



# 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

# STUDIUM METABOLISMU POLYHYDROXYBUTYRÁTU A GLYKOGENU U CYANOBAKTERIÍ

STUDY ON METABOLISM OF POLYHYDROXYBUTYRATE AND GLYCOGEN IN CYANOBACTERIA

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Jakub Drinka

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2022

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1694/2021 Akademický rok: 2021/22  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student: **Bc. Jakub Drinka**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **prof. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Studium metabolismu polyhydroxybutyrátu a glykogenu u cyanobakterií

### Zadání diplomové práce:

1. Vypracovat literární rešerši na zadané téma
2. Zavedení metodiky pro kvantifikaci glykogenu v cyanobakteriálních buňkách
3. Posouzení vlivu osvětlení a dalších parametrů na akumulaci zásobních polymerů u cyanobakterií

### Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

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

-----  
Bc. Jakub Drinka  
student

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

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

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

## ABSTRAKT

Predložená diplomová práca mala za cieľ zaviesť metodiku pre kvantifikáciu glykogénu v cyanobakteriálnych bunkách a posúdiť u nich vplyv osvitú a ďalších parametrov na akumuláciu zásobných polymérov, glykogénu a polyhydroxyalkanoátov (PHA), konkrétne poly(3-hydroxybutyrátu) (PHB). Experimenty boli realizované s využitím dvoch kmeňov, menovite *Synechocystis* sp. PCC 6803 a *Synechocystis salina* CCALA 192, ktorých rast bol pozorovaný pri kultiváciách v Erlenmayerových bankách (EB) aj v multikultivatore (MK). Na základe sledovanej literárnej rešerše a prevedenej optimalizácie bola zavedená metodika pre kvantifikáciu glykogénu v cyanobakteriálnych bunkách. Pozorovanie vplyvu osvitú spočívalo v kultivácií v dusík-deficientnom médiu M220, u prvého zmieneneho spôsobu bol svetelný režim pri raste kultúr v časovom rámci 16 hodín svetla a 8 hodín tmy. Po vyčerpaní dusíkatých zásob v médiu došlo u buniek k typickému prechodu do dormantného chlorotického stavu a boli rovnomerne prerozdelené – časť bola nasledujúcich 5 dní kultivovaná v tme a zvyšok pokračoval v predošlom iluminačnom nastavení. Výsledky ukázali u *Synechocystis* sp. PCC 6803 pokles hladiny oboch zásobných polymérov vplyvom tohto stresu. Naopak u druhej kultúry, *Synechocystis salina* CCALA 192, bola časť glykogénu odbúraná po zastavení osvetlenia za biosyntézy PHB, avšak koncentrácia polyesteru nedosiahla vyšších hodnôt, ako v kultúrach na svetle. Rovnako tak bol pozorovaný negatívny vplyv zmeny svetelného režimu na hladinu biomasy, naopak koncentrácia fotosyntetických pigmentov bola ovplyvnená pozitívne, nakoľko bunky ďalej nedegradovali svoje fotosystémy vplyvom chlorózy. Pokusy v MK prebiehali s využitím toho istého minerálneho média, ale s nepretržitým 24 hodinovým osvetlením a na konci s rovnakou tmavou/svetlou periódou. *Synechocystis* sp. PCC 6803 v týchto experimentoch nasledovala iný trend, kedy v tmavých podmienkach nedošlo k odbúravaniu PHB (ani k jeho syntéze), ale iba k poklesu hladiny glykogénu. *Synechocystis salina* CCALA 192 sa správala obdobne, ako pri kultiváciách v EB, produkovala však takmer 4-násobne viac polyesterových granúl, než prvý použitý kmeň. Nakoľko výsledky nadobudnuté z MK boli zaťažené veľkými odchýlkami a nepravidelnosťami spôsobenými radou nevýrazných rozdielov v kultivačných podmienkach, neboli posúdené ako vhodné z hľadiska vyslovovania záverov o vplyve osvitú na akumuláciu týchto polymérov. Na základe toho sa v druhej časti tieto kultivácie zamerali skôr na sledovanie možnej produkcie kopolymérov PHA v prítomnosti známych prekursorov. Analýzy však nepotvrdili ani v jednom prípade prítomnosť inej monomérskej jednotky, ako 3-hydroxybutyrátu (3HB).

## KLÚČOVÉ SLOVÁ

Polyhydroxyalkanoáty, cyanobaktérie, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechocystis salina* CCALA 192, glykogén, zásobné polyméry, vplyv osvitú, fotoautotrofné kultivácie, mixotrofné kultivácie

## ABSTRACT

The submitted diploma thesis is focused on establishing a quantification method for glycogen analysis in cyanobacterial cells in order to be able to consider the impact of illumination and other parameters on accumulation of reserve polymers, glycogen and polyhydroxyalkanoates (PHA), namely poly(3-hydroxybutyrate) (PHB). The experiments were conducted with two cyanobacterial species, *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Synechocystis salina* CCALA 192, which were grown both in Erlenmayer flasks (EF) and multicultivator (MC). The methodology for glycogen accumulation was introduced based on available literature and conducted optimalization. The effect of different illumination conditions was observed in a nitrogen-limiting media M22O, in which half of the cultures were cultivated with a 16 hours of light and 8 lights of darkness periods (EF) for the whole duration of the experiment. Others were transferred into full-time dark period after entering the dormant chlorosis state, following the exhaustion of nitrogen levels in the media. *Synechocystis* sp. PCC 6803 showed a decrease in both of the reserve polymers accumulation when introduced to this type of stress conditions. On the other hand, *Synechocystis salina* CCALA 192 converted some of the glycogen into PHB in the dark, but the polyester levels were lower than those of the cultures continuously cultivated under the lamp. A negative effect on the biomass concentration was also detected, while cyanobacterial pigments seemed to be unaffected by the lack of light, their levels in the EF that remained illuminated decreased due to chlorosis. The experiments in the MC were conducted in the same way, but the light period consisted of constant, 24-hour illumination. *Synechocystis* sp. PCC 6803 seemed to follow a different trend than in cultivations in EF, the PHB concentration was not affected by the dark period and remained on the same amounts, while glycogen was metabolised. *Synechocystis salina* CCALA 192 increased its polyester reserves in the darkness and in comparison with the first species accumulated almost 4 times more PHB. However, the results acquired from cultivations in MC seemed to be very unequal due to a lot of small differences in the cultivation conditions. That was the reason why in the later stages of experiments they were focused more on a possible PHA copolymer formation, rather than comparing the functions of these two reserve polymers in the light/dark cycles. However, none of the cultivations was succesful in this matter and no monomer other than 3-hydroxybutyrate (3HB) was detected in the dried biomass.

## KEY WORDS

Polyhydroxyalkanoates, cyanobacteria, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechocystis salina* CCALA 192, glycogen, reserve polymers, impact of illumination, photoautotrophic cultivations, mixotrophic cultivations

## CITÁCIA

DRINKA, Jakub. *Studium metabolismu polyhydroxybutyrátu a glykogenu u cyanobakterií* [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-05-12]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/138831>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnológií. Vedoucí práce Stanislav Obruča.

## PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracoval samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citoval. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....  
podpis študenta

## POĎAKOVANIE

Týmto by som sa rád poďakoval vedúcemu práce, prof. Ing. Stanislavovi Obručovi, Ph.D., za ústretovosť, ochotu a odborné vedenie práce. Obrovská vďaka patrí aj mojej konzultantke, Mgr. Zuzane Šedrlovej, bez ktorej trpezlivosti, rád a pomoci v rámci laboratórnej práce aj písomného spracovania by nebola uskutočnená. V neposlednom rade by som chcel poďakovať svojej rodine za podporu počas celého štúdia a svojim priateľom, ktorí ho spravili nezabudnuteľným.

# OBSAH

1	Úvod.....	8
2	Teoretická časť.....	9
2.1	Cyanobaktérie.....	9
2.1.1	Cytológia a morfológia.....	9
2.1.1.1	Povrchové obaly cyanobakteriálnych buniek.....	10
2.1.1.2	Membrány thylakoidov.....	11
2.1.1.3	Centrálny bunečný priestor.....	12
2.1.1.4	Pigmenty.....	13
2.1.1.5	Rast, rozmnožovanie, diferenciacia a z nich odvodená taxonómia.....	15
2.1.2	Metabolizmus a fyziológia.....	17
2.1.2.1	Metabolizmus uhlíka – Fotosyntéza a Calvin-Bensonov cyklus.....	17
2.1.2.2	Metabolizmus dusíka.....	19
2.2	Polyhydroxyalkanoáty.....	20
2.2.1	Vlastnosti a aplikácie PHA.....	20
2.2.2	Metabolizmus a bioprodukcia PHA.....	22
2.2.3	Cyanobakteriálna produkcia PHA.....	23
2.3	Glykogén.....	25
2.3.1	Štruktúra glykogénu.....	25
2.3.2	Metabolizmus glykogénu.....	26
2.3.3	Funkcie glykogénu.....	27
2.4	Vzťah medzi glykogénom a polyhydroxyalkanoátmi.....	29
2.4.1	Narušenie glykogénovej biosyntetickej/biodegradačnej dráhy.....	30
2.4.2	Narušenie biosyntetickej dráhy PHB.....	33
3	Experimentálna časť.....	34
3.1	Použité organizmy, chemikálie a prístroje.....	34
3.1.1	Použité organizmy.....	34
3.1.2	Použité chemikálie.....	34
3.1.3	Použité prístroje.....	34
3.2	Kultivovanie cyanobakteriálnych kmeňov.....	35
3.2.1	Pokusné kultúry v Erlenmayerových bankách.....	36
3.2.2	Pokusné kultúry v multikultivátore.....	36
3.3	Prípravy vzoriek a analýzy.....	37
3.3.1	Extrakcia a analýza koncentrácie glykogénu.....	37
3.3.2	Analýza koncentrácie PHB.....	38
3.3.3	Extrakcie a stanovenie koncentrácie pigmentov.....	39

4	Výsledky a diskusia.....	40
4.1	Zavedenie metodiky pre kvantifikáciu glykogénu v cyanobakteriálnych bunkách .....	40
4.1.1	Odber a prečistenie biomasy .....	40
4.1.2	Bunečná lýza a sprístupnenie glykogénu .....	40
4.1.3	Precipitácia a prečistenie .....	42
4.1.4	Enzymatický rozklad glykogénu .....	44
4.1.5	Precipitácia, filtrácia, neutralizácia a analýza .....	48
4.1.6	Vyhodnotenie .....	49
4.1.7	Alternatívny postup .....	49
4.2	Posúdenie vplyvu osvitu a ďalších parametrov na akumuláciu zásobných polymérov u cyanobaktérií .....	50
4.2.1	Kultivácie v Erlenmayerových bankách .....	50
4.2.2	Kultivácie v Multikultivatore (MK).....	58
4.2.2.1	Fotoautotrofné kultivácie .....	59
4.2.2.2	Mixotrofné kultivácie .....	62
5	Záver.....	65
	Zoznam použitých zdrojov .....	67
	Zoznam použitých skratiek a symbolov .....	79
	Prílohy .....	80

# 1 ÚVOD

Vedecký a materiálový výskum viedol k mnohým skvelým vynálezom a zlepšeniam, ktoré prudko zvýšili našu životnú úroveň, uľahčili v mnohých ohľadoch život a otvorili nám dvere k novým možnostiam. Medzi najvýznamnejšie z nich jednoznačne patria plasty, ktoré vďaka širokej škále vlastností, ktorá medzi materiálmi iných druhov snáď ani nemá obdoby, a často veľmi nízkej výrobnéj cene, rýchlo našli uplatnenie takmer v každom odvetví. Napriek tomu, aké benefity nám prinášajú, však netreba zabúdať na to, že predstavujú obrovské riziko pre životné prostredie, ktorého ochrana by mala pre dobro nás aj budúcich generácií byť prioritou číslo 1. Najväčšie riziko, ktoré predstavujú, spočíva v ich dlhom rozklade v prírode, rádovo sa pohybujúcom v desiatkach až stovkách rokov. Keďže ich spaľovanie je sprevádzané so vznikom toxických produktov, recyklácia je najmä v prípade jednorázovo používaných plastov takmer nemožná a hlavne z dôvodu ľudskej lenivosti a egoizmu aj tak nereálna, naskytla sa potreba nájdania náhrady, ktorá by pre životné prostredie nepredstavovala také riziko.

Ako jedna z viacerých vhodných alternatív sa naskytujú polyhydroxyalkanoáty. Jedná sa o mikrobiálne zásobné látky, ktoré vďaka svojmu biologickému pôvodu disponujú vlastnosťami, ktoré si od „bezpečnej náhrady plastov“ sľubujeme. Jedná sa hlavne o rýchlu biodegradabilitu za vzniku produktov, ktoré pre naše okolie nepredstavujú ďalšiu záťaž. Ich primárna funkcia u mikrobiálnych buniek spočíva hlavne v hromadení zásob energie či uhlíka v ideálnych podmienkach pre prípad nástupu podmienok neideálnych, či v lepšej adaptácii na stresové podmienky. Štúdiom ich metabolizmu sa však dostávame stále bližšie k pochopeniu tohto procesu a identifikácii nových, účinných výrobných stratégií, vďaka ktorým by sme mohli túto bionáhradu ťažko odbúrateľných plastov produkovať vo veľkom priemyselnom merítke za približne rovnakú cenu, a aspoň z časti tak zastaviť čoraz väčšiu globálnu krízu.

Cyanobakteriálna produkcia polyhydroxyalkanoátov sa síce z hľadiska dosiahnuteľných výťažkov zatiaľ nepribližuje heterotrofným producentom, jej obrovská výhoda však spočíva v ich akumulácii tak povediac „z ničoho“. Nielenže ich produkujú zo všadeprítomného slnečného žiarenia, zároveň môžu pomáhať odbúrať oxid uhličitý vznikajúci pri priemyselnej výrobe a premieňať ho do podoby bioplastov. Problém cyanobaktérií spočíva v tom, že ich metabolizmus stále nie je dokonale preskúmaný a prítomnosť dvoch druhov zásobných polymérov, ktorá je pre mikrobiálne bunky veľmi atypická, a jej spojenie s fotoautotrofným druhom generovania energie a živín tak otvára rôzne otázky ohľadom ich funkcií a vzájomnom vzťahu.



## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1 Cyanobaktérie

Cyanobaktérie (sinice) sú monofyletické, staroveké, morfológicky rozmanité a ekologicky veľmi dôležité fototrofické mikroorganizmy, ktoré realizujú vodu-oxidujúcu, kyslík-generujúcu fotosyntézu obdobnú rastlinám [1]. Bežne sa vyskytujú v rozmanitých prostrediach - v moriach, jazerách, nádržiach a iných stojatých vodných plochách, ale aj riekach a potokoch, kde hrajú esenciálnu úlohu v regulácii dynamiky uhlíka, dusíka či kyslíka [2]. Nachádzajú sa však aj v prostrediach často označovaných ako extrémne, v zamrznutých vodách, termálnych prameňoch či soliskách [3].

Presná doba výskytu prvých cyanobakteriálnych buniek je stále nejasná, zachované sú však fosílie staré 2-3,5 miliardy rokov, pričom k najväčšej diverzifikácii došlo pravdepodobne niekedy pred zhruba 2 miliardami rokov [1, 2]. Z hľadiska vývoja života na Zemi je im pripisovaná zásluha za primárne okysličovanie atmosféry, čo viedlo k rozvoju aeróbného respiračného systému. To bol prvý krok k vývoju vyšších rastlín a živočíchov a eventuálne inteligentných foriem života. Cyanobaktérie nielenže vykazujú veľkú odolnosť v rámci samostatnej existencie, ale tvoria aj symbiotické vzťahy s komplexnejšími formami života, ako napríklad dusík fixujúci druh *Anabeana* (alebo *Nostoc*) *azolae* symbiozujúci s plávajúcou papraďou *Azolla*, často sa vyskytujúcou v jazerách či močiaroch. Práve endosymbióza cyanobakteriálnej bunky s bezfarebnou eukaryotickou bunkou, ktorá ju pohltila a zachovala, dala vznik pravekým predchodcom dnešných rastlinných a riasových chloroplastov [2].

Sinice boli v minulosti klasifikované ako modro-zelené riasy kvôli ich vzhľadu blízkeho riasam, ich obsahu chlorofylu, nie baktériochlorofylu a ich produkcií kyslíka prostredníctvom dvojfotosyntetizujúceho systému, ako u vyšších rastlín a rias. Vnútrobučnej štruktúra sa však skôr podobá prokaryotickým bunkám, pretože im chýba typické eukaryotické jadro a iné organely, a je u nich prítomná peptidoglykánová bučnej stena vyskytujúca sa u gram-negatívnych Eubaktérií. Navyše obsahujú množstvo ďalších znakov, ktoré ich odlišujú od ostatných baktérií, najmä v ich fotosyntetickom aparáte a tvorbe kyslíku [2].

Dnes sú taxonomicky na základe Medzinárodného bakteriologického kódu radené do ríše Monera (Prokaryota), oddelenia Eubacteria, triedy Cyanobacteria [3]. V posledných rokoch sú tradičné taxonomické princípy nahrádzané molekulárnymi metódami, ako napríklad sekvenáciou malých podjednotiek rRNA génov, ktoré pravdepodobne do taxonómie a fylogénzy prinesú nové poznatky. K dnešnému dňu do tejto triedy radíme 5 radov, približne 150 rodov obsahujúcich zhruba 2 000 cyanobakteriálnych druhov rozličných tvarov a veľkostí [2, 3]. Ako skupina vykazujú jednu z najsofistikovanejších morfológických diferenciácií v rámci baktérií a mnohé druhy sa svojim skupinovým chovaním približujú mnohobunkovým organizmom. Predpokladá sa, že ich globálna biomasa presahuje  $10^{15}$  gramu a tvoria významnú časť globálnej primárnej produkcie biomasy v oceánoch [1].

#### 2.1.1 Cytológia a morfológia

Sinice vykazujú relatívne vysoký počet morfológických znakov v porovnaní s inými prokaryotmi [4]. Šírka cyanobakteriálnych buniek sa pohybuje v rozmedzí 0,5  $\mu\text{m}$  (napríklad u *Prochlorococcus*) a 50-100  $\mu\text{m}$  (*Chroococcus*, niektoré *Oscillatoria*), čo je výrazne viac ako u väčšiny iných baktérií či archeí (okolo 4  $\mu\text{m}$ ). Tvar buniek sa často líši v závislosti na spôsobe

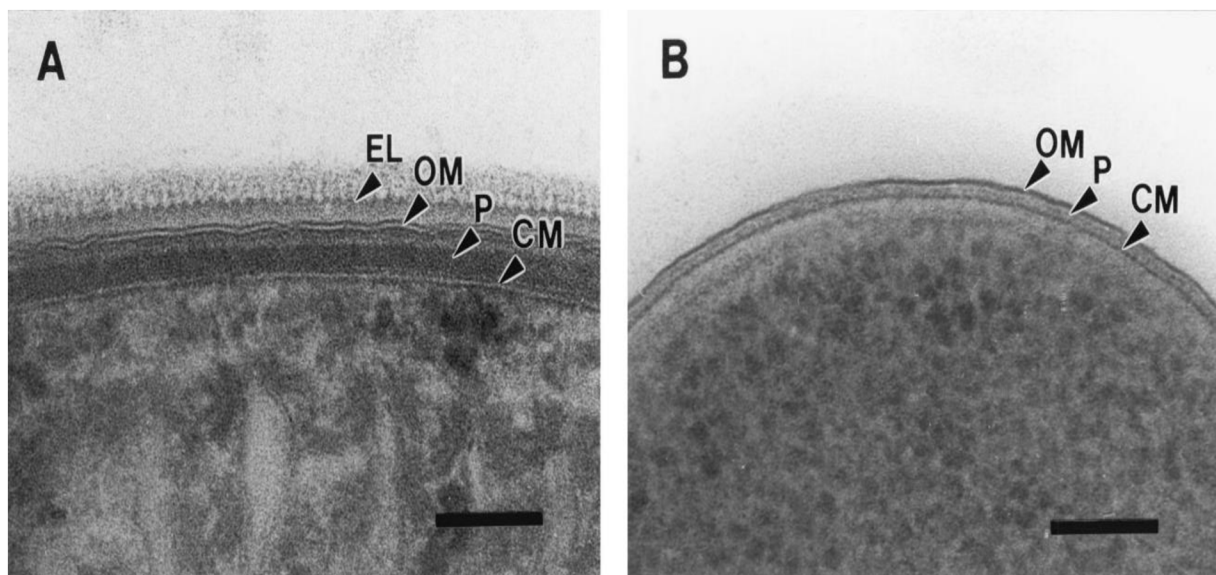
života a prostredí. Jednobunkové druhy a druhy tvoriace kolónie môžu byť guľovité, baciloidné, alebo vretenovité (podlhovasté, s výrazným rozšírením v strede bunky), niektoré druhy vykazujú pleiomorfizmus, kedy svoj tvar a veľkosť prispôsobujú podmienkam prostredia [1]. Druhy tvoriace filameny (vlákna) bývajú diskoidné, tyčinkovité či špirálovité a ich trichómy často dosahujú milimetrov [1, 5]. Kolónie jednobunkových cyanobaktérií môžu mať pravidelnú (napr. *Merismopedia*), alebo nepravidelnú (*Microcystis*) distribúciu buniek a ich počet sa líši v rozmedzí 2 až niekoľko tisíc v rámci jednej kolónie. Rod *Pleurocapsales* vykazuje komplexnú tvorbu kolónií, pripomínajúcu filamentá, vetvenie a bunky môžu byť heteropolárne. Vlákňité druhy vykazujú pravé aj falošné vetvenie. Zatiaľ čo falošné sa vyskytuje u všetkých druhov, pravé vetvenie je typické len pre rod *Nostocales* [4].

### 2.1.1.1 Povrchové obaly cyanobakteriálnych buniek

Na základe dnes ešte stále bežne používaného delenia prokaryotických bunečných obalov na gram-negatívne a gram-pozitívne, ktoré sú založené najmä na rozdielnostiach v štruktúre peptidoglykánú, ktorá výrazne ovplyvňuje mechanickú stabilitu, permeabilitu a odolnosť voči chemickým zlúčeninám, sa sinice podobajú viac gram-negatívnym prokaryotom. Napriek tomu, že táto klasifikácia je vo všeobecnosti nápomocná, ignoruje fakt, že najväčšia a pravdepodobne najrozmanitejšia skupina baktérií – cyanobaktérie, obsahuje bunečné obaly s kombináciami týchto znakov [6]. Peptidoglykánová vrstva je u siníc výrazne hrubšia než u väčšiny iných gram-negatívnych druhov. U jednobunkových druhov (napr. *Synechocystis*) dosahuje okolo 10 nm [7], u vláknitých druhov (*Phormidium uncinatum*) sa pohybuje v rozmedzí 15-35 nm a u veľkých zástupcov (*Oscillatoria princeps*) až 700 nm [6, 8]. Stupeň zosieťovania medzi peptidoglykánovými vláknami mureinu u *Synechocystis sp.* PCC 6714 je mnohonásobne vyšší (56-63 %) [9], ako u iných gram-negatívnych druhov (20-33 %) [10] a týmito hodnotami sa približuje skôr gram-pozitívnym prokaryotom [6, 11].

Rozdielne znaky bakteriálnych stien sa prejavujú aj u cyanobakteriálnych vonkajších membrán. Lipopolysacharidy (LPS) prítomné v týchto membránach nielenže obsahujú malé množstvo naviazaných fosfátov [12], ale často im chýba deoxyoktonát [13], typický LPS komponent u gram-negatívnych druhov [6]. Na druhej strane je prítomný O antigen podobný *Escherichia coli* O antigénu [14], zodpovedný za adsorpciu cyanofágov či endotoxickú aktivitu vo vodných prostrediach [6, 15]. Vonkajšie membrány obsahujú aj ďalšie látky netypické pre gram-negatívne baktérie, ako sú karotenoidy [16], netypické masné kyseliny ( $\beta$ -hydroxypalmitová kyselina) [17], či poríny, ktoré sú ukotvené na peptidoglykánovú vrstvu [6, 18]. Vonkajšie membrány sú u baktérií často pokryté vonkajšími povrchovými vrstvami - S-vrstvami, a uhl'ovodíkovými vrstvami (viď obr. 1) [19, 20]. S-vrstvy sú kryštalického charakteru, tvorené jedným druhom glykoproteínu, ktoré pokrývajú celý povrch bunky [21]. Plnia ochrannú funkciu, funkciu molekulových sít, podieľajú sa na bunečnej adhézii a často bývajú jedným z pozorovaných znakov pri bunečnom rozpoznávaní [22]. Mnohé sinice produkujú ako odpoveď na rozličné faktory prostredia viaceré vonkajšie uhl'ovodíkové štruktúry [6, 19, 23]. Niektoré majú charakter slizu, sú sekretované do prostredia a napomáhajú pri pomalom, povrchovom pohybe, tzv. kĺzaním (z angl. gliding) [24], nakoľko u cyanobaktérií neboli objavené bičíky zabezpečujúce pohyb, ako u väčšiny baktérií. Iné štruktúry, ako napríklad púzdra, sú s bunkou relatívne pevne spojené [24].

Pod vrstvou peptidoglykánu sa nachádza cytoplazmatická membrána, oddeľujúca centrálny bunecný priestor od bunecných obalov a prostredia. Okrem toho plní transportné funkcie – podieľa sa na transporte látok a energie. U cyanobaktérií, na rozdiel od iných gram-negatívnych baktérií, však úzko súvisí s tvorbou a funkciami fotosystémov [25] a systému membrán thylakoidov [26] a podieľa sa na udržiavaní homeostázy pri vysokom pH vonkajšieho prostredia [27].



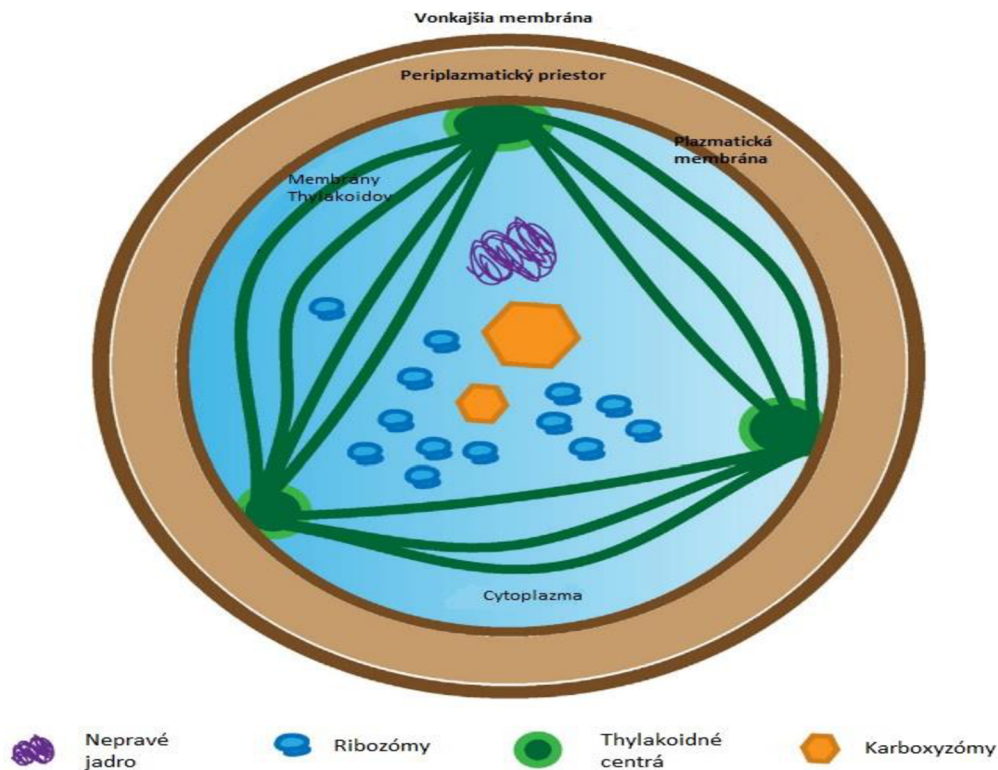
Obrázok 1 – Snímka z elektrónového mikroskopu zachytávajúca bunecné obaly gram-negatívnych prokaryotov - cyanobaktérie *P. uncinatum* (A) a *E. coli* (B). Pozoruhodná je najmä hrúbka peptidoglykánovej vrstvy neodpovedajúca taxonómii. Vonkajšia vrstva u cyanobakteriálnej bunky je tvorená S-vrstvou a oscilínovými vláknami. Vysvetlivky: EL – vonkajšia vrstva (External Layer), OM – vonkajšia membrána (Outer Membrane), P – peptidoglykán, CM – cytoplazmatická membrána. Prebraté z [6].

### 2.1.1.2 Membrány thylakoidov

Membrána thylakoidov je špecializovaným miestom, kde prebieha fotosyntéza. U rastlín je obklopená stromou, u rias plastidmi, u siníc cytoplazmou [28, 29]. Fotosyntetické eukaryoty získali schopnosť fotosyntézy práve vďaka cyanobaktériám, kedy eukaryotická hostiteľská bunka obsahujúca organely ako jadro, mitochondrie, endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát endosymbioticky pohltila pradávnu bunku obdobnú dnešným siniciam a tento endosymbiont sa stal dnešným primárnym plastidom [29, 30].

Štruktúra thylakoidov u cyanobaktérií je odlišná od plastidov, centrum má cibulovitý tvar a nachádza sa paralelne s plazmatickou membránou (obrázok 2) [29]. Prepojenie plazmatickej membrány a membrány thylakoidov je dodnes predmetom diskusie. Pracuje sa s tromi teóriami ich vzájomného vzťahu: 1. v mieste vzniku budúceho thylakoidu sa nachádzajú štruktúry, ktoré syntetizujú proteíny, lipidy a pigmenty pre danú konkrétnu membránu, 2. komplexy proteín-pigment sú syntetizované a zostavované v plazmatickej membráne a následne presúvané do thylakoidov, 3. thylakoidné „centrá“ sú tvorené ako špecializované štruktúry zahajujúce biosyntézu daných membrán [31, 32]. Momentálne sa považuje za najpravdepodobnejší tretí model, podporovaný viacerými pozorovaniami. Vo všeobecnosti sa thylakoidy vyskytujú vo

forme paralelných zoskupení v tvare listov, v blízkosti plazmatickej membrány, v niektorých miestach sa koncentrujú za tvorby tzv. thylakoidných centier [32, 33]. Tie boli popísané ako valcové štruktúry o rozmeroch 30 na 20 nm, skladajúce sa z guľovitých podjednotiek naskladaných v skupinách, ktoré vyzerajú byť naviazané na thylakoidy [32, 34].



Obrázok 2 – Štruktúra typickej jednobunkovej cyanobaktérie. Thylakoidné membrány obklopujú tzv. lumeny a sú spojené s plazmatickou membránou v thylakoidných centrách. Dodnes nie je jasné, ako sú plazmatická membrána a membrány thylakoidu (periplazma/thylakoidný lumen) fyzicky prepojené. Prebraté, upravené z [32].

### 2.1.1.3 Centrálny bunecný priestor

Hoci cyanobaktérie neobsahujú membránovo viazané organely, obsahujú viaceré bunecné štruktúry a inklúzie so špecializovanými funkciami, ktoré prispievajú k ich ekologickému úspechu [2]. Okrem fotosyntetizujúcich thylakoidných membrán sa v nich nachádzajú aj fykobilizómy, nukleoidná oblasť, alebo centroplazma v centre bunky, ktorá obsahuje komplexne zloženú kruhovú DNA, často vo viacerých kópiách. V bunkách sa taktiež vyskytujú rôzne zásobné zložky, vrátane glykogénových granúl, cyanofycínových granúl, v ktorých je uložený dusík v podobe arginínu a kyseliny asparagovej, karboxyzómy obsahujúce ribulóza-1,5-bisfosfát karboxylázy/oxygenázy (RuBisCO), ktoré zásobujú bunku týmito fotosyntetickými enzýmami ako aj dusíkom, a polyfosfátové granule [2]. Tieto inklúzie umožňujú bunkám akumulovať energiu a nutrienty ďaleko nad rámec ich aktuálnej potreby [2]. Bunky viacerých planktonických druhov obsahujú až tisícky plynových vakuól, ktoré sú duté, pre vodu nepriestupné válce zložené z proteínových podjednotiek. Tieto sa naplňajú plynmi, ktoré difundujú z okolitého média a poskytujú bunkám a kolóniám vztlakovú silu v prípade potreby nadnášať sa k hladine za svetlom pre vyššiu efektivitu fotosyntézy [2]. Niektoré druhy

podstupujú dennú migráciu hore a dole v rámci vodného stĺpca zmenou obsahu hustých uhlíkovodíkových inklúzií, ktoré plnia funkciu záťaže [2].

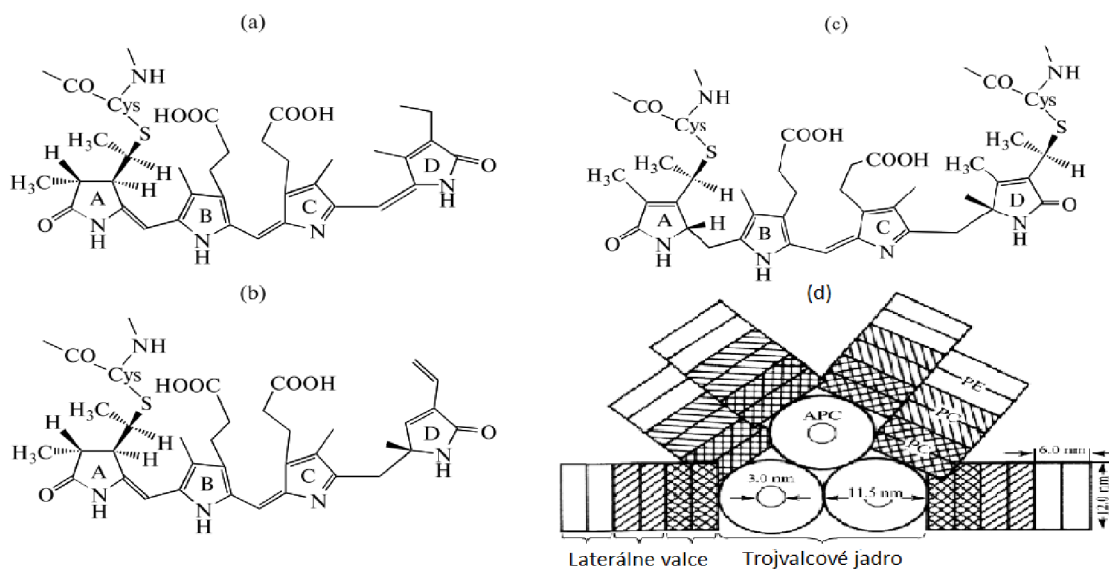
Eukaryotické bunky si vyvinuli sofistikované DNA-zbaľujúce mechanizmy, normálna eukaryotická bunka obsahuje jadro a pri delení sa objavujú kondenzované chromozómy. Prokaryotické bunky taktiež obsahujú zhluky či zväzky DNA, nazývané nukleoidy, v cytoplazme, kde sú ribozómy a mnohé iné komplexy vylučované k periférii nukleoidu [35, 36]. Nedochoďza tu však k tak výrazným transformáciám a zmenám pri delení ako u eukaryotických chromozómov. U cyanobaktérie *Synechococcus elongatus* PCC 7942 tyčinkovitého tvaru o rozmeroch 2-5  $\mu\text{m}$  bola pozorovaná prítomnosť 2-8 kópií kruhovej chromozomálnej DNA skladajúcej sa približne z 2,7 Mbp [37, 38]. Použitím fluorescenčnej mikroskopie bolo pozorované, že DNA u tohto kmeňa výrazne mení svoju podobu v závislosti na svetelnom režime [39]. Fluorescenčné značenie ukázalo, že DNA bola väčšinou uniformne uložená v cytoplazme a obklopená hrubou vrstvou thylakoidných membrán. Keď bol však tento druh kultivovaný v režime 12 hod svetlo/12 hod tma, DNA vyzerala byť zbaľovaná vždy na konci svetelnej periódy, zatiaľ čo v iných intervaloch bola rozbalená v cytoplazme [35, 39]. Murata a kolektív vizualizovali DNA u tohto kmeňa pomocou vysoko-napäťovej kryoelektrónovej tomografie a pozorovali, že u rýchlo zmrazených buniek mala zložená DNA tvar vlniacej sa tyčinky podobajúcej sa kondenzovanému eukaryotickému chromozómu [35].

Karboxyzómy sa vyskytujú v dvoch rozdielnych formách na základe formy enzýmu RubisCO, ktorý enkapsulujú.  $\alpha$ -karboxyzómy enkapsulujú RuBisCO 1A, vyskytujúci sa u cyanobaktérií rodov *Prochlorococcus*, morských rodov *Synechococcus* a proteobaktérií, ako napríklad *Thiobacillus*, zatiaľ čo  $\beta$ -karboxyzómy obsahujú formu 1B, ktorú všetky ostatné cyanobakteriálne rody zdieľajú s eukaryotickými riasami, napríklad s rodom *Chlamydomonas* [40]. Za kľúčovú úlohu karboxyzómov je považovaná ich schopnosť kontroly prúdenia malých molekúl dnu a von prostredníctvom sily sprostredkúvanej proteínovými pórmí v ich obale. RubisCO je totižto problematickým enzýmom s malými výťažkami, nízkou afinitou k substrátu, oxidu uhličitému, a zlou selektivitou k jeho druhému, konkurenčnému substrátu, molekule kyslíka. Cyanobaktérie, spolu s niektorými chemoautotrofmi, výrazne zvyšujú účinnosť fixácie uhlíka skupinou mechanizmov známych ako uhlík koncentrujúce mechanizmy (z angl. Carbon Concentrating Mechanism, CCM) [40, 41]. Napríklad pre hydrogenuhlíčanový anión  $\text{HCO}_3^-$  (bikarbonát), ktorý je prenášaný cez bunečnú membránu, pasívne difunduje cez cytoplazmu a je následne premieňaný na oxid uhličitý prostredníctvom uhlikatých anhydráz len v prítomnosti RuBisCO [40]. Výsledkom aktivity CCM je koncentrácia  $\text{CO}_2$  sprostredkúvaná pre RuBisCO až vo výške 50 mM [42]. Keďže na rozdiel od bikarbonátu, oxid uhličitý môže rýchlo difundovať naprieč bunečnými membránami a unikať tak z bunky, RuBisCO a CA sú lokalizované vo vnútri karboxyzómov. Tieto nezvyčajne veľké (často viac ako 90 nm) mnohostenné častice obklopujú proteínové jadro skladajúce sa najmä z RuBisCO, obalené v tenkom (3-6 nm) proteínovom obale [41]. Nedávne experimenty ukazujú, že tento obal funguje ako difúzna bariéra pre  $\text{CO}_2$ , umožňujúca akumuláciu tejto molekuly v blízkosti enzýmu [43].

#### 2.1.1.4 Pigmenty

U cyanobaktérií, fykobilizómy (z angl. phycobilisomes, PBS) slúžia ako „antény“ pre fotosyntetický pigmentový aparát [44]. Ide o granule nachádzajúce sa na vonkajšom povrchu

vnútornej membrány thylakoidov. Obsahujú pestro sfarbené fykobiliproteíny (z angl. phycobiliproteins, PBP) a vytvárajú obrovské supramolekulárne komplexy o veľkosti 3000-7000 kDa, 2 až 3 krát väčšie ako ribozómy, obsahujúc 200 až 500 fykobilínových chromofórov (chromofór je tá časť molekuly, kde dochádza k absorpcii a teda k najväčšej zmene geometrie, elektrónovej hustoty atď., po excitačnom procese [45]) kovalentne viazaných k proteínom. Je známych viac ako 10 PBP, ktoré spadajú do jednej z troch skupín: fykoerytríny, fykocyaníny a alofykocyaníny. Duté kotúče PBP trimérov a hexamérov sú usporiadané do valcov bezfarebnými spájajúcimi proteínmi a tieto kotúče sú následne zostavované do PBS. Typický polokotúčový PBS sa skladá z centrálného jadra, obsahujúceho 3 alofykocyanínové valce a 6 laterálnych valcov pozostávajúcich z iných PBP a pripojených k jadru (viď obrázok 3). Počet, veľkosť a zloženie pigmentov PBS závisí u siníc na svetelných podmienkach a iných faktoroch prostredia. Zatiaľ čo PBS majú isté výhody oproti iným absorbujúcim „anténam“, tieto proteínové komplexy vyžadujú viac energie pre svoju biosyntézu ako chlorofyl *a/b* a chlorofyl *a/c* proteíny vyskytujúce sa u iných organizmov praktizujúcich oxygénnu fotosyntézu [44]. Z hľadiska chemickej štruktúry sú PBP chromofóry rovnaké ako bilíny (žltové pigmenty), preto sa nazývajú fykobilíny. Na rozdiel od hémov a chlorofylov, fykobilíny neobsahujú žiadny atóm kovu [46]. Sú známe 4 fykobilíny vyskytujúce sa u cyanobaktérií: fykocyanobilín, fykoerytrobilín, fykourobilín a fykoviolobilín [47]. Hlavnými funkciami PBS je absorpcia svetelného kvanta a transport absorbovanej energie na chlorofyl [44]. Koncom 19. storočia Engelmann demonštroval, že ožiarenie cyanobaktérií celým viditeľným spektrom vyúsťuje v najvyššiu produkciu kyslíka v oblasti vlnových dĺžok 570 až 630 nm, kedy dochádza k absorpcii PBS [44, 48].



Obrázok 3 – Chemická štruktúra fykobilínov: (a) fykocyanobilín, (b) fykoerytrobilín, (c) fykourobilín. Na obrázku (d) je zobrazená štruktúra PBS pozostávajúca z trojvalcového jadra a šiestich laterálnych valcov tvorených fykocyanínovými a fykoerytrinovými hexamérmí (APC = alofykocyanín, PC = fykocyanín, PE = fykoerytrin). Prebraté a upravené z [44].

Chlorofyly, alebo horčíkom chelatované cyklické tetrapyrrolové komplexy, intenzívne absorbujú žiarenie vo viditeľnej a infračervenej oblasti. Pomenovanie chlorofylov je abecedné,

súvisí s poradím, v akom boli objavené. Funkčne sa delia na hlavné a doplnkové, pričom prvá skupina je súčasťou fotosyntetických reakčných centier, zatiaľ čo druhá plní len funkciu antén. Reakčné centrá však obsahujú okrem chlorofylov vykonávajúcu fotochemickú reakciu aj molekuly chlorofylov slúžiace ako antény jadra reakčných centier, ktoré sami o sebe nedokážu dodávať dostatok excitačnej energie pre fotoautotrofiu. Dôvodom je, že ich miera absorpcie fotónov je o niekoľko rádov nižšia, než je obrat reakčných centier. Tento problém je riešený prítomnosťou dodatočných svetlo-zachytávajúcich komplexov obsahujúcich veľké množstvo molekúl chlorofylov a PBP. Tie absorbujú žiarenie rôznych vlnových dĺžok spektra a redistribuuju energiu medzi reakčnými centrami fotosystémov I a II (PSI a PSII). Za zmienku stojí, že absorpčné spektrá chlorofylov *in vivo* sa takmer vždy líšia od spektier chlorofylov rozpustených v organických rozpúšťadlách. U cyanobaktérií je takmer výlučne prítomný ako hlavný chlorofyl typu *a*, výnimočne *d* a väčšinou neobsahujú doplnkové chlorofyly, hoci niektoré tvoria typy *b*, *c* a *f* [49].

Karotenoidy sú veľkou (poznáme viac ako 640 druhov) skupinou prírodných pigmentov vyskytujúcich sa u mikroorganizmov, húb, rias, rastlín aj živočíchov. Väčšina sa skladá z 40 uhlikatej kostry, obsahujúcej osem 5-uhlikatých isoprenoidných jednotiek s množstvom konjugovaných väzieb [50]. U fotosyntetizujúcich organizmov plnia dve hlavné funkcie: sú doplnkovými absorbujúcimi pigmentami a chránia pred fotooxidačným poškodením. Prvá funkcia spočíva v absorpcii fotónov v rozsahu 450-570 nm a prenosi energie na chlorofyl [51]. U *Synechococcus* sp. boli pozorované karotenoidy viazané na komplexy chlorofyl-proteín, ktoré boli tvorené najmä  $\beta$ -karoténom, absorbujúcim pri vlnových dĺžkach 505 a 470 nm, v prípade aktívnej formy vyskytujúcej sa v blízkosti membránovej roviny. U neaktívnej formy orientovanej kolmo na membránovú rovinu dochádzalo k absorpcii pri 495 a 465 nm. V reakčnom centre PSII boli taktiež popísané dve molekuly  $\beta$ -karoténu, u ktorých bolo dokázané, že chránia chlorofyl P680 pred svetelným poškodením u izolovaných PSII [50, 52].

### 2.1.1.5 Rast, rozmnožovanie, diferenciácia a z nich odvodená taxonómia

Niektoré druhy kultivované za ideálnych podmienok vykazujú časy zdvojenia odpovedajúce niekoľkým hodinám. V prírode je bežné, najmä v kvetúcich (z angl. blooming) planktonických populáciách, že za deň dôjde k jednému, ale aj k viacerým zdvojeniam a delenie je výrazne ovplyvňované dennou periodicitou. Mnohé cyanobaktérie nevd'acia za svoj ekologický úspech rýchlemu rastu, ale svojej schopnosti rásť pomaly a nepretržite v podmienkach pre iné organizmy nepriaznivých [1].

Sinice sa bežne rozmnožujú delením, ale charakteristiky bunečného delenia, ktoré sa líšia, vytvárajú morfológickú mnohotvárnosť, ktorá nemá u prokaryotov obdobu (príloha 1). Je prekvapujúce, že hoci je táto morfológická všestrannosť tak vzácna v bakteriálnom svete, naše znalosti regulácie ich delenia a ich morfológické dopady na biochemickej a molekulárnej úrovni sú takmer nulové [1].

Jednobunkové a kolónie-tvoriace druhy vytvárajú všetky krycie štruktúry (cytoplazmatickú membránu, bunečnú stenu, vonkajšiu membránu aj slizové púzdro) vo vnútri materskej bunky, väčšinou v ekvatoriálnej polohe. Genetická schopnosť výberu medzi dvomi či tromi ortogonálnymi deliacimi rovinami umožňuje priestorové usporiadanie kolónií, ako u *Merismopedia* (planárne kolónie), či *Myxosarcina* (priestorové kolónie). Viacnásobné delenia

v prípade absencie bunečného rastu vedú k tvorbe množstva malých dcérskych buniek – baeocytov, ktoré sa následne uvoľňujú zo zvyškov materskej bunky [1].

Opakujúce sa delenie v jednej rovine bez úplného rozdelenia buniek má za následok vznik vláknitých foriem. V morfológicky zložitých vláknitých formách môžu byť vonkajšie povrchové vrstvy spojené v rámci trichómu a je pozorovaný vznik stien či priehradiek (septum) vsunutím plazmatickej membrány či bunečnej steny, napríklad u *Nostoc*. U vláknitých druhov z radu *Oscillatoriales* môže byť zahájený vznik viacerých povrchových vsunutí (budúcich stien) ešte pred delením bunky. Pomerne rozšírená zmena v rovine delenia u buniek pozdĺž trichómu môže viesť ku vzniku dvoch či viacerých radov buniek rastúcich vedľa seba a zmena v rovine delenia iba u jednej bunky, ktorá je udržiavaná po viacero delení, vedie k vzniku pravého vetvenia (*Stigonema*) [1].

O rozsahu morfologickej zložitosti cyanobaktérií jednoducho svedčí dosiahnutie multicelularity. Skupina tvoriaca heterocysty (*Nostocales* a *Stigonematales*) a niektoré *Oscillatoriales* na prvý pohľad nie sú len lineárne zhluky buniek, ale skutočne viacbunkové organizmy, o čom svedčia ich viaceré vlastnosti: nadbunečné štruktúrne prvky, jednotné behaviorálne odpovede na stimuly z vonkajšieho prostredia a prerozdelenie funkcií prostredníctvom bunečnej diferenciácie rôznym bunečným typom [1].

Medzi najvýznamnejšie diferenciované typy buniek patria hormogónie, heterocysty, akinéty, ale aj koncové vlasové vlákna (z angl. terminal hairs) či nekridické bunky [1].

Hormogónie sú krátke retiazky buniek (zvyčajne o dĺžke 5-25 buniek) vznikajúce z a opúšťajúce parentálny trichóm. Plnia rozmnožovaciu funkciu, nakoľko sa po oddelení usádzajú a vyvíjajú sa v samostatný vegetatívny organizmus [1].

Heterocysty sú morfológicky odlišné bunky, ktoré vznikajú ako reakcia na nedostatok viazaného dusíka v prostredí. Väčšinou sa jedná o bunky väčších rozmerov než sú bunky vegetatívne, s bledým sfarbením, silnejšou bunečnou stenou a s výrazne nižšou autofluorescenciou. Sú špecializované na fixáciu molekúl dusíka N<sub>2</sub> za aeróbnych podmienok, predstavujú riešenie problému inaktivácie nitrogenáz voľným kyslíkom u kyslík-produkujúcich organizmov. Zdroj redukcie pre tvorbu ATP je poskytovaný v podobe organického uhlíka okolitými vegetatívnymi bunkami, ktoré na oplátku získavajú viazaný dusík vo forme aminokyselín (najmä glutamínu) [1].

Akinéty sú nepohyblivé bunky väčších rozmerov oproti bunkám vegetatívnym, s hrubšou bunkovou stenou, prídavnými povrchovými vrstvami a veľkými zásobami dusíka v podobe cyanofycínových granúl. Na základe ich odolnosti voči rôznym faktorom prostredia sú považované za pokojové štádium cyanobakteriálnych buniek. V prirodzených planktonických populáciách dochádza k masívnej tvorbe akinét na konci rastovej sezóny a naopak ich klíčenie nastáva za podmienok vhodných pre vegetatívny rast [1].

Koncové vlasové vlákna sú mnohobunečné diferenciácie vyskytujúce sa na koncoch trichómov u niektorých zástupcov *Calothrix* a príbuzných siníc. Sú odpoveďou na nedostatok nutričov v prostredí (napr. fosforu), kedy sa koncové časti trichómov nevratne diferencujú do dlhých, tenkých radov bezfarebných, vakuolitých buniek (pripomínajúcich vlasy). V týchto miestach je masívne uprednostňovaná expresia povrchovo viazaných fosfatáz [1].

Nekridické bunky sa vyskytujú len u pravých mnohobunkových druhov. Tieto bunky cielene podstupujú apoptózu, eventuálne sa roztrhnú a úplne rozpadnú, alebo sa zachovávajú v podobe



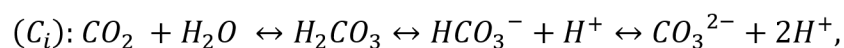
malých, izolovaných zakrpatených buniek a susedné bunky sa väčšinou premieňajú na bunky morfológicky odpovedajúce koncovým bunkám. Tvorenie nekridií môže viesť k rozdeleniu jedného trichómu na dva v rámci proliferácie, alebo v prípade tvorby hormogonií k odtrhnutiu od vegetatívnych buniek filamenta [1].

## 2.1.2 Metabolizmus a fyziológia

Cyanobaktérie sú fotoautotrofné, dusík fixujúce prokaryoty [53], charakteristické hlavne ich schopnosťou vykonávať oxygénnu fotosyntézu [54], hoci sa vyskytujú aj nefotosyntetizujúce druhy, vykazujúce obligátne endosymbiotické črty [55]. Okrem toho môžu niektoré druhy využívať aj sulfidy ako donory elektrónov počas anoxygéennej fotosyntézy [54] a sú známe aj druhy schopné fermentácie v bezkyslíkatých podmienkach či v tme [56, 57]. Sú považované za jedných z najdôležitejších producentov biomasy na Zemi, s neopomenuteľnou biogeochemickou funkciou cirkulácie prvkov [53, 58]. Momentálne sú široko skúmané ako modelové organizmy pre štúdium fotosyntetických dráh, sledovanie cirkadiálnych rytmov, fixácie dusíka, produkciu biopalív a sekundárnych metabolitov a taktiež stresových odpovedí na rôzne abiotické stresy [53], keďže obsahujú bunkovú organizáciu a metabolické systémy podobné baktériám a fotosyntetické systémy podobné eukaryotickým rastlinám [53, 59].

### 2.1.2.1 Metabolizmus uhlíka – Fotosyntéza a Calvin-Bensonov cyklus

Hoci niektoré cyanobakteriálne druhy sú schopné utilizovať cukry či iné uhľikaté zlúčeniny, oxid uhličitý je primárnym zdrojom uhlíka [57, 60]. Vo vodných prostrediach závisí dostupnosť oxidu uhličitého na pH a intenzitách difúzie, ktoré, mimo iných faktorov, ovplyvňujú rast [57, 61]. Rozpustené CO<sub>2</sub> sa navyše vyskytuje v rôznych anorganických formách podľa reakcie:



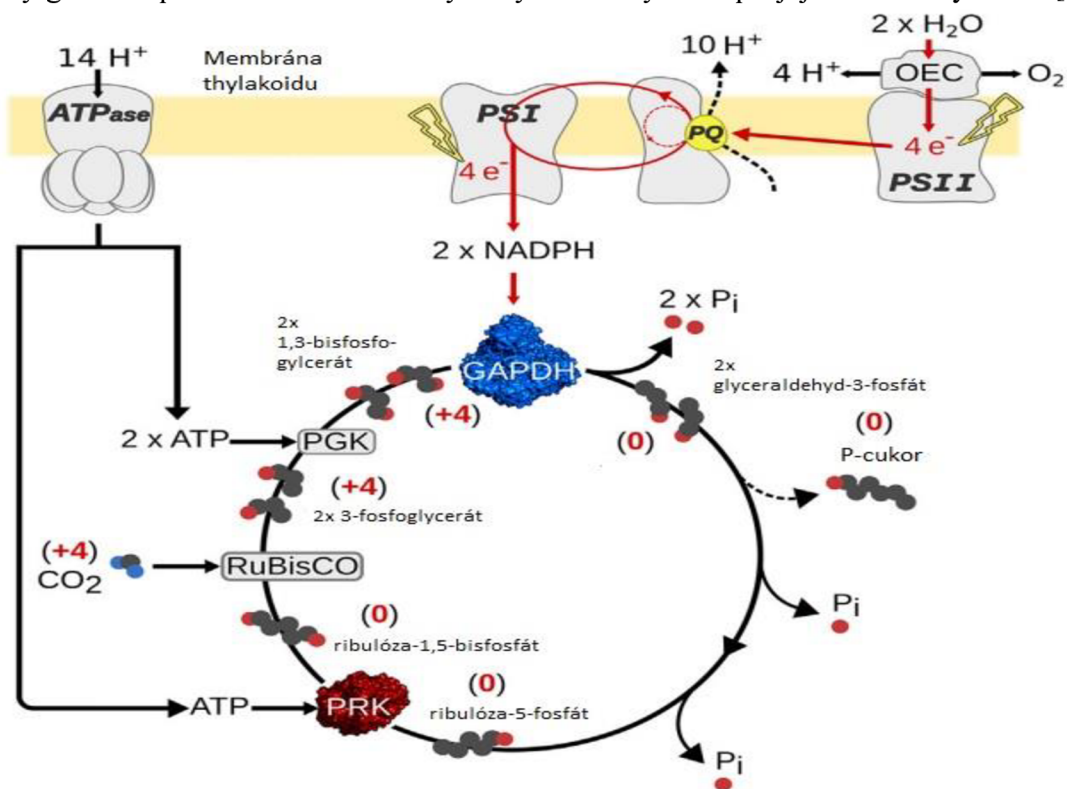
pričom rovnováha tejto reakcie je pH-dependentná. Vo forme plynného CO<sub>2</sub> sa vyskytuje v kyslých podmienkach, zatiaľ čo bikarbonát (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) pri neutrálnych a alkalických podmienkach, obe využiteľné sinicami [57, 62]. Pri utilizácii uhlíka je veľmi dôležitá rola CCM popísaná na príklade vyššie (koniec kapitoly 2.1.1.3).

Fotosyntéza prebieha v dvoch fázach: prvou je svetlom poháňaná premena slnečnej energie na energiu chemickú, ktorej výsledkom je vznik adenzintrijsófu (ATP) a nikotínamidadeníninkuleotid hydrogenfosfátu (NADPH), a druhou je Calvin-Bensonov cyklus, využívajúci vyprodukovanú chemickú energiu pre fixáciu oxidu uhličitého, ktorá vedie k tvorbe cukrov (obrázok 4) [29]. Svetlom poháňané reakcie využívajú štyri hlavné makromolekulové komplexy nachádzajúce sa v membráne thylakoidov – fotosystém II (PSII), cytochróm b<sub>6</sub>f, fotosystém I (PSI) a ATP syntázu [29].

Svetlo je u rastlín, zelených rias a organizmov obsahujúcich sekundárne plastidy zachytávané pomocou integrálnych membránových komplexov obsahujúcich naviazané chlorofyly, ktoré zachytávajú slnečnú energiu a prenášajú ju do fotosystémov. V siniciach túto funkciu plnia už spomínané fykobilizómy (kapitola 1.1.1.4), ktoré sa okrem nich vyskytujú len u glaukofytov a červených rias [29].

Proces začína excitáciou diméru PSII svetelnou excitáciou chlorofylov P680. Ten následne uvoľňuje elektrón, ktorý putuje reakčným centrom PSII a redukuje plastochinón (PQ).

Vzniknutý nedostatok elektrónov v P680 je dopĺňaný oxidáciou vody manganatým zhlukom (z angl. Cluster). Oxidácia vody vedie k uvoľňovaniu kyslíka a protónov do thylakoidného lumenu a prispieva k tvorbe protónového gradientu vznikajúceho na membráne thylakoidu. Elektróny z PQ-poolu sú následne prenášané na komplex cytochrómu  $b_6f$ , kde jeden z nich krúži v rámci podjednotky  $b_6$  a vracia sa do PQ-poolu. Druhý elektrón je zachytávaný rozpustným elektrónovým prenášačom  $c_6$  (alebo plastocyanínom) prostredníctvom Rieskeho železno-sírového proteínu a  $f$  podjednotky cytochrómu. Aktivitou PQ-poolu a cytochrómu  $b_6f$  vzniká ďalší protón vnikajúci do lumenu thylakoidu. Plastocyanín aj cytochróm  $c_6$  majú schopnosť prenášať jeden elektrón do PSI [29, 63]. Reakčné centrum PSI obsahuje špeciálny pár P700 excitovaný svetelnou energiou za vzniku elektrónu putujúceho k ferredoxínu, ktorý redukuje. U siníc sa vyskytuje odlišný PSI ako u rastlín – elektrónový deficit v P700 je cyanobaktérii dopĺňaný elektrónom z cytochrómu  $c_6$  [29, 64] a PSI je u nich tvorený trimérom, zatiaľ čo u iných organizmov je monomérny [29, 65]. Ferredoxín je následne oxidovaný katalýzou ferredoxín-NADP-reduktázy za uvoľňovania NADPH do cytozolu. Vzniknutý protónový gradient poháňa aktivitu ATP syntázy za tvorby ATP pri jej hlavici v cytozole [29].



Obrázok 4 – Schématické zobrazenie fotosyntézy – svetelnej fázy generujúcej NADPH a ATP, a Calvin-Bensonovho cyklu fixujúceho oxid uhličitý do organickej formy v podobe cukru. Červené čísla v zátvorkách vyjadrujú oxidačný stav uhlíka, zvyrazňujúci redoxnú povahu tohto komplexného cyklu. Skratky jednotlivých enzýmov sú uvedené v texte. Prebraté, upravené [66].

Oxygénne fototrofy využívajú Calvin-Bensonov cyklus na fixáciu oxidu uhličitého v „tmavej fáze“ fotosyntézy. Fotosyntéza je v zásade redukčný proces. Redukcia atómu uhlíka v  $CO_2$  (oxidačný stav +4) na atóm uhlíka v štruktúre cukru (priemerný oxidačný stav 0) vyžaduje štyri elektróny, ktoré sú dodávané z oxidácie dvoch molekúl vody v PSII [66]. V jednoduchosti teda oxygénna fotosyntéza prenáša elektróny z vody na uhlík prostredníctvom

svetlom poháňanej reakcie začínajúcej kyslík generujúcim komplexom v PSII a končí NAD(P)H-dependentnou glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázou (GAPDH) (celý proces je vyobrazený na obrázku 4). Tá  $\text{CO}_2$  neredukuje priamo, ale katalyzuje reakciu, ktorá dáva Calvin-Bensovomu cyklu jeho alternatívne názvy – fotosyntetický uhlík redukujúci cyklus či redukčný uhlík viazajúci cyklus, podmieňujúce redoxnú podstatu tejto metabolickej dráhy [66–68]. Pri naväzovaní molekuly oxidu uhličitého do molekuly cukru najprv RubisCO vytvára organickú kyselinu, ktorú GAPDH opäť zredukuje na cukor, čím vytvára podmienky pre obnovu substrátu pre RubisCO a generuje cukornaté fosfáty so zafixovaným uhlíkom. Reakcia RubisCO je exergonická, ale celý cyklus vyžaduje 3 molekuly ATP [66].

### 2.1.2.2 Metabolizmus dusíka

Cyanobaktérie dokážu využívať anorganické dusikaté zdroje, najmä vo forme dusičnanov a amónia. Mnohé druhy dokážu syntetizovať aj enzým nitrogenázu pre fixáciu molekuly dusíka  $\text{N}_2$ . Nezáleží na forme, v akej je dusík prijatý do bunky, vždy je premieňaný na amónium kvôli asimiláciám do metabolitov. Dusičnany vyžadujú prítomnosť nitrát a nitrit reductázy, aby mohli byť premenené na amónium, zatiaľ čo fixácia  $\text{N}_2$  je ešte energeticky náročnejšia, vyžadujúca prítomnosť oboch redukovaných kofaktorov a až 16 molekúl ATP pre vznik jednej molekuly amónia. Nitrogenázy navyše vyžadujú nízku hladinu kyslíka v bunke pre ich správne fungovanie, čo podmieňuje špeciálnu diferenciáciu. Niektoré vláknité druhy preto formujú heterocysty začlenené medzi vegetatívnymi bunkami, ktoré takéto vnútorné prostredie poskytujú. Alternatívou je fixácia  $\text{N}_2$  aj fotosyntetická generácia  $\text{O}_2$  v tej istej bunke, ale tieto procesy sú regulované cirkadiálnymi cyklami, teda fixácia dusíku prebieha výhradne v noci [62, 69]. Amónium je zároveň preferovaným zdrojom dusíku, potlačujúcim použitie iných foriem až do jeho vyčerpania v okolitom médiu, rovnako tak fixácia  $\text{N}_2$  a heterocystická diferenciácia prebiehajú len v neprítomnosti amónia či dusičnanov v okolí [62]. Sú známe dve cesty k viazaniu dusíka v podobe amónia – glutamín syntetáza/glutamát syntázový cyklus a priama asimilácia prostredníctvom reakcie katalyzovanej glutamát dehydrogenázou, obe vyžadujúce prítomnosť 2-oxoglutarátu, jedného z medziproduktov Krebsovho cyklu [62, 70].

Non-diazotrofné cyanobaktérie, vrátane *Synechocystis*, reagujú na nedostatok dusikátého zdroja zahájením procesu chlorózy [71, 72]. Tento adaptačný mechanizmus je charakterizovaný degradáciou fotosyntetických pigmentov, čo spôsobuje zmenu sfarbenia buniek z modrozelenej na žltú. Počas chlorózy sa bunky naposledy rozdelia a následne začína spomalený bunečný cyklus, v rámci ktorého degradujú väčšinu proteínov a fotosyntetický aparát, zanechávajúc iba reziduálnu fotosyntetickú aktivitu [72]. Navyše utlmujú svoj metabolizmus minimalizáciou energiu-vyžadujúcich reakcií, ako proteosyntéza a iné anabolické deje. Tieto molekulárne adaptácie spôsobujú nečinnosť buniek, ktorá im umožňuje prežiť v nepriaznivých podmienkach dlhý čas [72, 73]. Energia produkovaná reziduálnou fotosyntetickou aktivitou je dostatočná na prežitie buniek, ktoré nevyžadujú takmer žiadne ATP. Chlorotické bunky navyše rapídne akumulujú rezervné polyméry, ako sú glykogén a polyhydroxybutyrát [72–74].

Oba kmene používané v tejto práci, *Synechocystis* sp. PCC 6803 aj *Synechocystis salina* CICALA 192 sú non-diazotrofné, nedokážu viazať vzdušný molekulový dusík a sú preto odkázané na dusík viazaný v zlúčeninách minerálneho média [75, 76].

## 2.2 Polyhydroxyalkanoáty

V posledných dekádach prudko rástol záujem o výskum a aplikáciu polymérov z obnoviteľných zdrojov z dôvodu environmentálnych problémov a obmedzených zásob ropy ako suroviny pre výrobu petrochemických plastov [77].

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) predstavujú skupinu prirodzených biodegradabilných polymérov polyesterovej povahy, ktoré sú intracelulárne produkované a akumulované širokou skupinou mikroorganizmov za účelom ukladania energie a uhlíka [77, 78]. Biosyntéza PHA je stimulovaná nevyváženými rastovými podmienkami ako defenzívny mechanizmus mikróbov [79]. Príkladom je limitácia nutričov, dusíku či fosforu, za súčasného nadbytku uhlíka [80].

Monomérene jednotky sú tvorené esterami kyseliny hydroxyalkánovej prípadne jej derivátmi, medzi najbežnejšie sa vyskytujúce patria 3-hydroxybutyrát (3HB) alebo 3-hydroxyvalerát (3HV) [77]. V závislosti na počte uhlíkov tvoriacich tieto monoméry sa polyestery rozdeľujú na short-chain-length PHAs (scl, počet atómov uhlíka 3-5), medium-chain-length (mcl, 6-14 uhlíkov) a long-chain-length (lcl, 15 a viac atómov uhlíka). Najčastejšie sa vyskytujú polyméry prvej skupiny, kam patria poly(3-hydroxybutyrát) (PHB) a poly(3-hydroxyvalerát) (PHV) prípadne ich kopolymér. Je známych viac ako 150 druhov monomérov, čo z nich robí najrozmanitejšiu skupinu prírodných polymérov [77, 81].

### 2.2.1 Vlastnosti a aplikácie PHA

Z dôvodu ich biologického pôvodu (enzymatickej stereošpecifity) sú polyhydroxyalkanoáty striktne isotaktické, vyskytujú sa výlučne v R-konformácií chirálneho stereocentra v hlavnom reťazci [80]. Ich potenciál ako náhrady petrochemických plastov spočíva najmä v biodegradabilite [82]. Degradácia prebieha najmä za aeróbnych podmienok a dochádza k nej hlavne za predpokladu, že sú prítomné zdroje fosforu, dusíka, solí (iontov) a iných stopových prvkov, ale aj vhodnej teploty a vlhkosti pre daný mikroorganizmus [80]. Tieto podmienky sú väčšinou splnené v pôde či komposte, ale nie pri bežných aplikáciách, takže k biodegradabilite nedochádza pri denno-dennom využití. Rýchlosť rozkladu závisí hlavne na taktícite a monomérom zložení. Za aeróbnych podmienok dochádza k vzniku oxidu uhličitého a vody, v prípade anaeróbného rozkladu sa uvoľňuje metán, pričom všetky medziprodukty sú netoxické. Mikroorganizmy obsahujúce degradačný enzymatický aparát sú navyše široko rozšírené v našom okolí [80, 83, 84]. PHA vykazujú dobrú odolnosť voči ultrafialovému žiareniu, ale zlé voči pôsobeniu kyselín a zásad [85].

Z hľadiska izolácie, purifikácie a aplikácie je dôležitou vlastnosťou rozpustnosť. PHB je vo všeobecnosti považované za hydrofóbne a teda vo vode nerozpustné, táto vlastnosť však čiastočne závisí na morfológii a orientácii monomérmých jednotiek. U isotropných štruktúr môže prítomnosť nedokonalých minikryštalických štruktúr poskytnúť priestor pre čiastočnú absorpciu molekúl vody na karbonylové časti. Sorpcia organických rozpúšťadiel s väčšími molekulami (acetón) nie je závislá na morfológii PHB [82, 86]. Z praktického hľadiska sa pre extrakciu PHB používajú hlavne chloroform alebo dichlórmetán [82].

Polyhydroxyalkanoáty sú termoplastické a ich vlastnosti sa výrazne líšia v závislosti na chemickej štruktúre [85]. Mcl-PHA tvoria amorfné makromolekuly s klesajúcou teplotou skleneného prechodu s rastúcou dĺžkou bočného reťazca. Vlastnosti scl-PHA môžu byť vykreslené pomocou PHB, ktorý vykazuje vysoký stupeň kryštalinity (55-80 %) a tvorí kryštály s teplotou topenia okolo 175 °C [80]. Fyzikálne vlastnosti PHA dôležité pre komerčnú

aplikovateľnosť a ich porovnanie s najbežnejšie používanými polyolefínmi – polypropylénom (PP) a nízko-hustotným polyethylénom (LDPE) sú vyobrazené v nasledujúcej tabuľke.

*Tabuľka 1 – porovnanie vlastností PHA a polyolefínov, 20V = Poly(3-hydroxybutyrát-co-20mol% hydroxyvalerát); 6HA = Poly(3-hydroxybutyrát-co-6mol% HAs), HAs = 3% 3-hydroxydekanoát, 3% 3-hydroxydodekanoát, <1% 3-hydroxyoktanoát, 5-hydroxydodekanoát, prevzaté a upravené z [87].*

	PHB	20V	6HA	PP	LDPE
Teplota topenia [°C]	175	145	133	176	110
Teplota skleného prechodu [°C]	4	-1	-8	-10	-30
Kryštalinita [%]	60	-	-	50	50
Hustota [g·cm <sup>-3</sup> ]	1,25	-	-	0,91	0,92
Modul pružnosti v ťahu [GPa]	3,5	0,8	0,2	1,5	0,2
Modul pevnosti v ťahu [MPa]	0	20	17	38	10
Predĺženie pri pretrhnutí [%]	5	50	680	400	600

Z tabuľky 1 je zreteľné, že vlastnosti PHB sú pomerne podobné polypropylénu a vo väčšine parametrov dokonca prekonávajú polyetylén. Najnegatívnejšie pôsobí predĺženie pri pretrhnutí, ktoré súvisí s nízkou odolnosťou, neohybnosťou a drobnosťou. Tieto vlastnosti PHB sú spôsobené hlavne prítomnosťou veľkých kryštálov vo forme sferulitov vznikajúcich časom pri procese tzv. fyzikálneho starnutia (z angl. physical ageing). Na druhej strane jeho pevnosť a vysoký modul pružnosti v ťahu ponúkajú možnosť polymérnych modifikácií, ktoré by mohli jeho odolnosť a deformabilitu výrazne zlepšiť. Kopolyméry sa vlastnosťami oveľa viac približujú LDPE, ale ich dostupnosť a cena stále predstavujú prekážku z hľadiska ich konkurencie bežným polyolefínom [82]. Zvyšovanie obsahu HV umožňuje zlepšenie kontaktnej odolnosti a znižuje teplotu topenia, teplotu skleného prechodu, pevnosti v ťahu, kryštalinity a permeability vody [82, 88, 89]. Výsledky kopolymerizácie 3HB a 3HV sa však líšia, niektoré štúdie naznačujú, že tieto monomérene jednotky sú isodimorfne, z dôvodu ich podobnej veľkosti a tvaru sú jednotky 3HV inkorporované do P(3HB) kryštalickej mriežky [90, 91]. Z toho dôvodu vlastnosti kopolyméru nie sú výrazne lepšie od homopolyméru. Kopolyméry s optimálnejšími vlastnosťami môžu byť pripravené kopolymerizáciou s hydroxyalkánovými kyselinami s dlhšími reťazcami, ktoré tvoria separátnu kryštalickú mriežku, alebo nekryštalizujú vôbec, ako napríklad 3-hydroxyhexanoát (3HH) [82, 90].

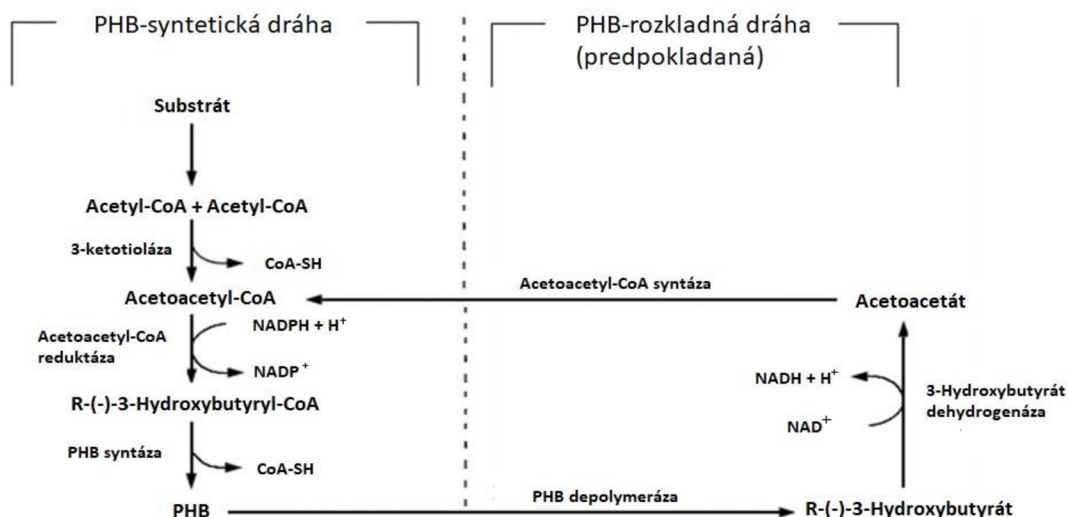
Ako u všetkých druhov bioplastov, použitie PHA je späté s ich environmentálnymi výhodami a charakteristickými vlastnosťami. Striktne isotaktická štruktúra fermentačnou metódou pripraveného PHB je nevýhodou pri jeho spracovaní. Používa sa na výrobu fliaš a nádob, ako aj podnosov, pohárov či tanierov. Tie môžu byť vhodne odbúrané vďaka ich biodegradabilite aeróbnou či anaeróbnou cestou. Ďalej sa v dnešnej dobe produkujú

flexibilné filmy, ktoré sa používajú v podobe odpadových sáčkov na kompostovateľný a iný organický odpad, čím znižujú náklady spojené s ich spracovaním. V potravinárstve našli využitie ako obalový materiál vďaka ich skvelým bariérovým vlastnostiam [80, 92]. Ich netoxičita a biokompatibilita otvára dvere pre široké biomedicínske uplatnenie, kde sa skúmajú pri aplikovanom kontrolovanom dlhodobom uvoľňovaní látok a tkanivovom inžinierstve [80].

### 2.2.2 Metabolizmus a bioprodukcia PHA

Polyhydroxyalkanoáty boli objavené ako sekundárne metabolity bakteriálnych buniek a ich biologická produkcia mikrobiálnou fermentáciou je v dnešnej dobe najvyužívanejšia a najvýznamnejšia. Okrem toho existuje aj možnosť chemickej syntézy PHB prostredníctvom polymerizácie butyrolaktónu, pri ktorej dochádza k roztvoreniu jeho heterocyklu. V posledných rokoch sa pracuje aj s geneticky upravenými rastlinami ako potenciálnymi producentmi, od industriálnej aplikácie má však táto technológia ešte pomerne ďaleko [82].

Za bakteriálnou produkciou PHA stoja desaťročia výskumov a vedeckej činnosti, ktoré odhalovali/odhaľujú základné princípy, mechanizmy a možnosti modifikácie týchto procesov. Prvým krokom biosyntézy je konverzia daného uhľikátého zdroja na acetát a následný vznik thioesterovej väzby medzi acetátom a kofaktorom – koenzýmom A, ktorý je univerzálnym prenášačom acylových skupín vyskytujúcim sa u všetkých PHA producentov. Spätnou kondenzáciou s ďalšou molekulou acetyl-CoA vzniká dimér acetoacetyl-CoA, ktorý je následne redukovaný na monoméru jednotku (R)-3-hydroxybutyryl-CoA. PHB vzniká polymerizáciou týchto monomérnych jednotiek, pričom si zachováva asymetrické centrum [82, 93]. Propagácia pokračuje viazaním ďalších monomérov na voľnú thiolovú skupinu aktívneho centra, nasledovaná ďalšou thioester-oxyster zameňujúcou reakciou za vzniku triméru atď. Hnacou silou tejto výmeny je vyššia väzobná energia oxysterovej skupiny v porovnaní s thiolovou, na základe ktorej je tento proces termodynamicky výhodný a spontánný. Syntéza teda pracuje ako iniciačný aj katalytický prvok procesu polymerizácie, ktorý pokračuje sériou inserčných reakcií [82]. Enzymatický aparát zodpovedný za reguláciu biosyntézy sa skladá z 3-ketotiolázy (PhbA), ktorej aktivitou vzniká acetoacetyl-CoA, acetoacetyl-CoA reduktázy (PhbB) generujúcej monomér za spotreby NADPH a polymerizačného enzýmu – v prípade PHB sa jedná o P(3-HB) syntázu (PhaC) (viď obrázok 5). Po ďalších krokoch je cyklus uzatváraný acetoacetyl-CoA syntetázou, zatiaľ čo zvyšný acetoacetyl-CoA je regenerovaný, priemieňaný na acetyl-CoA, ktorý je metabolizovaný v citrátovom cykle [80, 84, 94]. Ďalšie východiskové substráty môžu mať pôvod v  $\beta$ -oxidácií mastných kyselín, ktoré sú taktiež vhodné pre produkciu PHA. Táto dráha generuje rôzne hydroxyalkanoátové monoméry aktivitou (R)-enoyl-CoA hydratázy, acyl-CoA oxidázy a 3-ketoacyl-CoA reduktázy [95–97]. Jednoduché a finančne nenákladné, často odpadové substráty ako odpadné vody, aktivovaný kal, tuky živočíšneho pôvodu, uhl'ovodíky a podobne obsahujú široké spektrum uhľikátých zdrojov ako glukóza, sacharóza, laktóza atď. Tie môžu byť využívané na premenu (R)-hydroxyacylových medziproduktov z ich acyl prenášajúcej formy (z angl. Acyl Carrier Protein, ACP) na Co-A formu v prítomnosti acyl-ACP-CoA transacetylázy a následne môžu byť hydroxyalkanoátové monoméry polymerizované [97, 98].



Obrázok 5 – Dráha smerujúca k syntéze a degradácii PHB, prevzaté a upravené z [99].

Bolo dokázané, že PHB je akumulované širokým spektrom baktérií za podmienok nevyváženého rastu, keď dôjde k limitácii niektorého z esenciálnych zdrojov živín (amónium, sulfát, fosfát, magnézium či železo) a zároveň je k dispozícii nadbytok uhlíka. V prípade vyváženého rastu je hladina CoA relatívne vysoká, takže dochádza k inhibícii biosyntézy PHB a acetyl-CoA je metabolizovaný v Krebsovom cykle. V prípade limitácie živín bez nadbytku uhlíka nemôže dochádzať k proteosyntéze a nastáva zvyšovanie koncentrácie NADH. Ten inhibuje syntézu citrátu a acetyl-CoA nie je možné dostatočne rýchlo oxidovať a dochádza k jeho akumulácii. Hoci hodnota rovnovážnej konštanty spätnéj kondenzácie acetoacetyl-CoA nie je naklonená v prospech jeho vzniku, v nadbytku NADH a acetyl-CoA a nízkych koncentráciách CoA dochádza k biosyntéze PHB [82, 93].

Veľké množstvo bakteriálnych druhov produkuje polyhydroxyalkanoáty, najmä PHB, za rôznych podmienok a s rôznymi výťažkami. Syntéza kopolymérov, zložených najmä z kombinácie 3HA a 3HV, je už charakteristická pre nižšie spektrum mikroorganizmov a je ovplyvniteľná substrátovým zložením či prítomnosťou rôznych prekursorov [82]. Príkladom môže byť napríklad *C. necator*, ktorý pri kultivácii v prítomnosti cukrov, ethanolu či dokonca plynnej zmesi oxidu uhličitého a vodíka produkuje PHB [100]. Neskôr bolo zistené [101], že v prítomnosti propionátu či valerátu dochádza k inkorporácii HV jednotiek do polyméru v rozmedzí 0-47%, kvôli relatívne rýchlemu metabolizovaniu propionyl-CoA a acetyl-CoA [102, 103]. Vyššieho obsahu HV (0-95%) bolo dosiahnutého kombináciou kyseliny maslovej a valérovej a existuje aj možnosť priamej inkorporácie fermentáciou v prítomnosti monomérnych jednotiek, napríklad kyseliny 4-hydroxybutánovej či 3-hydroxypropionovej [82]. Okrem homopolyméru PHB sú technologicky zaujímavé najmä kopolyméry s 3- či 4-hydroxyvalerátom, z dôvodu nižšej kryštalinity a môžu byť produkované technológiami akceptovateľnými z ekonomického hľadiska [82]. Medzi najviac študovaných bakteriálnych producentov PHA patria *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes spp.*, *Azotobacter spp.*, *Bacillus spp.*, *Nocardia spp.*, *Pseudomonas spp.* či *Rhizobium spp.* [104].

### 2.2.3 Cyanobakteriálna produkcia PHA

Prvá zmienka o produkcii polyhydroxyalkanoátov pomocou siníc je z roku 1966, pozorovaná anglickým profesorom N. G. Carrom, ktorý pracoval s dusík-fixujúcou

cyanobaktériou *Chlorogloea fritschii* [105]. Vincenzi a De Phillippis v roku 1999 rozsiaholo zvedovali približne 90 cyanobaktériálnych druhov produkujúcich PHA prislúchajúcich k 4 fylogenetickým skupinám [106].

Sinice sú schopné bunečného rastu a produkcie PHA fotoautotrofne, heteroautotrofne aj mixotrofne. Hoci ich produktivita je v porovnaní s bakteriálnymi heterotrofmami výrazne nižšia, potenciál ich využitia spočíva v utilizácii oxidu uhličitého vznikajúceho pri priemyselnej výrobe a jeho premena do formy biodegradabilného plastu. S fotoautotrofnou či mixotrofnou produkciou sa zároveň prudko znižujú kultivačné náklady, nakoľko klesá cena uhlikatých substrátov. Na rozdiel od baktérií však geneticky nemodifikované druhy cyanobaktérií produkujú iba PHB, prípadne jeho kopolyméry s valerátom. Metabolický aparát zodpovedný za syntézu PHA sa vo svojej podstate nelíši od heteroautotrofných producentov, s výnimkami vo forme spracovania uhlikatého substrátu (oxidu uhličitého) procesom fotosyntézy [99].

Niekoľko cyanobaktériálnych kmeňov akumuluje PHA za autotrofných podmienok, ostatné vyžadujú suplementáciu acetátom či iným organickým uhlikatým zdrojom. Syntéza je stimulovaná nedostatkom jedného, prípadne oboch makronutrientov – fosforu a dusíku, čím dochádza k zvyšovaniu pomeru C:N či NADPH:ATP. Využíva sa preto tzv. dvojstupňovej kultivácie, kedy prvý krok (rastová fáza), ktorej cieľom je dosiahnuť maximálnu koncentráciu biomasy, prebieha za vyvážených podmienok. V druhom kroku (akumulačnej fáze) dochádza k nutričnej limitácii, čo stimuluje produkciu polyméru. Separácia buniek a kultivačného média po prvom kroku by však spôsobila bunkám stres v podobe nedostatku kyslíka či vplyvu strižných síl. Riešením býva nastavenie koncentrácie makronutrientu v médiu tak, aby došlo po istej dobe k jeho vyčerpaniu. Medzi rody, ktorým sa venuje najväčšia pozornosť z hľadiska produkcie týchto bioplastov patria napríklad *Arthrospira spp.*, *Aulosira spp.*, *Gloeotheca spp.*, *Nostoc spp.*, *Synechocystis spp.* či *Synechococcus spp.* [99].

Najväčšou prekážkou komerčnej priemyselnej výroby PHA pomocou siníc je neschopnosť konštrukcie ekonomicky realizovateľného masového kultivačného systému [99]. Rast cyanobaktériálnej kultúry je ovplyvňovaný najmä abiotickými faktormi – teplotou, koncentráciou živín, plynov, toxínov, pH či slanosťou, parametrami kultivácie, ako sú strižné sily pri miešaní, kultivačná hĺbka či riedenie. Do úvahy treba brať aj biotické faktory, teda prítomnosťou patogénov (baktérií, húb a vírusov) a konkurencieschopnosť voči iným siniciam či riasam [107]. V rámci priemyselnej produkcie by teda pripadali do úvahy dve kultivačné alternatívy – uzavreté fotobioreaktory či otvorené nádržové systémy [108]. Kultivácie v otvorených systémoch majú viacero prekážok, ako je nemožnosť presného monitoringu, ale hlavne regulácie dôležitých kultivačných parametrov (pH, teplota, miešanie či prístup svetla). Privádzaný oxid uhličitý má veľmi krátky čas zádrže, ktorého výsledkom je zlá rozpustnosť a veľké straty, a sezónne zmeny spôsobujú nemožnosť replikácie výsledkov. Dochádza k veľkému odparu vody a nemožnosť zabrániť kontaminácií znižuje výťažky prípadne spôsobuje úplnú stratu produkčného kmeňa [109–113]. Z uzavretých systémov existuje viac druhov fotobioreaktorov, napríklad trubkové reaktory, laminárne ploché reaktory, visiace vreckovité reaktory či tankové fermentory [109, 112]. Okrem poslednej možnosti môžu byť všetky druhy osvetľované prirodzeným svetlom. Hoci sú tieto systémy podstatne zložitejšie, ponúkajú oveľa lepšiu možnosť regulácie prebiehajúceho procesu a zároveň výrazne znižujú možnosť kontaminácie. Hlavnými problémami sú prístup svetla, prívod oxidu uhličitého, odvod



kyslíka vznikajúceho pri fotosyntéze a efektívne miešanie. Napriek všetkým výhodám v porovnaní s otvorenými systémami však najväčšou prekážkou zostáva neporovnateľne vyššia konštrukčná a procesná cena [109].

## 2.3 Glykogén

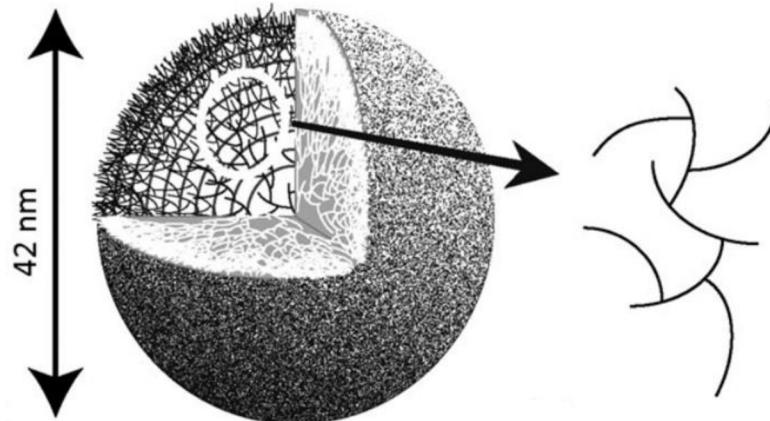
Živé bunky ukladajú uhľovodíky vo forme rôznych polymérnych a oligomérnych štruktúr, spomedzi ktorých najrozšírenejším je glykogén, nakoľko sa vyskytuje u archeí, baktérií aj eukaryotov [114]. Ide o formu akumulácie energie a uhlíka pre prípad, že sa bunka vyskytne v situácii, že nebudú prístupné z okolitého prostredia. Výhodou polysacharidov ako zásobných látok je fakt, že majú len veľmi nízky vplyv na osmotický tlak v bunkách vďaka ich molekulám o vysokej hmotnosti a iným fyzikálnym vlastnostiam. Hoci sú bakteriálny glykogén a glykogén vyskytujúci sa u cicavcov štruktúrne podobné, mechanizmus ich biosyntézy sa líši. Hlavným rozdielom je glukózový donor pri predĺžovaní primárneho glukánu [115].

### 2.3.1 Štruktúra glykogénu

Skladá sa z monomérnych jednotiek tvorených glukózou, navzájom pospájaných  $\alpha$ -1,4-glykosidickými väzbami do polymérneho reťazca, preto patrí medzi  $\alpha$ -1,4 glukány. Reťazce sú vetvené  $\alpha$ -1,6 väzbami, ktoré tvoria zhruba 7-10 % monomérnych prepojení a sú rovnomerne rozmiestnené v rámci molekuly glykogénu. Každý reťazec, s výnimkou vonkajších nevetvených reťazcov, podopiera ďalšie dva reťazce, čo umožňuje sférický rast častice za vzniku „poschodí“ (z angl. tier) (obrázok 6). Tie predstavujú kružnicový priestor medzi dvomi za sebou nasledujúcimi vetvami zo všetkých reťazcov nachádzajúcich sa v rovnakej vzdialenosti od centra častice glykogénu. Pri výskyte dvoch  $\alpha$ -1,6 vetvení na jeden glukánový polymérny reťazec tak dochádza k exponenciálnemu rastu hustoty reťazcov smerom od centra tejto častice ku periférii. Matematický model tak predpokladá maximálnu veľkosť glykogénovej častice 42 nm, skladajúcej sa z 55 000 glukózových jednotiek a 12 „poschodí“, nakoľko ďalšie vetvenie by zabránilo prístupu a interakcií enzýmov glykogénového metabolizmu [114]. Až 36 % týchto jednotiek sa nachádza vo vonkajšej nevetvenej vrstve, vďaka čomu sú jednoducho prístupné enzýmom a môžu byť katabolizované bez potrebného rozvetvovania [116]. *In vivo* sa teda tento polysacharid vyskytuje vo forme limitných častíc (makroglykogén) a taktiež menších granúl, predstavujúcich prechodné formy medzi biosyntézou a degradáciou (proglykogén) [116]. Glykogénové častice sú plne rozpustné vo vode a predstavujú tak formu existencie glukózy, ktorá vykazuje nižšiu osmotickú aktivitu a zároveň je plne prístupná pre rýchlu mobilizáciu enzýmami glykogénového katabolizmu [114].

Štúdie zaoberajúce sa lokalizáciou glykogénu v bunkách rôznych typov viedli k rozličným záverom, ktoré sú pravdepodobne spôsobené odlišnými technikami extrakcie (horúci hydroxid draselný, studená či horúca trikarboxylová kyselina, horúca kyselina sírová a studená či vrúca voda) používanými v odlišných laboratóriách. Napríklad u kvasiniek sú prítomné dva druhy glykogénu s mierne odlišnými funkciami. Jeden je vo vode nerozpustný, extrahovateľný kyselinami, ktorý sa nachádza na vonkajšej strane bunečnej membrány a druhý, vo vode rozpustný, extrahovateľný alkáliami, sa nachádza vo vnútri membrán. V tkanivách sa glykogén viaže s proteínmi (najmä enzýmami jeho metabolizmu) o hmotnosti 2-4 krát väčšou než je hmotnosť samotného polysacharidu adsorpčným mechanizmom [117]. Tento pár proteín-

glykogén tvorí samostatnú funkčnú jednotku a je považovaný za dynamickú nemembránovú organelu morfológicky podobnú ribozómu, ktorá sa nazýva glykozóm. Môžu byť voľne rozptýlené v cytozole či viazané na membrány endoplazmatického retikula či komponenty cytoskeletu [117].



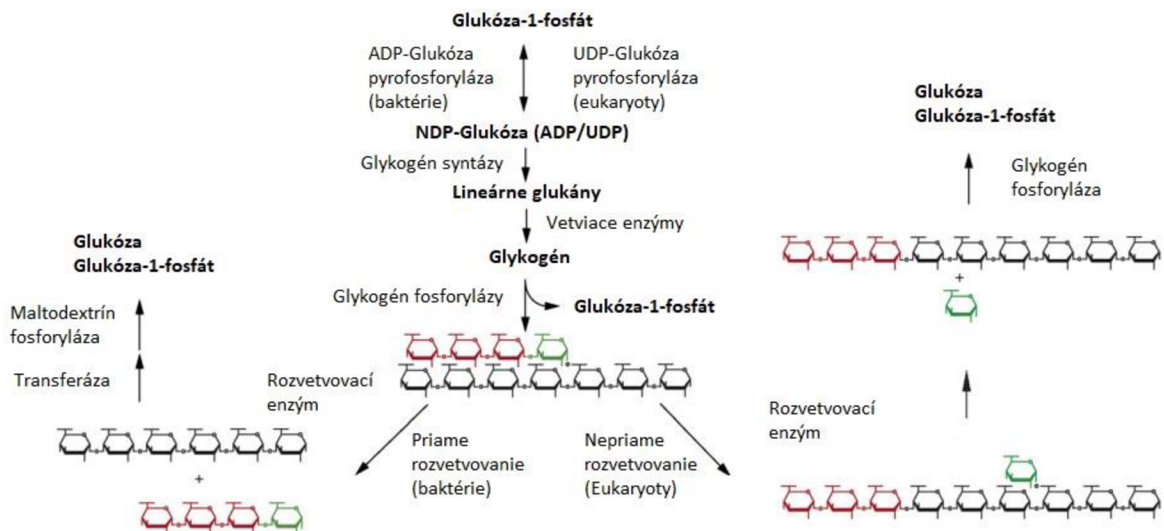
Obrázok 6 – Štruktúra makroglykogénu v maximálnej možnej veľkosti, kedy ešte môžu k poslednej vonkajšej nevetvenej vrstve pristupovať enzýmy. Z obrázka je viditeľné vetvenie pomocou  $\alpha$ -1,6-glykosidických väzieb, ako aj postupný nárast hustoty s rastúcim počtom „poschodí“. Prebraté z [114].

### 2.3.2 Metabolizmus glykogénu

V rámci glykogénu je glukóza metabolizovaná vďaka aktivácii vo forme nukleotid-cukru prostredníctvom NDP-glukóza pyrofosforylázy. Všetky známe eukaryoty s výnimkou *Archaeplastida*, syntetizujú glykogén z UDP-glukózy, zatiaľ čo všetky gram-negatívne glykogén akumulujúce baktérie (a teda aj cyanobaktérie) využívajú ADP-glukózu, ktorá je baktério-špecifickým metabolitom neobjaveným zatiaľ u žiadneho heterotrofného eukaryota (obrázok 7) [114]. Zatiaľ čo UDP-glukóza je využívaná všetkými živými bunkami na syntézu širokého spektra molekúl, ADP-glukóza je využívaná iba pre syntézu glykogénu, prípadne cyanobakteriálneho osmoprotektantu glukosylglycerolu [114, 118–120]. Aktivovaná glukóza je potom prenášaná k neredukujúcemu koncu rastúceho  $\alpha$ -1,4 viazaného reťazca a pripájaná pomocou glykogén syntázy. Vetvenie prebieha iným mechanizmom – rozštiepením vopred pripravenej  $\alpha$ -1,4 väzby a intra- alebo inter-molekulárneho transferu odtrhnutého reťazca do polohy  $\alpha$ -1,6 [114].

Vetvené polyméry podstupujú degradáciu prostredníctvom spolupráce glykogén fosforylázy a rozvetvovacieho enzýmu. Glykogén fosforyláza odtrháva jednotky glukózy z neredukujúceho konca a fosforyluje ich v prítomnosti orthofosfátu. Nedokáže však štiepiť  $\alpha$ -1,6 väzby a zastavuje štiepenie hlavného reťazca 4 jednotky glukózy od nasledujúceho vetvenia, ktoré sú následne odbúrané rozvetvovacími enzýmami [121, 122]. Mechanizmy účinku týchto rozvetvovacích enzýmov sa líšia u eukaryotov a prokaryotov. U eukaryotov sa vyskytuje tzv. nepriamy vetvy-štiepiaci systém, v rámci ktorého spolupracujú dve aktívne miesta bifunkčného enzýmu  $\alpha$ -1,4-glukanotransferázy a  $\alpha$ -1,6-glukozidázy. Transferáza najprv hydrolyzuje poslednú  $\alpha$ -1,4 pred novou vetvou a prenáša zvyšné tri glukózové zbytky v podobe maltotriózy a naviaže ich na ďalšie 4 zbytky iného reťazca. Fosforyláza potom opäť odštiepi tieto tri jednotky, zatiaľ čo druhé aktívne miesto štiepi  $\alpha$ -1,6 väzbu vetvenia a výsledkom celého

procesu sú jednotky glukózy a glukóza-1-fosfátu [114]. Proces odbúravania glykogénu u baktérií je podstatne jednoduchší, rozvetvovací enzým priamo štiepi  $\alpha$ -1,6 väzby za vzniku 4 jednotiek glukózy (maltotetraózy) [122]. Tá je následne degradovaná spoločnou aktivitou  $\alpha$ -1,4- glukanotransferázy a maltodextrín fosforylázy odlišnej od glykogén fosforylázy [114]. Transferáza opäť spája maltotetraózu a maltotriózu, čo umožňuje maltodextrín fosforyláze ďalšiu degradáciu. Tento priamy krok u baktérií zároveň naznačuje prepojenie metabolizmu glykogénu a metabolizmu malto-oligosacharidov, ktorý sa u eukaryotov nevyskytuje [114].



Obrázok 7 – Grafické zobrazenie metabolizmu glykogénu. Prebraté a upravené z [114].

### 2.3.3 Funkcie glykogénu

Glykogén sa vyskytuje u mnohých baktérií a k jeho akumulácii dochádza za podmienok prostredia, pri ktorých je obmedzený rast a delenie organizmu a zároveň je prístupný nadbytok uhlikatého zdroja [115, 120, 123, 124]. Bolo dokázané, že k tejto akumulácii dochádza v stacionárnej fáze rastového cyklu z dôvodu limitácie zdroja síry, dusíka či fosforu. Glykogén nie je esenciálny pre rast a mutanti bez génov kódujúcich enzýmy jeho metabolizmu môžu rásť rovnako ako prírodzene sa vyskytujúce druhy. Jeho funkciou je hlavne zachovávanie bunecnej integrity v prípade neprístupnosti uhlikatého zdroja, nakoľko baktérie majú energetické potreby aj v prípade, že nedochádza k rastu kultúry [120]. Pre príklad možno spomenúť udržiavanie pohyblivosti a intracelulárneho pH, chemotaktické odpovede, obrat proteínov a RNA a osmotickú reguláciu. V médiách postrádajúcich uhlikatý zdroj kultúry *Escherichia coli* a *Enterobacter aerogenes* obsahujúce glykogén nedegraduujú svoju RNA a proteínové štruktúry, zatiaľ čo v neprítomnosti glykogénu dochádza k uvoľňovaniu amoniaku z dusíkatých komponentov [124].

Ďalšia možná funkcia glykogénu je pozorovateľná u baktérií rodu *Clostridia*, ktoré dokážu akumulovať tento polysacharid až do obsahu 60% hmotnosti sušiny. U týchto prokaryotov dochádza pred vznikom spór k rýchlemu rozkladu glykogénu, u mutantov neschopných jeho syntézy je pozorovaná zlá schopnosť ich tvorby, čo naznačuje jeho úlohu ako zdroja uhlíka a energie pre diferenciáciu a maturáciu spór [125]. Hoci podobné štúdie naznačujú, že glykogén má dôležitú úlohu pri proliferácii baktérií, kontrastom sú napríklad bunky *Sarcina lutea* bohaté

na tento zásobný polymér, ktoré pri starvácií vo fosfátovom pufrí umierajú rýchlejšie než bunky bez glykogénu [126].

Za zmienku stojí aj rola glykogénového obratu ako ochrany proti substrátom-akcelerovanej bunecnej smrti a zlepšovaniu proliferácie buniek v stresových podmienkach. U *Sacharomyces cerevisiae* vystavenej stresovým podmienkam v glukózovom médiu dochádza k „recyklácií“ glykogénu namiesto indukcie jeho degradácie či akumulácie. Je dôležité spomenúť, že v stresových podmienkach je bunecný rast spomalený či pozastavený a dochádza teda k nerovnováhe ATP v hornej a dolnej časti glykolytického aparátu. Oxidácia glukózy v glykolýze spôsobí nadprodukciu ATP, glukóza-6-fosfátu, vyčerpanie fosfátových zásob a smrť bunky. Riešenie tejto situácie spočíva v stresom indukovanej transkripčnej aktivácii, a keďže enzýmy metabolizmu glykogénu sú regulované týmto spôsobom, dochádza k rovnakej miere expresie enzýmov syntézy aj degradácie a glykogénový obrat chráni bunku pred vyčerpaním fosfátových zásob. Tento „zbytočný“ cyklus navyše pomáha kvasinkám pri aklimatizácii na rôzne podmienky a je využívaný v pivovarníctve, kedy sú kvasinky cielene vystavované proliferačným podmienkam, pri ktorých dochádza k rozkladu glykogénu a syntéze sterolov a mastných kyselín. Glykogén je jediným zdrojom pre biosyntézu membránových komponentov a jeho obsah na začiatku fermentácie má priamy vplyv na vitalitu a metabolickú aktivitu kvasiniek [117].

U cyanobaktérií zastáva glykogén dôležitú úlohu z hľadiska prispôsobivosti organizmu a jeho prežitiu a rastu pri cykloch striedania dňa a noci [127]. Prechod medzi svetlom a tmou je sprevádzaný zmenami v cytoplazmatickom pH, redoxných potenciáloch, ako aj zmenami v intracelulárnych koncentráciách špecifických metabolitov či kovových iónov. Tieto faktory regulujú najmä zmeny medzi asimilačnými, fotosyntetickými dráhami a katabolickými dráhami v cyanobakteriálnych bunkách [128]. Mutanti neschopní syntézy glykogénu (s deléciou ADP-glukóza pyrofosforylázy či glykogén syntáz) vykazujú oveľa väčšiu senzitivitu k aklimatizácii na cykly svetlo-tma, čo dokazuje rolu glykogénu (ako aj rolu jeho metabolizmu) ako zásobnej látky aj protektantu voči tomuto druhu stresoru [129]. V tmavých podmienkach, keď fotosyntetická aktivita neprebíha, je energia a uhlík uložený v glykogéne využívaný na udržiavanie bunecného metabolizmu a integrity [127]. Inaktivácia syntézy glykogénu by teda mala vyústiť v genotyp neschopný rastu. To sa nepotvrdilo a predpokladá sa kompenzácia chýbajúceho glykogénu inými, jednoduchšími substrátmi, ako cukry, lipidy či chlorofyly ako endogénnych minoritných respiračných substrátov. Znížená viabilita a znížená respiračná spotreba kyslíka však naznačujú, že glykogén je hlavným respiračným substrátom u cyanobaktérií. Navyše bolo dokázané, že metabolizmus glykogénu pomáha siniciam chrániť sa pred nepriaznivými podmienkami prostredia a limitáciami makronutrientov. Fenotypy mutantov neschopných syntézy glykogénu v médiu s deficienciou dusíka sa vyznačovali zníženou tvorbou kyslíka, senzitivitou na glukózu, neblednúcim (z angl. non-bleaching) fenotypom a „preplnením“ (z angl. overflow) pyruvátom a 2-oxoglutarátom. Všetky tieto odchýlky sa objavovali výlučne za svetla, kedy je žiadaná syntéza glykogénu a bunka registruje významné uhlikaté toky [129]. Znížená tvorba kyslíka súvisí so zníženou fotosyntetickou aktivitou, tento jav bol popísaný u mnohých fotosyntetických producentov neobsahujúcich polyglukány a jeho presná príčina zatiaľ nebola identifikovaná. Preplnenie uhlikatými metabolitmi je spôsobené tým, že nadbytočná energia a uhlík nemôžu byť ukladané do formy

glykogénu, na čo bunka reaguje tým, že ich vylučuje von. Tento jav je tiež známy a nazýva sa „energy spilling“. Množstvo uhlíka vylúčeného z bunky odpovedalo 30-60 % uhlíka, ktorý by bol uložený vo forme glykogénu a poukazuje na jeho rolu ako bunecného nástroja pre udržiavanie bunecnej a energetickej homeostázy. Senzitivita na glukózu súvisí s tzv. fotomixotrofnou senzitivitou, kedy pri súčasnej asimilácii glukózy aj oxidu uhličitého naraz pracujú v podstate protichodné dráhy – glykolýza aj glukoneogenéza, ako aj Calvinov cyklus a oxidatívny pentózový cyklus. To výrazne zvyšuje rast *Synechocystis*, u mutantov neschopných syntézy glykogénu však nastáva opačný efekt, kedy bunky strácajú viabilitu. Tento jav je taktiež známy u iných metabolických delécií, predpokladá sa, že spracovávaná glukóza narúša uhlíkový metabolický tok a rovnováhu, ale presný mechanizmus nepoznáme. Pozorovaný neblednúci fenotyp súvisí s neschopnosťou mutantov deliť sa a podstupovať stav chlorózy, teda degradovať fykobilizómy. Dokonca ani po 7 dňoch limitácie dusíka nedošlo k zmene sfarbenia kultúry zo zelenej na hnedo-žltú [129]. Zaujímavé ale je, že zatiaľ čo u „wild-type“ kultúry došlo po dusíkovej limitácii za nasledujúcich 24 hodín k ďalšiemu zdvojeniu, u mutantných buniek došlo k okamžitému zastaveniu rastu. To indikuje rolu degradácie fykobilizómov ako zdroja dusíka v prípade limitácie tohto makronutrientu. Spôsob regulácie chlorózy ako odpovede na nutričný stres prostredníctvom biosyntézy glykogénu však taktiež zatiaľ nie je vysvetlený [130]. Všetky tieto zmeny poukazujú na komplexnú rolu tohto polyglukánu v bakteriálnom metabolizme, ktorá stále zostáva neúplne pochopená.

#### **2.4 Vzťah medzi glykogénom a polyhydroxyalkanoátmi**

Vzájomná syntéza oboch uhlikatých polymérov, glykogénu aj polyhydroxyalkanoátov, u *Synechocystis* a niektorých iných cyanobaktérií je výnimkou pravidla, že každý druh tvorí iba jeden typ zásobného polyméru [129]. S metabolizmom glykogénu je spojená celá rada dejov a regulácií v cyanobakteriálnych bunkách, na druhú stranu úloha biosyntézy PHB je stále nedostatočne preskúmaná [75]. Skúmanie ich vzájomného vzťahu je najčastejšie spojené s prácou s mutantnými kmeňmi s modifikáciami v enzymatickom aparáte týchto polymérov.

V súvislosti s nutričnými limitáciami je nutné spomenúť fakt, že mutanti tohto druhu s narušenou PHB biosyntetickou dráhou (konkrétne *ΔphaAB*, kódujúcich β-ketothiolázu a acetoacetyl-CoA reduktázu) podstupujú pri nedostatku dusíka rovnaké fyziologické zmeny ako „wild-type“. V rámci chlorózy u nich teda dochádza k degradácii fykobilizómov a ich viabilita je len mierne znížená [129, 131]. Naproti tomu bunky neschopné syntézy glykogénu tieto zmeny nepodstupujú, sú neschopné chlorózy a bunecného delenia a po pár dňoch strácajú viabilitu. Tieto dáta naznačujú, že u tohto druhu má glykogén a jeho syntéza dôležitejšiu úlohu z hľadiska metabolických zmien v rámci aklimatizačných odpovedí a prežitia organizmu, než PHB [129].

Jeho esenciálnu rolu pri regenerácii vegetatívnej bunky z bunky chlorotickej popisuje aj Doello a kolektív, ktorí skúmali rolu jednotlivých uhlíkových katabolických dráh pri tejto premene u *Synechocystis sp.* PCC 6803. Po prídavku dusičnanu k chlorotickým bunkám začína prechod z dormantného metabolizmu charakterizovaného reziduálnou fotosyntézou a nízkou hladinou ATP do heterotrofnej fáze, pri ktorej dochádza k respiračnému rozkladu glykogénu a prudkému zvýšeniu koncentrácie ATP. To dodá bunkám prvotný impulz k reštartu fixácie oxidu uhličitého a pomalom zapojení fotosyntézy, čím začína mixotrofná fáza regenerácie, za stálej spotreby glykogénu. V rámci nej poskytuje spoločná aktivita Pentózofosfátového cyklu

a Entner-Doudoroffovej dráhy metabolické medzi produkty potrebné k anabolickým reakciám obnovujúcim konštitúciu vegetatívnych buniek [72].

Stal a kolektív skúmali rolu oboch zásobných látok u morského druhu *Oscillatoria limosa* [132]. V rámci akumulácie pozorovali známy fakt, že obsah PHA sa zvyšoval v neskoršej exponenciálnej fáze rastu a maximum dosiahol vo fáze stacionárnej. Po presunutí kultúry do média s deficienciou uhlíka dochádzalo k rýchlej degradácii polyesterových zásob, ktorá ale nebola pozorovaná u kultúry bez svetelného zdroja, s prístupom ani bez prístupu kyslíka. Naproti tomu hladina glykogénu u kultivácie bez iluminácie výrazne klesala aktivitou Pentóza fosfátového cyklu a energia v ňom uložená bola teda využívaná na bunčné metabolické deje [132, 133]. K rovnakým záverom prišli aj pri kultivácii *Gloeotheca sp.* PCC 6909 bohatej na PHA, ktorá nezačala polymér po prerušení osvetlenia degradovať [134]. Tieto zistenia naznačujú, že v prípade neprebiehajúcej fotosyntézy cyanobaktérie využívajú glykogén ako primárny energetický zdroj, zatiaľ čo PHA plnia skôr funkciu uhlíkatého zdroja [133]. Úloha PHA ako regulátorov vnútrobunčného redučného náboja u fotoautotrofov, tzv. pseudofermentácia, bola skúmaná De Philippisom a kolegami v roku 1992. Ten taktiež prichádza k obdobnému záveru o role jednotlivých biopolymérov u druhov *Spirulina maxima* a *Rhodospseudomonas palustris*. Načrtáva, že na základe nízkej aktivity enzýmov glyoxalátového skoku, ktoré sú zodpovedné za dokončenie Calvinovho cyklu u siníc a teda vznik acetyl-CoA a generovanie energie, bude úloha PHA u fotoautotrofov spočívať skôr v generovaní/spotrebovaní redukovaných pyridinových nukleotidov, teda v regulácii redukčnej sily a udržiavaní intracelulárnej redoxnej rovnováhy [135].

#### **2.4.1 Narušenie glykogénovej biosynthetickej/biodegradačnej dráhy**

Na základe predpokladu konkurencie medzi PHA a glykogénom vo využívaní vnútrobunčných zásob uhlíka sa skúmali rôzne geneticky upravené kmene a pozoroval sa vplyv týchto manipulácií na akumuláciu polymérov. Wu a kolektív skúmali mutanta s deletovaným *agp* génom (gén kódujúci ADP-glukóza pyrofosforylázu) za limitácie fosforom. Tento mutant dosiahol 21% nárast biomasy pri suplementácii acetátom a 24% pri prídavku glukózy, fotoautotrofná kultivácia vyústila v približne rovnakú koncentráciu buniek. Vykazovali o 20-25 % zvýšenú produkciu kyslíka, čo naznačuje zvýšenú mieru fotosyntézy, pravdepodobne z dôvodu kompenzácie neprítomnosti glykogénu ako zásobnej látky, čoho dôsledkom bol nadbytok uhlíka a energie, ktorý vyústil do syntézy bunčných kompartmentov a bunčného rastu. Hladina polyhydroxybutyrátu stúpla pri fotoautotrofnom raste o približne 12% CDW (z angl. Cell Dry Weight – percento v sušine) na celkových 14% oproti druhu bez mutácie. U mixotrofnej kultivácie v prítomnosti 15 mM acetátu bolo pozorované zvýšenie koncentrácie približne o 9%, na celkovo 19% CDW, o približne 3% u mixotrofnej kultivácie s 5 mM glukózy v médiu a o približne 5,5% CDW u kombinácie týchto dvoch uhlíkatých substrátov. U buniek s deletovaným génom teda došlo k dosiahnutiu vyššej koncentrácie PHB vo všetkých kultiváciách, nárast však nebol lineárny vzhľadom k rozdielu hladiny glykogénu medzi mutantom a prirodzeným druhom. To naznačuje, že nie všetka energia a uhlík, ktoré mali byť využité pre syntézu glykogénu boli využité pre syntézu PHB [136]. Dutt a Srivastava tento jav neskôr odôvodnili a presne popísali prostredníctvom izotopového značenia so záverom, že približne 74 % uhlíka uloženého v PHB pochádza z glykogénu [137]. Ako reakcia na dusikátú limitáciu, je veľké množstvo viazaného uhlíka uložené u rodu *Synechocystis* v podobe

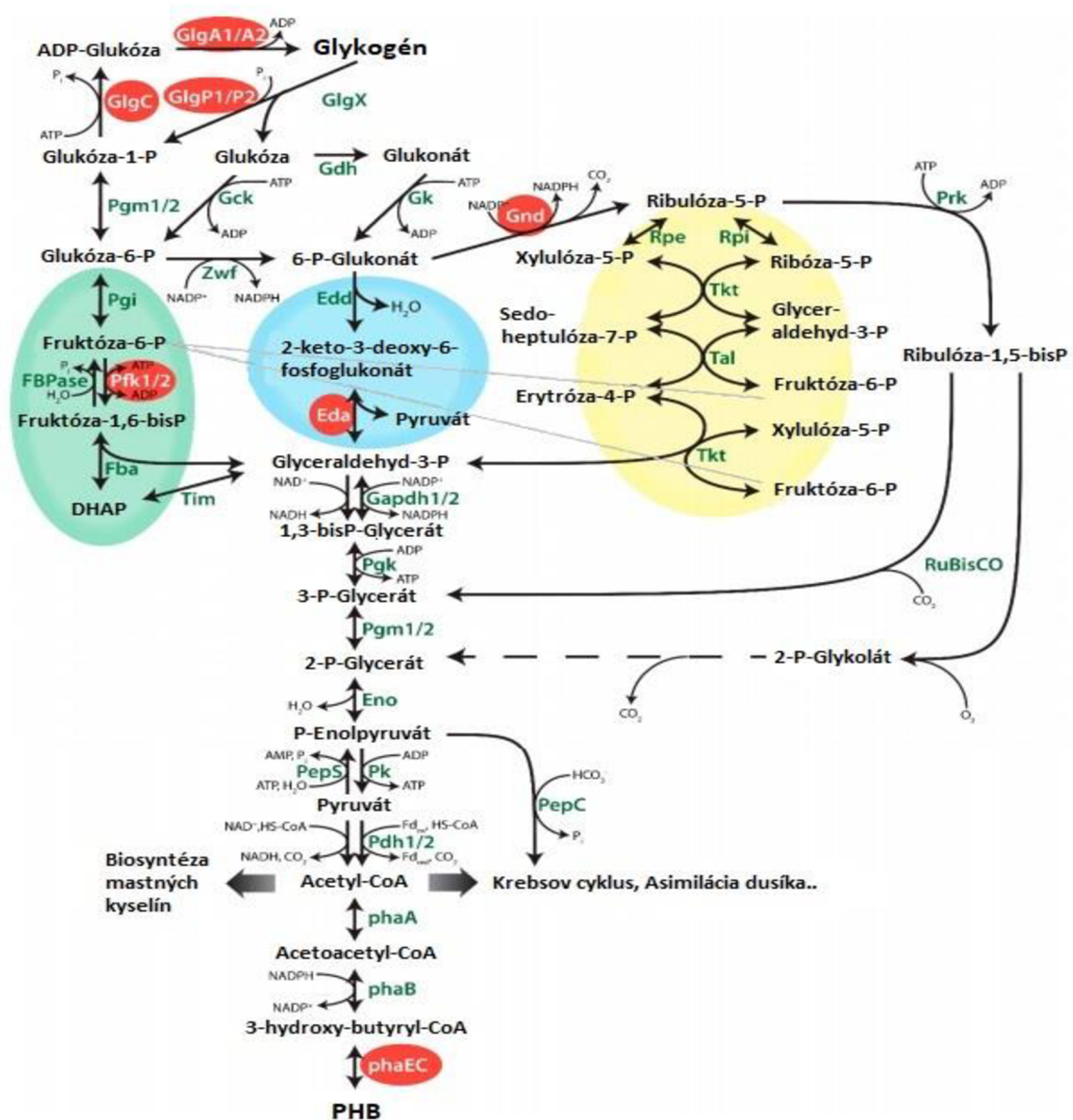
glykogénových granúl. Takéto dlhodobé experimenty zároveň ukázali, že zatiaľ čo bunky sú v stave chlorózy, glykogén po pôvodnej rýchlej akumulácii pomaly degraduje, ale koncentrácia PHB pomaly, ale konštantne rastie [138, 139]. Na overenie teórie, že PHB je syntetizované premenou z glykogénu, Koch a kolektív skúmali produkciu PHB u rôznych mutantov, u ktorých boli prerušené rôzne metabolické kroky [138]. Jednotlivé experimenty sú popísané v nižšie.

Pre tieto experimenty pracovali s kultúrami limitovanými dusíkom a bez génov pre jednu z dvoch isoforiem glykogénsyntázy, *glgA1* a *glgA2*, a bez génov pre glukóza-1-fosfát adenyltransferázu, *glgC*, po dobu 3 týždňov [138]. U *glgA1* došlo k viditeľnému poškodeniu v priebehu procesu chlorózy a bunky sa nedokázali po 2 týždňoch limitácie zviabilizovať. U „wild type“ (ďalej len WT) dosiahol glykogén koncentračné maximum po týždni a následne jeho hladina pomaly klesala. U oboch mutantov bola pozorovaná rovnaká hladina glykogénu ako u WT, ale táto hladina zostala vysoká aj v nasledujúcich týždňoch pri akumulácii PHB. U *glgA2* akumulácia PHB prvých 7 dní taktiež odpovedala WT, ale následne spomalila, zatiaľ čo u *glgA1* bola dráha trvalo poškodená. Z toho sa dá vyvodiť, že *GlgA1* hrá oveľa dôležitejšiu rolu z hľadiska aklimatizácie na N-deficienciu, viabilitu, a teda aj obsah PHB, hoci produkujú takmer rovnakú koncentráciu glykogénu. To by sa dalo vysvetliť tým, že malé rozdiely v glykogéne produkovanom týmito dvoma izoenzymami pravdepodobne ústia v ich rôzne metabolické úlohy [138]. Tieto štrukturálne rozdiely v dĺžke a vetvení reťazca glykogénu produkovaného izoenzymami boli už popísané Yoo a kolektívom [140]. *GlgC* mutant sa nedokáže dostatočne prispôsobiť dusíkovej limitácii, vykazuje nízku viabilitu, nedokáže syntetizovať glykogén a akumuluje málo PHB, čo sa zdá, odporuje teórii, že PHB je derivované z glykogénu. Vyzerá to teda tak, že za určitých podmienok sa môžu uhľikové prekurzory PHB vyhnúť glykogénovému poolu. V prípade vyradenia *glgC* nemôže byť glukóza-1-P (prípadne glu-6-P) premieňaná na ADP-glukózu a akumuluje sa. Ďalším krokom je teda jej premena na glycerinaldehyd-3-P a postupná modifikácia na monomér a polymerizácia do PHB [138].

Ak by glykogénový obrat vyústil v akumuláciu PHB počas chlorózy, syntéza PHB by nemala prebiehať, ak je porušená degradabilita glykogénu [138]. Glykogén je degradovaný (podobne ako syntetizovaný) dvoma fosforylázami, izoenzymami kódovanými *glgP1* a *glgP2*. Doello a kolektív prišli k záveru, že *glgP2* kódovaná fosforyláza je hlavným enzýmom zodpovedným za degradáciu glykogénu pri zotavovaní sa z chlorózy a vyradenie *glgP1* nijako neovplyvňuje túto schopnosť [72]. V priebehu troch týždňov mutant *glgP1* dosiahol najprv vyššiu koncentráciu glykogénu ako WT, ale jeho hladina následne aj výraznejšie klesla. U mutantu *glgP2* a dvojitého mutantu *glgP1/2* nedošlo k jeho degradácii, čo potvrdzuje teóriu Doello a kolektív. To sa prejavilo aj na schopnosti akumulovať PHB, zatiaľ čo mutant *glgP1* produkoval obdobnú koncentráciu ako WT, *glgP2* a dvojité mutant tvorili výrazne menej polyméru, čo opäť potvrdzuje spojitosť s nedostatočnou degradáciou v dôsledku delécie *glgP2*. To bolo potvrdené aj fluorescenčnou mikroskopiou, kedy tieto dva mutanty obsahovali veľmi malé, ak vôbec nejaké granule PHB [138]. To demonštruje, že *GlgP2* fosforyláza je kľúčová z hľadiska degradácie glykogénu a syntézy PHB.

Predchádzajúce experimenty odhalili a potvrdili teórie, že aktivita enzýmov zapojených do syntézy a degradácie glykogénu má veľký vplyv na koncentráciu PHB a že glykogénový obrat aktivitou *GlgP2* fosforylázy dodáva uhľikaté prekurzory pre jeho biosyntézu. Pre pochopenie metabolizmu molekúl glukóza-fosfátov smerujúcich k tvorbe PHB boli študovaní mutanti troch

najdôležitejších glykolytických dráh. Prvým bol mutant *Δeda*, neschopný katalyzovať cez Entner-Doudoroffovu (ED) metabolickú dráhu, *Δgnd* cez Pentózofosfátový cyklus (PC) a *Δpfk1*, *Δpfk2* a *Δpfk1/2* s deletovanou fosfofruktokinázou 1,2, alebo oboch zároveň. To znefunkčnilo aktivitu Embden-Meyerhof-Parnasovej (EMP) dráhy [138]. Pre grafické znázornenie vid' obrázok 8.



Obrázok 8 - Grafické vyobrazenie metabolizmu prekursorov PHB u *Synechocystis*, s červeným označením mutovaných/deletovaných génov rámci experimentov a vyobrazením EMP zelenou, ED modrou a OPP žltou farbou. Prevzaté, upravené z [138].

Opäť boli sledované hladiny glykogénu a PHB v rámci troch týždňov dusíkovej deficiencie. Narušením ED dráhy bol mutant PHB-fenotypicky nezmenený oproti WT a obsah glykogénu zostal vysoký počas celého experimentu, zatiaľ čo u WT došlo po 7 dňoch k postupnému poklesu. U mutantu so zmenou v PC došlo k výrazne nižšej akumulácii polyesteru v prvých desiatich dňoch, po ktorých nasledovala stagnácia a mierny pokles, zatiaľ čo hladina glykogénu približne odpovedala WT. U mutantu *Δpfk1/2* bol pozorovaný opačný jav, kedy prvotná nižšia



syntéza PHB bola neskôr vystriedaná zvýšením a dosiahnutím koncentrácie ako u mutanta PC. U jednotlivých mutantov fosfofruktokinázy bola výsledná koncentrácia PHB mierne menšia (80%) ako u WT, čo naznačuje schopnosť isoenzymov navzájom dopĺňať svoju aktivitu, zatiaľ čo dvojitý mutant PHB neakumuloval vôbec. Všetky 3 modifikácie fosfofruktokinázy dosiahli mierne vyšších koncentrácií glykogénu, ako WT. Z toho vyplýva, že dráhy PC a EMP prispievajú k tvorbe PHB, zatiaľ čo ED metabolická dráha nie [138].

#### 2.4.2 Narušenie biosyntetickej dráhy PHB

Pre tento posledný experiment skupina Koch a kolektív pracovala s mutantom *ΔphaEC* teoreticky neschopným syntézy PHB. Tento mutant v porovnaní s WT akumuloval výrazne viac glykogénu, ale zároveň ho rýchlejšie degradoval, takže výsledná hladina glykogénu po 21 dňoch bola takmer rovnaká. PHB podľa očakávania nesyntetizoval, v absencii tejto dráhy by sa mohli bunky metabolitov degradácie glykogénu zbavovať prebytkovými reakciami (z angl. overflow reactions). Každopádne to naznačuje, že glykogén a PHB nesúperia o oxid uhličitý ako zdroj uhlíka, ale glykogén je metabolicky nadradený PHB [138].

Z týchto pokusov boli mimo už spomenuté fakty teda vyvedené viaceré dôležité závery. Bolo pozorované, že pomalšia/chýbajúca degradácia glykogénu je často spojená s následnou nízkou/chýbajúcou syntézou PHB, čo podporuje načrtnutú teóriu, že PHB vzniká len ak dochádza k degradácii glykogénu počas chlorózy [138]. U mutantov s chýbajúcimi oboma fosforylázami či oboma fosfofruktokinázami, teda u narušenej schopnosti degradácie, dokonca dochádzalo k zvyšovaniu koncentrácie glykogénu aj v stave chlorózy, čo pri funkčnej depolymerizácii pravdepodobne nie je viditeľné. Tento zbytkový metabolizmus je pravdepodobne dôležitý pre opravu životne dôležitých makromolekúl – proteínov, nukleových kyselín, pre osmoreguláciu a pre prípravu pre možnú zmenu koncentrácie živín v prostredí. Aj „vyhladované“ bunky potrebujú neustály príjem ATP a redukčných ekvivalentov a schopnosť vytvárať bunčné kompartmenty. V súlade s týmto bola pozorovaná produkcia PHB hlavne prostredníctvom EMP dráhy, ktorá má najväčší výťažok ATP, aj prostredníctvom PC, ktorá dodáva prekursor pre biosyntetické deje ako je oprava biomolekúl. V kontraste s tým, mutácia ED dráhy, ktorá má menší výťažok ATP než EMP a je metabolicky najbližšia fotosyntéze a Calvin-Bensonovmu cyklu, neovplyvnila syntézu polyesteru. Zároveň bola v čase pozorovaná produkcia PHB u PC mutanta, ktorá následne prestala a simultánne u druhej kultivácie mutanta EMP v tom istom časovom úseku syntéza začala, čo naznačuje následnosť týchto dvoch dráh počas dusíkom vyvolanej chlorózy [138].

Získavanie ďalších poznatkov o intracelulárnych uhlíkových tokoch môže priniesť nové informácie o regulácii produkcie PHB a tým umožniť presmerovanie väčšieho množstva uhlíku uloženého v glykogené do akumulácie tohto polyesteru u cyanobaktérií, čím by došlo k ich zefektívneniu a zatraktívneniu ako potenciálnych priemyselných producentov [138].

## 3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 3.1 Použité organizmy, chemikálie a prístroje

#### 3.1.1 Použité organizmy

V rámci tejto diplomovej práce boli použité a analyzované dva cyanobakteriálne kmene – *Synechocystis* sp. PCC 6803 a *Synechocystis salina* CCALA 192. Oba tieto kmene pochádzajú od partnerskej výskumnej skupiny pod vedením Ass. Prof. Ines Fritz, PhD. Pôsobiacou v University of Natural Resources and Life Sciences (Universität für Bodenkultur – BOKU, Wien), Vienna, Institute of Environmental Biotechnology, Tulln an der Donau, Rakúsko.

#### 3.1.2 Použité chemikálie

Acetát sodný, Lach-Ner, s. r. o.

Amyloglukozidáza, Megazyme

Acetonitril, Sigma-Aldrich s. r. o.

Dusičnan sodný, Sigma-Aldrich s. r. o.

Dusičnan železitý nonahydrát, Lach-Ner s. r. o.

Etanol absolut., Sigma-Aldrich s. r. o.

Hexakynoželeznatán draselný trihydrát, Sigma-Aldrich s. r. o.

Hydrogenfosforečnan draselný, Sigma-Aldrich s. r. o.

Hydroxid draselný, Lach-Ner s. r. o.

Chlorid vápenatý dihydrát, LACHEMA a.s.

Chloroform, Sigma-Aldrich s. r. o.

Glykogén, štandard z ustríc (čistota  $\geq 0,75$ ), Sigma-Aldrich s. r. o.

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

Kyselina octová, Lach-Ner, s. r. o.

Kyselina sírová, Sigma-Aldrich s. r. o.

Kyselina benzoová, Sigma-Aldrich s. r. o.

Lyzozým, zo slepačích bielok, SERVA

Metanol, Sigma-Aldrich s. r. o.

Uhlíčan sodný, Lach-Ner s. r. o.

Síran horečnatý heptahydrát, Sigma-Aldrich s. r. o.

Síran zinočnatý heptahydrát, Sigma-Aldrich s. r. o.

$\gamma$ -butyrolaktón, Sigma-Aldrich s. r. o.

Zmes stopových prvkov (TES, z angl. Trace Elements Solution), dodávaná z BOKU, Tulln an der Donau, Rakúsko, presné zloženie je uvedené v kapitole 2.2.

Pozn. Použité chemikálie boli v čistote p.a. a vyššej, ak nie je uvedené inak.

#### 3.1.3 Použité prístroje

Analytické váhy PA224C, Ohaus

Centrifúga MIKRO 200, Hettich

Centrifúga Hettich EBA 20, Hettich

Centrifúga chladená Centrifuge 5417 R, Eppendorf

Kvapalinový chromatograf LC10A, SHIMADZU

Laminárny box Aura mini, BioAir

Lampa MASTERColour CDM-T MW eco 230W/842 E40, Phillips  
Lampa MASTER HPI-T Plus 250W/645 E40, Phillips  
Magnetická miešačka Magnetic Stirrer MMS-3000, BioSan  
Microspin FV-2400, BioSan  
Multikultivátor MC 1000-OD, Photon Systems Instruments s.r.o  
pH meter pH 50+ DHS, XS Instruments  
Plynový chromatograf Trace 1300 s FID DB-WAX 30 m/0,25 mm, Thermo Scientific  
Predvážky EW 620-3NM, Kern  
Termoblok SBH200D, Stuart equipment  
Trepáčka SHO-2D, Witeg Germany  
Vortex , Heidolph Reax Top  
UV/VIS Spektrofotometer „Nanophotometer Pearl“, Implen  
UV-VIS Spektrofotometer U-3900H, Hitachi  
Vodná lázeň TW2, JULABO LABORATORTECHNIK

### 3.2 Kultivovanie cyanobaktériálnych kmeňov

Obe cyanobaktériálne kultúry boli kultivované v dusík-deficientnom minerálnom médiu M22O, ktorého presné zloženie je uvedené nižšie v rámci tejto kapitoly.

Erárne kultúry určené na následné očkovanie pokusných kultúr boli pripravované v laminárnom boxe do vopred vysterilizovaných baniek s médiom inokulačným pomerom zhruba 9 obj.%. To pri kultiváciách v 250 ml Erlenmayerových bankách (ďalej EB) odpovedalo 100 ml sterilného média a 10 ml kultúry, u 500 ml baniek 200 ml M22O a 20 ml cyanobaktériálnej kultúry a u litrových EB pomeru 400 ml média a 40 ml kultúry. Všetky médiá boli pre účely experimentov štandardne vysterilizované s použitím tlakových hrncov.

Takto pripravené EB boli kultivované na trepačkách rotujúcich rýchlosťou 90 otáčok/minútu pre menšie objemy a 130 o/min pre väčšie objemy, prispôsobujúc sa efektívnosti miešania. Teplota kultivácie odpovedala laboratórnej teplote, pohybujúc sa v rozmedzí 21-23 °C. Svetelný režim lampy bol nastavený na 16 hodín svetla a 8 hodín tmy. Kultúry však neboli od začiatku kultivované pod svetelným zdrojom, nakoľko bola jeho intenzita pre zriedené kultúry príliš vysoká, boli pod neho presunuté až po aklimatizácii a dosiahnutí vyššej optickej hustoty.

Presné zloženie kvapalného minerálneho média M22O:

- $\text{NaNO}_3$  0,450 g
- $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  0,025 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,100 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,600 g
- TES 1,500 ml
- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,200 g
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,080 g
- Destilovaná voda 1000 ml

Zloženie zmesi stopových prvkov TES:

• H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,509 g
• CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,150 g
• KI	0,181 g
• FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,293 g
• MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,296 g
• Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,082 g
• NiSO <sub>4</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,275 g
• Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,100 g
• ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,490 g
• KAl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · 12H <sub>2</sub> O	0,395 g
• KCr(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · 12H <sub>2</sub> O	0,470 g
• Destilovaná voda	1000 ml

Príprava média M220 prebiehala v troch krokoch. V prvom boli do polovičného objemu destilovanej vody pridané a rozpustené prvé štyri zložky – dusičnan sodný, nonahydrát dusičnanu železitého, heptahydrát síranu horečnatého a dihydrát chloridu vápenatého. Druhým krokom bolo do zvyšného objemu pridať posledné dve zložky – hydrogenfosforečnan draselný a po jeho dôkladnom rozpustení uhličitan sodný. Nakoniec boli tieto dva objemy zmiešané a bolo do nich napipetované odpovedajúce množstvo zmesi TES. Takto pripravené médium bolo uschovávané pri 4°C.

### 3.2.1 Pokusné kultúry v Erlenmayerových bankách

Kultúry boli pri pokusoch kvôli dosiahnutiu uniformity pripravované nasledovne: dostatočne narastené erárne kultúry v exponenciálnej fáze rastu boli najprv sterilne zliate do vopred vysterilizovaných litrových fliaš Pyrex v laminárnom boxe. Z takto získanej kultúry bolo odobraté a bola premeraná optická hustota (z angl. Optical Density, ďalej len OD) pri vlnovej dĺžke 720 nm proti médiu M220 ako blanku. Následne bolo z tejto hodnoty zistené riedenie potrebné na dosiahnutie OD<sub>720</sub> približne odpovedajúce 0,6-0,7. Na základe tejto informácie bola kultúra vo fľaši Pyrex nariadená sterilným médiom M220 tak, aby toto OD dosiahla a bola umiestnená na 8-12 hodín (cez noc) na trepačku, kde sa aklimatizovala na nové chemické podmienky a za tento čas došlo k nárastu OD na hodnotu približne 0,8. Takto aklimatizovaná kultúra bola potom pomocou sterilného odmerného valca v laminárnom boxe rozdelená po 100 ml do vopred vysterilizovaných EB o objeme 250 ml a umiestnená na trepačky so svetelným režimom 16/8 (ak povaha experimentu nevyžadovala inak).

### 3.2.2 Pokusné kultúry v multikultivátore

Pokusy prebiehajúce v multikultivátore (ďalej MK) vyžadovali pred každým cyklom steriláciu zariadenia. Skúmavky s prevzdušňovacími hadicami boli sterilované v tlakových hrncoch obdobne ako Erlenmayerove banky. Rovnako bola sterilovaná aj voda, cez ktorú prechádzal prevzdušňovací vzduch a odpovedajúce vzduchové filtre. Plastová prevzdušňovacia trubica bola sterilovaná iba chemicky, vstreknutím antimikrobiálnej látky (Savo/Incidin) a jej pôsobením po dobu zhruba 20 minút a následným dôkladným preplachom etanolom a vysušením jeho odparom.

Fotoautotrofné kultivácie prebiehali po celú dobu experimentu v multikultivátore. Do vysterilovaných kultivačných skúmaviek bolo pridané sterilné médium o objeme 75 ml a bolo pridaných 5 ml kultúry. Skúmavky boli uzavreté, vložené do MK a pripojené na zdroj vzduchu.

Mixotrofné kultivácie prebiehali prvé 3 týždne v Erlenmayerových bankách. Takto narastené kultúry boli podobne ako v kapitole 3.2.1 zliate do fľaše Pyrex, ale neboli ďalej riedené. Homogénna kultúra bola sterilne rozdelená do kultivačných skúmaviek, bol pridaný konkrétny uhľikatý zdroj odpovedajúci požadovanej koncentrácii a kultúry boli vložené do MK a pripojené na zdroj sterilného vzduchu.

Všetky kultivácie prebiehajúce v multikultivátore boli pri nepretržitom 24 hodinovom osvetlení, ktoré zabezpečovali výbojky zabudované v ňom, nastavené na intenzitu žiarenia 25 %, čo odpovedá  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Ak si to podstata experimentu vyžadovala (v tmavej fáze), boli výbojky vypnuté a kultúry boli odizolované aj od okolitého svetla zaobalením MK do alobalu. Teplota sa pohybovala v rozmedzí asi 25-26 °C.

### 3.3 Prípravy vzoriek a analýzy

Vzorky na jednotlivé analýzy boli pri pokusoch v Erlenmayerových bankách odoberané sterilne, v laminárnom boxe. Pri kultiváciách prebiehajúcich v multikultivátore nebolo sterilné odoberanie možné, preto boli odbery realizované semisterilne – v rukaviciach sterilovaných etanolom boli týmto alkoholom stričkou ostriekané závitky spájajúce kultivačné banky a zdroj sterilného vzduchu. Tieto závitky boli následne rozpojené a sterilnou striekačkou bolo odobraté potrebné množstvo kultúry. Po odbere bol závit opäť rýchlo uzavretý.

#### 3.3.1 Extrakcia a analýza koncentrácie glykogénu

Z analyzovanej kultúry boli odobraté 2 mililitre (v neskorších fázach pri vyššej koncentrácii biomasy postačoval aj 1 ml) do skúmaviek Eppendorf s kónickým dnom. Boli centrifugované pri záťaži 8 000 g po dobu 5 minút a boli dvakrát premyté destilovanou vodou. Po tomto kroku boli do skúmaviek typu Eppendorf navážené aj dva glykogénové štandardy o hmotnosti 1-3 miligramy a ďalej sa s nimi pracovalo rovnako ako s analyzovanými vzorkami. Pelety biomasy boli po druhom premytí rozsuspendované v 400  $\mu\text{l}$  30 hm.% roztoku hydroxidu draselného a inkubované po dobu 2 hodín v termobloku pri teplote 95 °C. Po inkubácii a vychladnutí bolo pridaných 1 200  $\mu\text{l}$  100 obj.% predmrazeného etanolu a vzorky boli cez noc uchované v mrazničke. Nasledujúci deň boli na chladenej centrifúge vzorky stočené pri 4 °C po dobu 15 minút pri záťaži 10 000 g a trikrát premyté, v prvých dvoch krokoch 70 obj.% etanolom a v treťom 100 obj.% etanolom. Pri premývaní bolo nutné pozorne sledovať stav peletu a prispôbovať mu množstvo odpipetovaného množstva etanolu, aby nedochádzalo k stratám. Získaný pelet bol sušený v sušiarňi pri teplote 70 °C po dobu zhruba 40 minút (do úplného vysušenia, ale nie presušenia!). Takto vysušené pelety môžu byť skladované a naraz pripravené na analýzu vo väčšom množstve. Ďalším krokom je ich rozsuspendovanie pomocou vortexu v 1 ml 100 mM acetátového pufru o pH 4,5, ktorého zloženie a príprava sú uvedené na konci tejto kapitoly. Do tejto zmesi bolo následne napipetované 12,5  $\mu\text{l}$  roztoku amyloglukozidázy (3 260 U/ml) a bola inkubovaná vo vodnej lázni predhriatej na teplotu 55 °C po dobu 2,5 hodiny. Po inkubácii bola prevedená precipitácia – v prvom kroku bolo pridaných 40  $\mu\text{l}$  roztoku hexakvanoželeznatanu draselného (10,65 g trihydrátu tejto soli na 100 ml destilovanej vody), vzorky boli premiešané a ponechané stáť po dobu 5 minút. Druhý krok prebiehal rovnako,

rozdiel bol v napipetovaní 40 µl roztoku síranu zinočnatého (28,8 g heptahydrátu na 100 ml destilovanej vody). Po 5 minútach boli vzorky centrifugované po dobu 20 minút pri záťaži 10 000 g a supernatant bol prefiltrovaný do nových skúmaviek typu Eppendorf a analyzovaný na kvapalinovom chromatografe. Dôležité je myslieť na úpravu pH v závislosti na použitej kolóne pri kvapalinovej chromatografii.

Analýza prebiehala na kvapalinovom chromatografe s refraktometrickou detekciou (RID). Mobilnou fázou bola zmes acetonitrilu s vodou v objemovom pomere 80:20. Táto zmes bola pripravená do fľaše Pyrex a dôkladne odplynená pomocou ultrazvukovej lázne. Kolóna rozdeľujúca jednotlivé zložky bola plnená uhľovodíkom s naviazanými amínovými skupinami, o rozmeroch 3,9x300 mm. Prietok mobilnej fáze bol nastavený na 1,2 ml/min, tlak na kolóne sa pohyboval v rozmedzí 80-120 bar, teplota na kolóne 35 °C a na detektore 30 °C. Pri analýze bol vždy najprv premeraný štandardný roztok glukózy, kvôli identifikácii retenčného času (zloženie mobilnej fáze a podmienky merania sa môžu mierne líšiť), následne pripravené glykogénové štandardy a nakoniec vzorky. Kvôli neprítomnosti autosampleru boli vzorky na kolónu nastrekované ručne – premytím dávkovacej ihly, nasatím vzorku, vstreknutím do dávkovača a súčasným pootočením polohy dávkovača a tým vstreknutím vzorku na kolónu a zapnutím priebehu analýzy v použitom programe.

Na prípravu acetátového pufru bol najprv namiešaný 0,1 M roztok acetátu sodného (čo odpovedá 13,61 g/l) a 0,1 M roztok kyseliny octovej (čo odpovedá 5,72 ml 100% kyseliny alebo 7,15 ml 80% kyseliny a doplnením destilovanou vodou do objemu 1 litru). Príprava pol litra pufru o pH 4,5 následne vyžadovala zmiešanie 285 ml roztoku kyseliny a 215 ml roztoku acetátu sodného.

### **3.3.2 Analýza koncentrácie PHB**

Z kultúr bolo pre analýzu obsahu PHB odobratých 10 mililitrov do centrifugačných skúmaviek. Tie boli centrifugované po dobu 15 minút pri 6 000 o/min, supernatant bol odliaty a biomasa bola premytá 5 ml destilovanej vody, opäť stočená a sušená pri 70 °C. Po vysušení bola jej hmotnosť zistená na analytických váhach a bola navážená približne v rozmedzí 8-13 mg do krimplovacích vialiek. Rovnako bolo navážených aj 5 bodov kalibračnej krivky PHB odpovedajúcich 3-10 mg štandardu. V ďalšom kroku bol k biomase pridaný 1 ml chloroformu a 0,8 ml zmesi vnútorného štandardu, obsahujúcej 15 hm.% kyseliny sírovej v metanole a kyselinu benzoovú o koncentracii 5 mg/ml, ktorá slúži ako vnútorný štandard. Zmes bola zakrimplovaná a vložená do termobloku, kde prebiehala esterifikácia po dobu 3 hodín pri teplote 94 °C. Obsah vialiek bol pravidelne kontrolovaný, obzvlášť počas prvých 30 minút, kvôli možnosti úniku zmesi pri zlom uzavretí či poškodení vialky, v takom prípade bola krimplovacia zátka vymenená. Po ukončení a vychladnutí prebehlo odkrimplovanie a zmes bola prevedená do väčšej vialky o objeme 4 ml so závitom, do ktorej bolo predpipetovaných 0,5 ml 50 mM roztoku NaOH. Tá bola uzavretá a zmes dôkladne pretrepaná. Po rozdelení fází bolo následne do menších vialiek so závitom o objeme 2 ml napipetovaných 900 µl isopropylalkoholu a 50 µl zo spodnej, organickej fáze. Takto pripravené vzorky boli uzavreté a uschované v mrazničke do analýzy.

Analýza prebiehala na plynovom chromatografe s plameňovým ionizačným detektorom (FID). Princíp spočíval v stanovení koncentrácie metylesteru príslušnej hydroxyalkánovej

kyseliny, ktorý vznikol kyslou hydrolyzou PHA a naesterifikovaním jeho monomérovej jednotky.

### 3.3.3 Extrakcie a stanovenie koncentrácie pigmentov

Pre extrakciu chlorofylu *a* a karotenoidov bol odobratý 1 ml cyanobakteriálnej biomasy do skúmavky Eppendorf. Tá bola centrifugovaná pri laboratórnej teplote pri záťaži 7000 g po dobu 7 minút a následne bol dôkladne odstránený supernatant. K peletu bol pridaný 1 ml metanolu predchladeného na 4 °C a zmes bola čo najrýchlejšie zhomogenizovaná vortexovaním či jemným pipetovaním, zakrytá alobalom a ponechaná v chladničke po dobu 30-40 minút. Po tomto kroku bola preextrahovaná kultúra znova centrifugovaná, tentokrát na chladenej centrifúge pri teplote 4 °C po dobu 7 minút pri záťaži 10 000 g a po tomto kroku bolo potrebné vizuálne skontrolovať farbu vzniknutého peletu. Ten by mal mať po extrakcii modro-fialovú farbu, v opačnom prípade je potreba znova zmes zhomogenizovať a pokračovať v extrakcii. Koncentrácia pigmentov bola stanovená spektrofotometricky, premeraním vlnových dĺžok 720, 665 a 470 nm supernatantu proti metanolu ako blanku. Tieto hodnoty boli dosadené do rovníc:

$$c_m(\text{Chl}_a) = 12,9447 \cdot (A_{665} - A_{720}) \left[ \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right] \quad (1)$$

$$c(\text{Chl}_a) = 14,4892 \cdot (A_{665} - A_{720}) [\mu\text{M}] \quad (2)$$

$$c_m(\text{Karot.}) = [1,000 \cdot (A_{470} - A_{720}) - 2,86 \cdot \left( \frac{c_m(\text{Chl}_a)}{221} \right)] \left[ \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right] \quad (3)$$

Pozn. Extrakcia a spektrofotometrické stanovenie by mali prebiehať pod minimálnym osvetlením a nízkej teplote (v krokoch, v ktorých sa teplota ovplyvniť nedá, je treba pracovať čo najrýchlejšie) kvôli degradácii voľných farbív. Táto extrakcia bola prevedená podľa protokolu [141].

Na extrakciu fykocyanínu bolo odobratých 2,5 ml cyanobakteriálnej kultúry a bolo k nej pridaných 50 µl roztoku lyzozýmu o koncentrácií 10 mg/ml v destilovanej vode, čím bola dosiahnutá jeho koncentrácia 50 µg/ml. Zmes bola inkubovaná po dobu 5 hodín pri laboratórnych podmienkach a zhruba každú hodinu jemne premiešaná. Po rozložení buniek boli uskutočnené 2 rozmrazovacie cykly, pričom v tomto kroku je možné vzorky ponechať v mrazáku a následnú spektrofotometrickú analýzu previesť s väčším množstvom vzoriek. Po druhom rozmrazovacom cykle bola kultúra centrifugovaná pri 3 000 ot/min po dobu 10 minút a spektrofotometricky premeraná voči destilovanej vode pri vlnových dĺžkach 280, 562, 615, 620 a 652 nm. Po centrifugácii by mal mať pelet zelenú farbu a supernatant obsahujúci vyextrahovaný fykocyanín modrastú farbu. Extrakcia prebiehala podľa protokolu poskytnutého partnerskou skupinou z Tulln an der Donau.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Štúdium vzájomného vzťahu medzi glykogénom a PHB, ich metabolického významu a preferenciách u cyanobaktérií, si najprv vyžaduje zavedenie jednotnej metodiky analýzy ich koncentrácie v biomase. Metóda na kvantifikáciu PHB pomocou plynovej chromatografie už bola zavedená a optimalizovaná, zostáva tak ešte potreba navrhnutia postupu pre stanovenie koncentrácie glykogénu.

### 4.1 Zavedenie metodiky pre kvantifikáciu glykogénu v cyanobakteriálnych bunkách

#### 4.1.1 Odber a prečistenie biomasy

Pre analýzu cyanobakteriálnych kultúr je najprv potrebné z nich odobrať vhodné množstvo biomasy (obsahujúce dostatočné množstvo glykogénu). To sa samozrejme môže líšiť v závislosti na fáze rastu, v ktorej sa kultúra nachádza (na začiatku exponenciálnej fázy pri nízkej koncentracii biomasy bude hladina glykogénu výrazne nižšia), ale aj na aktuálnom stave kultúry (vstup buniek do chlorotického stavu môže hladinu glykogénu výrazne ovplyvniť). Ďalším faktorom, ktorý treba brať do úvahy je určite aj citlivosť prístrojov použitých na analýzu, prípadne ich limity detekcie. Vzhľadom na starší typ použitého vysokoúčinného kvapalinového chromatografu (ďalej len HPLC) boli teda v počiatočných fázach rastu kultúr odoberané na analýzu 2 ml. V neskorších fázach, hlavne pri viditeľnom začiatku prechodu do chlorotického stavu už bol odoberaný iba 1 ml, nakoľko akumulácia glykogénu by sa ním mala zvýšiť [72–74]. Keďže celý ďalší postup až po samotnú analýzu bude prebiehať v tých istých skúmavkách typu Eppendorf, je dôležité dodať, že skúmavky s kónickým dnom sú pre túto analýzu oveľa vhodnejšie, než tie s dnom plochým. Dôvody podporujúce toto tvrdenie budú špecifikované v konkrétnych kapitolách.

Ďalším krokom je prečistenie odobratej biomasy. Z hľadiska vhodnej pevnosti (priľnavosti) peletu, aby nedochádzalo pri izolácii supernatantu k stratám a zároveň pri premývaní destilovanou vodou bol pelet jemným prepipetovaním resuspendovateľný, sa zdala byť najvhodnejšia záťaž zhruba  $7-8\ 000 \times g$  po dobu 5-6 minút. Tieto vlastnosti cyanobakteriálneho peletu však taktiež záviseli aj na fáze (stave) kultúry, bunky v stave chlorózy s vyššou koncentraciou biomasy sú paradoxne jednoduchšie resuspendovateľné, ako mladá zelená kultúra (z vlastnej skúsenosti). Pri použití skúmaviek s kónickým dnom sa pelet navyše pekne usadí na dne a supernatant je možné jednoducho odliat, prípadne odpipetovať väčšie množstvo. Kultúry je potrebné premyť opakovane pre zisk čo najčistejšej vzorky.

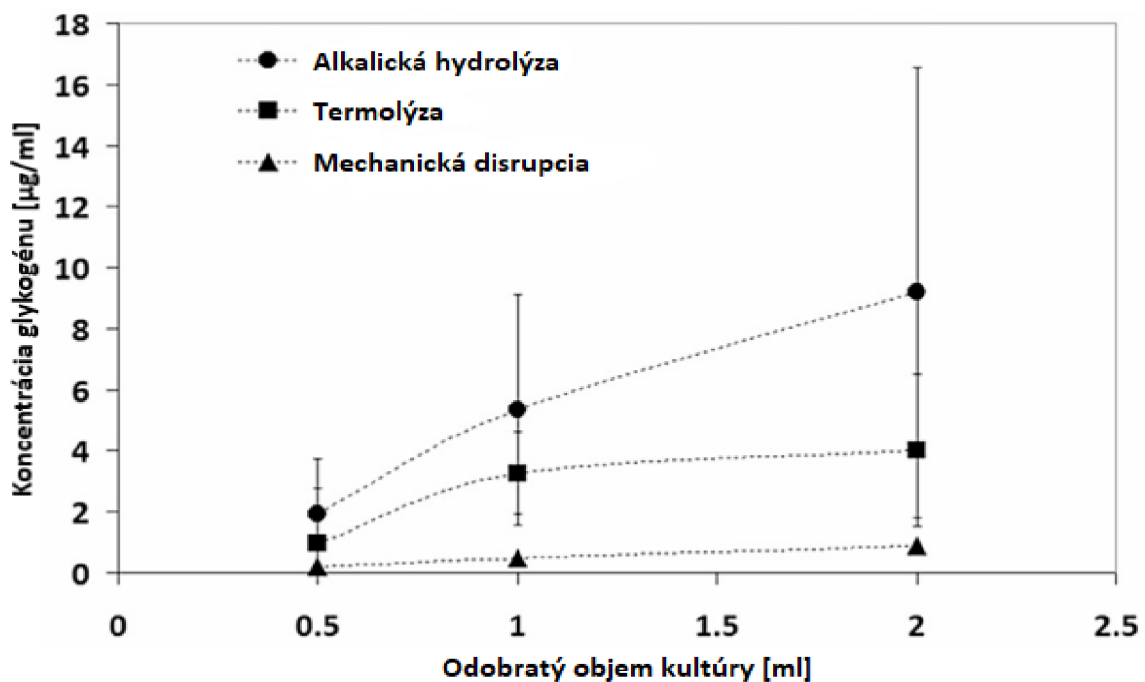
#### 4.1.2 Bunečná lýza a sprístupnenie glykogénu

V rámci rozrušenia bunečných obalov a sprístupnenia bunečného obsahu sa naskytuje veľké množstvo možností a postupy mnohých autorov sa navzájom často pomerne odlišujú. Vo všeobecnosti sa naskytujú 4 možnosti bunečnej lýzy – chemická, mechanická, termická a sónická [142, 143]. Chemická cesta je najčastejšie používaná a môže sa jednať o alkalickú alebo kyslú hydrolyzu. Alkalická hydrolyza spočíva v inkubácii resuspendovaných buniek pri vysokej teplote so silnou alkáliou pre zisk hydrolyzátu buniek s rozpusteným glykogénom. Kyslá hydrolyza prebieha obdobne, jedná sa o vystavenie kultúry vplyvu kyseliny pri vysokých teplotách, výsledkom je však hydrolyzát obsahujúci glykogén už rozložený na glukózu.



Mechanické narušenie bunecných stien je možné previesť viacerými spôsobmi, napríklad premiešavaním v podchladenom stave v prítomnosti sklenených, zirkóniových či kovových guľčiek. Termolytický rozklad zase spočíva v inkubácii kultúry, ktorá bola predtým extrahovaná etanolom či metanolom, resuspendovanej v destilovanej vode, pri teplote 100 °C a princípom sónickej lýzy je vystavenie buniek cyklom ultrasonikácie pri vysokej frekvencii a nízkej teplote [142, 143].

Problém kyslého rozkladu spočíva v tom, že síce pomerne urýchľuje samotné stanovenie, nakoľko nie je potrebné vykonávať nasledovnú precipitáciu, prečistenie a hydrolýzu, pretože dochádza k efektívnemu narušeniu glykozidických väzieb, ale nie je špecifický pre glykogén. U cyanobaktérií bolo identifikovaných veľké množstvo iných glukokonjugátov, ako napríklad sukroza [119], glukosylglycerol [144] či celulóza [146] a pri použití kyslej hydrolýzy by teda došlo k výraznému skresleniu vplyvom glukózy nederivovanej z glykogénu [143]. Vidal a Venegas-Caleron porovnávali alkalickú hydrolýzu, termolýzu a mechanické narušenie bunecných stien ako formu extrakcie pre 3 rôzne objemy a ich záverom bolo, že alkalickou hydrolýzou bol stanovený obsah glykogénu väčší až o jeden rád (obrázok 9). Dôvodom je, že po extrakcii fyzikálnou cestou zostáva glykogén uložený vo vode-nerozpustnej frakcii, zatiaľ čo alkalická hydrolýza umožňuje jeho rozpustenie a následnú precipitáciu [142].



Obrázok 9 – Porovnanie jednotlivých bežne používaných extrakčných postupov a ich vplyv na stanovenie hladiny glykogénu u cyanobaktériálnych kultúr. Prebraté, upravené z [142].

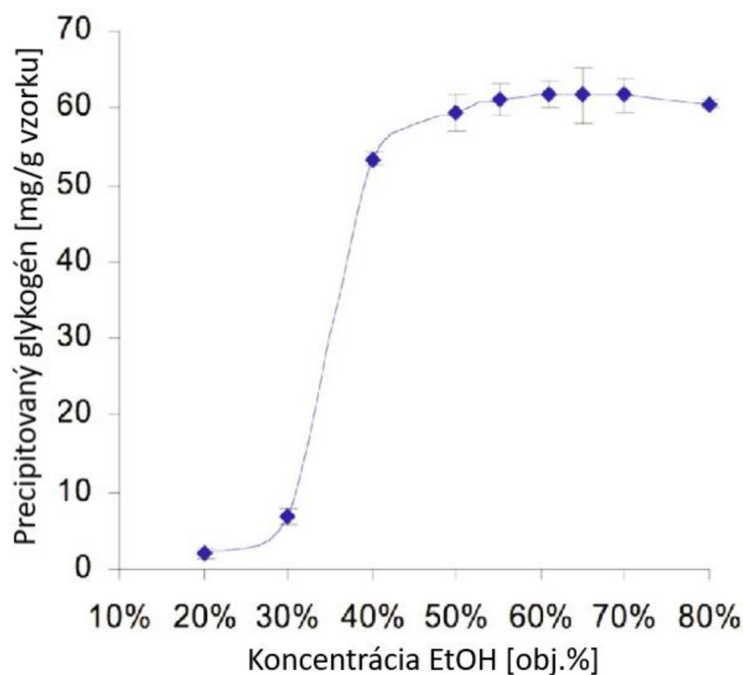
Takmer žiadny postup zahrňujúci mechanickú extrakciu navyše nekvantifikuje obsah glykogénu v nerozpustnej frakcii, všetky ho kvantifikujú priamo zo supernatantu po oddelení od zbytkového bunecného obsahu. Yoo a kolektív extrakciou pomocou DMSO a následnou precipitáciou etanolom zistili, že až 26% celkového glykogénu je u *Synechocystis* sp. PCC 6803 v tejto vo vode-nerozpustnej frakcii [142, 145]. Termolytický rozklad dosiahol výrazne vyšších hodnôt, pravdepodobne kvôli príspevku vysokej teploty k rozpustnosti glykogénu, analyzovaný obsah bol však stále omnoho nižší, než ten získaný alkalickou hydrolýzou [142].

Najčastejšie používanou metódou medzi autormi je alkalická hydrolyza, ktorá bola použitá aj v tejto práci. Bunečný pelet bol po druhom premytí destilovanou vodou resuspendovaný v 400  $\mu$ l 30 hm.% roztoku KOH vortexovaním, jemne stočený na microspine a vložený do termobloku na 2 hodiny pri teplote 95 °C. Vzorky v termobloku je vhodné zaťažiť, aby pri prípadnom otvorení skúmaviek typu Eppendorf nedošlo k odparu.

Z obrázku 9 sú u tohto druhu stanovenia viditeľné veľké chybové úsečky. Táto metóda je niektorými autormi kritizovaná pre jej nízku reprodukovateľnosť [142, 143], ktorej bola v tejto práci venovaná pozornosť a bude popísaná a optimalizovaná v kapitole 4.1.3.

#### 4.1.3 Precipitácia a prečistenie

Po ukončení alkalickéj bunečnej hydrolyzy je rozpustený glykogén potrebné precipitovať, aby mohol byť oddelený od ostatných rozpustených bunečných zložiek. Na precipitáciu je bežne autormi používaný predmrazený etanol [142], na koľko glykogén je v ňom nerozpustný. Táto nerozpustnosť rastie so zvyšujúcou sa koncentráciou alkoholu [147], s klesajúcou teplotou [148] a je ovplyvnená aj prítomnosťou a koncentráciou elektrolytov rôznej povahy [149].



Obrázok 10 – Rozpustnosť glykogénu v závislosti na koncentrácii etanolu. Prebraté, upravené z [147].

Z obrázku 10 je viditeľné, že pri obsahu zhruba 70 obj.% etanolu je dosiahnutá maximálna precipitácia glykogénu. Po ukončení alkalickéj hydrolyzy boli teda vzorky ponechané vychladnúť a bolo k nim napipetovaných 1200  $\mu$ l 100 obj.% etanolu, čím sa dosiahla približná koncentrácia 70-75 obj.% etanolu v zmesi (v závislosti na objeme, ktorý zostal spolu s peletom po druhom premytí). Takto upravené vzorky boli premiešané kvôli homogenizácii a ponechané v mrazničke pri -20°C cez noc na precipitáciu.

Pre oddelenie vyzrážaného glykogénu od zvyšku zmesi a zároveň zabráneniu spätnému rozpúšťaniu je potrebné vzorky centrifugovať pri zníženej teplote. Premývanie vyzrážaného glykogénu a jeho prečistenie od KOH a iných rozpustených zložiek je kritickým bodom tohto

stanovenia, čo prezentujú viacerí autori [142, 143] a vyplýva to aj z osobnej skúsenosti. Vzniknutý glykogénový pelet je totižto veľmi krehký. Táto krehkosť sa každým premytím zvyšuje a pelet je aj po centrifugácii pri vysokých otáčkach a relatívne dlhej dobe nestabilný a rozpadá sa na menšie častice. V kombinácii s relatívne nízkou viskozitou etanolu, ktorým je premývaný, tak vzniká možnosť veľkých chýb podmienených ľudským faktorom, čo znižuje opakovateľnosť procesu a spôsobuje veľké odchýlky. Z tohto dôvodu bolo potrebné previesť experiment hľadajúci vhodnú alternatívu umožňujúcu zamedzeniu strát a zároveň efektívnemu premytiu vzorku. V prípade nedostatočného premytia vzorku v ňom môžu zostať reziduálne množstvá KOH, ktoré môžu spôsobiť odklonenie od pH optima enzýmu použitého v ďalšom kroku, či znemožniť HPLC analýzu (z vlastnej skúsenosti, zle prevedené premytie si vyžiadalo hodinový preplach kolóny).

Autori väčšinou aplikujú dve premytia etanolom od roztoku KOH [138, 142]. Z hľadiska zamedzenia vznikajúcim stratám bolo porovnané dvojnásobné premytie s odstránením väčšiny etanolu s trojnásobným premytím za odstraňovania menšieho množstva za predpokladu, že dôjde k dostatočnému nariadeniu (a odstráneniu) hydroxidu a zároveň k nižším stratám pri odpipetovávaní.

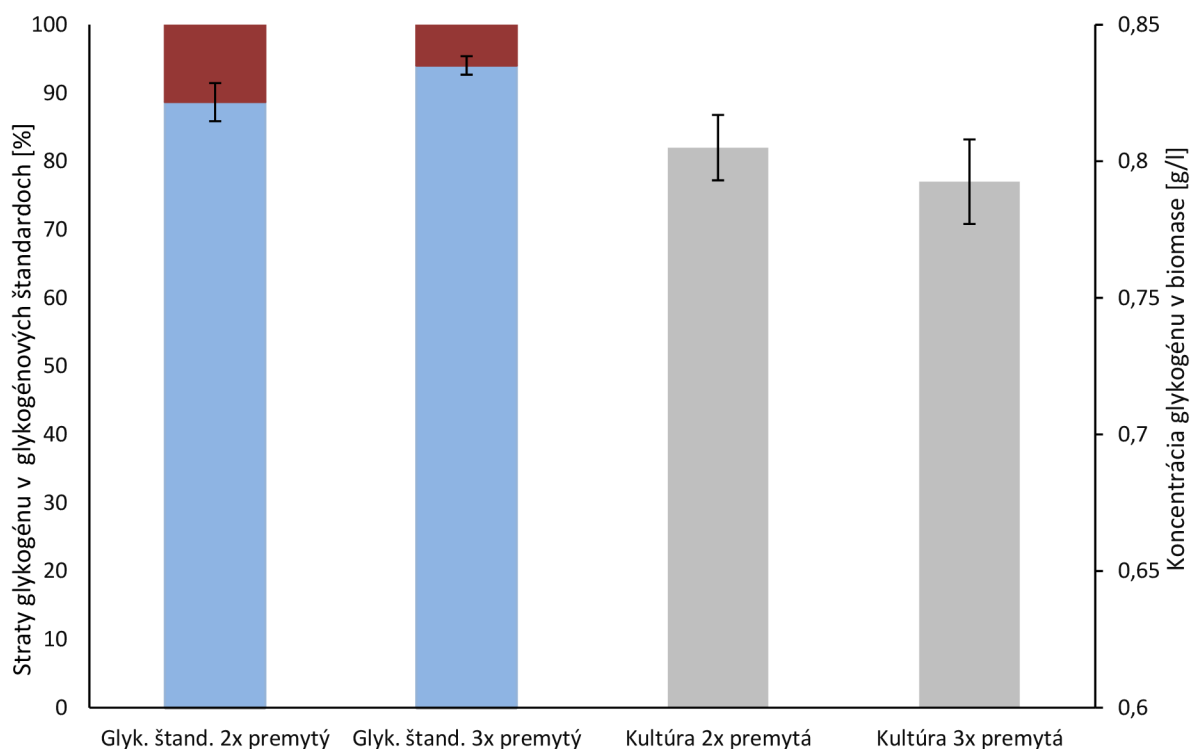
Všetky pokusy pre overenie presnosti a opakovateľnosti stanovenia boli prevedené na piatich vzorkách. Pre oba spôsoby premývania bolo navážených 5 vzoriek glykogénového štandardu v rozmedzí 0,7-2,5 mg a bol odobratý 1 ml kultúry v stave chlorózy. S takto odobratými a naváženými vzorkami bol prevedený celý analytický postup a boli vyhodnotené na HPLC.

Z obrázku 11 je viditeľné, že pri pozorovaní presnosti stanovenia došlo k značnému rozdielu v koncentrácií nameraného glykogénu z jeho štandardu. Zatiaľ čo pri dvojnásobnom premytí bola priemerná strata vypočítaná na 11,34 %, u trojnásobného premytia došlo k poklesu na 5,96%, takže takmer o polovicu. U prvého zmieneneho sa navyše stanovenia navzájom výrazne viac líšili, čo sa odrazilo na vyše dvojnásobnej veľkosti smerodajnej odchýlky. Pri hodnotení tohto výsledku je však potrebné brať do úvahy, že glykogénové štandardy boli vážené na analytických váhach vážiach na 4 desatinné čísla, teda navážky boli zaťažené chybou 0,05 mg.

Pokus zameraný na opakovateľnosť tejto metódy spočívajúci v analýze 5 vzoriek tej istej kultúry nepotvrdil markantný rozdiel medzi týmito postupmi. Bol však sledovaný nepatrný opačný trend, kedy bola pri troch premytiach nameraná mierne nižšia hladina glykogénu, rozdiel bol však iba 1,55 % a hodnota smerodatnej odchýlky bola väčšia iba o necelú tretinu.

Opačný trend ako v prvom pozorovanom bode môže byť spôsobený tým, že pelet získaný alkalickou hydrolýzou cyanobakteriálnej kultúry je po prvej centrifugácii a premytí výrazne pevnejší, než pelet získaný hydrolýzou práškoveho glykogénového štandardu. Ten je už na prvý pohľad výrazne nesúdržný. Napriek tomu však treba zhodnotiť, že pri navrhovanom trojnásobnom premývaní s nižším odberom došlo k zníženiu strát vzniknutých ľudským faktorom. Tie však veľmi závisia na schopnosti a pozornosti osobnosti prevádzajúcej experiment. Straty je navyše možné skorigovať navážením viacerých štandardov, aplikáciou celého postupu spolu so vzorkami, čím sa pri rovnakých pracovných chybách dá získať tzv. recovery value, ktorou vynásobením získaných hodnôt pre reálne vzorky je následne možné vzniknuté odchýlky čiastočne kompenzovať. Je treba podotknúť, že použitie skúmaviek typu

Eppendorf s kónickým dnom je pre tento krok výrazne odporúčané, nakoľko umožňujú separáciu väčšieho objemu etanolu od krehkého peletu.



Obrázok 11 – Graf vyjadrujúci presnosť stanovenia koncentrácie glykogénu navrhovanou metódou vo vzorke pri dvojnásobnom a trojnásobnom preplachu glykogénového štandardu po precipitácii a opakovateľnosť tejto metódy pre analyzovanie kultúru *Synechocystis salina* CCALA 192. Červená farba prítomná v prvých dvoch stĺpcoch vyjadruje straty pri príprave.

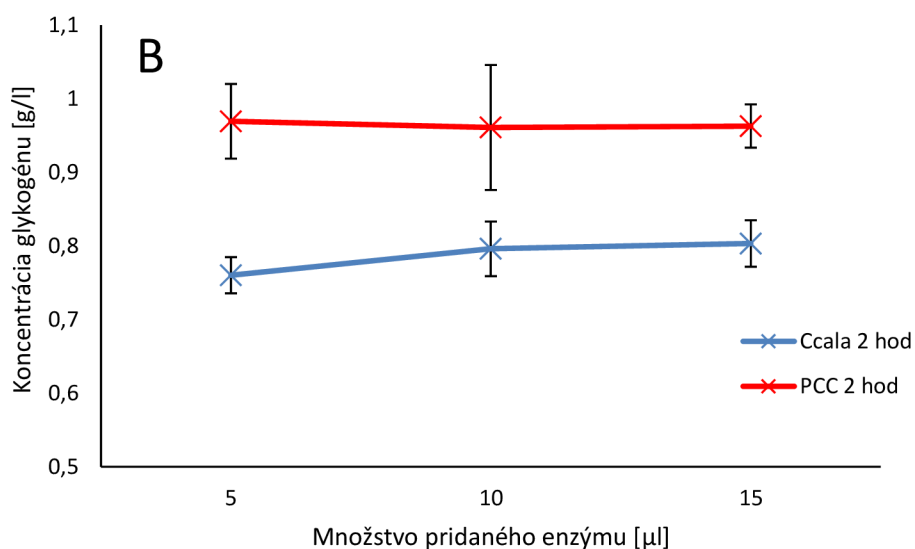
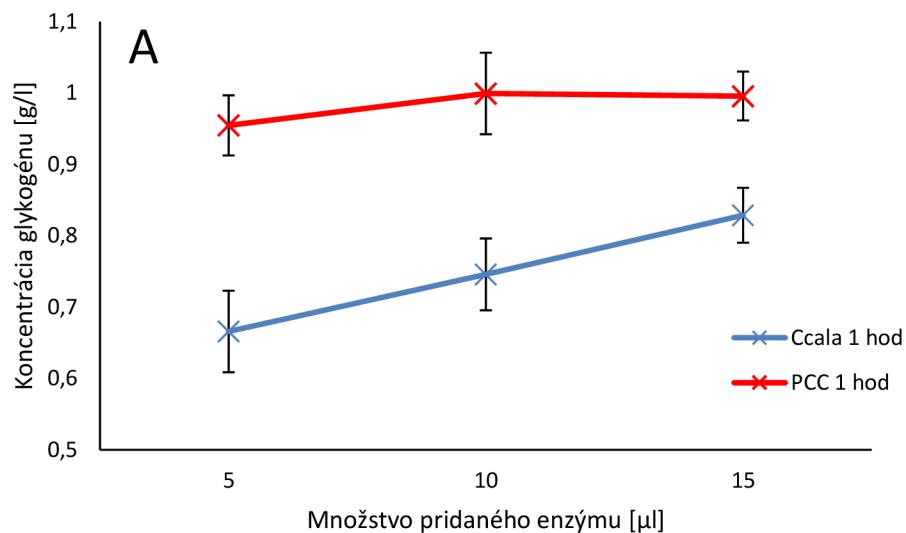
Prvé dve premytia boli realizované predmrazeným roztokom etanolu s destilovanou vodou o koncentrácii 70 obj.%, posledné premytie bolo kvôli zefektívneniu nasledujúceho sušiaceho kroku prevedené so 100 obj.% etanolu. Pri premývaní je nevyhnutné nesnažiť sa pelet resuspendovať, ani ho nevortexovať, aby sa čo najviac zachovala celistvosť peletu. Centrifugácia bola prevádzaná pri 4 °C a záťaži 10 000 g po dobu 15 minút. Po treťom premytí boli pelety so zbytkovým etanolom vložené do sušiarne pri teplote 70 °C a po zhruba pol hodine pravidelne kontrolované, aby nedošlo k presušeniu peletu. To môže spôsobiť veľmi zlú resuspendáciu v ďalšom kroku, čo bolo opäť potvrdené vlastnou skúsenosťou a zdôrazňujú to aj iní autori [143].

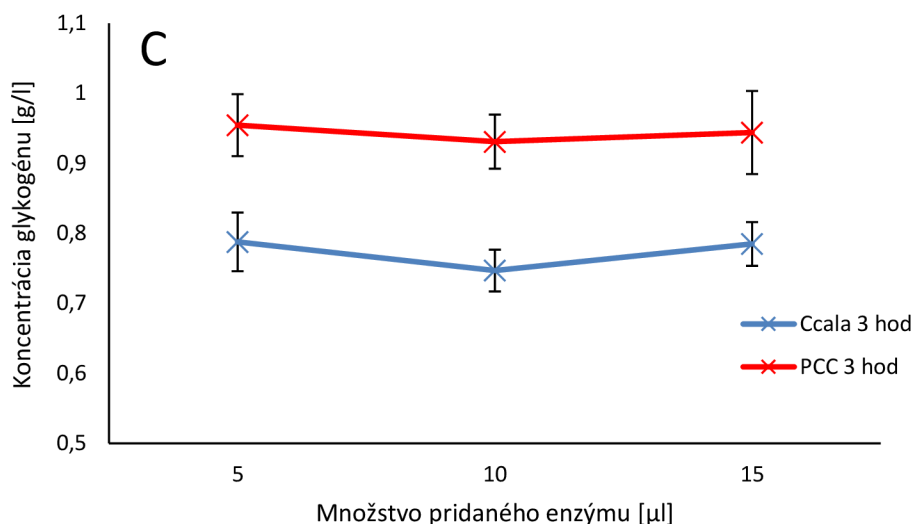
#### 4.1.4 Enzymatický rozklad glykogénu

Vyextrahovaný glykogén je kvôli stanoveniu na HPLC nutné rozložiť na monoméne jednotky glukózy. Vidal a Venegas-Calero spracovaním veľkého množstva postupov zistili, že približne 19 % autorov využíva vo svojich postupoch kyslú hydrolýzu, ktorej nevýhoda bola popísaná v kapitole 4.1.2. Rovnakému problému (nešpecifite stanovenej glukózy) čelia aj iné nešpecifické metódy stanovenia glykogénu či glukózy, ako sú metóda s použitím o-toluidínu, antrónu, Nelsonova metóda, DNS či fenol-sulfurová metóda. Zvyšok autorov sa prikláňa k enzymatickému rozkladu, ktorý je vďaka špecifite použitého enzýmu špecifický pre rozklad

glykosidických väzieb v glykogéne a navyše dosahuje za rovnaký čas aj lepšie výt'ážky, než acidická hydrolýza. Medzi autormi je najpoužívanejším enzýmom amyloglukozidáza (AMG) získavaná z plesne *Aspergillus niger*, ktorá efektívne štiepi glykozidické väzby a je vysoko špecifická pre glykogén a škrob [142].

Aby bol enzymatický rozklad efektívny, je však najprv potrebné docieľiť ideálne podmienky a zistiť čas potrebný na kompletný rozklad glykogénu v kultúre s jeho vysokým obsahom. Pelet získaného glykogénu je teda najprv potrebné resuspendovať (vortexovaním/jemným pipetovaním) v acetátovom pufre o pH 4,5 (presné zloženie je v kapitole 3.3.1), čím bolo dosiahnuté pH optimum použitého enzýmu. Ďalším krokom je prídavok amyloglukozidázy, jemné premiešanie vortexovaním, krátke stočenie na microspine, aby bol celý obsah skúmavky vystavený zahriatiu a inkubácia pri vhodnej teplote (55 °C). Použitie vhodného množstva enzýmu, času potrebného na enzymatický rozklad, ako aj porovnanie zahrievacej schopnosti vodnej lázne s termoblokom, boli optimalizované pre obe použité kultúry v stave chlorózy (obrázok 12). Použitá amyloglukozidáza má výrobcom udanú aktivitu 3 260 U/ml.





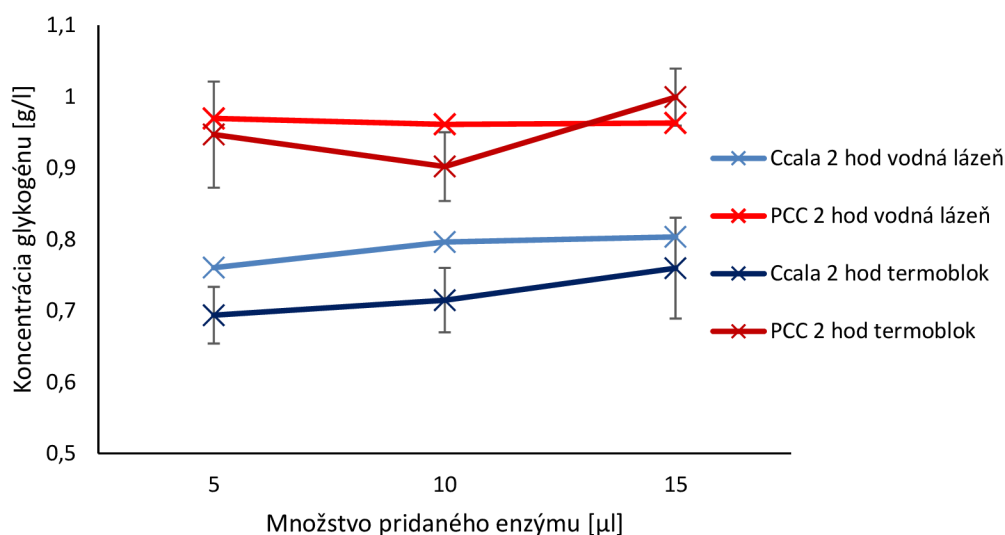
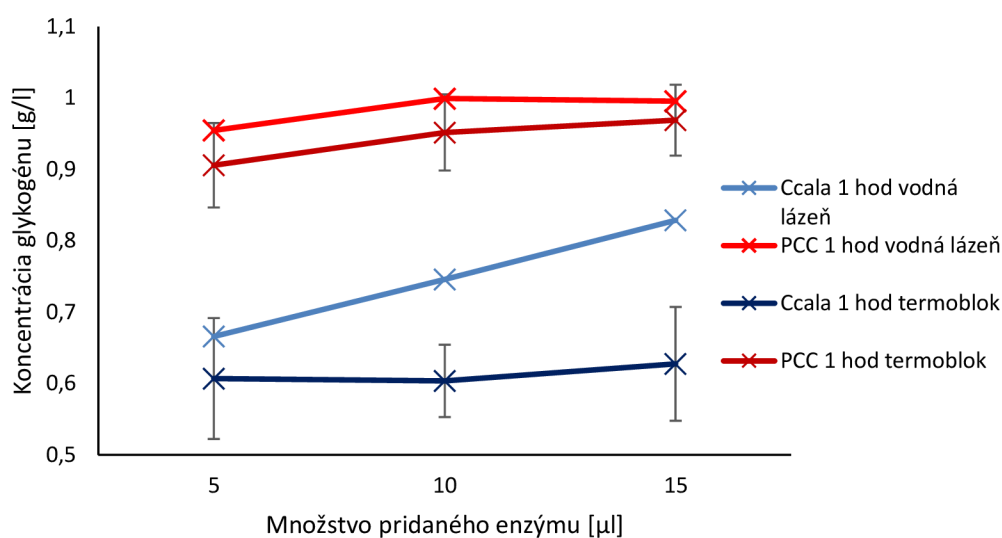
Obrázok 12 – Optimalizácia použitia množstva amyloglukozidázy a času enzymatickej hydrolyzy pre kompletné rozloženie glykogénu vo vyextrahovanom pelete. Na obrázku A je zobrazená doba inkubácie 1 hodina, na B 2 hodiny a na C 3 hodiny.

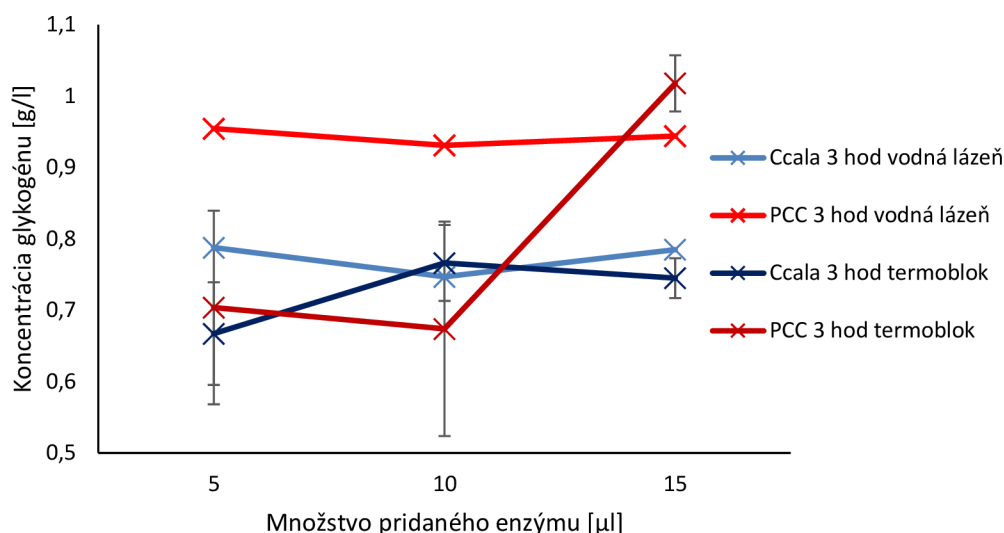
Ako je viditeľné z grafov na obrázku 12, rozklad glykogénu a analyzované množstvo sa výrazne líšia pri porovnaní týchto dvoch kultúr, najmä pri hodinovej kultivácii vyobrazenej na prvom grafe (A). Hoci mala kultúra, *Synechocystis sp.* PCC 6803, očividne vyšší obsah glykogénu, ten bol už po hodine kultivácie vo vodnej lázni pri napipetovaní objemu 10 μl kompletne rozložený. U druhej kultúry, *Synechocystis salina* CCALA 192, dochádzalo k približne lineárnemu nárastu koncentrácie rozloženého glykogénu, čo indikuje minimálne potrebu dlhšej inkubácie. Tento rozdiel mohol byť jednak spôsobený drobnými chybami a odchýlkami (rozdiely v distribúcii tepla pri zahrievaní vo vodnej lázni a iné), ale aj možnosťou miernych odlišností v štruktúre glykogénu medzi oboma kmeňmi. Glykogén je biomakromolekulou veľkých rozmerov a medzidruhovo sa môže líšiť v percentualite vetvenia, distribúciou veľkosti a disperzity polymérnych častíc a podobne [150]. To môže mať vplyv na prístupnosť enzýmu a tým na jeho schopnosť hydrolyzovať glykozidické väzby. Ďalšou možnosťou je neúplnosť resuspendovania glykogénového peletu, čo znemožňuje aktivitu enzýmu. Kvôli možnosti vzniknutia tohto problému je vhodné k vysušenému peletu najprv napipetovať používaný acetátový pufer, zmes zvortexovať a v prípade nerozpustnosti ho ponechať v pufri nahydratovať a postup prípadne opakovať. Aby k tomuto problému nedochádzalo je potrebné proces sušenia monitorovať a zbytočne ho nepredlžovať. Možnosťou môže byť prípadné rozbitie presušeného peletu ultrazvukom.

Na druhom grafe už vidno iba minimálny nárast medzi koncentráciou 5 a 10 μl enzymatického preparátu na mililiter acetátového pufru a takmer žiadny nárast medzi prídavkom 10 a 15 μl. Na grafe číslo 3 už nie je žiadny nárast evidovaný, poklesy boli spôsobené pravdepodobne skôr stratami počas celého procesu prípravy.

Na základe týchto výsledkov bola ako kompromis medzi ekonomickým (cena enzýmu) a časovým (trvanie rozkladu) hľadiskom do postupu zaradená koncentrácia tohto enzymatického preparátu 12,5 μl/ml pufru a čas rozkladu 2,5 hodiny. To by malo v prepočte odpovedať aktivite približne 40,25 U/ml a postačovať aj v prípade analýzy kultúry s vyšším obsahom glykogénu.

Okrem optimalizácie času hydrolýzy a koncentrácie enzýmu bola porovnávaná aj účinnosť inkubačného zariadenia, hoci bol výsledok pokusu predpokladaný, nakoľko prestup tepla medzi skúmavou typu Eppendorf pri tesnom kontakte kvapaliny je určite mnohonásobne presnejší a konzistentnejší. Na obrázku 13 je graficky vyobrazené toto porovnanie, pričom bol predpoklad potvrdený. Výsledky stanovenia sú vo väčšine prípadov podstatne nižšie, sú nekonštantné (neodpovedajú trendu predpokladanému na základe pomeru medzi jednotlivými koncentraciami enzýmu a časmi inkubácie) a sú zaťažené omnoho väčšími chybami. Na grafoch číslo 2 a 3 v tomto obrázku navyše došlo pri vyššej koncentrácii enzýmu u kultúry *Synechocystis sp.* PCC 6803 k prvotnému poklesu a k následnému prudkému nárastu, ktorý sa nedá vysvetliť inak ako zlým prestupom tepla v niektorých polohách konkrétneho termobloku.





Obrázok 13 – Porovnanie vhodnosti vodnej lázne a termobloku pre inkubáciu počas hydrolyzy amyloglukozidázou. Chybové úsečky pokusov z vodnej lázne boli kvôli prehľadnosti odstránené, v prípade potreby sú vyobrazené v obrázku 12

Tento výsledok môže byť samozrejme spôsobený nestálosťou konkrétneho použitého termobloku a je pravdepodobné, že v tomto kroku (ako jedinom) by skúmavky typu Eppendorf s plochým dnom boli kvôli lepšiemu kontaktu so stenou termobloku vhodnejšie. Hoci alkalická hydrolyza (kapitola 4.1.2) bola realizovaná v termobloku, pri výške teploty, ktorá bola použitá (95 °C), a dobe vystavenia 2 hodiny boli tieto straty zanedbateľné (väčšina autorov navyše aplikovala kratšie časy alkalickej hydrolyzy). Tak vysoká teplota je navyše vo vodnej lázni horšie (a pomalšie) dosiahnuteľná a spôsobuje výrazný odpar.

Vzhľadom na výsledok tohto pokusu bola inkubácia za účelom enzymatického rozkladu glykogénu na glukózu realizovaná vždy vo vodnej lázni.

#### 4.1.5 Precipitácia, filtrácia, neutralizácia a analýza

Pred odstránenie zvyšných rozpustených proteínov a lipidov bola prevedená Carrezova precipitácia. Jedná sa o metódu bežne používanú pri analýzach cukrov, cukrových alkoholov, ale aj iných uhlíkovodíkov a ich derivátov v prípade, že sa získavajú zo vzoriek bohatých na tieto látky, ako sú napríklad potraviny [151–153]. Často sa jedná o analytické metódy v spojení s kvapalinovou chromatografiou, aby sa zabránilo zachytávaniu týchto látok v kolónach, čím by dochádzalo k ich upchávaniu, prípadne k interferenciám. Carrezova precipitácia pozostáva z aplikovania dvoch roztokov – roztok C1 ( $K_4Fe(CN)_6$  o koncentracii trihydrátu 10,65 g/100 ml destilovanej vody) a roztok C2 ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  28,8g/100 ml ddH<sub>2</sub>O) [154].

Vzhľadom na relatívne nízky obsah biomasy vyskytujúci sa u použitých cyanobakteriálnych druhov (odkaz na nasledujúce kapitoly kde bude koncentrácia biomasy) a tým pádom nízky obsah vyžrážateľných látok a vysokú koncentráciu Carrezových reagentov nie je na precipitáciu potrebné veľké množstvo týchto roztokov. Po aplikácii 40 μl každého roztoku je vzorky potrebné pretrepať a ponechať 5 minút stáť pre plnohodnotné vyžrážanie. Po prídavku roztoku C1 je ihneď pozorovaný vznik bielej zrazeniny, ktorá po prídavku roztoku C2 zmení farbu na



bledomodrú (príloha 2). Precipitáty je ďalej potrebné od supernatantu efektívne oddeliť, čo je realizované centrifugáciou pri 12-13 000 rpm po dobu zhruba 20 minút.

Pre dokonalú čistotu od celého precipitátu a ochranu HPLC kolóny je ešte nevyhnutné vzorky prefiltrovať do novej skúmavky typu Eppendorf, preliatím supernatantu do striekačky s vytiahnutým piestom a nasadeným filtrom a následným pretlačením obsahu cez filter. Takto čistý supernatant je nakoniec potrebné zneutralizovať/inak upraviť pH v závislosti na pH optimite použitej kolóny. U amidovej kolóny použitej v tejto práci sa jednalo o neutrálne pH, čo bolo dosiahnuté neutralizáciou supernatantu pomocou zriedeného roztoku NaOH.

Priebeh samotného stanovenia pomocou vysokoúčinného kvapalinového chromatografu, ako aj jeho podmienky sú už popísané v kapitole 3.3.1.

#### 4.1.6 Vyhodnotenie

Výstupom z kvapalinového chromatografu je závislosť jednotky refraktívneho indexu (z angl. Refractive Index Unit) na čase. Chromatograf glukózového štandardu, glykogénového štandardu aj reálneho vzorku je zobrazený v prílohe 3. Po ohraňení hraníc peaku glukózy sa získa plocha peaku, ktorá je dosadená do rovnice kalibračnej závislosti plochy peaku na koncentrácií. Tým sa získa koncentrácia glukózy, ktorú je ešte potrebné prepočtom previesť na koncentráciu glykogénu. To sa dosiahne vynásobením stechiometrickým multiplikačným faktorom, ktorý má hodnotu 0,9. Okrem toho je možné ešte násobiť získanú koncentráciu glykogénu už spomínanou „recovery value“, ktorá sa získa tak, že navážené glykogénové štandardy sú po aplikovaní celého navrhnutého postupu (okrem prvotného premývania biomasy) zanalyzované a je vyhodnotená ich koncentrácia stanovená kvapalinovým chromatografom. Pri glykogénových štandardoch je dôležité brať na vedomie, že sa väčšinou neskladajú zo 100% z glykogénu, ale časť ich hmotnosti je tvorená vlhkosťou, napríklad u použitého štandardu z ustríc výrobca uvádza obsah glykogénu  $\geq 0,75$ , zbytok tvorí vlhkosť materiálu.

#### 4.1.7 Alternatívny postup

Možnou alternatívou k tomuto postupu, ktorá nie je ovplyvnená neselektivitou pôvodu glukózy, je tzv. metóda GOPXOD (glukóza-oxidáza/peroxidáza/o-dianizidín). Jedná sa o dnes už pomerne rozšírenú metódu stanovenia glukózy v biologických vzorkách a jej aplikácia z hľadiska stanovenia koncentrácie glykogénu spočíva v dvojkrokovom enzymatickom postupe. Postup je v podstate zhodný, ako v metodike navrhovanej v tejto práci, teda prečistená biomasa je alkalicky hydrolyzovaná, ale po hydrolyzačnom kroku nedochádza k premývaniu a precipitácií, ale k neutralizácií na pH optimum amyloglukozidázy (AMG). Tento krok môže byť mierne problematický a vyžaduje si dobrú optimalizáciu presného neutralizačného množstva [142]. Po neutralizácií je získaný glykogén rozložený v prítomnosti AMG a po enzymatickej hydrolýze je pridaná zmes GOPXOD, pričom glukóza-oxidáza najprv oxidáciou uvoľnenej glukózy produkuje  $H_2O_2$ , z ktorého je peroxidázou prenášaný kyslík na chromogénny kyslíkový akceptor – o-dianizidín. Jeho oxidovaná forma vytvára hnedé sfarbenie, ktoré absorbuje pri vlnovej dĺžke 420 nm a ktorého intenzita je úmerná koncentrácií glukózy [142, 155]. Táto absorpcia je však pH dependentná, v rozmedzí pH 4-7 má absorpčné maximum hodnotu 450 nm, pri pH 2 sa presúva na 390 nm [156] a prídavok 26% kyseliny sírovej ho presúva na 540 nm a predlžuje jeho stabilitu na niekoľko hodín [142, 157].

Viac informácií o tejto metóde, ako aj jej optimalizácia pre cyanobakteriálne kultúry, je prístupných z [142].

Metóda stanovenia pomocou HPLC bola zvolená z dôvodu uniformity stanovovania koncentrácie glykogénu medzi partnerskými skupinami FCH VUT v Brne a BOKU v Tulln an der Donau, Rakúsko.

## **4.2 Posúdenie vplyvu osvitú a ďalších parametrov na akumuláciu zásobných polymérov u cyanobaktérií**

Väčšina mikroorganizmov syntetizuje iba jeden druh zásobného uhľikátého polyméru – glykogénu alebo PHB [129]. Enzymatický aparát prvého menovaného, prevládajúceho z tejto dvojice, je prítomný u všetkých druhov cyanobaktérií. Niektoré druhy siníc, ako napríklad *Synechocystis* sp. PCC 6803 navyše však akumulujú aj spomínaný polyester [158]. Vzhľadom na snahu o nájdenie vhodného producenta PHA a následnú optimalizáciu ich priemyselnej výroby s cieľom znížiť environmentálnu záťaž, ktorú predstavujú dnes veľmi rozšírené používané petrochemické plasty, je teda potrebné preskúmať vzájomný vzťah a úlohy týchto zásobných látok a preferencie cyanobaktérií k ich akumulácii. Funkcie glykogénu sú relatívne dobre preskúmané (kapitola 2.3.3) a je s ním spájané množstvo metabolických funkcií, ako zachovávanie fotosyntetickej účinnosti pri svetelných podmienkach či viabilita pri stresujúcich podmienkach, ako je tma či nedostatok makronutrientov. Na druhú stranu funkcie PHB sú stále nedostatočne objasnené z dôvodu neprítomnosti výrazného produkčného fenotypu [75]. Cieľom tejto práce bolo okrem zavedenia metodiky pre kvantifikáciu glykogénu aj skúmať vplyv osvitú, prípadne iných faktorov, na ich vzájomnú akumuláciu.

### **4.2.1 Kultivácie v Erlenmayerových bankách**

Pozorovanie vplyvu osvitú na akumuláciu oboch zásobných polymérov bolo spojené s limitáciou makronutrientu, konkrétne dusíka v minerálnom médiu M220, ktorého zloženie je uvedené v kapitole 3.2. Podstata spočíva v takej koncentrácii dusičnanov v médiu, aby došlo k ich vyčerpaniu až po dostatočnom náraste kultúry. Tá potom ako reakciou na túto deficienciu vstupuje do stavu chlorózy, charakterizovaného akumuláciou zásobných polymérov [72–74].

Pôvodnou ambíciou bolo tento vplyv sledovať u oboch použitých kmeňov zároveň aj vo fosfor limitujúcom médiu BG-11, nakoľko tento druh stresu taktiež vyvoláva akumuláciu PHB, hoci neevokuje degradáciu fotosyntetických aparátov a vstup do dormantného chlorotického stavu [160]. Kultivácia sledujúca oba nutričné deficity u oboch kmeňov bola zahájená (príloha 4), z dôvodu atypického správania sprevádzaného pomalým rastom, úplným vynechaním tmavozelenej fázy rastu, zhlukovaním na dne a následným prechodom do žltého sfarbenia bola po takmer 3 týždňoch ukončená. Z časového hľadiska súvisiaceho s dlhým rastom kultúr, potrebou veľkého množstva kultúry v dobrej kondícii pre štatisticky významné výsledky, ale hlavne z technických príčin spojených s dlhodobou nefunkčnosťou kultivačnej lampy chybou dodávateľa, bol vzťah medzi spomínanými polymérmi sledovaný iba v spojení s dusíkovou deficienciou.

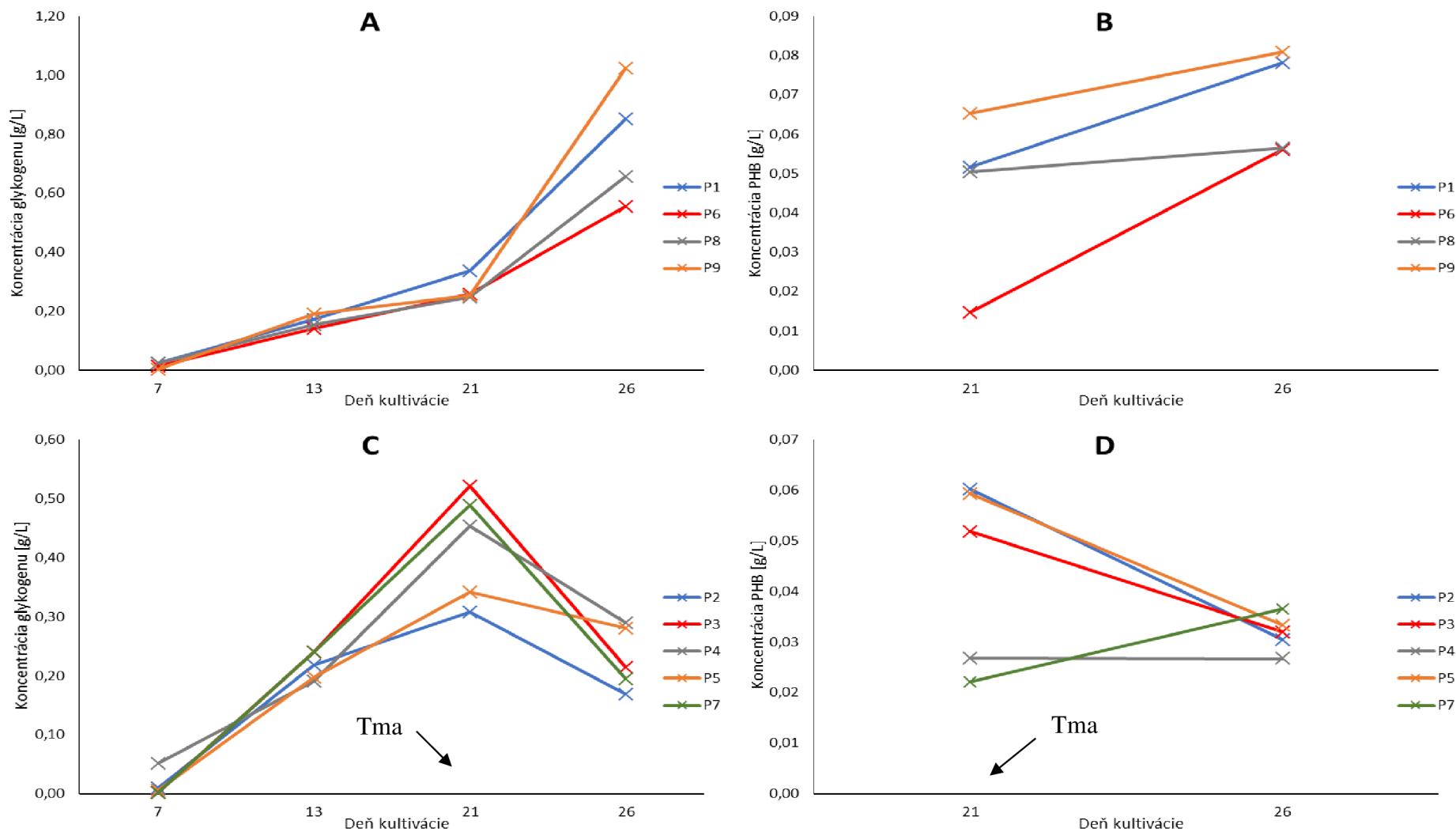
Experiment bol prevedený s 9 kultiváciami z každej kultúry, ktoré boli kvôli uniformite zaočkované tak, ako je popísané v kapitole 3.2.1. Predošlé skúsenosti ukázali (príloha 5), že pri očkovaní pokusných kultúr individuálne vedie k veľkému rozdielu vo fáze rastu medzi jednotlivými kultiváciami, čo je pravdepodobne spôsobené kombináciou väčšieho množstva

malých odchýliek. Menovite by mohlo ísť o miernu nehomogenitu inokulačnej kultúry, malé objemové odchýlky média či očkovacej kultúry, rôzne uhly dopadu lúčov iluminačnej lampy atď. Kombinácia týchto malých odchýliek môže pri kultivácii trvajúcej 3-4 týždne spôsobiť veľké rozdiely. Spôsobom popísaným v experimentálnej časti sa podarilo dosiahnuť výrazne menšie rozdiely (príloha 6). Počas rastu boli pravidelne obmieňané ich polohy a pred tmavou (a svetlou) fázou boli navyše kultúry rovnomerne prerozdelené na základe farby.

Ako je vidno z obrázku 14, hladina glykogénu je u *Synechocystis* sp. PCC 6803 rozdielnymi podmienkami ku koncu kultivácie veľmi výrazne ovplyvnená. Zaujímavé je, že po prvom týždni kultivácie bola veľmi blízka nule. To môže byť spôsobené faktom, že sa kultúry najprv v prvé dni prispôbovali novým podmienkam, najmä vyššej koncentracii živín, a nie samotnému rastu. U tejto kultúry bolo v prvé 2-3 dni po preočkovaní pozorované výrazné zhľukovanie na dne pri centre banky. Toto správanie však u zdravých kultúr nepresahovalo nikdy trvanie 3 dní a malo skôr charakter „oblaku“, bez viditeľného ohraničenia, než vločkovania, prítomného u kontaminovaných kultúr (príloha 7). Kvantifikácia však mohla byť pri takto nízkej koncentracii aj pomerne nepresná z dôvodu použitia staršieho HPLC prístroja s vyššími limitmi detekcie. Najprudkejší nárast je pozorovaný medzi 7. a 13. dňom, miernejší rast (v závislosti od konkrétnej kultivácie) zase medzi 13. a 21. dňom rastu. V tomto bode boli odobraté aj vzorky na analýzu PHB, približne polka kultúr ponechaná pri iluminačnom cykle 16h svetlo/8h tma (ďalej len štýlom 16/8) a druhá časť bola presunutá na 5 dní do tmy.

Je pozorovateľné, že u kultúr vystavených iluminácií došlo za týchto 5 dní takmer k zdvojeniu koncentrácie glykogénu (obrázok 14 A) voči predošlému nárastu za 21 dní. Zmena svetelných podmienok experimentu bola zahájená približne 3 dni od začiatku pozorovania žltňuceho procesu (chlorotického deja). To indikuje, že energia a uhlík získavaný prostredníctvom fotosyntézy až do vyčerpania dusíkatých zásob boli využívané na bunečné metabolické deje a bunečné delenie. Po skončení dusičnanov v médiu ale začali bunky akumulovať vnútrobunečné uhlikaté zásoby do glykogénového poolu, ktorý by mal počas dormantného štádia (s nefunkčnými fotosystémami) slúžiť na udržiavanie reziduálneho metabolizmu. Tento experiment zároveň podporuje už viackrát spomenutý fakt, že počas chlorózy cyanobakteriálne bunky akumulujú glykogén [72–74]. U kultúr presunutých do prostredia bez iluminácie (obrázok 14 C) došlo k viac či menej výraznému poklesu. Z toho vyplýva, že bunky začali svoje glykogénové zásoby eliminovať s cieľom zisku energie, keďže vykazovali nulovú fotosyntetickú aktivitu. Viacero štúdií už naznačilo úlohu glykogénu ako polyméru prispievajúcemu k udržiavaciemu (z angl. maintenance) metabolizmu v temných periódach. Na druhú stranu neboli žiadnymi štúdiami dokázané príspevky PHB v takýchto podmienkach [159].

Preto je prekvapivé, že u kultúr vystavených tme došlo k jeho výraznému poklesu (približne o polovicu). Povšimnutiahodné však je, že k tejto redukcii intracelulárnych zásob došlo iba u kultúr s jeho vyšším obsahom. Kultúra s najmenšou koncentraciou PHB dokonca zaznamenala mierny nárast a kultivácia s druhou najmenšou koncentraciou si ju zachovala. Z toho môže vyplývať, že bunky nechcú svoje intracelulárne polyesterové zásoby odbúrať pod istú kritickú hranicu. To načrtáva teóriu, že PHB musí plniť istú funkciu pri procese zvládania tohto druhu stresoru, alebo po jeho odznení.



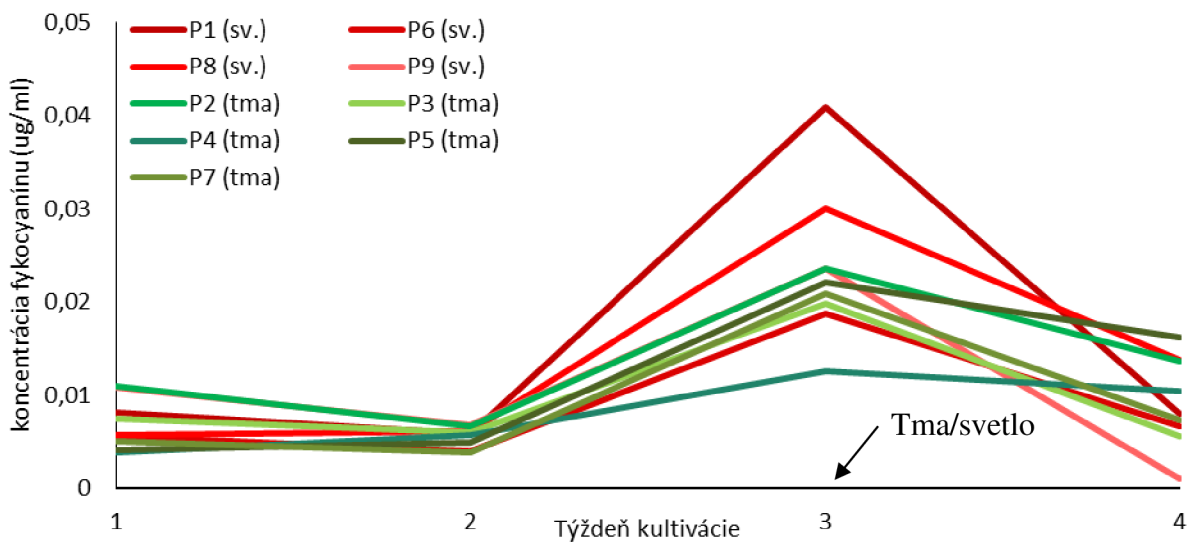
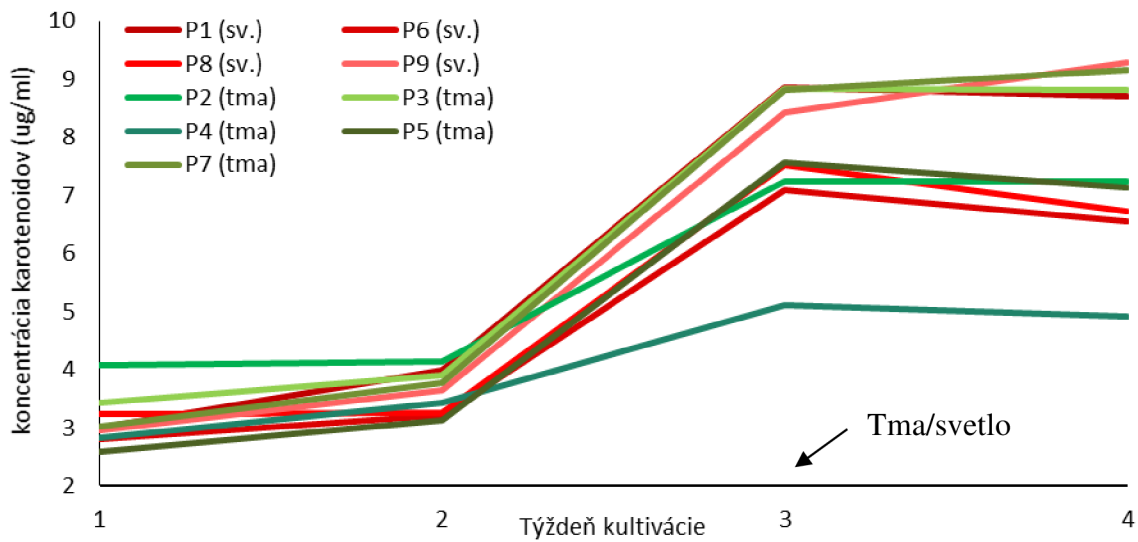
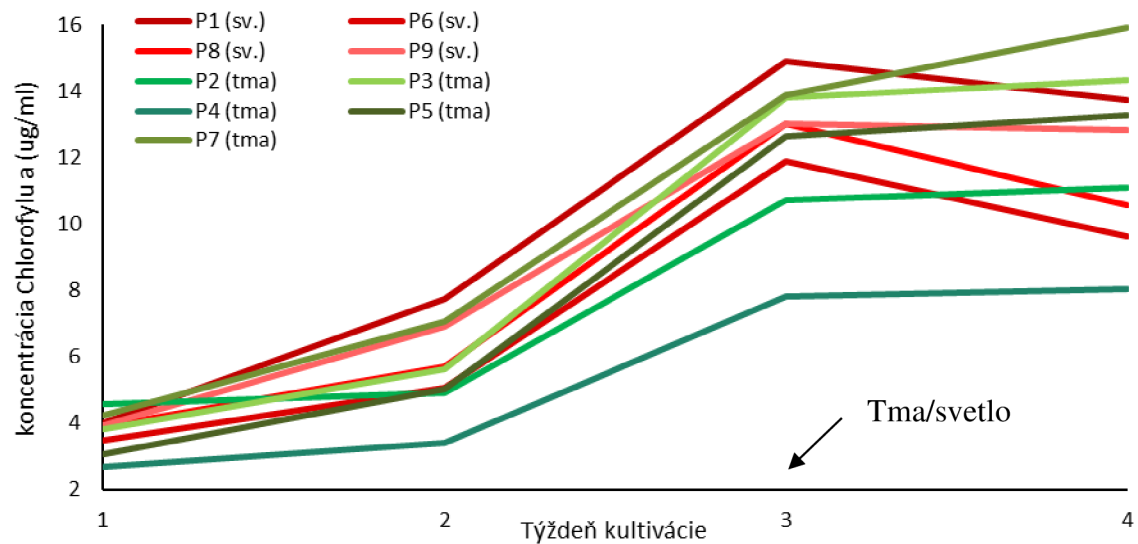
Obrázok 14 – Výsledky analýz koncentrácie glykogénu a PHB u *Synechocystis sp. PCC 6803*, na obrázkoch A (glykogén) a B (PHB) sú zobrazené kultúry, ktoré boli kultivované po celú dobu na svetle, na obrázkoch C (glykogén) a D (PHB) kultúry kultivované posledných 5 dní v tme. Chybové úsečky kvôli prehľadnosti v grafoch nie sú zobrazené.

Damrow a kolektív sledovali viabilitu mutantných buniek s vyradenými génmi kódujúcimi enzými metabolizmu glykogénu, PHA a oboch zásobných látok zároveň pri rôznych svetelných cykloch. Výsledkom bolo, že mutant neschopný syntézy PHB nemal výrazne ovplyvnenú viabilitu v porovnaní s WT, zatiaľ čo mutant postrádajúci glykogén s rastúcou dĺžkou tmavej periódy viabilitu výrazne stráca, s výnimkou nepretržitého osvetlenia. Kmeň neschopný akumulovať ani jeden z polymérov vykazoval znížený rast aj pri 24 hodinovej iluminácii a v porovnaní s mutantom s vyradeným metabolizmom glykogénu jeho životaschopnosť klesala výraznejšie aj pri režime 16/8, pri nastavení 12/12 už neprežil vôbec. To svedčí o tom, že oba tieto zásobné polyméry plnia esenciálnu úlohu z hľadiska fotoautotrofného metabolizmu, ale glykogén bude pravdepodobne hlavným zdrojom energie a uhlíka [75].

Naopak, u kultúry ponechanej na svetle došlo k miernemu nárastu hladiny PHB. Rozdiel bol pozorovateľný aj vizuálne (príloha 6), kedy u kultivácií s neustálym svetelným režimom 16/8 došlo k očividnému napredovaniu v procese chlorózy zo zeleno-žltej na žlto-hnedú farbu, zatiaľ čo u kultúry v tme došlo iba k minimálnej zmene farby oproti stavu pred zmenou svetelných podmienok. To je pravdepodobne spôsobené tým, že bunky vystavené iluminácii ešte absolujú posledné delenia a denaturujú svoje fotosystémy, ktoré nebudú počas chlorózy potrebné, nakoľko veľmi nízka spotreba ATP potrebná na udržiavanie reziduálneho metabolizmu bude kompenzovaná pomalým rozkladom glykogénu akumulovaného od začiatku nástupu chlorózy [72]. Naproti tomu bunky vystavené tme svoju degradáciu fotosyntetického aparátu spomaľujú až zastavia, rovnako ako buncné delenie, ktoré by vyžadovalo veľké energetické nároky a pomaly spotrebúvajú svoj glykogén. Fotosystémy sú pravdepodobne degradované iba v minimálnej miere, kvôli zisku esenciálnej hladiny dusíka na obnovu RNA a nevyhnutnú proteosyntézu. V prípade, že by sa iluminačné podmienky zmenili, boli by zvyšné fotosystémy schopné opäť generovať energiu a uhlíkatý zdroj.

Toto tvrdenie bolo potvrdené aj extrakciami cyanobakteriálnych farbív (obrázok 15). Na obrázku A je pozorovateľný pokles koncentrácie chlorofylu *a* u kultúr vystavených iluminácií, zatiaľ čo koncentrácia u kultúr v tme sa nezmenila, prípadne mierne narástla. Koncentrácia karotenoidov (B) zostala nezmenená, prípadne iba mierne poklesla. Keďže sa jedná poväčšine o čisto uhľikaté zlúčeniny [50], je logické, že nie je dôvod k ich odbúraniu v prítomnosti iných zásobných polymérov. Navyše plnia ochrannú funkciu voči fotooxidácií [51], takže ich prítomnosť je nevyhnutná vo svetelných podmienkach na ochranu reziduálnej fotosyntetickej aktivity a kultúry v tme si ich zachovávajú pre prípadnú zmenu svetelných podmienok. Obrázok C vyobrazuje pokles koncentrácie fykocyanínu u oboch druhov kultúr, u buniek vystavených konštantnej iluminácii je však podstatne výraznejšia a pravdepodobne taktiež súvisí s odbúraním pigmentov s cieľom zisku dusíka, podobne ako u chlorofylu *a*.

Počiatočný pokles/pomalý nárast koncentrácie všetkých pigmentov pozorovaných na obrázku 15 bol pravdepodobne spôsobený tým, že kultúry boli pri väčšine experimentov nezvyčajne svetlocitlivé. Hoci boli riedené na  $OD_{720}$  odpovedajúce vyše 0,8 a prvých pár dní počas aklimatizácie neboli vystavované priamemu žiareniu, po premiestnení pod iluminačnú lampu (s nižšou intenzitou než v minulosti) bolo po dvoch dňoch pozorovaný prechod do svetlejších zelených odtieňov. To indikovalo mierny úhyn kultúr a tie museli byť na ďalších pár dní premiestnené mimo priame žiarenie. Kultúry navyše dosahovali v konečných fázach



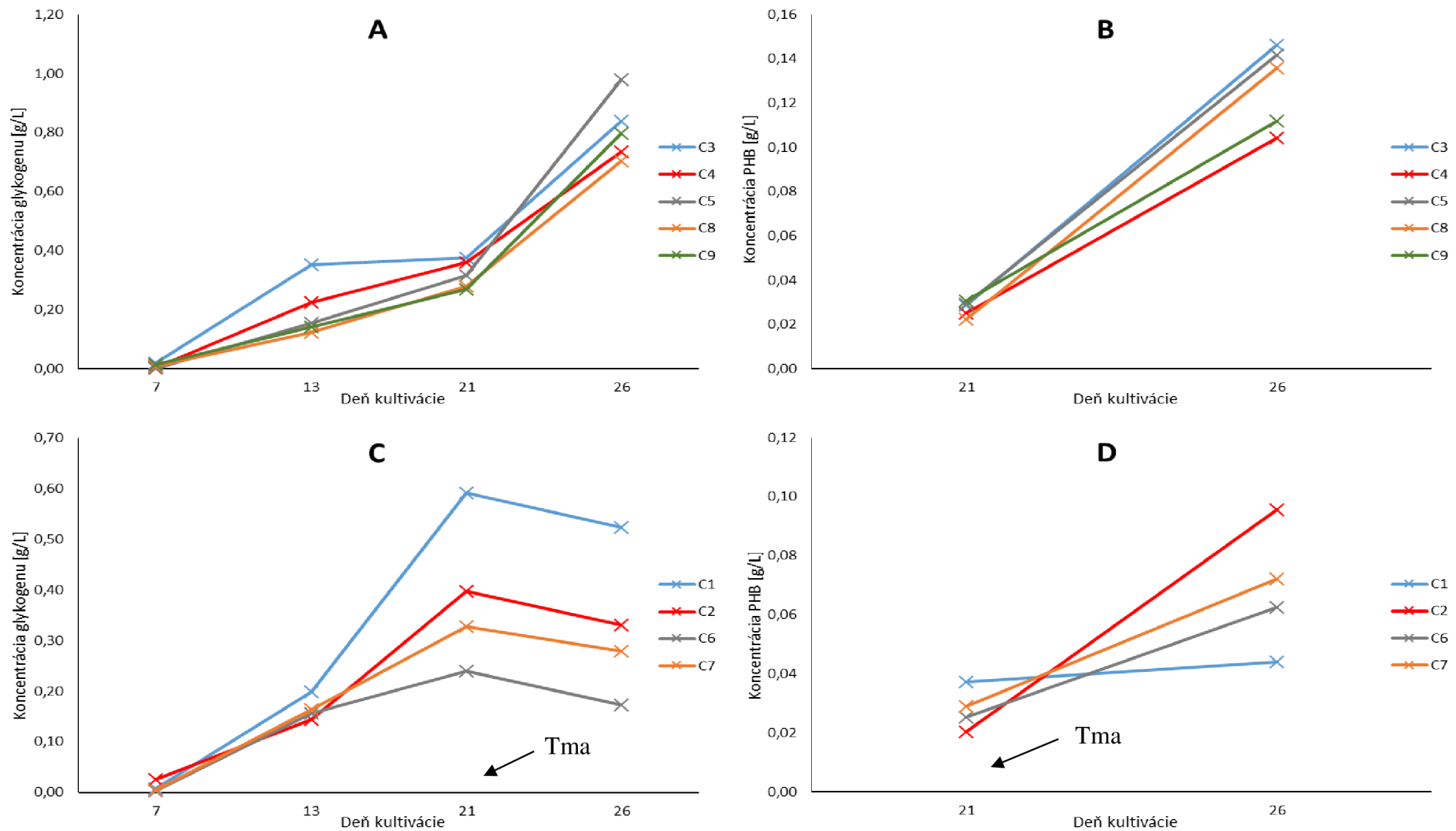
Obrázok 15 – Extrakcie cyanobakteriálnych pigmentov sledujúce zmenu ich koncentrácie pri rozličných iluminačných podmienkach. Kultúry v hnedo-červených odtieňoch (P1, P6, P8 a P9) boli vystavené celý čas režimu 16/8, ostatné, v zelených odtieňoch boli posledných 5 dní kultivované v tme. A – koncentrácia chlorofylu a, B – karotenoidov, C – fykocyanínu.

exponenciálnej fáze rastu  $OD_{720}$  približne v rozmedzí 3,5-4, zatiaľ čo v minulosti bolo zvykom dosahovať hodnoty bližšie sa 7.

Damrow a kolektív [75] navyše sledovali u mutantov dráh smerujúcich k týmto zásobným polymérom schopnosť aklimatizácie na dusíkovú deficienciu. Mutanti s narušenou glykogénovou dráhou vykazovali neblednuci fenotyp (poškodený chlorotický prechod) a „spilling“ čiastočne oxidovaných uhlikatých kyselín, ako 2-oxoglutarát či pyruvát, kvôli nemožnosti ich ukladania v podobe glykogénu. Neschopnosť prechodu do chlorotického stavu vyplýva pravdepodobne z neschopnosti ukladania dusíkatých zásob vo forme cyanoficínových granúl. Všetky tieto charakteristiky boli pozorované aj u dvojitého mutantu glykogén/PHB, zatiaľ čo samotná delécia génu pre PHB nevyústila v rozdiely z hľadiska prechodu do stavu chlorózy a akumulácie glykogénu a cyanoficínu, ani z hľadiska prebúdzania sa z tohto dormantného stavu a glykogénového odbúravania. To potvrdzuje, že glykogén hrá oveľa významnejšiu rolu vo všetkých zatiaľ pozorovaných situáciách a úloha PHB zostáva neobjasnená. Z hľadiska jeho produkcie je však dôležité spomenúť, že mutant  $\Delta glgC$  presmerovával časť nadbytočného uhlíka do polyesterových zásob, čo vyústilo v koncentráciu v sušine približne o 5% vyššiu, než u WT.

U druhej kultúry, *Synechocystis salina* CCALA 192, ktorej výsledky sú vyobrazené na obrázku 16, zdá sa došlo k menej výrazným odchýlkam pri zmene svetelných podmienok. Prírastok glykogénu do 7. dňa kultivácie bol taktiež veľmi nízky a teda pravdepodobne neefektívne detekovateľný použitým prístrojom, medzi 7. a 13. dňom kultivácie bol mierne nižší, než v nasledujúcom týždni. Po rozdelení kultúr na svetlo a do tmy dosiahli bunky pri 16 hodinovej iluminácii mierne vyšších koncentrácií glykogénu, ako tomu bolo u prvého kmeňa. Tie umiestnené do tmy však reagovali výrazne menším poklesom hladiny glykogénu a u väčšiny z nich bol pozorovaný aj nárast hladiny PHB. Dosiahnutá koncentrácia síce nedosiahla taký nárast, ako u buniek na svetle, v porovnaní s kultúrou *Synechocystis sp.* PCC 6803 sa však môže rovnať aj neustále osvetleným kultúram. Najdôležitejším zistením však je, že vzhľadom na neprítomnosť svetla a tým pádom nefunkčnosť fotosyntetických aparátov nie je iné vysvetlenie ako to, že uhlík ukladaný do polyesterových zásob pochádzal práve z glykogénu. Zaujímavé je, že kultúra, ktorá dosiahla najvyššej koncentrácie glykogénu (obrázok 16 C a D, kultivácia C1), však jeho odbúravaním dosiahla najmenší nárast PHB, napriek počiatkovej najvyššej koncentracii. To môže indikovať, že u tohto kmeňa dochádza k prevodu glykogénu na PHB pri nižších koncentráciách glykogénu, ako príprava na dlhodobější „hlad“ bez prístupu svetla pri poklese na istú hladinu glykogénu. Ďalšie vysvetlenie načrtáva Jendrosek a kolektív [161], ktorí pozorovali možnú úlohu PHB ako štruktúrneho komponentu počas rovnomerného delenia bakteriálnych nukleotidov. To by mohlo znamenať, že po obnovení vhodných podmienok by mohlo PHB slúžiť ako zdroj energie a uhlíka novovzniknutým dcérskym bunkám a nie priamo materskej bunke.

Vzhľadom na tieto zistenia mal byť zahájený ďalší experiment v Erlenmayerových bankách, ktorého cieľom bolo jednak sledovať hladinu glykogénu a PHB v kratších úsekoch počas chlorózy, aby bol lepšie dedukovateľný ich vzájomný prechod, a zároveň po niekoľkých dňoch dusíkovej deficiencie presun buniek do čerstvého média M220 a následné pozorovanie hladiny týchto dvoch zásobných polymérov. Bohužiaľ kvôli úhynu kultúr určených na tieto experimenty vplyvom spomínanej fotosenzibility (príloha 8) z nevysvetliteľných príčin, sa



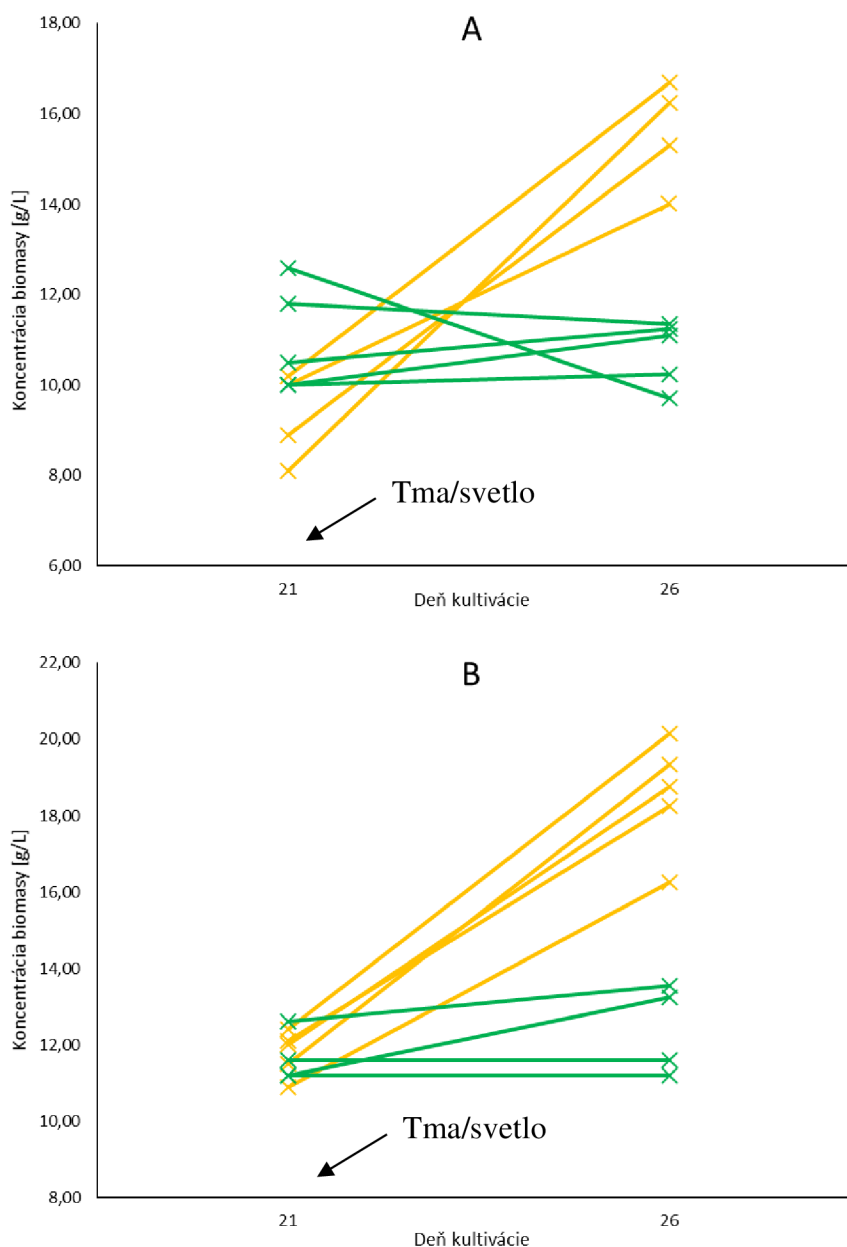
Obrázok 16 - Výsledky analýz koncentrácie glykogénu a PHB u *Synechocystis salina* CCALA 192, na obrázkoch A (glykogén) a B (PHB) sú zobrazené kultúry, ktoré boli kultivované po celú dobu na svetle, na obrázkoch C (glykogén) a D (PHB) kultúry kultivované posledných 5 dní v tme. Chybové úsečky kvôli prehľadnosti v grafoch nie sú zobrazené.



tento experiment z časových dôvodov nedokončil. Do budúca by ale toto pozorovanie bolo vhodné uskutočniť.

Extraktie cyanobakteriálnych farbív ukázali podobné trendy ako u rodu *Synechocystis* sp. PCC 6803, kedy u kultúr kultivovaných posledné dni v tme nedošlo k výrazným poklesom ich koncentrácie. Vzorky naďalej vystavené iluminácii zaznamenali mierne poklesy vplyvom pokračujúceho prechodu do chlorotického stavu a odbúravaním fotosystémových proteínov.

Obrázok 17 zobrazuje vplyv osvetlenia na hladinu biomasy u oboch použitých kultúr.



Obrázok 17 – Hladina biomasy u použitých kultúr – na obrázku A *Synechocystis* sp. PCC 6803 a na obrázku B *Synechocystis salina* CCA 192. Žltou farbou kultúry ponechané po celú dobu kultivácie na svetle, zelenou kultúry vložené ku koncu kultivácie do tmy.

Zo získaných dát je viditeľné, že u kultúr kultivovaných v tme dochádza poväčšine k minimálnemu nárastu, prípadne stagnácii v raste či k miernemu poklesu koncentrácie. Tento

trend sa medzi dvoma kmeňmi vzájomne príliš nelíši, *Synechocystis salina* CCALA 192 dosiahla z kvantitatívneho hľadiska mierne vyšších koncentrácií, rozdiel však nie je markantný. Nárast hmotností biomasy u kultúr na svetle je pravdepodobne spôsobený tým, že podľa literatúry dochádza pred vstupom do dormantného stavu k poslednému deleniu buniek a reziduálna aktivita fotosyntetického systému ako aj väčšina metabolických dráh začína smerovať k ukladaniu všetkého prítomného uhlíka do zásob v podobe polymérov [72].

#### 4.2.2 Kultivácie v Multikultivátore (MK)

Kultivácie cyanobakteriálnych kultúr boli v MK realizované tak, ako je popísané v kapitole 3.2.2. Multikultivátor by mal mať oproti Erlenmayerovým bankám viacero výhod, najmä z hľadiska efektivity a vyrovnanosti osvetlenia a intenzívnej aerácie sterilným vzduchom v porovnaní s prostou difúziou plynov cez štuple EB. Časom a skúsenosťami sa ukázalo, že tieto výhody sa stali skôr nevýhodami, čo mohlo čiastočne byť spôsobené aj starším typom prístroja, ale aj drobnými odchýlkami pri zakladaní kultivácie. Vznik neuniformity popisovanej v kapitole 4.2.1 v prípade Erlenmayerových baniek sa prejavoval u kultivácií v MK ešte omnoho výraznejšie. Rast najkrajšej (najuniformnejšej) kultivácie je pre grafickú predstavu v prílohe 9. Dôvodov, ktoré túto nejednotu kultivácií spôsobovali, je hneď viacero a opäť sa pravdepodobne jedná o mnoho malých odchýliek spôsobujúcich počas 3-4 týždňovej kultivácie na konci markantný rozdiel.

V prvom rade asi dochádzalo k veľmi minimálnym rozdielom už pri očkovaní, napriek používaniu sterilných odmerných válcov na dávkovanie média a pipiet na očkovanie kultúry. Kultivačné skúmavky nemali vždy úplne presné rozmery (najmä hrúbka steny), hoci sa na pohľad zdali takmer identické, po zaočkovaní kultúry bola hladina v niektorých z nich viditeľne v odlišnej výške. To spôsobovalo odlišnú výšku stĺpca plynu v kultivačnej nádobe a teda asi aj mierne odlišné plynové zloženie a distribúciu. Aerácia bola navyše relatívne obtiažne regulovateľná, jednak z dôvodu potreby veľmi citlivých ventilov, kedy pri miernej zmene polohy ventilu jednej kultivácie došlo k ovplyvneniu aerácie všetkých ostatných. Ďalším problémom, ktorý bol neskôr vyriešený inštaláciou externého ventilu v laboratóriu, bola nestálosť tlaku aeračného vzduchu pravdepodobne spôsobovaná vplyvom poklesu/nárastu tlaku v celoškolskom prívode v závislosti na aktuálnej spotrebe. Kvôli úplnému zastaveniu aerácie počas víkendov a úhynu buniek boli 2 kultivácie úplne zrušené.

Okrem toho bola obrovským problémom sedimentácia u oboch kultúr na spodku kultivačných skúmaviek. Kvôli snahe o elimináciu tohto problému boli aeračné sklenené trubičky umiestňované čo najbližšie ku dnu, aby prebublávací vzduch sediment rozháňal. To však problém riešilo iba lokálne v jej tesnej blízkosti. Možnosťou bolo snažiť sa jemnými pohybmi aeračnou trubičkou sediment rozháňa. Tá je však značne krehká a ľahko sa môže pri manipulácii zlomiť, čo znamená koniec kultivácie, pretože sterilná výmena nie je možná. Usadzovanie spôsobovalo teda značné odchýlky, nakoľko ovplyvňovalo koncentráciu buniek v zmesi a spôsobovalo odchýlky pri odberoch vzoriek na analýzu zásobných polymérov. Hoci bola pri každom odbere zmes „prefúknutá“ sterilnou odberovou striekačkou, sediment bol relatívne pevný a týmto krokom neovplyvnený.

Problém predstavovalo aj odparovanie kultúry počas kultivácie. Zhruba 1/3 objemu média (odhad) sa z tohto dôvodu počas kultivácie stratila, preto neboli u týchto experimentov realizované stanovenia farbív, ale iba zásobných polymérov. Iluminácia prostredníctvom

zabudovaných žiariviek pravdepodobne taktiež nebola úplne homogénna, nakoľko bol v niektorých pozíciách pravidelne sledovaný rýchlejší rast ako v iných. Konštrukcia multikultivátoru navyše nedovoľuje vypnutie osvetlenia v niektorých pozíciách, zatiaľ čo by ostatné naďalej svietili. To výrazne sťažuje porovnávanie kultúr v tme a vo svetle, pretože si to z dôvodu iba jedného použiteľného MK vyžaduje samostatné kultivácie, ktoré sa z vyššie uvedených dôvodov budú v čase vstupu do chlorotického stavu výrazne navzájom odlišovať. V neposlednom rade je nevýhodou aj to, že aeračná trubica, ktorou prechádza sterilný vzduch je z plastového materiálu, čo znemožňuje jej steriláciu v autokláve a prevádzaná chemická sterilácia nie je úplne ideálna, čo môže vyústiť v kontamináciu. Tá je navyše u aerovaných kultúr ťažko pozorovateľná, keďže vločky vznikajúce a identifikujúce kontamináciu (príloha 7) nie sú viditeľné.

Vyššie uvedené dôvody spôsobovali výrazné (oveľa razantnejšie než u kultivácií v Erlenmayerových bankách) odchýlky aj medzi duplikátmi (triplikátmi), aj napriek snahe o ich redukciu rovnakým postupom ako u EB (nariedenie v sterilnej fľaši Pyrex na isté OD a následné rozlievanie sterilným valcom do kultivačných skúmaviek namiesto pipetovania istého objemu kultúry do istého objemu sterilného média). Na základe týchto skúseností je odporúčané budúce experimenty v tomto modeli MK zameriavať napríklad skôr na overenie produkcie kopolymérov v prítomnosti rôznych uhľkatých substrátov (čo bolo v neskorších fázach práce aj realizované), ako na porovnávanie kultivácií navzájom. Obzvlášť sa to týka situácie sledovania vplyvu osvetlenia pri nemožnosti výberu iluminácie len v niektorých polohách. Čiastočne by tento problém mohol byť vyriešený zaradením ďalšieho MK. Podmienky medzi nimi by sa síce taktiež čiastočne odlišovali, ale už aj fakt, že by boli kultivácie založené z rovnakej kultúry, by mohol vzniknuté odchýlky znížiť.

Výsledky získané kultiváciami v MK sa teda často výrazne odlišujú, u niektorých viac, u iných pomenej. Nakoľko často vstupovali kultúry do stavu chlorózy v iné dni, a odbery boli realizované v inom intervale, budú niektoré porovnania zobrazované vo viacerých grafoch.

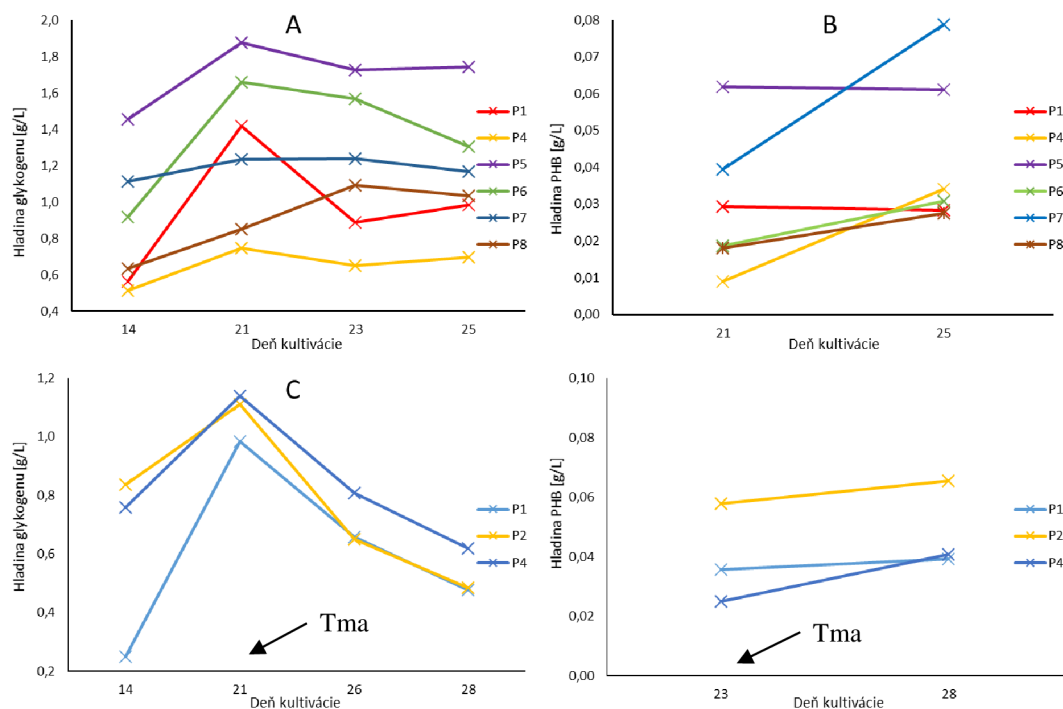
#### 4.2.2.1 Fotoautotrofné kultivácie

Ako prvé boli realizované fotoautotrofné kultivácie. Prvým pokusom bolo kultivovať obe kultúry naraz, kedy sa dospelo k záveru, že to nie je možné, nakoľko kultúra *Synechocystis* sp. PCC 6803 bola rastom o niekoľko dní popredu a pri dosiahnutí chlorózy druhou kultúrou už boli bunky mŕtve. Následné kultivácie teda už boli už realizované vždy iba s použitím jedného druhu, keďže tmavé fázy bolo potrebné zahájiť približne po začiatku chlorotického prechodu. Porovnanie vplyvu osvetlenia u oboch kultúr je zobrazené na obrázkoch. Niektoré merania boli kvôli veľmi atypickému správaniu z grafov vylúčené.

##### ***Synechocystis* sp. PCC 6803**

Ako je vidieť z obrázka 18, rast kultúry *Synechocystis* sp. PCC 6803 vo svetle (obrázky A a B) bol veľmi neuniformný čo sa týka dosiahnutej hladiny glykogénu aj PHB, ako aj z hľadiska trendov v ich priebehu. Hoci sa jednalo o absolútne replikáty očkované rovnakým spôsobom a kultivované v rovnakých podmienkach vedľa seba, kultúra s najvyšším obsahom glykogénu (P5) dosiahla v niektorých dňoch až takmer štvornásobok jeho hladiny v porovnaní s kultúrou s najmenším obsahom (P4). Neuniformita sa odrazila aj na obsahu PHB, kedy

u niektorých kultúr bol pozorovaný mierny nárast (P4, P6, P7 a P8) v rámci 5 dní počas chlorotického stavu, u ostatných bola jeho hladina skôr stagnujúca, takže kultúra sa pravdepodobne už nachádzala v neskorej fáze dormantného stavu. U nasledujúceho pokusu sledujúceho vplyv tmy na akumuláciu oboch polymérov (Obrázok 18 C a D) kultúra P3 po zaočkovaní z neznámych dôvodov (pravdepodobne zastavenia oxygenácie počas víkendu) uhynula, trend ostatných kultúr dopadol však obdobne ako u kultivácií v EB. Hladina glykogénu po umiestnení do tmy výrazne klesla u všetkých kultivácií, na rozdiel od tých



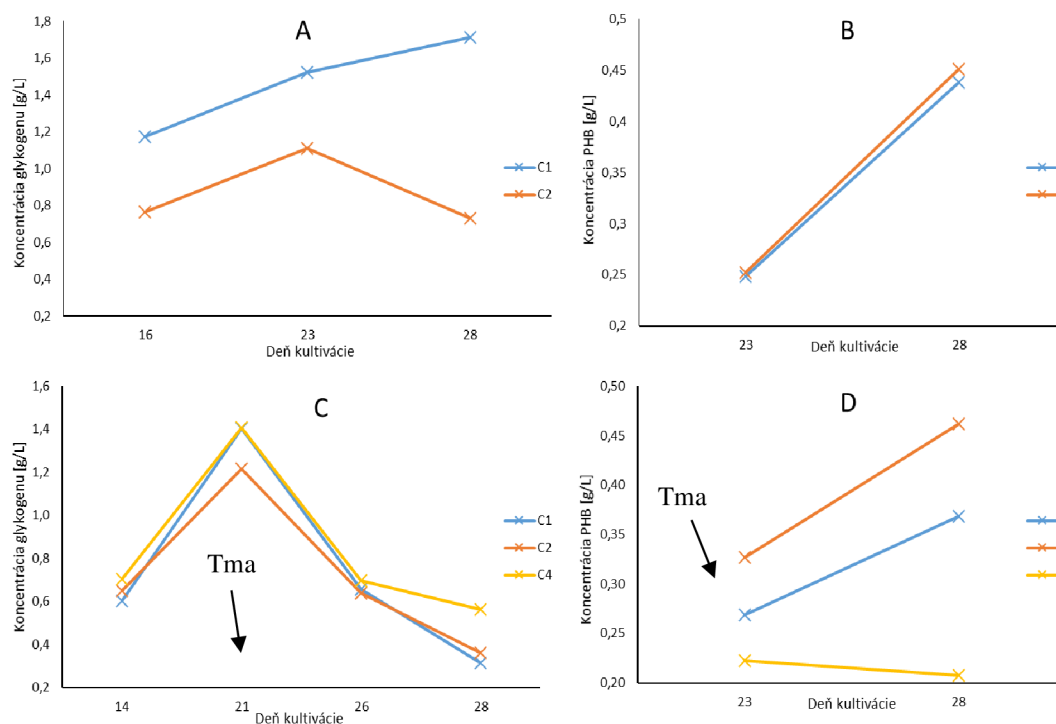
Obrázok 18 - Akumulácia zásobných polymérov u *Synechocystis sp. PCC 6803* (A, B – svetlo počas celej kultivácie, C, D – tma počas posledných 5 dní)

prevádzaných v Erlenmayerových bankách však došlo k miernemu nárastu a nie k poklesu v dosiahnutej hladine PHB. Rozdiel mohol byť spôsobený tým, že rast v MK bol sprevádzaný svetelným režimom 24/0 a nie 16/8. Pri upriamení pozornosti na konkrétne hodnoty dosiahnutej koncentrácie je však povšimnutiahodné, že u kultivácií v MK bola prvotná hladina PHB pred zahájením temnej fázy nižšia (u kultivácií P1 a P4) a zaznamenala mierny nárast na približne rovnakú koncentráciu (zhruba 0,04 g/L), na akú dosiahli kultúry v EB pokles (obrázok 14 C a D). To by mohlo potvrdzovať teóriu vyslovenú vyššie, že *Synechocystis sp. PCC 6803* sa pri vystavení stresu v podobe zastavenia iluminácie v spojení s dusíkatou limitáciou snaží udržiavať istú minimálnu bazálnu koncentráciu PHB. Tá bude pri ukončení expozície tomuto druhu stresoru plniť istú funkciu, pravdepodobne ako energetický a uhlikatý zdroj pre prvé delenia po vyčerpaní hladiny glykogénu na udržiavanie reziduálneho metabolizmu buniek v stave chlorózy.

Trend rastu glykogénu bol pravdepodobne u oboch kultúr skreslený tým, že dosiahli vyšších koncentrácií skôr, ako u kultivácií v EB, preto v posledné dni, kedy bola ich hladina sledovaná najviac, už nebol prírastok tak markantný, ako u kultivácií na trepačkách. Pokles trendu pri presune do tmy je však obdobný.

### *Synechocystis salina* CCALA 192

U kmeňa *Synechocystis salina* CCALA 192 bola situácia z hľadiska akumulácie PHB opäť mierne odlišná. Ukončenie iluminácie u dvoch kultúr (C1 a C2 obrázok 19 D) opäť znamenalo nárast jeho koncentrácie, u jednej kultúry, ktorá bola rastom mierne popredu, došlo k nevýraznému poklesu. Pri zameraní sa na dosiahnuté hodnoty PHB v g/L sú však pozorovateľné dve zaujímavé zistenia: dosiahnutá hladina polyesteru u kultivácií v tme a vo svetle bola približne rovnaká, ale v porovnaní s kultúrami rastúcimi v EB dosiahla 3-4 krát vyššie hodnoty. Prvý spomenutý faktor mohol byť jednoducho spôsobený tým, že kultivácie neprebíhali naraz a neboli očkované z tej istej kultúry a teda sú ťažko z tohto hľadiska porovnateľné. Zaujala však druhá spomenutá informácia, pretože tieto dve fotoautotrofné kultivácie dosiahli po 5 dňoch bez iluminácie v prepočte 22,75% a 24,20% CDW (z angl. Cell Dry Weight) obsah PHB. To bola jedna z najvyššie dosiahnutých koncentrácií pri autotrofných kultiváciách [133]. U kultúr nevystavených stresu v podobe tmy bola dosiahnutá hladina 18,31% a 18,76% CDW. Keďže je naozaj náročné porovnávať koncentrácie a trendy rastu/poklesu dosiahnuté u experimentov neprebíhajúcich súčasne, nakoľko mohli byť kultúry v dané odberové dni v inej fáze rastu, je nemožné vyvodzovať z tohto pozorovania závery o pozitívnom vplyve na akumuláciu PHB. Vyššej koncentrácie bolo dosiahnuté v prípade kultivácie vystavenej tomuto stresoru, avšak trend nárastu bol prudší u kultivácie pri 24 hodinovej iluminácii. Pre overenie tohto vplyvu by bolo vhodné využitie MK s možnosťou voľby pozícií, ktoré by boli osvetľované, prípadne kultivácia v dvoch MK zároveň, pričom by bol jeden z nich na posledných 5-7 dní uložený do tmy. Ideálne by taktiež bolo, keby boli objemy kultivačných skúmaviek väčšie, pretože pri maximálnom objeme 80 ml, pri ktorom sa pracovalo, kedy príde navyše k odparu zhruba 30 ml vplyvom aerácie a pri potrebe odberu



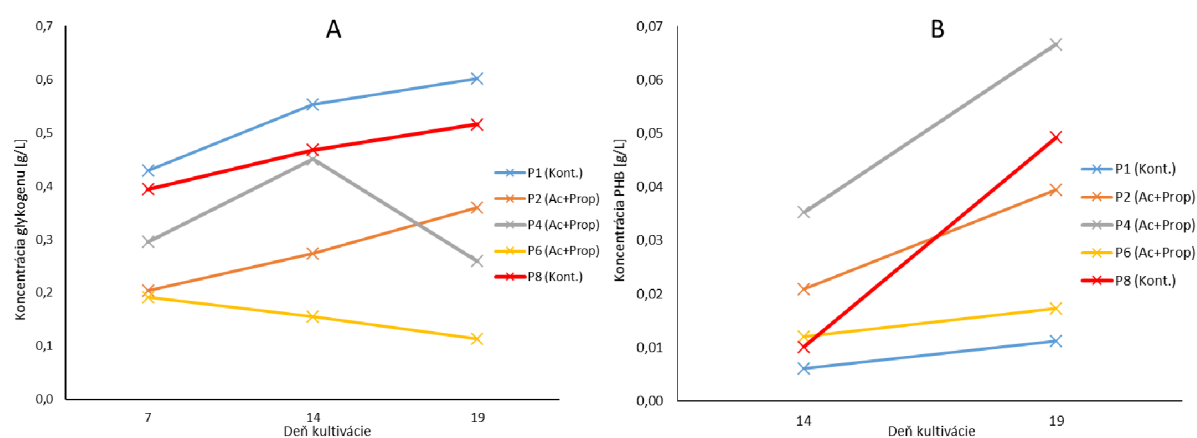
Obrázok 19 – Akumulácia zásobných polymérov u *Synechocystis salina* CCALA 192 (A, B – svetlo počas celej kultivácie, C, D – tma počas počas posledných 5 dní)

10 ml kultúry na jednu analýzu koncentrácie PHB nie je viac odberov možných, nehovoriac o analýze duplikátov.

Keďže toto vzájomné porovnávanie bolo diskutabilné a komplikované z hľadiska vyvodovania záverov, boli ďalej uskutočňované mixotrofné experimenty s cieľom sledovania ich vplyvu v kombinácií s 24 hodinovou ilumináciou na tvorbu PHA.

#### 4.2.2.2 Mixotrofné kultivácie

Ako snaha o zvýšenie dosiahnutej hladiny P3HB u *Synechocystis* sp. PCC 6803, prípadne pozorovanie tvorby kopolyméru s 3HV či 4HB, bola ako ďalší experiment prevedená mixotrofná kultivácia (24/0 po celú dĺžku experimentu) v prítomnosti acetátu v kombinácií s propionátom a acetátu v kombinácií s  $\gamma$ -butyrolaktómom. Výsledky tejto kultivácie sú uvedené na obrázku 20.

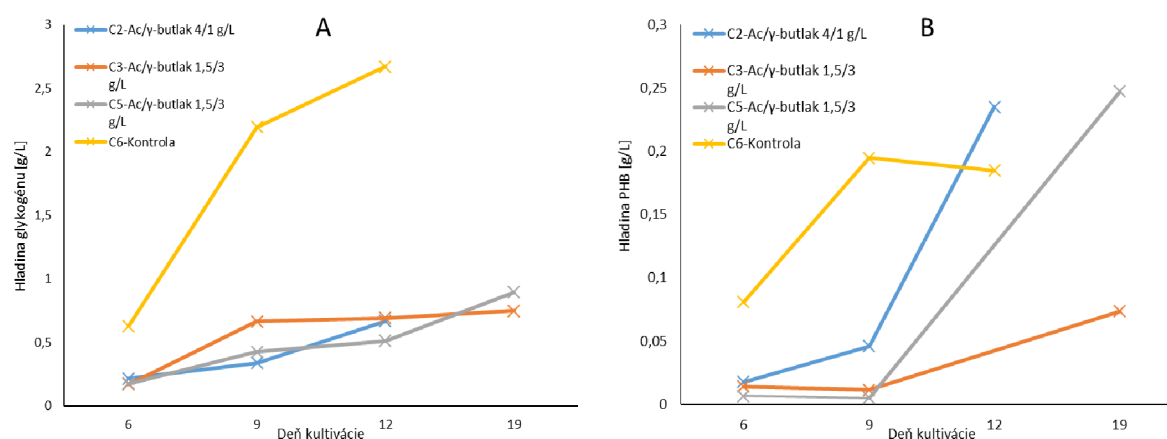


Obrázok 20 - Akumulácia zásobných polymérov (A - glykogén, B - PHB) u *Synechocystis* sp. PCC 6803 pri mixotrofnej kultivácii v prítomnosti acetátu v kombinácii s propionátom o koncentrácii 5g/L (P2, P4 a P6). Kultúry P1 a P8 boli kontroly kultivované fotoautotrofne, kultúry P3, P5 a P7 boli v prítomnosti acetátu a  $\gamma$ -butyrolaktónu o koncentrácii 5g/L, avšak po dvoch dňoch uhynuli.

Heterotrofné či mixotrofné kultivácie s prídavkami acetátu a propionátu v rôznych pomeroch sú častou metódou pri snahe o zahájenie tvorby kopolymérov s rôznym obsahom 3HV [133]. Rovnako tak bola u tohto druhu pozorovaná aj tvorba kopolyméru P(3-HB-co-4HB) o zložení až 43% 4HB pri kultivácii v prítomnosti acetátu a  $\gamma$ -butyrolaktónu [162]. Ani jedna z mixotrofných kultivácií nevyústila v tvorbu žiadnej inej monomérskej jednotky ako 3HB zakomponovanej do polymérnej štruktúry. U experimentov v prítomnosti laktónu navyše aj napriek optimalizácii kvôli popisovanej toxicite tohto prekursoru [162], kedy boli tieto kultúry riedené len na OD 0,8 až následne očkované do MK s príkrmom, došlo k ich úhynu. Rovnako tak v druhej mixotrofnej kultivácii v prítomnosti acetátu a propionátu nebola detekovaná prítomnosť 3HV monoméru. Na obrázku 20 B je vidno, že dosiahli mierne vyšších koncentrácií PHB, to bolo však pravdepodobne spôsobené tým, že kultúry rastom predbehli fotoautotrofné kultivácie (príloha 10). Zároveň bolo pri kultivácii pozorovateľné, že kultúry akumulovali menšej miere glykogén (obrázok 20 A) a taktiež preskočili typickú najtmavšiu žltu-hnedú fázu rastu. Hladina glykogénu a PHB ako aj ich výzor kultúr ale opäť potvrdili, že kultivácie nie sú absolútne uniformné. Koncentrácia glykogénu u kultúry P2 konštantne narastala, u P4 narástla

a následne prudko klesla a u P6 iba neustále klesala a koncentrácie PHB sú taktiež odlišné a v prípade neukončenia kultivácie by ich kontrolné kultúry pravdepodobne prekonalí.

Nakoľko tento experiment nevyústil v žiadnu tvorbu kopolymérov, ani v nárast hladiny polyesteru, nebola táto kultivácia prevádzaná aj s tmavou fázou na jej konci, nakoľko časové podmienky už umožňovali iba priebeh jedného cyklu MK. Druhý použitý kmeň dosiahol pri fotoautotrofných kultiváciách oveľa lepšie výsledky a preto bol podrobený obdobnému experimentu s cieľom produkcie kopolymérov. Výsledky sú vyobrazené na obrázku 21.

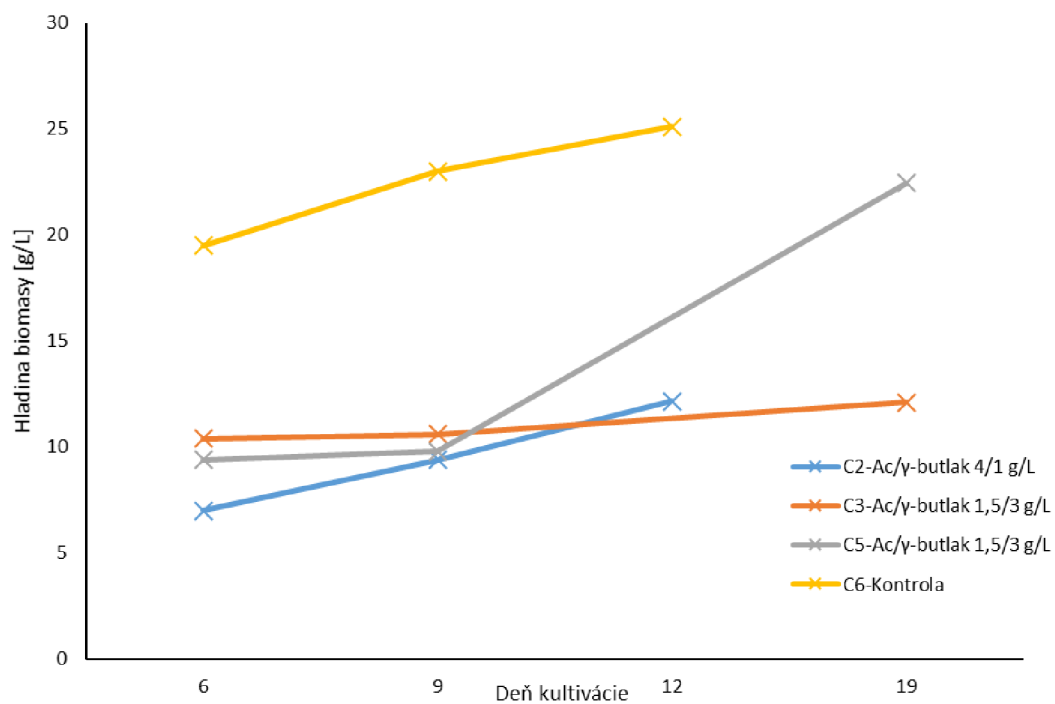


Obrázok 21 - Akumulácia zásobných polymérov (A - glykogén, B - PHB) u *Synechocystis salina* CCALA 192 pri mixotrofnej kultivácii v prítomnosti acetátu (4 g/L) v kombinácii s  $\gamma$ -butyrolaktónom o koncentracii 1 g/L (C2). Kultúry C3 a C5 mali iný pomer týchto uhľikových substrátov – acetát 1,5 g/L a  $\gamma$ -butyrolaktón 3g/L. Kultúra C6 bola fotoautotrofnou kontrolou.

Pred diskusiou výsledkov treba podotknúť, že kultúra C1 bola duplikátom C2, avšak pri analýze obsahu PHB došlo k odparu stanovovaných metylesterov v dvoch stanovovaných časových úsekoch a vzhľadom na nízku koncentráciu biomasy nebolo možné ju zopakovať. Do vzorky označenej ako C4 bola pridaná kyselina valérová (1 g/L) spolu s acetátom (4 g/L) ako pokus o tvorbu kopolyméru 4HV, avšak napriek tak nízkej koncentracii došlo k jej úhynu. Kultúry C2 a C6 navyše už na 12ty deň dosiahli na základe vizuálneho dojmu chlorotické maximum a boli preto ukončené skôr, C3 a C5 boli kultivované ešte ďalší týždeň.

Ani u tohto kmeňa nevyústila mixotrofná kultivácia v tvorbu požadovaného kopolyméru s monomérom 4HB, ktorú popisuje [162], napriek použitiu rôznych pomerov acetátu a laktónu. U kultúr síce nedošlo v jeho prítomnosti k bunečnej smrti, tak ako tomu bolo u *Synechocystis* sp. PCC 6803, na hladine glykogénu aj na základe faktu, že kultúra vyčerpala svoje dusikaté zásoby v médiu M220 až o týždeň neskôr je pozorovateľné, že ich rast bol jeho vplyvom výrazne spomalený. Odpovedá tomu aj hladina biomasy vyobrazená na obrázku 22. Ďalší cyklus pozorujúci vplyv zastavenia iluminácie na konci kultivácie nebol z časových dôvodov uskutočnený.

Pokusy o zisk kopolymérov boli teda neúspešné, pričom bola pozorovaná letálna toxicita  $\gamma$ -butyrolaktónu o koncentracii 4 g/L a kyseliny valérovej o koncentracii 1 g/L na použité cyanobakteriálne kmene.



Obrázok 22 – Hladina biomasy v kultiváciách kultúry *Synechocystis salina* CCALA 192 pri mixotrofných kultiváciách v prítomnosti acetátu (4 g/L) v kombinácii s  $\gamma$ -butyrolaktónom o koncentrácii 1 g/L (C2). Kultúry C3 a C5 mali iný pomer týchto uhľikých substrátov – acetát 1,5 g/L a  $\gamma$ -butyrolaktón 3g/L. Kultúra C6 bola fotoautotrofnou kontrolou.



## 5 ZÁVER

Cieľom tejto diplomovej práce bolo zaviesť metodiku pre kvantifikáciu glykogénu v cyanobaktériálnych bunkách a následne použitú metodiku aplikovať v rámci pozorovania vplyvu osvitú na hladinu glykogénu a poly(3-hydroxybutyrátu) ako dvoch rezervných polymérov vyskytujúcich sa u siníc. Tento vplyv bol pozorovaný u kultivácií v Erlenmayerových bankách (EB) aj multikultivátore (MK) v spojení s limitáciou makronutrientu – dusíka, ktorá u cyanobaktérií vyúsťuje v chlorózu.

Zavedenie postupu pre stanovenie hladiny glykogénu bolo realizované formou literárnej rešerše postupov vykonávaných širokou škálou autorov, ktoré sa od seba relatívne odlišovali, a optimalizáciou niektorých krokov pre naše konkrétne podmienky. Výsledkom bolo zavedenie postupu, ktorý v skratke pozostáva z krokov – premývanie biomasy, alkalická hydrolyza v prítomnosti roztoku KOH, precipitácia prídavkom podchladeného etanolu, premývanie vyzrážaného glykogénu ľadovým etanolom, sušenie, enzymatická hydrolyza s použitím amyloglukozidázy v acetátovom pufrí, Carrezova precipitácia, úprava pH a filtrácia od vyzrážaných bunčných komponentov a následná analýza pomocou HPLC. Kyslá hydrolyza je nevhodná z dôvodu neselektívneho rozkladu glykozidických väzieb, mechanická disrupcia buniek zase nedosiahne extrakciu glykogénu nachádzajúcu sa v nerozpustnej frakcii. Zavedenie tejto metodiky bolo spojené s optimalizáciou premývania etanolom, čo je autormi popisované ako kritický krok, nakoľko pri ňom dochádza k významným stratám. Experimentmi sa zistilo, že zavedenie dodatočného premytia etanolom za menšieho premývacieho objemu sa dajú straty znížiť takmer o polovicu (z 11,34 % na 5,96%), čo zlepšuje opakovateľnosť a presnosť metódy. Rovnako bola prevedená aj optimalizácia použitia amyloglukozidázy pre enzymatický rozklad glykogénu na glukózu, kedy sa ako dostačujúca (aj s miernou rezervou) určila koncentrácia 40,25 U/ml a jej pôsobenie po dobu 2,5 hodiny. Ako doplnková informácia bola potvrdená nevhodnosť termobloku pre tento enzymatický rozklad.

U kultúry *Synechocystis* sp. PCC 6803 pri kultiváciách v EB nedošlo vplyvom zastavenia osvitú v posledné dni kultivácie k zvýšenej akumulácii PHB. Naopak, hladina oboch zásobných polymérov zaznamenala u väčšiny výrazný pokles, u kultúr na svetle nárast. U všetkých kultivácií v tme však došlo k poklesu hladiny PHB na približne rovnakú hodnotu, čo naznačuje možnú rolu PHB pri reviiabilizácii z chlorotického stavu či opätovnej iluminácii. Extrakcie cyanobaktériálnych pigmentov ukázali, že kultúry kultivované bez osvitú si svoju hladinu chlorofylu *a* zachovali alebo prišlo k miernemu nárastu, hladina karotenoidov bola približne zachovaná u oboch situácií a koncentrácia fykocyanínu klesla v oboch prípadoch, ale u kultúr ponechaných celý čas na svetle bol tento trend výraznejší, čo potvrdzuje degradáciu fotosystémov vplyvom chlorózy.

V prípade *Synechocystis salina* CCALA 192 došlo vplyvom zastavenia osvitú k zvýšeniu koncentrácie PHB prevodom z glykogénu, avšak dosiahnutá hladina bola stále nižšia, než u kultúr ponechaných na svetle. Preto by bolo vhodné tento experiment zopakovať v neskoršej fáze chlorotického stavu, prípadne bunky po ukončení presunúť do čerstvého média a naďalej monitorovať hladinu zásobných polymérov, pre lepšie pochopenie ich funkcie. Tento experiment sa kvôli úhynu kultúr určených na toto pozorovanie vplyvom fotosenzitivity a nedostatočného časového priestoru už neuskutočnil. U oboch kmeňov bolo navyše pozorované, že hladina biomasy sa v tme nezvyšovala, zatiaľ čo u buniek v chlorotickom stave

došlo vplyvom reziduálnej fotosyntetickej aktivity ešte k jednému bunečnému deleniu a akumulácii zásobných polymérov, čo vyústilo v jej nárast.

Kultivácie v multikultivátore boli posúdené ako nevhodné z hľadiska pozorovania vplyvu osvitú na koncentráciu glykogénu a PHB z dôvodov veľkých odchýliek medzi duplikátmi/triplikátmi spôsobených radou malých rozdielov v kultivačných podmienkach. U *Synechocystis salina* CCALA 192 však bola pri fotoautotrofnej kultivácii dosiahnutá hladina 22,75% a 24,20% CDW PHB po vystavení tme, čo je jedna z najviac dosiahnutých koncentrácií. Následne bola u tohto kmeňa (kvôli nízkej hladine biomasy u *Synechocystis* sp. PCC 6803 sa s ňou ďalej nepracovalo) snaha o produkciu kopolymérov 4HB či 4HV v prítomnosti  $\gamma$ -butyrolaktónu či kyseliny valérovej. Ani v jednej kultivácii však neboli tieto prekurzory inkorporované do polyesterového reťazca, bol pozorovaný iba ich toxický vplyv, letálny/spomaľujúci rast biomasy.

Pre efektívnejšie posúdenie vplyvu osvitú s požitím MK je odporúčané previezť simultánnu kultiváciu v dvoch MK, ktoré budú očkované z tej istej inokulačnej kultúry a na konci bude v jednom z nich vypnuté osvetlenie, alebo ju previezť v MK umožňujúcom selektívne vypnutie osvetlenia len v niektorých pozíciách. Tým by sa mohlo dosiahnuť lepších a neskreslených výsledkov.

## ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] GARCIA-PICHEL, F. Cyanobacteria. In: *Encyclopedia of Microbiology* [online]. 3rd Editio. Tempe, USA: Academic Press, 2009, s. 107–124. ISBN 978-0-12-373944-5. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012373944-5.00250-9
- [2] VINCENT, W F. Cyanobacteria. In: *Encyclopedia of Inland Waters* [online]. Quebec, Canada: Elsevier, 2009, s. 226–232. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012370626-3.00127-7
- [3] PERCIVAL, Steven L a David W WILLIAMS. Cyanobacteria. In: *Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks* [online]. 2nd Editio. B.m.: Elsevier, 2014, s. 79–88. ISBN 9780124158467. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-415846-7.00005-6
- [4] HALLENBECK, Patrick C. Diversity of the Cyanobacteria. In: P.C. HALLENBECK, ed. *Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes* [online]. B.m.: Springer International Publishing Switzerland, 2017, s. 3–46. ISBN 9783319462615. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-46261-5
- [5] SINGH, Shailendra P. a Beronda L. MONTGOMERY. Determining cell shape: Adaptive regulation of cyanobacterial cellular differentiation and morphology. *Trends in Microbiology* [online]. 2011, **19**(6), 278–285. ISSN 0966842X. Dostupné z: doi:10.1016/j.tim.2011.03.001
- [6] HOICZYK, Egbert a Alfred HANSEL. Cyanobacterial cell walls: News from an unusual prokaryotic envelope. *Journal of Bacteriology* [online]. 2000, **182**(5), 1191–1199. ISSN 00219193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.182.5.1191-1199.2000
- [7] GOLECKI, Jochen R. Studies on ultrastructure and composition of cell walls of the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Archives of Microbiology* [online]. 1977, **114**(1), 35–41. ISSN 03028933. Dostupné z: doi:10.1007/BF00429627
- [8] HOICZYK, E. a W. BAUMEISTER. Envelope structure of four gliding filamentous cyanobacteria. *Journal of Bacteriology* [online]. 1995, **177**(9), 2387–2395. ISSN 00219193. Dostupné z: doi:10.1128/jb.177.9.2387-2395.1995
- [9] U J JÜRGENS, G DREWS, J Weckesser. Primary structure of the peptidoglycan from the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6714. *Journal of Bacteriology*. 1983, **154**(1), 471–8.
- [10] GLAUNER, B., J. V. HOLTJE a U. SCHWARZ. The composition of the murein of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1988, **263**(21), 10088–10095. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1016/s0021-9258(19)81481-3
- [11] H. LABISCHINSKI, H. Maidhof. Bacterial peptidoglycan. Overview and evolving concepts. In: J.-M. Ghuyssen and R. HAKENBECK, ed. *Bacterial Cell Wall*. 1st Editio. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 1994, s. 23–38.
- [12] SCHMIDT, W., G. DREWS, J. WECKESSER, I. FROMME a D. BOROWIAK. Characterization of the lipopolysaccharides from eight strains of the cyanobacterium *Synechococcus*. *Archives of Microbiology* [online]. 1980, **127**(3), 209–215. ISSN 03028933. Dostupné z: doi:10.1007/BF00427195
- [13] L. V. MIKHEYSKAYA, R. G. OVODOVA, Y. Ovodov. Isolation and characterization of lipopolysaccharides from cell walls of blue-green algae of the genus *Phormidium*. *Journal of Bacteriology* [online]. 1977, **130**(1), 1–3. Dostupné z: doi:10.1128/jb.130.1.1-3.1977.
- [14] KATZ, A., J. WECKESSER, G. DREWS, and H. Mayer. Chemical and biological studies on the lipopolysaccharide (O-antigen) of *Anacystis nidulans*. *Archives of*

- Microbiology*. 1977, (113), 247–256.
- [15] SYKORA, G Keleti and J L. Production and properties of cyanobacterial endotoxins. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1982, **43**(1), 104–109. Dostupné z: doi:10.1128/aem.43.1.104-109.1982
- [16] OMATA, Tatsuo a Norio MURATA. Isolation and characterization of three types of membranes from the cyanobacterium (blue-green alga) *Synechocystis* PCC 6714. *Archives of Microbiology* [online]. 1984, **139**(2–3), 113–116. ISSN 03028933. Dostupné z: doi:10.1007/BF00401984
- [17] SCHRADER, M., G. DREWS, and J. Weckesser. Chemical analyses on cell wall constituents of the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* PCC 6716. *FEMS Microbiology Letters*. 1981, (11), 37–40.
- [18] HANSEL, Alfred, Franc PATTUS, Uwe J. JÜRGENS a Monier H. TADROS. Cloning and characterization of the genes coding for two porins in the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* PCC 6301. *Biochimica et Biophysica Acta* [online]. 1998, **1399**(1), 31–39. ISSN 01674781. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-4781(98)00090-6
- [19] WECKESSER, Jürgen a Uwe Johannes JÜGRENES. Cell Walls and External Layers. *Methods in Enzymology* [online]. 1988, **167**, 173–188. ISSN 15577988. Dostupné z: doi:10.1016/0076-6879(88)67018-2
- [20] T J BEVERIDGE, L L Graham. Surface layers of bacteria. *Microbiology reviews* [online]. 1991, **55**(4), 684–705. Dostupné z: doi:10.1128/mr.55.4.684-705.1991
- [21] SLEYTR, U. B., P. MESSNER, D. PUM, and M. Sa'ra. *Crystalline bacterial cell surface layers*. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1988.
- [22] SLEYTR, Uwe B, Paul MESSNER a Dietmar PUM. Crystalline bacterial cell surface layers. *Molecular Microbiology* [online]. 1993, **10**(5), 911–916. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb00962.x
- [23] G A BÖHM, W PFLEIDERER, P BÖGER, S Scherer. Structure of a novel oligosaccharide-mycosporine-amino acid ultraviolet A/B sunscreen pigment from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 1995, **270**(15), 8536–8539. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.270.15.8536.
- [24] HOICZYK, Egbert. Structural and biochemical analysis of the sheath of *Phormidium uncinatum*. *Journal of bacteriology* [online]. 1998, **180**(15), 3923–3932. Dostupné z: doi:10.1128/jb.180.15.3923-3932.1998
- [25] ZAK, Elena, Birgitta NORLING, Radhashree MAITRA, Fang HUANG, Bertil ANDERSSON a Himadri B PAKRASI. The initial steps of biogenesis of cyanobacterial photosystems occur in plasma membranes. *PNAS* [online]. 2001, **98**(23), 13443–13448. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.241503898
- [26] WESTPHAL, Sabine a Lisa HEINS. Vipp1 deletion mutant of *Synechocystis*: A connection between bacterial phage shock and thylakoid biogenesis? *PNAS* [online]. 2001, **98**(7), 4243–4248. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.061501198
- [27] ZHANG, Li-fang, Hao-meng YANG, Su-xia CUI, Jia HU, Jie WANG, Ting-yun KUANG, Birgitta NORLING a Fang HUANG. Proteomic Analysis of Plasma Membranes of Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 in Response to High pH Stress research articles. *Journal of proteome research* [online]. 2009, **8**(6), 2892–2902. Dostupné z: doi:10.1021/pr900024w
- [28] NELSON, Nathan a Wolfgang JUNGE. Structure and Energy Transfer in Photosystems of Oxygenic Photosynthesis. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 2015, **84**, 659–683. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-biochem-092914-041942
- [29] RAST, Anna Margareta. *T HYLAKOID MEMBRANE ARCHITECTURE IN CYANOBACTERIA*. B.m., 2018. Ludwig-Maximilians-Universität München.
- [30] SAGAN, L Y N N. On the Origin of Mitosing Cdls. *Journal of Theoretical Biology*

- [online]. 1967, **14**(3), 225–274. Dostupné z: doi:10.1016/0022-5193(67)90079-3
- [31] JORG NICKELSEN, RENGSTL, Birgit, Anna STENGEL, Marco SCHOTTKOWSKI a Elisabeth ANKELE. update. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2010, **315**(1), 1–5. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02096.x
- [32] FRAIN, Kelly M, Doris GANGL, Alexander JONES, Julie A Z ZEDLER a Colin ROBINSON. Protein translocation and thylakoid biogenesis in cyanobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta BBABIO-47520*; [online]. 2015, **1857**(3), 266–273. ISSN 0005-2728. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbatio.2015.08.010
- [33] ALLISON M.L. VAN DE MEENE, HOHMANN-MARRIOTT, Martin F, Wim F J VERMAAS a Æ Robert W ROBERSON. The three-dimensional structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp . PCC 6803. *Archives of Microbiology* [online]. 2006, **184**(5), 259–270. Dostupné z: doi:10.1007/s00203-005-0027-y
- [34] DUNKEL, D. D. Thylakoid centers: structures associated with the cyanobacterial photosynthetic membrane system. *Archives of Microbiology*. 1982, **133**, 97–99.
- [35] MURATA, Kazuyoshi, Sayuri HAGIWARA, Yoshitaka KIMORI a Yasuko KANEKO. Ultrastructure of compacted DNA in cyanobacteria by high-voltage cryo-electron tomography. *Scientific reports* [online]. 2016, **6**(1), 6–13. Dostupné z: doi:10.1038/srep34934
- [36] BUTAN, Carmen, Lisa M HARTNELL, Andrew K FENTON, Donald BLISS, R Elizabeth SOCKETT, Sriram SUBRAMANIAM a Jacqueline L S MILNE. Spiral Architecture of the Nucleoid in *Bdellovibrio bacteriovorus* □ †. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* [online]. 2011, **193**(6), 1341–1350. Dostupné z: doi:10.1128/JB.01061-10
- [37] GRIESE, Marco a Christian LANGE. Ploidy in cyanobacteria “. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2011, **323**(2), 124–131. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02368.x
- [38] CHEN, Anna H, Bruno AFONSO, Pamela A SILVER a David F SAVAGE. Spatial and Temporal Organization of Chromosome Duplication and Segregation in the Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *PLoS One* [online]. 2012, **7**(10), 1–10. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0047837
- [39] SMITH, Rachele M a Stanly B WILLIAMS. Circadian rhythms in gene transcription imparted by chromosome compaction in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *PNAS* [online]. 2006, **103**(22), 8564–8569. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0508696103
- [40] BADGER, Murray R a G Dean PRICE. CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *Journal of Experimental Botany* [online]. 2003, **54**(383), 609–622. Dostupné z: doi:10.1093/jxb/erg076
- [41] ESPIE, George S a Matthew S KIMBER. Carboxysomes: cyanobacterial RubisCO comes in small packages. *Phytosynthesis research* [online]. 2011, **109**(1–3), 7–20. Dostupné z: doi:10.1007/s11120-011-9656-y
- [42] KAPLAN, Aaron, Murray R BADGER a Joseph A BERRY. Photosynthesis and the intracellular inorganic carbon pool in the bluegreen alga *Anabaena variabilis*: Response to external CO<sub>2</sub> concentration. *Planta* [online]. 1980, **149**(3), 219–226. Dostupné z: doi:10.1007/BF00384557.
- [43] DOU, Zhicheng, Sabine HEINHORST, Eric B WILLIAMS, C Daniel MURIN, Jessup M SHIVELY a Gordon C CANNON. CO<sub>2</sub> Fixation Kinetics of *Halothiobacillus neapolitanus* Mutant Carboxysomes Lacking Carbonic Anhydrase Suggest the Shell Acts as a Diffusional Barrier for CO<sub>2</sub> \*. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 2008, **283**(16), 10377–10384. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M709285200
- [44] STADNICHUK, I. N., P. M. KRASILNIKOV a D. V. ZLENKO. Cyanobacterial

- phycobilisomes and phycobiliproteins. *Microbiology (Russian Federation)* [online]. 2015, **84**(2), 101–111. ISSN 00262617. Dostupné z: doi:10.1134/S0026261715020150
- [45] KUBALL, H. G., T. HÖFER a S. KIESEWALTER. Chiroptical spectroscopy, general theory. In: *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* [online]. 3rd Editio. B.m.: Elsevier, 2017, s. 217–231. ISBN 9780128032244. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.04980-5
- [46] V IA BYKHOVSKIĬ, N I Zaĭtseva. Microbiological synthesis of tetrapyrrole compounds. *Prikl adnaia Biokhimiia i Mikrobioliia*. 1983, **19**(2), 163–75.
- [47] GLAZER, A. N. Light guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. *The Journal of biological chemistry* [online]. 1989, **264**(1), 1–4. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(17)31212-7
- [48] ENGELMANN, T.W. Über Sauerstoffausscheidung von Pflanzenzellen im Microspectrum. *Bot. Z.* 1882, **40**, 419–425.
- [49] AVERINA, S G, N V VELICHKO, A A PINEVICH, E V SENATSKAYA a A V PINEVICH. Non-a chlorophylls in cyanobacteria. *Photosynthetica* [online]. 2019, **57**(4), 1109–1118. Dostupné z: doi:10.32615/ps.2019.130 REVIEW
- [50] HIRSCHBERG, Joseph a Daniel CHAMOVITZ. Carotenoids in Cyanobacteria. In: *The Molecular Biology of Cyanobacteria* [online]. B.m.: Kluwer Academic Publishers, 1994, s. 559–579. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-011-0227-8\_18
- [51] J. COGDELL, Richard a Alastair T. GARDINER. Functions of Carotenoids in Photosynthesis. *Methods in Enzymology* [online]. 1993, **214**, 185–193. Dostupné z: doi:10.1016/0076-6879(93)14065-Q
- [52] NEWELL, W. R., H. VAN AMERONGEN, R. VAN GRONDELLE, J. W. AALBERTS, A. F. DRAKE, P. UDVARHELYI a J. BARBER. Spectroscopic characterisation of the reaction centre of photosystem II from higher plants. *FEBS Letters* [online]. 1988, **228**(1), 162–166. ISSN 00145793. Dostupné z: doi:10.1016/0014-5793(88)80608-2
- [53] KUMAR, Jay, Divya SINGH, Madhu B TYAGI a Ashok KUMAR. Cyanobacteria : Applications in Biotechnology. In: *Cyanobacteria, From Basic Science to Applications* [online]. B.m.: Academic Press, 2019, s. 327–346. ISBN 9780128146675. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814667-5.00016-7
- [54] R. Y. STANIER, G. Cohen-Bazire. Phototrophic prokaryotes: The cyanobacteria. *Annual review of microbiology* [online]. 1977, **31**(1), 225–274. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.mi.31.100177.001301
- [55] ZEHR, Jonathan P, Irina N SHILOVA, Hanna M FARNELID, Maria Carmen MUÑOZ-MARÍN a Kendra A TURK-KUBO. Unusual marine unicellular symbiosis with the nitrogen-fixing cyanobacterium UCYN-A. *Nature Microbiology* [online]. 2016, **2**(1), 1–10. Dostupné z: doi:10.1038/nmicrobiol.2016.214
- [56] STAL, Lucas J a Roy MOEZELAAR. Fermentation in cyanobacteria 1. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 1997, **21**(2), 179–211. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-6445(97)00056-9
- [57] MARCELO GOMES MARÇAL VIEIRA VAZ, ALLAN VICTOR MARTINS ALMEIDA, NAIRA VALLE DE CASTRO, ADRIANO NUNES-NESE, Wagner L. Araújo. Carbon and nitrogen metabolism in cyanobacteria : Basic traits , regulation and biotechnological application. In: *Handbook of Algal Science, Technology and Medicine* [online]. B.m.: Academic Press, 2020, s. 245–254. ISBN 9780128183052. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-818305-2.00015-2
- [58] D.-P. HADER, H. D. KUMAR, R. C. Smith a R. C. Worrest. Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change †. *Photochemical and Photobiological Sciences* [online]. 2007, **6**(3), 267–285. Dostupné

- z: doi:10.1039/b700020k
- [59] BRIAN ALAN WHITTON, Allan Pentecost. *The Ecology of Cyanobacteria. Their Diversity in Time and Space*. B.m.: Kluwer Academic Publisher, 2000.
- [60] ROSMARIE RIPPKA, JOSETTE DERUELLES, JOHN B. WATERBURY, MICHAEL HERDMAN, Roger Y. Stanier. Generic Assignments , Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* [online]. 1979, **111**(2), 1–61. Dostupné z: doi:10.1099/00221287-111-1-1
- [61] WANG, Hong-liang, Bradley L POSTIER a Robert L BURNAP. Alterations in Global Patterns of Gene Expression in *Synechocystis* sp . PCC 6803 in Response to Inorganic Carbon Limitation and the Inactivation of *ndhR* , a LysR Family Regulator \* □. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2004, **279**(7), 5739–5751. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M311336200
- [62] ZHANG, Cheng-cai, Cong-zhao ZHOU, Robert L BURNAP a Ling PENG. Carbon / Nitrogen Metabolic Balance : Lessons from Cyanobacteria. *Trends in Plant Science* [online]. 2018, **23**(12), 1116–1130. ISSN 1360-1385. Dostupné z: doi:10.1016/j.tplants.2018.09.008
- [63] HOHMANN-MARRIOTT, Martin F a Robert E BLANKENSHIP. Evolution of Photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* [online]. 2011, **62**, 515–548. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-arplant-042110-103811
- [64] LIU, HAIJUN, Hao Zhang a Et AL. Phycobilisomes supply excitations to both photosystems in a megacomplex in cyanobacteria. *Science* [online]. 2013, **342**(6162), 1104–7. Dostupné z: doi:10.1126/science.1242321
- [65] BOEKEMA, E J, J P DEKKER, M G Van HEEL, M R, W SAENGER, I WITT a H T WITT. Evidence for a trimeric organization of the photosystem I complex from the thermophilic cyanobacterium. *FEBS Letters* [online]. 1987, **217**(2), 283–286. Dostupné z: doi:10.1016/0014-5793(87)80679-8
- [66] GURRIERI, Libero, Simona FERMANI, Mirko ZAFFAGNINI, Francesca SPARLA a Paolo TROST. Calvin – Benson cycle regulation is getting complex. *Trends in Plant Science* [online]. 2021, **26**(9), 898–912. ISSN 1360-1385. Dostupné z: doi:10.1016/j.tplants.2021.03.008
- [67] SHARKEY, Thomas D. Discovery of the canonical Calvin – Benson cycle. *Photosynthesis Research* [online]. 2019, **140**, 235–252. ISSN 1573-5079. Dostupné z: doi:10.1007/s11120-018-0600-2
- [68] BAR-EVEN, Arren, Elad NOOR a Ron MILO. A survey of carbon fixation pathways through a quantitative lens. *Journal of Experimental Botany* [online]. 2012, **63**(6), 2325–2342. Dostupné z: doi:10.1093/jxb/err417
- [69] HERRERO, Antonia, Alicia M MURO-PASTOR, Ana VALLADARES a Enrique FLORES. Cellular differentiation and the NtcA transcription factor in filamentous cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2004, **28**(4), 469–487. Dostupné z: doi:10.1016/j.femsre.2004.04.003
- [70] MURO-PASTOR, M Isabel, Jose C REYES a Francisco J FLORENCIO. Ammonium assimilation in cyanobacteria. *Photosynthesis Research* [online]. 2005, **83**(2), 135–150. Dostupné z: doi:10.1007/s11120-004-2082-7.
- [71] LUQUE, I a K FORCHHAMMER. Nitrogen assimilation and C/N balance sensing. In: A HERRERO a E FLORES, ed. *The Cyanobacteria: Molecular biology, Genomics and Evolution*. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2008, s. 335–382.
- [72] DOELLO, Sofia, Alexander KLOTZ, Alexander MAKOWKA, Kirstin GUTEKUNST a Karl FORCHHAMMER. A specific glycogen mobilization strategy enables rapid awakening of dormant cyanobacteria from chlorosis. *Plant Physiology* [online]. 2018, **177**(2), 594–603. ISSN 15322548. Dostupné z: doi:10.1104/pp.18.00297

- [73] SAUER, J., U. SCHREIBER, R. SCHMID, U. VÖLKER a K. FORCHHAMMER. Nitrogen starvation-induced chlorosis in *Synechococcus* PCC 7942. Low-level photosynthesis as a mechanism of long-term survival. *Plant Physiology* [online]. 2001, **126**(1), 233–243. ISSN 00320889. Dostupné z: doi:10.1104/pp.126.1.233
- [74] SCHLEBUSCH, Maximilian a Karl FORCHHAMMER. Requirement of the nitrogen starvation-induced protein s110783 for polyhydroxybutyrate accumulation in *synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2010, **76**(18), 6101–6107. ISSN 00992240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.00484-10
- [75] DAMROW, Ramon, Iris MALDENER a Yvonne ZILLIGES. The multiple functions of common microbial carbon polymers, glycogen and PHB, during stress responses in the non-diazotrophic cyanobacterium *synechocystis* sp. PCC 6803. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2016, **7**, 1–10. ISSN 1664302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2016.00966
- [76] TROSCHL, Clemens, Katharina MEIXNER a Bernhard DROSG. Cyanobacterial PHA Production — Review of Recent Advances and a Summary of Three Years ' Working Experience Running a Pilot Plant. *Bioengineering* [online]. 2017, **4**(4), 1–19. Dostupné z: doi:10.3390/bioengineering4020026
- [77] LI, Zibiao, Jing YANG a Xian Jun LOH. Polyhydroxyalkanoates: Opening doors for a sustainable future. *NPG Asia Materials* [online]. 2016, **8**(4), e265. ISSN 18844057. Dostupné z: doi:10.1038/am.2016.48
- [78] YU, Long, Katherine DEAN a Lin LI. Polymer blends and composites from renewable resources. *Progress in Polymer Science (Oxford)* [online]. 2006, **31**(6), 576–602. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2006.03.002
- [79] CHEN, Guo Qiang. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society Reviews* [online]. 2009, **38**(8), 2434–2446. ISSN 14604744. Dostupné z: doi:10.1039/b812677c
- [80] WINNACKER, Malte. Polyhydroxyalkanoates: Recent Advances in Their Synthesis and Applications. *European Journal of Lipid Science and Technology* [online]. 2019, **121**(11), 1–9. ISSN 14389312. Dostupné z: doi:10.1002/ejlt.201900101
- [81] KIM, Doh-Yeon; Hyung Woo Kim; Moon Gyu Chung; Young Ha Rhee. Biosynthesis, modification, and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. *Journal of Microbiology*. 2007, **45**(2), 87–97.
- [82] CHODAK, Ivan. Polyhydroxyalkanoates: Origin, properties and applications. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources* [online]. 2008, 451–477. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-045316-3.00022-3
- [83] MADKOUR, Mohamed H., Daniel HEINRICH, Mansour A. ALGHAMDI, Ibraheem I. SHABBAJ a Alexander STEINBÜCHEL. PHA recovery from biomass. *Biomacromolecules* [online]. 2013, **14**(9), 2963–2972. ISSN 15257797. Dostupné z: doi:10.1021/bm4010244
- [84] DOI, Y. *Microbial polyesters*. New York: Wiley-VCH Publishers, 1990. ISBN 9780895737465.
- [85] BUGNICOURT, E., P. CINELLI, A. LAZZERI a V. ALVAREZ. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters* [online]. 2014, **8**(11), 791–808. ISSN 1788618X. Dostupné z: doi:10.3144/expresspolymlett.2014.82
- [86] KAMAIEV, P. P., I. I. ALIEV, A. L. IORDANSKII a A. M. WASSERMAN. Molecular dynamics of the spin probes in dry and wet poly(3-hydroxybutyrate) films with different morphology. *Polymer* [online]. 2001, **42**(2), 515–520. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/S0032-3861(00)00339-6
- [87] SUDESH, K., H. ABE a Y. DOI. Synthesis, structure and properties of



- polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. *Progress in Polymer Science (Oxford)* [online]. 2000, **25**(10), 1503–1555. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/S0079-6700(00)00035-6
- [88] SHOGREN, Randal. Water Vapor Permeability of Biodegradable Polymers. *Journal of Environmental Polymer Degradation* [online]. 1997, **5**(2), 91–95. Dostupné z: doi:Water vapor permeability of biodegradable polymers
- [89] AMASS, Wendy, Allan AMASS a Brian TIGHE. A Review of Biodegradable Polymers : Uses , Current Developments in the Synthesis and Characterization of Biodegradable Polyesters , Blends of Biodegradable Polymers and Recent Advances in Biodegradation Studies. *Polymer International* [online]. 1998, **47**(2), 89–144. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1097-0126(1998100)47:2<89::AID-PI86>3.0.CO;2-F
- [90] FISCHER, Jenny Josefina;, Yoshihiro AOYAGI, Makiko ENOKI a Yoshiharu DOI. Mechanical properties and enzymatic degradation of poly ( [ R ] -3- hydroxybutyrate- co - [ R ] -3-hydroxyhexanoate ) uniaxially cold-drawn films. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2004, **83**(3), 453–460. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2003.08.006
- [91] YOSHIE, Naoko, Miwa SAITO a Yoshio INOUE. Structural Transition of Lamella Crystals in a Isomorphous Copolymer , Poly ( 3-hydroxybutyrate- co -3-hydroxyvalerate ). *Macromolecules* [online]. 2001, **34**(26), 8953–8960. Dostupné z: doi:10.1021/ma0113071
- [92] RIEGER, Robert Reichardt; Bernhard. Poly(3-Hydroxybutyrate) from Carbon Monoxide. *Advances in polymer science* [online]. 2012, (245), 49–90. Dostupné z: doi:10.1007/12-2011-127
- [93] KONING, DE, G.J.M. *Prospects of bacterial poly [( R ) -3- ( hydroxyalkanoates )]* [online]. B.m., 1993. Technische Universiteit Eindhoven. Dostupné z: doi:10.6100/IR403691
- [94] KHOSRAVI-DARANI, Kianoush a Zahra-beigom MOKHTARI. Microbial production of poly ( hydroxybutyrate ) from C 1 carbon sources. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2013, **97**(4), 1407–1424. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-012-4649-0
- [95] YOGESH, Chaudhari, Bhavana PATHAK a M H FULEKAR. PHA - Production Application and its Bioremediation in Environment. *Research Journal of Environment Sciences*. 2012, **1**(2), 46–52.
- [96] LAYCOCK, Bronwyn, Peter HALLEY, Steven PRATT, Alan WERKER a Paul LANT. Progress in Polymer Science The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Progress in Polymer Science* [online]. 2013, **38**, 536–583. ISSN 0079-6700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2012.06.003
- [97] SHARMA, Vibhuti, Rutika SEHGAL a Reena GUPTA. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Properties and their Modifications. *Polymer* [online]. 2020, (212), 123–161. ISSN 0032-3861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2020.123161
- [98] CASTILHO, Leda R, David A MITCHELL a Denise M G FREIRE. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. *Bioresource Technology* [online]. 2009, **100**, 5996–6009. ISSN 0960-8524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2009.03.088
- [99] SINGH, Akhilesh Kumar, Laxuman SHARMA, Nirupama MALLICK a Jyoti MALA. Progress and challenges in producing polyhydroxyalkanoate biopolymers from cyanobacteria. *Journal of Applied Phycology* [online]. 2016, (29), 1213–1232. ISSN 0921-8971. Dostupné z: doi:10.1007/s10811-016-1006-1
- [100] BYROM, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *Trends in Biotechnology* [online]. 1987, **5**(9), 246–250. ISSN 01677799. Dostupné

- z: doi:10.1016/0167-7799(87)90100-4
- [101] HOLMES PA. Application of PHB: a microbially produced biodegradable thermoplastic. *Physics in Technology* [online]. 1985, **16**(1), 32–36. Dostupné z: doi:10.1088/0305-4624/16/1/305
- [102] ARAKI, Takeo; a Shuji HAYASE. Biodegradability of synthetic  $\beta$ -substituted poly- $\beta$ -esters. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* [online]. 1979, **17**(6), 1877–1881. Dostupné z: doi:10.1002/pol.1979.170170635
- [103] DOI, Yoshiharu, Masao KUNIOKA, Yoshiyuki NAKAMURA a Kazuo SOGA. Biosynthesis of Polyesters by *Alcaligenes eutrophus*: Incorporation of <sup>13</sup>C-Labelled Acetate and Propionate. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* [online]. 1986, (23), 1696–97. Dostupné z: doi:10.1039/C39860001696
- [104] MCADAM, Blaithín, Margaret Brennan FOURNET, Paul MCDONALD a Marija MOJICEVIC. Production of polyhydroxybutyrate (PHB) and factors impacting its chemical and mechanical characteristics. *Polymers* [online]. 2020, **12**(12), 1–20. ISSN 20734360. Dostupné z: doi:10.3390/polym12122908
- [105] CARR, N. G. The occurrence of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in the blue-green alga, *Chlorogloea fritschii*. *Biochim Biophys Acta* [online]. 1966, **120**(2), 308–310. ISSN 09266585. Dostupné z: doi:10.1016/0926-6585(66)90353-0
- [106] VINCENZINI, M a R DE PHILIPPIS. Polyhydroxyalkanoates. In: Zvi COHEN, ed. *Chemicals from Microalgae*. 1st Editio. 1999, s. 292–312.
- [107] MATA, Teresa M., António A. MARTINS a Nidia S. CAETANO. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [online]. 2010, **14**(1), 217–232. ISSN 13640321. Dostupné z: doi:10.1016/j.rser.2009.07.020
- [108] BOROWITZKA, Michael A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters. *Journal of Biotechnology* [online]. 1999, **70**(1–3), 313–321. ISSN 00796352. Dostupné z: doi:10.1016/S0079-6352(99)80123-4
- [109] DROSG, B., I. FRITZ, F. GATTERMAYR a L. SILVESTRINI. Photo-autotrophic production of poly(hydroxyalkanoates) in cyanobacteria. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* [online]. 2015, **29**(2), 145–156. ISSN 03529568. Dostupné z: doi:10.15255/CABEQ.2014.2254
- [110] BRENNAN, Liam a Philip OWENDE. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [online]. 2010, **14**(2), 557–577. ISSN 13640321. Dostupné z: doi:10.1016/j.rser.2009.10.009
- [111] KUMAR, Kanhaiya, Chitralekha Nag DASGUPTA, Bikram NAYAK, Peter LINDBLAD a Debabrata DAS. Development of suitable photobioreactors for CO<sub>2</sub> sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria. *Bioresource Technology* [online]. 2011, **102**(8), 4945–4953. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2011.01.054
- [112] PULZ, O. Photobioreactors: Production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2001, **57**(3), 287–293. ISSN 01757598. Dostupné z: doi:10.1007/s002530100702
- [113] UGWU, C. U., H. AOYAGI a H. UCHIYAMA. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology* [online]. 2008, **99**(10), 4021–4028. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2007.01.046
- [114] BALL, Steven, Christophe COLLEONI, Ugo CENCI, Jenifer Nirmal RAJ a Catherine TIRTIAUX. The evolution of glycogen and starch metabolism in eukaryotes gives molecular clues to understand the establishment of plastid endosymbiosis. *Journal of Experimental Botany* [online]. 2011, **62**(6), 1775–1801. ISSN 00220957. Dostupné

- z: doi:10.1093/jxb/erq411
- [115] PREISS, Jack. Biochemistry and molecular biology of glycogen synthesis in bacteria and mammals and starch synthesis in plants. In: Lew MANDER a Hung-Wen LIU, ed. *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology* [online]. 1st Editio. 2010, s. 429–491. ISBN 9780080453828. Dostupné z: doi:10.1016/b978-008045382-8.00644-4
- [116] SHEARER, Jane a Terry E GRAHAM. New perspectives on the storage and organization of muscle glycogen. *Canadian journal of applied physiology* [online]. 2002, **27**(2), 179–203. Dostupné z: doi:10.1139/h02-012
- [117] ROCHA LEO, MHM. GLYCOGEN. In: Benjamin CABALLERO, ed. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2nd Editio. 2003, s. 2930–2937. ISBN 978-0-12-227055-0.
- [118] MIAO, Xiaoling, Qingyu WU, Guifang WU a Nanming ZHAO. Changes in photosynthesis and pigmentation in an agp deletion mutant of the cyanobacterium *Synechocystis* sp . *Biotechnology Letters* [online]. 2003, **25**(5), 391–396. Dostupné z: doi:10.1023/a:1022446330284
- [119] MIAO, Xiaoling a Qingyu WU. Sucrose accumulation in salt-stressed cells of agp gene deletion-mutant in cyanobacterium *Synechocystis* sp . PCC 6803. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2003, **218**(1), 71–77. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.2003.tb11500.x.
- [120] PREISS, J. BACTERIAL GLYCOGEN SYNTHESIS AND ITS REGULATION. *Annual review of microbiology* [online]. 1984, **38**(1), 419–458. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.mi.38.100184.002223
- [121] ALONSO-CASAJU, Nora, David DAUVILLE, Alejandro Miguel VIALE, Francisco JOSE, Teresa MORA, Gustavo EYDALLIN, Steven BALL a Javier POZUETA-ROMERO. Glycogen Phosphorylase , the Product of the glgP Gene , Catalyzes Glycogen Breakdown by Removing Glucose Units from the Nonreducing Ends in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* [online]. 2006, **188**(14), 5266–5272. Dostupné z: doi:10.1128/JB.01566-05
- [122] DAUVILLE, David, Isabelle S KINDERF, Zhongyi LI, Behjat KOSAR-HASHEMI, Michael S SAMUEL, Lynette RAMPLING, Steven BALL a Matthew K MORELL. Role of the *Escherichia coli* glgX Gene in Glycogen Metabolism. *Journal of bacteriology* [online]. 2005, **187**(4), 1465–1473. Dostupné z: doi:10.1128/JB.187.4.1465
- [123] DAWES, Edwin A. a Peter J. SENIOR. The Role and Regulation of Energy Reserve Polymers in Micro-organisms. *Advances in Microbial Physiology* [online]. 1973, **10**(C), 135–266. ISSN 00652911. Dostupné z: doi:10.1016/S0065-2911(08)60088-0
- [124] PREISS, J. Chemistry and Metabolism of Intracellular Reserves. In: JS POINDEXTER a ER LEADBETTER, ed. *Bacteria in nature: Structure, Physiology, and Genetic Adaptability*. New York: Plenum Publishing Corp, 1989, s. 189–258.
- [125] MACKAY, B. M. a J. G. MORRIS. Ultrastructural changes during sporulation in *Clostridium pasteurianum*. *Journal of General Microbiology* [online]. 1971, **66**, 1–13. ISSN 00221287. Dostupné z: doi:10.1099/00221287-66-1-1
- [126] BURLEIGH, I. G. a E. A. DAWES. Studies on the endogenous metabolism and senescence of starved *Sarcina lutea*. *The Biochemical journal* [online]. 1967, **102**, 236–250. ISSN 02646021. Dostupné z: doi:10.1042/bj1020236
- [127] LUAN, Guodong, Shanshan ZHANG, Min WANG a Xuefeng LU. Progress and perspective on cyanobacterial glycogen metabolism engineering. *Biotechnology Advances* [online]. 2019, **37**, 771–786. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2019.04.005
- [128] SMITH, AJ. Modes of cyanobacterial carbon metabolism. In: N G CARR a B A

- WHITTON, ed. *The Biology of Cyanobacteria*. Oxford: Blackwell Scientific, 1982, s. 47–85.
- [129] GRÜNDEL, Marianne, Ramon SCHEUNEMANN, Wolfgang LOCKAU a Yvonne ZILLIGES. Impaired glycogen synthesis causes metabolic overflow reactions and affects stress responses in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology (United Kingdom)* [online]. 2012, **158**(12), 3032–3043. ISSN 13500872. Dostupné z: doi:10.1099/mic.0.062950-0
- [130] HICKMAN, Jason W., Kimberly M. KOTOVIC, Cameron MILLER, Paul WARRENER, Brett KAISER, Tracey JURISTA, Mark BUDDE, Fred CROSS, James M. ROBERTS a Michael CARLETON. Glycogen synthesis is a required component of the nitrogen stress response in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Algal Research* [online]. 2013, **2**(2), 98–106. ISSN 22119264. Dostupné z: doi:10.1016/j.algal.2013.01.008
- [131] TARONCHER-OLDENBURG, G. a G. STEPHANOPOULOS. Targeted, PCR-based gene disruption in cyanobacteria: Inactivation of the polyhydroxyalkanoic acid synthase genes in *Synechocystis* sp. PCC6803. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2000, **54**(5), 677–680. ISSN 01757598. Dostupné z: doi:10.1007/s002530000450
- [132] STAL, L., H. HEYER a G JACOBS. Occurrence and role of Poly-Hydroxyalkanoate in the cyanobacterium *Oscillatoria Limosa*. *Novel biodegradable microbial polymers* [online]. 1990, **186**, 435–438. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-009-2129-0\_38
- [133] KOLLER, Martin a Lukas MARSALEK. Cyanobacterial Polyhydroxyalkanoate Production: Status Quo and Quo Vadis? *Current Biotechnology* [online]. 2015, **4**(4), 464–480. ISSN 22115501. Dostupné z: doi:10.2174/2211550104666150917010849
- [134] STAL, Lucas J. Poly(hydroxyalkanoate) in cyanobacteria: an overview. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 1992, **103**(2–4), 169–180. ISSN 15746968. Dostupné z: doi:10.1016/0378-1097(92)90307-A
- [135] DE PHILIPPIS, Roberto, Alba ENA, Monica GUASTIINI, Claudio SILI a Massimo VINCENZINI. Factors affecting poly- $\beta$ -hydroxybutyrate accumulation in cyanobacteria and in purple non-sulfur bacteria. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 1992, **103**(2–4), 187–194. ISSN 15746968. Dostupné z: doi:10.1016/0378-1097(92)90309-C
- [136] WU, G. F., Z. Y. SHEN a Q. Y. WU. Modification of carbon partitioning to enhance PHB production in *Synechocystis* sp. PCC6803. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2002, **30**(6), 710–715. ISSN 01410229. Dostupné z: doi:10.1016/S0141-0229(02)00044-3
- [137] DUTT, Vaishali a Shireesh SRIVASTAVA. Novel quantitative insights into carbon sources for synthesis of poly hydroxybutyrate in *Synechocystis* PCC 6803. *Photosynthesis Research* [online]. 2017, **136**(3), 303–314. ISSN 15735079. Dostupné z: doi:10.1007/s11120-017-0464-x
- [138] KOCH, Moritz, Sofia DOELLO, Kirstin GUTEKUNST a Karl FORCHHAMMER. PHB is produced from Glycogen turn-over during nitrogen starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2019, **20**(8), 1–14. ISSN 14220067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20081942
- [139] KLOTZ, Alexander, Jens GEORG, Lenka BUČINSKÁ, Satoru WATANABE, Viktoria REIMANN, Witold JANUSZEWSKI, Roman SOBOTKA, Dieter JENDROSSEK, Wolfgang R. HESS a Karl FORCHHAMMER. Awakening of a Dormant Cyanobacterium from Nitrogen Chlorosis Reveals a Genetically Determined Program. *Current Biology* [online]. 2016, **26**(21), 2862–2872. ISSN 09609822. Dostupné z: doi:10.1016/j.cub.2016.08.054
- [140] YOO, Sang Ho, Byung Hoo LEE, Youyoun MOON, Martin H. SPALDING a Jay Lin JANE. Glycogen synthase isoforms in *synechocystis* sp. PCC6803: Identification of

- different roles to produce glycogen by targeted mutagenesis. *PLoS ONE* [online]. 2014, **9**(3). ISSN 19326203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0091524
- [141] ZAVŘEL, Tomáš, Jan ČERVENÝ a Maria A. SINETOVA. Measurement of Chlorophyll a and Carotenoids Concentration in Cyanobacteria. *Bio-protocol* [online]. 2015, **5**(9), 1–5. Dostupné z: <https://bio-protocol.org/e1467>
- [142] VIDAL, Rebeca a Mónica VENEGAS-CALERÓN. Simple , fast and accurate method for the determination of glycogen in the model unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp . PCC 6803 Starch amylopectin. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2019, **164**. ISSN 0167-7012. Dostupné z: doi:10.1016/j.mimet.2019.105686
- [143] PORCELLINIS, Alice De, Niels-ulrik FRIGAARD a Yumiko SAKURAGI. Determination of the Glycogen Content in Cyanobacteria [online]. 2017, (125), 1–6. Dostupné z: doi:10.3791/56068
- [144] HAGEMANN, Martin a Norbert ERDMANN. Activation and pathway of g lucosy Ig I ycerol synthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology* [online]. 1994, (140), 1427–1431. Dostupné z: doi:10.1099/00221287-140-6-1427
- [145] YOO, Sang-ho, Martin H SPALDING a Jay-lin JANE. Characterization of cyanobacterial glycogen isolated from the wild type and from a mutant lacking of branching enzyme. *Carbohydrate Research* [online]. 2002, **337**, 2195–2203. Dostupné z: doi:10.1016/s0008-6215(02)00228-8
- [146] ZHAO, Chi, Zhongkui LI, Tao LI, Yingjiao ZHANG, Donald A BRYANT a Jindong ZHAO. High-yield production of extracellular type-I cellulose by the cyanobacterium *Synechococcus* sp . PCC 7002. *Cell Discovery* [online]. 2015, **1**, 1–12. Dostupné z: doi:10.1038/celldisc.2015.4
- [147] SHOKRI-AFRA, H, A OSTOVAR-RAVARI a M RASOULI. Improvement of the classical assay method for liver glycogen fractions: ASG is the main and metabolic active fraction. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016, **20**(20), 4328–4336.
- [148] SULLIVAN, Mitchell A, Silvia NITSCHKE, Evan P SKWARA, Francisco VILAPLANA, Berge A MINASSIAN, Felix NITSCHKE, Mitchell A SULLIVAN, Silvia NITSCHKE, Evan P SKWARA, Peixiang WANG, Xiaochu ZHAO a Xiao S PAN. Skeletal Muscle Glycogen Chain Length Correlates with Insolubility in Mouse Models of Polyglucosan- Associated Neurodegenerative Diseases Report Skeletal Muscle Glycogen Chain Length Correlates with Insolubility in Mouse Models of Polyglucosan-Associated. *Cell Reports* [online]. 2019, **27**(5), 1334–1344. ISSN 2211-1247. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2019.04.017
- [149] KERLY, B Y Margaret. The solubility of glycogen. *Biochemical journal* [online]. 1930, **24**(1), 67–76. Dostupné z: doi:10.1042/bj0240067
- [150] FERNANDEZ, Céline, Cinthia CAROLA a Lars NILSSON. Size, structure and scaling relationships in glycogen from various sources investigated with asymmetrical flow field-flow fractionation and <sup>1</sup>H NMR. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2011, **49**(4), 458–465. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2011.05.016
- [151] POMERANZ, Yeshajahu a Clifton E. MELOAN. Carbohydrates. In: *Food Analysis* [online]. B.m.: Springer, Boston, MA, 1994, s. 625–677. ISBN 978-1-4615-7000-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4615-6998-5\_36
- [152] SARAIVA, Ariana, Conrado CARRASCOSA, Dele RAHEEM a Fernando RAMOS. Maltitol : Analytical Determination Methods , Applications in the Food Industry , Metabolism and Health Impacts. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 2020, **17**(14), 5227. Dostupné z: doi:doi.org/10.3390/ijerph17145227
- [153] IEDIKER, S Onja R, R Ichard H S TADLER a ET AL. Improved Sample Preparation to

- Determine Acrylamide in Difficult Matrixes Such as Chocolate Powder , Cocoa , and Coffee by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2004, **52**(15), 4625–4631. Dostupné z: doi:10.1021/jf0498362
- [154] MEIXNER, K, C Daffert D DALNODAR, K Mrázová K HRUBANOVÁ, V Krzyzanek J NEBESAROVA a O SAMEK. Glycogen , poly ( 3 - hydroxybutyrate ) and pigment accumulation in three *Synechocystis* strains when exposed to a stepwise increasing salt stress. *Journal of Applied Phycology* [online]. 2022. Dostupné z: doi:10.1007/s10811-022-02693-3
- [155] HUGGETT, A. S. G. a D. A NIXON. USE OF GLUCOSE OXIDASE, PEROXIDASE, AND O-DIANISIDINE IN DETERMINATION OF BLOOD AND URINARY GLUCOSE. *The Lancet* [online]. 1957, **270**(6991), 368–370. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(57)92595-3
- [156] MCCOMB, R B a W D YUSHOK. Colorimetric estimation of d-glucose and 2-deoxy-d-glucose with glucose oxidase. *Journal of the Franklin Institute* [online]. 1958, **265**(5), 417–422. Dostupné z: doi:10.1016/0016-0032(58)90724-5
- [157] BLECHER, Melvin a A B GLASSMAN. Determination of glucose in the presence of sucrose using glucose oxidase; effect of pH on absorption spectrum of oxidized o-dianisidine. *Analytical Biochemistry* [online]. 1962, **3**(4), 343–352. Dostupné z: doi:10.1016/0003-2697(62)90119-7
- [158] BECK, Christian, Henning KNOOP, Ilka M AXMANN a Ralf STEUER. The diversity of cyanobacterial metabolism: genome analysis of multiple phototrophic microorganisms. *BMC genomics* [online]. 2012, **13**(56), 1–17. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2164-13-56
- [159] ZILLIGES, Y. Glycogen, a dynamic cellular sink and reservoir for carbon. In: E FLORES a A HERRERO, ed. *The Cell Biology of Cyanobacteria*. Norfolk, VA: aister Academic Press, 2014, s. 189–210.
- [160] RUEDA, Estel a Joan GARCÍA. Optimization of the phototrophic Cyanobacteria polyhydroxybutyrate (PHB) production by kinetic model simulation. *Science of the Total Environment* [online]. 2021, **800**. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2021.149561
- [161] JENDROSSEK, Dieter a Daniel PFEIFFER. Minireview New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules ( carbonosomes ) and novel functions of poly ( 3-hydroxybutyrate ). *Environmental microbiology* [online]. 2014, **16**(8), 2357–2373. Dostupné z: doi:10.1111/1462-2920.12356
- [162] TANWEER, Sadaf a Bhabatarini PANDA. Prospect of *Synechocystis* sp . PCC 6803 for synthesis of poly ( 3- hydroxybutyrate- co -4-hydroxybutyrate ). *Algal Research* [online]. 2020, **50**. ISSN 2211-9264. Dostupné z: doi:10.1016/j.algal.2020.101994

## ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

3HB	3-hydroxybutyrát
4HB	4-hydroxybutyrát
3HV	3-hydroxyvalerát
AMG	amyloglukozidáza
CCM	carbon concentrating mechanism
CDW	cell dry weight
EB	Erlenmayerove banky
FID	flame ionization detector
GC	gas-chromatography
GOPXOD	glukóza-oxidáza/peroxidáza/o-dianizidín (zmes)
HPLC	high-performance liquid chromatography
lcl	long-chain-length
LPS	lipopolysacharidy
mcl	medium-chain-length
MK	multikultivátor
OD <sub>720</sub>	optická hustota pri 720 nm
PBP	fykobiliproteíny
PBS	fykobilizómy
PHA	polyhydroxyalkanoáty
PHB	poly(3-hydroxybutyrát)
PHV	poly(3-hydroxyvalerát)
PSI/PSII	fotosystém I/II
PQ	plastochinón
RID	refractive index detector
RuBisCO	ribulóza-1,5-bisfosfát karboxyláza-oxygenáza
Scl	short-chain-length
TES	trace elements solution
WT	wild-type

# PRÍLOHY

Rad I - Chroococcales			
Bez fykobilizomov		S fykobilizómami	
Bunky		Typ rozmnožovania	
Malé (<1 μm)	Veľké (<8 μm)	Pučaním	Delením
 Prochlorococcus Prochloron	 Chamaesiphon	Kokobaciloidné alebo Baciloidné	
		Bunky < 3 μm	Bunky > 3 μm
		Bez púzdra	Bez púzdra
		S púzdom	S púzdom
		Bez thylakoidov	S thylakoidmi
		Gloeobacter	Gloeothecae
			Gloeocapsa, Chroococcus

Rad II - Pleurocapsales			
Väčšinou dvojité delenie		Väčšinou viacnásobné delenie	
Dvojité delenie v niekoľkých rovinách, vytvárajúce krátke filameny	Dvojité delenie v 3 alebo viacerých rovinách	Polárna asymetria	Symetrické
 Pleurocapsa, Hyella, Solentia (Skupina Pleurocapsa)	 Myxosarcina	 Dermocarpella	 Stanieria
Baeocyty bez vláknitej steny (často nepohyblivé)			
Baeocyty s vláknitou stenou (často pohyblivé)			

Rad III - Oscillatoriales			
Prierez trichómami			
Kruhový			
Rovný alebo točité		Helikálne zatočený	
S púzdom		Bez púzdra	
1 trichóm vovnútri 1 púzdra	Viac ako 1 trichóm vovnútri 1 púzdra	Bunky sudového tvaru	Bunky diskoidného tvaru
 Lyngbya Leptolyngbya, Symploca	 Microcoleus	 Pseudanabaena, Limnothrix, Phrochlorothrix...	 Oscillatoria, Borzia, Planktothrix Trichodesmium
		Sklon helixu	
		< 45°	> 45°
		 Spirulina	 Arthrospira
		 Crinallum	 Starria

Rad IV - Nostocales			
Kušľovité trichómy vykazujúce polaritu	Trichómy nevykazujúce polaritu		
	Tvoriace homogónie		Netvoriace homogónie
Trichómový kužel	Opúzdrené, jedno vlákno	Mnoho vlákien vovnútri želatínovej matrice	Trichómy
Výrazný			Rovné
Jemný			Vegetatívne bunky (tvar)
			Diskoidné
			Nediskoidné
			Akinéty
			Áno
			Nie
			Trichómy
			V zviskoch
			Jednotrichómálne
 Calothrix Gloeotrichia Rivularia	 Tolypothrix	 Scytonema	 Nostoc
			Anabaenopsis, Cyanospira
			Nodularia
			Cylindrospermum
			Cylindrospermopsis
			Aphanizomenon
			Anabaena

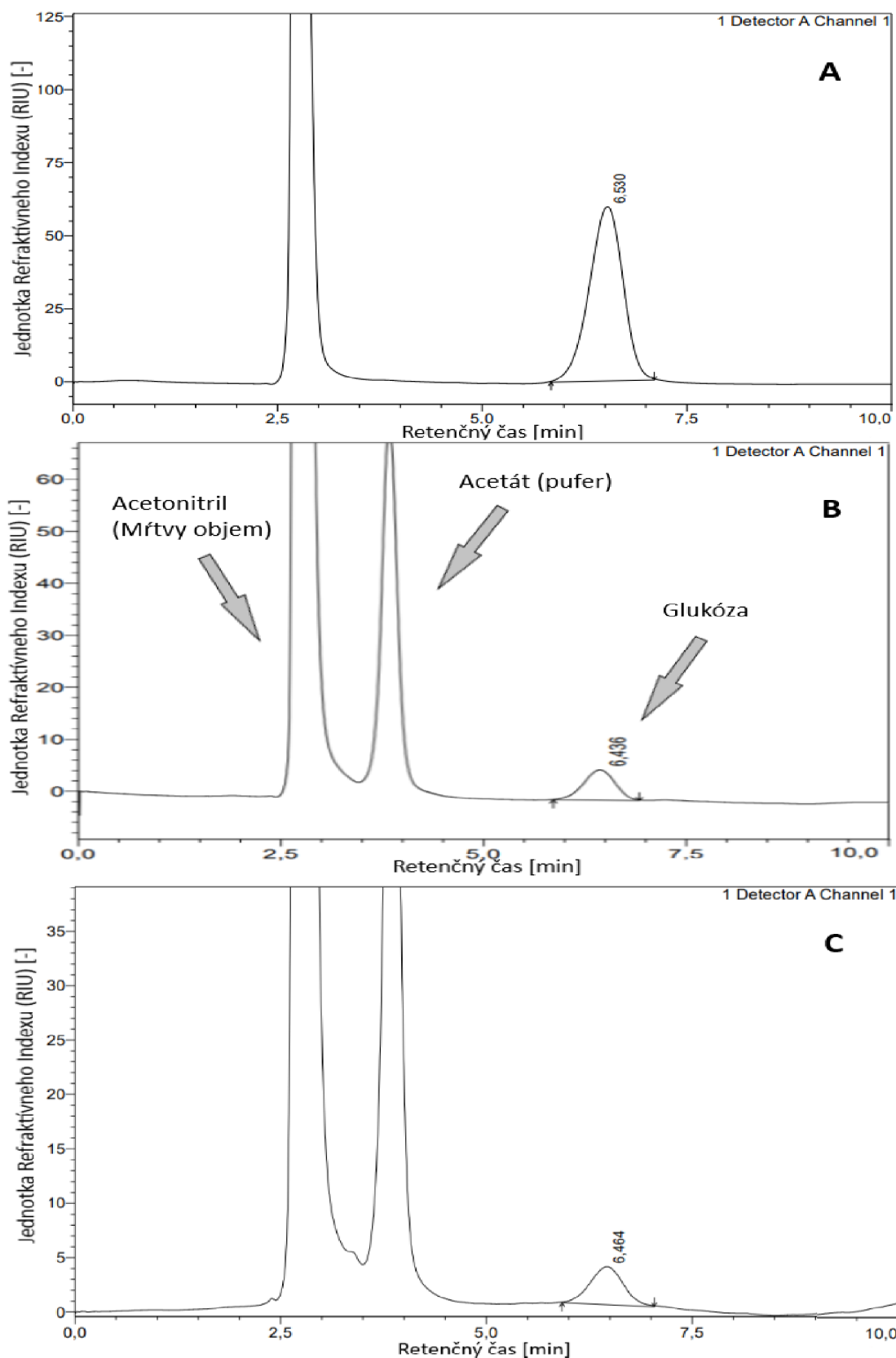
Rad V - Stigonematales			
Dvojvláknové vetvenie	Laterálne vetvenie		
	Prechodné vetvené, tvoriace agregáty	Permanentné vetvenie	
		Jednoradové vetvy	Viacradové vetvy
		Heterocyty	Stigonema
	Laterálne	Prekľadané	
 Geitleria	 Chlorogloopsis	 Nostochopsis	 Fischerella

Príloha 1 - Rady cyanobaktérii na základe Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Na obrázku sú vyobrazené charakteristické morfológické vlastnosti daných radov a typický zástupcovia. Prebraté a upravené z [1].





*Príloha 2 – Farba zrazeniny po Carrezovej precipitácii v roztoku a po precipitácii. Na treťom obrázku je možné pozorovať, že u mladšej kultúry nedochádzalo k vzniku zeleného sfarbenia, pravdepodobne kvôli nižšiemu obsahu fykocyanínu.*



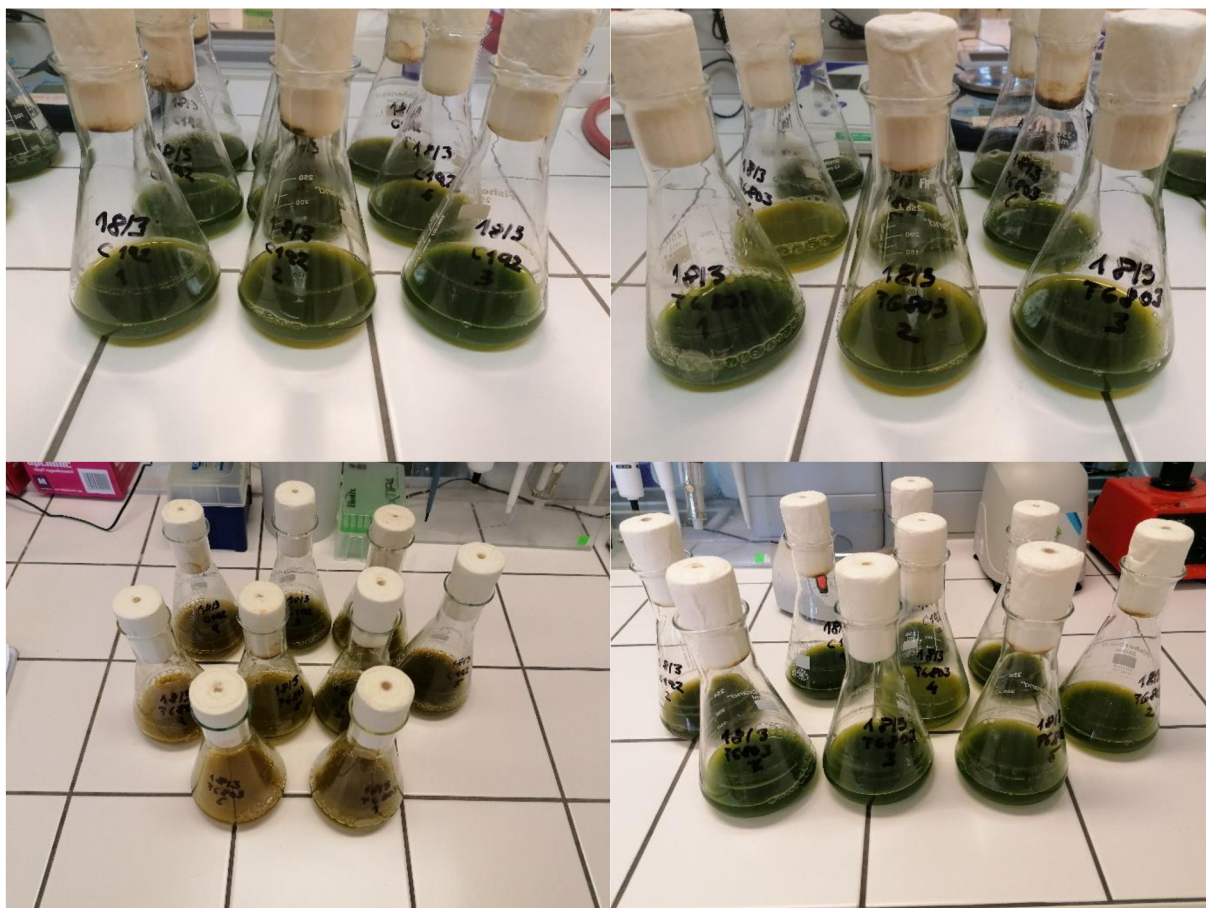
Príloha 3 – Výstupy z HPLC, na obrázku A sa nachádza glukózový štandard pre identifikáciu retenčného času, na obrázku B glykogénový štandard s popísanými peakmi a na obrázku C reálna vzorka. Retenčné časy sa môžu mierne líšiť v závislosti na aktuálnom tlaku na kolóne a miernymi odchýlkami v aktuálnom zložení mobilnej fáze



*Príloha 4 – Zahájenie kultivácie oboch kmeňov so zámerom sledovania vplyvu osvetlenia na akumuláciu zásobných polymérov v dusík- aj fosfor-limitujúcich médiách M220 a BG-11*



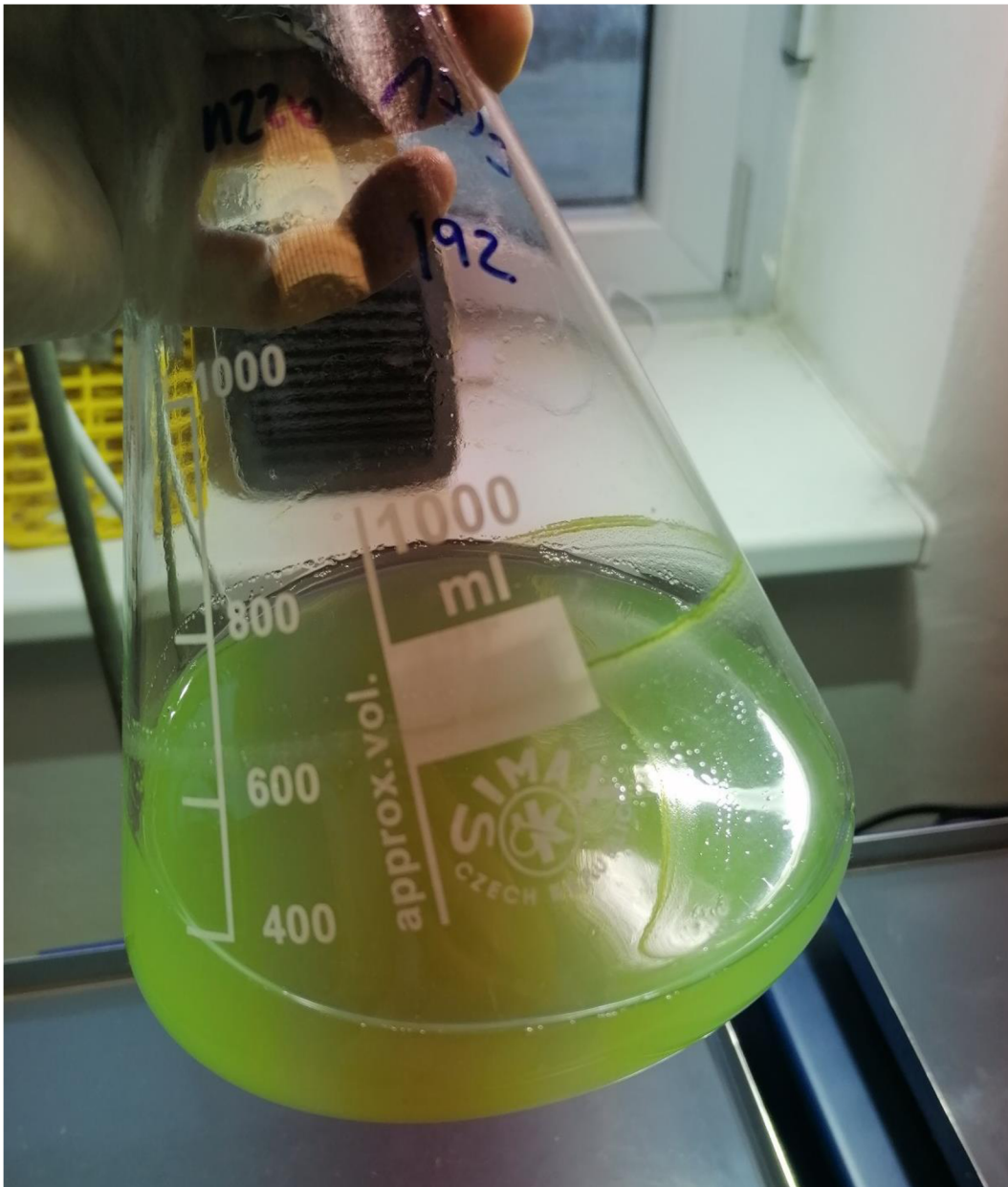
*Príloha 5 – Nehomogenita kultúr zaočkovaných z tej istej kultúry, rovnakým objemom, do rovnakého objemu kultivačného média, kultivovaných pri tých istých podmienkach v tesnej blízkosti*



Príloha 6 – Dosiahnutie uniformity kultivácií, na horných obrázkoch kultúry pred fázou svetlota, na spodných po uplynutí tejto fázy (naľavo kultúry na svetle, vpravo v tme).



Príloha 7 – Rozdiely medzi vložkovatením vplyvom kontaminácie (na 1. obrázku) a vplyvom aklimatizácie *Synechocystis* sp. PCC 6803 na nový objem média a koncentráciu živín



*Príloha 8 – 2-týždňová kultúra uhynutá po umiestnení pod lampu počas vikendu pre dodatočný nárast pred zahájením experimentu*



*Príloha 9 – Rast kultúr v Multikultivátore počas 3 týždňov (zhora v 0., 7., 14. a 21. deň)*



*Príloha 10 – Rýchlejší rast mixotrofnej kultivácie (v polohách 1 a 8 fotoautotrofné kultúry, v polohách 2, 4 a 6 kombinácia acetátu s propionátom 5g/L a v polohách 3, 5 a 7 mŕtve kultúry v prítomnosti  $\gamma$ -butyrolaktómu)*