



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

**POLYHYDROXYALKANOÁTY JAKO METABOLITY
PROKARYOT ADAPTOVANÝCH NA EXTRÉMNÍ
PROSTŘEDÍ**

POLYHYDROXYALKANOATES AS METABOLITES OF PROKARYOTIC MICROORGANISMS ADAPTED TO
EXTREME CONDITIONS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Juraj Vodička

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1276/2017
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student: **Juraj Vodička**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název bakalářské práce:

Polyhydroxyalkanoáty jako metabolity prokaryot adaptovaných na extrémní prostředí

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Charakterizace vybraného PHA produkující extremofilní bakterie
3. Ověření biotechnologické využitelnosti producenta PHA

Termín odevzdání bakalářské práce: 21.5.2018

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

Juraj Vodička
student(ka)

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

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cílem této práce je studium polyhydroxyalkanoátů jako zásobních bakteriálních zdrojů uhlíku a energie produkovaných intracelulárně. Teoretická část práce je zaměřena na vlastnosti PHA, jejich biotechnologickou produkci a degradaci. Experimentální část bakalářské práce se zabývá produkcí polyhydroxyalkanoátů pomocí halofilní bakterie *Halomonas organivorans* využitím různých uhlíkatých substrátů. V úvodu byl úspěšně amplifikován a detekován gen *phaC* kódující PHA-syntázu. Potvrzena byla také extracelulární lipolytická aktivita zkoumaného kmene. Nejvhodnějšími substráty pro růst a produkci PHB byly shledány sacharidy, konkrétně nejlepší výsledky prokázala galaktóza a manóza. Z toho důvodu je velice vhodné využití kávové sedliny pro biotechnologickou produkci PHB, jako odpadu bohatého na galaktomanany. Na druhé straně byl zaznamenán velmi omezený nebo žádný růst na laktóze a xylóze, a z toho důvodu jsou odpadní syrovátka a lignocelulóznové materiály bohaté na pentózy nevhodnými substráty pro požadovaný účel. Naopak se objevuje potenciální využití odpadní melasy kvůli dobrým výsledkům kultivace na sacharóze. Pomalý růst a snížená produkce byly zjištěny při kultivaci bakterií na kuchyňském odpadu a odpadním glycerolu. Koncentrace soli vhodná pro růst *H. organivorans* a produkci PHB byla optimalizovaná na hodnotu 60 g/l. Přídavek vybraných prekurzorů 3-hydroxyvalerátu po 24 hodinách kultivace nepomohl k tvorbě kopolymeru P(3HB-co-3HV). Sice tento přídavek zpomalil růst, ale zvýšil procentuální tvorbu PHB v buňkách. Obecně byly výtěžky biotechnologické produkce PHB vysoké, téměř ve všech úspěšných případech byl procentuální obsah PHB v buňkách větší než 50 %. S ohledem na výsledky lze konstatovat, že k úplnému zhodnocení *H. organivorans* jako potenciálního biotechnologického producenta jsou žádoucí další experimenty.

KLÍČOVÁ SLOVA

Polyhydroxyalkanoáty, *Halomonas organivorans*, produkce polyhydroxyalkanoátů, využití odpadních materiálů, fyzikální vlastnosti PHA

ABSTRACT

The objective of this work is a study of polyhydroxyalkanoates as bacterial carbon and energy storage forms, which are produced intracellularly. The theoretical part of the study is focused on physical properties of PHA, their biotechnological production and degradation. The experimental part deals with production of polyhydroxyalkanoates by halophile bacterium *Halomonas organivorans* using several different carbon substrates. Firstly, the gene encoding for PHA-synthase, *phaC*, was successfully amplified and detected. Extracellular lipolytic activity was also proved. Secondly, the most appropriate substrate for bacterial growth and PHA production were found to be hydrocarbons, especially galactose and mannose. Due to these results, it is highly desirable to use coffee grounds for the biotechnological production of PHB, as galactomannan-rich waste. On the other hand, lactose and xylose have shown to be unsuitable carbon sources. For that reason, waste whey and lignocellulosic materials rich for pentoses are inconvenient substrates for the intended purpose. There is a potential use of waste molasses because of good results of sucrose at contrast. By the cultivation on kitchen waste and waste glycerol were the growth slow and the production of PHA reduced significantly. The optimal salt concentration for bacterial growth and PHA production were discovered as 60 grams per litre. Addition of several precursors of 3-hydroxyvalerate after 24 hours of cultivation have not induced the copolymer P(3HB-co-3HV) formation. Even though these precursors have inhibited the bacterial growth, the significant increase of the PHB percent content was observed. In general, the yield of the production has been considerable, it should be noted than almost in each successful cultivation the PHA content in bacterial cells exceeded 50 weight %. With a respect to results, more experiments for full evaluation of *H. organivorans* as a potential biotechnological PHA producing bacteria are regarded.

KEY WORDS

Polyhydroxyalkanoates, physical properties of PHA, production of polyhydroxyalkanoates, *Halomonas organivorans*, use of waste materials

VODIČKA, J. *Polyhydroxyalkanoáty jako metabolity prokaryot adaptovaných na extrémní prostředí*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 49 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Touto formou bych rád poděkoval vedoucímu mojí práce doc. Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D. za velkou inspiraci ve studiu, výborné téma bakalářské práce a za vedení této práce. Dále velmi děkuji Ing. Ivě Pernicové a Ing. Danovi Kučerovi za ochotu a odbornou pomoc při práci nejen v laboratoři, ale také při zpracování výsledků a psaní práce. Děkuji také svým spolužákům za pomoc a hezké chvíle nejen v laboratoři. Velký vděk patří i mojí rodině za podporu při celém studiu a především přítelkyni za pomoc s celým studiem. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat ochotným vyučujícím, kteří mě studiem doprovázeli a poskytli mi cenné vědomosti, které jsou k nezaplacení.

OBSAH

1	Úvod.....	9
2	Současný stav řešené problematiky	10
2.1	Struktura a klasifikace PHA	10
2.2	Vlastnosti polyhydroxyalkanoátů	11
2.2.1	Chemické vlastnosti esterů karboxylových kyselin.....	11
2.2.2	Fyzikální vlastnosti	11
2.2.2.1	Krystalická morfologie	11
2.2.2.2	Vlastnosti SCL PHA.....	11
2.2.2.3	Vlastnosti MCL PHA.....	12
2.2.3	Termická stabilita PHA	13
2.3	Biosyntéza polyhydroxyalkanoátů	14
2.3.1	Molekulární biologie syntézy PHA	14
2.3.2	Formování polymeru v prokaryotické buňce.....	15
2.4	Funkce polyhydroxyalkanoátů v buňkách.....	16
2.4.1	PHA jako zásobní forma uhlíku a energie	16
2.4.2	Protektivní vlastnosti PHA	17
2.5	Ekologie.....	17
2.5.1	Stereoselektivita a substrátová specifita depolymeráz.....	17
2.5.2	Intracelulární depolymerázy	18
2.5.2.1	Depolymerázy PhaZa.....	18
2.5.2.2	Depolymerázy PhaZb	18
2.5.2.3	Depolymerázy PhaZc.....	18
2.5.2.4	Depolymerázy PhaZd	19
2.5.3	Extracelulární depolymerázy	19

2.6	Přehled současné literatury	19
2.6.1	PHA v medicínských aplikacích.....	19
2.6.2	Technologie balení potravin	20
3	Experimentální část.....	21
3.1	Použité mikroorganismy, chemikálie a přístroje	21
3.1.1	Použité mikroorganismy.....	21
3.1.2	Chemikálie	21
3.1.3	Chemikálie použité pro kultivaci	22
3.1.4	Chemikálie pro PCR	22
3.1.5	Přístrojové vybavení	23
3.2	Kultivace mikroorganismů	23
3.3	Postup práce.....	25
3.3.1	PCR.....	25
3.3.2	Gelová elektroforéza	26
3.3.3	Sekvenování genu <i>phaC</i>	26
3.3.4	Důkaz extracelulární lipolytické aktivity.....	27
3.3.5	Optimalizace zdroje uhlíku s ohledem na růst bakterií a produkci PHA..	27
3.3.6	Optimalizace osmotické síly produkčního média	27
3.3.7	Kultivace bakterií a produkce PHA po přidavku prekurzorů 3HV	28
3.3.8	Analýza suché biomasy využitím plynové chromatografie	28
3.3.9	Spektrofotometrické měření zákalu	28
4	Výsledky měření a diskuze	29
4.1	PCR, gelová elektroforéza a sekvenace genu <i>phaC</i>	29
4.2	Důkaz extracelulární lipolytické aktivity	30
4.3	Analýza připravených vzorků.....	30

4.3.1	Optimalizace zdroje uhlíku s ohledem na růst bakterií a produkci PHA..	30
4.3.1.1	První blok – srovnání glukózy a kuchyňského odpadu	30
4.3.1.2	Druhý blok – kultivace a produkce PHA na sacharidech	32
4.3.1.3	Třetí blok – srovnání vybraných sacharidů s odpadními produkty ...	34
4.3.2	Optimalizace osmotické síly produkčního média	36
4.3.3	Kultivace bakterií a produkce PHA po přidavku prekurzorů 3HV	38
5	závěr	40
6	Seznam použitých zkratk	42
7	Seznam použité literatury	44
8	Přílohy	49

1 ÚVOD

Plasty jsou dnes neoddělitelnou součástí života lidí na celé planetě. Šikovným a kompatibilním polymerům se podařilo nahradit spektra materiálů užívaných v široké škále oborů. Daň, kterou si však tyto materiály vybírají na životném prostředí, je relevantní a v současnosti hodně diskutovaná téma. V současné době je proto výzkumným zájmem substituce polymerů fosilního původu za neomezeně dostupné a především ekologicky přívětivější formy plastů. Jedním z předních adeptů pro tuto roli jsou polyhydroxyalkanoáty [1].

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) nepředstavují v chemii žádnou exotiku. Tyto polymery jsou předmětem studie z různých aspektů mnoho let. Jako neznámé a obdobné lipidům inkluze působily v povědomí vědců začátkem dvacátého století. V tomto závoji byly pozorovány v buňkách *Azotobacteria chroococcum*. O první konkrétní zmínky se postaral francouzský mikrobiolog Maurice Lemoigne ve dvacátých letech, který objevil polyester kyseliny 3-hydroxybutanové produkovaný ve formě intracelulárních granul gram-pozitivní bakterie *Bacillus megaterium*. Důležitým objevem padesátých let pro studium polyhydroxyalkanoátů byla příčina jejich kumulace v buňkách. Zjistilo se, že tvoří zásobní formu energie pro bakteriální buňky stejně jako polysacharidy pro rostliny a živočichy. Tento poznatek byl hodně důležitým milníkem pro studii PHA, protože bylo zřejmé, že tyto polymery jsou biologicky odbouratelné. V tom čase byl uvažován pouze zmíněný polyhydroxybutyrát. Až v roce 1974 vědci Wallen a Rohwedder identifikovali další monomerní jednotky extrahované chloroformem ze splaškového kalu, a to kyselinu valerovou a hexanovou. Přibližně deset let poté se podařilo definovat 11 monomerních komponent PHA analýzou mořské sedimenty pomocí kapilární plynové chromatografie. Biotechnologicky zajímavý experiment provedl Witholt a jeho kolektiv v roce 1983, kdy kultivoval rod *Pseudomonas oleovorans* na médiu obsahující oktan jako zdroj uhlíku. Výsledek byl ohromující – bakterie dokázali syntetizovat polyhydroxyoktanoáty s malým množstvím monomerních jednotek šesti-uhlíkatých. A tak se spustila prakticky nekonečná série experimentů dokazující a inovující tyto biotechnologie [1, 2].

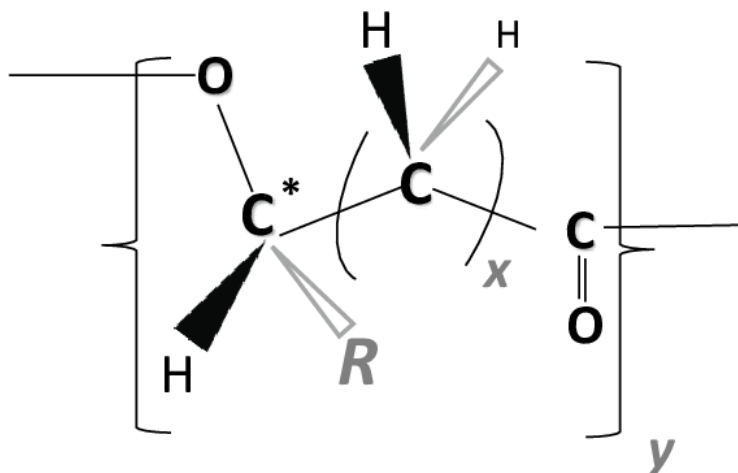
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Struktura a klasifikace PHA

Jak již bylo zmíněno, polyhydroxyalkanoáty jsou polyestery obsahující různé hydroxylované kyseliny jako monomerní jednotky. Kyseliny využitě pro stavbu PHA biologickými systémy jsou většinou hydroxylované na třetím uhlíku. Ve struktuře monomeru se vyskytuje chirální uhlík v R-konfiguraci, a to z důvodu stereospecifity enzymů zodpovědných za syntézu polymeru. Obecná struktura polymeru je uvedena na Obrázku 1. Průměrný počet monomerních jednotek v polymeru je 1000 – 30 000 jednotek, je možné však nalézt i větší polymery. Molekulová hmotnost PHA produkovaných mikroorganismy se pohybuje v rozmezí $2 \cdot 10^5$ až $3 \cdot 10^6$ Da [3].

Polyhydroxyalkanoáty se klasifikují dle počtu uhlíků v molekule monomeru:

- SCL PHA (short-chain-length) – PHA s krátkými řetězci monomerů
- MCL PHA (medium-chain-length) – PHA se středně dlouhými monomerními řetězci



Obrázek 1 – obecná struktura polyhydroxyalkanoátů [4]

Polymery s krátkými monomerními řetězci obsahují monomery o délce 3 až 5 uhlíků. Nejrozšířenějším polymerem v této kategorii produkovaným biosynteticky je polyhydroxybutyrát (PHB), jehož monomerem je kyselina 3-hydroxybutanová. Již oligomery 3-hydroxybutyrátu plní v přírodních systémech důležité role – příkladem jsou iontové kanály tvořeny kalcium-polyfosfátovým komplexem v biologických membránách. Řetězce obsahující do 200 monomerních jednotek lze nalézt téměř ve všech druzích organismů – od mikrobů až po lidské buňky. Polyhydroxybutyrát produkují různé bakteriální buňky využitím široké škály substrátů. Lze využít odpadní materiály obsahující mastné kyseliny – odpadní oleje a podobně. PHA se středně dlouhými řetězci monomerů se skládají z monomerních jednotek delších než 5 uhlíků, obecně v rozmezí 6-14 uhlíkových atomů [3].

V biosyntetických dějích vesměs nejsou produkovány PHA s monomery delšími než 14 uhlíků, proto nebyly klasifikovány. Řetězec může být homopolymerní nebo heteropolymerní v závislosti na substrátu, který mikroorganismus využívá jako zdroj uhlíku [5].

2.2 Vlastnosti polyhydroxyalkanoátů

2.2.1 Chemické vlastnosti esterů karboxylových kyselin

Polyestery vznikají polykondenzačním mechanismem, při kterém dochází k odštěpení malých molekul (obvykle se jedná o vodu). Důležitým požadavkem je tzv. bifunkčnost monomerů, což znamená, že monomery musí obsahovat minimálně dvě funkční skupiny. Hydroxylované karboxylové kyseliny vyhovují těmto požadavkům. Dalším příkladem polykondenzace je vznik amidů z aminokyselin, v živých systémech k tomu dochází při tvorbě peptidové vazby [6].

Esterifikace je reakce hydroxylové skupiny s karboxylovou skupinou, přičemž dochází k odštěpení jedné molekuly vody. Jedná se o nukleofilní reakci probíhající adičně-eliminačním mechanismem. Nukleofilní částice se aduje na uhlík karboxylové skupiny, k tomu dochází v důsledku odhalení uhlíkového jádra elektronegativnějšími kyslíky. Dochází tak k posunu π -elektronů vazby uhlík-kyslík. Dalším přesunem elektronů se karboxylová vazba obnovuje a uvolňuje se nejsnáze odstupující skupina, tedy hydroxyl. Nejčastější je Fischerova esterifikace, která je katalyzovaná minerální nebo Lewisovou kyselinou [7, 8].

Estery karboxylových kyselin jsou náchylné na hydrolýzu jak bazickou, tak kyselou. Bazická katalýza je obecně známa jako zmýdelňování. Přídavkem nižšího alkoholu k esteru v kyselém prostředí je možné původní alkohol vyměnit za nižší, tato reakce se nazývá transesterifikace a využívá se při analýze PHA získaných z biomasy [7].

2.2.2 Fyzikální vlastnosti

Z téměř všech dostupných studií plyne, že vlastnosti polyhydroxyalkanoátů závisí především na jejich složení, tedy monomerech, a také na molekulové hmotnosti polymeru.

2.2.2.1 Krystalická morfologie

Podstatná část polyhydroxyalkanoátů získaných z bakteriálních buněk může dosahovat vysoké stupně krystality, která tvoří řadu jejích mechanických vlastností. Obecně platí, že SCL PHA jsou krystalické, pevné v tahu, ale křehké. Naproti tomu MCL PHA jsou více flexibilní a elastické a ale mají nižší teploty tání [9 – 11].

2.2.2.2 Vlastnosti SCL PHA

PHA s menšími monomery jsou po extrakci z buněk obecně značně krystalické. Relativní krystalita SCL PHA se pohybuje v rozmezí 55-80 %. Nejrozšířenější homopolymer,

poly(3-hydroxybutyrát) je svými mechanickými vlastnostmi podobný polypropylenu, avšak relativní prodloužení polypropylenu je výrazně větší. Teplota skelného přechodu P3HB je přibližně 5 °C. Výhodou P3HB je jeho odolnost proti vlhkosti, optická čistota a dobré jsou také jeho piezoelektrické vlastnosti. Naopak, obrovské nevýhody tohoto polymeru spočívají především v jeho nízké termické stabilitě – teplota rozkladu je přibližně 200 °C, tedy velmi blízká bodu tání. Další velkou nevýhodou je křehnutí při skladování za běžných okolních podmínek. Na základě těchto vlastností jsou na P3HB kladeny vysoké požadavky modifikace, která by zvýhodnila jeho materiálové využití. Modifikace spočívá v inkorporaci komonomerů tak, aby byla zachována biodegradabilita a biokompatibilita polymeru. Vybrané mechanické vlastnosti P3HB a několika různých heteropolymerů jsou uvedeny v Tabulce 1. Pro srovnání jsou v tabulce uvedeny i vlastnosti polypropylenu [12].

Tabulka 1 – fyzikální a mechanické vlastnosti zvolených PHA a polypropylenu (PP), kde T_i je teplota tání; E je Youngův modul pružnosti; TS je pevnost v tahu; ε je relativní prodloužení a IS je vrubová (rázová) houževnatost. V tabulce lze pozorovat modifikace P3HB pomocí 3-hydroxyvalerátu (3HV) a 4-hydroxybutyrátu (4HB). S rostoucím obsahem 3HV se zvyšuje vrubová houževnatost, což lze obecně chápat jako snížení křehkosti polymeru. Zvyšováním obsahu 4HB roste zase relativní prodloužení, které je uvedeno v procentech natažení polymeru až do jeho přetržení. Srovnáním těchto modifikací s danými vlastnostmi polypropylenu lze pozorovat řádové překonání tohoto komerčního polymeru. Modifikace P3HB však přináší i negativní dopad na další vlastnosti, jako je teplota tání, v některých případech i pružnost (Youngův modul) či pevnost v tahu. To výrazně předurčuje modifikace pro speciální aplikace [12].

Polymer	T_i [°C]	E [GPa]	TS [MPa]	ε [%]	IS [J·m⁻¹]
P(3HB)	179	3,5	40	5	50
P(3HB-co-3 mol% 3HV)	170	2,9	38	-	60
P(3HB-co-9 mol% 3HV)	162	1,9	37	-	95
P(3HB-co-25 mol% 3HV)	137	0,7	30	-	400
P(3HB-co-3 mol% 4HB)	166	-	28	45	-
P(3HB-co-10 mol% 4HB)	159	-	24	242	-
P(3HB-co-90 mol% 4HB)	50	100	65	1080	-
P(4HB)	53	149	104	1000	-
PP	170	1,7	34,5	400	45

2.2.2.3 Vlastnosti MCL PHA

Obecné vlastnosti MCL PHA plynou z jejich nízké krystality. V porovnání s SCL PHA se tyto polyestery vyznačují vysokou flexibilitou a elasticitou (velké hodnoty prodloužení),

a tedy nízkou pevností v tahu, a také nízkým bodem skelného přechodu. Nejznámější monomery komponující MCL PHA jsou 3-hydroxyhexanoát (3HH) a 3-hydroxyoktanoát (3HO). Polyestery těchto kyselin obvykle tvoří směsi s SCL PHA o různých složeních, které jsou předmětem výzkumu. Čím větší je zastoupení MCL v směsném polymeru, tím vyšší je krystalizační teplota polymeru, teplota skelného přechodu se však snižuje. Tyto a další termální vlastnosti a některé mechanické vlastnosti jsou uvedeny v Tabulce 2 [13].

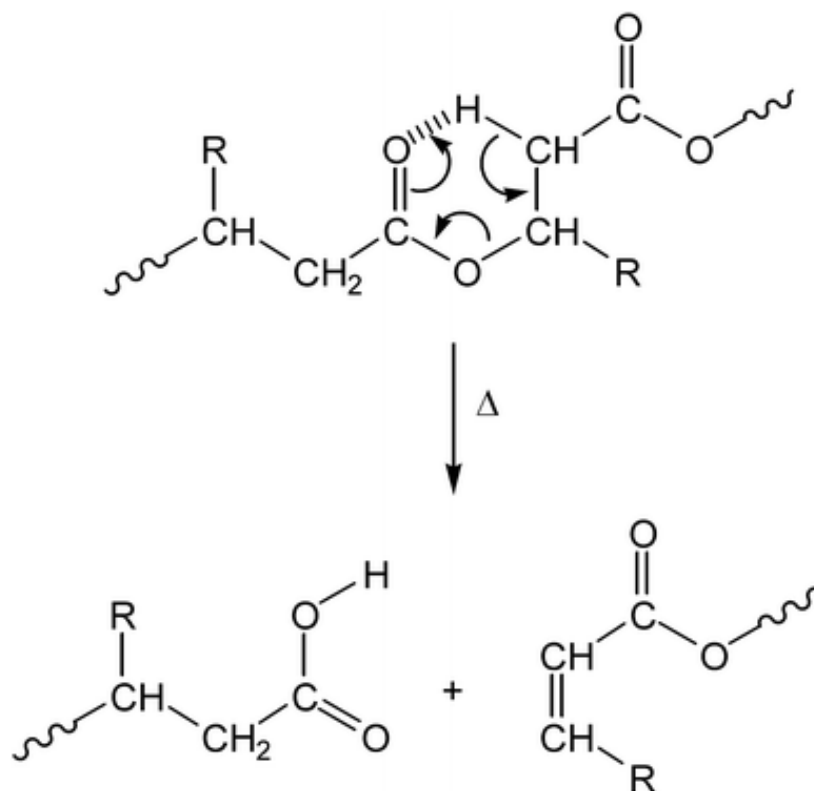
Tabulka 2 – vybrané vlastnosti heteropolymerů MCL PHA s PHB, kde T_g je teplota skelného přechodu; T_c je teplota krystalizace; T_t je teplota tání; E je Youngův modul pružnosti; TS je pevnost v tahu a ϵ je relativní prodloužení. V porovnání s SCL PHA jsou tyto polymery relevantně méně pružné a pevné v tahu, avšak s rostoucím množstvím MCL monomerů se výrazně zvyšuje relativní prodloužení [14].

Polymer	T_g [°C]	T_c [°C]	T_t [°C]	E [GPa]	TS [MPa]	ϵ [%]
P(3HB-co-6,4 mol% 3HO)	-1,42	65,1	158	0,170	10,5	53
P(3HB-co-14,7 mol% 3HO)	-2,23	77,6	156	0,032	3,2	110
P(3HB-co-31,3 mol% 3HO)	-6,24	-	-	0,012	1,7	230

2.2.3 Termická stabilita PHA

Dalším obecným pravidlem je relativně nízká termická stabilita. Působením teplot blízkých teplotám jejich tání se rozkládají a to vede k samovolnému rozpadu esterové vazby za vzniku alkenových kyselin – karboxylových kyselin s jednou dvojnou vazbou. Tato poměrně nevýhodná vlastnost významně omezuje komerční využití přírodních polyesterů. Schéma tepelné degradace je uvedena na Obrázku 2 [9].

Modifikací PHB monomery jiných hydroxykyselin se tepelná stabilita polymeru významně nemění. Toho lze dosáhnout modifikací polymerními aditivami, například karboxylovaným butadien-akrylonitrilem nebo biokompatibilním polyvinylpyrrolidonem. Přídavek malých množství zmíněných komponent lze dosáhnout výrazné zlepšení tepelné stability polymeru, zrychlení krystalizace a obecně změnu kinetiky degradace. To však může mít nepříznivý vliv na biodegradabilitu [15].



Obrázek 2 – tepelná degradace polyhydroxyalkanoátů [9]

2.3 Biosyntéza polyhydroxyalkanoátů

2.3.1 Molekulární biologie syntézy PHA

Za syntézu a metabolismus polyhydroxyalkanoátů ve většině bakteriálních producentů PHA jsou zodpovědné tři geny tvořící operon *phaCAB*. Tento operon přítomen v bakteriálním genomu kóduje tři enzymy katalyzující syntézu PHA – gen *phaC* kóduje PHA-syntázu, *phaA* kóduje β -ketothiolázu a gen *phaB* kóduje acetoacetyl-CoA reduktázu, který je NADP-dependentní. Dalšími geny pro enzymy podílejícími se na metabolismu PHA jsou třeba *phaG* (3-hydroxyacyl-acylový nosič protein-CoA transferáza) nebo *phaJ* (enoyl-CoA hydratáza) a podobně. Geny kódující PHA depolymerázy jsou označovány *phaZ*, *phaY*, *phaX* atd [5].

Substrátová specifita PHA syntáz spočívá v jejich primární struktuře – sekvenci aminokyselin. S ohledem na tuto strukturu a specifitu je možné PHA syntázy dělit do čtyř kategorií, a to na PHA syntázy typu I až IV. Syntázy typu I k syntéze PHA přednostně využívají thioestery koenzymu A s 3HA_{SCL} zatímco enzymy typu II pro syntézu spotřebovávají thioestery tvořené 3HA_{MCL} a koenzymem A. Oba typy syntáz se však skládají z podobného typu podjednotky (PhaC) s molekulovou hmotností 61 až 68 kDa. Substrátová specifita třetího typu syntáz (typ III) je zaměřena na 3HA_{SCL} . Tyto enzymy jsou však dimerní, tedy se skládají ze dvou rozdílných podjednotek: PhaC a PhaE, obě s molekulovou hmotností okolo 40 kDa. Podjednotka PhaC vykazuje 21 až 28 % podobnost v aminokyselinové sekvenci s typem I a II,

kdežto PhaE je odlišná od ostatních podjednotek. Syntázy posledního typu se skládají ze dvou podjednotek, a to PhaC a PhaR s molekulovou hmotností asi 20 kDa. Tyto syntázy obecně preferují tvorbu SCL PHA z monomerů 3HB a 3HV [5, 16].

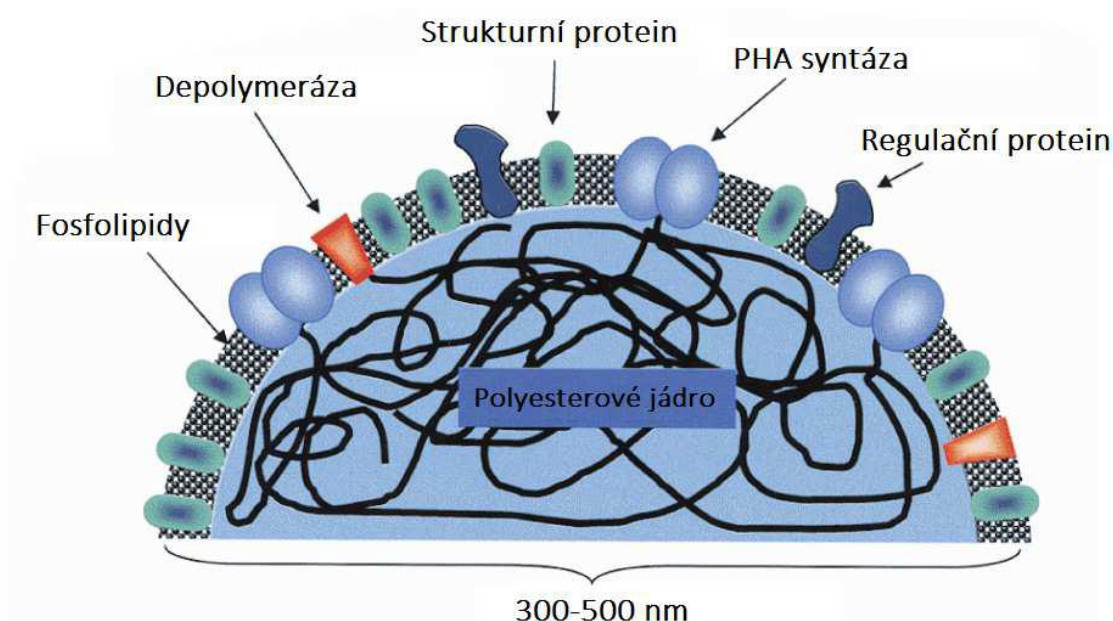
2.3.2 Formování polymeru v prokaryotické buňce

Polyhydroxyalkanoáty se v buňkách akumulují ve formě granul, tzv. karbozomů. Tyto granule mohou nabírat relativně velkých rozměrů, může se jich v buňkách vyskytovat víc a běžně tvoří 70-80 % hmotnosti suchých buněk. Pro identifikaci obalu granul byly použity různé techniky, které prokázali, že obal je fosfolipidového charakteru se značným obsahem proteinů. Později bylo zjištěno, že obal je konzistentnější a částečně je tvořen povlakem bílkovinného charakteru. Proteiny v granulovém obalu lze rozdělit do čtyř kategorií:

1. PHA syntázy (např. PhaA/B/C)
2. PHA depolymerázy (PhaX, PhaY apod.)
3. Regulační proteiny (PhaR)
4. PhaP (z angličtiny phasiny)

Nejhojnější skupinou proteinů zabudovaných v obalu granul jsou phasiny, přičemž tvoří 14 až 54% jejich povrchu. Funkce phasinů spočívá v kontrole množství, velikosti a počtech granul, a také v prevenci před krystalizací PHA. Můžou dokonce působit jako inhibitory syntáz za podmínek nevhodných pro akumulaci polyesterů. PhaP mají amfifilní charakter s hydrofobní částí směřující ke granulaci a hydrofilní doménou směřující do cytoplazmy. Tvoří se pouze při akumulaci PHA, nejsou však pro tento děj nezbytné [17 – 19].

Pro popsání tvorby granul obsahujících především PHB byly vytvořeny tři modely. První model se nazývá micelární model a spočívá v tvorbě micel souběžně s růstem polymerního řetězce. Protože je PHB hydrofobní a málo rozpustný ve vodním prostředí, dochází ke kovalentnímu navázání částečně hydrofilního dimeru PhaC na rostoucí polymerní řetězec PHB. Následně se přidávají také phasiny. Důsledkem těchto kroků se může iniciace tvorby polymeru uskutečnit prakticky kdekoli v cytoplazmě, a tak mohou být granule lokalizovány náhodně po celé buňce. Druhým modelem je tzv. pučící model. V tomto případě se syntázy soustředí na vnitřní straně cytoplazmatické membrány a hydrofobní polymer se syntetizuje uvnitř fosfolipidové dvojvrstvy. Zde se nacházejí nepolární konce dvojvrstvy, takže nedochází k odpuzování polymeru od prostředí. Syntéza karbozomu probíhá směrem do vnitřního prostoru buňky a pro syntézu fosfolipidové obalové vrstvy je využito části cytoplazmatické membrány. Granule pučí do cytosolu ze středu membrány do určité velikosti PHB uvnitř, pak se odděluje a následně se připojují PhaP. Třetí model navrhuje přítomnost molekulárního lešení uvnitř buňky, na které se připojují syntázy a tvoří polymer. V tomto případě je lokalizace karbozomu v buňce závislá na vlastnostech a umístění lešení. Z experimentů provedených na bakterii *R. eutropha* plyne, že aktuálně nejvýstižněji popisuje mechanismus tvorby granul třetí uvedený model. Zjednodušené schéma granule je ilustrováno na Obrázku 3 [19, 20].



Obrázek 3 – Struktura PHA granule [21]

2.4 Funkce polyhydroxyalkanoátů v buňkách

Jak již bylo zmíněno, přírodní polyestery jsou v bakteriálních buňkách akumulovány z důvodu uskladňování energie. Dalším významem tvorby PHA je odpověď buněk na stres. Ten může být vyvolán například změnou teploty, změnou pH, osmotického tlaku, redoxního potenciálu, přítomností toxinů nebo inhibujících látek, případně radiací a podobně. Mechanismů pro odolání stresu je celá řada a jsou specifické pro různé stresové podmínky. Typickým příkladem je tepelná odezva – za zvýšené teploty, která vede k denaturaci enzymů, se zvyšuje aktivita chaperonů, proteinů zodpovědných za sbalování enzymů do jejich nativní konformace. Příkladem protektivních vlastností PHA je odpověď buňky na oxidativní stres způsobený sníženou teplotou [22, 23].

2.4.1 PHA jako zásobní forma uhlíku a energie

Tvorba PHA v buňce je podmíněna přebytkem dostupného zdroje uhlíku a zároveň nedostatkem jiného prvku esenciálního pro růst mikroorganismu jako je například dusík, fosfor, síra nebo mikroelementy (železo, draslík a podobně). Podstatná součást mechanismu je enzymatická regulace syntézy. Během vyváženého růstu je acetyl-CoA oxidován v citrátovém cyklu na oxid uhličitý, přičemž se redukuje koenzym NAD na NADH a je regenerován v dýchacím řetězci za současného zisku energie. Limitací růstu nedostatkem biogenního prvku dochází ke zvýšené generaci NADH, čímž jsou enzymy TCA cyklu (citrát-syntáza a isocitrát-dehydrogenáza) inhibovány. Acetyl-CoA získaný oxidací uhlíkatého zdroje tak vstupuje do PHB-syntetické dráhy, nikoliv do TCA cyklu. Vzniklý PHB představuje zásobu uhlíku a energie a za nepříznivých podmínek může být degradován intracelulárními depolymerázami [3].

2.4.2 Protektivní vlastnosti PHA

Ayub a kolektiv studoval protektivní vlastnosti polyhydroxyalkanoátů na antarktickém bakteriálním kmenu *Pseudomonas* sp. 14-3 a na jeho mutantu působením mrazu. Mutantní buňky nebyly schopné genové exprese PHB syntázy a ukázalo se, že ztratili schopnost růstu při teplotě 10 °C. Náchylnost mutantů k chladu byla pozorovatelně větší než náchylnost nezmutovaných buněk. Přídavkem cysteinu a glutationu byl vliv oxidativního stresu na mutantní buňky zmírněn. Vliv oxidace byl kvantifikován poklesem poměru množství redukováného koenzymu NADH k jeho oxidované formě NAD po zchlazení mutantní i přirozené formy mikroorganismu. V případě přirozené podoby kultury byl pokles NADH/NAD patrný, ale mírný, na rozdíl od mutantní formy, u které byl pokles mnohem významnější. Experimenty, které provedli Sardesai a Babu na kmenu *Rhizobium* DDSS69, upravili tuto teorii. Bylo zjištěno, že snížením teploty byla syntéza PHB inhibovaná, takže pokles hladiny PHB při působení oxidativního stresu nesouvisí se stresovou odezvou. Další studie provedl Zhao s kolektiv a ukázalo se, že bakterie produkující PHA jsou vůči řadě stresových podmínek odolnější než jejich mutanti neschopní produkce polymeru [23 – 25].

2.5 Ekologie

Biologická odbouratelnost přírodních polyesterů závisí na dostupnosti mikroorganismů schopných dekompozice PHA v přirozeném prostředí. Řada mikroorganismů žijících v půdě je schopna produkovat extracelulární depolymerázy, které štěpí PHA na soli organických kyselin. Ty jsou pak transportovány do buněk a vstupují do základních metabolických drah buněk [26].

Přestože jsou všechny polyestery štěpeny mikroorganismy pomocí depolymeráz, vyžaduje extracelulární štěpení úplně jinou sadu štěpících enzymů, než je použito pro štěpení intracelulární. Izolací PHA depolymeráz z celé řady bakterií a analýzou strukturních genů kódujících extracelulární depolymerázy se ukázalo, že většina těchto enzymů se skládá ze tří základních strukturních domén – katalytická doména, označovací a doména vázající substrát. Poslední ze jmenovaných musí být správně sorbována na hydrofobní polymer, tudíž musí také vykazovat hydrofobní vlastnosti. Tyto vlastnosti jsou u enzymů zajímavé, jelikož zprostředkovávají reakce ve vodním prostředí. To vede k schopnosti těchto depolymeráz rozkládat i jiné polyestery. Za účelem energetického zisku tak lze rozložit stejnou sadou enzymů tyto polyestery: P3HB, P4HB, poly(3-hydroxypropionát), poly(ethylensukcinát) a poly(ethylenadipát); tedy jak polyestery hydroxylovaných kyselin, tak polyestery dikarboxylových kyselin a diolů. Depolymerázy jsou i tak relativně úzce stereospecifické, protože výše uvedené polyestery jsou si strukturně velmi podobné [27].

2.5.1 Stereoselektivita a substrátová specifita depolymeráz

Charakter substrátu významně ovlivňuje průběh enzymatické dekompozice. Exemplárním případem pro popis tohoto děje byl zvolen P3HB. Zkrácení polymerního řetězce na oligomerní fragmenty může značně urychlit rozklad polymeru. Studií Bachmanna a Seebacha (viz [28, 29]) bylo zjištěno, že rychlost dekompozice tetrameru je však výrazně

vyšší než rychlost rozkladu trimeru. To bylo vysvětleno tak, že aktivní místo PHB depolymerázy se skládá ze čtyř vazebných podjednotek. Štěpení tetrameru pravděpodobně může probíhat ve více místech tohoto oligomeru, naproti tomu trimer nedokáže aktivní místo plně obsadit, proto musí být štěpen postupně [28, 29].

Rychlost enzymatické dekompozice P3HB je ovlivněna taky konfigurací. Biosyntetický polyhydroxybutyrát a jeho kratší oligomerní formy jsou lehce štěpitelné extracelulárními depolymerázami produkovanými a vylučovanými mikroorganismy. Důvodem je stereospecifita těchto enzymů na R-konfiguraci P3HB. Syntetický P3HB však může obsahovat i monomery v S-konfiguraci. Takto připravené polyestery představují problém biologické degradace. Dalším předpokladem úspěšného rozkladu oligomeru je tedy jeho složení z monomerů výhradně v R-konfiguraci. Oligomery mohou být štěpeny pouze v místě, kde sousedí dva monomery požadované konfigurace. V případě trimeru je zde požadavek jasně určen. Převaha R-konfigurace je pro úspěšnou degradaci nezbytná [28, 29].

2.5.2 Intracelulární depolymerázy

Během studie degradační aktivity bakterie *C. necator* bylo nalezeno množství depolymeráz rozkládajících různé formy biopolymeru. Analýzou sekvencí genomu této bakterie bylo nalezeno celkem devět PHB depolymeráz, které byly známé: PhaZa (PhaZa1 až PhaZa5), PhaZb, PhaZc a dva typy PhaZd (PhaZd1 resp. 2) [30].

2.5.2.1 Depolymerázy PhaZa

Schopnost depolymeráz typu PhaZa spočívá v degradaci amorfních granul, přičemž se uvolňují především oligomery 3HB, ale také monomerní jednotky. Degradace krystalické podoby PHB však enzym nedokáže. Gen pro PhaZa je tvořen celkem 1260 bp, které kódují celkem 419 aminokyselin. Zajímavé je, že sekvence aminokyselin celkem postrádá klasický lipázový box Gly-X-Ser-X-Gly. Doména zodpovědná za vazbu k polymeru nebyla identifikována [31].

2.5.2.2 Depolymerázy PhaZb

Tento typ depolymerázy vykazuje obdobnou rychlost degradace PHB jako PhaZa. Ani PhaZb nedokáže štěpit krystalický polymer. Odlišnost těchto depolymeráz ukázal experiment, který provedl Kobayashi a kolektiv (viz [32]), dokázal, že depolymeráza PhaZb štěpí také cyklický polymer a je tedy endo-lytická. Na základě další studie, kterou provedl York a kolektiv (viz [33]), bylo zjištěno, že PhaZb je tvořena pouze při degradaci PHB na rozdíl od PhaZa, která je v buňce přítomna neustále. Vyskytuje se jak v cytoplasmě, tak v karbozomech [32, 33].

2.5.2.3 Depolymerázy PhaZc

PhaZc rozkládá různé oligomery s vysokou specifitou, s nižší specifitou také amorfní PHB. Nedokáže však degradovat krystalický PHB ani přirozené granule. Tyto enzymy se vyskytují především v cytosolu, malé množství bylo pozorováno také v inkluzích [34].

2.5.2.4 Depolymerázy PhaZd

Katalytická doména této depolymerázy je velmi podobná extracelulární PHB depolymeráze produkované rodem *R. pickettii*, avšak chybí zde rozeznávací a vazebné domény. Aktivita PhaZd při rozkladu amorfních PHB granul je výrazně vyšší než aktivity depolymeráz PhaZa, PhaZb a PhaZc. Množství PhaZd je přibližně stejné v inkluzích a cytoplazmě [35].

2.5.3 Extracelulární depolymerázy

Utilizace polymerního substrátu je v přírodě umožněna produkcí extracelulárních enzymů štěpících bio-makromolekuly na oligomerní, případně monomerní jednotky. Tento mechanismus je využíván i pro štěpení polyhydroxyalkanoátů. Extracelulární PHA depolymerázy (e-PHA depolymerázy) degradují hydrofobní PHA na oligomery (resp. monomery) ve vodě rozpustné. K uvolnění přírodních polymerů do prostředí dochází po smrti a lyzi buněk schopných tvorby tohoto polymeru. Degradace mimobuněčného polymeru je závislá kromě vlastností prostředí také na charakteru polymeru – e-PHA depolymerázy se vyznačují vysokou substrátovou specifitou vůči amorfním PHA, krystalickým PHA, částečně krystalickým PHA (dPHA) nebo umělým PHA (aPHA). Dále jsou tyto enzymy schopné rozeznat délku monomeru, a tím se specifikují na PHA_{SCL} depolymerázy a PHA_{MCL} depolymerázy [36, 37].

2.6 Přehled současné literatury v oblasti aplikace PHA

Problematika biopolymerů je v současné době značným trendem. Jako důkaz lze uvést snad pouze několik studií poslední dekády zabývajících se polyhydroxyalkanoáty, jejich aplikacemi v různých směrech a výrobky z těchto polymerů bakteriálního původu.

2.6.1 PHA v medicínských aplikacích

V oblasti medicíny je v posledních letech hodně diskutovaná cílená distribuce léčiv. Polymery zde plní svou roli již od začátku – příkladem jsou filmem obalené tablety. V roce 2010 sestavil Chan Zhang a spol. (viz [38]) nový systém cílení léčiv skládající se z kopolymeru P(HB-co-HO) jakožto nosiče, kyseliny listové jako zaměřovacího ligandu a doxorubicínu jako modelového léku proti rakovině. Systém byl testován na rakovinných buňkách HeLa. Aplikací nanočástic *in vitro* byla pozorována značná cytotoxicita v důsledku velké afinity kyseliny listové a příslušného receptoru. Nanočástice byly také aplikovány na myši s nádorovými buňkami *in vivo* a výsledkem byla výrazná inhibice růstu tumoru [38].

Aktuálně zkoumanými nanočásticemi jsou vlákna připravena roubováním P3HB na kyselinu hyaluronovou (viz [39]). Vysoce hydrofobní P3HB je hlavním důvodem posílení a zlepšení vlastností nanovláken. Jejich nízká cytotoxicita představuje značný potenciál pro medicínské aplikace. Navíc se jedná o vlákna čistě bakteriálního původu, což představuje vyhlídky i pro biotechnologie [39].

Progres v následujících letech by mohl být zaznamenán také v oblasti běžných léčiv, na které je řada lidí dennodenně odkázána. Chaturvedi a spol. (viz [40]) zkoumal nanočástice tvořené kopolymerem P3HB s polyethylenglykolem a obsahem kyseliny deoxycholové. Tyto částice tvořili kapsule obalující inzulín. Kolektiv autorů tak objevil možnost orálního podávání inzulínu, jakožto peptidu dříve dávovaného doposud injekčně. Orální dávání by významně zjednodušilo distribuci léčiva, které by tak překonalo agresivní prostředí žaludku bez výraznější degradace (denaturace) [40].

2.6.2 Technologie balení potravin

V potravinářských technologiích je obzvláště důležité zamezit růstu kontaminující mikroflóry. Jelikož jsou PHA biopolymery, jejich aplikace v těchto sférách je zatím podmíněna modifikací vláken jinými prvky nebo látkami, anebo je jejich využití limitováno. Posílení antimikrobiálních vlastností P(3HB-co-3HV) částicemi ZnO zkoumali v roce 2014 Ana M. Díez-Pascual a Angel L. Díez-Vicente (viz [41]). Výsledkem bylo zvýšení antimikrobiální aktivity a také zlepšení některých fyzikálních vlastností polymeru. Autoři studie popsali objevenou technologii jako velice vhodnou pro široké spektrum využití v potravinářství a obalových technologiích [41].

Další vhodné využití PHA zkoumala Castro-Mayorga a spol. v roce 2017 (viz [42]). Předmětem jejich výzkumu byly nanokompozity PHA obsahující stříbro. Tyto částice byly připraveny kultivací bakterie *Cupriavidus necator* na médiu s obsahem stříbrných solí. Zajímavých bylo hned několik výsledků. K produkci částic polymeru se stříbrem nebylo potřeba přidat redukční činidlo do kultivačního média. Navíc připravené částice nevykazovali změnu termálních vlastností ve srovnání s polymerem samotným, byl pozorován pouze menší pokles krystalinity P3HB. Připravené nanočástice vykazovali velkou antimikrobiální aktivitu vůči potravinářským patogenům *Salmonella enterica* a *Listeria monocytogenes*. V neposlední řadě bylo také zjištěno, že nebyla snížena biodegradabilita polymeru [42].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité mikroorganismy, chemikálie a přístroje

3.1.1 Použité mikroorganismy

Pro charakterizaci PHA produkujícího extremofilního mikroorganismu byl vybrán bakteriální kmen *Halomonas organivorans* CCM 7142, který byl zakoupen v České sbírce mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

3.1.2 Chemikálie

- NaCl (Lachner)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (Lachner)
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (Lachner)
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Lachner)
- KCl (Lachner)
- NaHCO_3 (Lachner)
- NaBr (Lachner)
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Lachner)
- KH_2PO_4 (Lachner)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (Lachner)
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (Lachner)
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (Lachner)
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (Lachner)
- $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (Lachner)
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (Lachner)
- MgCl_2 (Lachner)
- HCl (Sigma-Aldrich)
- NaOH (Lachner)
- Glukóza monohydrát (Lachner)
- Fruktóza (Lachner)
- Sacharóza (Sigma-Aldrich)
- Xylóza (Sigma-Aldrich)
- Galaktóza (Sigma-Aldrich)
- Manóza (Sigma-Aldrich)
- Laktóza dihydrát (Lachner)
- Arabinóza (Sigma-Aldrich)
- Nafta
- Kuchyňský odpad
- Odpadní glycerol
- Propionát sodný (Sigma-Aldrich)
- Kyselina valerová (Sigma-Aldrich)

- Kyselina levulová (Sigma-Aldrich)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma-Aldrich)
- H₃BO₃ (Lachner)
- EDTA (Sigma-Aldrich)
- Bromfenolová modř (HiMedia)
- Glycerol (Lachner)
- Chloroform (Lachner)
- Kyselina benzoová (Lachner)
- Methanol (Lachner)

3.1.3 Chemikálie použité pro kultivaci

- Nutrient Broth (HiMedia)
- Peptone (HiMedia)
- Yeast Extract (HiMedia)
- Casein Hydrolyzate (HiMedia)
- Agar Powder (HiMedia)
- Spirit Blue Agar (HiMedia)

3.1.4 Chemikálie pro PCR

Jako lyzační pufr byl použitý Tris-HCl pufr (5 mM, pH 8,5) o následujícím složení:

- | | |
|----------------------------------|------------------|
| • Tris(hydroxymethyl)aminomethan | 0,605 g |
| • HCl | úprava pH na 8,5 |
| • Destilovaná voda | 1000 ml |

Komponenty pro multiplex PCR (jeden vzorek):

- | | |
|--|----------|
| • Master mix One <i>Taq</i> Hot Start DNA polymerázy | 12,5 µl |
| • MgCl ₂ | 2,6 µl |
| • Primery (16S rRNA – 16S-F, 16S-R; phaC – G-D, G1R) | 4 x 1 µl |
| • Vzorek DNA | 2 µl |
| • PCR voda | 3,9 µl |

Desetkrát koncentrovaný TBE pufr:

- | | |
|----------------------------------|---------|
| • Tris(hydroxymethyl)aminomethan | 108 g |
| • H ₃ BO ₃ | 55 g |
| • EDTA | 9,3 g |
| • Destilovaná voda | 1000 ml |

Komponenty pro přípravu agarózového gelu použitého při elektroforéze:

- | | |
|---------------------------------------|-----------|
| • Agaróza | 2 g |
| • Jedenkrát koncentrovaný TBE pufr | 100 ml |
| • Midori Green Advanced (DNA barvivo) | 6 μ l |

Komponenty pro přípravu nanášecího pufru:

- | | |
|---------------------|------------|
| • Bromfenolová modř | 20 μ g |
| • Glycerol | 3 ml |
| • Destilovaná voda | 7 ml |

3.1.5 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy (Boeco)
- Laminární box Aura mini (Bio Air Instruments)
- Temperovaná třepačka, Heidolph Unimax 1010 (Labicom s.r.o.)
- Centrifuga U-32R (Boeco)
- Centrifuga Sigma (Sartorius)
- Vortex TK3S (techno Kartell)
- Spektrofotometr Helios δ (Unicam)
- Termostat (LS-35)
- Termo-cycler MyCyclerTM (BIO-RAD)
- Zdroj napětí MP 300 V (Major science)
- UV-transluminátor (Major Science)
- Plynový chromatograf GC-FID, Series II 5890 (Hewlett Packard)
Kolona: 30 m by 0,25 mm (DB-WAX)
- Běžné laboratorní pomůcky a sklo

3.2 Kultivace mikroorganismů

Kultury byly zakoupeny v lyofilizovaném stavu, jejich oživení bylo provedeno na pevném médiu B 82 při optimální teplotě 37 °C. Kultury byly uchovány pro kultivaci při teplotě 5 – 8 °C na agarových plotnách a také ve formě kryozkumavek v 10 % glycerolu. Přeočkování kultur na nové pevné médium proběhlo pouze jedenkrát.

K pokusům byly kultury nejdříve očkovány do dvou inokul o objemu 50 ml a kultivovány při optimální teplotě po dobu přibližně 24 hodin. Následně byly kultury přesazeny do minerálních médií s různými zdroji uhlíku. Inokulační poměr byl vždy 10 %. Zpravidla byla koncentrace uhlíkatého zdroje v minerálním médiu 20 g/l, výjimkou byla pouze nafta, které obsah v médiu byl pouze 10 g/l.

Pro oživení a uchování kultury bylo použito médium B 82 o následujícím složení:

• Kvasničný extrakt	10 g
• Pepton	5 g
• Glukóza	1 g
• NaCl	81 g
• $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	9,6 g
• $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	7 g
• $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,36 g
• KCl	2 g
• NaHCO_3	0,06 g
• NaBr	0,026 g
• Agar	20 g
• Destilovaná voda	1000 ml

Jako inokulum bylo připraveno následující živné médium:

• Pepton	15 g
• Kvasniční extrakt	3 g
• NaCl	80 g
• Glukóza	1 g
• Destilovaná voda	1000 ml

Pro kultivaci a produkci PHA bylo použito následující minerální médium:

• $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3 g
• KH_2PO_4	1,02 g
• $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	11,1 g
• $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g
• NaCl	80 g
• Glukóza	20 g
• Roztok stopových prvků (MES)	1 ml
• Destilovaná voda	1000 ml

Složení roztoku stopových prvků použitého v minerálním médiu:

• $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	9,7 g
• $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	7,8 g
• $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,156 g
• $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,119 g
• $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,118 g
• $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,1 g
• 0,1 M HCl	1000 ml

K ověření exocelulární lipolytické aktivity byl využit Spirit Blue Agar připraven rozpuštěním práškového agaru o následujícím složení:

- Kaseinový hydrolyzát 10 g
- Kvasniční extrakt 5 g
- Spirit Blue 0,15 g
- Agar 17 g
- Destilovaná voda 1000 ml

3.3 Postup práce

Schopnost tvorby PHA byla ověřena pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a k detekci PCR produktů sloužila agarózová elektroforéza. Dále byla také ověřena produkce extracelulárních lipáz. Následně byly provedeny kultivace na různých uhlíkatých substrátech za účelem určení toho nejvhodnějšího pro biotechnologickou produkci polymeru. Pro optimalizaci podmínek produkce byly také provedeny kultivace na médiích s různou osmotickou silou. Z každé kultivace byly odebrány vzorky biomasy a také byl změřen zákal média pomocí spektrofotometru. Pro analýzu obsahu polyhydroxyalkanoátů v biomase byla použita plynová chromatografie. Přesné postupy konkrétních experimentů jsou rozebrány níže.

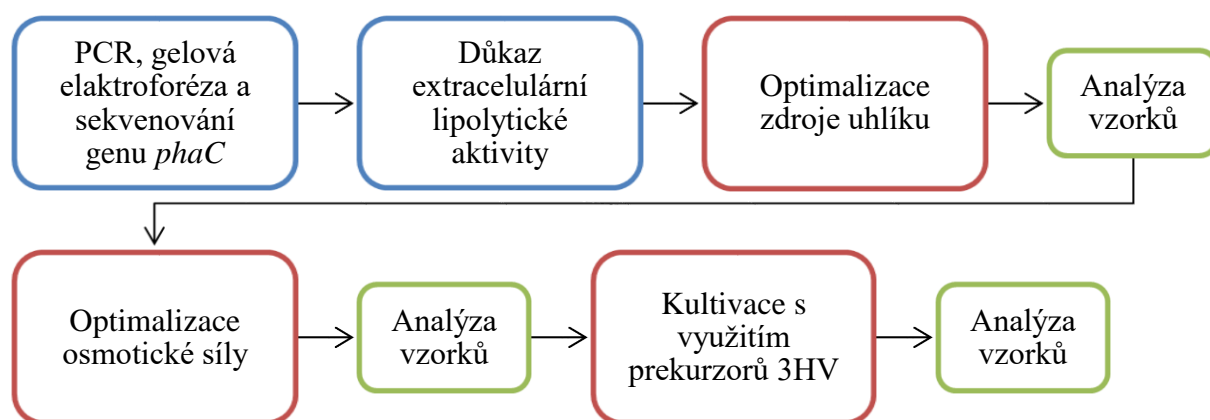


Schéma 1 – experimentální postup práce (červený rám zahrnuje kultivační experimenty). Analýza vzorků byla provedena spektrofotometrickým měřením zákalu, vážením biomasy a analýzou na plynovém chromatografu

3.3.1 PCR

Pro získání bakteriální DNA bylo využito tepelné lyze buněk. Z narostlé kultury na plotně bylo odebráno plné očko buněk a převedeno do zkumavky typu Ependorf se 100 μ l pufru tris-HCl o koncentraci 5 mM a pH 8,5. Zkumavka byla následně zahřívána na 90 $^{\circ}$ C, přičemž došlo k tepelné lyzi buněk. Hrubý lyzát byl odstředěn při 10 000 otáčkách za minutu

po dobu 10 minut. Z čirého roztoku (supernatantu) byl odebrán objem 60 μ l do druhé zkumavky, která byla připravena pro PCR. Čistota vzorku DNA byla ověřena spektrofotometricky poměrem A_{260} k A_{280} proti pufru.

Bakteriální DNA z lyzátu byla amplifikována metodou multiplex PCR za použití primeru pro gen *phaC* (G-D, G1R) a pro gen 16SrRNA (16S-F, 16S-R). Do čisté zkumavky Ependorf byly přidány komponenty pro PCR o konkrétních objemech uvedených výše. Paralelně se vzorkem byl stejným způsobem připraven vzorek DNA bakteriálního rodu *Cupriavidus necator H16* jako pozitivní kontrola a jako negativní kontrola byla místo DNA použita sterilní destilovaná voda. PCR bylo provedeno pomocí termocycleru značky BIO-RAD.

Tabulka 3 – program termocycleru

Číslo kroku	t [°C]	τ [s]	Počet cyklů
1	94	30	1
2	94	30	30
	55	30	
	68	90	
3	68	300	1
	30	60	
	4	60	

3.3.2 Gelová elektroforéza

Gel pro elektroforézu byl připraven smícháním přibližně 2 g agarózy a 100 ml 1 x koncentrovaného TBE pufru. Následně byl roztok šestkrát povařen v mikrovlnné troubě tak, aby nedošlo k vypěnění kapaliny z baňky, ale aby došlo k její úplnému rozvaření. Po ochlazení bylo přidáno 6 μ l DNA barviva Midori Green. Roztok gelu byl nalit do formy s hřebínkem a ponechán ke ztuhnutí. Po odebrání hřebínku vznikly malé otvory, do kterých byl nanesen vzorek smíchaný s nanášecím pufrem v poměru 1:1. Elektroforéza byla prováděna po dobu přibližně 45 minut při napětí 90 mV mezi elektrodami.

3.3.3 Sekvenování genu *phaC*

Bakteriální DNA z lyzátu byla amplifikována metodou PCR za použití primeru *phaC* gen (G-D,G1R), amplikon byl následně přečištěn pomocí NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kitu a odeslán k sekvenaci.

3.3.4 Důkaz extracelulární lipolytické aktivity

Pro ověření lipolytické aktivity byla využita krátká kultivace bakterie na plotně obsahující Spirit Blue Agar. Barvivo Spirit Blue vytváří komplex s lipidy a po degradaci komplexu (lipidů) dochází k odbarvení agaru. Sledovaný jev byl tedy odbarvení části plotny.

3.3.5 Optimalizace zdroje uhlíku s ohledem na růst bakterií a produkci PHA

Bakteriální kultury byly po dobu 24 hodin kultivovány na inokulu s glukózou jako zdrojem uhlíku, následně byly kultury přesazeny na produkční (minerální) médium využitím různých uhlíkatých substrátů. Tento experiment byl proveden v několika blocích. V každém bloku bylo srovnáno několik substrátů, přičemž každý blok obsahoval experiment na médiu s glukózou jakožto referenční vzorek. První blok sloužil jako srovnání sacharidu a lipidu jako zdroje uhlíku, proto byly provedeny kultivace pouze na glukóze a kuchyňském odpadu bohatém na lipidy. Další blok byl zaměřen výhradně na sacharidy, a pro kultivaci byla použita glukóza, fruktóza, sacharóza, xylóza, galaktóza, manóza, laktóza a arabinóza. Do posledního experimentálního bloku byly pro porovnání s vybranými odpadními produkty zvoleny dva nejvhodnější sacharidy s ohledem na růst biomasy a produkci PHA, dále byla také použita nafta. Inokulační poměr byl 10 % a doba kultivace na produkčním médiu byla 72 hodin.

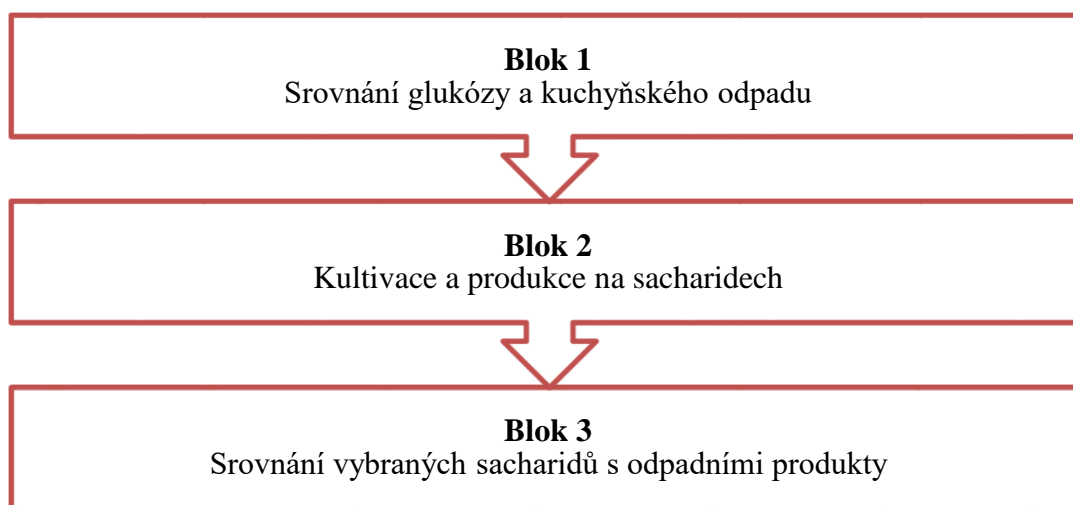


Schéma 2 – pracovní postup optimalizace zdroje uhlíku s ohledem na růst a produkci PHA

3.3.6 Optimalizace osmotické síly produkčního média

S ohledem na růst biomasy a produkci bakteriálních PHA byly uskutečněny kultivace na minerálních médiích s koncentracemi chloridu sodného 20, 40, 60, 80 a 100 g/l. Jako zdroj uhlíku v médiích byla pro jednoduché srovnání zvolena glukóza. Nejvhodnější koncentrace soli byla následně využita při následujícím experimentu.

3.3.7 Kultivace bakterií a produkce PHA po přidavku prekurzorů 3HV

Schopnost produkce kopolymeru P(3HB-co-3HV) byla zkoumaná přidavkem prekurzorů 3-hydroxyvalerátu po 24 hodinách kultivace na produkčních médiích s glukózou. Prekurzory byly přidány tak, aby jejich výsledná koncentrace byla 2 g/l. Do první baňky byl přidán propionát, do další valerát a do poslední byla přidána kyselina levulová. Čtvrtá baňka sloužila jako srovnávací vzorek.

3.3.8 Analýza suché biomasy využitím plynové chromatografie

Z kultury po 72 hodinách bylo odebráno 10 ml do centrifugační zkumavky. Vzorek byl odstředěn při 6 000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut, následně byl odlit roztok nad sedlinou a bylo přidáno 5 ml destilované vody. Kultura byla rozmyta využitím vortexu a znovu odstředěna za stejných podmínek. Po odlití supernatantu byla biomasa kvantitativně převedena do zkumavky Ependorf pomocí 1,5 ml destilované vody, odstředěna při 8 000 otáčkách za minutu po 5 minut a následně sušena v sušárně temperované na 60 °C do úplného vysušení. Suchá biomasa byla zvážena na analytických vahách a její část byla navážena pro transesterifikaci. K této části biomasy byl přidán 1 ml chloroformu a 0,8 ml esterifikační směsi (15 % kyselina sírová v methanolu s 5 mg/ml kyseliny benzoové jakožto interním standardem). Po zakrimpování vialky proběhla transesterifikace za teploty 94 °C po dobu 3 hodin. Následně byly vzorky extrahované 0,5 ml 0,05 M roztoku NaOH, 50 µl organické fáze bylo odebráno a dvacetkrát zředěno chloroformem ve šroubovací vialce. Takto připravený vzorek byl analyzován na plynovém chromatografu s plamenovou ionizační detekcí (GC-FID).

3.3.9 Spektrofotometrické měření zákalu

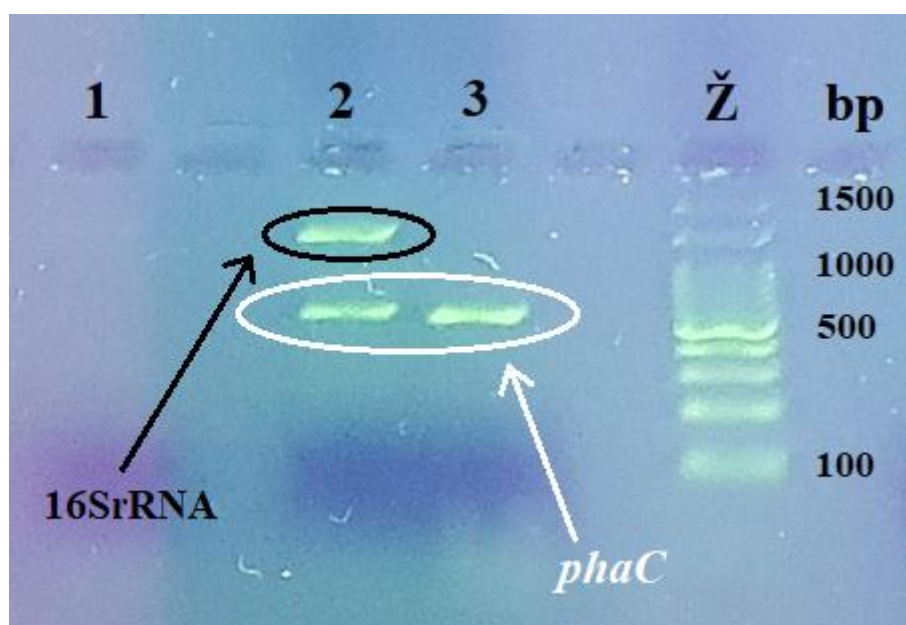
V kyvetě s délkou optické dráhy 1 cm byla měřena absorbance při vlnové délce 630 nm proti destilované vodě. Vzorek minerálního média s kulturou byl nejdříve vhodně naředěn tak, aby byla absorbance v intervalu $0,100 \leq A \leq 0,900$.

4 VÝSLEDKY MĚŘENÍ A DISKUZE

Na základě naměřených výsledků je možné posoudit, jak vhodný je rod *H. organivorans* k produkci bakteriálních polyesterů. Zkoumané bylo nejen množství PHB v litru substrátu použitého pro biotechnologickou produkci, ale také zastoupení komonomeru P3HV, který pozitivně ovlivňuje vlastnosti polymeru. Schopnosti produkce polyhydroxyalkanoátů jsou přirozeně závislé na schopnosti kultury růst v daném prostředí (a dalších aspektech), z toho důvodu byla experimentální část zaměřena na optimalizaci podmínek růstu i produkce.

4.1 PCR, gelová elektroforéza a sekvenace genu *phaC*

Cílem PCR a gelové elektroforézy bylo vyhledání genu *phaC*, jeho namnožení a detekce. Jelikož detekovaná látka byla DNA, byl stanoven poměr absorbancí A_{260}/A_{280} buněčného lyzátu. Na základě tohoto poměru bylo zjištěno, že DNA izolovaná z bakteriálních buněk byla čistá. Výsledná hodnota 1,877 se nacházela v intervalu $1,8 \leq A_{260}/A_{280} \leq 2$.



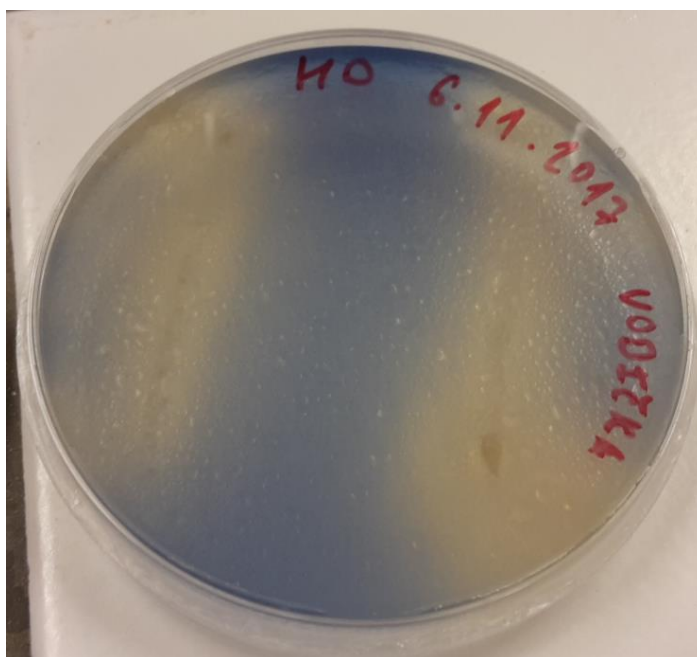
Obrázek 4 – výsledek gelové elektroforézy. 1 – negativní kontrola (bez DNA), 2 – pozitivní kontrola (DNA *C. necator* HI6), 3 – vzorek (DNA *H. organivorans*), Ž – DNA žebříček se stupnicí v párech bází (bp)

Z výsledků gelové elektroforézy na Obrázku 4 plyne, že kmen *H. organivorans* je vhodný pro studium metabolismu polyhydroxyalkanoátů, protože jeho genom obsahuje gen kódující PHA-syntázu (*phaC*). Gen 16SrRNA (asi 1500 bp) je amplifikován při multiplex PCR souběžně s genem *phaC* (přibližně 500 bp) a slouží k potvrzení bakteriální DNA. V případě vzorku však tento gen detekován nebyl. Při multiplex PCR často dochází k selektivní amplifikaci pouze kratšího z genů, což je v tomto případě gen *phaC* (viz běh 2). Nicméně *phaC* také potvrzuje bakteriální DNA, jelikož metabolismus polyhydroxyalkanoátů je spojován

především s bakteriemi. Výsledek sekvenování amplikonu odpovídajícího genu *phaC* je uveden v příloze.

4.2 Důkaz extracelulární lipolytické aktivity

V důsledku změny pH při degradaci lipidů se několik hodin po nasazení kultur na agar Spirit Blue změní zbarvení tohoto agaru, a to indikuje produkci extracelulárních lipáz. Kultivací kultury na agaru Spirit blue byla potvrzena schopnost tohoto kmene využít lipidy z prostředí. Výsledek tohoto experimentu je možné pozorovat na Obrázku 5.



Obrázek 5 – rod *H. organivorans* je schopen tvorby extracelulárních lipáz, důkazem je odbarvení agaru Spirit Blue

4.3 Analýza připravených vzorků

V této kapitole jsou zahrnuty výsledky analýzy suché biomasy využitím plynové chromatografie a spektrofotometrické měření zákalu. Výsledky jednotlivých experimentů lze mezi sebou srovnávat, protože všechny kultivace byly provedeny stejným postupem. Všechny hodnoty zákalu byly spočteny vynásobením průměrné hodnoty absorbance daného vzorku faktorem ředění.

4.3.1 Optimalizace zdroje uhlíku s ohledem na růst bakterií a produkci PHA

4.3.1.1 První blok – srovnání glukózy a kuchyňského odpadu

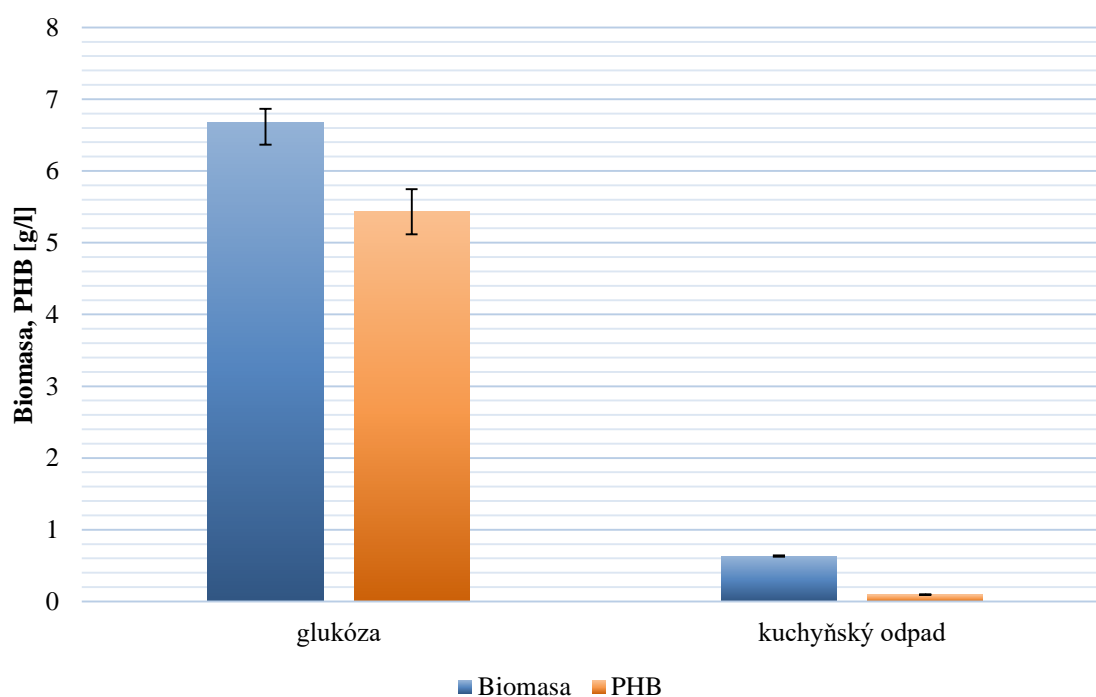
Charakter živin představuje v přírodě jeden z dominantních faktorů určujících mikrobiologické složení daného prostředí. Výsledky tohoto experimentu ilustrují odlišnost růstu *H. organivorans* na odpadním materiálu lipidického složení od běžné glukózy. Druhý

z uvedených sice není odpadní materiál, avšak glukóza je v přírodě rozšířeným a relativně snadno dostupným zdrojem uhlíku. Naproti tomu kuchyňský odpad představuje rozšířený produkt průmyslové a komerční výroby. Jeho cena a využitelnost jsou hodně nízké, a tedy vhodné pro studium možného biotechnologického využití.

Tabulka 4 – výsledky prvního experimentálního bloku – srovnání glukózy a kuchyňského odpadu s ohledem na růst kultur a produkci PHB

Substrát	OD ₆₃₀ [-]	Biomasa [g/l]	PHB [%]	PHB [g/l]
glukóza	32,57 ± 1,14	6,68 ± 0,18	81,27 ± 2,47	5,43 ± 0,31
kuchyňský odpad	25,43 ± 0,54	0,63 ± 0,01	15,09 ± 0,92	0,09 ± 0,00

Míra zakalení média prorostlého bakteriemi souvisí s koncentrací biomasy. V případě média s kuchyňským odpadem je hodnota OD₆₃₀ příliš vysoká vzhledem k tak malému množství biomasy (viz Tabulka 4). Substrát pravděpodobně přispívá k finálnímu zákalu, proto je spektrofotometrické měření zákalu pouze orientační metoda při analýze vzorků médií s bakteriemi.



Graf 1 – srovnání glukózy a kuchyňského odpadu jako substrátů pro růst kultur a tvorbu PHB

Výsledky první kultivace ukázaly, že glukóza je pro *H. organivorans* mnohem lepší zdroj energie a uhlíku než odpadní materiál lipidického charakteru. Důvodem tak malého růstu kultur na odpadu může být významný obsah inhibitorů růstu vznikajících při běžných kuchyňských operacích, jako například akrolein nebo akrylamid vzniklý při smažení. Značně závisí také na dostupnosti mastných kyselin, triacylglycerolů a jiných lipidů pro oxidaci.

Nepolární látky tvoří fázové rozhraní ve vodném prostředí. Vzniklé mezifázové napětí tvoří výraznou bariéru pro látkovou výměnu mezi fázemi. Všechny tyto aspekty se odvíjí od původu odpadního materiálu.

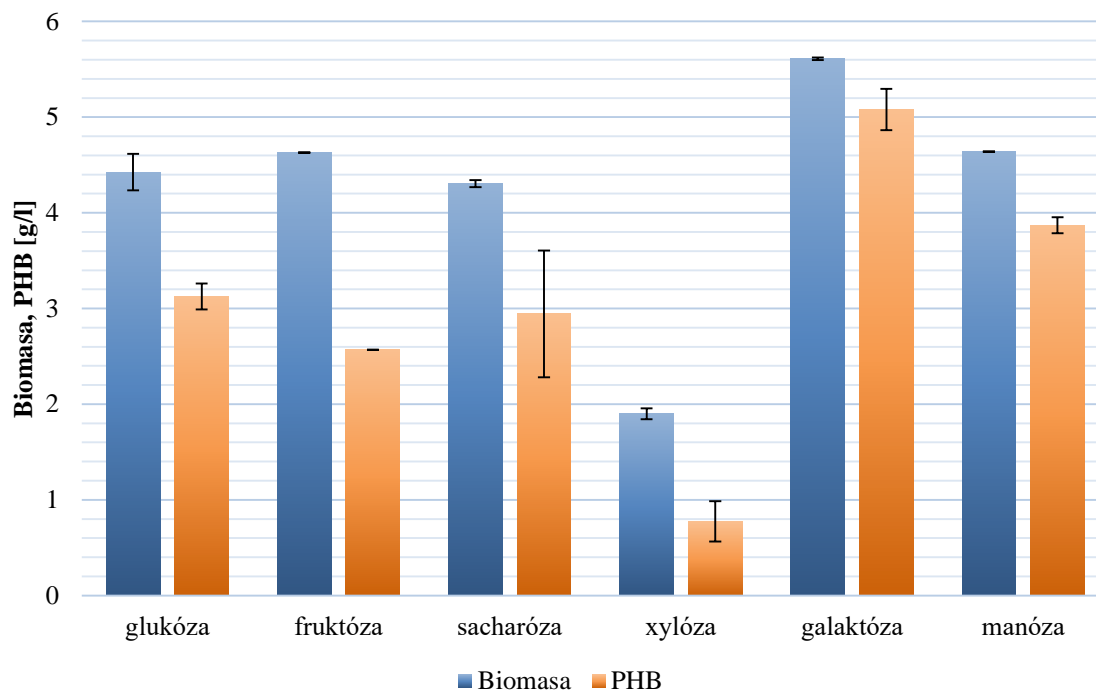
4.3.1.2 Druhý blok – kultivace a produkce PHA na sacharidech

Nejvýznamnějším zdrojem rychlé energie pro všechny živé organizmy v přírodě jsou bezpochyby sacharidy. Jelikož jejich katabolická dráha – glykolýza, je primární metabolickou dráhou, ze které lze bezprostředně získat energii ve formě ATP, je obtížné dosáhnout tak rychlého růstu mikroorganismů využitím jiného zdroje energie. Proto bylo několik vybraných cukrů běžně dostupných v přírodě zkoumáno s ohledem na výsledné množství biomasy. Tyto látky však představují také podstatně velký zdroj uhlíku pro výstavbu buněčných struktur. Z toho důvodu byl očekáván také vysoký obsah zásobního PHB. Výsledky tohoto experimentu by mohli pomoci při výběru vhodných odpadních materiálů bohatých na tyto cukry k produkci bakteriálních polymerů.

Tabulka 5 – výsledky druhého experimentálního bloku optimalizace zdroje uhlíku

Substrát	OD ₆₃₀ [-]	Biomasa [g/l]	PHB [%]	PHB [g/l]
glukóza	33,07 ± 0,29	4,43 ± 0,19	70,78 ± 6,13	3,13 ± 0,14
fruktóza	38,33 ± 0,35	4,63 ± 0,00	55,44 ± 0,00	2,57 ± 0,00
sacharóza	25,43 ± 0,25	4,31 ± 0,04	68,32 ± 14,83	2,94 ± 0,66
xylóza	9,18 ± 0,03	1,90 ± 0,06	40,62 ± 9,88	0,77 ± 0,21
galaktóza	33,17 ± 1,14	5,61 ± 0,01	90,55 ± 4,08	5,08 ± 0,22
manóza	27,60 ± 1,21	4,64 ± 0,00	83,41 ± 1,83	3,87 ± 0,08
laktóza	-	neroste	neprodukuje	neprodukuje
arabinóza	-	neroste	neprodukuje	neprodukuje

Stejně jako v předešlém bloku, absorbance jednotlivých substrátů (cukrů) při stejné vlnové délce se může lišit, proto tyto výsledky nemusí analogicky kopírovat výsledné koncentrace biomasy. Relativně vysokou absorbanci po kultivaci *H. organivorans* vykazovalo médium s fruktózou. Může to být důsledek metabolitů, které vznikly kultivací na tomto monosacharidu. Srovnání výsledků pro glukózu a galaktózu přibližně odpovídá dosavadním výsledkům.



Graf 2 – srovnání sacharidů jako substrátů k produkci bakteriálního PHB

Z hlediska obsahu biomasy a PHB přinesl druhý blok hned několik zajímavých výsledků, které je možné pozorovat v Grafu 2. V první řadě lze pozorovat mírně lepší růst kultury na fruktóze než na glukóze. Tento jev lze vysvětlit tak, že fruktóza vstupující do glykolýzy přeskakuje jeden krok této oxidační dráhy, a tak bude snadněji oxidována. Proto je možné, že fruktóza bude pro růst kultury lepším zdrojem uhlíku a energie než glukóza. Překvapivý výsledek je však obsah PHB v buňkách. Glukóza vykazuje mnohem lepší produkci polymeru. Příčinou můžou být regulační schopnosti glukózy. Tato molekula v přírodě nepředstavuje pouze zdroj energie, je schopna regulovat metabolismus na molekulární úrovni. Fruktóza nevykazuje tyto vlastnosti. Dalším cukrem vhodným k produkci PHB je manóza, na které dokázaly kultury vyprodukovat více polymeru, než na většině ostatních testovaných substrátů. Nejpriznivější výsledky vykazuje kultivace na galaktóze. Tato informace je velice zajímavá, protože řada hemicelulóz je bohatých na manózu a galaktózu. Například kávová sedlina obsahuje až 30 hmotnostních % galaktomananů (viz [43]). Podle našich výsledků se tedy *H. organivorans* zdá být velice perspektivním kmenem pro biotechnologickou konverzi kávové sedliny na polyhydroxyalkanoáty. Jako další velice vhodný substrát se pak jeví sacharóza, což naznačuje, že by *H. organivorans* mohl být využit k produkci PHA z odpadní melasy [43].

Absolutně nevhodnými substráty pro kultivaci *H. organivorans* jsou arabinóza a laktóza. Vzhledem k tomu, že se laktóza skládá z jednotky glukózy a galaktózy, byl s ohledem na výsledky těchto dvou monosacharidů očekáván podobný výsledek, jako v případě trojice sacharózy, glukózy a fruktózy (sacharóza mezivýsledkem fruktózy a glukózy). Použité kultury mají s největší pravděpodobností degenerovaný laktóзовý operon nebo jim zcela chybí, a tedy nejsou schopny rozštěpit laktózu. Neuspokojivé výsledky poskytuje také xylóza. Množství

biomasy i polymeru jsou relativně malé. Z těchto důvodů nejsou pro kultivaci *H. organivorans* a produkci bakteriálního PHB vhodné odpadní lignocelulózové materiály bohaté na pentózy, pektiny obsahující vysoký podíl arabinózy nebo také odpadní syrovátka.

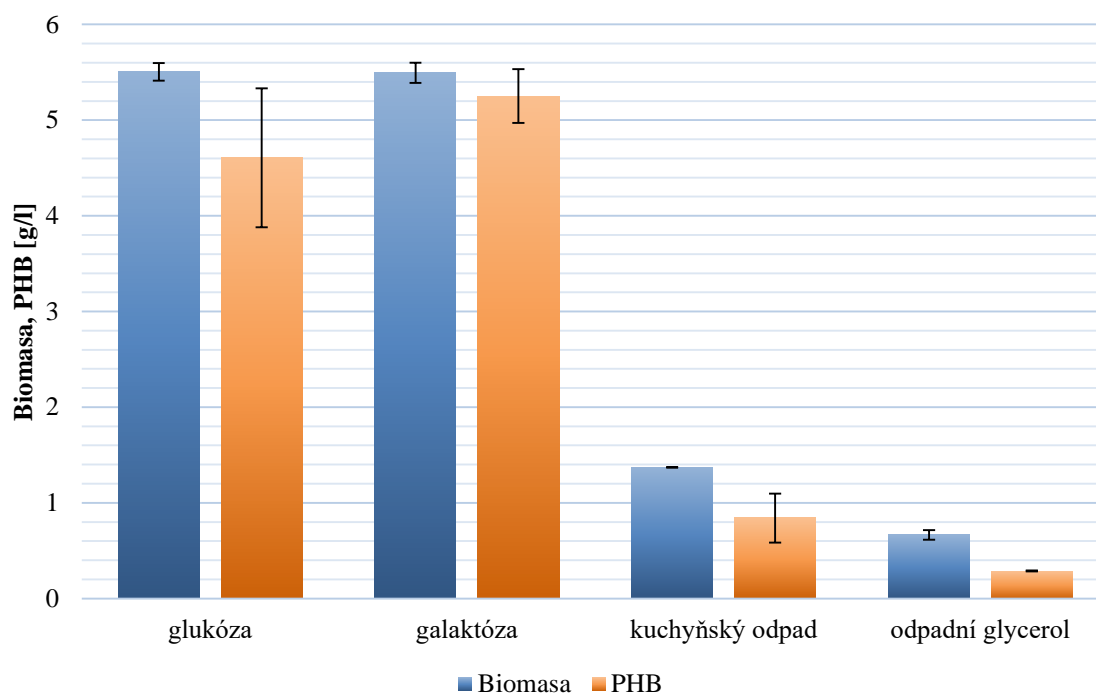
4.3.1.3 Třetí blok – srovnání vybraných sacharidů s odpadními produkty

Pro biotechnologické účely jsou vhodné odpadní produkty nejen potravinářského průmyslu, ale také jiných oblastí výrobních procesů. Exemplárním příkladem hojně rozšířeného odpadu z průmyslové výroby bionafty a méně také kosmetiky je glycerol, který byl součástí tohoto experimentu též.

Tabulka 6 – výsledky třetího bloku – srovnání odpadních materiálů a nafty s glukózou a galaktózou

Substrát	OD ₆₃₀ [-]	Biomasa [g/l]	PHB [%]	PHB [g/l]
glukóza	32,20 ± 2,13	5,51 ± 0,09	83,57 ± 11,78	4,61 ± 0,73
galaktóza	31,27 ± 1,03	5,50 ± 0,11	95,56 ± 3,27	5,25 ± 0,28
kuchyňský odpad	27,22 ± 1,58	1,37 ± 0,00	61,37 ± 18,66	0,84 ± 0,26
odpadní glycerol	3,59 ± 0,14	0,67 ± 0,05	43,36 ± 4,02	0,29 ± 0,01
nafta	-	neroste	neprodukuje	neprodukuje

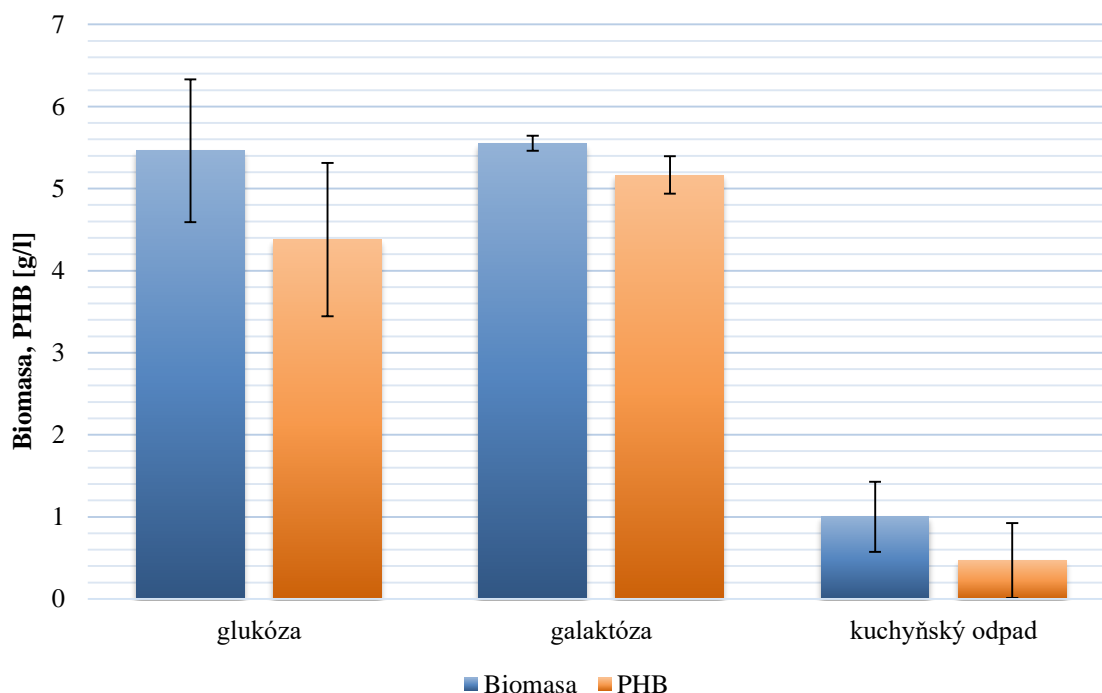
Rod *H. organivorans* tvořil při vyšších koncentracích biomasy značné množství biofilmu. Kultivací kultury na odpadním glycerolu však nevzniklo velké množství biomasy a množství biofilmu bylo téměř zanedbatelné. Tento aspekt mohl mít vliv na absorbanci.



Graf 3 – srovnání glukózy, galaktózy, kuchyňského odpadu a odpadního glycerolu s ohledem na růst kultury a biotechnologickou produkci PHB

Glycerol tvoří pro buňky agresivní prostředí. Odpadní glycerol je navíc znečištěn jinými organickými látkami, které mohou působit inhibičně vůči růstu buněk. Kuchyňský odpad je odpad potravinového původu, proto bude ve srovnání s odpadním glycerolem vhodnějším substrátem pro růst mikroorganismů, a tedy i vhodnějším substrátem pro tvorbu PHB. S ohledem na obsah PHB v gramech na litr jsou však tyto výsledky značně neuspokojivé. Nafta je bohatá na nepolární uhlovodíky a látky působící nepříznivě na buňky, výsledek kultivace bakterií na naftě proto není překvapující.

Výsledky kultivace třetího bloku dokazují, že jednoduché monosacharidy jsou vzhledem ke kultivaci a produkci PHB mnohem lepším substrátem než produkty různého chemického průmyslu. Zároveň je možné pozorovat vyšší množství vyprodukovaného PHB na stejné množství biomasy v případě glukózy a galaktózy. Metabolismus galaktózy bude zřejmě vyžadovat větší množství minerálních látek, což bude vést k rychlejší spotřebě těchto látek z média, a tím i k intenzivnější produkci pseudosekundárních metabolitů. Tento jev je možné pozorovat v Grafu 4, který zobrazuje průměrné koncentrace biomasy a PHB ze všech provedených kultivací.



Graf 4 – srovnání průměrných hodnot koncentrací biomasy, resp. PHB u vybraných substrátů

Galaktóza vykazuje nejen nejvyšší produkci PHB, ale také jsou její výsledky nejvíce reprodukovatelné (viz Graf 4). Výsledky kultivací, resp. produkcí na galaktóze jsou tedy nejspolehlivější. Na druhé straně výsledky kultivací na odpadním kuchyňském substrátu jsou evidentně nespolehlivé a neopakovatelné. Tento substrát je nevhodný pro další použití. Pro další experimenty byla používána glukóza, a to z důvodu lepší srovnatelnosti výsledků (byla použita ve všech dosavadních experimentech jako referenční vzorek).

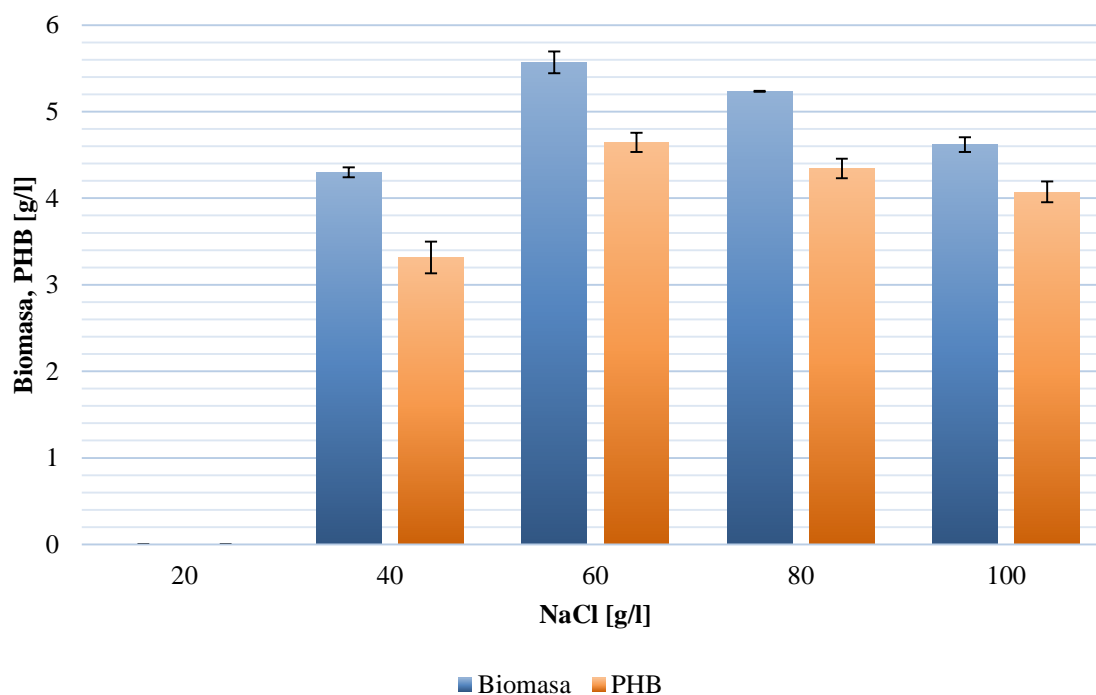
4.3.2 Optimalizace osmotické síly produkčního média

Osmotická síla je důležitým faktorem ovlivňujícím růst mikroorganismů. Vysoká koncentrace chloridů je pro optimální rozvoj halofilních mikroorganismů klíčová a rod *Halomonas organivorans* je typickým zástupcem této skupiny mikroorganismů.

Tabulka 7 – výsledky kultivací a produkci PHB na médiích s různými koncentracemi soli

NaCl [g/l]	OD ₆₃₀ [-]	Biomasa [g/l]	PHB [%]	PHB [g/l]
20	-	neroste	neprodukuje	neprodukuje
40	26,47 ± 0,44	4,30 ± 0,06	77,13 ± 5,27	3,32 ± 0,18
60	33,52 ± 1,06	5,57 ± 0,13	83,41 ± 0,10	4,65 ± 0,11
80	31,37 ± 0,56	5,24 ± 0,01	82,98 ± 2,03	4,34 ± 0,11
100	29,78 ± 0,18	4,62 ± 0,08	88,17 ± 0,97	4,07 ± 0,12

V Tabulce 7 je možné pozorovat vliv zvyšujícího se osmotického tlaku na halofilní bakterie *H. organivorans*. Výsledky měření zákalu jsou analogické výsledkům analýzy pomocí plynové chromatografie. Optimální růst a produkce biopolymeru lze pozorovat v případě koncentrace soli 60 g/l, proto byla tato koncentrace použita v následujícím experimentu.



Graf 5 – grafické znázornění výsledků optimalizace osmotické síly

Médium s obsahem chloridů 20 g/l představuje absolutně nevhodné prostředí pro rozvoj zkoumaných halofilů. Dvojnásobný obsah soli (40 g/l) je pořád nevyhovující k produkci biopolymeru. Na druhé straně koncentrace NaCl 100 g/l v produkčním médiu způsobuje mírný pokles ve srovnání s koncentrací 80 g/l. Vyšší osmotický tlak již působí na buňky inhibičně.

4.3.3 Kultivace bakterií a produkce PHA po přidavku prekurzorů 3HV

Již malé množství komonomeru 3-hydroxyvalerátu v bakteriálním polymeru významně zlepšuje jeho fyzikální vlastnosti, které v současnosti představují největší bariéru v jeho komerčním využití. Kopolymer P(3HB-co-3HV) však rodem *H. organivorans* není produkován kultivací na běžných substrátech. Přídavek prekurzorů 3HV by teoreticky mohl pomoci produkci kopolymeru.

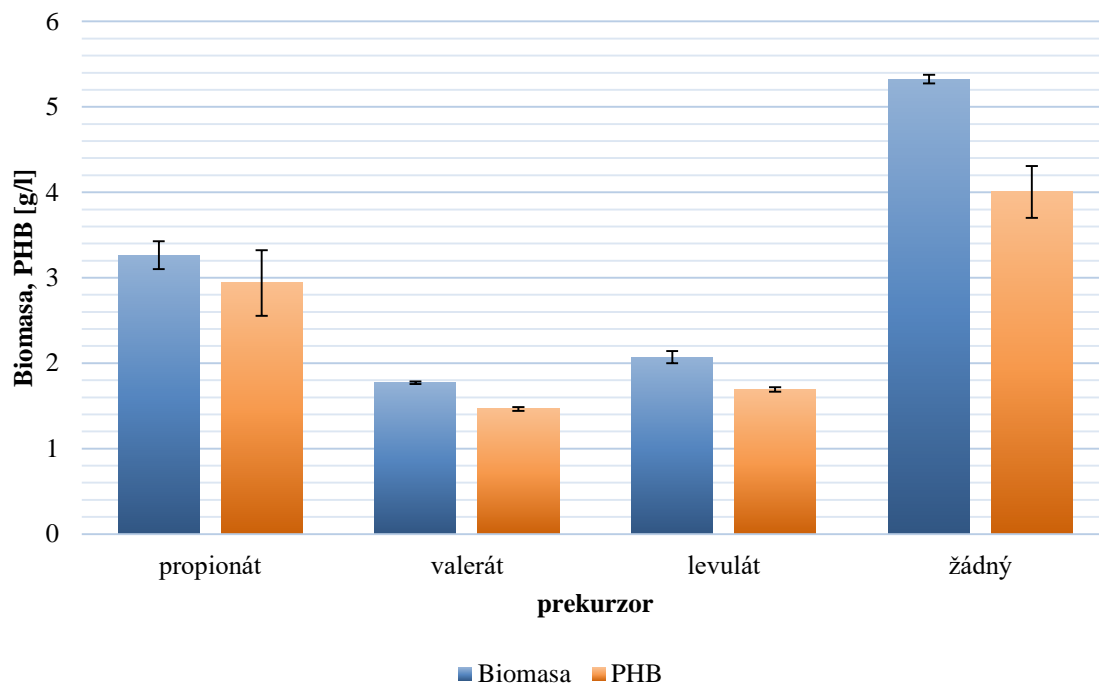
Jako základní zdroj uhlíku v médiích byla použita glukóza. Přestože růst kultury i produkce PHB byly příznivější na galaktóze, dostupnost galaktózy v přírodě je nižší než dostupnost glukózy. Navíc glukóza byla použita při všech dosavadních experimentech jako referenční vzorek. Dále také cena čisté galaktózy je řádově vyšší.

Tabulka 8 – výsledky kultivace a produkce kopolymeru PHBV využitím prekurzorů 3-hydroxyvalerátu

Prekurzor	OD ₆₃₀ [-]	Biomasa [g/l]	PHA [%]	PHA [g/l]	PHV [%]
propionát	18,92 ± 0,37	3,27 ± 0,16	89,82 ± 7,24	2,94 ± 0,38	0
valerát	9,17 ± 0,18	1,77 ± 0,01	82,63 ± 0,60	1,46 ± 0,02	0
levulát	9,17 ± 0,18	2,07 ± 0,07	81,74 ± 4,06	1,69 ± 0,03	0
žádný	33,60 ± 0,38	5,33 ± 0,05	75,17 ± 5,02	4,00 ± 0,30	0

Z výsledků kultivace a produkce PHA po přidavku prekurzorů 3-hydroxyvalerátu je zřejmé, že přidané prekurzory nebyly pro požadovaný účel spotřebovány, a tudíž mohli zůstat v médiu a ovlivnit absorbanci. Výsledky měření absorbance vykazují stejný trend, jako výsledky měření koncentrace biomasy a PHB.

Produkce kopolymeru P(3HB-co-3HV) rodem *H. organivorans* pomocí propionátu sodného, kyseliny valerové ani kyseliny levulové není možná. K částečné produkci PHV nepomohl ani přídavek těchto prekurzorů 3-hydroxyvalerátu. Avšak přidavkem propionátu došlo k pozoruhodnému zvýšení produkce PHB. Tento děj je možné pozorovat v Grafu 6. Zdá se, že bakterie *H. organivorans* disponuje efektivním metabolismem umožňujícím konverzi propionyl-CoA na acetyl-CoA, který se následně vřadí do homopolymeru PHB. V řadě bakterií plní tuto funkci 2-methylcitrátový cyklus. Vzhledem k tomu, že aktivita této dráhy brání produkci kopolymeru, nabízí naše výsledky námět pro genetické inženýrství bakterie *H. organivorans*. Je možné předpokládat, že úspěšná delece 2-methylcitrát syntázy, případně jiného genu kódující enzymy výše uvedené metabolické dráhy by umožnila efektivní produkci žádaného kopolymeru P(3HB-co-3HV).



Graf 6 – výsledky kultivací v prostředí prekurzorů 3-hydroxyvalerátu

Přídavek propionátu evidentně inhibuje růst biomasy a i když je propionát prekurzor 3-hydroxyvalerátu, podporuje tvorbu homopolymeru PHB. Došlo k relativnímu zvýšení produkce PHB vzhledem k obsahu biomasy. Je tedy zřejmé, že propionát indukuje tvorbu biopolymeru a tím omezuje utilizaci glukózy pro rozvoj kultury.

5 ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na tvorbu optimálního prostředí pro růst halofilních bakterií *Halomonas organivorans* a biotechnologickou produkci bakteriálních polyhydroxyalkanoátů. Pro tento účel byly testovány různé komerční substráty nebo vybrané odpadní produkty jakožto zdroj uhlíku. Optimalizovaná byla také osmotická síla produkčního média, která je pro halofilní mikroorganismy zásadním faktorem ovlivňujícím jejich rozvoj. Se záměrem zlepšení fyzikálních vlastností bakteriálního polymeru byly při kultivaci přidány do média prekurzory 3-hydroxyvalerátu. Obecnou logikou experimentů bylo zvýšení výtěžnosti produkce, snížení její nákladů a zlepšení vlastností finálního produktu.

- Vstupní bránou do experimentální části bylo vyhledání genu *phaC* kódujícího PHA-syntázu, který je základním předpokladem pro metabolismus PHA. Gen byl nejprve amplifikován metodou multiplex PCR a následně detekován pomocí agarózové elektroforézy. Zároveň byl amplikon *phaC* genu osekvenován a bude vřazen do vznikající banky sekvencí *phaC* genů halofilních bakterií.
- Extracelulární lipolytická aktivita byla dokazována se záměrem provedení dalších experimentů, ve kterých byl použit kuchyňský odpad jako jeden ze zdrojů uhlíku a energie. Agar Spirit Blue byl v okolí kultur během několika hodin odbarven, a to potvrdilo produkci extracelulárních lipáz.
- Kultivace bakterií na glukóze a kuchyňském odpadu ukázala, že glukóza je výrazně lepším substrátem k produkci polyhydroxybutyrátu než odpad bohatý na lipidy. Z toho důvodu bylo předpokládáno, že sacharidy představují lepší zdroj uhlíku pro tvorbu bakteriálních polyesterů.
- Produkce polymeru na sacharidech projevila vysokou výtěžnost, v některých případech bylo dosaženo 80 až 90 % obsahu PHB v buňkách. Bylo dosaženo také značného množství biomasy, proto byl obsah polymeru na litr média vysoký. Překvapující růst a produkce vykazovala kultura na galaktóze, manóze a sacharóze což naznačuje, že by testovaný bakteriální kmen mohl být využit k produkci PHA na odpadní kávové sedlině nebo melase. Zajímavá byla neschopnost kultury štěpení laktózy na monosacharidové jednotky. Bakterie také nedokázali využít arabinózu a slabý růst byl pozorován na xylóze. Tyto výsledky vylučují možnost použití odpadní syrovátky nebo lignocelulósových materiálů bohatých na pentózy.
- Běžné odpadní materiály představují problém pro růst *H. organivorans*, což se negativně projevuje také na produkci PHB. Obecně vhodnější substráty pro biotechnologickou produkci polymeru využitím tohoto rodu jsou sacharidy. To předurčuje *H. organivorans* k produkci biopolymeru spíše na potravinářských odpadech než na jiných odpadních produktech. Příkladem takového substrátu může být vyslazená cukrová řepa nebo třtina bohatá na sacharózu. Absolutně nevhodným zdrojem uhlíku pro použitou bakterii je nafta.
- Optimální koncentrace soli pro halofilní bakterii *H. organivorans* s ohledem na růst a produkci PHB byla 60 g /l NaCl. Podobné výsledky obsahu biomasy a PHB byly dosaženy také při koncentraci soli 80 g/l.

- Příklad: Přídavek propionátu, kyseliny valerové nebo kyseliny levulové do produkčního média jakožto prekurzorů 3-hydroxyvalerátu neumožnil produkci kopolymeru P(3HB-co-3HV). Došlo však ke zvýšení procentuálního obsahu PHB. Tyto prekurzory mírně zpomalují růst kultury, ale indukují tvorbu zásobního polymeru.
- Zlepšení fyzikálních vlastností bakteriálního PHB modifikací dalším typem monomeru pomocí halofilních bakterií *H. organivorans* má potenciální prostor pro vývoj protože existuje řada dalších prekurzorů 3-hydroxyvalerátu, které v této práci nebyly použity. Dále také 3-hydroxyvalerát není jediným monomerem, jehož přítomnost v řetězci biologických polyesterů zlepšuje jejich fyzikální vlastnosti. Proto jsou pro zatraktivnění polyhydroxyalkanoátů a motivaci různých odvětví průmyslu k jejich komerčnímu využití požadovány další experimenty.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

PHA	polyhydroxyalkanoáty
PHB	polyhydroxybutyrát (obecně)
SCL PHA	polyhydroxyalkanoáty s krátkými řetězci monomerů
MCL PHA	polyhydroxyalkanoáty se středně dlouhými řetězci monomerů
3HA _{SCL}	3-hydroxyalkanoáty s krátkými řetězci monomerů
3HA _{MCL}	3-hydroxyalkanoáty se středně dlouhými řetězci monomerů
3HB	3-hydroxybutyrát
P3HB	poly-3-hydroxybutyrát
4HB	4-hydroxybutyrát
P4HB	poly-4-hydroxybutyrát
P(3HB- <i>co</i> -3HV)	poly-3hydroxybutyrát- <i>co</i> -3-hydroxyvalerát
3HV	3-hydroxyvalerát
P3HV	poly-3-hydroxyvalerát
PP	polypropylen
3HH	3-hydroxyhexanoát
P(3HB- <i>co</i> -3HH)	poly-3-hydroxybutyrát- <i>co</i> -3-hydroxyhexanoát
3HO	3-hydroxyoktanoát
P(HB- <i>co</i> -HO)	polyhydroxybutyrát- <i>co</i> -hydroxyoktanoát
NADP	nikotinamidadeninukleotidfosfát
CoA	koenzym A
NAD	nikotinamidadeninukleotid – oxidovaná forma
NADH	nikotinamidadeninukleotid – redukována forma
TCA cyklus	citrátový cyklus
Gly	glycin

Ser	serin
PCR	polymerázová řetězová reakce
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ATP	adenosintrifosfát

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KESHAVARZ, Tajalli a Ipsita ROY. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 2010, **13**(3), 321-326 [cit. 2017-03-13]. DOI: 10.1016/j.mib.2010.02.006. ISSN 13695274.
- [2] SUDESH, K, H ABE, Y DOI, Mohd. ZAFAR a Hung-suck PARK. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science* [online]. 2000, **25**(10), 1503-1555 [cit. 2017-03-13]. DOI: 10.1016/S0079-6700(00)00035-6. ISSN 00796700.
- [3] KESSLER, Birgit a Bernard WITHOLT. Poly(3-Hydroxyalkanoates). In: *Encyclopedia of Bioprocess Technology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2002. DOI: 10.1002/0471250589.ebt168. ISBN 0471250589.
- [4] KOLLER, Martin, Denis VADLJA, Gerhart BRAUNEGG, Aid ATLIC a Predrag HORWAT. Formal- and high-structured kinetic process modelling and footprint area analysis of binary imaged cells: Tools to understand and optimize multistage-continuous PHA biosynthesis. *Polymer Testing*. 2012, **31**(2), 226-235. DOI: 10.24190/ISSN2564-615X/2017/03.01. ISBN 10.24190/ISSN2564-615X/2017/03.01. ISSN 01429418.
- [5] REHM, Bernd H.A. a Alexander STEINBÜCHEL. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. In: *International Journal of Biological Macromolecules*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 1999, **25**(1-3), s. 3-19. DOI: 10.1016/S0141-8130(99)00010-0. ISBN 0471250589. ISSN 01418130.
- [6] EDLUND, U a A.-C ALBERTSSON. Polyesters based on diacid monomers: preparation, characterization, and biological implications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2003, **55**(4), 585-609. DOI: 10.1016/S0169-409X(03)00036-X. ISBN 10.1016/S0169-409X(03)00036-X. ISSN 0169409x.
- [7] SVOBODA, Jiří. *Organická chemie I*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708-0561-7.
- [8] HOROWITZ, Daniel M. a Jeremy K. M. SANDERS. Amorphous, biomimetic granules of polyhydroxybutyrate: preparation, characterization, and biological implications. *Journal of the American Chemical Society*. 1994, **116**(7), 2695-2702. DOI: 10.1021/ja00086a001. ISSN 0002-7863.
- [9] MARTELLI, Silvia Maria, Matteo PIETRINI, Elizabeth Grillo FERNANDES a Emo CHIPELLINI. Poly[(R)-3-hydroxy butyrate] Melt Processing: Strategy for Prevention of Degradation Reactions. *Journal of Polymers and the Environment*. 2013, **21**(1), 39-45. DOI: 10.1007/s10924-012-0550-2. ISSN 1566-2543.
- [10] PHILIP, S., T. KESHAVARZ a I. ROY. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology*. 2007, **82**(3), 233-247. DOI: 10.1002/jctb.1667. ISSN 02682575.
- [11] [Y2] NODA, Isao, S. Blake LINDSEY a Daniel CARAWAY. Nodax™ Class PHA Copolymers: Their Properties and Applications. *Plastics from Bacteria*. Berlin,

- Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010, 237-255. Microbiology Monographs. DOI: 10.1007/978-3-642-03287-5_10. ISBN 978-3-642-03286-8.
- [12] LEE, Sang Yup. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*. 1996, **49**(1), 1 - 14. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19960105)49:1<::AID-BIT1>3.0.CO;2-P. ISSN 0006-3592.
- [13] SHARMA, Parveen, Riffat MUNIR, Warren BLUNT, Chris DARTIAILH, Juijun CHENG, Trevor CHARLES a David LEVIN. Synthesis and Physical Properties of Polyhydroxyalkanoate Polymers with Different Monomer Compositions by Recombinant *Pseudomonas putida* LS46 Expressing a Novel PHA SYNTHASE (PhaC116) Enzyme. *Applied Sciences*. 2017, **7**(3), 242-. DOI: 10.3390/app7030242. ISSN 2076-3417.
- [14] TAPPEL, Ryan C., Jason M. KUCHARSKI, Jessica M. MASTROIANNI, Arthur J. STIPANOVIC, Christopher T. NOMURA, Trevor CHARLES a David LEVIN. Biosynthesis of Poly[(R)-3-hydroxyalkanoate] Copolymers with Controlled Repeating Unit Compositions and Physical Properties. *Biomacromolecules*. 2012, **13**(9), 2964-2972. DOI: 10.1021/bm301043t. ISSN 1525-7797.
- [15] HONG, Shinn-Gwo, Tsung-Kai GAU a Shih-Che HUANG. Enhancement of the crystallization and thermal stability of polyhydroxybutyrate by polymeric additives. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2011, **103**(3), 967-975. DOI: 10.1007/s10973-010-1180-3. ISSN 1388-6150.
- [16] ZOU, Huibin, Mengxun SHI, Tongtong ZHANG, Lei LI, Liangzhi LI a Mo XIAN. Natural and engineered polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase: key enzyme in biopolyester production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2017, **101**(20), 7417-7426. DOI: 10.1007/s00253-017-8485-0. ISSN 0175-7598.
- [17] KUNASUNDARI, Balakrishnan, Carlos Rodriguez ARZA, Frans H.J. MAURER, Vikneswaran MURUGAIYAH, Gurjeet KAUR a Kumar SUDESH. Biological recovery and properties of poly(3-hydroxybutyrate) from *Cupriavidus necator* H16. *Separation and Purification Technology*. 2017, **172**, 1-6. DOI: 10.1016/j.seppur.2016.07.043. ISSN 13835866.
- [18] STEINBÜCHEL, Alexander, Kristin AERTS, Matthias LIEBERGESELL, et al. Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions. *Canadian Journal of Microbiology*. 1995, **41**(13), 94-105. DOI: 10.1139/m95-175. ISSN 0008-4166.
- [19] LAYCOCK, Bronwyn, Peter HALLEY, Steven PRATT, et al. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Progress in Polymer Science*. 2013, **38**(3-4), 536-583. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2012.06.003. ISSN 00796700.
- [20] JENDROSSEK, Dieter a Daniel PFEIFFER. New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). *Environmental Microbiology*. 2014, **16**(8), 2357-2373. DOI: 10.1111/1462-2920.12356. ISSN 14622912.

- [21] STEINBÜCHEL, Alexander a Henry E. VALENTIN. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters*. 1995, **128**(3), 219-228. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1995.tb07528.x. ISSN 03781097.
- [22] FULDA, Simone, Adrienne M. GORMAN, Osamu HORI a Afshin SAMALI. Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death. *International Journal of Cell Biology*. 2010, **2010**, 1-23. DOI: 10.1155/2010/214074. ISSN 1687-8876.
- [23] AYUB, Nicolás D., Paula M. TRIBELLI, Nancy I. LÓPEZ a Afshin SAMALI. Polyhydroxyalkanoates are essential for maintenance of redox state in the Antarctic bacterium *Pseudomonas* sp. 14-3 during low temperature adaptation: Cell Survival and Cell Death. *Extremophiles*. 2009, **13**(1), 59-66. DOI: 10.1007/s00792-008-0197-z. ISSN 1431-0651.
- [24] SARDESAI, Nagesh a Cherukeri Raghavendra BABU. Poly- β -Hydroxybutyrate Metabolism Is Affected by Changes in Respiratory Enzymatic Activities Due to Cold Stress in Two Psychrotrophic Strains of *Rhizobium*. *Current Microbiology*. 2001, **42**(1), 53-58. DOI: 10.1007/s002840010178. ISSN 0343-8651.
- [25] ZHAO, Yan Hong, Hong Ming LI, Ling Fang QIN, Hong Hui WANG a Guo-Qiang CHEN. Disruption of the polyhydroxyalkanoate synthase gene in *Aeromonas hydrophila* reduces its survival ability under stress conditions. *FEMS Microbiology Letters*. 2007, **276**(1), 34-41. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00904.x. ISSN 03781097.
- [26] TOKIWA, Yutaka a Buenaventurada P. CALABIA. Review Degradation of microbial polyesters. *Biotechnology Letters*. 2004, **26**(15), 1181-1189. DOI: 10.1023/B:BILE.0000036599.15302.e5. ISSN 0141-5492.
- [27] NUMATA, Keiji, Hideki ABE a Yoshiharu DOI. Enzymatic processes for biodegradation of poly(hydroxyalkanoate)s crystals. *Canadian Journal of Chemistry*. 2008, **86**(6), 471-483. DOI: 10.1139/v08-004. ISSN 0008-4042.
- [28] BACHMANN, Beat M. a Dieter SEEBACH. Investigation of the Enzymatic Cleavage of Diastereomeric Oligo(3-hydroxybutanoates) Containing Two to Eight HB Units. A Model for the Stereoselectivity of PHB Depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T 1. *Macromolecules*. 1999, **32**(6), 1777-1784. DOI: 10.1021/ma981496w. ISSN 0024-9297.
- [29] BACHMANN, Beat M. a Dieter SEEBACH. Synthesis and structure of linear and cyclic oligomers of 3-hydroxybutanoic acid with specific sequences of (R)- and (S)-configurations. *HELVETICA CHIMICA ACTA*. 1998, **81**(12), 2430 - 2461. ISSN 0018-019X.
- [30] UCHINO, K., T. SAITO a D. JENDROSSEK. Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) Depolymerase PhaZa1 Is Involved in Mobilization of Accumulated PHB in *Ralstonia eutropha* H16. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008, **74**(4), 1058-1063. DOI: 10.1128/AEM.02342-07. ISSN 0099-2240.
- [31] SAEGUSA, H., M. SHIRAKI, C. KANAI a T. SAITO. Cloning of an Intracellular Poly[D(-)-3-Hydroxybutyrate] Depolymerase Gene from *Ralstonia eutropha* H16 and Characterization of the Gene Product. *Journal of Bacteriology*. 2001, **183**(1), 94-100. DOI: 10.1128/JB.183.1.94-100.2001. ISSN 0021-9193.

- [32] KOBAYASHI, T., M. SHIRAKI, T. ABE, A. SUGIYAMA a T. SAITO. Purification and Properties of an Intracellular 3-Hydroxybutyrate-Oligomer Hydrolase (PhaZ2) in *Ralstonia eutropha* H16 and Its Identification as a Novel Intracellular Poly(3-Hydroxybutyrate) Depolymerase. *Journal of Bacteriology*. 2003, **185**(12), 3485-3490. DOI: 10.1128/JB.185.12.3485-3490.2003. ISSN 0021-9193.
- [33] YORK, G. M., J. LUPBERGER, J. TIAN, A. G. LAWRENCE, J. STUBBE a A. SINSKEY. *Ralstonia eutropha* H16 Encodes Two and Possibly Three Intracellular Poly[D-(–)-3-Hydroxybutyrate] Depolymerase Genes. *Journal of Bacteriology*. 2003, **185**(13), 3788-3794. DOI: 10.1128/JB.13.3788.3794.2003.
- [34] KOBAYASHI, T., K. UCHINO, T. ABE, Y. YAMAZAKI a T. SAITO. Novel Intracellular 3-Hydroxybutyrate-Oligomer Hydrolase in *Wautersia eutropha* H16. *Journal of Bacteriology*. 2005, **187**(15), 5129-5135. DOI: 10.1128/JB.187.15.5129-5135.2005. ISSN 0021-9193.
- [35] ABE, T., T. KOBAYASHI, T. SAITO a Y. YAMAZAKI. Properties of a Novel Intracellular Poly(3-Hydroxybutyrate) Depolymerase with High Specific Activity (PhaZd) in *Wautersia eutropha* H16. *Journal of Bacteriology*. 2005, **187**(20), 6982-6990. DOI: 10.1128/JB.187.20.6982-6990.2005. ISSN 0021-9193.
- [36] JAEGER, KE., A. STEINBUCHEL a D. JENDROSSEK. SUBSTRATE SPECIFICITIES OF BACTERIAL POLYHYDROXYALKANOATE DEPOLYMERASES AND LIPASES - BACTERIAL LIPASES HYDROLYZE POLY(OMEGA-HYDROXYALKANOATES). *Applied and Environmental Microbiology*. 1995, **61**(8), 3113-3118. ISSN 0099-2240.
- [37] SCHIRMER, A., D. JENDROSSEK a H. G. SCHLEGEL. DEGRADATION OF POLY(3-HYDROXYOCTANOIC ACID) [P(3HO)] BY BACTERIA - PURIFICATION AND PROPERTIES OF A P(3HO) DEPOLYMERASE FROM PSEUDOMONAS-FLUORESCENS GK13. *Applied and Environmental Microbiology*. 1993, **59**(4), 1220-1227. ISSN 0099-2240.
- [38] ZHANG, Chan, LiangQi ZHAO, YueFeng DONG, XiaoYan ZHANG, Ji LIN a Zhang CHEN. Folate-mediated poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyoctanoate) nanoparticles for targeting drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2010, **76**(1), 10-16. DOI: 10.1016/j.ejpb.2010.05.005. ISSN 09396411.
- [39] HUERTA-ÁNGELES, Gloria, Kateřina KNOTKOVÁ, Petr KNOTEK, et al. Aligned nanofibres made of poly(3-hydroxybutyrate) grafted to hyaluronan for potential healthcare applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2018, **29**(3), -. DOI: 10.1007/s10856-018-6045-5. ISSN 0957-4530.
- [40] CHATURVEDI, Kiran, Kuntal GANGULY, Anandrao R. KULKARNI, Walter E. RUDZINSKI, Leslie KRAUSS, Mallikarjuna N. NADAGOUDA a Tejrjaj M. AMINABHAVI. Oral insulin delivery using deoxycholic acid conjugated PEGylated polyhydroxybutyrate co-polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*. 2015, **10**(10), 1569-1583. DOI: 10.2217/nmm.15.36. ISSN 1743-5889.
- [41] DÍEZ-PASCUAL, Ana M. a Angel L. DÍEZ-VICENTE. *ZnO-Reinforced Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Bionanocomposites*

- with Antimicrobial Function for Food Packaging*. 2014, **6**(12), 9822-9834. DOI: 10.1021/am502261e. ISSN 1944-8244.
- [42] CASTRO-MAYORGA, J.L., F. FREITAS, M.A.M. REIS, M.A. PRIETO a J.M. LAGARON. Biosynthesis of silver nanoparticles and polyhydroxybutyrate nanocomposites of interest in antimicrobial applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, **108**(12), 426-435. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.007. ISSN 01418130.
- [43] OBRUCA, Stanislav, Pavla BENESOVA, Dan KUCERA, Sinisa PETRIK a Ivana MAROVA. Biotechnological conversion of spent coffee grounds into polyhydroxyalkanoates and carotenoids. *New Biotechnology*. 2015, **32**(6), 569-574. DOI: 10.1016/j.nbt.2015.02.008. ISSN 18716784.

8 PŘÍLOHY

H. organivorans – sekvence genu *phaC*

CAACAAGTACTATATTCTCGACCTGCGCCAGGACAACCTCGCTGGTGAAGTG
GCTGGTGGACCAGGGGCACACCGTGTTTCCTGATTTCTGGCGCAACCCCGGCCCC
GAACAGCGTGACCTGACCTGGGCCGACTACATGCAGCTTGGGCCGATCAGCGCC
ATGGAGGCCATCGAGCAGGCCACCGGCGAAAAGTCGGTCAACCTGCTGAGCTAT
TGCGTCGGCGGTACCCTGGCCGGCTCCACGGTGGCCTACCTGACCAGCACCCGGC
GCGGGCGCAAGATCAAGTCGGCGACCTACATGACCAGCCTGTGGGACTTCCGCG
ATCCCGGCGAGATCGGCGTTTTCTCGGTGAACCGGTTCTCAAGGGCATCGAGGC
CAAGCTCGAGCAGGACGGCTACCTGGACGGCCGGGTCATGGCCTACTCCTTCAAT
CTGCTGCGCGAGAACGACCTCTTCTGGTCCTTCTACATCAACAACCTACCTCAAGG
GCGACGTGCCCGCGCCCTTCGA