



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

METODY KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ ANALÝZY PHA V BUŇKÁCH CYANOBAKTERIÍ

ANALYTICAL METHODS FOR QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF PHA IN
CYANOBACTERIA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Diana Černayová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1384/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Diana Černayová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Metody kvalitativní a kvantitativní analýzy PHA v buňkách cyanobakterií

Zadání diplomové práce:

1. Vypracovat aktuální literární rešerši se zaměřením na metody stanovení PHA v bakteriálních buňkách.
2. Na základě literární rešerše navrhnout vhodné metody v dispozici pracoviště a experimentálně otestovat jejich použitelnost pro analýzu PHA ve vybraných kmenech cyanobakterií, příp. i referenčních heterotrofních bakteriálních kmenů.
3. Na základě výsledků realizovaných experimentů diskutovat výhody a nevýhody jednotlivých testovaných technik s ohledem na specifické vlastnosti cyanobakteriálních kultur.

Termín odevzdání diplomové práce: 31.7.2020:

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

Bc. Diana Černayová
student(ka)

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Táto diplomová práca sa venuje overeniu využiteľnosti vybraných fyzikálne-chemických a spektroskopických metód pri charakterizácii cyanobaktérií, a to sa so zvláštnym dôrazom na možnosti kvalitatívnej a kvantitatívnej analýzy polyhydroxyalkanoátov (konkrétne polyhydroxybutyrátu (PHB)) akumulovaných v bunkách cyanobaktérií. Vzorkovú základňu práce tvorili kultúry cyanobakteriálnych kmeňov *Synechocystis* sp. PCC 6803 a *Synechocystis salina* CCALA 192, ktoré boli kultivované viacerými spôsobmi za účelom pokrytia čo najširšieho spektra fyziologických podmienok a obsahov PHB a to konkrétne pri využití autotrofného spôsobu kultivácie na trepačke a v multikultivátore v základnom kultivačnom médiu, v médiách obohatených o 2% soli (NaCl) a tiež mixotrofných kultiváciách – médiách s rôznymi typmi uhlíkového substrátu. Po niekoľko týždňovej kultivácii boli získané cyanobakteriálne kultúry komplexne analyzované nasledujúcimi technikami – bunkové suspenzie boli analyzované prietokovou cytometriou a UV-VIS spektrofotometriou (v transmisnom a difúznom transmisnom móde), zatiaľ čo suchá biomasa bola charakterizovaná plynovou chromatografiou, ktorou bol stanovený presný obsah PHB, a ďalej FT-IR spektrometrickou a termogravimetrickou analýzou.

Cieľom práce bolo jednak posúdiť, či niektorá z uvedených metód môže predstavovať rýchlu a dostupnú alternatívu stanovenia obsahu PHB k najčastejšie využíwanej metóde plynovej chromatografii, ale tiež posúdiť, aké ďalšie informácie o fyziologickom stave cyanobakteriálnych buniek môžu testované metódy poskytnúť. Najvyššia korelácia na obsahu PHB bola stanovená pre parametre stanovené infračervenou spektroskopiou, pri ktorej boli dôležité konkrétne píky z charakteristických vlnočtov pre polyhydroxybutyrát. Slabé korelácie na obsahu PHB boli dosiahnuté pri termogravimetrickej analýze a cytometrii, kedy bola využitá hydrofóbna fluorescenčná sonda BODIPY 439/503, ktorá sa naviazala na lipofilné časti buniek.

Popri stanovení PHB bolo možné prietokovou cytometriou a UV-VIS spektrometriou s difúznym transmisným módom stanoviť pigmenty, ktoré sa nachádzajú v siniciach (ako sú chlorofyl, fykocyanin a karotenoidy).

Na záver boli výsledky experimentov zo všetkých techník porovnané PCA analýzou, aby sa zistila vzájomná podobnosť všetkých analyzovaných vzoriek.

Kľúčové slová

Polyhydroxyalkanoáty cyanobaktérie, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechocystis salina* CCALA 192, GC-FID, FT-IR, turbidimetria, integračná guľa, UV-VIS spektrometria, termogravimetria

Abstract

The diploma thesis is confused to verify the applicability of selected physicochemical and spectroscopic methods for characterization of cyanobacteria, with special emphasis on possibilities of qualitative and quantitative analysis of polyhydroxyalkanoates (specifically polyhydroxybutyrate (PHB)) accumulated in cyanobacterial cells. The sample basis of the work was formed by cultures of cyanobacterial strains of *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Synechocystis salina* CCALA 192. The cultures were were cultivated in several ways to cover the widest possible range of physiological conditions and PHB contents, in particular using an autotrophic way of cultivation on shakers and multicultural culture method in a basic culture medium, and in media enriched with 2% salt (NaCl) as well as mixotrophic culture media with different types of the carbon substrate. After few weeks of cultivation, cyanobacterial cultures were obtained and complexly analyzed by following techniques- cell suspensions were analyzed by flow cytometry and UV-VIS spectrometry (transmission and diffusion transmission mode), dry cell biomass was characterised by gas chromatography to obtain a exact amount of PHB, and then FT-IR spectrometry and thermogravimetric analysis.

The work aimed to assess whether any of these methods can be a quick and affordable alternative to the determination of PHB content to the most commonly used method of gas chromatography, but also to assess what additional information about the physiological state of cyanobacterial cells can provide test methods. The highest correlation on PHB content was determined for the parameters determined by infrared spectroscopy, in which specific peaks from the characteristic wavelengths for polyhydroxybutyrate were important. Weak correlations on PHB content were achieved in thermogravimetric analysis and cytometry, using the hydrophobic fluorescent probe BODIPY 439/503, which bound to lipophilic parts of cells. In addition to the determination of PHB, it was possible to determine pigments present in cyanobacteria (such as chlorophyll, phycocyanin and carotenoids) by flow cytometry and UV-VIS diffusion transmission spectrometry.

In the end, results from all used techniques were compared by PCA analysis to determine the similarity of all analyzed samples.

Keywords

Polyhydroxyalkanoates, cyanobacteria, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechocystis salina* CCALA 192, GC-FID, FT-IR, turbidimetry, integration sphere, UV-VIS spectroscopy, thermogravimetry analysis

ČERNAYOVÁ, Diana. *Metody kvalitativní a kvantitativní analýzy PHA v buňkách cyanobakterii*. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123424>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Petr Sedláček.

Prehlásenie

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

.....
Diana Černayová

Podakovanie

Týmto by som chcela poďakovať vedúcemu mojej diplomovej práce Ing. Petru Sedláčkovi, Ph.D. za odborné vedenie práce, zaujímavé a plnohodnotné konzultácie, cenné rady a jeho ústretovosť a trpezlivosť. Obrovská vďaka patrí aj mojej konzultantke Ing. Eve Slaninovej, za doprovod v rámci teoretickej časti práce, pomoc pri uskutočnení experimentov v laboratóriu a jej nesmiernu ochotu. Taktiež nemôžem opomenúť moju rodinu a kamarátov, ktorým patrí tiež veľké ďakujem.

OBSAH

1	Úvod	8
2	Teoretická časť	10
	2.1 Polyhydroxyalkanoáty	10
	2.1.1 Štruktúra a klasifikácia.....	10
	2.1.2 Fyzikálne a chemické vlastnosti polyhydroxyalkanoátov	11
	2.1.3 Syntéza polyhydroxyalkanoátov	12
	2.1.4 Polyhydroxybutyrát ako hlavný zástupca polyhydroxyalkanoátov	14
	2.1.5 Využitie polyhydroxyalkanoátov	15
	2.2 Cyanobaktérie ako producenti polyhydroxyalkanoátov	17
	2.2.1 Modelové cyanobakteriálne kmene produkujúce polyhydroxyalkanoáty	18
	2.2.2 Rastová krivka cyanobaktérií.....	20
	2.2.3 Faktory ovplyvňujúce zvýšenú tvorbu polyhydroxyalkanoátov	21
	2.3 Kvalitatívne a kvantitatívne metódy stanovenia PHA v súčasnosti používané u cyanobaktérií.....	23
	2.3.1 Plynová chromatografia ako referenčná technika.....	23
	2.3.2 Termická analýza	24
	2.3.3 Optické techniky	26
	2.3.4 Prietoková cytometria	28
3	Experimentálna časť	31
	3.1 Použité chemikálie a prístroje	31
	3.1.1 Použité bakteriálne kmene	31
	3.1.2 Použité chemikálie	31
	3.1.3 Prístroje použité na meranie.....	32
	3.2 Kultivácia cyanobaktérií	32
	3.2.1 Multikultivátor	33
	3.2.2 Mixotrofné médiá.....	34
	3.2.3 Príprava vzoriek na analýzy	35
	3.2.4 Plynová chromatografia	35
	3.2.5 Cytometrická analýza.....	36
	3.2.6 Spektroskopické analýzy v ultrafialové a viditeľné oblasti.....	36
	3.2.7 Infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou.....	36

3.2.8 Termogravimetrická analýza.....	37
4 Výsledky meraní a diskusia.....	38
4.1 Vplyv kultivačných podmienok na bunkový rast a produkciu PHB.....	38
4.2 Prietoková cytometria	46
4.3 Spektrofotometrické techniky	50
4.3.1 Spektrofotometrické analýzy	50
4.3.2 Molekulová spektroskopia	56
4.4 Termogravimetrická analýza.....	59
4.5 Štatistická analýza súboru analytických výstupov testovaných techník.....	64
5 Záver.....	72
6 Zoznam lit. Zdrojov.....	74
7 Zoznam skratiek a symbolov.....	84
8 Prílohy	85

1 ÚVOD

Rozložiteľné plasty sú v súčasnej dobe predmetom mnohých štúdií intenzívneho výskumu. Je tomu hlavne z dôvodu, že plasty ako také sú neodškriepiteľnou súčasťou našich životov a používame ich ako obalové a krycie materiály, alebo veci na každodenné použitie (fólie, fľašky, zubné kefky).

Mnohé plasty sú používané iba jednorazovo, a preto, je nutná ich recyklácia, alebo rozklad. Medzi v súčasnosti intenzívne študované rozložiteľné resp. biodegradovateľné plasty patria polyhydroxyalkanoáty (PHA). PHA sú polyester, produkované mikroorganizmami (baktérie, sinice), ktoré si ich tvoria ako energetickú zásobu – podobne ako živočíchy zásoby tuku z uhlíkových zdrojov (glukóza, acetát, CO_2). Enzýmami (depolymerázami), alebo vplyvom vonkajších podmienok (teplota, pH, a iné) môžu byť rozložené na oxid uhličitý a vodu [1].

Produkcia PHA pomocou mikroorganizmov je však drahšia ako výroba syntetických plastov, preto sa hľadajú rozličné alternatívy, ktorými by bolo možné výrobu zlacniť a zefektívniť. Jednou z takých alternatív je napríklad využitie fotoautotrofných cyanobaktérií. Cyanobaktérie, alebo tiež sinice, vedia tvoriť PHA z oxidu uhličitého ako zdroja uhlíka. Vďaka fotosyntéze za slnečného žiarenia, sú sinice schopné tvoriť monosacharidy a energetické zásoby v podobe polyhydroxybutyrátu (PHB), najznámejšieho polyesteru zo skupiny PHA. Navyše, sinice takto môžu prispievať k znižovaniu jedného zo skleníkových plynov (CO_2) v atmosfére [2].

Tvorba PHA sa odvíja od viacerých faktorov, akými sú typ mikroorganizmu, intenzita svetla, množstvo živín v médiu, v ktorom sa cyanobaktérie nachádzajú, teplota a ďalšie [2]. Tieto podmienky ovplyvňujú množstvo PHA, ktoré si sinice vedia vytvoriť. Dnes bežnou a vysoko-spoľahlivou metódou, ktorú používame pri stanovení obsahu PHA je plynová chromatografia. Nevýhodou tejto metódy však je to, že príprava vzoriek na samotnú analýzu je časovo náročná a trvá až niekoľko dní. Ďalej zahŕňa používanie karcinogénnych a toxických látok, akými sú chloroform, alebo methanol. V poslednom rade máme taktiež aj cenu prístroja, ktorý si skrátka menšie laboratória nemôžu dovoliť. Je preto dôležité nájsť vhodné metódy, či už kvalitatívne, alebo kvantitatívne, akými by sme mohli študovať PHA tvoreného sinicami.

Táto diplomová práca sa zaoberá viacerými typmi metód, či už sa jedná o metódy spektrofotometrické (UV–VIS, FT-IR), termické (termogravimetria), alebo analýza na úrovni jednej bunky (prietoková cytometria). Cieľom práce je overenie využiteľnosti týchto

metód pri kvalitatívnej a kvantitatívnej analýze PHB akumulovaného v bunkách cyanobaktérií. Vedľajším cieľom je tiež posúdiť to, aké ďalšie informácie o chemickom zložení prípadne o fyziologickom stave cyanobakteriálnych buniek môžu testované metódy poskytnúť. V práci je zhrnutá literárna rešerš a rovnako tak aj súčasné riešenie danej problematiky. K mnohým technikám sa vraciame po tom, čo bola v rámci bakalárskej práce overená ich využiteľnosť pri stanovení PHB u heterotrofných producentov, schopných produkovať a akumulovať vysoké obsahy PHB. V prípade siníc sa však stretávame s novými výzvami, či už v rámci kultivácií, príprav vzoriek, alebo merania u jednotlivých techník. Okrem toho sa obecné cyanobakteriálni producenti oproti heterotrofovi vyznačujú výrazne menšími intracelulárnymi obsahmi PHB a tiež špecifickými chemickými a spektroskopickými parametrami, súvisiacimi s obsahom fotosyntetických pigmentov, ako je chlorofyl, karotenoisy a fykocyanín. Preto bolo nutné vybrané techniky najskôr optimalizovať špecificky pre analýzu cyanobakteriálnych kultúr. Výsledkom diplomovej práce by mali byť techniky, ktoré by mohli zefektívniť a zjednodušiť prácu pri stanovení obsahu polyhydroxyalkanoátov v cyanobaktériách, prípadne poskytnúť komplexné informácie o fyziologickom stave analyzovanej cyanobakteriálnej kultúry.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

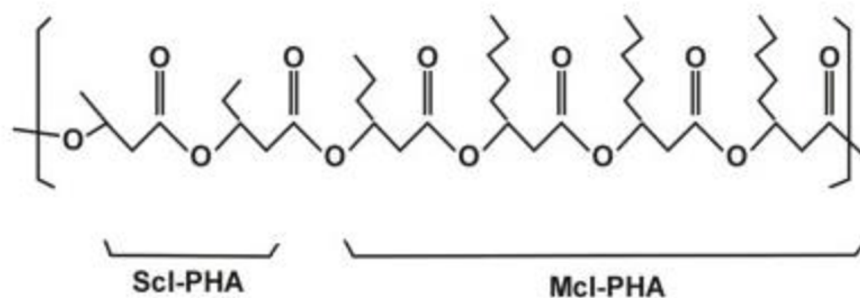
2.1 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) sú lineárne polyestery hydroxykyselín, ktoré sú syntetizované gram–pozitívnymi aj gram–negatívnymi baktériami. Baktérie sú schopné produkovať a akumulovať PHA ako uhlíkovú a energetickú rezervu vo forme intracelulárnych granúl. Za stresových podmienok, akými je napr. limitácia živín (dusík, fosfor) môžu potom baktérie vďaka tejto energetickej zásobe prežívať. Tak isto môže produkcia intracelulárnych granúl PHB prebiehať pri nepriaznivých podmienkach (zvýšená teplota, vystavenie sa UV žiareniu), kedy dochádza k zvýšeniu rezistencie bakteriálnych buniek. Medzi druhy baktérií, ktoré tvoria PHA vo väčšom množstve patria napr. heterotrofné baktérie rodu *Cupriavidus*, *Hallomonas*, *Azotobacter*, ale tiež aj niektoré druhy fofotrofných cyanobaktérií (*Synechocystis* sp, *Synechocystis salina*). Baktérie sú schopné vytvoriť granule obsahujúce PHA až do 90% hmotnosti vysušenej biomasy bunky, pri cyanobaktériách je tento obsah výrazne menší (u rekombinantnej *Synechocystis* sp. PCC 6803 to bolo maximálne okolo 41 hm.%, pri prirodzených kmeňoch je to menej) [1].

Polyhydroxyalkanoáty sa skladajú z rôznych typov monomérnych jednotiek a tvoria rôzne dlhé polymérne reťazce. Molekulová hmotnosť produkovaného PHA závisí na type mikroorganizmu, podmienkach kultivácie (zdroj uhlíka, teplota), vo veľkovýrobe aj od spôsobu fermentácie (vsadkový, kontinuálny proces), a môže sa pohybovať v širokom rozmedzí od 200 po 3 000 kDa [1].

2.1.1 Štruktúra a klasifikácia

Ako už bolo spomínané v úvode, PHA je súhrnný názov pre polyestery tvorené hydroxykyselinami ako monomérnymi jednotkami. V štruktúre monoméru sa vyskytuje chirálny uhlík, v pravotočivej R–konfigurácií, z dôvodu stereospecificity syntetizujúcich enzýmov [1]. V závislosti od dĺžky uhlíkových reťazcov u monomérnych jednotiek, je možné rozdeliť PHA na SCL–PHA (*short-chain-length*), obsahujúcich 3–5 uhlíkov, a MCL-PHA (*medium-chain.length*), pri ktorom monomér PHA obsahuje 6–14 atómov uhlíka, ako je možné vidieť na nasledujúcom obrázku (*Obrázok 1*). Viac ako 14 atómov uhlíka obsahujú LCL–PHA (*long-chain.length*), ktoré zatiaľ neboli detekované v žiadnom prirodzenom producentovi PHA, ale popísaná bola iba ich *in vitro* produkcia [3, 4]. Monomérne jednotky vytvárajú polymérne reťazce o priemernej dĺžke 1000–30 000 jednotiek [1].



Obrázok 1 Rozdiel medzi SCL a MCL PHA [5]

Polymérne reťazce sa môžu skladať z rovnakého druhu monomérnych jednotiek, ako napr. kyselina 3-hydroxybutánová, ktorá tvorí monomérnu jednotku pre polyhydroxybutyrát (PHB). V takom prípade sa jedná o homopolymér. PHB je najznámejším a najlepšie charakterizovaným polyhydroxyalkanoátom, patriacim medzi SCL-PHA. Avšak, priemyselné aplikácie PHB sú obmedzené kvôli jeho vlastnostiam (ako je napr. termická stabilita) a z toho dôvodu je preferovaná tvorba kopolyméru s MCL-PHA (napr. poly-4-hydroxyoktanátom), ktoré sú elastoméry s malou pevnosťou v ťahu. Kopolyméry SCL-MCL PHA vykazujú lepšie fyzikálne a chemické vlastnosti ako samotné homopolyméry [6, 7].

Ak sa polymérne reťazce skladajú z dvoch, alebo viacerých monomérnych jednotiek, jedná sa o heteropolyméry (napr. kopolymér 3-hydroxybutyrátu s 3-hydroxyvalerátom P(3HB-co-3HV)). To, či dôjde k tvorbe homopolyméru, alebo heteropolyméru závisí na substráte, ktorý mikroorganizmus využíva ako zdroj uhlíka [8].

2.1.2 Fyzikálne a chemické vlastnosti polyhydroxyalkanoátov

Vlastnosti izolovaných polymérov PHA závisia predovšetkým od dĺžky reťazca monomérnych jednotiek a molekulovej hmotnosti polymérov [9].

Ako už bolo zmienené v kapitole 2.1.1 vlastnosti SCL a MCL-PHA sa líšia v termickej stabilite, kryštalinite a pevnosti. SCL-PHA sú obecné kryštalické s vysokým stupňom kryštalinity, ktorá pri niektorých polyméroch môže dosiahnuť až 70% (jedná sa napr. o kopolymér 3-hydroxybutyrátu s valerátom). Na druhú stranu majú MCL-PHA nižší stupeň kryštalinity a sú vysoko elastické a flexibilné (majú veľké hodnoty predĺženia). Teplota rozkladu SCL-PHA sa pohybuje 200°C a je blízka teplote topenia (pri PHB je to 180°C), zatiaľ čo MCL-PHA patria medzi termoplastické polyméry (teplota topenia dosahuje okolo 160°C, teplota degradácie 180°C), dosahujú nižšiu teplotu skleneného prechodu ako SCL-PHA, ale vyššiu teplotu kryštalizácie [10].

Ako už bolo zmienené pred vyššie, pevnosť materiálu vyrobeného z PHA sa líši v závislosti od molekulovej hmotnosti polyméru. Podľa štúdie Špitalský a kol. (2006), sa so zvýšením molekulovej hmotnosti PHA z 100 kDa na 300 kDa, zároveň zvýši aj pevnosť materiálu z 10 MPa na 30 MPa [11].

Z dôvodu lepších technologických a úžitkových vlastností sa zvyčajne využívajú kopolyméry SCL a MCL-PHA tvorené z monomérnych jednotiek ako napr. 3-hydroxybutyrát s 3-hydroxyoktanoátom P(3HB-co-3HO) (napr. v medicíne). Takéto kopolyméry zabezpečujú lepšie mechanické vlastnosti, vyššiu termickú stabilitu a lepšiu elasticitu. Na základe spomínaných vlastností môžu byť porovnateľné so synteticky produkovanými plastami (napr. PHB s polypropylénom) [1, 10, 12].

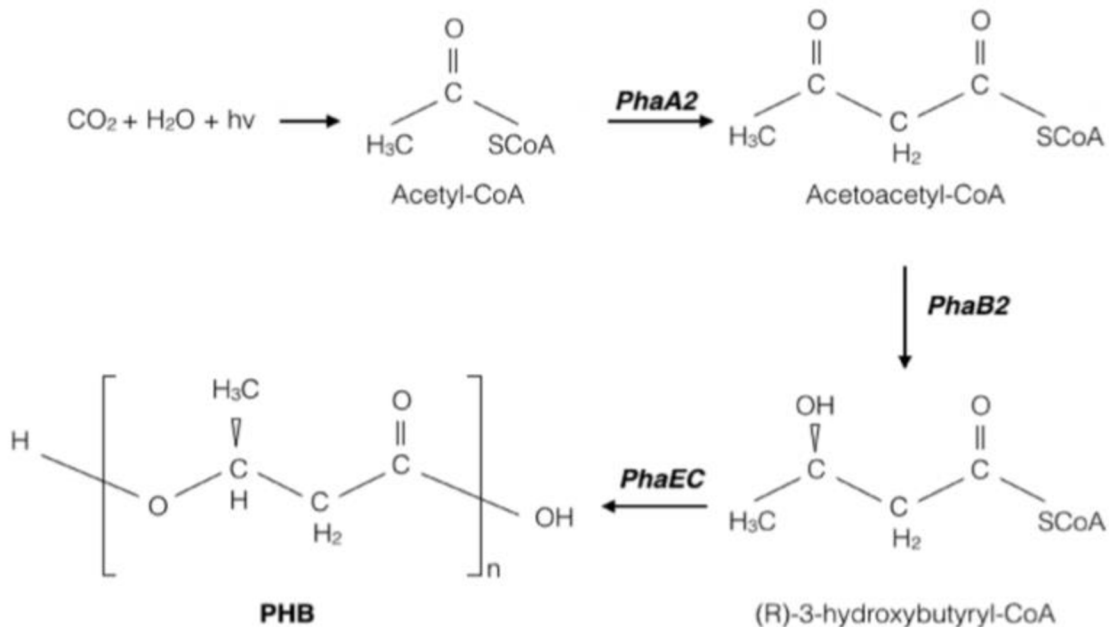
Kopolymér hydroxybutyrátu a hydroxyvalerátu (PHBV) zasa zvyšuje odolnosť voči vonkajším podmienkam. Pevnosť izolovaných polyhydroxyalkanoátov a teplota topenia polyméru sa tiež mení tvorbou kopolymérov, pričom je možné kombinovať až 150 rôznych monomérov. Mechanické vlastnosti (termoplastičita, pevnosť) sa dajú zmeniť modifikovaním povrchu- prípravou kompozitou PHA s inými polymérmí (PLA, PGA) a anorganickými materiálmi (hydroxyapatit) [13]. Medzi charakteristické vlastnosti polyhydroxyalkanoátov patrí UV stabilita a tiež hydrofobicita, ktorá spôsobuje, že sa PHA rozpúšťajú iba v nepolárnych rozpúšťadlách (napr. chloroform) a nie sú rozpustné (ani neoptajú) vo vode. Polyhydroxyalkanoáty sú ďalej netoxické a biokompatibilné, teda dobre znášané v živom organizme so schopnosťou postupného samovstrebávania. PHA sú získavané z obnoviteľných zdrojov (ako baktérie, sinice) a tiež sú biodegradabilné v prírode, čo znamená, že PHA sú prirodzene rozložiteľné na netoxické látky akými sú voda a oxid uhličitý [1, 12].

2.1.3 Syntéza polyhydroxyalkanoátov

Polyhydroxyalkanoáty sú syntetizované v bunkách pri špecifických druhoch baktérií (napr: *A. eutrophus*, *Protomonas exorquens*) za prítomnosti nadbytku uhlíkového zdroja (napr. glukóza) a limitnom množstve ostatných biogénnych prvkov, prevažne dusíka a fosforu, alebo prvkov ako horčík a síra. Tvorbu PHA granúl môže ovplyvniť aj teplota, pH, alebo UV žiarenie [14].

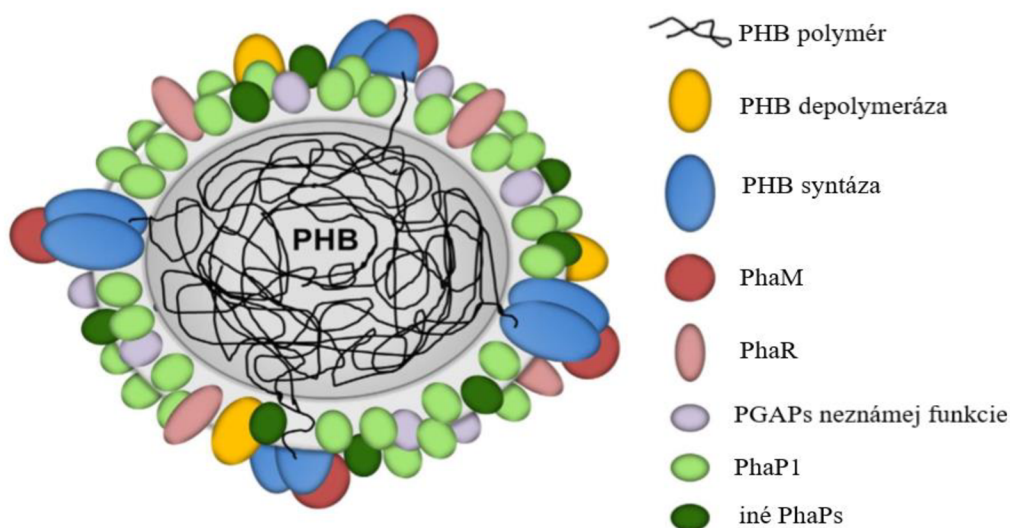
Bioyntéza PHA vychádza z acetyl-CoA, vzniknutého z pyruvátu z Calvin-Bensonovho cyklu. Na syntézu PHB z acetyl-CoA sú potrebné tri hlavné reakcie katalyzované tromi enzýmami. V cyanobaktériách sa nachádzajú štyri gény na dvoch rozdielnych miestach v genóme, ktoré sú regulované dvomi odlišnými operónmi. *Obrázok 2* zobrazuje syntézu PHA

pri cyanobaktérii *Synechocystis* sp. PCC 6803. Gén *PhaA2* kóduje enzým β -ketoacylCoA thiolázu, ktorá katalyzuje kondenzáciu dvoch acetyl-CoA za vzniku acetoacetyl-CoA. Ďalšiu reakciu katalyzuje acetoacetyl-CoA dehydrogenáza za prítomnosti NADPH (kódovaná *PhaB2*), ktorá katalyzuje hydrogenáciu karbonylovej skupiny na (R)-3-hydroxybutyryl-CoA. Polymerizáciu monoméru katalyzuje PHB polymeráza (kódovaná *phaE/phaC*) [1, 14].



Obrázok 2 Biosyntetická cesta tvorby PHB u *Synechocystis* sp PCC 6803 [16]

V baktériách sa polyhydroxyalkanoáty nachádzajú vo forme intracelulárnych granúl v cytoplazme. Počet a veľkosť PHA granúl závisí na podmienkach kultivácie vybraných druhov mikroorganizmov. Schéma štruktúry intracelulárnej granule je možné vidieť na nasledujúcom obrázku (Obrázok 3), kde je z dôvodu lepšej prehľadnosti zväčšené jadro v pomere k obalu proteínov, tzv. phasínov. Obrázok 3 sa týka baktérie *Cupriavidus necator* H16, nejedná sa o sinice [17].



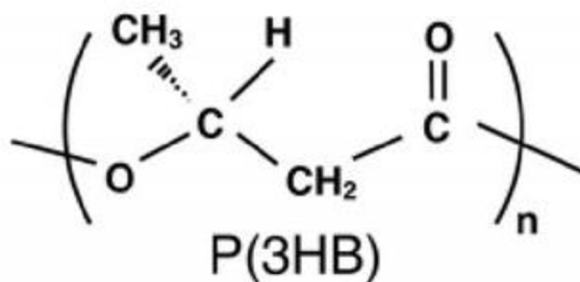
Obrázok 3 Štruktúra intracelulárnej granule obsahujúcej PHA [17]

Tieto intracelulárne granule pozostávajú z hydrofóbného polymérneho jadra, ktoré je obklopené štruktúrnymi proteínmi (fazíny) a enzýmami (PHA syntázy, PHA depolymerázy). PHA syntázy sú viazané na reťazce polyméru a sú zodpovedné za syntézu reťazca, (PHA depolymerázy zasa reťazce PHA rozkladajú). Reťazce polyhydroxyalkanoátov majú hydrofóbný charakter, avšak pri intracelulárnej akumulácii PHA nedochádza k zvyšovaniu osmotického tlaku, z dôvodu prítomnosti proteínového povrchu [17]. Proteíny okolo jadra tvoria monovrstvu, ktorá bráni aglomerácii granúl na väčšiu granulu (tzv. koalescencia). Fazíny sú amfifilické proteíny, ktoré sa nešpecificky viažu cez hydrofóbný koniec na polymér a hydrofilná časť smeruje k rozpúšťadlu [18, 19].

2.1.4 Polyhydroxybutyrát ako hlavný zástupca polyhydroxyalkanoátov

Ako už bolo zmienené v podkapitole 2.1.1, polyhydroxybutyrát (PHB) je z pomedzi všetkých polyhydroxyalkanoátov najrozšírenejším a veľmi dobre preskúmaným polymérom. Jeho monomérom je 3-hydroxybutánová kyselina, ktorá sa bežne nachádza v živých systémoch (tvorí iónové kanály) [19].

Jedná sa o polymér v skupine SCL-PHA, ktorého štruktúrny vzorec je možné vidieť na *Obrázku 4*. Vyskytuje sa ako homopolymér (služi ako zásoba energie pre mikroorganizmy), alebo vo forme derivátu (napr. s polyfosfátom draselným), kedy služi ako neurónový prenášač iónov [19, 20].



Obrázok 4 Štruktúra monomérskej jednotky PHB [23]

Baktérie produkujú lineárnu a amorfnú formu PHB. Teplota skleneného prechodu sa pohybuje okolo 4°C a teplota topenia polyméru je pri 180°C. Hustota PHB je 1,18 g/cm³. Mechanické vlastnosti tohto polyméru sú podobné izotaktickému polypropylénu [21]. Navzdory amorfnej povahe natívneho PHB v intracelulárnej granulii, po izolovaní z mikroorganizmu, vykazuje PHB vysokú kryštalinitu, a to kvôli prísnemu zachovaniu R-konfigurácie vo všetkých monomérnych jednotkách. Prechod z amorfného do čiastočne kryštalického stavu (okolo 55%) je vyvolaný z dôvodu pôsobenia chemického, alebo fyzikálneho stresu na proteíny obklopujúce jadro polyesteru [22]. Izolované PHB tvorí laminárne kryštály, ktoré sú zoskupené do doštičiek, alebo sférulitov s pravotočivou konfiguráciou, čo napomáha rýchlejšej degradácii. Molekulárna hmotnosť priemyselne tvoreného PHB závisí na producentovi, rastových podmienkach a metódach, akými sa získava izolovaný polymér – môže sa preto pohybovať v rozmedzí od 200 do 3 000 kDa [20, 21].

2.1.5 Využitie polyhydroxyalkanoátov

Spomínané fyzikálne a chemické vlastnosti v podkapitole 2.1.2 robia z polyhydroxyalkanoátov atraktívne materiály s vysokým aplikačným potenciálom. Predovšetkým kvôli stále rastúcemu znečisteniu životného prostredia hrá biodegradabilita ako jedna z esenciálnych vlastností PHA, kľúčovú rolu v modernom materiálov inžinierstve. V porovnaní s používanými plastami sa PHA môžu rozkladať na oxid uhličitý a vodu, pričom extracelulárne PHA depolymerázy (tvorené taktiež samotnými baktériami) tento proces iba urýchlia. Z toho dôvodu môžu nachádzať svoje uplatnenie v priemysle a slúžiť na výrobu potravinových fólií a obalov v potravinárstve, tiež na výrobu fliaš a vreciek [13].

Avšak jeho použitie sa netýka iba potravinárskeho priemyslu, PHA je možné využiť aj v medicíne vďaka ich biokompatibilite. Pre ľudský organizmus sú PHA netoxické a preto je možné ich využiť na výrobu samovstrebateľných nití, alebo implantátov. Možno použiť PHA aj v zmesi s polymlečnou kyselinou (PLA), na zlepšenie mechanických vlastností, ako je napr.

pevnosť. Pri výrobe scaffoldov (t.j. oporné materiály) sa z PHA využívajú rozličné prímеси s anorganickými materiálmi (napr. hydroxyapatit), alebo inými typmi polymérov (PLA, PGA). Takto vyrobené scaffoldy je možné použiť pri regenerácii kostného tkaniva, kde budú poskytovať mechanickú oporu a zároveň stimulovať rast buniek [13, 24, 25].

Svoje uplatnenie majú PHA aj vo farmakológii v distribúcií liečiv v organizme. Vďaka hydrofóbnemu charakteru, sú PHA vhodné na účinnú enkapsuláciu hydrofóbných liekov vo forme mikro a nanočastíc. Mikroporozita povrchu častíc nosiča prispieva k urýchleniu jeho degradácie, preto aby nosič vydržal dlhšie, je nutná jeho modifikácia– či už chemická, syntetická, alebo kopolymérna syntéza [25].

Dôležitým faktorom pri technologickom využití PHA je jeho cena. Vhodné médium, produkcia vo veľkom množstve v bioreaktoroch a samotný down-streamový proces (izolácia polyméru z mikroorganizmov) sú veľmi nákladné. Predajná cena izolovaného polyméru sa môže znížiť vďaka vývoju fermentačných, purifikačných technológií a metód génového inžinierstva na 4 \$/kg. Cena syntetického polypropylénu alebo polyetylénu sa pohybuje od 0,25 po 0,5 \$/kg, čo je stále približne 10 krát menej ako cena PHA [26].

Hlavne z dôvodu predajnej ceny je jednou z hlavných priorít nájsť lacnejšiu alternatívu výroby PHA. Ako substráty sa pri baktériách rodu *Cupriavidus* používajú odpadové oleje, alebo iné odpadné substráty [27].

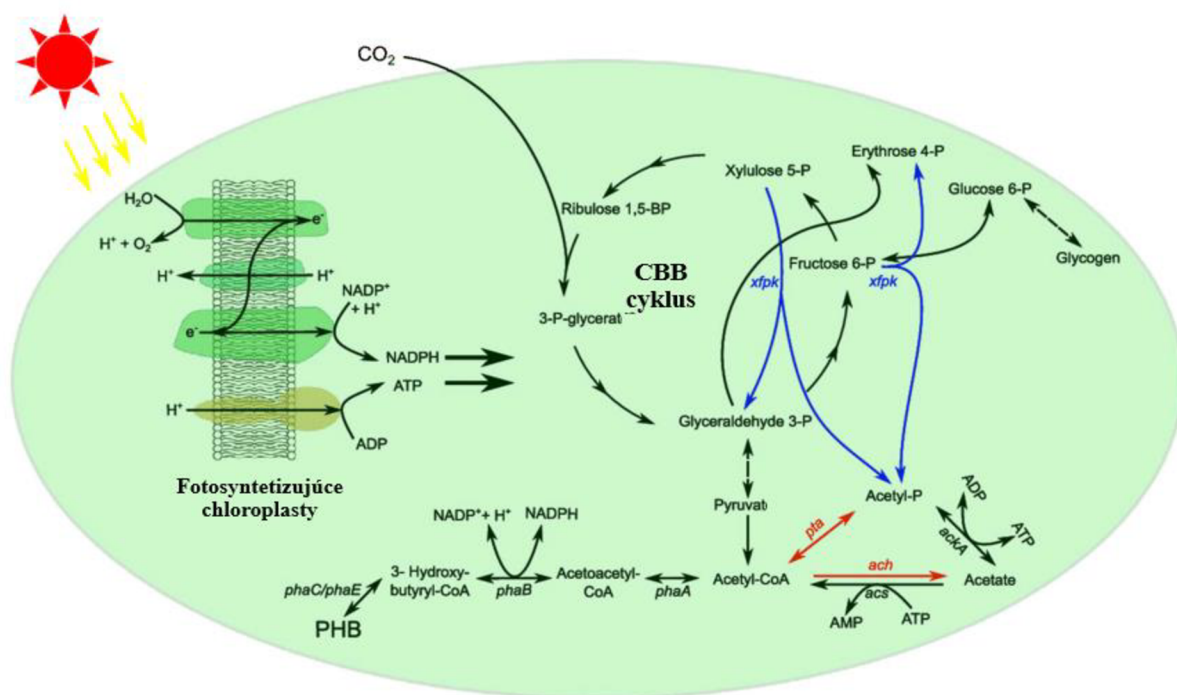
Niekoľko štúdií sa zameralo na využitie odpadových vôd a následnú produkciu polyméru a to konkrétne pri využití cyanobaktérií. Sinice ako autotrofy sú schopné syntetizovať zložitejšie uhlíkové molekuly (ako PHB) vďaka slnečnému žiareniu, vode a uhlíkovému zdroju CO₂. Kedy pri použití CO₂ ako uhlíkového zdroja môžu sinice prispieť k jeho zníženiu v atmosfére a vďaka fotosyntéze zasa k produkcii kyslíka. Práve to, robí zo siníc vhodné nízkonákladové primárne producenty PHB [28, 29].

Rovnako tak, je možné využiť ako lacný a ľahko získateľný uhlíkový zdroj napr. odpadovú vodu, vďaka čomu by bolo možné znížiť celkové náklady na výrobu PHB [28]. *Aulosira fertilissima* sa po 15 dní inkubácie získalo až 200 mg.l⁻¹ PHB. Výsledky z experimentov poukazujú na to, že odpadové vody by mohli byť používané pri získavaní cenných produktov z cyanobaktérií bez zbytočných výdavkov spojených s používaním pitnej vody a živín ako je tomu u čistých kultúr [29].

2.2 Cyanobaktérie ako producenti polyhydroxyalkanoátov

Cyanobaktérie, alebo tiež pod názvom sinice patria do skupiny gram-negatívnych fototrofných prokaryot. Cyanobaktérie sú schopné rásť a prežívať v rozličných prostrediach a pri tom tvoriť sekundárne metabolity vrátane biologicky aktívnych zlúčenín napr. s antibakteriálnou či antivírusovou aktivitou (alkaloidy, polyketidy). Medzi najdôležitejšie sekundárne metabolity cyanobaktérií patria PHA a glykogén. Ďalšie dôležité metabolity sú enzýmy, alebo UV-absorbujúce pigmenty a fluorescenčné farbivá [30, 31].

Veľká časť cyanobaktérií je schopná oxidatívnej fotosyntézy a dokáže syntetizovať chlorofyl *a* ako najčastejší fotosyntetický pigment a phycobiliproteíny ako pigmenty zachytávajúce svetlo. Ako už bolo zmienené vyššie, sinice fixujú oxid uhličitý (CO_2) ako zdroj uhlíka, konkrétne využívajú primárne redukčnú pentózo-fosfátovú dráhu. Počas tmy, sinice mobilizujú vytvorené polyméry v Calvinov-Bensonovom cykle (CBB). Biosyntetické dráhy prebiehajúce v cyanobaktériách je možné vidieť na *obrázku 5* [32].



Obrázok 5 Biosyntetické dráhy v cyanobaktériách [33]

Cyanobaktérie potrebujú svetlo, aby boli schopné fotosyntézy a to vo vlnovej dĺžke 400–700 nm. Zo získaného absorbovaného slnečného žiarenia, môžu cyanobaktérie previesť maximálne 9% na biomasu. Na úspešnú produkciu biomasy musí byť intenzita žiarenia

v optimálnom rozmedzí. Veľmi nízka intenzita žiarenia nie je dostačujúca, na druhú stranu príliš vysoká intenzita žiarenia môže spôsobiť fotoinhibíciu (teda stratu aktivity fotosystému) [32].

Bolo zistené, že sinice sú dobre uplatniteľné ako nízko–nákladoví producenti PHA, vďaka ich malým požiadavkám na zdroje živín a schopnosti akumulovať PHA oxidatívnou fotosyntézou. Tvorba a akumulácia PHA prebieha za účelom tvorby uhlíkovej rezervy v stacionárnej fázy rastu. Ako už bolo viackrát spomenuté, akumulácia PHA závisí na druhu cyanobaktérií a od fyzikálnych a chemických podmienok, ktoré podporujú ich rast (ako je cyklus svetlo/tma, teplota, pH, limitácia živín) a rovnako zdroj uhlíka (organický, anorganický zdroj). Z pomedzi týchto podmienok je limitované množstvo živín–prevažne dusíka a fosforu, najčastejší využívaný prístup k akumulácii PHA [29].

Sinice neprodukujú iba PHA, ale rovnako aj monosacharidy (podobne ako riasy, alebo nižšie rastliny). Monosacharidy, rovnako ako di-, oligo-, a poly-sacharidy sú energetickou rezervou a súčasťou bunkovej steny u zelených siníc. Cyanobaktérie syntetizujú glykogén (zásobný polysacharid) počas fotosyntézy a uskladňujú ho ako granuly na membránach tylakoidov [29].

Vďaka nedávnym štúdiám bola potvrdená spojitosť medzi produkciou PHB a glykogénu v cyanobaktériách. Tieto štúdie potvrdzujú že za nepriaznivých podmienok (ako nedostatok živín), hrá glykogén v cyanobaktériách v energetickom zásobení väčšiu rolu ako PHB. Avšak výhodou cyanobaktérií je, že akumulácia PHA prebieha aj za heterotrofných podmienok, kedy polyhydroxyvalerát a jeho kopolymér s polyhydroxybutyrátom môžu byť získané s použitím glukózy, acetátu, kyseliny propionovej a valereovej ako zdroje uhlíka. V tomto prípade, proces zahŕňa acetyl koenzým A, alebo acylkoenzým A ako intermediát a končí polymerizáciou pomocou enzýmu PHA syntázy [29].

2.2.1 Modelové cyanobakteriálne kmene produkujúce polyhydroxyalkanoáty

Medzi kmene cyanobaktérií, ktoré sú využívané na produkciu PHA môžu patriť prirodzení, alebo rekombinantní producenti, ktorí obsahujú vybraný gén z baktérie (napr. *Cupriavidus necator*) za účelom zvýšenej produkcie polyméru.

Prirodzení producenti využívajú fotosyntetickú dráhu k produkcii PHA s využitím CO₂ ako uhlíkového zdroja, čo vedie k získaniu malých výťažkov polyméru (okolo 6% z vysušenej biomasy). K prirodzeným producentom patria napr. kmene *Spirulina*, *Aphanothece sp*, *Oscillatoria limosa*, alebo termofilický rod *Synechococcus*. Výnimku tvorí termofilná cyanobaktéria *Synechococcus sp.* MA19, kde bol zaznamenaný obsah PHB až 27 hm%. Aby

bolo dosiahnutej vyššej produkcie PHA využívajú sa rozličné ovplyvňujúce faktory, ktoré budú bližšie opísané v kapitole 2.2.3 (limitácia N a P, teplota, stresové podmienky) [34, 35]. V štúdiách, kde boli využité iné uhlíkové zdroje (napr. acetát) bola zistená vyššia produkcia PHA- napr. obsah PHB sa pri *Synechocystis* sp. PCC 6803 pohyboval okolo 20 hm. % [34].

Rekombinantní producenti sú ďalšou možnosťou ako zvýšiť produkciu, PHA. Do cyanobaktérie sa implikuje jeden, alebo viacero génov z PHA produkujúcej baktérie (napr. *Cupriavidus*). Vložené gény podmieňujú zvýšenú syntézu PHA (ovplyvňujú aktivitu enzýmov ako acetoacetyl-CoA reduktáza, β -ketothioláza), poprípade inhibujú depolymerázy, aby sa PHA nerozkladalo, ale bolo intraceluárne akumulované v bunke. V štúdií *Nyok-Sean Lau* a kol. (2014) do baktérie *Synechocystis* sp. PCC 6803 vložili gén z *Cupriavidus necator*, zodpovedný za kódovanie enzýmu acetoacetyl-CoA syntázy, ktorá katalyzovala nevratnú kondenzáciu acetyl-CoA, a malonyl-CoA na acetoacetyl-CoA. V rámci tohto experimentu sa dosiahol obsah PHA až 14 hm.%. Keď ďalej pokračovali v štúdií a rekombinantným cyanobaktériám dali zdroj uhlíka vo forme acetátu, produkcia PHA sa vyšplhala na 41% z vysušenej biomasy [3].

Vysoký obsah PHB bol dosiahnutý aj pri morskej cyanobaktérii *Synechococcus* sp. PCC 7002 a to až 52% hmotnosti vysušenej biomasy. Jednalo sa o rekombinantnú cyanobaktériu, do ktorej bol vložený plazmid z baktérie *Cupriavidus necator* [3].

V tejto diplomovej práci sa ako modelové organizmy využili dva kmene cyanobaktérií a to—*Synechocystis* sp. PCC 6803 a *Synechocystis salina* CCALA 192. Ako modelové organizmy sa využili z dôvodu, že sú schopné produkovať a akumulovať PHA v širokom rozmedzí a sú pomerne dobre preskúmané [36].

Synechocystis sp. PCC 6803 je prirodzeným producentom PHA, pričom je veľmi dobre preskúmanou cyanobaktériou, a to geneticky aj fyziologicky. Jedná sa o jednobunkovú baktériu nefixujúcu dusík, ktorá sa používa ako modelový organizmus po celom svete. Rast *Synechocystis* sp PCC 6803 je pomerne rýchly (minimálny čas delenia je menej ako sedem hodín) a nevyžaduje špecifické nutričné podmienky [37, 38]. Navyše, *Synechocystis* sp. PCC 6803 je prvý fotosyntetizujúci organizmus, ktorého celý genóm bol nasekvenovaný. Taktiež bolo urobených veľa experimentov, v ktorých bol skúmaný vplyv limitácii živín, inkubácii v tme, či zdrojov uhlíka (opísané v kapitole 2.2.3) na produkciu a akumuláciu PHB [34].

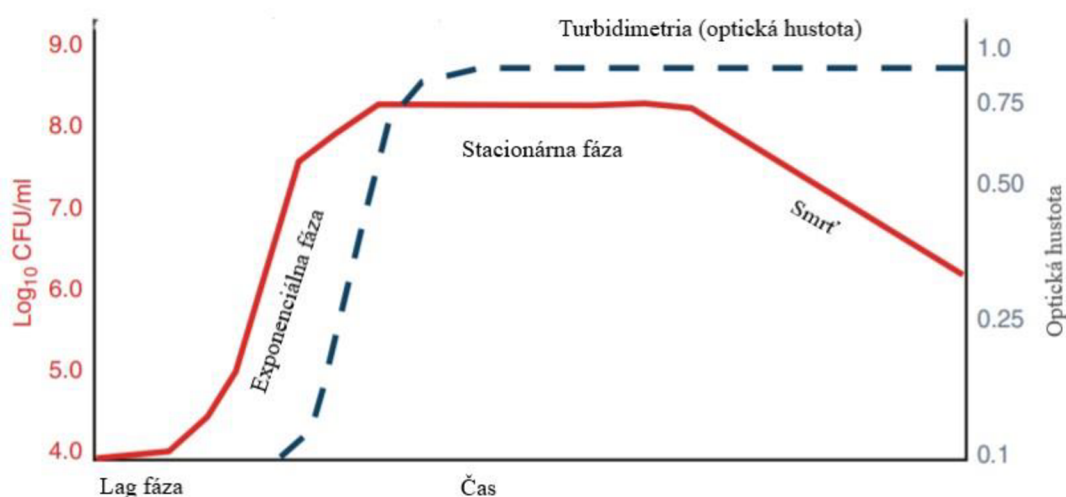
Synechocystis sp. PCC 6803 môže rásť na agarových plotniach, a rovnako tak aj v kvapalnej kultúre, pričom optimálne rozmedzie pH by sa malo pohybovať od 7–8,5. Rast prebieha za svetla, avšak je podkmeň ATCC 27184, ktorý môže rásť heterotrofne za tmy, v prítomnosti

uhlíkového zdroja. Tento podkmeň na rozdiel od materského kmeňa PCC 6803 vie zužitkovať glukózu ako zdroj uhlíka [39, 40]. .

Synechocystis salina CCALA 192 bola vybraná ako druhý modelový mikroorganizmus. Produkcia PHB je u CCALA 192 prirodzene vyššia, ako je tomu u *Synechocystis* sp. PCC 6803 a na základe viacerých štúdií je sľubným producentom PHB. *Synechocystis salina* CCALA 192 môže byť zaočkovaná z malého objemu inokula a napriek tomu sa dokáže rýchlo adaptovať a rásť. Pri kultivácii s dostatkom živín, fixovaním CO₂ ako zdroju uhlíka a svetelnom cykle 16/8 hod. (svetlo/tma) sa pohybuje produkcia PHB okolo 10–11 hm.%. Produkciu PHB je možné ešte navýšiť napr. pridaním soli chloridu sodného (NaCl) a rovnako ako v prípade *Synechocystis* sp. PCC 6803 je možné zvýšiť obsah PHB acetátom, čo bude neskôr opísané v kapitole 2.2.3 [51, 42]. .

2.2.2 Rastová krivka cyanobaktérií

Rast bakteriálnych buniek prebieha postupne v rozmedzí dní až týždňov, čo závisí od konkrétneho typu mikroorganizmov. Bunky z mikrobiologického izolátu sú umiestnené do tekutého média, obsahujúceho potrebné živiny s kontrolovanými podmienkami (ako okolitá teplota, tlak). V prípade optimálnych podmienok pre rast, môže byť bakteriálna biomasa meraná ako množstvo buniek, čím je možné získať rastovú krivku, ktorú možno vidieť na *Obrázku 6*. Rast baktérií a cyanobaktérií sa líši v rýchlosti. Na rozdiel od baktérií, kde sa doba rastu pohybuje väčšinou v hodinách, poprípade trvá niekoľko málo dní, cyanobaktérie rastú dlhšie v rozmedzí týždňov až mesiaca [43].



Obrázok 6 Rastová krivka baktérií [43]

Priebeh rastu je možné rozdeliť na štyri fázy: Lag fáza, Exponenciálna, stacionárna a fáza zániku. Každá zo spomínaných fáz reprezentuje určité obdobie rastu, ktoré je sprevádzané fyziologickými zmenami v bakteriálnej kultúre [43].

Počas „Lag fázy“ sa cyanobaktérie adaptujú na rastové podmienky- ako na výživu, rovnako tak aj na vonkajšie podmienky, ako teplota, pH a iné. V lag fáze bunky dospievajú a zatiaľ nie sú schopné sa deliť, avšak prebieha u nich syntéza RNA, tvorba enzýmov a ďalších molekúl. Množstvo bakteriálnych buniek sa veľmi v tejto fáze nemení [44]. Dĺžka fázy sa odvíja od typu média a od počiatocnej veľkosti inokula [43].

Exponenciálna fáza (niekedy nazývaná aj logaritmickej) je charakterizovaná zdvojením buniek. Bunky cyanobaktérií počas exponenciálnej fázy rastú a delia sa a pokiaľ ich rast nie je limitovaný množstvom živín, delenie bude pokračovať v konštantnej rýchlosti, takže aj počet buniek aj populácia sa bude zvyšovať dvojnásobne každú nastávajúcu časovú periódu. Exponenciálny rast nemôže pokračovať donekonečna keďže z média sa výživa postupne spotrebúva a hromadí sa odpad (strata esenciálnej výživy vedie k formovaniu inhibujúcich produktov– napr. organických kyselín) [43].

Potom nastáva stacionárna fáza, kde sú stupeň rastu a úmrtie buniek rovnaké. Práve v stacionárnej fáze nastáva produkcia PHA a celkových sekundárnych metabolitov pri limitácii N, P a dostatku uhlíkového substrátu [40, 45]. Výskumy ukazujú, že počas stacionárnej fázy zároveň so zvyšovaním koncentrácie PHB, dochádza k zníženiu biomasy. Zvyšovanie koncentrácie PHB počas stacionárnej fázy je možné pozorovať aj voľným okom, kedy dochádza k zmene sfarbenia kultúry zo zelenej na žltú. Podľa štúdie *Troschl* a kol. (2018) dochádza k zníženiu fykocyanínu a naopak, k zvyšovaniu karotenoidov. Platí, že čím dlhšie prebieha kultivácia siníc, tým vyššie množstvo PHB obsahujú [41].

Poslednou fázou je fáza poklesu, alebo fáza úmrtia, počas ktorej dochádza k odumieraniu buniek. Odumieranie je najčastejšie spôsobené nedostatkom živín, ale príčinou môžu byť aj vonkajšie podmienky ako teplota okolia, alebo znížená tolerancia okolitých podmienok pre daný druh, poprípade metabolity, či iné škodlivé vplyvy [40].

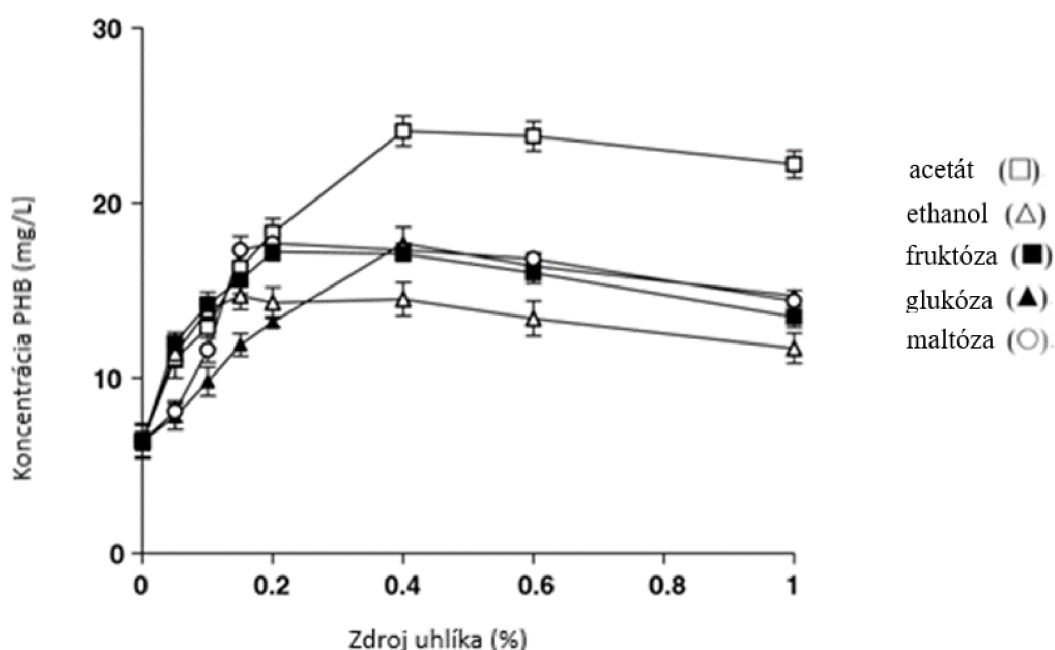
2.2.3 Faktory ovplyvňujúce zvýšenú tvorbu polyhydroxyalkanoátov

2.2.3.1 Zdroj uhlíka

Ako už bolo niekoľko rát zmienené, množstvo vyprodukovaného polyhydroxyalkanoátu sa líši u rôznych druhov cyanobaktérií a v závislosti na podmienkach ich kultivácie. Napríklad pri oxide uhličitom ako zdroji uhlíka bol dosiahnutý obsah 6% z vysušenej biomasy,

s výnimkou *Synechococcus* sp. MA19, kde bola zaznamenaná akumulácia 27 hm. % PHB. Avšak, pri limitnom množstve fosfátu dosahoval výťažok v štúdií *Panda a Mallick* (2006) PHB až 55 hm.%. Zvýšená produkcia PHB bola zistená aj pri mixotrofných podmienkach s acetátom u *Synechocystis* sp. PCC 6803 – do 15 hm.%. V prípade nedostatku fosfátu sa akumulácia PHB v prítomnosti acetátu vyšplhala na až 29 hm. % [34].

Panda a kol. vo svojej štúdií (z roku 2005) využili viacero typov uhlíkových zdrojov, aj pre *Synechocystis* sp. PCC 6803, ktoré mali podporovať tvorbu PHA. Jednalo sa o glukózu, maltózu, acetát, etanol a fruktózu v koncentráciách od 0,2 do 0,6 % (Obrázok 7) [46].



Obrázok 7 Závislosť rozličných koncentrácií rozdielnych zdrojov uhlíka na akumuláciu PHB pri *Synechocystis* sp. PCC 6803 v priebehu 14 dennej inkubácie [46]

Najvyššia akumulácia PHA bola zistená pri médiu s 0,4 % acetátu ako uhlíkového zdroja. Cyanobaktérie produkovali a akumulovali PHA v rozmedzí 20–30 hm. % z vysušenej biomasy [46].

2.2.3.2 Abiotické faktory

Ako už bolo niekoľko krát spomínané, rast baktérií a akumulácia PHA môže byť ovplyvnená vonkajšími podmienkami, ktoré môžu byť rozdelené na biotické a abiotické faktory. Biotické faktory zahŕňajú prítomnosť patogénov (ako baktérie, huby, vírusy), abiotickými faktormi sú teplota, pH, salinita, množstvo nutričov v médiu (fosfor, dusík) a svetlo [47].

Intenzita svetla patrí medzi najdôležitejšie faktory v procese fotosyntézy, s čím priamo súvisí rast mikroorganizmov a tvorba PHA, vrátane iných sekundárnych metabolitov. V otvorených kultúrach slnečné svetlo prechádza priamo do kultúry, ale môže sa stať, že dôjde k nerovnomernej distribúcií v médiu. Oproti tomu vo fotobioreaktoroch a pri lampách dochádza k lepšej distribúcií svetla. Intenzita svetla môže byť ovplyvnená hustotou a pigmentáciou buniek [48, 49].

Rovnako ako intenzita žiarenia, tak aj teplota ovplyvňuje metabolické procesy a rýchlosť biologických reakcií. Niektoré štúdie poukázali, že termostres pri iniciách zvyšuje akumuláciu lipidov a PHA [47].

Ďalším dôležitým faktorom je pH média. U väčšiny baktérií sa pH optimum pohybuje v rozmedzí 7,0–9,0. Nesprávne pH môže zapríčiniť fyziologické zmeny v baktériách, preto je dôležité udržiavať optimálne pH [50].

Špecifické požiadavky na mieru salinity závisia od druhu mikroorganizmov. Zmeny v obsahu solí majú vplyv na rast a zloženie baktérií z dôvodu osmotického stresu a zmien v membránovej priepustnosti iónov [47]. Podľa *Li a kol.* (2009) osmostres zvyšuje syntézu karotenoidov a lipidov a je priamo spojený s produkciu PHA [51].

2.3 Kvalitatívne a kvantitatívne metódy stanovenia PHA v súčasnosti používané u cyanobaktérií

2.3.1 Plynová chromatografia ako referenčná technika

Na stanovenie PHA sa najčastejšie využíva práve metóda plynovej chromatografie s plameňovou ionizačnou detekciou, alebo v tandemovom spojení s hmotnostnou spektrometriou (GC/MS), ktorá je vhodná na kvalitatívnu aj kvantitatívnu analýzu –jedná sa o spoľahlivú a presnú, avšak časovo náročnú metódu, pri ktorej je potrebné derivatizovať polymér [52].

Časová náročnosť plynovej chromatografie spočíva v úprave vzoriek. Nie je možné stanoviť samotný polymér PHB (z dôvodu nemožnosti jeho uvedenia do plynného stavu), preto je stanovovaný jeho derivát– napr. methyl-3hydroxybutyrát, v čom spočíva ďalšia nevýhoda tejto techniky. Aby mohol byť polymér derivatizovaný, musí najskôr dôjsť k jeho rozpusteniu v nepolárnom rozpúšťadle, akým je najčastejšie chloroform (CHCl_3), ktorý je karcinogénny a toxický. Ďalej sa pri úprave často používa methanol a koncentrovaná kyselina sírová, podobne ako v štúdií u *Manangan, Shawaphun* a kol. (2010). Pri tejto štúdií na stanovenie obsahu PHA, autoripoužili vzorky zo sušenej biomasy, ktoré rozpustili v chloroforme, pridali

inertný štandard (methylbenzoát), methanol a koncentrovanú kyselinu sírovú. Vzorky boli zohrievané v olejovom kúpeli pri 100°C po dobu 2 hod. Po ochladení vzoriek na laboratórnu teplotu, boli premyté vodou a nasýteným roztokom hydrogenuhličitanu sodného (NaHCO₃), vysušené pomocou Na₂SO₄ a následne prefiltrované. Takto pripravené vzorky boli analyzované na plynovom chromatografe s plameňovým ionizačným detektorom (FID) [53].

Podobne to bolo v štúdií u *Bhati a Mallick* (2017), ktorí extrahovali vysušenú biomasu v horúcom chloroforme pri 60°C a postupovali podľa staršieho protokolu od *Yellore a Desie* (1998). Po 36 hod extrakcií, bol extrakt zrážaný v studenom diethyl ethéry a následne filtrovaný. Precipitant bol premytý acetónom a diethyl etherom pred vysušením na konštantnú váhu [54, 55].

Štúdiá iba potvrdzujú fakt, že napriek tomu, že sa jedná o najčastejšie využívanú a veľmi presnú techniku, akou PHA stanovujeme, zahŕňa pomerne veľké nevýhody spočívajúce v náročnej príprave vzorky na analýzu (časová náročnosť a toxické látky).

2.3.2 Termická analýza

Termické analýzy sa sústreďujú na stanovenie fyzikálnych a chemických vlastností analyzovaných látok, ako sú polyméry, anorganické látky (minerály, horniny), alebo lieky. Zahrňuje obecné experimentálne metódy, pri ktorých sú analyzované zmeny zloženia a vlastností študovaného materiálu pri tepelnom zaťažení. V priebehu tepelného zaťaženia dochádza u vzorky k vyvolaniu, alebo zmene intenzity procesu napr. rozkladu, chemickej reakcie, objemu. Podľa typu zmeny, ku ktorej dochádza sa nazýva aj príslušná analýza- t.j termogravimetrická analýza (meranie hmotnosti), diferenčná skenovacia kalorimetria (meranie tepelného toku), termomechanická analýza (rozmer a mechanické vlastnosti), diferenčná termická analýza (rozdiel teplôt) a pod [56, 57].

Termogravimetrická analýza

Termogravimetrická analýza spočíva v meraní hmotnosti vzorky v priebehu určitého teplotného programu. Termogravimetria je vhodnou metódou na analýzu syntetického, alebo prírodného materiálu, pri ktorom sa teplota topenia môže pohybovať až do tisícich stupňoch Celsia, v závislosti od prístroja. Pre TGA analýzu je kľúčový termický rozklad- uvoľnenie plynných degradačných produktov s tým spojený pokles hmotnosti vzorky. Pri PHA sa teplotná degradácia pohybuje v rozmedzí 160–270 °C [57].

K. Roja a kol. (2019) podrobili termickej degradácii vzorky biomasy z *Chlorella sp*, *O.salina*, *L.valderiana* a *S. elongatus*. Postupný úbytok hmotnosti nastáva až k teplote 150°C pre všetky štyri vzorky z dôvodu prítomnosti molekúl vody a taktiež aj prítomnosti nečistôt z procesu extrakcie PHA. Termická degradácia polyméru nastala pri teplotách 217°C, 238°C, 261°C a 249°C, čo záviselo od počtu monomérnych jednotiek [58]. Zatiaľ čo termická degradácia PHA získaného z cyanobaktérie *Nostoc muscorum* Agardh bola stanovaná na teplotu 223°C [55].

Meixner a kol. (2017) vo svojej štúdií termogravimetricky stanovili extrahované PHB z baktérií *Synechocystis salina* a *Cupriavidus necator* H16. Približne 5 mg vzorky umiestnili na hliníkové kelímky a zahrievali z teploty 25°C na 550°C s krokom 10°C/min, aby zistili termálnu stabilitu extrahovaného PHB a porovnali ju s komerčnými produktami. Teplota degradácie extrahovaného PHB zo *Synechocystis salina* sa pohybovala pri teplotách 259, 256 a 254°C (v závislosti od rozpúšťadla použitého na extrahovanie). Teplota degradácie PHB extrahovaného z *Cupriavidus necator* H16 bola 284°C [60].

Kovalčík a kol. v ďalšej štúdií z roku 2017 analyzovali *S. salina* technikou TGA v dvoch médiách– MM1 (minerálne médium) a DS2 (*digestate supernatant*). Komerčne vyrábaný PHB sa použil ako referencia a meranie prebiehalo do 500°C. Začiatok degradácie PHB u siníc nastal pri teplote 283°C a 281°C (degradácia referenčného PHB nastala pri 286,7°C). Rozdiel v teplotách degradácie pri oboch médiách bol malý. Médium MM1 rovnako ako médium DS2 demonštrujú termálnu stabilitu typickú pre P(3HB) v porovnaní s referenčným komerčne vyrábaným PHB [61].

Diferečná skenovacia kalorimetria

Pri diferenčnej skenovacej kalorimetrii (DSC) dochádza k skúmaniu tepelnej výmeny meraného materiálu a okolia v priebehu daného teplotného programu. Pomocou DSC sa mimo iné určujú teploty topenia, skleneného prechodu a kryštalizácie materiálov, alebo je metóda DSC využívaná pri analýze kinetiky reakcií [59]. Polyméry obecné predstavujú jedny z najčastejšie analyzovaných materiálov technikou DSC.

Dôležitým parametrom pri DSC metóde je tepelná kapacita, ktorá vyjadruje množstvo tepla dodávaného telesu, aby sa zvýšila teplota telesa o 1 K. Tepelná kapacita môže byť vyjadrená z tepelného toku a rýchlosti ohrevu. Ďalšou dôležitou veličinou je entalpia, vyjadrujúca tepelnú energiu v jednotkovom množstve látky. Entalpia je termodynamickou veličinou, ktorá súvisí s vnútornou energiou, objemom a tlakom sústavy [59, 62].

Ako už bolo spomínané, teplota skleného prechodu je jedným z dôležitých výstupných údajov z merania. Je tomu tak preto, že sklený prechod je spojený so zmenou vnútornej štruktúry materiálu. Zmena vnútornej štruktúry sa prejaví hlavne na mechanických vlastnostiach materiálu – pod teplotou skleného prechodu je materiál krehký a tvrdý. Po prekročení teploty skleného prechodu sa materiál stáva pružný a teda aj tvarovateľný. Okrem zmeny mechanických vlastností, dochádza aj k zmene tepelnej kapacity [59].

K. Roja a kol. (2019) charakterizovali izolované PHA pomocou DSC pri meraní v rozsahu teplôt od -30°C po 200°C s krokom $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Teplota skleného prechodu a teplota topenia izolovaného PHA polyméru boli stanované na $0,8^{\circ}\text{C}$ a 178°C . Pri zmene zloženia polyméru došlo k zníženiu oboch teplôt. Degradácia PHA polyméru bola zaznamenaná pri 251°C a pri 284°C došlo k úplnej degradácii PHA získaného z *Natrinema altunense* kmeňa RM-G10 [58].

V inej štúdií od Salgaonkar a Braganca z roku 2015, prostredníctvom TGA spozorovali úbytok hmotnosti okolo 241°C a celková strata hmotnosti nastala v blízkosti 305°C . DSC metóda stanovila teplotu topenia a teplotu skleného prechodu, ktoré sa pohybovali v závislosti od typu cyanobaktérie – napr. pri *Chlorella sp.* bola teplota topenia 90°C a teplota skleného prechodu (T_g) pri 6°C a pri *O. salina* sa teplota topenia pohybovala pri 116°C a T_g pri $9,35^{\circ}\text{C}$ [62].

2.3.3 Optické techniky

2.3.3.1 Spektrometria ultrafialového a viditeľného žiarenia

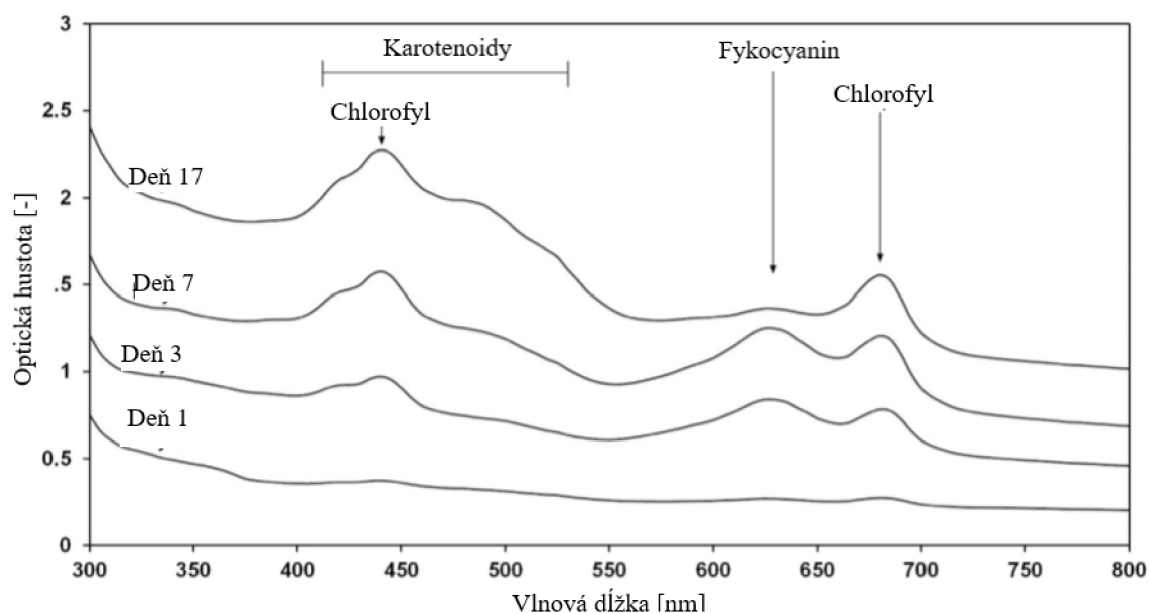
Spektroskopia v ultrafialovej a viditeľnej časti spektra (UV–VIS) je klasická analytická metóda, merajúca zmenu intenzity dopadajúceho žiarenia pri prechode vzorkou. Žiarenie má po prechode vzorkou menšiu intenzitu ako pôvodné, pretože časť energie sa absorbuje. Absorbovanie elektromagnetického žiarenia charakterizuje fyzikálna veličina absorbancia [63].

UV–VIS spektrometria sa využíva samostatne, ale často tiež ako detekcia spojená s inou technikou, ktorou môže byť napríklad vysokotlaková kvapalinová chromatografia (HPLC) [64].

Pri meraní cyanobaktérií v štúdií Carpine a kol. (2017) bola koncentrácia biomasy meraná spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 730 nm. Analýza sušenej biomasy prebehla po prípravení 10 ml odobraných z kultúry, prefiltrovaných a následne vysušených na 60°C . Hodnoty nameranej optickej hustoty (OD) boli prevedené na koncentráciu biomasy s využitím vhodnej kalibračnej krivky zo závislosti OD na hmotnosti sušenej biomasy. Výsledky sa líšili pri dvoch

rôznych médiách jednej kultúry *Synechocystis* sp PCC 6803. Jedno médium obsahovalo vyvážené množstvo živín, zatiaľ čo druhé médium bolo zbavené dusíka. Výsledky z merania optickej hustoty (OD) ukázali, že pri vyváženom médiu bol rast buniek exponenciálny počas 20 dní, zatiaľ čo tvorba PHB bola od 10 dňa konštantná a dosiahla 0,4% obsahu vysušenej biomasy. Pri médiu ochudobnenom o dusík bol naopak koncentrácia buniek nižšia, avšak tvorba PHB aj po desiatom dni stále stúpala a výsledný obsah PHB sa vyšplhal až ku 1 hm.% biomasy [33].

Metódou UV–VIS je možné stanoviť celé absorpčné spektrum, z ktorého sa dá charakterizovať absorbancia jednotlivých pigmentov obsiahnutých v cyanobaktériách. Pigmenty sa líšia absorbanciou pri rozdielnych vlnových dĺžkach. Stanoviť je možné *chlorofyl a*, absorbujúci viditeľné žiarenie pri vlnových dĺžkach 435 a 670 nm, viz na *Obrázok 8*. Okrem chlorofylu, cyanobaktérie obsahujú aj karotenoidy (beta–karotén, myxoxanthophyl, zeaxanthin), ktoré vytvárajú absorpčné píky pri vlnových dĺžkach v okolí 400–500 nm. Pri vlnovej dĺžke 630 nm absorbuje sprievodný fotosyntetizujúci pigment–fukocyanin [41].



Obrázok 8 Absorpčné spektrum CCA 192 v rôznych dňoch kultivácie [41]

2.3.3.2 *Infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou*

Infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou (FTIR) je analytická metóda, pri ktorej je merané infračervené žiarenie absorbované, alebo rozptýlené vzorkou. Analýza súvisí so zmenou rotačných a vibračných stavov molekuly v závislosti na zmenách dipólového momentu. Infračervené žiarenie sa pohybuje v rozsahu od 0,78 do 1000 nm, čo odpovedá rozsahu vlnočtu 12 800–10 cm⁻¹, pričom analyticky sa najviac využíva oblasť 4 000–400 cm⁻¹.

FT-IR nepoužíva na získanie spektra disperzné prvky ako mriežku, alebo hranol, ale interferometer. V interferometri dochádza k skladaniu dvoch lúčov do jedného svetelného lúča, z ktorého sa získa spektrum z interferogramu pomocou Fourierovej transformácie [66, 67].

K. Roja a kol. (2019) využili infračervenú spektrometriu s Fourierovou transformáciou na kvalitatívne stanovenie extraktov z rias *Chlorella sp.*, *O. Salina*, *L. Valderiana* a *S. elongatus*. Spektrum bolo merané v rozmedzí 4000–400 cm^{-1} , kde boli skúmané charakteristické funkčné skupiny. Signál pre PHA sa objavil pri vlnôčtoch 3 339 cm^{-1} , 3 348 cm^{-1} a 3 349 cm^{-1} , ktorý reprezentujú vibrácie -OH v rámci karboxylovej skupiny. Výskyt pík v okolí 2 920 cm^{-1} reprezentuje C-H vibráciu z metylovej a metylénovej skupiny v polymére. V okolí vlnôčtu 1 630 cm^{-1} bola nájdená vibrácia pre skupinu C=O. Absorbancia v regióne pri 1 400 cm^{-1} reprezentuje asymetrické a symetrické vibrácie metylových skupín prítomných vo vzorkách PHA. Píky pri 1020 cm^{-1} znázorňujú skupinu C=O v esterovej skupine. Charakteristické skupiny potvrdzujú prítomnosť PHA vo vzorkách spomínaných rias. Podobné pokusy boli dokázané aj inými výskumnými tímami (napr. *Salgaonka a Braganca*, alebo *Kavitha a kol.*) [58]. Stručný prehľad charakteristických vibračných skupín sa nachádza v *tabuľke 1*:

Tabuľka 1 Charakteristické píky pri infračervenej spektroskopii [67]

Vibrácia charakteristickej skupiny	Vlnôčet (cm^{-1})	Poznámky
Alifatické skupiny (CH_3- , $-\text{CH}_2-$)	2 900–2 850	–
Karboxylová skupina (v esterovej väzbe)	1 737	Charakteristické pre PHB
Amidy	1 540	Amid asociovaný s proteínmi
Metylové skupiny (CH_3-)	1 454, 1 379	–
Kryštalické PHB	1 229, 1 279	–
Amorfne PHB	1 189	–
Polysacharidy (C–O–C)	1 200–900	Glykogén v cyanobaktériách

2.3.4 Prietoková cytometria

Ďalšou veľmi využívanou technikou patrí prietoková cytometria, ktorá umožňuje rýchlu analýzu niekoľkých tisícov buniek za sekundu na úrovni jedinej bunky. Inštrumentácia je optimalizovaná na analýzu jednotlivých buniek. Princíp merania funguje na nasatí bunečnej suspenzie do prietokovej cely, do ktorej je privádzaná nosnou tekutinou (napr. destilovaná

voda, fyziologický roztok, pufor). Bunky sú pred samotnou analýzou v nosnej tekutine jednotlivo zoradené v rýchlej sérii. Zoradenie buniek jednotlivo za sebou sa deje pomocou tzv. hydrodynamickej fokusácie, kedy nosná kvapalina strháva bunky z centrálného jadra systému a mení tok v centrálnom jadre na parabolický tzn. najvyššia rýchlosť je uprostred, čím je ťažná sila schopná uvádzať suspenziu s bunkami do pohybu. Vzorka je ďalej ožiarená monochromatickým žiarením (laserom) a cez sústavu zrkadiel a šošoviek, žiarenie dopadá na detektor. Detektory zaznamenávajú rozptyl (priamy a bočný) a fluorescenciu. Po dopade signálu na detektor je možné získať informácie o veľkosti buniek a ich vnútornej štruktúre. Prístroj je schopný merať a odlišovať fluorescenciu, podľa definovaných excitačných a emisných vlnových dĺžok, ktoré sa líšia podľa použitého fluoroforu [68].

Medzi známe fluorofory, používané aj v tejto diplomovej práci patrí napr. nílka červená, alebo BODIPY. Pri oboch fluorescenčných sondách sa jedná o lipofilné farbivá, ktoré sa viažu na triacylglyceroly (TGA). Na základe oblasti, v akej sa pohybuje fluorescencia bodipy a nílkej červene (okolo 500 nm–závisí od typu sondy), v jednej zo štúdií- *Rumin J.* a kol. (2015) využili na identifikáciu lipidových zložiek v riasach práve spomenuté fluorescenčné farbivá, aby sa vyhli nežiaducej autofluorescencii chlorofylu (fluorescencia pri 675 ± 20 nm) [69].

Chlorofyly u rias, rovnako ako aj v prípade cyanobaktérií, môžu byť pri fluorescenčnej mikroskopii, alebo pri cytometrickom stanovení nežiaducimi, z dôvodu autofluorescencie. Autofluorescencia môže mať vplyv na signál z fluorescenčných sond a môže tak dôjsť k interferencii žiarenia, alebo k tvorbe šumu na pozadí [69]. Oba vplyvy zamedzujú spoľahlivejšiu kvantifikáciu lipidov nílskou červenou. Pri využití fluorescenčných sond, ktoré pôsobia pri určitých vlnových dĺžkach sa môže negatívne vplyvu autofluorescencie predísť. Vlnové dĺžky 450–500 nm viedli k dobrej detekcii vysoko hydrofóbných zlúčenín, ako neutrálne lipidy, zatiaľ čo vyššie excitačné vlnové dĺžky (515–560 nm) viedli k fluorescencii polárnych lipidov z interakcií s intracelulárnou membránou fosfolipidov. Avšak, prienik nílkej červene na lipofilné časti v bunkách môže byť problémový kvôli štruktúre bunkovej steny. Hrubá bunková stena pôsobí ako bariéra pre prienik nílkej červene do bunky a naviazaní sa na intracelulárne lipidy. Penetrácia do bunky tak prebieha pomaly. Interakcia nílkej červene s bunkovými zložkami (napr. proteínmi) je hlavným oneskorujúcim faktorom [69].

Naopak, lipofilné farbivo BODIPY 505/515 sa viaže iba na lipofilné časti molekuly ako sú lipidové látky a chloroplasty. Pri excitácií modrým laserom (450–490 nm) je tak červená autofluorescencia chloroplastov odlišiteľná od zelenej fluorescencie sondy BODIPY.

Pri permeácii sondy do vnútra buniek rias sa sonda BODIPY javí účinnejšia ako nílaska červeň aj pri bunkách s hrubou bunkovou stenou (ako *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella primolecta*) [69].

Stanovením obsahu PHB v baktériách pomocou prietokovej cytometria sa zaoberali vo svojej štúdií Alves a kol. (2017) použili nílsku červeň ako lipofilné farbivo pomocou ktorého by bolo možné stanoviť PHA. Avšak, pred zafarbením intracelulárneho PHB bolo potrebné, aby nílaska červeň prešla bakteriálnymi membránami. Prienik nílskej červene membránou vyriešili použitím tlmivého roztoku TBE (jednalo sa o sacharózový pufor), ktorý zlepšoval priepustnosť membrán. TBE bol aplikovaný u buniek *Synechocystis* sp. PCC 6803 a *Escherichia coli*. Optimálna úprava meraných vzoriek je pri každom druhu baktérií špecifická, preto bola práve úprava kritickým krokom pre optimalizáciu. Výsledok štúdie ukázal, že prietoková cytometria a GC, ktoré boli použité na kvantifikáciu PHB, vykazovali vysoký korelačný koeficient (R^2)- až 0,99 [70].

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Použité chemikálie a prístroje

3.1.1 Použité bakteriálne kmene

V experimentálnej časti boli použité kultúry cyanobaktérií *Synechocystis* sp. PCC 6803 a *Synechocystis salina* CCALA 192 zo zbierky autotrofných organizmov, Inštitútu botaniky, Trebon v Českej republike.

3.1.2 Použité chemikálie

1,4-butandiol, Sigma-Aldrich

BODIPY 439/503, Thermo Fisher Scientific

Dusičnan sodný, Lach-Ner

NaNO_3

Dusičnan železitý nonahydrát, Penta

$9\text{H}_2\text{O} \cdot \text{Fe}(\text{NO}_3)_3$

Hydrogenfosforečnan disodný, Lach-Ner

Na_2HPO_4

Hydrogénfosforečnan draselný

KH_2PO_4

Hydroxid sodný, Lach-Ner (ČR)

NaOH

Chlorid draselný, Lach-Ner (ČR)

KCl

Chlorid sodný, Lach-Ner (ČR)

NaCl

Chlorid vápenatý dihydrát

$2\text{H}_2\text{O} \cdot \text{CaCl}_2$

Chloroform, Lach-Ner

CHCl_3

Kyselina sírová, Penta

H_2SO_4

Methanol, VWR International (USA)

CH_3OH

Nílska červeň, Sigma Aldrich

Octan sodný trihydrát, Penta

$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

Propionát sodný, Sigma-Aldrich

Propínium jodid, eBioscience

Síran horečnatý heptahydrát (Penta)

$7\text{H}_2\text{O} \cdot \text{MgSO}_4$

Uhličitan sodný, Lach-Ner (ČR)

Na_2CO_3

γ -butyrolakton, Sigma-Aldrich

Všetky použité chemikálie boli o čistote p.a. a vyššej

3.1.3 Prístroje použité na meranie

Analytické váhy, PA224C (Ohaus)

Bežné laboratórne sklo a vybavenie

Centrifuga Hettich EBA 20 (Hettich)

Centrifuga vysokorýchlostná, HERMLE Z 36 HK (HERMLE)

Diferenčný skenovací kalorimeter DSC Q2000, TA Instruments

FT-IR spektrometer Nicolet iS50, Thermo Fisher Scientific Inc.

- jednodrazový diamantový nadstavec iS50 ATR

Laminárny box Aura mini, Bio Air Instruments

Lampa MASTER HPI-T Plus 250W/645 (Philips)

Lampa MASTERColour CDM MW Eco 230W/842 (Philips)

Mikrocentrifúga Centrifuge 5417R

Multi-Cultivator MC 1000-OD

Plynový chromatograf s plameňovým ionizačným detektorom (Thermo Scientific, Trace 1300; DB-WAX 30 m by 0,25 mm)

Prietokový cytometer (Cytex[®] Aurora, NL 2 000)

Termogravimetrický analyzátor Q5000, TA Instruments

Termostat, LS-35

Trepačka, SHO-2D, Witeg Germany

UV-VIS spektrofotometer, Hitachi U-3900H

- Integračná guľa (60mmDIA) na difúzne-transmitančné meranie
- Transmisný mód

Predvážka EW 620-3NM (Kern)

Vortex TK3S (Kartell)

3.2 Kultivácia cyanobaktérií

V diplomovej práci bolo pripravených viacero typov vzoriek určených na kvantitatívne a kvalitatívne stanovenie PHA. Na kultiváciu boli vybrané modelové cyanobaktérie *Synechocystis salina* CICALA 192 a *Synechocystis spirulina* PCC 6803. Modelové cyanobaktérie boli zaočkované do rôznych typov médií, aby sme dosiahli široké rozmedzie produkovaného PHA.

Základom všetkých kultúr je kvapálne médium 220, ktorého zloženie je nasledovné:

NaNO ₃	0,450 g
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0,025 g
NaCl	0,001 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,100 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,600 g
Roztok stopových prvkov	1,500 ml
Na ₂ CO ₃	0,200 g
KH ₂ PO ₄	0,080 g
Destilovaná voda	1 000 ml

Jednotlivé látky boli pridávané postupne v poradí až po CaCl₂·2H₂O, do polovičného objemu. Uhličitan sodný a dihydrogenfosforečnan draselný boli zmiešané zvlášť vo zvyšných 500 ml. Až po rozpustení všetkých látok, boli oba roztoky zmiešané a na záver bolo do celkového objemu pridaných 1,5 ml/l z predpripraveného roztoku stopových prvkov (*Trace element solution*).

Takto pripravené médium bolo sterilizované po dobu 35 min a po ochladení bolo do neho napipetovaných 5 obj.% inokulačnej kultúry (CCALA 192, alebo PCC 6803) v sterilnom boxe. Ako prvý experiment boli obe kultúry kultivované v štandardnom médiu 220. Kultivácia prebiehala na okne za prítomnosti slnečného žiarenia ako zdroja svetla, a to po dobu 4 týždňov. Druhý experiment prebiehal v multikultivátore, kde sa použilo médium 220 resp. médium 220 s prídavkom 2% NaCl. V treťom experimente boli pripravené heteromédiá s rôznymi zdrojmi uhlíka.

3.2.1 Multikultivátor

Na kultiváciu s využitím multikultivátoru bolo pripravených osem kultúr. V sterilnom boxe bolo odobraných 76 ml vopred vysterilizovaného média 220, do ktorého boli naočkované 4 ml z kultúr PCC 6083 (4 skúmavky) a CCALA 192 (4 skúmavky). Po zaočkovaní boli skúmavky s kultúrami umiestnené do multikultivátora so striedaním denného a nočného cyklu (16/8 hod) a s intenzitou 50 μ E .

Ďalší experiment prebiehal pri zaočkovaní kultúr PCC 6803 a CCALA 192 do média 220 a do média 220 s prídavkom soli NaCl (2%). Z oboch kultúr boli pripravené vzorky po dvoch. Očkovanie prebiehalo v sterilnom boxe, kde bol pripravený opäť 5% roztok (4 ml kultúry

do 76 ml média). Intenzita žiarenia v multikulivátore bola nastavená na 50 μ E. Zároveň bola prístrojom meraná každých 10 min optická hustota (OD). Tento experiment bol opakovaný.

3.2.2 Mixotrofné médiá

Na dosiahnutie vyššieho obsahu PHA a tiež na porovnanie fyziologického stavu u mixotrofne kultivovaných cyanobaktérií boli využité uhlíkové substráty. Tieto kultivácie prebiehali na trepačkách spolu s kontrolou, ktorá neobsahovala žiadny pridaný uhlíkový substrát. Prehľad mixotrofných médií s rozdielnym obsahom zdroja uhlíka je možné vidieť v nasledujúcej tabuľke:

Tabuľka 2 Kultúry s rozdielnym zdrojom uhlíka

Médium č.	Zdroj uhlíka	Koncentrácia [g/l]
1	Octan sodný	1
2	Octan sodný + propionát	1 + 1
3	Octan sodný + 1,4-butandiol	1 + 1
4	Octan sodný + γ butyrolalkohol	1 + 1
A	-	-

Pri kultúre označenej ako „A“ (autotrofná) sa jedná o médium obsahujúce iba Médium 220 bez pridaného zdroja uhlíka. Pred samotným zaočkovaním všetkých médií bolo potrebné upraviť pH na 7,5 kyselinou chlorovodíkovou (v koncentrácii 1 mol/l), pretože inak by bolo pH príliš vysoké a mohlo by prísť k usmrteniu kultúr.

Kultúry č. 1,2,3 a 4 boli pripravené v dvoch opakovaniach, aby kultivácia mohla prebiehať jednak pri svetle - na trepačkách so zdrojom svetla (16/8 hod) pri intenzite 250 W (neskôr boli vymenené lampy a kultivácia prebiehala pri 230 W). – tak v druhom prípade pre porovnanie tiež v tme, kedy boli banky s kultúrami obalené alobalom, z dôvodu zamedzenia prístupu svetla. Kultivácia kultúry „A“ predstavovala autotrofné médium bez prídavku cukru a prebiehala za svetla.

Kultivácia všetkých kultúr prebiehala po dobu 4 týždňov v laboratórnych podmienkach pri teplote 24°C. V priebehu kultivácie dochádzalo k sterilnému odoberaniu vzoriek na meranie optickej hustoty kultúry pri 435 nm (absorbancia chlorofylu), čím bol sledovaný rast baktérií.

3.2.3 Príprava vzoriek na analýzy

3.2.3.1 Príprava sušenej biomasy

Zo všetkých kultúr bolo odobraných približne 80 ml (ktoré neboli použité pri UV-VIS spektrofotometrické a cytometrické analýze) do plastových skúmaviek, ktoré boli následne odstredené na centrifúge pri 6 000 rpm po dobu 5 min. Po zcentrifugovaní bol supernatan zliatý a usadená kultúra bola premytá destilovanou vodou. Po premytí boli skúmavky odložené do sušiarne vyhriatej na 70°C. Sušenie biomasy trvalo min 48 h a po vysušení boli sušiny pripravené na meranie plynovou chromatografiou a infračervenou spektroskopiou (FTIR), ktorých postup bude popísaný v nasledujúcich kapitolách.

3.2.3.2 Príprava fosfátového pufru

Všetky látky použité na prípravu fosfátového pufru (ďalej iba PBS) boli spolu zmiešané v destilovanej vode. Obsah fosfátového pufru a navážené hmotnosti látok sú nasledujúce:

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Destilovaná voda	1000 ml

Výsledné pH pufru bolo upravené na 7,5.

3.2.4 Plynová chromatografia

Vzorky na analýzu metódou plynovej chromatografie boli pripravené rozpustením 8–12 mg sušiny (príprava je opísaná v predchádzajúcej podkapitole 3.2.3.1) v 1 ml chloroformu a následnom pridaní 800 µl roztoku 15 % kyseliny sírovej v methanole a kyseline benzoovej, ktorá slúži ako vnútorný štandard. Vzorky sa pripravili vo vialkách, následne boli hermeticky uzatvorené a pripravené na esterifikáciu. Esterifikácia prebieha pri 94 °C po dobu 3 hodín, za vzniku methylesteru polyhydroxybutyrátovej kyseliny.

Po ukončení esterifikácie sa vzorky v celom objeme preliali do pripraveného 0,5 ml hydroxidu sodného (0,05 M) a obsah vialiek sa pretrepal, dôsledkom čoho došlo k vyzrážaniu kyseliny sírovej a rozdeleniu vzorky na dve vzájomne nemiesiteľné fázy. Zo spodnej fázy sa odobralo 50 µl vzorky, ktorá sa zriedila s 900 µl chloroformu. Analýza takto pripravených vzoriek prebieha na prístroji s FID detektorom spojeným s hmotnostnou spektrometriou.

3.2.5 Cytometrická analýza

Na cytometrické stanovenie buniek bolo z pripravených kultúr odobraných po 1 ml vzorky. Vzorka bola zriedená na požadovaný objem (dobře narastené a vaic zakalené kultúry boli zriedené 50×, menej narastené kultúry boli zriedené 20×). Po zriedení boli vzorky premyté PBS pufrom a centrifugované pri 8 000 rpm po dobu 2 min. Vzorky boli 2krát premyté. Po premytí k nim bolo pridaných po 1 µl fluorescenčnej sondy BODIPY 439/503 (koncentrace 1 mg/ml v DMSO), alebo propídium jodidu (1 mg/ml) a nasledovala 5 min inkubácia v tme.

V prípade použitia nílskej červene boli po zcentrifugovaní vzorky fixované 1 ml 20% ethanolu pri 4°C po dobu 10 min. Po fixácii bola suspenzia 2krát premytá 1 ml PBS pufrou. Vzorky boli zriedené rovnako ako v predchádzajúcom prípade (50×) a bolo k nim pridaných po 1 µl nílskej červene. Inkubácia prebiehala v tme po dobu 15 min.

3.2.6 Spektroskopické analýzy v ultrafialové a viditeľné oblasti

Kultúry boli merané na UV-VIS spektrometri v deň ukončenia kultivácie. Z každej kultúry bolo odobraných 6 ml, ktoré boli premyté roztokom PBS (6 000 rpm, 5 min). Po premytí a zliatí supernatanu bolo doplnený fosfátový pufor na počiatkový objem a vzorka bola pripravená na meranie. Každá z pôvodných vzoriek bolo niekoľko krát riedená roztokom PBS, aby sa získala závislosť rozptýleného žiarenia na počte buniek– to, slúžilo k ďalšiemu vyhodnoteniu dát V závislosti od počiatkovej absorbancie bolo pripravených 5–10 rôznych riedení, ako je možné vidieť v *tabuľke 3*:

Tabuľka 3 Riedenie vzoriek pre UV-VIS analýzu

Roztok č.	1	2	3	4	5	6	7	8
Zriedenie	0×	10×	20×	30×	40×	50×	60×	70×

Každý roztok bol meraný na UV VIS spektrofotometri v rozsahu vlnových dĺžok 900–200 nm s krokom 0,5 nm. Týmto spôsobom boli premerane všetky pripravené roztoky s bežným zapojením spektrometra (transmisný mód, turbidimetria) a so zapojením integračnej gule (difúzne trasnmisný mód).

3.2.7 Infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou

Po vysušení vzoriek (kapitola 3.2.3.1) bolo odobrané malé množstvo na FTIR analýzu (cca 4 mg). Analýza prebiehala na FT-IR spektrometri Nicolet iS50 (Thermo Fisher Scientific Inc).

Vzorky boli merané ATR metódou na diamantovom kryštály v spektrálnom rozsahu 4 000–400 cm^{-1} . Každé zaznamenané spektrum predstavuje priemer 64 skenov s rozlíšením 2 cm^{-1} .

3.2.8 Termogravimetrická analýza

Vysušené vzorky kultúr (príprava je opísaná v kapitole 3.2.3.1) boli merané termogravimetrickým analyzátorom Q5000 od firmy TA Instruments. Vzorky boli nanesené na platinovú panvičku v množstve cca 5 mg a vložené do pece prístroja. Meranie vzorky prebiehalo vážením jej hmotnosti za súčasného zvyšovania teploty s krokom 10°C/min na konečnú teplotu 800°C. Vzorky boli analyzované v oxidačnej vzduchu.

4 VÝSLEDKY MERANÍ A DISKUSIA

4.1 Vplyv kultivačných podmienok na bunkový rast a produkciu PHB

Kultivácia mikroorganizmov prebiehala viacerými spôsobmi, a to jednak preto, aby boli získané rozdielne množstvá obsahu PHB v bakteriálnych kultúrach, ale tiež preto aby boli testované kultúry v rôznej fyziologickej kondícii. Samotné postupy kultivácie boli zo začiatku viac krát upravované a optimalizované, aby sa dosiahlo vhodné médium, v ktorom kultúry mohli niekoľko týždňov rásť.

Množstvo akumulovaného PHB bolo u všetkých vzoriek zistené plynovou chromatografiou (viď prípravu v kapitole 3.2.4) ako v súčasnosti najrozšírenejšou metódou, ktorá však so sebou nesie celú radu limitácií, viď kap. 2.3.1

Prvý experiment pozostával z kultúr kultivovaných na trepačkách za cyklu 16/8 h (svetlo/tma), takže autotrofné cyanobaktérie si boli samy schopné pomocou fotosyntézy syntetizovať cukry a tvoriť PHB bez akéhokoľvek uhlíkového zdroja. Kultivácia cyanobaktérii trvala štyri týždne, pričom bola závislá od toho, z akých kultúr došlo k zaočkovaniu. Pri použití mladých kultúr, prebiehala ich adaptácia v novom médiu dlhšie a tým pádom aj samotné kultúry rástli pomalšie, ako tomu bolo pri starších kultúrach. Vhodné na kultiváciu boli tým pádom kultúry staré minimálne 4 týždne. Výsledky prvého pokusu, kedy kultúry boli ešte zelené, môžeme vidieť v *tabuľke 4*:

Tabuľka 4 Výsledky prvého experimentu kultivácie na trepačkách

Kultúra	PHB [%]
CCALA	1,84
PCC	0,38

Pri *Synechocystis salina* CCALA 192 došlo k akumulácii vyššieho obsahu PHB, na rozdiel od *Synechocystis* sp. PCC 6803. V druhom pokuse sme kultivovali tzv. pozitívnu kontroly, ktoré mali produkovať PHB (označené ako „+“), a negatívne kontroly, kedy kultúry nemali tvoriť PHB, resp. ho tvorili iba v malom množstve. Hmotnostný obsah PHB u týchto kultúr je uvedený v nasledujúcej tabuľke.

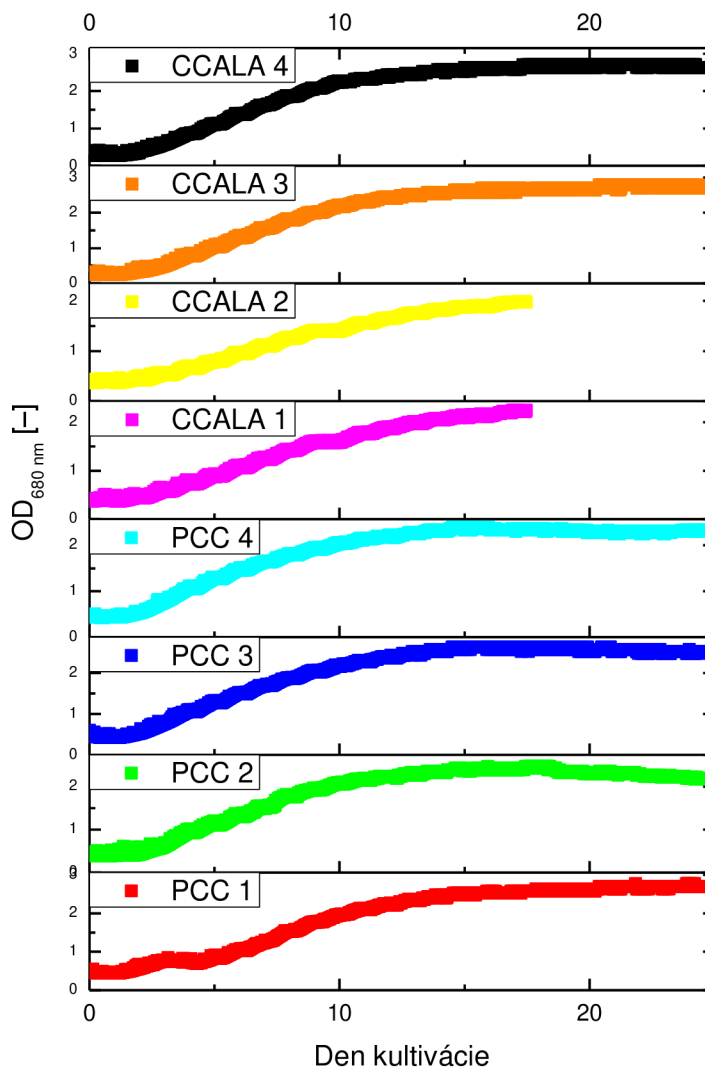
Tabuľka 5 Obsah PHB pri pozitívnej a negatívnej kontrole

kultúra	PHB [%]
PCC +	1,10
CCALA +	12,99
PCC-	0,60
CCALA -	0,25

Pozitívna kontrola sa u CCALA 192 vyšplhala takmer na 13% z hmotnosti vysušenej biomasy, pričom u PCC 6803 to bolo 1 hm %. Pri negatívnej kontrole sa obsah PHB u oboch kultúr pohyboval pod 1 hm.% a kultúry boli sfarbené na tmavozeleno. Pri kultúrach, ktoré obsahovali vyššie množstvá PHB bola charakteristická zmena sfarbenia. Tú bolo možné pozorovať voľným okom, kedy sa tmavozelené kultúry sfarbili do žltá.

V druhom experimente boli vzorky umiestnené do multikultivátora vo veľkých 100 ml skúmavkách, pričom boli osvietené wolframovými žiarovkami po celej dĺžke skúmavky o intenzite žiarenia 50 μ E. Okrem klasického kultivačného médiá 220 bolo pri každej kultúre použité aj médium 220 s 2% obsahom soli NaCl. Motivácia prídavku soli bola za účelom stresovej odpovedi baktérií vo forme intenzívnejšej tvorby PHB granúl. Baktérie sa týmto spôsobom bránia voči zvýšenému osmotickému stresu spôsobeného prítomnosťou NaCl [73].

Počas tohto experimentu bola zo začiatku meraná aj optická hustota všetkých kultúr každých 10 min pri 680 nm. Rastová krivka je zobrazená na nasledujúcom obrázku.



Obrázok 9 Priebeh rastu CCALA 192 a PCC 6803 v multikultivátore, čísla 1 a 2 platia pre kultúry v médiu 220, čísla 3 a 4 označujú médiá s 2% prídavkom NaCl

Podľa rastovej krivky môžeme vidieť, že do 4 dňa sa rast buniek výrazne nemení. Kultúry sú v tzv. lag fáze. Po štvrtom dni dochádza k exponenciálnej fázy, resp. k fázy intenzívneho rastu cyanobaktérií. Rastová krivka je meraná iba do 25 dňa kultivácie, kedy je vidieť, že exponenciálna fáza rastu už prešla do stacionárnej fázy. V stacionárnej fáze dochádza k produkcii a akumulácii polyhydroxyalkanoátov v bunkách. V prípade CCALA 1 a CCALA 2 (Tabuľka 7), kedy sa jedná o kultúry v médiu 220, bez prídavku chloridu sodného, bola kultivácia ukončená ešte vo fáze rastu. Dôvodom je, že tieto kultúry sa uchytili neskôr, ako ostatné, čo značí aj nižší obsah PHB v porovnaní s prvým pokusom v tabuľke 6. Pri prvom pokuse (Tabuľka 6) sa obsah PHB vyšplhal u CCALA takmer na 20% z hmotnosti vysušenej biomasy, zatiaľ čo pri druhom pokuse (Tabuľka 7) obsah PHB pri rovnakej kultúre a rovnakom médiu dosahoval 0,72 resp. 2,51%.

Výsledné množstvá akumulovaného PHB sú zobrazené v nasledujúcich tabuľkách.

Tabuľka 6 Obsah PHB z multikultivátora č.1

Kultúra	PHB [%]
CCALA 1t	0,00
PCC 1t	0,00
CCALA 4t	19,53
PCC 4t	3,54

Tabuľka 7 Obsah PHB z multikultivátora č.2

Kultúra	PHB [%]
PCC 1	5,67
CCALA 1	2,51
CCALA 2	0,72
S NaCl (2%)	
PCC 3	4,44
PCC 4	4,22
CCALA 3	7,77
CCALA 4	5,84

Pri kultivácii *Synechocystis* sp. PCC 6803 (PCC 1) bolo množstvo PHB 5,67 hm% v médiu 220 (dvojica–PCC 2 z toho istého média bola kontaminovaná, preto sa s ňou ďalej nepracovalo). Pri oboch médiách s 2% prídavkom NaCl bol obsah PHB výrazne vyšší ako pri obyčajných médiách.

V treťom opakovaní experimentu boli dosiahnuté vyššie množstvá PHB, ako možno vidieť v nasledujúcej tabuľke.

Tabuľka 8 Obsah PHB z multikultivátora č.3

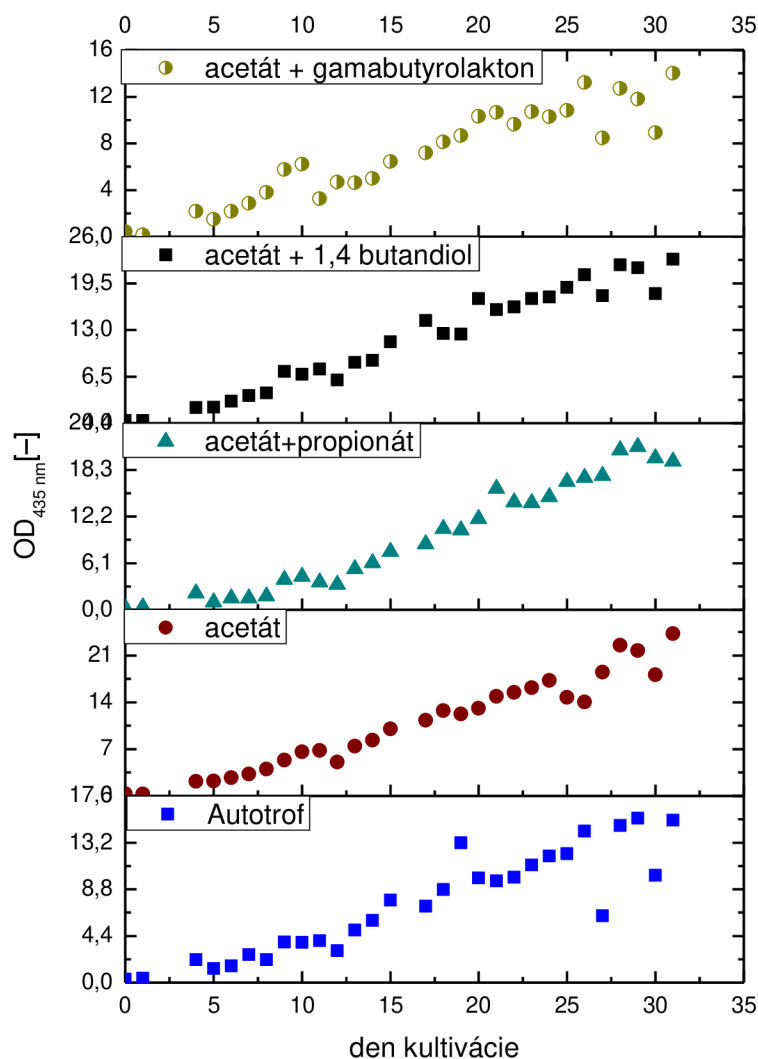
Kultúra	PHB [%]
PCC 1	3,31
PCC 2	2,37
CCALA 1	9,37
CCALA 2	9,58
S NaCl (2%)	
PCC 3	3,55
PCC 4	3,27
CCALA 3	12,60
CCALA 4	11,88

Kultúry sa v tomto prípade všetky pomerne rýchlo uchytili a rástli 35 dní, čo je o 7 dní viac ako v predchádzajúcom prípade. Medzi obyčajným médiom 220 v prípade kultúry *Synechocystis salina* CCALA 192 a médiom s prídavkom soli je vidieť rozdiel v obsahu PHB pri porovnaní s *tabuľkou 7*. Kultiváciou CCALA 192 v médiu 2% NaCl bolo dosiahnutých cca 12 hm. % PHB. Rozdiel medzi pokusmi je pravdepodobne spôsobený zaočkovaním média z nerozrastenej kultúry, keďže všetky ostatné podmienky kultivácie boli rovnaké.

Z oboch pokusov je pri tom jasné, že prídavok soli výrazne zvyšuje tvorbu PHB granúl. S obsahom PHB pri kultúre *Synechocystis salina* CCALA 192 sme sa v tomto experimente dostali až na 12 hm.% PHB, čo je pri cyanobaktériách v rámci týchto pokusov pomerne vysoké číslo. Rovnako tak aj pri kultúre *Synechocystis* sp. PCC 6803 bol obsah PHB takmer o 1 hm.% vyšší, ako pri kultúre v štandardnom médiu.

V poslednom, treťom experimente prebiehala mixotrofná resp. heterotrofná kultivácia s použitím médií, ktoré obsahovali acetát, propionát, 1,4-butandiol a γ -butyrolakton, ako pridaného zdroja uhlíka. Kultivácia heterotrofných médií prebiehala po celý čas v tme, čo malo viesť k rastu siníc iba na uhlíkovom zdroji bez akéhokoľvek príspevku fotosyntetického využitia svetelného žiarenia. Avšak, v priebehu prvého týždňa sa ukázalo, že tento experiment vedie k úsmrteniu kultúr.

Keďže sinice ako autotrofné organizmy potrebujú aspoň nejaký zdroj svetla, zvolila sa varianta s použitím kultivačného média 220 obohateného o spomenuté uhlíkové substráty, ktoré bolo vystavené svetelnému žiareniu o intenzite 250 W (neskôr 230 W). Na nasledujúcom obrázku (*Obrázok 10*) sú vidieť rastové krivky (v tomto prípade vyjadrené ako postupný nárast optickej hustoty pri 435 nm) v priebehu kultivácie CCALA 192.



Obrázok 10 Mixotrofná kultivácia kultúr CCALA 192

Optická hustota bola meraná spektrofotometricky vždy po 24 hod v rovnakom čase, aby bolo možné sledovať priebeh rastu kultúr. Podľa Obrázok 10 najrýchlejšie rástla kultúra v médiu s acetátom a propionátom a najmenej sa OD_{435nm} zvyšovala pri médiu s acetátom a γ -butyrolaktonom. Akonáhle sa OD_{435nm} prestala zvyšovať, bunky baktérii sa ocitli v stacionárnej fázy, kedy začali akumulovať PHA. Stacionárna fáza začala v tomto prípade od 28 dňa kultivácie. Výsledný obsah PHB u jednotlivých médií je možné vidieť v tabuľke (Tabuľka 9).

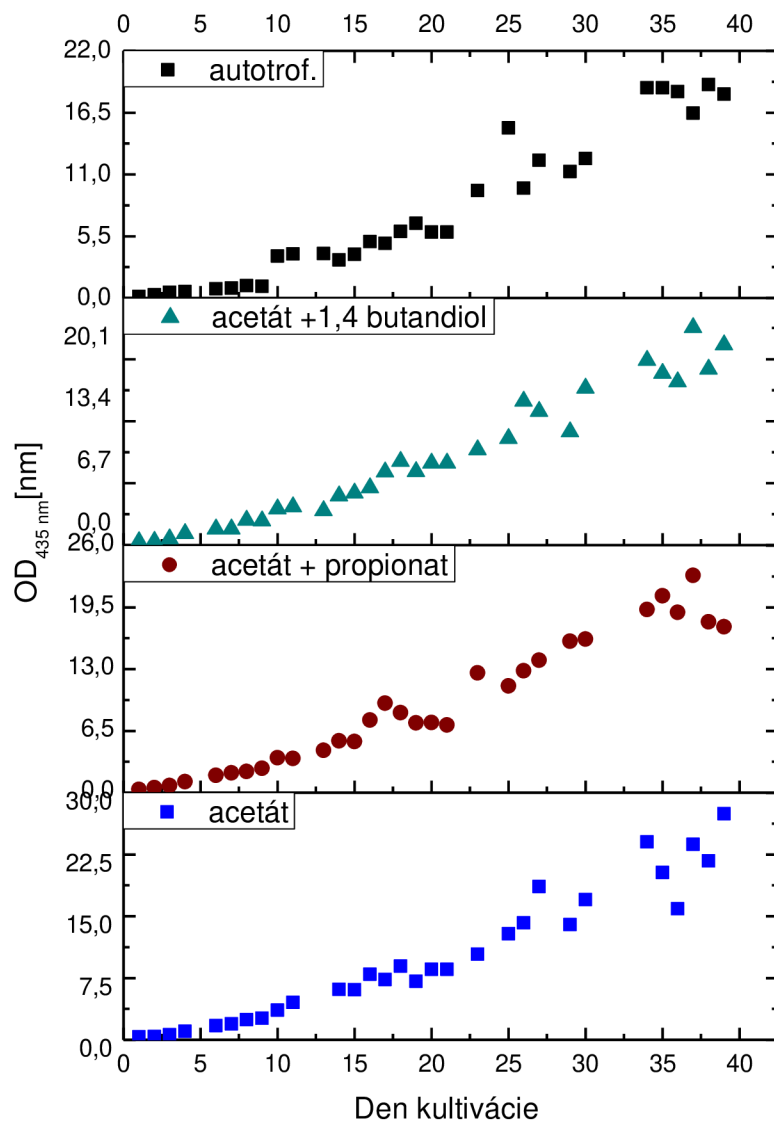
Tabuľka 9 Obsah PHB u mixotrofných médií CCALA 192

Médium	Značenie	PHB (%)
Autotrofné médium	A	7,76
acetát	1M	15,67
Acetát +propionát	2M	15,09
Acetát+ 1,4–butandiol	3M	21,91
Acetát + γ–butyrolakton	4M	15,94

Najvyššia produkcia nastala pri médiu s obsahom acetátu a 1,4–butandiolu, kedy sa obsah PHB vyšplhal na takmer 22 hm%, čo bolo najviac v tejto diplomovej práci.

Kultivácia kultúry *Synechocystis* sp. PCC 6803 prebiehala vo dvojiciach. Použité boli rovnaké zdroje uhlíka ako pri CCALA 192. Kultúra sa v médií s prídavkom acetátu a γ –butyrolaktonu neuchytila a po týždni bola vyradená z experimentu. Pred ukončením kultivácie však bolo zamerané jej pH, ktoré dosahovalo hodnoty 6,56 v jednej banke a 6,33 v druhej. Treba pripomenúť, že na začiatku sa pH všetkých médií pohybovalo okolo 7,5. Nižšie hodnoty pH môžu značiť vytvorenie kyslých organických zlúčenín, pravdepodobne z uhlíkového zdroja (γ –butyrolaktonu), ktoré cyanobaktérie vyprodukovali svojimi biosyntetickými dráhami.

Rovnako ako v prípade CCALA 192 bola stanovená rastová krivka s pravidelným meraním optickej hustoty (Obrázok 11). Kultúry *Synechocystis* sp. PCC 6803 ale rástli pri dennom svetle a lampa bola použitá až v poslednom týždni kultivácie. Samotná kultivácia trvala celkom 7 týždňov.



Obrázok 11 Mixotrofná kultivácia kultúr PCC 6803

Analýze na obsah PHB predchádzala zmena sfarbenia zo smaragdovo zelenej na žltú, ktorá nastala pri médiu 1 (acetát) a médiu 2 (acetát+ propionát). V médiu acetátu s 1,4 butandiolom, rovnako ako v autotrofnom médiu táto zmena nenastala a tak je pravdepodobné, že ich kultivácia bola ukončená predčasne, aj napriek dobe trvania kultivácie. Médium s acetátom a 1,4-butandiolom bolo zo začiatku tiež kultivované v dvojici, ale v priebehu kultivovania jedna banka s kultúrou prestala ďalej rásť, tak sme ju taktiež museli vyradiť z experimentu. Výsledné množstvá PHB mixotrofných médií PCC 6803 sa nachádzajú v *tabuľke 10.*

Tabuľka 10 Výsledné množstvá PHB u mixotrofných médií kultúry PCC 6803

Médium	Označenie	PHB (%)	
		a	b
Autotrofné médium	A	0,12	0,91
acetát	1	7,45	7,53
Acetát +propionát	2	9,99	9,49
Acetát+ 1,4–butandiol	3	8,57	-

Rovnako ako pri *Synechocystis salina* CCALA 192 nastala aj v tomto prípade u mixotrofných médií s prídavkom zdroja uhlíka zvýšená produkcia polyhydroxybutyrátu. Kultúre PCC 6803 podľa výsledkov vyhovovali iné typy uhlíkové substrátu a to- acetát s propionátom, pri ktorom sa dosiahol obsah takmer 10 hm.% PHB. Médium acetátu v kombinácii s 1,4 butandiolom malo výsledný obsah menší o 1%– teda 8,5 hm.%. Obsah PHB v médiu so samotným acetátom bol stanovený na 7,5 hm % Výsledné obsahy PHB pri kultúre PCC 6803 sú takmer o polovicu menšie ako je to v prípade CCALA 192.

Výsledky uvedené v tejto kapitole dobre ilustrujú, že cyanobakteriálna produkcia PHB predstavuje zložitý biotechnologický proces, ktorý je aj napriek kontrole kľúčových kultivačných parametrov (ako typ, intenzita a cyklus osvit, použité kultivačné médium, dĺžka kultivácie) komplexný a ťažko reprodukovateľný. Na druhú stranu, keďže cieľom tejto práce nebolo jednoducho maximalizovať produkciu PHB, ale vytvoriť čo najširšiu a najrozmanitejšiu vzorkovú základňu pre následné fyzikálne-chemické a spektroskopické charakterizácie bunkových kultúr, je možné konštatovať, že uvedenou kombináciou kultivačných procedúr sa podarilo vytvoriť bohatú kolekciu vzoriek nie len z hľadiska obsahu PHB, ale aj obecné z hľadiska ich fyziologického stavu. Vďaka tomu boli v naväzujúcich experimentoch analyzované vzorky získané v rôznych fázach rastu, s rôznym obsahom sekundárnych metabolitov (PHB, glykogén) s rôznym zložením a obsahom pigmentov a pod. To je výhodné predovšetkým pre zhodnotenie informačného prínosu jednotlivých testovaných techník nie len s ohľadom na obsah PHB, ale aj na ďalšie chemické a štruktúrne charakteristiky cyanobakteriálnych buniek.

4.2 Prietoková cytometria

Prvou metódou, ktorou boli získané kultúry charakterizované, bola prietoková cytometria. Dôvod, prečo sme sa rozhodli vyskúšať práve prietokovú cytometriu bol taký, že existuje široký výber rôznych typov lipofilných sond, ktoré sa môžu naviazať na intracelulárne PHB.

Predpokladali sme, že čím väčšie množstvo PHB budú vzorky obsahovať, tým bude fluorescencia lipofilní sondy intenzívnejšia, takže by táto metóda mala byť využiteľná na kvantitatívne stanovenie PHB. Mimo to, je samotná analýza a príprava vzoriek na meranie pomerne rýchla a nenáročná. Vzorky kultúr boli pred meraním premyté, nariadené na požadovaný objem a následne analyzované v kvapalnom stave.

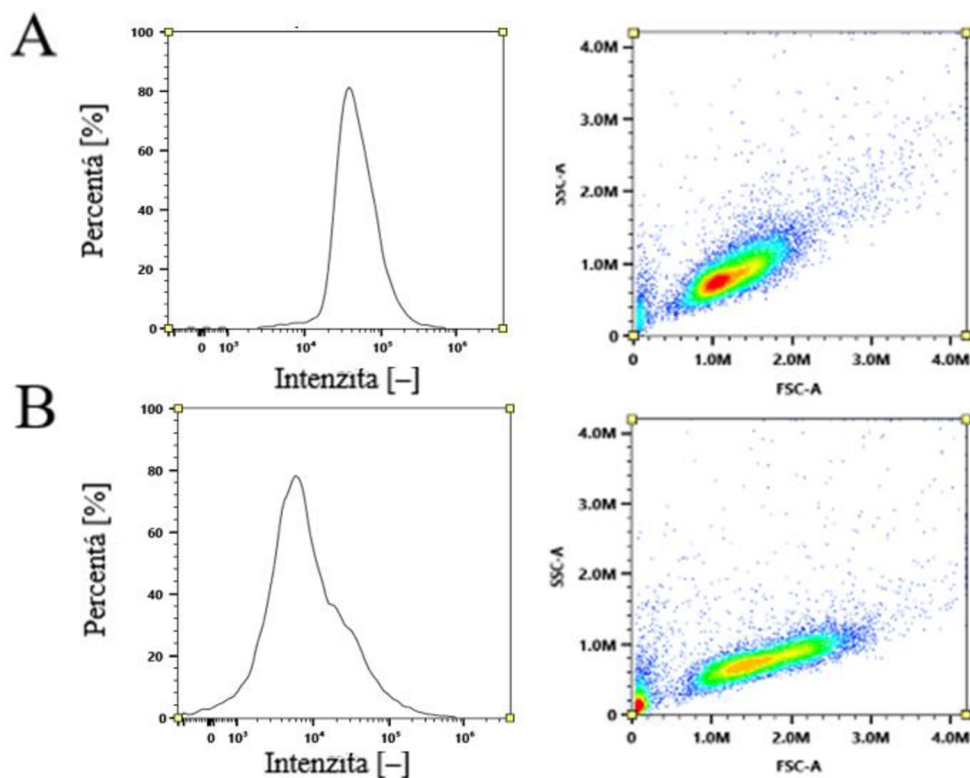
To predstavuje výraznú výhodu oproti náročnej príprave vzorky pre referenčnú techniku plynovej chromatografie. Na rozdiel od nej by bolo možné cytometrické stanovenie použiť aj ako skriningovú techniku *off-line* monitoring obsahu PHB priamo v priebehu kultivácie. Okrem toho táto analýza automaticky umožňuje stanovenie počtu buniek, čo predstavuje ďalší kľúčový kultivačný parameter (napr. ako paralelna technika na stanovenie rastovej krivky). Špecifickou vlastnosťou cyanobakteriálnych buniek z hľadiska ich cytometrickej analýzy je obsah celej rady charakteristických fluoroforov (predovšetkým fotosyntetických pigmentov). To síce na jednu stranu komplikuje výber cytometrických sônd a omezuje ich použiteľnosť iba na tie, u ktorých nedochádza k prekryvu týchto fluoroforov. Na druhú stranu to však umožňuje rozšíriť celkovú informáciu, získanú z cytometrickej analýzy, o parametre autofluorescencie charakterizujúce zloženie a obsah pigmentov v bunke.

V rámci optimalizácie techniky pre použitie k analýze cyanobaktérií boli testované rôzne fluorescenčné sondy ako propidium jodid, nílaska červená a BODIPY 439/503. Propidium jodid stanovuje viabilitu buniek, ktorá pre nás v tejto práci nebola zcela relevantná, ale môže byť kľúčová napr. v prípadoch, kedy sa pre ovplyvnenie fyziologického stavu testovaných vzoriek použije expozícia kultúry intenzívnej dávke určitého stresového faktoru. Pri použití nílskej červene ako sondy reagujúcej na obsah PHB bolo nutné fixovať premyté vzorky ethanolom, aby sa lipofilná sonda dostala do vnútra buniek a mohla sa tak naviazať na intracelulárne granule. Pri použití fluorescenčnej sondy BODIPY 439/503, nebolo treba vzorky špeciálne upravovať (viď kapitolu 3.2.5) a inkubácia sondy trvala iba 5 minút. Preto, sme sa v ďalších pokusoch rozhodli používať práve BODIPY 439/503.

Z výsledkov merania bolo okrem analýzy fluorescenčného signálu farbiva (viz ďalej) na základe merania rozptylu svetla vyhodnotené, koľko buniek sa v jednotlivých médiách nachádzalo. Dáta boli neskôr použité pri vyhodnocovaní turbidimetrie, rozptylu žiarenia na bunkách (viď kapitolu 4.3.1.2).

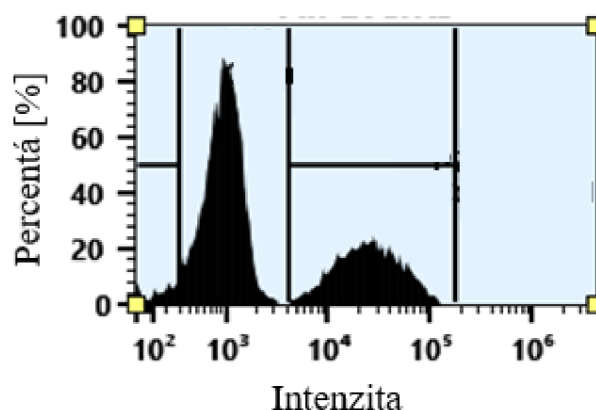
Použitá fluorescenčná sonda BODIPY 439/503, je hydrofóbná fluorescenčná sonda, ktorá sa inkorporuje do lipofilných komponentov bunky, ako sú napr. PHA granule. Keďže sa sonda vyznačuje intenzívnou zelenou fluorescenciou, ktorá sa pohybuje v emisnej/excitačnej oblasti

493/503 nm, je možné ju použiť aj pri mikroorganizmoch obsahujúcich chlorofyl. Na základe literatúry bola použitá koncentrácia 1 mg.ml^{-1} , vďaka čomu bola optimálna hodnota fluorescence. Vyššie koncentrácie by mohli viesť k samozhášaniu fluorescence. Autofluorescencia chlorofylu u baktérií sa pohybovala v oblasti 435 a 675 nm, čo nemalo vplyv na fluorescenčne značené hydrofóbne časti siníc (ako sú spomínané PHA granule). Keďže sonda sa môže naviazať aj na iné hydrofóbne časti buniek akými sú granule (napr. bunková stena), výstupom merania bola stredná hodnota fluorescence BODIPY 439/503.



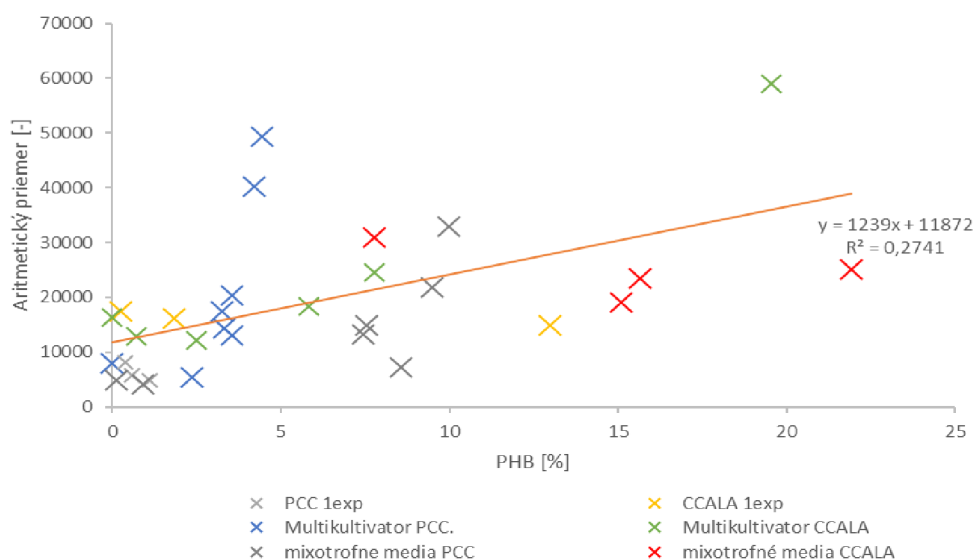
Obrázok 12 Histogramami a cytogramami kultúr CCALE 192 (obr. A) a PCC 6803 (obr. B)

Na obrázku 12 je vidieť ukážku histogramov a cytogramov oboch kultúr kultivovaných v multikultivátore. Väčšina histogramov vyzerala podobne a vo výsledku bola často iba jedna populácia. Pri autotrofných médiách (kultivovaných v experimente č.3 spolu s mixotrofnými médiami), ktoré obsahujú iba kultúru CCALE 192, poprípade PCC 6803, bolo vidieť dve populácie, vid' Obrázok 13.



Obrázok 13 Histogram kultúry kultivovanej v autotrofnom médiu s dvomi populáciami

Výsledné aritmetické priemery intenzity fluorescencie sondy boli vynesené do závislosti na % obsahu PHB, aby sme zistili, či existuje nejaká korelácia medzi touto metódou a referenčnou hodnotou získanou plynovou chromatografiou. Pri kultúrach v autotrofnom médiu (kultivovaných v rámci mixotrofných kultivácií) ktoré obsahovali dve populácie bola stredná hodnota vyrátaná z intenzity BODIPY 439/503 v jednotlivých populáciách, ktoré boli vynásobené počtom buniek, nachádzajúcich sa v daných populáciách. Výsledok bol podelený celkovým počtom buniek. Graf aritmetického priemeru intenzity fluorescencie BODIPY 439/503 na obsahu PHB je vidieť nižšie (Obrázok 14). Korelácia medzi metódami je nízka-koeficient spoľahlivosti R^2 sa rovná 0,2741, čo môže byť príčinou ďalších hydrofóbných častí buniek, ktoré sa zafarbiajú použitou sondou (napr. membrány, tylakoidy a pod).



Obrázok 14 Závislosť aritmetického priemeru intenzity BODIPY 439/503 na PHB

Ako už bolo zmienené predtým, autofluorescenčný signál tých fluoreskujúcich pigmentov u siníc, ktoré sú excitované pri vlnových dĺžkach použitých pri cytometrickej analýze môžu byť ďalším dôležitým údajom, ktoré by sa dali získať prietokovou cytometriou. Rovnako, ako v prípade BODIPY 439/503 bol zisťovaný aj aritmetický priemer intenzity chlorofylu, β -karoténu a fykocyanínu z príslušných kanálov, prehľad je v *Tabuľka 11*

Tabuľka 11 Prehľad excitačných a emisných dĺžok vybraných pigmentov [71]

Pigment	Excitačná vlnová dĺžka (nm)	Emisná vlnová dĺžka (nm)	Stredná vlnová dĺžka (nm)
Chlorofyl	651	678	664
	669	687	678
β-karotén	451	466	458
	518	539	528
Fykocyanin	606	630	618

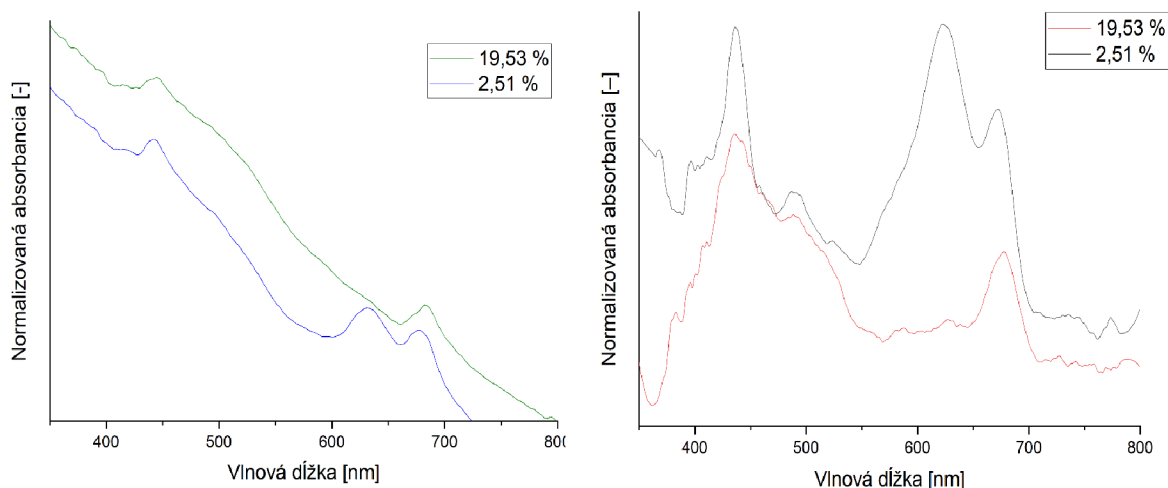
Celkové priemery, ktoré boli zistené v niektorých prípadoch aj z dvoch, alebo troch populácií boli neskôr použité v analýze hlavných komponentov a porovnané s výstupom UV-VIS spektroskopickkej analýzy v difúzne-transmitančnom móde (kapitola 4.5).

4.3 Spektrofotometrické techniky

4.3.1 Spektrofotometrické analýzy

Spektroskopiou v ultrafialovej a viditeľnej oblasti (ďalej UV–VIS) boli merané absorbancie na vzorkách zriedených a neriedených kultúr cyanobaktérií. Kultúry boli merané v kvapálnom stave, takže nebola potrebná časovo náročná úprava vzorky, viz kapitolu 3.2.6. Meranie prebiehalo priamo, v transmisnom móde, a pri zapojení s integračnou guľou (v difúzne transmisnom móde). V oboch prípadoch bola výstupom merania transmitancia, tj. relatívne množstvo svetla, ktoré prešlo vzorkou. Pri prvom type merania (t.j. transmisný mód) je toto žiarenie detekované iba v smere šírenia pôvodného lúča, zatiaľ čo v prípade difúzne transmisného módu je vďaka použitému guľovému integračnému zrkadlu, detekovaný celý rozptylový kužeľ vychádzajúci v smere z analyzovanej vzorky. Z toho dôvodu je možné využiť transmisný mód na turbidimetrické meranie – žiarenie rozptýlené na bunkách, prípadne na ich vnútornej štruktúre nie je detekované a prispieva k hodnote zdanlivej absorbance (vypočítanej ako záporný logaritmus transmitancie nameranej pre danú vlnovú dĺžku žiarenia). Meranie

v difúzne transmisnom móde oproti tomu minimalizuje vplyv rozptylu svetla a vďaka tomu zvyšuje citlivosť fotometrického stanovenia komponent, ktoré žiarenie v analyzovanej oblasti absorbujú (u viditeľnej časti spektra chromoforov, ktoré dávajú bakteriálnej kultúre jej charakteristickú farbu).

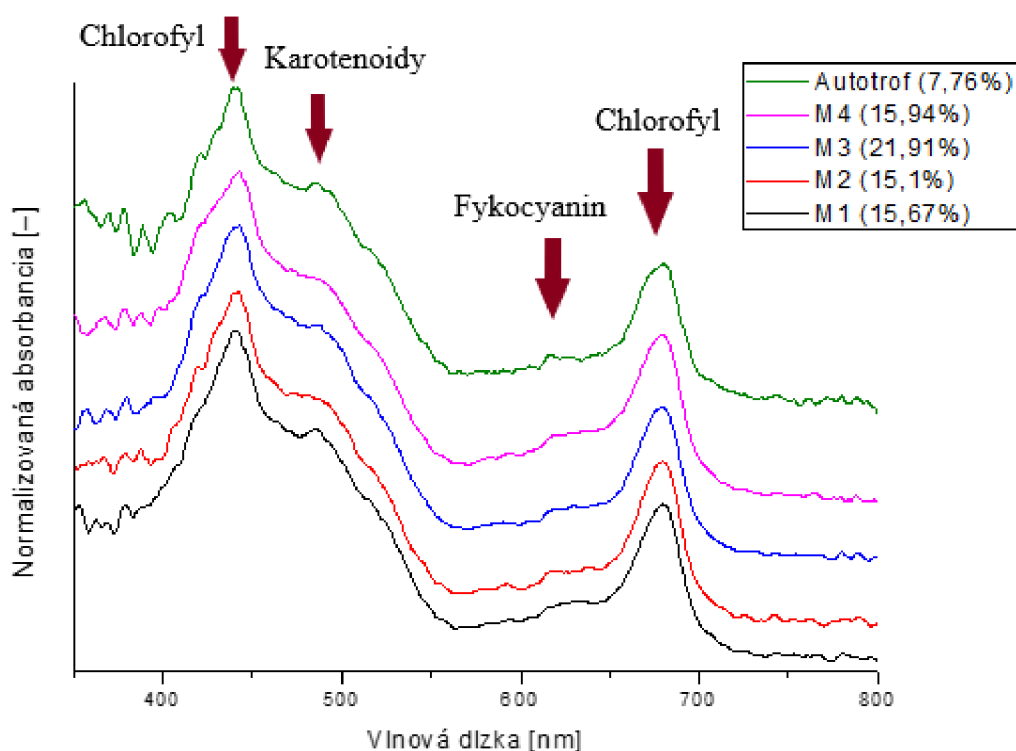


Obrázok 15 Porovnanie absorbancií z transmisného módu a difúzne transmisného módu pre vysoký a nízky obsah PHB

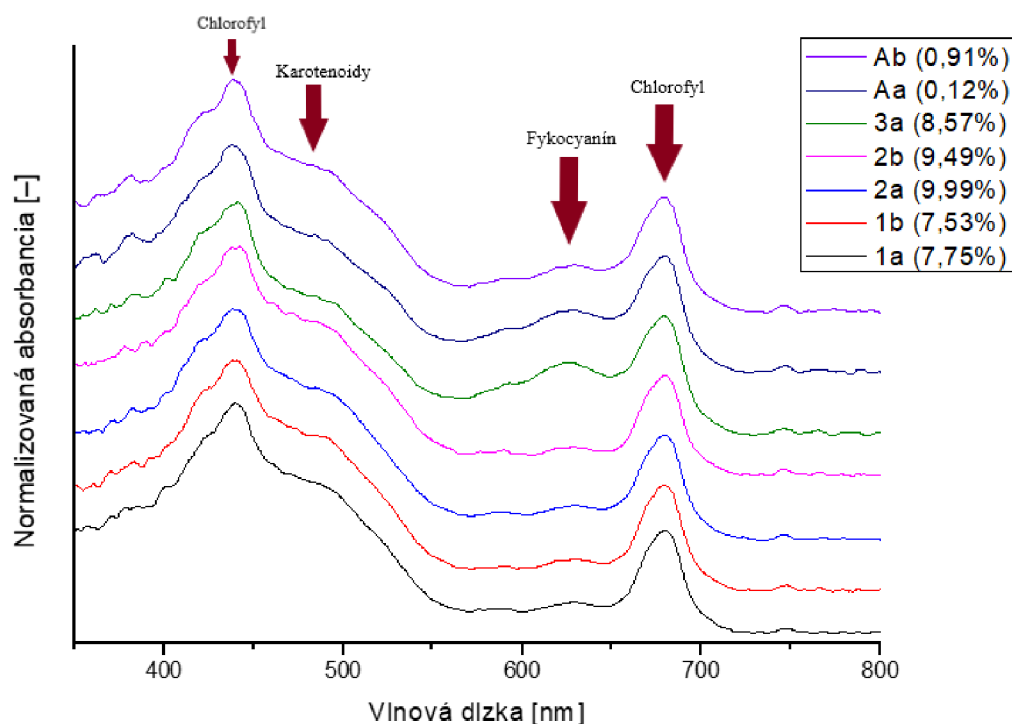
Na obrázku 15 sú zrovnávané absorpčné spektrá (závislosť zdánlivej absorbance, tj. záporného logaritmu transmitancie nameranej spektrometrom) z transmisného, resp. difúzne transmisného módu spektrofotometrickej analýzy. Na ilustráciu toho, aká je informačná hodnota jednotlivých typov spektier sú na obrázku 15 porovnávané spektrá pre približne rovnakú koncentráciu (cca $4 \cdot 10^7$ buniek/ml) dvoch rozdielnych vzoriek tej istej kultúry. Jednalo sa o vysoký (19,53 hm.%) a nízky (2,51 hm.%) obsah PHB. Pre lepšiu prehľadnosť sú spektrá normalizované v rozsahu 0–1. Na obrázku 15 môžeme postrehnúť rozdiel medzi normalizovanými píkmi v oblasti 430, 630 a 680 nm. Konkrétne pri vlnovej dĺžke 430 nm (chlorofyl) pri výstupe z integračnej gule je vyšší pík pri vyššom obsahu PHB, pri výstupe z turbidimetrie sa to javí byť opačné. Tento spektrálny rys dobre charakterizuje vizuálnu zmenu farby kultúry zo zelenej na žltú pri zvýšenej produkcii PHB. Z porovnania spektier je tiež zjavné, že spektrálna informácia o zmene farebnosti vzorky je podstatne lepšie viditeľná zo spektier zaznamenaných v difúzne transmisnom móde. Navyše, v prípade transmisného módu je z dôvodu intenzívneho rozptylu pre nameranie spektra v rozsahu citlivosti detektoru samotnú vzorku nutné niekoľko krát riediť. Pri integračnej guli (difúzne transmisnom móde) je možné sledovať spektrum aj pri nezriedených vzorkách, čím sa získajú intenzívnejšie a lepšie interpretovateľné píky.

4.3.1.1 Výsledky spektrofotometrickej analýzy v difúzne transmisnom móde

Spektrofotometrická analýza v difúzne transmisnom móde bola preto využitá predovšetkým k charakterizácii obsahu jednotlivých typov pigmentov v jednotlivých bunkových kultúrach. Difúzne transmisné spektrá obsahujú píky v charakteristických vlnových dĺžkach, kvôli prítomným pigmentom akými sú chlorofyl (680, 440 nm), β -karotén (485 nm), a fykocyanin (630 nm). Tieto píky nachádzajúce sa v meraných vzorkách boli overené aj na základe literatúry [41]. Názorné spektrá z integračnej gule sa nachádzajú na nasledujúcich obrázkoch (Obrázok 16, Obrázok 17), oboje pre mixotrofné médiá kultúry CCALA 192 a PCC 6803. Spektrá su opäť normalizované a červenou šípkou sú označené charakteristické píky jednotlivých typov fotosyntetických pigmentov.



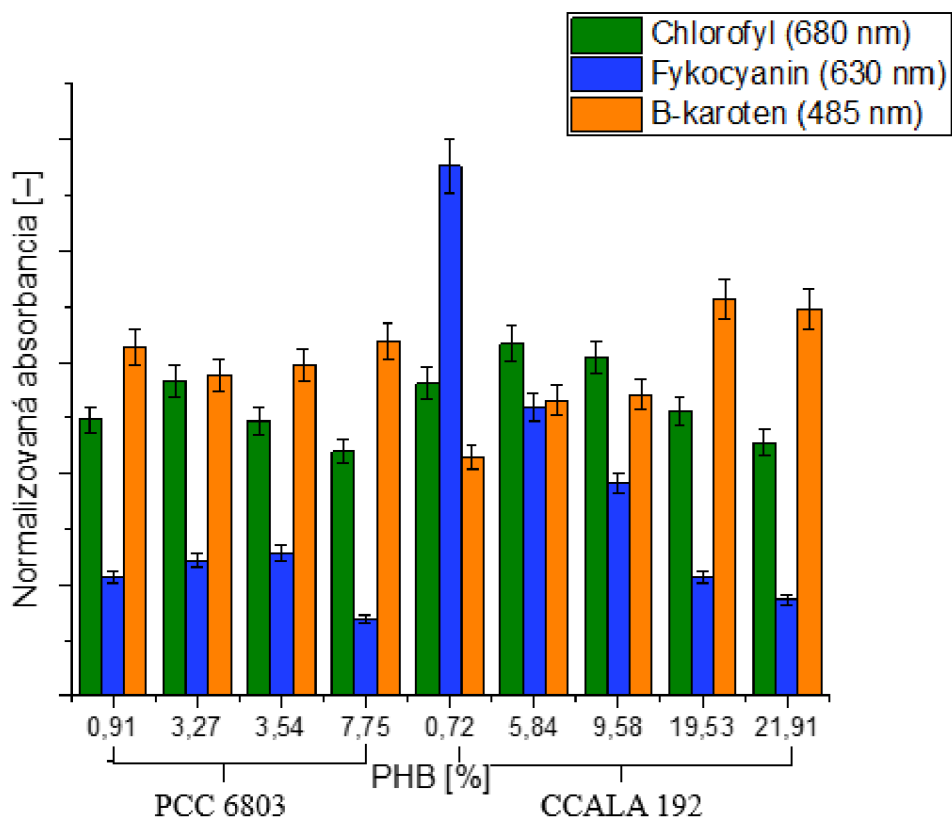
Obrázok 16 Vynesené spektrum v závislosti norm. absorbancie na vlnovej dĺžke pre CCALA 192; mixotrofné médiá sú obohatené o uhlíkový zdroj podľa označenia: M1- acetát; M2- acetát + propionát; M3- acetát+1,4 butandiol, M4- acetát + γ -butyrolakton; v zátvorkách legendy sa nachádza obsah PHB



Obrázok 17 Výsledné spektrum v závislosti norm. absorbancie na vlnovej dĺžke pre PCC 6803; označenie médií podľa prídavku uhľikového zdroja: A- autotrofné; 1- obohatené o acetát; 2- obohatené o acetát a propionát; 3- obohatené o acetát a 1,4- butandiol; v zátvorkách sa nachádza obsah PHB u jednotlivých vzoriek

Pigmenty nachádzajúce sa v rôznych typoch médií s navyše s rozdielnym množstvom PHB sa líšia vo svojej absorbancii. Na obrázku 18 je porovnanie normalizovaných absorbancií pigmentov (chlorofyl, fykocyanín a β -karoten) v závislosti na rôznom obsahu PHB. Karotenoidy (konkrétne β -karotén pri 485 nm) sú viac menej vo všetkých médiách rovnaké. Výraznejšie rozdiely nastávajú pri absorbancii fykocyanínu. Všeobecne v médiách pre CCALA 192, obsahujúcich vyššie množstvá PHB, je ich absorbancia nízka a naopak s nižším obsahom PHB, je absorbancia fykocyanínu vysoká (0,72 hm. % PHB). Na podobné pokusy sa zamerali v štúdií Santos, Correa a kol (2019), kde kultivovali neupravené médium a médium s nízkym obsahom dusíka. Zistili, že v druhom type médiá dochádza k zvýšenej produkcii PHB, ale k nižšiemu obsahu fykocyanínu, a karotenoidov, zatiaľ čo pri neupravenom médiu tomu bolo presne naopak [73].

Nami analyzované cyanobakteriálne kultúry sa líšia vo viacerých podmienkach, nie len v obsahu PHB, ale aj v type kultivácie. Pri mixotrofnom médiu kultúry PCC 6803 (7,75 hm. % PHB) je napr. absorbanca fykocyanínu menšia v porovnaní s médiom s obsahom 3,54% PHB, ktoré bolo kultivované v multikultivátore. Vysoké obsahy PHB nemusia vždy zaručene znamenať nižšie množstvá pigmentov v cyanobaktériách.



Obrázok 18 Normalizované absorbanacie pigmentov v rozsahu 0–1 (hodnotu 1 dosahoval vždy najviac intenzívny pík pri 435 nm (chlorofyl)) pre médiá s rôznymi obsahmi PHB

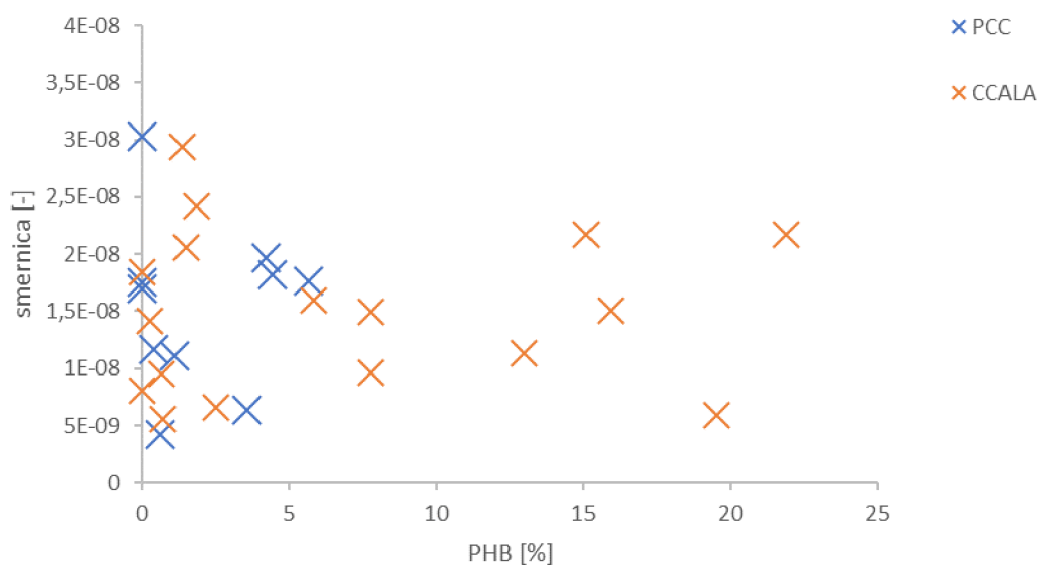
Hlavné získané parametre spektrofotometrickej analýzy boli korelované s výstupmi z ostatných analytických techník a využité v PCA analýze charakterizovaných cyanobakteriálnych kultúr. Výsledky týchto pokročilých štatistických analýz sú uvedené v kap. 4.5.

4.3.1.2 Výsledky turbidimetrickej analýzy

Turbidimetrické meranie bolo v prípade heterotrofných producentov v minulosti úspešne aplikovaná za účelom nepriameho sanovania obsahu PHB granul v bunke. PHB granule v týchto prípadoch fungovali ako prídavný zdroj rozptýleného žiarenia a v porovnaní s PHB negatívnu kontrolou prispievali ku zvýšeniu zdanlivej absorbanacie vzorky, a to v závislosti na vlnovej dĺžke žiarenia a úmmerne obsahu PHB v bunke [74]. Na základe toho vzišla otázka, či aj v prípade siníc bude platiť, že sinice s vyšším obsahom PHB granul budú rozptylovať žiarenie viac ako tie s málo, alebo žiadnymi granulami.

Na vyhodnotenie zmeraných dát postupom uvedeným v citovanej referencii bolo potrebné zistiť počet buniek v jednotlivých kultúrach. Počet buniek bol stanovený cytometrickou analýzou, ktorá bola bližšie opísaná v kapitole 4.2. Ďalej bolo nutné zvoliť vhodnú vlnovú

dĺžku pre turbidimetrickú charakterizáciu vzorky. Pri meraní neriedených roztokov pomocou integračnej gule bolo zistené, že k najnižšej absorbančii žiarenia dochádza pri vlnovej dĺžke 560 nm. To viedlo k predpokladu, že by v tejto oblasti dochádzalo iba k rozptylu žiarenia, pretože sa tam nenachádzajú pigmenty, ktoré by svojou absorbančiou mohli ovplyvniť výsledky. Závislosť zdanlivej absorbančie pri vlnovej dĺžke 560 nm na počte buniek pri jednotlivých riedeniach (vypočítaných na základe merania prietokovou cytometriou) bola pre každú analyzovanú vzorku preložená rovnicou lineárnej regresie, vypočítaná smernica tejto závislosti, ktorá charakterizuje rozptyl žiarenia na jednej bunke v danej vzorke (Obrázok 29). Táto smernica v prípade heterotrofných producentov PHB rástla s obsahom PHB, pretože vysoký obsah PHB granul spôsoboval výrazný príspevok rozptylu svetla na vnútornej štruktúre bunky. Preto boli smernice týchto lineárnych regresí vynesené v závislosti na obsahu PHB pre jednotlivé cyanobakteriálne kultúry analyzované v tejto diplomové práci, čím bol získaný nasledujúci *Obrázok 19*.



Obrázok 19 Smernica z absorbančie pri 560 nm vynesená na obsahu PHB

Z grafu na *obrázku 19* je zjavné, že pre kultúry *Synechocystis* sp. PCC 6803 a *Synechocystis salina* CCALA 192 nebola preukázaná korelácia smernice závislosti zdanlivej absorbančie pri 560 nm na počte buniek a obsahu PHB v bunkách. Náš pôvodný predpoklad, že by sme pomocou turbidimetrie získali závislosť na obsahu PHB sa teda nesplnil. Príčinou môže byť odlišná veľkosť cyanobaktérií oproti heterotrofnej kultúre *C. necator*, pre ktorú bola turbidimetrická metóda stanovenia obsahu PHB stanovená, rovnako ako fakt, že cyanobakteriálne bunky obsahujú výrazne menšie množstvo intracelulárnych granul PHB.

Turbidimetria samo o sebe nie je dostatečne citlivá na to, aby dokázala rozlíšiť príspevok rozptylu žiarenia na vnútornej štruktúre cyanobakteriálnych buniek.

4.3.1.3 Zhodnotenie spektrofotometrických techník

UV–VIS spektroskopia má nakoniec väčší význam v prípade stanovenia pigmentov, ktoré cyanobaktérie obsahujú, ako pri stanovení intracelulárnych granúl PHB. Integračná guľa navyše poskytuje značnú výhodu, pretože bežne sa pigmenty, nachádzajúce sa v riasach a siniciach, analyzujú prostredníctvom vysokotlakovej kvapalinovej chromatografie HPLC, pred ktorou je nutná ich extrakcia. Izolácia a extrakcia pigmentov pri meraní na integračnej guli nie je nutná. Výhodou analýzy je stanovenie celého spektra v UV a viditeľnej oblasti. Pri integračnej guli na rozdiel od turbidimetrie nedochádza k zakaleniu, takže samotné vzorky sa riedia málo (najčastejšie sme sa stretli s riedením 5×), alebo takmer vôbec. Zjednodušenie prípravy vzorky o hľadanie optimálneho riedenia môže celkom značne urýchliť celú analýzu.

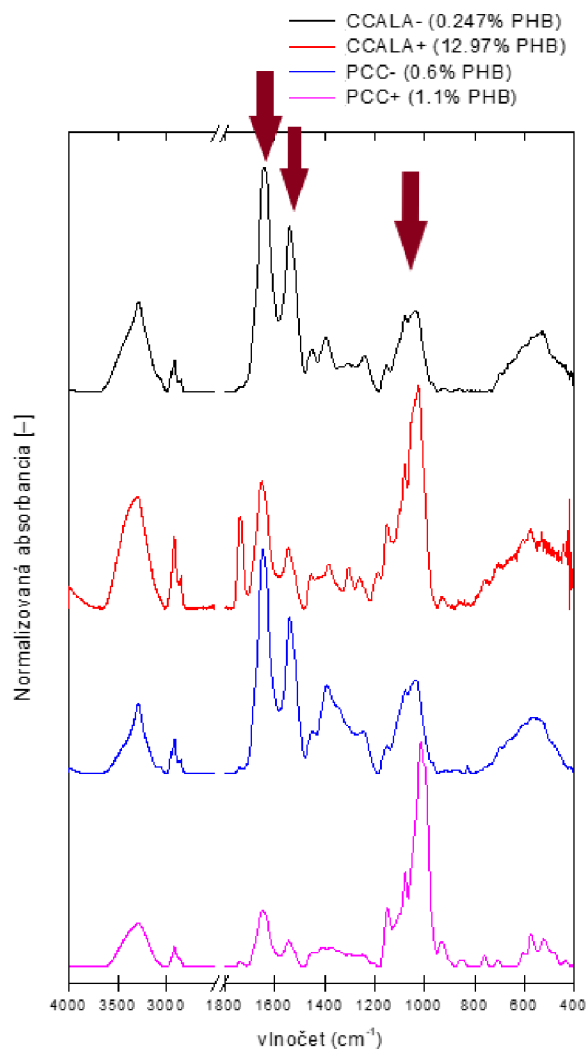
Rovnako tak je UV–VIS spektrometria relatívne lacnou technikou pri porovnaní s HPLC, alebo prietokovou cytometriou. Okrem samotnej ceny, je možné vyzdvihnúť aj jednoduchú prípravu vzorky a rýchly čas samotnej analýzy, ktorá napr. nezahŕňa premývanie samotného prístroja. Vzorky je tým pádom možné analyzovať rýchlo za sebou. Nevýhodou tejto techniky je, že nie je repetitívna. Vzorky kultúr cyanobaktérií bolo nutné merať ihneď v deň ukončenia kultivácie, pretože v siniciach stále mohli ďalej pokračovať rôzne biochemické procesy. Tým, že vzorky museli byť pri meraní tak povediac čerstvé, nemohli sme si dovoliť ich zamraziť, alebo uskladniť, čo je možné pri iných technikách.

4.3.2 Molekulová spektroskopia

Ďalšou aplikovanou metódou analýzy získaných cyanobakteriálnych kultúr bola infračervená spektroskopia spojená s Fourierovou transformáciou. V bakalárskej práci, v ktorej sme stanovovali PHA vo vzorkách baktérií *Cupriavidus necator* H16, táto technika vykazovala značnú koreláciu s obsahom PHB stanoveným referenčnou technikou plynovej chromatografie. Metóda spočíva v analyzovaní vzorky vysušenej biomasy (viď príprava v kapitole 3.2.3.1) infračervenou spektroskopiou s technikou zoslabeného odrazu (*attenuated total reflectance*, ATR metóda) na diamantovom kryštály. Bolo merané spektrum v rozsahu 4000–400 cm⁻¹. Meranie vzoriek vysušenej biomasy prebiehalo priamo v tuhom stave, teda nebol dôvod ich pred meraním špeciálne upravovať, čím sa zjednodušila príprava vzorky a zkrátil sa potrebný čas. Navyše, sa jedná o nedestruktívnu techniku, po ktorej je možné meranie zopakovať, poprípade merať ďalej vzorku iným prístrojom, keďže zostane nepoškodená.

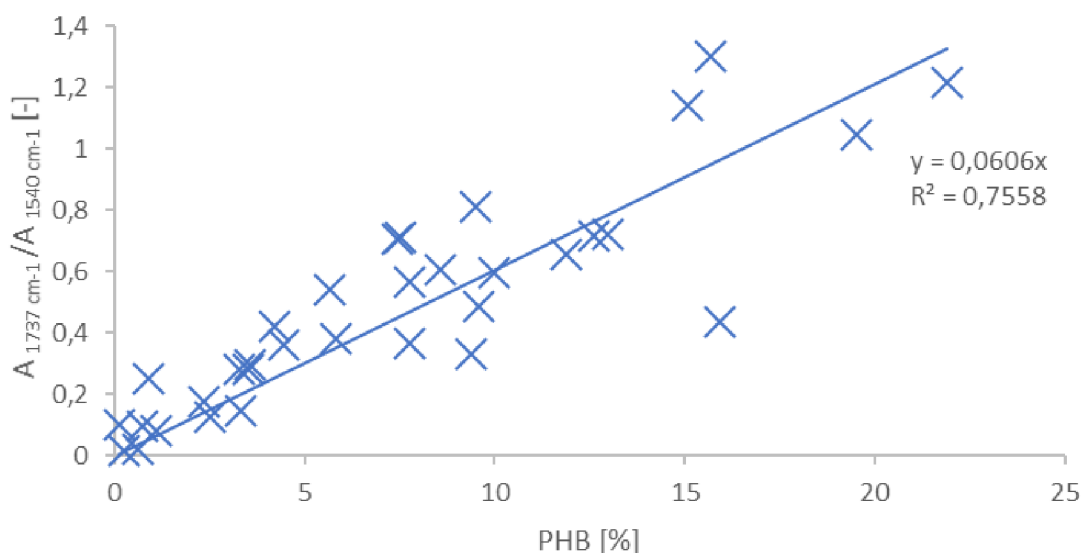
Určité skupiny (ako je napr. dvojité väzba, esterová alebo amidová skupina) vykazujú vibrácie pri špecifických vlnôčtoch, čím je možné charakterizovať molekulárnu štruktúru konkrétnej látky. Pri analýze cyanobaktériálnych producentov PHB sa zaujíma hlavne o identifikáciu a stanovenie polyhydroxybutyrátu (charakteristické vibračné pásy polyesterovej väzby pri 1 737, 1 230 a 1 189 cm^{-1}), no FTIR analýza môže poskytnúť informácie aj o ďalších zaujímavých molekulových komponentách cyanobaktérií, je napr. glykogén (charakteristické intenzívne polysacharidové pásy C–O vibrácií pri 1 200–900 cm^{-1}). Po zmeraní spektra sa vybrali píky pri viacerých vlnôčtoch, ktoré charakterizovali konkrétne skupiny (stručný prehľad charakteristických vibračných skupín sa nachádza v kapitole 2.3.3.2).

Príklady spektier aj s vyznačenými charakteristickými píkmi možno vidieť na nasledujúcom obrázku (Obrázok 20).



Obrázok 20 Výstup z FTIR- závislosť absorbanca na vlnôčte pre vzorky kultivované na trepačkách (v zátvorkách je % obsah PHB)

Vlnočť 1 737 cm^{-1} , reprezentujúci vibrácie v esterovej väzbe, bol normalizovaný k vlnočtu 1 540 cm^{-1} (amidová väzba v bielkovinách, tzv. pás Amid II) a vyneseny na obsahu PHB, ako je možné vidieť na nasledujúcom grafe (Obrázok 21).



Obrázok 21 Pomer charakteristických absorbancií PHB vyneseny na obsahu PHB pre všetky analyzované vzorky

Koeficient spoľahlivosti R^2 je v tomto prípade vysoký ($R^2 = 0,7558$), takže v tomto prípade môžeme hovoriť o dobrej korelácii absorbancie meranej infračervenou spektroskopiou k obsahu PHB. V tomto prípade rôzne typy médií pri analýze nehrajú veľkú rolu, pretože sú analyzované píky charakteristických vibrácií PHB a bielkovín, u ktorých nedochádza k prekryvu s absorpčnými pásmi ďalších komponentov cyanobakteriálnych buniek (polysacharidy, pigmenty). Obdobne dobrá korelácia bola získaná pri normalizácii spektra na absorbanciu pri vlnočte 1 640 cm^{-1} (Amid I).

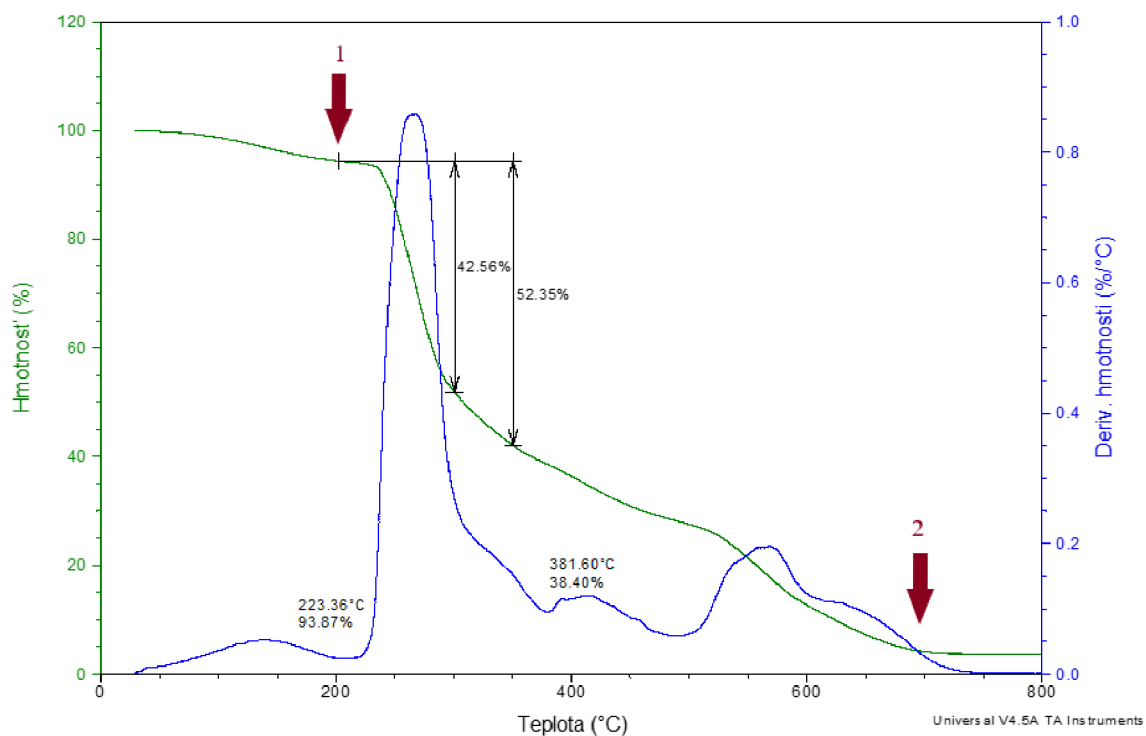
Ďalšou výhodou infračervenej spektroskopie je to, že vďaka detailnej analýze pozície a tvaru pásov charakteristických vibrácií je možné zistiť aj informácie o stupni usporiadanosti, t.j. o miere krystalinity, resp. amorfnosti polyméru. To, či sa PHB nachádza v amorfnom, alebo kryštalickom stave je dobré vedieť ako z hľadiska posúdenia miery poškodenia buniek oproti ich fyziologickému stavu pri príprave vzoriek biomasy (viz [75]), tiež aj z toho aplikačného (kvôli izolácii a spracovaniu polyméru). Priemyselne výhodná je vyššia miera amorfnosti PHB, ktorá sa v spektre prejavuje rastúcim absorpčným pásmom pri vlnočtu 1 189 cm^{-1} . Kryštalické PHB naopak reprezentujú charakteristické píky pri vlnočtoch 1 229 a 1 279 cm^{-1} . Zo základného porovnania spektier (prípadne konkrétny pásov charakteristických pre amorfný

a kryštalický polymér) žiadne rozdiely nevyplýnuli a vo všetkých prípadoch sa prejavuje semikryštalická povaha PHB (prítomnosť amorfného a semikryštalického pásu). Avšak aj tieto píky boli zaradené do záverečnej podrobnej štatistickej analýzy PHB (korelačná + PCA analýza), ktorá sa nachádza v kapitole 4.5.

4.4 Termogravimetrická analýza

Termogravimetrická analýza bola vybraná ako posledná z metód stanovenia PHA. Ako u jedinej z použitých techník sa jedná o čiste fyzikálne-chemickú metódu, ktorá na rozdiel od chromatografických resp. spektroskopických metód neposkytuje priamu informáciu o chemickom zložení a molekulovej štruktúre buniek. Analýza spočíva v meraní úbytku hmotnosti kontinuálne so zvyšujúcou sa teplotou. Podobne ako u FTIR techniky, tak aj v prípade TGA vychádzame z predchádzajúcich skúseností z bakalárskej práce. Pri bakalárskej práci sa pre heterotrofné poducenty PHB (*C. necator* H16) z úbytku hmotnosti v danom rozmedzí teplôt (200–400°C) prejavila vysoká korelácia s obsahom PHB. Z toho dôvodu sme chceli overiť, či sa prejaví korelácia aj v prípade analyzovania siníc s nižšími obsahmi polyhydroxybutyrátu.

Samotné meranie prebiehalo rýchlosťou 10 °C/min do teploty 800°C. Prvý úbytok hmotnosti nastáva v rozmedzí laboratornej teploty a cca 150 – 200 °C. Tento úbytok je interpretovaný ako odstránenie zbytkovej vody zo vzorky. Spálenie termicky najviac labilných zložiek organickej hmoty začína pri teplote približne 220°C (viz *Obrázok 22*, v ktorom sa jedná o vzorku s obsahom 19,53% PHB). Pri zvyšujúcej se teplote sú postupne termicky degradované aj stabilnejšie zložky organickej hmoty. Pomerne dobre separovaný krok poklesu hmotnosti nastáva u všetkých vzoriek pri teplote cca 500°C, kedy dochádza k úbytku najstabilnejších zložiek biomasy (proteíny, heterocyklické štruktúrne motívy v pigmentoch). Reziduálna hmotnosť vzorky pri 800°C bola považovaná za mieru obsahu nespáliteľných zložiek (popoľ, zbytky solí z kultivačného médiá). Na *obrázku 22* môžeme vidieť, že k výsledku merania bola pridaná vedľajšia os (derivácie hmotnosti podľa teploty), ktorá prehľadne zobrazuje priebeh jednotlivých krokov termickej degradácie vzorky.



Obrázok 22 Priebeh analýzy TGA u vzorky s obsahom PHB 19,53%

Ako už bolo spomínané, počas zvyšovania teploty, dochádza viac krát k úbytku hmotnosti vzorky. Pri vyhodnotení dát, boli použité dve rozmedzia, v ktorých nastal úbytok hmotnosti, ktorý bol podľa poznatkov o termickej stabiite PHB mal zahŕňať termický rozklad tejto bunkovej komponenty:

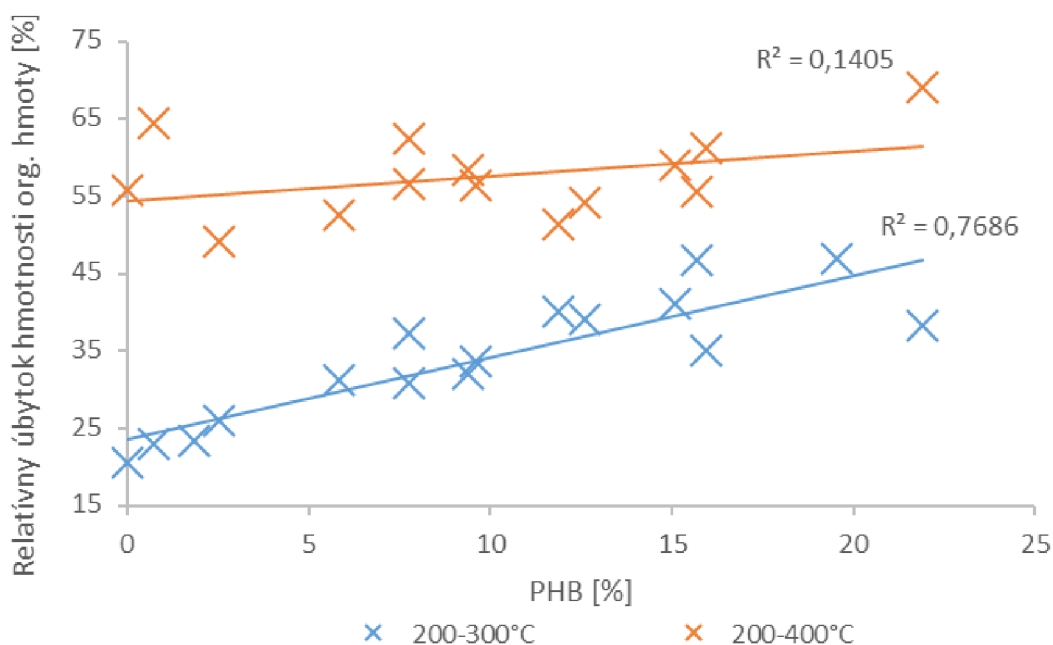
- i) od 200°C do 300°C,
- ii) od 200°C do 400 °C

Zistené úbytky hmotnosti boli následne vyjadrené ako relatívne frakcie organickej (t.j suchej bezpopolovej) hmoty vzorky. Za týmto účelom boli relatívne hmotnostné obsahy stanovené pre oba analyzované rozsahy podelené celkovou hmotnosťou, od ktorej bola odrátaná vlhkosť (relatívny pokles hmotnosti v rozsahu 0–200 °C) , viz označenie červenou šípkou na *obrázku 22*) a obsah nespáliteľného podielu (vyznačenie druhej šíčky pri teplote cca 700°C), ktorý sa v každom médiu líšil.

V *tabulke 12* sa nachádzajú výsledky TGA analýzy kultúry CCALA 192 zo všetkých troch experimentov a pre porovnanie ich obsah PHB. Ďalej bol graficky vyneseny relatívny obsah organickej hmoty degradovány v dvoch teplotných intervaloch v závislosti na obsahu PHB (*Obrázok 23*).

Tabuľka 12 Úbytky hmotnosti pri spaľovaní metódou TGA pre CCALA 192

Kultúra	PHB (%)	Úbytok <i>m</i> 200–300°C (%)	Úbytok <i>m</i> 200–400°C (%)	vlhkosť (%)	popol (%)	Rel. Obsah organickej hmoty 1 (%)	Rel. Obsah organickej hmoty 2 (%)
1. experiment							
CCALA	1,84	19,43	46,38	8,00	8,83	23,00	56,00
2. experiment							
Multik. 1: CCALA 1t	0,00	18,08	43,28	7,52	4,61	21,00	49,00
CCALA 4t	19,53	41,96	57,53	6,40	4,24	47,00	64,00
Multik. 2: CCALA 1	2,51	20,75	45,06	7,49	13,02	26,00	57,00
CCALA 2	0,72	19,24	44,1	8,59	7,56	23,00	53,00
CCALA 3	7,77	33,06	51,79	7,22	4,28	37,00	59,00
CCALA 4	5,84	26,81	48,43	7,22	6,85	31,00	56,00
Multik. 3: C1	9,37	28,97	48,9	8,41	1,35	32,00	54,00
C2	9,58	30,52	46,45	9,08	0,36	34,00	51,00
C3	12,60	35,34	50,28	7,97	1,71	39,00	56,00
C4	11,88	36,03	53,18	7,27	2,68	40,00	59,00
3. experiment							
M1	15,67	37,95	54,57	5,37	13,49	47,00	61,00
M2	15,09	36,56	49,85	6,10	4,77	41,00	62,00
M3	21,91	30,58	50,95	6,23	13,97	38,00	59,00
M4	15,94	30,32	46,24	6,66	6,80	35,00	57,00
Autotrof.	7,76	25,10	46,38	8,00	10,42	31,00	56,00



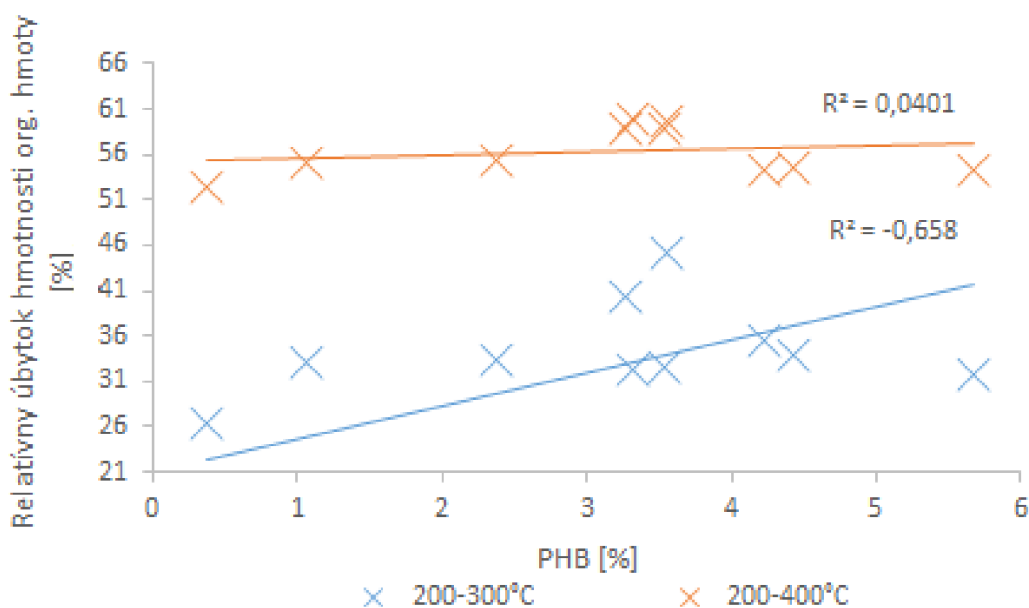
Obrázok 23 Vynesené úbytky hmotnosti, získané viacerými spôsobmi na obsahu PHB: modrou farbou je označený úbytok hmotnosti v rozsahu teplôt 200–300°C, oranžovou úbytok hmotnosti v rozmedzí teplôt 200–400°C

Na grafe vyššie je vidieť, že vyššia korelácia ($R^2=0,7686$) sa prejavila pri použití úbytku hmotnosti 200–300°C. Pri relatívnom úbytku hmotnosti vzorky v oblasti 200–400°C bola výsledná korelácia výrazne nižšia ($R^2=0,1405$). Tieto výsledky potvrdzujú predpoklad, že PHB predstavuje jednu z termicky najmenej stabilných komponent organického hmoty buniek (*Synechocystis salina* CCALA 192) k jeho termickému rozkladu teda dochádza už pri najnižších teplotách do 300°C.

Avšak, pri kultúre *Synechocystis* sp. PCC 6803 nebola táto korelácia potvrdená, viz *Obrázok 24*. To je pravdepodobne spôsobené tým, že táto kultúra produkuje (nezávisle na produkcii PHB) aj ďalšie termicky labilné komponenty, ktoré ovplyvňujú relatívny pokles hmotnosti v uvedenom teplotnom rozsahu. Jedným z možných kandidátov na túto interferujúcu zložku je glykogén, avšak iba na základe výsledkov termogravimetrickej analýzy túto domienku nie je možné jednoznačne posúdiť.

Tabuľka 13 Úbytky hmotností pri meraní metódou TGA u PCC 6803

Kultúra	PHB (%)	zmena <i>m</i> 200–300°C (%)	zmena <i>m</i> 200–400°C (%)	vlhkosť (%)	popol (%)	Rel. Obsah org. Hmoty 1 (%)	Rel. Obsah org. Hmoty 2 (%)
1. experiment							
PCC	0,38	22,71	45,2	8,22	5,60	26,00	52,00
2. experiment							
Multi 1: PCC 4t	3,54	27,98	50,78	7,73	6,20	33,00	59,00
Multi 2 PCC 1	5,67	27,89	47,96	7,86	3,99	32,00	54,00
PCC 3	4,44	30,09	48,36	7,09	4,26	34,00	55,00
PCC 4	4,22	31,37	47,93	7,54	4,14	36,00	54,00
Multi 3 PCC 1	3,31	28,99	53,98	7,07	2,91	32,20	59,96
PCC 2	2,37	29,26	48,62	7,75	4,65	33,40	55,50
PCC 3	3,55	37,14	49,04	8,68	9,00	45,12	59,57
PCC 4	3,27	34,87	50,96	8,56	5,08	40,38	59,01



Obrázok 24 závislosť rel. obsahu org hmoty na obsahu PHB pri kultúre PCC 6803, modrou farbou je značený úbytok hmotnosti org. hmoty v teplotnom rozmedzí 200–300°C a oranžovou v oblasti 200–400°C

Výsledky TGA v podobe relatívneho obsahu labilnej organickej hmoty obecné pre cyanobaktériálne kultúry nevykazujú takú mieru korelácie s obsahom PHB, ako je tomu

pri heterotrofnej produkcii PHB u *C. necator* H16. Metóda TGA tak nie je metódou na stanovenie obsahu PHB univerzálne použiteľnou pre rôzne cyanobakteriálne kultúry.

Pravdepodobným vysvetlením tohto zistenia je, podobne ako to už bolo diskutované u ostatných testovaných techník, výrazne menší obsah PHB granúl v bunkách cyanobaktérií. Cyanobaktérie navyše z hľadiska chemickej a štruktúrnej povahy svojich buniek predstavujú podstatne komplexnejší bunkový systém. Rovnako ako u spektroskopických metód, tiež aj u TGA sa v cyanobakteriálnych kultúrach vyskytujú bunkové komponenty, ktorých signál interferuje so signálom PHB. Pomerne dobrá korelácia relatívneho obsahu labilnej organickej hmoty (degradácia 200–300°C) s PHB v prípade kultúry *Synechocystis salina* CCALA 192 naznačuje, že pre niektoré konkrétne cyanobakteriálne kmeny môže byť táto metóda pre sledovanie obsahu PHB využitá. Výhodou tejto techniky v takom prípade aj naďalej zostáva aj naďalej zostáva jednoduchá príprava vzorky, ktorá sa pred samotnou analýzou musí vysušiť. Taktiež na analýzu stačí malý obsah vzorky, čo je praktické pri malých výťažkoch.

4.5 Štatistická analýza súboru analytických výstupov testovaných techník

Na záver práce sme sa rozhodli previesť detailnejšiu analýzu výstupov zo všetkých techník, ktoré boli použité v diplomovej práci. Cieľom bolo vyhľadať prípadné korelácie medzi jednotlivými parametrami, nad rámec korelácií pôvodne predpokladaných (predovšetkým koreláciou s obsahom PHB). Vzorky sa samo o sebe totižto nelíšia iba v rozdielnom obsahu PHB (aj napriek tomu, že taký bol pôvodný úmysel), ale líšia sa aj v obsahu a zložení pigmentov, alebo glykogénu. Korelačná analýza umožňuje celkovo vybrať hodnoty, ktoré medzi sebou vzájomne súvisia. Tento typ analýzy tak umožňuje lepšie posúdiť celkovú informačnú hodnotu jednotlivých analytických metód, respektíve ich špecifických kombinácií pri charakterizácii cyanobakteriálnych kultúr.

Výstupné dáta z FT-IR analýzy zahŕňajú normalizované absorbancie pri všetkých signifikantných pásoch (viz *Tabuľka 1*, ktoré sa v spektre objavili (vlnočty pre CH₃ a CH₂ skupiny, esterové skupiny, polysacharidy) normalizácia prebehla na 1640 cm⁻¹ (amid I). Z UV-VIS analýzy boli vybraté pomery absorbancie pri konkrétnych vlnových dĺžkach pigmentov (680 nm–chlorofyl, 485 nm–β-karotén, 630 nm–fykocyanín) a vzájomné pomery týchto absorbancií, ktoré sú špecificky prisudzované jednotlivým typom pigmentom (chlorofyl, β-karotén a fykocyanínu). Z analýzy prietokovou cytometriou bola vzatá stredová hodnota intenzity fluorescencie sondy BODIPY (ktorá farbila lipofilné časti bunky), a stredové hodnoty intenzít vzatých pigmentov (chlorofylu, β-karotén a fykocyanin). Keďže nie všetky vzorky boli

analyzované termogravimetrickou analýzou (z dôvodu omedzenej meracej kapacity prístroja) Korelačná analýza bola prevedená dvakrát – pre všetky vzorky s koreláciou výsledkov cytometrie, spektrofotometrie a FTIR spektroskopie, a potom zvlášť pre vzorky analyzované aj TGA. Z TGA techniky boli použité výsledky relatívnej hmotnosti labilnej organickej hmoty a to zvlášť pre relatívny obsah hmoty degradovanej v rozmedzí teplôt 200–300°C a 200–400°C.

Ako ďalší krok štatistickej analýzy bola prevedená analýza hlavných komponentov (PCA), ktorá sa používa k redukcii viacrozmerých dát. Metóda analýzy hlavných komponentov pomohla roztriediť v priestore tie vzorky, ktoré mali nejaký spoločný charakteristický znak, alebo kombináciu spoločných znakov. PCA analýzou bolo zistené, ktoré z parametrov medzi sebou korelovali, tým pádom dávali čiastočne rovnakú informáciu o vzorke. Z veľkého množstva pôvodných analytických parametrov, ktoré sme použili (viz *Tabuľka 14*) sa pomocou analýzy hlavných komponentov vytvorí malé množstvo nových premenných (tvorených lineárnou kombináciou pôvodných parametrov), ktoré čo najlepšie popisujú variabilitu analyzovaných vzoriek. Na základe týchto premenných je potom možné prehľadným spôsobom vyjadriť podobnosť, resp odlišnosť medzi jednotlivými pozorovaniami (v našom prípade medzi jednotlivými testovanými kultúrami).

Výsledky korelačnej analýzy uvádza *Tabuľka 14*, ktorá predstavuje výber porovnávaných premenných (tabuľka s kompletnými výsledkami sa nachádza v prílohe 8). Korelácia je v bunkách označená farebne; zelene označené bunky reprezentujú priamu koreláciu s hodnotou Pearsonovho korelačného koeficientu nad 0,5 (tmavozelené bunky značia $R > 0,8$). Bunky označené žltou farbou zasa reprezentujú nepriamu koreláciu s $R < -0,5$. Z tabuľky je jasne vidieť, že medzi obsahom PHB a píkom 1737 cm^{-1} z FTIR analýzy je vysoká korelácia nad 0,8. Dôležité sú aj píky pri vlnočtoch 1 305; 1 261 (kedy sa jedná o kryštalické PHB) a 1 189 cm^{-1} (amorfné PHB). FTIR technika je teda najvhodnejšou pri stanovení polyhydroxybutyrátu zo všetkých metód použitých v tejto diplomovej práci. O niečo menšia, ale stále zaujímavá korelácia s obsahom PHB sa potom vyskytuje už iba pri analýze prietokovou cytometriou a použitím sondy BODIPY 439/503 ($R=0,5362$)

Zaujímavá je korelácia z techník, ktoré poskytujú informácie predovšetkým o bunkových pigmentoch tj. z prietokovej cytometrie a difúznej transmisnej spektrofotometrie. Analyzovaním chlorofylu obomi technikami sa zistila korelácia s korelačným koeficientom $R = 0,5368$. O niečo vyššia je korelácia chlorofylu z cytometrie a fykocyanínu o spektrofotometrie, kde je $R = 0,668$. To môže značiť spoločnú produkciu oboch pigmentov v bunkách, ale tiež to môže naznačovať, že zvolené spektrálne rozsahy emisných (cytometria)

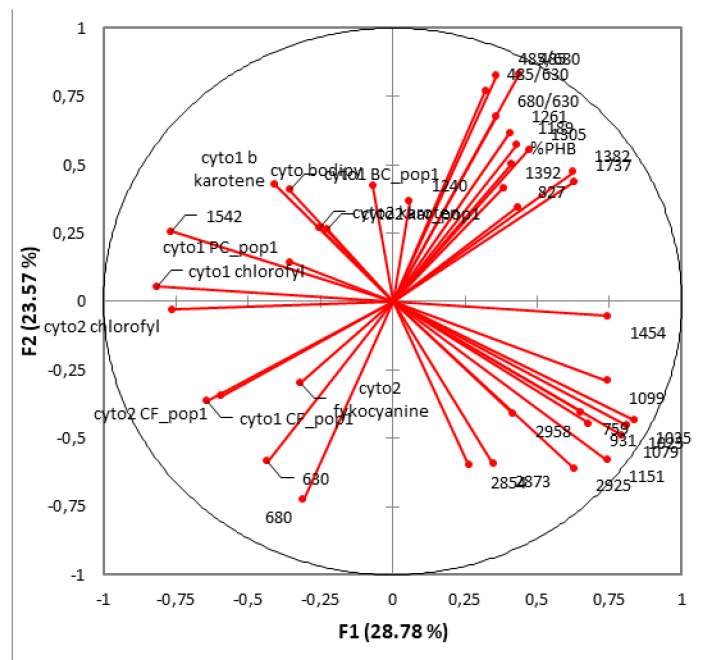
resp. absorpčných spektier (spektrofotometria) nie sú dostatočne špecifické pre jednotlivé farbivá a dochádza k ich čiastočnému prekryvu. Zaujímavá je aj nepriama korelácia chlorofylu zisteného cytometricky s karotenoidmi analyzovanými integračnou guľou ($R = -0,6329$).

Vzájomné pomery absorbancií z integračnej gule je možné porovnať s jednotlivými absorbanciami pri konkrétnych vlnových dĺžkach pigmentov – napr. pri chlorofyle (680 nm) je nepriama korelácia s karotenoidmi pri 485 nm, alebo pri pomere chlorofylu k fykocyaniu.

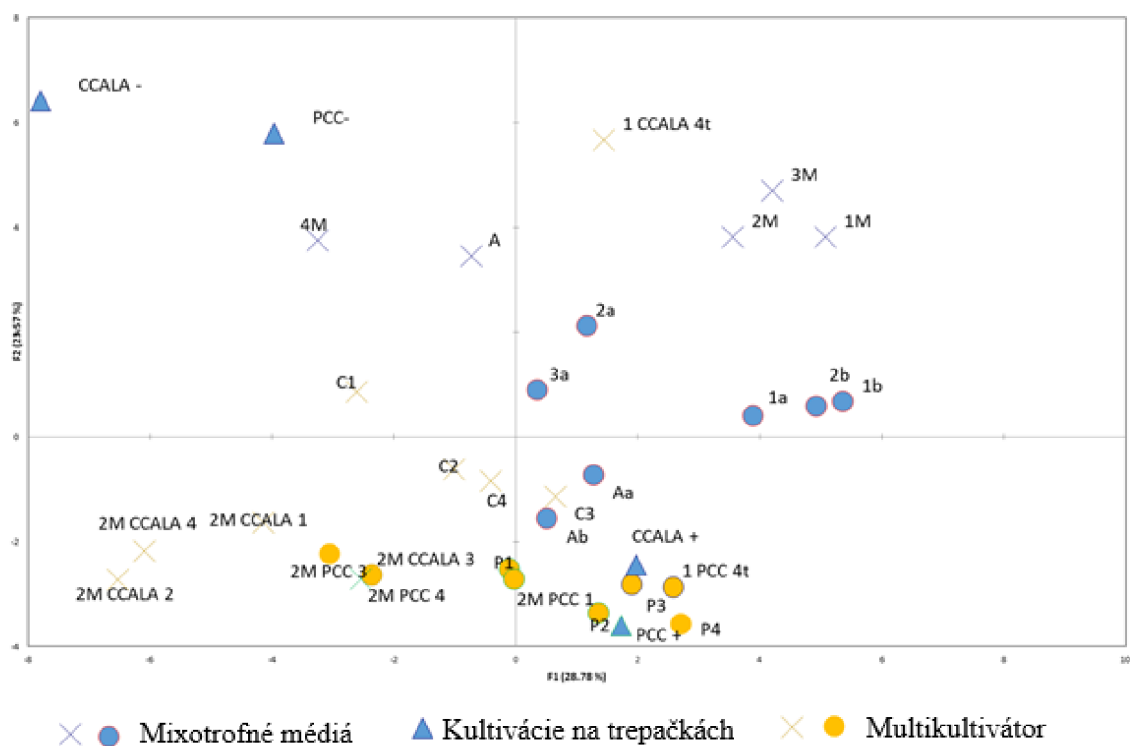
Tabuľka 14 Vybrané výsledky korelačnej analýzy (bez TGA) tabuľka uvádza hodnoty Pearsonovho korelačného koeficientu R); tučne sú vyznačené hodnoty, kde bola stanovená korelácia na hladine štatistickej významnosti $\alpha=0,05$

		GC	Prietoková cytometria				Difúzna transmisná spektrofotometria				
		Premenné	CF				680 nm	630 nm	485 nm		
		PHB [%]	bodipy	(chlorofyl)	chlorofyl	fykocyanin	karoten				
G	C	PHB [%]	1,000	0,536	-0,255	-0,360	-0,031	0,420	-0,156	-0,246	0,486
		bodipy	0,536	1,000	0,001	-0,035	0,264	0,668	-0,156	-0,235	0,346
		Chlorofyl (emisia 578 651 nm)	-0,255	0,001	1,000	0,700	0,584	0,188	0,537	0,668	-0,647
		Chlorofyl (emisia 687 669 nm)	-0,360	-0,035	0,700	1,000	0,354	0,106	0,169	0,367	-0,327
		Fykocyanin	-0,031	0,264	0,584	0,354	1,000	0,340	0,498	0,182	-0,419
		Karoten	0,420	0,668	0,188	0,106	0,340	1,000	0,131	-0,130	0,141
		680 nm	-0,156	-0,156	0,537	0,169	0,498	0,131	1,000	0,676	-0,824
Difúzna transmisná spektrofotometria	630 nm	-0,246	-0,235	0,668	0,367	0,182	-0,130	0,676	1,000	-0,838	
	485 nm	0,486	0,346	-0,647	-0,327	-0,419	0,141	-0,824	-0,838	1	
	680 nm /630 nm	0,178	0,178	-0,565	-0,180	-0,268	0,047	-0,824	-0,909	0,843	
	485 nm /630 nm	0,216	0,183	-0,548	-0,130	-0,376	0,003	-0,912	-0,833	0,886	
Infračervená spektroskopía	485 nm /680 nm	0,321	0,248	-0,593	-0,212	-0,464	0,005	-0,955	-0,788	0,948	
	2925 cm ⁻¹	0,065	-0,242	-0,141	-0,475	-0,006	-0,184	0,267	0,131	-0,243	
	2854 cm ⁻¹	0,082	-0,070	0,198	-0,162	0,163	0,022	0,446	0,388	-0,420	
	1737 cm ⁻¹	0,885	0,278	-0,314	-0,406	-0,035	0,172	-0,251	-0,344	0,530	
	1542 cm ⁻¹	-0,106	0,155	0,671	0,784	0,371	0,272	0,102	0,287	-0,187	
	1454 cm ⁻¹	0,226	-0,245	-0,191	-0,370	-0,128	-0,300	-0,274	-0,172	0,237	
	1382 cm ⁻¹	0,588	0,016	-0,298	-0,341	-0,197	-0,061	-0,394	-0,306	0,536	
	1305 cm ⁻¹	0,819	0,252	-0,244	-0,256	-0,093	0,115	-0,268	-0,207	0,490	
	1261 cm ⁻¹	0,820	0,256	-0,240	-0,229	-0,174	0,200	-0,283	-0,201	0,522	
	1189 cm ⁻¹	0,876	0,453	-0,253	-0,253	-0,042	0,190	-0,278	-0,246	0,536	
1151 cm ⁻¹	-0,127	-0,273	-0,266	-0,542	0,005	-0,407	0,108	-0,072	0,118		
1035 cm ⁻¹	0,058	-0,204	-0,371	-0,668	-0,106	-0,286	0,008	-0,180	0,049		

Výsledky PCA analýzy zobrazujú obr. 25 a 26. K ilustrácii odlišností, resp. podobností jednotlivých testovaných kultúr prvé dva hlavné komponenty s najvyššou mierou popisu variability systému (F1 a F2 celkom popisujú 52,35% variability). Projekcia jednotlivých analytických parametrov do súradnicového systému dvoch hlavných komponentov F1 a F2 uvádza *obrázok 25*. Tento obrázok tiež znovu ilustruje, akým spôsobom sú jednotlivé parametre získané jednotlivými analytickými metódami korelujú a tiež to, akým spôsobom budú do súradnicového systému F1–F2 projektované jednotlivé bakteriálne kultúry. Do prvého kvadrantu (vpravo hore) tak spadajú napr. projektované kultúry s vysokým obsahom PHB (viz projekciu parametrov hm. % PHB, 1 737 (absorbancia pri 1 737cm⁻¹) a pod.), zatiaľ čo do druhého kvadrantu budú projektované kultúry s nízkym obsahom PHB (viz projekcia parametrov 1 542 (absorbancia pri 1 542 cm⁻¹), ktorý charakterizuje vysoký relatívny obsah proteínov v biomase) a vysokým obsahom chlorofylu (viz projektované parametre z cytometrie).



Obrázok 25 Súhrnný parameter, korelácie prvého a druhého hlavného komponentu



Obrázok 26 Analýza hlavných komponentov u vzoriek cyanobaktérií- (bez TGA) ; „x“ sú označené kultúry CCALA 192, „o“ kultúry PCC 6803

Samotná projekcia analyzovaných bakteriálnych kultúr je uvedená na *obrázku 26*. Z tejto projekcie (*Obrázok 26*) je vidieť, že vzorky sa projektujú do všetkých štyroch kvadrantov. Do prvého kvadrantu (vzorky s vysokým obsahom PHB) sa projektovali predovšetkým kultúry získané mixotrofnou kultiváciou na uhlíkovom substráte. Diagonálne od nich (tretí kvadrant, vľavo dole) sa nachádzajú hlavne médiá z multikultivátora. Dôvodom tohto rozloženia môžu byť práve rozdiely v pigmentoch, keďže médiá na uhlíkových substrátoch si dokážu tvoriť cukry a tuky aj bez intenzívnej fotosyntézy. Médiá kultivované v multikultivátore mali naopak prístup k väčšej intenzite svetla a potrebovali si vytvoriť sacharidy a uhlíkové rezervy (napr. PHB), preto je pravdepodobné, že fotosyntéza u nich prebiehala intenzívnejšie.

Analogicky bola prevedená korelačná a PCA analýza pre časť vzoriek, ktoré boli merané termogravimetricky, ako už bolo spomínané na začiatku tejto kapitoly. Korelačná analýza (viz *Tabuľka 15*) v tomto prípade ukázala koreláciu medzi TGA metódou a obsahom PHA, čo bolo možné vidieť už v kapitole 4.4. Jednalo sa o slabú koreláciu (s hodnotami R 0,585 resp. 0,598) relatívnych úbytkov hmotnosti pri oboch rozsahoch (200–300 a 200–400°C), čo môže byť spôsobené aj tým, že vzorky CCALA 192 a PCC 6803 sa správali odlišne. Priama korelácia nastáva v prípade určitých píkov z FTIR (1 737, 1 261 a 1 189 cm^{-1} , ktoré charakterizujú PHB).

Zaujímavá je v tomto prípade nepriama korelácia medzi výstupmi z TGA a parametrami charakterizujúcimi obsah (z výstupov z cytometrie a difúzne transmisnej spektrofotometrie) a fykocyaninom (výstup zo spektrometrie). Priama korelácia nastáva aj medzi TGA a β -karoténom meraným spektrofotometricky, čo môže znamenať, že v rozmedzí 200–400°C dochádza k degradácii β -karoténu v siniciach. To môže byť dôvod, prečo výsledná korelácia TGA s obsahom PHB je slabšia ako tomu bolo pri baktériách rodu *Cupriavidus*, kde sa obsah PHB pohyboval výrazne vyššie (40–70 hm.%), pričom heterotrofné baktérie neobsahovali pigmenty.

Tabuľka 15 Vybrané dáta z korelačnej analýzy vrátane TGA Tabuľka uvádza hodnoty Pearsnovho korelačného koeficientu R; tučne sú vyznačené hodnoty, kde bola stanovená korelácia na hladine štatistickej významnosti $\alpha=0,05$

	Premenné	PHB [%]	Rel obsah org hmoty (200–300°C)	Rel Obsah org. Hmoty (200–400°C)
TGA	PHB [%]	1,000	0,585	0,598
	Rel. Obsah (200-300°C)	0,585	1,000	0,715
	Rel. Obsah (300-400°C)	0,598	0,715	1,000
Cytometria	bodipy	0,534	0,143	0,238
	Chlororfyl (emisía 678 nm)	-0,448	-0,617	-0,384
	Chlorofyl (emisía 687 nm)	-0,420	-0,594	-0,322
Difúzne transmisná spektrofotometria	B- karotén	-0,062	-0,199	-0,057
	Fykocyanin	-0,390	-0,245	-0,251
	680 nm	-0,499	-0,305	-0,626
	630 nm	-0,514	-0,696	-0,487
	485 nm	0,792	0,600	0,698
	680 nm/630 nm	0,540	0,700	0,582
	485 nm/630 nm	0,661	0,600	0,681
Infračervená spektroskopia	485 nm/680 nm	0,707	0,480	0,703
	2 925 cm ⁻¹	-0,349	0,273	0,019
	2873 cm ⁻¹	-0,346	0,022	-0,065
	2854 cm ⁻¹	-0,413	-0,106	-0,197
	1737 cm ⁻¹	0,877	0,669	0,692
	1542 cm ⁻¹	-0,072	-0,532	-0,197
	1454 cm ⁻¹	0,160	0,404	0,539
	1392 cm ⁻¹	0,382	0,250	0,570
	1382 cm ⁻¹	0,669	0,550	0,718
	1305 cm ⁻¹	0,838	0,531	0,661
	1261 cm ⁻¹	0,876	0,554	0,652
	1240 cm ⁻¹	0,508	0,202	0,545
	1189 cm ⁻¹	0,899	0,568	0,753
	1151 cm ⁻¹	-0,325	0,340	0,215
1099 cm ⁻¹	0,300	0,559	0,686	
1079 cm ⁻¹	-0,138	0,463	0,396	
1035 cm ⁻¹	-0,105	0,566	0,393	

Z projekcie analýzy hlavných komponentov zahŕňajúc výsledky z TGA (Obrázok 28) je možné vidieť, rovnako ako v predchádzajúcom prípade (Obrázok 26), že vzorky sa opäť projektujú do štyroch kvadrantov. V tomto prípade dochádza k prehľadnejšiemu rozdeleniu kultúr *Synechocystis salina* CCALA 192 a *Synechocystis* sp. PCC 6803- v horných kvadrantoch sa nachádzajú vzorky kultúry *Synechocystis* sp. PCC 6803, zatiaľ čo v celej spodnej časti projekcie sa nachádzajú vzorky *Synechocystis salina* CCALA 192. Za toto výrazné rozdelenie kultúr môžu pravdepodobne výsledky zo samotnej termogravimetrickej analýzy, kedy dochádzalo k výrazným odlišnostiam medzi rozmedzím teplôt pri 200–300°C a 200–400°C (opísané v kapitole 4.4). Ďalším dôležitým parametrom je opäť obsah PHB, ako je možné vidieť v pravom dolnom kvadrante, kde sa nachádzajú vzorky s najvyšším % obsahom PHB, diagonálne od toho (vľavo hore) zasa vzorky s najmenším obsahom PHB.

5 ZÁVER

Primárnym cieľom tejto diplomovej práce bolo nájsť najst' a vyskúšať kvalitatívne a kvantitatívne metódy stanovenia polyhydroxyalkanoátov u siníc. Najprv bolo potrebné kultivovať sinice tak, aby vyprodukovali rôzne množstvá PHA– konkrétne polyhydroxybutyrátu, ktorý sme stanovovali. V priebehu práce boli vyskúšané tri rôzne typy kultivácie. Najskôr bola použitá lampa v cykle 16/8 hod, pod ktorou sinice vyprodukovali maximálne 13 % PHB z hmotnosti vysušenej biomasy. Nasledovalo použitie multikultivátora, kde sinice dokázali vyprodukovať až 19% PHB v bežnom type kultivačného média a pri už spomínanom cykle 16/8 hod. Podobný výsledok sa nám už za rovnakých podmienok nepodarilo zopakovať, no okrem použitia klasického média, bolo vyskúšané aj médium s 2% prídavkom soli NaCl, kde sa výsledné množstvá PHB pohybovali v rozmedzí od 4 do 12,6%.

Najvyšší obsah PHB bol získaný z kultivovaných mixotrofných médií, kedy mali sinice k dispozícii rôzne typy uhlíkového substrátu–acetát a propionát sodný, 1,4 butandiol a γ -butyrolakton. S pomocou pridaného uhlíkového zdroja, sinice boli schopné vyprodukovať takmer 23% PHB. Kultúry *Synechocystis salina* CCALA 192 a *Synechocystis* sp. PCC 6803 sa v akumulácii granúl polyhydroxybutyrátu boli výrazne rozdielne pri všetkých typoch kultivácii.

Metódy, použité v tejto diplomovej práci boli vybrané tak, aby čo najrýchlejšie a s najvyššou efektivitou bolo možné stanoviť obsah polyhydroxyalkanoátov. Začalo sa od analýzy vzoriek v kvapalnom stave, bez výrazných úprav, cez sušenie biomasy vzoriek a ich analýze bez, alebo so špeciálnou úpravou. Celkovo boli použité štyri techniky– cytometria, UV–VIS spektrometria, termogravimetrická analýza, infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou. Navrhnuté techniky boli vo výsledku korelované s obsahom PHA, zisteným plynovou chromatografiou ako referenčnou technikou, v súčasnosti štandardne využívanou za účelom stanovenia PHB v bunkách.

Zistili sme, že najvyššia korelácia s obsahom PHB sa dosiahla pomocou FT-IR, kedy nastali v konkrétnych oblastiach charakteristické vibrácie, ktoré môžeme prisúdiť práve polyhydroxybutyrátu. Pre jednu z testovaných kultúr (*Synechocystis salina* CCALA 192) korelácia bola dosiahnutá aj pri termogravimetrickej analýze, kedy nastal úbytok hmotnosti v rozsahu teplôt 200–300°C, ktorý môže byť prisúdený tepelnej degradácii PHB.

Pri technikách prietokovej cytometrie a UV–VIS spektrometrie neprebehlo úspešné stanovenie PHB. Tieto metódy sa však vyplatili v niečom inom– pomocou nich bolo možné charakterizovať pigmenty, ktoré sa u siníc nachádzajú. Konkrétne sme boli schopní stanoviť

chlorofyl, karotenoidy a fykocyanín pomocou integračnej gule pri UV–VIS spektrometrii a intenzitu fluorescencie u konkrétnych kanálov v prietokovej cytometrii. Vzájomná korelácia bola zistená pri chlorofyle.

Na záver boli porovnané všetky použité techniky a výsledky z nich metódou PCA analýzy. Najskôr, bola spomedzi všetkých vzoriek prevedená korelačná analýza, kde sa dokázala korelácia medzi obsahom PHB a výstupom charakteristických pík, meraných infračervenou spektroskopiou. V prípade strednej hodnoty intenzity lipofilnej sondy BODIPY 439/503, ktorá sa použila pri prietokovej cytometrii bola zistená slabá korelácia, rovnako ako pri termogravimetrickej analýze.

Korelácia nastala aj pri výsledných absorbanciách z určitých vlnových dĺžok pre charakteristické pigmenty. PCA analýzou boli študované všetky typy vzoriek a bolo možné pozorovať medzi nimi vzájomné rozdiely.

- [1] REDDY, C.S.K, R GHAI, RASHMI a V.C KALIA, 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*. **87**(2), 137-146. DOI: 10.1016/S0960-8524(02)00212-2. ISSN 09608524. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852402002122>
- [2] DROSG, B., 2015. Photo-autotrophic Production of Poly(hydroxyalkanoates) in Cyanobacteria. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. **29**(2), 145-156. DOI: 10.15255/CABEQ.2014.2254. ISSN 03529568. Dostupné také z: http://pierre.fkit.hr/hdki/cabeq/pdf/29_2_2015/Cabeq_2015-02-web_Drosg.pdf
- [3] LAU, Nyok-Sean, Choon Pin FOONG, Yukio KURIHARA, Kumar SUDESH, Minami MATSUI a Brett NEILAN, 2014. RNA-Seq Analysis Provides Insights for Understanding Photoautotrophic Polyhydroxyalkanoate Production in Recombinant *Synechocystis* Sp. *PLoS ONE*. **9**(1). DOI: 10.1371/journal.pone.0086368. ISSN 1932-6203.
- [4] FLICKINGER, Michael C. a Stephen W. DREW, c1999. *The encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation*. New York: Wiley. ISBN 978-047-1138-228
- [5] RAZA, Zulfiqar Ali, Sharjeel ABID a Ibrahim M. BANAT, 2018. *Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications*. **126**, 45-56. DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.10.001. ISSN 09648305. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830517300276>
- [6] SINGH, A.K. a N. MALLICK, 2008. Enhanced production of SCL-LCL-PHA copolymer by sludge-isolated *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 7925. *Letters in Applied Microbiology*. **46**(3), 350-357. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2008.02323.x. ISSN 0266-8254. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-765X.2008.02323.x>
- [7] SINGH, A.K. a N. MALLICK, 2009. SCL-LCL-PHA copolymer production by a local isolate, *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 7925. *Biotechnology Journal*. **4**(5), 703-711. DOI: 10.1002/biot.200800307. ISSN 18606768. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/biot.200800307>
- [8] REHM, Bernd H.A. a Alexander STEINBÜCHEL, 1999. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA

- synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*. **25**(1-3), 3-19. DOI: 10.1016/S0141-8130(99)00010-0. ISSN 01418130. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813099000100>
- [9] Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications, 2002. *Polymer testing*. **4**(21), 433-442. ISSN 0142-9418.
- [10] Short-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates: Synthesis in Metabolically Engineered *Escherichia coli* and Medical Applications, 2005. *J. Microbiol. Biotechnol.* **15**(1), 206-215.
- [11] ŠPITALSKÝ, Zdeno, Igor LACÍK, Elena LATHOVÁ, Ivica JANIGOVÁ a Ivan CHODÁK, 2006. Controlled degradation of polyhydroxybutyrate via alcoholysis with ethylene glycol or glycerol. *Polymer Degradation and Stability*. **91**(4), 856-861. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2005.06.019. ISSN 01413910. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391005003022>
- [12] Structural effects on enzymatic degradabilities for poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and its copolymers., 1999. *Int J Biol Macromol.* **20**(25), 1-3.
- [13] BUGNICOURT, E., P. CINELLI, A. LAZZERI a V. ALVAREZ, 2014. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters*. **8**(11), 791-808. DOI: 10.3144/expresspolymlett.2014.82. ISSN 1788618X.
- [14] Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements, 2016. *International journal of biological macromolecules*. **2016**(89), 161-174. ISSN 0141-8130
- [15] DROSG, B., 2015. Photo-autotrophic Production of Poly(hydroxyalkanoates) in Cyanobacteria. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. **29**(2), 145-156. DOI: 10.15255/CABEQ.2014.2254. ISSN 03529568. Dostupné také z: http://pierre.fkit.hr/hdki/cabeq/pdf/29_2_2015/Cabeq_2015-02-web_Drosg.pdf
- [16] WANG, Bo, Shawn PUGH, David R. NIELSEN, Weiwen ZHANG a Deirdre R. MELDRUM, 2013. Engineering cyanobacteria for photosynthetic production of 3-hydroxybutyrate directly from CO₂. *Metabolic Engineering*. **16**, 68-77. DOI: 10.1016/j.ymben.2013.01.001. ISSN 10967176. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096717613000049>
- [17] BRESAN, Stephanie, Anna SZNAJDER, Waldemar HAUF, Karl FORCHHAMMER, Daniel PFEIFFER a Dieter JENDROSSEK, 2016.

- Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids. *Scientific Reports*. **6**(1), -. DOI: 10.1038/srep26612. ISSN 2045-2322. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/srep26612>
- [18] MAESTRO, Beatriz a Jesús M. SANZ, 2017. Polyhydroxyalkanoate-associated phasins as phylogenetically heterogeneous, multipurpose proteins. *Microbial Biotechnology*. **10**(6), 1323-1337. DOI: 10.1111/1751-7915.12718. ISSN 1751-7915. Dostupné také z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1751-7915.12718>
- [19] GRAGE, K., A. C. JAHNS, N. PARLANE, R. PALANISAMY, I. A. RASIAH, J. A. ATWOOD a B. H. A. REHM. Bacterial Polyhydroxyalkanoate Granules: Biogenesis, Structure, and Potential Use as Nano-/Micro-Beads in Biotechnological and Biomedical Applications. *Biomacromolecules*. 2009, 10(4), 660-669. ISSN 1525-7797
- [20] SEEBACH, Dieter a Monica G. FRITZ, 1999. Detection, synthesis, structure, and function of oligo(3-hydroxyalkanoates): contributions by synthetic organic chemists. *International Journal of Biological Macromolecules*. **25**(1-3), 217-236. DOI: 10.1016/S0141-8130(99)00037-9. ISSN 01418130. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813099000379>
- [21] RAZA, Zulfiqar Ali, Shahina RIAZ a Ibrahim M. BANAT, 2018. Polyhydroxyalkanoates: Properties and chemical modification approaches for their functionalization. *Biotechnology Progress*. **34**(1), 29-41. DOI: 10.1002/btpr.2565. ISSN 87567938. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/btpr.2565>
- [22] JENDROSSEK, Dieter. Extracellular Polyhydroxyalkanoate Depolymerases: The Key Enzymes of PHA Degradation. In: Doi, Y. a A. Steinbüchel (eds.) *Biopolymers: Polyesters II: Properties and Chemical Synthesis*. Weinheim: Wiley-VCH, 2002, 42-84. ISBN 978-3527302192
- [23] ISHII, Daisuke, Tang YING, Tetsuji YAMAOKA a Tadahisa IWATA, 2009. Characterization and Biocompatibility of Biopolyester Nanofibers. *Materials*. **2**(4), 1520-1546. DOI: 10.3390/ma2041520. ISSN 1996-1944. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1996-1944/2/4/1520>
- [24] SENATOV, Fedor, Natalia ANISIMOVA, Mikhail KISELEVSKIY, Aleksey KOPYLOV, Viktor TCHERDYNTSEV a Aleksey MAKSIMKIN, 2017. Polyhydroxybutyrate/Hydroxyapatite Highly Porous Scaffold for Small Bone

- Defects Replacement in the Nonload-bearing Parts. *Journal of Bionic Engineering*. **14**(4), 648-658. DOI: 10.1016/S1672-6529(16)60431-6. ISSN 1672-6529. Dostupné také z: [http://link.springer.com/10.1016/S1672-6529\(16\)60431-6](http://link.springer.com/10.1016/S1672-6529(16)60431-6)
- [25] ELMOWAFY, Enas, Abdalla ABDAL-HAY, Athanasios SKOURAS, Mattia TIBONI, Luca CASETTARI a Vincenzo GUARINO, 2019. Polyhydroxyalkanoate (PHA): applications in drug delivery and tissue engineering. *Expert Review of Medical Devices*. **16**(6), 467-482. DOI: 10.1080/17434440.2019.1615439. ISSN 1743-4440. Dostupné také z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17434440.2019.1615439>
- [26] Priemerné mesačné ceny plastov, 2015. Plasticportal [online]. Nitra: ICOSA [cit. 2018-04-28]. Dostupné z: <http://www.plasticportal.sk/sk/ceny-polymerov/lm/1/>
- [27] ARUMUGAM, A., T. S. ANUDAKSHAINI, R. SHRUTHI, K. JEYAVISHNU, S. SUNDARRA HARINI a J. S. SHARAD, Low-cost production of PHA using cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) juice as potential substrate: optimization and characterization. *Biomass Conversion and Biorefinery*. DOI: 10.1007/s13399-019-00502-5. ISSN 2190-6815. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s13399-019-00502-5>
- [28] CARPINE, Roberta, Francesca RAGANATI, Giuseppe OLIVIERI, Klaas J. HELLINGWERF, Antonino POLLIO, Piero SALATINO a Antonio MARZOCHELLA, 2018. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production by *Synechocystis* PCC6803 from CO₂: Model development. *Algal Research*. **29**, 49-60. DOI: 10.1016/j.algal.2017.11.011. ISSN 22119264. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211926417302795>
- [29] ARIAS, Dulce María, Joan GARCÍA a Enrica UGGETTI, 2020. Production of polymers by cyanobacteria grown in wastewater: Current status, challenges and future perspectives. *New Biotechnology*. **55**, 46-57. DOI: 10.1016/j.nbt.2019.09.001. ISSN 18716784. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678419300226>
- [30] E., Zainuddin, Mundt S., Wegner U. a Mentel R., 2002. Cyanobacteria a potential source of antiviral substances against influenza virus. *Medical Microbiology and Immunology*. **191**(3-4), 181-182. DOI: 10.1007/s00430-002-0142-1. ISSN 0300-8584. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00430-002-0142-1>

- [31] KUMAR, Jay, Divya SINGH, Madhu B. TYAGI a Ashok KUMAR, 2019. Cyanobacteria: Applications in Biotechnology. *Cyanobacteria*. Elsevier, 2019, 327-346. DOI: 10.1016/B978-0-12-814667-5.00016-7. ISBN 9780128146675. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128146675000167>
- [32] SOULE, Tanya a Ferran GARCIA-PICHEL, 2019. Cyanobacteria. *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier, 2019. DOI: 10.1016/B978-0-12-809633-8.20886-8. ISBN 9780128096338. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128096338208868>
- [33] CARPINE, Roberta, Wei DU, Giuseppe OLIVIERI, Antonino POLLIO, Klaas J. HELLINGWERF, Antonio MARZOCHELLA a Filipe BRANCO DOS SANTOS, 2017. Genetic engineering of *Synechocystis* sp. PCC6803 for poly- β -hydroxybutyrate overproduction. *Algal Research*. **25**, 117-127. DOI: 10.1016/j.algal.2017.05.013. ISSN 22119264. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211926417301480>
- [34] PANDA, B. a N. MALLICK, 2007. Enhanced poly- γ -hydroxybutyrate accumulation in a unicellular cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Letters in Applied Microbiology*. **44**(2), 194-198. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2006.02048.x. ISSN 0266-8254. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-765X.2006.02048.x>
- [35] LAU, Nyok-Sean, Minami MATSUI a Amirul Al-Ashraf ABDULLAH, 2015. Cyanobacteria: Photoautotrophic Microbial Factories for the Sustainable Synthesis of Industrial Products. *BioMed Research International*. **2015**, 1-9. DOI: 10.1155/2015/754934. ISSN 2314-6133. Dostupné také z: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/754934/>
- [36] RAMOS, Vitor, João MORAIS a Vitor M. VASCONCELOS, 2017. A curated database of cyanobacterial strains relevant for modern taxonomy and phylogenetic studies. *Scientific Data*. **4**(1). DOI: 10.1038/sdata.2017.54. ISSN 2052-4463. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/sdata201754>
- [37] The Cyanobacterial Route to Produce Poly- β -hydroxybutyrate, 2015. *Chemical engineering transaction*. (43), 289-294. DOI: 10.3303/CET1543049. ISSN 2283-9216.
- [38] ANGERMAYR, S Andreas, Klaas J HELLINGWERF, Peter LINDBLAD a M Joost TEIXEIRA DE MATTOS, 2009. Energy biotechnology with

- cyanobacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. **20**(3), 257-263. DOI: 10.1016/j.copbio.2009.05.011. ISSN 09581669. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166909000706>
- [39] HUANG, Hsin-Ho a Peter LINDBLAD, 2013. Wide-dynamic-range promoters engineered for cyanobacteria. *Journal of Biological Engineering*. **7**(1). DOI: 10.1186/1754-1611-7-10. ISSN 1754-1611. Dostupné také z: <http://jbioleng.biomedcentral.com/articles/10.1186/1754-1611-7-10>
- [40] HEIDORN, Thorsten, Daniel CAMSUND, Hsin-Ho HUANG, Pia LINDBERG, Paulo OLIVEIRA, Karin STENSJÖ a Peter LINDBLAD, 2011. Synthetic Biology in Cyanobacteria. *Synthetic Biology, Part A*. Elsevier, 2011, 539-579. Methods in Enzymology. DOI: 10.1016/B978-0-12-385075-1.00024-X. ISBN 9780123850751. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012385075100024X>
- [41] TROSCHL, Clemens, Katharina MEIXNER, Ines FRITZ, Klaus LEITNER, Alejandra Palacios ROMERO, Adriana KOVALCIK, Petr SEDLACEK a Bernhard DROSG, 2018. Pilot-scale production of poly- β -hydroxybutyrate with the cyanobacterium *Synechocystis* sp. CCALA192 in a non-sterile tubular photobioreactor. *Algal Research*. **34**, 116-125. DOI: 10.1016/j.algal.2018.07.011. ISSN 22119264. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211926418302923>
- [42] TROSCHL, Clemens, Katharina MEIXNER a Bernhard DROSG, 2017. Cyanobacterial PHA Production—Review of Recent Advances and a Summary of Three Years' Working Experience Running a Pilot Plant. *Bioengineering*. **4**(4). DOI: 10.3390/bioengineering4020026. ISSN 2306-5354. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2306-5354/4/2/26>
- [43] MAIER, Raina M., 2009. Bacterial Growth. *Environmental Microbiology*. Elsevier, 2009, 37-54. DOI: 10.1016/B978-0-12-370519-8.00003-1. ISBN 9780123705198. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123705198000031>
- [44] TORTORA, Gerard J., 2010. *Microbiology an introduction*. 10th. San Francisco: CA Pearson Benjamin Cummings 2010. ISBN 0321582020.
- [45] BRIDGES, Bryn A., Patricia L. FOSTER a Andrew R. TIMMS, 2001. Effect of endogenous carotenoids on “adaptive” mutation in *Escherichia coli* FC40. *Mutation*

- Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. **473**(1), 109-119. DOI: 10.1016/S0027-5107(00)00144-5. ISSN 00275107. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0027510700001445>
- [46] PANDA, Bhabatarini, Praveen JAIN, Laxuman SHARMA a Nirupama MALLICK, 2006. Optimization of cultural and nutritional conditions for accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Bioresource Technology*. **97**(11), 1296-1301. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.05.013. ISSN 09608524. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852405002877>
- [47] COSTA, Samantha Serra, Andréa Lobo MIRANDA, Michele Greque DE MORAIS, Jorge Alberto Vieira COSTA a Janice Izabel DRUZIAN, 2019. Microalgae as source of polyhydroxyalkanoates (PHAs) — A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. **131**, 536-547. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.099. ISSN 01418130. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813019311869>
- [48] Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products-A review., 2017. *Bioresour Technol*. **2**(244), 1198-1206. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.05.170.
- [49] RAZZAK, Shaikh Abdur, Saad Aldin M. ALI, Mohammad Mozahar HOSSAIN a Hugo DELASA, 2017. Biological CO₂ fixation with production of microalgae in wastewater – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **76**, 379-390. DOI: 10.1016/j.rser.2017.02.038. ISSN 13640321. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032117302514>
- [50] GONÇALVES, Ana L., José C.M. PIRES, Manuel SIMÕES, Jorge Alberto Vieira COSTA a Janice Izabel DRUZIAN, 2017. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Research*. **24**, 403-415. DOI: 10.1016/j.algal.2016.11.008. ISSN 22119264. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211926416306300>
- [51] LI, Yantao, Junchao HUANG, Gerhard SANDMANN a Feng CHEN, 2009. High-light and sodium chloride stress differentially regulate the biosynthesis of a staxanthin in *Chlorella Zofingiensis* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*. **45**(3), 635-641. DOI: 10.1111/j.1529-8817.2009.00689.x. ISSN 00223646. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1529-8817.2009.00689.x>

- [52] *Quantitative chemical techniques*, 1999. 5th. United States: W. H. Freeman and Company. ISBN 9780716728818.
- [53] MANANGAN, Thara a Sarinya SHAWAPHUN, 2010. Quantitative extraction and determination of polyhydroxyalkanoate accumulated in *Alcaligenes latus* dry cells. *ScienceAsia*. **36**(3), 199-203. DOI: 10.2306/scienceasia1513-1874.2010.36.199. ISSN 1513-1874. Dostupné také z: <http://www.scienceasia.org/content/viewabstract.php?ms=2677>
- [54] YELLORE a DESAI, 2002. Production of poly-3-hydroxybutyrate from lactose and whey by *Methylobacterium* sp. ZP24. *Letters in Applied Microbiology*. **26**(6), 391-394. DOI: 10.1046/j.1472-765X.1998.00362.x. ISSN 0266-8254. Dostupné také z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1472-765X.1998.00362.x>
- [55] BHATI, Ranjana a Nirupama MALLICK, 2015. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production by the diazotrophic cyanobacterium *Nostoc muscorum* Agardh: Process optimization and polymer characterization. *Algal Research*. **7**, 78-85. DOI: 10.1016/j.algal.2014.12.003. ISSN 22119264. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211926414001350>
- [56] HANYKÝŘ, V.; KUTZENDÖRFER, J. *Technologie keramiky*. Praha: Silikátový svaz, 2008. ISBN 978-80-86821-48-1.
- [57] HANYKÝŘ, V. Vliv keramických surovin na strukturu a vlastnosti pórovitého keramického střepu, *Zpravodaj STOP*, 2010, 12 (4), 4-11.
- [58] Characterization of polyhydroxyalkanoates produced by *Bacillus subtilis* isolated from soil samples, 2014. *Malaya Journal of Biosciences*. **1**(1), 8-12.
- [59] ROJA, K., D. RUBEN SUDHAKAR, Susaimanickam ANTO a Thangavel MATHIMANI, 2019. Extraction and characterization of polyhydroxyalkanoates from marine green alga and cyanobacteria. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. **22**. DOI: 10.1016/j.bcab.2019.101358. ISSN 18788181. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878818119311259>
- [60] MEIXNER, K., A. KOVALCIK, E. SYKACEK, et al., 2018. Cyanobacteria Biorefinery — Production of poly(3-hydroxybutyrate) with *Synechocystis salina* and utilisation of residual biomass. *Journal of Biotechnology*. **265**, 46-53. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2017.10.020. ISSN 01681656. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165617317248>

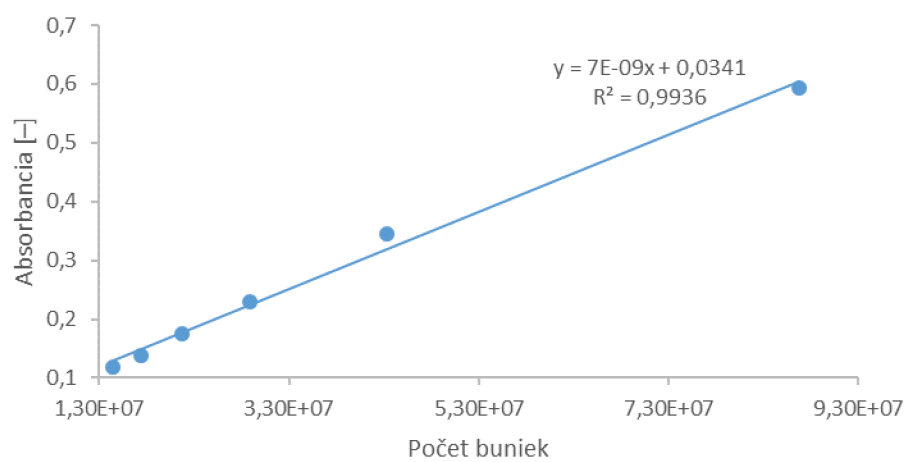
- [61] KOVALCIK, Adriana, Katharina MEIXNER, Matthias MIHALIC, et al., 2017. Characterization of polyhydroxyalkanoates produced by *Synechocystis salina* from digestate supernatant. *International Journal of Biological Macromolecules*. **102**, 497-504. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.04.054. ISSN 01418130. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813016322802>
- [62] FISCHER, Oldřich, 1984. *Fyzikální chemie: (termodynamika, elektrochemie, kinetika, koloidní soustavy : učebnice pro vysoké školy)*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství. ISBN (Váz.).
- [63] SALGAONKAR, Bhakti B. a Judith M. BRAGANÇA, 2015. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate- co -3-hydroxyvalerate) by Halogeometricum borinquense strain E3. *International Journal of Biological Macromolecules*. **78**, 339-346. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.04.016. ISSN 01418130. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813015002548>
- [64] NAVRÁTIL, Leoš, 2005. *Medicínská biofyzika*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-1152-2.
- [65] SKOOG, Douglas A., F. James. HOLLER a Stanley R. CROUCH, c2007. *Principles of instrumental analysis*. 6th ed. / Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole. ISBN 978-049-5012-016.
- [66] HLÍDEK, P, 2003, Fyzikální ústav UK, Fourierovská infračervená spektroskopie.
- [67] HORÁK, M, D. PAPOUŠEK, 1976, Academia, Infračervená spektra a struktura molekul
- [68] Fourier Transform Infrared microspectroscopy and chemometrics as a tool for the discrimination of cyanobacterial strains, 1999. *Phytochemistry*. **52**(1999), 407-417.
- [69] MACEY, Marion G. Flow cytometry: principles and applications. Totowa, N.J.: Humana Press, c2007. ISBN 1597454516.
- [70] RUMIN, Judith, Hubert BONNEFOND, Bruno SAINT-JEAN, Catherine ROUXEL, Antoine SCIANDRA, Olivier BERNARD, Jean-Paul CADORET a Gaël BOUGARAN, 2015. The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. *Biotechnology for Biofuels*. **8**(1). DOI: 10.1186/s13068-015-0220-4. ISSN 1754-6834. Dostupné také z: <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/8/1/42>
- [71] ALVES, L.P.S., A.T. ALMEIDA, L.M. CRUZ, F.O. PEDROSA, E.M. DE SOUZA, L.S. CHUBATSU, M. MÜLLER-SANTOS a G. VALDAMERI, 2017. A

- simple and efficient method for poly-3-hydroxybutyrate quantification in diazotrophic bacteria within 5 minutes using flow cytometry. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **50**(1). DOI: 10.1590/1414-431x20165492. ISSN 1414-431X.
- [72] Cytex Aurora's user's guide, 2017. *Cytex* [online]. Canada: Cytex Biosciences [cit. 2020-07-23]. Dostupné z: <https://www.umassmed.edu/globalassets/flow-cytometry-lab/documents/aurora-users-guide-103017.pdf>
- [73] SOTO, Gabriela, Lorena SETTEN, Christian LISI, Camila MAURELIS, Matteo MOZZICAFREDDO, Massimiliano CUCCIOLONI, Mauro ANGELETTI a Nicolás Daniel AYUB, 2012. Hydroxybutyrate prevents protein aggregation in the halotolerant bacterium *Pseudomonas* sp. CT13 under abiotic stress. *Extremophiles*. **16**(3), 455-462. DOI: 10.1007/s00792-012-0445-0. ISSN 1431-0651. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00792-012-0445-0>
- [74] DOS SANTOS, Raquel Rezende, Priscila Santos CORRÊA, Fabio Moyses Lins DANTAS a Cláudia Maria Luz Lapa TEIXEIRA, 2019. Evaluation of the co-production of total carotenoids, C-phycocyanin and polyhydroxyalkanoates by *Arthrospira platensis*. *Bioresource Technology Reports*. **7**. DOI: 10.1016/j.biteb.2019.100226. ISSN 2589014X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2589014X19301161>
- [75] SLANINOVA, E., SEDLACEK, P., MRAVEC, F. *et al.* Light scattering on PHA granules protects bacterial cells against the harmful effects of UV radiation. *Appl Microbiol Biotechnol* **102**, 1923–1931 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8760-8>
- [76] SEDLACEK, Petr, Eva SLANINOVA, Vojtech ENEV, et al., 2019. What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **103**(4), 1905-1917. DOI: 10.1007/s00253-018-09584-z. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-018-09584-z>

7 ZOZNAM SKRATIEK A SYMBOLOV

%	percento
°C	stupeň Celsia
μE	mikroeinstejn
μl	mikroliter
ATR	technika zoslabeného úplného odrazu
cm	centimeter
cm ⁻¹	reciproký centimeter
DSC	diferenčná skenovacia kalorimetria
DMSO	dimethylsulfoxid
FT-IR	infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou
g	gram
GC-FID	plynová chromatografia s plameňovým ionizačným detektorom
l	liter
<i>m</i>	hmotnosť
MCL-PHA	polyhydroxyalkanoáty so stredne dlhými postrannými reťazcami (<i>medium-chain-length</i>)
mg	miligram
min	minúty
ml	mililiter
PCA	analýza hlavných komponentov
PHA	polyhydroxyalkanoát
PHB	polyhydroxybutyrát
PLA	polymliečna kyselina
rpm	otáčky za minútu (<i>revolutions per minute</i>)
SCL-PHA	polyhydroxyalkanoáty s krátkymi postrannými reťazcami (<i>short-chain-length</i>)
T _g	teplota skleneného prechodu (<i>glass transition temperature</i>)
TGA	termogravimetrická analýza
TBE	pufor (<i>Tris-Borate-EDTA</i>)
UV-VIS	ultrafialovo-viditeľná spektroskopia
W	Watt

8 PRÍLOHY



Obrázok 29 Závislosť absorbancie pri 560 nm na počte bunie

Tabuľka 16 Korelačná analýza hl. komponent, uvádzajúca hodnoty Pearsonovho korelačného koeficientu R; tučne sú vyznačené hodnoty, kde bola stanovená korelácia na hladine štatistickej významnosti $\alpha=0,05$, farebne zeleno- korelácia nad 0,5; žltou korelácia pod -0,5) - 1. časť; - čísla v zátvorkách pri pigmentoch značia emisné vlnové dĺžky, 1.pop- označuje intenzívnejší pik v prípade viacerých populácií))

Premenné	GC		Cytometria									
	PHB [%]	bodipy	Chlorofyl (678)	Bkaroten (466)	Fykocyanin (630)	chlorofyl (687)	Bkaroten (539)	fykocyanin (630, 1.p)	Chlorofyl (678, 1.p)	Bkaroten (466 1.p)	chlorofyl (687, 1.p)	Bkaroten 539, 1. p)
GC												
PHB [%]	1	0,536	-0,254	0,188	0,057	-0,360	0,198	-0,031	-0,169	0,451	-0,370	0,420
bodipy	0,536	1	0,001	0,601	0,040	-0,031	0,057	0,263	0,033	0,643	-0,009	0,667
Chlorofyl (678)	-0,254	0,001	1	0,311	0,256	0,699	-0,118	0,583	0,984	0,143	0,694	0,187
B karotén (466)	0,188	0,601	0,311	1	0,426	0,516	0,374	0,259	0,339	0,376	0,482	0,406
Fykocyanin (630)	0,057	0,040	0,256	0,426	1	0,460	0,300	0,113	0,264	0,330	0,368	0,351
chlorofyl (687)	-0,360	-0,035	0,699	0,516	0,460	1	0,518	0,353	0,655	0,091	0,917	0,105
Bkaroten (539)	-0,199	0,057	-0,118	0,374	0,300	0,518	1	-0,027	-0,194	-0,012	0,497	0,084
Fykocyanin (630, 1.pop)	-0,031	0,263	0,583	0,259	0,113	0,353	-0,027	1	0,600	0,112	0,547	0,339
Chlorofyl (678, 1.pop)	-0,169	0,033	0,984	0,339	0,264	0,655	-0,194	0,600	1	0,170	0,656	0,206
Bkaroten (466, 1. pop)	0,451	0,643	0,143	0,376	0,330	0,091	-0,012	0,112	0,170	1	0,119	0,835
Chlorofyl (687, 1. pop)	-0,371	-0,009	0,694	0,482	0,368	0,917	0,497	0,547	0,656	0,119	1	0,167
B-karoten (539, 1.pop)	0,420	0,667	0,187	0,406	0,351	0,105	0,084	0,339	0,206	0,835	0,167	1
680 nm	-0,156	-0,156	0,536	-0,190	0,009	0,168	-0,343	0,497	0,562	0,171	0,251	0,130
630 nm	-0,246	-0,234	0,667	-0,088	0,108	0,367	-0,215	0,181	0,650	-0,042	0,315	-0,130
485 nm	0,486	0,345	-0,647	0,213	-0,035	-0,327	0,277	-0,418	-0,632	0,163	-0,355	0,141
680 nm/630 nm	0,178	0,178	-0,564	0,131	-0,085	-0,179	0,316	-0,267	-0,575	-0,028	-0,172	0,047
485 nm/630 nm	0,216	0,182	-0,547	0,187	-0,042	-0,129	0,374	-0,376	-0,564	-0,048	-0,163	0,003
485 nm/680nm	0,320	0,248	-0,593	0,230	-0,014	-0,212	0,357	-0,464	-0,601	-0,017	-0,266	0,004
2958 cm ⁻¹	0,2350	-0,069	0,076	0,019	-0,077	-0,211	-0,295	0,155	0,122	-0,067	-0,115	-0,050
2925 cm ⁻¹	0,065	-0,242	-0,140	-0,313	-0,149	-0,475	-0,442	-0,005	-0,120	-0,174	-0,387	-0,184
2873 cm ⁻¹	0,051	-0,098	0,229	0,004	-0,099	-0,141	-0,335	0,357	0,260	-0,112	-0,002	-0,041
2854 cm ⁻¹	0,081	-0,070	0,198	-0,011	-0,010	-0,162	-0,365	0,162	0,218	0,036	-0,098	0,021
1737 cm ⁻¹	0,885	0,278	-0,314	0,062	0,001	-0,405	-0,202	-0,035	-0,227	0,167	-0,381	0,171
1542 cm ⁻¹	-0,106	0,155	0,671	0,482	0,318	0,783	0,296	0,371	0,653	0,190	0,712	0,271
1454 cm ⁻¹	0,226	-0,245	-0,190	-0,252	-0,045	-0,369	-0,309	-0,128	-0,174	-0,325	-0,386	-0,300
1392 cm ⁻¹	0,254	-0,085	-0,115	0,151	-0,080	-0,075	-0,034	-0,148	-0,073	-0,281	-0,097	-0,222
1382 cm ⁻¹	0,588	0,016	-0,297	0,025	-0,050	-0,340	-0,192	-0,197	-0,224	-0,078	-0,349	-0,061
1305 cm ⁻¹	0,819	0,252	-0,243	0,167	-0,031	-0,255	-0,112	-0,093	-0,150	0,108	-0,266	0,115
1261 cm ⁻¹	0,820	0,256	-0,239	0,168	0,061	-0,229	-0,092	-0,173	-0,146	0,220	-0,264	0,200
1240 cm ⁻¹	0,103	0,021	-0,063	0,273	-0,094	0,128	0,116	-0,301	-0,030	-0,138	0,045	-0,208
1189 cm ⁻¹	0,876	0,453	-0,252	0,291	-0,049	-0,253	-0,099	-0,041	-0,154	0,247	-0,251	0,189
1151 cm ⁻¹	-0,126	-0,273	-0,266	-0,396	-0,353	-0,542	-0,428	0,004	-0,246	-0,387	-0,434	-0,407
1099 cm ⁻¹	0,347	0,209	-0,168	-0,057	-0,278	-0,533	-0,511	0,099	-0,113	-0,001	-0,441	-0,061
1079 cm ⁻¹	0,041	-0,112	-0,281	-0,334	-0,308	-0,609	-0,482	-0,034	-0,257	-0,236	-0,520	-0,265
1035 cm ⁻¹	0,058	-0,204	-0,371	-0,439	-0,283	-0,667	-0,467	-0,106	-0,344	-0,273	-0,581	-0,286
1025 cm ⁻¹	-0,015	-0,254	-0,374	-0,462	-0,289	-0,646	-0,439	-0,124	-0,351	-0,317	-0,563	-0,327
931 cm ⁻¹	-0,032	-0,197	-0,144	-0,230	-0,286	-0,423	-0,363	0,199	-0,114	-0,294	-0,277	-0,229
827 cm ⁻¹	0,709	0,188	-0,288	-0,037	-0,060	-0,349	-0,289	-0,140	-0,216	0,309	-0,342	0,150
759 cm ⁻¹	-0,152	-0,387	-0,504	-0,667	-0,204	-0,652	-0,356	-0,295	-0,525	-0,292	-0,621	-0,333

Tabuľka 17 Korelačná analýza hl. komponent, uvádzajúca hodnoty Pearsonovho korelačného koeficientu R; 2. časť korelácia s difúznou transmisnou spektrometriou

		Difúzna transmisná spektrometria					
Premenné		680 nm	630 nm	485 nm	680 nm/630 nm	485 nm/630 nm	485 nm/680 nm
GC	PHB [%]	-0,156	-0,246	0,486	0,178	0,216	0,321
	bodipy	-0,156	-0,235	0,346	0,178	0,183	0,248
	Chlorofyl (678)	0,537	0,668	-0,647	-0,565	-0,548	-0,593
	B karotén (466)	-0,190	-0,089	0,214	0,131	0,187	0,231
	Fykocyanin (630)	0,009	0,108	-0,036	-0,085	-0,042	-0,015
	chlorofyl (687)	0,169	0,367	-0,327	-0,180	-0,130	-0,212
	Bkaroten (539)	-0,343	-0,215	0,277	0,316	0,375	0,358
	Fykocyanin (630, 1.pop)	0,498	0,182	-0,419	-0,268	-0,376	-0,464
	Chlorofyl (678, 1.pop)	0,562	0,650	-0,633	-0,576	-0,564	-0,601
	Bkaroten (466, 1. pop)	0,171	-0,042	0,164	-0,028	-0,049	-0,017
	Chlorofyl (687, 1. pop)	0,252	0,316	-0,355	-0,172	-0,163	-0,266
	B-karoten (539, 1.pop)	0,131	-0,130	0,141	0,047	0,003	0,005
	Difúzna transmisná spektrometria	680 nm	1,000	0,676	-0,824	-0,824	-0,912
630 nm		0,676	1,000	-0,838	-0,909	-0,833	-0,788
485 nm		-0,824	-0,838	1,000	0,843	0,886	0,948
680 nm/630 nm		-0,824	-0,909	0,843	1,000	0,971	0,886
485 nm/630 nm		-0,912	-0,833	0,886	0,971	1,000	0,958
485 nm/680nm	-0,955	-0,788	0,948	0,886	0,958	1,000	
Infračervená spektroskopia	2958 cm ⁻¹	0,322	0,263	-0,245	-0,276	-0,302	-0,296
	2925 cm ⁻¹	0,267	0,131	-0,243	-0,197	-0,272	-0,288
	2873 cm ⁻¹	0,450	0,295	-0,394	-0,332	-0,401	-0,438
	2854 cm ⁻¹	0,446	0,388	-0,420	-0,428	-0,471	-0,464
	1737 cm ⁻¹	-0,251	-0,344	0,530	0,314	0,338	0,402
	1542 cm ⁻¹	0,102	0,287	-0,187	-0,155	-0,088	-0,112
	1454 cm ⁻¹	-0,274	-0,172	0,237	0,255	0,260	0,257
	1392 cm ⁻¹	-0,409	-0,173	0,391	0,327	0,414	0,441
	1382 cm ⁻¹	-0,394	-0,306	0,536	0,370	0,433	0,490
	1305 cm ⁻¹	-0,268	-0,207	0,489	0,247	0,321	0,402
	1261 cm ⁻¹	-0,283	-0,201	0,522	0,236	0,322	0,422
	1240 cm ⁻¹	-0,289	0,125	0,184	0,063	0,195	0,264
	1189 cm ⁻¹	-0,278	-0,246	0,536	0,230	0,295	0,413
	1151 cm ⁻¹	0,108	-0,072	-0,118	-0,021	-0,117	-0,147
	1099 cm ⁻¹	0,061	-0,073	0,082	-0,030	-0,076	-0,025
	1079 cm ⁻¹	0,058	-0,102	-0,014	-0,002	-0,078	-0,072
	1035 cm ⁻¹	0,008	-0,180	0,049	0,071	-0,010	-0,013
1025 cm ⁻¹	0,007	-0,172	0,023	0,070	-0,012	-0,024	
931 cm ⁻¹	0,102	-0,221	-0,024	0,111	-0,012	-0,081	
827 cm ⁻¹	-0,084	-0,186	0,364	0,141	0,157	0,218	
759 cm ⁻¹	-0,103	-0,294	0,066	0,178	0,079	0,047	

Tabuľka 18 Korelačná analýza hl. komponent, 3. časť s infračervenou spektrometriou

		Infračervená spektroskopia (cm ⁻¹)									
	Premenné	2958	2925	2873	2854	1737	1542	1454	1392	1382	1305
GC	PHB [%]	0,235	0,065	0,051	0,082	0,885	-0,106	0,226	0,254	0,588	0,819
	bodipy	-0,069	-0,242	-0,098	-0,070	0,278	0,155	-0,245	-0,085	0,016	0,252
	Chlorofyl (678)	0,077	-0,141	0,230	0,198	-0,314	0,671	-0,191	-0,115	-0,298	-0,244
	B karotén (466)	0,019	-0,313	0,004	-0,012	0,062	0,483	-0,252	0,151	0,026	0,168
	Fykocyanin (630)	-0,078	-0,150	-0,099	-0,010	0,001	0,319	-0,045	-0,081	-0,050	-0,031
	chlorofyl (687)	-0,212	-0,475	-0,141	-0,162	-0,406	0,784	-0,370	-0,076	-0,341	-0,256
	Bkaroten (539)	-0,296	-0,442	-0,335	-0,365	-0,203	0,297	-0,309	-0,035	-0,192	-0,112
	Fykocyanin (630, 1.pop)	0,156	-0,006	0,358	0,163	-0,035	0,371	-0,128	-0,148	-0,197	-0,093
	Chlorofyl (678, 1.pop)	0,122	-0,120	0,260	0,219	-0,228	0,653	-0,174	-0,073	-0,224	-0,150
	Bkaroten (466, 1.)	-0,068	-0,174	-0,112	0,036	0,167	0,191	-0,326	-0,281	-0,078	0,108
Cytometria	Chlorofyl (687, 1.)	-0,115	-0,388	-0,002	-0,099	-0,381	0,712	-0,387	-0,097	-0,349	-0,266
	B-karoten (539, 1.pop)	-0,050	-0,184	-0,041	0,022	0,172	0,272	-0,300	-0,223	-0,061	0,115
	680 nm	0,322	0,267	0,450	0,446	-0,251	0,102	-0,274	-0,409	-0,394	-0,268
	630 nm	0,263	0,131	0,295	0,388	-0,344	0,287	-0,172	-0,173	-0,306	-0,207
	485 nm	-0,245	-0,243	-0,394	-0,420	0,530	-0,187	0,237	0,391	0,536	0,489
	680/630	-0,276	-0,197	-0,332	-0,428	0,314	-0,155	0,255	0,327	0,370	0,247
	485/630	-0,302	-0,272	-0,401	-0,471	0,338	-0,088	0,260	0,414	0,433	0,321
	485/680	-0,296	-0,288	-0,438	-0,464	0,402	-0,112	0,257	0,441	0,490	0,402
	2958 cm ⁻¹	1,000	0,848	0,940	0,920	0,371	-0,338	0,379	0,239	0,263	0,305
	2925 cm ⁻¹	0,848	1,000	0,846	0,873	0,235	-0,638	0,514	0,018	0,129	0,036
Difúzna transmisná spektrometria	2873 cm ⁻¹	0,940	0,846	1,000	0,899	0,212	-0,302	0,363	0,130	0,120	0,117
	2854 cm ⁻¹	0,920	0,873	0,899	1,000	0,126	-0,301	0,231	-0,051	-0,028	0,003
	1737 cm ⁻¹	0,371	0,235	0,212	0,126	1,000	-0,218	0,544	0,492	0,804	0,908
	1542 cm ⁻¹	-0,338	-0,638	-0,302	-0,301	-0,218	1,000	-0,388	0,060	-0,135	-0,053
	1454 cm ⁻¹	0,379	0,514	0,363	0,231	0,544	-0,388	1,000	0,613	0,694	0,428
	1392 cm ⁻¹	0,239	0,018	0,130	-0,051	0,492	0,060	0,613	1,000	0,874	0,675
	1382 cm ⁻¹	0,263	0,129	0,120	-0,028	0,804	-0,135	0,694	0,874	1,000	0,873
	1305 cm ⁻¹	0,305	0,036	0,117	0,003	0,908	-0,053	0,428	0,675	0,873	1,000
	1261 cm ⁻¹	0,187	-0,065	-0,011	-0,087	0,863	0,002	0,359	0,625	0,849	0,964
	1240 cm ⁻¹	0,133	-0,144	0,003	-0,065	0,142	0,140	0,074	0,593	0,440	0,456
Infračervená spektroskopia	1189 cm ⁻¹	0,282	0,011	0,080	0,033	0,875	-0,033	0,291	0,507	0,729	0,920
	1151 cm ⁻¹	0,473	0,770	0,585	0,450	0,120	-0,696	0,604	0,060	0,148	-0,052
	1099 cm ⁻¹	0,497	0,635	0,543	0,449	0,438	-0,495	0,584	0,184	0,366	0,285
	1079 cm ⁻¹	0,431	0,740	0,524	0,424	0,227	-0,688	0,640	0,070	0,221	0,029
	1035 cm ⁻¹	0,368	0,713	0,442	0,337	0,287	-0,739	0,684	0,081	0,278	0,071
	1025 cm ⁻¹	0,329	0,688	0,415	0,300	0,225	-0,741	0,666	0,068	0,243	0,024
	931 cm ⁻¹	0,397	0,626	0,566	0,323	0,244	-0,516	0,587	0,105	0,235	0,059
	827 cm ⁻¹	0,219	0,154	0,061	0,114	0,691	-0,119	0,181	0,243	0,562	0,657
	759 cm ⁻¹	0,081	0,579	0,133	0,181	0,010	-0,745	0,470	-0,214	-0,025	-0,273

Tabuľka 19 Korelačná analýza hl. komponentov, 4. časť s infračervenou spektrometriou

		Infračervená spektroskopia (cm ⁻¹)											
Premenné		1261	1240	1189	1151	1099	1079	1035	1025	931	827	759	
GC	PHB [%]	0,820	0,104	0,876	-0,127	0,347	0,041	0,058	-0,015	-0,031	0,710	-0,152	
	bodipy	0,256	0,021	0,453	-0,273	0,209	-0,112	-0,204	-0,254	-0,198	0,188	-0,387	
	Chlorofyl (678)	-0,240	-0,063	-0,253	-0,266	-0,168	-0,281	-0,371	-0,374	-0,144	-0,288	-0,505	
	B karotén (466)	0,168	0,274	0,292	-0,396	-0,057	-0,335	-0,440	-0,463	-0,230	-0,037	-0,667	
	Fykocyanin (630)	0,061	-0,095	-0,050	-0,353	-0,279	-0,309	-0,283	-0,290	-0,286	-0,061	-0,205	
Cytometria	chlorofyl (687)	-0,229	0,129	-0,253	-0,542	-0,533	-0,609	-0,668	-0,646	-0,424	-0,349	-0,653	
	Bkaroten (539)	-0,093	0,116	-0,099	-0,428	-0,511	-0,483	-0,467	-0,439	-0,363	-0,290	-0,356	
	Fykocyanin (630, 1.pop)	-0,174	-0,301	-0,042	0,005	0,100	-0,034	-0,106	-0,124	0,199	-0,141	-0,296	
	Chlorofyl (678, 1.pop)	-0,146	-0,030	-0,155	-0,246	-0,114	-0,258	-0,344	-0,352	-0,115	-0,216	-0,525	
	Bkaroten (466, 1. pop)	0,221	-0,139	0,248	-0,388	-0,001	-0,237	-0,273	-0,317	-0,294	0,310	-0,293	
	Chlorofyl (687, 1. pop)	-0,264	0,045	-0,252	-0,435	-0,442	-0,520	-0,582	-0,563	-0,277	-0,342	-0,622	
	B-karoten (539, 1.pop)	0,200	-0,209	0,190	-0,407	-0,062	-0,266	-0,286	-0,327	-0,229	0,151	-0,333	
	680 nm	-0,283	-0,289	-0,278	0,108	0,061	0,058	0,008	0,007	0,102	-0,084	-0,103	
	630 nm	-0,201	0,125	-0,246	-0,072	-0,073	-0,102	-0,180	-0,172	-0,221	-0,186	-0,294	
	485 nm	0,522	0,184	0,536	-0,118	0,082	-0,014	0,049	0,023	-0,024	0,364	0,066	
Difúzna transmisná spektrometria	680/630	0,236	0,063	0,230	-0,021	-0,030	-0,002	0,071	0,070	0,111	0,141	0,178	
	485/630	0,322	0,195	0,295	-0,117	-0,076	-0,078	-0,010	-0,012	-0,012	0,157	0,079	
	485/680n	0,422	0,264	0,413	-0,147	-0,025	-0,072	-0,013	-0,024	-0,081	0,218	0,047	
	2958 cm ⁻¹	0,187	0,133	0,282	0,473	0,497	0,431	0,368	0,329	0,397	0,219	0,081	
	2925 cm ⁻¹	-0,065	-0,144	0,011	0,770	0,635	0,740	0,713	0,688	0,626	0,154	0,579	
	2873 cm ⁻¹	-0,011	0,003	0,080	0,585	0,543	0,524	0,442	0,415	0,566	0,061	0,133	
	2854 cm ⁻¹	-0,087	-0,065	0,033	0,450	0,449	0,424	0,337	0,300	0,323	0,114	0,181	
	1737 cm ⁻¹	0,863	0,142	0,875	0,120	0,438	0,227	0,287	0,225	0,244	0,691	0,010	
	1542 cm ⁻¹	0,002	0,140	-0,033	-0,696	-0,495	-0,688	-0,739	-0,741	-0,516	-0,119	-0,745	
	1454 cm ⁻¹	0,359	0,074	0,291	0,604	0,584	0,640	0,684	0,666	0,587	0,181	0,470	
	Infračervená spektroskopia	1392 cm ⁻¹	0,625	0,593	0,507	0,060	0,184	0,070	0,081	0,068	0,105	0,243	-0,214
		1382 cm ⁻¹	0,849	0,440	0,729	0,148	0,366	0,221	0,278	0,243	0,235	0,562	-0,025
		1305 cm ⁻¹	0,964	0,456	0,920	-0,052	0,285	0,029	0,071	0,024	0,059	0,657	-0,273
		1261 cm ⁻¹	1,000	0,503	0,902	-0,144	0,222	-0,038	0,013	-0,033	-0,033	0,654	-0,299
		1240 cm ⁻¹	0,503	1,000	0,437	-0,100	0,037	-0,131	-0,198	-0,193	-0,182	0,191	-0,464
		1189 cm ⁻¹	0,902	0,437	1,000	-0,068	0,370	0,032	0,027	-0,036	0,005	0,696	-0,288
		1151 cm ⁻¹	-0,144	-0,100	-0,068	1,000	0,795	0,960	0,938	0,942	0,898	0,018	0,726
		1099 cm ⁻¹	0,222	0,037	0,370	0,795	1,000	0,894	0,807	0,765	0,741	0,341	0,424
		1079 cm ⁻¹	-0,038	-0,131	0,032	0,960	0,894	1,000	0,971	0,960	0,866	0,105	0,719
		1035 cm ⁻¹	0,013	-0,198	0,027	0,938	0,807	0,971	1,000	0,996	0,870	0,102	0,790
1025 cm ⁻¹		-0,033	-0,193	-0,036	0,942	0,765	0,960	0,996	1,000	0,871	0,043	0,798	
931 cm ⁻¹		-0,033	-0,182	0,005	0,898	0,741	0,866	0,870	0,871	1,000	0,044	0,584	
827 cm ⁻¹		0,654	0,191	0,696	0,018	0,341	0,105	0,102	0,043	0,044	1,000	0,028	
759 cm ⁻¹		-0,299	-0,464	-0,288	0,726	0,424	0,719	0,790	0,798	0,584	0,028	1,000	