



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

Evoluční a genové inženýrství bakteriálních producentů polyhydroxyalkanoátů

Evolutionary and genetic engineering of bacterial producers of
polyhydroxyalkanoates

AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

Doctoral thesis

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Ivana Nováčková

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

prof. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

ŠKOLITEL SPECIALISTA

Consultant

prof. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.

BRNO 2023

Disertační práce byla sepsána v rámci doktorského studijního programu na Vysokém učení technickém v Brně na Ústavu chemie potravin a biotechnologií v prezenční formě studia.

Uchazeč: Ing. Ivana Nováčková
Ústav chemie potravin a biotechnologií
FCH VUT v Brně

Školitel: prof. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
Ústav chemie potravin a biotechnologií
FCH VUT v Brně

Školitel specialista: prof. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.
Ústav chemie potravin a biotechnologií
FCH VUT v Brně

Oponenti:

Autoreferát byl odeslán dne:

Obhajoba disertační práce se koná dne v.....hodin před komisí pro obhajoby disertačních prací v zasedací místnosti číslo.....na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně.

S disertační prací je možné se obeznámit na děkanátu Fakulty chemické Vysokého učení technického v Brně.

ABSTRAKT

Předložená disertační práce se zabývá tematikou evolučního a genového inženýrství bakteriálních producentů polyhydroxyalkanoátů (PHA). Vyjma tato témata přímo související s názvem práce je rozvinuta o problematiku biotechnologické produkce PHA na modelových hydrolyzátech lignocelulosové biomasy s využitím extrémofilních mikroorganismů a dále o vývoj alternativního způsobu izolace PHA. Rozvíjející témata přitom volně navazovala na předchozí experimenty a reflektovala aktuálně řešené projekty na pracovišti. Disertační práce je vypracovaná formou komentované diskuse publikovaných prací, které jsou její součástí ve formě příloh. Evoluční inženýrství bylo aplikováno především na modelový PHA produkující bakteriální kmen *Cupriavidus necator* H16. Adaptací na kyselinu levulovou byly získány izoláty produkující kopolymer P(3HB-co-3HV) s vyšším zastoupením frakce 3HV, což vede ke zlepšení vlastností polymeru pro další zpracování. Stejně tak i růst kultur a množství celkových PHA v biomase bylo vyšší. Dlouhodobou adaptací téhož kmene na osmotický stres a přítomnost měďnatých iontů byly získány izoláty charakterizované v rámci druhé publikace. Ze získaných dat bylo možné pozorovat rozdíly v adaptačním procesu, kdy adaptace na osmotický stres byla postupná, zatímco u mědi byl pozorován výrazný skok nárůstu biomasy a PHA signalizující rychlou adaptaci. Na základě analýz byla diskutována významná úloha PHA při adaptaci kmene *C. necator* H16 na testované stresory, která nespočívala pouze v nárůstu množství polymeru v biomase, nicméně v posílení celého cyklu, což vede také ke zvýšení poolu monomerních jednotek vykazujících protektivní účinky. Adaptací na ϵ -kaptolakton, unikátní prekurzor 4HB, byl získán kopolymer P(3HB-co-4HB). Jeho vlastnosti jsou opět výhodnější než u homopolymeru P(3HB), a to už při nízkém zastoupení 4HB, kterého jsme dosáhli také v laboratorním bioreaktoru. Dalšího navýšení frakce 4HB by mohlo být dosaženo s využitím delečních mutantů s absencí relevantních genů, jež byly více diskutovány. Produkce PHA na modelech hydrolyzátů lignocelulosové biomasy pocházející například z potravinářství byla testována v kombinaci s využitím extrémofilních producentů, kdy byla diskutována preference obsažených monosacharidů (hexos, pentos) pro jednotlivé producenty. Pro přiblížení se reálným hydrolyzátům byla testována také odolnost kmenů vůči relevantním potenciálním mikrobiálním inhibitorům. Náchylnosti halofilních a termofilních producentů PHA k osmotickému namáhání bylo využito při vývoji alternativního izolačního přístupu, který by snížil ekonomickou i ekologickou zátěž celého procesu oproti standardní extrakci využívající chlorovaná rozpouštědla. Aplikací detergentu SDS v nízkých koncentracích při současném temperaci při vyšších teplotách vedla k zisku polymeru vysoké čistoty současně bez ztráty výtěžku. Dále se nabízí možnost recyklace využitého SDS.

KLÍČOVÁ SLOVA

Evoluční inženýrství; genové inženýrství; polyhydroxyalkanoáty (PHA); extrémofilní mikroorganismy; izolace PHA; SDS

OBSAH

1	ÚVOD	5
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	6
2.1	Postavení mikrobiální buňky v biotechnologiích	6
2.1.1	Stresová odpověď mikroorganismů	6
2.1.2	Zlepšení charakteristik mikrobiálních producentů	6
2.2	Evoluční inženýrství.....	6
2.2.1	Princip metodiky evolučního inženýrství.....	7
2.2.2	Metody analýzy adaptovaných kmenů	8
2.2.3	Aplikace evolučního inženýrství.....	8
2.3	Genové inženýrství.....	8
2.3.1	Princip a provedení experimentů genového inženýrství	9
2.3.2	Aplikovatelnost technik genového inženýrství	9
2.4	Polyhydroxyalkanoáty	9
2.4.1	Výskyt, vlastnosti a složení PHA	10
2.4.2	Biosyntéza PHA	11
2.4.3	Degradace PHA.....	12
2.4.4	Scale-up biotechnologické produkce PHA	12
3	CÍLE PRÁCE	13
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	14
4.1	Evoluční inženýrství producentů PHA.....	15
4.1.1	Adaptace <i>C. necator</i> H16 na kyselinu levulovou.....	15
4.1.2	Dlouhodobá adaptace kmene <i>C. necator</i> H16 na biotechnologicky relevantní stresory	19
4.1.3	Produkce kopolymeru P(3HB-co-4HB) pomocí <i>C. necator</i> H16	22
4.2	Využití extrémofilů pro biotechnologickou produkci PHA	24
4.3	Ekologická izolace PHA z extrémofilních producentů	28
5	ZÁVĚR.....	32
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	35
7	LITERATURA	36
8	ŽIVOTOPIS	42
9	PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORKY	43

1 ÚVOD

Mikroorganismy jsou neustále vystaveny působení stresu, a to jak při biotechnologických procesech, tak i v jejich přirozeném prostředí. Stres, de facto představující posun jakéhokoliv relevantního parametru mimo optimum, slouží jako hnací krok evoluce. Bez působení vnějšího tlaku by totiž organismy neměly potřebu se v rámci adaptačního procesu vyvíjet. U mikroorganismů je stres doprovázený adaptací téměř neustávající záležitostí, což vede ke zvýšení jejich variability oproti složitějším organismům, které adaptují podstatně pomaleji. V případě, že je organismus neschopný se na často se měnící podmínky adaptovat, dochází po nějakém čase k jeho úhynu. Pro biotechnologické procesy jsou zapotřebí dostatečně odolné mikrobiální kmeny s dobrými produkčními vlastnostmi, které je možné získat pomocí řady technik.

Jeden z možných přístupů, evoluční inženýrství, je založen na řízené aplikaci stresu v laboratorním či průmyslovém měřítku. Pro přípravu kmenů se nevyužívá všech přirozeně se vyskytujících stresů, nýbrž pouze stresových podmínek, které mohou reálně v biotechnologických procesech nastat. Při kultivacích by měly být kontaminující mikroorganismy aplikací stresu eliminovány, zatímco adaptované kmeny by měly být odolné. Aplikací stresů různých intenzit mohou být připravovány kmeny s vyšší robustností nebo mohou být vyvíjeny kmeny se zcela novými charakteristikami na úrovni fenotypu, a to např. navýšením schopnosti utilizace zdroje uhlíku. Přestože je ale efektivita evolučního inženýrství poměrně vysoká, provedení experimentů je časově náročné.

Další možností konstrukce kmenů s novými vlastnostmi představuje aplikace technik genového inženýrství. Oproti evolučnímu inženýrství je provedení časově méně náročné, ale změny v genotypu se ne vždy projeví na úrovni fenotypu. Aplikací různých technik lze připravit kmeny s vylepšenými charakteristikami podobně jako u evolučního inženýrství.

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) představují jednu z možností, jak se mikroorganismy mohou dočasně chránit vlivům stresu. PHA slouží řadě bakterií jako rezervní zdroj uhlíku a energie pro případ, že se nachází ve stavu nedostatku živin nebo jsou vystaveny stresu prostředím. Jedná se o obnovitelné biomateriály, které disponují biokompatibilitou a biodegradabilitou. Svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi se podobají syntetickým polymerům vyráběným z ropy, což je při jejich současné biologické odbouratelnosti činí vhodnými materiály pro využití nejen v průmyslu, ale také například v oblasti péče o zdraví nebo kosmetice. Vlastnosti polymerů závisí na zastoupení monomerů v molekulách polyesterů, čehož lze využít při designu materiálů pro nejrůznější cílové aplikace.

Cílem práce je pojednat o obou zmíněných technikách, tedy o evolučním i o genovém inženýrství. Dále budou diskutovány možnosti aplikace obou přístupů na PHA produkující bakterie sloužící ke zvýšení výtěžku produkce a také k cílené produkci materiálů s požadovanými vlastnostmi.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Postavení mikrobiální buňky v biotechnologiích

Mikrobiální biotechnologie obecně zahrnují komplexní procesy, při nichž jsou prostřednictvím mikroorganismů produkovány látky a materiály pro různé účely, jedná se přitom o metabolity izolované v různých fázích růstu producentů. Mezi využívané mikroorganismy patří především bakterie a kvasinky, tedy zástupci prokaryotické i eukaryotické říše. Vzhledem ke komplexní povaze průmyslových fermentačních procesů je zapotřebí využívat mikroorganismy, které jsou dostatečně robustní, kdy robustnost spočívá v odolnosti kmenů vůči vlivům prostředí, ve kterém se nachází [1–4].

2.1.1 Stresová odpověď mikroorganismů

Mikrobiální stres může být obecně brán jako posun libovolného pro buňku relevantního parametru mimo její optimum. Mikroorganismy jakožto nejčastěji jednobuněčné organismy mají v přítomnosti stresu dvě možnosti, a to buď se na stres adaptovat, nebo na následky poškození vlivem expozice zahynout, a to ihned nebo postupně, kdy následkem stresu nejsou schopny dělení. Adaptace spočívá ve změnách v buňce (změny ve složení) nebo buňky jako takové (změny ve fyziologii), a to kvůli limitaci fyzického pohybu. Lze ji tedy vysvětlit jako (evoluční) proces, při kterém se organismus přizpůsobí vnějším podmínkám, v nichž se vyskytuje [1–5].

Samotnými projevy adaptace mohou být morfologické změny, inhibice syntézy DNA, RNA a neesenciálních proteinů, zvýšená rychlost obratu proteinů (proteolýzy), indukce exprese proteinů nezbytných pro adaptaci na daný stres a také indukci exprese proteinů zapojených do všeobecných regulačních sítí, čímž si buňka zajistí ochranu i vůči jiným stresovým podmínkám [1, 2, 5, 6].

2.1.2 Zlepšení charakteristik mikrobiálních producentů

Jak již bylo zmíněno, u mikrobiálních producentů je při biotechnologických procesech nezbytná dostatečná odolnost vůči prostředí, v němž se nachází, a rovněž schopnost produkce dostatečného množství požadovaných metabolitů. Nejen za tímto účelem může být ke zlepšení charakteristik mikrobiálních producentů využita řada přístupů, mezi které patří především evoluční a genové inženýrství, které mohou být aplikovány jednak separátně, jednak kombinovaně [7]. O těchto strategiích pojednají další kapitoly této disertační práce.

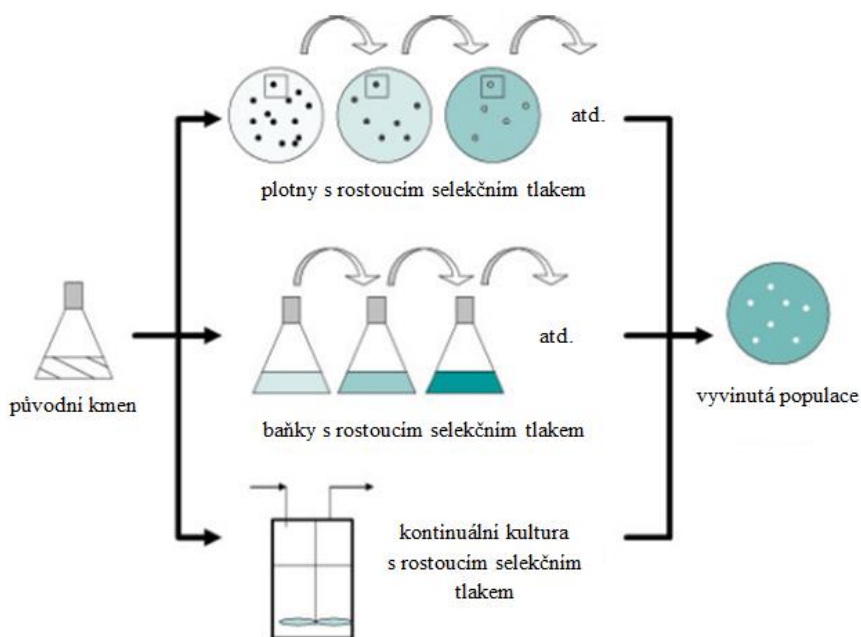
2.2 Evoluční inženýrství

Evoluční inženýrství nebo také adaptivní laboratorní evoluce, buněčná řízená evoluce či *in vitro* evoluce představuje možnost přípravy látek, produktů metabolismu, s požadovanou funkcí nebo vlastnostmi pro cílovou aplikaci, a to s využitím principů přirozeného evolučního procesu. Může se jednat o různé biopolymery, nukleové kyseliny či proteiny se specifickými funkcemi, které nejsme schopni synteticky cíleně racionálně připravit s využitím klasických inženýrských postupů. Jedna z výhod evolučního inženýrství spočívá v tom, že není zapotřebí znát genetické determinanty podmiňující charakteristiky na úrovni fenotypu, jelikož mnohé

z nich nejsou doposud popsány. Tento inverzní přístup umožňuje pouze fenotypové změny, které lze pozorovat ve spojitosti s růstem. Vesměs náhodnými postupy získané fenotypy mohou být následně prostřednictvím metod genetiky, transkriptomiky, metabolomiky, případně i jejich kombinací, charakterizovány a analyzovány za účelem identifikace vzniklých mutací a jejich příčiny [8–11].

2.2.1 Princip metodiky evolučního inženýrství

Provedení evolučních experimentů spočívá ve množení mikrobiálních populací při současném působení selekčního tlaku (Obr. 1). Selekční tlak, představující limitaci růstu, jsou přitom různé stresové faktory jako teplota, pH, osmolarita, přítomnost toxických látek apod. Výhodami jsou především jednoduchost a účinnost, které činí evoluční inženýrství přední technikou pro zlepšování vlastností průmyslových producentů. Oproti přirozenému procesu evoluce, který metodika evolučního inženýrství napodobuje, probíhá adaptační proces racionálně, efektivně a podstatně rychleji. Při kultivaci v kontrolovaných podmínkách lze sledovat změny na úrovni fenotypu a zpětně i genotypu s volitelným časovým odstupem s ohledem na počet generací, kterým můžou být desítky, stovky až tisíce [9, 10, 12].



Obr. 1: Princip evolučních experimentů [13]

Zlepšení vlastností na úrovni fenotypu, provázející proces adaptace, souvisí s aktivacími dříve latentních metabolických drah a adaptované kmeny s evoluční výhodou následně rozšiřují populaci. Na úrovni genomu se během evolučního procesu účastní řada základních procesů, jako jsou různé typy mutací, rekombinace, genetický drift a také přirozený výběr [9, 10, 14].

Jednou z nejčastějších aplikací evolučního inženýrství je především využití širší škály substrátů, zvýšení tolerance mikrobiálních producentů vůči stresorům spojených s průmyslovými fermentacemi nebo zvyšování rychlosti růstu [9–11].

2.2.2 Metody analýzy adaptovaných kmenů

Kmeny získané z jednotlivých kroků kultivací mohou být porovnávány vzájemně mezi sebou nebo s původním kmenem za účelem charakterizace rozdílů. K tomuto účelu se využívají různé metody genomiky, transkriptomiky, metabolomiky a jejich kombinace, které srovnávají kmeny na příslušných úrovních, tedy na úrovni DNA, RNA, proteinů a celé škály metabolitů [9, 10, 15].

Nejjednodušší techniky jsou založeny na využití charakteristik fenotypů, které jsou značně rozdílné, a to např. rychlý růst či barva. Kromě rozdílné růstové kinetiky a barvy lze jednoznačně rozlišit fenotypy na základě tolerance vůči vybraným látkám. Další možnost screeningu představuje využití biosenzorů, které mohou být aplikovány za účelem vyvolání exprese proteinů anebo produkce jiných metabolitů odlišujících cílový fenotyp od okolí, vyvolání rezistence vůči antibiotiku nebo provádění screeningu metabolitů [10, 15]. Nejobecnějším přístupem k analýze korelací mezi genotypem a fenotypem pomocí metod molekulární biologie pak představuje zpětná analýza vzniklých mutací. Zatímco kulturační část evolučních experimentů je již po dlouhou dobu identická, metody molekulární biologie zaznamenávají v posledních letech dramatický vývoj vedoucí ke zjednodušení a zefektivnění analýzy a objasnění mechanismů na molekulární úrovni [8, 9, 16].

2.2.3 Aplikace evolučního inženýrství

Evoluční inženýrství se aplikuje především na mikroorganismy, které se oproti jiným organismům vyznačují řadou výhodných charakteristik, jako jsou: i) nenáročné podmínky na živiny; ii) snadná kultivace v laboratoři a iii) vysoká rychlost rozmnožování a možnost stabilní kultivace v horizontu několika set až tisíc generací během dlouhodobých experimentů. Dlouhodobý časový horizont (volitelně dny, týdny až roky) umožňuje v průběhu procesu vyselektovat adaptované kmeny s nejlepšími charakteristikami na úrovni fenotypu [8].

Jak již bylo uvedeno výše, v biotechnologických procesech se evoluční inženýrství využívá primárně za účelem zvyšování robustnosti ve smyslu vyšší odolnosti vůči stresu způsobenému jednak fyzikálními faktory (např. teplota, pH, osmolarita), jednak vůči složkám kulturačního media nebo produktům metabolismu působících toxickým efektem a také ke zvyšování výtěžku vybraných metabolitů. Komplikace mohou nastat ve spojitosti se scale-up procesem z laboratorního do průmyslového měřítka, a to při produkci metabolitů spojených s růstem. Během převodu do většího objemu jsou mikrobiální producenti vystaveni stresu vlivem změny kulturačního media, kdy se v laboratořích a poloprovozech začíná zpravidla komplexními medii bohatými na živiny, následně jsou při velkoobjemové produkci kultury převedeny do nutričně chudších medií a během toho jsou i jinak namáhány, což se negativně podepíše na růstu a také na výtěžku požadovaných produktů [8].

2.3 Genové inženýrství

Genové (genomové) inženýrství představuje techniku založenou na změně genetického kódu organismu, která vznikla jako odnož molekulární biologie. Genom všech organismů sestává z nukleotidů kódujících proteiny, pro jejichž správnou funkci musí být nukleotidy ve správném pořadí, kdy změny v sekvencích mohou mít pozitivní i negativní dopad na

organismus. V posledních letech byla vyvinuta celá řada metod a nástrojů pro cílenou editaci genomu organismů, a to včetně průmyslově významných mikroorganismů. Genové inženýrství zahrnuje celou řadu úprav, a to delece nukleotidů vedoucí k vyřazení genů, inkorporace nukleotidů vedoucí k inserci nových genů a úpravy sekvencí nukleotidů vedoucí ke vzniku mutací, čímž se mění stávající nebo konstruuji nové genotypy. Vyjma toho se zabývá umělou syntézou či izolací vybraných genů z genotypů organismů se specifickými charakteristikami na úrovni fenotypu, následným řízeným přenosem do genomu nepříbuzných organismů a zajištěním exprese vložených genů [17, 18].

2.3.1 Princip a provedení experimentů genového inženýrství

Manipulace s nukleovými kyselinami, která byla dříve téměř nemyslitelná, je v současné době běžnou technikou. Přenos nukleových kyselin je standardní pro každé v rámci jednoho organismu představující klasickou dědičnost vertikálním přenosem na potomky. Oproti tomu genové inženýrství pracuje s horizontálním přenosem DNA, a to nejen v rámci jedné generace, ale i mezi jednotlivými kmeny, čímž se odklání od většiny přirozených procesů [18]. V podstatě existují tři hlavní úpravy genomu vybraného organismu, a to delece (knock-out), inserce (knock-in) či výměny existujících DNA sekvencí za exogenní [19].

2.3.2 Aplikovatelnost technik genového inženýrství

Pro biotechnologické aplikace jsou zapotřebí robustní mikroorganismy s dobrými produkčními vlastnostmi, které lze získat mj. právě technikami genového inženýrství. Po zásahu do genomu zpravidla následuje testování mutanta z hlediska manifestace změn na úrovni fenotypu, přístup je tedy reverzní oproti evolučnímu inženýrství [8].

Dlouhou dobu byly za účelem indukce mutací využívány různé chemické látky nebo záření, jak již bylo uvedeno výše. Přestože takto vznikla řada mutantních kmenů umožňující zkoumat funkce genů a podstatu mutací, byla tato mutagenese nespecifická, což limitovalo změny konkrétních genů nebo jejich sekvencí. Využívá se v medicíně při designování léčiv, při terapii, pro *in vitro* či *in vivo* modely nemocí a diagnostice, v zemědělství a biotechnologiích generováním geneticky modifikovaných organismů s výhodnými vlastnostmi a dalších odvětvích, stejně jako pro účely výzkumu [17, 18].

2.4 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) patří do skupiny biopolymerů především mikrobiálního původu. Z chemického hlediska se jedná o lineární polyestery nejčastěji 3-, ale i 4-, 5- nebo 6-hydroxyalkanových kyselin [20], které jsou ukládány v buňkách mikroorganismů ve formě intracelulárních granulí. Vlastnosti PHA mohou být v závislosti na složení značně variabilní, a proto mají potenciál nahradit klasické syntetické plasty vyráběné z ropy, kterým jsou ze všech bioplastů nejpodobnější. Oproti nim disponují řadou výhodných vlastností, a to především možností produkce z obnovitelných zdrojů, biokompatibilitou a biodegradabilitou, která eliminuje problém s akumulací použitých materiálů v životním prostředí [21, 22].

2.4.1 Výskyt, vlastnosti a složení PHA

Více než 300 druhů bakterií syntetizuje PHA ve formě intracelulárních granulí, které byly objeveny a popsány už v roce 1926 francouzským vědcem Mauricem Lemoignem [23, 24]. Slouží jim jako zásobní látky pro případ nepříznivých podmínek, kdy představují zdroj uhlíku, energie a také redukční síly, což jim ve stresových situacích umožní přežití, dokud nedojde k jejich vyčerpání. Obsah PHA v biomase se odvíjí od konkrétních producentů, ale závisí i na řadě dalších faktorů, které lze při biotechnologické výrobě zohlednit, což může vést až k 90 % výtěžku [24, 25]. Granule nabývají přibližně kulovitěho tvaru o velikosti v průměru 0,2–0,5 μm s vnější vrstvou tvořenou proteiny a vnitřním polyesterovým jádrem. Z proteinů jsou zastoupeny především PHA polymerasa, intracelulární PHA depolymerasa, které díky asociaci s řetězcem polymeru zajišťují efektivní proces jeho biosyntézy a degradace, phasiny zabraňující vzájemné koalescenci granulí a plnící další funkce, z nichž některé jsou i neobjasněné [25–27].

Doposud bylo objeveno a popsáno přibližně 150 druhů různých monomerních jednotek, které se liší jednak pozicí hydroxylové skupiny, jednak postranními řetězci [28]. Na základě zastoupených monomerů můžeme rozdělit PHA na homopolymery s pouze jedním typem monomerní jednotky, a heteropolymery s rozdílnými monomery. Nejčastěji se vyskytují kopolymery, sestávající ze dvou rozdílných monomerů, ale i terpolymery. Molekulová hmotnost polymeru leží v rozmezí 200–3 000 kDa a stejně jako další vlastnosti odvíjí se přitom od producenta, podmínek kultivačního procesu a způsobu fermentace [29–31].

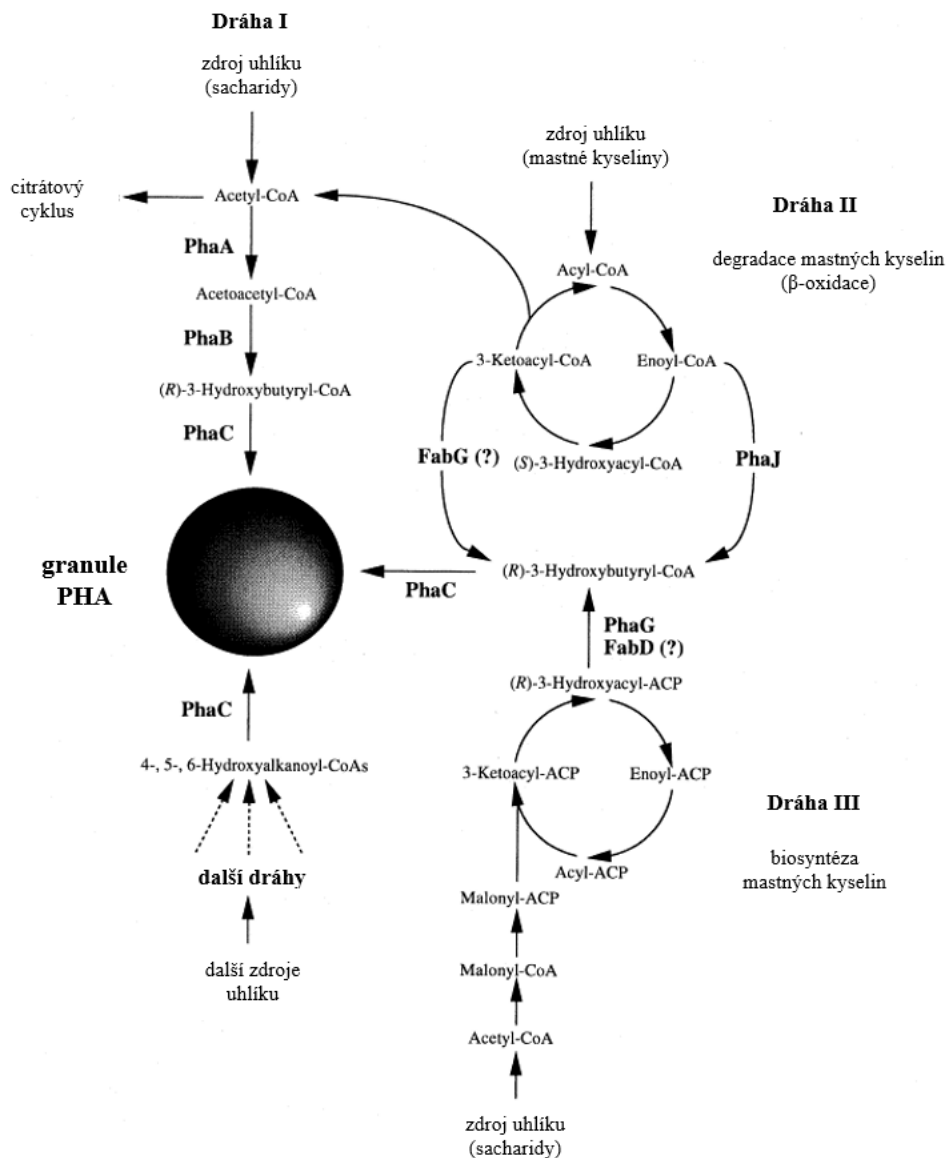
Další možností je dělení na základě počtu uhlíků v monomerních jednotkách, které se projevuje mj. změnou fyzikálně-chemických vlastností materiálu. Na základě tohoto kritéria se dělí do tří skupin na PHA s krátkým řetězcem scl-PHA, se středně dlouhým řetězcem mcl-PHA a s dlouhým řetězcem lcl-PHA. Vlastnosti heteropolymerů se odvíjí od zastoupení jednotlivých monomerních jednotek, proto lze jejich kombinacemi připravovat materiály požadovaných vlastností pro cílové aplikace (Tab. 1). Od zastoupení monomerních jednotek se odvíjí krystalinita a hydrofobní povaha polymeru, stejně jako jeho teplota tání a teplota skelného přechodu [20, 29, 31].

Tab. 1: Vlastnosti homopolymeru 3HB a jeho vybraných kopolymerů, porovnání s PP [32]

Polymer	Teplota tání [$^{\circ}\text{C}$]	Youngův modul [GPa]	Pevnost v tahu [MPa]	Prodloužení při přetržení [%]
P(3HB)	175–180	3,5–4	40	3–8
P(3HB-co-3HV)				
3 mol. % 3HV	170	2,9	38	–
20 mol. % 3HV	145	1,2	32	50–100
P(3HB-co-4HV)				
3 mol. % 4HV	166	–	28	45
10 mol. % 4HV	159	–	24	242
PP (polypropylen)	170–176	1,0–1,7	29,3–38,6	500–900

2.4.2 Biosyntéza PHA

Biosyntetické dráhy vedoucí k produkci PHA se odvíjí od uhlíkatého zdroje. Byly popsány tři hlavní dráhy napříč metabolismy známých produkujících kmenů, kdy rozdíl v nich se spočívá v úpravě zdroje uhlíku do podoby substrátu pro PHA syntasu (Obr. 2) [33].



Obr. 2: Biosyntetické dráhy PHA [30]

2.4.2.1 Využití odpadních substrátů

Na základě možností biosyntézy lze říci, že pro produkci PHA lze využít sacharidické substráty, stejně jako substráty s obsahem mastných kyselin. Při identifikaci nových obnovitelných zdrojů uhlíku za účelem produkce PHA je tedy zapotřebí povahu substrátu zohlednit. Využití odpadních substrátů vede ke snížení nákladů na produkci PHA, a tím je činí konkurenceschopné při porovnání s tradičními petrochemickými plasty. Jako zdroje uhlíku a živin se často využívají odpadní produkty z různých segmentů průmyslu nebo zemědělství, a to především lignocelulosaová biomasa, odpadní oleje, syrovátka, melasa anebo odpadní glycerol [34].

Přestože je lignoceluloso­vá biomasa nejrozšířenějším, a tedy i nejlevnějším odpadním produktem řady výrob, musí být pro využití jako substrát nejvíce upraven. Po hydrolyze vedoucí až ke vzniku fermentovatelných sacharidů, především glukosy, jsou v hydrolyzátech přítomny vlivem rozkladu ligninu i látky působící jako mikrobiální inhibitory, proto je vhodné hydrolyzáty detoxifikovat. Přítomnost organických kyselin, například kyseliny octové a levulové, může působit jednak jako inhibitor, ale s využitím adaptovaných kmenů mohou být tyto kyseliny naopak využity pro syntézu společně se sacharidy, čímž se zvyšuje účinnost celého procesu [35].

2.4.3 Degradace PHA

Degradaci PHA může být rozdělena na intracelulární a extracelulární, a to na základě povahy polymeru. Rozklad je katalyzován depolymerasami, které hydrolyticky štěpí esterovou vazbu v polymeru za uvolňování oligomerních a monomerních jednotek. Při intracelulární degradaci dochází k utilizaci amorfního PHA naakumulovaného v granulích při vyčerpání původních zdrojů uhlíku a energie a extracelulární degradace přímo souvisí s biodegradabilitou materiálu [30].

2.4.4 Scale-up biotechnologické produkce PHA

Pro úspěšnou velkoobjemovou biotechnologickou produkci polyhydroxyalkanoátů jsou klíčové především tři faktory, a to co nejnižší náklady na substrát, na vývoj procesu a také na down-streamový izolační proces. Volbou vhodných substrátů či jejich kombinací lze cíleně produkovat relativně velká množství homopolymerů a kopolymerů PHA s volitelnou molekulovou hmotností, kdy kombinace různých substrátů může kompenzovat jejich nedostatky s ohledem na zastoupení živin [36, 37].

Při převedení kultivace z laboratorního měřítka do velkých objemů zpravidla dochází ke snížení výtěžku PHA v biomase, proto i zde probíhá optimalizace přídavky různých lehce užitelných zdrojů uhlíku jako např. glycerol. Oproti laboratorním experimentům se totiž pro produkci zpravidla nevyužívají syntetické zdroje uhlíku, které jsou jednoduše přístupné. Volba módu kultivace závisí na konkrétní situaci s ohledem na využívaný mikroorganismus, substrát, potřebu nárůstu kultury, požadavků na monitorování procesu apod. Po kultivaci následuje sklizení biomasy, izolace polymeru a v závislosti na požadavkům na čistotu také jeho purifikace [36, 37].

3 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem disertační práce je aplikace technik evolučního a genového inženýrství na bakteriální kmeny schopné produkovat polyhydroxyalkanoáty s ohledem na kvantitativní i kvalitativní charakteristiky produkovaného polymeru. Mimoto byla práce zaměřena na biotechnologickou produkci PHA s využitím odpadů z potravinářského průmyslu a taktéž vývoj alternativního způsobu izolace těchto biopolymerů.

Dílčí cíle práce:

1. **evoluční inženýrství** vybraných PHA producentů ve smyslu jejich adaptace na vybrané mikrobiální stresory, metabolická charakterizace získaných adaptovaných kmenů a ověření biotechnologického potenciálu pro produkci PHA u nejslibnějších z nich;
2. **genové inženýrství** vybraných producentů PHA ve smyslu zavedení a optimalizace postupů umožňujících stanovit genovou expresi vybraných genů, výběr vhodných cílů pro genové manipulace, zavedení technik pro vybrané kmeny;
3. **využití získaných kmenů** při biotechnologických produkcích, kultivace adaptovaných kmenů získaných během evolučního inženýrství v laboratorním bioreaktoru, využití odpadních substrátů z potravinářského průmyslu (odpadní olej, hydrolyzáty lignocelulosové biomasy) jako substrátů pro kultivace, podrobná materiálová charakterizace připravených materiálů;
4. **vývoj alternativního způsobu izolace PHA** se zaměřením na snížení ekologických a ekonomických aspektů standardního extrakčního přístupu, využití výhodných vlastností extrémofilních mikroorganismů.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

V rámci kapitoly věnované výsledkům a diskuzi jsou obsažena data publikovaná v rámci článků v impaktovaných časopisech, a to s popisem výsledků.

Disertační práce je zaměřena především na evoluční inženýrství bakteriálních producentů polyhydroxyalkanoátů. Aplikací technik v rámci jednotlivých metodik představuje hlavní úsilí úprava produkčních charakteristik mikroorganismů s ohledem na kvantitu vyprodukovaných PHA, ale i kvalitativní zastoupení různých monomerů v kopolymerech, a to P(3HB-co-3HV) a P(3HB-co-4HB) při růstu na chemicky čistých substrátech, ale i odpadních materiálech, pocházejících často z potravinářského průmyslu, majících potenciál i pro velkokapacitní výrobu. Produkci kopolymeru 3HB s 3HV byla věnována především část práce zaměřená na adaptaci kmene *Cupriavidus necator* H16 CCM 3726 na kyselinu levulovou, která se přirozeně nachází v hydrolyzátech lignocelulosových materiálů a vystupuje jako inhibitor mikrobiálního růstu (viz podkapitola 4.1.1). Zisk kmenů schopných růst při vyšší koncentraci kyseliny levulové je žádoucí nejen s ohledem na celkovou výtěžnost procesu, ale také pro zisk kopolymeru s vyšší podílem 3HV, jelikož bakterie je schopna kyselinu využít za vzniku propionyl-CoA a ten následně využít jako prekurzor pro pětiuhlíkatý monomer 3-hydroxyvalerát, který následně začlení do kopolymeru.

Dlouhodobému adaptačnímu procesu byly v dalších experimentech vystaveny kmeny *Halomonas halophila* a opět i *Cupriavidus necator* H16, kdy byly využity stresové podmínky relevantní pro reálné biotechnologické procesy, a to přítomnosti organických kyselin (octová a levulová) pro *H. halophila* CCM 3662^T a vyššímu osmotickému stresu respektive přítomnosti vyšší koncentrace měďnatých iontů představujících antropogenní polutant pro *C. necator* H16 (viz podkapitola 4.1.2). Přestože se opět jednalo o experiment v rámci evolučního inženýrství, strategie experimentu a časový horizont byly odlišné. Z hlediska produkce PHA byla v průběhu evolučních experimentů sledována kvantitativní charakteristika polymeru, jelikož kmen *H. halophila* není schopen využít kyseliny levulové, což bylo potvrzeno mj. i stanovením její residuální koncentrace v supernatantech po kultivaci.

Další část práce pojednává o využití extrémofilů k produkci PHA na modelových hydrolyzátech lignocelulosové biomasy (viz podkapitola 4.2). Jako mikroorganismy byly využity středně halofilní kmen *H. halophila* již využívaná pro evoluční experimenty, která disponuje schopností využívat širokou škálu uhlíkatých substrátů, termofilní kmen *Schlegelella thermodepolymerans* disponující unikátní schopností využít xylozu, která bývá v hydrolyzátech hojně zastoupena, a mesofilní *Burkholderia sacchari*, která podobně jako *H. halophila* dokáže metabolizovat širokou škálu uhlíkatých substrátů. Právě vysoká katabolická flexibilita je výhodná vzhledem k využití odpadních substrátů, které často obsahují pestrou paletu různých sacharidů. Obecně platí, že extrémofilní producenti PHA jsou z biotechnologického hlediska velice atraktivní a plně zapadají do moderního konceptu průmyslových biotechnologií nové generace (NGIB). Extrémní podmínky (např. vysoká salinita nebo kultivační teplota), při kterých extrémofily přirozeně rostou, zamezují kontaminaci, čímž se snižují nároky na sterilitu procesu a zařízení. To ve svém důsledku vede ke snížení energetických, ekonomických a také technologických nároků a nákladů. Kromě

samotné produkce PHA pomocí extrémofilů byla vyvinuta a optimalizována ekologicky šetrná metoda izolace polymeru z mokré biomasy, kde bylo opět využito unikátních charakteristik vybraných extrémofilních mikroorganismů (viz podkapitola 4.3).

4.1 Evoluční inženýrství producentů PHA

Obecně lze vylepšení růstových či produkčních charakteristik mikrobiálních producentů nebo i biotechnologických procesů dosáhnout více přístupy. Jeden z nich představují cílené metody genového inženýrství, alternativní přístup spočívá v aplikaci evolučního inženýrství, kdy vznikají adaptované fenotypy bez předchozí typizace na úrovni genomu. V rámci předložené disertační práce byly experimenty zaměřené na evoluční inženýrství aplikovány na mikroorganismy produkující PHA, a to jednak za účelem celkového navýšení produkce polymeru v přítomnosti stresorů, ale i za účelem produkce kopolymerů s vyšším zastoupením 3-hydroxyvalerátu (3HV) v prvním evolučním experimentu, případně 4-hydroxybutyrátu (4HB) v případě dlouhodobého adaptačního experimentu. V neposlední řadě bylo smyslem adaptačních experimentů také posoudit význam PHA v kontextu adaptace konkrétního bakteriálního kmene na vybraný stresor.

4.1.1 Adaptace *C. necator* H16 na kyselinu levulovou

Myšlenka vedoucí k adaptaci na kyselinu levulovou pramenila ze dvou hlavních idejí. První z nich spočívala ve skutečnosti, že se jedná o látku přirozeně se vyskytující v hydrolyzátech lignocelulosových materiálů, které představují značnou část odpadních substrátů využitelných po hydrolytickém štěpení pro biotechnologické produkce mj. právě PHA. Při hydrolýze však z hemicelulosity vznikají kromě utilizovatelných sacharidů také jejich degradační produkty, látky působící jako inhibitory mikrobiálního růstu, a to 5-hydroxymethyl furfural, furfural a dále organické kyseliny jako kyselina octová, mravenčí nebo právě kyselina levulová. Namísto nutnosti následné detoxifikace je proto vhodné mít mikrobiální producenty, které buď dokáží tyto látky přímo využít, nebo jsou vůči nim alespoň částečně rezistentní. Druhá idea vycházela ze skutečnosti, že pro biosyntézu kopolymeru P(3HB-co-3HV) je možné využít kyselinu levulovou jako prekurzor pro 3-hydroxyvalerát v kombinaci s vhodným mikrobiálním producentem, který je schopen její utilizace a konverze na 3-hydroxyvaleryl-CoA. Jako mikroorganismus pro adaptaci na kyselinu levulovou byl vybrán modelový kmen pro produkci PHA *C. necator* H16 CCM 3726, který disponuje schopností ji využít. Cílem práce tedy bylo prostřednictvím metody evolučního inženýrství získat kmen adaptovaný na kyselinu levulovou, což by vedlo ke snížení inhibičního vlivu vlivem tohoto stresoru, tedy lepšímu růstu v jeho přítomnosti, a zároveň ke zvýšení zastoupení 3HV v kopolymeru P(3HB-co-3HV).

Vybraný kmen je nejvíce prozkoumaným producentem PHA s vysokým potenciálem pro průmyslovou produkci polymeru. Sérií evolučních experimentů založených na adaptaci na postupně se navyšujícího množství inhibitoru a také experimentů s využitím mutagenního činidla methyl methansulfonátu byly připraveny kmeny, které byly následně porovnávány skrze růstové charakteristiky, kvalitativní a kvantitativní analýzu PHA, metabolickou

charakterizaci a také detailnější analýzu vyizolovaných polymerů. Výsledky provedených experimentů byly publikovány v **naší práci Nováčková a kol. 2019¹**.

Aplikací evolučního inženýrství při adaptaci na kyselinu levulovou jsme celkově získali 5 adaptovaných kmenů schopných úspěšně růst a reprodukovatelně produkovat kopolymer, 3 kmeny pocházely z první generace, jeden z druhé generace a jeden byl získán aplikací chemického mutagenu MMS. U izolátu ALA04 z druhé generace bylo detekováno $20,6 \pm 0,9$ mol. % 3HV v kopolymeru P(3HB-co-3HV), což byl nejvyšší pozorovaný obsah 3HV frakce v kopolymeru mezi všemi testovanými kmeny, divoký kmen dosahoval zastoupení 3HV v množství $15,6 \pm 0,9$ mol. %.

Podstatnou částí práce byla metabolická charakterizace získaných adaptovaných kmenů a současné porovnání s divokým kmenem skrze stanovení specifických enzymových aktivit, a to za účelem objasnění adaptační strategie při expozici kyselině levulové. Jak už bylo uvedeno výše, jedná se o slabou organickou kyselinu, reakci na ni, jakožto na stresor, se může projevat obecnou stresovou odpovědí [38]. Pro tento účel byly stanovovány aktivity enzymů zapojené do centrálních metabolických drah, aby bylo možné zhodnotit celkový fyziologický stav buněk, drah generujících redukovaný kofaktor NADPH, představující hlavní donor elektronů všech organismů, a biosyntetické dráhy PHA. Mimoto ale vzhledem ke schopnosti utilizace kyseliny levulové vybraným bakteriálním kmenem byla pozorována metabolická cesta vedoucí k syntéze levulinyl-CoA [39]. Kromě prostého srovnání byly naměřené hodnoty podrobeny statistické analýze prostřednictvím stanovení Pearsonova korelačního koeficientu a analýze hlavních komponent (PCA) za účelem odhalení podobností a diferencí mezi jednotlivými izoláty vůči sobě a vůči divokému kmeni.

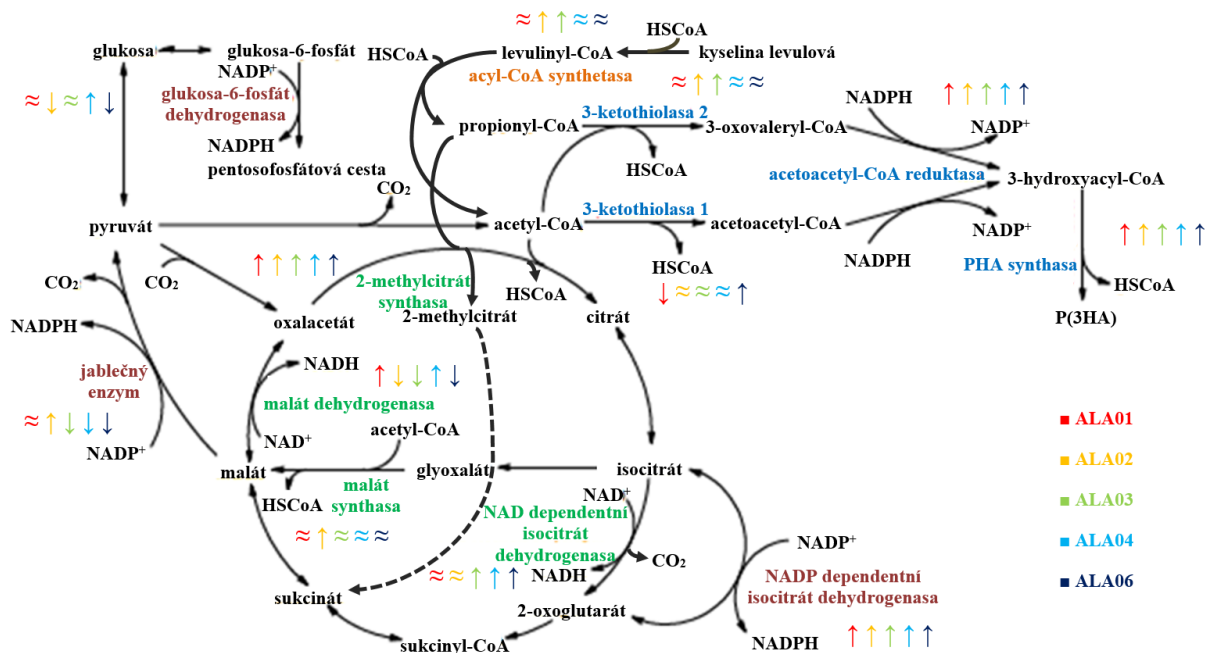
Na základě získaných dat a následné statistické analýzy byly objeveny některé společné prvky adaptace, a to především v rámci obecné odpovědi na oxidativní stres, což se projevilo navýšením aktivit enzymů generujících redukovaný kofaktor NADPH, který je podstatný pro regeneraci molekul glutathionu a thioredoxinu zapojených do ochrany buněk vůči škodlivým radikálům, jenž jsou vlivem oxidativního stresu generovány [40, 41]. Může se jednat o alternativní dráhy v rámci Krebsova cyklu, a to u NADP-dependentní varianty enzymu isocitrát dehydrogenasy, alternativní dráhu zpracování malátu na pyruvát pomocí jablečného enzymu či dráhy pentosofosfátového cyklu vycházející z glukosa-6-fosfátu za katalýzy glukosa-6-fosfát dehydrogenasou. Do generace redukovaného kofaktoru jsou ovšem v rámci metabolismu zapojeny i další enzymy, které nebyly stanovovány [40]. Kromě regenerace molekul zapojených do antioxidačního procesu vytváří vyšší množství NADPH příznivé prostředí pro biosyntetické procesy, a to mj. biosyntézu PHA, kdy enzym acetoacetyl-CoA reduktasa je NADPH dependentním enzymem redukujícím keto- formu na hydroxyskupinu monomerní jednotky PHA. Přestože prostřednictvím korelační analýzy nebyla nalezena korelace mezi žádným stanovovaným enzymem generujícím NADPH a acetoacetyl-CoA reduktasou, pro sumu specifických aktivit všech těchto stanovovaných enzymů by pozitivní

¹ **NOVÁČKOVÁ, I.; KUČERA, D.; POŘÍZKA, J.; PERNICOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; KOLLER, M.; KOVALČÍK, A.; OBRUČA, S.** Adaptation of *Cupriavidus necator* to levulinic acid for enhanced production of P(3HB-co-3HV) copolyesters. *BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL*, 2019, roč. 151, č. 11, s. 1-10. ISSN: 1369-703X.

korelace mohla být potvrzena. Navýšení aktivity biosyntetické dráhy PHA by mělo v rámci metabolomu manifestovat jako vyšší výtěžek polymeru v biomase, což bylo vyjma izolátu ALA06 u ostatních izolátů v kombinaci s vyšším množstvím biomasy v důsledku adaptace prokázáno. Pozitivní následky mírného oxidačního stresu navyšující biosyntézu PHA byly potvrzeny řadou experimentů, a to při expozici peroxidu vodíku a ethanolu v rámci výzkumu na našem pracovišti [42–44], ale také dalšími výzkumnými skupinami, které k indukci stresu využívali rovněž peroxid vodíku [45].

Vyjma obecného vlivu kyseliny levulové jakožto stresoru byl pozorován výrazný vliv adaptace na posílení jejího metabolismu, což se projevilo skrze posílení aktivity klíčového enzymu 2-methylcitrátového cyklu a také 3-ketothiolasy 2, která generuje 3-oxovaleryl-CoA. Navýšení se podstatně více (dvojnásobně až pětinašobně) projevilo u 2-methylcitrát syntasy, která vystupuje v cyklu představujícím součást centrálního metabolismu. Přebíhá propionyl-CoA generovaný z levulinylnyl-CoA přes pyruvát až na acetyl-CoA [46, 47], který může navyšovat celkový energetický metabolismus vedoucí rovněž k navýšení množství biomasy. Zároveň jej ale odčerpává, čímž snižuje podíl 3HV v kopolymeru [48], jenž pak u vybraných adaptovaných izolátů byl nižší než u kmene divokého bez předchozí adaptace. Metabolismus je komplexní proces a posílení drah využívajících propionyl-CoA se v rámci adaptovaných kmenů projevilo především navýšením výtěžku biomasy a celkové produkce PHA, u většiny současně snížením 3HV frakce v kopolymeru. U některých kmenů ale i přes navýšení enzymové aktivity 2-methylcitrát syntasy došlo k navýšení 3HV v P(3HB-*co*-3HV) kopolymeru, což pouze potvrzuje komplexnost celého metabolismu a i adaptačního procesu. Kromě propionyl-CoA vzniká po štěpení levulinylnyl-CoA i acetyl-CoA, který představuje v rámci metabolismu výchozí produkt či meziproduct řady reakcí, a to jednak katabolických vedoucích k zisku energie prostřednictvím navýšení aktivity Krebsova cyklu, tak i anabolických, z nichž v rámci této práce stojí za zmínku především biosyntéza PHA.

Vyjma uvedených společných znaků adaptovaných kmenů jsme již na základě stanovených hodnot specifických enzymových aktivit navrhli více adaptačních strategií v rámci jednotlivých kmenů. Jako nejodlišnější se nám v rámci pozorovaných metabolických drah jevil kmen ALA02. Naopak podobné strategie adaptace byly pozorovány u kmenů ALA03, ALA04 a ALA06. Znázornění analyzovaných enzymů, jejich zapojení do metabolismu a trendy specifických enzymových aktivit jsou obsahem následujícího schématu (Obr. 3).



Obr. 3: Přehled stanovovaných enzymů a trendy hodnot aktivit adaptovaných kmenů vůči divokému kmeni

Jako další z metod statistické analýzy aplikované na získaná data byla využita analýza hlavních komponent (PCA). Na základě lokalizace jednotlivých adaptovaných kmenů a izolátu v odpovídající 2D projekci lze diskutovat metabolické podobnosti mezi nimi. Nejvýraznější oddělení zón na základě rozdílů v enzymových aktivitách jsme pozorovali mezi divokým kmenem a kmeny adaptovanými, což vede k potvrzení myšlenky změn v metabolismu jako důsledku adaptace. V rámci adaptovaných kmenů se nejvíce odlišuje izolát ALA02, který už byl vzhledem ke své odlišnosti diskutován výše vzhledem k pravděpodobné odlišné adaptační strategii. Nejbližší vztah mezi sebou mají kmeny ALA01, ALA03 a ALA06. Z hlediska podobnosti s divokým kmenem je nejbližší vztah k ALA01, který kromě obecné adaptační strategie (zvýšená aktivita respirace, posílené dráhy utilizace propionyl-CoA, zvýšené generace NADPH a také biosyntetické dráhy PHA) vykazuje nejvyšší metabolickou podobnost.

Na základě obou provedených materiálových charakteristik lze potvrdit trend popsáný v literatuře, kdy s narůstajícím množstvím 3HV v P(3HB-co-3HV) kopolymeru dochází ke snižování teploty tání, což je výhodné pro zpracování, a také krystalinity, což je výhodné s ohledem na aplikační potenciál. Jedinou výjimku představuje polymer vyizolovaný z kmene ALA06 připraveného s využitím mutagenu MMS. Vzhledem k předpokladu souvislosti těchto charakteristik s rozdílným umístěním jednotlivých monomerů v rámci kopolymeru a skutečnosti, že bakterie standardně produkují náhodné kopolymery, předpokládáme, že kmen ALA06 je schopen produkovat částečně organizovaný kopolymer s částmi bohatšími na frakci 3HV, tedy celkově má poté polymer zčásti blokový charakter, což následně ovlivní vlastnosti materiálu [49].

4.1.2 Dlouhodobá adaptace kmene *C. necator* H16 na biotechnologicky relevantní stresory

Následující práce byla zaměřena na dlouhodobý adaptační experiment při zachování konstantního selekčního tlaku. Jako mikroorganismy byly využity bakteriální kmeny *C. necator* H16 stejně jako v předchozím experimentu a středně halofilní kmen *H. halophila* s 66 g/L chloridu sodného v médiu jako optimem. Modelový kmen metabolismu PHA *C. necator* H16 byl exponován působení zvýšeného osmotického tlaku a zvýšené koncentraci měďnatých iontů, halofilní kmen byl exponován dvěma slabým organickým kyselinám, octové a levulové. Všechny aplikované stresy představují biotechnologicky relevantní situace, kterým mohou být mikroorganismy během reálných procesů vystaveny.

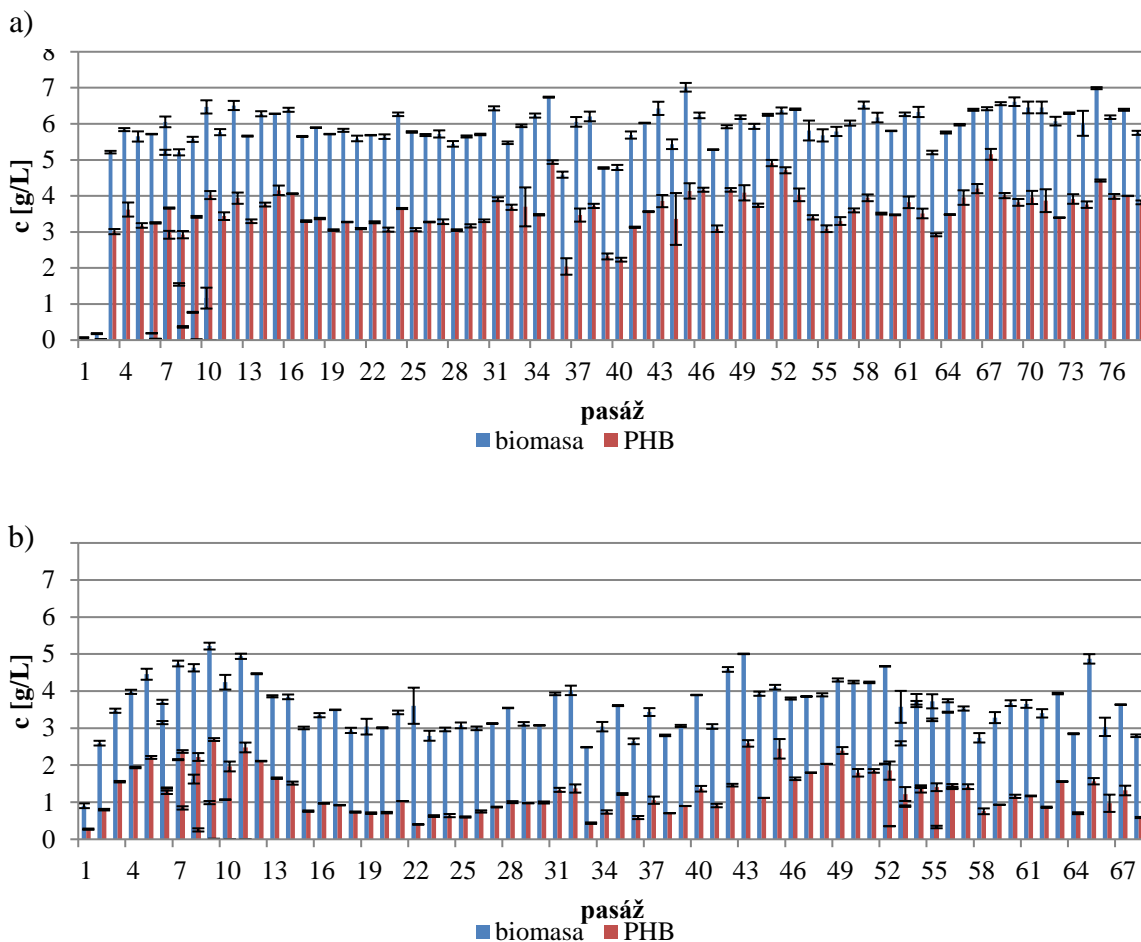
Evolučnímu experimentu předcházelo nalezení optimální dávky stresoru, která jsme volili tak, aby byly kultury stále schopny růstu a množení, zároveň aby se projevil inhibiční efekt. Optimální dávky stresorů pro *C. necator* H16 byly nastaveny na 30 mg/L měďnatých iontů Cu^{2+} v podobě modré skalice a 20 g/L NaCl, pro *H. halophila* byly jako nejvhodnější koncentrace stresorů zvoleny 3 g/L kyseliny octové respektive 1 g/L kyseliny levulové. Jelikož i v zamýšlených reálných biotechnologických procesech při kultivaci na hydrolyzátech dochází k úpravě hodnot pH na přibližně 7, bylo i v médiích pro *H. halophila* pH vždy upravováno, čímž se neprojevil primárně vliv kyselého prostředí, ale samotných kyselin.

Dlouhodobý adaptační experiment jsme prováděli v baňkách, kdy po 48 hodinách kultivace jsme 10 obj. % kultury přenesli do čerstvého média se stresorem. Každá pasáž byla charakterizována s ohledem na nárůst biomasy skrze měření optické hustoty a gravimetrické stanovení a také na kvalitativní a kvantitativní stanovení PHA v biomase pomocí plynové chromatografie s plamenově-ionizačním detektorem. V supernatantech po kultivaci *H. halophila* byla pomocí iontové chromatografie stanovováno residuální množství kyselin. Z výsledků pro *H. halophila* bylo zjištěno, že na rozdíl od kmene *C. necator* využívaného v rámci předchozí práce. Tento kmen tedy rovněž není schopen kyselinu levulovou využít k produkci kopolymeru P(3HB-co-3HV), jelikož veškerý polymer v biomase byl povahy homopolymeru P(3HB). Jelikož bylo zajímavějších výsledků v rámci adaptace docíleno pro kmen *C. necator* a zároveň za účelem redukce velkého množství dat, byla v **práci Nováčková a kol. 2022²** interpretována data z experimentů pouze pro tento kmen.

U adaptace na měď došlo k adaptačnímu kroku v průběhu třetí pasáže, kdy byl pozorován výrazný nárůst bakteriálních buněk v kultuře více než desetinásobek oproti druhé pasáži, u adaptace na vyšší koncentraci soli v médiu docházelo k postupnému nárůstu biomasy, kdy k dosažení maxima došlo při páté pasáži. Prvních 5–6 pasáží bylo tedy na základě naměřených dat nejvýznamnějších z hlediska adaptace na stresové podmínky, poté docházelo

² **NOVÁČKOVÁ, I.**; HRABALOVÁ, V.; SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; SAMEK, O.; KOLLER, M.; KRZYZANEK, V.; HRUBANOVÁ, K.; NEBESÁŘOVÁ, J.; OBRUČA, S. The role of polyhydroxyalkanoates in adaptation of *Cupriavidus necator* to osmotic pressure and high concentration of copper ions. *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*, 2022, roč. 206, č. 5, s. 977-189. ISSN: 0141-8130.

v rámci dlouhodobého časového horizontu pouze k méně významným nárůstům, ale i k menším poklesům či k oscilaci kolem maximálních dosažených hodnot koncentrace biomasy. Průběh jednotlivých adaptačních experimentů je znázorněn na následujícím obrázku (Obr. 4).



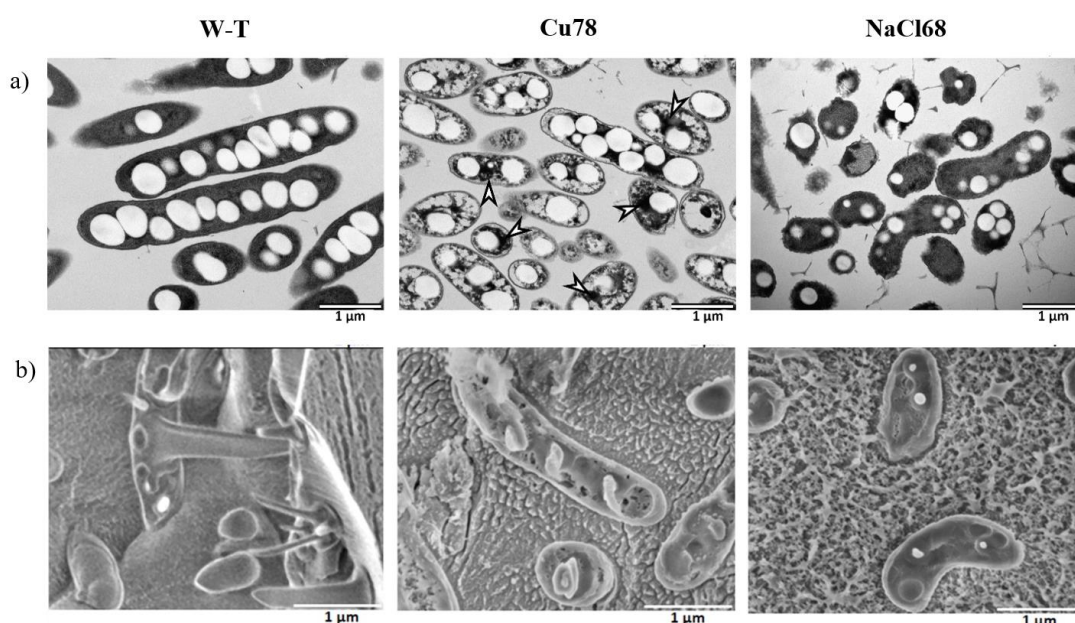
Obr. 4: Základní screening během evolučních procesů – a) expozice iontům Cu^{2+} , b) expozice NaCl

I v případě dlouhodobé adaptace jsme se zaměřili na metabolickou charakterizaci prostřednictvím stanovení specifických enzymových aktivit vybraných drah centrálního metabolismu a dalších relevantních enzymů za účelem odhalení adaptačních strategií v závislosti na jednotlivých stresorech. Z centrálního metabolismu byly vyselektovány klíčové enzymy Krebsova cyklu, glyoxalátového cyklu, jímž kmen *C. necator* disponuje, dále pak vybrané enzymy generující NADPH a enzymy zapojené do biosyntetické dráhy PHA.

Nejvýznamnějším rysem adaptace na měď je na základě naměřených dat navýšení aktivity NADPH generujících enzymů, konkrétně především NADP-dependentní isocitrát dehydrogenasy a jablečného enzymu. Expozice hypertonickému prostředí vedla u divokého i adaptovaného kmene pravděpodobně k navýšení intenzity respirace, což usuzujeme na základě aktivit enzymů s respirací přímo spjatých. Rovněž stejně jako při expozici mědi, i zde se vlivem zvýšení intenzity respirace projevilo navýšení produkce redukovaného kofaktoru NADPH, ale pouze u adaptovaného kmene.

Z hlediska biosyntézy PHA spojuje oba adaptované kmeny trend posílení biosyntetické dráhy, a to především navýšením aktivity PHB syntasy, což nasvědčuje tomu, že role PHA má při adaptaci na aplokované stresové podmínky význam. Nicméně u adaptovaných kmenů nebyl detekován vyšší obsah polymeru v biomase a rovněž molekulová hmotnost PHA byla menší než pro polymer izolovaný z divokého kmene. Tento poznatek nás vedl hypotéze, že adaptace je spojena nejen se zvýšenou biosyntézou, ale také současně posílenou intracelulární degradací PHA. Z hlediska adaptace mohl být tedy podstatný ne samotný obsah polymeru, ale celkově navýšený cyklus PHA zahrnující současnou syntézu a degradaci polymerních řetězců vedoucí mj. k navýšení poolu monomerní jednotky 3-hydroxybutyrátu [50]. Jelikož bylo popsáno, že monomer slouží jako potenciální chemický chaperon chránící biomolekuly před denaturací vlivem oxidačního stresu, má navýšení cyklu přeměny velký vliv v rámci adaptace na měď [51]. Z hlediska ochrany vůči vlivu osmotického stresu pak může 3HB sloužit jako osmoticky aktivní látka [52]. Na základě našich výsledků jsme tedy došli k závěru, že jako adaptační strategie může být využíván právě celkově posílený cyklus PHA.

K posouzení tvarů a vnitřní struktury buněk divokého kmene bez aplikace stresu v průběhu kultivace a adaptovaných kmenů exponovaných stresorům jsme využili techniky elektronové mikroskopie. Aplikovány byly konkrétně techniky kryo-skenovací elektronová mikroskopie a transmisní elektronová mikroskopie (Obr. 5). Oběma technikami byly v buňkách kultury adaptované na měď patrné precipitáty uvnitř v cytoplazmě. Z toho usuzujeme, že bakteriální buňky v rámci adaptace vytvořily útvary s měďnatými ionty, které chrání důležité části buňky před škodlivým efektem těžkého kovu, jenž je navázáním do precipitátů odstíněn. Tvorba precipitátů již byla popsána při expozici uranu, a to u bakterie *Cupriavidus metallidurans* NA4, která z toxického kovu formovala dusičnan uranylu. Studie rovněž prokázala tvorbu komplexů s granulemi PHA, což přímo podporuje myšlenku protektivního účinku PHA vůči působení těžkých kovů [53].



Obr. 5: Snímky divokého kmene a adaptovaných kmenů získané pomocí elektronové mikroskopie – a) TEM (šipky znázorňují výše diskutované precipitáty), b) kryo-SEM

Jednu z nepublikovaných součástí, která se vztahuje k výše zmíněné publikaci, představuje proteomická analýza, jež byla provedena pro tetraplikáty kultur divokého kmene *C. necator* H16 v minerálním médiu bez stresu, dále tohoto divokého kmene v médiu se stresy, na něž byl původní kmen adaptován, tedy 30 mg/L měďnatých iontů respektive 20 g/L NaCl, a dále adaptovaných kmenů v médiu s odpovídajícími stresory. Pro účely analýzy byly využity vzorky bakteriální biomasy po 48 h kultivace. Samotná proteomická analýza byla realizována ve spolupráci s Proteomic Core Facility CEITEC Brno.

Analýzou jednotlivých proteinů obsažených v analyzovaných buňkách byla detekována přítomnost celkem 4 604 proteinových skupin v rámci celého datasetu na základě anotace s UniProt databází. Nicméně se nejednalo výhradně o různé proteiny, jelikož řada shodných proteinů byla pravděpodobně vzhledem k drobným odlišnostem rozdělena. Ze zmíněného počtu bylo 489 proteinů na základě komparace s databází definovaných jako blíže necharakterizovaných.

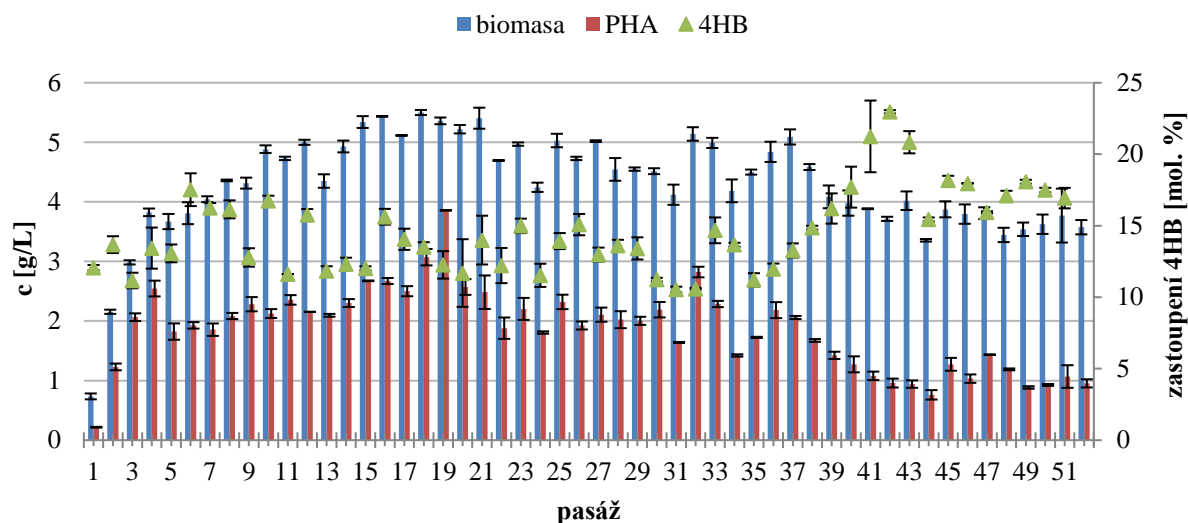
Byly vzájemně porovnány všechny relevantní dvojice divokého kmene a adaptovaných kmenů. Prostřednictvím stanovení specifických enzymových aktivit bylo nalezeno více rozdílů mezi jednotlivými adaptovanými kmeny a divokým kmenem bez stresorů i v jejich přítomnosti než na základě down- či up-regulací stanovených proteomickou analýzou. Vliv stresu se mohl projevit buď navýšením aktivit relevantních enzymů nebo nevyšším jejich exprese, a to bez nutnosti vzájemné souvislosti. Zároveň ale musíme brát v úvahu, že v rámci metabolismu nedochází k regulaci enzymové aktivity pouze na úrovni exprese, zásadní jsou také posttranslační modifikace a také regulace skrze další strategie jako allostérie, zpětná vazba, inhibice produktem atd. Tyto skutečnosti by také mohly vést k získaným výsledkům. S pomocí odhalit větší provázanost naměřených dat v rámci metabolismu by nám mohly pomoci bioinformatické nástroje využívané kolegy z FEKT VUT, se kterými plánujeme spolupráci.

4.1.3 Produkce kopolymeru P(3HB-co-4HB) pomocí *C. necator* H16

Kopolymer P(3HB-co-4HB) je z důvodů jeho mechanických, termických, ale také biologických vlastností velice zajímavým polymerem, který je některými odborníky považován za PHA polymer třetí generace. Pro účel inkorporace 4-hydroxybutyrátu (4HB) do struktury kopolymeru P(3HB-co-4HB) byly využity prekurzory aplikované, nejen v rámci našeho pracoviště, na jiné bakteriální kmeny, a to 1,4-butandiol (1,4-BD), γ -butyrolakton (γ -BL), 1,6-hexandiol (1,6-HD) a ϵ -kaprolakton (ϵ -KL), které vykazovaly v závislosti na kmenech různou úspěšnost konverze na 4-hydroxybutyryl-CoA, substrát PHA syntasy [54–57]. U kmene *Cupriavidus necator* H16 schopného využít mimo cukerných substrátů také odpadní olej očekáváme mj. efektivní dráhu metabolizující mastné kyseliny (β -oxidace). Z molekuly ϵ -hydroxykapronové kyseliny tak může dojít k odštěpení produktu katabolismu mastných kyselin (acetyl-CoA) za vzniku 4-hydroxybutyryl-CoA, jenž je využitelný pro biosyntézu kopolymeru P(3HB-co-4HB).

Na základě optimalizačních experimentů byl jako nejvhodnější rekurzor 4HB zvolen ϵ -KL vystupující současně jako stresový faktor vzhledem ke svému inhibičnímu efektu na kulturu

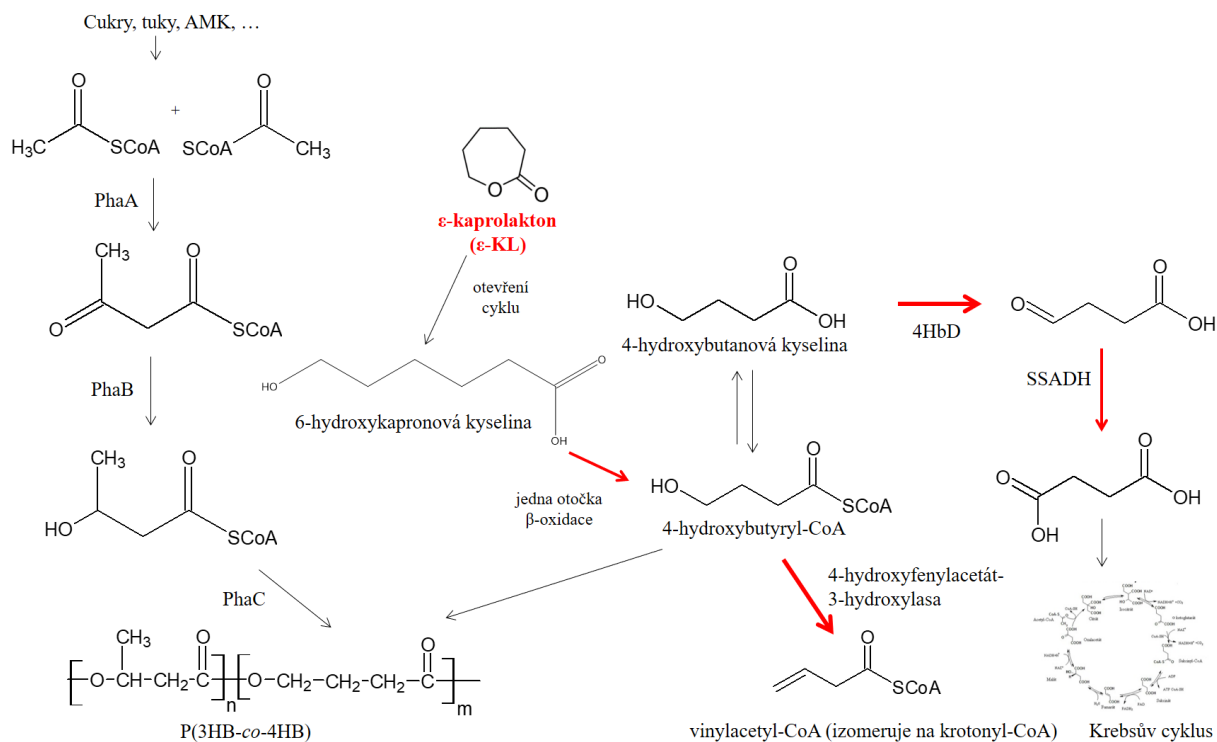
C. necator H16. Proto jsme se zaměřili na adaptaci kmene na přítomnost ϵ -KL. Výsledky gravimetrické analýzy a analýza PHA kumulovaných v biomase jsou uvedeny na Obr. 6.



Obr. 6: Gravimetrické stanovení biomasy a stanovení PHA při adaptaci kultury *C. necator* H16 na ϵ -KL v rámci evolučního inženýrství

Z výsledků stanovení biomasy můžeme usuzovat, že adaptace na přítomnost ϵ -KL má postupný charakter podobně jako při adaptaci na osmotický stres v publikovaném článku. Maximální množství biomasy bylo stanoveno kolem 15. pasáže, poté už nedocházelo k signifikantnímu zlepšení růstových charakteristik v rámci sledovaného časového horizontu 50 pasáží. Množství celkových PHA bylo oproti tomu vyšší v iniciálních pasážích, nejvyšší v rámci 3. a 4. pasáže, poté byl pozorován pokles a případně náhodný nárůst, zastoupení v biomase však tvořilo v průměru přibližně 50 hm. %. Z hlediska adaptace je patrné, že byla úspěšná, jelikož docházelo k nárůstu množství celkové biomasy, a stejně tak i množství PHA bylo zvýšené.

Aplikace evolučního inženýrství nás tedy přivedla ke zlepšení růstových a produkčních charakteristik kmene *C. necator* za optimalizovaných podmínek vzhledem k produkci kopolymeru P(3HB-co-4HB) s co nejvyšším zastoupením 4HB. Nicméně, jak bylo popisováno již v teoretické části práce, existují i jiné přístupy, jak charakteristiky kmenů vylepšit. Jeden z nich reprezentuje genové inženýrství, které je založené na cílených intervencích do genomu mikroorganismů, což poté vede ke změnám na úrovni fenotypu. Mezi tyto úpravy obecně patří delece či inserce genů, případně jejich výměna. Abychom byli schopni efektivně podpořit biosyntézu P(3HB-co-4HB), je zapotřebí mít zmapovaný metabolismus vybraného bakteriálního kmene v souvislosti s relevantními substráty (Obr. 7).



Obr. 7: Předpokládaný metabolismus ε-kaprolaktonu u *C. necator* H16 (částečně převzato z [58])

Na základě návrhu metabolismu tedy inkorporaci 4HB do kopolymeru tedy potenciálně konkurují dvě reakce odvádějící 4-hydroxybutyryl-CoA jinými směry. Naším experimentálním záměrem v rámci genového inženýrství bylo vyzkoušet postupně delece genů kódujících oba výše diskutované konkurenční proteiny odčerpávající 4-hydroxybutyryl-CoA, tedy 4HbD i 4-hydroxyfenylacetát-3-hydroxylasu, a to za účelem porovnání vlivu jejich absence na zastoupení frakce 4-hydroxybutyrátu v kopolymeru P(3HB-*co*-4HB). Navýšení zastoupení 4HB v kopolymeru by vedlo ke zlepšení vlastností produkovaného polymeru. Práce byla prováděna na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v týmu Mgr. Pavla Dvořáka, Ph.D., který má s oblastí genových manipulací dlouholeté zkušenosti. Přestože nebyl cílený záměr v rámci disertace dotažen k deleci genů, byly již úspěšně provedeny transformační experimenty s kmenem *C. necator* H16 na základě protokolu publikovaného týmem Tee a kol. (2017) [59], a to s plasmidy pSEVA238 nesoucí resistenci na kanamycin a pSW1 nesoucí resistenci k ampicilinu.

4.2 Využití extrémofilů pro biotechnologickou produkci PHA

Druhou oddělenou částí disertační práce, na niž byla naměřena a opublikována data, se zaměřuje na biotechnologickou produkci PHA s využitím extrémofilních mikroorganismů při kultivaci na odpadních substrátech. Produkce petrochemických plastů se odhaduje na přibližně 400 megatun ročně navíc se stále rostoucím využitím, a to převážně v rozvojových zemích, které se příliš nezaměřují na ekologickou stránku produkce [60]. I proto je zapotřebí, aby v tomto případě byla alespoň část nahrazena ekologičtější alternativou, jako jsou již vícekrát zmíněné PHA. Produkce těchto materiálů se odhaduje na 25 kilotun ročně, což je oproti ropným alternativám zanedbatelné množství. Nicméně se odhaduje navýšení

celosvětové produkce na třinásovek v následujících pěti letech [61]. Navýšení produkce však vyžaduje snížení nákladů na celý biotechnologický proces výroby a také izolace. Z hlediska výrobního procesu je důležité, aby byl založen na široce rozšířených zdrojích, které umožňují udržitelnou produkci PHA za snížení celkových nákladů. Výchozích surovin splňujících tyto požadavky je více, nicméně jako jeden z nejvhodnějších kandidátů jsou odpadní materiály na bázi lignocelulosity, které představují širokou skupinu odpadu pocházejícího z odvětví zemědělství, potravinářského a dřevozpracujícího průmyslu. Lignocelulosové materiály zároveň představují nejzastoupenější skupinu biomasy na světě. Stejně jako pro všechny zdroje je i v tomto případě nezbytné brát v úvahu charakteristiky materiálu, ať už se jedná o dostupnost, skladovatelnost a cenu, což se mj. odvíjí od řady parametrů, jako jsou mj. konkurenční možnosti využití. Řada lignocelulosových materiálů se dále využívá jako krmivo či stelivo pro zvířata, výplňové či tepelně izolační materiály, případně i jako nosiče energie [62]. Zde potom hraje roli vysoký roční výnos v řádech stovek megatun, který umožňuje část materiálu uvolnit ve prospěch bílých biotechnologií, mezi něž patří právě i produkce PHA. V rámci naší **práce Kouřilová a kol. 2022**³ jsou shrnuta data posuzující potenciál vybraných kmenů pro produkci PHA na modelových hydrolyzátech lignocelulosové biomasy.

V rámci pilotního experimentu jsme posuzovali potenciál kmenů při růstu na modelových hydrolyzátech, a to jednak vzhledem k nárůstu biomasy, jednak s ohledem na produkci PHA v biomase. Jako doplňková analýza reflektující schopnost utilizace dávkovaných sacharidů bylo využito stanovení zbytkových sacharidů v supernatantu po kultivaci. Pro celkové porovnání byly kmeny kultivovány rovněž na preferovaných zdrojích uhlíku, tedy glukose pro *B. sacchari* a *H. halophila*, respektive xylose pro *S. thermodepolymerans*. Jako modelové hydrolyzáty odpadních lignocelulosových produktů byly vybrány následující; hydrolyzát měkkého dřeva, tvrdého dřeva, rýžové slámy, bagasy z cukrové třtiny, pšeničné slámy a pšeničných otrub, které se liší zastoupením jednotlivých monosacharidů. Na základě literatury byly připraveny modelové hydrolyzáty obsahující v různém zastoupení směs hexos a pentos, konkrétně glukosu, xylosu, arabinosu, mannosu a galaktosu, kdy ne všechny monosacharidy byly zastoupeny u všech směsí (Tab. 2).

Tab. 2: Složení jednotlivých modelových hydrolyzátů

sacharid (g/L)	glukosa	xylosa	arabinosa	mannosa	galaktosa	reference
materiál						
měkké dřevo	16,6	1	0,1	2	0,3	[63]
tvrdé dřevo	3,2	12,4	1	1,8	1,6	[64]
rýžová sláma	4,2	13,4	2,4	-	-	[65]
bagasa z cukrové třtiny	2,8	15	2,2	-	-	[65]
pšeničná sláma	11,2	7,2	0,9	-	0,7	[66]
pšeničné otruby	0,8	12,4	6,8	-	-	[67]

³ KOUŘILOVÁ, X.; NOVÁČKOVÁ, I.; KOLLER, M.; OBRUČA, S. Evaluation of mesophilic *Burkholderia sacchari*, thermophilic *Schlegelella thermodepolymerans* and halophilic *Halomonas halophila* for polyhydroxyalkanoates production on model media mimicking lignocellulose hydrolysates. *BIORESOURCES TECHNOLOGY*, 2021, roč. 325, č. 4, s. 1–5. ISSN: 0960-8524.

Celková koncentrace sacharidů v připravených médiích byla 20 g/L, a to jak v případě modelových hydrolyzátů, tak i u kontrolních kultivací s preferovaným substrátem. Jedním z cílů experimentů bylo tedy najít nejvhodnější hydrolyzát pro jednotlivé bakterie. Experimenty zaměřené na výtěžek byly prováděny na ideálních modelových hydrolyzátech sestávajících z monosacharidů, reálné vzorky lignocelulosových hydrolyzátů by obsahovaly i řadu dříve diskutovaných chemických látek vystupujících jako mikrobiální inhibitory, a to kyselinu ferulovou, gallovou, furfural, 5-hydroxymethylfurfural a již zmiňované kyseliny octovou a levulovou.

Tab. 3: Porovnání růstu a produkce PHA u vybraných bakteriálních kmenů na modelových hydrolyzátech

mikroorganismus	modelový hydrolyzát	biomasa [g/L]	PHB [hm. %]	residuální sacharidy [g/L]	*Y _{P/S} [-]	**Y _{X/S} [-]
<i>B. sacchari</i>	kontrola (glukosa)	3,45 ± 0,10	53,86 ± 1,30	4,89 ± 0,31	0,14	0,25
	měkké dřevo	3,16 ± 0,03	49,75 ± 1,40	8,41 ± 0,29	0,11	0,29
	tvrdé dřevo	3,11 ± 0,05	53,50 ± 1,73	10,59 ± 0,33	0,20	0,35
	rýžová sláma	2,71 ± 0,06	49,79 ± 1,02	14,14 ± 0,13	0,14	0,25
	bagasa z cukrové třtiny	3,02 ± 0,10	49,64 ± 1,56	14,83 ± 0,74	0,13	0,25
	pšeničná sláma	3,22 ± 0,04	49,30 ± 0,81	7,01 ± 0,14	0,23	0,43
	pšeničné otruby	3,31 ± 0,03	54,18 ± 0,14	10,81 ± 0,14	0,15	0,28
<i>H. halophila</i>	kontrola (glukosa)	6,35 ± 0,05	72,35 ± 0,96	3,16 ± 0,02	0,27	0,38
	měkké dřevo	6,47 ± 0,08	73,48 ± 1,15	2,98 ± 0,32	0,28	0,38
	tvrdé dřevo	3,81 ± 0,09	51,30 ± 1,14	9,68 ± 0,23	0,19	0,37
	rýžová sláma	3,52 ± 0,08	51,43 ± 1,23	9,70 ± 0,52	0,18	0,34
	bagasa z cukrové třtiny	3,14 ± 0,13	56,14 ± 0,89	8,52 ± 0,78	0,15	0,27
	pšeničná sláma	5,32 ± 0,01	74,74 ± 1,73	5,77 ± 0,44	0,28	0,37
	pšeničné otruby	2,56 ± 0,13	44,47 ± 1,30	10,69 ± 0,78	0,12	0,28
<i>S. thermodepolymerans</i>	kontrola (xylosa)	5,92 ± 0,08	72,03 ± 0,41	2,77 ± 0,21	0,25	0,34
	měkké dřevo	0,86 ± 0,16	14,74 ± 7,42	18,29 ± 0,31	0,08	0,50
	tvrdé dřevo	4,91 ± 0,48	65,71 ± 2,41	4,96 ± 0,08	0,21	0,33
	rýžová sláma	5,24 ± 0,13	75,32 ± 2,00	4,33 ± 0,29	0,25	0,33
	bagasa z cukrové třtiny	4,62 ± 0,06	70,45 ± 0,23	6,12 ± 0,00	0,23	0,33
	pšeničná sláma	4,41 ± 0,69	70,92 ± 1,37	5,79 ± 0,47	0,22	0,31
	pšeničné otruby	3,64 ± 0,39	64,48 ± 4,02	6,93 ± 0,31	0,18	0,28

*výtěžnostní koeficient Y_{P/S} – poměr výtěžku produktu k množství utilizovaných sacharidů

**výtěžnostní koeficient Y_{X/S} – poměr množství biomasy k množství utilizovaných sacharidů

Přestože se v obou případech extrémofilů dostáváme k vyšším výtěžkům biomasy i PHA, je z hlediska reálného biotechnologického procesu nutné reflektovat charakteristiky jednotlivých skupin těchto bakterií (výsledky viz Tab. 3). Společný rys spočívá v eliminaci kontaminace běžnou mikrobiální mikroflórou, a to buď zvýšenou koncentrací soli v médiu či vyšší kultivační teplotou. Jako možná limitace potenciálu termofilů pro produkci na reálných hydrolyzátech se může zdát přítomnost většího množství soli, nicméně bylo dokázáno, že řada termofilních mikroorganismů patří rovněž mezi halotolerantní, jelikož podobně jako halofilové produkují kompatibilní soluty, které je primárně chrání vůči zvýšené teplotě, ale mohou právě zastat i funkci osmoprotektantů v případě expozice hyperosmotickému prostředí

[68]. Porovnáme-li kultivační nároky halofilních a termofilních PHA producentů, první zmíněná skupina vyžaduje vysokou koncentraci solí, což může způsobovat vážný problém spojený s korodováním používaného zařízení [69]. Termofilní producenti naproti tomu vyžadují pouze zvýšenou teplotu, často v rozmezí 50–55 °C, což pro kultivační zařízení nepředstavuje nebezpečí z hlediska poškození v porovnání s vysokými koncentracemi solí. Přestože se může zdát, že nároky na vyšší teplotu představují komplikace s ohledem na vyšší energetickou náročnost celého procesu, ve skutečnosti rychle rostoucí kultury produkují metabolické teplo, které současně s teplem vznikajícím při míchání může představovat značnou část energie, která pokryje nároky kultury. Tím patří termofilní kultury k de facto částečně samozahříváním systémům [70]. Je na místě poznamenat, že velkou část energetických nákladů při kultivaci mesofilů představuje chlazení rychle rostoucí a metabolizující mikrobiální kultury. Tento náklad u termofilů prakticky odpadá.

Abychom se přiblížili reálným hydrolyzátům a posoudili i druhý aspekt vhodnosti vybraných mikroorganismů pro účely využití pro produkci PHA, byly kmeny vystaveny inhibitorům, které se mohou v reálných hydrolyzáttech vyskytovat. Vliv mikrobiálních inhibitorů je nezanedbatelný, výrazně ovlivňuje růst i celkový metabolismus, a to právě i vzhledem k produkci PHA. Pro co nejvyšší výtěžky PHA je tak nutné, aby byly použity kmeny co nejvíce robustní vůči negativním vlivům těchto látek. Mezi nejčteněji se vyskytující potenciální inhibitory po hydrolyze lignocelulosoové biomasy byly pro tento účel vybrány organické kyseliny ferulová, gallová, octová a levulová a dále furfural či jeho derivát 5-hydroxymethylfurfural (5HMF).

Porovnáním charakteristik růstu a produkce v přítomnosti výše zmíněných inhibitorů jsme zjistili, že oba extrémofilní kmeny vykazují větší náchylnost jejich negativnímu vlivu oproti mesofilnímu kmeni *B. sacchari*. Nejvýrazněji se projevil inhibiční efekt kyseliny ferulové, což je pro účely produkce PHA na hydrolyzáttech lignocelulosity v rámci konceptu NGIB vhodné reflektovat. Vesměs tak může být provedeno více způsoby, kdy první spočívá v úpravě hydrolyzátů při procesu detoxifikace [71]. I přes zmíněný vyšší inhibiční vliv testovaných látek stále testování extrémofilové *H. halophila* a *S. thermodepolymerans* představují velmi úspěšné kandidáty pro produkci PHA na hydrolyzáttech lignocelulosoové biomasy pocházející např. z potravinářství. Pomineme-li vysoký inhibiční vliv kyseliny ferulové na oba kmeny a kyseliny levulové na *H. halophila*, výtěžky PHA získané z biomasy extrémofilních kmenů byly podstatně vyšší než pro mesofilní kmen *B. sacchari* kultivovaný za stejných podmínek, a to dvakrát až třikrát vyšší. V případě modelových hydrolyzátů byly získány pro nejvhodnější hydrolyzáty výtěžky PHA ještě vyšší. Při výběru nejvhodnějších reálných hydrolyzátů je důležité reflektovat zastoupení sacharidů po hydrolyze, jelikož jednotliví producenti mohou různé nároky na povahu uhlíkatých zdrojů (pentosy, hexosy), a taktéž přítomnost mikrobiálních inhibitorů. Na základě našich dat je možné dále rozvinout robustní a efektivní výrobní proces produkce PHA na hydrolyzáttech lignocelulosoových odpadů v rámci NGIB, a to za snížení celkových nákladů na produkci. Kromě homopolymery P(3HB) může být produkován také kopolymer P(3HB-co-3HV) s výhodnějšími mechanickými a technologickými vlastnostmi.

4.3 Ekologická izolace PHA z extrémofilních producentů

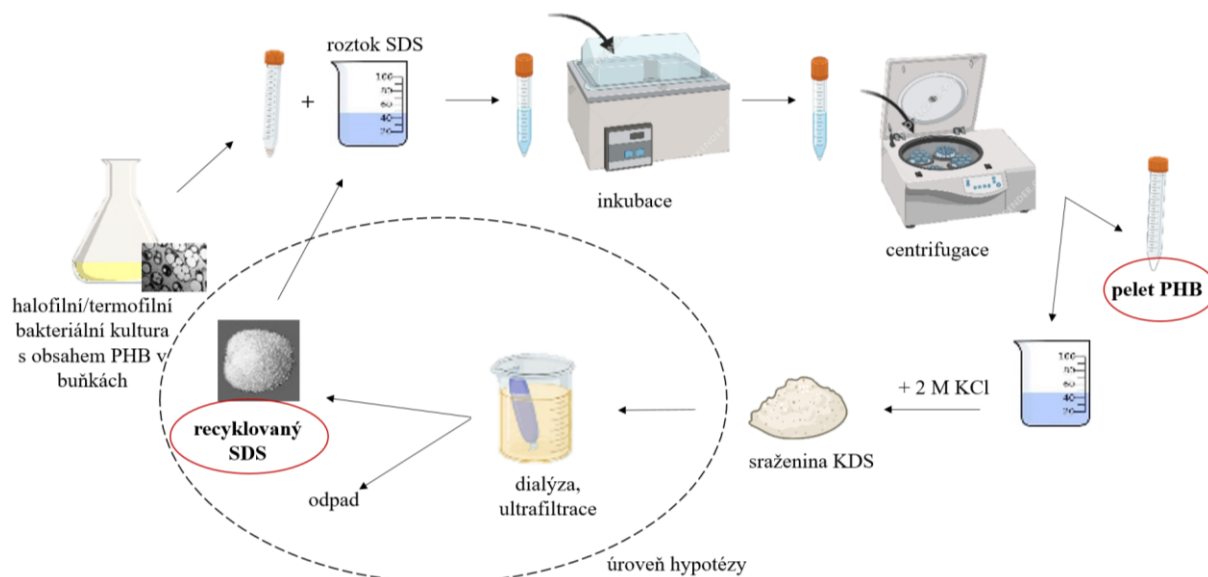
Vysoké náklady na celý proces velkoobjemové produkce PHA limitují její výraznější zavedení do průmyslu. Pro účely snížení celkové ceny existuje řada strategií, které byly již diskutovány dříve v rámci práce. Jedná se především o využití odpadních substrátů pro kultivaci či využití extrémofilních mikroorganismů. Předchozí část práce se zabírala využitím extrémofilních mikroorganismů při biotechnologické produkci PHA. Bylo zjištěno, že tato skupina producentů kromě vysokého potenciálu tvorby polymeru nabízí v rámci konceptu NGIB možnost snížení cen biotechnologického procesu díky snížení nákladů na sterilizaci médií a kultivačního zařízení, což následně sníží náklady ještě více než samotné využití odpadních substrátů. Nicméně vybraných vlastností extrémofilních producentů PHA může být s výhodou využito i při procesu izolace polymeru z buněk. Při návrhu izolačního procesu je přitom nutné zohlednit charakteristiky vybraných extrémofilů, jelikož přestože některé rysy mohou být společné, jiné se naopak mohou odlišovat vzhledem k prostředí, ve kterém se dané skupiny těchto mikroorganismů přirozeně vyskytují.

Jako přístup, který vede k narušení celistvosti mikrobiálních buněk bez nutnosti přidavku dalších chemických látek, se nabízí využití hypotonické lyze. Provedení je poměrně jednoduché, tkví v expozici buněk prostředí o výrazně nižší osmotické síle než prostředí, v němž byly buňky kultivovány. Při náhlé expozici buněk takovému prostředí dochází vlivem rozdílů osmotických tlaků k penetraci vody do buněk, což vede k narušení jejich integrity, praskání buněk a následnému uvolnění intracelulárního obsahu. Přestože lze přístup teoreticky aplikovat na téměř všechny mikroorganismy, zejména haofily, byl popsán především pro extrémně halofilní archaea *Hfx. mediterranei* uvedený již dříve, který je vzhledem k požadavku na vysoké množství soli (přes 200 g/L) na expozici hypotonickému prostředí extrémně senzitivní. Reakce při expozici destilované vodě se projeví téměř okamžitě, buňky ztratí svoji integritu a dochází k uvolnění granulí PHA do roztoku. Nicméně lyze v pouhé destilované vody nevede v tomto případě k zisku polymeru o vysoké čistotě, pelet získaný po centrifugaci je směsí vrstvy buněčné debris, granulí PHA a vrstvy proteinů [72]. Na celkový pelet je tedy nutné aplikovat purifikační kroky vedoucí k odstanění residuí buněčných komponent [73], a to např. chlornanem sodným, peroxidem vodíku či dalšími látkami uvedenými výše.

V rámci problematiky shrnuté v naší práci **Nováčková a kol. 2022**⁴ jsme se věnovali vývoji metodiky nejen ekonomicky, ale i ekologicky méně náročné izolace PHA z buněk extrémofilních mikroorganismů *H. halophila* a *S. thermodepolymerans* schopných produkce polymeru vyšší než 70 hm. % se současným potenciálem pro aplikovatelnost přístupu NGIB. Na zvolené kmeny jsme aplikovali podmínky vedoucí k nastolení hypotonické lyze buněk, jelikož jsme vzhledem k potvrzenému obsahu kompatibilních solutů v buňkách sloužících k adaptaci v jejich přirozených podmínkách očekávali jejich vyšší náchylnost k osmotickému namáhání. Abychom získali dostatečně čistý produkt, když vezmeme do úvahy výsledky

⁴ **NOVÁČKOVÁ, I.**; KOUŘILOVÁ, X.; MRÁZOVÁ, K.; SEDLÁČEK, P.; KALINA, M.; KRZYZANEK, V.; KOLLER, M.; OBRUČA, S. Combination of Hypotonic Lysis and Application of Detergent for Isolation of Polyhydroxyalkanoates from Extremophiles. *Polymers*, 2022, roč. 14, č. 9, s. 1–16. ISSN: 2073-4360.

práce s *Hfx. mediterranei*, a zároveň abychom napomohli účinnější disrupci buněk, využili jsme detergent SDS v koncentračním rozmezí 1–10 g/L, aby byly i přes jeho přítomnost nadále nastoleny hypoosmotické podmínky vedoucí k lyzi. Residuální SDS po extrakci bylo odstraněno převedením na nerozpustný produkt vysrážením s KCl, což eliminovalo potenciální negativní ekologický dopad sloučeniny v případě, že by zůstala v původní formě v odpadní vodě. Nerozpustný produkt dodecylsíran draselný (KDS) byl z odpadní vody jednoduše odstraněn a v rámci dalšího procesu může být potenciálně převeden zpět na SDS pro další využití. Shrnutí celého experimentu je znázorněno na následujícím schématu (Obr. 8).



Obr. 8: Schéma izolačního procesu PHB s využitím SDS z halofilních či termofilních bakteriálních buněk

Na základě literární rešerše jsme se zpočátku věnovali optimalizaci parametrů izolace. Vycházeli jsme z předpokladu nastavení hypoosmotického prostředí pro izolaci, a to aplikací roztoku SDS do maximální koncentrace 10 g/L. Kromě přítomnosti detergentu byl izolační proces doplněn tepelným ošetřením za účelem zvýšení účinnosti. Jako optimalizační parametry byly tedy testovány různé koncentrace detergentu SDS, teplota a doba inkubace v hypoosmotickém prostředí, a dále také robustnost procesu testováním vyššího množství biomasy v roztoku SDS optimální koncentrace při optimální inkubaci. Během experimentů jsme vždy charakterizovali vyizolovaný materiál a jeho množství, aby bylo možné kvantitativně porovnat efektivitu jednotlivých přístupů. Materiál získaný optimalizovaným izolačním procesem byl dále podrobněji charakterizován prostřednictvím pokročilejších instrumentálních technik.

Tab. 4: Vliv koncentrace SDS na izolaci polymeru

mikroorganismus	SDS [g/L]	čistota PHB [hm. %]	výtěžek [-]
<i>H. halophila</i>	1	88,0 ± 0,4	0,99
	2,5	91,4 ± 2,7	0,99
	5	97,1 ± 3,7	1,11
	10	89,6 ± 1,4	1,09
<i>S. thermodepolymerans</i>	1	65,7 ± 0,8	0,95
	2,5	87,7 ± 3,6	0,97
	5	86,4 ± 1,4	1,00
	10	85,5 ± 0,4	0,92

U obou kmenů jsme exponovali nakultivované bakteriální buňky po 72 h kultivace daným prostředím po dobu 2 h, lišily se přitom teploty inkubace, které byly v rámci tohoto experimentu na základě kultivačních teplot nastaveny na 70 °C pro *H. halophila* a 90 °C pro *S. thermodepolymerans*, výsledky viz Tab. 4. Pro halofilní kmen s optimální koncentrací soli v médiu 66 g/L jsme očekávali mírně vyšší náchylnost k působení hypoosmotického prostředí, jako nejuspěšnější se jevílo možnost 5 g/L. Lze tedy pozorovat výrazný efekt hypotonické lyze buněk současně se značným purifikačním vlivem. Odlišných výsledků bylo dosaženo pro termofilní kmen *S. thermodepolymerans*, kde se jevíla jako nejefektivnější koncentrace SDS 2,5 g/L, tedy poloviční oproti *H. halophila*. Rozdíl mezi kmeny může být mj. způsoben nižším zastoupením kompatibilních solutů v buňkách termofilního kmene, což vede k očekávání o menší náchylnosti buněk k hypotonické lyzi v porovnání s halofily. Jelikož jsme z výsledků uvažovali kromě konečné čistoty polymeru i celkovou výtěžnost aplikovaného izolačního postupu, jako nejvhodnější koncentrace SDS bylo zvoleno stejně jako u *H. halophila* 5 g/L, a to mj. i vzhledem k odchylce u 2,5 g/L.

Tab. 5: Vliv inkubačního procesu na izolaci polymeru

mikroorganismus	inkubace	čistota PHB [hm. %]	výtěžek [-]
<i>H. halophila</i>	50 °C (120 min)	97,5 ± 1,2	0,92
	70 °C (120 min)	96,7 ± 0,3	0,97
	90 °C (120 min)	99,7 ± 0,1	0,90
	4 °C (120 min) + 70 °C (120 min)	94,3 ± 1,5	0,92
<i>S. thermodepolymerans</i>	30 °C (120 min)	67,6 ± 0,8	0,73
	50 °C (120 min)	81,4 ± 4,3	0,78
	70 °C (120 min)	96,7 ± 2,4	0,79
	90 °C (120 min)	99,8 ± 2,8	0,91
	4 °C (120 min) + 90 °C (120 min)	86,2 ± 2,1	0,87

Dalším parametrem pro optimalizaci byla teplota, při níž byl kmen v přítomnosti SDS inkubován (Tab. 5). Pro kmen *H. halophila* se jako nejvhodnější inkubační teplota na základě čistoty PHA jevíla expozice 90 °C. Nicméně výtěžek PHA byl ve všech případech včetně kombinace chlazení a následného ohřevu nižší než při expozici 70 °C po dobu 2h, navíc pokles čistoty oproti 90 °C nebyl příliš vysoký, proto byla jako optimální teplota inkubace zvolena hodnota 70 °C. Naše domněnka náchylnosti membrány termofilního kmene ke snížené teplotě nebyla potvrzena, naopak jako nejefektivnější na základě výtěžku i čistoty se jevíla inkubace při teplotě 90 °C. Expozice termofilů nízké teplotě vedla ke zcela opačnému efektu, než jsme primárně očekávali, jelikož bylo již dříve popsáno, že tyto podmínky naopak

namísto narušení kompaktnosti buňky vedou k oslabení vlivu následného tepelného namáhání. Bylo popsáno, že zvýšená odolnost vůči vyšší teplotě souvisela se změnami ve složení mastných kyselin v membráně buněk [74]. Přestože byl jev popsán u mesofilních kmenů *E. coli* [75] a *C. necator* [76] po expozici nízkým teplotám (0–5 °C), nikoli konkrétně u termofilů, lze předpokládat, že princip při expozici nízké teplotě se u termofilů projeví taktéž a možná ještě výrazněji. Taktéž lze očekávat změny v membránových lipidech, což celkově posílí celistvost buňky a ta je následně méně náchylná vůči vlivům hypotonické lyzi a dalšímu teplotnímu namáhání. Tuto domněnku nám potvrdila data získaná pro kombinaci chlazení při 4 °C a následné expozice 90 °C, kdy čistota polymeru vykazovala podstatně nižší hodnotu než při samotné expozici teplotě 90 °C, jež byla nejúspěšnější.

Pro další zpracování polymeru je vhodné znát vyjma čistoty i další charakteristiky, které ovlivňují fyzikálně-chemické vlastnosti. Z tohoto pohledu jsou důležité parametry molekulová hmotnost a polydisperzita systému. Vzhledem k aplikovaným podmínkám bylo naším dalším cílem stanovit, jaký vliv má aplikovaný izolační postup na tyto parametry. U kmene *S. thermodepolymerans* jsme pozorovali mírný pokles hodnot vzhledem ke kontrole, což může být způsobeno zvýšenou teplotou 90 °C aplikovanou po dobu 2 h při izolaci s působením SDS, kdy mohlo docházet k částečné degradaci polymeru. Jiný trend byl pozorován u kmene *H. halophila*, která standartně produkuje polymer vyšší molekulové hmotnosti v porovnání s ostatními PHA producenty včetně *S. thermodepolymerans* [77]. Porovnáním molekulové hmotnosti polymeru získaného z vysušené biomasy a polymeru izolovaného z buněk po kultivaci aplikací optimalizovaného postupu s použitím SDS bylo zjištěno, že aplikací námi navrženého postupu byl získán polymer až 1,5krát vyšší molekulovou hmotností. Nárůst molekulové hmotnosti řetězců polymeru po ošetření detergentem SDS přičítáme zvýšené rozpustnosti dlouhých řetězců PHA v chloroformu po odstranění ostatních buněčných komponent.

Kromě optimalizace izolačního postupu vedoucího k zisku čistého polymeru a podrobnější charakterizace materiálu jsme se zaměřili také na možnost recyklace využitého SDS v rámci procesu, jelikož v odpadní vodě by vykazoval škodlivý efekt a komplikoval by proces čištění odpadních vod. Po izolaci a následné centrifugaci vedoucí k zisku peletu reprezentujícího především PHA jsme tak dále zpracovávali i supernatant obsahující SDS. Jako nejefektivnější cesta se nám jevilo kvantitativní vysrážení ve vodě rozpustného SDS v prostředí 2 M KCl do podoby nerozpustného KDS, který může být poté jednoduše odstaněn dekantací nebo opět centrifugací. Jedná se o vysoce efektivní, rychlý a zároveň levný způsob eliminace SDS z odpadní vody, po vysrážení nebyla v roztocích detekována žádná residua detergentu. Dále uvažujeme možnou recyklaci SDS ultradialýzou KDS ve vhodném rozpouštědle v přítomnosti nadbytku sodných iontů, což by vedlo k regeneraci SDS a možnosti opětovného využití v dalším izolačním experimentu, jež by ještě více prohloubilo ekonomickou výhodnost námi navrhovaného izolačního procesu. Nicméně proces regenerace nebyl v rámci předložené disertační práce experimentálně ověřen.

5 ZÁVĚR

Předložená disertační práce se tematicky zaměřuje na aplikaci technik především evolučního, ale v menší míře i genového inženýrství na bakteriální kmeny schopné produkce polyhydroxyalkanoátů. Hlavním cílem bylo získat ze sbírkových bakteriálních kmenů kmeny se zlepšenými produkčními schopnostmi, a to jednak z kvantitativního hlediska tvorby PHA, jednak z hlediska kvalitativního, kdy byla zaměřena snaha na zlepšení syntézy kopolymerů P(3HB-co-3HV) a P(3HB-co-4HB). Pro vybrané kopolyмеры je charakteristické, že se zvyšujícím se obsahem druhé monomerní frakce vůči frakci 3HB se do určité míry zlepšují celkové vlastnosti polymeru. Naším cílem bylo mj. pro tvorbu těchto kopolymerů využít levnější či doposud nevyužívané alternativy prekurzorů 3HV či 4HB. Stejná myšlenka, spočívající ve snížení nákladů na produkci PHA, byla náplní další části práce, kdy byly využity jako substráty modelové hydrolyzáty lignocelulosové biomasy pocházející například z potravinářského průmyslu. Pro tyto účely byl vybrán jednak mesofilní bakteriální kmen, jednak vybrané kmeny extrémofilní, konkrétně zahrnující zástupce halofilů a termofilů, které mají specifické požadavky na kultivaci, které mohou v konečném důsledku snížit také nároky na proces produkce polymeru. Specifik termofilních a halofilních mikroorganismů bylo využito posléze v poslední tematické části disertační práci, při níž byla upřena pozornost na vývoj alternativního způsobu izolace PHA z bakteriální biomasy.

Z experimentu zaměřeného na krátkodobou adaptaci kmene *C. necator* H16 na mikrobiální inhibitor kyselinu levulovou bylo získáno pět kmenů s potenciálem pro lepší růst a produkci kopolymeru P(3HB-co-3HV) v přítomnosti kyseliny levulové oproti divokému kmeni. Jeden z kmenů byl získán po aplikaci chemického mutagenu methyl methansulfonátu. Reprodukovatelně získaný kopolymer s nejvyšším zastoupením 3HV obsahoval přibližně 21 mol. % této frakce v kopolymeru. Kmeny byly podrobeny metabolické charakterizaci a porovnány s divokým kmenem za účelem objasnění adaptační strategie na kyselinu levulovou. Statistickou analýzou získaných dat specifických enzymových aktivit byly objasněny některé společné prvky adaptace spočívající především v obecné odpovědi na oxidativní stres vedoucí především k navýšení produkce NADPH. Vyjma izolátu ALA06 získaného aplikací MMS bylo v rámci adaptace pozorováno navýšení výtěžku biomasy stejně jako v ní obsaženého polymeru. Na základě PCA byla pozorována rozdílnost divokého kmene od adaptovaných kultur. Charakterizovaný polymer vykazoval trend klesající krystalinity a teploty tání společně s narůstajícím zastoupením frakce 3HV. Trendu se vymykal kopolymer vyizolovaný z kmene ALA06, u něhož předpokládáme schopnost syntetizovat částečně blokové kopolyмеры, což se projeví zlepšením vlastností materiálu i přes nejnižší obsah 3HV frakce.

Dlouhodobý adaptační experiment byl aplikován opět na kmen *C. necator* H16, jako stresové faktory byly vybrány osmotický tlak a přítomnost iontů těžkých kovů, konkrétně měďnaté ionty. Z trendů růstu biomasy u obou stresorů jsme odhalili dva odlišné adaptační mechanismy, skokový nárůst při adaptaci na měď a postupný nárůst při adaptaci na osmotický stres, u obou paralelních experimentů došlo po čase k ustálení a žádné další trendy v růstu při dalším pasážování nebyly pozorovány. Jako robustnější byl na základě experimentů sledán

kmen adaptovaný na měď, který vykazoval lepší charakteristiky růstu i produkce oproti divokému kmeni. Stejně jako u předchozí práce zaměřené na adaptaci, byly kmeny metabolicky charakterizovány a data byla následně podrobena statistické analýze. Oba adaptované kmeny spojovala navýšená dráha biosyntézy PHA, proto lze na základě získaných výsledků z jednotlivých základních a následně i pokročilejších analýz (FT-IR, Ramanova spektroskopie) v rámci diskutované publikace usuzovat, že při adaptaci *C. necator* H16 na přítomnost měďnatých iontů a zvýšený osmotický stres hrály PHA důležitou roli. Ne však pouze prostřednictvím vyššího množství polymeru v biomase, ten nebyl pokaždé přímo prokázán, ale především pravděpodobně skrze navýšený cyklus přeměny PHA v buňkách, což vedlo k navýšení poolu monomerních jednotek, které vykazují funkci jednak chaperonů, jednak osmoprotektantů.

Data z proteomické analýzy aplikované na adaptované kmeny a divoký kmen bez a za přítomnosti stresorů nám pomocí jednoduchého srovnání ukázala řadu up-regulovaných či down-regulovaných proteinů při porovnání jednotlivých dvojic kmenů. Vliv aplikovaného stresu se mohl projevit navýšením aktivit enzymů, navýšením jejich exprese, ale také na dalších úrovních metabolismu, což by se mohlo dále projevit ve výsledcích při podrobnějším porovnání kmenů. Za účelem odhalit větší provázanost naměřených dat v rámci metabolismu uvažujeme aplikaci bioinformatických nástrojů v rámci další spolupráce.

Jako nevhodnější prekurzor jednotky 4HB pro produkci kopolymeru P(3HB-co-4HB) pomocí kmene *C. necator* H16 se na základě experimentů jevil ϵ -KL, jehož využití pro tento účel je poměrně unikátní, nicméně zároveň vystupoval jako mikrobiální inhibitor. Dlouhodobým adaptačním experimentem bakteriálního kmene na ϵ -KL jsme získali izolát vykazující výrazně lepší růst v přítomnosti prekurzoru zároveň s jeho efektivnějším využitím pro tvorbu kopolymeru v kombinaci s dalším zdrojem uhlíku. Další zlepšení kmene za účelem navýšení frakce 4HB v kopolymeru nabízí delece genů zapojených do utilizace meziprojektu 4-hydroxybutyryl-CoA pomocí metod genového inženýrství. Dva možné zapojené proteiny, respektive je kódující geny, byly popsány a také byly provedeny transformační experimenty, jež jsou součástí delečního protokolu, nicméně deleční mutanty v rámci této práce připraveny nebyly. I přes to však adaptovaný izolát získaný na základě metodiky evolučního inženýrství byl schopen i při kultivaci v laboratorním bioreaktoru produkovat značné množství polymeru s nezanedbatelnou frakcí 4HB, která má pozitivní vliv na výsledné vlastnosti materiálu.

Dále jsme se věnovali biotechnologické produkci PHA pomocí mesofilního kmene *B. sacchari* a dále dvou extrémofilních kmenů, halofilního kmene *H. halophila* a termofilního kmene *S. thermodepolymerans*, a to na modelových hydrolyzátech lignocelulosové biomasy, jež pochází často z odvětví potravinářství. Jednotlivé modelové směsi sestávaly z rozdílného zastoupení hexos a pentos. Využití extrémofilních producentů PHA může společně s využitím odpadních substrátů vést k dalšímu zredukování nákladů na produkci snížením nároků na sterilitu procesu v rámci konceptu NGIB. Z výsledků bylo zjištěno, že extrémofilní kmeny mají velký potenciál pro využití při kultivaci na směsích sacharidů. Zatímco kmen *H. halophila* preferoval směsi bohaté na hexosy, kmen *S. thermodepolymerans* preferoval směsi bohaté na pentosy, což je podstatná informace pro případné další experimenty např. na

reálných hydrolyzátech. Dále jsme testovali robustnost vůči potenciálním inhibitorům často přítomným v reálných lignocelulosových hydrolyzátech, kdy vliv na jednotlivé producenty byl proměnný. Výhodná byla nicméně schopnost mesofilního a termofilního kmene využít kyseliny levulovou za současné produkce kopolymeru P(3HB-co-3HV).

V návaznosti na předchozí problematiku produkce PHA pomocí halofilního a termofilního producenta, kteří jsou schopni produkovat vysoké množství polymeru v biomase, jsme se dále zaměřili na vývoj alternativního způsobu izolace z těchto bakteriálních buněk. Hlavní myšlenkou přitom bylo snížit ekonomickou i ekologickou zátěž procesu a využít skutečnosti, že oba zvolené typy extrémofilů spojuje zvýšená náchylnost k osmotickému namáhání. Pro účely izolace jsme využili detergent SDS, jehož optimální koncentrace pro izolaci byla experimentálně stanovena na 5 g/L. Jednotlivé kmeny byly namáhány také při inkubaci při zvýšené teplotě, kdy termofilní kmen vyžadoval teplotu 90 °C, pro halofilní kmen byla dostatečná teplota 70 °C. Získané polymery vykazovaly čistoty vyšší než 99 hm. %, výtěžky se blížily hodnotě 1,0. Porovnáním molekulových hmotností takto izolovaných polymerů oproti standardní extrakci chloroformem bylo zjištěno, že na polymer izolovaný z *H. halophila* byl efekt pozitivní, jelikož molekulová hmotnost byla v tomto případě vyšší, izolace při vyšší teplotě pro *S. thermodepolymerans* má na tento parametr polymeru negativní dopad. Zatímco SDS může při 70 °C zvyšovat rozpustnost dlouhých řetězců, při 90 °C může již docházet k částečné degradaci. Vyvinutý postup byl na základě experimentů vyhodnocen jako robustní. Další možností, která by ještě více snížila ekologickou a ekonomickou zátěž celého procesu, spočívá v potenciální recyklaci SDS po izolaci, která byla v patentové žádosti i publikaci nastíněna a vyžaduje další experimenty.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

1,4-BD	1,4-butandiol
1,6-HD	1,6-hexandiol
3HB	3-hydroxybutyrát
3HV	3-hydroxyvalerát
4HB	4-hydroxybutyrát
4HbD	4-hydroxybutyrát dehydrogenasa
5-HMF	5-hydroxymethylfurfural
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FT-IR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
KDS	dodecylsíran draselný
kryo-SEM	kryogenní skenovací (rastrovací) elektronová mikroskopie
lcl-PHA	polyhydroxyalkanoáty s dlouhým bočním řetězcem
mcl-PHA	polyhydroxyalkanoáty se středně dlouhým bočním řetězcem
MMS	methyl methansulfonát
NAD ⁺ /NADH	nikotinamidadeninukleotid (oxidovaná/redukovaná forma)
NADP ⁺ /NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát (oxidovaná/ redukovaná forma)
NGIB	průmyslové biotechnologie nové generace
P(3HB-co-3HV)	kopolymer 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu
P(3HB-co-4HB)	kopolymer 3-hydroxybutyrátu a 4-hydroxybutyrátu
PCA	analýza hlavních komponent
PHA	polyhydroxyalkanoáty
PHB	poly(3-hydroxybutyrát)
RNA	ribonukleová kyselina
scl-PHA	polyhydroxyalkanoáty s krátkým bočním řetězcem
SDS	dodecylsíran sodný
SSADH	sukcinát-semialdehyd dehydrogenasa
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
γ-BL	γ-butyrolakton
ε-KL	ε-kaprolakton

7 LITERATURA

- [1] MARLES-WRIGHT, J., R. J. LEWIS. 2007. Stress responses of bacteria. *Current Opinion in Structural Biology*. **17**(6), 755–760.
- [2] FOSTER, P. L. 2005. Stress responses and genetic variation in bacteria. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. **569**(1–2), 3–11.
- [3] HRSTKA, M. *Obecná biologie*. 1. vyd. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2005, 112 s. ISBN 80-214-3057-5.
- [4] XIAO, H., Z. BAO, H. ZHAO a B. TEUSINK, 2015. High Throughput Screening and Selection Methods for Directed Enzyme Evolution: Past, present, and future. *AIChE Journal*. **54**(16), 4011–4020.
- [5] FULDA, S., A. GORMAN, O. HORI a A. SAMALI. 2010. Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death. *International Journal of Cell Biology*. **1**, 1–23.
- [6] ŠIMONOVÍČOVÁ, A.. *Environmentálna mikrobiológia*. 1. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislavě 2013.
- [7] TRIPATHI, L., Y. ZHANG a Z. LIN. 2014. Bacterial Sigma Factors as Targets for Engineered or Synthetic Transcriptional Control. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. **2**.
- [8] DRAGOSITS, M. a D. MATTANOVICH. 2013. Adaptive laboratory evolution – principles and applications for biotechnology. *Microbial Cell Factories*. **12**(64).
- [9] WINKLER, J. D. a K. C. KAO. 2014. Recent advances in the evolutionary engineering of industrial biocatalysts. *Genomics*. **104**(6), 406–411.
- [10] CHAE, T. U., S. Y. CHOI, J. W. KIM, Y.-S. KO a S. Y. LEE. 2017. Recent advances in systems metabolic engineering tools and strategies. *Current Opinion in Biotechnology*. **47**, 67–82.
- [11] ZHU, Z., J. ZHANG, X. JI, Z. FANG, Z. WU, J. CHEN a G. DU. 2018. Evolutionary engineering of industrial microorganisms-strategies and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **102**(11), 4615–4627.
- [12] SAUER, U., A. HANSEN, R. LENNEN, H. LUO, M. HERRGÅRD, J. CHEN a G. DU. 2001. Evolutionary Engineering of Industrially Important Microbial Phenotypes: Evolutionary Engineering of Chemical Production in Microbes. *Metabolic Engineering*. **9**(5), 129–169.
- [13] HAHN-HÄGERDAL, B., K. KARHUMAA, Ch. U LARSSON, M. GORWA-GRAUSLUND, J. GÖRGENS a W. H. VAN ZYL. 2005. Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use. *Microbial Cell Factories*. **4**(31).
- [14] HUANG, D., R. WANG, W. DU, G. WANG a M. XIA. 2015. Activation of glycerol metabolic pathway by evolutionary engineering of *Rhizopus oryzae* to strengthen the fumaric acid biosynthesis from crude glycerol. *Bioresource Technology*. **196**, 263–272.
- [15] XIAO, H., Z. BAO, H. ZHAO a B. TEUSINK, 2015. High Throughput Screening and Selection Methods for Directed Enzyme Evolution. *Current Opinion in Biotechnology*. **54**(16), 4011–4020.
- [16] LENSKI, R., F. VASI a M. TRAVISANO. 1994. Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. II. Changes in life-history traits during adaptation to a seasonal environment. *The American Naturalist*. **144**(3), 432–456.

- [17] SNUSTAD, D. Peter a Michael J. SIMMONS. Genetika. Druhé aktualizované. Brno: Masarykova univerzita, 2017. ISBN 978-80-210-8613-5.
- [18] The Essential Guide To Genome Engineering: Techniques & Applications. SYNTHEGO [online]. [cit. 2020-04-27]. Dostupné z: <https://www.synthego.com/learn/genome-editing-engineering>.
- [19] LANIGAN, T. M., H. C. KOPERA a T. L. SAUNDERS. 2020. Principles of Genetic Engineering. *Genes*. **11**(3).
- [20] PHILIP, S., T. KESHAVARZ a I. ROY. 2007. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 82, 233–247.
- [21] ANJUM, A., M. ZUBER, K. M. ZIA, A. NOREEN, M. N. ANJUM a S. TABASUM. 2016. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*. 89, 161–174.
- [22] GILL, M. 2014. Bioplastic: A better alternative to plastics. *IMPACT: International Journal of Research in Applied. Natural and Social Sciences*. **2**(8), 115–120.
- [23] LEMOIGNE, M. 1926. Produit de déshydratation et de polymérisation de l'acide b-oxy butyrique. *Bulletin De La Societe De Chimie Biologique*. 8, 770–782.
- [24] STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoic acids. In: Byrom, D. (eds) Biomaterials. Palgrave MacMillan. London. 1991, 125-213. ISBN 978-1-349-11167-1.
- [25] STEINBÜCHEL, A., B. FÜCHTENBUSCH. 1998. Bacterial and other biological systems for polyester production. *Trends in Biotechnology*. 16, 419–427.
- [26] LUENGO, J.M., B. GARCÍA, A. SANDOVAL, G. NAHARRO a E. R. OLIVERA. 2003. Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*. 6, 251–260.
- [27] GRAGE, K., A. C. JAHNS, N. PARLANE, R. PALANISAMY, I. A. RASIAH, J. A. ATWOOD a B. H. A. REHM. 2009. Bacterial Polyhydroxyalkanoate Granules: Biogenesis, Structure, and Potential Use as Nano-/Micro-Beads in Biotechnological and Biomedical Applications. *Biomacromolecules*. **10**(4), 660-669.
- [28] ZINN, M., B. WITHOLT a T. EGLI. 2001. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **53**(1), 5–21.
- [29] ZINN M. 2003. Tailor-made synthesis of polyhydroxyalkanoates. *European Cells & Materials*. 5, 38–39.
- [30] SUDESH, K., H. ABE a Y. DOI. 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*. 25, 1503–1555.
- [31] KESHAVARZ T. a I. ROY. 2010. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*. 13, 321–326.
- [32] VAN DER WALLE, G. A. M., G. J. M. DE KONING, R. A. WEUSTHUIS a G. EGGINK. 2001. Properties, modifications and applications of biopolyesters. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*. 71, 263–291.
- [33] KAZUNORI, T., T. TAKEHARU, K. MATSUMOTO, S. NAKAE, S. TAGUCHI a Y. DOI. 2001. Investigation of metabolic pathways for biopolyester production. *Ecomolecular Science Research*. 42, 71–74.

- [34] DU, CH., J. SABIROVA, W. SOETAERT a S. KI CAROL LIN. 2012. Polyhydroxyalkanoates Production From Low-cost Sustainable Raw Materials. *Current Chemical Biology*. **6**(1), 14–25.
- [35] OBRUCA, S., P. BENESOVA, L. MARSALEK a I. MAROVA. 2015. Use of Lignocellulosic Materials for PHA Production. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. **29**(2), 135–144.
- [36] KAUR, G. 2015. Strategies for Large-scale Production of Polyhydroxyalkanoates. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. **29**(2), 157–172.
- [37] RODRIGUEZ-PEREZ, S., A. SERRANO, A. A. PANTIÓN a B. ALONSO-FARIÑAS. 2018. Challenges of scaling-up PHA production from waste streams. A review. *Journal of Environmental Management*. **205**, 215–230.
- [38] JONSSON, L. J., B. ALRIKSSON a N.-O. NILVEBRANT. 2013. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*. **6**, e16.
- [39] JAREMKO, M. a J. YU. 2011. The initial metabolic conversion of levulinic acid in *Cupriavidus necator*. *Journal of Biotechnology*. **155**, 293–298.
- [40] SPAANS, S. K., R. A. WEUSTHUIS, J. VAN DER OOST a S. W. M. KENGEN. 2015. NADPH-generating systems in bacteria and archaea. *Frontiers in Microbiology*. **6**.
- [41] MURAKAMI, K., R. TSUBOUCHI, M. FUKAYAMA, T. OGAWA a M. YOSHINO. 2006. Oxidative inactivation of reduced NADP-generating enzymes in *E. coli*: iron-dependent inactivation with affinity cleavage of NADP-isocitrate dehydrogenase. *Archives of Microbiology*. **186**, 385–392.
- [42] OBRUCA, S., I. MAROVA, M. STANKOVA, L. MRAVCOVA a Z. SVOBODA. 2010. Effect of ethanol and hydrogen peroxide on poly(3-hydroxybutyrate) biosynthetic pathway in *Cupriavidus necator* H16. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **26**(7), 1261–1267.
- [43] OBRUCA, S., O. SNAJDAR, Z. SVOBODA a I. MAROVA. 2013. Application of random mutagenesis to enhance the production of polyhydroxyalkanoates by *Cupriavidus necator* H16 on waste frying oil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **29**(12), 2417–2428.
- [44] OBRUCA, S., I. MAROVA, Z. SVOBODA a R. MIKULIKOVA. 2010. Use of controlled exogenous stress for improvement of poly(3-hydroxybutyrate) production in *Cupriavidus necator*. *Folia Microbiologica*. **55**, 17–22.
- [45] JUNG, Y. M. a Y. H. LEE. 2000. Utilization of oxidative pressure for enhanced production of poly-b-hydroxybutyrate and poly(3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) in *Ralstonia eutropha*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **90**, 266–270.
- [46] BRAMER, C. O. a A. STEINBÜCHEL. 2001. The methylcitric acid pathway in *Ralstonia eutropha*: new genes identified and involved in propionate metabolism. *Microbiology*. **147**, 2203–2214.
- [47] EWERING, C., C. O. BRAMER, N. BRULAND, A. BETHKE a A. STEINBÜCHEL. 2006. Occurrence and expression of tricarboxylate synthases in *Ralstonia eutropha*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **71**, 80–89.

- [48] YU, J. a Y. T. SI. 2006. Metabolic carbon fluxes and biosynthesis of polyhydroxyalkanoates in *Ralstonia eutropha* on short fatty acids. *Biotechnology Progress*. 20, 1015–1024.
- [49] KOLLER, M. 2019. Chemical and Biochemical Engineering Approaches in Manufacturing Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters of Tailored Structure with Focus on the Diversity of Building Blocks. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. 32(4), 413–438.
- [50] KADOURI, D., E. JURKEVITCH, Y. OKON a S. CASTRO-SOWINSKI. 2018. Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Critical Reviews in Microbiology*. 31(2), 55–67.
- [51] OBRUCA, S., P. SEDLACEK, F. MRAVEC, O. SAMEK a I. MAROVA. 2016. Evaluation of 3-hydroxybutyrate as an enzyme-protective agent against heating and oxidative damage and its potential role in stress response of poly(3-hydroxybutyrate) accumulating cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100(3), 1365–1376.
- [52] ROBERTS, M. F. 2005. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems*. 1(5).
- [53] ROGIERS, T., M. L. MERROUN, A. WILLIAMSON, N. LEYS, R. V. HOUDT, N. BOON a K. MIJNENDONCKX. 2022. *Cupriavidus metallidurans* NA4 actively forms polyhydroxybutyrate-associated uranium-phosphate precipitates. *Journal of Hazardous Materials*. 421, e126737.
- [54] PERNICOVA, I., I. NOVACKOVA, P. SEDLACEK, X. KOURILOVA, M. KALINA et al. 2020. Introducing the Newly Isolated Bacterium *Aneurinibacillus* sp. H1 as an Auspicious Thermophilic Producer of Various Polyhydroxyalkanoates (PHA) Copolymers-1. Isolation and Characterization of the Bacterium. *Polymers*. 12(6), 1235.
- [55] NORHAFINI, H., L. THINAGARAN, K. SHANTINI et al. 2017. Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) with high 4HB composition and PHA content using 1,4-butanediol and 1,6-hexanediol for medical application. *Journal of Polymer Research*. 24(189).
- [56] KUCERA, D., I. NOVACKOVA, I. PERNICOVA, P. SEDLACEK a S. OBRUCA. 2019. Biotechnological Production of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-4-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) Terpolymer by *Cupriavidus* sp. DSM 19379. *Bioengineering*. 6(3), 74.
- [57] VIGNESWARI, S., S. VIJAYA, M. I. A. MAJID, K. SUDESH, C. S. SIPAUT, M. N. M. AZIZAN a A. A. AMIRUL. 2009. Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer with manipulated variables and its properties. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 36(4), 547–556.
- [58] DOI, Y., A. SEGAWA a M. KUNIOKA. 1990b. Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in *Alcaligenes eutrophus*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 12, 101–106.
- [59] TEE, K. L., J. GRINHAM, A. M. OTHUSITSE, M. GONZÁLEZ-VILLANUEVA, A. O. JOHNSON a T. S. WONG. 2017. An Efficient Transformation Method for the Bioplastic-Producing “Knallgas” Bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Biotechnology Journal*. 12(11).

- [60] NIELSEN, T. D., J. HASSELBALCH, K. HOLMBERG a J. STRIPPLE. 2020. Politics and the plastic crisis: a review throughout the plastic life cycle. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Energy and Environment*. 9, e360.
- [61] European Bioplastics, Bioplastic Market Data 2019 available at: https://docs.european-bioplastics.org/publications/market_data/Report_Bioplastics_Market_Data_2019.pdf
- [62] YOUSUF, A., D. PIROZZI a F. SANNINO. Chapter 1 - Fundamentals of lignocellulosic biomass, In: Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels. Editor(s): A. YOUSUF, D. PIROZZI a F. SANNINO, Academic Press, 2020, 1–15, ISBN 9780128159361.
- [63] BOWERS, T., A. VAIDYA, D. A. SMITH a G. LLOYD-JONES. 2014. Softwood hydrolysate as a carbon source for polyhydroxyalkanoate production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 89, 1030–1037.
- [64] JEFFRIES, T. W. a H. K. SREENATH. 1988. Fermentation of hemicellulosic sugars and sugar mixtures by *Candida shehatae*. *Biotechnology and Bioengineering*. 31, 502–506.
- [65] ROBERTO, I. C., M. G. A. FELIPE, I. M. DE MANCILHA, M. VITOLO, S. SATO a S. S. DA SILVA. 1995. Xylitol production by *Candida guilliermondii* as an approach for the utilization of agroindustrial residues. *Bioresource Technology*. 51, 255–257.
- [66] SAHA, B., L. ITENA, M. COTTAA a Y. WU. 2005. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry*. 40, 3693–3700.
- [67] CHOTEBORSKA, P., B. PALMAROLA-ADRADOS, M. GALBE, B. ZACCHI, K. MELZUCH a M. RYCHTERA. 2004. Processing of wheat bran to sugar solution. *Journal of Food Engineering*. 61, 561–565.
- [68] ESTEVES, A. M., S. K. CHANDRAYAN, P. M. MCTERNAN, N. BORGES, M. W. W. ADAMS a H. SANTOS. 2014. Mannosylglycerate and di-myo-inositol phosphate have interchangeable roles during adaptation of *Pyrococcus furiosus* to heat stress. *Applied Environmental Microbiology*. 80, 4226–4233.
- [69] CHEN, G. Q. a X. R. JIANG. 2018. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. 50, 94–100.
- [70] IBRAHIM, M. H. a A. STEINBÜCHEL. 2010. High-cell-density cyclic fed-batch fermentation of poly(3-hydroxybutyrate)-accumulating thermophile, *Chelatococcus* sp. strain MW10. *Applied Environmental Microbiology*. 76, 7890–7895.
- [71] BHATIA, S. K., S. S. JAGTAP, A. A. BEDEKAR, R. K. BHATIA, A. K. PATEL, D. PANT et al. 2020. Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: effect of key parameters, technological improvements, and challenges. *Bioresource Technology*. 300, e122724.
- [72] RODRIGUEZ-VALERA, F. 1992. Halobacteria as producers of polyhydroxyalkanoates. *FEMS Microbiology Letters*. 103, 181–186.
- [73] BHATTACHARYYA, A., A. PRAMANIK, S. K. MAJI, S. HALDAR, U. K. MUKHOPADHYAY a J. MUKHERJEE. 2012. Utilization of vinasse for production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. *AMB Express*. 2(34).

- [74] MIDDELBERG, A. P. J. 1995. Process-scale disruption of microorganisms. *Biotechnology Advances*. 13, 491–551.
- [75] KATSUI, N., T. TSUCHIDO, M. TAKANO a I. SHIBASAKI. 1981. Effect of preincubation temperature on the heat resistance of *Escherichia coli* having different fatty acid compositions. *Journal of Genetic Microbiology*. 122, 357–361.
- [76] REES, P., R. H. CUMMING a J. S. WATSON. Rheology of heated bacterial DNA. In: Proceedings of the 1994 ICheme Research Event, London, UK, 1994; Volume 1, 183–185.
- [77] KUCERA, D., I. PERNICOVÁ, A. KOVALCIK, M. KOLLER, L. MULLEROVA, P. SEDLACEK et al. 2018. Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*. *Bioresource Technology*. 256, 552–556.

8 ŽIVOTOPIS

Osobní údaje:

Jméno a příjmení: Ivana Nováčková
Adresa bydliště: Horákov 169, Mokrá 664 04
Telefon: +420 602 835 511
Datum narození: 6. 2. 1993
E-mail: xcnovackova@fch.vut.cz
Dosažený titul: Ing.

Vzdělání:

2018 – současnost Doktorské studium – obor Potravinářská chemie
Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně
2016–2018 Magisterské studium – obor Chemie pro medicínské aplikace
Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně
2013–2016 Bakalářské studium – obor Chemie pro medicínské aplikace
Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně
2009–2013 Gymnázium Brno Křenová

Pracovní zkušenosti:

2021 – 2022 Kvalitní Interní Granty VUT, vedoucí týmu
2018 – 2021 projekt Brno Ph.D. Talent 2018
2016 – současnost Centrum materiálového výzkumu, Fakulta chemická, VUT v Brně
pozice vědecký pracovník
srpen–září 2016 Enantis, s.r.o., pozice laboratorní asistent
srpen–září 2015 Enantis, s.r.o., pozice laboratorní asistent

Člen řešitelského týmu na následujících projektech:

Řízená evoluce bakterií produkujících polyhydroxyalkanoáty (2019–2021, standardní projekt GAČR, GA 19-20697S)

Ekologická role polyhydroxybutyrátu u cyanobakterií (2019–2021, mezinárodní projekt GAČR, GA 19-29651L)

9 PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORKY

Publikace v recenzovaných časopisech s impakt faktorem:

NOVÁČKOVÁ, I.; KUČERA, D.; POŘÍZKA, J.; PERNICOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; KOLLER, M.; KOVALČÍK, A.; OBRUČA, S. Adaptation of *Cupriavidus necator* to levulinic acid for enhanced production of P(3HB-co-3HV) copolyesters. *BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL*, 2019, roč. 151, č. 11, s. 1–10. ISSN: 1369-703X.

KUČERA, D.; NOVÁČKOVÁ, I.; PERNICOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. Biotechnological Production of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-4-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) Terpolymer by *Cupriavidus sp.* DSM 19379. *Bioengineering*, 2019, roč. 6, č. 3, s. 74–84. ISSN: 2306-5354.

PERNICOVÁ, I.; KUČERA, D.; NEBESÁŘOVÁ, J.; KALINA, M.; NOVÁČKOVÁ, I.; KOLLER, M.; OBRUČA, S. Production of polyhydroxyalkanoates on waste frying oil employing selected *Halomonas* strains. *BIORESOURCE TECHNOLOGY*, 2019, roč. 292, č. 11, s. 1–4. ISSN: 0960-8524.

PERNICOVÁ, I.; NOVÁČKOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; KOUŘILOVÁ, X.; KOLLER, M.; OBRUČA, S. Application of osmotic challenge for enrichment of microbial consortia in polyhydroxyalkanoates producing thermophilic and thermotolerant bacteria and their subsequent isolation. *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*, 2020, roč. 144, č. 2, s. 698–704. ISSN: 0141-8130.

PERNICOVÁ, I.; NOVÁČKOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; KOUŘILOVÁ, X.; KALINA, M.; KOVALČÍK, A.; KOLLER, M.; NEBESAROVA, J.; KRZYZANEK, V.; HRUBANOVA, K.; MÁSILKO, J.; SLANINOVÁ, E.; OBRUČA, S. Introducing the Newly Isolated Bacterium *Aneurinibacillus sp.* H1 as an Auspicious Thermophilic Producer of Various Polyhydroxyalkanoates (PHA) Copolymers-1. Isolation and Characterization of the Bacterium. *Polymers*, 2020, roč. 12, č. 6, s. 1–13. ISSN: 2073-4360.

SEDLÁČEK, P.; PERNICOVÁ, I.; NOVÁČKOVÁ, I.; KOUŘILOVÁ, X.; KALINA, M.; KOVALČÍK, A.; KOLLER, M.; NEBESAROVA, J.; KRZYZANEK, V.; HRUBANOVA, K.; MÁSILKO, J.; SLANINOVÁ, E.; TRUDIČOVÁ, M.; OBRUČA, S. Introducing the Newly Isolated Bacterium *Aneurinibacillus sp.* H1 as an Auspicious Thermophilic Producer of Various Polyhydroxyalkanoates (PHA) Copolymers-2. Material Study on the Produced Copolymers. *Polymers*, 2020, roč. 12, č. 6, s. 1–18. ISSN: 2073-4360.

KOUŘILOVÁ, X.; NOVÁČKOVÁ, I.; KOLLER, M.; OBRUČA, S. Evaluation of mesophilic *Burkholderia sacchari*, thermophilic *Schlegelella thermodepolymerans* and halophilic *Halomonas halophila* for polyhydroxyalkanoates production on model media mimicking lignocellulose hydrolysates. *BIORESOURCE TECHNOLOGY*, 2021, roč. 325, č. 4, s. 1–5. ISSN: 0960-8524.

POSPÍŠILOVÁ, A.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; PŘIKRYL, R. Isolation of poly(3-hydroxybutyrate) from bacterial biomass using soap made of waste cooking oil. *BIORESOURCES TECHNOLOGY*, 2021, roč. 326, č. 1, s. 1–5. ISSN: 0960-8524.

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

NOVÁČKOVÁ, I.; KOUŘILOVÁ, X.; MRÁZOVÁ, K.; SEDLÁČEK, P.; KALINA, M.; KRZYZANEK, V.; KOLLER, M.; OBRUČA, S. Combination of Hypotonic Lysis and Application of Detergent for Isolation of Polyhydroxyalkanoates from Extremophiles. *Polymers*, 2022, roč. 14, č. 9, s. 1–16. ISSN: 2073-4360.

Kapitola v knize:

OBRUČA, S.; SEDLÁČEK, P.; PERNICOVÁ, I.; KOVALČÍK, A.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; SLANINOVÁ, E.; MÁROVÁ, I. Interconnection between PHA and Stress Robustness of Bacteria. In *The Handbook of Polyhydroxyalkanoates*. 1. Boca Raton: CRC Press, 2020. s. 107-132. ISBN: 9780367275594.

Patenty:

OBRUČA, S.; PERNICOVÁ, I.; KUČERA, D.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; SEDLÁČEK, P.; Vysoké učení technické v Brně, Brno, CZ: *Způsob výroby polyhydroxyalkanoátů pomocí izolátu termofilního bakteriálního kmene Aneurinibacillus sp. H1*. 308626, patent. (2021)

Podaná patentová přihláška:

NOVÁČKOVÁ, I.; KOUŘILOVÁ, X.; OBRUČA, S.; *Způsob izolace PHA biopolymerů z halofilních a termofilních bakterií*. Patentová přihláška, číslo deníku 2022/747.

Konferenční příspěvky – přednášky:

NOVÁČKOVÁ, I.; KUČERA, D.; POŘÍZKA, J.; SEDLÁČEK, P.; PERNICOVÁ, I.; OBRUČA, S. *Evolutionary engineering approach for enhancement of growth characteristics and producing capacity of selected PHA producing microorganisms*. Studentská odborná konference Chemie je život 2019 - Sborník abstraktů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019. s. 58-58. ISBN: 978-80-214-5807-9.

Konferenční příspěvky – postery:

NOVÁČKOVÁ, I.; KUČERA, D.; POŘÍZKA, J.; PERNICOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. *Adaptation of Cupriavidus necator H16 to levulinic acid for enhancement of 3-hydroxyvalerate content in copolymer P(3HB-co-3HV)*. XIX. setkání biochemiků a molekulárních biologů Wimmerová, Michaela, Holková, Jitka, eds. Brno: 2018. s. 76-76. ISBN: 978-80-210-9069-9.

NOVÁČKOVÁ, I.; KUČERA, D.; POŘÍZKA, J.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S.; PERNICOVÁ, I. *Adaptation of selected PHA producing bacteria to biotechnologically relevant stressors*. XXVIII: konference mladých mikrobiologů Tomáškovy dny 2019. Brno: Masarykova univerzita, 2019. s. 52-52. ISBN: 978-80-210-9296-9.

NOVÁČKOVÁ, I.; KUČERA, D.; OBRUČA, S.; SEDLÁČEK, P.; POŘÍZKA, J.; PERNICOVÁ, I. *Adaptation of PHA producing bacteria Cupriavidus necator H16 and Halomonas halophila to biotechnologically relevant stressors*. 10th European Symposium on Biopolymers - Program. 2019. s. 70-70.

NOVÁČKOVÁ, I.; KUČERA, D.; POŘÍZKA, J.; PERNICOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. *Application of evolutionary engineering for enhancement of robustness and producing capacity of selected microbial PHA producers*. The Biomania student scientific meeting and Eusynbios symposium 2019 - Book of Abstracts. 1. 2019. s. 120-120. ISBN: 978-80-210-9373-7.

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

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

NOVÁČKOVÁ, I.; KOUŘILOVÁ, X.; MRÁZOVÁ, K.; OBRUČA, S. *Environmentally-friendly Isolation of Polyhydroxyalkanoates from Extremophilic Bacteria*. The EuroBiotech Journal. 2021. s. 99-99. ISSN: 2564-615X.

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

NOVÁČKOVÁ, I.; HRABALOVÁ, V.; SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. *The role of polyhydroxyalkanoates in adaptation process of Cupriavidus necator under*

stress conditions. The Biomania Student Scientific Meeting 2022 - Book of Abstracts. 1. Brno: MUNI PRESS, 2022. s. 133-133. ISBN: 9788028000400.

NOVÁČKOVÁ, I.; HRABALOVÁ, V.; SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. *Involvement of polyhydroxyalkanoates in the adaptation process of bacterial strain Cupriavidus necator*. ICCT 2022 - Book of abstracts. 2022. s. 1 (1 s.). ISBN 978-80-88307-11-2.

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

NOVÁČKOVÁ, I.; KOUŘILOVÁ, X.; MRÁZOVÁ, K.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. *Ekologická izolace polyhydroxyalkanoátů z extrémofilních bakterií*. 29. kongres Československé společnosti mikrobiologické s mezinárodní účastí. Brno: Československá společnost mikrobiologická z.s., 2022. s. 17-17. ISBN: 978-80-88379-18-8.

Další konferenční příspěvky – směs obou forem prezentace:

KUČERA, D.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; PERNICOVÁ, I.; OBRUČA, S. *Adaptation of PHA Producing Bacteria to Levulinic Acid*. 6th International Conference on Chemical Technology. 2018. ISBN: 978-80-86238-83-8.

KUČERA, D.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; PERNICOVÁ, I.; OBRUČA, S. *Adaptation of PHA producing bacteria to levulinic acid*. In *Proceedings of the 6th International Conference on Chemical Technology. International Conference on Chemical Technology*. 1st edition. Prague: Czech Society of Industrial Chemistry, 2018. s. 74-77. ISBN: 978-80-86238-77-7. ISSN: 2336-8128.

KUČERA, D.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; PERNICOVÁ, I.; OBRUČA, S. *Evolutionary engineering of Cupriavidus necator for improved utilization levulinic acid*. Abstracts of the 18th European Congress on Biotechnology. New Biotechnology. 2018. s. 93-93. ISSN: 1871-6784.

PERNICOVÁ, I.; KOUŘILOVÁ, X.; KUČERA, D.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; OBRUČA, S. *Screening of biotechnological potential in extremophilic bacteria*. XIX. setkání biochemiků a molekulárních biologů Wimmerová, Michaela, Holková, Jitka, eds. Brno: 2018. s. 78-78. ISBN: 978-80-210-9069-9.

VANĚK, M.; TOMALA, L.; SZOTKOWSKI, M.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; OBRUČA, S. *On Mixing and Separation During Polyhydroxyalkanoates Extraction – Yield and Purity Optimization*. 7th Meeting on Chemistry and Life 2018. Book of abstracts. 2018. ISBN: 978-80-214-5488-0.

PERNICOVÁ, I.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; KOUŘILOVÁ, X.; KUČERA, D.; OBRUČA, S. *Isolation extremophilic bacteria producing polyhydroxyalkanoate from natural sample*. The

biomania student scientific meeting and eusynbios symposium 2019 Book of abstracts. Brno, Czech Republic: Masaryk University Press, 2019. s. 114-114. ISBN: 978-80-210-9373-7.

PERNICOVÁ, I.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; KOUŘILOVÁ, X.; OBRUČA, S. *Isolace extremofilních bakterií produkující polyhydroxyalkanoáty z přírodních vzorků. XXVIII. konference mladých mikrobiologů Tomáškovy dny 2019.* Brno: Masarykova universita, 2019. s. 24-24. ISBN: 978-80-210-9296-9.

PERNICOVÁ, I.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; KOUŘILOVÁ, X.; HERNÁNDEZ, N.; PRIETO, M.A.; OBRUČA, S. *Thermophilic bacteria isolated from compost as producers of polyhydroxyalkanoates.* 10th European Symposium on Biopolymers. Straubing, Germany: C.A.R.M.E.N.e.V., 2019. s. 72-72.

KOUŘILOVÁ, X.; PERNICOVÁ, I.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; OBRUČA, S. *Thermophilic Bacteria of the Genus Caldimonas as Polyhydroxyalkanoate Producers.* The Biomania Student Scientific Meeting & Eusynbios Symposium 2019 Book of Abstracts. Brno: Masaryk University Press, 2019. s. 112-112. ISBN: 978-80-210-9379-7.

PERNICOVÁ, I.; KUČERA, D.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; VODIČKA, J.; KOVALČÍK, A.; OBRUČA, S. *Extremophiles – Platform strains for sustainable production of polyhydroxyalkanoates.* In *Materials Science Forum.* Trans Tech Publications Ltd, 2019. s. 74-79. ISBN: 9783035714449.

POSPÍŠILOVÁ, A.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; PŘIKRYL, R. *Novel method for isolation of PHB from bacterial biomass.* Studentská odborná konference CHEMIE JE ŽIVOT 2020, Sborník abstraktů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, 2020. s. 120-121. ISBN: 978-80-214-5920-0.

PERNICOVÁ, I.; KOUŘILOVÁ, X.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. *Isolace termofilních bakterií schopných produkce polyhydroxyalkanoátů. XXIX. konference mladých mikrobiologů Tomáškovy dny 2020. 1.* Brno: Masarykova universita, 2020. s. 46-46. ISBN: 978-80-210-9611-0.

KOUŘILOVÁ, X.; PERNICOVÁ, I.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; OBRUČA, S. *Bakterie rodu Caldimonas jako termofilní producenti polyhydroxyalkanoátů. XXIX. konference mladých mikrobiologů Tomáškovy dny 2020. 1.* Brno: Masarykova univerzita, 2020. s. 44-44. ISBN: 978-80-210-9611-0.

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

CHATRNÁ, V.; KOUŘILOVÁ, X.; PERNICOVÁ, I.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; POŘÍZKA, J.; OBRUČA, S. *Využití lignocelulózových materiálů k produkci polyhydroxyalkanoátů. XXX.*

konference mladých mikrobiologů Tomáškovy dny 2021. 1. Brno: Masarykova univerzita, 2021. s. 41-41. ISBN: 978-80-210-9882-4.

MRÁZOVÁ, K.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; KOUŘILOVÁ, X.; OBRUČA, S.; KRZYŽÁNEK, V. *The first insight on changes in PHA granules after extraction from extremophilic microorganisms.* Microscopy 2021: Conference. 1. 2021. s. 81-81.

KOUŘILOVÁ, X.; VIDLÁKOVÁ, M.; PERNICOVÁ, I.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; OBRUČA, S. *Polyhydroxyalkanoate's production by thermophilic genus *Caldimonas* and *Tepidimonas*.* Biotechnology and Biotechnological Equipment. 2021. ISSN: 1314-3530.

PERNICOVÁ, I.; KOUŘILOVÁ, X.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. *Production of P(3HB-co-4HB) copolymer by new thermophilic isolate *Aneurinibacillus* sp. H1 in batch, repeated-batch and fed-batch cultivation modes of cultivation.* Biotechnology and Biotechnological Equipment. 2021. s. 1 (1 s.). ISSN: 1314-3530.

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

SLANINOVÁ, E.; RUBANOVÁ, B.; ČERNAYOVÁ, D.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; HAVLÍKOVÁ, M.; MRÁZOVÁ, K.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. *Study of aeration and light/dark conditions on production of polyhydroxyalkanoates in bacteria *Rhodospirillum rubrum*.* ICCT 2022 - Book of abstracts. 2022. s. 1 (1 s.). ISBN 978-80-88307-11-2.

HRABALOVÁ, V.; KOUŘILOVÁ, X.; PERNICOVÁ, I.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; POŘÍZKA, J.; OBRUČA, S. *Valorizace odpadních produktů na bázi lignocelulózy.* ICCT 2022 - Book of abstracts. 2022. s. 1 (1 s.). ISBN 978-80-88307-11-2.

SLANINOVÁ, E.; RUBANOVÁ, B.; ČERNAYOVÁ, D.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; HAVLÍKOVÁ, M.; MRÁZOVÁ, K.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. *Study of aeration and light/dark conditions on production of polyhydroxyalkanoates in bacteria *Rhodospirillum rubrum*.* ICCT 2022 - Book of abstracts. 2022. s. 1 (1 s.). ISBN 978-80-88307-11-2.

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

PERNICOVÁ, I.; KOUŘILOVÁ, X.; ŘEHÁKOVÁ, V.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. *A new generation of biotechnological PHA production using thermophilic bacteria.* 13th International congress on extremophiles – Abstract Book. 2022. s. 173-173.