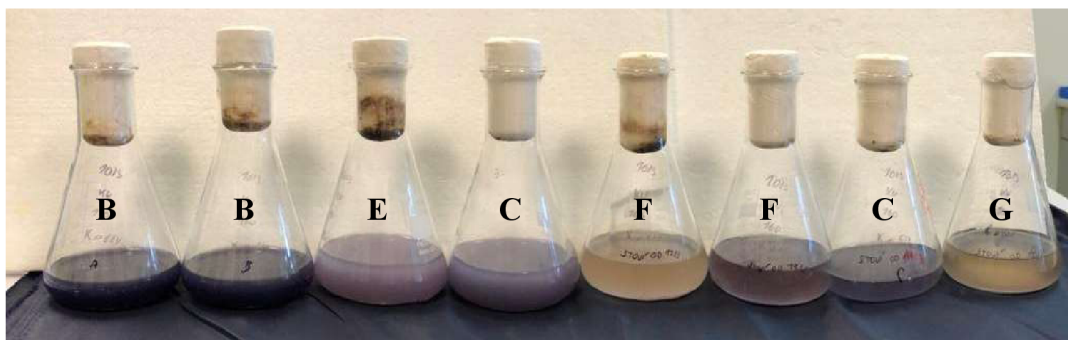
### 4.3.3 Vizuální analýza

Na Obrázku 24 můžeme vidět baňky s kulturou po 72 hodinách kultivace, všechny tyto baňky bylo po tuto dobu kultivovány za stálého třepání. Na Obrázku 25 jsou vyfoceny ty stejné baňky po dalších 48 h kultivace, jak si můžeme všimnout, kultury jsou mnohem více fialové než na předchozí obrázku, jelikož vyprodukovaly více violaceinu. U baňky G, která celou dobu stála a levá baňka F, která byla kultivována 72 h za třepání a následně 48 h staticky, se vytvořil biofilm, který po pohnutí s baňkou klesl ke dnu. Pravá baňka F je pro porovnání již vyfocena po rozmíchání biofilmu. Vyfocená baňka s biofilmem ze spodu je vyfocena na obrázku 31 níže v kapitole 4.4.2.

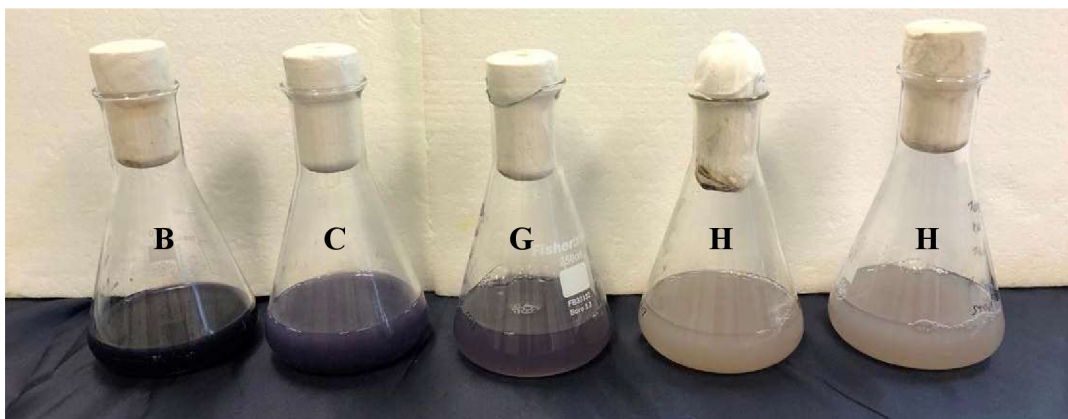
Na Obrázku 26 je vyfoceno zbylých 5 baňek, které se kultivovaly po dobu 168 h. Nalevo je baňka s označením B, která je nejsytěji zbarvená fialovým pigmentem.



Obrázek 24: 72 h kultivace při třepání



Obrázek 25: 120 h kultivace

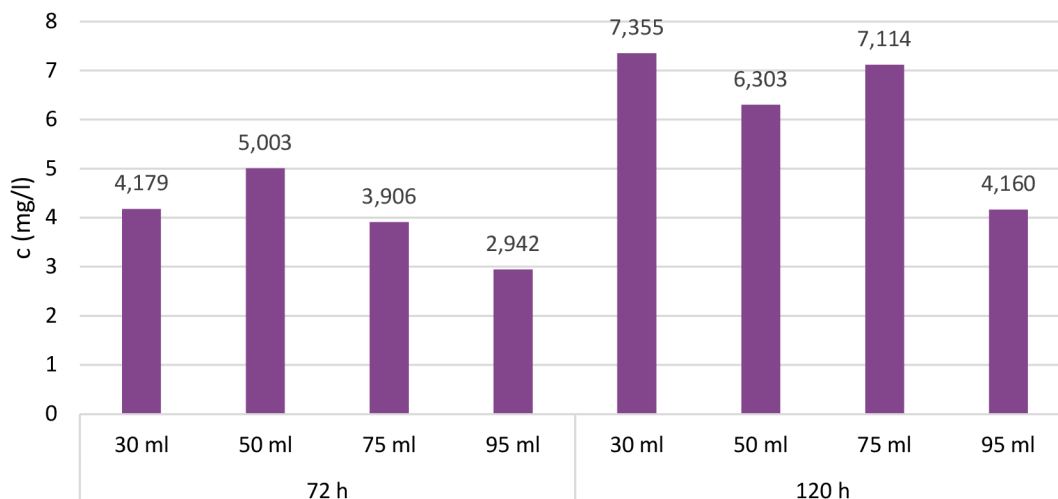


Obrázek 26: 168 h kultivace

#### 4.4 Kultivace při stání a následném třepání

Během této kultivace bylo vyzkoušeno vyměnit pořadí statické a submerzní fáze. Nejprve naočkované médium Kanelli s glycerolem s bakteriálním kmenem CCM 160 staticky stálo na vypnuté třepačce ve tmě, po 72 h probíhala kultivace standardně při třepání 145 rpm. Zároveň byly porovnávány odlišné objemy produkčního média, a to konkrétně při 30 ml, 50 ml, 75 ml a 95 ml vše ve dvou sadách. Statická kultivace probíhala po dobu 72 h, potom se jedna sada odebrala na analýzu a druhá sada se dále kultivovala akorát se zapnutou třepačkou na 145 rpm, i nadále za tmy po dobu dalších 48 h. Po této době se vzorky taktéž zanalyzovaly.

Z grafu na Obrázku 27 lze vyčíst, že vyšší hodnoty koncentrace violaceinu bylo dosaženo při delším časovém intervalu kultivace, tudíž lze za ideální čas kultivace považovat 120 h. V porovnání s předchozím pokusem, kdy nejprve probíhala fáze třepání a následně stání můžeme vidět, že při 72 h kultivace bakterie vyprodukovaly více violaceinu ve statické poloze (2,94 mg/l) než při třepání (0,96 mg/l) v objemu 95 ml média. Hodnoty vyprodukovaného violaceinu se během stání zvýšily ještě víc díky menšímu objemu média, konkrétně nejvíc při objemu 50 ml - 5,00 mg/l, což je 1,5krát více. Když se stejně porovná i 120 h kultivace, kdy se v minulém experimentu kultura v médiu 72 h třepala a následně 48 h stála s tímto experimentem, kdy 72 h stála a 48 h třepala, tak si můžeme všimnout, že bakterie ve stejném produkčním médiu o stejném objemu 95 ml vyprodukovala více violaceinu v druhém případě. Konkrétně 4,16 mg/l oproti 0,72 mg/l v minulém případě. I v tomto případě platí, že s nižším objemem média koncentrace vyprodukovaného violaceinu stoupla.



Obrázek 27: Graf koncentrace violaceinu kmene CCM 160 při kultivaci za stání a následného třepání

Když porovnáme 120 h kultivace a) třepání-stání, za b) stání, za c) třepání a za d) stání-třepání, podle Tabulky 6, zjistíme, že bakterie dokázaly vyprodukovat nejvyšší množství violaceinu při 120 h statické kultivace. Bakterie měly dostatek času pro produkci metabolitu a zároveň ještě nestrádaly z nedostatku okysličení média. Hodnoty koncentrace violaceinu varianty kultivace při třepání anebo stání a následném třepání se od sebe nijak zásadně neliší, tudíž můžeme říct, že obě tyto metody mají stejný výsledek. Nejhůře skončila kultivace za třepání a následném stání. Zřejmě proto, že bakterie si zvykly na konstantní přísun kyslíku způsobeným třepáním a po postavení na pracovní desku začaly bakterie umírat vlivem nedostatku kyslíku. Další možnou variantou je, že bakterie rostou za třepání rychleji, tudíž po zanalyzování po 120 h už mohly být mrtvé. Zatímco bakterie, které se kultivovaly staticky, rostly pomaleji, jelikož nebyl přístup kyslíku v médiu homogenní.

Za nejideálnější objem pro 120 h kultivaci při stání bych vybrala objem 75 ml, jelikož lze stejně jako v případě tohoto experimentu předpokládat, že vyprodukovaná koncentrace violaceinu bude vyšší než u objemu 95 ml média.

Tabulka 6: Různé varianty 120 h kultivace při objemu produkčního média 95 ml pro kmen CCM 160

Označení	Typ kultivace	c (mg/l)
a)	třepání-stání	0,720
b)	stání	20,620
c)	třepání	4,629
d)	stání-třepání	4,160

#### 4.4.1 Stanovení PHA

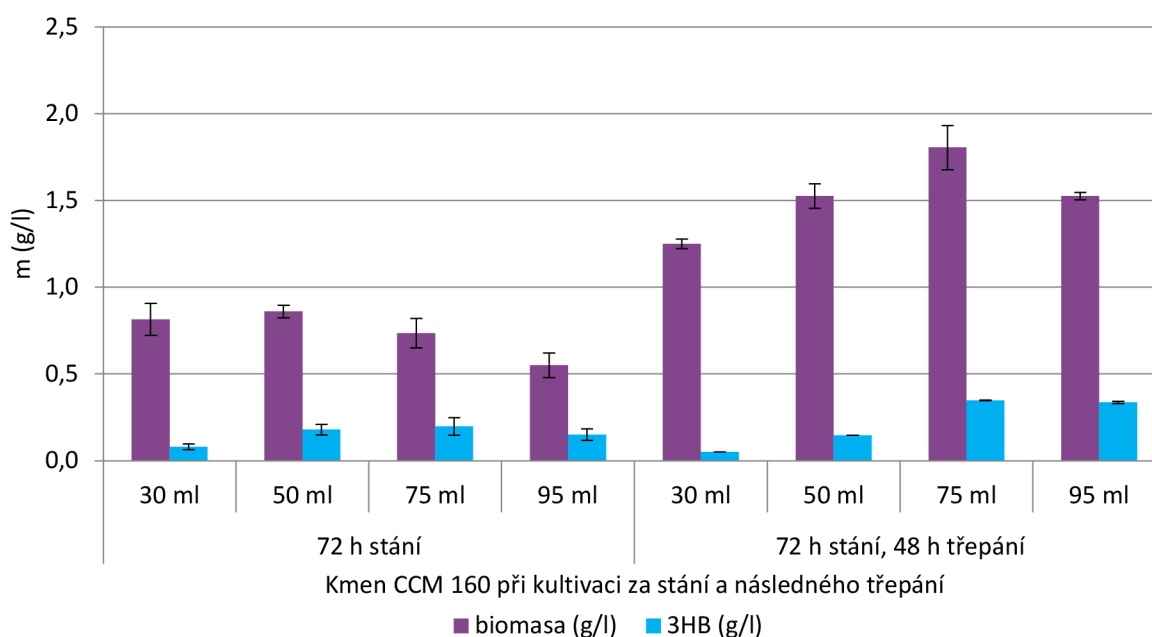
Stejně jako při produkci violaceinu, i u produkce PHA pomohlo prodloužit kultivační čas ze 72 h na 120 h. Bakterie mají zřejmě během statické kultivace delší generační dobu, než přejdou z exponenciální fáze do fáze stacionární. Bakterie se kultivovaly 72 h staticky, kdy vlivem nehomogenního zdroje kyslíku v médiu rostly pomaleji. Po této době nastalo 48 h třepání, kdy došlo k dostatečnému provzdušnění média a bakterie začaly růst rychleji a produkovat více metabolitů.

V Tabulce 7 můžeme vidět hodnoty pro vyprodukovanou hmotnost biomasy, procentuální množství vyprodukovaného PHA a jeho množství v g/l. Jak můžeme vidět, nejvíce PHA vyprodukovala bakterie při 120 h kultivaci v 75 ml produkčního média Kanelli s glycerolem, ale procentuálně je to z vyprodukované biomasy pouze 19,28 %. Největší procentuální podíl se nachází u 72 h statické kultivace při objemu média 75 ml (27,02 %) a 95 ml (27,52 %). To je zřejmě způsobeno tím, že za 72 h statické kultivace bakterie rostly pomaleji, proto je naměřená hodnota biomasy menší než u 120 h kultivace. Zároveň bakterie produkovaly PHA, jelikož nedostatek kyslíku inhibuje Krebsův cyklus a tok acetyl-CoA je následně směřován do syntézy PHA.

Nejnižší vyprodukovaná hodnota PHA (0,052 g/l) je zároveň ta nejvyšší hodnota vyprodukovaného violaceinu, jejíž koncentrace je 7,355 mg/l. Jak již bylo zmíněno výše, bakterie měly optimální podmínky pro produkci violaceinu, proto se nezaměřovaly na tvorbu PHA. Na druhou stranu je nejvyšší hodnota vyprodukovaného PHA (0,348 g/l) zároveň i ta druhá nejvyšší hodnota vytvořeného violaceinu (7,114 mg/l). Bakterie při statické kultivaci měly vhodné množství produkčního média na tvorbu biofilmu, který byl sytě zbarven do fialova a obsahoval vysoké množství pigmentu.

Tabulka 7: Naměřené a vypočítané hodnoty z GC pro kmen CCM 160 při kultivaci za stání a následného třepání

		biomasa (g/l)	odchylka	% PHA	PHB (g/l)
72 h stání	30 ml	0,82	0,12	9,98	0,081
	50 ml	0,86	0,03	20,84	0,179
	75 ml	0,74	0,02	27,02	0,199
	95 ml	0,55	0,01	27,52	0,151
72 h stání, 48 h třepání	30 ml	1,25	0,16	4,14	0,052
	50 ml	1,53	0,01	9,64	0,147
	75 ml	1,81	0,05	19,28	0,348
	95 ml	1,53	0,02	22,04	0,336



Obrázek 28: Graf obsahu biomasy a PHA v g/l pro kmen CCM 160 při kultivaci za stání a následného třepání



#### 4.4.2 Vizuální analýza

Na Obrázku 29 je vyfoceno všech 8 baněk s různými objemy kultivačních médií a naočkovanou kulturou CCM 160 po 72 h statické kultivace. Baňky byly vyfoceny před rozmícháním biofilmu, který bakterie vyprodukovaly na hladině média. V mnoha případech biofilm po pohybu s baňkou klesl ke dnu. Na Obrázku 30 jsou vyfoceny 4 baňky s 30 ml, 50 ml, 75 ml a 95 ml produkčního média po rozmíchání biofilmu po 120 h kultivaci za 72 h stání a 48 h třepání.



Obrázek 29: po 72 h kultivace při stání před roztřepáním



Obrázek 30: po 72 h kultivace při stání a následně po 48 h třepání

Kultivace při stání a následném roztřepání přinesla pozitivní výsledky. Prvních 72 h kultivace během stání bakterie vytvořily fialový biofilm, který lze vidět na Obrázku 31. Tímto se podařilo ověřit, že na produkci má pozitivní vliv, pokud mohou být bakterie v blízkém kontaktu, jde o tzv. *quorum sensing* (QS). Jedná se o proces komunikace mezi buňkami, který umožňuje bakteriím sdílet informace o buněčné hustotě a podle toho upravovat genovou expresi [54]. Zároveň podporuje transkripci určitých cílových genů v bakteriálních buňkách, což vede k aktivaci různých buněčných procesů, z nichž některé souvisí s tvorbou bakteriálního biofilmu. Tvorba těchto biofilmů podporuje například rezistenci vůči antibiotikům [55]. Po uplynutí této doby následovala 48 h kultivace za třepání, při které se bakterie arovaly, a tak docházelo k provzdušnění kultury. Nejideálnější kultivační objem se ukázal být 75 ml média s přidáním 5% zastoupením bakteriální kultury.

Cílem studie bylo zhodnotit antimikrobiální potenciál violaceinu na biofilmu *Staphylococcus epidermidis*. Bylo zjištěno, že violacein vykazuje antibiofilmové účinky a inhibuje tvorbu biofilmu [56].

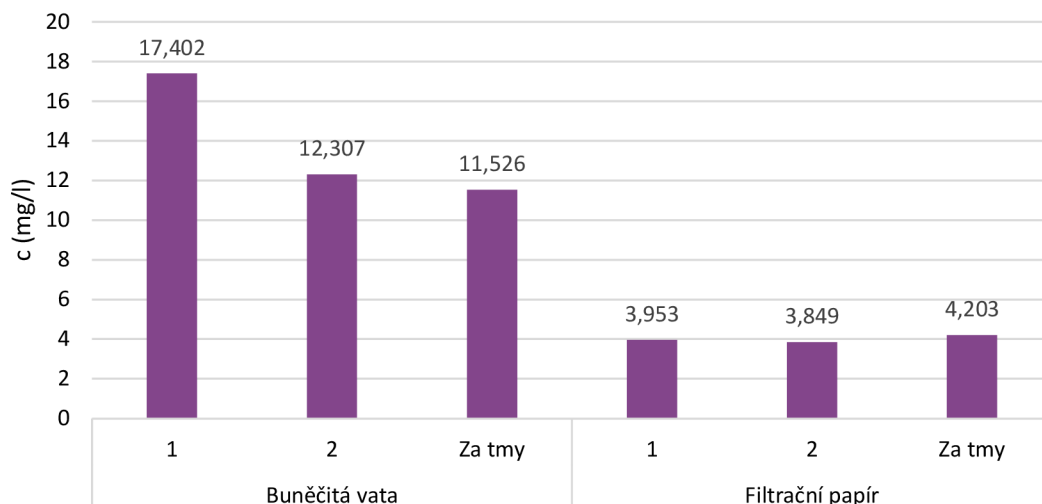
Produkce violaceinu a biofilmu u *J. lividum* je řízena zdrojem uhlíku a zesílena glycerolem [32]. Z tohoto důvodu lze předpokládat, že bakterie vytvořily v médium Kanelli s glycerolem tolik biofilmu, který obsahoval vysoké množství violaceinu.



Obrázek 31: Vytvořený fialový film po 72 h statické kultivaci kmene CCM 160

#### 4.5 Statická kultivace na pevném podkladu

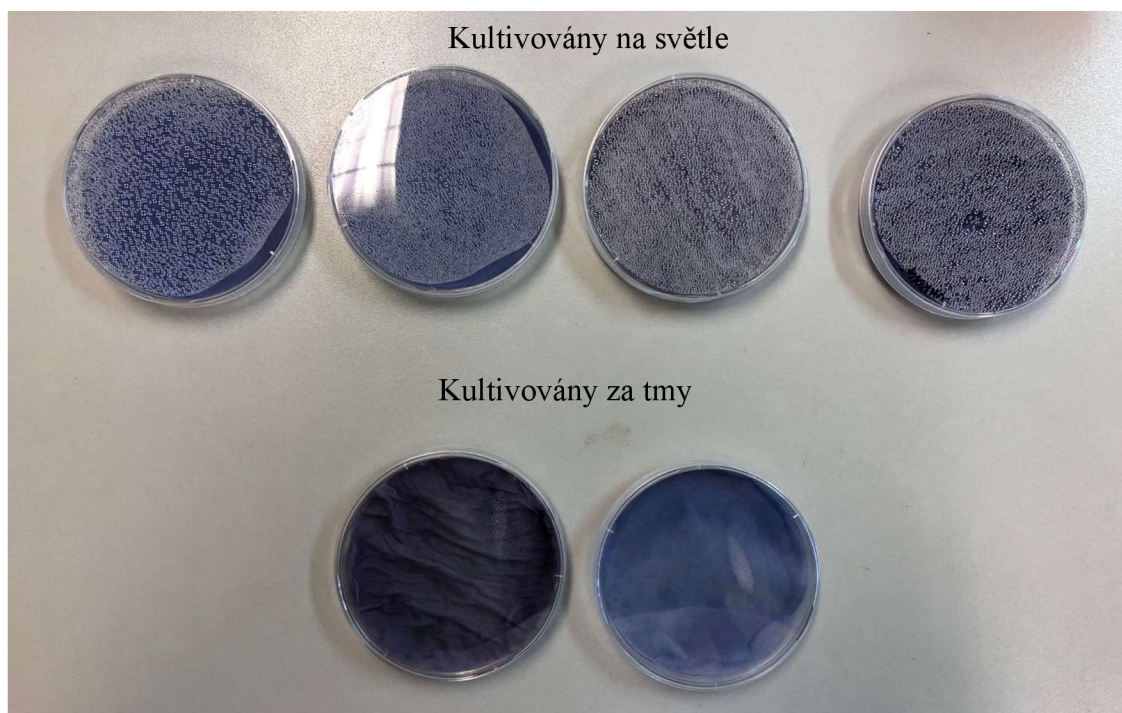
Během všech předešlých kultivací bylo zpozorováno a potvrzeno, že se při statické kultivaci bakterie shlukují a vytvářejí biofilm. Proto byla vyzkoušena statická kultivace na buničité vatě a na filtračním papíru. Jak si lze z grafu na Obrázku 32 všimnout, buničitá vata byla pro bakteriální kmen CCM 160 lepším pojídkem než filtrační papír, pravděpodobně proto, že do sebe dokázala lépe nasáknout produkční médium, nemá tak pevnou a hustou strukturu jako filtrační papír a zároveň extrakce probíhala snadněji. Violacein se snadněji uvolnil do methanolu a následně se buničitá vata snadněji vymačkávala. Z grafu si také můžeme všimnout, že u statické kultivace nemělo na produkci violaceinu nijak zásadní vliv světlo či tma.



Obrázek 32: Graf koncentrace violaceinu při statické kultivaci na pevném podkladu pro kmen CCM 160

#### 4.5.1 Vizuální analýza

Na následujícím Obrázku 33 je vyfoceno všech 6 Petriho misek, na kterých se kultivoval kmen CCM 160. Na třech levých miskách je pevným podkladem buničitá vata a na pravých třech miskách je filtrační papír.



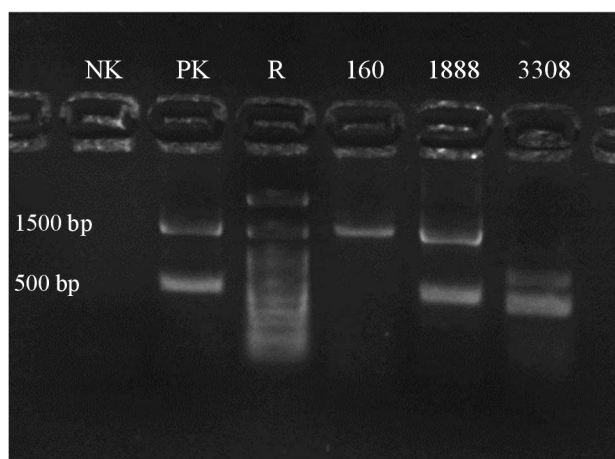
Obrázek 33: Petriho misky se statickou kultivací na pevném podkladu s kmenem CCM 160

Průmysl v dnešní době není schopen levně a efektivně produkovat bakteriální pigmenty v čistých a koncentrovaných formách [19], proto by tento typ kultivace mohl mít budoucnost v komerční produkci violaceinu. Bakterie by se mohly kultivovat na buničité vatě ve velkých Petriho miskách o větší ploše, například o průměru 200 mm. Petriho misky by mohly být naskládány na sobě v několika patrech, takže by produkce nebyla náročná na prostory. Bakterie by se ani nemusely osvětlovat, jelikož jak bylo zjištěno, světlo či tma nemají na produkci

violaceinu zásadní vliv. Produkce by probíhala po dobu 120 h a následně by byly buničité pláty bohaté na fialový pigment promývány v methanolu, kde by proběhla extrakce. Pomocí lisu by se vymačkal veškerý methanol s pigmentem.

#### 4.6 PCR detekce genu *phaC*

Na Obrázku 34 lze vidět identifikaci produktů pomocí multiplexní PCR metody na gelu agarové gelové elektroforézy. Negativní i pozitivní kontrola vyšla správně. Přibližně na úrovni fragmentu o velikosti 1500 bp metoda PCR detekovala gen *16S rRNA* u kmene CCM 160 a CCM 1888, který je charakteristický pro všechny bakterie. U kmene CCM 3308 tento gen detekován nebyl, jelikož mohlo dojít k chybě během izolace, nebo při purifikaci DNA. Jelikož ale došlo k amplifikaci *phaC* genu, lze tento výsledek považovat za pozitivní pro oba geny. Důvodem je, že *phaC* gen je mnohem kratší, než je gen *16S rRNA*, proto dochází k preferenční amplifikaci. Dále došlo k amplifikaci fragmentu o velikosti odpovídající 500 bp u kmene CCM 1888. Tento amoplikon indikuje přítomnost PHA-syntázy, která zodpovídá za produkci scl-PHA a mcl-PHA. Stejný úsek DNA je detekován i u pozitivní kontroly, kde byla nanesena DNA z bakterie *C. necator*, která má taktéž schopnost produkovat PHA. Bylo zjištěno, že v DNA kmene CCM 160 není možno detekovat *phaC* gen. To ale nevypovídá o neschopnosti bakterie vytvářet PHA. O tom se lze přesvědčit z výsledků práce této závěrečné práce, kdy byla u tohoto kmene pozorována koprodukce violaceinu a PHA. To dokazuje například údaj z Tabulky 3, kde je uvedena hodnota 1,837 g/l, což je hodnota množství vyprodukovaného PHA kmene CCM 160 v produkčním médiu Kumar. Tato hodnota PHA je nejvyšší naměřenou hodnotou v celé práci. Tento kmen má zřejmě lehce odlišnou genovou sekvenci PHA-syntázy než zbylé dva použité kmeny a je proto lze předpokládat, že jej nebylo možné, s využitím použitých primerů, detekovat.



Obrázek 34: Gel po elektroforéze se vzorky bakteriálních kmenu CCM 160, CCM 1888 a CCM 3308 z PCR pro detekci *16S rRNA* a *phaC* genu

## 5 ZÁVĚR

Polyhydroxyalkanoáty jsou skupina biopolymerů produkovaná celou řadou mikroorganismů. Jejich hlavní funkcí je, že slouží jako zásobárna energie a uhlíku. Mají výborné schopnosti biodegradability a biokompability, což se využívá v různých odvětvích jako je biomedicína, bioinženýrství nebo farmacie [35]. Jsou produkovány například bakteriemi rodu *Janthinobacterium*. Díky produkci a akumulaci PHA dokážou tyto bakterie žít v extrémních podmínkách za nízkých teplot a s nedostatkem živin [33]. Jsou to Gram-negativní bakterie fialové barvy. Tmavě fialová barva je způsobena barevným pigmentem jménem violacein, který produkují [13]. Tento pigment se skládá ze dvou složek – violacein a deoxyviolacein [1]. Violacein je velice významnou sloučeninou, která má nespočet vlastností a využití. Vykazuje například protirakovinné vlastnosti, je cytotoxický pro některé lidské rakovinné linie. Také má antibiotický potenciál, jelikož dokáže patogenně působit na některé mikroorganismy. Zabraňuje například zánětům mléčných žláz u krav. V potenciálním komerčním využití by se nejvíce mohl využívat v kosmetice k výrobě opalovacích krémů, jelikož je violacein fotoprotektivní a dokáže zvyšovat účinnost ochranného faktoru (SPF). V textilním průmyslu se využívá při výrobě světlostálých barevných vláken [2].

Během práce bylo zjištěno, že se produkce PHA a violaceinu navzájem ovlivňuje. Když jsou bakteriální kmeny kultivovány za nepříznivých podmínek v podobě lampy (teplota 30 °C) nebo nevyhovujícího produkčního média, nezaměřují se na produkci violaceinu, nýbrž na produkci PHA, které jim slouží jako zásobárna energie. Naopak pokud mají bakterie během kultivace dostatek vhodného produkčního média, kyslíku a vhodnou kultivační teplotu, zaměřují se na produkci violaceinu, kterého je oproti prvnímu případu podstatně více.

Bylo zjištěno, že kultivační podmínky všech tří používaných kmenů se lehce liší, nejvíce však mezi kmeny *Janthinobacterium* a kmenem *Iodobacter*. Bylo zjištěno, že kmen CCM 3308 bakterie *Iodobacter* více vyhovuje kultivace za vyšší, než laboratorní teploty (30 °C) a za přítomnosti silnějšího zdroje světla.

Dále bylo zjištěno, že ze všech používaných kmenů je schopný největší produkce violaceinu kmen CCM 160, s kterým se pracovalo po větší část práce.

Výsledkem této práce jsou poznatky ohledně kultivace bakteriálního kmene *Janthinobacterium lividum* kmene CCM 160 izolovaného z půdy. Bylo zjištěno, že nejideálnější podmínky pro jeho kultivaci v tekutém médiu je použití produkčního média Kanelli s glycerolem o objemu 75 ml a 5% obsahem naočkované kultury, doba kultivace 120 hodin za statického stání.

PCR analýza detekovala gen *16S rRNA* u kmene CCM 160 a CCM 1888 a potvrdila *phaC* gen u bakteriálních kmenů CCM 1888 a CCM 3308. U kmene CCM 160 se sice přítomnost *phaC* genu nepotvrdila, to ale neznamená, že není produkce PHA schopen, což bylo potvrzeno v laboratoři během měření na tuto závěrečnou práci. Kmen CCM 1888 nebyl v produkci violaceinu v porovnání s kmenem CCM 160 tak efektivní, ale po vybrání vhodných stresových faktorů, by mohla být vhodným producentem PHA, jelikož potenciál na produkci díky *phaC* genu má. To stejné platí u kmene CCM 3308, jehož optimální kultivační podmínky se od *J. lividum* lehce liší.

## 6 Seznam použité literatury

- [1] KUMAR, Vijay, Sanyukta DARNAL, Subhash KUMAR, Sanjay KUMAR a Dharam SINGH. Bioprocess for co-production of polyhydroxybutyrate and violacein using Himalayan bacterium *Iodobacter* sp. PCH194. *Bioresource Technology*. Indie: Academy of Scientific & Innovative Research (AcSIR), 2021, (319), 124235. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124235>
- [2] DURÁN, Nelson, Giselle Z. JUSTO, Marcela DURÁN, Marcelo BROCCHI, Livia CORDI, Ljubica TASIC, Guillermo R. CASTRO a Gerson NAKAZATO. Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein-Its main secondary metabolite: A review. *Biotechnology Advances: Research reviews*. 2016, **34**(5), 1030-1045. ISSN 0734-9750. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.06.003>
- [3] CHOI, Seong, Jin LEE a Robert MITCHELL. Violacein: Properties and production of a versatile bacterial pigment. *BioMed Research International*. Hindawi Publishing Corporation, 2015, **2015**(465056). ISSN 23146133. Dostupné z: doi:[10.1155/2015/465056](https://doi.org/10.1155/2015/465056)
- [4] MOSS, M., C. RYALL a N. LOGAN. The classification and characterization of chromobacteria from a lowland river. *Journal of General Microbiology*. 1978, **105**(1), 11-21. Dostupné z: doi:[10.1099/00221287-105-1-11](https://doi.org/10.1099/00221287-105-1-11)
- [5] AHMAD, W., N. YUSOF, N. NORDIN, Z. ZAKARIA a M. REZALI. Production and Characterization of Violacein by Locally Isolated *Chromobacterium violaceum* Grown in Agricultural Wastes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2012, **167**(5), 1220–1234. Dostupné z: doi:[10.1007/s12010-012-9553-7](https://doi.org/10.1007/s12010-012-9553-7)
- [6] HAKVÅG, S., E. FJÆRVIK a G. KLINKENBERG. Violacein-producing *Collimonas* sp. from the sea surface microlayer of coastal waters in Trøndelag, Norway. *Marine Drugs*. 2009, **7**(4), 576–588. Dostupné z: doi:[10.3390/md7040576](https://doi.org/10.3390/md7040576)
- [7] ARANDA, S., M. MONTES-BORREGO a B. LANDA. Purple-pigmented violacein-producing *Duganella* spp. inhabit the rhizosphere of wild and cultivated olives in southern Spain. *Microbial Ecology*. 2011, **62**(2), 446–459. Dostupné z: doi:[10.1007/s00248-011-9840-9](https://doi.org/10.1007/s00248-011-9840-9)
- [8] LI, W., Y. ZHANG a D. PARK. *Duganella violaceinigra* sp. nov., a novel mesophilic bacterium isolated from forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004, **54**(5), 811–1814. Dostupné z: doi:[10.1099/ijs.0.63141-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.63141-0)
- [9] LU, Yuan, Liyan WANG, Yuan XUE et al. Production of violet pigment by a newly isolated psychrotrophic bacterium from a glacier in Xinjiang, China. *Biochemical Engineering Journal*. 2009, **43**(2), 135-141. Dostupné z: doi:[10.1016/j.bej.2008.09.009](https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.09.009)
- [10] AVGUŠTIN, J., D. BERTOK, R. KOSTANJŠEK a G. AVGUŠTIN. Isolation and characterization of a novel violacein-like pigment producing psychrotrophic bacterial species *Janthinobacterium svalbardensis* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*. 2013, **103**(4), 763–769. Dostupné z: doi:[10.1007/s10482-012-9858-0](https://doi.org/10.1007/s10482-012-9858-0)
- [11] YADA, Shuichi, Yi WANG, Yanshuang ZOU, Keiko NAGASAKI, Kakushi HOSOKAWA, Issey OSAKA, Ryuichi ARAKAWA a Keiich ENOMOTO. Isolation and characterization of two groups of novel marine bacteria producing violacein. *Marine Biotechnology*. 2008, **10**(2), 128-132. Dostupné z: doi:[10.1007/s10126-007-9046-9](https://doi.org/10.1007/s10126-007-9046-9)

- [12] YANG, L., H. XIONG, O. LEE, S. QI a P. QIAN. Effect of agitation on violacein production in *Pseudoalteromonas luteoviolacea* isolated from a marine sponge. *Letters in Applied Microbiology*. 2007, **44**(6), 625–630. Dostupné z: doi:10.1111/j.1472-765x.2007.02125.x
- [13] *Janthinobacterium lividum*: Useful pigment. In: *Artis Micropia* [online]. [cit. 2022-06-27]. Dostupné z: <https://www.micropia.nl/en/discover/microbiology/janthinobacterium-lividum/#atoz-content>
- [14] SURYAWANSHI, Rahul, Chandrashekhar PATIL, Hemant BORASE, Chandrakant NARKHEDE, Andrew STEVENSON, John HALLSWORTH a Satish PATIL. Towards an understanding of bacterial metabolites prodigiosin and violacein and their potential for use in commercial sunscreens. *International Journal of Cosmetic Science*. **37**(1), 98-107. Dostupné z: doi:10.1111/ics.12175
- [15] MANSUR, J., M. BREDER, M. MANSUR a R. AZULAY. Determination of Sun protection factor by spectrophotometry. *An. Bras. Dermatol.* 1986, **61**, 121-124.
- [16] DURÁN, Marcela, Alexandre PONEZI, Adelaide FALJONI-ALARIO, Maria TEIXEIRA, Giselle JUSTO a Nelson DURÁN. Potential applications of violacein: a microbial pigment. *Medicinal Chemistry Research*. 2012, **21**, 1524-1532. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1007/s00044-011-9654-9>
- [17] MELO, P., S. MARIA, B. VIDAL, M. HAUN a N. DURÁN. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology—Animal*. 2000, **36**(8), 539-543.
- [18] CRISTEA, Daniela a Gerard VILAREM. Improving light fastness of natural dyes on cotton yarn. *Dyes and pigments*. Elsevier, 2005, **70**(214), 238-245.
- [19] VENIL, Chidambaram, Zainul ZAKARIA a Wan AHMAD. Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*. 2013, **48**(128), 1065–1079. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.06.006>
- [20] YURKOV, Vladimir a Julius CSOTONYI. New Light on Aerobic Anoxygenic Phototrophs. *Advances in Photosynthesis and Respiration*. 2009, (28), 31-35. Dostupné z: doi:[https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8815-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8815-5_3)
- [21] MAROSVÖLGYI, Marcell a Hans GORKOM. Cost and color of photosynthesis. *Photosynthesis Research*. 2010, **103**, 105-109. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1007/s11120-009-9522-3>
- [22] HENRY, Sarah a Richard COGDEL. The Evolution of the Purple Photosynthetic Bacterial Light-Harvesting System. *Advances in Botanical Research*. Elsevier, 2013, **66**, 205-226. Dostupné z: doi:<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-397923-0.00007-2>
- [23] AHMAD, W., W. AHMAD, Z. ZAKARIA a N. YUSOF. Isolation of Pigment-Producing Bacteria and Characterization of the Extracted Pigments. *Application of Bacterial Pigments as Colorant*. 2011, 25-44. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-24520-6\_2
- [24] LOGAN, Niall A. Iodobacter. In: KIM, Seung a Michael GOODFELLOW. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 2015.
- [25] BRONZINI, V., J. GIANNETTINI, C. GAMBOTTI a J. MAURY. Genetic relationships between cultivated and wild olives of Corsica and Sardinia using RAPD markers. *Euphytica*. 2002, **123**, 263–271. Dostupné z: doi:10.1023/A:1014902210530
- [26] ANGIOLILLO, A., M. MENCUCCINI a L. BALDONI. Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *Theor Appl Genet*. 1999, **98**(3-4), 411-421. Dostupné z: doi:10.1007/s001220051087

- [27] WANG, H., Y. LU a Y. XUE. Separation, purification and structure identification of purple pigments from *Duganella* B2. *Huagong Xuebao/Journal of Chemical Industry and Engineering*. 2008, **59**(3), 630-635.
- [28] ASENCIO, Geraldine, Paris LAVIN, Karen ALEGRÍA, Mariana DOMÍNGUEZ, Helia BELLO, Gerardo GONZÁLEZ-ROCHA a Marcelo GONZÁLEZ-ARAVENA. Antibacterial activity of the Antarctic bacterium *Janthinobacterium* sp. SMN 33.6 against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2013, **17**, 1-5.
- [29] Minimální inhibiční koncentrace. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2023-05-05]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Minim%C3%A1ln%C3%AD\\_inhibi%C4%8Dn%C3%AD\\_koncentrace](https://cs.wikipedia.org/wiki/Minim%C3%A1ln%C3%AD_inhibi%C4%8Dn%C3%AD_koncentrace)
- [30] XU, Xian, Liqing TIAN, Si ZHANG, Ling JIANG, Zhidong ZHANG a He HUANG. Complete genome sequence of *Janthinobacterium* sp. B9-8, a violacein-producing bacterium isolated from low-temperature sewage. *Microbial Pathogenesis*. 2019, (128), 178-183. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.003>
- [31] KOO, Hyunmin, Bailey M. STROPE, Eddy H. KIM, Adel M. SHABANI, Ranjit KUMAR, Michael R. CROWLEY, Dale T. ANDERSEN a Asim K. BEJ. Draft Genome Sequence of *Janthinobacterium* sp. Ant5-2-1, Isolated from Proglacial Lake Podprudnoye in the Schirmacher Oasis of East Antarctica. *Microbiology: Recourse Announcements*. 2016, **1**(4). Dostupné z: doi:10.1128/genomeA.01600-15
- [32] PANTANELLA, F., F. BERLUTTI, C. PASSARIELLO, S. SARLI, C. MOREA a S. SCHIPPA. Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. *Journal of Applied Microbiology I*. 2006, **102**(2007), 992–99. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03155.x
- [33] SHAN GOH, Yuh a Irene KIT PING TAN. Polyhydroxyalkanoate production by antarctic soil bacteria isolated from Casey Station and Signy Island. *Microbiological Research*. 2012, **4**(167), 211-219. Dostupné z: doi:10.1016/j.micres.2011.08.002
- [34] ANJUM, Komal, Izhar SADIQ, Lei CHEN, Sidra KALEEM, Xing-Cong LI, Zhizhen ZHANG a Xiao-Yuan LIAN. Novel antifungal janthinopolyenemycins A and B from a co-culture of marine-associated *Janthinobacterium* spp. ZZ145 and ZZ148. *Tetrahedron Letters*. 2018, **38**(59), 3490-3494. Dostupné z: doi:10.1016/j.tetlet.2018.08.022
- [35] ZULFIQAR, Raza, Abid SHARJEEL a M. IBRAHIM. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*. Elsevier, 2018, (126), 45-56. ISSN 0964-8305. Dostupné z: doi:10.1016/j.ibiod.2017.10.001
- [36] OJUMU, T. a J. YU. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology*. 2004, **3**(1), 18-24. ISSN 1684–5315. Dostupné z: doi:10.5897/AJB2004.000-2004
- [37] KAUR, G. a I. ROY. Strategies for Large-scale Production of Polyhydroxyalkanoates. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. 2015, **29**(2), 157-172. Dostupné z: doi:10.15255/CABEQ.2014.2255
- [38] SAGONG, Hye-Young, Hyeoncheol SON, So CHOI, Sang LEE a Kyung-Jin KIM. Structural Insights into Polyhydroxyalkanoates Biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier, 2018, **43**(10), 790-805. ISSN 0968-0004. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibs.2018.08.005
- [39] KIT PING TAN, Irene, Choon PIN FOONG, Hua TIANG TAN, Hui LIM, Noor-Afiqah AHMAD ZAIN, Yung CHIE TAN, Chee CHOONG HOH a Kumar SUDESH.



Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase genes and PHA-associated gene clusters in *Pseudomonas* spp. and *Janthinobacterium* spp. isolated from Antarctica. *Journal of Biotechnology*. 2020, (313), 18-28. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiotec.2020.03.006

- [40] SHRIVASTAV, Anupama, Hae-Yeong KIM a Young-Rok KIM. Advances in the Applications of Polyhydroxyalkanoate Nanoparticles for Novel Drug Delivery System. *BioMed Research International*. Institute of Life Sciences and Resources & Department of Food Science and Biotechnology, College of Life Sciences, Kyung Hee University, Yongin 446-701, Republic of Korea: Hindawi Publishing Corporation, 2013, **2013**, 1-12. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2013/581684
- [41] NEOH, Soon, Min CHEK, Hua TAN, Javier LINARES-PASTÉN, Ardra NANDAKUMAR, Toshio HAKOSHIMA a Kumar SUDESH. Polyhydroxyalkanoate synthase (PhaC): The key enzyme for biopolyester synthesis. *Current Research in Biotechnology*. 2022, **4**, 87-101. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2022.01.002
- [42] REHM, B. H. A. Polyester synthases: Natural catalysts for plastics. *Biochemical Journal*. 2003, **376**(1), 15-33. Dostupné z: doi:10.1042/BJ20031254
- [43] MEZZOLLA, Valeria, Oscar D'URSO a Palmiro POLTRONIER. Role of PhaC Type I and Type II Enzymes during PHA Biosynthesis. *Polymers*. 2018, **10**(8), 1-12. Dostupné z: doi:10.3390/polym10080910
- [44] TSUGE, Takeharu, Manami HYAKUTAKE a Kouhei MIZUNO. Class IV polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases and PHA-producing *Bacillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015, **99**(15), 6231–6240. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-015-6777-9
- [45] KÄMPFER, Peter, Enevold FALSEN a Hans-Jürgen BUSSE. Reclassification of *Pseudomonas mephitica* Claydon and Hammer 1939 as a later heterotypic synonym of *Janthinobacterium lividum* (Eisenberg 1891) De Ley et al. 1978. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2008, **58**(1). Dostupné z: doi:10.1099/ij.s.0.65450-0
- [46] *Iodobacter fluviatilis* (Moos et al. 1981) Logan 1989VP [online]. [cit. 2023-05-07]. Dostupné z: https://www.sci.muni.cz/ccm/bakterie/htmlb/3308.HTM
- [47] SNEATH, P.H.A. Cultural and biochemical characteristics of the genus *Chromobacterium*. *Journal of General Microbiology*. 1956, **15**(1), 70-98.
- [48] *Janthinobacterium lividum* (Eisenberg 1891) De Ley et al. 1978AL [online]. [cit. 2023-05-07]. Dostupné z: https://www.sci.muni.cz/ccm/bakterie/htmlb/1888.HTM
- [49] DANTAS, Clecio, Pedro VOLPE, Nelson DURÁN a Márcia FERREIRA. The Violacein Biosynthesis Monitored by Multi-Wavelength Fluorescence Spectroscopy and by the PARAFAC Method. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2012, **23**(11), 2054-2064. Dostupné z: doi:10.1590/s0103-50532012005000083
- [50] KANELLI, Maria, Mina MANDIC, Margarita KALAKONA, Sozon VASILAKOS, Dimitris KEKOS, Jasmina NIKODINOVIC-RUNIC a Evangelos TOPAKAS. Microbial Production of Violacein and Process Optimization for Dyeing Polyamide Fabrics With Acquired Antimicrobial Properties. *Frontiers in Microbiology*. 2018, **9**, 1-13. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2018.01495
- [51] *Medium 30: CHROMOBACTERIUM MEDIUM* [online]. [cit. 2023-05-07]. Dostupné z: https://www.sci.muni.cz/ccm/bakterie/html\_med/M30.HTM
- [52] TANTRAY, Javeed, Sheikh MANSOOR, Rasy WANI a Nighat NISSA. *Basic Life Science Methods: A Laboratory Manual for Students and Researchers* [online]. Academic Press, 2023

[cit. 2023-05-19]. ISBN 9780443191749. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-19174-9.00048-9>

- [53] Tryptone. In: *Cephams Life Sciences, Inc.* [online]. [cit. 2023-05-04]. Dostupné z: <https://www.cephamls.com/tryptone/>
- [54] RUTHERFORD, Steven a Bonnie BASSLER. Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012, **2**(11). Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a012427
- [55] GOMEZ-GOMEZ, B., L. ARREGUI, S. SERRANO, A. SANTOS, M. PEREZ-CORONA a Y. MADRID. Selenium and tellurium-based nanoparticles as interfering factors in quorum sensing-regulated processes: violacein production and bacterial biofilm formation. *Metallomics*. 2019, **11**(6), 1104–1114. Dostupné z: doi:10.1039/c9mt00044e
- [56] DODOU, H., A. BATISTA, S. MEDEIROS et al. Violacein antimicrobial activity on *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Natural Product Research*. 2019, 1-4. Dostupné z: doi:10.1080/14786419.2019.1569654
- [57] KRÁLOVÁ, Blanka, Ladislav FUKAL, Pavel RAUCH a Tomáš RUML. *Bioanalytické metody*. Třetí. Praha, 2001. ISBN 80-7080-449-1.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

PHA = polyhydroxyalkanoát

PHB = polyhydroxybutyrát

PHO = polyhydroxyoctanát

MIC = nejnižší koncentrace antimikrobiální chemické látky, které inhibuje viditelný růst mikroorganismu po inkubaci přes noc

PhaC = PHA-syntáza

scl-PHA = krátká délka řetězce

mcl-PHA = střední délka řetězce

lcl-PHA = dlouhá délka řetězce

CDM = sušina buněk

PCR = Polymerázová řetězová reakce

IPA = imin kyseliny indol-3-pyrohroznové

FAD, FADH<sub>2</sub> = flavinadenindinukleotid

NADPH = Nikotinamidadenindinukleotidfosfát

PVA = kyseliny prodeoxyviolaceinové

pHaB = acetoacetyl-CoA-reduktáza

SPF = ochranný faktor

MRSA = meticilin-rezistentní zlatý stafylokok

GC-FID = plynový chromatograf s plamenovým ionizačním detektorem

QS = quorum sensing