



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# STUDIUM METABOLISMU BAKTERIÁLNÍCH BUNĚK A VLIVU STRESU NA BIOSYNTÉZU PHA

METABOLISM OF BACTERIAL CELLS AND THE EFFECT OF STRESS ON BIOSYNTHESIS OF PHA

## DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Dan Kučera

## ŠKOLITEL

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2019

## ABSTRAKT

Předložená dizertační práce se zabývá studiem biosyntézy polyhydroxyalkanoátů, jakožto mikrobiálního produktu s potenciálem nahradit současné konvenční plasty vyráběné z ropy. Dizertační práce je vypracovaná ve formě diskutovaného souboru již uveřejněných publikací, které jsou pak součástí práce ve formě příloh. Práce navazuje na poměrně rozsáhlé znalosti v oblasti produkce polyhydroxyalkanoátů a přináší nové skutečnosti a možné strategie. V rámci práce byly testovány rozličné možnosti analýzy polyhydroxyalkanoátů pomocí moderních metod, které přináší především rychlost, která může být klíčová při „real-time“ evaluaci produkčního biotechnologického procesu. Ramanova spektroskopie se ukázala jako velice perspektivní technika pro rychlou kvantifikaci PHA. Dále se práce zabývá valorizací odpadů potravinářského a zemědělského původu. Důraz je kladen především na metody detoxifikace hydrolyzátů lignocelulózy. V tomto kontextu byla poprvé využita adsorpce inhibitorů na lignin jako alternativa k dalším detoxifikačním technikám. Vybrané produkční kmeny *Burkholderia cepacia* a *B. sacchari* byly díky detoxifikaci schopné využít hydrolyzát měkkého dřeva pro produkci PHA. V další části práce byla testována také možnost využití kuřecího peří jako komplexního zdroje dusíku. V rámci práce bylo také využito evoluční inženýrství jako možná strategie pro eliminaci inhibičního účinku kyseliny levulové – mikrobiálního inhibitoru, který vzniká při hydrolýze lignocelulóзовých materiálů. Adaptačními experimenty byly z původního divokého kmene *C. necator* vyvinuty kmeny projevující se vyšší odolností ke kyselině levulové a schopné akumulovat kopolymer s vyšším zastoupením 3HV. Dalším slibným přístupem testovaným v rámci práce bylo využití extrémofilního mikrobiálního kmene, což vede ke snížení nákladů na biotechnologickou produkci. Vybrané druhy rodu *Halomonas* prokázaly vysoký potenciál jako halofilní producenti PHA. Závěrečná část práce se věnovala výběru produkčního kmene s ohledem na vlastnosti výsledného PHA. Kmen *Cupriavidus malaysiensis* byl vybrán za účelem produkce terpolymeru P(3HB-co-3HV-co-4HB) u kterého byly odhaleny značné rozdíly v materiálových vlastnostech oproti P3HB.

### **Klíčová slova:**

Polyhydroxyalkanoáty, biopolymer, lignocelulóza, valorizace odpadu, evoluční inženýrství, extrémofilní mikroorganismy, Ramanova spektroskopie

## **ABSTRACT**

This thesis deals with the study of polyhydroxyalkanoate biosynthesis as a microbial product with the potential to replace current conventional plastics made from petroleum. The dissertation thesis is elaborated in the form of a discussed set of already published publications, which are then part of the thesis in the form of appendices. The work builds on relatively extensive knowledge in the field of polyhydroxyalkanoate production and brings new facts and possible strategies. Various possibilities of analysis of polyhydroxyalkanoates using modern methods were tested in this work, which brings especially speed, which can be crucial in real-time evaluation of production biotechnological process. Raman spectroscopy has proven to be a very promising technique for rapid quantification of PHA. Furthermore, the work deals with valorisation of waste of food and agricultural origin. Emphasis is placed on methods of detoxification of lignocellulose hydrolysates. In this context, adsorption of inhibitors to lignin was first used as an alternative to other detoxification techniques. Due to detoxification, selected production strains *Burkholderia cepacia* and *B. sacchari* were able to utilize softwood hydrolyzate for PHA production. In the next part of the work was also tested the possibility of using chicken feathers as a complex source of nitrogen. Evolutionary engineering was also used as a possible strategy to eliminate the inhibitory effect of levulic acid as a microbial inhibitor that results from the hydrolysis of lignocellulosic materials. Adaptation experiments were used to develop strains exhibiting higher resistance to levulic acid and the ability to accumulate a higher 3HV copolymer from the original wild-type *C. necator* strain. Another promising approach tested in the work was the use of extremophilic microbial strain, which leads to a reduction in the cost of biotechnological production. Selected *Halomonas* species have shown high potential as halophilic PHA producers. The final part of the thesis was devoted to the selection of the production strain with regard to the properties of the resulting PHA. The *Cupriavidus malaysiensis* strain was selected to produce a P(3HB-co-3HV-co-4HB) terpolymer which revealed significant differences in material properties over P3HB.

## **Keywords**

Polyhydroxyalkanoates, biopolymer, lignocellulosis, valorization of waste, evolutionary engineering, extremophilic microorganism, Raman spectroscopy

KUČERA, Dan. Studium metabolismu bakteriálních buněk a vlivu stresu na biosyntézu PHA. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/124207>. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Stanislav Obruča.

## Prohlášení

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

.....  
podpis studenta

## Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat vedoucímu mojí dizertační práce doc. Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D. za odborné vedení a za ochotu a pomoc při práci v laboratoři. Dále pak poděkování patří mé konzultantce doc. Ing. Adriáně Kovalčík, Ph.D. za veškerou pomoc. Prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. bych rád na tomto místě poděkoval především za cenné rady v průběhu celého mého doktorského studia.

Rád bych také poděkoval kolegům a spolužákům, se kterými jsme sdíleli nejen laboratoře. V neposlední řadě bych také rád poděkoval své rodině a přátelům za podporu, především milované manželce Evě a dceři Ditě.

Práce byla podpořena z projektu „Centrum materiálového výzkumu na FCH VUT v Brně-udržitelnost a rozvoj“ financovaného z prostředků Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR v rámci Národního programu udržitelnosti I.

# OBSAH

OBSAH .....	5
1 ÚVOD .....	7
2 TEORETICKÁ ČÁST .....	9
2.1 Polyhydroxyalkanoáty .....	9
2.1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti .....	9
2.2 Biosyntéza PHA .....	11
2.2.1 PHA syntázy .....	13
2.2.2 Regulace PHA biosyntetické dráhy .....	14
2.2.3 Biologická role PHA.....	16
2.2.3.1 Použití producentů PHA v zemědělských inokulantech.....	16
2.2.3.2 Aplikace PHA produkujících bakterií pro <i>in situ</i> remediace.....	17
2.2.4 Charakterizace vybraných producentů PHA.....	18
2.2.4.1 <i>Cupriavidus necator</i> H16.....	18
2.2.4.2 Rod <i>Bacillus</i> .....	19
2.2.4.3 <i>Haloferax mediterranei</i> .....	19
2.2.5 Strategie zvyšující konkurenceschopnost PHA produkce.....	20
2.2.5.1 Molekulární strategie ke zlepšení produkce P(3HB).....	21
2.2.5.2 Evolučně inženýrské přístupy získávání nových producentů PHA.....	23
2.2.5.3 Průmyslová biotechnologie nové generace.....	24
2.3 Zpracování rostlinné biomasy s ohledem na její využití v biotechnologickém procesu .....	24
2.3.1 Chemické složení rostlinné biomasy.....	25
2.3.1.1 Lignin.....	25
2.3.1.2 Celulóza .....	27
2.3.1.3 Hemicelulóza .....	28
2.4 Předúprava a hydrolýza lignocelulóзовých materiálů.....	28
2.4.1 Fyzikální předúpravy .....	29
2.4.1.1 Ultrazvuk .....	30
2.4.2 Chemické předúpravy .....	30
2.4.2.1 Kyselá hydrolýza .....	30
2.4.2.2 Zásaditá hydrolýza.....	30
2.4.2.3 Zelená rozpouštědla (iontové kapaliny).....	31
2.4.3 Fyzikálně-chemické metody .....	31
2.4.3.1 Parní exploze.....	31
2.4.3.2 Amoniakální exploze (AFEX – ammonia fiber explosion).....	32
2.4.3.3 Superkritická exploze CO <sub>2</sub> .....	32
2.4.3.4 Biologická předúprava.....	32
2.5 Produkty degradace lignocelózy.....	33
2.5.1 Aromatické látky.....	34
2.5.2 Alifatické kyseliny .....	34
2.5.3 Furanové sloučeniny .....	34
2.5.4 Metody používané při identifikaci produktů hydrolýzy.....	34

2.5.4.1 Stanovení aromatických sloučenin .....	35
2.6 Strategie omezující efekt inhibice .....	35
2.6.1 Výběr surovin.....	36
2.6.2 Detoxifikace.....	36
2.7 Využití odpadu ze zpracování potravinářských surovin a lesnického průmyslu k produkci PHA .....	37
2.7.1 Využití dřevní biomasy .....	38
2.7.2 Využití lignocelulózových odpadů z agropotravinářského průmyslu.....	38
3 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE .....	40
4 DISKUZE.....	41
4.1 Zefektivnění procesu kvantifikace PHA.....	41
4.2 Využití odpadů z potravinářských výroby k produkci polyhydroxyalkanoátů .....	46
4.2.1 Využití odpadních produktů jako zdroje dusíku .....	49
4.3 Aplikace evolučního inženýrství .....	51
4.4 Extrémofilní bakterie produkující PHA .....	53
4.5 Biotechnologická produkce terpolymeru poly(3-hydroxybutyrát-co-4- hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) .....	59
5 ZÁVĚR .....	62
6 BUDOUCÍ PERSPEKTIVA .....	65
7 LITERATURA.....	66
8 SEZNAM PŘÍLOH.....	82
8.1 Podíl na publikovaných článcích: .....	83
9 PŘÍLOHY .....	85
9.1 Příloha I .....	85
9.2 Příloha II .....	90
9.3 Příloha III .....	96
9.4 Příloha IV .....	105
9.5 Příloha V .....	112
9.6 Příloha VI .....	113
9.7 Příloha VII .....	123
9.8 Příloha VIII .....	129
9.9 Příloha IX .....	134
9.10 Příloha X .....	141
10 SEZNAM ZKRATEK.....	151
11 PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORA.....	152

# 1 ÚVOD

S pokračujícím tempem světového hospodářského růstu bude udržitelný socioekonomický rozvoj záviset na bezpečné dodávce surovinových vstupů pro zemědělství, průmysl, energetiku a související odvětví. Lidská společnost byla v posledních několika desetiletích do značné míry závislá na petrochemii. Ačkoliv jsou neobnovitelné zdroje lidem známy již od počátku své existence, jejich spotřeba začala exponenciálně růst až teprve s nástupem industrializace. Dnešní vysoká závislost na neobnovitelných zdrojích – zejména fosilních palivech – je stále více omezována ekonomickými, politickými i environmentálními faktory. Postupné vyčerpávání fosilních zdrojů, kolísání cen ropy a v neposlední řadě také environmentální otázky vedou k úsilí o nahrazení stávajících neobnovitelných zdrojů zdroji obnovitelnými.

Lignocelulóza je obnovitelným zdrojem organické povahy. Zahrnuje zemědělské, potravinářské a lesnické zbytky, části pevného komunálního odpadu a také plodiny bylinného a dřevinného charakteru. Záměna surovin však vyžaduje významný technologický posun. Mikrobiální biotechnologie, jež má za cíl přeměnu látek za využití mikroorganismů, je jedním ze způsobů využití lignocelulózy k výrobě paliv (např. bioethanolu), biologicky odbouratelných polymerů a řady chemikálií takovým způsobem, který je udržitelným z hlediska životního prostředí.

Toto téma se stává stále zásadnějším zejména v posledních letech, kdy se západní svět začíná stále zodpovědněji starat o životní prostředí, a to především v reakci na prohlášení vycházející z odborné veřejnosti upozorňující na dopad lidstva na stav planety. Zásadním problémem je globální oteplování, které již dnes má dopady na podobu dnešního světa. Dalším významným problémem je právě spotřeba plastů, které nejsou v přírodě rozložitelné. I přesto, že se ve společnosti objevují tendence problém řešit, zdá se, že řada těchto tendencí má spíše opačný dopad. Příkladem může být podpora plastů, které jsou biodegradabilní jen z části, což má za následek vznik mikroplastů, které jsou v posledních letech považovány za velký problém, a řada vyspělých států včetně Evropské unie přichází s opatřeními, která budou bránit jejich uvolňování do prostředí.

V posledních letech je vynakládáno velké úsilí za účelem nahrazení syntetických plastů biopolymery. Konvenční syntetické polymery jsou problémem nejen kvůli vysoké závislosti na fosilních palivech, ale také představují hlavní část nerozložitelného tuhého odpadu. Kumulace plastového odpadu se stala velmi důležitou otázkou životního prostředí.

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou obecně považovány za alternativu k syntetickým polymerům produkovaných v petrochemickém průmyslu. Tyto mikrobiální polyestery jsou některými mikroorganismy z domén *Bacteria* a *Archaea* syntetizovány a akumulovány jako intracelulární granule. Tento jev je znám již od roku 1926, kdy mikrobiolog Maurice Lemoigne poprvé identifikoval v bakterii poly-3-hydroxybutyrát (P3HB). Později se ukázalo, že fyzikální vlastnosti jsou velmi blízké polypropylenu, což odstartovalo řadu rozsáhlých studií zaměřených na snížení nákladů na výrobu polyhydroxyalkanoátů za účelem konkurenceschopnosti oproti výrobě konvenčních polymerů.

Cílem této práce bylo ověřit několik možných strategií, které by ve svém důsledku mohly vést ke snížení ceny produkce PHA, díky čemuž by se tato technologie mohla stát

konkurenceschopná konvenčním syntetickým polymerům z ropy. Zaměřili jsme se na snížení ceny základní vstupní suroviny přechodem na odpadní materiály odvozené zejména od lignocelulózy. Dále na výběr vhodného extrémofilního bakteriálního kmene, schopného produkce PHA i v prostředí, ve kterém typičtí představitelé PHA produkujících bakterií nepřežívají. Tato vlastnost pak sníží náklady vynaložené na detoxifikaci substrátu získaného z odpadních materiálů. Bakteriální kmen a složení kultivačního média může být zodpovědné i za výsledné materiálové vlastnosti PHA. S cílem připravit termoplast s vyšší houževnatostí a podstatně nižší křehkostí v porovnání s běžným P3HB byl využit *Cupravidus malaysiensis*, který byl schopný akumulovat terpolymer s obsahem 3-hydroxyvelerátu a 4-hydroxybutyrátu.



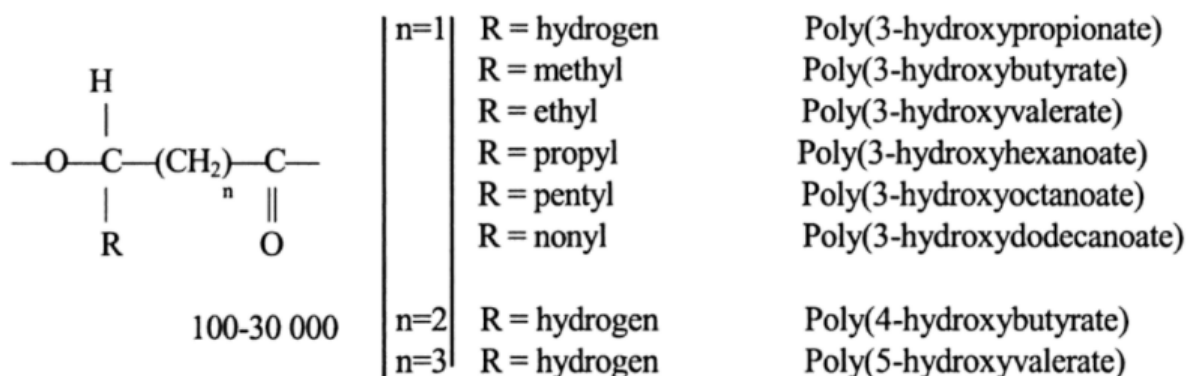
## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou biopolymery neboli polymery přírodního původu. Jedná se o mikrobiální polyester syntetizované a akumulované ve formě intracelulárních granulí řadou mikroorganismů z domén bakterie a archea. Všeobecně jsou považované za alternativu k petrochemickým syntetickým plastům. V porovnání s polypropylenem, který má podobné fyzikální a mechanické vlastnosti, jsou PHA biokompatibilní, biodegradovatelné a je možné k jejich produkci využít řadu obnovitelných zdrojů i odpadních materiálů (Flickinger a Drew, 1999).

#### 2.1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Z chemického hlediska jsou PHA lineární polyester hydroxyalkanových (HA) kyselin (obvykle 3 hydroxyalkanových kyselin). Jak je vidět na Obrázek 1, esterová vazba vzájemně spojuje jednotlivé hydroxyalkanové kyseliny a je tvořena kondenzační reakcí mezi hydroxylovou skupinou a karboxylovou skupinou sousedního monomeru. V této skupině polymerů lze kombinovat více než 150 různých monomerů a výsledné materiály mají výrazně odlišné vlastnosti. I přesto jsou některé vlastnosti společné, a to že se jedná se o elastomerní a termoplastické polymery, nerozpustné ve vodě a mají vysoký stupeň polymerizace (molekulová hmotnost  $2 \times 10^5$  až  $3 \times 10^6$ ). Ve všech PHA, které byly dosud charakterizovány, je atom uhlíku substituovaný hydroxyskupinou R-konfigurace v důsledku stereospecifity PHA biosyntetických enzymů, s výjimkou některých zvláštních případů, kdy neexistuje chiralita (Muhammadi a kol., 2015).



Obrázek 1 Všeobecná molekulární struktura polyhydroxyalkanoátů (Volova, 2004)

PHA mohou být rozděleny do tří skupin v závislosti na počtu atomů uhlíku v monomerních jednotkách (Volova, 2004).

1. Short-chain-length (scl-PHA), která obsahuje 3-5 atomů uhlíku.
2. Medium-chain-length (mcl-PHA), která obsahuje 6-14 atomů uhlíku.
3. Long-chain-length (lcl-PHA), která obsahují více než 14 atomů uhlíku.

Toto rozdělení polymerů do skupin je založeno na substrátové specifitě PHA syntáz, které mohou přijímat pouze určité HA kyseliny v průběhu polymerace. Dříve se předpokládalo, že PHA syntáza *Cupriavidus necator* a dalších přirozených kmenů dokáže syntetizovat materiály obsahující pouze HA kyseliny se 3-5 atomy uhlíku. A stejně tak, že v případě u různých kmenů *Pseudomonas oleovorans* PHA syntázy mohou přijímat pouze 6-14 uhlíkaté monomery. Až později byly zaznamenány případy přirozených kmenů, které jsou schopny syntetizovat jak scl-PHA, tak i mcl-PHA (Steinbuechel a Valentin, 1995).

Nejprostudovanějším a zároveň i prvním objeveným polyesterem ze skupiny polyhydroxyalkanoátů je poly(3-hydroxybutyrát) (P3HB). Už v roce 1926 Lemoigne izoloval a charakterizoval P3HB z bakteriálního kmene *Bacillus megaterium*. P3HB je homopolymer se všemi chirálními atomy uhlíku v R-konfiguraci, a je proto vysoce krystalický. Vysoká krystalinita (typicky 55-80 %) činí P3HB poměrně tuhé a křehké. Teplota skelného přechodu ( $T_g$ ) P3HB leží mezi 5 a 9 °C a teplota tání ( $T_m$ ) se nachází mezi 173 a 180 °C. Polymer P3HB se rozkládá přibližně při teplotě 200 °C, což je poměrně blízko jeho teplotě tání. Mechanické vlastnosti, jako je Youngův modul (3,5 GPa) a pevnost v tahu (43 MPa) materiálu P3HB, se blíží hodnotám izotaktického polypropylenu. Hodnoty poměrného prodloužení při přetržení P3HB ( $\epsilon_b = 5\%$ ) jsou 80krát nižší než dosažené hodnoty polypropylenu ( $\epsilon_b = 400\%$ ). Proto je P3HB ve srovnání s polypropylenem daleko tužší a křehčí materiál (Flickinger a Drew, 1999).

Jak již bylo zmíněno, mechanické vlastnosti jednotlivých PHA jsou velmi závislé od přítomných monomerních jednotek. Proto možným řešením při snaze zlepšit mechanické vlastnosti P3HB je inkorporace vhodných monomerních jednotek do jeho struktury. Při zabudování například 3-hydroxyvalerátových jednotek do polymeru dosáhneme výrazné změny ve flexibilitě materiálu. Výsledkem je snížení Youngova modulu pod 0,7 a snížení pevnosti v tahu pod 30 MPa. Teplota tání je v závislosti na obsahu 3-hydroxyvalerátu snížena až na 130 °C, což výrazně usnadňuje tepelné zpracování, jako je roztavení polymeru bez tepelné degradace materiálu. Výrazně se mění i možnosti elongace, které se zvyšují se zvyšováním frakce PHV (Sudesh a kol., 2000).

Tabulka 1 Srovnání vlastností PHA polymerů s běžnými plasty (Sudesh a kol., 2000).

Polymer	Bod tání [°C]	Skelný přechod [°C]	Youngův modul [GPa]	Pevnost v tahu [MPa]	Délkové prodloužení při přetržení [%]
P(3HB)	180	4	3,5	40	5
P(3HB-co-20 mol% 3HV)	145	-1	0,8	20	50
P(3HB-co-6 mol% 3HV)	133	-8	0,2	17	680
Polypropylen	176	-10	1,7	38	400
LD polypropylen	130	-30	0,2	10	620

V nedávné době byly vyvinuty nové přizpůsobené kopolymery náhodným začleněním kontrolovaného množství flexibilních lineárních alifatických hydroxyalkanoátů podél hlavního řetězce, například 3-hydroxypropionát nebo 4-hydroxybutyrát (4HB). Výsledkem jsou semikrystalické kopolymerní struktury navržené tak, aby měly teplotu tání na míru mezi 80 °C a 150 °C a které jsou méně citlivé na tepelnou degradaci během zpracování. Jejich vlastnosti sahají od křehkých termoplastů po gumovité elastomery. Jejich produkce může být řízena volbou substrátu, bakteriálního kmene a fermentačních podmínek (García-Quiles a kol., 2019). Tabulka 2 znázorňuje rozmanitost materiálových vlastností v závislosti na obsahu 4HB v polymeru.

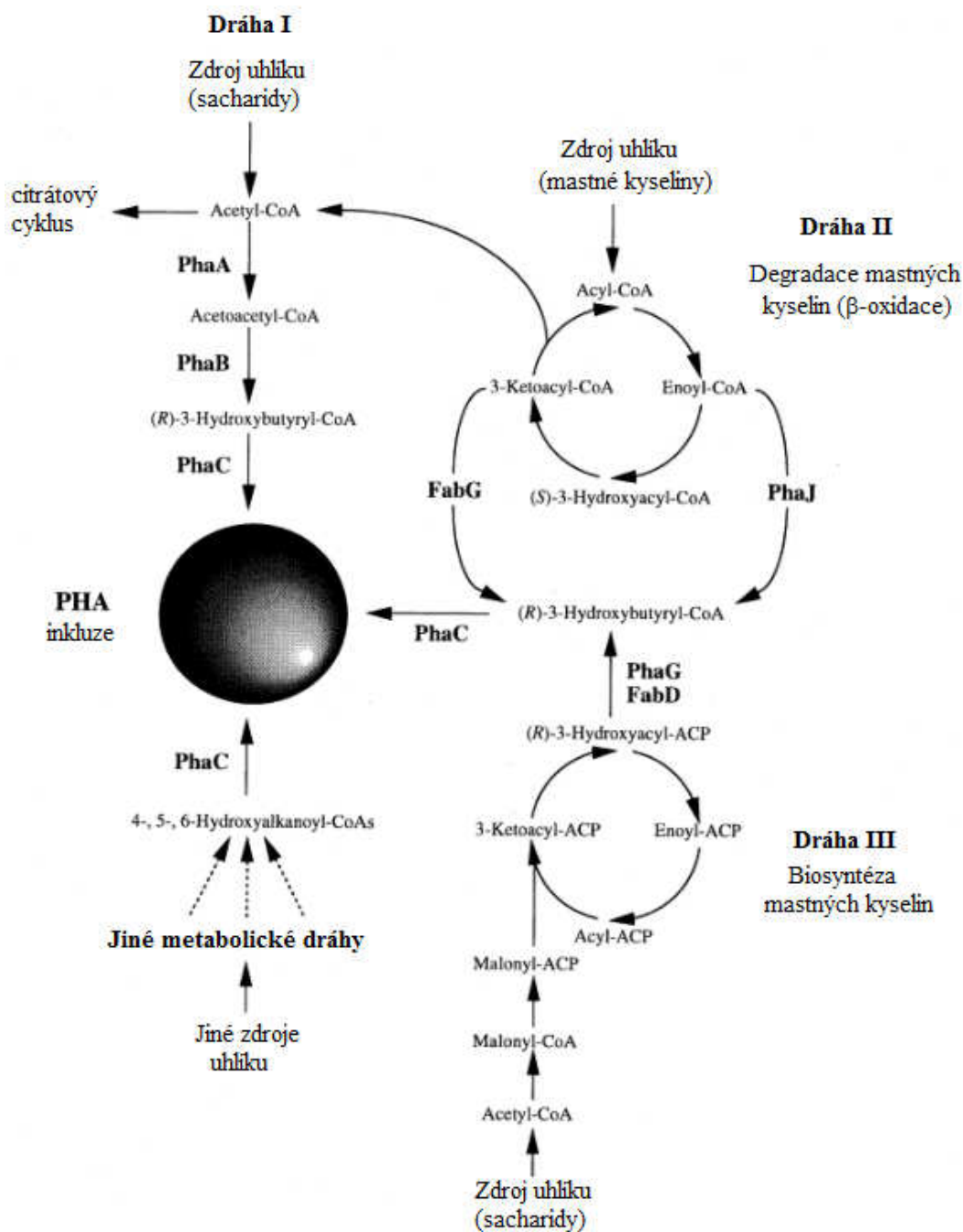
Tabulka 2 Vlastnosti kopolymeru P(3HB-co-4HB) filmů při 23 °C (Saito a Doi, 1994)

Vlastnosti	4HB frakce [mol%]								
	0	3	10	16	64	78	82	90	100
Krystalinita [%]	60	55	45	45	15	17	18	28	34
Youngův modul [MPa]	3500				30	24	45	100	149
Pevnost v tahu [MPa]	43	28	24	26	17	42	58	65	104
Délkové prodloužení při přetržení [%]	5	45	242	444	591	1120	1320	1080	1000

Kromě scl-PHA kopolymerů, z hlediska vysoké elasticity a houževnatosti mají význam také mcl-PHA. Matriály na bázi mcl-PHA v porovnání s scl-PHA mají významně nižší teplotu tání, která se pohybuje v rozmezí 39-61 °C. Teplota skelného přechodu je pak obvykle hluboko pod pokojovou teplotou v rozmezí od -43 do -25 °C a krystalinita mcl-PHA dosahuje přibližně 25 % (Flickinger a Drew, 1999).

## 2.2 Biosyntéza PHA

Biosyntéza PHA je z biochemického hlediska velmi prostudovanou metabolickou dráhou (Sudesh a kol., 2000). Bakteriální kmen *Cupriavidus necator* H16 (v minulosti známý pod mnoha názvy jako *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha*, *Hydrogenomonas eutropha* nebo *Wautersia eutropha*) je považovaný za modelový organismus pro metabolismus scl-PHA. *C. necator* H16 tvoří P3HB třístupňovou enzymaticky katalyzovanou reakcí, která vychází z acetyl-CoA. Dvě molekuly acetyl-CoA se kondenzují na acetoacetyl-CoA pomocí 3-ketothiolázy (PhaA). Produkt následně podléhá redukci NADPH-dependentní reduktázou (PhaB), která produkuje (R)-3-hydroxybutyryl-CoA. Závěrečným krokem je pak polymerizace (R)-3-hydroxybutyryl-CoA monomerů za vzniku P3HB granulí za přítomnosti enzymu PHA syntázy (PhaC) (Obrázek 2, Dráha I) (Volova, 2004).



Obrázek 2 Metabolické dráhy, dodávající hydroxyalkanoátové monomery pro biosyntézu PHA. PhaA,  $\beta$ -ketothioláza; PhaB, NADPH-dependentní acetoacetyl-CoA reduktáza; PhaC, PHA syntáza; PhaG, 3-hydroxyacyl-ACP-CoA transferáza; PhaJ, (R)-enoyl-CoA hydratáza; FabD, malonyl CoA ACP transacyláza; FabG, 3-ketoacyl-CoA reduktáza (Sudesh a kol., 2000).

Zdroj uhlíku zásadně určuje, který typ PHA bude daný bakteriální kmen produkovat. *C. necator* (a řada dalších bakteriálních kmenů) dokáže při použití směsného substrátu fruktózy a kyseliny propionové syntetizovat kopolymer 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu. Stejného efektu lze docílit i přidávkem kyseliny valerové jako přímého prekurzoru 3-hydroxyvalerové kyseliny. V případě použití propionátu je biochemická dráha v podstatě stejná jako při syntéze P3HB s tím rozdílem, že propionyl-CoA a acetyl-CoA jsou

kondenzovány  $\beta$ -ketothiolázou za vzniku 3-ketovaleryl-CoA, což po redukci keto- skupiny patřičnou dehydrogenázou vede k začlenění monomerů 3-hydroxyvalerátu do polymeru. Kyseliny alkanové s lichým počtem uhlíků v řetězci mohou také sloužit jako zdroj pro syntézu kopolymeru. V tomto případě vzniká 3 hydroxyvalerát přímo z  $\beta$  oxidace těchto mastných kyselin (Sudesh a kol., 2000).

Nicméně, PHA složené z mcl (R)-3 hydroxy-mastných kyselin jsou syntetizované odkloněním meziproductů metabolismu mastných kyselin na (R)-3-hydroxyacyl-CoA a tedy k mcl-PHA (Obrázek 2, Dráha II a III). Pokud je zdroj uhlíku oxidován na acetyl-CoA, vyjma jeho tvorby cestou  $\beta$ -oxidace mastných kyselin, pak meziproducty biosyntézy mastných kyselin *de-novo* se stanou prekurzory pro biosyntézu mcl-PHA a jejichž konverze je katalyzována transacylázou PhaG (Sudesh a kol., 2000).

Tato specifická transacyláza se podílí na přenosu (R)-3 hydroxyacylové části příslušného thioesteru ACP (acyl carrier protein) na CoA. PhaG byl použit pro metabolické inženýrství biosyntézy mcl-PHA za účelem získání konkrétního biopolyesteru. Je-li zdroj uhlíku oxidován cestou  $\beta$ -oxidace mastných kyselin, potom (R)-specifická enoyl-CoA hydratáza (PhaJ) katalyzuje oxidaci enoyl-CoA na (R)-3-hydroxyacyl-CoA. (R)-3-Hydroxyacyl-CoA je substrát pro PHA syntázu (PhaC) jako přímý prekurzor biosyntézy PHA. PhaJ byl také použit pro metabolické inženýrství biosyntézy mcl-PHA za účelem získání konkrétního biopolyesteru. Geny kódující proteiny biosyntézy PHA jsou často kolokalizovány a organizovány v operonu (Tabulka 3), avšak geny PhaG nebo PhaJ kolokalizovány nejsou. Metabolické inženýrství si dává často za cíl získání PHA s definovaným složením a požadovanými vlastnostmi materiálů (Rehm, 2003).

## 2.2.1 PHA syntázy

PHA syntázy mohou být rozděleny do čtyř hlavních tříd s ohledem na složení substrátu a podjednotky (Tabulka 3).

Tabulka 3 Klasifikace PHA syntáz (Rehm, 2003)

Třída	Organismus	Podjednotky	Substrát	Organizace operonu
I	<i>C. necator</i>	PhaC ~60-73 kDa	$3\text{HA}_{\text{SCL}}\text{-CoA}$ (~C <sub>3</sub> -C <sub>5</sub> ), $4\text{HA}_{\text{SCL}}\text{-CoA}$ , $5\text{HA}_{\text{SCL}}\text{-CoA}$ , $3\text{MA}_{\text{SCL}}\text{-CoA}$	
II	<i>P. aeruginosa</i> <i>P. oleovorans</i>	PhaC1 and PhaC2 ~60-65 kDa	$3\text{HA}_{\text{MCL}}\text{-CoA}$ (~C <sub>6</sub> -C <sub>14</sub> )	
III	<i>A. vinosum</i>	PhaC ~40 kDa PhaE ~40 kDa	$3\text{HA}_{\text{SCL}}\text{-CoA}$ (~C <sub>3</sub> -C <sub>5</sub> ), $[3\text{HA}_{\text{MCL}}\text{-CoA}$ (~C <sub>6</sub> -C <sub>8</sub> ), $4\text{HA}_{\text{SCL}}\text{-CoA}$ , $5\text{HA}_{\text{SCL}}\text{-CoA}]$	
IV	<i>B. megaterium</i>	PhaC ~40 kDa PhaR ~22 kDa	$3\text{HA}_{\text{SCL}}\text{-CoA}$ (~C <sub>3</sub> -C <sub>5</sub> )	

PHA syntázy třídy I se skládají z jedné podjednotky (PhaC) 60-73 kDa a syntetizují PHA složené z monomerů s krátkým řetězcem (scl-PHA) (Rehm, 2003). Ve třídě II se PHA syntázy nacházejí ve fluoreskujících pseudomonádách a také obsahují pouze jeden typ podjednotky (PhaC) (Timm a Steinbüchel, 1990). Na rozdíl od PHA syntáz třídy I je preferovaným substrátem (R)-3-hydroxyacyl-CoA složený z 6 až 14 atomů uhlíku. Na rozdíl

od syntáz tříd I a II jsou syntázy PHA třídy III složeny ze dvou různých podjednotek. Jedna podjednotka PhaC asi 40 kDa, jejíž primární struktura vykazuje silnou podobnost s PHA syntázami předchozích tříd, a PhaE podjednotkou (asi 40 kDa) (Liebergesell a Steinbuchel, 1992). Zatímco, syntázy III. třídy dovedou v některých případech kromě scl-PHA syntetizovat i mcl-PHA, tak ve třídě IV syntázy PHA syntetizují pouze scl-PHA. PHA syntázy třídy IV se nacházejí u bakterií rodu *Bacillus* a skládají se z podjednotky PhaC (přibližně 40 kDa) a menší PhaR podjednotky přibližně 20 kDa (McCool a Cannon, 1999).

U *C. necator*, v posledním kroku syntézy dochází k polymeraci (R)-3-hydroxybutyryl-CoA na P3HB pomocí PHA syntázy. Dříve se předpokládalo, že výsledné granule PHA jsou pak potaženy vrstvou fosfolipidů a bílkovin. Až teprve v nedávné době se ukázalo, že *C. necator in vivo* neobsahuje žádné fosfolipidy a předpokládá se, že povrchové vrstvy granulí PHA u přírodních producentů obecně fosfolipidy neobsahují a sestávají pouze z proteinů, přičemž převládajícími proteiny jsou tzv. phasiny (Bresan a kol., 2016). Jedná se o třídu proteinů o velikosti 14 až 28 kDa, které tvoří vrstvu na povrchu hydrofobního jádra PHA granulí. Mají také vliv na počet a velikost granulí PHA. Phasin *C. necator* je kódován genem *phaP* a tvorba PhaP je závislá na biosyntéze a akumulaci PHA. Bylo prokázáno, že množství phasinu přítomného v buňkách je úměrné s množstvím přítomného PHA (Pötter a kol., 2002). PHB granule *in vivo* jsou díky peptidům vysoce organizované funkční jednotky a bývají označovány jako karbonosomy. Doposud bylo u *C. necator* rozeznáno devatenáct bílkovin, které jsou zjevně spojeny s proteinovou povrchovou vrstvou granulí PHA. Jejich funkce při regulaci biosyntézy je přibližena v následující kapitole a rozděleny mohou být takto (Pfeiffer a Jendrossek, 2014):

- PHB syntáza PhaC1
- sedm depolymeráz PHB (souhrnně PhaZ, PhaZa1 až PhaZa5, PhaZd1 a PhaZd2)
- dvě oligomerní hydrolázy PHB (PhaZb a PhaZc alternativně označované PhaY1 a PhaY2)
- sedm phasinů (PhaP1 až PhaP7)
- dva DNA- a PHB-vazné proteiny (PhaR a PhaM)

## 2.2.2 Regulace PHA biosyntetické dráhy

Účinek kultivačních podmínek na metabolismus PHA byl poprvé studován v roce 1958 pro nesporeující kmen *B. megaterium*. Bylo pozorováno, že množství akumulovaného PHA vzrostlo při navýšení poměru uhlíku k dusíku (Macrae a Wilkinson, 1958). Později bylo zjištěno, že bakterie produkují a akumulují PHA v podmínkách, kdy jim chybí kompletní rozsah živin potřebných pro buněčné dělení a zároveň mají nadbytek uhlíku. Bylo prokázáno, že biosyntéza PHA může být iniciována nedostatkem hořčíku, síry, dusíku, fosforu nebo kyslíku (Senior a kol., 1972). Právě tyto nevyrovnané podmínky růstu často vedou k pozitivnímu vlivu na regulaci na enzymatické úrovni.

Pro *C. necator* jako modelový bakteriální kmen je regulace podrobně popsána. Koncentrace acetyl-CoA a volného CoA jsou klíčovými faktory ovlivňujícími aktivitu 3-ketothiolázy, která katalyzuje první krok syntézy PHA. Dále bylo prokázáno, že biosyntéza P3HB je silně stimulována, jak vysokými intracelulárními koncentracemi NAD(P)H, tak

vysokými poměry NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>. Tyto podmínky vedou k významné inhibici citrát syntázy a citrát dehydrogenázy, což má za následek zvýšené zapojení acetyl-CoA do biosyntetické dráhy PHA namísto citrátového cyklu. Experiment, který provedl Park a Lee (1996), tuto hypotézu potvrdil. Ukázalo se, mutant *C. necator* s narušenou isocitrát dehydrogenázou, vykazoval výrazně nižší aktivitu citrátového cyklu a zároveň produkoval PHA rychleji než v případě nemutovaného kmene. Rychlost biosyntézy PHA je ovlivněn aktivitou enzymů  $\beta$ -ketothiolázou a acetoacetyl-CoA reduktázou, zatímco obsah P3HB je řízen PHA syntázou (Jung a kol., 2000).

K regulaci ovšem, kromě enzymatické úrovně, dochází i na úrovni genové exprese. K tomu slouží transkripční regulátory PhaR, které ovlivňují expresi phasinů a biosyntézu PHA. PhaR je protein (kodován genem *phaR*), který je schopen se vázat na intergenní oblasti DNA (*phaC phaP* a *phaP-phaR*). Při podmínkách nevhodných pro biosyntézu PHA se PhaR váže na *phaP* promotorovou oblast, a tím inhibuje transkripci. Následně, když nastanou podmínky vhodné pro akumulaci PHA a začne PHA syntáza tvořit PHA granule, tak se PhaR začne vázat na povrch PHA granulí. K tomu dochází z důvodu vysoké vazebné schopnosti PhaR na hydrofobní povrchy. Tím dojde ke snížení jeho koncentrace v cytoplazmě a transkripce *phaP* přestane být potlačena. To vede k syntéze PhaP, která se okamžitě váže na PHA granule. Po dosažení maximální velikosti PHA granule a pokrytí většiny jejího povrchu PhaP proteinem, dochází opět k uvolnění PhaR do cytoplazmy. To opět umožňuje vazbu na příslušné DNA sekvence a potlačení transkripce *phaP*, a také *phaR*. Autoregulaci exprese *phaR*, slouží k zabránění syntéze více PhaR, než je nutné pro dostatečnou represi exprese *phaP* (Grage a kol., 2009; Pötter a kol., 2002).

Dalším z peptidů na povrchu PHA granule u *C. necator* je 32 kDa PhaM, který je zjevně zodpovědný za připojení granulí PHA k bakteriálnímu nukleoidu a zajišťuje, že obě dceřiné buňky získají během dělení buněk téměř stejný počet granulí PHB z mateřské buňky. Pfeiffer a Jendrossek (2014) se zaměřili na objevení dalších funkcí tohoto proteinu a zjistili, že jen ~16 nM PhaM stačilo k přepnutí ~165 nM PhaCl z neaktivní na aktivní formu. Navíc specifická aktivita PhaM-aktivované formy PhaCl byla podstatně vyšší (~17 versus ~5 U/mg) ve srovnání s maximální aktivitou stanovenou pro PhaCl v nepřítomnosti PhaM. Jedna PhaM molekula je tedy dostatečná pro aktivaci přibližně 10 až 11 molekul PhaCl. I když vezmeme v úvahu určitou chybu při stanovení koncentrace proteinu, je zřejmé, že PhaM je vyžadován pouze v substechiometrických množstvích (Jendrossek, 2009).

Protože fyziologickou funkcí akumulovaného PHA v bakteriích je poskytovat energii a uhlík pro metabolismus během fází hladovění, je regulace degradace PHA neméně důležitá. Enzymy, které katalyzují depolymeraci dříve nashromážděného PHA, se nazývají intracelulární PHA (iPHA) depolymerázy (PhaZ). Depolymerázy iPHA byly poprvé popsány u mcl-PHA akumulující *Pseudomonas putida*. Až o řadu let později byly popsány proteiny zodpovědné za degradaci iPHA i u scl-PHA producenta *C. necator*. V závislosti na vzájemných podobách primárních aminokyselinových sekvencí byly tyto hydrolázy pojmenovány PhaZa1 až PhaZa5 a PhaZd1 a PhaZd2 pro iPHB depolymerázy a PhaZb a PhaZc pro oligomerní hydrolázy. Znalosti v této oblasti jsou značně limitovány obtížností stanovení depolymerázy iPHA, vzhledem k povaze polymerního substrátu: *in vivo* jsou PHA amorfní a jsou pokryty povrchovou vrstvou sestávající z proteinů. V mnoha výzkumných laboratořích je aktivita iPHB depolymeráz testována pomocí umělých detergentem (na bázi

cholátu nebo oleátu) potažených uměle vyrobených granulí PHB (aPHB) jako substrátu, které byly připraveny z čistěného krystalického PHB, nicméně tento substrát zcela neodpovídá nativní amrofní formě PHA granulí v buňkách. První a nejlépe prostudovanou depolymerázou je PhaZal. Ačkoli nemá detekovatelnou hydrolytickou aktivitu při přidání k izolovaným nativním granulím P3HB (nPHB) a pouze nízkou aktivitu (aPHB) *in vitro*, PhaZal je protein vázaný na nPHB granule *in vivo* a delece phaZal vede k významně menšímu uvolňování 3HB z PHB akumulovaných buněk ve srovnání s divokým typem. Doplňkové experimenty, ve kterých byl PhaZal exprimován v rekombinantní PHB akumulující *Escherichia coli*, vykazovaly zvýšené uvolňování 3HB. Další studie pak ukázaly, že PhaZal může katalyzovat thiolizační reakci granulí nPHB *in vitro* (Jendrossek, 2009).

## 2.2.3 Biologická role PHA

PHA jako mikrobiální metabolit není bakteriemi v přírodě syntetizován zcela bezúčelně, ale naopak produkce těchto polymerních látek dodává jejich nositelům zjevnou strategickou výhodu. V minulosti byla produkce PHA spojována se sporulací bakterií, přičemž se mělo za to, že PHA vzniká před nástupem sporulace a rychlá utilizace polymeru předchází sporulaci (Slepecky a Law, 1961). Nicméně, později byly tyto představy vyvráceny, protože se ukázalo, že ne všechny sporující bakterie dokážou produkovat PHA a zároveň se také ukázalo, jaké nepřehledné množství různých nespořulujících druhů mikroorganismů je schopno PHA akumulovat (Emeruwa a Hawirko, 1973). Proto v současnosti je z fyziologického úhlu pohledu význam biosyntézy PHA spojován se schopností akumulovat polymerní látku, která při hladovění slouží jako zdroj uhlíku a energie. PHA představuje ideální materiál pro ukládání uhlíku a energie kvůli své nízké rozpustnosti a vysoké molekulové hmotnosti, která působí na bakteriální buňku zanedbatelným osmotickým tlakem (Dawes a Senior, 1973). Nicméně je pravděpodobné, že PHA hraje mnohem složitější roli ve stresové reakci bakterií. Ostatně bylo testováno, že expozice bakteriální kultury ke kontrolované stresové dávce může vést k navýšení produkce PHA. Podle těchto výsledků přidávek etanolu nebo peroxidu vodíku do kultivačních médií výrazně zvýšil akumulaci PHA v *Cupriavidus necator* H16, čímž došlo k významnému zlepšení procesu výroby PHA (Obruca a kol., 2010).

To, že PHA v buňkách má zásadnější význam než jen sloužit jako zásobní materiál, dokládá další studie, ve které za různých stresových faktorů byly porovnávány *Cupriavidus necator* H16 a mutantní kmen *Cupriavidus necator* H16/PHB-4 neschopný produkovat PHA. V těchto testech prokázal produkující kmen lepší schopnost odolávat zvýšené teplotě i oxidativnímu stresu (Obruca a kol., 2016). Producenti PHA jsou i hojně přítomni v prostředích, které jsou vystaveny nízkým teplotám. Například v antarktické sladké vodě byla identifikována řada PHA akumulujících bakterií (Ciesielski a kol., 2014).

### 2.2.3.1 Použití producentů PHA v zemědělských inokulantech

Znalost zvýšené odolnosti PHA akumulujících bakterií má dalekosáhlý dopad na zemědělské aplikace. Inokulanty založené na bakteriích produkujících PHA jsou již mnoho let využívány pro ochranu rostlin a podporu jejich růstu.

Bakterie fixující dusík neboli diazotrofy, jsou schopny přeměnit atmosférický dusík na anorganické látky použitelné rostlinami. Jejich úloha je nepostradatelná v koloběhu dusíku, protože jsou odpovědné za fixaci asi 90 % organicky vázaného dusíku. Četná skupina



diazotrofů tvoří v půdě symbiotické komplexy s některými druhy rostlin, nejčastěji s luštěninami. Z tohoto důvodu jsou znalosti z této oblasti vědy nezbytné v oblasti zemědělství a výroby hnojiv (Rogers, 2011). *Rhizobium* a *Azospirillum* jsou dobře studované příklady bakterií podporujících růst rostlin. Jednotlivé kmeny patřící do těchto rodů se vyznačují mimo jiné schopností akumulovat PHA. Skutečnost, že stresová odolnost těchto bakterií je důsledkem jejich schopnosti akumulovat PHA, byla potvrzena v řadě případů (Kadouri a kol., 2003; Zhao a kol., 2007). Proto jsou diazotrofy produkující PHA velmi slibnými promotory růstu rostlin.

*Azospirillum brasilense* obsahující vyšší množství PHA se projeví podstatně vyššími účinky na podporu růstu rostlin. Tato pozorování byla potvrzena zvýšením výnosů plodin dosažených na kukuřičných a pšeničných polích v Mexiku, kde byly buňky *A. brasilense* s vysokým obsahem PHA použity jako inokulanty rašeliny (Dobbelaere a kol., 2001). Dále bylo zjištěno, že různé druhy rhizobií potřebují P3HB pro úspěšný proces nodulace. Aneja a kol. (2005) uvedli, že narušení biosyntézy PHA u *Sinorhizobium meliloti* vyústilo v závažné narušení růstu a schopnosti nodulace. Navíc je biologická fixace dusíku energeticky náročným procesem, jehož energetické nároky lze částečně pokrýt využitím PHA.

Volně žijící diazotrofy nemají schopnost se vázat ke kořenům rostlin a množství fixovaného dusíku je obecně poměrně nízké, ale s hodnotou 2-25 kg ha<sup>-1</sup> za rok stále značné. Kmeny rodu *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia* a *Pseudomonas* jsou široce používány producenti PHA jako doplněk konvenčních inokulantů pro jejich růst podporující vlastnosti (Patel a kol., 2016; Singh a kol., 2013).

### 2.2.3.2 Aplikace PHA produkujících bakterií pro *in situ* remediace

Přirozeně se vyskytující mikroorganismy produkující PHA se také široce používají v technologiích zaměřených na odstraňování organických, a dokonce anorganických znečišťujících látek z životního prostředí. Například mohou být díky mimořádně široké metabolické aktivitě některé druhy *Cupriavidus necator* (Vandamme a Coenye, 2004). *C. necator* H16, lze použít k odstranění aromatických sloučenin, jako je toluen, xylen, kyselina benzoová (Berezina a kol., 2015), ethanethiol (Sedighi a kol., 2013), chlor-aromatických sloučenin (Lykidis a kol., 2010) nebo p-nitrofenol (Salehi a kol., 2010). Genetické inženýrství může navíc rozšířit spektrum degradovaných polutantů. Saavedra a kol. (2010) genetickou modifikací upravil *Cupriavidus necator* JMP134 za vzniku kmene schopného zcela mineralizovat polychlorované bifenylly.

Zástupci rodu *Pseudomonas*, kteří jsou obvykle schopni akumulace mcl-PHA, mohou být používány k odstraňování řady polutantů včetně, nitrofenolů (Arora a kol., 2014), polyaromatických uhlovodíků (Bisht a kol., 2015), fenolu a jeho derivátů (Krastanov a kol., 2013) a ropné uhlovodíky (Safiyancu a kol., 2015). Biodegradační kapacita *Pseudomonas* spp. pro organické polutanty je vylepšena jejich schopností produkovat biosurfaktanty, díky nimž jsou tyto těžko rozpustné nebo dokonce nerozpustné substráty bakteriálním buňkám přístupné (Li, 2017).

Bakterie produkující PHA mohou být výhodně použity jako čisté kultury nebo dokonce i jako součást smíšených mikrobiálních konsorcií pro *in situ* bioremediační technologie. Obecně je základní výhodou mikroorganismů produkujících PHA jejich zvýšená odolnost vůči stresu a robustnost. V této souvislosti je nutné brát během přípravy inokula v potaz, že

vysoký obsah PHA v mikrobiálních buňkách je důležitým pozitivním faktorem. Kromě toho, přestože existují určité obecné pochybnosti o použití geneticky modifikovaných bakterií pro bioremediační technologie in situ, je genetická modifikace bakterií obecně považována za slibnou strategii, která výrazně zvyšuje účinnost procesu bioremediace (Srivastav a kol., 2014). Protože akumulace PHA a související metabolické dráhy mají velký potenciál pro zlepšení procesu biologického rozkladu, bylo by zajímavé buď geneticky modifikovat přirozené producenty PHA, aby se zvýšil jejich potenciál biodegradace, nebo použít nástroje genetického inženýrství k umožnění biosyntézy PHA u bakterií se slibnou biodegradační aktivitou, ale neschopných akumulovat PHA.

## 2.2.4 Charakterizace vybraných producentů PHA

### 2.2.4.1 *Cupriavidus necator* H16

Tento bakteriální kmen je považován za modelový organismus pro metabolismus PHA. Jedná se o Gramnegativní, fakultativně chemolithoautotropní bakterii třídy Betaproteobacteria, která byla intenzivně zkoumána téměř 50 let. Vzhledem k příslušnosti k různým taxonům se název této bakterie v minulosti často měnil, a proto i v literatuře posledních let bývá často chybně označována některým z dřívějších jmen, což je značně matoucí. V roce 1961 byl kmen izolován jako zástupce rodu *Hydrogenovorans*. V roce 1969 byl převeden do rodu *Alcaligenes* a od té doby vystřídal názvy *Alcaligenes eutrophus* H16, *Ralstonia eutropha* H16, *Wautersia eutropha* H16, až nakonec ustálil název na *Cupriavidus necator* H16 (Vandamme a Coenye, 2004).

Jako fakultativní chemolithoautotrofní „Knallgasbakterium“ *C. necator* H16 se asimiluje v autotrofním růstovém režimu CO<sub>2</sub> prostřednictvím cyklu Calvin-Benson-Basham, ale je také schopen heterotrofního růstu s využitím fruktózy, kyseliny glukonové, různých dalších organických kyselin, a dokonce i aromatických sloučenin jako zdroji uhlíku a energie. Centrální metabolismus uhlíku *C. necator* H16 se již podařilo podrobně popsat. Fruktóza a kyselina glukonová jsou katabolizovány cestou Entner-Doudoroff s 2-keto-3-desoxy-6-fosfoglukonát aldolázou jako klíčovým enzymem. Cesta Embden-Meyerhoff-Parnass je neúplná, protože chybí klíčový enzym fruktóza-1,6-bisfosfát (FBP) aldolasa. Glykolýza je však probíhá v případě, že je FBP aldoláza z *Escherichia coli* (PfkA) exprimována v *C. necator*. *C. necator* vyžaduje pro růst respirační metabolismus, ke kterému dochází tehdy, když je možné používat kyslík, dusičnany nebo dusitany jako akceptory koncových elektronů. Nicméně k sekreci typických fermentačních produktů do média dochází, pokud jsou buňky kultivovány za podmínek omezeného přísunu kyslíku. (Reinecke a Steinbüchel, 2009).

*C. necator* jako jeden z mála přirozených kmenů dokáže akumulovat PHA v uspokojivém množství z hlediska průmyslové produkce. *C. necator* byl první druh, který byl použit pro výrobu kopolymeru P(3HB-co-3HV) společností Imperial Chemical Industries pod obchodním názvem Biopol™. Výtěžnost PHA se při utilizaci čistých sacharidů obvykle pohybuje nad 100 g/l polymeru (Mozejko-Ciesielska a Kiewisz, 2016). *C. necator* H16 se zdá má potenciál se stát průmyslovým producentem v biotechnologii využívající odpadní substrát, protože kmen dokáže využít odpadní fritovací olej pro produkci PHA. Toto průmyslové

zpracování využívá biotechnologie Hydral patřící společnosti Nafigate (Brigham a Riedel, 2019).

#### 2.2.4.2 Rod *Bacillus*

Druhy rodu *Bacillus* jsou podrobně studovány ve světě PHA od doby objevení P3HB v cytosolu *Bacillus megaterium* francouzským Lemoignem v roce 1926. Bylo popsáno, že některé druhy dosahují až 90 % PHA v biomase. Druhy *Bacillus* se stávají modelovými organismy v průmyslovém a akademickém světě, a to především díky genetické stabilitě. Kromě vyšší rychlosti růstu ve srovnání s jinými bakteriemi je použití druhů *Bacillus* k produkci PHA výhodné oproti jiným díky absenci lipopolysacharidové vnější vrstvy v nich, což velmi usnadňuje extrakci PHA. Druhy *Bacillus* jsou také schopné produkovat PHA kopolymery za využití relativně jednoduchých, levných a strukturně nesouvisejících zdrojů uhlíku. Izoláty navíc mají schopnost vylučovat řadu hydrolytických enzymů, které lze využít pro cenově dostupnou výrobu PHA, například využíváním odpadů zemědělského průmyslu (Mohapatra a kol., 2017). Nevýhodou však při práci s druhy *Bacillus* na produkci biopolymeru ve velkém měřítku je sporulace, která je důvodem nízké produktivity P3HB. Je zřejmé, že tomu tak je vzhledem k tomu, že tvorba spór a akumulace PHA jsou vyvolány podobnými podmínkami nutričního stresu. U *B. cereus* může být sporulace potlačena kyselým prostředím nebo nedostatkem draslíku. Tyto podmínky pak nejen inhibují tvorbu spór, ale také mohou zvýšit produktivitu PHA. Proto je slibné prozkoumat strategie, které zabraňují sporulaci druhů *Bacillus* ke zvýšení produkce PHA a jejího výtěžku z použitého zdroje uhlíku (Rodríguez-Contreras a kol., 2013).

*Bacillus megaterium* je grampozitivní aerobní sporulující bakterie, která se nachází v široce rozmanitých lokalitách od půdy po mořskou vodu, sediment, rýžová pole, med, ryby a sušené jídlo. Může růst v jednoduchých médiích na více než 62 zdrojích uhlíku z 95 testovaných, včetně všech meziproduktů cyklu trikarboxylových kyselin, mravenčanu a acetátu. V roce 1884 De Bary pojmenoval *Bacillus megaterium* jako „big beast“, protože jeho velikost byla přibližně 100krát větší než u *Escherichia coli*. Obecně je metabolická dráha PHA poměrně podobná jako u *C. necator*, nicméně na syntéze PHA se podílí jiná PHA syntáza (třída IV) a další protein, nazývaný phaQ, regulující expresi syntetických genů PHA. Navzdory skutečnosti, že obsah PHA v buňkách *B. megaterium* je ve srovnání s *C. necator* poměrně nízký (asi 50 %), díky značné variabilitě využitelných zdrojů uhlíku je *B. megaterium* slibným kandidátem na produkci PHA z různých odpadních substrátů, jako je například melasa z cukrové třtiny, tekutina z kukuřice nebo mléčný odpad (Jendrossek, 2009).

Další druhy rodu *Bacillus* schopné produkovat PHA v biomase v rozmezí 11–69 % jsou *B. amyloliquefaciens*, *B. laterosporus*, *B. mycoides*, *B. licheniformis*, *B. cirulans*, *B. macerans*, *B. cereus*, *B. firmus*, *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. sphaericus*, *B. brevis* a *B. thuringiensis* (Mohapatra a kol., 2017).

#### 2.2.4.3 *Haloferax mediterranei*

*Haloferax mediterranei* je extrémně halofilní organismus patřící do čeledi Halobacteriaceae v doméně Archaea. Poprvé byl izolován z nádrží určených pro výrobu mořské soli poblíž Alicante ve Španělsku v roce 1980, kdy byl popsán s těmito klíčovými vlastnostmi – Gramnegativní, narůžovělá pigmentace, tvorba pleomorfních tyčinek, optimální

salinita 250 g/l NaCl s rozsahem 100–300 g/l. Schopnost akumulovat PHA byla odhalena až v roce 1986. *H. mediterranei* roste rychleji než většina ostatních členů Halobacteriaceae a vykazuje pozoruhodnou metabolickou účinnost a stabilitu genomu při vysokých koncentracích solí, a proto sloužil jako dobrý modelový organismus pro studie fyziologie haloarchaea a metabolismu po několik desetiletí. *H. mediterranei* je schopen akumulovat poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) (PHBV) z mnoha levných zdrojů uhlíku, přičemž pro syntézu kopolymeru nevyžaduje přídavek externích strukturálních prekurzorů 3HV. U *H. mediterranei* byly identifikovány dva klíčové enzymy (PhaEC a PhaB) a strukturální protein (PhaP) zapojený do biosyntézy PHBV (Han a kol., 2012).

Obecně jsou PHA syntázy, které se nacházejí v haloarchaea, seskupeny do třídy III. Syntázy PHA třídy III byly identifikovány v několika eubakteriích, například *Allochromatium vinosum* nebo *Thiocapsa pfennigii*, a polymerizují krátké hydroxyacyl-CoA, jmenovitě ty, které nejsou delší než 3-hydroxyvaleryl-CoA. Navíc jsou takové syntázy typicky složeny ze dvou podjednotek: katalyticky aktivní podjednotka PhaC (molární hmotnost v rozmezí 40–53 kDa) a strukturální podjednotka PhaE (molární hmotnost 20–40 kDa), která je také nezbytná pro polymeraci. Společně tyto dvě podjednotky tvoří biokatalytický klastr PhaEC (Koller, 2019).

Spolu se syntézou PHA *H. mediterranei* je extracelulární polymerní látka (EPS) vylučována jako vedlejší produkt, což snižuje účinnost produkce PHA. EPS lze získat z roztoku vysrážením studeným ethanolem a jedná se chemicky o aniontový, sulfátovaný polymer, skládající se z pravidelné jednotky opakující trisacharidy s jednou manosou a dvěma monomery kyseliny 2-acetamido-2-deoxyglukuronové a jedné vazby esterového sulfátu na trisacharidovou jednotku. Bylo zjištěno, že vysoké koncentrace NaCl inhibují produktivitu EPS a současně zvyšují produktivitu PHA (Cui a kol., 2017).

## **2.2.5 Strategie zvyšující konkurenceschopnost PHA produkce**

PHA se vyrábějí od 80. let minulého století s omezeným úspěchem na trhu. Mnoho výzev se týká omezené komercializace PHA (Tabulka 4), zejména vysokých výrobních nákladů a nestability termomechanických vlastností vyplývajících z nestabilních molekulových hmotností (Mw) a struktur, které jsou také spojeny s nestabilní aktivitou syntázy PHA a dodávkami monomerů.

Tabulka 4 Výzvy pro výrobu nákladově konkurenceschopného PHA (Chen a Jiang, 2017)

Problémy	Důvody	Řešení
Vysoké energetické nároky	Sterilizace a intenzivní provzdušňování	Nesterilní a mikroaerobní procesy
Nízká konverze substrátu na PHA	Substráty se spotřebovávají pro jiné účely	Odstranění nebo oslabení nesouvisejících cest PHA
Nestabilní struktury PHA	Více cest spotřebovávajících prekurzory PHA	Odstranění nebo oslabení nesouvisejících cest PHA
Nestabilní Mw	Nestabilní aktivita PHA syntázy	Řízení aktivity PHA syntázy
Pomalý růst	Binární dělení aj.	Vícenásobné dělení
Diskontinuální procesy	Vyvarování se možné kontaminaci	Použití kmenů odolných vůči kontaminaci
Drahý downstream	Složité extrakce a čištění produktů	Morfologické inženýrství

Vysoké náklady jsou výsledkem vysoké energetické náročnosti spojené se složitou sterilizací a intenzivním provzdušňováním, nízkou přeměnou uhlíkových substrátů na PHA, pomalým růstem mikroorganismů, diskontinuálními procesy a drahým následným zpracováním atd. Použití extrémofilních bakterií v kombinaci s metabolickým inženýrstvím a syntetickou biologií by mohly tyto problémy plně vyřešit. Budoucí inženýrství na mikroorganismech produkujících PHA by se mělo zaměřit na bakterie odolné vůči kontaminaci, zejména extremofily, zvýšení konverze substrátu na PHA a kontrole Mw produkovaného PHA. Studie důkazů koncepce jsou nejčastěji prováděny na *E. coli* nebo *Pseudomonas* spp., které se snadno používají pro molekulární manipulace (Chen a Jiang, 2017).

### 2.2.5.1 Molekulární strategie ke zlepšení produkce P(3HB)

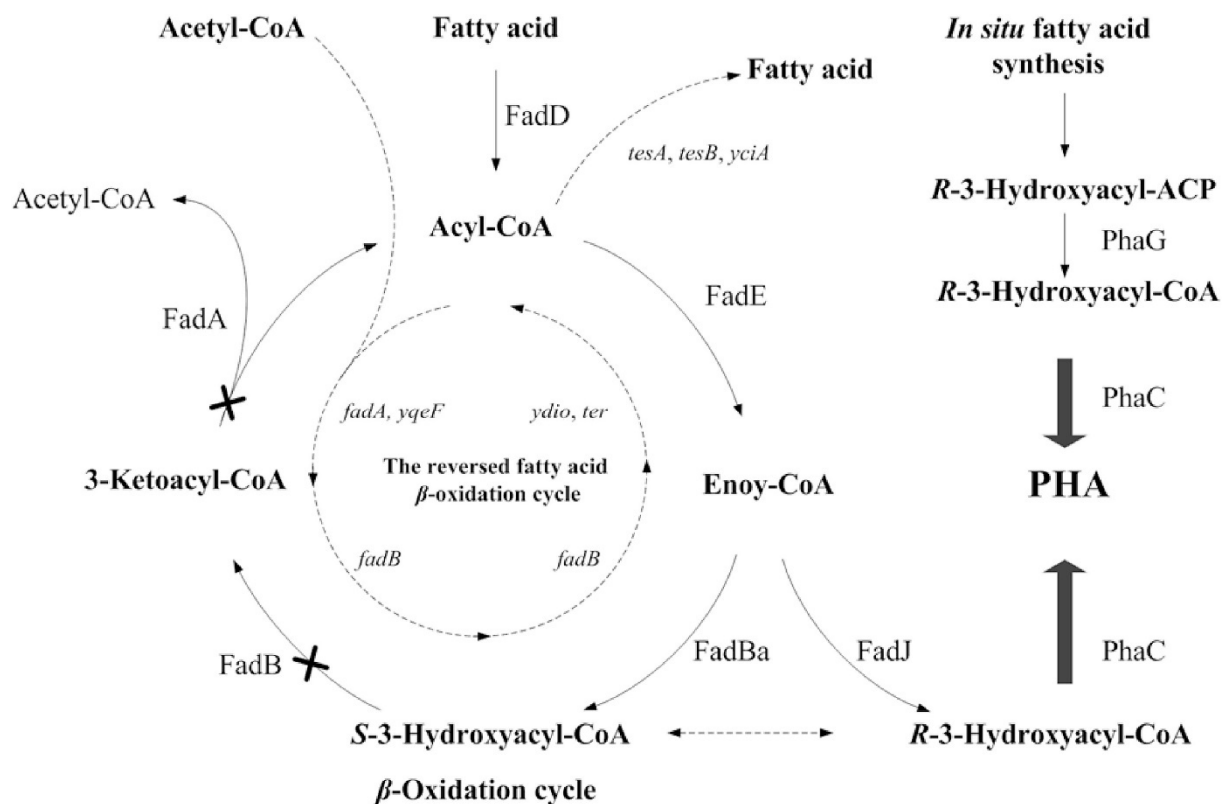
Rychlý růst na jednoduchých médiích a možnost dosáhnout vysoké buněčné hustoty v kultuře s vysokým obsahem P3HB jsou důležité faktory, které je třeba vzít v úvahu pro úspěšný výrobní proces P3HB. Protože *E. coli* je rozsáhle studovaná bakterie s dobře zavedenými technologiemi pro manipulaci s genomem, kultivaci a následné zpracování, mnoho studií se zaměřilo na použití *E. coli* k efektivní produkci těchto polymerů. Tato bakterie není producentem PHA. Geny z *C. necator* H16 byly však v *E. coli* klonovány poprvé Slaterem a kol., 1988, což umožnilo produkci P3HB v tomto organismu. Od té doby bylo provedeno mnoho různých genetických modifikací, a to jak ke zlepšení akumulace P3HB při nízkých nákladech s vysokou produktivitou, tak k produkci rozmanitých kopolymerů pomocí metabolického inženýrství a strategií syntetické biologie (Peña a kol., 2014).

Na udržování bakteriálních tvarů se podílí mnoho genů. Manipulace s těmito geny nám umožňují změnit tvary bakterií z tyčinek na vlákna nebo na malé či velké kuloidní útvary. Takovéto úpravy pak bývají označovány za morfologické inženýrství a může sloužit pro

usnadnění downstreamových procesů. Geny proteinů *ftsZ* a *mreB* kódujících bakteriální štěpný kruh a kostry jsou nezbytné pro růst buněk a pro zachování bakteriálních tvarů. K regulované intenzitě exprese *ftsZ* nebo/a *mreB* v *E. coli*, která vedla k různým sníženým hladinám exprese *ftsZ* nebo/a *mreB*, se použila metoda zásahu do segmentů nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetitiv (CRISPRi). Bylo zjištěno, že čím silnější je represe na genech *ftsZ* nebo *mreB*, tím delší jsou vlákna *E. coli* a větší buňky *E. coli*. Kombinované represe na expresi *ftsZ* a *mreB* generovaly dlouhé a větší *E. coli* s různými morfologiemi včetně různých velikostí tykví, tyčinek, koků, vřeten a elipsoidů. Ve všech případech došlo ke zlepšení akumulace PHB. Změna morfologie zvýšila syntézu P3HB ze 40 % na 80 % a podporuje gravitační separaci buněk (Jiang a Chen, 2016).

Další možností metabolického inženýrství je přesměrování substrátů na biochemické dráhy směřující k PHA. Jako příklad lze použít syntézu PHA neobsahujících monomer 3HB, která vyžaduje mastnou kyselinu jako substrát pro tvorbu jiných monomerů. Protože většina mastných kyselin bude  $\beta$ -oxidací přeměněna na acetyl-CoA, který bude použit i mnoha jinými biosyntetickými drahami jinými než jen pro syntézu PHA, dojde ke zbytečnému plýtvání drahých mastných kyselin (Obrázek 4). V důsledku  $\beta$ -oxidace je přeměna mastných kyselin na produkty PHA velmi nízká, což vede k vysokým nákladům na výrobu PHA (Chung a kol., 2011).

Účinnost přeměny substrátu na PHA lze významně zlepšit odstraněním enzymů *FadA* a *FadB* v dráze  $\beta$ -oxidace *Pseudomonas putida* nebo *P. entomophila*. Substráty mastných kyselin byly většinou převedeny na 3-hydroxyacyl-CoA vstupující do syntetické dráhy PHA, namísto postupné oxidace se na acetyl-CoA (Obrázek 4). U *Pseudomonas* spp. s tímto genetickým zásahem bylo popsáno, že produkované PHA obsahovalo 3-hydroxyhexanoát, 3-hydroxyoktanoát, 3-hydroxydeekanoát a 3-hydroxydodekanoát ve formě homopolymerů, blokových nebo náhodných kopolymerů (Chung a kol., 2011).



Obrázek 3 Biosyntéza PHA z mastných kyselin dráhou  $\beta$ -oxidace. Delece na enzimech (FadA + FadB) v  $\beta$ -oxidačních drahách umožňují většině mastných kyselin směřovat k syntéze PHA, čímž se výrazně zlepšují poměry substrátů k PHA produktu (Chen a Jiang, 2017).

### 2.2.5.2 Evolučně inženýrské přístupy získávání nových producentů PHA

Vedle cílených zásahů do genomu mikroorganismů za účelem pozitivně ovlivnit proces biosyntézy PHA se můžeme také setkat s přístupy založenými na nahodilejších změnách u potenciálního producenta PHA. Techniky evolučního inženýrství (EI) napodobují evoluční proces a postupným působením nutí mikroorganismus k přizpůsobení se vnějšímu prostředí. Postupnou selekcí jsou pak vybrány kmeny, jejichž přizpůsobení nejlépe odpovídá požadovaným vlastnostem. Techniky se skládají ze dvou kroků: aplikace nepříznivého prostředí, které vyvolá vznik kmenů odlišných od původního kmene, a následná selekce vhodného kmene. EI lze rozdělit podle typu prostředí indukujícího změnu v mikrobiálním genu. Nejčastěji se můžeme setkat s přidáním stresového faktoru do produkčního média a následným opakovaným přeočkováváním do stále stejného prostředí docílit postupné adaptace na daný stresový faktor. Možností také je postupně zvyšovat selekční tlak například postupnou zvyšující se koncentrací stresového faktoru. Další možností, jak indukovat změnu v organismu, je náhodná mutagenese způsobená alkylačními činidly, jejichž aplikace může vést k poškození DNA. Za tímto účelem se nejčastěji využívá UV ionizující záření nebo methyl metansulfonát (MMS). Aplikace DNA poškozujících činidel je často kombinována i s přidáním stresového faktoru (Chae a kol., 2017).

Nevýhodou těchto technik je, že proces adaptace bývá často zdoluhavý a s nejasnými výsledky. Výsledkem bývá enormní množství evolvovaných kmenů, u kterých je třeba

náležitě posoudit, zda došlo k zásadní změně od původního kmene a případně zda jsou změny pozitivního charakteru, protože negativní dopady na organismus mohou převažovat u většiny získaných kmenů. Naopak výhodou je, že pomocí těchto technik lze adaptovat mikroorganismy ke snášení stresových faktorů, které vyvolávají komplexní stresovou odpověď mikroorganismu. V takových případech bychom nedokázali pomocí cílené genové manipulace dosáhnout přizpůsobení k danému stresu. Příkladem může být adaptace mikroorganismu na inhibiční látky vznikající při hydrolýze lignocelulózy (např. furfural). Rezistence inhibitorů vybraného fermentačního mikroorganismu může být zlepšena adaptivní evolucí. Nedávné příklady EI zahrnují kmeny kvasinek vykazující zlepšenou odolnost vůči hydrolyzátu smrkového dřeva (Koppram a kol., 2012) nebo vůči hydrolyzátu kukuřičné slámy (Almario a kol., 2013).

### 2.2.5.3 Průmyslová biotechnologie nové generace

Extremofily pěstované v extrémních podmínkách jsou odolnější vůči mikrobiální kontaminaci. Mezi nimi jsou halofilní bakterie schopné rychlého růstu v médiu s vysokými koncentracemi solí při vysokém pH, jsou tedy odolné vůči kontaminaci, protože je toho schopno jen málo jiných mikroorganismů. Bylo zjištěno, že halofilní bakterie rostou bez kontaminace v otevřených nesterilních a kontinuálních procesech v mořském prostředí po dobu nejméně dvou měsíců. Jejich využitelnost lze dále v budoucnu zlepšit přidáním nových metabolických drah genetickou úpravou (Chen a Jiang, 2017).

Účinnost genetické manipulace je však často ovlivněna hostitelskými kmeny a změněná aktivita biologických částí často způsobuje selhání v řídicím procesu. Proto, aby se plně využil potenciál *Halomonas*, je třeba vyvinout genetické části se striktní regulací a vysokou účinností. Nedávno byla také vyvinuta technologie pro genetickou manipulaci s halofilními bakteriemi. Byly vyvinuty nástroje pro molekulární inženýrství pro konstrukci rekombinantního *Halomonas* spp. pro produkci cizích proteinů, nízkomolekulární sloučeniny 5-aminolevulinové kyseliny a PHBV kopolymerů sestávajících z 3-hydroxybutyrátu (3HB) a 3-hydroxyvalerátu (3HV) s vysokou účinností přeměny substrátu na PHA (Chen a Jiang, 2017).

Biotechnologie založená na extremofilech pěstovaných v otevřených nesterilních podmínkách jistě podpoří vznikající „průmyslovou biotechnologii nové generace“ (neboli NGIB z anglického „Next Generation Industrial Biotechnology“) pro bioprodukcí se sníženými náklady, a tím i zvýšenou konkurenceschopností (Chen a Jiang, 2018).

## 2.3 Zpracování rostlinné biomasy s ohledem na její využití v biotechnologickém procesu

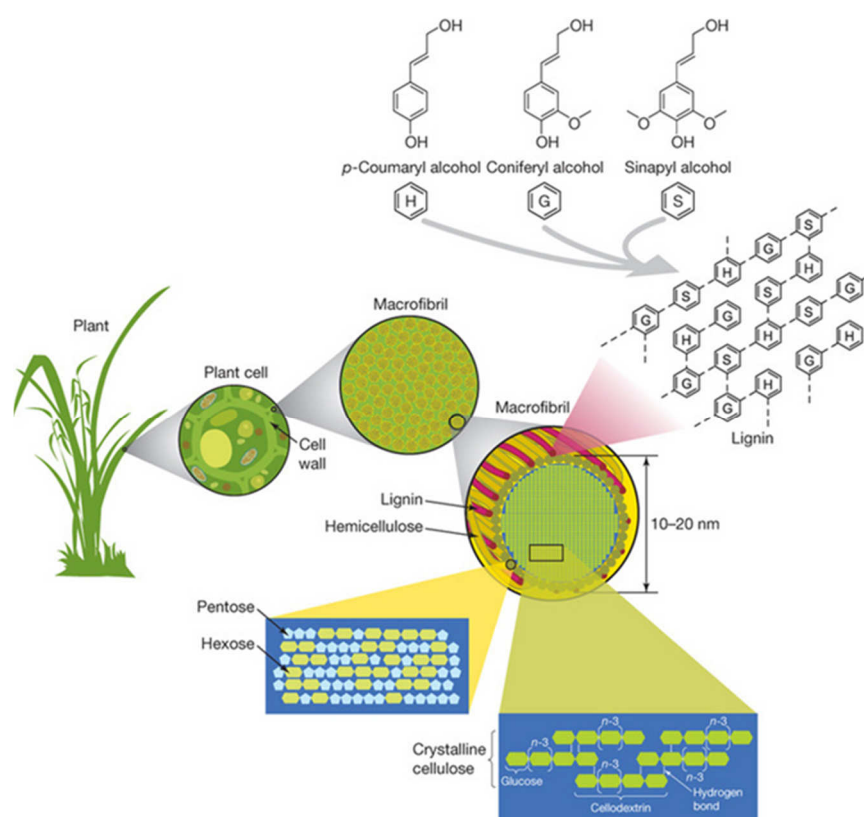
Ve své nejširší definici je biomasa popisována jako veškerý materiál, který byl nebo je částí živého organismu. Nicméně pro biomasu jako obnovitelný zdroj se definice obvykle zužuje na materiály rostlinného původu. Ty zahrnují zejména zemědělské zbytky (pšeničná a kukuřičná sláma), vedlejší produkty průmyslových procesů (dřevěné piliny, odpadní vlákna, mláto) nebo energetické plodiny (rychle rostoucí dřeviny, řepka olejka) (Pothiraj a kol., 2006).



## 2.3.1 Chemické složení rostlinné biomasy

Rostlinná biomasa může zaujímat mnoho podob, avšak skládá se ze stejných základních stavebních bloků. Základním blokem je lignocelulóza, která se skládá z ligninu, celulózy a hemicelulózy. Dalšími komponentami pak dále jsou extrahovatelné látky, proteiny a popel. Podíl jednotlivých komponent v biomase závisí v rámci rostliny na typu a stáří tkáně. U různých rostlin pak závisí na genetice a prostředí (Hames, 2009).

Lignocelulóza je hlavní strukturální složkou dřevin a bylin a představuje hlavní zdroj obnovitelné organické hmoty. Lignocelulóza se skládá z komplexní struktury biopolymerů zahrnující lignin, hemicelulózu a celulózu. Tyto tři základní složky jsou vzájemně propojeny a zasítovány a výsledkem je velmi robustní struktura odolávající vnějším vlivům. Chemické vlastnosti jednotlivých komponent však dělají z lignocelulózy substrát s enormní biotechnologickou hodnotou (Pothiraj a kol., 2006).

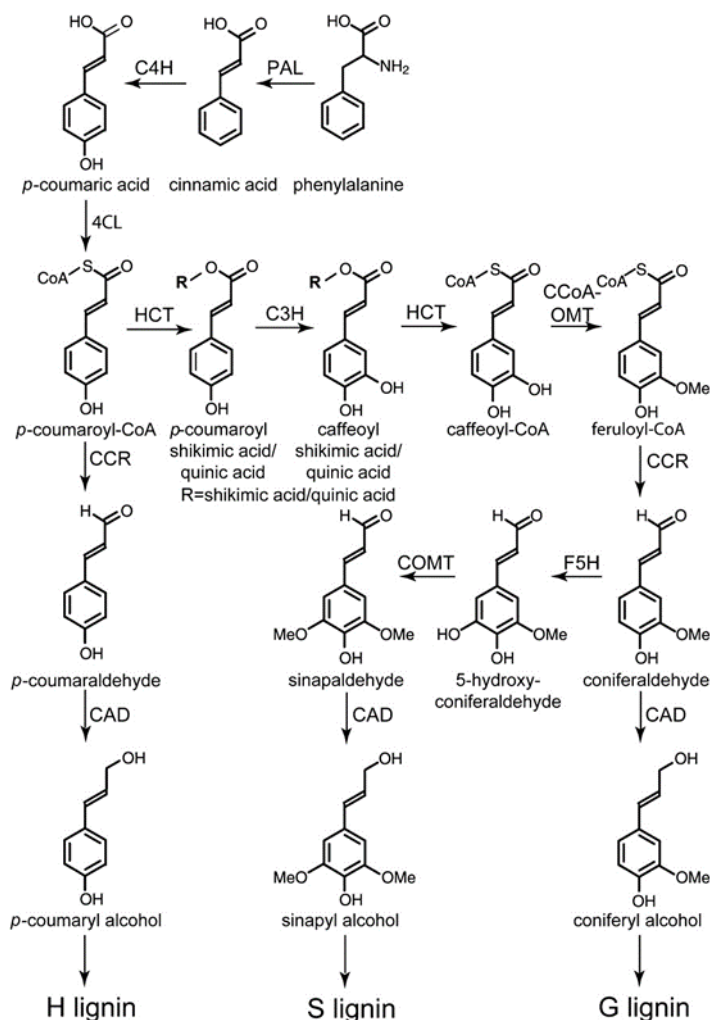


Obrázek 4 Struktura lignocelulózy (Rubin, 2008).

### 2.3.1.1 Lignin

Lignin je obecný termín pro velkou skupinu aromatických polymerů, které vznikají oxidativním spojováním 4-hydroxyfenylpropanoidů (Boerjan a kol., 2003, Ralph a kol., 2004). Tyto polymery jsou uloženy převážně ve stěnách sekundárně zesílených buněk, čímž se stávají tuhými a nepropustnými. Vedle vývojově naprogramovaného umístění ligninu může být jeho biosyntéza indukována také při různých biotických a abiotických stresových stavech, jako jsou zranění, patogenní infekce, metabolický stres nebo poruchy ve struktuře buněčné stěny (Cano-Delgado a kol., 2003; Tronchet a kol., 2010). Vzhledem k tomu, že lignin chrání polysacharidy buněčných stěn před mikrobiální degradací, čímž přináší odolnost proti

rozkladu, je také jedním z nejdůležitějších omezujících faktorů při zpracování rostlinné biomasy. Odstranění ligninu z rostlinné biomasy je nákladný proces, a proto je kladeno vysoké úsilí na výběr rostlin, které buď ukládají méně ligninu, nebo produkují ligniny, které jsou více přístupné chemické degradaci (Weng a kol., 2008).



Obrázek 5 Hlavní biosyntetické dráhy k monolignolům. PAL, fenylalanin amonia-lyáza; C4H, cinamát 4-hydroxyláza; 4CL, 4-kumarát:CoA ligáza; C3H, p-kumarát 3- hydroxyláza; HCT, p hydroxycinnamyl-CoA:chinát/šikimát p- hydroxycinnamyltransferáza; CCoAOMT, caffeoyl CoA methyltransferáza; CCR, cinnamyl-CoA reduktáza; F5H, ferulát 5- hydroxyláza; COMT, caffeate O-methyltransferáza; CAD, cinnamyl alkohol dehydrogenáza (Boerjan a kol., 2003).

Hlavními stavebními jednotkami ligninu jsou hydroxycinnamylalkoholy (nebo monolignoly), konkrétně koniferylalkohol a sinapylalkohol, s typicky malými množstvími p-kumarylalkoholu (Obrázek 5). Monolignoly jsou syntetizovány z fenylalaninu přes obecné fenylopropanoidové a monolignolové specifické dráhy, přičemž fenylalanin je syntetizován v šikimátové biosyntetické dráze, která probíhá v plastidech (Rippert a kol., 2009). Určité enzymy ligninové biosyntetické dráhy, jmenovitě enzymy cytochromu P450 cinamát-4-hydroxyláza (C4H), p-kumarát-3-hydroxyláza (C3H), a ferulát-5-hydroxyláza (F5H), jsou membránové proteiny, o kterých se předpokládá, že jsou aktivní na cytosolické straně endoplazmatického retikulu (Chapple, 1998). Jednotky vznikající z monolignolů,

pokud jsou včleněny do ligninového polymeru, se nazývají guaiacyl (G), syringyl (S) a p-hydroxyfenyl (H) jednotky (Vanholme a kol., 2010).

Až na některé výjimky jsou ligniny z nahosemenných rostlin složeny pouze z G-jednotek (s menším množstvím H-jednotek) (Uzal a kol., 2009), zatímco ligniny dvouděložných rostlin jsou složeny z jednotek G a S. H-jednotky jsou ve vyšší míře obsaženy v měkkých dřevích a trávách (Boerjan a kol., 2003).

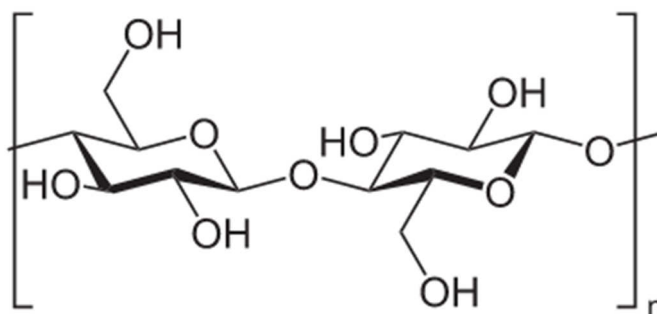
### 2.3.1.2 Celulóza

Celulóza je hlavní složkou dřeva a je důležitou složkou primárních a sekundárních buněčných stěn. Obsah celulózy se liší v různých druzích dřeva v rozmezí 40-50 %. Celulóza je homopolymer sestávající z D-glukopyranózových jednotek  $\beta$ -1,4-glykosidickou vazbou. Jednotky glukózy jsou spojeny dohromady do dlouhého lineárního řetězce, kde je každá jednotka obrácena o  $180^\circ$  vzhledem k sousední jednotce. Základní jednotka celulózy je celobióza, viz Obrázek 6. Každá glukózová jednotka obsahuje tři hydroxylové skupiny umístěné na uhlících C2, C3 a C6, které jsou všechny schopné podstoupit typické reakce primárních a sekundárních alkoholů. Nahrazení primární polohy v poloze C6 je více termodynamicky stabilní než u sekundárních poloh C2 a C3. Nejméně favorizovanou reakcí pro hydroxyskupinu je reakce u C3 vzhledem ke sterickému zvýhodnění C2 (Dumitriu, 2005).

Vodíkové vazby se tvoří mezi hydroxylovými skupinami a atomy kyslíku v rámci jednoho řetězce glukózy (intramolekulárně) i mezi sousedními řetězci (intermolekulárně). Spolu s van der Waalsovými silami vodíkové vazby agregují glukánové řetězce dohromady vedle sebe a podporují paralelní stohování celulózových mikrovláken do krystalické celulózy (Brett, 2000).

Celulóza I je celulóza, která existuje v přírodě a je tvořena během fotosyntézy. Tento typ celulózy má dvě fáze, které koexistují – celulóza I $\alpha$  a celulóza I $\beta$ . Rozdíl mezi celulózou I $\alpha$  a celulózou I $\beta$  je krystalická struktura. Celulóza I $\alpha$  může být modelována monoklinickým prostorem, zatímco se předpokládá, že celulóza I $\beta$  má triklinické uspořádání.

Celulóza II se vzniká macerací celulózy nebo regenerací z roztoku. V celulóze I jsou řetězce paralelní, a jsou proto s největší pravděpodobností spojeny van der Waalsovými silami. Celulosa II je antiparalelní a tím zvyšuje počet vodíkových vazeb mezi molekulárními vrstvami. Vzhledem k tomu, že vodíkové můstky jsou silnější než van der Waalsovy síly, celulóza II je z hlediska termodynamicky více stabilní a tím i výhodnější než celulóza I, proto se celulóza II nemůže regenerovat zpět na celulózu I (Brown, 2004).



Obrázek 6 Struktura celulózy

Stěna z celulóзовých vláken sestává z několika vrstev, představovaných mikro- a makrofibrily. Ve vláknité struktuře buněčné stěny je zahrnuta střední lamela, primární stěna a sekundární stěna. Primární stěna je první vrstva buněčné stěny a je velmi tenká a skládá se z volné agregace mikrofibril. Sekundární stěna se často skládá ze tří vrstev (S1, S2, S3). S1 je úzká vrstva a také vrstva vytvořená nejbližší k primární stěně. Střední vrstva a obecně nejsilnější část je S2 a poslední vrstva sekundární stěny S3 funguje jako rozhraní mezi celulóзou a cytoplazmou v živé buňce nebo buněčného lumenu v mrtvých buňkách. Vrstva, která nejvíce přispívá k fyzickým a mechanickým vlastnostem, je vrstva S2. Celulóзová vlákna mají různou délku, ale obecně měkké dřevo má dlouhá vlákna a tvrdé dřevo má kratší vlákna (Dumitriu, 2005).

### 2.3.1.3 Hemicelulóza

Hemicelulózy jsou polysacharidy ve stěnách rostlinných buněk, které mají  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) vázané skelety s ekvatoriální konfigurací. Mezi hemicelulózy patří xyloglukany, xylany, mannany a glukomannany a  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 4) glukany. Tyto typy hemicelulóz jsou přítomny v buněčných stěnách téměř všech suchozemských rostlin. Podrobná struktura hemicelulóz a jejich hojnost se velmi liší mezi různými druhy a typy buněk. Nejdůležitější biologickou úlohou hemicelulóz je jejich přínos ke zpevnění buněčné stěny interakcí s celulóзou a v některých stěnách s ligninem. Tyto rysy jsou diskutovány ve vztahu k obecně uznávaným modelům primární stěny. Hemicelulózy jsou syntetizovány glykosyltransferázami umístěnými v membránách Golgiho aparátu (Scheller a Ulvskov, 2010).

## 2.4 Předúprava a hydrolýza lignocelulóзовých materiálů

Rozhodujícím krokem při zpracování lignocelulóзové biomasy je předúprava, která umožňuje solubilizaci nebo separaci hlavních složek biomasy, čímž umožní fermentovatelnost lignocelulóзového materiálu. Při volbě předúpravy by měla být zvážena celková kompatibilita výchozích surovin, enzymů a organismů, které mají být aplikovány. Tento krok není nákladný jen sám o sobě, ale zvyšuje náklady prakticky všech ostatních biologických procesů zpracování, včetně těch, které předcházejí předběžnému zpracování, tj. manipulaci s výsledným hydrolyzátem, zpracování pevného odpadu z předúpravy a detoxifikace potenciálních vedlejších produktů atd. (Menon a Rao, 2012).

Základním předpokladem je rozštěpení polysacharidů, celulózy a hemicelulózy, na fermentovatelné cukry (Wyman a kol., 2004). Kompozit vytvořený celulóзou, hemicelulóзou a ligninem je však zodpovědný za pozoruhodnou odolnost proti hydrolýze a enzymatickému napadení (Peters, 2006). Proto je cílem předúpravy alespoň částečné odstranění ligninu a hemicelulóz (delignifikace), snížení krystalinity celulózy a zvýšení porozity lignocelulóзového materiálů (Obruča a kol., 2015).

Předúpravy lignocelulóзové biomasy zahrnují biologické, mechanické, chemické metody a jejich různé kombinace. Výběr optimálního postupu předúpravy závisí na surovinách a jejich ekonomickém posouzení, ale také na vlivu na životní prostředí. Tabulka 5 znázorňuje vybrané metody předúprav, které lze komerčně využít. Účinná předúprava je charakterizována

několika kritérii: zachováním hemicelulózových frakcí, omezením tvorby inhibitorů v důsledku tvorby degradačních produktů, minimalizací nákladů a energetické spotřeby. Kromě těchto kritérií je třeba vzít v úvahu i několik dalších faktorů, včetně izolace a využití druhotných produktů s vysokou přidanou hodnotou (např. ligninu a proteinů), předúprava a recyklace katalyzátorů a zpracování odpadu (Banerjee a kol., 2010).

*Tabulka 5 Nejslibnější metody předúpravy (Menon a Rao, 2012).*

<b>Metoda</b>	<b>Výtěžek cukrů</b>	<b>Tvorba inhibitorů</b>	<b>Tvorba vedlejších produktů</b>	<b>Výhody</b>	<b>Nevýhody</b>
Mechanická	Nízký	Žádná	Žádná	Snížení krystalinity celulózy	Vysoká potřeba energie
Minerální kyseliny	Vysoký	Vysoká	Vysoká	Hydrolyzuje celulózu a hemicelulózu	Korozivní účinky
Zásady	Vysoký	Nízká	Vysoká	Odstranění ligninu a hemicelulózy, zvyšuje přístupnou plochu	Dlouhá doba účinku
Horká voda	Vysoký	Vysoká	Nízká	Odstranění hemicelulózy, což činí enzymy přístupné celulóze	Dlouhá doba účinku, méně odstraněného ligninu
Organická rozpouštědla	Vysoký	Vysoká	Vysoká	Hydrolyza ligninu a hemicelulóz	Náročná regenerace rozpouštědel
Ozonolýza	Vysoký	Nízká	Vysoká	Snižuje obsah ligninu, žádné toxické zbytky	Vyžaduje se velké množství ozonu
CO <sub>2</sub> exploze	Vysoký	Nízká	Nízká	Odstranění hemicelulózy, dekrystalizace celulózy, nákladově efektivní	Nepůsobí na lignin
Parní exploze	Vysoký	Vysoká	Nízká	Odstranění hemicelulózy a změna struktury ligninu	Neúplné narušení komplexní struktury lignocelulózy
Amoniakální exploze	Vysoký	Nízká	Nízká	Odstranění ligninu a hemicelulózy	Neúčinná pro biomasu s vysokým obsahem ligninu
Iontové kapaliny	Střední	Nízká	Nízká	Rozpuštění celulózy, zvýšená schopnost celulózy	Vysoká cena

## 2.4.1 Fyzikální předúpravy

Většina lignocelulózové biomasy vyžaduje některé mechanické procesy pro snížení velikosti částic. Několik metod předúpravy, jako je mletí, ozařování nebo extruze, se běžně používají k zefektivnění enzymatické hydrolyzy lignocelulózových materiálů. Ke zlepšení výsledků hydrolyzy dochází v důsledku snížení krystalinity a zlepšení přenosu hmoty. Energetická náročnost fyzikálních předúprav závisí na požadované velikosti částic (Menon a Rao, 2012).

### **2.4.1.1 Ultrazvuk**

Sonikace je relativně nová technika používaná pro předúpravu lignocelulózové biomasy. Studie v laboratoři však ukázaly, že ultrazvuk má slibný potenciál. Ultrazvukové vlny produkují jak fyzikální, tak chemické účinky, které mění morfologii lignocelulózové biomasy. Ultrazvuková předúprava vede ke tvorbě malých kavitačních bublin, které způsobují praskání a frakcionaci celulózy a hemicelulózy, čímž se zvyšuje přístupnost enzymů degradujících celulózu (Kumar a Sharma, 2017). Kromě doby působení sonikace je důležitým faktorem její frekvence, která přímo určuje sílu sonikace. Většina vědců pro proces předúpravy používá ultrazvukový kmitočet 10-100 kHz, který je zcela dostatečný pro rozbití buněk a degradaci polymerů (Gogate a kol., 2011). Sonikace alkalické předem ošetřené pšeničné slámy po dobu 15-35 minut zvýšila delignifikaci o 7,6-8,4 % ve srovnání s kontrolou (Sun a Tomkinson, 2002).

## **2.4.2 Chemické předúpravy**

Chemické předúpravy byly původně vyvinuty a byly značně používány v papírenském průmyslu pro delignifikaci celulózových materiálů pro výrobu vysoce kvalitních papírových výrobků. O tyto techniky byl zvýšený zájem především díky efektivitě a nízkým nákladům na proces rozvláknování. Dosavadní chemické předúpravy měly primární cíl zlepšit biologickou rozložitelnost celulózy odstraněním ligninu a/nebo hemicelulózy a v menší míře ke snížení stupně polymerace a krystalinity celulózové složky. Tyto předúpravy jsou nejprostudovanějšími technikami předúprav a zahrnují působení kyselinami, zásadami a iontovými kapalinami (Menon a Rao, 2012).

### **2.4.2.1 Kyselá hydrolýza**

Kyselá hydrolýza použití koncentrovaných, ale častěji zředěných kyselin k narušení tuhé struktury lignocelulózového materiálu. Nejčastěji používanou kyselinou je zředěná kyselina sírová, která je používána pro širokou škálu typů biomasy – proso (Digman a kol., 2010), kukuřičné klásky (Du a kol., 2010) nebo smrkové dřevo (Kucera a kol., 2017). Zředěná kyselina sírová se tradičně používá k výrobě furfuralu hydrolýzou hemicelulózy na jednoduché sacharidy, jako je xylóza, která se dále mění na furfural. Rovněž byly studovány jiné kyseliny, jako je kyselina chlorovodíková (Wang a kol., 2010), kyselina fosforečná (Zhang a kol., 2007) a kyselina dusičná (Himmel a kol., 1997).

### **2.4.2.2 Zásaditá hydrolýza**

Alkalická předúprava lignocelulózy zahrnuje použití zásad, jako jsou hydroxid sodný, draselný, vápenatý a amonný. Působení hydroxidů způsobuje degradaci esterových a glykosidických vedlejších řetězců, což vede ke strukturální změně ligninu, částečné rozpouštění hemicelulózy, napučení celulózy, její částečnou dekrystalizaci (Cheng a kol., 2010). Hydroxid sodný má schopnost narušovat strukturu ligninu, čímž zvyšuje dostupnost enzymů k celulóze a hemicelulóze. Sun a jeho tým studoval účinnost různých alkalických roztoků analýzou míry delignifikace a rozpouštění hemicelulózy u slámy. Nejlepších výsledků bylo dosaženo použitím 1,5 % hydroxidu sodného po dobu 144 hodin při 20 °C s výsledkem 60 % rozloženého ligninu a 80 % rozložené hemicelulózy (Sun a kol., 1995). Podmínky

alkalické předúpravy jsou obvykle méně striktní než jiné. Může se provádět za okolních podmínek, pak však vyžaduje delší dobu účinku než při zvýšené teplotě teplotách. Před enzymatickou hydrolýzou je nutný neutralizační krok pro odstranění ligninu a inhibitorů (solí, fenolových kyselin, furfuralu a aldehydů) (Menon a Rao, 2012).

### **2.4.2.3 Zelená rozpouštědla (iontové kapaliny)**

Není tomu mnoho let, kdy vznikla nová třída rozpouštědel označovaná jako zelená rozpouštědla. Tato rozpouštědla jsou často tekutá při pokojové teplotě a sestávají výhradně z iontů. Termodynamika a kinetika reakcí prováděných v iontových kapalinách jsou odlišné od reakcí v konvenčních molekulárních rozpouštědlech. Obecně se iontové kapaliny skládají ze soli, kde jeden nebo oba ionty jsou velké a kation má nízkou míru symetrie (Earle a Seddon, 2002). Tyto faktory mají tendenci snižovat mřížovou energii krystalické formy soli, a tím snižovat teplotu tání.

Několik nedávných studií prokázalo, že iontové kapaliny jsou účinné při rozpouštění řady lignocelulóзовých materiálů, jako je celulóza, dřevo nebo pšeničná a kukuřičná sláma (Cao a kol., 2010; Yoo a kol., 2017). Dadi a kolektiv (Dadi a kol., 2006) použil jako krok předúpravy celulózy 1-n-butyl-3-methylimidazolium chlorid (BMIMCl). Předupravená celulóza při následné enzymatické hydrolýze dosahovala vyšší aktivity enzymů a výtěžků glukózy. Kuo a Lee (Kuo a Lee, 2009) zaznamenali, že cukrová třtina předupravená kapalinou 1,3-N-methylmorfolin-N-oxid (NMMO) má ve srovnání s neupravenou dvojnásobně vyšší výtěžek enzymové hydrolýzy.

Významnou nevýhodou iontových kapalin je velké potřebné množství a vysoká cena. Při správném zacházení je však možné recyklovat téměř 100 % rozpouštědla (Heinze a kol., 2005). Dalším negativem je inhibiční účinek iontových kapalin na celulólytické enzymy používané v následujícím kroku. Proto je oddělení iontové kapaliny od předupravené celulózy důležitým krokem za účelem zachování celulózové aktivity a zvýšení výtěžků fermentovatelných cukrů (Capolupo a Faraco, 2016). Navzdory těmto nevýhodám tato předúprava vykazuje velký potenciál, protože je považována za šetrnější k životnímu prostředí než jiné metody chemické předúpravy za srovnatelných výtěžků fermentovatelných sacharidů (Hayes, 2009).

## **2.4.3 Fyzikálně-chemické metody**

Předúpravy, které kombinují chemické i fyzikální procesy, jsou označovány jako fyzikálně-chemické. Nejdůležitějšími procesy v této skupině jsou: parní exploze, katalyzovaná exploze SO<sub>2</sub> nebo CO<sub>2</sub>, exploze amoniaku (AFEX), horká voda, mikrovlnná-chemická předúprava.

### **2.4.3.1 Parní exploze**

Při parní explozi se biomasa zpracovává nasycenou párou za vysokého tlaku, přičemž dojde k náhlému snížení tlaku, což má za následek, že materiál prochází výbušnou dekompresí. Výbuch páry se zpravidla zahajuje při teplotě 160-260 °C (odpovídající tlak 0,69 až 4,83 MPa) po dobu několika sekund až několika minut před vystavením materiálu atmosférickému tlaku. Směs biomasy a páry se udržuje po určitou dobu, aby se podpořila hydrolýza hemicelulózy, a proces je ukončen výbušnou dekompresí (Varga a kol., 2004).

#### **2.4.3.2 Amoniakální exploze (AFEX – ammonia fiber explosion)**

Průběh amoniakální exploze je téměř identický jako u parní exploze. Dávkování hydroxidu amonného je 1-2 kg na 1 kg biomasy, teplota je okolo 90 °C a doba účinku je 30 minut. Předúprava AFEX vede k dekrystalizaci celulózy, částečné depolymeraci hemicelulózy, odstranění acetylových skupin převážně na hemicelulóze, štěpení komplexu lignin-sacharidového komplexu, štěpení C-O-C vazby ligninu, zvýšení dostupnosti povrchu díky narušení struktury a ke zvýšené smáčivosti zpracované biomasy (Gollapalli a kol., 2002). Účinnost AFEX je vysoká u lignocelulózy s nízkým obsahem ligninu (5-15 %), ale u biomasy s relativně vysokým obsahem ligninu, jako je dřevo nebo ořechové skořápky, není předúprava AFEX příliš efektivní (Taherzadeh a Karimi, 2008).

#### **2.4.3.3 Superkritická exploze CO<sub>2</sub>**

Superkritická exploze CO<sub>2</sub> je metoda předúpravy používající superkritickou tekutinu, která existuje při teplotě a tlaku nad jeho kritickým bodem, kde plynná a kapalná fáze nejsou rozlišeny. Energetické nároky na přivedení CO<sub>2</sub> do jeho superkritického bodu je nižší než u jiných rozpouštědel, díky nízké kritické teplotě (31 °) a tlaku (7,38 MPa). Nahrazování běžných chemikálií a rozpouštědel bezpečnějšími se zdá být v současné době nezbytné s ohledem na vývoj technologií s nízkým dopadem na životní prostředí (Morais a Bogel-Lukasik, 2013). Superkritické tekutiny mohou být použity k narušení krystalické struktury lignocelulózy a účinně odstraňují lignin, což zvyšuje stravitelnost celulózy (McHardy a Sawan, 1998).

Zheng a kol. (1995) jako první použili CO<sub>2</sub> jako metodu předúpravy pro komerční celulóзовý materiál (Avicel) a později tuto metodu opět použili na odpad z cukrové třtiny. Vykázali až 75 % zvýšení výtěžku glukózy v porovnání s neupravenou biomasou (Zheng a kol., 1998).

Molekuly CO<sub>2</sub> jsou schopny proniknout do pórů lignocelulóзовých materiálů, podobně jako vodní pára nebo amoniak. Proto exploze CO<sub>2</sub> je v podstatě stejná jako předúpravy v předchozích dvou podkapitolách. Na rozdíl od vodní páry, exploze CO<sub>2</sub> vykazuje nižší výtěžky redukujících cukrů, ale za to nezpůsobuje jejich následnou degradaci v důsledku nižší teploty. Ve srovnání s AFEX je pak méně nákladné a netoxická vůči životnímu prostředí (Zheng a kol. 1995).

#### **2.4.3.4 Biologická předúprava**

Biologická předúprava využívá mikroorganismy, které degradují dřevo, zejména různé druhy mikroskopických hub a bakterií, které modifikují chemické složení a/nebo strukturu lignocelulóзовé biomasy. Výsledkem je modifikovaná biomasa, která je přístupnější k celulólytickým enzymům. Přestože doposud přitahuje malou pozornost kvůli mnoha vlastním omezením, biologická předúprava má mnoho výhod. Biologická předúprava se zdá být slibnou technikou a má velmi zjevné výhody, např. není třeba použít další chemikálie, nízká spotřeba energie, mírné podmínky prostředí a pracovní způsob šetrný k životnímu prostředí (Sindhu a kol., 2016). Nicméně nevýhody jsou stejně zřejmé jako jeho výhody. Biologická předúprava je velmi pomalá, vyžaduje striktní podmínky růstu a velké množství prostoru pro úpravu. Navíc většina lignolytických mikroorganismů degraduje nejen lignin, ale také

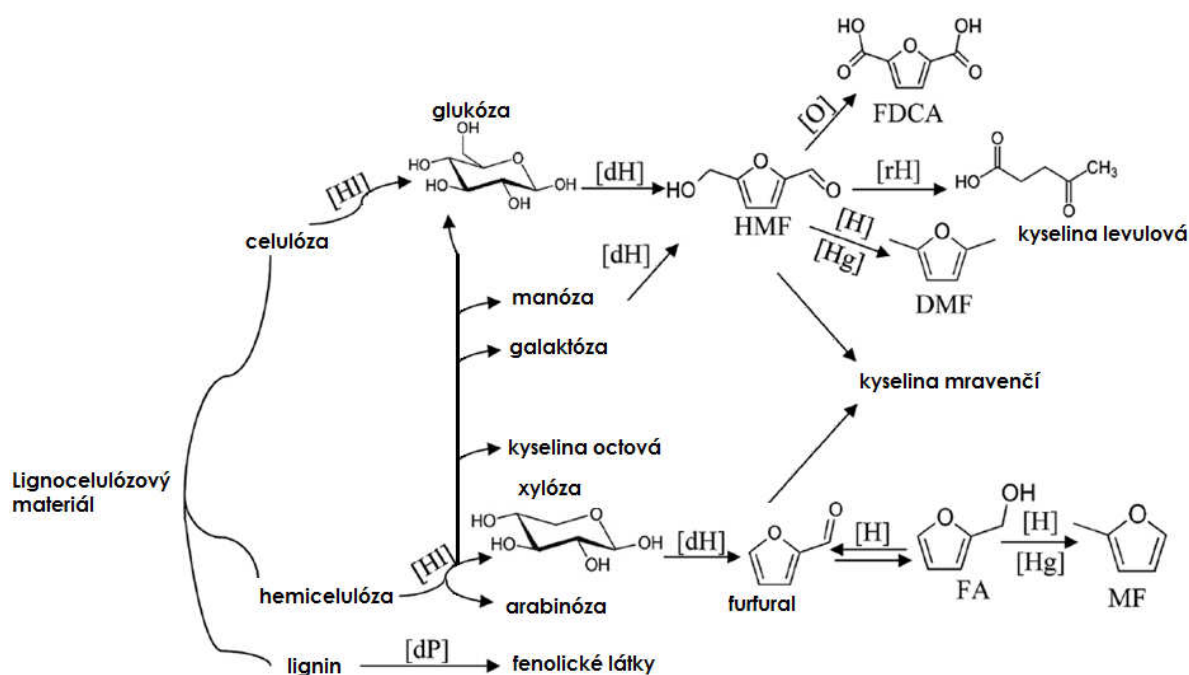


hemicelulózu a celulózu. Proto tato úprava čelí techno-ekonomickým výzvám a v porovnání s chemickými úpravami je drahá (Eggeman a Elander, 2005).

## 2.5 Produkty degradace lignocelózy

Lignocelulózové materiály se hydrolýzou přeměňují na fermentovatelné cukry. Ty mohou následně být využity k produkci řady produktů (Chandel a kol., 2011). Celulóza může být hydrolyzována za vzniku molekul glukózy nebo celobiózy, zatímco hemicelulózy mohou být štěpena za vzniku molekul, jako jsou arabinóza, manóza, glukóza, galaktóza, xylóza nebo uronové kyseliny (Gibson, 2012; Wyman a kol., 2004). Právě tyto látky jsou požadovanými produkty hydrolýzy a jejich množství je klíčové při hodnocení využitelnosti získaného hydrolyzátu.

Chemická i enzymatická hydrolýza lignocelulózového materiálu však vede i k uvolnění řady rozkladných produktů, které se prokázaly jako škodlivé pro mikrobiální fermentaci. Kyselá hydrolýza lignocelulózových materiálů například produkuje několik sloučenin s inhibičními účinky, které ovlivňují specifické rychlosti růstu a tím výrazně snižují výtěžnost biotechnologického procesu. Obrázek 7 zobrazuje původ nejčastěji vznikajících inhibičních látek (Putro a kol., 2016).



Obrázek 7 Přehled reakcí při degradaci lignocelózy. Hl: hydrolýza, dH: dehydratace, rH: rehydratace, O: oxidace, H: hydrogenace, Hg: hydrogenolýza, dP: depolymerizace (Putro a kol., 2016).

Produkty degradace lignocelózy s inhibičními účinky bývají nejčastěji rozdělovány do tří základních skupin – alifatické kyseliny, aromatické látky a furanové sloučeniny (Jönsson a kol., 2013).

## 2.5.1 Aromatické látky

Velké množství různých fenolických sloučenin je tvořeno z ligninu během kysele katalyzované hydrolýzy nebo předúpravy lignocelulózy. Karboxylové kyseliny vznikající při předúpravách přispívají k tvorbě kyselého prostředí. Fenolické sloučeniny a další aromatické látky se uvolňují během předúprav bez ohledu na to, zda byla využita kyselá katalýza (Martín a kol., 2002). Některé extrahovatelné látky jsou navíc také fenolické povahy (Rowell, 2013). Tvorba fenolických sloučenin ze sacharidů je další možností, i přesto, že význam této dráhy je stále předmětem mnoha studií (Popoff a kol., 1976).

Účinky fenolických sloučenin, které inhibují růst a tím i výtěžek produktu, jsou velmi variabilní a mohou být spojovány se specifickými funkčními skupinami (Ando a kol., 1986). V mnoha případech nebyl doposud mechanismus toxicity objasněn. Jeden z možných mechanismů spočívá v tom, že fenoly interferují s buněčnou membránou, a tím ovlivňují její funkci a mění svůj poměr proteinů a lipidů (Keweloh a kol., 1990). Fenolické sloučeniny jsou také zkoumány s ohledem na inhibici enzymatické hydrolýzy celulózy. Experimenty s fenoly naznačují, že jedním ze způsobů, jak ovlivňují aktivitu proteinů, je že vyvolávají jejich srážení (Kim a kol., 2011).

## 2.5.2 Alifatické kyseliny

Hydrolyzáty lignocelulózy obsahují alifatické kyseliny, jako jsou kyselina octová, kyselina mravenčí a kyselina levulová. Kyselina octová se vytváří primárně hydrolýzou acetyl skupin hemicelulózy, zatímco kyselina mravenčí a kyselina levulová vznikají jako produkty kysele katalyzované termochemické degradace polysacharidů. Kyselina mravenčí je produkt degradace furfuralu a HMF (5-hydroxymethylfurfuralu), zatímco kyselina levulová je tvořena degradací HMF (Ulbricht a kol., 1984).

Nedisociované kyseliny vstupují do buňky difúzí přes buněčnou membránu a poté se disociují kvůli neutrálnímu cytosolickému pH. Disociace kyseliny vede ke snížení intracelulárního pH, což může vést k smrti buněk (Pampulha a Loureiro-Dias, 1989).

## 2.5.3 Furanové sloučeniny

Furfural a HMF patří mezi nejběžněji se vyskytující furanové aldehydy v lignocelulóзовých hydrolyzátech. Furfural pochází z dehydratace pentóz a HMF dehydratací hexózových cukrů (Reginatto a Antônio, 2015). Tyto furanové aldehydy jsou známé jako nejúčinnější inhibitory růstu mikrobiálních buněk. V buňkách vyvolávají oxidační stres, indukují poškození DNA a inhibují řadu enzymů glykolýzy (Ask a kol., 2013). Pozornost je častěji věnována furfuralu, protože jej při předúpravě vzniká více než HMF a je více toxický pro průmyslovou katalýzu (Flores a kol., 2017).

## 2.5.4 Metody používané při identifikaci produktů hydrolýzy

Jako rychlá a jednoduchá metoda stanovení orientačního množství primárních produktů hydrolýzy bývají nejčastěji zařazeny spektrofotometrické metody pro stanovení redukcí sacharidu. Mezi nejběžnější používané patří metoda Somogyi-Nelson, jejímž principem je redukce měďnatého kationtu na oxid měďný, který následně reaguje s arsenomolybdatovým

komplexem za vzniku molybdenové modři. Další používanou je metoda využívající redukce 3,5-dinitrosalicylové kyseliny v zásaditém prostředí na 3-amino-5-nitrosalicylovou kyselinu.

Pro identifikaci a přesnou kvantifikaci jednotlivých monosacharidů, disacharidů, případně oligosacharidů je již zapotřebí instrumentální analýza. Nejčastěji se můžeme setkat metodou vysoko účinné kapalinové chromatografie s refraktometrickou detekcí (Glyad, 2002).

#### **2.5.4.1 Stanovení aromatických sloučenin**

Vzhledem k tomu, že degradací ligninu vznikají zejména látky fenolické povahy, tak spektrofotometrická metoda Folin-Ciocalteu bývá často využívána, pro stanovení celkových fenolických látek. Mělo by se také poznamenat, že analýza fenolů s použitím činidla Folin-Ciocalteu má podobný reakční mechanismus s metodou Lowryho pro stanovení celkového obsahu bílkovin, a že je proto citlivá na potenciální složky média, jako jsou hydrolytické enzymy, buněčné extrakty a hydrolyzovaný protein (Lowry a kol., 1951). Larsson a jeho tým (Larsson a kol., 1999) však použili ke stanovení celkového množství fenolů v hydrolyzátu smrkového dřeva alternativní spektrofotometrickou metodu s využitím Prussian Blue a zjistili, že tato metoda poskytuje spolehlivější výsledky, pokud jde o analýzu fenolických sloučenin v hydrolyzátu. Dále je možné pro stanovení polyfenolů využít i HPLC instrumentaci (Nilvebrant a kol., 2001).

K identifikaci specifických aromatických sloučenin v hydrolyzátech z různých druhů lignocelulózových surovin bývají používány různé analytické techniky, především plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS) a kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS). Studie se nejčastěji zabývají analýzou kyselých hydrolyzátů řady lignocelulózových materiálů – např. kukuřičná sláma (Fenske a kol., 1998), smrk (Larsson a kol., 1999). Kromě toho byly zkoumány i aromatické degradační produkty alkalické hydrolýzy (Klinke a kol., 2002).

## **2.6 Strategie omezující efekt inhibice**

Tabulka 6 shrnuje různé strategie používané k vyloučení nebo řešení problémů s inhibicí biokatalyzátorů po předúpravě lignocelulózy.

Tabulka 6 Přehled vybraných strategií k překonání problémů s rozpustnými inhibitory pocházejícími z lignocelulózy vzniklými během předúprav (Jönsson a Martín, 2016).

Strategie	Postup	Potenciální nevýhody	Reference
Výběr surovin	Používání méně odolných surovin a surovin, které během předúpravy generují méně inhibitorů	Je žádoucí použít širokou škálu surovin	(Chiaramonti a kol., 2012) (Larsen a kol., 2012) (Studer a kol., 2011)
Detoxifikace	Chemická aditiva, např. Alkalická úprava, redukční činidla, polymery	Další chemikálie (cenově náročné); další procesní krok	Viz Tabulka 7
Evoluční inženýrství	Adaptivní vývoj pomocí specifických inhibitorů a lignocelulózových hydrolyzátů	Příčina potíží s inhibicí se liší v závislosti na surovinách, podmínkách předúpravy	(Almario a kol., 2013) (Koppram a kol., 2012)

## 2.6.1 Výběr surovin

Snahy o komercializaci biokonverze lignocelulózových surovin se mohou potenciálně soustředit na suroviny s relativně nízkou odolností, což by umožnilo provádět předúpravu za mírných podmínek. Příklady zahrnují hydrotermickou předúpravu bez nutnosti přídavku kyselých katalyzátorů pro biokonverzi trávy ozdobnice (Chiaramonti a kol., 2012) a pšeničné slámy (Larsen a kol., 2012). Tyto podmínky vedly k nízké koncentraci furanových aldehydů a fenolů, avšak koncentrace kyseliny octové dosáhly 17 g/kg pro ozdobnici a 5,1 g/kg pro pšeničnou slámu. Některé druhy stromů jako *Populus trichocarpa* se mohou také zařadit mezi druhy surovin vhodných pro biokonverzi na fermentovatelné cukry. Klíčem je výběr odrůdy, která projevuje nízkou vzdorovitost k předúpravě (Studer a kol., 2011). Selektce je zaměřena především na obsah a strukturu komponentů výchozí suroviny, jako je lignin, hemicelulóza a pektin. Výběr rostlin s nízkým obsahem acetylů může potenciálně minimalizovat riziko tvorby inhibičních koncentrací kyseliny octové. Tyto strategie jsou zajímavé, zejména s ohledem na rychle-rostoucí plodiny, určené k využití v biorafinériích (Jönsson a Martín, 2016).

## 2.6.2 Detoxifikace

Detoxifikace lignocelulózových hydrolyzátů a kalů je jedním z nejúčinnějších způsobů, jak potlačit problémy s inhibicí (Jönsson a kol., 2013). Tato strategie zahrnuje techniky, jako je použití chemických aditiv, např. alkálií, redukčních činidel a polymerů. Dalšími možnostmi jsou použití enzymatické úpravy, zahřívání a odpařování, extrakce kapalina-kapalina a

extrakce kapalina-pevná látka. Extrakce kapalina-pevná zahrnuje techniky, jako je výměna iontů a adsorpce aktivním uhlím (Jönsson a Martín, 2016).

*Tabulka 7 Přehled technik detoxifikace lignocelulózových hydrolyzátů a kalů (Jönsson a kol., 2013)*

<b>Technika</b>	<b>Procedura</b>	<b>Příklad</b>
Chemická aditiva	Zásady (Ca(OH) <sub>2</sub> , NaOH, NH <sub>4</sub> OH)	(Alriksson a kol., 2005)
	Redukční činidla (dithionit, dithiothreitol, sulfite)	(Cannella a kol., 2014)
Působení enzymů	Lakáza, Peroxidáza	(Jönsson a kol., 1998)
Zahřívání a odpařování	Odpařování	(Larsson a kol., 1999)
	Působení tepla	(Ranatunga a kol., 2000)
Extrakce kapalina-kapalina	Ethyl acetát	(Fenske a kol., 1998)
	Superkritická fluidní extrakce (CO <sub>2</sub> )	(Persson a kol., 2002)
	Trialkylamin	(Zhu a kol., 2011)
Extrakce kapalina-pevná látka	Aktivní uhlí	(Pan a kol., 2012)
	Iontoměnič	(Pan a kol., 2012)

Nevýhodou metody detoxikace je nutnost zařazení samostatného kroku procesu, což má neblahý vliv na technicko-ekonomický aspekt. Zatímco existuje mnoho způsobů, jak provádět detoxikaci, jen málo z nich bylo předmětem technicko-ekonomických hodnocení, které se zabývají například procesními vstupy, energetickými nároky, investičním vybavením, účinností a příspěvkem na náklady technologie. Některé detoxifikační metody mají výhody, které při technicko-ekonomickém hodnocení nemohou být opomenuty, např. přidání redukčních činidel nebo adsorpce inhibitorů na PEI polymer je kompatibilní s kroky biokatalytické konverze. Další výhodou některých redukčních činidel, jako jsou síranové oxyaniony, sulfid a dithionit, je to, že zlepšují jak fermentovatelnost a enzymatické sacharifikaci celulózy (Cannella a kol., 2014).

## **2.7 Využití odpadu ze zpracování potravinářských surovin a lesnického průmyslu k produkci PHA**

Mikroorganismy jsou schopné produkovat PHA z různých zdrojů uhlíku a lignocelulóza nepatří mezi výjimky. Jak již bylo řečeno, lignocelulóza představuje vysoce bohatou, ale také poměrně univerzální skupinu materiálů. Vlastnosti a udržitelnost těchto materiálů, s ohledem

na jejich využití pro biotechnologickou produkci PHA, stejně jako jeho hydrolýza a další zpracování by měly být vždy prováděny s ohledem na konkrétní druh biomasy a proces fermentace (Obruča a kol., 2015).

Kromě volby a přípravy substrátu je obvykle klíčový výběr PHA produkujícího bakteriálního kmene. Obecně bylo mnoho bakterií testováno za účelem produkce PHA, nicméně jen málo z nich bylo považováno za vhodné kandidáty na produkci ve velkém měřítku. Vhodnost bakterie pro produkci PHA z takto komplexních a náročných substrátů závisí na mnoha různých faktorech, především: schopnost využívat fermentovatelné cukry přítomné v hydrolyzátech (včetně pentóz), schopnost tolerovat nebo dokonce eliminovat potenciální mikrobiální inhibitory, stabilita a nerizikovost organismu, růstové rychlosti a schopnost akumulace vysokého obsahu PHA v buňkách. Dále pak často opomíjená extrahovatelnost a molekulové hmotnosti naakumulovaného PHA (Kessler a Wilholt, 1999).

### 2.7.1 Využití dřevní biomasy

Lignocelulózová biomasa z lesnického průmyslu představuje enormní zásobu obnovitelného zdroje uhlíku. Celosvětově se každoročně vyprodukuje přibližně 80 miliard tun dřevěné biomasy, přičemž celková hmotnost ročně vyprodukovaných rostlin se odhaduje zhruba na 180 miliard tun. Zatímco většina celulózové složky je efektivně využívána průmyslem papíru/buničiny, frakce hemicelulózy a ligninu nejsou téměř vůbec využity, i přes jejich biotechnologicky atraktivní složení. Jednou z mnoha možností může být právě využití pro produkci PHA (Keenan a kol., 2006).

Pan a kol. zvolili javorový hemicelulosový hydrolyzát jako obnovitelnou surovinu pro výrobu PHA s použitím *Burkholderia cepacia* jako produkčního kmene (Pan a kol., 2012). Pro zvýšení fermentovatelnosti hydrolyzátu dřeva, získaného hydrolýzou pomocí zředěné kyseliny, bylo testováno několik metod detoxikace. Over-liming v kombinaci s nízkoteplotní sterilizací měl za následek přítomnost nejnižší koncentraci celkových inhibičních fenolických látek. Fed batch kultivace vykazovala maximální produkci P3HB (po 96 h – biomasa 8,72 g/l a 51,4 % P3HB v suché biomase).

Bowers a kol. se také zaměřili na využití dřevní biomasy pro výrobu PHA. Ve své studii použili dřevní štěpky *Pinus radiata*, které fyzikálně-chemicky předupravili explozí oxidu siřičitého před enzymatickou hydrolýzou za vzniku odpovídajících hydrolyzátů. Na těchto hydrolyzátech byly pěstovány dva kmeny bakterií produkující P3HB *Novosphingobium nitrogenifigens* a *Sphingobium scionense*. Nejvyšší výtěžky P3HB (koncentrace suché biomasy 1,23 g/l, obsah P3HB v biomase 32 % a výtěžek P3HB 0,4 g/l) byly pozorovány u *Sphingobium scionense* (Bowers a kol., 2014).

### 2.7.2 Využití lignocelulózových odpadů z agropotravinářského průmyslu

Kromě dřevní biomasy existuje řada dalších zdrojů materiálů založených na lignocelulóze, které lze použít jako zdroj pro výrobu PHA – odpady z agropotravinářského průmyslu. Tyto materiály se vyrábějí v obrovských množstvích při zpracování zemědělských rostlin. Navzdory tomu, že některé z těchto odpadů a vedlejší produkty mohou být použity k různým účelům, jako je krmení zvířat nebo hnojení, výroba PHA představuje velmi zajímavou a

slibnou strategii pro jejich valorizaci, což přináší vysoce hodnotný produkt. Existuje tedy řada studií zabývajících se přeměnou těchto odpadů na PHA (Obruča a kol., 2015b).

Velmi slibným odpadním substrátem pro výrobu PHA je kávová sedlina. V roce 2010 celosvětová roční produkce kávových zrn překročila 8 milionů tun. Během přípravy kávového nápoje nebo při výrobě instantní kávy vzniká pevný podíl známý jako kávová sedlina. Ta obsahuje přibližně 15 % oleje, který lze jednoduše extrahovat a s využitím bakteriálního kmene *Cupriavidus necator* konvertovat na P3HB (Cruz a kol., 2014; Obruča a kol., 2015a). Po extrakci oleje vzniká zbytek s významným obsahem hemicelulóz a celulózy. Kyselou hydrolyzou lze tyto přírodní polymery převést na fermentovatelné sacharidy, které mohou být převedeny na PHA s použitím kmene *Burkholderia cepacia* (Obruča a kol., 2014).

Dalším slibným materiálem mohou být pšeničné otruby. Van-Thuoc s kolegy hydrolyzoval otruby mixem enzymů z *Aspergillus oryzae* NM1 za vzniku redukujících sacharidů složených zejména z glukózy, manózy, xylózy a arabinózy. K produkci P3HB byl následně použit bakteriální kmen *Halomonas boliviensis*, přičemž získaná koncentrace P3HB dosahovala 4 g/l a obsah P3HB v suché biomase byl přibližně 50 % (Van-Thuoc a kol., 2007).

Také hydrolyzát rýžové slámy získaný chemickou hydrolyzou s použitím zředěné kyseliny byl využit k produkci na PHA kmenem *Bacillus firmus*. Kysele předupravené hydrolyzáty obsahovaly cukry, ale také jejich rozkladné produkty, jako jsou kyselina mravenčí, kyselina octová, furfural a HMF. Bakterie rostly v hydrolyzátovém médiu bez jakékoliv detoxikace za vzniku biomasy 1,8 g/l s 1,7 g/l akumulovaného P3HB a obsah P3HB v buňkách činil 89 % (Sindhu a kol., 2013).

Vláknitá hmota, která zůstává po vysušení šťávy z cukrové třtiny nebo čiroku, je další atraktivní surovinou. Zejména díky tomu, že se jedná o hojně dostupný odpadní materiál. Proto se utiizací tohoto materiálu zabývá řada studií, přičemž některé z nich zahrnují i pokusy vyrábět PHA. Silva a kol. k tomuto záměru využili bakteriální kmene *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari*. Pro zlepšení fermentovatelnosti hydrolyzátu byl použit třístupňový detoxikační proces (zakoncentrování ve vodní lázni, over-liming a sorpce aktivním uhlím). Po detoxifikaci byly nejvyšší výtěžky pozorovány u *B. sacchari*, a to 4,4 g/l biomasy a 2,7 g/l PHA (Silva a kol., 2004).

# 3 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

V průběhu práce byly řešeny následující dílčí úkoly:

1. Vývoj technik pro kvantifikaci PHA v bakteriálních buňkách.
2. Charakterizace a příprava hydrolyzátů utilizovatelných pro biotechnologickou produkci
  - Hydrolýza vybraných materiálů
  - Charakterizace hydrolyzátů vhodnými analytickými metodami
  - Aplikace detoxifikačních metod za účelem snížení koncentrace inhibičních látek
3. Produkce polyhydroxyalkanoátů na hydrolyzáttech odpadních produktů potravinářského průmyslu
  - Screening a výběr vhodných přirozených mikrobiálních kmenů schopných utilizovat hydrolyzáty lignocelulózy
  - Aplikace evolučního inženýrství za účelem zvýšení produkce PHA
  - Studium vlivu stresových faktorů na schopnost akumulovat PHA
4. Studium produkce terpolymeru P(3HB-*co*-3HV-*co*-4HB)



## 4 DISKUZE

Tato kapitola je zamýšlena jako detailní diskuze k výsledkům, které již byly v průběhu doktorského studia publikovány. Všechny publikace a manuskripty jsou součástí této práce jako přílohy (seznam příloh je v kapitole 8 a přílohy samotné jsou obsaženy v kapitole 9) a v průběhu diskuze jsou jednotlivé přílohy odkazovány. Samozřejmě součástí přiložených publikací a manuskriptů je také detailní popis použitých metod a výsledků.

Předložená práce se zaměřuje na strategie vedoucí ke snížení nákladů na biotechnologickou produkci polyhydroxyalkanoátů. První část (kapitola 4.1) se zabývá možností využití moderních technik při stanovení obsahů PHA v produkované biomase, přičemž nahrazení standardních časově náročných kvantitvích metod umožňuje výrazné zefektivnění monitoringu průběhu produkce. Další části se pak zabývají přímo produkcí PHA. Nejzásadnější pro snížení nákladů je použití levného zdroje, jako jsou například odpady z potravinářských výrob (kapitola 4.2). To však s sebou často nese řadu nevýhod, které mohou být do určité míry eliminovány použitím vhodného kmene. Takový vhodný kmen je možné získat pomocí evolučního inženýrství, kterému se věnuje kapitola 4.3. Tato cesta však bývá časově velmi náročná s nejasným výsledkem, proto je zde také alternativní strategie založená na využití extrémofilního bakteriálního kmene (kapitola 4.4). Extrémofilní mikroorganismy často dokážou přetavit úskalí biologického procesu ve strategickou výhodu. Kapitola 4.5 se pak zabývá produkcí terpolymeru PHA složeného z monomerů 3HB, 3HV a 4HB.

### 4.1 Zefektivnění procesu kvantifikace PHA

Nezbytnost identifikovat a kvantifikovat PHA se táhne celým vývojem biotechnologického procesu od izolace produkčního kmene až po určení čistoty ve výsledném produktu. Dostupných metod pro screening bakterií produkujících PHA, kvantifikaci a charakterizaci PHA existuje celá řada, která zahrnuje barvení pomocí více či méně selektivních barviv kultur, spektrofotometrické analýzy, infračervenou spektroskopii, vysoce účinnou kapalinovou chromatografii, průtokovou cytometrii, plynovou chromatografii a další (Koller a Rodríguez-Contreras, 2015).

Mezi tradiční metody detekce přítomnosti PHA granulí ve struktuře bakterií patří barvení buněk pomocí barviv Sudánská čern nebo Nilská modř (Smibert a Krieg, 1979). Předností těchto metod je především jejich rychlost. S možností obarvení kolonií přímo na agarových plotnách během růstu přišel Spierkermann P. a kol. (1999), kdy byl flouorofor Nilská červeň (NR) přidán přímo do agaru. NR však neposkytuje pozitivní fluorescenční reakci pouze s molekulami PHA, ale i ostatními zásobními látkami na bázi lipidů.

Pro identifikaci PHA v bakteriálních buňkách je možné aplikovat infračervenou spektroskopii, kde využíváme faktu, že molekuly mají silný absorční pík při  $1728\text{ cm}^{-1}$  v infračerveném spektru vyvolaný karbonylovou skupinou, získáváme spolehlivou metodu identifikace potenciálních producentů (Juttner a kol., 1975). Dokonce navíc lze ze spekter infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) určit, o který typ PHA z hlediska délky řetězce se jedná. V práci Honga K. a kolektivu (1999) se MCL-monomery

jako jsou hydroxyoctanoát (HO) a hydroxydodecanoát (HH) se vyznačovaly píkem při 1740  $\text{cm}^{-1}$  a kopolymer obsahující SCL i MCL píkem při 1732  $\text{cm}^{-1}$ . Dále je pomocí infračervené spektroskopie možné stanovit, je-li materiál amorfni či krystalický. Nicméně hlavní nevýhodou je, že při infračervené spektroskopii významně interferuje voda, která má široký absorpční pík zakrývající velkou část spektra. Proto je principiálně nutné vodu ze vzorků před samotnou analýzou buněk pomocí infračervené spektroskopie odstranit (Sedlacek a kol., 2019).

Když se však přesuneme ke kvantifikaci PHA, která je nutná při monitoringu biotechnologického procesu produkce PHA, objeví se nám zásadní problém v časové náročnosti jednotlivých metod. V minulosti byla kvantifikace prováděna přímou gravimetrickou analýzou PHA izolovaného po extrakci rozpouštědlem nebo spektrofotometrickou metodou. Tato metoda využívala degradace P(3HB) pomocí koncentrované kyseliny sírové za zvýšené teploty na kyselinu krotonovou, která se absorbuje UV zářením s vlnovou délkou 235 nm (Law a Slepecky, 1961), nicméně obě metody jsou časově velice náročné.

V současné době se k analýze PHA využívá především plynová chromatografie (GC). Jako první stanovení publikoval G. Braunegg (1978), když použil mírnou kyselinu nebo zásadu k metanolýze P3HB přímo bez předchozí extrakce P3HB z buněk. Následně vznikla řada alternativních postupů založených na etanolýze případně propanolýze PHA v biomase. V této práci byla ke kvantifikaci PHA používána metoda podle Brandla a kolektivu (1988), kdy lyofilizované nebo vysušené buňky byly zpracovávány ve směsi chloroformu a 15% kyselině sírové v methanolu po dobu 3 hodin při teplotě 94 °C. Výsledné metylestery hydroxykyselin byly analyzovány pomocí GC s plamenově ionizačním detektorem (FID).

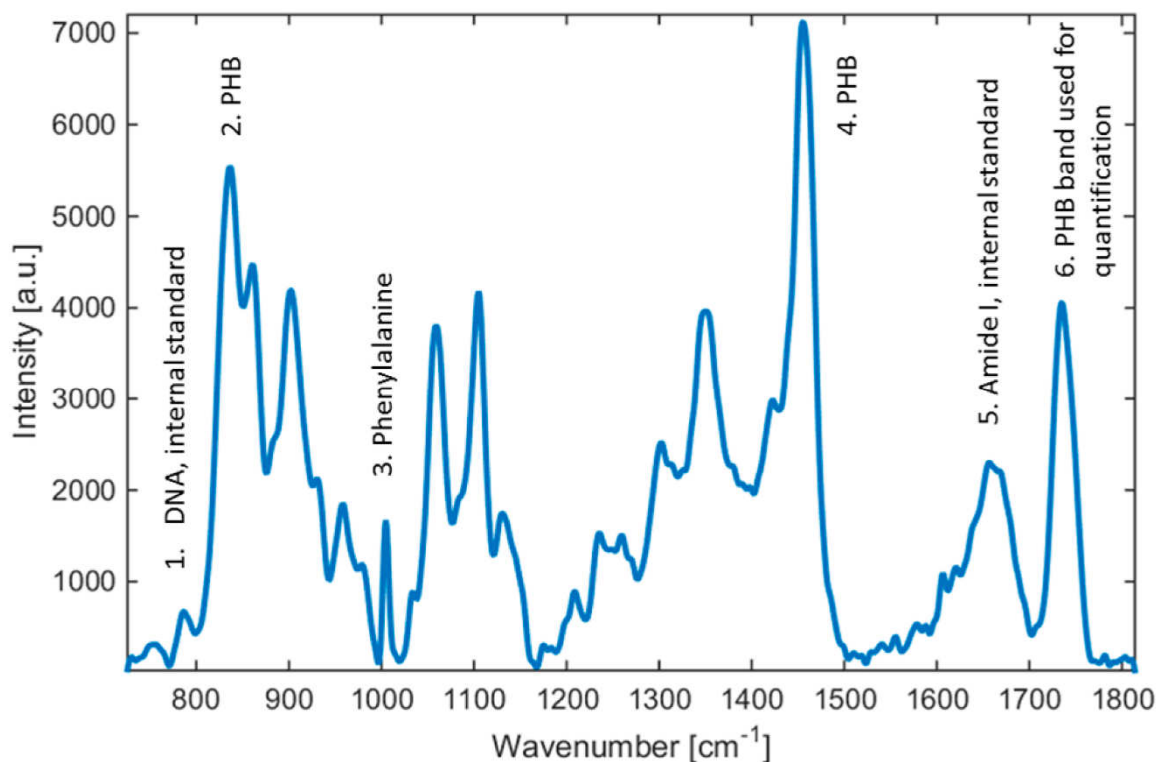
S ostatními metodami má tato metoda kromě jiného společnou především časovou náročnost. V našem případě je to přibližně asi 8 hodin od odběru vzorku po získání výsledků, což je doba, která by se dala výrazně snížit využitím spektrálních metod. Proto jsme se rozhodli ověřit možnosti kvantifikace pomocí Ramanovské spektroskopie a průtokové cytometrie. Pro experimenty byl zvolen kmen *Cupriavidus necator* H16 jakožto modelový bakteriální kmen pro produkci P3HB.

V první řadě jsme se zaměřili na využití průtokové cytometrie, přičemž jako fluorofor interagující s intracelulárními granulemi P3HB byla použita Nilská červeň. Kultura, u níž byl obsah P3HB paralelně stanoven pomocí plynové chromatografie, byla po fixaci a aplikaci nilské červěně měřena na průtokovém cytometru. Především jsme se zaměřovali na korelaci jednotlivých parametrů vůči obsahu P3HB. Nejslibnějšími parametry se zdály průměrná intenzita fluorescence, přímý rozptyl a boční rozptyl s korelačními koeficienty 0,961; 0,800 a 0,785. Tyto výsledky byly prezentovány na 4. mezinárodní chemicko technologické konferenci a plný text našeho příspěvku je v **Příloze I** (Kučera a kol., 2016). Nicméně je na místě poznamenat, že námi získané korelace nebyly nijak výrazně přesvědčivé. Tyo a kol. (2006) stanovovali P3HB v bakteriích *Escherichia coli* a *Synechocystis* sp. prakticky identickým postupem. V případě *E. coli* dosahovali koeficientu determinace 0,96 a u *Synechocystis* sp. 0,98. Získané korelace proto také mohou posloužit pouze k rychlému a orientačnímu stanovení obsahů. I Alvez a kol. (2017) postupovali velice podobně v případě stejného stanovení u bakterií *Herbaspirillum seropedicae* a *Azospirillum brasilense*. Pro práci však využili modernější vybavení v podobě průtokového cytometru BD

Accuri C5® a v práci dali větší důraz na optimalizaci permeabilizace, čas vystavení Nilské červeni a její koncentraci. U optimalizovaného postupu pak dosahovali koeficientu determinace vyššího než 0,99. Z výsledků se zdá, že optimální koncentrace NR se může mezi jednotlivými druhy lišit, a proto je nastavení koncentrace podle druhů kritickým krokem pro optimalizaci.

Protože je využití průtokové cytometrie za účelem kvantifikace PHA problematické a podle našich zkušeností je zatíženo celou řadou experimentálních artefaktů a vykazuje relativně nízkou opakovatelnost, zabývali jsme se dále využitím Ramanovské spektroskopie. Podobně jako s infračervenou spektroskopií (IČ) je tato technika založena na interakci elektromagnetických vln s fonony. Ramanova spektroskopie závisí na změně polarizovatelnosti molekuly, zatímco IČ spektroskopie závisí na změně dipólového momentu. Ramanova spektroskopie měří relativní frekvence, při kterých vzorek rozptyluje záření, na rozdíl od IČ spektroskopie, která měří absolutní frekvence, při kterých vzorek absorbuje záření. FTIR spektroskopie je citlivá na vibrace hetero-nukleárních funkčních skupin a polární vazby, zejména OH. To zásadně omezuje použití této techniky jen na vzorky, které vodu neobsahují. U Ramanovy spektroskopie toto omezení neplatí a s oblibou je v současné době používána pro analýzu biologických vzorků. V našem případě jsme s touto technikou od počátku dosahovali daleko vyšší míry korelace. Proto jsme se na tuto techniku později více zaměřili a výsledkem mohla být publikace v impaktovaném časopisu *Sensors* a je součástí této práce v **Příloze II** (Samek a kol., *SENSORS*, 2016, vol. 16, no. 11, p. 1-7.).

Na počátku bylo zapotřebí identifikovat Ramanova spektra P3HB u *Cupriavidus necator* H16. Pro získání spekter té samé bakterie, ale bez akumulovaného PHA jsme použili mutantní kmen *Cupriavidus necator* H16/PHB<sup>-4</sup>, neschopný akumulace PHA. Obrázek 8 ukazuje typické Ramanovo spektrum kmene *Cupriavidus necator* H16 kultivovaného přímo na Petriho misce. Je třeba zdůraznit, že v zájmu jednoduchosti lze vzorky analyzovat také přímo na Petriho miskách, na nichž byly bakterie pěstovány.

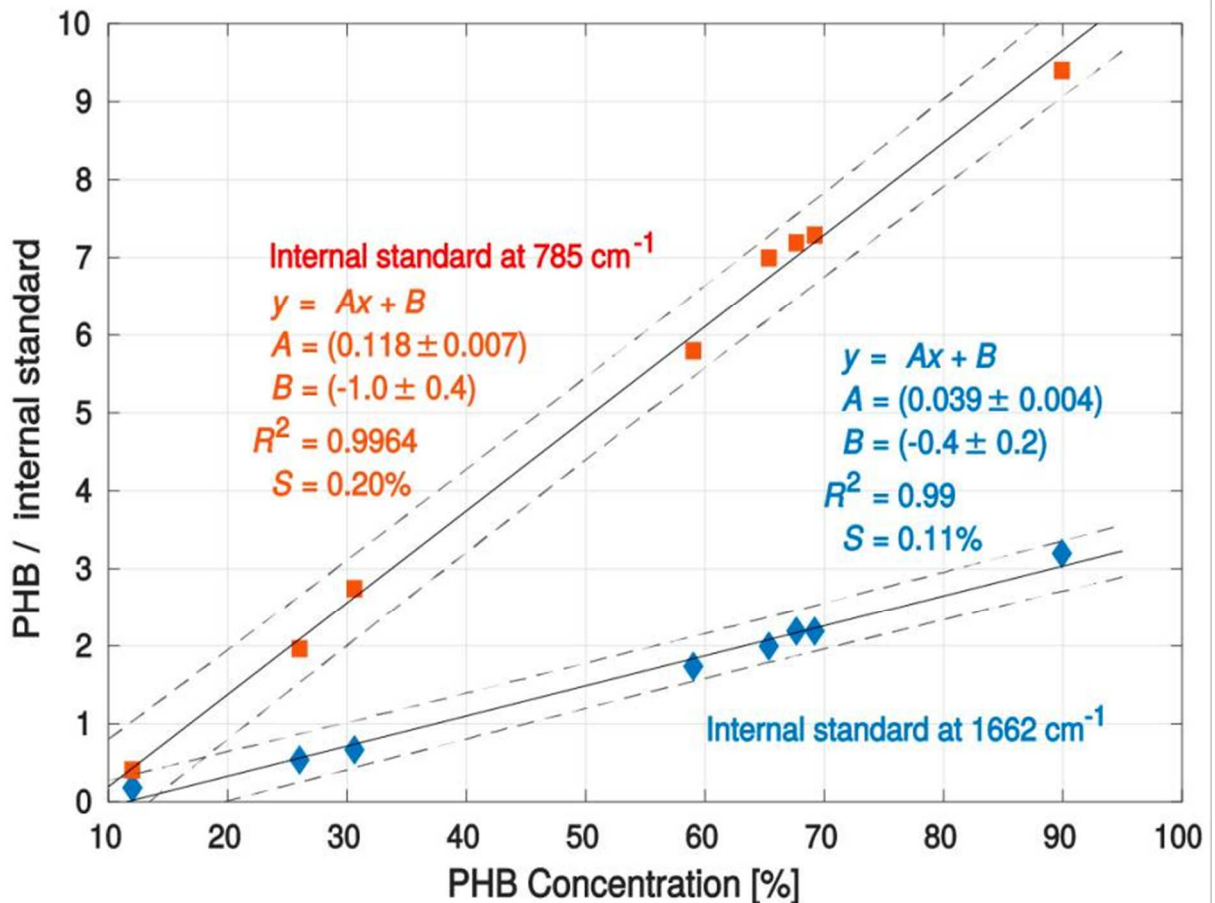


Obrázek 8 Ramanova spektra *Cupriavidus necator* H16. Vybrané emisní linie použité v naší studii jsou zvýrazněny. Píky 1, 5 a 6 byly použity pro analýzu P3HB ve vzorku bakterií (Samek a kol., 2016).

Abychom získali jednotlivé body kalibrace, bylo zapotřebí získat bakteriální buňky s různým obsahem P3HB. Toho jsme dosáhli aplikací různých kultivačních strategií využívajících předpokladu, že nejvyššího obsahu P3HB v biomase dosáhneme za podmínek vysokého poměru C/N. Pro dosažení nízkých hodnot P3HB jsme naopak použili kulturu rostoucí na komplexním mediu po dobu pouze 24 h. Přestože výše uvedené spektrum je získáno analýzou přímou z Petriho misky, jednotlivé body kalibrace byly získány kultivací v tekutých médiích, aby bylo možné získané kultury snadno analyzovat pomocí plynové chromatografie, a aby bylo možné je před Ramanovou analýzou promýt pro dosažení přesnějších hodnot. Samotná příprava vzorků na analýzu probíhala v následujících krocích. 1 ml kultury byl centrifugován (10 000 rpm, 2 min) a promyt 50% ethanolem. Přibližně 20  $\mu$ l suspenze bylo převedeno na CaF sklíčko a po usušení na vzduchu byla zaschlá suspenze analyzována Ramanovým spektrometrem.

Dalším řešným problémem byl výběr vhodného interního standardu. V prvotních experimentech, ve kterých jsme zjistili, že se spektrum  $\beta$ -karotenu nepřekrývá s píkem P3HB (pík č. 6 v Obrázku 8), jsme se rozhodli zařadit krok přidání konstantního množství  $\beta$ -karotenu k buněčné suspenzi před fixační fází při přípravě vzorku. Při analýze těchto vzorků se však ukázalo, že plocha píku  $\beta$ -karotenu, a tedy jeho koncentrace v buněčné suspenzi je více méně náhodná. Lze předpokládat, že lepších výsledků bychom dosáhli, pokud bychom před analýzou naředili kulturu tak, aby byl obsah biomasy ve všech vzorcích stejný. To by však analýzu výrazně komplikovalo a její přesnost by poklesla.

Přišli jsme však s předpokladem, že intracelulární koncentrace proteinů a nukleových kyselin je do velké míry konstantní s proměnlivou koncentrací intracelulárního P3HB. Proto byly píky odpovídající DNA ( $787\text{ cm}^{-1}$ ) a proteinům, konkrétně Amid I ( $1662\text{ cm}^{-1}$ ) navrženy jako vnitřní standardy pro kalibrační závislost. Výsledkem byly dvě kalibrační křivky znázorněné na Obrázek 9.



Obrázek 9 Kalibrační křivky pro P3HB u bakterie *Cupriavidus necator* v koncentračním rozmezí P3HB 12 % - 90 %. U horní kalibrační křivky (červené čtverečky) byla jako vnitřní standard použita emisní linie na  $787\text{ cm}^{-1}$  (DNA) a u dolní kalibrační křivky byla zkonstruována s použitím linie při  $1662\text{ cm}^{-1}$  (Amid I) jako vnitřního standardu. Čárkované křivky ukazují 95% pásmo spolehlivosti lineárního přizpůsobení. Parametry popisující kalibrační křivky jsou uvedeny na obrázku.  $R^2$  je koeficient determinace a  $S$  je střední kvadratická chyba (Samek a kol., 2016).

Využitím Ramanovy spektroskopie pro kvalitativní analýzu PHA se zabývá celá řada publikací. Ramanovo spektrum u P3HB bylo stanoveno a interpretováno De Gelderem a kol. (2008) u *C. necator* DSM 428. Intenzita reprezentativního Ramanova pásma kolem  $1734\text{ cm}^{-1}$  se ukázala být vhodná pro sledování syntézy P3HB a její spotřeby v biomase. A dále prokázali, že intenzity píky jsou lineárně úměrné koncentraci P3HB. Autoři navrhli Ramanovu spektroskopii jako rychlou neinvazivní techniku pro monitorování intracelulárního obsahu P3HB v biomase. V porovnání s naší prací však nepracovali s koncepcí využití interního standardu.

Zásadní výhodou Ramanovy spektroskopie oproti ostatním technikám, především GC, je významná uspora času. Technika má potenciální využití i pro *in-situ* real-time analýzu přímo ve fermentoru. Zároveň ji však lze uplatnit i při hledání nových potenciálních PHA producentů a v kombinaci s Ramanovskou pinzetou je možné tyto potenciální kmeny izolovat na úrovni jedné buňky. Nevýhodou této techniky při využití pro kvantitativní analýzu PHA je fakt, že je nezbytné provést kalibraci pro každý mikrobiální kmen, protože obsahy DNA a proteinů se mohou značně lišit.

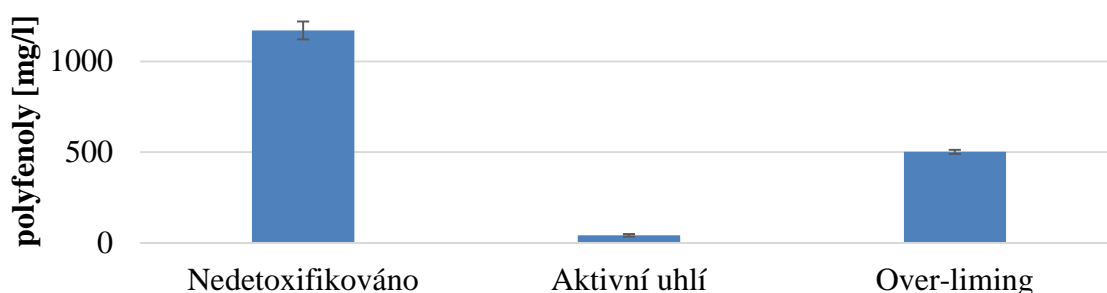
## 4.2 Využití odpadů z potravinářských výroby k produkci polyhydroxyalkanoátů

Naše další experimenty se zaměřovaly na možnosti utilizace lignocelulózových materiálů k biotechnologické produkci PHA. Celá řada odpadů z agropotravinářského komplexu má lignocelulózový základ, který může sloužit jako substrát při produkci PHA. Ostatně tímto tématem se zabývá kapitola 2.7. V našich experimentech jsme se zaměřili na zapojení gramnegativních bakterií rodu *Burkholderia*, a to především z důvodu bohatých zkušeností s utilizací lignocelulózy pomocí kmene *Burkholderia cepacia*, nabitých při vypracování diplomové práce (Kučera, 2015).

Další vydaný článek připojený jako **Příloha III** (Kučera a kol., Bioengineering, 2017, vol. 4, no. 2, p. 1-9.), se zabývá porovnáním detoxifikačních metod aplikovaných na dřevní hydrolyzáty, které byly použity pro produkci PHA. Kromě běžných metod snižujících obsah inhibičně působících látek, jako jsou overliming nebo sorpce aktivním uhlím, byla testována aplikace lignitu jakožto ekonomicky zajímavého sorbentu, který může být využit k odstranění mikrobiálních inhibitorů z hydrolyzátů lignocelulózových materiálů.

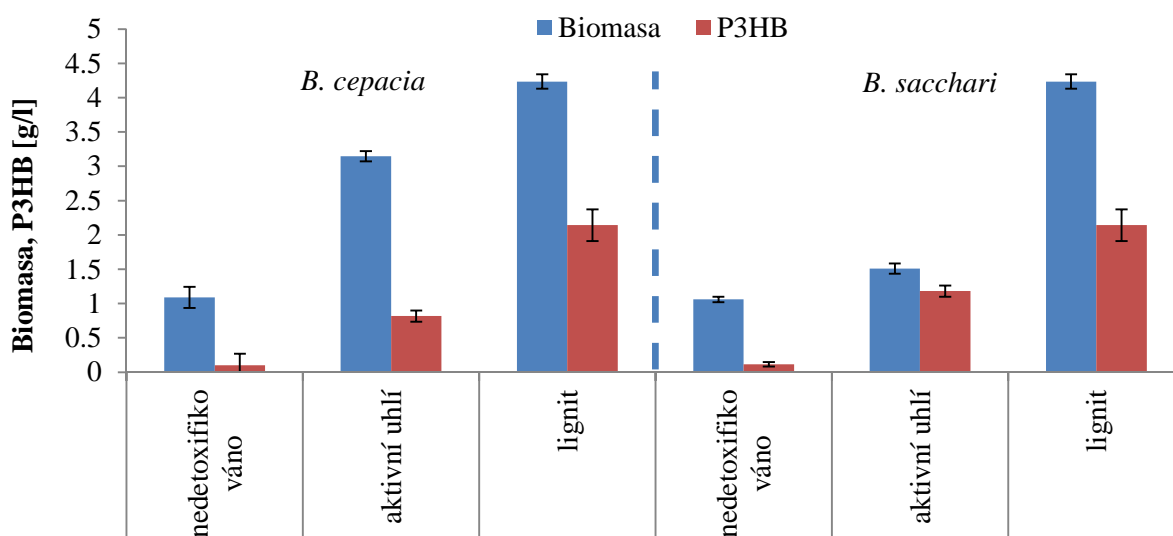
Práce poukazuje na nezbytnost detoxifikačního kroku při snaze využít hydrolyzáty získané z lignocelulózových materiálů. Při hydrolyze vznikají inhibiční látky jako kyselina octová, furfural, 5-hydroxymetylfurfural, kyselina levulová a další, jejichž vznik je popsán v kapitole 2.5. Na směs měkkého dřeva jsme aplikovali hydrolyzu zředěnou kyselinou. Četnost výskytu této metody v literatuře svědčí o tom, že je to nejobvyklejší způsob zpracování lignocelulózových materiálů za účelem jejich následné valorizace pomocí mikrobiálních biotechnologií. Inhibiční látky vzniklé při této metodě jsou vždy obdobné a bez ohledu na to, zda je použito dřevo z borovice (Silva a kol., 2014), odpad z výroby třtinového cukru (Yu a Stahl, 2008) nebo dřevěné štěpky z javoru (Pan a kol., 2012). To, čím však materiály zásadně liší množství získaného užitkového uhlíkatého zdroje. V případě borovicového dřeva obsahoval hydrolyzát celkově koncentraci cukrů 112,5 g/l (Silva a kol., 2014). Yu a Stahl použili bakteriální kmeny *Brevundimonas vesicularis* a *Sphingopyxis macrogoltabida* pro produkci terpolymeru poly(3-hydroxypropionát-co-3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) z odpadní cukrové třtiny. Jejich hydrolyzát celkově obsahoval 27,6 g/l cukrů v poměru 70 % xylózy, 6 % glukózy a 6 % arabinózy. Přehled využitelných lignocelulózových materiálů pro produkci PHA je přehledně zpracován v Tabulce Tabulka 8. Obrázek 12 pak ukazuje jednotlivé biochemické dráhy, vycházející z monosacharidů vznikajících hydrolyzou lignocelulózového materiálu, až po žádaný produkt PHA.

V našem případě byl celkový výtěžek cukrů při hydrolýze 14,9 g/l v poměru 70 % xylózy a 30 % glukózy. Při použití dřevěných pilin v koncentraci 50 g/l bylo tedy dosaženo téměř 30% konverze na fermentovatelné cukry. Pro produkci PHA byly použity kmeny *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari*, ale při přímém použití hydrolyzátů bez snahy eliminovat inhibiční látky, byl zaznamenán velmi nízký nárůst biomasy (1,0 – 1,5 g/l) a stejně tak byl nízký i výtěžek P3HB (0,1 g/l). Analýzy hydrolyzátů odhalily především značný obsah fenolických látek, jejich negativní dopad je popsán v kapitole 2.5.1. Pro eliminaci mikrobiálních inhibitorů byly zvoleny a porovnány dvě tradiční metody – overliming, adsorpce na aktivní uhlí. Obrázek 10 porovnává schopnost eliminovat přítomnost polyfenolů v médiu.



Obrázek 10 Porovnání tradičních detoxifikačních metod

V dalších experimentech byla navíc testována nová detoxifikační metoda, a to adsorpce na lignit. Lignit je nejmladší a nejméně karbonizované hnědé uhlí. Značnou výhodou oproti aktivnímu uhlí je především výrazně nižší cena. Nejvyšší efektivitu detoxifikace dosahovalo aktivní uhlí, které snížilo obsah polyfenolů o 90 % a produkci P3HB navýšilo 8 – 12krát. U lignitu i přesto, že jeho detoxifikační účinnost zdaleka nedosahovala takových hodnot, tak hydrolyzát ošetřen touto metodou, byl bakteriemi výrazně lépe využíván, což mělo za následek nejvyšší dosažený nárůst biomasy (4 g/l) a produkce P3HB (přibližně 2 g/l). Výsledky jsou shrnuty na Obrázek 11.

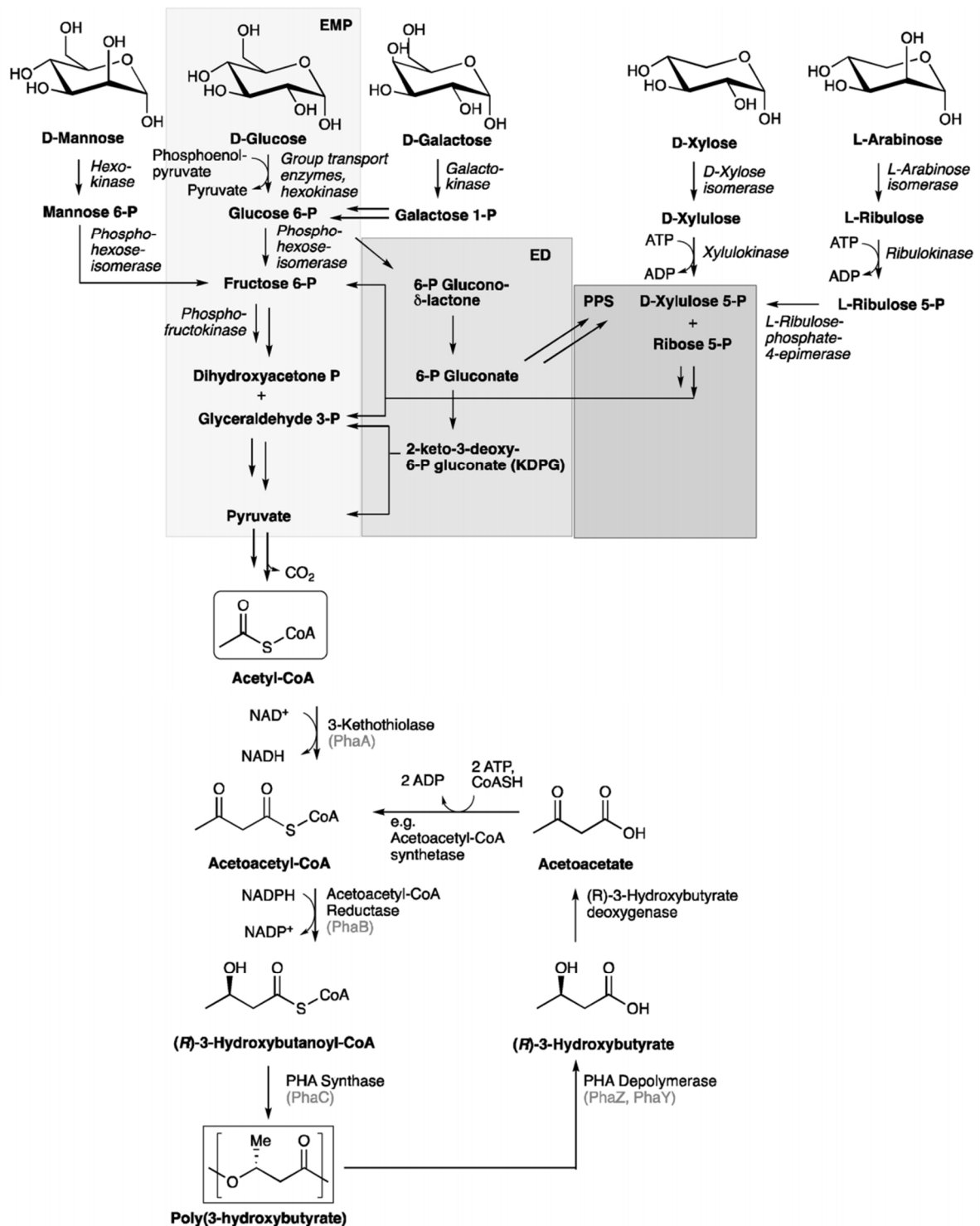


Obrázek 11 Výsledky kultivace na detoxifikovaných hydrolyzátech dřevní biomasy

Tabulka 8 Využitelné lignocelulózoové materiály k produkci PHA (převzato z Obruča a kol., 2015 a aktualizováno)

Produkční kmen	Zdroj uhlíku	typ PHA	Kultivace	Biomasa [g/l]	PHA [%]	PHA [g/l]	$Y_{PS}$	Produktivita [g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	Zdroj
<i>Burholderia cepacia</i>	xylóza	PHB	baňka, batch	2,6	60	1,6	0,11	n.a.	Ramsay a kol. (1995)
<i>Pseudomonas strains</i>	rostlinná biomasa	mcl-PHA	baňka, batch	0,9	33	0,3	n.a.	n.a.	Davis a kol. (2013)
<i>Azotobacter beijerinickii</i>	kokosové výlisky	PHB	baňka, batch	5,0	48	2,4	n.a.	n.a.	Prabu a Murugesan (2010)
<i>Burholderia sacchari</i>	hydrolyzát pšeničné slámy	PHB	fermentor, fed-batch	145,8	72	105,0	0,22	1,6	Cesario a kol. (2014)
recombinantní <i>E.coli</i>	xylan z bukového dřeva a xylóza	P(LA-co-3HB)	baňka, batch	8,9	40	3,6	n.a.	n.a.	Salamanca-Cardona a kol. (2014)
<i>Burholderia cepacia</i>	hydrolyzát dřeva	PHB	baňka, batch	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Pan a kol. (2012)
<i>Ralstonia eutropha</i>	lignocelulózoový hydrolyzát	PHB	baňka, batch	11,1	57	6,3	n.a.	n.a.	Yu a Stahl (2008)
<i>Bacillus firmus</i>	hydrolyzát rýžové slámy	PHB	baňka, batch	1,9	89	1,7	n.a.	n.a.	Sindhu a kol. (2013)
<i>Burholderia cepacia</i>	hydrolyzát dřeva	P(3HB-co-3HV)	baňka, batch	n.a.	40	2,0	n.a.	n.a.	Keenan a kol. (2006)
Recombinant <i>E.coli</i>	hydrolyzát celulózy + propionát	P(3HB-co-3HV)	baňka, batch	4,2	50	2,1	n.a.	n.a.	Nduko a kol. (2012)
<i>Bacillus megaterium</i>	odpad ze zpracování palmového oleje	PHB	baňka, batch	24,2	52	12,5	0,23	0,26	Zhang a kol. (2013)
<i>Burholderia cepacia</i>	hydrolyzát dřeva	PHB	fermentor, fed-batch	16,9	51	8,7	0,19	0,091	Pan a kol. (2012)
<i>Sacharophagus degradans</i>	lignocelulózoový odpad z Agáve	PHA	baňka, batch	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Munoz a kol. (2018)
<i>Burholderia cepacia</i>	lignocelulózoový hydrolyzát	PHB	baňka, batch	4,4	53	2,3	0,29	0,09	Silva a kol. (2004)
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	borovice montereyská piliny	P(3HP-co-3HB-co-3HV)	baňka, batch	0,25	64	0,16	n.a.	n.a.	Silva a kol. (2007)
<i>Sphingopyxis macrogoltabida</i>	borovice montereyská piliny		baňka, batch	0,32	72	0,23	n.a.	n.a.	Silva a kol. (2007)
<i>Burholderia sacchari</i>	lignocelulózoový hydrolyzát	PHB	baňka, batch	4,4	62	2,7	0,39	0,11	Silva a kol. (2004)
<i>Halomonas boliviensis</i>	pšeničné otruby	PHB	baňka, batch	8	50	4,0	0,2	n.a.	Van-Thuoc a kol. (2008)
<i>Ralstonia eutropha</i>	hydrolyzát vodního hyacintu	PHB	fermentor, batch	12	58	7,0	0,13	0,24	Radhika a Murugesan (2012)
<i>Burholderia sacchari</i>	xylóza	PHB	baňka, batch	5,5	58	3,2	0,26	0,07	Lopes a kol. (2009)
Mutant <i>Burholderia sacchari</i>	xylóza	PHB	baňka, batch	5,3	50	2,7	0,17	0,07	Lopes a kol. (2011)
<i>Ralstonia eutropha</i>	enzymaticky hydrolyzovaná buničina	PHB	baňka, batch	8,78	32	2,8	n.a.	n.a.	Zhang a kol. (2004)
<i>Sphingobium scionense</i>	enzym. hydrolyzované měkké dřevo	PHB	baňka, batch	1,23	32	0,4	0,22	n.a.	Bowers a kol. (2014)
<i>Burholderia cepacia</i>	hydrolyzovaná kávová sedlina	P(3HB-co-3HV)	baňka, batch	5,5	56	3,1	0,24	n.a.	Obruča a kol. (2014)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	lignocelulózoový hydrolyzát	PHB	baňka, batch	10,6	40	4,2	n.a.	n.a.	Gowda a Shivakumar (2014)
<i>Bacillus spp.</i>	odpad z cukrové třtiny	P(3HB-co-3HV)	baňka, batch	2,89	8	0,2	0	n.a.	Moorkoth a kol. (2016)
rekomb. <i>Bacillus subtilis</i>	pomerančové slupky	PHB	baňka, batch	3,10	40	1,2	0,02	n.a.	Sukan a kol. (2014)





Obrázek 12 Přehled hlavních katabolických drah přeměňujících lignocelulózy na P3HB. EMP: Embden-Meyerhof-Parnas, ED: Entner-Doudoroff, PPS: Pentose Phosphate Shunt (Dietrich a kol., 2019)

## 4.2.1 Využití odpadních produktů jako zdroje dusíku

Lignocelulózy může celkem snadno posloužit jako zdroj uhlíku (Obrázek 12), ovšem z hlediska obsahu dalších makrogenerických prvků, jsou produkty hydrolyzy zcela nevhodné a je třeba tyto prvky dodávat v podobě anorganických solí, případně komplexních

kultivačních komponent, která jsou ale obvykle pro produkci PHA příliš drahá. Proto jsme se v další práci zaměřili na využití hydrolyzátu z kuřecího peří, které pro naše účely sloužilo jako cenově dostupný komplexní zdroj dusíku. Celý článek je v **Příloze IV** (Benešová a kol., Letters In Applied Microbiology, 2017, roč. 65, č. 2, s. 182-188.).

Celosvětový drůbeží průmysl ročně vygeneruje přibližně  $7,7 \times 10^8$  kg peří, jehož převažující složkou (přes 90 %) jsou bílkoviny, především keratin. I přes nízké náklady a snadnou dostupnost je průmyslové použití peří omezeno a kuřecí peří je obvykle považováno za odpad (Taskin a kol., 2012). V naší práci jsme peří podrobili alkalické hydrolyze v kombinaci s mikrovlnným ohřevem. Následně byla testována možnost využít hydrolyzát z peří jako komplexní zdroj dusíku při biotechnologické produkci P3HB pomocí bakteriálního kmene *Cupriavidus necator* H16 (CCM 3726) s využitím odpadního fritovacího oleje jako jediného zdroje uhlíku. Optimalizována byla zejména koncentrace síranu amonného v minerálním médiu v kombinaci s 10 % hydrolyzátu peří a dále pak byla optimalizována koncentrace peří při přípravě hydrolyzátu. Výsledky kultivačních experimentů jsou ukázány v Tabulka 9. Obecně přítomnost hydrolyzátu peří zvýšila výtěžnost biomasy a PHA. Nejvyšších výtěžků PHA bylo dosaženo při přidavku 10 % hydrolyzátu peří, který byl připraven hydrolyzou 60 g peří na 1 l alkalického hořtoku, k minerálnímu médiu obsahujícímu 1 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . V tomto případě byly výtěžky PHA zvýšeny přibližně o 40 % ve srovnání s kontrolní kultivací. Kromě toho byly také pozorovány vysoké obsahy PHA v biomase, když byl  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  zcela nahrazen hydrolyzátem. Zejména pokud byl jako jediný zdroj dusíku použit pouze hydrolyzát z 60 g/l peří, byly výtěžky PHA o 17% vyšší než v kontrolní kultivaci.

*Tabulka 9 Výtěžky biomasy a PHA při použití různého obsahu hydrolyzátu peří v kombinaci s různým obsahem síranu amonného v minerálním médiu*

	<b>Hydrolyzát peří (g/l)</b>	<b>Biomasa (g/l)</b>	<b>PHA (%)</b>	<b>PHA (g/l)</b>
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 1 g/l	20	10,4 ± 1,0	86,2 ± 3,3	8,9 ± 0,2
	30	11,9 ± 1,3	84,4 ± 0,6	10,1 ± 0,1
	40	10,4 ± 0,9	80,1 ± 5,9	8,3 ± 0,4
	50	12,5 ± 1,5	80,3 ± 2,0	10,3 ± 0,2
	60	12,8 ± 0,9	85,1 ± 0,3	10,6 ± 0,1
	0	8,5 ± 0,9	90,7 ± 0,9	7,8 ± 0,1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0 g/l	20	5,9 ± 0,3	83,4 ± 6,2	4,9 ± 0,3
	30	6,4 ± 0,8	92,2 ± 1,5	5,9 ± 0,1
	40	8,3 ± 0,6	88,0 ± 0,3	7,3 ± 0,1
	50	7,0 ± 0,6	94,0 ± 5,4	6,6 ± 0,3
	60	9,5 ± 1,3	86,3 ± 0,9	8,2 ± 0,1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 3 g/l	0 (kontrola)	9,6 ± 0,9	71,8 ± 2,3	6,9 ± 0,2

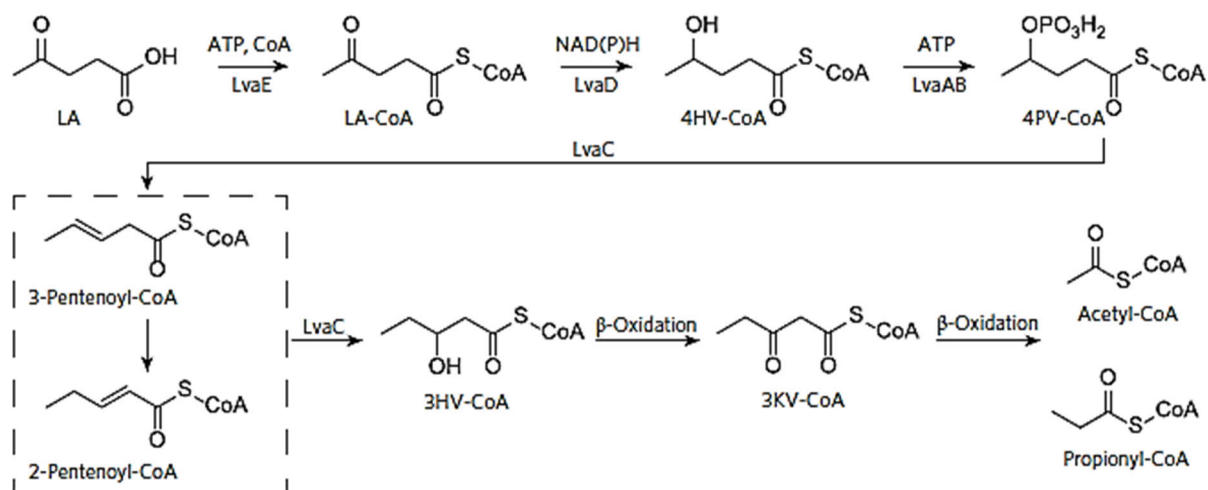
Snaha nahradit dusíkatý zdroj v produkčním médiu není nic neobvyklého a nezdědka je volen odpadní materiál bohatý na proteiny. Z tohoto hlediska se nejčastěji setkáváme se snahou o využití syrovátky, což je odpad z výroby sýrů, bohatý na laktózu a také na proteiny

(Oliveira a kol., 2018). Alternativní levné zdroje komplexního dusíku lze také hledat v zemědělství. Tým Martina Kollera (2005) přidával silážní šťávu a šťávu ze zelené trávy do kultivačního média s cílem prozkoumat její dopad na akumulaci PHA kmenem *Cupriavidus necator*. Vliv byl srovnáván s médiem suplementovaným dražšími aditivami jako jsou „corn steep liquor“ a casamino kyseliny.

Dalším potenciálním zdrojem komplexního dusíku uplatnitelného v biotechnologické výrobě může být odpad z jatek a zpracování živočišných produktů (Titz a kol., 2012). Avšak ekonomická hodnocení ukazují, že cesta využití odpadů poskytuje komplexní zdroj dusíku, který je podstatně dražší než zdroje minerálního dusíku, ale je levnější než srovnatelné jiné zdroje komplexního dusíku. Použití těchto materiálů je proto omezeno na poskytnutí nezbytných komplexních zdrojů dusíku pro fermentaci. Vzhledem k mikrobiálním požadavkům je použití anorganického dusíku stále nepostradatelné. Aplikace hydrolyzátů z odpadních zdrojů má na mikrobiální kultivaci pozitivní efekt, který se projevuje zkrácením lag fáze, ale však za výrazně vyšší náklady.

### 4.3 Aplikace evolučního inženýrství

Pro biosyntézu kopolymeru P(3HB-co-3HV) vyžaduje většina bakteriálních producentů PHA suplementaci vhodného prekursoru, který umožňuje tvorbu propionyl-CoA. Nejčastější to jsou soli kyseliny propionové, propanol nebo kyselina valerová a její soli. Nicméně vzhledem k tomu, že cena těchto prekursorů je vysoká, tak jejich aplikace snižuje ekonomickou kompetitivitu produkce PHA. Proto vznikla řada publikací zabývajících se využitím kyseliny levulové (4-oxopentanonové) jako levného alternativního prekursoru pro produkci P(3HB-co-3HV) z odpadních substrátů (Ashby, 2012; Keenan, 2004). Podle předpokládaného metabolismu (Obrázek 13) kyseliny levulové vzniká propionyl-CoA, jehož vstupem do biosyntetické dráhy PHA vzniká 3HV.



Obrázek 13 Předpokládaný metabolismus kyseliny levulové u *Pseudomonas putida* (Rand a kol., 2017)

Jak již bylo zmíněno v kapitole 4.2, tak kyselina levulová vzniká jako nežádoucí vedlejší produkt při termické hydrolýze lignocelulózy za přítomnosti silných kyselin a společně s kyselinou octovou, felnolickými sloučeninami a furfuraly je považována za mikrobiální

inhibitor přítomný v médiích získaných z lignocelulózy. Díky jejímu snadnému vzniku však může být efektivně produkována s vysokými výtežky právě dehydratací biomasy nebo sacharidů pomocí kyselin a je proto také považována za zásadně potenciální „bio-based“ chemikálii (Morone a kol., 2015).

Použití kyseliny levulové jako prekurzoru 3HV je však velmi problematické kvůli toxicitě, která významně snižuje produktivitu celého procesu. Po zohlednění všech možných vztahů jsme se rozhodli využít přístupu EI, abychom odhalili mechanismus adaptace kmene *Cupriavidus necator* H16 ke kyselině levulové. Výsledky vlivu kyseliny levulové jako stresového faktoru byly prezentovány formou posteru na konferenci European Congress on Biotechnology a abstrakt našeho příspěvku je dodán jako **Příloha V** (Kučera a kol., New Biotech. 2018. s. 93). Poznatky byly rozšiřovány o testy, zda vybrané přístupy mohou být využity k získání kmenů adaptovaných na kyselinu levulovou, což by mělo velký význam pro produkci PHA s jejím využitím jako prekurzoru nebo pro produkci PHA ze substrátů odvozených od lignocelulózy. *C. necator* byl pro tyto experimenty zvolen nejen proto, že je považován za modelový bakteriální kmen v souvislosti s metabolismem PHA, ale také s ohledem na to, že se jedná o slibného průmyslového producenta PHA. Výsledky byly publikovány v časopisu a článek je přiložen jako **Příloha VI** (Nováčková a kol., Biochemical Engineering Journal 2019).

Aplikací EI přístupů na kmen *C. necator* jsme získali celkem 8 evolvovaných kmenů označených jako ALA01 - ALA08, které byly dále testovány na své schopnosti produkovat PHA v přítomnosti 3,5 g/l levulové kyseliny ve srovnání s původním kmenem. Kmeny *C. necator* ALA01, ALA02 a ALA03 byly klasifikovány jako první generace vyvinutých kmenů, kmen *C. necator* ALA04 představuje druhou generaci vyvinutých kmenů a *C. necator* ALA06 byl získán za přispění chemického mutagenu MMS. Z 8 evolučních kmenů 3 kmeny (ALA05, ALA07 a ALA08) při submerzním kultivaci v minerálním médiu vykazovaly jen velmi slabý růst a nebyly schopné akumulace PHA. Tyto bakteriální kultury byly proto vyloučeny z dalších experimentů a metabolické charakterizace. Naopak, jak se předpokládalo, adaptace kmenů podstatně zlepšila růstové vlastnosti v přítomnosti kyseliny levulové ve většině zbývajících kultur. Zejména zejména kmeny ALA01 a ALA02 dosáhly přibližně o 25% vyšší koncentrace buněk než kontrolní kultura divokého typu.

EI je důležitým nástrojem pro biotechnologie, jeho hlavní aplikací je zlepšení tolerance organismu ke konkrétní sledované sloučenině, ale také lze použít i ke studiu dynamiky antibiotické rezistence, která je důležitá pro klinický výzkum (Jansen a kol., 2013). V EI existují dva hlavní přístupy, vsádkové a kontinuální (chemostatové). Kritická proměnná je čas trvání experimentu, který je často velmi dlouhý, v řádu týdnů nebo měsíců. Příkladem je dlouhodobý evoluční experiment (LTEE), který začal v roce 1988 a pokračuje až do současnosti a který zahrnuje více než 60 000 generací bakterií. Experiment používá minimal salt médium s 25 µg/ml glukózy a každý den se populace převedena do čerstvého média (Lenski 2016).

Toxické sloučeniny v hydrolyzátu lignocelulózy mohou být eliminovány detoxifikačními metodami, například over-limingem. Tento proces však vyžaduje velké úsilí, vytváří odpad a může snížit koncentraci cukru. Vyvinutí mikroorganismů rezistentních vůči furanu by umožnilo tento proces vynechat. Vývoj kmene tolerantního k furfuralu a 5-HMF je obtížný, pokud se používají přímé genetické inženýrské přístupy kvůli nedostatečnému pochopení

jejich toxických molekulárních mechanismů. EI tedy představuje uskutečnitelnou strategii pro generování tolerantních kmenů, protože tato metoda umožňuje výběr neintuitivních pozitivních mutací, které se mohou vyskytovat v několika různých genech (Dragosits a Mattanovich, 2013).

## 4.4 Extrémofilní bakterie produkující PHA

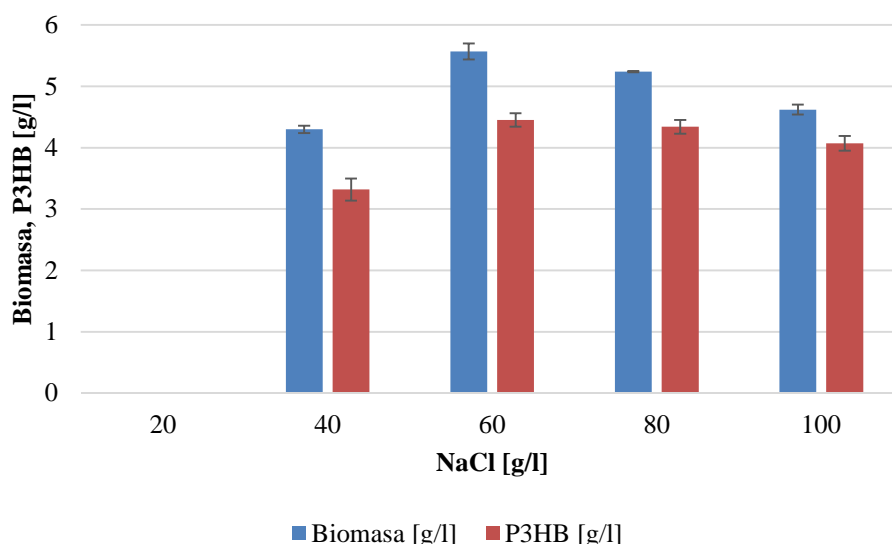
Dalším navazujícím logickým postupem bylo, zaměřit se na přirozené producenty PHA, které však dokážou snášet takové extrémní prostředí, které bývá navozeno použitím odpadních materiálů jako zdroje živin. Slibnou cestou může být implementace robustních producentů, kteří jsou buď pěstováni výhradně v ekologické nice charakterizované extrémní salinitou, teplotou, koncentrací substrátu nebo hodnotou pH prostředí nebo dokážou taková extrémní prostředí tolerovat bez vážných ztrát schopnosti růstu. Procesy založené na takových mikrobiálních producentech pak nevyžadují zásah genetického nebo evolučního inženýrství a často vykazují minimální nároky na sterilitu systému (Koller, 2015).

Vzhledem k faktu, že hydrolyzáty lignocelulózy vykazovaly, kvůli aplikaci minerální kyseliny a následné nezbytné neutralizaci vysokou iontovou sílu, tak jsme se mimo jiné zaměřili především na halofilní kmeny. Využitím PHA mikrobiálních producentů, schopných růst v prostředí s extrémním obsahem chloridu sodného, se v posledních letech začala zabývat celá řada výzkumných pracovišť po celém světě. Z tohoto hlediska bývá nejčastěji skloňována archea *Haloferax mediterranei*, která doáže růst až v koncentracích vyšších než 200 g/l NaCl. Díky schopnosti utilizace celé řady sacharidů včetně galaktózy a glukózy, nachází uplatnění při produkci PHA z hydrolyzátu syrovátky. Kromě už takto vynikajících vlastností je tato archea schopna syntetizovat kopolymer P(3HB-co-3HV) bez nutnosti přídavku prekurzorů (Pais a kol., 2016).

Po zkušenostech s tímto mikroorganismem, který jsme mimo jiné používali k i produkci extracelulárních polysacharidů (Chytilová, 2017), jsme se rozhodli vyzkoušet halofilní bakteriální kmeny, zejména jsme se zaměřili na rod *Halomonas*. Zástupci tohoto rodu jsou Gram negativní rovné nebo zakřivené tyčinkovité buňky, obvykle  $0,6\text{--}0,8 \times 1,6\text{--}1,9 \mu\text{m}$ . Jsou halotolerantní (také označované jako lehce až středně halofilní), schopné růst v koncentracích NaCl v rozmezí 0,1–32,5 % (Whitman a kol., 2015). U některých zástupců tohoto rodu byla schopnost produkce PHA již popsána a některé druhy jsou považovány za slibné producenty PHA (Martínez-Gutiérrez a kol., 2018). Otestovali jsme potenciál řady zástupců rodu *Halomonas* a například kmeny *Halomonas organivorans* CCM 7142T a *Halomonas salina* CCM 4361 se jeví být velice zajímavými producenty PHA (Vodička 2018; Kurzová 2018)

Porovnáním těchto kmenů ještě s kmenem *Halomonas halophila* vznikla publikace, jež je součástí **Přílohy VII** (Pernicova a kol., Materials Science Forum, 2019, roč. 955, s. 74-79). V této práci jsme mimo jiné využili multiplex PCR, pomocí které jsme zjistili, že všechny tři testované kmeny *Halomonas* (*Halomonas halophila*, *Halomonas organivorans* a *Halomonas salina*) obsahují gen *phaC*, zodpovědný za polymeraci (R)-3-hydroxybutyryl-CoA za vzniku P3HB. Tím jsme si u kmenů ověřili schopnost produkovat PHA. Následně jsme pak porovnávali schopnost utilizovat základní monosacharidy a zároveň akumulovat PHA. Dále jsme zkoumali vliv koncentrace NaCl v kultivačních médiích na produktivitu PHA, jakož i na molekulovou hmotnost a materiálové vlastnosti akumulovaného polymeru. Obrázek 14

shrnuje výsledky. *H. organivorans* nebyl schopen růstu a biosyntézy P3HB v médiu s nízkou osmolaritou (20 g/l NaCl), ale rostl dobře v přítomnosti 40–100 g/l NaCl. Lze konstatovat, že čím vyšší osmolarita, tím vyšší obsah PHB v biomase byl dosažen; nicméně nejvyšší výtěžky PHB byly získány v koncentraci NaCl odpovídající 60 g/l, další zvýšení osmolarity mírně inhibovalo růst bakteriální kultury.



Obrázek 14 Vliv salinity prostředí na schopnost růstu kmene *Halomonas organivorans*

Rodríguez-Contreras a kol. (2016) zveřejnila studii zabývající se vlivem salinity na produkci PHA halofilní grampozitivní bakterií *Bacillus megaterium* uyni S29. Použitím tohoto kmene byl získán nejvyšší výtěžek PHA (2,22 g/l), stejně jako procentuální obsah PHA v biomase při koncentraci NaCl 45 g/l, zatímco při nižší a vyšší koncentraci soli (5 a 100 g/l) byla produktivita PHA dramaticky nižší. Koncentrace NaCl je proto klíčovým parametrem ovlivňujícím produktivitu PHA při použití halofilních bakterií a musí být optimalizována pro každý nový produkční kmen PHA.

Z porovnání v **Příloze VII** vycházel kmen *Halomonas halophila* velmi slibně, a proto jsme se rozhodli věnovat se tomuto tématu komplexněji. Výsledky pak byly publikovány a jsou součástí **Přílohy VIII** (Kučera a kol., Bioresource Technology, 2018, roč. 256, č. 1, s. 552-556). Výhodnou vlastností *H. halophila* jako potenciálního producenta PHA je, že tato bakterie roste v levném minerálním médiu, aniž by vyžadovala nákladné, komplexní zdroje dusíku. Řada slibných halofilních producentů PHA totiž vyžaduje komplexní zdroje dusíku (Koller 2015).

*Halomonas halophila*, dříve *Deleya halophila*, je gramnegativní, striktně aerobní středně halofilní bakterie. Původně byla izolována poblíž Alicante v jihovýchodním Španělsku (Quesada a kol., 1984). Schopnost produkovat PHA byla u *H. halophila* nebyla až do naší publikace nikde publikována. Cílem této práce proto bylo prozkoumat biosyntézu PHA u této zajímavé halofilní bakterie a zhodnotit její potenciál pro biotechnologickou produkci PHA z různých levných substrátů.

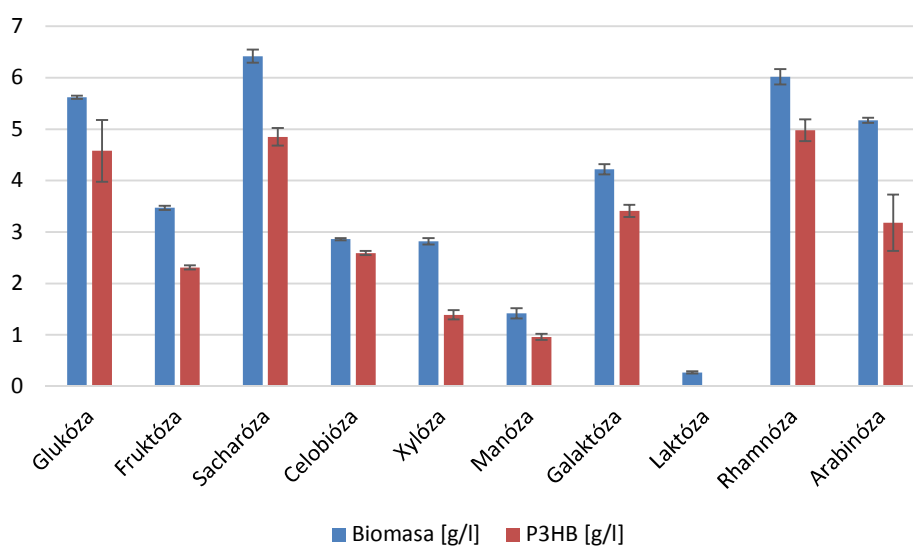
Podobně jako v předchozí publikaci, byl i u kmene *H. halophila* zkoumán vliv salinity prostředí na produkci PHA (Tabulka 10). V tomto případě jsme se však zaměřili i na

molekulovou váhu (Mw) polymeru a jeho distribuce. Při nízké koncentraci NaCl se vytvoří PHB s nižší hmotností, ale velmi úzkou distribucí Mw, se zvýšeným osmotickým tlakem v kultivačním médiu se zvyšuje také Mw, ale také PDI. Proto lze salinitu definovat jako parametr mechanické vlastnosti polymeru produkovaného kmenem *H. halophila*.

Tabulka 10 Vliv salinity prostředí na schopnost růstu kmene *Halomonas halophila*

NaCl (g/l)	biomasa (g/l)	PHB (hm.%)	PHB (g/l)	Mw (kDa)	PDI (-)
20	4,27 ± 0,01	47,57 ± 2,76	2,03 ± 0,12	473 ± 26	1,02
40	5,16 ± 0,11	51,96 ± 3,00	2,68 ± 0,17	722 ± 56	1,10
60	5,11 ± 0,11	72,01 ± 2,78	3,68 ± 0,16	793 ± 27	1,29
80	4,66 ± 0,12	58,34 ± 6,58	2,72 ± 0,31	797 ± 25	1,82
100	3,25 ± 0,36	45,43 ± 0,50	1,48 ± 0,16	810 ± 20	2,87

Kromě jiného jsme se v článku zaměřili na schopnost *H. halophila* přeměnit různé sacharidy na P3HB. S výjimkou laktózy byla bakteriální kultura schopna využít všechny testované sacharidy. Překvapivě nejvyšší výtěžky P3HB byly získány na rhamnose, následované sacharózou a glukózou, ale bakteriální kultura byla také schopna akumulovat PHA na jiných sacharidech, jako je cellobiosa, xylóza, manóza nebo galaktóza (viz Obrázek 15). Zjištění, že *H. halophila* je schopna využít široké spektrum sacharidů je důležité, protože to ukazuje, že kmen může být použit pro produkci PHA z řady levných substrátů, jako jsou lignocelulóza nebo melasa, potenciálně je schopna využít i odpadních substrátů bohatých na laktózu (např. syrovátka), nicméně laktóza musí být před samotnou kultivací enzymaticky nebo chemicky rozštěpena na galaktózu a glukózu.



Obrázek 15 Koncentrace biomasy a P3HB produkovaná *H. halophila* na různých čistých sacharidech po 72 h kultivaci v Erlenmeyerových baňkách.

S ohledem na účelné spektrum sacharidů využitelných *H. halophila*, byl kmen testován na produkci PHA na několika vybraných odpadních substrátech (Tabulka 11). Zpočátku byla kultivace prováděna na syrové syrovátce. Vzhledem k tomu, *H. halophila* nebyl schopen přímo využít laktózu, ale jen její monomery glukózu a galaktózu tak byla provedena hydrolyza pomocí HCl. Dalším testovaným zdrojem byla melasa, v tomto případě nebyla před kultivací nutná žádná hydrolyza, protože testovaný bakteriální kmen je schopný přímého využití sacharózy jako hlavní složky melasy. *H. halophila* byl také testován na hydrolyzáttech lignocelulózových materiálů, a to kávové sedliny (SCGH), pilin z měkkého dřeva (SWDH), kukuřičných stonků (CSH).

*Tabulka 11 Koncentrace biomasy a P3HB produkovaná H. halophila na různých levných odpadních substrátech po 72 h kultivaci v Erlenmeyerových baňkách.*

<b>Levné odpadní substráty</b>	<b>Biomasa [g/l]</b>	<b>P3HB [hm. %]</b>	<b>P3HB [g/l]</b>
Hydrolyzát syrovátky	8.50 ± 0.17	38.32 ± 2.21	3.26 ± 0.27
Melasa	4.05 ± 0.06	64.06 ± 1.13	2.57 ± 0.14
SCGH	3.51 ± 0.15	61.95 ± 1.34	2.17 ± 0.05
SCGH, 2x zředěno	1.80 ± 0.13	15.27 ± 0.90	0.27 ± 0.02
SWDH	2.14 ± 0.19	46.85 ± 4.29	1.00 ± 0.13
SWDH, 2x zředěno	1.35 ± 0.04	11.27 ± 0.23	0.15 ± 0.01
CSH	nedetekováno	nedetekováno	nedetekováno
CSH, 2x zředěno	2.12 ± 0.1	38.67 ± 0.65	0.82 ± 0.01

*H. halophila* se jeví jako robustní bakteriální kmen s pozitivními vyhlídkami pro potenciální průmyslovou aplikaci. Pravděpodobně v důsledku přítomnosti podstatné části pentózových cukrů, jejichž přeměna na PHA je metabolicky problematická a méně účinná ve srovnání s hexózy (Lopes a kol. 2009), jsou výtěžky PHA získané na SWDH a CSH nižší než výtěžky získané u hydrolyzátu kávové sedliny, který je bohatší na hexózy. Koncentrace sacharidů stanovené metodou HPLC u jednotlivých hydrolyzátů před (poč.) začátkem a po skončení (kon.) kultivace jsou zobrazeny v Tabulka 12.

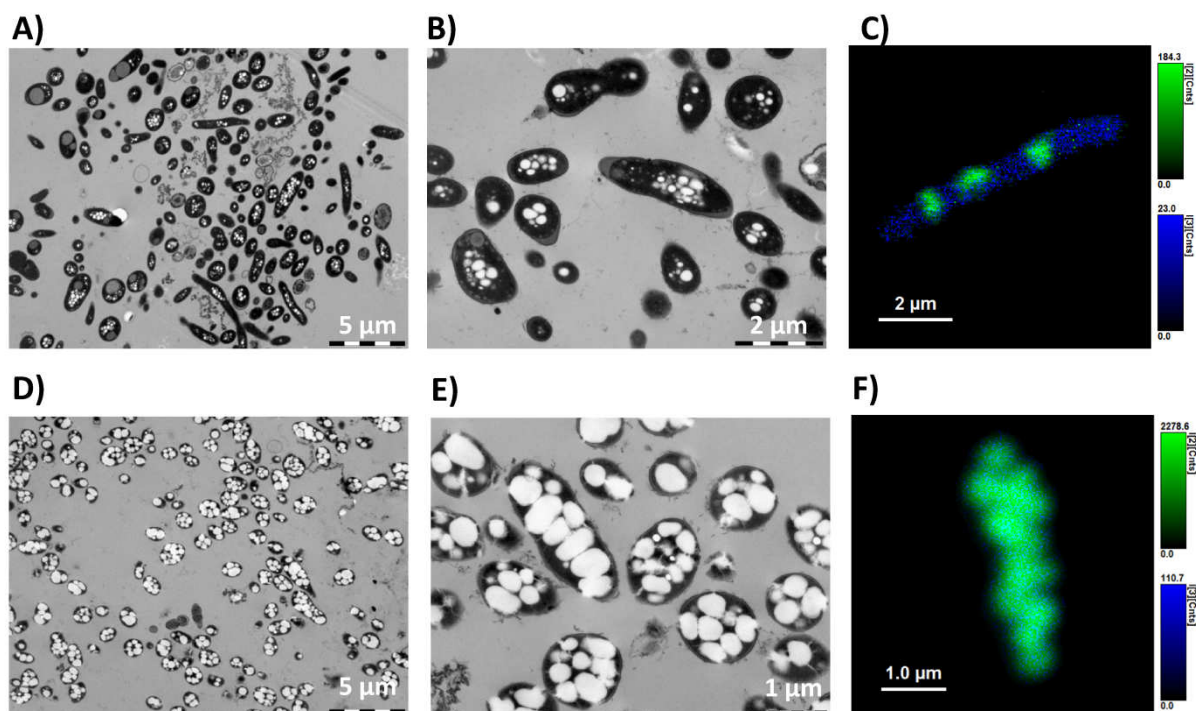
*Tabulka 12 Stanovené koncentrace sacharidů a inhibitorů u hydrolyzátů lignocelulózy.*

	<b>glukóza [g/l]</b>		<b>xylóza [g/l]</b>		<b>arabinóza [g/l]</b>		<b>galaktóza + manóza [g/l]</b>	
	<b>poč.</b>	<b>kon.</b>	<b>poč.</b>	<b>kon.</b>	<b>poč.</b>	<b>kon.</b>	<b>poč.</b>	<b>kon.</b>
<b>SCGH</b>	1,48	0,98	0	0	1,70	0,60	15,98	8,78
<b>SCGH, 2x zředěno</b>	0,74	0,69	0	0	0,85	0	7,99	2,08
<b>SWDH</b>	1,74	1,73	6,61	1,78	0,88	0	0	0
<b>SWDH, 2x zředěno</b>	0,86	0	3,30	0	0,44	0	0	0
<b>CSH, 2x zředěno</b>	3,23	0	5,22	0	0,72	0	0	0

Publikace byla také rozšířena o snímky získané pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) a fluorescence-lifetime imaging mikroskopie (FLIM) (Obrázek 16). Obě tyto techniky umožnili vizualizovat granule PHA v buňkách. Kultura kultivovaná v médiu



bohatém na dusík obsahovala značně menší granule PHA oproti kultuře pěstované v prostředí s omezeným množstvím dusíku.



Obrázek 16 Mikrofotografie *H. halophila* kultivované na komplexním nutričně bohatém médiu (A, B – TEM, C – FLIM) a minerálním médiu s limitovaným obsahem dusíku (D, E – TEM, F - FLIM). Na obrázcích FLIM odpovídá zelená barva granulím PHB obarveným BODIPY 493/503 a modrá ukazuje zelenou autofluorescenci zbytku bakteriálních buněk.

Z důvodu slibných výsledků na SCGH v předchozí publikaci, jsme náš další zájem směřovali na valorizaci kávové sedliny (SCG) a výsledkem byla další publikace, která je součástí **Přílohy IX** (Kovalčík a kol., Journal of Environmental Chemical Engineering, 2018, roč. 6, č. 2, s. 3495-3501).

V této práci byla SCG předupravena před samotnou kyselou hydrolýzou různými metodami. Cílem bylo porovnat vliv těchto metod na složení získaných hydolyzátů, na produktivitu PHA a jeho materiálové vlastnosti. Z kávové sedliny byl před aplikací hydrolýzy odstraněn tuk extrakcí podle Soxhleta za použití směsi n-hexanu a isopropyl alkoholu (50:50). Další aplikovanou metodou byla pro přípravu předupraveného SCG bylo odstranění lipidů a následně extrakce polyfenolů pomocí ethanolu v Soxhletově extraktoru. Všechny získané hydolyzáty byly podrobeny HPLC analýze a výsledky jsou znázorněny v Tabulce 13. Zároveň postup kyselé hydrolýzy se značně odlišoval od postupu v **Příloze VIII** a proto nemohou být výsledky přímo srovnávány s předchozí publikací.

Nejnižší koncentrace celkových cukrů byla stanovena v hydrolyzátu z nepředupravené kávové sedliny. Extrakce oleje z SCG zvýšila obsah celkového cukru v SCGH přibližně o 20 %. V posledním SCGH s extrahovaným olejem a fenoly byl srovnatelný s nepředupraveným. Důvodem pro snížení obsahu cukru mohlo být částečné odstranění hemicelulóz během extrakce fenolů. Fenomén existence komplexů lignin-sacharidy ve dřevěných a rostlinných tkáních byl již dříve popsán (Koshijima a Watanabe, 2013).

*Tabulka 13 Základní složení získaných hydrolyzáatů. SCGH#1 je nepředupravené, SCGH#2 je z odtučněného SCG a SCGH#3 je z odtučněného SCG po extrakci fenolů*

	<b>SCGH#1</b>	<b>SCGH#2</b>	<b>SCGH#3</b>
Celkové cukry [g/l]	64.4 ± 1.5	77.8 ± 1.1	65.8 ± 1.2
Kyselina octová [g/l]	0.42 ± 0.03	0.50 ± 0.03	0.32 ± 0.02
5-Hydroxymethyl furfural [g/l]	0.13 ± 0.003	0.17 ± 0.002	0.12 ± 0.002
Furfural [g/l]	0.02 ± 0.001	0.05 ± 0.001	0.06 ± 0.001
Celkové fenolické látky [g/l]	2.20 ± 0.13	2.89 ± 0.2	1.30 ± 0.04

Koncentrace inhibičních látek vzniklých degradací sacharidů (kyselina octová, 5-hydroxymethyl furfural a furfural) jsou uvedeny v Tabulka 13. Stanovené hodnoty se liší podle použité metodiky produkce SCGH a korelují s nárůstem obsahu celkových cukrů. Nízké stanovené koncentrace furfuralu a 5-hydroxymethylfurfuralu ukazují, že podmínky hydrolýzy byly nastaveny správně, což zabránilo nežádoucí ztrátě cukrů a tvorbě těchto toxických sloučenin.

Za účelem produkovat PHA kmenem *H. halophila*, byly všechny hydrolyzáty zředěny na koncentraci 20 g/l celkových cukrů. Nicméně, SCG hydrolyzáty byly příliš toxické a zcela inhibovaly růst *H. halophila*. Proto byly všechny SCG hydrolyzáty detoxikovány adsorcí na nepolárních pryskyřicích na bázi styren-divinylbenzenu (Amberlite XAD4). Výtěžky P3HB jsou v Tabulce 14. Nejvyšší produkce biomasy a P3HB byla získána použitím SCGH#2. Z hlediska koncepce biorafinérie však metoda získání SCGH#2 i SCGH#3 zajímavá pro dosažení ekonomické efektivnosti a udržitelného využívání kávové sedliny. Olej získaný z SCG před hydrolýzou lze použít v mnoha aplikacích s vysokou přidanou hodnotou. Například lze použít jako zdroj pro výrobu bionafty (Yordanov a kol. 2013), substrátu pro biotechnologickou výrobu PHA (Obruca a kol., 2014), nebo může být použit v kosmetice jako účinná látka v nové kosmetické formulaci se zlepšeným kožním mazem a hydratační vlastnosti (Ribeiro a kol., 2013).

*Tabulka 14 Produkce P3HB a molekulová hmotnost produkováného P3HB*

	<b>Biomasa [g/l]</b>	<b>P3HB [hm. %]</b>	<b>P3HB [g/l]</b>	<b>Mw (kDa)</b>	<b>PDI (-)</b>
SCGH #1	2.14 ± 0.1	13.3 ± 0.5	0.28 ± 0.08	825 ± 8	1.26 ± 0.12
SCGH #2	3.52 ± 0.3	27.0 ± 1.2	0.95 ± 0.09	815 ± 12	1.09 ± 0.02
SCGH #3	2.18 ± 0.1	15.9 ± 0.5	0.35 ± 0.07	440 ± 2	1.44 ± 0.03

## 4.5 Biotechnologická produkce terpolymeru poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát)

Dále jsme upřeli pozornost na možnost ovlivnit složení výsledného polymeru, tak aby se svými materiálovými vlastnostmi lišil od P3HB, které má vysokou krystalinitu a nízké délkové prodloužení při protažení, což limituje jeho aplikační potenciál. Dalším nepříznivým parametrem je pak vysoká teplota tání, což komplikuje následné zpracování polymeru. Změna monomerního složení v PHA, například inkorporací 3HV nebo 4HB, má na tyto parametry zásadní vliv. Proto jsme se rozhodli, že zkusíme biotechnologicky produkovat terpolymer poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) (P(3HB-co-4HB-co-3HV)). Z bakteriálních kmenů, které jsou schopny akumulovat PHA s obsahem 4HB monomerů a které jsou dostupné ve sbírkách mikroorganismů, byl vybrán *Cupriavidus malaysiensis* DSMZ 19379, který je v literatuře často zmiňován (Ramachandran a kol, 2011). Výsledky této práce jsou obsaženy v manuskriptu, který je součástí této práce jako **Příloha X** (Kučera a kol., Bioengineering, 2019, roč. 6, s. 74).

*Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379 při růstu v přítomnosti gama-butyrolaktonu (GBL),  $\epsilon$ -kapolaktonu, 1,4-butandiolu a 1,6-hexandiolu dokázal syntetizovat polymer sestávajícího z monomerů 3HB a 4HB. Pro začlenění 3HV podjednotky do struktury polymeru byly použity jednostupňové a dvoustupňové strategie výroby terpolymeru. V jednostupňovém kultivačním režimu sloužil GBL nebo 1,4-butandiol jako primární substrát a zároveň prekurzor 4HB a kyselina propionová a valerová jako prekurzor 3HV.

Pro zvýšení produktivity PHA jsme provedli další experiment, ve kterém byla kultivace provedena ve dvou krocích. V prvním kroku jsme se zaměřili na kultivaci s maximálním výtěžkem biomasy za použití glycerolu (20 g/l) jako levného zdroje uhlíku. Podle našich výsledků glycerol stimuluje růst bakterie, ale nepřevádí se na P(3HB), což by se dalo považovat za výhodu, protože produkce terpolymeru s nízkou frakcí 3HB by mohla být dosažena ve druhém kroku. Kromě toho byl glycerol (12 g/l) také smíchán s 1,4-butandiolem (8 g/l) v paralelní sérii kultivací. Druhá fáze byla prováděna v kultivačním médiu s 1,4-butandiolem, kyselinou valerovou a limitovaným obsahem dusíku. 1,4-butandiol a kyselina valerová byly použity jako prekurzory 4HB a 3HV. Kyselina valerová byla vybrána jako prekurzor 3HV, protože byla identifikována jako nejlepší prekurzor 3HV pro zkoumanou kulturu. Všechny výsledky jsou uvedeny v Tabulce Tabulka 15.

Z níže uvedených výsledků tohoto experimentu je patrné, že bakteriální kmen rostl nejlépe, když byl v prvním kroku použit glycerol v kombinaci s 1,4-butandiolem a ve druhém 1,4-butandiol s valerovou kyselinou. Zisk biomasy byl 5,94 g/l. Naopak nejmenší růst byl dosažen kultivací za použití glycerolu a následně 1,4-butandiolu, kde bylo získáno pouze 1,60 g/l biomasy.

Tabulka 15 Dvoustupňová produkce terpolymeru - 48 hodin v glycerolu nebo glycerolu a 1,4 butandiolu, poté převedena na médium s limitovaným obsahem dusíku s prekurzorem 3HV.

Primární substrát	Sekundární prekurzor	Biomasa (g/l)	PHA (g/l)	PHA (hm%)	3HB (mol%)	4HB (mol%)	3HV (mol%)
Glycerol	1,4-BD	1.60 ± 0.03	0.84 ± 0.02	52.3 ± 0.1	80.9 ± 0.7	18.1 ± 0.3	1.1 ± 0.4
	1,4-BD + k. valerová	2.73 ± 0.58	1.42 ± 0.25	52.1 ± 1.8	53.78 ± 0.6	16.8 ± 0.9	29.5 ± 0.3
Glycerol + 1,4-BD	1,4-BD	3.26 ± 0.11	2.09 ± 0.01	64.1 ± 2.4	77.9 ± 0.5	21.6 ± 0.5	0.5 ± 0.1
	1,4-BD + k. valerová	5.94 ± 0.14	4.14 ± 0.05	69.6 ± 0.7	65.7 ± 1.0	16.5 ± 1.3	17.9 ± 0.3

Z výsledků vyplývá, že *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379 může účinně syntetizovat požadovaný terpolymer P(3HB-co-3HV-co-4HB). Při využití dvoustupňové kultivační strategie byl obsah PHA v bakteriálních buňkách podstatně vyšší. Nejvyšší hmotnostní frakce, 69,64 hm%, jakož i nejvyššího zisku PHA 4,14 g/l, bylo dosaženo, při použití glycerolu společně s 1,4-butandiolem v prvním kroku a 1,4-butandiol s kyselinou valerovou ve druhém. Pokud jde o složení polymeru, dobrých výsledků bylo dosaženo, když byl 1,4-butandiol použit v kombinaci s kyselinou valerovou ve druhém kroku. Když byl v prvním kroku použit pouze glycerol, získali jsme terpolymer složený z 53,78 mol% 3HB, 16,76 mol% 4HB a 29,46 mol% 3HV. Za použití glycerolu společně s 1,4-butandiolem v prvním kroku byl následně získán terpolymer složený z 3HB 65,68 mol%, 4HB 16,46 mol%, 3HV 17,86 mol%. Zdá se, že kombinace glycerolu a 1,4-butandiolu v prvním kroku kultivace a 1,4-butandiolu a kyseliny valerové ve druhém stupni kultivace je velmi slibná strategie, která vede k vysokému obsahu PHA v buňkách a také k vysokým podílům 4HB a 3HV v terpolymerní struktuře.

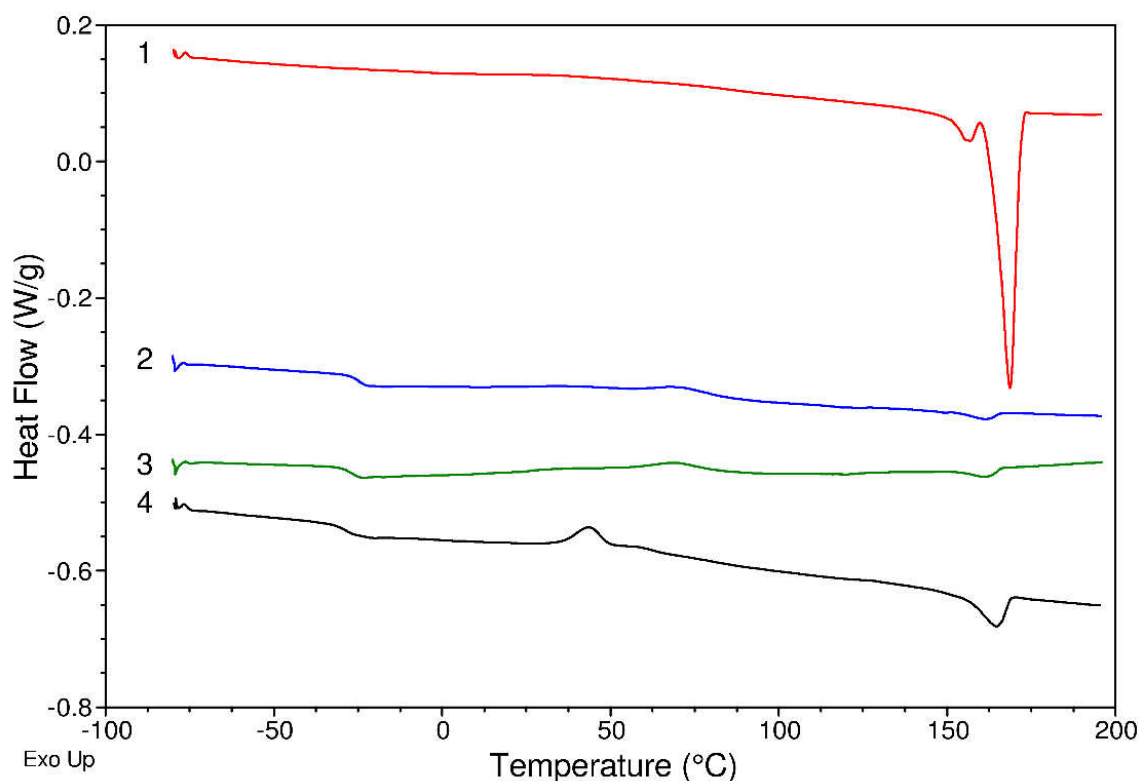
Vybrané získané polymery byly izolovány a charakterizovány z hlediska materiálových vlastností. Ke studiu tepelných vlastností polymerů byly vybrány techniky diferenciální skenovací kalorimetrie a termogravimetrie; K určení molekulové hmotnosti a indexu polydispersity polymerů pak byla použita vylučovací chromatografie. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce Tabulka 16. Vzorek č. 1 je kontrolní polymer obsahující téměř výhradně monomerní jednotky 3HB. Vzorek č. 2 byl odebrán kultivací za použití kombinace 1,4-butandiolu a kyseliny valerové, přičemž podíl 3-hydroxyvalerátu v tomto vzorku byl 14,7 mol%. Vzorek č. 3 byl získán kultivací za použití 1,4-butandiolu a propionátu sodného a koncentrace 3HV byla 8,3 mol%. Poslední vzorek byl izolován z buněčné suspenze kultivované za účelem produkce terpolymeru, za použití glycerolu a následně 1,4-butandiolu společně s kyselinou valerovou. V tomto vzorku byl molární poměr 3HV vůbec nejvyšší, konkrétně 29,4 mol%. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.

Z termogramů zaznamenaných diferenční skenovací kalorimetrií jsme stanovili teplotu skelného přechodu ( $T_g$ ) a teplotu tání ( $T_m$ ). Celkové teplo fúze  $\Delta H$  bylo také stanoveno integrací endotermy tání. Pomocí termogravimetrie byla stanovena teplota počátku degradace ( $T_{d_{onset}}$ ) a teplota, která odpovídá maximální rychlosti rozkladu vzorku ( $T_{d_{max}}$ ).

Tabulka 16 Vlastnosti vybraných polymerů

Vzorek	3HB (mol%)	4HB (mol%)	3HV (mol%)	Mw (kDa)	PDI (-)	Tg (°C)	Tm (°C)	ΔH (J/g)	Td <sub>onset</sub> (°C)	Td <sub>max</sub> (°C)
1	99,3	0,7	0	156,0	1,04	-	155,8 168,7	4,7 64,9	271,9	287,9
2	60,6	24,7	14,7	258,7	1,02	24,8	161,3	2,8	271,5	293,5
3	63,8	27,9	8,3	314,6	1,01	26,2	161,7	3,0	275,2	300,8
4	53,8	16,8	29,4	137,9	1,17	29,0	164,6	12,7	271,4	295,5

Porovnání termogramů DSC čtyř izolovaných polymerů je znázorněno na Obrázek 17. Ve vzorku č. 1 je endoterma s ostrou teplotou tání, která se objevuje při asi 170 °C, což je typické pro P3HB. Plocha píku odpovídá teplu uvolněnému v tomto procesu. Velká oblast endotermy tání naznačuje, že jde o polymer s vysokým stupněm krystalinity. Vzorek je dále charakterizován dvojitým vrcholem v bodu tání, což ukazuje, že polymerní krystaly jsou přítomny ve dvou formách se zřetelnou tepelnou stabilitou. Na druhou stranu u všech vzorků terpolymeru (vzorky 2–4) je na první pohled vidět, že na křivkách je vidět mnohem méně intenzivní pík tání. Zdánlivý skelný přechod a studená krystalizace polymerních řetězců dohromady značně naznačují významně sníženou tendenci ke spontánní krystalizaci. Jinými slovy, zapojení dalšího monomeru do kopolymerní struktury vedlo k amorfní struktuře. Začlenění 3HV do polymerní struktury také způsobilo snížení teploty tání na přibližně 161 °C.



Obrázek 17 Výsledky DSC analýzy izolovaných polymerů jejichž materiálové vlastnosti jsou zobrazeny v Tabulce 16. Vzorek č. 1 je kontrolní polymer obsahující téměř výhradně monomerní jednotky 3HB. Vzorky 2-4 jsou terpolymery s různými pomery monomerů (Kučera a kol., 2019).

## 5 ZÁVĚR

Předložená dizertační práce se zabývá především využitím lignocelulózových materiálů k produkci polyhydroxyalkanoátů, ale záběr práce má daleko širší rozsah. Kromě možností kvantifikace PHA se práce zabývá i studiem aplikace evolučního inženýrství za účelem získat nové kmeny se schopností lépe odolávat nepříznivým vlivům vzniklých při hydrolýze lignocelulózy. Další část práce pak byla věnována přirozeným kmenům, které jsou schopny růstu pouze v extrémním prostředí a zároveň jsou schopny produkce PHA. Výsledky jsou prezentovány formou diskuze 10 publikovaných prací, které jsou v příloze (Kapitola 9).

- Průtokovou cytometrii lze využít nejenom k určení přítomnosti PHA ve struktuře bakteriálních buněk, ale také pro kvantifikaci. Metoda spočívající ve fixaci buněk a následném obarvení niiskou červení však nedosahovala vysoké korelace a je vhodnější pro orientační posouzení obsahu PHA. V porovnání s Ramanovskou spektroskopií však tato metoda umožňuje analýzu buněk na úrovni jedné buňky, což umožňuje studovat distribuci PHA v jednotlivých populacích.
- Ramanova spektroskopie se ukázala jako snadno aplikovatelná technika umožňující kvalitativní a kvantitativní analýzu PHA. Metoda využívající pík DNA ( $787\text{ cm}^{-1}$ ) nebo pík Amid I ( $1662\text{ cm}^{-1}$ ) jako vnitřní standard dosahovala u bakteriálního kmene *Cupriavidus necator* H16 vysoké korelace. Tato technika je aplikovatelná pro *in-situ* monitoring P3HB produkce v reálném čase. Ramanova spektroskopie představuje řadu benefitů oproti současně využívaným metodám kvantifikace, jako je plynová chromatografie, především díky rychlosti a neinvazivitě.
- Hydrolyzát směsi měkkého dřeva získaný kyselou hydrolýzou není možno využít pro produkci PHA bez předcházející aplikace detoxifikační metody, protože při hydrolýze vzniká značné množství inhibičních látek jako jsou kyselina octová, HMF, furfural nebo polyfenoly.
- Detoxifikace hydrolyzátu dřeva aktivním uhlím a metodou „overliming“ vedla k odstranění značné části polyfenolických látek. Výrazně lepších výsledků dosahovala metoda využívající aktivní uhlí, která eliminovala více než 90 % polyfenolů. Detoxifikované hydrolyzáty byly použity pro produkci P3HB s využitím bakteriálních kmenů *Burkholderia cepacia* a *B. sacchari* a i z tohoto hlediska hydrolyzát po aplikaci aktivního uhlí dosahoval nejvyšší výsledky. Proto jeho účinnost byla porovnána s lignitem.
- Lignit lze použít jako sorbent k detoxifikaci hydrolyzátu dřeva a jeho účinnost je srovnatelná s běžně používaným aktivním uhlím. Tato detoxifikační metoda byla hodnocena přímo při použití hydrolyzátů dřeva pro produkci PHA pomocí bakteriálních kmenů *Burkholderia cepacia* a *B. sacchari*. Výsledky ukázaly, že použití hnědého uhlí výrazně zlepšilo fermentovatelnost hydrolyzátů dřeva a zvýšilo výtěžky PHA.

- Alkalicky hydrolyzované kuřecí peří bylo testováno pro produkci PHA pomocí kmene *C. necator* jako komplexní zdroj dusíku. Jako substrát byl použit odpadní fritovací olej. Kombinací 1 g/l síranu amonného s přídatkem 10 obj. % hydrolyzátu peří došlo k nejvyššímu výtěžku biomasy a PHA. Dále byl zkoumán vliv peří na inkorporaci monomeru 3HV do PHA. Jako prekurzor 3HV byla použita kyselina valerová, propanol a propionát sodný. Vliv hydrolyzátu byl pozitivní, a to především v případě propionátu.
- Metodou evolučního inženýrství bylo z původního divokého kmene *C. necator* H16 získáno pět kmenů adaptovaných na kyselinu levulovou. Všechny získané kmeny vykazovaly lepší růst v přítomnosti inhibitoru LA, než bylo pozorováno u původního kmene, což byl jeden z hlavních parametrů potvrzujících úspěšný adaptační proces. Analýza PHA v biomase navíc ukázala vyšší obsah PHA v biomase a pro některé kmeny také vyšší obsah 3HV v kopolymeru P(3HB-co-3HV). Kmen *C. necator* ALA04 opakovaně uváděl nejvyšší hodnotu PHA a také obsah 3HV s více než 20 mol. %.
- U všech tří testovaných halofilních kmenů, konkrétně *Halomonas halophila*, *Halomonas organivorans* a *Halomonas salina*, bylo pomocí multiplex PCR zjištěno, že obsahují gen *phaC*, zodpovědný za polymeraci (R)-3-hydroxybutyryl-CoA za vzniku P3HB.
- *Halomonas halophila* dokáže využít širokou paletu sacharidů, což dává kmeni vysoký potenciál v utilizaci odpadních agro-industriálních substrátů. To také bylo testováno na hydrolyzované syrovátce, melase a hydrolyzátech vybraných lignocelulózových odpadů – kávová sedlina, dřevěné piliny, kukuřičná sláma. Kmen nedokázal z jednoduchých sacharidů využít laktózu, ale i přesto bylo možné produkovat PHA ze syrovátky, tím že jsme přiřadili krok kyselé hydrolyzy. Poté syrovátka vycházela ze všech testovaných odpadů nejlépe, zatímco s hydrolyzáty lignocelulózy měl kmen problémy. K nejlepší utilizaci docházelo v případě kávové sedliny.
- *H. halophila* v závislosti na salinitě prostředí vykazovala značně rozdílnou produktivitu PHA a také mechanické a termální vlastnosti produkovaného PHA se lišily. Produktivita PHA dosahovala maximálních hodnot v prostředí o koncentraci 60 g/l NaCl, při které byl i nejvyšší procentuální obsah PHA v biomase. Molekulová hmotnost získaného polymeru rostla i s narůstající salinitou prostředí až do koncentrace 60 g/l, přičemž při hodnotách 80 a 100 g/l se zásadně nelišila, ale došlo k nárůstu polydisperzity. Nejvyšší termální stabilita byla zaznamenána u PHA produkovaného ve 20 g/l NaCl. Teplota tání polymeru byla u všech koncentrací stanovena okolo 180 °C.
- Dále byl testován vliv předúpravy kávové sedliny na produkci PHA kmenem *H. halophila*. Kávová sedlina po vyextrahování olejů byla po hydrolyze lépe užitelná a bylo dosaženo nejvyšších výtěžků biomasy a PHA. Zařazení další předúpravy v podobě extrakce polyfenolů ethanolem mělo pouze nepatrný pozitivní vliv, avšak z pohledu biorafinérie může mít tento krok pozitivní ekonomický vliv.

- Vyvinuli jsme dvoustupňovou kultivační strategii, která je založena na aplikaci glycerolu a 1,4-butandiolu jako uhlíkových substrátů v první fázi kultivace, a poté se buňky přenesou do kultivačního média s limitovaným obsahem dusíku a 1,4-butandiol s kyselinou valerovou slouží jako substrát. Tato kultivační strategie poskytuje vysoký výtěžek PHA a obsah PHA v bakteriálních buňkách, což je velmi pozitivní. Kromě toho se získá terpolymer P(3HB-*co*-3HV-*co*-4HB) s nízkou frakcí 3HB a vysokým obsahem 3HV a 4HB s velmi zajímavými materiálovými vlastnostmi.



## 6 BUDOUCÍ PERSPEKTIVA

Výsledky a zkušenosti, které jsme získali v experimentech prezentovaných v této práci, přinesly nové otázky a cíle, které bychom v budoucnu rádi vysvětlili a kterých bychom chtěli v budoucnu dosáhnout.

Zde je jejich krátký výčet:

- Vyvinout postupy využívající Ramanovu spektroskopii k selekci potenciálních producentů PHA.
- Vyvinout setrnější postupy hydrolýzy lignocelulózy.
- Aplikovat evoluční inženýrství na další mikroorganismy schopné produkce PHA a otestovat, zda naše postupy vedou k jednoznačnému vzniku evolvovaných kmenů přizpůsobených konkrétním stresovým faktorům.
- Využít technik genového inženýrství k získání kmenů, které budou odolnější vůči inhibitorům vznikající při zpracování lignocelulózy.
- Lépe porozumět procesům a biochemickým drahám u extrémofilních bakterií a využít tyto znalosti pro zvýšení produktivity PHA
- Otestovat další substráty pro *Cupriavidus malaysiensis*, které mají potenciál být inkorporovány do struktury PHA za vzniku terpolymeru.
- Převést tento proces do laboratorních bioreaktorů, aby se vyhodnotila jeho vhodnost pro průmyslovou výrobu PHA.

## 7 LITERATURA

- Almario, M.P., Reyes, L.H., Kao, K.C., 2013. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced tolerance to hydrolysates of lignocellulosic biomass. *Biotechnology and Bioengineering* 110, 2616-2623. doi:10.1002/bit.24938
- Alriksson, B., Horváth, I.S., Sjöde, A., Nilvebrant, N.-O., Jönsson, L.J., 2005. Ammonium Hydroxide Detoxification of Spruce Acid Hydrolysates. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 124, 0911-0922. doi:10.1385/ABAB:124:1-3:0911
- Alves, L.P.S., Almeida, A.T., Cruz, L.M., Pedrosa, F.O., de Souza, E.M., Chubatsu, L.S., Müller-Santos, M., Valdameri, G., 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. doi:10.1590/1414-431x20165492
- Ando, S., Arai, I., Kiyoto, K., Hanai, S., 1986. Identification of aromatic monomers in steam-exploded poplar and their influences on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation Technology* 64, 567-570. doi:10.1016/0385-6380(86)90084-1
- Aneja, P., Zachertowska, A., Charles, T.C., 2005. Comparison of the symbiotic and competition phenotypes of *Sinorhizobium meliloti* PHB synthesis and degradation pathway mutants. *Canadian Journal of Microbiology* 51, 599-604. doi:10.1139/w05-042
- Arora, P.K., Srivastava, A., Singh, V.P., 2014. Bacterial degradation of nitrophenols and their derivatives. *J. Hazard. Mater.* 266, 42-59.
- Ashby, R.D., Solaiman, D.K.Y., Strahan, G.D., Zhu, C., Tappel, R.C., Nomura, C.T., 2012. Glycerine and levulinic acid: Renewable co-substrates for the fermentative synthesis of short-chain poly(hydroxyalkanoate) biopolymers. *Bioresource Technology* 118, 272-280. doi:10.1016/j.biortech.2012.05.092
- Ask, M., Bettiga, M., Mapelli, V., Olsson, L., 2013. The influence of HMF and furfural on redox-balance and energy-state of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels* 6, 22-. doi:10.1186/1754-6834-6-22
- Banerjee, S., Mudliar, S., Sen, R., Giri, B., Satpute, D., Chakrabarti, T., Pandey, R.A., 2010. Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 4, 77-93. doi:10.1002/bbb.188
- Berezina, N., Yada, B., Lefebvre, R., 2015. From organic pollutants to bioplastics: insights into the bioremediation of aromatic compounds by *Cupriavidus necator*. *New Biotechnol.* 32, 47-53.
- Bisht, S., Pandey, P., Bhargava, B., Sharma, S., Kumar, V., Sharma, K.D., 2015. Bioremediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) using rhizosphere technology. *Braz. J. Microbiol.* 46, 7-21.

- Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M., 2003. Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* 54, 519-546. doi:10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938
- Bowers, T., Vaidya, A., Smith, D.A., Lloyd-Jones, G., 2014. Softwood hydrolysate as a carbon source for polyhydroxyalkanoate production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 89, 1030-1037. doi:10.1002/jctb.4196
- Braunegg, G., Sonnleitner, B., Lafferty, R.M., 1978. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 6, 29-37. doi:10.1007/BF00500854
- Brandl, H., Knee, E.J., Fuller, R.C., Gross, R.A., Lenz, R.W., 1989. Ability of the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum* to produce various poly ( $\beta$ -hydroxyalkanoates): Potential sources for biodegradable polyesters. *International Journal of Biological Macromolecules* 11, 49-55. doi:10.1016/0141-8130(89)90040-8
- Bresan, S., Sznajder, A., Hauf, W., Forchhammer, K., Pfeiffer, D., Jendrossek, D., 2016. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids. *Scientific Reports* 6. doi:10.1038/srep26612
- Brett, C.T., 2000. Cellulose microfibrils in plants: biosynthesis, deposition, and integration into the cell wall. *International review of cytology* 199, 161-99.
- Brigham, C.J., Riedel, S.L., 2019. The Potential of Polyhydroxyalkanoate Production from Food Wastes. *Applied Food Biotechnology* 6, 7-18. doi:10.22037/afb.v6i1.22542
- Brown, R.M., 2004. Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 21st century? *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 42, 487-495. doi:10.1002/pola.10877
- Cannella, D., Sveding, P.V., Jørgensen, H., 2014. PEI detoxification of pretreated spruce for high solids ethanol fermentation. *Applied Energy* 132, 394-403. doi:10.1016/j.apenergy.2014.07.038
- Cano-Delgado, A., Penfield, S., Smith, C., Catley, M., Bevan, M., 2003. Reduced cellulose synthesis invokes lignification and defense responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 34, 351-362. doi:10.1046/j.1365-313X.2003.01729.x
- Cao, Y., Li, H., Zhang, Y., Zhang, J., He, J., 2010. Structure and properties of novel regenerated cellulose films prepared from cornhusk cellulose in room temperature ionic liquids. *Journal of Applied Polymer Science* 116, 547-554. doi:10.1002/app.31273
- Capolupo, L., Faraco, V., 2016. Green methods of lignocellulose pretreatment for biorefinery development. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, 9451-9467. doi:10.1007/s00253-016-7884-y
- Ciesielski, S., Górnjak, D., Możejko, J., Świątecki, A., Grzesiak, J., Zdanowski, M., 2014. The Diversity of Bacteria Isolated from Antarctic Freshwater Reservoirs Possessing

- the Ability to Produce Polyhydroxyalkanoates. *Current Microbiology* 69, 594-603. doi:10.1007/s00284-014-0629-1
- Cruz, M.V., Paiva, A., Lisboa, P., Freitas, F., Alves, V.D., Simões, P., Barreiros, S., Reis, M.A.M., 2014. Production of polyhydroxyalkanoates from spent coffee grounds oil obtained by supercritical fluid extraction technology. *Bioresource Technology* 157, 360-363. doi:10.1016/j.biortech.2014.02.013
- Cui, Y.-W., Gong, X.-Y., Shi, Y.-P., Wang, Z. (D.), 2017. Salinity effect on production of PHA and EPS by *Haloferax mediterranei*. *RSC Advances* 7, 53587-53595.. doi:10.1039/C7RA09652F
- Dadi, A.P., Varanasi, S., Schall, C.A., 2006. Enhancement of cellulose saccharification kinetics using an ionic liquid pretreatment step. *Biotechnology and Bioengineering* 95, 904-910. doi:10.1002/bit.21047
- Dawes, E.A., Senior, P.J., 1973. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. *Advances in Microbial Physiology* 10, 135-266.
- Dietrich, K., Dumont, M.-J., Del Rio, L.F., Orsat, V., 2019. Sustainable PHA production in integrated lignocellulose biorefineries. *New Biotechnology* 49, 161-168.. doi:10.1016/j.nbt.2018.11.004
- Digman, M.F., Shinnars, K.J., Casler, M.D., Dien, B.S., Hatfield, R.D., Jung, H.-J.G., Muck, R.E., Weimer, P.J., 2010. Optimizing on-farm pretreatment of perennial grasses for fuel ethanol production. *Bioresource Technology* 101, 5305-5314. doi:10.1016/j.biortech.2010.02.014
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., Labandera-Gonzalez, C., Caballero-Mellado, J., Aguirre, J.F., Kapulnik, Y., Brener, S., Burdman, S., Kadouri, D., Sarig, S., Okon, Y., 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Functional Plant Biology* 28, 871-879. doi:10.1071/PP01074
- Dragosits, M., Mattanovich, D., 2013. Adaptive laboratory evolution – principles and applications for biotechnology. *Microbial Cell Factories* 12. doi:10.1186/1475-2859-12-64
- Du, B., Sharma, L.N., Becker, C., Chen, S.-F., Mowery, R.A., van Walsum, G.P., Chambliss, C.K., 2010. Effect of varying feedstock-pretreatment chemistry combinations on the formation and accumulation of potentially inhibitory degradation products in biomass hydrolysates. *Biotechnology and Bioengineering* 107, 430-440. doi:10.1002/bit.22829
- Dumitriu, S., 2005. Polysaccharides: structural diversity and functional versatility, 2nd ed. ed. Marcel Dekker, New York.
- Earle, M.J., Seddon, K.R., 2002. Ionic Liquids: Green Solvents for the Future, in: *Clean Solvents: Alternative Media For Chemical Reactions And Processing*. American Chemical Society, Washington, D.C., p. 10. doi:10.1021/bk-2002-0819.ch002

- Eggeman, T., Elander, R.T., 2005. Process and economic analysis of pretreatment technologies. *Bioresource Technology* 96, 2019-2025. doi:10.1016/j.biortech.2005.01.017
- Emeruwa, A.C., Hawirko, R.Z., 1973. Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate Metabolism During Growth and Sporulation of *Clostridium botulinum*. *Journal of Bacteriology* 116, 989-993.
- Fenske, J.J., Griffin, D.A., Penner, M.H., 1998. Comparison of aromatic monomers in lignocellulosic biomass prehydrolysates. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 20, 364-368. doi:10.1038/sj.jim.2900543
- Flickinger, M.C., Drew, S.W., 1999. *Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation*. J. Wiley, New York.
- Flores, A.D., Kurgan, G.L., Wang, X., 2017. Engineering Bacterial Sugar Catabolism and Tolerance Toward Lignocellulose Conversion, in: *Engineering Of Microorganisms For The Production Of Chemicals And Biofuels From Renewable Resources*. Springer International Publishing, Cham, pp. 147-180. doi:10.1007/978-3-319-51729-2\_6
- García-Quiles, Cuello, Castell, 2019. Sustainable Materials with Enhanced Mechanical Properties Based on Industrial Polyhydroxyalkanoates Reinforced with Organomodified Sepiolite and Montmorillonite. *Polymers* 11.. doi:10.3390/polym11040696
- De Gelder, J., Willems-Erix, D., Scholtes, M.J., Sanchez, J.I., Maquelin, K., Vandenabeele, P., De Boever, P., Puppels, G.J., Moens, L., De Vos, P., 2008. Monitoring Poly(3-hydroxybutyrate) Production in *Cupriavidus necator* DSM 428 (H16) with Raman Spectroscopy. *Analytical Chemistry* 80, 2155-2160. doi:10.1021/ac702185d
- Gibson, L.J., 2012. The hierarchical structure and mechanics of plant materials. *Journal of The Royal Society Interface* 9, 2749-2766. doi:10.1098/rsif.2012.0341
- Glyad, V.M., 2002. Determination of Monosaccharides, Disaccharides, and Oligosaccharides in the Same Plant Sample by High-Performance Liquid Chromatography. *Russian Journal of Plant Physiology* 49, 277-282. doi:10.1023/A:1014870011027
- Gogate, P.R., Sutkar, V.S., Pandit, A.B., 2011. Sonochemical reactors: Important design and scale up considerations with a special emphasis on heterogeneous systems. *Chemical Engineering Journal* 166, 1066-1082. doi:10.1016/j.cej.2010.11.069
- Gollapalli, L.E., Dale, B.E., Rivers, D.M., 2002. Predicting Digestibility of Ammonia Fiber Explosion (AFEX)-Treated Rice Straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 98-100, 23-36. doi:10.1385/ABAB:98-100:1-9:23
- Grage, K., Jahns, A.C., Parlane, N., Palanisamy, R., Rasiah, I.A., Atwood, J.A., Rehm, B.H.A., 2009. Bacterial Polyhydroxyalkanoate Granules: Biogenesis, Structure, and Potential Use as Nano-/Micro-Beads in Biotechnological and Biomedical Applications. *Biomacromolecules* 10, 660-669. doi:10.1021/bm801394s
- Han, J., Zhang, F., Hou, J., Liu, X., Li, M., Liu, H., Cai, L., Zhang, B., Chen, Y., Zhou, J., Hu, S., Xiang, H., 2012. Complete Genome Sequence of the Metabolically Versatile

- Halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei*, a Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) Producer. *Journal of Bacteriology* 194, 4463-4464.. doi:10.1128/JB.00880-12
- Hames, B.R., 2009. Biomass Compositional Analysis for Energy Applications, in: *Biofuels: Methods And Protocols*. Springer, New York, p. 145. doi:10.1007/978-1-60761-214-8\_11
- Hayes, D.J., 2009. An examination of biorefining processes, catalysts and challenges. *Catalysis Today* 145, 138-151. doi:10.1016/j.cattod.2008.04.017
- Heinze, T., Schwikal, K., Barthel, S., 2005. Ionic Liquids as Reaction Medium in Cellulose Functionalization. *Macromolecular Bioscience* 5, 520-525. doi:10.1002/mabi.200500039
- Himmel, M.E., Adney, W.S., Baker, J.O., Elander, R., McMillan, J.D., Nieves, R.A., Sheehan, J.J., Thomas, S.R., Vinzant, T.B., Zhang, M., 1997. Advanced Bioethanol Production Technologies: A Perspective, in: *Fuels And Chemicals From Biomass*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 2-45. doi:10.1021/bk-1997-0666.ch001
- Hong, K., Sun, S., Tian, W., Chen, G.Q., Huang, W., 1999. A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51, 523-526. doi:10.1007/s002530051427
- Chae, T.U., Choi, S.Y., Kim, J.W., Ko, Y.-S., Lee, S.Y., 2017. Recent advances in systems metabolic engineering tools and strategies. *Current Opinion in Biotechnology* 47, 67-82. doi:10.1016/j.copbio.2017.06.007
- Chandel, A.K., da Silva, S.S., Singh, O.V., 2011. Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysates for Improved Bioethanol Production, in: *Biofuel Production-Recent Developments And Prospects*. InTech, pp. 225-246. doi:10.5772/16454
- Chapple, C., 1998. Molecular-genetic analysis of plant cytochrome p450-dependent monooxygenases. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49, 311-343. doi:10.1146/annurev.arplant.49.1.311
- Chen, G.-Q., Jiang, X.-R., 2017. Engineering bacteria for enhanced polyhydroxyalkanoates (PHA) biosynthesis. *Synthetic and Systems Biotechnology* 2, 192-197.. doi:10.1016/j.synbio.2017.09.001
- Chen, G.-Q., Jiang, X.-R., 2018. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 50, 94-100.. doi:10.1016/j.copbio.2017.11.016
- Cheng, Y.-S., Zheng, Y., Yu, C.W., Dooley, T.M., Jenkins, B.M., VanderGheynst, J.S., 2010. Evaluation of High Solids Alkaline Pretreatment of Rice Straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162, 1768-1784. doi:10.1007/s12010-010-8958-4

- Chiaromonti, D., Prussi, M., Ferrero, S., Oriani, L., Ottonello, P., Torre, P., Cherchi, F., 2012. Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. *Biomass and Bioenergy* 46, 25-35. doi:10.1016/j.biombioe.2012.04.020
- Chung, A.-L., Jin, H.-L., Huang, L.-J., Ye, H.-M., Chen, J.-C., Wu, Q., Chen, G.-Q., 2011. Biosynthesis and Characterization of Poly(3-hydroxydodecanoate) by  $\beta$ -Oxidation Inhibited Mutant of *Pseudomonas entomophila* L48. *Biomacromolecules* 12, 3559-3566.. doi:10.1021/bm200770m
- Chytilová, A., Drábková, K., Strečanská, P., Enev, V., Kučera, D., Benešová, P., Obruča, S., 2017. Production and characterization of extracellular polysaccharide of extremely halophilic Archaea *Haloferax mediterranei*. 6th Central European Congress of Life Sciences Eurobiotech. Krakow, 156-157.
- Jansen, G., Barbosa, C., Schulenburg, H., 2013. Experimental evolution as an efficient tool to dissect adaptive paths to antibiotic resistance. *Drug Resistance Updates* 16, 96-107.. doi:10.1016/j.drug.2014.02.002
- Jendrossek, D., 2009. Polyhydroxyalkanoate Granules Are Complex Subcellular Organelles (Carbonosomes). *Journal of Bacteriology* 191, 3195-3202.. doi:10.1128/JB.01723-08
- Jiang, X.-R., Chen, G.-Q., 2016. Morphology engineering of bacteria for bio-production. *Biotechnology Advances* 34, 435-440.. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.12.007
- Jönsson, L.J., Palmqvist, E., Nilvebrant, N.-O., Hahn-Hägerdal, B., 1998. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49, 691-697. doi:10.1007/s002530051233
- Jönsson, L.J., Alriksson, B., Nilvebrant, N.-O., 2013. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels* 6, 16-. doi:10.1186/1754-6834-6-16
- Jönsson, L.J., Martín, C., 2016. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology* 199, 103-112. doi:10.1016/j.biortech.2015.10.009
- Jung, Y.-M., Park, J.-S., Lee, Y.-H., 2000. Metabolic engineering of *Alcaligenes eutrophus* through the transformation of cloned *phbCAB* genes for the investigation of the regulatory mechanism of polyhydroxyalkanoate biosynthesis. *Enzyme and Microbial Technology* 26, 201-208. doi:10.1016/S0141-0229(99)00156-8
- Juttner, R.-R., Lafferty, R.M., Knackmuss, H.-J., 1975. A simple method for the determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European Journal of Applied Microbiology* 1, 233-237.
- Kadouri, D., Jurkevitch, E., Okon, Y., 2003. Involvement of the Reserve Material Poly- -Hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* Stress Endurance and Root Colonization. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 3244-3250. doi:10.1128/AEM.69.6.3244-3250.2003

- Keenan, T.M., Nakas, J.P., Tanenbaum, S.W., 2006. Polyhydroxyalkanoate copolymers from forest biomass. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 33, 616-626. doi:10.1007/s10295-006-0131-2
- Keenan, T.M., Tanenbaum, S.W., Stipanovic, A.J., Nakas, J.P., 2004. Production and Characterization of Poly- $\beta$ -hydroxyalkanoate Copolymers from *Burkholderia cepacia* Utilizing Xylose and Levulinic Acid. *Biotechnology Progress* 20, 1697-1704. doi:10.1021/bp049873d
- Kessler, B., Wilholt, B., 1999. Poly(3-hydroxyalkanoates, in: *The Encyclopedia Of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, And Bioseparation*. Wiley, New York, pp. 2024-2040.
- Keweloh, H., Weyrauch, G., Rehm, H.-J., 1990. Phenol-induced membrane changes in free and immobilized *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 33, 66-71. doi:10.1007/BF00170572
- Kim, Y., Ximenes, E., Mosier, N.S., Ladisch, M.R., 2011. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. *Enzyme and Microbial Technology* 48, 408-415. doi:10.1016/j.enzmictec.2011.01.007
- Klinke, H.B., Ahring, B.K., Schmidt, A.S., Thomsen, A.B., 2002. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. *Bioresource Technology* 82, 15-26.
- Koller, M., 2015. Recycling of Waste Streams of the Biotechnological Poly(hydroxyalkanoate) Production by *Haloferax mediterranei* on Whey. *Int. J. Polym. Sci.* 2015, Article ID 370164
- Koller, 2019. Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis at the Edge of Water Activity-Haloarchaea as Biopolyester Factories. *Bioengineering* 6.. doi:10.3390/bioengineering6020034
- Koller, M., Bona, R., Hermann, C., Horvat, P., Martinz, J., Neto, J., Pereira, L., Varila, P., Braunegg, G., 2005. Biotechnological production of poly(3-hydroxybutyrate) with *Wautersia eutropha* by application of green grass juice and silage juice as additional complex substrates. *Biocatalysis and Biotransformation* 23, 329-337. doi:10.1080/10242420500292252
- Koller, M., Rodríguez-Contreras, A., 2015. Techniques for tracing PHA-producing organisms and for qualitative and quantitative analysis of intra- and extracellular PHA. *Engineering in Life Sciences* 15, 558-581.. doi:10.1002/elsc.201400228
- Koppram, R., Albers, E., Olsson, L., 2012. Evolutionary engineering strategies to enhance tolerance of xylose utilizing recombinant yeast to inhibitors derived from spruce biomass. *Biotechnology for Biofuels* 5, 32-. doi:10.1186/1754-6834-5-32
- Koshijima, T., Watanabe, T., 2013. *Association Between Lignin and Carbohydrates in Wood and Other Plant Tissues*. Springer, Berlin Heidelberg.
- Krastanov, A., Alexieva, Z., Yemendzhiev, H., 2013. Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives. *Eng. Life Sci.* 13, 76-87.



- Kučera, D., 2015. Využití lignocelulóзовých materiálů k biotechnologické produkci polyhydroxyalkanoátů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická,
- Kucera, D., Benesova, P., Ladicky, P., Pekar, M., Sedlacek, P., Obruca, S., 2017. Production of Polyhydroxyalkanoates Using Hydrolyzates of Spruce Sawdust: Comparison of Hydrolyzates Detoxification by Application of Overliming, Active Carbon, and Lignite. *Bioengineering* 4, 53. doi:10.3390/bioengineering4020053
- Kumar, A.K., Sharma, S., 2017. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. *Bioresources and Bioprocessing* 4, -. doi:10.1186/s40643-017-0137-9
- Kuo, C.-H., Lee, C.-K., 2009. Enhanced enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse by N-methylmorpholine-N-oxide pretreatment. *Bioresource Technology* 100, 866-871. doi:10.1016/j.biortech.2008.07.001
- Kurzová, P., 2018. Biotechnologická produkce PHA pomocí extremofilních mikroorganismů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
- Larsen, J., Haven, M.Ø., Thirup, L., 2012. Inbicon makes lignocellulosic ethanol a commercial reality. *Biomass and Bioenergy* 46, 36-45. doi:10.1016/j.biombioe.2012.03.033
- Larsson, S., Reimann, A., Nilvebrant, N.-O., Jönsson, L.J., 1999. Comparison of Different Methods for the Detoxification of Lignocellulose Hydrolyzates of Spruce. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 77, 91-104. doi:10.1385/ABAB:77:1-3:91
- Law, J. H., a Slepecky, R. A., 1961. Assay of poly-beta-hydroxybutyric acid. *Journal of bacteriology*, 82(1), 33–36.
- Lenski, R., 2016. The E. coli long-term experimental evolution project site. V: <http://myxo.css.msu.edu/ecoli>; <http://myxo.css.msu.edu/ecoli>. Datum přístupu 28.6.2019
- Li, Q., 2017. Rhamnolipid synthesis and production with diverse resources. *Front. Chem. Sci. Eng.* 11, 27- 36
- Liebergesell, M., Steinbuchel, A., 1992. Cloning and nucleotide sequences of genes relevant for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyric acid) in *Chromatium vinosum* strain D. *European Journal of Biochemistry* 209, 135-150. doi:10.1111/j.1432-1033.1992.tb17270.x
- Lopes, M., Rocha, R., Zanotto, S., Gomez, J., Silva, L., 2009. Screening of bacteria to produce polyhydroxyalkanoates from xylose. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 1751-1756.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- Lykidis, A., Pérez-Pantoja, D., Ledger, T., Mavromatis, K., Anderson, I.J., Ivanova, N.N., et al., 2010. The complete multipartite genome sequence of *Cupriavidus necator* JMP134, a versatile pollutant degrader. *PLoS ONE* 5, e9729-.

- Macrae, R.M., Wilkinson, J.F., 1958. Poly-*-*hydroxybutyrate Metabolism in Washed Suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. *Journal of General Microbiology* 19, 210-222. doi:10.1099/00221287-19-1-210
- Martín, C., Galbe, M., Nilvebrant, N.O., Jönsson, L.J., 2002. Comparison of the fermentability of enzymatic hydrolyzates of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnating agents. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 98-100, 699-716.
- Martínez-Gutiérrez, C.A., Latisnere-Barragán, H., García-Maldonado, J.Q., López-Cortés, A., 2018. Screening of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria and PhaC-encoding genes in two hypersaline microbial mats from Guerrero Negro, Baja California Sur, Mexico. *PeerJ* 6.. doi:10.7717/peerj.4780
- McCool, G.J., Cannon, M.C., 1999. Polyhydroxyalkanoate inclusion body-associated proteins and coding region in *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology* 181, 585-92.
- McHardy, J., Sawan, S.P., 1998. *Supercritical fluid cleaning: fundamentals, technology, and applications*, 1st ed. Noyes Publications, Westwood, N.J.
- Menon, V., Rao, M., 2012. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science* 38, 522-550. doi:10.1016/j.pecs.2012.02.002
- Mohapatra, S., Maity, S., Dash, H.R., Das, S., Pattnaik, S., Rath, C.C., Samantaray, D., 2017. *Bacillus* and biopolymer: Prospects and challenges. *Biochemistry and Biophysics Reports* 12, 206-213.. doi:10.1016/j.bbrep.2017.10.001
- Morais, A.R.C., Bogel-Lukasik, R., 2013. Green chemistry and the biorefinery concept. *Sustainable Chemical Processes* 1, 18-. doi:10.1186/2043-7129-1-18
- Morone, A., Apte, M., Pandey, R.A., 2015. Levulinic acid production from renewable waste resources: Bottlenecks, potential remedies, advancements and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 51, 548-565. doi:10.1016/j.rser.2015.06.032
- Możejko-Ciesielska, J., Kiewisz, R., 2016. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous?. *Microbiological Research* 192, 271-282.. doi:10.1016/j.micres.2016.07.010
- Muhammadi, Shabina, Afzal, M., Hameed, S., 2015. Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. *Green Chemistry Letters and Reviews* 8, 56-77. doi:10.1080/17518253.2015.1109715
- Nilvebrant, N.-O., Reimann, A., Larsson, S., Jönsson, L.J., 2001. Detoxification of Lignocellulose Hydrolysates with Ion-Exchange Resins. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 91-93, 35-50. doi:10.1385/ABAB:91-93:1-9:35
- Obruca, S., Benesova, P., Kucera, D., Petrik, S., Marova, I., 2015a. Biotechnological conversion of spent coffee grounds into polyhydroxyalkanoates and carotenoids. *New Biotechnology* 32, 569-574. doi:10.1016/j.nbt.2015.02.008

- Obruča, S., Benešová, P., Márová, I., 2015b. Use of Lignocellulosic Materials for PHA Production. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 29, 133-144. doi:10.15255/CABEQ.2014.2253
- Obruca, S., Benesova, P., Petrik, S., Oborna, J., Prikryl, R., Marova, I., 2014. Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolysate of spent coffee grounds. *Process Biochemistry* 49, 1409-1414. doi:10.1016/j.procbio.2014.05.013
- Obruca, S., Marova, I., Svoboda, Z., Mikulikova, R., 2010. Use of controlled exogenous stress for improvement of poly(3-hydroxybutyrate) production in *Cupriavidus necator*. *Folia Microbiologica* 55, 17-22. doi:10.1007/s12223-010-0003-z
- Obruca, S., Sedlacek, P., Mravec, F., Samek, O., Marova, I., 2016. Evaluation of 3-hydroxybutyrate as an enzyme-protective agent against heating and oxidative damage and its potential role in stress response of poly(3-hydroxybutyrate) accumulating cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, 1365-1376. doi:10.1007/s00253-015-7162-4
- Oliveira, C., Silva, M., Silva, C.E., Carvalho, G., Reis, M.A.M., 2018. Assessment of Protein-Rich Cheese Whey Waste Stream as a Nutrients Source for Low-Cost Mixed Microbial PHA Production. *Applied Sciences* 8. doi:10.3390/app8101817
- Pais, J., Serafim, L.S., Freitas, F., Reis, M.A.M., 2016. Conversion of cheese whey into poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. *New Biotechnology* 33, 224-230. doi:10.1016/j.nbt.2015.06.001
- Pampulha, M.E., Loureiro-Dias, M.C., 1989. Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* 31-31, 547-550. doi:10.1007/BF00270792
- Pan, W., Perrotta, J.A., Stipanovic, A.J., Nomura, C.T., Nakas, J.P., 2012. Production of polyhydroxyalkanoates by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759 using a detoxified sugar maple hemicellulosic hydrolysate. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 39, 459-469. doi:10.1007/s10295-011-1040-6
- Park, J.S., Lee, Y.H., 1996. Metabolite characteristics of isocitrate dehydrogenase-leaky mutant of *Alcaligenes eutrophus* and its utilization for poly-beta-hydroxybutyrate production. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 81, 197-205.
- Patel, G., Singh, S., Saxena, D.S.K., Kaur, D.K.J., 2016. Isolation, Biochemical Characterization and Production of Biofertilizer from *Bacillus megaterium*. *Int. J. Life. Sci. Scienti. Res.* 2, 749-752. doi:10.21276/ijlssr.2016.2.6.16
- Peña, C., Castillo, T., García, A., Millán, M., Segura, D., 2014. Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): a review of recent research work. *Microbial Biotechnology* 7, 278-293.. doi:10.1111/1751-7915.12129
- Persson, P., Larsson, S., Jönsson, L.J., Nilvebrant, N.-O., Sivik, B., Munteanu, F., Thörneby, L., Gorton, L., 2002. Supercritical fluid extraction of a lignocellulosic hydrolysate of spruce for detoxification and to facilitate analysis of inhibitors. *Biotechnology and Bioengineering* 79, 694-700. doi:10.1002/bit.10324

- Peters, D., 2006. Carbohydrates for fermentation. *Biotechnology Journal* 1, 806-814. doi:10.1002/biot.200600041
- Pfeiffer, D., Jendrossek, D., 2014. PhaM Is the Physiological Activator of Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) Synthase (PhaC1) in *Ralstonia eutropha*. *Applied and Environmental Microbiology* 80, 555-563.. doi:10.1128/AEM.02935-13
- Popoff, T., Theander, O., Rømming, C., Foltmann, B., Taticchi, A., Anthonsen, T., 1976. Formation of Aromatic Compounds from Carbohydrates. Part III. Reaction of D-Glucose and D-Fructose in Slightly Acidic, Aqueous Solution. *Acta Chemica Scandinavica* 30, 397-402. doi:10.3891/acta.chem.scand.30b-0397
- Pothiraj, C., Kanmani, P., Balaji, P., 2006. Bioconversion of Lignocellulose Materials. *Mycobiology* 34, 159-165. doi:10.4489/MYCO.2006.34.4.159
- Pötter, M., Madkour, M.H., Mayer, F., Steinbüchel, A., 2002. Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology* 148, 2413-2426. doi:10.1099/00221287-148-8-2413
- Putro, J.N., Soetaredjo, F.E., Lin, S.-Y., Ju, Y.-H., Ismadji, S., 2016. Pretreatment and conversion of lignocellulose biomass into valuable chemicals. *RSC Adv* 6, 46834-46852. doi:10.1039/C6RA09851G
- Quesada, E., Ventosa, A., Ruiz-Berraquero, F., Ramos-Cormenzana, A., 1984. *Deleya halophila*, a New Species of Moderately Halophilic Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34, 287-292.. doi:10.1099/00207713-34-3-287
- Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P.F., Marita, J.M., Hatfield, R.D., Ralph, S.A., Christensen, J.H., Boerjan, W., 2004. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl- propanoids. *Phytochemistry Reviews* 3, 29-60. doi:10.1023/B:PHYT.0000047809.65444.a4
- Ramachandran, H., Iqbal, N.M., Sipaut, C.S., Abdullah, A.A.A., 2011. Biosynthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate). Terpolymer with various monomer compositions by *Cupriavidus* sp. USMAA2-4. *Applied biochemistry and biotechnology*, 164, 867-877.
- Ranatunga, T.D., Jervis, J., Helm, R.F., McMillan, J.D., Wooley, R.J., 2000. The effect of overliming on the toxicity of dilute acid pretreated lignocellulosics: the role of inorganics, uronic acids and ether-soluble organics. *Enzyme and Microbial Technology* 27, 240-247. doi:10.1016/S0141-0229(00)00216-7
- Rand, J.M., Pisithkul, T., Clark, R.L., Thiede, J.M., Mehrer, C.R., Agnew, D.E., Campbell, C.E., Markley, A.L., Price, M.N., Ray, J., Wetmore, K.M., Suh, Y., Arkin, A.P., Deutschbauer, A.M., Amador-Noguez, D., Pfleger, B.F., 2017. A metabolic pathway for catabolizing levulinic acid in bacteria. *Nature Microbiology* 2, 1624-1634.. doi:10.1038/s41564-017-0028-z
- Reginatto, V., Antônio, R.V., 2015. Fermentative hydrogen production from agroindustrial lignocellulosic substrates. *Brazilian Journal of Microbiology* 46, 323-335. doi:10.1590/S1517-838246220140111

- Rehm, B.H.A., 2003. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochemical Journal* 376, 15-33. doi:10.1042/bj20031254
- Reinecke, F., Steinbüchel, A., 2009. *Ralstonia eutropha* Strain H16 as Model Organism for PHA Metabolism and for Biotechnological Production of Technically Interesting Biopolymers. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 16, 91-108.. doi:10.1159/000142897
- Ribeiro, H., Marto, J., Raposo, S., Agapito, M., Isaac, V., Chiari, B.G., Lisboa, P.F., Paiva, A., Barreiros, S., Simões, P., 2013. From coffee industry waste materials to skin-friendly products with improved skin fat levels. *European Journal of Lipid Science and Technology* 115, 330-336. doi:10.1002/ejlt.201200239
- Rippert, P., Puyaubert, J., Grisolle, D., Derrier, L., Matringe, M., 2009. Tyrosine and Phenylalanine Are Synthesized within the Plastids in Arabidopsis. *Plant Physiology* 149, 1251-1260. doi:10.1104/pp.108.130070
- Rodríguez-Contreras, A., Koller, M., Braune, G., Marqués-Calvo, M.S., 2016. Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] production under different salinity conditions by a novel *Bacillus megaterium* strain. *New Biotechnology* 33, 73-77. doi:10.1016/j.nbt.2015.08.006
- Rodríguez-Contreras, A., Koller, M., Miranda-de Sousa Dias, M., Calafell-Monfort, M., Braune, G., Marqués-Calvo, M.S., 2013. High production of poly(3-hydroxybutyrate) from a wild *Bacillus megaterium* Bolivian strain. *Journal of Applied Microbiology* 114, 1378-1387.. doi:10.1111/jam.12151
- Rogers, K., 2011. Bacteria and viruses. Britannica Educational Pub. in association with Rosen Educational Services, New York, NY.
- Rowell, R.M. (Ed.), 2013. Handbook of wood chemistry and wood composites, 2nd ed. ed. CRC Press, Boca Raton.
- Rubin, E.M., 2008. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature* 454, 841-845. doi:10.1038/nature07190
- Saavedra, J.M., Acevedo, F., González, M., Seeger, M., 2010. Mineralization of PCBs by the genetically modified strain *Cupriavidus necator* JMS34 and its application for bioremediation of PCBs in soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 1543-1554.
- Saito, Y., Doi, Y., 1994. Microbial synthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in *Comamonas acidovorans*. *International Journal of Biological Macromolecules* 16, 99-104.. doi:10.1016/0141-8130(94)90022-1
- Safiyani, I., Abdulwahid Isah, A., Abubakar, U.S., Rita Singh, M., 2015. Review on comparative study on bioremediation for oil spills using microbes. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 6, 783.
- Salehi, Z., Vahabzadeh, F., Sohrabi, M., Fatemi, S., Znad, H.T., 2010. Statistical medium optimization and biodegradative capacity of *Ralstonia eutropha* toward p-nitrophenol. *Biodegradation* 21, 645-657

- Sedighi, M., Vahabzadeh, F., Zamir, S.M., Naderifar, A., 2013. Ethanethiol degradation by *Ralstonia eutropha*. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* 18, 827-833.
- Sedlacek, P., Slaninova, E., Enev, V., Koller, M., Nebesarova, J., Marova, I., Hrubanova, K., Krzyzanek, V., Samek, O., Obruca, S., 2019. What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103, 1905-1917.. doi:10.1007/s00253-018-09584-z
- Senior, P.J., Beech, G.A., Ritchie, G.A.F., Dawes, E.A., 1972. The role of oxygen limitation in the formation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. *Biochemistry Journal* 128, 1193–1201.
- Shrivastav, A., Mishra, S.K., Mishra, S., 2010. Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis by *Spirulina subsalsa* from Gujarat coast of India. *Int. J. Biol. Macromolec.* 46, 255-260
- Scheller, H.V., Ulvskov, P., 2010. Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology* 61, 263-289. doi:10.1146/annurev-arplant-042809-112315
- Silva, L.F., Taciro, M.K., Michelin Ramos, M.E., Carter, J.M., Pradella, J.G.C., Gomez, J.G.C., 2004. Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 31, 245-254. doi:10.1007/s10295-004-0136-7
- Silva, L.F., Taciro, M.K., Raicher, G., Piccoli, R.A.M., Mendonça, T.T., Lopes, M.S.G., Gomez, J.G.C., 2014. Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in biorefineries associated with the production of sugar and ethanol. *International Journal of Biological Macromolecules* 71, 2-7. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.06.065
- Sindhu, R., Binod, P., Pandey, A., 2016. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. *Bioresource Technology* 199, 76-82. doi:10.1016/j.biortech.2015.08.030
- Sindhu, R., Silviya, N., Binod, P., Pandey, A., 2013. Pentose-rich hydrolysate from acid pretreated rice straw as a carbon source for the production of poly-3-hydroxybutyrate. *Biochemical Engineering Journal* 78, 67-72. doi:10.1016/j.bej.2012.12.015
- Singh, N.K., Chaudhary, F.K., Patel, D.B., 2013. Effectiveness of *Azotobacter* bio-inoculant for wheat grown under dryland condition. *J. Environ. Biol.* 34, 927-32.
- Slater, S.C., Voige, W.H., Dennis, D.E., 1988. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic pathway. *Journal of Bacteriology* 170, 4431-4436.. doi:10.1128/jb.170.10.4431-4436.1988
- Slepecky, R.A., Law, J.H., 1961. Synthesis and degradation of poly-beta-hydroxybutyric acid in connection with sporulation of *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* 82, 37-42.
- Smibert, R.M. and Krieg, N.R. P. In Gerhardt, P. Murray, G.E. Costillows R.N. Nester, E.W. Wood, W.A. Kerieg, N.R. a Phillips, G.P., 1979. *General characterization Manual of methods for general bacteriology*. American society for microbiology, 409-443.
- Spiekermann, P., Rehm, B.H.A., Kalscheuer, R., Baumeister, D., Steinbüchel, A., 1999. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria

- that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Archives of Microbiology* 171, 73-80.
- Steinbüchel, A., Valentin, H.E., 1995. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters* 128, 219-228. doi:10.1111/j.1574-6968.1995.tb07528.x
- Studer, M.H., DeMartini, J.D., Davis, M.F., Sykes, R.W., Davison, B., Keller, M., Tuskan, G.A., Wyman, C.E., 2011. Lignin content in natural *Populus* variants affects sugar release. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 6300-6305. doi:10.1073/pnas.1009252108
- Sudesh, K., Abe, H., Doi, Y., 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science* 25, 1503-1555. doi:10.1016/S0079-6700(00)00035-6
- Sun, R., Lawther, J.M., Banks, W.B., 1995. Influence of alkaline pre-treatments on the cell wall components of wheat straw. *Industrial Crops and Products* 4, 127-145. doi:10.1016/0926-6690(95)00025-8
- Sun, R.C., Tomkinson, J., 2002. Comparative study of lignins isolated by alkali and ultrasound-assisted alkali extractions from wheat straw. *Ultrasonics Sonochemistry* 9, 85-93. doi:10.1016/S1350-4177(01)00106-7
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K., 2008. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* 9, 1621-1651. doi:10.3390/ijms9091621
- Taskin, M., Esim, N., Ortucu, S., 2012. Efficient production of l-lactic acid from chicken feather protein hydrolysate and sugar beet molasses by the newly isolated *Rhizopus oryzae* TS-61. *Food and Bioproducts Processing* 90, 773-779. doi:10.1016/j.fbp.2012.05.003
- Timm, A., Steinbüchel, A., 1990. Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 3360-3367.
- Titz, M., Kettl, K.-H., Shahzad, K., Koller, M., Schnitzer, H., Narodoslowsky, M., 2012. Process optimization for efficient biomediated PHA production from animal-based waste streams. *Clean Technologies and Environmental Policy* 14, 495-503. doi:10.1007/s10098-012-0464-7
- Tronchet, M., Balagué, C., Kroj, T., Jouanin, L., Roby, D., 2010. Cinnamyl alcohol dehydrogenases-C and D, key enzymes in lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant Pathology* 11, 83-92. doi:10.1111/j.1364-3703.2009.00578.x
- Tyo, K.E., Zhou, H., Stephanopoulos, G.N., 2006. High-Throughput Screen for Poly-3-Hydroxybutyrate in *Escherichia coli* and *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 3412-3417. doi:10.1128/AEM.72.5.3412-3417.2006

- Ulbricht, R.J., Northup, S.J., Thomas, J.A., 1984. A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. *Fundamental and Applied Toxicology* 4, 843-853. doi:10.1016/0272-0590(84)90106-4
- Uzal, E.N., Gómez Ros, L.V., Pomar, F., Bernal, M.A., Paradela, A., Albar, J.P., Ros Barceló, A., 2009. The presence of sinapyl lignin in *Ginkgo biloba* cell cultures changes our views of the evolution of lignin biosynthesis. *Physiologia Plantarum* 135, 196-213. doi:10.1111/j.1399-3054.2008.01185.x
- Vandamme, P., Coenye, T., 2004. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 2285-2289
- Van-Thuoc, D., Quillaguamán, J., Mamo, G., Mattiasson, B., 2007. Utilization of agricultural residues for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1. *Journal of Applied Microbiology* 071003000434003-??? doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03553.x
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., Boerjan, W., 2010. Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant physiology* 153, 895-905. doi:10.1104/pp.110.155119
- Varga, E., Réczey, K., Zacchi, G., 2004. Optimization of Steam Pretreatment of Corn Stover to Enhance Enzymatic Digestibility. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 114, 509-524. doi:10.1385/ABAB:114:1-3:509
- Vodička, J., 2018. Polyhydroxyalkanoáty jako metabolity prokaryot adaptovaných na extrémní prostředí. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
- Volova, T.G., 2004. Polyhydroxyalkanoates--plastic materials of the 21st century: production, properties, applications, 1st ed. Nova Science Publishers, Hauppauge, N.Y.
- Wang, H., Wang, J., Fang, Z., Wang, X., Bu, H., 2010. Enhanced bio-hydrogen production by anaerobic fermentation of apple pomace with enzyme hydrolysis. *International Journal of Hydrogen Energy* 35, 8303-8309. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.12.012
- Weng, J.-K., Li, X., Bonawitz, N.D., Chapple, C., 2008. Emerging strategies of lignin engineering and degradation for cellulosic biofuel production. *Current Opinion in Biotechnology* 19, 166-172. doi:10.1016/j.copbio.2008.02.014
- Whitman, W.B., Rainey, F., Kämpfer, P., Trujillo, M., Chun, J., DeVos, P., Hedlund, B., Dedysh, S. (Eds.), 2015. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley, Chichester, UK
- Wyman, C., Decker, S., Himmel, M., Brady, J., Skopec, C., Viikari, L., 2004. Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose, in: *Polysaccharides*. CRC Press, New York, pp. 995-1034. doi:10.1201/9781420030822.ch43
- Yoo, C.G., Pu, Y., Ragauskas, A.J., 2017. Ionic liquids: Promising green solvents for lignocellulosic biomass utilization. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 5, 5-11. doi:10.1016/j.cogsc.2017.03.003



- Yordanov, D. I., Tsonev, Z. B., Palichev, T. V., Mustafa, Z. A., 2013. A new approach for production of coffee oil from waste coffee residue as a feedstock for biodiesel. *Petroleum* 55, 74-81.
- Yu, J., Stahl, H., 2008. Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates. *Bioresource Technology* 99, 8042-8048. doi:10.1016/j.biortech.2008.03.071
- Zhang, Y.-H.P., Ding, S.-Y., Mielenz, J.R., Cui, J.-B., Elander, R.T., Laser, M., Himmel, M.E., McMillan, J.R., Lynd, L.R., 2007. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. *Biotechnology and Bioengineering* 97, 214-223. doi:10.1002/bit.21386
- Zhao, Y.H., Li, H.M., Qin, L.F., Wang, H.H., Chen, G.-Q., 2007. Disruption of the polyhydroxyalkanoate synthase gene in *Aeromonas hydrophila* reduces its survival ability under stress conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* 276, 34-41. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00904.x
- Zheng, Y., Lin, H.-M., Tsao, G.T., 1998. Pretreatment for Cellulose Hydrolysis by Carbon Dioxide Explosion. *Biotechnology Progress* 14, 890-896. doi:10.1021/bp980087g
- Zheng, Y., Lin, H.-M., Wen, J., Cao, N., Yu, X., Tsao, G.T., 1995. Supercritical carbon dioxide explosion as a pretreatment for cellulose hydrolysis. *Biotechnology Letters* 17, 845-850. doi:10.1007/BF00129015
- Zhu, J., Yong, Q., Xu, Y., Yu, S., 2011. Detoxification of corn stover prehydrolyzate by trialkylamine extraction to improve the ethanol production with *Pichia stipitis* CBS 5776. *Bioresource Technology* 102, 1663-1668. doi:10.1016/j.biortech.2010.09.083

## 8 SEZNAM PŘÍLOH

- I. **KUČERA, D.**; SAMEK, O.; MÜLLEROVÁ, L.; BENEŠOVÁ, P.; OBRUČA, S. Comparison of flow cytometry and Raman spectroscopy as methods for rapid determination of intracellular content of polyhydroxyalkanoates in bacterial cells. 4th International Conference on Chemical Technology ICCT 2016 Sborník příspěvků. 2016. ISBN: 978-80-86238-91- 3.
- II. SAMEK, O.; OBRUČA, S.; ŠILER, M.; SEDLÁČEK, P.; BENEŠOVÁ, P.; **KUČERA, D.**; MÁROVÁ, I.; JEŽEK, J.; BERNATOVÁ, S.; ZEMÁNEK, P. Quantitative Raman Spectroscopy Analysis of Polyhydroxyalkanoates Produced by *Cupriavidus necator* H16. SENSORS, 2016, vol. 16, no. 11, p. 1-7. ISSN: 1424-8220.
- III. **KUČERA, D.**; BENEŠOVÁ, P.; LADICKÝ, P.; PEKAŘ, M.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. Production of Polyhydroxyalkanoates Using Hydrolyzates of Spruce Sawdust: Comparison of Hydrolyzates Detoxification by Application of Overliming, Active Carbon, and Lignite. Bioengineering, 2017, roč. 4, č. 2, s. 1-9. ISSN: 2306-5354.
- IV. BENEŠOVÁ, P.; **KUČERA, D.**; MÁROVÁ, I.; OBRUČA, S. Chicken feather hydrolysate as an inexpensive complex nitrogen source for PHA production by *Cupriavidus necator* on waste frying oils. Letters In Applied Microbiology, 2017, roč. 65, č. 2, s. 182-188. ISSN: 0266-8254.
- V. **KUČERA, D.**; NOVÁČKOVÁ, I.; PERNICOVÁ, I.; OBRUČA, S. Evolutionary engineering of *Cupriavidus necator* for improved utilization levulinic acid. Abstracts of the 18th European Congress on Biotechnology. New Biotechnology. 2018. s. 93-93. ISSN: 1871-6784.
- VI. NOVACKOVA, I.; **KUCERA, D.**; PORIZKA, J.; PERNICOVA, I.; SEDLACEK, P.; KOLLER, M.; KOVALCIK, A.; OBRUCA, S. Adaptation of *Cupriavidus necator* to levulinic acid for enhanced production of P(3HB-co-3HV) copolyesters. Biochemical Engineering Journal, 2019, 151. doi:10.1016/j.bej.2019.107350
- VII. PERNICOVA, I.; **KUCERA, D.**; NOVACKOVA, I.; VODICKA, J.; KOVALCIK, A.; OBRUCA, S. Extremophiles - Platform Strains for Sustainable Production of Polyhydroxyalkanoates. Materials Science Forum, 2019, roč. 955, s. 74-79. doi:10.4028/www.scientific.net/MSF.955.74
- VIII. **KUČERA, D.**; PERNICOVÁ, I.; KOVALČÍK, A.; KOLLER, M.; MÜLLEROVÁ, L.; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; NEBESÁŘOVÁ, J.; KALINA, M.; MÁROVÁ, I.; KRZYŽÁNEK, V.; OBRUČA, S. Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*. BIORESOURCE TECHNOLOGY, 2018, roč. 256, č. 1, s. 552-556. ISSN: 0960-8524.

- IX.** KOVALČÍK, A.; KUČERA, D.; MATOUŠKOVÁ, P.; PERNICOVÁ, I.; OBRUČA, S.; KALINA, M.; ENEV, V.; MÁROVÁ, I. Influence of removal of microbial inhibitors on PHA production from spent coffee grounds employing *Halomonas halophila*. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2018, roč. 6, č. 2, s. 3495-3501. ISSN: 2213-3437.
- X.** KUČERA, D.; NOVÁČKOVÁ, I.; PERNICOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. Biotechnological Production of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-4-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) Terpolymer by *Cupriavidus* sp. DSM 19379. Bioengineering, 2019, roč. 6, č. 3, s. 74-84. ISSN: 2306-5354.

## 8.1 Podíl na publikovaných člancích:

- I.** Dan Kučera vypracoval komplexní koncepci experimentální práce, v rámci experimentální práce se věnoval kultivacím a analýze mikrobiálních buněk pomocí plynové chromatografie a průtokové cytometrie. Spolupodílel se také na přípravě vzorků pro další analýzy. V rámci přípravy publikace připravil většinu textu. Podle systému Apollo mu v autorském kolektivu přísluší autorský podíl 35 %.
- II.** Dan Kučera se podílel na návrhu experimentálních strategií, v rámci experimentální práce se věnoval kultivacím a analýze mikrobiálních buněk pomocí plynové chromatografie a spolupodílel se na přípravě vzorků pro další analýzy. Na publikaci se podílel popisem materiálů a metod, a také na diskusi a interpretaci výsledků. Podle systému Apollo mu v autorském kolektivu přísluší autorský podíl 24 %.
- III.** Dan Kučera se podílel na návrhu experimentů a experimentálních strategií, v rámci experimentální práce se věnoval přípravě médií založených na lignocelulóзовých hydrolyzátech a jejich detoxifikaci a následným využitím ke kultivacím. Analyzoval mikrobiální buňky pomocí plynové chromatografie a získané hydrolyzáty pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie. V rámci přípravy publikace připravil většinu textu a zajistil komunikaci s recenzenty v průběhu recenzního řízení. Podle systému Apollo mu v autorském kolektivu přísluší autorský podíl 30 %.
- IV.** Dan Kučera se podílel na návrhu experimentů, v rámci experimentální práce se věnoval přípravě hydrolyzátů peří, které využil ke kultivacím. Dále se věnoval analýze mikrobiálních buněk pomocí plynové chromatografie a spolupodílel se na přípravě vzorků pro další analýzy. V rámci přípravy publikace se podílel na přípravě výsledků a jejich diskusi. Podle systému Apollo mu v autorském kolektivu přísluší autorský podíl 30 %.
- V.** Dan Kučera se podílel na návrhu experimentů a experimentálních strategií, v rámci experimentální práce se věnoval přípravě evolvovaných kultur a jejich kultivací. Dále pak analýze mikrobiálních buněk pomocí plynové chromatografie a spolupodílel se na přípravě vzorků pro další analýzy. Abstrakt připravil sám a následně jej prezentoval na

zahraniční konferenci. Podle systému Apollo mu v autorském kolektivu přísluší autorský podíl 25 %.

- VI.** Práce z velké části navazuje na předchozí abstrakt (Příloha V). Dan Kučera se podílel na návrhu experimentů a experimentálních strategií, v rámci experimentální práce se věnoval přípravě evolvovaných kultur a jejich kultivací. Dále pak analýze mikrobiálních buněk pomocí plynové chromatografie a spolupodílel se na přípravě vzorků pro další analýzy. V rámci přípravy publikace se podílel zpracování sekce „materiály a metody“, na přípravě výsledků a jejich dizkuzi. Podle systému Apollo mu v autorském kolektivu přísluší autorský podíl 15 %.
- VII.** Dan Kučera se v rámci experimentální práce se věnoval kultivacím a analýze mikrobiálních buněk pomocí plynové chromatografie a spolupodílel se na přípravě vzorků pro další analýzy. V rámci přípravy publikace se podílel zpracování části „materiály a metody“, na přípravě výsledků a jejich dizkuzi. Podle systému Apollo mu v autorském kolektivu přísluší autorský podíl 25 %.
- VIII.** Dan Kučera vypracoval komplexní koncepci experimentální práce, v rámci experimentální práce se věnoval kultivacím a analýze mikrobiálních buněk pomocí plynové chromatografie a spolupodílel se na přípravě vzorků pro další analýzy. V rámci přípravy publikace byl koordinátorem, který zajistil návaznost jednotlivých kapitol vzhledem k širokému autorskému týmu a připravil většinu sekce „materiály a metody“, podílel se na interpretaci a dizkuzi výsledků. Podílel se na korespondenci v rámci recenzního řízení. Podle systému Apollo mu v autorském kolektivu přísluší autorský podíl 20 %.
- IX.** Dan Kučera se podílel na vypracování návrhu koncepce celé práce, v rámci experimentální práce se věnoval kultivacím, které zahrnovaly především přípravu a detoxifikaci médií, a analýze mikrobiálních buněk pomocí plynové chromatografie a spolupodílel se na přípravě vzorků pro další analýzy. V rámci přípravy publikace připravil větší část výsledků a podílel se jejich dizkuzi. Podle systému Apollo mu v autorském kolektivu přísluší autorský podíl 15 %.
- X.** Dan Kučera se podílel na návrhu experimentů a experimentálních strategií, v rámci experimentální práce se věnoval kultivacím, analýze mikrobiálních buněk pomocí plynové chromatografie a izolaci získaného polymeru. Dále se spolupodílel se na přípravě vzorků pro další analýzy. V rámci přípravy publikace připravil většinu textu a zajistil komunikaci s recenzenty v průběhu recenzního řízení. Podle systému Apollo mu v autorském kolektivu přísluší autorský podíl 35 %.

# 9 PŘÍLOHY

## 9.1 Příloha I

### COMPARISON OF FLOW CYTOMETRY AND RAMAN SPECTROSCOPY AS METHODS FOR RAPID DETERMINATION OF INTRACELLULAR CONTENT OF POLYHYDROXYALKANOATES IN BACTERIAL CELLS

**Kučera D.**<sup>1,2</sup>, Samek O.<sup>3</sup>, Müllerová L.<sup>1,2</sup>, Benešová P.<sup>1,2</sup>, Obruča S.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Materials Research Centre, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 464/118, 61200, Brno, Czech Republic

<sup>2</sup>Institute of Food Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 464/118, 61200, Brno, Czech Republic

<sup>3</sup>Institute of Scientific Instruments of the ASCR, v.v.i., Brno, Czech Republic  
Dan.Kucera@vut.cz

#### Abstract

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are bacterial polyesters which are considered as biodegradable and environmentally-friendly alternative to petrochemical plastics. Biotechnological production of PHAs is complicated by the lack of fast and reliable analytical tool enabling rapid and sensitive determination of PHAs in bacterial cells during the biotechnological process. The most commonly employed method for quantitative analysis of PHAs is gas chromatography, nevertheless, labour intensity and time demands of this methods prevents its application for routine analysis of PHAs during biotechnological process. The aim of this work was to compare two analytical methods which could be used for determination of intracellular content in time-frame of 20 minutes - Flow cytometry and Raman spectroscopy.

#### Introduction

PHAs are polyesters of natural origin accumulated as carbon and energy storage materials in a form of intracellular granules by a wide variety of bacterial strains including Gram-negative and Gram-positive species (i.e. autotrophic, heterotrophic and phototrophic microorganisms, aerobes and anaerobes) as well as for some Archae strains. Due to their mechanical properties resembling synthetic polymers and their fully biodegradable and biocompatible nature, PHAs are considered being ecologically-friendly alternative for petrochemical plastics.

Biotechnological production of PHAs is complicated by the lack of fast and reliable analytical tool enabling rapid and sensitive determination of PHAs in bacterial cells during the biotechnological process. The most commonly employed method for quantitative analysis of PHAs is gas chromatography, nevertheless, labour intensity and time demands of this methods prevents its application for routine analysis of PHAs during biotechnological process. Apart from gas chromatography, there are other techniques (such as gravimetric and turbidimetric analysis, UV spectroscopy, optical fluorescence or electron microscopy etc.) which can be used for determination of PHAs in bacterial cells<sup>1</sup>, nevertheless most of them are time consuming and/or do not provide sufficient reliability or sensitivity to be used in PHAs production process control.

The surface analysis technique of Raman spectroscopy is slowly becoming a well-recognized analytical technique because of the identification of its competitive position amongst other techniques. Raman spectroscopy has an extremely competitive position if in-situ, fast analysis is required, for instance, at process bioproduction line. The sample does not have to be prepared for analysis using solvents, the technique is label free and with minimal interference from water.

Flow cytometry is another feasible method to measure PHB content in cells by measuring the change in the cellular light scattering properties caused by the formation of PHB granules. A more sensitive method utilizing of staining the cellular PHB with Nile red. These optical methods allow for almost real-time online measurement of PHB for bioreactor monitoring, control and optimization. Furthermore, flow cytometric methods provide information on the single cell distribution of PHB content, which cannot be obtained in conventional physiological studies. However background staining of intracellular lipids reduces the sensitivity of the method<sup>2</sup>.

#### Materials and methods

Microorganisms and their cultivation

*Cupriavidus necator* H16 (CCM 3726) was obtained from the Czech Collection of Microorganisms, Brno, Czech Republic.

To obtain cells with various intracellular content of PHB, culture of *C. necator* H16 was cultivated in Erlenmeyer flasks (volume 250 mL) containing 100 mL of Mineral Salt (MS) medium described elsewhere<sup>3</sup> containing

various concentrations of fructose (5-20 g/l) as a sole carbon source and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1-5 g/l) as a sole nitrogen source. The flasks were inoculated by 5 mL of the overnight culture of a cells grown in Nutrient Broth medium (NB medium, 10 g peptone, 10 g beef extract, 5 g NaCl in 1 L of distilled water). The samples were taken at various cultivation times, the cells were harvested (centrifugation, 8000×g, 5 min) and PHB content was analysed by gas chromatography, Raman Spectroscopy and Flow cytometry.

Before PHB analysis by gas chromatography, the cells washed with 5% (vol/vol) Triton X (10 ml) and distilled water, respectively and dried overnight at 105°C. After that the PHB content of dried cells was analysed by gas chromatography (Trace GC Ultra, Thermo Scientific, USA) as reported by Brandl et al. <sup>4</sup>. Commercially available PHB (Sigma Aldrich, Germany) was used as a standard; benzoic acid (LachNer, Czech Republic) was used as an internal standard.

#### *Flow cytometry*

Bacterial suspension was diluted by PBS to concentration  $10^6$  cells in 1 ml. The cells were washed with PBS, fixed by 20% ethanol 10 minutes in 4 °C and resuspended in PBS. 5 µm of solution of Nile Red (Sigma Aldrich, Germany, 1mg/ml DMSO) was added. Flow cytometer Apogee A50 (Apogee Flow Systems Ltd., UK) with a laser with a wavelength of 488 nm was utilized to measure the single cell fluorescence intensity after staining. Nile red fluorescence was measured using a  $590 \pm 35$  nm band pass filter. Mean fluorescence intensity, small-angle scattering (SALS) and large-angle scattering (LALS) were used for calibration curves.

#### *Raman spectroscopy*

To prepare samples for Raman analysis, aliquots of washed cells were dried on CaF glass at room temperature. Dried cells were analysed using a Renishaw InVia system (Renishaw inVia Raman Spectrometer, Renishaw plc., Wotton-under-Edge, UK), with 785 nm single-mode diode laser as the excitation source. A laser beam was focused onto a sample by the microscope objective (Leica, Wetzlar, Germany, 50×, NA (Numerical aperture) 0.5) with the laser spot diameter of approximately  $2 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$  (note that such laser spot shape is characteristic for the Renishaw inVia instrument), with full axial depth of the excitation region at 8 µm. The laser was focused onto a surface of the sample. Overview spectra were acquired in the range of 700–1800  $\text{cm}^{-1}$ . Each spectrum used for calibration was measured for 15 s from different parts of a dried sample in a total of 3 measurements for one sample and averaged.

Bacterial samples were first transferred from the culture media, centrifuged and washed. Then, small drop of sample was placed on CaF microscopic slide and dried at room temperature.

#### *Raman data processing*

The Raman spectra were treated with the Savitzky-Golay coupled advanced rolling filter background removal routine (see <sup>3</sup>), normalized to Amide I ( $1656 \text{ cm}^{-1}$ ) and DNA ( $878 \text{ cm}^{-1}$ ) and subsequently emission line intensities of interest were estimated for construction of calibration curves using the program written in-house using MatLab software (MathWorks, Natick, MA, USA). As already mentioned, obtained spectra were normalized to the peak assigned to the DNA and Amide I. Both Raman features are present in all of the tested microorganisms and were used for internal standardization following numerous tests to use this peak intensity.

## **Results and discussion**

#### *Calibration of PHB concentration by Flow cytometry*

The measured fluorescence intensity, LALS and SALS was compared with the cellular PHB content obtained from gas chromatography, and a linear regression was performed to quantify the relationship (Fig.1). Approached linearity of dependence PHB content on mean LALS and SALS is lower than on FL3 channel. The method not seems to be sufficiently accurate and has considerable drawbacks in the range of values between 0 and 30% PHB. Possibility to increase the accuracy of quantification PHAs by flow cytometry could be achieved by using another fluorophores such as BODIPY 439/503. Use of Nile Red for this purpose is insufficient. On the contrary, Flow cytometry providing analysis of bacterial cells at single-cell-level can be used to study distribution of PHA among bacterial population under investigation.

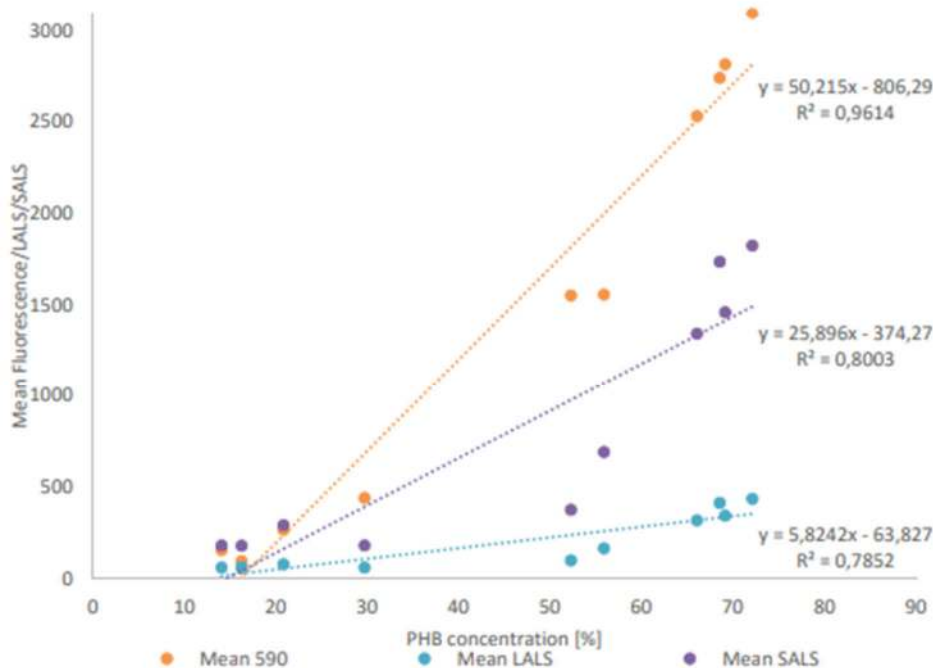


Figure 1. Calibration plot for PHB in *C. necator* over a PHB concentration. Approached linearity of dependence PHB content on large and small angle light scattering is lower than on FL3 channel. Coefficient of determination reached 0.96.

Raman micro-spectroscopic experiments with PHB producing bacteria were carried out using Renishaw Invia system. Fig. 2 shows a typical Raman spectrum, here for *Cupriavidus necator* H16 cultured directly on a Petri dish. It should be pointed out that for the sake of simplicity the samples can be analysed directly on the Petri dishes on which the bacteria were cultivated.

The whole cell Raman spectrum revealed some characteristic emission lines which can be attributed to common cell components such as DNA (786  $\text{cm}^{-1}$ ), phenylalanine (1005  $\text{cm}^{-1}$ ) or proteins and lipids (so called Amide I at 1662  $\text{cm}^{-1}$ ). PHB provides several Raman peaks (837, 1455, 1736  $\text{cm}^{-1}$ ) which can be theoretically used for PHB identification and further analysis. Among them, the emission lines at 1736  $\text{cm}^{-1}$  can be considered being the most useful because no other biomolecule, present in bacterial cells, interferes at this emission line.

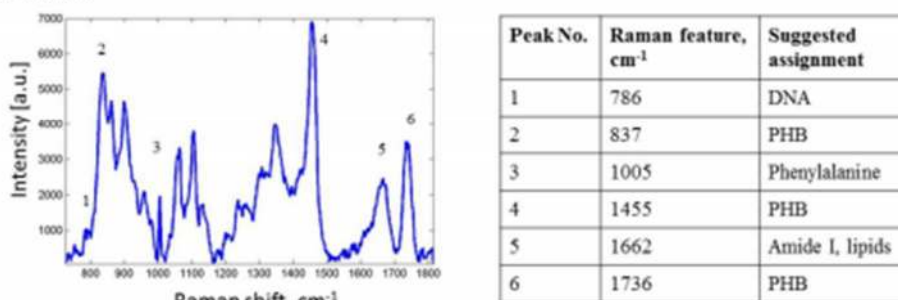


Figure 2. (a) Raman spectra of *Cupriavidus necator* H16 cultivated on Petri dish. (b) list of selected emission lines. Note that peaks 1, 5 and 6 were used for calibration of PHB in the bacteria sample - No.: 6 for PHB, No.: 5 internal standard (Amide I), and No.: 1 internal standard (DNA).

For the calibration, reference samples of various PHB contents were prepared and the exact amounts of PHB in these samples were determined using an established method of gas chromatography (GC). The reference samples with PHB concentrations in the range from 12 to 90 % (w/w) were used. Since it can be expected that intracellular concentration of proteins and nucleic acid is more or less constant in the samples, lines at  $787\text{ cm}^{-1}$  (DNA) and at  $1662\text{ cm}^{-1}$  (Amide I) were proposed as internal standards for reliable calibration procedure. Consequently, the average PHB/DNA and PHB/Amide ratio value for each sample was plotted vs. its reference value. The resulting calibration curves are shown in Fig. 3.

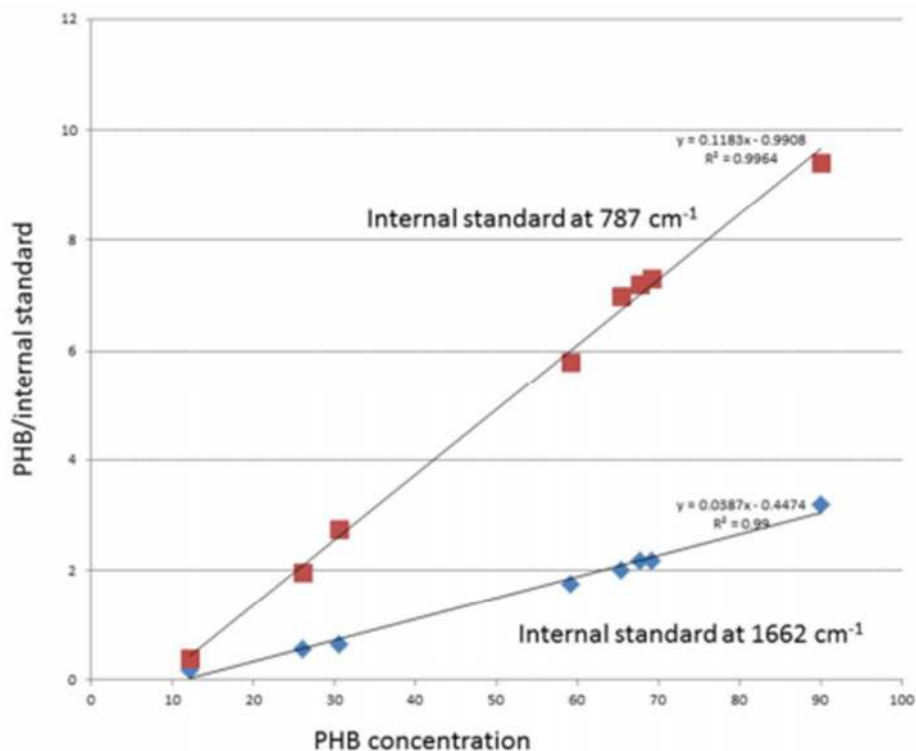


Figure 3. Calibration plot for PHB in *C. necator* over a PHB concentration range 12-90 % (by mass). For upper calibration curve (squares) emission line at  $787\text{ cm}^{-1}$  (DNA) was used as an internal standard. The bottom calibration curve was constructed using line at  $1662\text{ cm}^{-1}$  (Amide I) as an internal standard. Error bars do not exceed the size of the symbols. Coefficient of determination reached 0.99.

In summary, we have shown that it is possible to perform fast quantitative Raman spectroscopy analysis to monitor PHB concentrations in *Cupriavidus necator* H16. The data from bacterial samples fitted well the straight line of calibration curve with coefficient of determination of 0.99. Raman spectroscopy excels in the speed of the identification/quantification process over the most commonly used existing routine chemical techniques such as Gas Chromatography.

Entire procedure of sample preparation and analysis for Raman spectroscopy and Flow cytometry takes about 17 minutes. Determination of PHA by GC takes more than 8 hours.

### Conclusion

In general, both techniques can be used for fast determination of intracellular PHA content, nevertheless, Raman spectroscopy seems to be more suitable and reliable technique for purpose of PHA production process monitoring. Based on our experience, its performance can be compared to GC-FID. On the contrary, Flow cytometry providing analysis of bacterial cells at single-cell-level can be used to study distribution of PHA among bacterial population under investigation.



## Acknowledgement

*This work was supported by the COST CZ project LD 15031 of the Czech Ministry of Education, Youth and Sports of The Czech Republic and the Czech Science Foundation (GACR) [GA15-206455]. MaterialsResearch Centre - Sustainability and Development" Nr. LO1212, of the Ministry of Education, Youth and Sports.*

## References

1. Koller M., Salerno A., Dias M., Reitere A., Braunegg G.: Food technol and biotechnol, 48, 255 (2010)
2. Kacmar J., Carlson R., Balogh S.J., Srienc F.: Cytometry Part A., 69A, 27 (2006)
3. Obruca S., Benesova P., Oborna J., Marova I.: Biotechnol Lett, 36, 775 (2014).
4. Brandl H., Gross R. A., Lenz R. W., Fuller R. C.: Appl and Env Microbiol 54. 1977 (1988).
5. Samek O., Jonas A., Pilat Z., Zemanek P., Nedbal L., Triska J., Kotas, P., Trtilek M.: Sensors, 10, 8635 (2010).

## 9.2 Příloha II

Sensors 2016, 16(11), 1808; doi:10.3390/s16111808

Open Access

Technical Note

### Quantitative Raman Spectroscopy Analysis of Polyhydroxyalkanoates Produced by *Cupriavidus necator* H16

Ota Samek <sup>1,\*</sup> , Stanislav Obruča <sup>2</sup> , Martin Šiler <sup>1</sup> , Petr Sedláček <sup>2</sup> , Pavla Benešová <sup>2</sup> , Dan Kučera <sup>2</sup> , Ivana Márova <sup>2</sup> , Jan Ježek <sup>1</sup> , Silva Bernatová <sup>1</sup>  and Pavel Zemánek <sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Institute of Scientific Instruments of the CAS, Brno 61264, Czech Republic

<sup>2</sup> Materials Research Centre, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Brno 61200, Czech Republic

\* Author to whom correspondence should be addressed.

Academic Editors: Sebastian Wachsmann-Hogiu and Zachary J. Smith

Received: 28 July 2016 / Accepted: 18 October 2016 / Published: 28 October 2016

**Abstract:** We report herein on the application of Raman spectroscopy to the rapid quantitative analysis of polyhydroxyalkanoates (PHAs), biodegradable polyesters accumulated by various bacteria. This theme was exemplified for quantitative detection of the most common member of PHAs, poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) in *Cupriavidus necator* H16. We have identified the relevant spectral region (800–1800  $\text{cm}^{-1}$ ) incorporating the Raman emission lines exploited for the calibration of PHB (PHB line at 1736  $\text{cm}^{-1}$ ) and for the selection of the two internal standards (DNA at 786  $\text{cm}^{-1}$  and Amide I at 1662  $\text{cm}^{-1}$ ). In order to obtain quantitative data for calibration of intracellular content of PHB in bacterial cells reference samples containing PHB amounts—determined by gas chromatography—from 12% to 90% (w/w) were used. Consequently, analytical results based on this calibration can be used for fast and reliable determination of intracellular PHB content during biotechnological production of PHB since the whole procedure—from bacteria sampling, centrifugation, and sample preparation to Raman analysis—can take about 12 min. In contrast, gas chromatography analysis takes approximately 8 h.

**Keywords:** Raman spectroscopy; *Cupriavidus necator* H16; polyhydroxyalkanoates

#### 1. Introduction

PHAs are polyesters of natural origin accumulated as carbon and energy storage materials in a form of intracellular granules by a wide variety of bacterial strains including Gram-negative and Gram-positive species (i.e., autotrophic, heterotrophic, and phototrophic microorganisms, aerobes and anaerobes) as well as for some Archae strains. Due to their mechanical properties resembling synthetic polymers and their fully biodegradable and biocompatible nature, PHAs are considered being ecologically friendly alternative for petrochemical plastics [1,2]. Nevertheless, there are several aspects that prevent PHAs from massively entering the market. The cost of PHAs is significantly higher than that of synthetic polymers. Since about 45% of the total costs of PHA production are ascribed to carbon sources, such as refined glucose or sucrose. Therefore, cheap wastes or side products of agriculture and food industry, are used as inexpensive carbon substrates, improving thus the economic feasibility of the PHA production [2,3]. Further, the biotechnological production of PHAs is also complicated by the lack of fast and reliable analytical tools enabling the rapid and sensitive determination of PHAs in bacterial cells during the biotechnological process. The most commonly employed method for quantitative analysis of PHAs is gas chromatography; nevertheless, the labor intensity and time demands of this method prevents its application for routine analysis of PHAs during the biotechnological process. Apart from gas chromatography, there are other techniques (such as gravimetry, turbidimetry, UV spectroscopy, optical fluorescence, and electron microscopy) that can be used for the determination of PHAs in bacterial cells [4], but most of them are time consuming or do not provide sufficient reliability or sensitivity to be used in the PHA production process control.

Therefore, the main aim of our study was to utilize Raman spectroscopy for the quantitative determination of the most common member of PHAs family, poly(3-hydroxybutyrate) (PHB). For this purpose, cells with various contents of PHB are referenced to selected internal standards using dedicated Raman spectra of bacterial strain *Cupriavidus necator* H16, which is considered a model microorganism for PHA metabolism and a valid candidate for the industrial production of PHAs.

The technique of Raman spectroscopy is slowly becoming a well recognized analytical technique because of the identification of its competitive position amongst other techniques [5,6,7]. Raman spectroscopy has an extremely competitive position if in situ, contactless, noninvasive, and fast analysis is required, say, on-line in biotechnological processes. The sample does not have to be prepared for analysis using solvents; the technique is label free with minimal interference from water [8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19].

For the analysis of PHB-producing bacteria, experiments have recently been performed in which PHB spectra were recognized [19,20]. Additionally, studies using the IR-Raman technique were performed on different polymers [21,22].

However, studies [19,20] do not provide reliable quantitative analysis over the entire range of PHB concentrations required by biotechnological production. In [19], the authors used Raman band intensities plotted against PHB content determined by HPLC. The highest concentration of PHB was about 0.2 g/L (note that industrial applications require concentrations of about tens of g/L). *Cupriavidus necator* H16 has been used recently to monitor the PHB fermentation process [23] using the intensities of the Raman bands.

In contrast, our work presents Raman intensity ratios that, rather than simply use the spectral intensity, were recorded and used to construct a calibration curve. This process is often referred to as internal standardization and eliminates different experimental factors such as laser power and instrumental effects. Recently, internal standardization employing Raman spectroscopy was used for the rapid determination of the quality of turmeric roots [24].

Thus, our study presents full calibration curves based on internal standards covering a large range of PHB concentrations—up to 90% (w/w). To the best of our knowledge, such data has not been published previously. Our results are convincing, and we believe that our study will be of significant assistance to research groups being involved in the biotechnological production of PHB.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Microorganisms and Their Cultivation

*Cupriavidus necator* H16 (CCM 3726) was obtained from the Czech Collection of Microorganisms (Masaryk University, Faculty of Science, Brno, Czech Republic).

To obtain cells with various amounts of intracellular content of PHB, a culture of *Cupriavidus necator* H16 was cultivated in Erlenmeyer flasks (volume 250 mL) containing 100 mL of a mineral salt (MS) medium described elsewhere [25] containing various concentrations of fructose (5–20 g/L) as a sole carbon source and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1–5 g/L) as a sole nitrogen source. The flasks were inoculated by 5 mL of an overnight culture of cells grown in a nutrient broth (NB) medium (NB medium: 10 g of peptone, 10 g of beef extract, and 5 g of NaCl in 1 L of distilled water). The samples were taken at various cultivation times, the cells were harvested (centrifugation,  $8000\times g$ , 5 min), and PHB content was analyzed via gas chromatography and Raman spectroscopy.

Before PHB analysis via gas chromatography, the cells washed with 5% (vol/vol) Triton X (10 mL) and distilled water and dried overnight at 105 °C. Consequently, the PHB content of dried cells was analyzed via gas chromatography (Trace GC Ultra, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Commercially available PHB (Sigma Aldrich, Germany) was used as a standard; benzoic acid (LachNer, Neratovice, Czech Republic) was used as an internal standard.

### 2.2. Bacterial Sample Preparation and Estimated Time Frame for Analysis

To prepare samples for Raman analysis, the following steps were addressed:

- (a) One milliliter of bacterial culture was transferred into a 1.5 mL tube, and the cells were centrifuged (10,000 rpm, 2 min), washed with 50% ethanol, and centrifuged again (total 5 min).
- (b) In the next step, the supernatant was aspirated, and approx. 20  $\mu\text{L}$  of cell pellets formed via centrifugation was pipetted onto a CaF (Raman grade) microscope slide (1 min).
- (c) The cell suspensions were air-dried (approx. 5 min) at laboratory temperature and analyzed using a Raman instrument (1 min).

Thus, the entire procedure of sample preparation and analysis takes about 12 min, while that of GC technique analysis takes approximately 8 h. Note that the air drying step can be skipped so that only the pipetted sample can be measured. We found that focusing on the dried sample is easier, so that is why this step was also included in the above procedure.

### 2.3 Raman Spectroscopy

Cells were analyzed using a Renishaw InVia system (Renishaw inVia Raman Spectrometer, Renishaw plc., Wotton under Edge, UK), with a 785 nm single-mode diode laser as the excitation source. A laser beam was focused onto a sample by the microscope objective (50 $\times$ , NA 0.5, Leica, Wetzlar, Germany) with a laser spot diameter of approximately  $2\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ , which is a characteristic feature for this type of Raman spectroscopy instrument supplied by Renishaw. Overview spectra were acquired in the range of 700–1800  $\text{cm}^{-1}$ . Each spectrum used for calibration was measured for 15 s in a total of 3 measurements for one sample.

### 2.4 Data Analysis

The Raman spectra were treated with the Savitzky–Golay procedure coupled with an advanced rolling filter background removal routine (see [12]), normalized to Amide I (1656  $\text{cm}^{-1}$ ) or DNA (878  $\text{cm}^{-1}$ ); subsequently, emission line intensities of interest were estimated and averaged for the construction of the calibration plot. The program written in-house using MatLab software (MathWorks, Natick, MA, USA) was used. Both Raman features used for normalization are present in the tested

microorganisms and were used for internal standardization after following numerous tests exploring the reliability of these internal standards.

### 3. Results and Discussion

Figure 1 shows a typical Raman spectrum, here for *Cupriavidus necator* H16 cultured directly on a Petri dish. It should be pointed out that, for the sake of simplicity, the samples can be also analyzed directly on the Petri dishes on which the bacteria were cultivated.

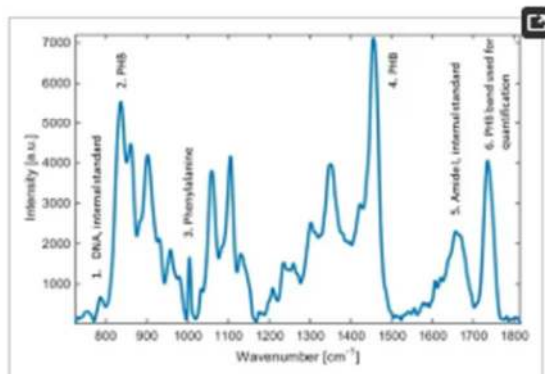


Figure 1. Raman spectra of *Cupriavidus necator* H16. Selected emission lines used in our study are highlighted. Note that peaks 1, 5, and 6 can be used for analysis of PHB in the bacteria sample—peak 6 represents the PHB band used in this study, peak 5 is an internal standard (Amide I), and peak 1 is a second internal standard (DNA).

As can be seen from Figure 1, the whole cell Raman spectrum revealed some characteristic emission lines which can be attributed to common cell components such as DNA (phosphodiester bond at 786 cm<sup>-1</sup>), proteins (phenylalanine at 1005 cm<sup>-1</sup>), Amide I (1662 cm<sup>-1</sup>), and lipids (C–H vibrations at 1449 cm<sup>-1</sup> or 1301 cm<sup>-1</sup>). PHB provides several Raman peaks (837, 1455, and 1736 cm<sup>-1</sup>) that can be used for PHB identification and further analysis. Among them, the emission lines at 1736 cm<sup>-1</sup> were selected and can be considered to be the most useful candidate because the vibrations of the other components of bacterial cells do not interfere with this emission line.

For the calibration, reference samples of various PHB contents were prepared and the exact amounts of PHB in these samples were determined using an established method of gas chromatography (GC). Reference samples with PHB concentrations in the range from 12% to 90% (w/w) were used, as detailed in Table 1. Since it can be expected that intracellular concentration of proteins and nucleic acid is more or less constant with varying intracellular PHB concentration, line intensities at 787 cm<sup>-1</sup> (DNA) and at 1662 cm<sup>-1</sup> (Amide I) were proposed as internal standards for a reliable calibration procedure (Figure 1). Thus, the acquired Raman spectra of the PHB line were normalized to one of these values (see Table 1). Consequently, the two resulting calibration curves are shown in Figure 2.

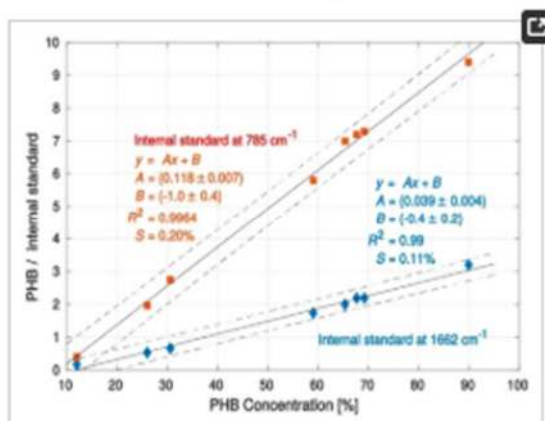


Figure 2. Calibration plot for PHB in *Cupriavidus necator* over a PHB concentration range of 12%–90% (by mass). The upper calibration curve (red squares) emission line at 787 cm<sup>-1</sup> (DNA) was used as an internal standard. The bottom calibration curve was constructed using a line at 1662 cm<sup>-1</sup> (Amide I) as an internal standard. The dashed

curves show a 95% confidence band of linear fit. Parameters describing the calibration curves are shown in the figure (including 95% error interval).  $R^2$  is the coefficient of determination.  $S$  is the mean square error. The calibration curve provides an excellent fit to the data over the region of interest. Normalized intensities of emission lines used for calibration and cultivation conditions and media used for growing bacteria are listed in Table 1.

**Table 1.** Data used for the construction of calibration curves shown in Figure 2. PHB reference values were estimated using the GC technique. Cultivation conditions for each reference sample are also provided.

Cultivation Conditions	PHB %	Intensity of PHB Line at 1736 $\text{cm}^{-1}$ (Normalized on Amide I at 1662 $\text{cm}^{-1}$ )	Intensity of PHB Line at 1736 $\text{cm}^{-1}$ (Normalized on DNA at 785 $\text{cm}^{-1}$ )
<i>Cupriavidus necator</i> H16			
MS medium, 5 g/L fructose, 1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , from Petri dish, 72 h of cultivation	12.1	0.17	0.39
<i>Cupriavidus necator</i> H16			
MS medium, 5 g/L fructose, 3 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 72 h of cultivation	26.1	0.55	2.0
<i>Cupriavidus necator</i> H16			
NB medium, 24 h of cultivation	30.6	0.65	2.7
<i>Cupriavidus necator</i> H16			
MS medium, 20 g/L fructose, 1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 24 h of cultivation	59.1	1.8	5.8
<i>Cupriavidus necator</i> H16			
MS medium, 20 g/L fructose, 3 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 24 h of cultivation	65.4	2.0	7.0
<i>Cupriavidus necator</i> H16			
MS medium, 20 g/L fructose, 3 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 24 h of cultivation	67.7	2.2	7.2
<i>Cupriavidus necator</i> H16			
MS medium, 20 g/L fructose, 3 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 72 h of cultivation	69.2	2.2	7.3
<i>Cupriavidus necator</i> H16			
MS medium, 20 g/L fructose, 3 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 72 h of cultivation	90.0	3.2	9.4

In our experiments, we focused on bacteria (*Cupriavidus necator* H16) that are a model producer of PHB. Ideally, more reference samples should be used to construct a calibration curve. During this work, however, only eight referenced samples covering concentrations of interest for biotechnological production (with PHB determined by gas chromatography) were available.

The calibration curves clearly show an excellent linear fit to the data over the region of interest. It can be seen that all measured data points can be found close to the center of the 95% confidence bounds. In order to validate or justify our calibration set and curves, we performed a cross-validation based on the "leave-one-out" cross-validation method. The slopes of lines fitted to the training sets corresponded with the presented experimental results for the full data sets. Moreover, the root mean square error taken from all validation points was significantly smaller than the width of the presented 95% confidence band. This demonstrates the statistical significance of the data. Therefore, we believe that the presented results are based on solid data, and the calibration curve can be readily used in different biotechnological applications, exploiting PHB amounts in *Cupriavidus necator* H16 during the cultivation process.

It should be noted that the calibration curves are limited only for the amorphous state of the polymer found inside the cells. We noticed that only in a few cases (most likely depending on incorrect treatment of cells before analysis) could the amorphous state be changed such that crystallization appears as a great enhancement of intensity or shift of PHB-corresponding Raman peaks [26]. This can be favorably solved—the qualitative difference between crystalline and amorphous polymer states can be evaluated by simply monitoring the position of the PHB line of interest (peak 6 in Figure 1) within the spectra. In the case of crystallization, this band may vary up to 15  $\text{cm}^{-1}$  (from 1736  $\text{cm}^{-1}$  to about 1721  $\text{cm}^{-1}$ ) in the Raman spectra of bacteria, which is a clear sign that the crystallization will occur and can be readily controlled by the naked eye.

We used a univariate approach because it is simple to use. Indeed, we have tried multivariate approaches, however, we have not obtained any reasonable improvement of our results. Note that, for other PHB-producing bacterial strains, we considered that the amount of proteins and DNA (which we used as internal standards) is different for different species producing PHB. Thus, our calibration curve should not be used as a generic tool for the quantification of PHB in different PHB-producing strains.

#### 4. Conclusions

In summary, we have herein demonstrated an easy-to-apply Raman spectroscopy technique for the qualitative and quantitative determination of the amount of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) in bacteria *Cupriavidus necator* H16. The technique is applicable to near real-time and in-situ monitoring at the process control of PHB bio production. Here, Raman spectroscopy demonstrates clear benefits over existing chemical means of identification, such as gas chromatography in the speed and noninvasivity of the quantification process.

#### Acknowledgments

This work was supported by the Czech Science Foundation (GA15-20645S), the infrastructure by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (LO1212), and the European Commission (ALISI ED0017/01/01).

#### Author Contributions

Ota Samek, Pavel Zemánek, Stanislav Obruča, and Petr Sedláček initiated, designed, and structured the study, drafted the manuscript, and performed experiments. Silvie Bernatová, Pavla Benešová, Dan Kučera, Ivana Márová, and Jan Ježek participated in the design of the study, analyzed extensive sample sets, performed statistical analysis using in-house written routines, and were responsible for the cultivation of samples. Martin Šiler contributed to the writing in-house analysis routines and participated in data analysis, coordination, and manuscript preparation.

#### Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

#### References

1. Smith, R. *Biodegradable Polymers for Industrial Applications*; CRC Press: Cambridge, UK, 2005; p. 245. [Google Scholar]
2. Tan, G.-Y.A.; Chen, C.-L.; Li, L.; Ge, L.; Wang, L.; Razaad, I.M.N.; Li, Y.; Zhao, L.; Mo, Y.; Wang, J.-Y. Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. *Polymers* **2014**, *6*, 708–754. [Google Scholar] [CrossRef]
3. Liu, C.C.; Zhang, L.L.; An, J.; Chen, B.; Yang, H. Recent strategies for efficient production of polyhydroxyalkanoates by micro-organisms. *Letts. Appl. Microbiol.* **2015**, *62*, 9–15. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
4. Koller, M.; Rodriguez-Contreras, A. Techniques for tracing PHA-producing organisms and for qualitative and quantitative analysis of intra- and extracellular PHA. *Eng. Life Sci.* **2015**, *15*, 558–581. [Google Scholar] [CrossRef]
5. Schie, I.W.; Huser, T. Methods and applications of Raman microspectroscopy to single-cell analysis. *Appl. Spectrosc.* **2013**, *67*, 813–828. [Google Scholar] [PubMed]
6. Afseth, N.K.; Bloomfield, M.; Wold, J.P.; Matousek, P.A. Novel approach for subsurface through-skin analysis of salmon using spatially offset raman spectroscopy (SORS). *Appl. Spectrosc.* **2014**, *68*, 255–262. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
7. De Gelder, J.; De Gussem, K.; Vandenabeele, P.; Moens, L. Reference database of Raman spectra of biological molecules. *J. Raman Spectrosc.* **2007**, *38*, 1133–1147. [Google Scholar] [CrossRef]
8. Brauchle, E.; Schenke-Leyland, K. Raman spectroscopy in biomedicine—Non-invasive in vitro analysis of cells and extracellular matrix components in tissues. *Biotechnol. J.* **2013**, *8*, 288–297. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
9. Samek, O.; Al-Marashi, J.F.M.; Telle, H.H. The potential of Raman spectroscopy for the identification of biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Laser Phys. Lett.* **2010**, *7*, 378–383. [Google Scholar] [CrossRef]
10. Samek, O.; Telle, H.H.; Harris, L.G.; Bloomfield, M.; Meck, D. Raman spectroscopy for rapid discrimination of *Staphylococcus epidermidis* clones related to medical device-associated infections. *Laser Phys. Lett.* **2008**, *5*, 465–470. [Google Scholar] [CrossRef]
11. Bernatová, S.; Samek, O.; Pilát, Z.; Šerý, M.; Ježek, J.; Ják, P.; Šiler, M.; Krzyžánek, V.; Zemánek, P.; Holá, V.; et al. Following the mechanisms of bacteriostatic versus bactericidal action using Raman spectroscopy. *Molecules* **2013**, *18*, 13188–13199. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
12. Samek, O.; Jonáš, A.; Pilát, Z.; Zemánek, P.; Nedbal, L.; Tríska, J.; Kotas, P.; Trtílek, M. Raman microspectroscopy of individual algal cells: Sensing unsaturation of storage lipids in vivo. *Sensors* **2010**, *10*, 8835–8851. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
13. Sandt, C.; Smith-Palmer, T.; Pink, J.; Brennan, L.; Pink, D. Confocal Raman microspectroscopy as a tool for studying the chemical heterogeneities of biofilms in situ. *J. Appl. Microbiol.* **2007**, *103*, 1808–1820. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

14. Choo-Smith, L.P.; Maquelin, K.; van Vreeswijk, T.; Bruining, H.A.; Puppels, G.J.; Ngo Thi, N.A.; Kirchner, C.; Naumann, D.; Ami, D.; Villa, A.M.; et al. Investigating microbial (Micro)colony heterogeneity by vibrational spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 1461–1469. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Samek, O.; Mlynáriková, K.; Bernatová, S.; Ježek, J.; Krzyžánek, V.; Šiler, M.; Zemánek, P.; Růžička, F.; Holá, V.; Mahelová, M. Candida parapsilosis Biofilm Identification by Raman Spectroscopy. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 23924–23935. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Maquelin, K.; Choo-Smith, L.P.; van Vreeswijk, T.; Endtz, H.P.; Smith, B.; Bennett, R.; Bruining, H.A.; Puppels, G.J. Raman Spectroscopic Method for Identification of Clinically Relevant Microorganisms Growing on Solid Culture Medium. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 12–19. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Maquelin, K.; Choo-Smith, L.P.; Endtz, H.P.; Bruining, H.A.; Puppels, G.J. Rapid identification of Candida species by confocal Raman microspectroscopy. *J. Clin. Microbiol.* **2002**, *40*, 594–600. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Espagnon, I.; Ostrovskii, D.; Mathey, R.; Dupoy, M.; Joly, P.L.; Novelli-Rousseau, A.; Pinston, F.; Gal, O.; Mallard, F.; Leroux, D.F. Direct identification of clinically relevant bacterial and yeast microcolonies and macrocolonies on solid culture media by Raman spectroscopy. *J. Biomed. Opt.* **2014**, *19*, 027004. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Gelder, J.; Willems-Erix, D.; Scholtes, M.J.; Sanchez, J.I.; Maquelin, K.; Vandenaabeele, P.; Boever, P.; Puppels, J.G.; Moens, L.; Vos, P. Monitoring poly(3-hydroxybutyrate) production in *Cupriavidus necator* DSM 428 (H16) with Raman spectroscopy. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 2155–2160. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Ciobota, V.; Burkhardt, E.M.; Schumacher, W.; Rosch, P.; Kusel, K.; Popp, J. The influence of intracellular storage material on bacterial identification by means of Raman spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 2929–2937. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Izumi, C.M.S.; Temperini, M. FT-Raman investigation of biodegradable polymers: Poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Vibrat. Spectr.* **2010**, *54*, 127–132. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
22. Naumann, D. FT-Infrared and FT-Raman spectroscopy in biomedical research. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2001**, *36*, 239–298. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
23. Tao, Z.; Peng, L.; Zhang, P.; Li, Y.-Q.; Wang, G. Probing the Kinetic Anabolism of Poly-Beta-Hydroxybutyrate in *Cupriavidus necator* H16 Using Single-Cell Raman Spectroscopy. *Sensors* **2016**, *16*, 1257. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Peng, P.; Zeng, C.; Zhou, Y.; Lian, S.; Nie, G. Rapid Determination of Turmeric Roots Quality Based on the Raman Spectrum of Curcumin. *Food Anal. Methods* **2015**, *8*, 103. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
25. Obruca, S.; Petrik, S.; Benesova, P.; Svoboda, Z.; Eremka, L.; Marova, I. Utilization of oil extracted from spent coffee grounds for sustainable production of polyhydroxyalkanoates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 5883–5890. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Sato, H.; Dybal, J.; Murakami, R.; Noda, I.; Ozaki, Y. Infrared and Raman spectroscopy and quantum chemistry calculation studies of C–H/O hydrogen bondings and thermal behavior of biodegradable polyhydroxyalkanoate. *J. Mol. Struct.* **2005**, *744–747*, 35–46. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 9.3 Příloha III



Article

### Production of Polyhydroxyalkanoates Using Hydrolyzates of Spruce Sawdust: Comparison of Hydrolyzates Detoxification by Application of Overliming, Active Carbon, and Lignite

Dan Kucera, Pavla Benesova, Peter Ladicky, Miloslav Pekar, Petr Sedlacek and Stanislav Obruca \*

Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkynova 118, 612 00 Brno, Czech Republic; Dan.Kucera@vut.cz (D.K.); pavla.benesova@vut.cz (P.B.); peter.ladicky@vut.cz (P.L.); pekar@fch.vut.cz (M.P.); sedlacek-p@fch.vut.cz (P.S.)

\* Correspondence: obruca@fch.vut.cz; Tel.: +420-541-149-486

Academic Editor: Martin Koller

Received: 28 April 2017; Accepted: 25 May 2017; Published: 28 May 2017

**Abstract:** Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are bacterial polyesters which are considered biodegradable alternatives to petrochemical plastics. PHAs have a wide range of potential applications, however, the production cost of this bioplastic is several times higher. A major percentage of the final cost is represented by the price of the carbon source used in the fermentation. *Burkholderia cepacia* and *Burkholderia sacchari* are generally considered promising candidates for PHA production from lignocellulosic hydrolyzates. The wood waste biomass has been subjected to hydrolysis. The resulting hydrolyzate contained a sufficient amount of fermentable sugars. Growth experiments indicated a strong inhibition by the wood hydrolyzate. Over-liming and activated carbon as an adsorbent of inhibitors were employed for detoxification. All methods of detoxification had a positive influence on the growth of biomass and PHB production. Furthermore, lignite was identified as a promising alternative sorbent which can be used for detoxification of lignocellulose hydrolyzates. Detoxification using lignite instead of activated carbon had lower inhibitor removal efficiency, but greater positive impact on growth of the bacterial culture and overall PHA productivity. Moreover, lignite is a significantly less expensive adsorbent in comparison with activated charcoal and; moreover, used lignite can be simply utilized as a fuel to, at least partially, cover heat and energetic demands of fermentation, which should improve the economic feasibility of the process.

**Keywords:** polyhydroxyalkanoates; detoxification; lignite; *Burkholderia*

#### 1. Introduction

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polyesters which are synthesized by numerous naturally occurring microorganisms as energy and carbon storage materials. Moreover, due to their mechanical and technological properties resembling those of some petrochemical plastics, PHAs are generally considered a biodegradable alternative to petrochemical-based synthetic polymers [1]. PHAs have a wide range of potential applications, however, the production cost of these bioplastics are several times higher which complicates their production at an industrial scale [2].

A substantial percentage of the final cost is represented by price of carbon substrate [3]. This is the motivation for seeking alternative sources for PHAs production. Among numerous inexpensive or even waste substrates, lignocellulose materials—with an annual generation of 80 billion tons—represent one of the most promising resources for biotechnological production of (not only) PHAs [4]. Nevertheless, utilization of lignocellulosic materials is accompanied by numerous obstacles stemming from the complex nature of these materials. To access fermentable sugars from cellulose and hemicellulose,



a hydrolytic step is required. The hydrolysis of complex lignocellulose biomass is usually performed in two steps. Diluted mineral acid is used in the first step to hydrolyze hemicellulose and to disrupt the complex structure of lignocellulose, which enables subsequent enzymatic hydrolysis of cellulose [5]. Nevertheless, apart from utilizable sugars, also numerous microbial inhibitors such as organic acids (e.g., acetic, formic or levulinic acid), furfurals, and polyphenols are generated by the hydrolysis process. These substances usually reduce fermentability of the hydrolyzates and decrease yields of the biotechnological processes. This problem can be solved by introduction of detoxification. Generally, the aim of detoxification is to selectively remove or eliminate microbial inhibitors from the hydrolyzate prior to biotechnological conversion of the hydrolyzate into desired products [6].

Numerous detoxification methods are based on more or less selective removal of inhibitors by their adsorption on various sorbents. The most commonly used sorbent for this purpose is active carbon, nevertheless, this detoxification strategy suffers from high cost of the sorbent [6]. On the contrary, lignite represents a very promising, low-cost, and effective sorbent which has already been used for the treatment of wastewater to remove various organic and inorganic contaminants [7].

The woodworking industry generates a variety of solid waste materials, such as sawdust, shavings, or bark. It is true that many of these waste materials are already used in various applications. Wood waste is very often burned and used for heat and electricity generation. On the contrary, it could be a potentially inexpensive and renewable feedstock for biotechnological production of PHAs. For instance, Pan et al. employed *Burkholderia cepacia* for biotechnological production of PHAs from detoxified maple hemicellulosic hydrolyzate [8]. Further, Bowers et al. studied PHA production wood chips of *Pinus radiata* which were subjected to high-temperature mechanical pre-treatment or steam explosion in the presence of sulphur dioxide before being enzymatically hydrolyzed. *Novosphingobium nitrogenifigens* and *Sphingobium scionense* were used for PHA production on these hydrolyzates [9]. *Brevundimonas vesicularis* and *Sphingopyxis macrogoltabida* were employed by Silva et al. [10] to produce ter-polymer consisting of 3-hydroxybutyrate, 3-hydroxyvalerate, and lactic acid (3-hydroxypropionate) from acid hydrolyzed sawdust. Despite the fact that PHA production capabilities are exhibited by many bacterial strains, *Burkholderia cepacia* and *Burkholderia sacchari* are the most commonly used for PHA production from hydrolyzates of lignocellulosic materials [8,11,12].

In this study, wood hydrolyzate was utilized as a carbon source for production of polyhydroxyalkanoates. Moreover, since hydrolyzates contain substantial concentrations microbial inhibitors, various detoxification methods including the novel application of lignite as a sorbent are used to improve the fermentability of wood hydrolyzate based media and thus, the PHA yields obtained on this promising substrate.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Wood Hydrolyzate (WH) Preparation

Spruce sawdust was supplied by a wood processing company. The waste material was firstly dried to constant weight (80 °C for 24 h). Sawdust was then pretreated with diluted acid and thereafter subjected to enzymatic hydrolysis. To hydrolyze the hemicelluloses of raw material, 20% (w/v) pre-dried sawdust was treated by 4% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 60 min at 121 °C. Enzymatic hydrolysis, as a following step, was used for digestion of cellulose structure to release further fermentable saccharides. It was performed by adjusting the pH of the suspension to 5.0 by NaOH and cellulose was treated by 0.5% of Viscozyme L (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) at 37 °C under permanent shaking for 24 h. Subsequently, solids were removed by filtration and the permeate, called wood hydrolyzate (WH), was used in the preparation of the cultivation medium and for PHA production.

### 2.2. Microorganisms and Cultivation

*Burkholderia cepacia* (CCM 2656) was purchased from Czech Collection of Microorganisms, Brno, Czech Republic. *Burkholderia sacchari* (DSM 17165) was purchased from Leibnitz Institute

DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures, Braunschweig, Germany. The mineral salt medium for *B. cepacia* and *B. sacchari* cultivation was composed of:  $1 \text{ g L}^{-1}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $1.5 \text{ g L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $9.02 \text{ g L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.1 \text{ g L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.2 \text{ g L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , and  $1 \text{ mL L}^{-1}$  of microelement solution, the composition of which was as follows:  $0.1 \text{ g L}^{-1}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.03 \text{ g L}^{-1}$   $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.3 \text{ g L}^{-1}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $0.2 \text{ g L}^{-1}$   $\text{CoCl}_2$ ,  $0.02 \text{ g L}^{-1}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.02 \text{ g L}^{-1}$   $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.03 \text{ g L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . The cultivations were performed in Erlenmeyer flasks (volume 100 mL) containing 50 mL of the cultivation medium. The temperature was set to  $30^\circ\text{C}$  and the agitation to 180 rpm. The cells were harvested after 72 h of cultivation.

### 2.3. Detoxification of Hydrolyzates

Overliming was carried out as described by Ranatunga et al. [13], whereupon pH of the hydrolyzate was adjusted to approx. pH 10.0 using solid calcium hydroxide. The samples were then kept at  $50^\circ\text{C}$  for 30 min, the pH was adjusted back to 7, and the sample was subsequently filtered through filter paper.

Detoxification with activated charcoal was performed as described by Pan et al. [8]. Charcoal was added to hydrolyzate in the ratio 1:20 (*w/v*) and stirred for 1 h at  $60^\circ\text{C}$ . Solid particles were removed by filtration. Furthermore, detoxification with lignite was performed similarly, finely milled lignite power (grain size of under 0.2 mm) from South Moravian Coalfield (the northern part of the Vienna basin in the Czech Republic) was used.

### 2.4. Analytical Methods

All analyses of hydrocarbons and furfural were performed with a Thermo Scientific UHPLC system—UltiMate 3000. REZEX-ROA column ( $150 \times 4.6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ; City, Phenomenex, Torrance, California, USA) was used for separation. The mobile phase was  $5 \text{ mN H}_2\text{SO}_4$  at a flow rate of  $0.5 \text{ mL per min}$ . Xylose and other saccharides were detected using a refractive index detector (ERC RefractoMax 520). Acetate, levulinic acid and furfural were detected with a Diode Array Detector (DAD-3000) at  $284 \text{ nm}$ .

Total phenolics were determined as described by Li et al. [14] with the Folin–Ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich). Gallic acid was used for calibration and total phenolics were expressed as milligrams of gallic acid equivalents per liter of wood hydrolyzate.

### 2.5. PHA Extraction and Content Analysis

To determine biomass concentration and PHA content in cells, samples (10 mL) were centrifuged and the cells were washed with distilled water. The biomass concentration expressed as cell dry weight (CDW) was analyzed as reported previously [15]. PHA content of dried cells was analyzed by gas chromatography (Trace GC Ultra, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) as reported by Brandl et al. [16]. Commercially available P(3HB-co-3HV) (Sigma Aldrich) composed of 88 mol. % 3HB and 12 mol. % 3HV was used as a standard; benzoic acid (LachNer, Neratovice, Czech Republic) was used as an internal standard.

## 3. Results and Discussion

The composite formed by cellulose, hemicellulose, and lignin is responsible for the remarkable resistance against hydrolysis and enzymatic attack [17]. Generally, proper pre-treatment of lignocellulose prior to its enzymatic hydrolysis by cellulases significantly improves fermentable sugar yields [18]. The combination of diluted acid hydrolysis ( $1\% \text{ H}_2\text{SO}_4$ ) and enzymatic digestion of cellulose was used for hydrolysis of spruce sawdust. This approach yielded liquid hydrolyzate of wood (WH) and its composition is shown in Table 1.

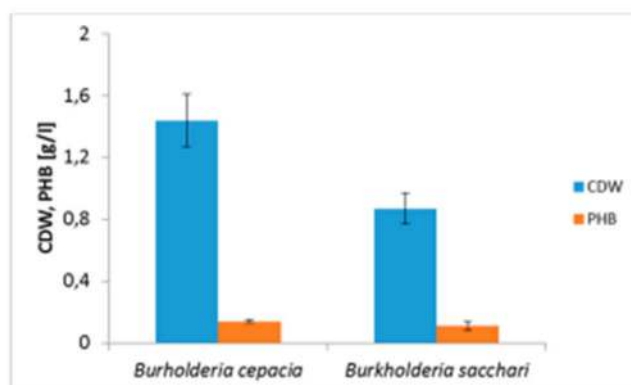
**Table 1.** Composition of wood hydrolyzate (50 g of sawdust per 1 L of 4% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

	Concentration
Glucose	4.5 g/L
Xylose	10.4 g/L
Ash	52.6 g/L
Polyphenols	1205 mg/L
Furfural	52.0 mg/L
Acetic acid	0.53 g/L
Levulinic acid	9.9 mg/L
5-HMF	not detected

Glucose is formed by the cleavage of cellulose. Hemicelluloses can be hydrolyzed to yield molecules such as xylose, arabinose, mannose, galactose, and uronic acid [19]. The total concentration of sugars in WH was determined to be 14.9 g L<sup>-1</sup> (by the hydrolysis of 50 g L<sup>-1</sup> of spruce sawdust). The only identified saccharides in WH are xylose (10.4 g L<sup>-1</sup>) and glucose (4.5 g L<sup>-1</sup>). Unfortunately, WH contains high concentrations of inhibiting substances such as polyphenols (1205 mg L<sup>-1</sup>), furfural (52.0 mg L<sup>-1</sup>), acetic acid (0.53 mg L<sup>-1</sup>), and levulinic acid (9.9 mg L<sup>-1</sup>). Polyphenols are likely to be released from waste wood biomass during the partial degradation of lignin by acid hydrolysis. Furfural is formed by degradation of reducing sugars at high pressure and low pH. Levulinic acid, the degradation product of furfural or 5-hydroxymethylfurfural, is formed in the same manner. Acetic acid is probably formed by deesterification of acetylated wood components. Moreover, the amount of ash is significant, which is a consequence of the application of sulfuric acid and subsequent neutralization by NaOH. High concentrations of salts may theoretically cause the inhibition of bacterial growth due to the induction of osmotic stress. On the contrary, mild osmotic up-shock was reported to support PHB accumulation in *Cupriavidus necator* H16 [20,21].

The hydrolyzate of waste wood biomass was used as the sole carbon source for PHA production employing *B. cepacia* and *B. sacchari*. Figure 1 demonstrates the negative impact of the presence of inhibitors on the intended biotechnological processes. In both cases, the WH was twice diluted prior to culturing and supplemented by mineral medium.

Yields of biomass were relatively low, approximately 1.0–1.5 g L<sup>-1</sup>, and PHB content in CDW was about 10%. Total yield of PHB was around 0.1 g L<sup>-1</sup>, which is very low.



**Figure 1.** Cultivation of *B. cepacia* and *B. sacchari* on WH which composition is demonstrated in Table 1, WH was twice diluted and supplemented with mineral salts as described above. Cultivation conditions: 30 °C, 72 h, 180 rpm.

The effect of phenolic and other aromatic compounds, which may inhibit both microbial growth and product yield, are very variable, and can be related to specific functional groups. One possible mechanism is that phenolics interfere with the cell membrane by influencing its function and changing its protein-to-lipid ratio [22]. Undissociated acids enter the cell through diffusion over the cell membrane and then dissociate due to the neutral cytosolic pH. The dissociation of the acid leads to a decrease in the intracellular pH, which may cause cell death. This effect is promoted by furfural and 5-HMF which cause higher cell membrane permeation and disturb the proton gradient over the inner mitochondrial membrane which inhibits regeneration of ATP and eventually can lead to cellular death [23]. A different mechanism of action of growth inhibitors results in a stronger synergistic effect.

The presence of inhibitors, and especially polyphenols, in the wood hydrolyzate appears to be crucial for the intended biotechnological process. Therefore, we continued to focus on the elimination of microbial inhibitors. In the first phase, we compared two common detoxification procedures—separation by adsorption inhibitors on activated carbon and over-liming. Theoretically, overliming is effective due to precipitation or chemical destabilization of inhibitors [13] and activated charcoal could improve the fermentability of hydrolysate by absorbing phenolic compounds and other inhibitory substances [24].

The effect of various methods of detoxification on the concentration of the most important inhibitors present in hydrolysates and polyphenols is demonstrated in Figure 2.

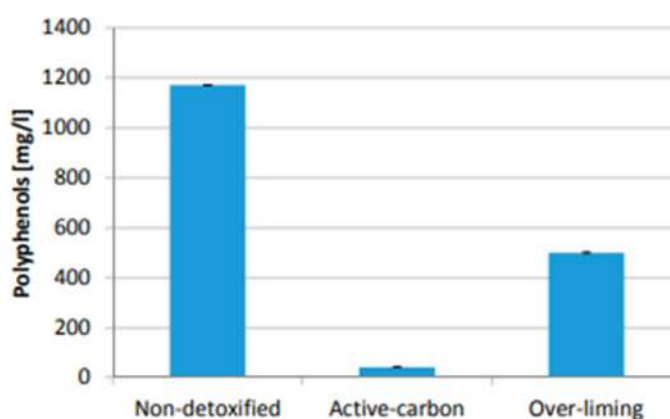


Figure 2. Detoxification employing over-liming and active carbon.

It is evident that both detoxification techniques significantly reduce the concentration of polyphenols in hydrolysates. More effective is the application of activated carbon, which can adsorb and thereby remove more than 90% of polyphenols. Table 2 demonstrates results of cultivation experiment with detoxified WH, employing the same PHB producers as in the previous test. Both methods of detoxification exhibited a positive influence on the growth of biomass, and this effect was more apparent with *B. cepacia*. More significantly, the effect of detoxification was reflected in the content of PHB in biomass. A positive effect on the biosynthesis of PHB occurred primarily in the strain of *B. sacchari*. PHB content reached nearly 90% of CDW. The yields were 8–12 times higher compared to the use of non-detoxified hydrolyzate. On the other hand, the detoxification process itself is time-consuming and particularly expensive, especially if activated carbon is used for detoxification of the hydrolyzates [25].

**Table 2.** Cultivation on detoxified hydrolyzates.

	Detoxification	Biomass (g/L)	PHB (%)	PHB (g/L)
<i>Burkholderia sacchari</i>	Non-detoxified	0.87	12.2	0.11
	Over-liming	1.57	88.7	1.39
	Activated carbon	1.01	87.6	0.89
<i>Burkholderia cepacia</i>	Non-detoxified	1.44	9.8	0.14
	Over-liming	2.86	30.0	0.86
	Activated carbon	1.40	74.7	1.05

A further aim of our experiments was to find an alternative sorbent, which would be comparable to activated carbon, but the cost of which would be significantly lower. After several pilot experiments, we focused on lignite. It is the youngest and the least carbonized brown coal, which consists of a macromolecular complex polyelectrolyte (e.g., humic acids), polysaccharides, polyaromatics, and carbon chains with sulfur, nitrogen, and oxygen-containing groups. Its cost is significantly lower than that of activated carbon. The price of activated carbon is currently around \$1/kg [26] compared to a lignite price of \$0.2/kg [26]. Moreover, the recovery of activated charcoal after its application as a sorbent in detoxification is practically impossible [27,28]. On the other side, lignite can be burned after absorbing the inhibitors and the energy released during the combustion process could provide energy which can at least partially cover energetic demands of the intended process of PHA production from waste wood biomass.

The adsorption capacity of lignite and its application as a sorbent is often a subject of interest. It is the price of conventional sorbents that leads to finding low-cost alternatives [29]. Over the last decade, there has been an increase in publications dealing with low-cost adsorbents for wastewater treatment [30]. For instance, lignite was used as a sorbent for removal of organic substances such as phenol [31] or inorganic components, especially heavy metals [32], from contaminated water solutions. Nevertheless, to our best of our knowledge despite its high sorption capacity and low cost, lignite has not been used as a sorbent for detoxification of complex lignocellulose hydrolyzates to increase their fermentability and yield of biotechnological products.

According to our results, lignite has a lower sorption capacity than activated charcoal. On the other hand, lignite is also able to eliminate a substantial amount of inhibitors, and thus potentially increase the fermentability of WH. Comparison of lignite and activated charcoal as a sorbent for microbial inhibitors is displayed in Table 3.

**Table 3.** Detoxification using active carbon and lignite

	Glucose (g/L)	Xylose (g/L)	Polyphenols (mg/L)	Furfural (mg/L)	Levulinic Acid (mg/L)	Acetic Acid (g/L)
Non-detoxified	4.4	10.0	998.8	41.4	10.0	0.5
Lignite	4.6	10.3	772.4	35.7	7.9	0.4
Activated carbon	4.5	10.1	23.8	3.8	3.6	0.4

The sorption properties of lignite depend on the number of sorption sites or functionalities [33]. Understandably, WH detoxified with lignite were also tested for cultivation. Detoxified hydrolyzates using lignite and activated carbon were used for the biotechnological production of PHB employing *B. cepacia* and *B. sacchari*. Figure 3 shows the results.

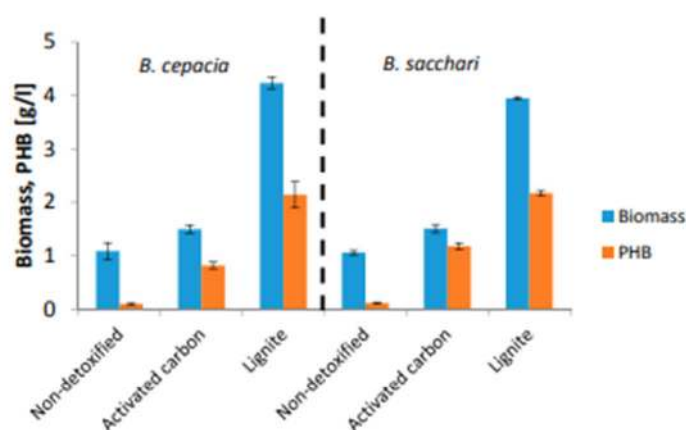


Figure 3. Cultivation on detoxified hydrolyzates.

It is interesting that the sorption capacity of lignite as detoxification strategy does not provide as good a removal of monitored inhibitors as in the case of activated carbon. However, lignite is comparable with activated charcoal, considering the overall yields of PHB. *B. Sacchari* reached markedly higher yields. These surprisingly higher yields obtained by replacing active carbon with lignite should be explained and our further experiments will be focused in this direction. We assume that, during the detoxification, lignite released substances that had a positive effect on the growth of soil bacteria. Lignite is a complex material compared to activated carbon which contains only carbon. Therefore, use of lignite could have an enriching effect on the composition of the production medium. This interesting and surprising feature could also be used in other biotechnological processes in which soil originating microorganisms are employed.

#### 4. Conclusions

This article demonstrates the possibilities of utilization of lignite in biotechnology. Lignite can be used as a sorbent to detoxify wood hydrolyzate and its efficiency was comparable with commonly used activated carbon. This detoxification method was evaluated directly using the hydrolyzates to produce PHAs employing *Burkholderia cepacia* and *Burkholderia sacchari*. The results showed that the use of lignite considerably improved fermentability of wood hydrolyzates and enhanced PHA yields. Therefore, lignite can cope with significantly more expensive activated carbon.

**Acknowledgments:** This work was supported by the project Materials Research Centre at FCH BUT-Sustainability and Development No. LO1211 and by national COST project LD15031 of the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic and by the project GA15-20645S of the Czech Science Foundation (GACR).

**Author Contributions:** Dan Kucera, Peter Ladicky and Stanislav Obruca conceived and designed the experiments; Dan Kucera, Peter Ladicky, Stanislav Obruca, Petr Sedlacek, Miloslav Pekar and Pavla Benesova performed the experiments; Dan Kucera, Peter Ladicky, Pavla Benesova and Stanislav Obruca analyzed the data; Miloslav Pekar, Petr Sedlacek and Stanislav Obruca contributed reagents/materials/analysis tools; Dan Kucera and Stanislav Obruca wrote the paper.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

- Steinbüchel, A. Perspectives for Biotechnological Production and Utilization of Biopolymers: Metabolic Engineering of Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Pathways as a Successful Example. *Macromol. Biosci.* **2001**, *1*, 1–24. [CrossRef]
- Ivanov, V.; Stabnikov, V.; Ahmed, Z.; Dobrenko, S.; Saliuk, A. Production and applications of crude polyhydroxyalkanoate-containing bioplastic from the organic fraction of municipal solid waste. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **2015**, *12*, 725–738. [CrossRef]
- Choi, J.; Lee, S.Y. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *51*, 13–21. [CrossRef]
- Obruca, S.; Benesova, P.; Kucera, D.; Petrik, S.; Marova, I. Biotechnological conversion of spent coffee grounds into polyhydroxyalkanoates and carotenoids. *New Biotechnol.* **2015**, *32*, 569–574. [CrossRef] [PubMed]
- Amidon, T.E.; Wood, C.D.; Shupe, A.M.; Wang, Y.; Graves, M.; Liu, S. Biorefinery: Conversion of Woody Biomass to Chemicals, Energy and Materials. *J. Biobased Mater. Bioenergy* **2008**, *2*, 100–120. [CrossRef]
- Canilha, L.; Kumar Chandel, A.; dos Santos Milessi, T.S.; Fernandes Antunes, F.A.; da Costa Freitas, W.L.; das Graças Almeida Felipe, M.; da Silva, S.S. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, *2012*, 1–15. [CrossRef] [PubMed]
- Doskočil, L.; Grasset, L.; Enev, V.; Kalina, L.; Pekař, M. Study of water-extractable fractions from South Moravian lignite. *Environ. Earth Sci.* **2015**, *73*, 3873–3885. [CrossRef]
- Pan, W.; Perrotta, J.A.; Stipanovic, A.J.; Nomura, C.T.; Nakas, J.P. Production of polyhydroxyalkanoates by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759 using a detoxified sugar maple hemicellulosic hydrolysate. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *39*, 459–469. [CrossRef] [PubMed]
- Bowers, T.; Vaidya, A.; Smith, D.A.; Lloyd-Jones, G. Softwood hydrolysate as a carbon source for polyhydroxyalkanoate production. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2014**, *89*, 1030–1037. [CrossRef]
- Silva, J.A.; Tobella, L.M.; Becerra, J.; Godoy, F.; Martinez, M.A. Biosynthesis of poly- $\beta$ -hydroxyalkanoate by *Brevundimonas vesicularis* LMG P-23615 and *Sphingopyxis macrogoltabida* LMG 17324 using acid-hydrolyzed sawdust as carbon source. *J. Biosci. Bioeng.* **2007**, *103*, 542–546. [CrossRef] [PubMed]
- Keenan, T.M.; Tanenbaum, S.W.; Stipanovic, A.J.; Nakas, J.P. Production and Characterization of Poly- $\beta$ -hydroxyalkanoate Copolymers from *Burkholderia cepacia* Utilizing Xylose and Levulinic Acid. *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20*, 1697–1704. [CrossRef] [PubMed]
- Wang, Y.; Liu, S. Production of (R)-3-hydroxybutyric acid by *Burkholderia cepacia* from wood extract hydrolysates. *AMB Express* **2014**, *4*. [CrossRef] [PubMed]
- Ranatunga, T.D.; Jervis, J.; Helm, R.F.; McMillan, J.D.; Wooley, R.J. The effect of overliming on the toxicity of dilute acid pretreated lignocellulosics: The role of inorganics, uronic acids and ether-soluble organics. *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *27*, 240–247. [CrossRef]
- Li, H.-B.; Wong, C.-C.; Cheng, K.-W.; Chen, F. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *Food Sci. Technol.* **2008**, *41*, 385–390. [CrossRef]
- Obruca, S.; Marova, I.; Melusova, S.; Mravcova, L. Production of polyhydroxyalkanoates from cheese whey employing *Bacillus megaterium* CCM 2037. *Ann. Microbiol.* **2011**, *61*, 947–953. [CrossRef]
- Brandl, H.; Gross, R.A.; Lenz, R.W.; Fuller, R.C. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(beta-hydroxyalkanoates) for potential application as a biodegradable polyester. *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, *54*, 1977–1982. [PubMed]
- Peters, D. Raw Materials. In *White Biotechnology*; Ulber, R., Sell, D., Eds.; Springer: Berlin, Germany, 2007; pp. 1–30.
- Obruca, S.; Benešová, P.; Maršálek, L.; Márová, I. Use of Lignocellulosic Materials for PHA Production. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **2015**, *29*, 135–144. [CrossRef]
- Wyman, C.E.; Decker, S.R.; Himmel, M.E.; Brady, J.W.; Skopec, C.E.; Viikari, L. *Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose*; Dumitriu, S., Ed.; CRC Press: New York, NY, USA, 2004; pp. 995–1034.
- Obruca, S.; Marova, I.; Svoboda, Z.; Mikulikova, R. Use of controlled exogenous stress for improvement of poly (3-hydroxybutyrate) production in *Cupriavidus necator*. *Folia Microbiol.* **2010**, *55*, 17–22. [CrossRef] [PubMed]

21. Passanha, P.; Kedia, G.; Dinsdale, R.M.; Guwy, A.J.; Esteves, S.R. The use of NaCl addition for the improvement of polyhydroxyalkanoate production by *Cupriavidus necator*. *Bioresour. Technol.* **2014**, *163*, 287–294. [CrossRef] [PubMed]
22. Jönsson, L.J.; Alriksson, B.; Nilvebrant, N.-O. Bioconversion of lignocellulose: Inhibitors and detoxification. *Biotechnol. Biofuels* **2013**, *6*. [CrossRef] [PubMed]
23. Chandel, A.K.; da Silva, S.S.; Singh, O.V. Detoxification of Lignocellulose Hydrolysates: Biochemical and Metabolic Engineering Toward White Biotechnology. *Bioenergy Res.* **2013**, *6*, 388–401. [CrossRef]
24. Mussatto, S.I.; Roberto, I.C. Evaluation of nutrient supplementation to charcoal-treated and untreated rice straw hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2005**, *48*, 497–502. [CrossRef]
25. Babel, S.; Kurniawan, T.A. Low-cost adsorbents for heavy metals uptake from contaminated water: A review. *J. Hazard. Mater.* **2003**, *97*, 219–243. [CrossRef]
26. Lignite. Available online: <https://www.alibaba.com> (accessed on 26 April 2017).
27. Obruca, S.; Benesova, P.; Kucera, D.; Marova, I. Novel Inexpensive Feedstocks from Agriculture and Industry for Microbial Polyester Production. In *Recent Advances in Biotechnology; Microbial Biopolyester Production, Performance and Processing Microbiology, Feedstocks, and Metabolism*; Koller, M., Ed.; Bentham Science: Berlin, Germany, 2016; pp. 3–99.
28. Parawira, W.; Tekere, M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: Review. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2011**, *31*, 20–31. [CrossRef] [PubMed]
29. Gautam, R.K.; Mudhoo, A.; Lofrano, G.; Chattopadhyaya, M.C. Biomass-derived biosorbents for metal ions sequestration: Adsorbent modification and activation methods and adsorbent regeneration. *J. Environ. Chem. Eng.* **2014**, *2*, 239–259. [CrossRef]
30. De Gisi, S.; Lofrano, G.; Grassi, M.; Notarnicola, M. Characteristics and adsorption capacities of low-cost sorbents for wastewater treatment: A review. *Sustain. Mater. Technol.* **2016**, *9*, 10–40. [CrossRef]
31. Polat, H.; Molva, M.; Polat, M. Capacity and mechanism of phenol adsorption on lignite. *Int. J. Miner. Process.* **2006**, *79*, 264–273. [CrossRef]
32. Klucakova, M.; Pavlikova, M. Lignitic Humic Acids as Environmentally-Friendly Adsorbent for Heavy Metals. *J. Chem.* **2017**, *2017*, 1–5. [CrossRef]
33. Robles, I.; Bustos, E.; Lakatos, J. Adsorption study of mercury on lignite in the presence of different anions. *Sustain. Environ. Res.* **2016**, *26*, 136–141. [CrossRef]



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



## ORIGINAL ARTICLE

## Chicken feather hydrolysate as an inexpensive complex nitrogen source for PHA production by *Cupriavidus necator* on waste frying oils

P. Benesova<sup>1,2</sup>, D. Kucera<sup>1,2</sup>, I. Marova<sup>1,2</sup> and S. Obruca<sup>1,2</sup><sup>1</sup> Faculty of Chemistry, Materials Research Centre, Brno University of Technology, Brno, Czech Republic<sup>2</sup> Faculty of Chemistry, Institute of Food Chemistry and Biotechnology, Brno University of Technology, Brno, Czech Republic

**Significance and Impact the Study:** Millions of tons of feathers, important waste product of poultry-processing industry, are disposed off annually without any further benefits. Thus, there is an inevitable need for new technologies that enable ecologically and economically sensible processing of this waste. Herein, we report that alkali-hydrolysed feathers can be used as a complex nitrogen source considerably improving polyhydroxyalkanoates production on waste frying oil employing *Cupriavidus necator*.

**Keywords**

complex nitrogen source, *Cupriavidus necator*, feather valorization, poly(3-hydroxybutyrate), polyhydroxyalkanoates, waste frying oil.

**Correspondence**

Stanislav Obruca, Faculty of Chemistry, Materials Research Centre, Brno University of Technology, Purkynova 118, Brno 612 00 Czech Republic.  
E-mail: Stana.O@seznam.cz

2017/0177: received 26 January 2017, revised 19 May 2017 and accepted 31 May 2017

doi:10.1111/lam.12762

**Abstract**

The chicken feather hydrolysate (FH) has been tested as a potential complex nitrogen source for the production of polyhydroxyalkanoates by *Cupriavidus necator* H16 when waste frying oil was used as a carbon source. The addition of FH into the mineral salt media with decreased inorganic nitrogen source concentration improved the yields of biomass and polyhydroxyalkanoates. The highest yields were achieved when 10 vol.% of FH prepared by microwave-assisted alkaline hydrolysis of 60 g l<sup>-1</sup> feather was added. In this case, the poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) yields were improved by more than about 50% as compared with control cultivation. A positive impact of FH was also observed for accumulation of copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) when sodium propionate was used as a precursor. The copolymer has superior processing and mechanical properties in comparison with PHB homopolymer. The application of FH eliminated the inhibitory effect of propionate and resulted in altered content of 3-hydroxyvalerate (3HV) in copolymer. Therefore, the hydrolysed feather can serve as an excellent complex source of nitrogen for the polyhydroxyalkanoates (PHA) production. Moreover, by the combination of two inexpensive types of waste, such as waste frying oil and feather hydrolysate, it is possible to produce PHA with substantially improved efficiency and sustainability.

**Introduction**

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are biodegradable, environmentally friendly and biocompatible biopolymers produced by a variety of prokaryotic micro-organisms under unbalanced nutrition conditions as carbon and energy storage materials. The main obstacle preventing the market from their expansion is primarily their cost. In the economics of PHA production, the cost of carbon substrate accounts for 40%. Therefore, there are efforts to exploit cheap or even waste carbon sources for PHA production (Liu *et al.* 2015).

In this context, lipids are considered being very promising substrates for biotechnological production of PHAs. Apart from noble plant oils, there are also attempts to utilize waste frying oils for the production of PHA. These sources provide numerous advantages over noble oils—they do not compete with the human food chain, their utilization does not place demands on agricultural land and, moreover, potentially problematic waste is transformed into the high-value product (Obruca *et al.* 2010a). *Cupriavidus necator* is, due to its ability to utilize triacylglycerols and high PHA accumulating capacity, considered being the candidate strain for PHA

production using plant oils and other lipids as substrates (Obruca et al. 2013).

Although the application of complex nitrogen supports the biomass growth as well as the PHA production (Koller et al. 2005), low-cost inorganic nitrogen sources, such as  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{OH}$  or urea, are used almost exclusively for the PHA production from fatty substrates employing *C. necator* (Budde et al. 2011; Pradella et al. 2012). Nevertheless, inexpensive alternatives to costly complex nitrogen, such as meat bone meal, silage juice or proteolytic hydrolysates of cheese whey, were also tested (Koller et al. 2005, 2010; Obruca et al. 2014).

Hydrolysates of chicken feather might represent an alternative promising inexpensive complex nitrogen source. Poultry-processing industry worldwide generates approx.  $7.7 \times 10^8$  kg of feathers annually. Feathers constitute up to 100 g  $\text{kg}^{-1}$  of total chicken weight, and are composed of over 900 g protein per kg (Taskin et al. 2011). Nonetheless, despite their low cost and abundant availability, industrial applications of feathers are limited and chicken feather is usually treated as waste (Reddy 2015). Nevertheless, classical methods of feather disposal, such as incineration or landfilling, have already been restricted or banned in some countries due to the pollution they create (Stiborova et al. 2016). Thus, there is an inevitable need for new technologies that enable ecologically and economically sensible processing of this waste. Few studies regarding utilization of chicken feather for microbial production of valuable metabolites has been reported so far. Taskin et al. (2012) reported a study dealing with the usage of chicken feather protein hydrolysate for biotechnological production of L-lactic acid by *Rhizopus oryzae*. Furthermore, chicken feather was also used for biotechnological production of biogas (Patinvoh et al. 2016), xylanase (Taskin et al. 2011) or extracellular polysaccharides (Prakash et al. 2009).

The aim of this study was to evaluate chicken feather hydrolysate as a possible cheap complex nitrogen source for the production of PHA by *C. necator* H16 using waste frying oil as a carbon source.

## Results and discussion

### Testing feather hydrolysate as a complex nitrogen source for the PHA production

At first, the effect of the presence of FH in the cultivation media on *C. necator* growth and the PHA production on waste frying oil was studied using various concentrations of inorganic nitrogen source  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in the cultivation media, the results are shown in Table 1. The presence of FH in the cultivation media resulted in a considerable increase in the biomass as well as PHA yields (approx. 29

and 45%, respectively), when comparing the same concentration of  $3 \text{ g l}^{-1}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  to control cultivation without FH. Generally, FH is composed mainly of oligopeptides and amino acids (Stiborova et al. 2016), therefore it can be considered as a potentially complex source of nitrogen for bacterial cells. The availability of nitrogen sources usually stimulates the growth of microbial cells, nevertheless, the PHA accumulation in *C. necator* is induced by nitrogen limitation (Koller et al. 2017). Hence, the decrease in the dose of inorganic nitrogen source  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  had a positive impact primarily on the PHA content in biomass and, therefore, also on the PHA yields. The highest PHA yields ( $9 \text{ g l}^{-1}$  PHA) were gained for  $1 \text{ g l}^{-1}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

### Optimization of feather hydrolysate dose

Furthermore, the concentration of feather used for the FH preparation and the ratios of applied inorganic and complex nitrogen sources were optimized. Therefore, FHs were prepared in the range of initial feather concentrations 20, 30, 40, 50 and  $60 \text{ g l}^{-1}$  and were subsequently applied (10 vol.%) as partial or complete replacement of inorganic nitrogen source in the cultivation media where waste frying oil served as the primary carbon source. The results are shown in Table 2. Generally, the presence of FH again enhanced the biomass and PHA yields. The highest PHA titres were achieved when 10 vol.% of FH ( $60 \text{ g l}^{-1}$  feather) was added and the MS media contained  $1 \text{ g l}^{-1}$  of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . In this case, the PHA yields were increased more than about 50% as compared to control cultivation. Furthermore, high PHA contents in the biomass were also observed when  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  was completely

**Table 1** Cultivation of *Cupriavidus necator* H16 in the presence of feather hydrolysate ( $40 \text{ g l}^{-1}$ ) applied at the concentration of 10% (vol/vol) and various concentrations of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ( $\text{g l}^{-1}$ )	CDW* ( $\text{g l}^{-1}$ )	PHA (wt.%)	PHA ( $\text{g l}^{-1}$ )
0	$7.9 \pm 0.2$	$491.3 \pm 1.0$	$7.3 \pm 0.1$
1	$11.0 \pm 0.7$	$81.5 \pm 3.1$	$9.0 \pm 0.9$
2	$11.6 \pm 0.3$	$72.0 \pm 2.0$	$8.2 \pm 0.7$
3	$11.6 \pm 0.5$	$73.3 \pm 1.7$	$8.7 \pm 0.5$
Control†	$9.2 \pm 0.9$	$66.3 \pm 6.5$	$6.0 \pm 1.2$

Each value is an average of three independent cultivations and three independent determinations of each cultivation, the results are presented as mean  $\pm$  SD.

\*CDW, cell dry weight.

†Control cultivation was performed without the addition of feather hydrolysate,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  was present at the concentration of  $3 \text{ g l}^{-1}$ .

‡Marks the results in which a significant difference between particular result and control cultivation was confirmed by paired two-sample t test.

**Table 2** Polyhydroxyalkanoates (PHA) and biomass yields gained by the application of feather hydrolysate prepared using various concentrations of feather hydrolysate (FH)

	Feather hydrolysate (g l <sup>-1</sup> )	CDW* (g l <sup>-1</sup> )	PHA (%)	PHA (g l <sup>-1</sup> )
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 g l <sup>-1</sup>	20	10.4 ± 1.0	‡86.2 ± 3.3	‡8.9 ± 0.2
	30	11.9 ± 1.3	‡84.4 ± 0.6	‡10.1 ± 0.1
	40	10.4 ± 0.9	80.1 ± 5.9	‡8.3 ± 0.4
	50	12.5 ± 1.5	‡80.3 ± 2.0	‡10.3 ± 0.2
	60	12.8 ± 0.9	‡85.1 ± 0.3	‡10.6 ± 0.1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0 g l <sup>-1</sup>	0	8.5 ± 0.9	90.7 ± 0.9	‡7.8 ± 0.1
	20	5.9 ± 0.3	‡83.4 ± 6.2	‡4.9 ± 0.3
	30	6.4 ± 0.8	‡92.2 ± 1.5	‡5.9 ± 0.1
	40	8.3 ± 0.6	‡88.0 ± 0.3	7.3 ± 0.1
	50	7.0 ± 0.6	‡94.0 ± 5.4	‡6.6 ± 0.3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 3 g l <sup>-1</sup>	0/control†	9.6 ± 0.9	71.8 ± 2.3	6.9 ± 0.2
	60	9.5 ± 1.3	‡86.3 ± 0.9	‡8.2 ± 0.1

Each value is an average of three independent cultivations and three independent determinations of each cultivation, the results are presented as mean ± SD.

\*CDW, cell dry weight.

†Control cultivation was performed without the addition of feather hydrolysate, concentration of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was 3 g l<sup>-1</sup>.

‡Marks the results in which a significant difference between particular result and control cultivation was confirmed by paired two-sample t test.

replaced by FHs. In particular, when only FH 60 g l<sup>-1</sup> feather was used as the sole nitrogen source, the PHA yields gained were 17% higher than in control cultivation. Since the highest PHA yields were achieved using FH prepared from 60 g l<sup>-1</sup> feather, basic parameters and amino acid composition were therefore analysed for chicken feather hydrolysate (60 g l<sup>-1</sup>) characterization.

#### Characterization of FH

The microwave-assisted alkali treatment of chicken feather yields the mixture of oligopeptides and free amino acids, therefore, FH can be considered being an interesting complex nitrogen source for various biotechnological processes (Štíborová *et al.* 2016). Basic parameters of FH prepared from 60 g l<sup>-1</sup> feather including its amino acid composition are shown in Table 3.

The amino acid composition is balanced and most of the amino acids are present in relatively high amount. The composition of amino acids in the complex nitrogen source is one of crucial factors influencing the PHA accumulation in bacterial cells. Kim *et al.* (1996) observed that the introduction of leucine increased the intracellular NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> ratio and decreased the intracellular concentration of free Coenzyme A, which consequently stimulated the PHA accumulation in *C. necator*. Similarly, Lee *et al.* (1995) reported that significant introduction of cysteine, isoleucine, methionine and proline into the cultivation media supported the PHA accumulation in recombinant *E. coli*. From this point of view, the fact that PHA is rich in proline and leucine and also contains substantial amount of isoleucine might explain the

stimulating effect of FH on the PHA biosynthesis in *C. necator* (Tables 1 and 2).

Furthermore, one of the major advantages of using a complex nitrogen source is the possible shortening of the lag phase. It could be due to the availability of complete amino acids and peptides in the complex nitrogen source which can be easily converted by cells to synthesize their own proteinaceous material. Therefore, higher

**Table 3** Amino acid composition and the characterization of feather hydrolysate (60 g l<sup>-1</sup>)

Parameter	Concentration (g l <sup>-1</sup> )
Solids	76.9 ± 0.5
Ash	27.5 ± 0.2
Proteins, peptides	33.1 ± 0.5
Total nitrogen	45.7 ± 0.3
Amino acid profile (g l <sup>-1</sup> )	
Aspartic acid	2.8 ± 0.3
Threonine	0.7 ± 0.1
Serine	3.1 ± 0.3
Glutamic acid	4.6 ± 0.1
Proline	4.4 ± 0.4
Glycine	4.1 ± 0.3
Alanine	2.1 ± 0.3
Valine	3.8 ± 0.2
Methionine	0.4 ± 0.1
Isoleucine	2.0 ± 0.4
Leucine	3.7 ± 0.2
Tyrosine	0.9 ± 0.1
Phenylalanine	2.3 ± 0.2
Histidine	1.8 ± 0.1
Lysine	1.2 ± 0.1
Arginine	1.2 ± 0.1

concentration of a catalytically active biomass that is able to accumulate PHA is produced in a shorter time, resulting in an increase in the process productivity (Koller et al. 2010).

Due to the application of NaOH and subsequent neutralization of FH by HCl, FH is rich in ash content causing the increase of osmotic pressure in the cultivation media. Also, this can partially contribute to improved PHB productivity in the presence of FH since it was reported that mild osmotic pressure stimulates the PHB biosynthesis in *C. necator* (Obruca et al. 2010b; Passanha et al. 2014).

Apart from the positive effect of FH on the biomass and PHA biosynthesis also the valorization of feather as waste in terms of sustainability plays an important role. Moreover, FH seems to be an economically feasible complex nitrogen source. Typical complex nitrogen sources used in cultivation media such as soya peptone or yeast extract are sold at the price of 7 Euro per kg or higher, the price of casein is about 2 Euro per kg but it needs to be hydrolysed prior to its use and the cost of casamino acids (casein hydrolysate) is about 100 Euro per kg (information from www.alibaba.com). On the contrary, feather is basically inexpensive waste (Reddy 2015) and its alkaline hydrolysis represents a simple and cheap process.

Actually, there is only limited amount of reports dealing with the use of inexpensive complex nitrogen sources for the PHA production. Page and Cornish (1993) reported that fish peptone served as a cheap nitrogen source for the production of PHA by *Azotobacter vinelandii*. The possibilities of using meat extract, casamino acids and corn steep liquor were reported by Purushothaman et al. (2001) and Koller et al. (2010). Lee (1998) studied the effect of soybean hydrolysate and cotton seed hydrolysate as a source of nitrogen for the PHA production by recombinant *E. coli*. In addition, protease-hydrolysed cheese whey served as a complex nitrogen source for the PHA production employing *C. necator* (Obruca et al.

2014). Therefore, FH can be considered as additional very promising waste-derived complex nitrogen source for the PHA production.

#### Influence of feather hydrolysate on 3HV accumulation

Mechanical and processing properties of PHA are strongly dependent upon the monomer composition of polymer. The incorporation of 3-hydroxyvalerate (3HV) results in the formation of a copolymer P(3HB-co-3HV) possessing considerably improved flexibility, strength and processing properties (such as the decrease in melting temperature) in comparison with homopolymer of 3-hydroxybutyrate (PHB). It can be generally stated that mechanical properties of the copolymer are improved with rising portion of 3HV (Sudesh et al. 2000). The incorporation of 3HV is implemented via feeding of propionyl-CoA-generating precursors such as propionate, propanol or valerate. Propionyl-CoA can be either incorporated into the copolymer or metabolized via the 2-methylcitrate cycle. Generally, only a small portion (less than 15% of carbon) of available propionyl-CoA is incorporated into P(3HB-co-3HV) (Ewering et al. 2006). Taking into account the costs of 3HV precursors, the inefficiency of precursor incorporation into the copolymer negatively influences the economics of PHA production (Obruca et al. 2013). Moreover, the precursors of 3HV are in nature (alcohols, weak organic acids or their salts) microbial inhibitors and their application usually partially decreases the growth of employed microbial culture as well as total yields of the polymer. Therefore, the effect of FH on the copolymer P(3HB-co-3HV) production using propanol, valeric acid and propionate as 3HV precursors was tested. The results are shown in Table 4.

There was a considerable positive effect on 3HV incorporation into the polymer structure when FH was applied into the cultivation media. Surprisingly, the bacterial

**Table 4** Influence of feather hydrolysate on the production of P(3HB-co-3HV) using various precursors of 3HV\*

Nitrogen source	Precursor	CDW* (g l <sup>-1</sup> )	PHA (%)	PHA (g l <sup>-1</sup> )	3HV (mol.%)
FH (10%), (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 (g l <sup>-1</sup> )	Control†	10.2 ± 0.2	‡91.6 ± 1.1	‡9.5 ± 0.07	n.d.
	Propanol	4.2 ± 0.2	‡79.4 ± 2.1	‡3.3 ± 0.06	12.7 ± 0.2
	Valeric acid	8.8 ± 0.2	68.3 ± 3.2	‡6.0 ± 0.3	6.9 ± 0.2
	Sodium propionate	12.1 ± 0.1	‡85.7 ± 0.8	‡10.4 ± 0.4	37.7 ± 0.6
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 3 (g l <sup>-1</sup> )	Control†	10.5 ± 0.3	69.7 ± 1.1	7.3 ± 0.3	n.d.
	Propanol	4.7 ± 0.1	74.6 ± 3.4	‡3.5 ± 0.1	14.9 ± 0.7
	Valeric acid	8.2 ± 0.1	‡63.2 ± 1.3	‡5.2 ± 0.1	n.d.
	Sodium propionate	8.4 ± 0.3	‡75.7 ± 0.5	6.4 ± 0.4	23.2 ± 1.0

Each value is an average of three independent cultivations and three independent determinations of each cultivation, the results are presented as mean ± SD. n.d.—not detected.

\*CDW, cell dry weight.

†Control cultivation was provided without the addition of feather hydrolysate, concentration of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was 3 g l<sup>-1</sup>.

‡Marks the results in which a significant difference between particular result and control cultivation was confirmed by paired two-sample *t* test.

culture was not capable of copolymer biosynthesis in the absence of FH when valeric acid was used as a precursor; however, the application of FH enabled the incorporation of valeric acid into the copolymer structure with 3HV content of 6.9 mol%. An even more pronounced positive effect was observed in propionate which substantially decreased the biomass and polymer yields as compared to control cultivation in MS media. Nevertheless, the presence of FH as a complex nitrogen source eliminated the toxic effect of precursor and, oppositely, the biomass as well as polymer yields were higher than in control cultivation without the precursor. In addition, the presence of FH in the cultivation media substantially improved the efficiency of propionate incorporation into the copolymer since 3HV portion in copolymer synthesized in the presence of FH reached 37.7 mol%. However, there are several studies that reported an undesirable isodimorphism phenomenon if the concentration of 3HV in copolymer exceeds 40 mol% (Mitomo *et al.* 1993). Therefore, to avoid this phenomenon, the concentration of the precursor in cultivation media may be possibly decreased which can have a significant positive effect not just to lower the accumulation of 3HV units, but the toxic effect of the precursor to bacterial growth will be limited as well. To the best of our knowledge, there are no reports dealing with the influence of complex nitrogen sources on the biosynthesis of P(3HB-co-3HV). Nevertheless, since it was reported that the application of particular amino acids contained in FH, such as proline, leucine or isoleucine, enhanced the activity of the PHA biosynthetic pathway (Lee *et al.* 1995; Kim *et al.* 1996) it can be hypothesized that activated PHA biosynthesized pathway was capable of partial pumping off propionyl-CoA from 2-methylcitrate cycle and incorporating it into the copolymer structure.

To sum up, alkaline FH could serve as an inexpensive complex nitrogen source for the PHA production since by its addition into the cultivation media, the PHA and biomass yields were considerably improved. Moreover, the application of FH also substantially improved the P(3HB-co-3HV) production by eliminating the inhibitory effect of propionate on the biomass and polymer production and improving the efficiency of precursor incorporation into the copolymer structure.

## Materials and methods

### Materials and micro-organisms

Chicken feathers were supplied by the RABBIT s.r.o. poultry processing plant, Czech Republic. Waste frying oil was obtained from faculty cafeteria—Faculty of Chemistry, Brno University of Technology. *Cupriavidus necator*

H16 (CCM 3726) was purchased from the Czech Collection of Microorganisms, Brno, Czech Republic.

### Preparation of feather hydrolysate by microwave-alkali treatment and its characterization

Microwave-assisted alkali hydrolysis treatment of chicken feathers was carried out as reported by Lee *et al.* (2016) using a microwave oven (Samsung, M1610N, Kuala Lumpur, Malaysia) with the operating frequency of 2450 MHz and power level of 600 W. For hydrolyses, the exact amount of chicken feather was hydrolysed by 0.5 mol l<sup>-1</sup> NaOH. Microwave (600 W) operated for a total time of 10 min with an on/off 1-min period. After that, solid residues were removed by filtration and the pH was adjusted to 7 by HCl.

The content of dry matter was determined by drying (105°C) of chicken FH to constant weight. The ash content was determined as the weight of solids after the incubation of 1 g of dry FH at 750°C to constant weight. The protein content was determined by the BCA Protein Assay Kit (23227; Thermo Scientific MA, USA) and bovine serum albumin (BSA) as a standard. The analysis of amino acid composition of FH was performed after the acidic hydrolysis by automatic amino acids analyzer (AAA 400; Ingos, Prague, Czech Republic). The elemental analysis of FH was carried out by EuroEA Elemental Analyser (Wegberg, Germany).

### Cultivation in Erlenmeyer flasks

Nutrient broth medium was used for the inoculum growth. Mineral salt (MS) medium described previously (Obruca *et al.* 2010a) with 3 g l<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, unless otherwise stated, was used in all the experiments, concentration of waste frying oil was 20 g l<sup>-1</sup>. The volume of added FH amounted to 10% (vol/vol) of the cultivation medium. The production flasks containing MS medium and FH were inoculated by 10% of 24 h seed culture grown on NB medium. The precursors of 3-hydroxyvalerate (sodium propionate, valeric acid and propanol) were added in a final concentration of 3 g l<sup>-1</sup> after 24 h of cultivation. The cultivations were performed in Erlenmeyer flasks (volume 100 ml) containing 50 ml of the cultivation media. The temperature was set to 30°C, the agitation at 180 rev min<sup>-1</sup>. After 72 h of cultivation, the cells were harvested (centrifugation, 8000 rev min<sup>-1</sup>, 5 min) and the biomass as well as the PHA yields were determined as described below. All cultivations were performed in triplicate, each sample was also analysed in triplicate.

### Analytical methods

Biomass concentration and the PHA content in cells was analysed as reported previously (Obruca *et al.* 2010a).

The PHA content of dried cells was analysed by gas chromatography (Trace GC Ultra; Thermo Scientific). Commercially available P(3HB-co-3HV) (Sigma Aldrich, Schnelldorf, Germany) composed of 88 mol.% 3HB and 12 mol.% 3HV was used as a standard; benzoic acid (LachNer, Neratovice, Czech Republic) was used as an internal standard.

### Acknowledgements

This work was supported by the project Materials Research Centre at FCH BUT—Sustainability and Development no. LO1211 and national COST project LD15031 of the Ministry Education, Youth and Sports and by the project GA15-20645S of the Czech Science Foundation (GACR). Authors thank Prof. Eva Strakova (University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic) for the analysis of amino acid composition.

### Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

### References

- Budde, C.F., Riedel, S.L., Hübner, F., Risch, S., Popović, M.K., Rha, C.K. and Sirskey, A.J. (2011) Growth and polyhydroxybutyrate production by *Ralstonia eutropha* in emulsified plant oil medium. *Appl Microbiol Biotechnol* **89**, 1611–1619.
- Ewering, C., Bramer, C., Bruland, N., Bethke, A. and Steinbüchel, A. (2006) Occurrence and expression of tricarboxylate synthases in *Ralstonia eutropha*. *Appl Microbiol Biotechnol* **71**, 80–89.
- Kim, M.K., Lee, I.Y. and Park, Y.H. (1996) Metabolites and amino acids affecting cellular cofactor concentrations and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus*. *Biotech Lett* **18**, 559–564.
- Koller, M., Bona, R., Hermann, C., Horvat, P., Martinz, J., Neto, J., Pereira, L., Varila, P. et al. (2005) Biotechnological production of poly(3-hydroxybutyrate) with *Wautersia eutropha* by application of green grass juice and silage juice as additional complex substrates. *Biocatal Biotransform* **23**, 329–337.
- Koller, M., Atlíč, A., Dias, M., Reiterer, A. and Braunegg, G. (2010) Microbial PHA production from waste raw materials. In *Plastics From Bacteria: Natural Functions and Applications* ed. Chen, G.Q. pp 85–119. Berlin: Springer Berlin Heidelberg.
- Koller, M., Marsalek, L., Sousa Dias, M.M. and Braunegg, G. (2017) Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. *New Biotechnol* **37**, 24–38.
- Lee, S. (1998) Poly(3-hydroxybutyrate) production from xylose by recombinant *Escherichia coli*. *Bioprocess Eng* **18**, 397–399.
- Lee, S., Lee, Y.K. and Chang, H.N. (1995) Stimulatory effects of amino acids and oleic acid on poly(3-hydroxybutyric acid) synthesis by recombinant *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng* **79**, 177–180.
- Lee, Y.S., Phang, L.Y., Ahmad, S.A. and Ooi, P.T. (2016) Microwave-alkali treatment of chicken feathers for protein hydrolysate production. *Waste Biomass Valorization* **7**, 1147–1157.
- Liu, C.C., Zhang, L.L., An, J., Chen, B. and Yang, H. (2015) Recent strategies for efficient production of polyhydroxyalkanoates by micro-organisms. *Lett Appl Microbiol* **62**, 9–15.
- Mitomo, H., Morishita, N. and Doi, Y. (1993) Composition range of crystal phase transition of isodimorphism in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Macromolecules* **26**, 5809–5811.
- Obruca, S., Marova, I., Snajdar, O., Mravcova, L. and Svoboda, Z. (2010a) Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* from waste rapeseed oil using propanol as a precursor of 3-hydroxyvalerate. *Biotech Lett* **32**, 1925–1932.
- Obruca, S., Marova, I., Svoboda, Z. and Mikulikova, R. (2010b) Use of controlled exogenous stress for improvement of poly(3-hydroxybutyrate) production in *Cupriavidus necator*. *Folia Microbiol* **55**, 17–22.
- Obruca, S., Snajdar, O., Svoboda, Z. and Marova, I. (2013) Application of random mutagenesis to enhance the production of polyhydroxyalkanoates by *Cupriavidus necator* H16 on waste frying oil. *World J Microbiol Biotechnol* **29**, 2417–2428.
- Obruca, S., Benesova, P., Oborna, J. and Marova, I. (2014) Application of protease-hydrolyzed whey as a complex nitrogen source to increase poly(3-hydroxybutyrate) production from oils by *Cupriavidus necator*. *Biotech Lett* **36**, 775–781.
- Page, W. and Cornish, A. (1993) Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of poly-beta-hydroxybutyrate. *Appl Environ Microbiol* **59**, 4236–4244.
- Passanha, P., Kedia, G., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J. and Esteves, S.R. (2014) The use of NaCl addition for the improvement of polyhydroxyalkanoate production by *Cupriavidus necator*. *Bioresour Technol* **163**, 287–294.
- Patinvoh, R.J., Feuk-Lagerstedt, E., Lundin, M., Sárvári Horváth, I. and Taherzadeh, M.J. (2016) Biological pretreatment of chicken feather and biogas production from total broth. *Appl Biochem Biotechnol* **180**, 1401–1415.
- Pradella, J.G., Ienczak, J.L., Delgado, C.R. and Taciro, M.K. (2012) Carbon source pulsed feeding to attain high yield and high productivity in poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) production from soybean oil using *Cupriavidus necator*. *Biotech Lett* **34**, 1003–1007.

- Prakash, S., Veeranagouda, Y., Kyoung, L. and Sreeramulu, K. (2009) Xylanase production using inexpensive agricultural wastes and its partial characterization from a halophilic *Chromohalobacter* sp. TPSV 101. *World J Microbiol Biotechnol* **25**, 197–204.
- Purushothaman, M., Anderson, R., Narayana, S. and Jayaraman, V. (2001) Industrial byproducts as cheaper medium components influencing the production of polyhydroxyalkanoates (PHA) - biodegradable plastics. *Bioprocess Biosyst Eng* **24**, 131–136.
- Reddy, N. (2015) Non-food industrial applications of poultry feathers. *Waste Manage* **45**, 91–107.
- Stiborova, H., Branska, B., Vesela, T., Lovecka, P., Stranska, M., Hajslova, J., Jiru, M., Patakova, P. et al. (2016) Transformation of raw feather waste into digestible peptides and amino acids. *J Chem Technol Biotechnol* **91**, 1629–1637.
- Sudesh, K., Abe, H. and Doi, Y. (2000) Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog Polym Sci* **25**, 1503–1555.
- Taskin, M., Ozkan, B., Atici, O. and Aydogan, M.N. (2011) Utilization of chicken feather hydrolysate as a novel fermentation substrate for production of exopolysaccharide and mycelial biomass from edible mushroom *Morchella esculenta*. *Int J Food Sci Nutr* **63**, 597–602.
- Taskin, M., Esim, N. and Ortucu, S. (2012) Efficient production of l-lactic acid from chicken feather protein hydrolysate and sugar beet molasses by the newly isolated *Rhizopus oryzae* TS-61. *Food Bioprod Process* **90**, 773–779.

## 9.5 Příloha V

similar to those for thermotolerant genes of intrinsically thermotolerant *Escherichia coli* [2] and thermotolerant *Acetobacter tropicalis* [3], suggesting that they share similar mechanisms for survival at a CHT. Moreover, to further improve thermotolerance, we performed thermal adaptation of two strains of *Z. mobilis* and identified mutations responsible for the adaptation. These experiments suggest that there is genomic capacity for thermal adaptation and its limit, and that there are several common molecular mechanisms.

### References

- [1] Charoensuk K, et al. *Biotechnol Biofuels* 2017;10:204. <http://dx.doi.org/10.1186/s13068-017-0891-0>.
- [2] Murata M, et al. *PLOS ONE* 2018. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0189487>.
- [3] Soemphol W, et al. *Biosci Biotechnol Biochem* 2011;75:1921–8. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.05.951>

### P10-9

#### Evolutionary engineering of *Cupriavidus necator* for improved utilization levulinic acid

D. Kucera<sup>1,\*</sup>, I. Novackova<sup>2</sup>, I. Pernicova<sup>1</sup>, S. Obruca<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Materials Research Centre, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Brno, Czech Republic

<sup>2</sup> Institute of Food Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Brno, Czech Republic

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are bacterial polyesters that are considered as biodegradable and environmentally friendly alternatives to petrochemical plastics. The most common of them is poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) which, although having material properties very close to polypropylene, lacks some qualities. Above all, it is very stiff and brittle. However, in the case of copolymers such as P3HB-co-3HV containing 3-hydroxyvalerate units (3HV), the most problems can be eliminated. The 3HV/3HB ratio significantly influences the different characteristics of the copolymer, such as melting temperature or impact strength. In order to produce the copolymer, it is necessary to add 3HV precursors which bacteria can incorporate into the copolymer structure. These are mostly expensive, which affects the already expensive PHA production. Levulinic acid (LA) is possible precursor, because it can be produced cost effectively and in high yield from renewable feedstocks. LA is a relatively cheap substrate and compares favorably with other possible precursors like propionic acid or valeric acid.

The aim of work was to use the concept of adaptive laboratory evolution to obtain strains capable of utilization LA. Adaptation tests were carried out with the *Cupriavidus necator* H16 strain. Higher LA concentrations have been shown to significantly reduce the growth of the selected strain. Adaptation tests led to an increase in the proportion of PHV in the copolymer produced.

This work was supported by the project LO1211 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.05.952>

### Molecular tools and bioinformatics

#### P11-1

#### Hot spot identification by ligand-protein surface interactions mapping – *in silico* study

A. Stanczak<sup>1,2</sup>, T. Magdziarz<sup>1</sup>, A. Raczynska<sup>1,3,\*</sup>, A. Gra<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Tunneling Group, Biotechnology Centre, Silesian University of Technology, Bolesława Krzywoustego 8, 44-100 Gliwice, Poland

<sup>2</sup> Faculty of Chemistry, Silesian University of Technology, ks. Marcina Strzody 9, 44-100 Gliwice, Poland

<sup>3</sup> Faculty of Automatic Control, Silesian University of Technology, Akademicka 16, 44-100 Gliwice, Poland

Haloalkane dehalogenases possess the ability to cleave carbon-halogen bonds in halogenated aliphatic compounds. They are becoming subject of many studies because of their potential use in bioremediation. Their active center is formed in a cavity hidden deep inside protein core. Before reaction takes place, substrates need to be transferred from surrounding solution to active site cavity. Previous experimental studies revealed an allosteric effect which suggest that despite substrate binding in active site, ligands can bind to the surface and participate in regulation of enzyme activity. Such findings have initiated our research concerning searching for surface amino acids which interact with substrates and controlling well-studied LinB dehalogenase activity.

We performed classical molecular dynamics simulations using Amber14 package to study spontaneous delivery of two different substrates: bromocyclohexane and 1,2-dibromoethane. The preliminary results show that we are able to capture the ligands entry phenomena. Furthermore, we are observing that particular sections of protein surface are able to trap and hold substrates prior to their entry to the active site. Detailed analysis yields information about the retentions of substrates in different compartments of protein surface, hence we constructed the surface-ligand contact map. It might shed a new light on importance of substrate transportation phenomena for selectivity and activity of LinB enzyme. The proposed approach can be used for identification of potential hot-spots for fine-tuning of an enzyme activity and selectivity.

This work is supported by National Science Centre Poland grant HARMONIA DEC-2015/18/M/NZ1/00427.

<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.05.953>

#### P11-2

#### Evolution of functionally important compartments of proteins – what can we learn from studying epoxide hydrolases?

M. Bzwicka<sup>1,2</sup>, T. Magdziarz<sup>1</sup>, K. Mitusinska<sup>1,2</sup>, A. Stanczak<sup>1,2</sup>, A. Raczynska<sup>1,3,\*</sup>, A. Gra<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Tunneling Group, Biotechnology Centre, Silesian University of Technology, Krzywoustego 8, 44-100 Gliwice, Poland

<sup>2</sup> Faculty of Chemistry, Silesian University of Technology, ks. Marcina Strzody 9, 44-100 Gliwice, Poland

<sup>3</sup> Institute of Automatic Control, Silesian University of Technology, Akademicka 16, 44-100 Gliwice, Poland



## 9.6 Příloha VI

Biochemical Engineering Journal 151 (2019) 107350



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Engineering Journal

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bej](http://www.elsevier.com/locate/bej)



Regular article

### Adaptation of *Cupriavidus necator* to levulinic acid for enhanced production of P(3HB-co-3HV) copolyesters



Ivana Novackova<sup>a</sup>, Dan Kucera<sup>a,b</sup>, Jaromir Porizka<sup>a,b</sup>, Iva Pernicova<sup>a,b</sup>, Petr Sedlacek<sup>b</sup>, Martin Koller<sup>c,d</sup>, Adriana Kovalcik<sup>a</sup>, Stanislav Obruca<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Food Chemistry and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Bmo University of Technology, Purkynova 118, 612 00 Bmo, Czech Republic

<sup>b</sup> Material Research Centre, Faculty of Chemistry, Bmo University of Technology, Purkynova 118, 612 00 Bmo, Czech Republic

<sup>c</sup> Institute of Chemistry, NAWI Graz, University of Graz, Heinrichstrasse 28/III, 8010 Graz, Austria

<sup>d</sup> ARENA Arbeitsgemeinschaft Für Ressourcenschonende & Nachhaltige Technologien, Inffeldgasse 21b, 8010 Graz, Austria

#### HIGHLIGHTS

- Evolved strains demonstrated better growth in the presence of LA.
- Adaptation of *C. necator* H16 to LA led to higher content of 3HV in P(3HB-co-3HV).
- Higher 3HV content was connected with lower crystallinity and lower  $T_m$ .
- Slightly different adaptation strategies of evolved strains were observed.
- PCA has been used for multiparametric analysis of data.

#### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
polyhydroxyalkanoates  
levulinic acid  
adaptation  
*Cupriavidus necator*  
metabolic characterization

#### ABSTRACT

Evolutionary engineering is an approach, which allows preparing microorganisms with desired phenotype without the need for knowledge of genetic characteristics connected with changes at phenotype level. This approach is based on cell multiplication under stress conditions and it can be performed in various designs. In connection with PHA-producing bacteria, evolutionary engineering can be used to gain microorganisms producing PHAs with required material properties. Using levulinic acid (LA) as a stress factor and *Cupriavidus necator* H16 as a model PHA producing bacterial strain, five evolved strains have been obtained in the present study. Compared with the parental strain, all of these showed better growth in the presence of LA, strains ALA01 and ALA04 showed higher PHA content in biomass and strains ALA03 and ALA04 showed higher 3-hydroxyvalerate (3HV) content in copolymer P(3HB-co-3HV). By DSC and FTIR analysis of polymers, connections between 3HV content, crystallinity and melting temperature have been studied. Metabolic characterization provided information about possible adaptation strategies of evolved strains, while based on methods of statistical analysis similarities and differences between individual strains were discussed. Considering obtained information, evolutionary engineering displays a useful tool for modification of microorganisms together with fine-tuning the properties of produced metabolites (PHA copolyesters).

#### 1. Introduction

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polyesters of hydroxyalkanoic acids, which are accumulated by numerous prokaryotic microorganisms in form of intracellular granules. The primary biological function of PHA is intracellular storage of carbon, energy and reducing power; however, apart from their role for survival of cells under starvation conditions, presence of PHA granules in bacterial cells also enhances

their robustness against various other stress factors [1] such as UV irradiation [2], repeated freezing-thawing cycles [3], oxidative stress [4,5] or osmotic imbalance [6].

Furthermore, due to their biodegradable and biocompatible nature and renewable origin, PHAs have been attracting considerable attention as promising "green" alternatives to petrochemical polymers [7]. Nevertheless, commercial production of PHA is scarce as a consequence of the high production cost and also due to their non-optimal

\* Corresponding author.

E-mail address: [Stana.O@seznam.cz](mailto:Stana.O@seznam.cz) (S. Obruca).

<https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107350>

Received 6 May 2019; Received in revised form 17 July 2019; Accepted 15 August 2019

Available online 16 August 2019

1369-703X/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Nomenclature			
D	polydispersity index	3-KT1	3-ketothiolase 1
Mw	weight-average molecular weight	3-KT2	3-ketothiolase 2
Mn	number-average molecular weight	AACoAR	acetoacetyl-CoA reductase
T <sub>m</sub>	melting temperature	ACoAS	acyl-CoA synthetase
ΔH <sub>m</sub>	enthalpy of fusion	CoA	coenzyme A
ΔH <sub>tot</sub>	total melting enthalpy	G6PD	glucose-6-phosphate dehydrogenase
A	absorbance	LA	levulinic acid
<b>Abbreviation</b>		MDH	malate dehydrogenase
2MCS	2-methylcitrate synthase	MMS	methyl methansulphonate
3HB	3-hydroxybutyrate	MS	malate synthase
3HV	3-hydroxyvalerate	NAD-IDH	NAD-dependent isocitrate dehydrogenase
		NADP-IDH	NADP-dependent isocitrate dehydrogenase
		PCA	principal component analysis
		PHA	polyhydroxyalkanoate

mechanical and technological properties. The most common PHA, poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), the homopolymer of 3-hydroxybutyrate (3HB), is a highly crystalline and brittle material with melting temperature (T<sub>m</sub>) close to its degradation temperature. However, processing of PHB is challenging, and applications are considerably limited because of its disadvantageous material characteristics [8]. Nevertheless, mechanical properties of PHA can be substantially improved when other monomer units are incorporated into polymeric chains. For instance, the most widely studied PHA copolymer consisting of 3HB and 3-hydroxyvalerate (3HV), namely poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (P(3HB-co-3HV)), demonstrates reduced crystallinity, higher flexibility and considerably lower melting temperature than PHB homopolymer [9,10].

Most bacterial PHAs producers require supplementation by suitable propionyl-CoA generating precursors such as propionate, n-propanol or valerate to induce biosynthesis of P(3HB-co-3HV) copolymer [11], while only a limited number of microbes, mainly from the Archaea domain, are able to synthesize P(3HB-co-3HV) copolyesters without the need for 3HV precursors (reviewed by [12]). However, these precursors are expensive; thus, their application further reduces economic competitiveness of PHAs production. Therefore, an alternative inexpensive 3HV-precursor, levulinic acid (4-oxopentanoic acid, LA) was utilized in previous studies for P(3HB-co-3HV) production from glycerol [13,14], xylose [15], or whey [16] as main substrates. Moreover, a process for production of PHA containing 3HB, 3HV, 4-hydroxyvaleric acid (4HV) and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids by a recombinant *Pseudomonas putida* strain was developed using a medium with octanoic and LA as carbon sources [17]. LA can be efficiently produced in high yields by the dehydrative treatment of biomass or carbohydrates with acid and, therefore, it is considered being a crucial bio-based platform chemical. Cost of LA in large scale production is estimated at US-\$ 0.09 – US-\$ 0.20 kg<sup>-1</sup> [18]. Nevertheless, LA reveals substantial microbial inhibitory activity since it inhibits biosynthesis of tetrapyrroles such as heme or vitamin B12 and, similarly to other weak organic acids, LA can acidify the cytoplasm of bacterial and yeast cells and, hereby, inhibit or completely hamper the entire metabolism [19]. Due to its toxicity, use of LA as a precursor of 3HV can be problematic since it can substantially decrease productivity of the biotechnological process. It should be mentioned that levulinic acid is also formed as an undesired side product when the carbohydrate fraction of lignocellulose materials is thermally hydrolyzed in assistance of mineral acids. Therefore, LA along with acetic acid, phenolics and furfural is considered being one of the undesired microbial inhibitors, which are present in lignocellulose-based cultivation media [20].

Taking into account all the possible relationships of LA to biotechnological production of PHA, we have decided to utilize approaches of evolutionary engineering and subsequent metabolic characterization of evolved strains to investigate mechanisms of adaptation of

*Cupriavidus necator* to LA. We also intended to test whether selected approach can be used to gain strains adapted to LA, which would be of great importance for PHA production both by using LA as 3HV precursor and for PHA production from lignocellulose based substrates used as the main carbon source. *C. necator* was selected since it is considered being the model bacterial strain in the context of PHA metabolism, and it is also a promising candidate strain for industrial production of PHAs [21].

## 2. Material and methods

### 2.1. Microorganism, its cultivation and adaptation to LA

*Cupriavidus necator* H16 CCM 3726 was purchased from the Czech Collection of Microorganisms. The nutrient broth (NB) medium (10 g L<sup>-1</sup> peptone, 10 g L<sup>-1</sup> beef extract, 5 g L<sup>-1</sup> NaCl) was used for the inoculum preparation and the culture preservation (agar plates). The mineral salt (MS) medium was used in all the experiments: 3 g L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.02 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11.01 g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O, 0.2 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, 1 mL microelement solution and 1 L distilled water. The microelement solution was composed of 9.7 g L<sup>-1</sup> FeCl<sub>3</sub>, 7.8 g L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, 0.156 g L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O, 0.119 g L<sup>-1</sup> CoCl<sub>2</sub>, 0.118 g L<sup>-1</sup> NiCl<sub>2</sub>, 0.062 g L<sup>-1</sup> CrCl<sub>2</sub> and 0.1 mol L<sup>-1</sup> HCl. Fructose at a concentration of 20 g L<sup>-1</sup> was used as a carbon source in all the cultivations. Fructose stock solution, salt solutions, stock solution of LA (Sigma Aldrich) and microelement solutions were autoclaved separately (121 °C, 25 min) and then aseptically reconstituted at room temperature prior to the inoculation. The pH-value was adjusted to 7.0 using 1 mol L<sup>-1</sup> NaOH. The cultivations were performed in Erlenmeyer flasks (volume 250 mL) containing 100 mL of MS medium. The temperature was set to 30 °C, the flasks were agitated at 180 rpm.

The adaptation of the bacterial culture to LA was performed by a series of cultivations with gradual increase of concentration of LA in cultivation media, followed by selection and identification of the best adapted cells as fastest-growing colonies on agar dishes containing MS medium with high concentration of LA. In the first step, overnight inoculum grown in NB medium was transferred into MS media with 0.5 and 5 g L<sup>-1</sup> of LA, respectively, and also into MS media without LA; these cultures were cultivated for 48 hours. After that, 100 μL of each bacterial culture was transferred onto agar plates containing agar solidified MS media with 1, 3, 5 and 10 g L<sup>-1</sup> of LA. It should be noted that no growth occurred in presence of 10 g L<sup>-1</sup> of LA in this step. Subsequently, the colonies capable of growth at the highest concentration of LA (5 g L<sup>-1</sup>) were transferred by streaking patterns onto new agar plates containing agar solidified MS medium with 5 and 7.5 g L<sup>-1</sup> of LA, respectively. Finally, the colonies capable of growth at the highest concentration of LA were selected as adapted cultures for further characterization.

In parallel, the model organism *C. necator* H16 was subjected to adaptation to LA ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) in the presence of 0.1 and  $0.5 \text{ g L}^{-1}$  of the chemical mutagen methyl methanesulphonate (MMS) for 48 hours (cultivated at  $30^\circ\text{C}$ , 180 rpm). After that,  $100 \mu\text{L}$  of each bacterial culture was transferred onto agar plates containing agar-solidified MS media with 5, 7.5, 10 and  $12.5 \text{ g L}^{-1}$  of LA, respectively. Similarly to the cultures described above, the colonies capable of growth at the highest concentration of LA were selected as adapted cultures for further characterization. All the evolved strains were transferred into NB medium with  $1 \text{ g L}^{-1}$  of LA, cultivated for 24 h ( $30^\circ\text{C}$ , 180 rpm) and stored in presence of 10 vol.% glycerol at  $-80^\circ\text{C}$ .

An illustration summarizing the adaptation process with and without the mutagen can be seen in Supplementary materials.

## 2.2. Testing of PHA production capabilities of evolved strains

PHA production capability of evolved strains was compared to the wild-type strain in an experiment performed in Erlenmeyer flasks. The inocula were prepared in NB medium and cultivated for 24 h ( $30^\circ\text{C}$ , 180 rpm). After that, microbial cultures were transferred into flasks (volume 250 mL) containing 100 mL of MS medium with  $3.5 \text{ g L}^{-1}$  of LA. The cultivations were performed for 72 h; after that, the microbial cells were harvested by centrifugation ( $8000 \times g$ , 5 min) and analyzed for PHA content as described in section 2.3. Furthermore, after 48 h of cultivation, samples were taken for determination of intracellular activities (described in 2.4) of selected enzymes. All the cultivations were performed in triplicate.

## 2.3. Analysis of PHA

To determine biomass concentration expressed as cell dry mass (CDM) and PHA content in cells, samples (10 mL) were centrifuged and the cells were re-suspended and washed with 5% (v/v) Triton X (10 mL), centrifuged again, and finally re-suspended and washed with distilled water. The biomass concentration was analyzed gravimetrically and PHA content in cells and monomer composition of PHA were analyzed as methyl esters of individual 3-hydroxyacids (3HB and 3HV) by gas chromatography as reported previously [22]. Copolymer P (3HB-co-3HV) with a 3HV content of 12% (Sigma Aldrich, Germany) was used as a standard, benzoic acid (LachNer, Czech Republic) was used as an internal standard.

To determine the molecular weight of PHA samples, the polyesters were extracted from the dried cells by chloroform (approx. 20 mg biomass, 5 mL chloroform,  $70^\circ\text{C}$ , 24 h under continuous stirring), residual bacterial biomass was separated by filtration, and, finally, the solvent was removed by evaporation at  $70^\circ\text{C}$  for 24 h. After that, 5 mg of the polymer was solubilized in 1 mL of HPLC-grade chloroform. Obtained samples were passed through syringe filters (nylon membrane, pore size  $0.45 \mu\text{m}$ ) and analyzed by gel Size Exclusion Chromatography (Agilent, Infinity 1260 system containing PLgel MIXED-C column) coupled with Multiangle Light Scattering (Wyatt Technology, Dawn Heleos II) (SEC-MALS) and Differential Refractive Index (Wyatt Technology, Optilab T-rEX) detection. For the analysis,  $100 \mu\text{L}$  of individual samples were injected into the chromatographic system containing HPLC-grade chloroform (pre-filtered through  $0.02 \mu\text{m}$  membrane filter) as mobile phase. The used flow rate was  $0.6 \text{ mL min}^{-1}$ . The weight-average molecular weight ( $M_w$ ) and polydispersity index ( $\mathcal{D}$ , ratio of weight-average and number-average molecular weight  $M_w/M_n$ ) were determined using the ASTRA software (Wyatt Technology, version 6.1) based on Zimm's equations [23]. The used value of refractive index increment ( $dn/dc$ ) for PHB was  $0.0336 \text{ mL g}^{-1}$ , as determined from the differential refractometer response assuming a 100% sample mass recovery from the column.

Melting behavior of the isolated PHA polymers was analyzed by means of a differential scanning calorimeter (DSC) Q2000 (TA Instruments) equipped with an RCS90 Cooling accessory and evaluated

by TA Universal Analysis 2000 software. Phase transitions of mercury and indium were used for the calibration in the applied temperature range. Samples of a certain mass (ca. 5 mg) were placed in hermetically sealed Tzero aluminum pans, and the measurement was carried out under a dynamic nitrogen atmosphere. To ensure the same thermal history of all samples prior to the evaluation of their melting behavior, each sample was first heated at  $10^\circ\text{C min}^{-1}$  to  $190^\circ\text{C}$  and subsequently cooled down to  $-30^\circ\text{C}$  at the same cooling rate. Then the sample was heated again ( $10^\circ\text{C min}^{-1}$  to  $200^\circ\text{C}$ ) and the thermogram, recorded in this second heating step, was further evaluated. From each of the measured thermograms,  $T_m$  was determined as the peak temperature value in the melting endotherm. Further, total melting enthalpy ( $\Delta H_{\text{tot}}$ ) was determined by integration of the melting endotherm as its total area.

The infrared spectra of isolated polymers were recorded with a Nicolet iS50 FTIR spectrometer (Thermo Scientific). All measurements were taken at ambient temperature ( $25^\circ\text{C}$ ) on the built-in single-reflection diamond attenuated total reflectance (ATR) crystal. Each spectrum was collected as an average of 128 scans with resolution  $1 \text{ cm}^{-1}$ . Recorded spectra are provided without further corrections.

## 2.4. Determination of enzyme activities

The cells for determination of activities of selected enzymes were sampled after 48 h of cultivation as described in section 2.2, harvested by centrifugation ( $8000 \times g$ , 5 min,  $4^\circ\text{C}$ ), suspended in  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  phosphate buffer (pH 7.4) and disrupted by sonication (Sonopuls HD 3200, Bandeline, Germany) at  $4^\circ\text{C}$ . The cytosol was separated from the cell debris by centrifugation ( $10,000 \times g$ , 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ), aliquoted and stored at  $-80^\circ\text{C}$ .

Spectrophotometric determination of enzyme activities was described in details previously by Obruca et al. [24]. Activity of NAD-dependent isocitrate dehydrogenase (NAD-IDH) and NADPH-dependent isocitrate dehydrogenase (NADP-IDH) were determined spectrophotometrically (340 nm) in reaction mixture consisting of  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  phosphate buffer (pH 7.4),  $1 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{NAD}^+$  or  $\text{NADP}^+$ ,  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  isocitrate,  $10 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4$  and  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  KCl. Similarly, activities of malate dehydrogenase (MDH) and malic enzyme (ME) were determined in phosphate buffer (pH 7.4),  $1 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{NAD}^+$  in case of MDH or  $1 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{NADP}^+$  in case of ME,  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  malate,  $10 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4$  and  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  KCl. The activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) was measured in following reaction mixture: phosphate buffer pH 7.4,  $1 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{NADP}^+$ ,  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  glucose-6-phosphate and  $30 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ . Activity of malate synthase (MS) was determined by monitoring the release of free CoA during the enzymatic reaction (at  $30^\circ\text{C}$ ) using  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  5,5'-di-thiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) at 405 nm in  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  phosphate buffer (pH 7.4) containing  $0.2 \text{ mmol L}^{-1}$  acetyl-CoA and  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  glyoxylic acid.

Similarly, activity of 3-ketothiolases (3-KT) was assayed by following release of free CoA using DTNB. The reaction mixture for determination of activity of 3-KT1 (catalyzing the condensation of two acetyl-CoA molecules) contained phosphate buffer ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7.4),  $0.2 \text{ mmol L}^{-1}$  acetyl-CoA and  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  DTNB. In order to estimate activity of 3-KT2 capable of incorporation of propionyl-CoA into 3-hydroxyvaleryl-CoA (condensation of acetyl-CoA and propionyl-CoA), the reaction mixture contained  $0.2 \text{ mmol L}^{-1}$  acetyl-CoA,  $0.2 \text{ mmol L}^{-1}$  propionyl-CoA and  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  DTNB, and the activity of 3-KT1 was subtracted from the results of this assay. Acetoacetyl-CoA reductase (AACoR) activity was determined in a mixture containing  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  acetoacetyl-CoA,  $0.4 \text{ mmol L}^{-1}$  NADPH and phosphate buffer ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7.4),  $\text{NADP}^+$  formation was measured spectrophotometrically as a decrease of absorbance at 340 nm. PHA synthase activity was determined spectrophotometrically (405 nm) in a mixture containing phosphate buffer ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7.4),  $0.2 \text{ mmol L}^{-1}$  3-hydroxybutyryl-CoA and  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  DTNB. Activity of 2-

methylcitrate synthase (2MCS) was determined in mixture consisting of 50 mmol L<sup>-1</sup> phosphate buffer pH 7.4, 2 mmol L<sup>-1</sup> oxaloacetate, 1 mmol L<sup>-1</sup> propionyl-CoA and 2 mmol L<sup>-1</sup> DTNB by measuring the absorbance at 405 nm. Activity of levulinic acid specific acyl-CoA synthetase (ACoAS) was determined in mixture containing 50 mmol L<sup>-1</sup> phosphate buffer (pH 7.4), 2 mmol L<sup>-1</sup> DTNB, 0.07 mmol L<sup>-1</sup> CoA and 0.15 mmol L<sup>-1</sup> ATP. Separately, the activities of intracellular enzymes from cell extracts and membrane-binding enzymes from cell debris were measured. Activity of ACoAS was measured as a decrease of absorbance at 405 nm caused by loss of substrate, namely free CoA.

All the samples were analyzed in triplicate. In all these cases, final volume of reaction mixture was 250 µL, the reactions were initiated by addition of cell extracts (25 µL) and the changes of absorbance were recorded at 340 or 405 nm with regards to the enzyme analyzed, temperature was set to 30°C (ELx800, Biotek, Germany). One unit of enzyme activity was defined as the conversion of one nmol of substrate per minute. The amount of soluble protein in cell extracts was determined by Hartree-Lowry method [25] using bovine serum albumin as a standard (NanoPhotometer, Implen, Germany).

### 2.5. Statistical analysis

Results were sorted and processed by various statistical approaches. Analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test were used to evaluate the differences between the tested bacterial strains in terms of production and metabolic parameters. Principal component analysis (PCA), based on Pearson correlation, was used for multivariate characterization of bacterial strains. The main goal of PCA was to find similarities and dissimilarities between the strains and to obtain potential clustering of the observations. Results of PCA were visualized by the two dimensional projection of the observations onto biplot of principal components and original variables. Data analysis was performed by Microsoft excel (Microsoft, USA) and XL-stat (Addinsoft, France).

## 3. Results and discussion

### 3.1. PHA production by LA-adapted strains

By application of evolutionary engineering approaches to gain *C. necator* strains adapted to LA, we obtained in total 8 evolved strains designated as ALA01 – ALA08. All these strains were further tested for their PHA production capabilities via submerged cultivation in mineral medium in presence of 3.5 g L<sup>-1</sup> of LA. The wild-type strain was cultivated in the same medium as a control culture. The results of this comparative production experiment are demonstrated in Table 1. Out of the eight evolved strains, three strains (ALA05, ALA07 and ALA08) revealed very poor growth and no PHA accumulation. Therefore, these bacterial cultures were eliminated from further experiments and metabolic characterization. On the contrary, as expected, adaptation of the

strains to LA substantially improved growth properties in presence of LA for most of remaining cultures. In particular, especially strains ALA01 and ALA02 reached about 25% higher cell concentration than the wild-type control culture. The fact that application of evolutionary engineering for adaptation of *C. necator* to LA may eliminate its growth inhibitory effect can be considered being positive for the overall volumetric productivity. PHAs are intracellular products, thus reaching high cell density is crucial to obtain high product titers [26]. This fact is well demonstrated by our data since PHA titers reached with ALA01 and ALA02 (4.7 and 5.0 g L<sup>-1</sup>, respectively) are substantially higher than those obtained by wild-type strain (3.5 g L<sup>-1</sup>) and, at the same time, intracellular contents of the polymer are comparable. Further, with exception of ALA04 and ALA06, evolved strains accumulated polymer with considerably lower M<sub>w</sub> than the wild-type strain. Despite lower M<sub>w</sub> of polymer is not desired considering its properties, all determined values were still high enough for processing of the materials. Moreover, the strain ALA04 as well as strain ALA03 are interesting due to the fact that they were capable of incorporating higher amounts of 3HV into the copolymer than observed for the wild type, while the 3HV content in the copolymers produced by other evolved strains were even lower than in the wild-type strain. The material properties of polymers produced by particular strains are in details discussed in part 3.3.

### 3.2. Metabolic profiling of evolved strains

Evolved strains and the wild-type strain were characterized by determination of enzyme activities of selected enzymes involved in the central metabolism, PHA metabolism and metabolism of LA. The scheme of metabolic pathways and particular enzymes, which activities were examined within this study, is shown in Fig. 1. Activities of selected enzymes of all the evolved strains and of the control strain were compared to assess possible similarities and dissimilarities, and to identify potential adaptation strategies of *C. necator* to LA. The results are provided in Table 2.

Generally, when exposed to LA during cultivation, the evolved strains adapted to LA show metabolic disparities in comparison to the wild-type strain. The most significant disparity between evolved strains and the wild-type strain was observed in propionyl-CoA catabolism through the 2-methylcitrate cycle in which propionyl-CoA is turned into pyruvate, which may be further decarboxylated to acetyl-CoA [27,28]. Metabolization of propionyl-CoA via the 2-methylcitrate cycle provides energy and/or important constituents for biomass synthesis. Activity of 2-methylcitrate synthase (2MCS) was considerably enhanced in all the evolved strains as compared to wild-type strain (1.9–5.2 fold). It seems reasonable that adaptation of the bacterium to LA, which is metabolically cleaved into acetyl-CoA and propionyl-CoA, is associated with increasing activity of the 2-methylcitrate pathway. On the other side, it was reported that due to the activity of the propionyl-CoA-consuming 2-methylcitrate cycle, only a small portion of propionyl-CoA is

Table 1

Biomass and PHA titers obtained with various strains adapted to LA. 72 h cultivations with 3.5 g L<sup>-1</sup> LA.

	CDM	PHA	PHA	3HV content in PHA	M <sub>w</sub>
	[g L <sup>-1</sup> ]	[wt. %]	[g L <sup>-1</sup> ]	[mol. %]	[kDa]
<i>C. necator</i> Wild-type	7.3 ± 0.2	47.8 ± 2.1	3.5 ± 0.1	15.8 ± 0.9	668.0 ± 25.6
<i>C. necator</i> ALA01	9.3 ± 0.3	49.9 ± 0.9	4.7 ± 0.2	13.9 ± 0.3	422.0 ± 64.2
<i>C. necator</i> ALA02	9.0 ± 0.1	47.7 ± 0.7	5.0 ± 0.1	13.50.2	455.2 ± 64.6
<i>C. necator</i> ALA03	8.1 ± 0.1	47.8 ± 2.8	4.1 ± 0.1	17.0 ± 0.1	427.8 ± 22.4
<i>C. necator</i> ALA04	7.8 ± 0.1	55.4 ± 1.5	3.9 ± 0.1	20.6 0.9	615.5 ± 66.0
<i>C. necator</i> ALA05	0.4 ± 0.1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>C. necator</i> ALA06	7.4 ± 0.8	41.80.5	3.1 ± 0.3	11.4 ± 0.3	725.9 ± 27.1
<i>C. necator</i> ALA07	0.9 ± 0.2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>C. necator</i> ALA08	0.6 ± 0.1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

CDM stands for cell dry mass, n.d. – not detected. Results are in form: mean ± standard deviation. Highest results for CDM, PHA, PHA content, 3HV content in PHA, and M<sub>w</sub> are highlighted in grey.

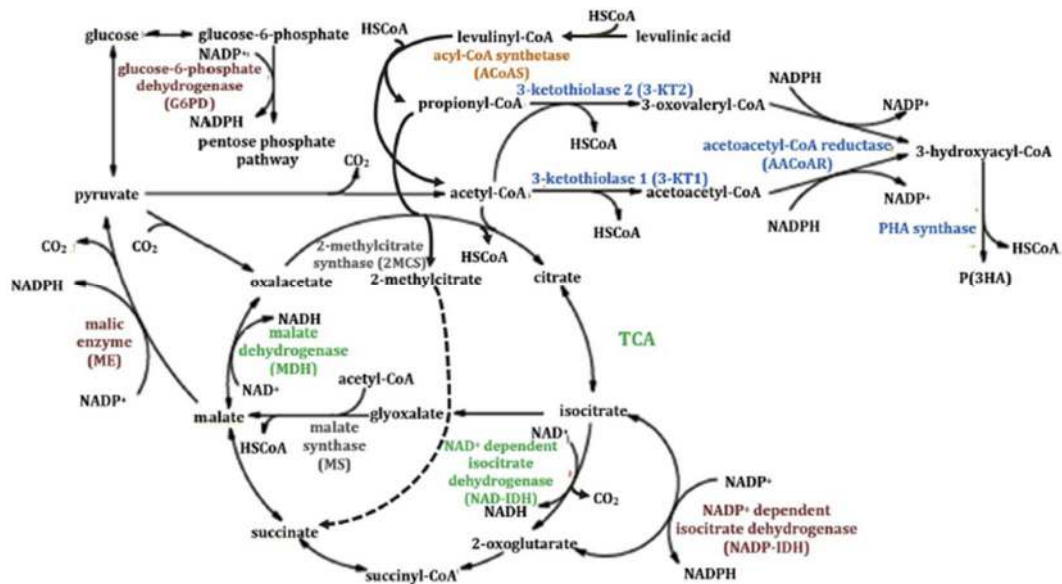


Fig. 1. Scheme of central metabolism of *C. necator* with selected enzymes, which were analyzed in terms of their specific activities.

incorporated into P(3HB-co-3HV) in *C. necator* [29]. This fact explains why the 3HV content in most of evolved strains was lower than in the wild-type strain, which demonstrated lower activity of 2MCS. Therefore, adaptation of the culture to LA has positive consequences from the point of view of growth and overall productivity, but it has a slightly negative impact on efficiency of 3HV incorporation by lower LA-to-3HV yields. Metabolism is generally a complex process and this could be the reason why, despite high activity of 2MCS, some evolved strains produced copolyester with higher 3HV content. Except enhanced metabolic activity via the 2-methylcitrate cycle, also the pathway leading to copolyester biosynthesis could be enhanced, which could lead to higher 3HV content in PHA.

Other similarities between evolved strains dealt with increased activity of the TCA cycle, enhanced production of the reduced cofactor NADPH through different metabolic pathways, and also increased activity of the PHA biosynthetic pathway. It is likely that higher amount of available acetyl-CoA, as a product of LA catabolism, increased activity of TCA cycle, which is closely related to cell respiration. This could be the reason why the activities of the enzymes responsible for

NADPH generation, primarily of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase (observed in all the evolved strains), much less of malic enzyme (observed in ALA02) or glucose-6-phosphate dehydrogenase (observed in ALA04) were enhanced. Reduced NADPH generated by these enzymes is necessary for regeneration of glutathione and thioredoxin involved in detoxification of reactive oxygen species [30]; therefore, the evolved strains revealed indication of adaptation to oxidative stress conditions, which could be a consequence of the expected increased respiratory activity of the evolved cultures. Consequently, increased levels of NADPH directs flux of acetyl-CoA towards PHA biosynthesis, where it reduces the hydrogen-acceptors acetoacetyl-CoA and 3-oxovaleryl-CoA to the respective alcohols (3-hydroxyacyl-CoAs; so called "pseudofementation" reaction), thus supporting activity of enzymes involved in PHA accumulation. A positive effect of mild oxidative pressure on PHA biosynthesis was observed repeatedly in our previous studies [4,24,31] and also confirmed by other authors [32,33].

Furthermore, despite some general similarities among evolved strains were observed, the closer look at the metabolic profiles of evolved strains indicates slightly different adaptation strategies. In

Table 2  
Specific enzyme activities of selected enzymes obtained with various strains adapted to LA.

Metabolic pathway	Enzyme	Specific enzyme activity [U mg <sup>-1</sup> ]					
		Wild-type	ALA01	ALA02	ALA03	ALA04	ALA06
TCA cycle	NAD-IDH	53.55 ± 1.86	124.47 ± 9.85	196.87 ± 3.53	926.22 ± 70.64	847.94 ± 38.10	669.81 ± 46.94
	MDH	409.68 ± 11.36	629.03 ± 25.42	220.33 ± 12.24	301.13 ± 32.63	1,034.43 ± 45.33	130.60 ± 5.28
2-methylcitrate cycle	2MCS	473.71 ± 10.57	2,503.70 ± 318.39	1,440.09 ± 111.17	1,440.22 ± 81.68	1,719.68 ± 103.71	910.28 ± 30.93
Glyoxylate cycle	MS	163.55 ± 4.36	195.62 ± 0.62	498.54 ± 85.43	214.23 ± 9.99	218.97 ± 4.34	152.40 ± 3.27
NADP <sup>+</sup> dependent enzymes	G6PD	524.81 ± 75.92	510.16 ± 46.43	128.41 ± 16.63	491.45 ± 16.51	779.69 ± 24.99	331.69 ± 32.62
	NADP-IDH	53.55 ± 10.71	1,605.52 ± 55.23	1,143.47 ± 70.87	1,505.64 ± 45.70	1,937.27 ± 65.98	1,337.75 ± 78.96
Levulinic acid metabolism	ME	303.46 ± 29.95	314.51 ± 19.06	589.08 ± 10.82	236.84 ± 18.25	170.17 ± 8.08	203.99 ± 7.04
	ACoAS - ICE	166.64 ± 17.58	83.16 ± 2.22	72.77 ± 11.56	39.10 ± 10.14	43.22 ± 8.87	90.59 ± 18.06
	ACoAS - MBE	79.39 ± 2.88	75.82 ± 0.65	177.92 ± 2.54	111.31 ± 1.65	86.79 ± 7.83	95.16 ± 9.94
PHA metabolism	Σ ACoAS	246.03 ± 25.95	158.98 ± 4.24	250.69 ± 39.83	150.40 ± 39.02	130.01 ± 26.67	185.75 ± 37.03
	3-KT1	145.55 ± 14.00	91.15 ± 13.67	168.50/7.40	167.21 ± 11.55	147.83 ± 8.52	222.19 ± 32.85
	3-KT2	63.32 ± 3.38	95.32 ± 7.77	138.24 ± 10.04	108.48 ± 10.37	81.52 ± 12.79	80.99 ± 9.37
	AACoAR	617.99 ± 27.37	1,732.52 ± 50.32	1,856.48 ± 97.71	2,178.95 ± 92.10	1,950.36 ± 75.84	2,454.27 ± 39.09
	PHB synthase	18.00 ± 2.36	214.03 ± 6.22	72.57 ± 6.92	121.63 ± 2.38	370.29 ± 17.11	80.53 ± 2.63

Results are presented in the form: mean ± standard deviation

particular, the results of enzymatic assays indicate that the strain ALA02 evolved most differently in comparison to the other strains. This strain revealed high activity of 2MCS (similarly as ALA01, ALA03 and ALA04) and, moreover, in ALA02, utilization of acetyl-CoA through the glyoxylate cycle was more pronounced on the expense of activity of Krebs cycle, which was slowed down due to reduced MDH activity. Malate generated in TCA or in glyoxylate cycle was predominantly converted to pyruvate, a reaction catalyzed by ME producing NADPH for biosynthesis. On the contrary, similar adaptation strategies were identified in strains ALA03, ALA04 and ALA06. At the simultaneous activation of Krebs cycle through NAD-IDH and unchanged MS (glyoxylate cycle) activity, ME activity was reduced in ALA03, ALA04 and ALA06 compared to the wild-type strain.

The connection between enzyme activities through correlation analysis using determination of Pearson correlation coefficient was assessed. We considered correlation when the absolute value of coefficient was higher than 0.85. We have spotted six positive and one negative correlation between activities of selected enzymes (see Table 3). The highest correlation was observed between enzyme activities of MS and ACoAS. According to Jaremko and Yu [34], propionyl-CoA and also acetyl-CoA are formed during metabolization of LA, while the produced acetyl-CoA can be used for malate synthesis by reacting with glyoxylate. The correlation between MDH (reaction produces reduction equivalents) and PHA synthase (polymerizes products of reactions consuming reduction equivalents) could be related with good overall cell physiology, thus leading to intensive respiration during exponential phase and PHA formation during the stationary phase. The connection between MS and ME could result in metabolic continuity, because the product of MS, malate, is the substrate for ME. The excess of malate in cells could be used to gain energy through transformation into pyruvate, which enters the Krebs cycle after transformation into oxaloacetate, or the cells could gain energy from propionyl-CoA through 2MCS. This pathway is not required for P(3HB-co-3HV) production. The other correlation confirmed our results about LA metabolism: we identified correlation between ACoAS and 3-KT2, when we assumed creation of acetyl-CoA and propionyl-CoA from levulinyl-CoA catalyzed by ACoAS, whereas 3-KT2 catalyzes condensation of these two molecules to form 3-hydroxyvaleryl-CoA. Based on previous correlation between MS and 3-KT2, this is a further evidence for the close connection of PHA biosynthesis with LA metabolism. Effective metabolism of LA resulted in increased activity of 3-KT2-catalyzed condensation of acetyl-CoA and propionyl-CoA to 3-oxovaleryl-CoA, and also to higher production of malate via the glyoxylate cycle. Subsequently, the reaction metabolizing excess of malate to pyruvate generates high quantities of NADPH, which in turn fuels the PHA biosynthetic pathway. The threshold value for positive correlation was identified also for MDH and G6PD. The connection between higher

respiration activity and NADPH producing enzymes was described above; the other context could be identified in higher metabolic activity and subsequent requirement for pentoses because of higher intensity of cell division. Negative correlation between enzyme activities of NADP-IDH and ACoAS could indicate metabolic pathways oriented in opposite directions, whereas NADP-IDH produced the reduced cofactor NADPH involved in biosynthetic pathways, while ACoAS catalyzed initial step of degradation of fatty acids, LA in our case. If activity of ACoAS was higher, transformation of isocitrate into 2-oxoglutarate was primarily catalyzed by NAD-IDH.

The results of metabolic profiling were also subjected to statistical analysis using the PCA method. Dimension of the 13 input variables was reduced to three principal components with eigenvalue > 1. Selected principal components F1 (39.89%), F2 (32.47%) and F3 (19.01%) composed 90.37% of the variability of the original data set. Best possible visual representation of the bacterial strains was obtained by the dispersion of the observations onto a two dimensional factor plane of principal components F1 and F2 (Fig. 2). Clear clustering of individual bacterial strains can be observed and it is based on differences in bacterial metabolism as represented by enzymatic activities. Most significant separation can be observed between the wild-type strain and remaining strains. In the wild-type strain, the observations are projected in the area with negative scores for F2 component, which is strongly positively connected with activity of ACoAS – ICE and negatively with NADP-IDH, NAD-IDH, AACoAR and 2MCS. Therefore, adaptation to LA manifested through enzyme activities led probably to different adaptation strategies of evolved strains, which indicates that performed evolutionary experiments substantially changed metabolism of evolved strains. Similarly, a separated cluster was formed by the ALA02 observations, because its enzyme activities differed significantly from the other analyzed strains. It could be assumed that adaptive evolution of ALA02 to LA led to a different adaptation strategy than in other evolved strains. The closest relationship could be observed between strains ALA01, ALA03 and ALA06. The strain ALA02 represented the most separate and remote zone in Fig. 2. As was in-depth described and discussed above, the strain ALA02 demonstrated increased activity of the glyoxylate cycle and decreased activity of TCA cycle than other evolved strains. The strain ALA01 was most similar to the wild-type strain, without features common to all evolved strains (increased respiration activity, enhanced propionyl-CoA utilization pathway, increased activity of NADPH generating enzymes and enhanced PHA biosynthesis pathway); hence, enzymatically, ALA01 did not differ much from wild-type strain.

**Table 3**  
Correlation analysis of enzyme activities.

variable	NAD-IDH	MDH	MS	2MCS	G6PD	NADP-IDH	ME	ACoAS - ICE	ACoAS - MBE	Σ ACoAS	3-KT1	3-KT2	AACoAR	PHB synthase
NAD-IDH	1													
MDH	0.165	1												
MS	-0.241	-0.208	1											
2MCS	0.026	0.487	0.150	1										
G6PD	0.368	<b>0.846</b>	-0.635	0.196	1									
NADP-IDH	0.631	0.437	0.046	0.744	0.272	1								
ME	-0.621	-0.398	<b>0.889</b>	0.052	-0.769	-0.293	1							
ACoAS - ICE	-0.730	-0.262	-0.260	-0.597	-0.125	-0.911	0.131	1						
ACoAS - MBE	-0.069	-0.463	<b>0.940</b>	-0.047	-0.763	0.006	0.816	-0.286	1					
Σ ACoAS	-0.715	-0.586	0.471	-0.578	-0.686	-0.823	0.731	0.694	0.492	1				
3-KT1	0.466	-0.590	0.036	-0.650	-0.408	-0.065	-0.106	-0.069	0.326	0.182	1			
3-KT2	-0.009	-0.322	<b>0.872</b>	0.379	-0.648	0.310	0.741	-0.538	<b>0.884</b>	0.175	0.034	1		
AACoAR	0.699	-0.147	0.092	0.348	-0.179	0.799	-0.199	-0.802	0.245	-0.545	0.474	0.408	1	
PHB synthase	0.444	<b>0.894</b>	-0.128	0.660	0.712	0.788	-0.436	-0.620	-0.314	-0.799	-0.384	-0.092	0.308	1

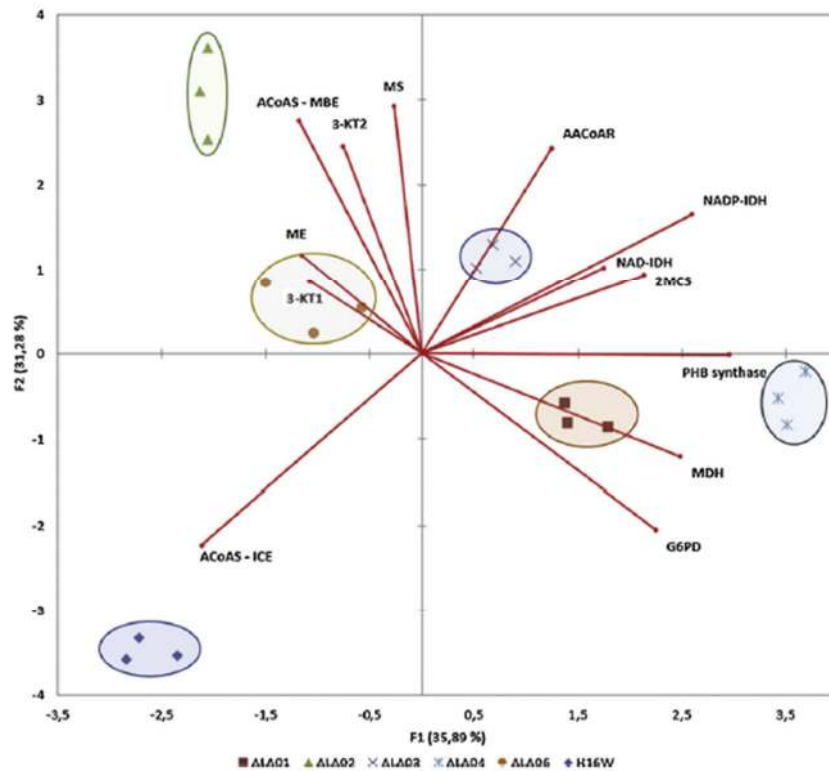


Fig. 2. Projection of characterized evolved strains and wild-type using PCA.

### 3.3. Characterization of material properties of P(3HB-co-3HV) produced by LA adapted strains

In the next part of the work, basic material properties of the PHA polymers produced by the wild-type strain and the evolved strains were investigated and compared. In particular, molecular weight, monomer composition and crystallinity of the produced copolyesters were analyzed. Results of this material assay are summarized in Table 4. First of all, it can be seen that the produced polyesters differed significantly in their molecular weight. In comparison with the wild type strain, the first generation of strains evolved in absence of chemical mutagen (i.e., strain ALA01 – ALA03) produced copolyesters with significantly lower molecular weight. Contrarily, the strain representing the second generation evolved without chemical mutagen (ALA04) provided polymer of similar molecular weight as the wild type strain, while an involvement of the chemical mutagen resulted in strain ALA06, which produced a polymer with even higher molecular weight than the wild type strain. For all tested strains, very low values of polydispersity index  $\bar{D}$

(provided by the molecular weight assay as ratio of weight average value to number average value of molecular weight) represent a narrow distribution of the polymer chain lengths in all produced polymer samples.

Similarly to the differences in  $M_w$  of the polymer, the two evolved strains ALA04 and ALA06 stood out among the other strains also with respect to the monomer composition of the copolyester. It can be seen in Table 4 that the strain evolved in the second generation of LA adaptation (ALA04) was capable of incorporating the highest amount of 3HV. On the other hand, the chemical mutagen-assisted adaptation to LA resulted in the strain that incorporated the lowest amount of 3HV among all studied strains. The relative content of 3HV in the polymer chain represents a crucial parameter as far as polymer processing and forming is concerned. It has already been thoroughly described how the incorporation of 3HV in the copolymer influences its physical properties such as crystallization behavior, melting behavior as well as mechanical properties [35–37]. In this context, Kunioka et al. have revealed that depending on the 3HV content, P(3HB-co-3HV) copolyesters

Table 4

Basic material parameters of PHA polymers produced by the wild type strain and the evolved strains of *C. necator* H16.

	3HV content(mol.%)	$M_w$ [kDa]	$\bar{D}$	$T_m$ [°C]	$\Delta H_{fus}$ [J g <sup>-1</sup> ]	$\Delta H_1/\Delta H_{tot}$ **	$\Delta H_2/\Delta H_{tot}$ **	$A_{1228}/A_{1180}$ ***
WT	15.8 ± 0.9	668.0 ± 5.6	1.05	167.2	62.7	0.88	0.12	0.91
ALA01	13.9 ± 0.3	422.0 ± 64.2	1.05	167.5	74.7	0.94	0.06	0.95
ALA02	13.5 ± 0.2	455.2 ± 64.6	1.06	168.2	81.4	0.48	0.52	1.09
ALA03	17.0 ± 0.1	427.8 ± 22.4	1.07	167.2	81.8	0.70	0.30	0.94
ALA04	20.6 ± 0.9	615.5 ± 66.0	1.05	164.7	73.1	0.91	0.09	0.82
ALA06	11.4 ± 0.3	725.9 ± 27.1	1.06	164.9	63.4	0.73	0.27	0.87

\*polydispersity Index  $\bar{D}$  ( $M_w/M_n$ ).

\*\*relative area of the two deconvolution components.

\*\*\*IR absorbance ratio at frequencies 1228 cm<sup>-1</sup> and 1180 cm<sup>-1</sup>, respectively.

crystallize in two crystalline forms, in the P(3HB) crystal lattice or the P(3HV) crystal lattice [35]. A relative content of 40 mol % 3HV was described as the threshold value for the transition from one crystal form to the other. Furthermore, Kunioka and Doi also proved that the degree of crystallinity as well as melting temperature decrease with the increasing concentration of 3HV up to 37 mol.% [36]. Any decrease of the melting point is of great technological interest, because the homopolymer P(3HB) is in general thermally unstable due to the random chain scission at ester groups at temperatures close above its melting point [36]. An unintentional thermal degradation thus may take place during the melting processing, leading to a significant reduction of an average molecular weight and undesired changes in rheological and mechanical properties [37]. Therefore, any shift of  $T_m$  to lower temperatures contributes to higher thermal stability during the melt processing of copolyester and constitutes a significant material improvement of the PHA polymer in terms of facilitated technological processing. For that reason, we complemented our material analysis of produced PHA copolymers also by a characterization of their crystallization and melting behavior.

DSC analysis of the isolated copolymers was used primarily in order to determine their melting temperatures ( $T_m$ ) and enthalpies of fusion ( $\Delta H_m$ ). Raw thermograms, determined during the second heating scan of previously molten and cooled materials (see Materials and Methods for details), are shown in Fig. S3. Resulting values of the two parameters are shown in Table 4. From the comparison of  $T_m$  it can be seen that the polymers produced by the first generation of the strains, which evolved in absence of chemical mutagen (ALA01, ALA02 and ALA03), were characterized by  $T_m$  close to that of the wild type strain. On the other hand, strains ALA04 (second generation of LA adaptation) and ALA06 (adaptation with presence of chemical mutagen) provided again polymers with different material properties – in this case with significantly lower  $T_m$ . Total melting enthalpy values vary by far more among the individual producing strains. It is worth remembering that  $T_m$  represents a qualitative characteristic of the crystallites, while  $\Delta H_{tot}$  is influenced rather by their quantitative content in the polymer. Further, it can be seen in the thermograms presented in Fig. S3 that all copolyesters exhibit double melting peaks, which indicates presence of two major types of crystallites in the structure of molten-and-cooled polymers. It is also evident from the different shapes of the melting peaks that the relative content of the two crystallite types differs among the tested polymers. Therefore, we have performed deconvolution of the melting endotherm peak by fitting the experimental envelope band by the summation of two calculated Gaussian components using non-linear fitting tools of the Origin 8.1 software (see Fig. S3b for an example of the graphical representation of the deconvolution results). Table 4 shows calculated relative areas of the first and the second melting component, respectively. Apparently, the first melting component represents melting of crystals with lower thermal stability, while the second melting peak represents melting of crystals with higher thermal stability. As can be seen from Table 4, significant relative areas of the second melting peak were found for ALA02, ALA03 and ALA06. Overall, the relative areas of the second melting peak vary from 6% (ALA01) to 52% (ALA02) of the total area of the melting endotherm.

FTIR analysis was applied as a supplementary structural assay of the produced polymers; spectra of the analyzed materials are shown in Fig. S4. Evidently, all copolymers show similar spectra that involve all the spectral features characteristic for PHA [38]. This is expectable as far as the differences in chemical composition (relative 3HV content ranging from 11.4% to 20.6%) are not large enough to cause any significant spectral signatures in FTIR. Nevertheless, FTIR spectra can provide information not only about chemical, but also about physical structure of PHA. In our previous work, we have summarized the way how the FTIR spectra can be utilized in evaluation of crystallinity of PHA [39]. It has been described that FTIR spectra of PHA involve vibration bands characteristic for crystalline and for amorphous PHA, respectively. Therefore, in this work we provide the ratio of IR absorbance at the

frequency characteristic for crystalline PHA ( $1228\text{ cm}^{-1}$ ) to an absorbance at frequency attributed to amorphous PHA ( $1180\text{ cm}^{-1}$ ) as a supplementary spectral indicator of inherent sample crystallinity (see detail of the spectral region with the two characteristic vibration bands in Fig. S4b). Results of this spectral assay are provided in Table 4. Once again, lower value of  $A_{1228}/A_{1180}$  as compared to the wild-type strain distinguish the copolymers produced by strains ALA04 and ALA06 from those isolated from the other adapted strains.

As was already discussed, there is strong evidence from literature that the relative content of 3HV in P(3HB-co-3HV) copolymers influences their overall crystallinity and melting behavior. Therefore, we have performed correlation analysis to seek for correlations between particular material parameters that were determined for the individual copolymers (see Table S1 in supplementary material). This analysis has revealed a strong negative correlation between molecular weight of the copolyesters and both basic parameters determined by DSC, i.e., melting temperature  $T_m$  (Pearson coefficient -0.722) and total heat of fusion (Pearson coefficient -0.892). It indicates that the chain length is the primary parameter that affects crystallinity of the isolated copolymers. Furthermore, strong positive correlation was found between melting temperature and the spectral parameter  $A_{1228}/A_{1180}$ , which confirms that the quality of crystallites in the polymer structure manifests in its FTIR spectrum. However, no strong or even moderate positive/negative correlation was confirmed for 3HV content and any of the other material parameters contrarily to the original expectations. Nevertheless, from the closer look at the relation between 3HV and other properties of the polymer, it can be seen that the low correlation coefficients are influenced by a specific position of ALA06, which is strongly distinguished from other materials. After elimination of the ALA06 parameters from the correlation analysis, originally expected correlation was indeed confirmed between the 3HV content and melting temperature  $T_m$  (strong negative correlation Pearson coefficient -0.952), and also between the 3HV content and spectral parameter  $A_{1228}/A_{1180}$  (strong negative correlation Pearson coefficient -0.859). Both correlations are presented graphically in Fig. S5, and the correlation table is provided in supplementary material as well (see Table S2). It is difficult to discuss this unique position of polymer produced by strain ALA06 solely on the basis of material parameters presented in this work. Nevertheless, it is likely that the distinguished material properties of the polymer come from a different orientation of the monomer units in the structure of copolymer chain. Usually, bacteria produce random copolymers, nevertheless, we hypothesize that strain ALA06 is capable, up to some level, to produce partially organized copolymer with parts of the chains rich in 3HV, hence, a partially blocky structure, which subsequently changes the properties of the produced material [8]. However, this hypothesis needs to be tested by detail crystallography assay of the polymer (including X-ray diffraction) and polymer sequence distribution and fragmentation studies of the individual copolyesters as a viable tool to study their microstructure [40].

Finally, the distinctive position of the evolved strains ALA04 (second generation of LA adaptation) and ALA06 (adaptation in presence of chemical mutagen) was further supported by results of multivariate characterization based on PCA evaluation of material properties. It can be seen in Fig. S6 that these two materials were projected in the opposite dimensions than the observation, which corresponds to samples produced by first generation in the biplot of selected principal components F1 and F2 (eigenvalue > 1), which in sum comprise 87.3% of the variability of the original data set.

#### 4. Conclusions

By methods of evolutionary engineering, five strains adapted to LA originating from *C. necator* H16 (wild-type) have been obtained. Strains *C. necator* ALA01, ALA02 and ALA03 have been classified as the first generation of evolved strains, strain *C. necator* ALA04 has represented



the second generation of evolved strains and *C. necator* ALA06 has been gained by the contribution of the chemical mutagen MMS. All evolved strains showed better growth in the presence of the inhibitor LA than observed for the wild-type strain, which was one of main parameters confirming a successful adaptation process. The analysis of PHAs in biomass moreover showed higher content of PHA in the biomass and, for some strains, also higher content of 3HV in P(3HB-co-3HV). The strain *C. necator* ALA04 repeatedly reported the highest value of PHA and also 3HV content with more than 20 mol.%. After GC-FID analysis, copolymers were further characterized by DSC, SEC-MALS and FTIR. On the basis of results, a connection between higher 3HV content, lower melting temperature and lower crystallinity has been observed for copolymers isolated from strains *C. necator* ALA01, ALA02, ALA03 and ALA04. Polymer isolated from *C. necator* ALA06 has not confirmed that trend, therefore a different structural motif could be considered. Biochemical characterization of evolved strains through determination of specific activities of selected enzymes has provided information about possible adaptation strategies of strains considering similarities and differences between evolved strains and the wild-type strain. Similarities among evolved strains with the wild-type strain have been observed in enhanced metabolism of propionyl-CoA, enhanced PHA biosynthetic pathways, respiratory activity and also in enhanced activities of NADPH producing enzymes. It could be assumed that higher respiratory activity could be associated with adaptation to LA metabolized via aerobic  $\beta$ -oxidation. Higher intensity of respiration could cause oxidation stress, which was eliminated by higher production of NADPH. The excess of NADPH could promote biosynthetic pathways such as production of PHAs. Moreover, metabolic differences between evolved strains have been evaluated by PCA, and some adaptation strategies have been suggested. The most striking one among the adapted strains was strain *C. necator* ALA02 with enhanced intensity of LA catabolism, higher activity of glyoxylate cycle and reduced MDH activity. Strains *C. necator* ALA01, ALA03 and ALA06 were similar to each other. Strain ALA01 was the most similar to the wild-type strain, and the adaptation strategy of strain ALA04 was probably a little different from others. Different results have been observed when material properties have been used for PCA. From this prospective, no obvious link between general metabolic strategies of the strains and the shifts in quality of the produced polymer was identified.

#### Acknowledgements

This study was funded by the project GA 19-20697S of the Czech Science Foundation (GACR). Further, Ivana Novackova is Brno Ph.D. Talent Scholarship Holder – Funded by the Brno City Municipality. This work was also funded through the project SoMoPro (project No. 6SA18032). This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme under the Marie Skłodowska-Curie, and it is co-financed by the South Moravian Region under grant agreement No. 665,860. Note: Authors confirm that the content of this work reflects only the author's view and that the EU is not responsible for any use that may be made of the information it contains.

#### Appendix A. Supplementary Data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107.350>.

#### References

- [1] S. Obruca, P. Sedlacek, M. Koller, D. Kucera, I. Pemcova, Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications, *Biotechnol. Adv.* 36 (3) (2018) 856–870, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.006>.
- [2] E. Slaninova, P. Sedlacek, F. Mravec, L. Mullerova, O. Samek, M. Koller, O. Heskó, D. Kucera, I. Marova, S. Obruca, Light scattering on PHA granules protects bacterial cells against the harmful effects of UV radiation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102 (4) (2018) 1923–1931, <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8760-8>.
- [3] S. Obruca, P. Sedlacek, V. Krzyzanek, F. Mravec, K. Hubanova, O. Samek, D. Kucera, P. Benesova, I. Marova, Accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) helps bacterial cells to survive freezing, *PLoS One.* 11 (6) (2016), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157778> e0157778.
- [4] S. Obruca, I. Marova, M. Stankova, L. Mmavcova, Z. Svoboda, Effect of ethanol and hydrogen peroxide on poly(3-hydroxybutyrate) biosynthetic pathway in *Cupriavidus necator* H16, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26 (7) (2010) 1261–1267, <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0296-8>.
- [5] I.S.A. Rowaihi, A. Paillier, S. Rasul, R. Karan, S.W. Grötzing, K. Takanahe, J. Eppinger, Poly(3-hydroxybutyrate) production in an integrated electromicrobial setup: Investigation under stress-inducing conditions, *PLoS One.* 13 (4) (2018), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196079> e0196079.
- [6] P. Sedlacek, E. Slaninova, M. Koller, J. Nebesova, L. Marova, V. Krzyzanek, S. Obruca, PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances, *New Biotechnol.* 49 (2019) 129–136, <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.10.005>.
- [7] M. Koller, Switching from petro-plastics to microbial polyhydroxyalkanoates (PHA): the biotechnological escape route of choice out of the plastic predicament? *EuroBiotech. J.* 3 (1) (2019) 32–44, <https://doi.org/10.2478/ebj-2019-0004>.
- [8] M. Koller, Chemical and Biochemical Engineering Approaches in Manufacturing Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters of Tailored Structure with Focus on the Diversity of Building Blocks, *Chem. Biochem. Eng. Q* 32 (4) (2019) 413–438, <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2018.1385> (2019).
- [9] M. Kunioka, A. Tamaki, Y. Doi, Crystalline and thermal properties of bacterial copolymers: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate), *Macromolecules.* 22 (2) (1989) 694–697, <https://doi.org/10.1021/ma00192a031>.
- [10] M. Scandola, G. Ceccorulli, M. Pizzoli, M. Gazzano, Study of the crystal phase and crystallization rate of bacterial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), *Macromolecules.* 25 (5) (1992) 1405–1410, <https://doi.org/10.1021/ma00031a008>.
- [11] Y. Doi, A. Tamaki, M. Kunioka, K. Soga, Production of copolymers of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alkaligenes eutrophus* from butyric and pentanoic acids, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28 (4-5) (1988) 330–334, <https://doi.org/10.1007/BF00268190>.
- [12] M. Koller, Polyhydroxyalkanoate biosynthesis at the edge of water activity: Haloarchaea as biopolyester factories, *Bioengineering* 6 (2) (2019), <https://doi.org/10.3390/bioengineering6020034>.
- [13] R.D. Ashby, D.K.Y. Solaiman, G.D. Strahan, C. Zhu, R.C. Tappel, C.T. Nomum, Glycerine and levulinic acid: Renewable co-substrates for the fermentative synthesis of short-chain poly(hydroxyalkanoate) biopolymers, *Bioresour. Technol.* 118 (2012) 272–280, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.092>.
- [14] V. Kachrimanidou, N. Kopsahelis, S. Papanikolaou, I.K. Kookos, M. De Bruyn, J.H. Clark, A.A. Koutinas, Sunflower-based biorefinery: poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production from crude glycerol, sunflower meal and levulinic acid, *Bioresour. Technol.* 172 (2014) 121–130, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.044>.
- [15] T.M. Keenan, S.W. Tanenbaum, A.J. Stipanovic, J.P. Nakas, Production and characterization of poly-beta-hydroxyalkanoate copolymers from *Burkholderia cepacia* utilizing xylose and levulinic acid, *Biotechnol. Prog.* 20 (2004) 1697–1704, <https://doi.org/10.1021/bp049873d>.
- [16] M. Koller, P. Hesse, H. Fasl, F. Stelzer, G. Braunege, Study on the effect of levulinic acid on whey-based biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Hydrogenophaga pseudoflava*, *Appl. Food Biotechnol.* 4 (2) (2017) 65–78, <https://doi.org/10.22037/afb.v4i2.16337>.
- [17] G. Schmack, V. Gorenflo, A. Steinbüchel, Biotechnological production and characterization of polyesters containing 4-hydroxyvaleric acid and medium-chain-length hydroxyalkanoic acids, *Macromolecules* 31 (3) (1998) 644–649, <https://doi.org/10.1021/ma970864d>.
- [18] J.J. Bozell, L. Moens, D.C. Elliott, Y. Wang, G.G. Neuenschwander, S.W. Fitzpatrick, R.J. Bilski, J.L. Jarnefeld, Production of levulinic acid and use as a platform chemical for derived products, *Resour. Conserv. Recycl.* 28 (3-4) (2000) 227–239, [https://doi.org/10.1016/S0921-3449\(99\)00047-6](https://doi.org/10.1016/S0921-3449(99)00047-6).
- [19] L.J. Jönsson, B. Alriksson, N.O. Nilvebrant, Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification, *Biotechnol. Biofuels.* 6 (1) (2013), <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-16>.
- [20] F. Palmqvist, B. Hahn-Hägerdal, Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition, *Bioresour. Technol.* 74 (1) (2000) 25–33, [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00161-3).
- [21] C.J. Brigham, A. Abdulrahman, J. Kehail, D. Palmer, *Ralstonia eutropha* and the Production of Value Added Products: Metabolic Background of the Wild-Type Strain and its Role as a Diverse, Genetically-Engineered Biocatalyst Organism, *Ralstonia eutropha* and the Production of Value Added Products: Metabolic Background of the Wild-Type Strain and its Role as a Diverse, Genetically-Engineered Biocatalyst Organism, in: M. Koller (Ed.), Recent Advances in Biotechnology Volume: 1. Microbial Biopolyester Production, Performance and Processing Microbiology, Feedstocks, and Metabolism, Bentham Science Publishers, Sharjah, 2016, pp. 265–347.
- [22] G. Braunege, B.Y. Sonnleitner, R.M. Lafferty, A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 6 (1) (1978) 29–37, <https://doi.org/10.1007/BF00500854>.
- [23] K.A. Osaki, Revised version of the Interdiffusion Equation in the Zimm Theory for Polymer Solution Dynamics, *Macromol.* 5 (2) (1972) 141–144.

- [24] S. Obruca, O. Snajdar, Z. Svoboda, I. Marova, Application of random mutagenesis to enhance the production of polyhydroxyalkanoates by *Cupriavidus necator* H16 on waste frying oil, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29 (12) (2013) 2417–2428, <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1410-5>.
- [25] O.H. Lowry, N.J. Rosbrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Hartree-Lowry and modified Lowry protein assays, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [26] M. Koller, L. Marsalek, M.M. de Sousa Dias, G. Braunegg, Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner, *New Biotechnol.* 37 (2017) 24–38, <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.05.001>.
- [27] C.O. Bramer, A. Steinbüchel, The methylcitric acid pathway in *Ralstonia eutropha*: new genes identified and involved in propionate metabolism, *Microbiology.* 147 (2001) 2203–2214, <https://doi.org/10.1099/00221287-147-8-2203>.
- [28] C. Ewertng, C.O. Bramer, N. Bruland, A. Bethke, A. Steinbüchel, Occurrence and expression of tricarboxylate synthases in *Ralstonia eutropha*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71 (2006) 80–89, <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0099-2>.
- [29] J. Yu, Y.T. Si, Metabolic carbon fluxes and biosynthesis of polyhydroxyalkanoates in *Ralstonia eutropha* on short fatty acids, *Biotechnol. Prog.* 20 (2006) 1015–1024, <https://doi.org/10.1021/bp034380e>.
- [30] K. Munkami, R. Tsubouchi, M. Fukayama, T. Ogawa, M. Yoshino, Oxidative inactivation of reduced NADP-generating enzymes in *E. coli*: iron-dependent inactivation with affinity cleavage of NADP-isocitrate dehydrogenase, *Arch. Microbiol.* 186 (2006) 385–392, <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0153-1>.
- [31] S. Obruca, I. Marova, Z. Svoboda, R. Mikulíková, Use of controlled exogenous stress for improvement of poly(3-hydroxybutyrate) production in *Cupriavidus necator*, *Folia Microbiol.* 55 (2010) 17–22, <https://doi.org/10.1007/s12223-010-0003-z>.
- [32] Y.M. Jung, Y.H. Lee, Utilization of oxidative pressure for enhanced production of poly-b-hydroxybutyrate and poly(3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) in *Ralstonia eutropha*, *J. Biosci. Bioeng.* 90 (2000) 266–270, [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)80080-8](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)80080-8).
- [33] W. Blunt, R. Sparling, D.J. Gapes, D.B. Levin, N. Cicek, The role of dissolved oxygen content as a modulator of microbial polyhydroxyalkanoate synthesis, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 34 (8) (2018) 106, <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2488-6>.
- [34] M. Jaremko, J. Yu, The initial metabolic conversion of levulinic acid in *Cupriavidus necator*, *J. Biotechnol.* 155 (2011) 293–298, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.07.027>.
- [35] M. Kunioka, Y. Kawaguchi, Y. Doi, Production of biodegradable copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *A. eutrophus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30 (1989) 569–573, <https://doi.org/10.1007/BF00255361>.
- [36] M. Kunioka, Y. Doi, Thermal degradation of microbial copolyesters: Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate), *Macromolecules.* 23 (7) (1990) 1933–1936, <https://doi.org/10.1021/ma00209a009>.
- [37] A. Kovacic, K. Meixner, M. Mihalic, W. Zeilinger, I. Fritz, W. Fuchs, B. Drogg, Characterization of polyhydroxyalkanoates produced by *Synechocystis salina* from digestate supernatant, *Int. J. Biol. Macromol.* 102 (2017) 497–504, <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2017.04.054>.
- [38] M. Kanisz, H. Billman-Jacobe, D. McNaughton, Quantitative Determination of the Biodegradable Polymer Poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) in a Recombinant *Escherichia coli* Strain by Use of Mid-Infrared Spectroscopy and Multivariate Statistics, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (8) (2000) 3415–3420, <https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3415-3420.2000>.
- [39] P. Sedláček, E. Slaninová, V. Enev, M. Koller, J. Nebesárova, I. Marova, K. Hrubánová, V. Krzyžanek, O. Samek, S. Obruca, What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103 (4) (2019) 1905–1917, <https://doi.org/10.1007/s00253-018-09584-z>.
- [40] G. Adamus, W. Sikorska, M. Kowalczyk, M. Montaudo, M. Scandola, Sequence distribution and fragmentation studies of bacterial copolyester macromolecules: Characterization of PHBV macroinitiator by electrospray ion-trap multistage mass spectrometry, *Macromol.* 33 (16) (2000) 5797–5802, <https://doi.org/10.1021/ma000005g>.

## 9.7 Příloha VII

Materials Science Forum  
ISSN: 1662-9752, Vol. 955, pp 74-79  
doi:10.4028/www.scientific.net/MSF.955.74  
© 2019 Trans Tech Publications, Switzerland

Submitted: 2018-09-30  
Revised: 2018-11-23  
Accepted: 2019-01-04  
Online: 2019-05-27

### Extremophiles – platform strains for sustainable production of polyhydroxyalkanoates

Iva Pernicova<sup>1,2</sup>, Dan Kucera<sup>1,2</sup>, Ivana Novackova<sup>1,2</sup>, Juraj Vodicka<sup>2</sup>, Adriana Kovalcik<sup>2</sup> and Stanislav Obruca<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Materials Research Centre, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkynova 118, 612 00 Brno, Czech Republic.

<sup>2</sup>Department of Food Chemistry and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkynova 118, 612 00 Brno, Czech Republic.

\*corresponding author: obruca@fch.vut.cz

**Keywords:** polyhydroxyalkanoates; halophiles; *Halomonas halophila*, *Halomonas organivorans*, spent coffee grounds

**Abstract.** Polyhydroxyalkanoates (PHA) are biodegradable polyesters, which are produced by various bacteria including numerous halophiles. Employment of halophilic strain for PHA production brings numerous benefits such as robustness of the process against contamination by ubiquitous mesophiles or possibility to isolate polymer from bacterial biomass via hypotonic lysis. In this work, we screened three moderate halophiles – *Halomonas halophila*, *Halomonas organivorans* and *Halomonas salina* for the presence of *phaC* gene encoding for PHA synthase and, subsequently, we have investigated their PHA production potential on various sugars. Among tested strains, *H. organivorans* demonstrated extraordinary capacity of PHA production in particular on galactose and mannose since on these saccharides PHA content in dried bacterial cells reached 83 and 90 wt. % on mannose and galactose, respectively. Therefore, *H. organivorans* can be considered being a promising PHA producing strain in particular suitable for the valorization of lignocellulose materials rich in galactomannans such as spent coffee grounds.

#### Introduction

Extremophiles are a very interesting group of microorganisms which are adapted to extreme environments. For several decades, extremophiles attracted the attention of biotechnologists mainly as a source of industrially relevant enzymes (so-called “extremozymes”) which are, unlike conventional enzymes from mesophilic microorganisms, capable of withstanding harmful conditions frequently associated with industrial processes such as high temperature or low or high pH values [1]. Nevertheless, very recently extremophiles has attracted attention also as platform strains in industrial biotechnology, since their utilization solves many weaknesses of traditional industrial biotechnologies [2]. At first, due to induction of extreme conditions which prevent the growth of the mesophilic microorganisms, biotechnological process based on extremophiles are much more prone to microbial contamination, hence they can be operated under semi-sterile or even completely non-sterile conditions. This in turns reduces energy costs associated with sterilization of equipment and fermentation media. Further, increased robustness of the process against contamination opens a possibility to operate fermentation in more efficient continuous mode. These major advantages enabled the formulation of the concept of Next Generation Industrial Biotechnologies (NGIB) which are based on the employment of extremophiles [3].

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are microbial polyesters which are accumulated by numerous microorganisms. Homopolymer of 3-hydroxybutyrate, poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) is the most

common member of this family. PHA serve primarily as a storage of carbon and energy, however, their biological role seems to be much more complex since PHA generally enhances stress robustness against various stress conditions [4]. For instance, we have recently reported that PHA accumulation enhances the resistance of bacteria against harmful effects of osmotic up-shock [5]. This is very likely the main reason why PHA accumulation is a common feature among halophiles – microorganisms adapted to high osmolality of the environment including extremely halotolerant *Archaea* [6].

PHA attracts the attention of scientists and industry as potential fully biodegradable, biocompatible and bio-based alternative to petrochemical polymers. Nevertheless, industrial production of PHA is scarce since they are disadvantaged due to a high cost of their biotechnological production and, therefore, they can currently hardly compete with cheap petrochemical plastics. Therefore, they are attempts to reduce the cost of PHA by using waste or inexpensive substrates and/or to improve the productivity of the PHA production by genetic engineering of producing strains [7]. Moreover, additional improvement of the economic aspect of PHA production could be reached by employing extremophiles capable of PHA accumulation which is in accordance with the above-mentioned concept of NGIB. Furthermore, using halophiles for PHA production brings additional advantages because *i.* hypotonic lysis of the bacterial cells can be used as a simple and inexpensive strategy for isolation of crude polymer from bacterial biomass [8] and *ii.* compatible solutes such as ectoines or trehalose, which are accumulated by many halophilic prokaryotes to compensate extracellular osmotic pressure, can represent valuable side product of the process [9].

Therefore, using genotypic characterization we have screened PHA biosynthesis capability among several members of the genus *Halomonas*; furthermore, we have compared their PHA production potential.

## Material and Methods

**Microorganisms** *Halomonas halophila* CCM 3662, *Halomonas salina* CCM 4361 and *Halomonas organivorans* CCM 7142 were purchased from Czech Collection of Microorganisms, Bmo, Czech Republic.

**PCR detection of *phaC* gene** Multiplex PCR for detection of bacterial DNA (16S rRNA gene) and the PHA synthase gene (*phaC*) was performed with the primer for 16S rRNA: forward 16S-F 5'- AAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', reverse 16S-R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'; with the primer for *phaC* gene: forward G-D 5'-GTGCCGCC(GC)(CT)(AG)(GC)ATCAACAAGT-3', reverse G1-R 5'-GTTCCAG(AT)ACAG(GC)A(GT)(AG)TCGAA-3'. For this procedure, a PCR mixture consisted of: 12.5 µL One Taq™ Hot Start 2X Master Mix with Standard Buffer, 2.6 µL MgCl<sub>2</sub>, 2 µL DNA template, 0.2 µM of each primer and volume added to 25 µL H<sub>2</sub>O. The PCR mixture was pre-incubated at 94°C for 30 s. The PCR cycle consisted of 30 s at 94°C (denaturation), 30 s at 55°C (annealing), 90 s at 68°C (extension); this cycle was repeated 30 times, final extension was performed for 5 min at 68°C. The PCR amplicon was detected by 2% agarose gel electrophoresis.

**PHB production** The bacterial strains were cultivated on Complex Nutrient Medium (peptone bacteriological 15 g/L, yeast extract 3 g/L, glucose 1 g/L, NaCl 66 g/L) and maintained as a cryo-conserved culture at - 80°C in the presence of 17 (w/v) % glycerol. For PHB production, a mineral medium (MM) was used which consisted of 20 g/L glucose (or other sugar), 1 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.05 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11.1 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O, 66 g/L NaCl (unless stated otherwise), 0.2 g/L MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O and 1 mL/L of microelement solution (MES) which consists of 9.7 g/L FeCl<sub>3</sub> · 6 H<sub>2</sub>O, 7.8 g/L CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, 0.156 g/L CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O, 0.119 g/L CoCl<sub>2</sub>, 0.118 g/L NiCl<sub>2</sub> in 0.1 M HCl. Sugars, salt solutions and microelement solutions were autoclaved separately (115°C, 20 min),

cooled down, and aseptically combined at room temperature. Prior to inoculation, pH was adjusted to 7 by 1 M HCl or NaOH. This medium was inoculated by 5 vol. % of a 24 h old liquid culture grown on Complex Nutrient Medium. The production cultivations were performed in Erlenmeyer flasks (volume 250 mL) containing 100 mL of the cultivation media. The temperature was set at 30°C, and the agitation to 200 rpm. After 72 hours of cultivation, the cells were harvested (centrifugation, 8000 × g, 5 min), and the concentration of biomass and PHB were determined as described below.

**Analytical methods** To determine the biomass concentration and the PHB content in cells, fermentation broth samples (10 mL) were centrifuged (8000 × g, 5 min), and the cells were washed with PBS buffer. The biomass concentration expressed as the cell dry mass (CDM) was analyzed gravimetrically. The PHB content in dried cells was determined by gas chromatography (Trace GC Ultra, Thermo Scientific, USA) as reported previously [10]. Commercially available PHB (Sigma Aldrich, Germany) was used as a standard; benzoic acid (LachNer, Czech Republic) was used as internal standard.

## Results and Discussion

To identify and verify the PHA accumulating potential of various halophilic bacteria, we developed and optimized multiplex-PCR assay employing two pairs of primers; the first pair of primers targets *16S rRNA* (amplicon size 1500 bp) and serves also as isolation control for all the tested bacteria. The second primer pair enables amplification of the *phaC* gene encoding for PHA synthase (amplicon size 551 bp), the key enzyme of PHA biosynthetic pathway which presence in bacteria is indispensable for PHA accumulation. Therefore, the multiplex PCR assay of *phaC*-positive bacterial samples results in the formation of both amplicons but *phaC*-negative samples reveals only the amplicon corresponding to *16S rDNA*, which is the general bacterial gene. It should be mentioned that in some cases, due to preferential amplification of the amplicon with lower size, only the amplicon corresponding to the *phaC* gene appears in PHA positive bacteria; nevertheless, this fact does not complicate the identification of bacterial strains harboring *phaC* gene. Results of the PCR-assay for *Halomonas organivorans* are demonstrated in Fig. 1. This experimental approach enabled us to test various bacterial strains (isolates as well as collection strains) for their PHA accumulating potential. We have observed that all the three tested *Halomonas* strains (*Halomonas halophila*, *Halomonas organivorans* and *Halomonas salina*) contain *phaC* gene and, therefore, they can be considered being potential PHA producers.

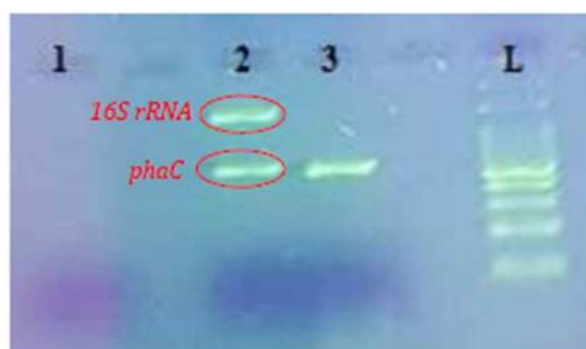


Fig. 1 Visualization of the results of multiplex PCR assay. 1 – isolation control, 2 – *Cupravidius necator* H16 – positive control, 3 – *Halomonas organivorans*, L – Ladder. The first amplicon (marked as A) (1,500 bps) corresponds to 16S rRNA, the second amplicon proves the presence of *phaC* gene encoding for PHA synthase.

Therefore, we have tested PHA production of all the three strains in simple and cheap mineral media using various sugars as the sole carbon substrates, the results are shown in Table 1. All the tested strains were capable of growth on glucose, fructose, sucrose, xylose, and mannose but, based on our experimental results, they were not able to utilize lactose and arabinose (data not shown). We have already reported that *H. halophila* seems to be a promising strain for PHA production [11] and this observation is also proved by our results since very high PHB titers were obtained mainly on glucose and fructose (4.58 and 4.85 g/L, respectively). Nevertheless, comparable PHB yields were also obtained by *H. organivorans*. It should be noted that *H. organivorans* is generally recognized as very promising strain for biodegradation of organic pollutants [12], but, to our best knowledge, its PHB accumulation potential has not been described in scientific literature before. Actually, *H. organivorans* provided the best PHB production when cultivated on galactose (5.80 g/L) and mannose (3.87 g/L). It should be noted that PHB content on these saccharides reached very high values 90.55 and 83.41 weight % for galactose and mannose, respectively. Based on these results, *H. organivorans* seems to be a very promising PHB producing strain suitable for the valorization of lignocellulosic materials rich in galactomannans such as spent coffee grounds [13]. On the contrary, biomass growth and PHA accumulation in *H. salina* were much lower as compared with *H. halophila* and *H. organivorans*. It is likely that *H. salina* requires complex components to induce more intensive growth of biomass and also to activate PHB biosynthesis. Nevertheless, since complex cultivation components such as yeast extract or peptones usually bring additional costs, based on our results *H. salina* does not seem to be candidate strain for industrial PHB production.

Table 1. Biomass and PHB yields of the tested halophiles on various sugars (initial carbon substrate concentration 20 g/L, NaCl 66 g/L, cultivation time 72 h, 30°C, 200 rpm).

		CDM* [g/L]	PHB content [% in CDM]	PHB [g/L]
<i>H. halophila</i>	Glucose	5.61 ± 0.04	81.48 ± 10.63	4.58 ± 0.60
	Fructose	3.47 ± 0.03	66.80 ± 0.80	2.31 ± 0.04
	Sucrose	6.42 ± 0.13	75.41 ± 2.16	4.85 ± 0.03
	Xylose	2.82 ± 0.06	49.38 ± 3.14	1.39 ± 0.09
	Galactose	4.22 ± 0.10	80.73 ± 2.04	3.41 ± 0.12
	Mannose	1.42 ± 0.10	68.12 ± 0.01	0.96 ± 0.06
<i>H. organivorans</i>	Glucose	4.43 ± 0.19	70.78 ± 6.13	3.13 ± 0.14
	Fructose	4.63 ± 0.01	55.44 ± 0.10	2.57 ± 0.01
	Sucrose	4.31 ± 0.04	68.32 ± 8.34	2.94 ± 0.66
	Xylose	1.90 ± 0.06	40.62 ± 9.88	0.77 ± 0.21
	Galactose	5.61 ± 0.01	90.55 ± 4.08	5.80 ± 0.22
	Mannose	4.64 ± 0.01	83.41 ± 1.83	3.87 ± 0.08
<i>H. salina</i>	Glucose	1.51 ± 0.07	6.28 ± 0.44	0.10 ± 0.01
	Fructose	1.43 ± 0.04	12.55 ± 1.24	0.17 ± 0.01
	Sucrose	1.22 ± 0.02	11.81 ± 0.06	0.14 ± 0.01
	Xylose	0.90 ± 0.07	4.28 ± 0.37	0.04 ± 0.01
	Galactose	0.97 ± 0.03	12.3 ± 0.48	0.12 ± 0.01
	Mannose	1.06 ± 0.03	12.35 ± 1.01	0.13 ± 0.01

\*CDM stands for cell dry mass, results are in presented as: mean ± standard deviation

Since *H. organivorans* seems to be a very promising halophilic PHB producer, we decided to test the influence of salinity of cultivation media on biomass growth and PHA yields. It was recently reported that NaCl concentration is a crucial factor affecting PHB production in *H. halophila* [11] and in a halophilic strain of *Bacillus megaterium* [14]. Our results are summarized in Table 2. *H. organivorans* was not capable of growth and PHB biosynthesis in media with low osmolarity (20 g/L of NaCl), but it grew well in presence of 40 – 100 g/L of NaCl. It can be stated that the higher osmolarity was, the higher PHB content in biomass was reached; nevertheless, the highest PHB yields were obtained in NaCl concentration corresponding to 60 g/L further increase in osmolarity slightly inhibited the growth of bacterial culture.

Table 2. Biomass and PHA yields of *Halomonas organivorans* at various concentration of NaCl in cultivation media (initial glucose concentration 20 g/L, NaCl 66 g/L, cultivation time 72 h, 30°C, 200 rpm).

NaCl [g/L]	CDM [g/L]	PHB content [% in CDM]	PHB [g/L]
20	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
40	4.30 ± 0.06	77.13 ± 5.27	3.32 ± 0.18
60	5.57 ± 0.13	83.41 ± 0.10	4.45 ± 0.11
80	5.24 ± 0.01	82.98 ± 2.03	4.34 ± 0.11
100	4.62 ± 0.08	88.17 ± 0.97	4.07 ± 0.12

\*CDM stands for cell dry mass, results are in presented as: mean ± standard deviation, n.d. – not detected

#### Summary

Our results indicate that *H. organivorans* is very promising PHB producer which is capable of reaching very high polymer contents in bacterial cells and it is capable of efficient utilization of mannose and galactose. Hence, this halophilic strain can be used for PHB production using spent coffee grounds or similar lignocellulose substrates rich in galactomannans as major hemicellulose component.

#### Acknowledgement

This work was supported by the projects Materials Research Centre at FCH BUT—Sustainability and Development no.LO1211 of the Ministry Education, Youth and Sports. Further, this work was funded through the project SoMoPro (project No. 6SA18032). This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie, and it is co-financed by the South Moravian Region under grant agreement No. 665860. Authors confirm that the content of this work reflects only the author's view and that the EU is not responsible for any use that may be made of the information it contains.

#### References

- [1] K. Dumome, D.C. Córdova, M. Astorga-Elo, P. Renganathan. Extremozymes: A Potential Source for Industrial Applications. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27 (2017) 649-659.
- [2] A. Krüger, C. Schäfers, C. Schröder and G. Antranikian. Towards a sustainable biobased industry – Highlighting the impact of extremophiles. *New Biotechnol* 40 (2018) 144 – 153.
- [3] G.-Q. Chen, Z.-R. Jiang. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 50 (2018) 94-100.

- [4] S. Obruca, P. Sedlacek, M. Koller, D. Kucera, I. Pernicova. Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. *Biotechnol. Adv.* 36 (2018) 856 – 870.
- [5] S. Obruca, P. Sedlacek, F. Mravec, V. Krzyzanek, J. Nebesarova, O. Samek, D. Kucera, P. Benesova, K. Hrubanova, M. Milerova, I. Marova. The presence of PHB granules in cytoplasm protects non-halophilic bacterial cells against the harmful impact of hypertonic environments. *New Biotechnol.* 39 (2017) 68-80.
- [6] M. Koller. Recycling of waste streams of the biotechnological poly(hydroxyalkanoate) production by *Haloferax mediterranei* on whey. *Int. J. Polym. Sci.* (2015) Article ID 370164.
- [7] Y.-K. Jeong, P. L. Show, C. W. Ooi, T.C. Ling, J. C-W. Lan. Current trends in polyhydroxyalkanoates (PHAs) biosynthesis: Insights from the recombinant *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 180 (2014) 52 – 65.
- [8] M. Koller, E. Chiellini, G. Braunegg. Study on the production and re-use of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and extracellular polysaccharide by the archaeon *Haloferax mediterranei* strain DSM 1411. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 29 (2015) 87-98.
- [9] H. Guzmán, D. Van-Thuoc, J. Martín, R. Hatti-Kaul, J. Quillaguamán. A process for the production of ectoine and poly(3-hydroxybutyrate) by *Halomonas boliviensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84 (2009) 1069 – 1077.
- [10] S. Obruca, O. Snajdar, Z. Svoboda, I. Marova. Application of random mutagenesis to enhance the production of polyhydroxyalkanoates by *Cupriavidus necator* H16 on waste frying oil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29 (2013) 2417-2428.
- [11] D. Kucera, I. Pernicová, A. Kovalcik, M. Koller, L. Mullerova, P. Sedlacek, F. Mravec, J. Nebesarova, M. Kalina, I. Marova, V. Krzyzanek, S. Obruca. Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*. *Bioresour. Technol.* 256 (2018) 552-556.
- [12] M. T. García, E. Mellado, J. C. Ostos, A. Ventosa. *Halomonas organivorans* sp. nov., a moderate halophile able to degrade aromatic compounds. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54 (2004) 1723-1728.
- [13] A. Kovalcik, S. Obruca, I. Marova. Valorization of spent coffee grounds: A review. *Food Bioprod. Process.*, 110 (2018) 104-119.
- [14] A. Rodríguez-Contreras, M. Koller, G. Braunegg, M.S. Marqués-Calvo. Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] production under different salinity conditions by a novel *Bacillus megaterium* strain. *New Biotechnol.* 33 (2016) 73-77.





Contents lists available at ScienceDirect

Bioresource Technology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biortech](http://www.elsevier.com/locate/biortech)

Short Communication

## Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*

Dan Kucera<sup>a</sup>, Iva Pernicová<sup>a</sup>, Adriana Kovalcik<sup>a</sup>, Martin Koller<sup>b,c</sup>, Lucie Mullerová<sup>a</sup>, Petr Sedlacek<sup>a</sup>, Filip Mravec<sup>a</sup>, Jana Nebesarová<sup>d,e</sup>, Michal Kalina<sup>a</sup>, Ivana Marová<sup>a</sup>, Vladislav Krzyzanek<sup>f</sup>, Stanislav Obruca<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Parkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic

<sup>b</sup> Institute of Chemistry, NAWI Graz, University of Graz, Heinrichstrasse 28/III, 8010 Graz, Austria

<sup>c</sup> ARENA Arbeitsgemeinschaft für Ressourcenschonende & Nachhaltige Technologien, Inffeldgasse 21b, 8010 Graz, Austria

<sup>d</sup> Biology Centre, The Czech Academy of Sciences, V.v.i., Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

<sup>e</sup> University of South Bohemia, Faculty of Science, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

<sup>f</sup> Institute of Scientific Instruments, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vvi Kralovopolska 147, 612 64 Brno, Czech Republic



### ARTICLE INFO

#### Keywords

*Halomonas halophila*  
Halophiles  
Lignocellulose hydrolysates  
Morphology of bacterial cells  
Polyhydroxyalkanoates

### ABSTRACT

This work explores molecular, morphological as well as biotechnological features of the highly promising polyhydroxyalkanoates (PHA) producer *Halomonas halophila*. Unlike many other halophiles, this bacterium does not require expensive complex media components and it is capable to accumulate high intracellular poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) fractions up to 82% of cell dry mass. Most remarkably, regulating the concentration of NaCl apart from PHB yields influences also the polymer's molecular mass and polydispersity. The bacterium metabolizes various carbohydrates including sugars predominant in lignocelluloses and other inexpensive substrates. Therefore, the bacterium was employed for PHB production on hydrolysates of cheese whey, spent coffee grounds, sawdust and corn stover, which were hydrolyzed by HCl; required salinity of cultivation media was set up during neutralization by NaOH. The bacterium was capable to use all the tested hydrolysates as well as sugar beet molasses for PHB biosynthesis, indicating its potential for industrial PHB production.

### 1. Introduction

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are polyesters of hydroxyalkanoic acids accumulated by numerous prokaryotes in the form of intracellular granules as storage of carbon and energy. The homopolymer of 3-hydroxybutyrate (3HB), poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), is the most common and best-studied PHA. PHA resemble synthetic petrochemistry-based polymers in mechanical and technological properties, but, unlike these, they are produced from renewable resources and reveal completely biodegradable and biocompatible nature (Koller et al., 2017).

PHA are accumulated by a wide variety of bacteria including numerous halophiles, a group of microorganisms adapted to highly saline environments with NaCl being the major salt component. These microorganisms developed different strategies to cope with high salt concentrations such as accumulation of organic compatible solutes or high concentrations of K<sup>+</sup> ions in the cells (Obruca et al., 2018). Nevertheless, it is likely that also PHA accumulation helps microbes to

deal with high osmotic pressure. This statement is supported by the fact that PHA biosynthesis was identified in numerous halophilic prokaryotes including various extremely halophilic archaea (Mahansaria et al., 2015). Furthermore, presence of PHA granules was recently reported being an advantageous factor supporting the survival of non-halophilic bacteria exposed to osmotic up-shock (Obruca et al., 2017) and, moreover, PHA accumulating bacteria contain a substantial amount of PHA monomers, which were recently identified being a potent compatible solute (Obruca et al., 2016).

Despite the fact that PHA are very promising ecologically friendly materials, their industrial production at large scale is still scarce. The primary cause is the high cost of production. It was estimated that cost of carbon substrate represent about 40% of total PHA cost (Choi and Lee 1999), therefore, there are many attempts to produce PHA from inexpensive carbon resources (Obruca et al. 2015, Haas et al. 2017). Also the high-energy input demanding sterilization as well as cost of PHA isolation contributes significantly to the cost of PHA. In this context, halophiles are considered auspicious candidates for PHA

\* Corresponding author.

E-mail address: [Stana.O@seznam.cz](mailto:Stana.O@seznam.cz) (S. Obruca).

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.062>

Received 13 December 2017; Received in revised form 8 February 2018; Accepted 13 February 2018

Available online 16 February 2018

0960-8524/© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

production PHA since the high salt concentration reduces the risk of microbial contamination and PHA can be efficiently recovered from halophiles by simple hypotonic lysis of cells (Koller 2015; Yin et al. 2015).

*Halomonas halophila*, formerly *Deleya halophila*, is a Gram-negative, strictly aerobic moderately halophilic bacterium. It was originally isolated near Alicante in southeast Spain (Quesada et al. 1984). Up to date, only one very brief report indicates that *H. halophila* accumulates PHA (Klein et al. 2016), while morphological, molecular, kinetic as well as biotechnological characteristics of PHA biosynthesis by this strain have not been studied at all. Therefore, the aim of this work was to explore PHA biosynthesis by this highly interesting halophilic bacterium under different salinities, and to evaluate its potential for biotechnological production of PHA from various inexpensive substrates.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microorganism, cultivation and microscopy analysis of bacterial cells

*Halomonas halophila* CCM 3662 was purchased from the Czech Collection of Microorganisms. The bacterium was cultivated on Complex Nutrient Medium (CNM; peptone bacteriological 15 g/L, yeast extract 3 g/L, glucose 1 g/L, NaCl 66 g/L) and maintained as a cryo-conserved culture at  $-80^{\circ}\text{C}$  in the presence of 17 (w/v) % glycerol. For PHA production, a mineral medium (MM) reported elsewhere (Obruca et al. 2014a) was applied, which was supplemented by 20 g/L glucose (or other sugars) and 66 g/L NaCl (unless stated otherwise). This medium was inoculated by 3 vol% of a 24 h old liquid culture grown on CNM. The production cultivations were performed in Erlenmeyer flasks (volume 250 mL) containing 100 mL of the cultivation media ( $30^{\circ}\text{C}$ , 200 rpm, 72 h). PHA-rich and -poor bacterial cells cultivated for 48 h on glucose (20 g/L) supplemented MM and CNM, respectively, were analyzed by Transmission Electron Microscopy (TEM) and also by time-resolved fluorescence microscopy. The detailed protocols of microscopy analyses are provided in Supplementary Materials as description of Fig. S2.

### 2.2. Molecular analysis of PHA-synthase

Multiplex PCR for detection of bacterial DNA (16S rRNA gene) and the PHA synthase gene (*phaC*) was performed to confirm PHA production capability of various bacteria including *H. halophila*, the detailed description of the procedure is provided in Supplementary materials as description of Fig. S1.

### 2.3. Analysis and characterization of PHA

The biomass concentration and the PHA content in cells were determined as reported previously (Obruca et al. 2014b). To determine the molecular weight of PHB, the polyesters were extracted from dried biomass by chloroform (approx. 20 mg biomass, 5 mL chloroform,  $70^{\circ}\text{C}$ , 24 h, continuous stirring); residual bacterial biomass was separated by filtration, and, finally, the solvent was removed by evaporation at  $70^{\circ}\text{C}$  for 24 h. After that, the polymer was solubilized in HPLC-grade chloroform (5 mg/mL), and obtained samples were analyzed by gel Size Exclusion Chromatography (Agilent, Infinity 1260 system, PLgel MIXED-C column) with Multiangle Light Scattering (Wyatt Technology, Dawn Heleos II) and Differential Refractive Index (Wyatt Technology, Optilab T-REX) detection.

Thermal stability of PHB samples was determined by thermogravimetric analysis carried out using TGA Q5000 (TA Instruments) (nitrogen 50 mL/min). Samples of 5 mg of were placed in sealed pans, and analyzed in the temperature range from  $25^{\circ}\text{C}$  to  $500^{\circ}\text{C}$  with a heating rate of  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Other thermal properties were determined by differential scanning calorimetry (DSC) (TA Instruments) with a nitrogen gas flow of 50 mL/min. Samples (5 mg) were placed in hermetically

sealed aluminum pans. The first heating cycle was run between  $25^{\circ}\text{C}$  and  $190^{\circ}\text{C}$  at a scan rate of  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , followed by cooling to  $-30^{\circ}\text{C}$  at  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . The second heating cycle took place between  $-30^{\circ}\text{C}$  and  $200^{\circ}\text{C}$  at a heating rate of  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . DSC was calibrated using the reference metals Hg ( $-36.31^{\circ}\text{C}$ ), In ( $156.86^{\circ}\text{C}$ ), Sn ( $231.58^{\circ}\text{C}$ ) and Zn ( $418.49^{\circ}\text{C}$ ).

### 2.4. Preparation of inexpensive substrates and their hydrolysates

Sugar beet molasses was obtained from sugar refinery in Hrusovany nad Jevisovkou (Czech Republic) and added to cultivation media in the amount needed to obtain a final concentration of sucrose of 20 g/L. Cheese whey was obtained from the Pribina Pribyslav cheese manufactory (Pribyslav, Czech Republic). It was hydrolyzed prior to cultivation by 2 M HCl for 90 min at  $90^{\circ}\text{C}$ , neutralized by NaOH and diluted with 2-times concentrated mineral salt media not containing NaCl. Hence, the osmotic pressure of the media (1 M NaCl  $\approx$  60 g/L) was fully obtained by neutralization of HCl after hydrolysis. Final sugar concentration of the hydrolysate was determined spectrophotometrically by the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method, and amounted to 21.99 g/L.

Similarly, 50 g/L of lignocellulose materials, namely sawdust (SWD) containing predominantly pine wood, corn stover (CS) and spent coffee grounds (SCG) were hydrolyzed by 1 M HCl for 40 min at  $110^{\circ}\text{C}$ . After that, the hydrolysates were cooled, the pH-value was set to 4.5 by NaOH, and the commercial enzyme cocktail Viscozyme L (Sigma-Aldrich, Germany) (1 vol%) was applied (stirring at  $45^{\circ}\text{C}$  for 18 h). After remaining solids were removed by filtration, the pH-value was adjusted to 7.0 by NaOH, and the hydrolysates were used for cultivation media preparation. At first, hydrolysates were simply supplemented with mineral salts according to the mineral media (MM) recipe (*vide supra*). Again, no NaCl addition was needed, since the required salt concentration (1 M NaCl  $\approx$  60 g/L) was entirely generated by neutralization. Sugar concentrations in the hydrolysates amounted to 8.93 g/L for SWD hydrolysate (SWDH), 18.71 g/L for CS hydrolysate (CSH), and 19.16 for SCG hydrolysate (SCGH). Moreover, all the lignocellulose hydrolysates were diluted by 2-times concentrated MM containing 60 g/L NaCl.

Furthermore, HPLC analysis of sugar composition in the lignocellulose hydrolysates prior and after cultivation was performed by liquid chromatography (Thermo Scientific UHPLC system – Ultimate 3000, refractometric detector – ERC RefractoMax 520) with REZEX-ROA column (150  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ; Phenomenex, USA). The mobile phase was 5 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  at a flow rate 0.5 mL/min.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Molecular and microscopy analysis of *H. halophila*

The results obtained by this multiplex PCR assay for *H. halophila* clearly demonstrated the presence of the *phaC* gene (see Fig. S1). Generally, this result is not surprising since numerous members of the genus *Halomonas* are capable of PHA biosynthesis, and some of them are even considered auspicious candidates for industrial production of PHA (Yin et al. 2015).

Transmission electron microscopy, as well as FLIM analysis, were used to investigate the morphology of *H. halophila* cultivated in nutrient and nitrogen rich cultivation media not stimulating PHA synthesis, and also in glucose supplemented nitrogen limited mineral medium, which was expected to induce PHA accumulation; the results are shown in Fig. S2. In both cases, the bacterial culture formed rod-shaped cells, although both cell diameters and cell shapes differed in the two cultivation media. In nutrient rich media, bacterial cells formed rather slim, elongated cells with a diameter of about 1  $\mu\text{m}$  and length 5–8  $\mu\text{m}$ . On the contrary, when cultivated in mineral media, bacterial cells were rather short (length of 3–6  $\mu\text{m}$ ), and are spherically shaped. The main

difference between the cultivations in the two media referred to the PHA content. In nutrient-rich media (Fig. S2A and S2B), bacterial cells contained approximately 3–8 relatively small PHA granules being predominantly localized in the center of the cells. Jendrossek and Pfeiffer (2014) reported that granules in PHA-poor cells (young bacterial cells in initial state of PHA formation) are localized in the center of the cells and suggested the “Scaffold-type model” as a novel theory of PHA granules formation. Our observation of PHA granules localization indicates for the first time that this model could be valid also for halophilic bacteria. Image analysis of *H. halophila* cells cultivated in nutrient-rich media demonstrated that PHA granules take a mean share of  $2.1 \pm 0.6\%$  of the bacterial cell volume.

Bacterial cells accumulated a substantially more PHA when cultivated in nitrogen limited mineral media (Fig. S2C and S2D). According to the results of image analysis, the volume fraction occupied by PHA granules in PHA rich cells amounted to about  $38.4 \pm 2.7\%$  of cell volume. This is in agreement with recent findings indicating that even bacterial cells with very high intracellular PHA content control their cells diameters in order to prevent the PHA volume fraction from exceeding a value of 40 vol% (Mravec et al. 2016). Moreover, these results are in excellent agreement with data reported by Vadija et al. (2016), who observed that the upper limit of PHA content in cells is determined by the cell's geometry and steric factors.

### 3.2. PHA production on various media and carbon substrates

An important factor influencing the economic feasibility of PHA production is the cost of cultivation media. Some promising halophilic PHA producers require complex nitrogen sources (Koller 2015). An advantageous characteristic of *H. halophila* as potential PHA producer is that this bacterium finds its way with inexpensive mineral media without requiring expensive, complex nitrogen sources.

Further, we investigated the effect of NaCl concentration in cultivation media on PHA productivity as well as on molecular weight and thermal properties of the accumulated polymer; the results are shown in Table 1. Regarding PHB yields, the optimal concentration of NaCl amounted to 60 g/L (which roughly corresponds to 1 M). Recently, Rodríguez-Contreras et al. (2016) published a study dealing with the influence of salinity on PHA production by the halophilic Gram-positive bacterium *Bacillus megaterium* uyuni S29. Using this strain, the highest PHA titer (2.22 g/L) as well as PHA content in biomass were gained at a NaCl concentration of 45 g/L, whereas at lower and higher salt concentration (5 and 100 g/L), the productivity dramatically decreased. Hence, NaCl concentration is a crucial parameter influencing PHA productivity when employing halophilic bacteria and needs to be optimized for each new PHA production strain.

Furthermore, in case of *H. halophila*, salinity of the cultivation media influences also molecular weight of the polymer and its polydispersity (see Table 2). At low NaCl concentration, PHB with lower mass but very narrow polydispersity was formed, while the molecular weight of the polymer and also polydispersity increased in parallel to

**Table 2**

Biomass and PHB titers and PHB fraction in biomass gained by *H. halophila* on various pure sugars and various inexpensive complex substrates after 72 h cultivation in Erlenmeyer flasks.

	CDM [g/L]	PHB [wt%]	PHB [g/L]
<i>Pure sugars as carbon source</i>			
Glucose	5.62 ± 0.03	81.5 ± 10.6	4.58 ± 0.60
Fructose	3.47 ± 0.04	66.8 ± 0.8	2.31 ± 0.04
Sucrose	6.47 ± 0.13	75.4 ± 7.7	4.85 ± 0.17
Cellobiose	2.86 ± 0.02	90.8 ± 1.1	2.59 ± 0.04
Xylose	2.82 ± 0.06	49.4 ± 3.1	1.39 ± 0.09
Mannose	1.42 ± 0.10	68.1 ± 0.1	0.96 ± 0.06
Galactose	4.22 ± 0.10	80.7 ± 2.0	3.41 ± 0.12
Lactose	0.27 ± 0.02	n.d.	n.d.
Rhamnose	6.02 ± 0.15	82.8 ± 2.9	4.98 ± 0.21
Arabinose	5.17 ± 0.05	61.4 ± 10.7	3.18 ± 0.55
<i>Complex substrates as carbon source</i>			
Cheese whey hydrolysate	8.50 ± 0.17	38.32 ± 2.21	3.26 ± 0.27
Molasses	4.05 ± 0.06	64.06 ± 1.13	2.57 ± 0.14
SCGH	3.51 ± 0.15	61.95 ± 1.34	2.17 ± 0.05
SCGH, 2x diluted	1.80 ± 0.13	15.27 ± 0.90	0.27 ± 0.02
SWDH	2.14 ± 0.19	46.85 ± 4.29	1.00 ± 0.13
SWDH, 2x diluted	1.35 ± 0.04	11.27 ± 0.23	0.15 ± 0.01
CSH	n.d.	n.d.	n.d.
CSH, 2x diluted	2.12 ± 0.1	38.67 ± 0.65	0.82 ± 0.01

n.d.: not detected

increasing osmotic pressure. In view of physico-mechanical properties of PHA and its processing towards final products, both a rather high molecular weight of the polymer and the controllability of molecular weight during the bioprocess are considered desirable features. Therefore, the polymer produced by *H. halophila* attracts interest since at a higher NaCl concentration (60, 80 and 100 g/L), polymers of high molecular weight were produced. When lower osmotic pressure is applied, the resulting polymer revealed a highly uniform distribution of molecular weight. Hence, certain controllability of the molecular mass and its distribution can be achieved by this strain by adapting the medium salinity. To the best of our knowledge, the influence of the variation of the NaCl concentration on the molecular weight and polydispersity of PHA produced by halophilic bacteria was not reported in the literature before.

Furthermore, the concentration of NaCl used during cultivation of *H. halophila* influenced also thermal properties of PHA (see Table 1). The highest thermal stability was observed for the PHA produced at 20 g/L of NaCl. For all PHB samples, the melting temperature ( $T_m$ ) was determined at about 180 °C, which is typical for high molecular weight samples of PHB produced by other organisms (Koller et al. 2017). PHB samples produced at a higher concentration of NaCl demonstrated much lower thermal stability, as evidenced by the decreased  $T_d$  at about 3.8–14.2 °C. The differences in the thermal stability corresponded to the degrees of crystallinity ( $X_c$ ) of PHA samples after isolation. Next, the different NaCl concentrations markedly influenced the crystallization

**Table 1**

Biomass and PHB concentration and molecular weights of PHA produced by *H. halophila* at various NaCl concentrations in glucose-based cultivation media (MM) after 72 h cultivation in Erlenmeyer flasks.

NaCl [g/L]	CDM [g/L]	PHB [wt %]	PHB [g/L]	$M_w$ [kDa]	$\bar{D}$	DSC						TGA			
						1st heating scan			Cooling scan		2nd heating scan			$T_d$ [°C]	$T_{max}$ [°C]
						$T_m$ [°C]	$\Delta H_f$ [J/g]	$X_c$ [%]	$T_c$ [°C]	$\Delta H_c$ [J/g]	$T_m$ [°C]	$\Delta H_f$ [J/g]	$X_c$ [%]		
20	4.27 ± 0.01	47.57 ± 2.76	2.03 ± 0.12	473.84 ± 26.91	1.2	179.1	73.8	50.5	105.1	198.9	176.2	90.2	61.8	261.7	273.7
40	5.16 ± 0.11	51.96 ± 3.00	2.68 ± 0.17	722.81 ± 56.98	1.10	178.6	66.0	45.2	107.0	100.0	176.9	69.9	47.8	247.9	256.9
60	5.11 ± 0.11	72.01 ± 2.78	3.68 ± 0.16	793.91 ± 27.78	1.29	180.5	65.8	45.0	106.5	149.3	178.4	70.3	48.1	247.5	259.0
80	4.66 ± 0.12	58.34 ± 6.58	2.72 ± 0.31	797.98 ± 25.80	1.82	178.1	70.3	48.2	109.4	136.2	177.6	62.6	42.9	257.9	269.0
100	3.25 ± 0.36	45.43 ± 0.50	1.48 ± 0.16	810.64 ± 20.80	2.87	180.1	65.9	45.1	111.3	190.6	177.9	81.2	55.6	251.3	261.3

kinetics of PHB. PHB produced at 100 g/L NaCl crystallized at a temperature about 6.2 °C higher than observed for PHB from cultures grown at 20 g/L NaCl. It must be noted that the crystallinity of PHB, additionally to the purity of samples, cultivation and isolation conditions, also depends on its molecular weight. Narrower molecular weight distribution and lower molecular weight resulted in a higher degree of crystallinity of PHB samples.

Another investigated property of *H. halophila* was its capability of converting various sugars into PHB (see Table 2). With the exception of lactose, the bacterial culture was able to utilize all the tested sugars. Surprisingly, the highest PHB titers were gained on rhamnose, followed by sucrose and glucose, but the bacterial culture was also capable of PHA accumulation on other sugars such as cellobiose, xylose, mannose or galactose. This is an essential feature of *H. halophila* because it indicates that it can be used for PHA production from various inexpensive substrates such as lignocelluloses or molasses (Obruca et al. 2015).

The production cost of PHA can be substantially decreased when cheap substrates are used. In this context, lignocellulose-based waste materials are of high interest. Nevertheless, prior to conversion of lignocellulose materials into PHA, polysaccharides must be hydrolyzed to yield fermentable sugars. This process usually includes chemical hydrolysis of hemicellulose by mineral acids such as HCl and subsequent enzymatic hydrolysis of cellulose (Obruca et al. 2015). Neutralization of the hydrolysates after mineral acid treatment is usually performed by NaOH, which results in the presence of high NaCl concentration in cultivation media. Hence, it is reasonable to use halotolerant or even halophilic microbes for the biotechnological valorization of lignocellulose and other cheap substrate hydrolysates – they are naturally tolerant to high salt concentrations, and there is no need to remove salts from cultivation media prior to cultivation.

Taking into account the expedient spectrum of carbohydrates utilizable by *H. halophila*, the strain was tested for PHA production on several selected waste substrates (Table 2). At first, cultivation was performed on cheese whey, the lactose rich waste stream of cheese production. Since *H. halophila* was not capable of direct lactose utilization, but it can grow on its monomers glucose and galactose, we performed HCl-catalyzed hydrolysis of whey lactose. The concentration of HCl was set to reach a desired NaCl concentration of approx. 60 g/L after neutralization, therefore, no additional NaCl had to be introduced. The tested bacterial culture was capable of efficient utilization of hydrolyzed cheese whey; achieved PHA concentration amounted to 3.26 g/L. Similarly, *H. halophila* also efficiently converted molasses into PHA (PHA titers 2.57 g/L); in this case, no hydrolysis was needed before cultivation, since the tested bacterial species is capable of direct utilization of sucrose as the major sugar constituent of molasses.

PHA production by *H. halophila* was also tested on hydrolysates of lignocellulose materials. Also in these cases, chemical hydrolysis of lignocellulose materials was performed by 1 M HCl, to reach optimal salinity of the cultivation media after neutralization. The first tested lignocellulose material was SCG, an important side stream of the coffee processing industry; it represents 60 wt% of coffee beans used for coffee beverage preparation or instant coffee production. SCG is rich in hemicelluloses, and composed mainly of galactomannans (30–40 wt%); it also contains cellulose (approx. 10 wt%), lipids (15 wt%) and lignin (approx. 30%) (Mussatto et al. 2011). Therefore, SCG represents a suitable, still underestimated substrate, which can be valorized employing a bio-refinery concept (Obruca et al. 2014a, Obruca et al. 2015). Since *H. halophila* is capable of utilizing mannose as well as galactose as the dominant sugars in SCG hydrolysate, we also tested its potential for valorization of SCG; indeed, the tested bacterial species was capable of SCG hydrolysate utilization.

Moreover, *H. halophila* was also capable of utilization and PHA accumulation on hydrolysates of sawdust (SWD) and corn stover (CS), which were prepared in the same way as hydrolysate of SCG. Both hydrolysates contain predominantly xylose, arabinose and glucose. It was an interesting finding that the bacterial culture revealed poor

growth and no PHB accumulation on concentrated corn stover hydrolysate (CSH), which is in contrast to the relatively good biomass and PHB titers achieved on twice diluted CSH. This observation indicates the presence of microbial inhibitors in CSH, which is a typical finding in lignocellulosic hydrolysates, since numerous microbial inhibitors are released from lignocellulose materials during their hydrolysis (Jönsson & Martín 2016). Since among all the hydrolysates of inexpensive substrates tested substantial inhibition was observed only in CSH, and this problem can be easily solved by simple dilution of the hydrolysate, it can be stated that *H. halophila* seems to be a robust bacterial strain which is a very positive feature for a potential industrial application. Probably as a consequence of the presence of the substantial portion of pentose sugars, whose conversion into PHA is metabolically problematic and less effective as compared with hexoses (Lopes et al. 2009), PHA yields obtained on SWDH and CSH are lower than those obtained in the hexose-rich SCG hydrolysate. Furthermore, determination of sugars in lignocellulose hydrolysates on which bacterial culture revealed substantial growth and PHB production was performed prior and after cultivation; data are provided as supplementary materials (Table S1). Despite the fact that glucose was identified as one of the best convertible sugars for *H. halophila*, no preference for utilization of glucose over other sugars in hydrolysates was observed. Contrarily, in SWD hydrolysate, xylose seemed to be preferentially utilized compared to glucose. Nevertheless, in the other cultivation setups, sugars were consumed more or less at the same rates. This observation can be considered being positive since risk of the catabolite repression, which typically complicates PHA production on lignocellulose hydrolysates, is substantially limited. Hence, the results indicate a high biotechnological potential of *H. halophila* for PHA production from inexpensive substrates.

#### 4. Conclusions

This work makes us familiar with the high potential of the osmophilic strain *H. halophila* for economically feasible PHB production. Based on a series of cultivations, the conversion of a variety of inexpensive (agro)industrial waste and surplus materials towards PHB was successfully demonstrated, which opens the door to upgrade these materials to feedstocks in bio-refinery processes operated with this auspicious microbial cell factory. Remarkably, fine-tuning of the salinity of cultivation media pre-determines the properties of PHB produced by this strain already *in statu nascendi*, which paves the way for convenient tailor-made production of PHB with pre-defined molecular mass and polydispersity as essential parameters, which influence its processing towards marketable polymeric materials.

#### Funding

This work was supported by the projects Materials Research Centre at FCH BUT—Sustainability and Development no. LO1211, program for large research infrastructures within the project “National Infrastructure for Biological and Medicinal Imaging (Czech-BioImaging LM2015062) and LD15031 of the Ministry Education, Youth and Sports and by the project GA15-20645S (GACR). Further, we acknowledge the. This work was funded through the project SoMoPro (project No. 6SA18032). This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie, and it is co-financed by the South Moravian Region under grant agreement No. 665860. Authors confirm that the content of this work reflects only the author's view and that the EU is not responsible for any use that may be made of the information it contains.

#### Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.062>.

## References

- Choi, J., Lee, S.Y., 1999. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 12–21.
- Haas, C., El-Najjar, T., Virgolini, N., Smerilli, M., Neureiter, M., 2017. High cell-density production of poly(3-hydroxybutyrate) in a microtiter bioreactor. *New Biotechnol.* 37, 117–122.
- Jendrošák, D., Pfeiffer, D., 2014. New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). *Environ. Microbiol.* 16, 2357–2373.
- Jönsson, L.J., Martin, C., 2016. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresour. Technol.* 199, 103–112.
- Klein, C., Paulik, C., Weber, H.K., 2016. Polyhydroxybutyrate generated from lignocellulosic process streams by halophiles. *BoPoCo*. In: 3rd International Conference, August 28–September 1 Bio-Based Polymers and Composites Abstract book, pp. 363–364.
- Koller, M., 2015. Recycling of Waste Streams of the Biotechnological Poly(hydroxyalkanoate) Production by *Haloferax mediterranei* on Whey. *Int. J. Polym. Sci. Article ID 370164*.
- Koller, M., Maršálek, L., Miranda de Sousa Dias, M., Braunegg, G., 2017. Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. *New Biotechnol.* 37, 24–38.
- Lopes, M., Rocha, R., Zanoatto, S., Gomez, J., Silva, L., 2009. Screening of bacteria to produce polyhydroxyalkanoates from xylose. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 1751–1756.
- Mahansaria, R., Choudhury, J.D., Mukherjee, J., 2015. Polymerase chain reaction-based screening method applicable universally to environmental haloarchaea and halo-bacteria for identifying polyhydroxyalkanoate producers among them. *Extremophiles* 19, 1041–1054.
- Mravec, F., Obruca, S., Krzyzaneck, V., Sedlacek, P., Hrubanova, K., Samek, O., Kucera, D., Benesova, P., Nebesarova, J., 2016. Accumulation of PHA granules in *Cupriavidus necator* as seen by confocal fluorescence microscopy. *FEEMS Microbiol. Lett.* 263, fw094.
- Mussatto, S.J., Machado, E.M.S., Martins, S., Teixeira, J.A., 2011. Production, composition and application of coffee and its industrial residues. *Food Bioprocess Technol.* 4, 661–672.
- Obruca, S., Petrik, S., Benesova, P., Svoboda, Z., Eremka, I., Marova, I., 2014a. Utilization of oil extracted from spent coffee grounds for sustainable production of polyhydroxyalkanoates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 5883–8590.
- Obruca, S., Benesova, P., Oborna, J., Marova, I., 2014b. Application of protease-hydrolyzed whey as a complex nitrogen source to increase poly(3-hydroxybutyrate) production from oils by *Cupriavidus necator*. *Biotechnol. Lett.* 36, 775–781.
- Obruca, S., Benesova, P., Kucera, D., Petrik, S., Marova, I., 2015. Biotechnological conversion of spent coffee grounds into polyhydroxyalkanoates and carotenoids. *New Biotechnol.* 32, 569–574.
- Obruca, S., Sedlacek, P., Mravec, F., Samek, O., Marova, I., 2016. Evaluation of 3-hydroxybutyrate as an enzyme-protective agent against heating and oxidative damage and its potential role in stress response of poly(3-hydroxybutyrate) accumulating cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 1365–1376.
- Obruca, S., Sedlacek, P., Mravec, F., Krzyzaneck, V., Nebesarova, J., Samek, O., Kucera, D., Benesova, P., Hrubanova, K., Milersova, M., Marova, I., 2017. The presence of PHB granules in cytoplasm protects non-halophilic bacterial cells against the harmful impact of hypertonic environments. *New Biotechnol.* 39, 68–80.
- Obruca, S., Sedlacek, P., Koller, M., Kucera, D., Pernicova, I., 2018. Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: biotechnological consequences and applications. *Biotechnol. Adv.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.006>.
- Quesada, E., Ventosa, A., Ruiz-Berraquero, F., Ramos-Cormenzana, A., 1984. *Deleya halophila*, a new species of moderately halophilic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34, 287–292.
- Rodríguez-Contreras, A., Koller, M., Braunegg, G., Marqués-Calvo, M.S., 2016. Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] production under different salinity conditions by a novel *Bacillus megaterium* strain. *New Biotechnol.* 33, 73–77.
- Vadlja, D., Koller, M., Novak, M., Braunegg, G., Horvat, P., 2016. Footprint area analysis of binary imaged *Cupriavidus necator* cells to study PHB production at balanced, transient, and limited growth conditions in a cascade process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 10065–10080.
- Yin, J., Chen, J.-C., Wu, Q., Chen, G.-Q., 2015. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 33, 1433–1442.

## 9.9 Příloha IX

Journal of Environmental Chemical Engineering 6 (2018) 3495–3501



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Environmental Chemical Engineering

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jece](http://www.elsevier.com/locate/jece)



### Influence of removal of microbial inhibitors on PHA production from spent coffee grounds employing *Halomonas halophila*



Adriana Kovalcik<sup>a,\*</sup>, Dan Kucera<sup>b</sup>, Petra Matouskova<sup>b</sup>, Iva Pernicova<sup>b</sup>, Stanislav Obruca<sup>b</sup>, Michal Kalina<sup>b</sup>, Vojtěch Enev<sup>b</sup>, Ivana Marova<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Food Chemistry and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkynova 118, 612 00 Brno, Czech Republic

<sup>b</sup> Materials Research Centre, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkynova 118, 612 00 Brno, Czech Republic

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

Antioxidants  
Phenolics  
Polyhydroxyalkanoates  
Resource recovery  
Spent coffee grounds  
Waste minimization

#### ABSTRACT

The valorization of food waste is the sustainable way how to handle resources wisely. Spent coffee grounds (SCGs) are waste products of the instant coffee production and coffee brewing. The potential of *Halomonas halophila* to produce polyhydroxyalkanoates (PHA) from fermentable sugars derived from SCGs has been studied. This organism was able to process SCG hydrolysates as a carbon source for its growth. Diluted acid hydrolysis (4.0 vol.% sulfuric acid, 120 min, 100 °C) has been employed, and three different SCG hydrolysates from non-modified SCGs, defatted SCGs and defatted SCGs with the eliminated phenolics have been prepared. However, in shake flask fermentation cultures, the growth of *H. halophila* was entirely inhibited on all the hydrolysates. Therefore, the hydrolysates have been detoxified using sorbent based on styrene-divinylbenzene based resins. When *H. halophila* was grown on detoxified hydrolysates, poly(3-hydroxybutyrate) (P3HB) was accumulated during 72 h. The biopolymer was characterized by gas chromatography, and size exclusion chromatography coupled with multiangle light scattering and differential refractometry. PHB titers reached 0.95 g/L with PHB content in bacteria cell dry mass 27% (wt/wt), the molecular weight of the produced polymer was about 440–825 kDa. This study demonstrates that at least the detoxification of SCG hydrolysates with sorbent was necessary to promote the fermentation of *H. halophila*. Moreover, the extraction of coffee oil and phenolics from SCG as a detoxification pretreatment step contributes to the increase of economic and environmental values of spent coffee grounds in the case of the cascading utilization and resource recovery.

#### 1. Introduction

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are biodegradable and biocompatible polyesters synthesized intracellularly by various microorganisms by certain conditions such as limitation of essential nutrients (e.g., nitrogen, phosphorus, or oxygen) and sufficient supply of the carbon source. The broad range of PHA polyesters, such as homopolymers, copolymers, and terpolymers with different physicochemical properties, can be biosynthesized by variation of substrates, co-substrates, and microorganisms [1]. PHA are considered being an environmentally-friendly alternative to petroleum-based plastics, and they have received the designation as the plastic material of the 21st century [2,3]. The most extensively studied is the homopolymer poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), which physicochemical properties are comparable with polypropylene (PP). PP is a non-biodegradable thermoplastic polymer produced from petroleum. The global production of polypropylene reached 54.44 million tonnes in 2016, and the assumed

production capacity by 2022 is 75.72 million tonnes [4]. PHA are biocompatible, non-toxic biopolymers, which may be considered as alternatives to some PP products, mainly in the medical field, such as in vivo implants, medical ware, packaging, and syringes [5,6]. Moreover, the biodegradation of PHA into non-toxic compounds enables using them as an additive in pharmaceutical formulations [7,8]. However, the much higher price of PHA compared to PP is a significant drawback, which inhibits the broader commercialization of PHA. One of the way leading to the lower production cost of PHA is the utilization of cheap non-food by-products as carbon sources. As efficient methods for the delimitation of carbohydrates from lignocellulose materials, dilute acid hydrolysis or acid hydrolysis combined with an enzymatic post-treatment have been developed. The reducing sugar content in hydrolysates vary with the kind of lignocellulosic material and applied hydrolysis conditions. Various inexpensive lignocellulosic materials have been tested as a carbon source for the microorganisms with the ability to accumulate PHA such as forest-based feedstocks, and agro-industrial

\* Corresponding author.  
E-mail address: [kovalcik@fch.vut.cz](mailto:kovalcik@fch.vut.cz) (A. Kovalcik).

<https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.05.028>

Received 12 February 2018; Received in revised form 5 May 2018; Accepted 15 May 2018  
Available online 16 May 2018

residues [9–13].

The main problem in using lignocellulosic hydrolysates as the carbon source is the presence of co-contaminants, which inhibit the cell growth of PHA producing bacteria [14]. Between compounds, which act toxically, belong extractives (e.g., terpenes, alcohols, and tannins), substances originated from the cleavage of ligno-carbohydrate complexes (phenolic compounds based on lignin degradation products) and materials released through to the degradation of hemicellulose and cellulose (furfural, hydroxymethylfurfural, and acetic acid). The study of the toxic effect of these substances on various microorganisms including yeasts has been the focus of the extensive research [15–17]. Jarboe et al. [18] in their work reviewed the effect of carboxylic acids on *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* and reported that the toxicity of carboxylic acids is related to the alteration of the cell morphology with the membrane damage and a decrease of the internal microbial pH [18]. Further, it was reported that furfural and hydroxymethyl furfural have a negative impact on the respiratory mechanism of microorganisms [19,20]. Furfural has been found to cause inactivation of cell replication of *S. cerevisiae* [21]. Next, literature denotes that phenolics originated as lignin degradation products have an inhibitory effect on the growth of microorganisms [17]. Moreover, it should be noted here that the interactive effects of all toxic substances present in lignocellulosic hydrolysates cause several times higher adverse impact as compared with the individual compounds [16]. In order to overcome the inhibitory effect of toxic substances present in hydrolysates have been used a few strategies such as (1) adaptation of microorganisms, (2) increase of the concentration of bacterial cells in the inoculum, and (3) detoxification of hydrolysates. Different methods have been applied for the elimination of toxic compounds in hydrolysates such as evaporation under vacuum, steam stripping (concentration step), pH adjustment – overliming (precipitation step), adsorption of toxic compounds by e.g., active charcoal, molecular sieves, anion/cation exchange resins (adsorption step), or extraction of poisonous compounds (extraction step). The efficiency of detoxification methods strongly varies and depends on many factors such as the principle of detoxification, the type, and concentration of toxic substances as well as the microorganism identity and applied growth conditions [22].

Spent coffee grounds (SCGs) are abundantly available as a waste product from coffee industry, coffee bars, and coffee automat machines and can be used as a cheap carbon feedstock. The composition of SCGs depends on many factors such as the origin of green beans and their composition, roasting conditions, and coffee drink processing procedures and SCGs treatment. SCGs contain carbohydrates, proteins, phenolic compounds, and melanoidins. The carbohydrate fraction can be solubilized through the thermal, acid or alkali hydrolysis. SCG hydrolysates include mainly mannose, galactose, and arabinose [23–25]. Literature shows that only a few bacteria accumulating polyhydroxyalkanoates can metabolize these monosaccharides, e.g., *Pseudomonas fluorescens* 555 [26], *Bacillus subtilis* [27], *Bacillus firmus* [28], *Burkholderia cepacia* [29], *Novosphingobium nitrogenifigens* Y88 [30], and *Burkholderia sacchari* [31]. Recently our research group presented that also *Halomonas halophila* can utilize monosaccharides present in SCGs and other lignocellulosic materials [32].

It is known that SCGs contain a large group of phenolics including chlorogenic acid, catechin, caffeic acid, ellagic acid, ferulic acid, gallic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, *p*-coumaric acid, protocatechuic acid, rutin, quercetin and tannic acid [33,34]. Phenolics contribute to the high antioxidant activity of SCG extracts. Melanoidins are brown water-

soluble complex macromolecular compounds generated from carbohydrates, proteins, and phenolics (mainly chlorogenic acid) during roasting through Maillard reaction [35]. Several studies suggested that melanoidins are bioactive compounds, which exhibit antioxidant activity, antimicrobial activity, chemopreventive activity, prebiotic activity, antihypertensive activity, metal chelating ability, and genotoxic and cytotoxic effects [36].

It can be supposed that the antimicrobial activity of phenolics present in SCGs will negatively influence the growing of PHA producing bacteria. Therefore, in this study, the multiple detoxification strategies of SCG hydrolysates on the vitality of *H. halophila* and its ability to accumulate PHA were evaluated. Additionally, options for integrating PHB production on modified SCG hydrolysates and the obtained by-products of detoxification into biorefinery concept were investigated.

## 2. Experimental part

### 2.1. Materials and methods

#### 2.1.1. Preparation of SCG hydrolysates

SCGs originated from Arabica coffee (Pavin coffee) were collected from a coffee machine at the Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Czech Republic. SCGs were dried at 80 °C for 24 h and milled to receive particles about 80 µm. The oil extraction was performed with the mixture of *n*-hexane and isopropyl alcohol (50:50 by volume) using a Soxhlet extractor for 4 h. In the next step defatted SCGs were extracted with ethanol for 4 h using a Soxhlet extractor, receiving defatted SCGs with a reduced content of phenolics. The solvent-extracted SCGs were dried at 80 °C for 24 h. Production of SCG hydrolysates (SCGH) with the aim to receive the high content of released saccharides was as following (see Fig. 1):

Method 1: SCGH#1 was prepared by hydrolysis of SCGs (25% (w/v)) with 4 vol.% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, without stirring in an autoclave for 2 h at 100 °C and 15 psi [37]. SCGH#1D was received after detoxification of SCGH#1 with the polymeric exchanger (styrene-divinylbenzene based resins, XAD4). The XAD4 in the concentration of 10 g/L was added into SCGH#1 with pH adjusted to 1.3 (96% sulfuric acid, p.a., Lachner). The detoxification was carried out at 23 °C, for 5 h and shaking at 150 rpm. After that, XAD4 resins were filtered out with Whatman # 1 filter paper.

Method 2: SCGH#2 was prepared by hydrolysis of defatted SCGs (25% (w/v)) with 4 vol.% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, without stirring in the autoclave for 2 h at 100 °C and 15 psi. SCGH#2D was received after detoxification of SCGH#2 with the polymeric exchanger XAD4 under the same conditions as above-mentioned in the method a).

Method 3: SCGH#3 was prepared by hydrolysis of defatted SCGs with the reduced content of phenolics (25% (w/v)) with 4 vol.% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, without stirring in the autoclave for 2 h at 100 °C and 15 psi. SCGH#3D was received after detoxification of SCGH#3 with the polymeric exchanger XAD4 under the same conditions as above-mentioned in the method a).

#### 2.1.2. Analysis of SCGH composition

The concentration of dry matter in SCG hydrolysates was estimated by lyophilization of 50 mL of SCGH at –43 °C, 0.133 mBar, for 24 h (Freeze dry system, Freezone 4.5, Labconco). The ash content was determined as follows: 1 g of lyophilized SCGH was incinerated in Silica crucible over the burner. The charred material was heated in a muffle

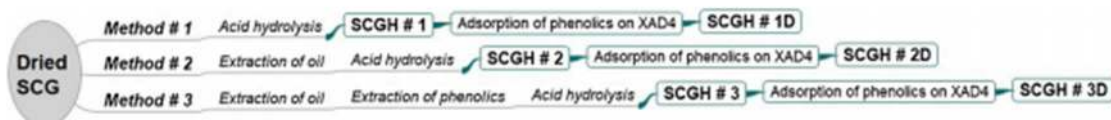


Fig. 1. Methods used for the preparation of SCG hydrolysates.

furnace for 5 h at 800 °C. The concentration of nitrogen compounds in the lyophilized SCGH was estimated by the Kjeldahl method, and the conversion factor of 6.25 was used to convert nitrogen into protein [38]. Elemental composition was determined using a CHNS analyzer EuroVector EA 3000 [39]. Samples were sealed in tin pans and heated in the oven up to 980 °C in an oxygen atmosphere. The concentration of CHNS elements has been determined by using thermal conductivity detector (TCD) and calibration with the sulphanimide.

Particular sugars contents (cellobiose, glucose, mannose, galactose, and arabinose), acetic acid, 5-hydroxymethyl furfural and furfural content in non-diluted and diluted (20 g/L) hydrolysates were estimated by liquid chromatography (pump LCP 4020, thermostat LCO 101, degasser DG-1210, refractometer detector RIDK 102; Ecom, Czech Republic) with REZEX-ROA column (150 mm × 4.6 mm, 5 µm; Phenomenex, USA). SCG hydrolysates # 1–3 were diluted into concentration 20 g/L of total sugar before cultivation to keep the same concentration of fermentable sugar by using SCGH prepared by different methods (see Fig. 1). Next, UV-vis spectra and brown color intensity of diluted SCGH (before and after detoxification) were determined by using absorbance range of 250–700 nm (the Implen NanoPhotometer Pearl UV-vis spectrophotometer). The absorption at 420 nm was used as an indicator of brown color [40]. The total phenolics content (TPC) in diluted SCGH (before and after detoxification) was estimated using the colorimetric method at 750 nm using the Folin-Ciocalteu reagent [41]. The amount of TPC was calculated according to a standard curve prepared with gallic acid as a standard. The results were expressed as milligram of gallic acid equivalent per mL of hydrolysate containing 20 g/L of sugar (mg/mL). Next, the content of flavonoids in hydrolysates with the sugar concentration of 20 g/L, before and after detoxification was estimated according to the colorimetric method at 510 nm using catechin as a standard [42]. The content of total flavonoids was expressed as milligram catechin equivalent per mL of hydrolysate containing 20 g/L of sugar (mg/mL). The absorbance was measured using Implen NanoPhotometer Pearl UV-vis spectrophotometer. All analyses were performed in triplicate, and the results were evaluated as mean values with standard deviation values.

The radical scavenging activity of diluted non-detoxified hydrolysates (20 g/L) against a stable free radical 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) was determined spectrophotometrically at 517 nm on a UV-vis spectrophotometer (Implen NanoPhotometer Pearl) according to the method of Brand-Williams et al. [43]. For each determination hydrolysates were diluted with 60% (v/v) ethanol and 0.5 mL of each dilution was mixed with 5 mL of a methanolic solution of DPPH (0.06 mM). The mixtures were shaken and kept in the dark at 37 °C for 30 min. A mixture of 0.5 mL of 60% (v/v) ethanol with 5 mL of a methanolic solution of DPPH (0.06 mM) was prepared as the control. Methanol was used as blank. Radical scavenging activity was characterized as IC<sub>50</sub> value, meaning the concentration of the sample necessary to decrease the initial DPPH concentration by 50% [44]. All determinations were performed in triplicate.

### 2.1.3. Microorganism and cultivation conditions

*Halomonas halophila* CCM 3662 was purchased from the Czech Collection of Microorganisms. The bacterium was cultivated on Complex Nutrient Medium (peptone bacteriological 15 g/L, yeast extract 3 g/L, glucose 1 g/L, NaCl 66 g/L) and maintained as a cryo-conserved culture at -80 °C in the presence of 17 (w/v) % glycerol. For PHA production, a mineral medium (MM) was applied, which consisting of 20 g/L total sugar present in SCGH (the concentration of total sugar in hydrolysates – shown in Fig. 1- was adjusted to 20 g/L), 1 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.02 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11.1 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, 66 g/L NaCl, 0.2 g/L MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O and 1 mL/L of microelement solution (MES) which consists of 9.7 g/L FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 7.8 g/L CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.156 g/L CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 0.119 g/L CoCl<sub>2</sub>, 0.118 g/L NiCl<sub>2</sub> in 0.1 M HCl. Sugars, salt solutions, and microelement solutions were autoclaved separately (115 °C, 20 min), cooled down, and aseptically combined at room

temperature. Before inoculation, pH was adjusted to 7 by 1 M HCl or NaOH. This medium was inoculated by 3 vol.% of a 24 h old liquid culture grown on Complex Nutrient Medium. The production cultivations were performed in Erlenmeyer flasks (volume 250 mL) containing 50 mL of the cultivation media. The temperature was set at 30 °C, and the agitation to 200 rpm. After 72 h of cultivation, the cells were harvested (centrifugation, 8000 × g, 5 min).

### 2.1.4. PHA extraction and analysis

The cells after centrifugation were twice purified in milli-Q water and dried to constant weight (75 °C). The dried biomass was determined gravimetrically, and the PHB content in dried biomass was analyzed by gas chromatography (Trace GC Ultra, Thermo Scientific, USA) according to Brand et al. [45]. As the standard was used commercially available poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBHV) (12% of hydroxyvalerate, Sigma Aldrich). PHB was extracted from the milled biomass with hot chloroform for 2.5 h, followed by the precipitation in slowly stirred ice-cold ethanol [46]. The precipitated PHB was washed with methanol and lyophilized.

Average molecular weights ( $M_n$  and  $M_w$ ) and polydispersity ( $D_M = M_w/M_n$ ) of polymers were measured at 25 °C by size exclusion chromatography (SEC, size separation by PL gel MIXED-C column, Agilent Technologies, USA) coupled with Dawn Heleos II multiangle light scattering (MALS) detector (Wyatt Technology, USA) and Optilab T-eEX differential refractometer (dRI, Wyatt Technology, USA). The samples were dissolved in chloroform (4 mg/mL) for 3 h at 70 °C and filtered prior to analyses (0.45 µm syringe filter). Chloroform was used as eluent at a flow rate of 0.6 mL min<sup>-1</sup> and the injection volume was 100 µL. The obtained molecular weights were calculated using the value of refractive index increment of PHB (dn/dc) 0.0336 mL/g, as was determined from the differential refractometer response assuming a 100% sample mass recovery from the column. Data acquisition and evaluation was done using Astra 6.1 software (Wyatt Technology, USA).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Composition and characterization of SCG hydrolysates

A principal goal of this work was to prepare carbon substrate from spent coffee grounds for the cultivation of *H. halophila*. This organism was chosen as a production strain because it can grow and accumulate PHA at less strict sterile conditions and the high osmotic pressure (inference after neutralization of acidic SCGH). Table 1 shows the composition of SCG hydrolysates prepared by different methodology (see

**Table 1**  
Composition of SCG hydrolysates produced in this study (250 g SCGs per L).

Composition (g/L)	SCGH # 1	SCGH # 2	SCGH # 3
Dry solid matter (DSM)	81.0 ± 0.2	84.0 ± 0.3	90.8 ± 0.5
Ash	40.03 ± 0.23	30.7 ± 0.80	41.98 ± 0.04
Total nitrogen in DSM (wt%)	0.77 ± 0.06	0.87 ± 0.02	1.03 ± 0.04
Total carbon in DSM (wt%)	14.26 ± 0.43	15.50 ± 0.23	19.80 ± 0.70
Total hydrogen in DSM (wt%)	1.56 ± 0.03	2.19 ± 0.15	3.25 ± 0.22
Total sulphur in DSM (wt%)	5.27 ± 0.23	7.56 ± 0.47	5.35 ± 0.43
Proteins in DSM (N × 6.25) (wt %)	7.71 ± 0.1	7.66 ± 0.1	7.79 ± 0.2
Cellobiose	5.24 ± 0.3	6.85 ± 0.4	5.66 ± 0.6
Glucose	0.83 ± 0.09	0.98 ± 0.09	0.79 ± 0.02
Mannose	22.61 ± 0.3	27.54 ± 0.3	23.25 ± 0.1
Galactose	27.64 ± 0.3	33.66 ± 0.2	28.44 ± 0.3
Arabinose	8.12 ± 0.5	8.81 ± 0.09	7.68 ± 0.09
Total sugar	64.44 ± 1.5	77.84 ± 1.1	65.80 ± 1.2
Acetic acid	0.42 ± 0.03	0.50 ± 0.03	0.32 ± 0.02
5-Hydroxymethyl furfural	0.13 ± 0.003	0.17 ± 0.002	0.12 ± 0.002
Furfural	0.02 ± 0.001	0.05 ± 0.001	0.06 ± 0.001
Total phenolic compounds (TPC)	2.20 ± 0.13	2.89 ± 0.2	1.30 ± 0.04



Table 2

Composition and characterization of SCGH (total sugar content was 20 g/L) before and after detoxification.

Sample	Before detoxification			Sample	After detoxification		
	Browning, absorbance values at 420 nm 10 × diluted SCGH	TPC (mg/mL)	Flavonoids (mg/mL)		Browning, absorbance values at 420 nm 10 × diluted SCGH	TPC (mg/mL)	Flavonoids (mg/mL)
SCGH # 1	0.600	2.20	0.76	SCGH # 1D	0.313	0.15	0.06
SCGH # 2	0.754	2.89	1.01	SCGH # 2D	0.318	0.32	0.10
SCGH # 3	0.476	1.20	0.52	SCGH # 3D	0.274	0.20	0.12

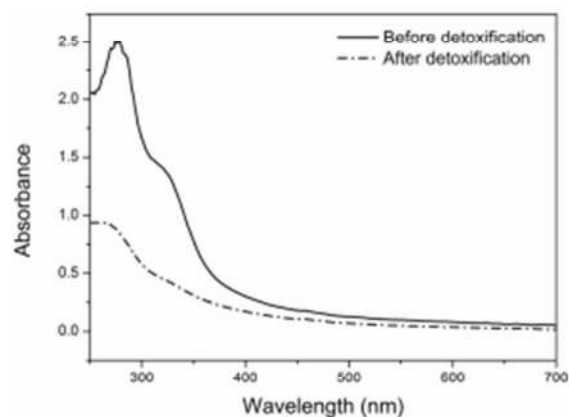


Fig. 2. UV-vis spectra of hydrolysate S6 (1 g/L) before and after detoxification.

Fig. 1).

The lowest concentration of total sugar was determined in non-treated SCGH # 1 (64.4 g/L). The extraction of oil from SCGs increased the content of total sugar in SCGH # 2 about 20.8%. The content of total sugar in SCGH # 3 with extracted oil and phenolics was comparable with SCGH # 1. The reason for the decrease in sugar content compared to SCGH # 2 could be the partial elimination of hemicelluloses during extraction of phenolics. The phenomena of the existence of lignin-carbohydrate complexes in wood and plant tissues have been excellently described and explained by Koshijima and Watanabe [47]. The total sugar yield present in SCG hydrolysates was as follows: 242 mg/g SCGs (SCGH # 1) < 257 mg/g SCGs (SCGH # 3) < 311 mg/g SCGs (SCGH # 2). The content of total sugar in all SCGH was adequate for the bacterial fermentation, but as their dark brown color indicated, hydrolysates contained high concentrations of different co-contaminants. The concentrations of co-contaminants produced after the degradation of saccharides (acetic acid, 5-hydroxymethyl furfural, and furfural) are shown in Table 1. The determined values of the co-contaminants vary with the applied methodology of SCGH production and correlate with the increased of fermentable sugar content. The low determined concentrations of furfural and 5-hydroxymethylfurfural indicate that conditions of hydrolysis were well adjusted and prevented undesired loss of sugars and formation of these toxic compounds.

Several bacterial strains, which accumulate PHA have been announced as capable of utilizing fermentable sugars present in lignocellulosic hydrolysates. However, the majority of bacterial strains are

sensitive to co-contaminant present in lignocellulosic hydrolysates and their growth is often inhibited or even stopped. The efficiency of various detoxification methods on the vitality of *B. cepacia* and *B. sacchari* strains have been reported in the literature. Silva et al. [14] eliminated toxic compounds present in sugarcane bagasse hydrolysate through a three-step procedure consisted of hydrolysate evaporation, separation of toxic compounds through the precipitation and filtration (pH adjustment with CaO, NaOH and H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), and adsorption of toxic substances on the activated charcoal. The first two-detoxification steps showed low efficiency and as the crucial detoxification step has been found the treatment with the activated charcoal [14]. Similarly, Keenan et al. [10] highlighted the necessity of the detoxification of aspen and maple hydrolysates to receive high yields of PHBHV accumulated by *B. cepacia* [10]. In this work, the detoxification procedure involved the overliming and the adsorption with the activated charcoal. Pan et al. [48] determined in undiluted wood hydrolysate 0.96 g/L of total phenolic together with the presence of low amounts of other minor inhibitors, e.g., acetic acid. As the primary toxic compound for the fermentation of *B. cepacia* ATCC 17759 has been marked furfural, which concentration of 1 g/L completely inhibited the microbial growth of *B. cepacia*. Hemicellulosic wood hydrolysate as feedstock for PHB production by *B. cepacia* was usable only after partial elimination of phenolics with the overliming combined with low-temperature [48]. Lopes et al. [49] reported that isolated strains from soil samples, *Burkholderia* sp. F24 was capable of utilizing the non-detoxified sugarcane bagasse hydrolysate. Though, the applied detoxification procedure (the adjustment of pH with Ca(OH)<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> followed by filtration and the evaporation of hydrolysate (concentration step) resulted in a significantly increased PHA productivity [49]. Koller et al. [50] investigated the efficiency of a liquefied ligno-cellulosic material (acid-catalyzed hydrolyzed spruce wood sawdust prepared by using a microwave-assisted technique) as a carbon substrate for PHA producing bacteria (*Cupriavidus necator* DSM 545). The obtained results indicate that the non-detoxified liquefied spruce obviously resulted in the inhibition of the tested bacteria [50].

In our work, for the cultivation of *H. halophila*, all hydrolysates were diluted into the concentration of 20 g/L of total sugars. However, SCG hydrolysates were too toxic and entirely inhibited the growth of *H. halophila*. Therefore, all SCG hydrolysates were detoxified through the adsorption on non-polar styrene-divinylbenzene based resins (Amberlite XAD4). XAD4 is non-ionic crosslinked polymer, which adsorptive properties are connected with its macroreticular structure, high surface area and the aromatic nature of its surface. XAD4 have a capacity for the adsorption of organic substances from aqueous systems.

The effectiveness of the applied detoxification was evaluated with the determination of UV spectroscopy profile, browning, the content of

Table 3

Production of PHB and molecular weight properties of produced PHB.

Sample	<sup>a</sup> CDM (g/L)	PHB/CDM (wt.%)	PHB (g/L)	M <sub>w</sub> (kDa)	D <sub>90</sub>
SCGH # 1D	2.14 ± 0.1	13.3 ± 0.5	0.28 ± 0.08	825 ± 8	1.26 ± 0.12
SCGH # 2D	3.52 ± 0.3	27.0 ± 1.2	0.95 ± 0.09	815 ± 12	1.09 ± 0.02
SCGH # 3D	2.18 ± 0.1	15.9 ± 0.5	0.35 ± 0.07	440 ± 2	1.44 ± 0.03

<sup>a</sup> Cell dry mass (biomass).

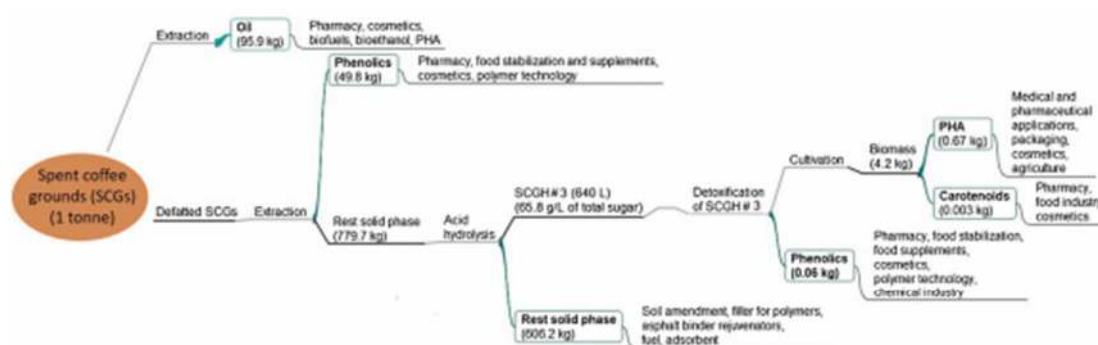


Fig. 3. Biorefinery concept for producing of PHB by using hydrolysate SCGH # 3 generated from 1 tonne of spent coffee grounds.

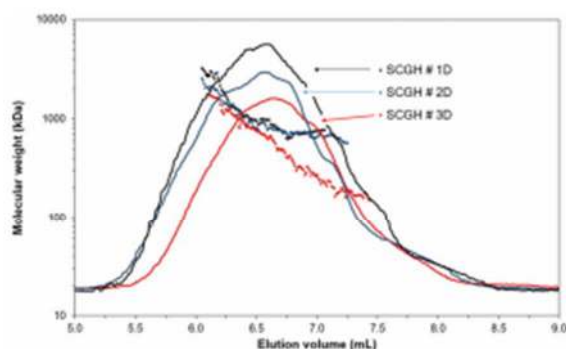


Fig. 4. Molar mass vs. elution volume curves and SEC-MALS chromatograms of SCGH # 1D, SCGH # 2D, and SCGH # 3D.

phenolics and flavonoids. UV–vis spectroscopy from 250 to 700 nm has been used to characterize water solutions of SCG hydrolysates with a sugar concentration of 20 g/L. SCGH showed different UV–vis spectra before detoxification compared to those after detoxification. The original SCG hydrolysates were dark brown, but after detoxification, their color was different and much lighter. Table 2 shows the extent of browning measured by the UV absorbance at 420 nm. The coffee beans receive the extensive brown color after roasting due to the presence of polymeric melanoidins [35]. The intensity of brown color between prepared SCG hydrolysates differs in dependence on the applied processing method (see Fig. 1). The most intense brown color shows SCGH # 2. It may be supposed that after extraction of oil, the higher concentration of phenolic compounds was unloaded into hydrolysate together with carbohydrates. The lowest intensity in brown color shows SCGH # 3, where the amount of phenolics presented in SCGs has been initially decreased with ethanol: water extraction in Soxhlet extractor. All hydrolysates after detoxification showed a significant decrease in browning. According to the determined UV spectra and determination of total phenolics and flavonoids, the XAD4 nonionic macroreticular resins trapped the major of melanoidins and phenolics. SCG hydrolysates before and after detoxification showed the main differences in the UV spectra in the range of 300 to 350 nm, where the non-detoxified hydrolysates showed a small peak tail, which disappeared after detoxification. Fig. 2 shows an example of UV spectra of SCGH # 3 before and after detoxification. The existence of the small peak tail in the UV spectrum in the area of 300–350 nm was similarly reported in the extract of roasted coffee by Liu et al. [40]. On the other side, the extract of non-roasted coffee beans did not indicate the tail peak. The differences in chemical structure between non-roasted coffee beans and roasted coffee extracts have been explained by the presence of Maillard reaction

products (MRPs), which have arisen during roasting of coffee beans [40].

The coffee beverage, as well as SCGs, are known having high antioxidant activity. The antioxidant activity of the trapped phenolics and melanoidins (adsorbed on XAD4) was determined by the DPPH radical scavenging assay and  $IC_{50}$  values. The ethanol/water (50:50) solution of phenolics (2 g/L) reached the  $IC_{50}$  value of  $121.7 \pm 0.9 \mu\text{g/mL}$ . The determined value of the radical scavenging activity indicates the high potential of coffee phenolics mixed with melanoidins as antioxidative agents for cosmetic, food and pharmaceutical products.

### 3.2. Production of PHB and co-products in the context of biorefinery

*H. halophila* was cultivated in media with various detoxified SCG hydrolysates (total sugar content was 20 g/L) for 72 h. Our previous studies (results are not enclosed) showed that this cultivation time was optimal for the production of PHB. Unlike in non-detoxified SCG hydrolysates, bacterial culture was capable of utilization of detoxified hydrolysates. Since the inclusion of detoxification step removes polyphenols and melanoidins predominantly, our results indicate that these substances were the primary inhibitory substances in SCG hydrolysates. The titers of biomass and PHB are shown in Table 3. The highest production of biomass and PHB was obtained by using SCGH # 2D. However, if the PHB production from SCG hydrolysates is judged from the view of the biorefinery concept (see Fig. 3), also the methodology used for the SCGH # 3D is exciting for the aim to achieve the economic efficiency and sustainable utilization of spent coffee grounds. Oil extracted from SCGs before hydrolysis can be used in numerous high-value applications. There are reports that oil extracted from SCGs can be used as platform chemical for biodiesel production [51], substrate for biotechnological production of PHA [52] or it can be used in cosmetics as active substance in the new cosmetic formulation with improved skin sebum and hydration properties [53] or UVB absorbent in sunscreens [54]. Solids after oil extraction can be subjected to hydrolysis as reported in this work. Liquid stemming from hydrolysis can be detoxified using Amberlite XAD4, and such treated hydrolysates can be used for PHB production employing *H. halophila*. The solvent received after Amberlite XAD4 regeneration reveals high antioxidant activity caused by the presence of polyphenols and melanoidins. Therefore, these solvents can be used in numerous high-value applications. Finally, residual solids after SCG hydrolysis can be used for soil amendments, asphalt binders, adsorbents, etc., (see Fig. 3).

The structure of the biosynthesized polymers, identified by gas chromatography, revealed only the accumulation of PHB without any 3-hydroxyvalerate (3HV) formation. The weight average molecular weight ( $M_w$ ) found for PHB produced by *H. halophila* was 825 kDa for the setup SCGH # 1D, 815 kDa for the setup SCGH # 2D, and 440 kDa for the setup SCGH # 3D. SEC-MALS chromatograms of PHB dissolved

in chloroform are shown in Fig. 4. The determined polydispersity indexes ( $D_w$ ) were in the range of 1.09–1.44 (see Table 3), exhibiting a highly uniform length of the intracellular polymer chains. The variation in molecular weight properties of PHB demonstrates the influence of the composition of the used SCG hydrolysates on the structural rearrangement of PHB during biosynthesis. The determined molecular weight properties of PHB derived from the detoxified SCG hydrolysates show that the polymers are comparable to commercially available PHB [55].

#### 4. Conclusions

It was shown that by the application of the extreme conditions during acid hydrolysis of spent coffee grounds, it is possible to obtain the high content of total sugar in SCG hydrolysate. However, the release of carbohydrates into hydrolysate is accompanying with the co-contamination with phenolics, melanoidins, and sugar degradation products. The high content of these co-contaminants stopped the cultivation of the halophilic bacterium *Halomonas halophila*. The detoxification of SCG hydrolysates with polymeric non-ionic exchanger (Amberlite XAD4) enabled the cultivation of *Halomonas halophila*, which successfully accumulated PHB. Detoxified spent coffee ground hydrolysates were used as the carbon substrate. Besides PHB, further co-products can be produced from the coffee spent grounds in a cascading way.

#### Acknowledgements

This work was funded through the project SoMoPro (project No. 6SA18032). This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme under the Marie Skłodowska-Curie, and it is co-financed by the South Moravian Region under grant agreement No. 665860. This work was also supported through the project "Materials Research Centre at FCH BUT—Sustainability and Development" Nr. LO1211 of the Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech Republic.

Note: Authors confirm that the content of this work reflects only the author's view and that the EU is not responsible for any use that may be made of the information it contains.


#### References

- J. Draper, J. Du, D.O. Hooks, J.W. Lee, N. Parlani, B.H.A. Rehm, Polyhydroxyalkanoate inclusions: polymer synthesis, self-assembly and display technology, in: B. Rehm (Ed.), *Bionanotechnology: Biological Self-assembly and Its Applications*, Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2013, pp. 1–36.
- T.G. Volova, *Polyhydroxyalkanoates—plastic Materials of the 21st Century: Production, Properties, Applications*, Nova Science Publishers, 2004.
- M. Miller, J. Barber, R. Whitehouse, *PHA-based Polymers: Materials for the 21st Century*, Rapra Technology Ltd., 2004, pp. 221–231.
- <https://www.prnewswire.com>, Global Polypropylene (PP) Market Report 2017: \$100+ Billion Market Size, Demand Forecasts, Industry Trends and Updates 2016–2022 – Research and Markets, Research and Markets, May 30, 2017 (Accessed 16 April 2018).
- D.P. Martin, S. Rizk, J.I. Montcrieff, D.W. Connelly, *Coatings for the Manufacture and Application of Polyhydroxyalkanoate Medical Devices*, Tephra, Inc., USA, 2011, p. 44.
- I. Ali, N. Jamil, Polyhydroxyalkanoates current applications in the medical field, *Front. Biol.* 11 (1) (2016) 19–27.
- A.M. Nair, K. Karthik, K.S.G.A. Kumaran, S.G. Simco, A. Thomas, S. Kuppusamy, Application of polyhydroxyalkanoates as a novel tablet disintegrator in fast dissolving tablets and acute toxicity studies, *Res. Rev. BioSci.* 8 (3) (2014) 117–124.
- P. Keunus, T. Rakkarn, T. Yunu, N. Paichid, P. Prasertsan, K. Sangkharak, The production of polyhydroxybutyrate by two-step fermentation and the application of polyhydroxybutyrate as a novel substrate for a biolubricant, *J. Polym. Environ.* 26 (6) (2018) 2459–2466.
- J.A. Ramsay, M.-C.A. Hassan, B.A. Ramsay, Hemicellulose as a potential substrate for production of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates), *Can. J. Microb.* 41 (13) (1995) 262–266.
- T.M. Keenan, J.P. Nakas, S.W. Tanenbaum, Polyhydroxyalkanoate copolymers from forest biomass, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33 (7) (2006) 616–626.
- N.V. Ramadas, S.K. Singh, C.R. Soccol, A. Pandey, Polyhydroxybutyrate production using agro-industrial residue as substrate by *Bacillus sphaericus* NCM 5149, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 52 (1) (2009) 17–23.
- M. Koller, R. Bona, G. Brauneegg, C. Hermann, P. Horvat, M. Kroutil, J. Martinz, J. Neto, L. Pereira, P. Varila, Production of polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and surplus materials, *Biomacromolecules* 6 (2) (2005) 561–565.
- Y. Dahman, C.U. Ugwu, Production of green biodegradable plastics of poly(3-hydroxybutyrate) from renewable resources of agricultural residues, *Bioprocess Biotechnol. Eng.* 37 (8) (2014) 1561–1568.
- L.F. Silva, M.K. Taciro, M.E. Michelin Ramos, J.M. Carter, J.G.C. Pradella, J.G.C. Gomez, Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31 (6) (2004) 245–254.
- R. Maiorella, H.W. Blanch, C.R. Wilke, By-product inhibition effects on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Bioeng.* 25 (1) (1983) 103–121.
- L.S. Chung, Y.Y. Lee, Ethanol fermentation of crude acid hydrolyzate of cellulose using high-level yeast inocula, *Biotechnol. Bioeng.* 27 (3) (1985) 308–315.
- J.C. Parajo, M. Dominguez, J.M. Dominguez, Improved xylitol production with *Debaryomyces hansenii* Y.7426 from raw or detoxified wood hydrolysates, *Enzyme Microb. Technol.* 21 (1) (1997) 18–24.
- L.R. Jarboe, L.A. Royce, P. Liu, Understanding biocatalyst inhibition by carboxylic acids, *Front. Microbiol.* 4 (2013) 272.
- B. Weigert, C. Klein, M. Rizzi, C. Lauterbach, H. Dellweg, Xylose fermentation by yeasts. 8. Influence of furfural on the aerobic growth of the yeast *Pichia stipitis*, *Biotechnol. Lett.* 10 (12) (1988) 895–900.
- L.S. Horvath, C.J. Franzén, M.J. Taherzadeh, C. Niklasson, G. Lidén, Effects of furfural on the respiratory metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in glucose-limited chemostats, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (7) (2003) 4076–4086.
- E. Palmqvist, J.S. Almeida, B. Hahn-Hägerdal, Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture, *Biotechnol. Bioeng.* 62 (4) (1999) 447–454.
- L. Olsson, B. Hahn-Hägerdal, Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production, *Enzyme Microb. Technol.* 18 (5) (1996) 312–331.
- A.G.W. Bradbury, D.J. Halliday, Chemical structures of green coffee bean polysaccharides, *J. Agric. Food Chem.* 38 (2) (1990) 389–392.
- R. Campos-Vega, G. Loarca-Piña, H.A. Vergara-Castañeda, B.D. Oomah, Spent coffee grounds: a review on current research and future prospects, *Trends Food Sci. Technol.* 45 (1) (2015) 24–36.
- T. Tian, S. Freeman, M. Corey, J.R. German, D. Barile, Chemical characterization of potentially prebiotic oligosaccharides in brewed coffee and spent coffee grounds, *J. Agric. Food Chem.* 65 (13) (2017) 2784–2792.
- R. Davis, R. Kataria, F. Cerrone, T. Woods, S. Kenny, A. O'Donovan, M. Guzik, H. Shaikh, G. Duane, V.K. Gupta, M.G. Tuohy, R.B. Padamatti, E. Casey, K.E. O'Connor, Conversion of grass biomass into fermentable sugars and its utilization for medium chain length polyhydroxyalkanoate (mcl-PHA) production by *Pseudomonas* strains, *Bioresour. Technol.* 150 (2013) 202–209.
- M. Anjali, C. Sukumar, A. Kanakalakshmi, K. Shanthi, Enhancement of growth and production of polyhydroxyalkanoates by *Bacillus subtilis* from agro-industrial waste as carbon substrates, *Compos. Interfaces* 21 (2) (2014) 111–119.
- R. Sindhu, N. Silviya, P. Binod, A. Pandey, Pentose-rich hydrolysate from acid pretreated rice straw as a carbon source for the production of poly-3-hydroxybutyrate, *Biochem. Eng. J.* 78 (Supplement C) (2013) 67–72.
- S. Obruca, P. Benesova, S. Petrík, J. Oborna, R. Příkrýl, I. Marova, Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolysate of spent coffee grounds, *Process Biochem. (Oxf., U. K.)* 49 (9) (2014) 1409–1414.
- T. Bowers, A. Vaidya, D.A. Smith, G. Lloyd-Jones, Softwood hydrolysate as a carbon source for polyhydroxyalkanoate production, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 89 (7) (2014) 1030–1037.
- M.T. Cesário, R.S. Raposo, M.C.M.D. de Almeida, F. van Keulen, B.S. Ferreira, M.M.R. da Fonseca, Enhanced bioproduction of poly-3-hydroxybutyrate from wheat straw lignocellulosic hydrolysates, *New Biotechnol.* 31 (1) (2014) 104–113.
- D. Kucera, I. Pernicova, A. Kovalčík, M. Koller, L. Müllerová, P. Sedláček, F. Mravec, J. Nebesarova, M. Kalina, I. Marova, V. Krzyzaneck, S. Obruca, Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*, *Bioresour. Technol.* 256 (2018) 552–556.
- K.S. Andrade, R.T. Gonçalves, M. Maraschin, R.M. Ribeiro-do-Valle, J. Martinez, S.R.S. Ferreira, Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husk: antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition, *Talanta* 88 (Supplement C) (2012) 544–552.
- D.M. López-Barrera, K. Vázquez-Sánchez, M.G.F. Loarca-Piña, R. Campos-Vega, Spent coffee grounds, an innovative source of colonic fermentable compounds, inhibit inflammatory mediators in vitro, *Food Chem.* 212 (Supplement C) (2016) 282–290.
- R.C. Borrelli, A. Visconti, C. Mennella, M. Anese, V. Fogliano, Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins, *J. Agric. Food Chem.* 50 (22) (2002) 6527–6533.
- H.-Y. Wang, H. Qian, W.-R. Yao, Melanoidins produced by the Maillard reaction: structure and biological activity, *Food Chem.* 128 (3) (2011) 573–584.
- H.-M.D. Wang, Y.-S. Cheng, C.-H. Huang, C.-W. Huang, Optimization of high solids dilute acid hydrolysis of spent coffee ground at mild temperature for enzymatic saccharification and microbial oil fermentation, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 180 (4) (2016) 753–765.
- J.M. Lynch, D.M. Barbano, Kjeldahl nitrogen analysis as a reference method for protein, *J. AOAC Int.* 82 (6) (1999) 1389–1398.
- L.P. Eksperianova, O.I. Fedorov, N.A. Stepanenko, Estimation of metrological characteristics of the element analyzer EuroVector EA-3000 and its potential in the single-reactor CHNS mode, *Microchem. J.* 99 (2011) 235–238.
- Y. Liu, D.D. Kitts, Confirmation that the Maillard reaction is the principle

- contributor to the antioxidant capacity of coffee brews, *Food Res. Int.* 44 (8) (2011) 2418–2424.
- [41] V.L. Singleton, J.A. Rossi, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *Am. J. Enol. Viticult.* 16 (1965) 145–158.
- [42] V. Dewanto, X. Wu, K.K. Adom, K.H. Liu, Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity, *J. Agric. Food Chem.* 50 (10) (2002) 3010–3014.
- [43] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Food sci. Technol. (London)* 28 (1) (1995) 25–30.
- [44] T. Siatka, M. Kasparova, Seasonal variation in total phenolic and flavonoid contents and DPPH scavenging activity of *Bellis perennis* L. flowers, *Molecules* 15 (2010) 9450–9461.
- [45] H. Brandl, R.A. Gross, R.W. Lenz, R.C. Fuller, *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters, *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (8) (1988) 1977–1982.
- [46] M. Koller, A. Salerno, K. Strohmeier, S. Schober, M. Mittelbach, V. Illieva, E. Chiellini, G. Braunegg, Novel precursors for production of 3-hydroxyvalerate-containing poly[(10-hydroxyalkanoates)], *biocatal. biotransform.* 32 (3) (2014) 161–167.
- [47] T. Koshijima, T. Watanabe, *Association Between Lignin and Carbohydrates in Wood and Other Plant Tissues*, Springer, Berlin Heidelberg, 2013.
- [48] W. Pan, J.A. Perrotta, A.J. Stipanovic, C.T. Noemura, J.P. Nakas, Production of polyhydroxyalkanoates by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759 using a detoxified sugar maple hemicellulosic hydrolysate, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39 (3) (2012) 459–469.
- [49] M.S.G. Lopes, J.G.C. Gomez, M.K. Taciro, T.T. Mendonca, L.F. Silva, Polyhydroxyalkanoate biosynthesis and simultaneous removal of organic inhibitors from sugarcane bagasse hydrolysate by *Burkholderia* sp., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41 (9) (2014) 1353–1363.
- [50] M. Koller, M.M. de Sousa Dias, A. Rodriguez-Contreras, M. Kunaver, E. Žagar, A. Kržan, G. Braunegg, Bio-mediated incorporation of (R)-3-hydroxyvalerate into polyhydroxyalkanoates, *Materials* 8 (2015) 6543–6557.
- [51] D.I. Yordanov, Z.B. Tsonev, T.V. Palichev, Z.A. Mustafa, A new approach for production of coffee oil from waste coffee residue as a feedstock for biodiesel, *Pet. Coal* 55 (2) (2013) 74–81.
- [52] S. Obruca, S. Petrik, P. Benesova, Z. Svoboda, L. Eremka, I. Marova, Utilization of oil extracted from spent coffee grounds for sustainable production of polyhydroxyalkanoates, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98 (13) (2014) 5883–5890.
- [53] H. Ribeiro, J. Marto, S. Raposo, M. Agapito, V. Isaac, B.G. Chiari, P.F. Lisboa, A. Paiva, S. Barreiros, P. Simoes, From coffee industry waste materials to skin-friendly products with improved skin fat levels, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 115 (3) (2013) 330–336.
- [54] J. Marto, L.F. Gouveia, B.G. Chiari, A. Paiva, V. Isaac, P. Pinto, P. Simoes, A.J. Almeida, H.M. Ribeiro, The green generation of sunscreens: using coffee industrial sub-products, *Ind. Crops Prod.* 80 (2016) 93–100.
- [55] R. Hufenus, F.A. Reifler, M.P. Fernandez-Ronco, M. Heuberger, Molecular orientation in melt-spun poly(3-hydroxybutyrate) fibers: effect of additives, drawing and stress-annealing, *Eur. Polym. J.* 71 (2015) 12–26.

Article

## Biotechnological Production of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-4-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) Terpolymer by *Cupriavidus* sp. DSM 19379

Dan Kucera <sup>1,2</sup> , Ivana Novackova <sup>1</sup>, Iva Pernicova <sup>1,2</sup>, Petr Sedlacek <sup>2</sup> and Stanislav Obruca <sup>1,2,\*</sup><sup>1</sup> Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkynova 118, 612 00 Brno, Czech Republic<sup>2</sup> Material Research Centre, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkynova 118, 612 00 Brno, Czech Republic

\* Correspondence: obruca@fch.vut.cz; Tel.: +420-541-149-486

Received: 19 July 2019; Accepted: 20 August 2019; Published: 26 August 2019



**Abstract:** The terpolymer of 3-hydroxybutyrate (3HB), 3-hydroxyvalerate (3HV), and 4-hydroxybutyrate (4HB) was produced employing *Cupriavidus* sp. DSM 19379. Growth in the presence of  $\gamma$ -butyrolactone,  $\epsilon$ -caprolactone, 1,4-butanediol, and 1,6-hexanediol resulted in the synthesis of a polymer consisting of 3HB and 4HB monomers. Single and two-stage terpolymer production strategies were utilized to incorporate the 3HV subunit into the polymer structure. At the single-stage cultivation mode,  $\gamma$ -butyrolactone or 1,4-butanediol served as the primary substrate and propionic and valeric acid as the precursor of 3HV. In the two-stage production, glycerol was used in the growth phase, and precursors for the formation of the terpolymer in combination with the nitrogen limitation in the medium were used in the second phase. The aim of this work was to maximize the Polyhydroxyalkanoates (PHA) yields with a high proportion of 3HV and 4HB using different culture strategies. The obtained polymers contained 0–29 mol% of 3HV and 16–32 mol% of 4HB. Selected polymers were subjected to a material properties analysis such as differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry, and size exclusion chromatography coupled with multi angle light scattering (SEC-MALS) for determination of the molecular weight. The number of polymers in the biomass, as well as the monomer composition of the polymer were determined by gas chromatography.

**Keywords:** polyhydroxyalkanoates; terpolymer; P(3HB-co-3HV-co-4HB); *Cupriavidus malaysiensis*

### 1. Introduction

Polyhydroxyalkanoates (PHA) represent a very attractive family of materials which are considered as an alternative to petrochemical polymers in applications which may benefit from their fully biodegradable and biocompatible nature. PHA are produced via fermentation since they are biosynthesized by numerous prokaryotes in the form of intracellular granules primarily as storage of carbon and energy [1]. Nevertheless, according to recent findings, PHA also plays a crucial role in the stress robustness and resistance of bacterial cells against various stress factors [2,3].

PHA are disadvantaged in competition with petrochemical polymers by their high-production cost. Since a substantial amount of the final cost is attributed to the cost of the carbon substrate, there are many attempts to produce PHA from inexpensive or even waste products in the food industry [4] such as waste lipids [5,6], crude glycerol formed as a side product of biodiesel production [7,8], various lignocellulose materials [9], or even carbon dioxide [10,11].

In general, the material properties of PHA strongly depend upon monomer composition. The homopolymer of 3-hydroxybutyrate (3HB), poly(3-hydroxybutyrate) (P3HB) is the most studied member of the PHA family, as it possesses numerous desirable properties. It is very interesting that the material in the native intracellular granules is completely amorphous and demonstrates extraordinary properties resembling super-cooled liquid [12]; nevertheless, when extracted from bacterial biomass, it quickly crystallizes. Therefore, its application potential is limited mainly by its high crystallinity, which reduces flexibility and elongation of the material. Nevertheless, the properties of the materials could be tuned when other monomer structures are incorporated into the polymer chain by feeding microbial culture with a suitable precursor(s). Therefore, copolymers containing, aside from 3HB, 3-hydroxyvalerate (3HV) subunits could be gained when microbial culture is cultivated in the presence of a suitable precursor with an odd number of carbon atoms such as propanol, propionate, pentanol, valerate, etc. The resulting copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (P[3HB-co-3HV]) reveals substantially improved material properties and decreased crystallinity [13]. Similarly, some bacterial strains exposed to 1,4-butanediol or  $\gamma$ -butyrolactone (GBL) are able to biosynthesize copolymers containing 3HB and 4-hydroxybutyrate (4HB) monomer units. The copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) (P[3HB-co-4HB]) reveals mechanical properties, which resemble thermoplastic elastomers [14]. Moreover, PHA possessing 4HB subunits demonstrate increased biodegradability because lipases, which with PHA depolymerases, also have the ability to degrade P(3HB-co-4HB) [15], show higher activity at a higher fraction of 4HB [16]. Therefore, they find numerous high-value applications in the medical field [17]. Of course, terpolymer P(3HB-co-3HV-co-4HB) containing all of the above-mentioned monomer subunits demonstrate even superior properties and could be used in numerous fields and applications [18].

There are several reports dealing with the production of P(3HB-co-3HV-co-4HB) terpolymers employing various microorganisms. *Cupriavidus necator* (formerly *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha* and *Wautersia eutropha*) was capable of desirable terpolymer production when cultivated on GBL and propionate; it was observed that propionate served not only as a 3HV precursor but it also increased the efficiency of 4HB incorporation into the terpolymer chain [19]. Similarly, Cavalheiro et al. produced P(3HB-co-3HV-co-4HB) by *Cupriavidus necator* using crude glycerol as the main carbon source, GBL as the 4HB precursor, and the 3HV-related precursor compound propionic acid [20]. Also, *Haloferax mediterranei* could be employed for the production of the terpolyester poly(3HB-co-3HV-co-4HB) without the need for a specific 3HV precursor which is based on the extraordinary metabolism of this microorganism, since it is capable of 3HV production from structurally unrelated carbon sources such as sugars or glycerol [21]. Finally, Ramachandran et al. used *Cupriavidus* sp. USMAA2-4 (now designated as *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379) for the terpolymer production from oleic acid and various 4HB and 3HV precursors [22].

In this work, we attempted to develop an efficient process of P(3HB-co-3HV-co-4HB) production employing *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379. We aimed at the maximization of both PHA yields, as well as 3HV and 4HB monomer fractions in the polymer to achieve desired material properties of the produced materials. Various culture strategies were used for this purpose.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Microorganisms and Cultivation

*Cupriavidus malaysiensis* USMAA2-4 (DSM 19379) was purchased from Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures, Braunschweig, Germany. The nutrient broth (Himedia—10 g/L Peptone, 10 g/L Beef Extract, 5 g/L NaCl) (NB) medium was used for the inoculum development. The mineral salt medium (MSM) for cultivation was composed of 3 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1.02 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 11.1 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ , 0.2 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , and 1 mL/L of microelement solution, the composition of which was as follows: 9.7 g/L  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 7.8 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 0.156 g/L  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ , 0.119 g/L  $\text{CoCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 0.118 g/L  $\text{NiCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ , and 1 L

0.1 M HCl. The following carbon sources were used to prepare the production media: GBL (8 g/L) (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany);  $\epsilon$ -caprolactone (8 g/L) (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany); 1,4-butanediol (8 g/L) (Sigma Aldrich, Schnellendorf, Germany); 1,6-hexanediol (8 g/L) (Sigma Aldrich, Schnellendorf, Germany); fructose (20 g/L); glucose (20 g/L); sunflower oil (20 g/L); glycerol p.a. (20 g/L) (Lach-ner, Neratovice, Czechia). Carbon sources, salt solutions, and microelement solutions were autoclaved separately (121 °C, 20 min) and then aseptically reconstituted at room temperature prior to the inoculation (inoculum ratio was 10 vol%). The cultivations were performed in Erlenmeyer flasks (volume 250 mL) containing 100 mL of MSM. The temperature was set at 30 °C, the agitation at 180 rpm. The cells were harvested after 72 h of cultivation as described in Section 2.2. For a successful centrifugation process, the medium was heated to 70 °C for 15 min.

### 2.1.1. Single-Stage Cultivation Mode

GBL or 1,4-butanediol were used to prepare the production media in the same way as described in Section 2.1. Propionic acid (Sigma Aldrich, Schnellendorf, Germany) and valeric acid (Sigma Aldrich, Schnellendorf, Germany) as 3HV precursors were added at a concentration 1 g/L to media after 24 h of cultivation to minimize their toxic effect on growth of the microbial culture. After another 48 h of cultivation, the cells were harvested. The total length of the cultivation was 72 h. As a control, we chose to cultivate without adding any of the precursors of 3HV.

### 2.1.2. Two-Stage Cultivation Mode

Glycerol (20 g/L) or combination of glycerol and 1,4-butanediol (12 and 8 g/L, respectively) were used to prepare the production media based on MSM. After 48 h of cultivation (30 °C, 180 rpm), biomass was separated by centrifugation (6000 rpm, 4 °C) and aseptically transferred to fresh MSM with 0.1 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 8 g/L 1,4-butanediol and 1 g/L valeric acid. Cultivation without valeric acid served as a control. The cells were harvested after another 48 h of cultivation (30 °C, 180 rpm).

## 2.2. Determination of the CDM and PHA Content

To determine the biomass concentration and PHA content in cells, samples (10 mL) were centrifuged (6000 rpm) and then the cells were washed with distilled water. The biomass concentration expressed as cell dry mass (CDM) was analyzed as reported previously [23]. The PHA content of dried cells was analyzed by gas chromatography (GC) (Trace GC Ultra, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) as reported by Brandl et al. [24]. Commercially available P(3HB-co-3HV) (Sigma Aldrich, Schnellendorf, Germany) composed of 88 mol% 3HB and 12 mol% 3HV were used as a standard and benzoic acid (LachNer, Neratovice, Czechia) was used as an internal standard. In addition to the quantification of total PHA in biomass, GC was also used to determine the monomeric composition and to determine the molar content of individual monomers in the obtained polymers.

## 2.3. Polymer Characterization

Following four polymers obtained by *Cupriavidus malaysiensis*, USMAA2-4 (DSM 19379) using different substrates and cultivation strategies were selected due to various 4HB content for polymer characterization: Sample 1—single-stage, fructose (20 g/L); Sample 2—single-stage, 1,4-butanediol + valeric acid; Sample 3—single-stage, 1,4-butanediol + propionic acid; Sample 4—two-stage, glycerol (20 g/L), and then 1,4-butanediol + valeric acid.

To determine the molecular weight of PHA, approximately 20 mg CDM was washed in 5 mL chloroform at 70 °C for 24 h under continuous stirring. Solid residues were separated by filtration and, finally, the solvent was removed by evaporation at 70 °C to a constant weight. The obtained polymer was also used for DSC analysis. After that, 5 mg of the polymer was solubilized in 1 mL of HPLC-grade chloroform and passed through syringe filters (nylon membrane, pore size 0.45  $\mu\text{m}$ ). Samples were analyzed by gel Size Exclusion Chromatography (Agilent, Infinity 1260 system containing PLgel MIXED-C column) coupled with Multiangle Light Scattering (Wyatt Technology, Dawn Heleos

II, Goleta, CA, USA) and Differential Refractive Index (Wyatt Technology, Optilab T-rEX, Goleta, CA, USA) detection [24]. The weight-average molecular weight ( $M_w$ ) and polydispersity index ( $\mathcal{D}$ ) were determined using the ASTRA software (Wyatt Technology, Goleta, CA, USA) based on Zimm's equations.

Melting behavior of the isolated PHA polymers was analyzed by means of a differential scanning calorimeter (DSC) Q2000 (TA Instruments, New Castle, DE, USA) equipped with an RCS90 cooling accessory as previously described by Kucera et al. [25]. Phase transitions of mercury and indium were used for the calibration in the applied temperature range. Approximately 5 mg of sample was placed in hermetically sealed Tzero aluminum pans, and the measurement was carried out under a dynamic nitrogen atmosphere. To ensure the same thermal history of all samples prior to the evaluation of their melting behavior, each sample was first heated at 10 °C/min to 190 °C and subsequently cooled down to -30 °C at the same cooling rate. Then the sample was heated again (10 °C/min to 200 °C) and the thermogram, recorded in this second heating step, was further evaluated.

Thermogravimetric analysis of the isolated polymers was performed on Q5000 TGA analyzer (TA Instruments, New Castle, DE, USA). During the analysis, a known weight of a sample (ca 5 mg) was heated at 10 °C/min to 800 °C under oxidative atmosphere (air). The major decomposition step, characterized by a rapid fall in the sample weight in the temperature range 250 °C to 350 °C, was further processed using TGA data evaluation software Universal Analysis 2000 (TA Instruments, New Castle, DE, USA). The automated evaluation of the weight change provided two characteristic temperatures of the degradation step: onset temperature of the thermal decomposition ( $T_{d_{onset}}$ ) and temperature corresponding to the maximal rate of the weight change ( $T_{d_{max}}$ ).

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Biosynthesis of P(3HB-co-4HB) Copolymer

*Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379 was employed to produce polyhydroxyalkanoates (PHA) using different carbon sources. This bacterium was isolated from water samples collected from Sg. Pinang river, Penang, Malaysia based on its ability to produce various types of PHA, including copolymers containing 4HB [26]. According to our results shown in Table 1, P3HB or P(3HB-co-4HB) were produced according to the type of the substrate. The bacterial strain was capable to produce copolymer P(3HB-co-4HB) only in the presence of precursors structurally related to 4HB such as GBL, 1,4-butanediol,  $\epsilon$ -caprolactone, or 1,6-hexanediol e.g., diols and carboxylic acids possessing hydroxy group at last carbon atom which is agreement with results of Rahayu et al. [27] The highest PHA titers were achieved when four-carbon precursors of 4HB such as 1,4-butanediol or GBL were used. When such a structural motif was lacking, the strain accumulated homopolymer consisting exclusively of 3HB subunits. In the results, the strain appears to be unable to utilize oil because the CDM yield was low, and GC did not reveal PHA in the cell structure. There is a significant difference between utilization of fructose and glucose. While the yield of CDM and PHA with fructose was 10.78 g/L and 7.54 g/L, respectively, the yield with glucose was only 2.29 g/L CDM and 0.23 g/L PHA. This is not a very surprising result, also the closely related wild-type strain *Cupriavidus necator* H16 is not able to efficiently utilize glucose because it does not possess the activity of 6-phosphofructokinase [28]. *Cupriavidus malaysiensis* USMAA2-4 was also able to utilize glycerol reaching relatively high biomass titers; nevertheless, PHA production was the lowest among the substrates used which enabled PHA biosynthesis.



**Table 1.** Substrates for P3HB and P(3HB-co-4HB) production by *Cupriavidus* sp. DSM 19379.

Substrate	CDM (g/L)	PHA (wt%)	PHA (g/L)	4HB (mol%)	3HB (mol%)
fructose	10.78 ± 0.06	69.95 ± 0.42	7.54 ± 0.10	0	100
glucose	2.29 ± 0.06	10.03 ± 0.06	0.23 ± 0.02	0	100
glycerol	4.60 ± 0.04	5.30 ± 0.05	0.24 ± 0.02	0	100
sunflower oil	1.33 ± 0.05	0	0	0	0
GBL	4.50 ± 0.02	35.84 ± 0.92	1.61 ± 0.12	22.18 ± 1.06	77.82 ± 1.06
1,4-butanediol	4.01 ± 0.02	11.67 ± 0.06	0.47 ± 0.03	23.12 ± 1.61	76.88 ± 1.61
ε-caprolactone	0.22 ± 0.04	42.80 ± 0.61	0.10 ± 0.04	68.89 ± 1.12	31.11 ± 1.12
1,6-hexanediol	2.64 ± 0.01	39.83 ± 0.95	1.05 ± 0.07	34.35 ± 0.96	65.65 ± 0.96

### 3.2. Biosynthesis of P(3HB-co-3HV-co-4HB) Terpolymer through Single-Stage Cultivation

The following experiments were focused on the production of the terpolymer P(3HB-co-3HV-co-4HB). To obtain the desired material, 1,4-butanediol and GBL have been selected as carbon sources since the bacteria can utilize these substances for growth but also incorporate them into the copolymer P(3HB-co-4HB). Sodium propionate and valeric acid were tested in this experiment as odd carbon atom precursors for the synthesis of 3HV monomer incorporated into the terpolymer chain. Results of the single-stage terpolymer production including yields of CDM and PHA are shown in Table 2.

**Table 2.** Single stage terpolymer production (72 h cultivation, application of 3HV precursor at the 24 h of cultivation 1 g/L).

Primary Substrate	3HV Precursor	CDM (g/L)	PHA (g/L)	PHA (wt%)	3HB (mol%)	4HB (mol%)	3HV (mol%)
GBL	none	3.64 ± 0.03	0.81 ± 0.05	22.14 ± 0.01	68.40 ± 0.23	31.60 ± 0.23	0
	propionic acid	5.06 ± 0.37	0.62 ± 0.06	12.16 ± 0.00	69.18 ± 0.22	23.41 ± 0.05	7.41 ± 0.16
	valeric acid	7.97 ± 1.85	0.82 ± 0.09	10.41 ± 0.01	56.22 ± 0.32	25.85 ± 0.40	17.92 ± 0.07
1,4-butanediol	none	7.41 ± 0.51	1.05 ± 0.19	14.44 ± 0.02	68.97 ± 2.26	31.03 ± 2.26	0
	propionic acid	8.19 ± 0.35	1.65 ± 0.43	20.01 ± 0.04	63.81 ± 1.71	27.87 ± 0.10	8.32 ± 1.80
	valeric acid	8.68 ± 0.14	1.79 ± 0.88	20.52 ± 0.10	60.63 ± 2.90	24.72 ± 7.42	14.65 ± 4.53

In the resulting Table 2, CDM column shows that it generally achieved better growth using 1,4-butanediol as carbon sources than with GBL. Surprisingly, with the addition of the precursors for terpolymer synthesis, the CDM gain was higher. Valeric acid appears to be superior in the production of the P(3HB-co-4HB-co-3HV) terpolymer. With the addition of this precursor, significant growth was achieved with both GBL and 1,4-butanediol. The highest biomass concentration was obtained using 1,4-butanediol in combination with valeric acid, with a biomass yield of 8.68 g/L.

The highest PHA production was achieved in combination with valeric acid. The PHA yields were 0.82 g/L and 1.79 g/L for GBL and 1,4-butanediol, respectively. Thus, the combination of 1,4-butanediol with valeric acid again appears to be the best for production terpolymer in the single-stage strategy. Regarding the composition of the polymers obtained in this experiment, the terpolymer was synthesized using both precursors of 3HV. However, a higher 3HV fraction was obtained using valeric acid. In the case of propionate, generation of 3HV requires activity of 3-ketothiolase coupling propionyl-CoA and acetyl-CoA such as BktB in *C. necator* H16 [29]. On the contrary, conversion of valerate into 3HV could be relatively simply performed within the first “turn” of β-oxidation. It is likely that *Cupriavidus* DSM 19379 reveals relatively lower 3-ketothiolase activity as compared to the activity of the β-oxidation pathway, and therefore, valerate seems to be superior to the 3HV precursor for terpolymer synthesis as compared with propionate. In the case of terpolymer composition, the highest 3HV content was achieved using GBL together with valeric acid. The monomeric composition of the P(3HB-co-3HV-co-4HB) terpolymer was 56.22, 17.92, and 25.85 mol%, respectively. The polymer produced by *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379 using 1,4-butanediol in combination with valeric acid had almost the same composition. Nevertheless, it should be pointed out that the overall PHA

productivity gained in the single-stage process was relatively low. The PHA content was about 20 weight percent of CDM and gained PHA titers were, therefore, also low. Hence, we attempted to improve the productivity of the culture by employing the two-stage cultivation.

### 3.3. Biosynthesis of the P(3HB-co-3HV-co-4HB) Terpolymer through the Two-Stage Cultivation

To enhance PHA productivity, we performed an additional experiment in which cultivation was performed in two steps. In the first step, we aimed at a cultivation of maximal biomass using glycerol (20 g/L) as a cheap carbon source. According to our results, glycerol stimulates growth of the bacterium, but it is not converted into P(3HB) which could be taken as an advantage since the production of a desirable terpolymer with low 3HB fraction could be achieved in the second step. In addition, glycerol (12 g/L) was also mixed with 1,4-butanediol (8 g/L) in a parallel series of cultivations. The second stage was performed in the cultivation media with nitrogen limitation and 1,4-butanediol, and most importantly, 1,4-butanediol and valeric acids were used as 4HB and 3HV precursors, respectively. Valeric acid was chosen as the precursor of the 3HV since it was identified as the superior 3HV precursor for the investigated culture. The first phase of cultivation served to obtain a high amount of PHA-poor biomass. PHA production was then achieved by nitrogen limitation in the second phase. All results are shown in Table 3.

**Table 3.** Two-stage terpolymer production (48 h at glycerol or glycerol + 1,4-butanediol, after that transfer to nitrogen-limited medium with precursor of 3HV).

Primary Substrate	Secondary Precursor	CDM (g/L)	PHA (g/L)	PHA (wt%)	3HB (mol%)	4HB (mol%)	3HV (mol%)
Glycerol	1,4-butanediol	1.60 ± 0.03	0.84 ± 0.02	52.25 ± 0.12	80.85 ± 0.68	18.09 ± 0.26	1.06 ± 0.43
	1,4-butanediol + valeric acid	2.73 ± 0.58	1.42 ± 0.25	52.12 ± 1.76	53.78 ± 0.61	16.76 ± 0.87	29.46 ± 0.26
Glycerol + 1,4-butanediol	1,4-butanediol	3.26 ± 0.11	2.09 ± 0.01	64.14 ± 2.38	77.89 ± 0.53	21.60 ± 0.54	0.51 ± 0.01
	1,4-butanediol + valeric acid	5.94 ± 0.14	4.14 ± 0.05	69.64 ± 0.73	65.68 ± 1.02	16.46 ± 1.28	17.86 ± 0.26

From the results of this experiment shown above, it could be seen that the bacterial strain grew best when, in the first step, glycerol was used in combination with 1,4-butanediol and in the second one, 1,4-butanediol with valeric acid. The biomass gain was 5.94 g/L. Conversely, the smallest growth was achieved by cultivation using glycerol followed by 1,4-butanediol, where only 1.60 g/L CDM was obtained. CDM and PHA analysis was also performed on cultures after the first stage of the two-stage production. The assumption that at this stage a biomass with a low PHA content would be obtained, has been fulfilled. The glycerol-based medium reached 3.1 g/L CDM containing 5.3% PHB. Using a substrate containing 14-BD, we obtained 3.8 g/L CDM containing 24.0% P(3HB-co-4HB).

From the results, *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379 can efficiently synthesize the desired terpolymer P(3HB-co-3HV-co-4HB), PHA contents in bacterial cells are substantially higher when two-stage cultivation strategy was adopted. The highest weight fraction, 69.64 wt%, as well as the highest PHA gain, 4.14 g/L, was achieved when glycerol was used together with 1,4-butanediol in the first step and 1,4-butanediol with valeric acid in the second. Regarding polymer composition, good results were achieved when 1,4-butanediol was used in combination with valeric acid in the second step. When only glycerol was used in the first step, we obtained a terpolymer composed of 53.78 mol% 3HB, 16.76 mol% 4HB, and 29.46 mol% 3HV. Using glycerol together with 1,4-butanediol in the first step, a terpolymer composed of 3HB 65.68 mol%, 4HB 16.46 mol%, 3HV 17.86 mol% was subsequently obtained. It seems that a combination of glycerol and 1,4-butanediol in the first step of cultivation and 1,4-butanediol and valeric acid in the second stage of the cultivation is a very promising strategy which results in very high PHA titers and high PHA content in the cells and also high portions of 4HB and 3HV in the terpolymer structure.

### 3.4. Characteristics of Isolated Polymers

Differential scanning calorimetry and thermogravimetry were chosen to study the thermal properties of the polymers; size exclusion chromatography was used to determine molecular weight and polydispersity index of the polymers. The following samples of isolated polymers were selected for analysis. Sample No. 1 is a control polymer containing almost exclusively 3HB monomer units. Sample No. 2 was collected by cultivation using a combination of 1,4-butanediol and valeric acid; the proportion of 3-hydroxyvalerate in this sample is 14.65 mol%. Sample No. 3 was obtained from cultivation using 1,4-butanediol and sodium propionate, and the concentration of 3HV was 8.32 mol%. The last sample was isolated from a cell suspension-cultured to produce a terpolymer, using glycerol followed by 1,4-butanediol together with valeric acid. In this sample, the 3HV molar ratio was highest at all, namely 29.46 mol%. The results are placed in Table 4. From the thermograms recorded by differential scanning calorimetry, we determined glass transition temperature ( $T_g$ ) and melting point ( $T_m$ ). The total heat of fusion  $\Delta H$ , was also determined via integration of the melting endotherm. Using thermogravimetry, the degradation onset temperature ( $T_{d_{onset}}$ ) and the temperature that corresponds to the maximal rate of sample decomposition ( $T_{d_{max}}$ ) were determined.

**Table 4.** Properties of the selected materials.

Sample	3HB (mol%)	4HB (mol%)	3HV (mol%)	Mw (kDa)	D (-)	$T_g$ (°C)	$T_m$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)	$T_{d_{onset}}$ (°C)	$T_{d_{max}}$ (°C)
1	99.33	0.67	0	155.97	1.04	-	155.79 168.70	4.70 64.89	271.88	287.94
2	60.63	24.72	14.65	258.66	1.02	24.78	161.34	2.80	271.48	293.49
3	63.81	27.87	8.32	314.60	1.01	26.19	161.67	3.04	275.24	300.83
4	53.78	16.76	29.46	137.89	1.17	29.00	164.63	12.69	271.36	295.53

Comparison of DSC thermograms of the four isolated polymers is shown in Figure 1. In Sample No. 1, there is a sharp melting endotherm which appears at about 170 °C, which is typical of polyhydroxybutyrate. The peak area corresponds to the heat released in this process. The large area of the melting endotherm indicates a high tendency of the polymer to crystallize spontaneously which in turn causes no significant signs of glass transition and cold crystallization are found in its thermogram as compared to the other three analyzed samples. Further, the sample is characterized by a double peak at the melting point, indicating that the polymer crystallites are present in two forms with distinct thermal stability. On the other hand, for all the terpolymer samples (Samples 2–4), it can be seen at first sight that much less intensive melting peak is shown on the curves. Furthermore, apparent glass transition and cold crystallization of the polymer chains altogether indicates significantly reduced the tendency for spontaneous crystallization. In other words, involvement of an additional monomer to the copolymer structure resulted in a more amorphous structure. Incorporating 3HV into the polymer structure also caused a decrease in melting point to about 161 °C. Fahima Azira et al. [30] produced terpolymer P(3HB-co-3HV-co-4HB) and the melting points ranged from 160 to 164 °C.

The SEC-MALS technique was used to measure weight average molecular weight ( $M_w$ ) of obtained polymers and values ranged from 137 to 314 kDa. The highest value was measured for the sample with the highest molar ratio of 4HB and the lowest for the sample with the highest molar ratio of 3HV. The  $M_w$  values measured are typical for the bacterial strain used and consistent with other studies [22].

Thermogravimetric analysis was performed in order to compare the thermal stability of the produced polymers. In a respective thermogram, decomposition of a polymer is represented by the onset temperature of the decomposition (the temperature at which the polymer starts to decompose,  $T_{d_{onset}}$ ) and by the temperature which corresponds to the maximal rate of the decomposition ( $T_{d_{max}}$ ). Among the isolated P(3HB-co-3HV-co-4HB) terpolymer samples, the highest degradation temperature (i.e., the highest thermal stability of the polymer) was measured for Sample No. 3 composed of

63.81 mol% 3HB, 27.87 mol% 4HB, and 8.32 mol% 3HV. This is the sample with the lowest 3HV but the highest 4HB. This suggests that a higher proportion of 4HB in the terpolymer leads to the higher thermal stability of the polymer. Thus, sample 3 has the most promising properties from a technological point of view because its melting point was set at near lowest, 161.67 °C, and the degradation temperature to highest 300.83 °C. The wide temperature window between melting temperature and degradation temperature is important for polymer processing. When working with the melt, it is important that it does not decompose.

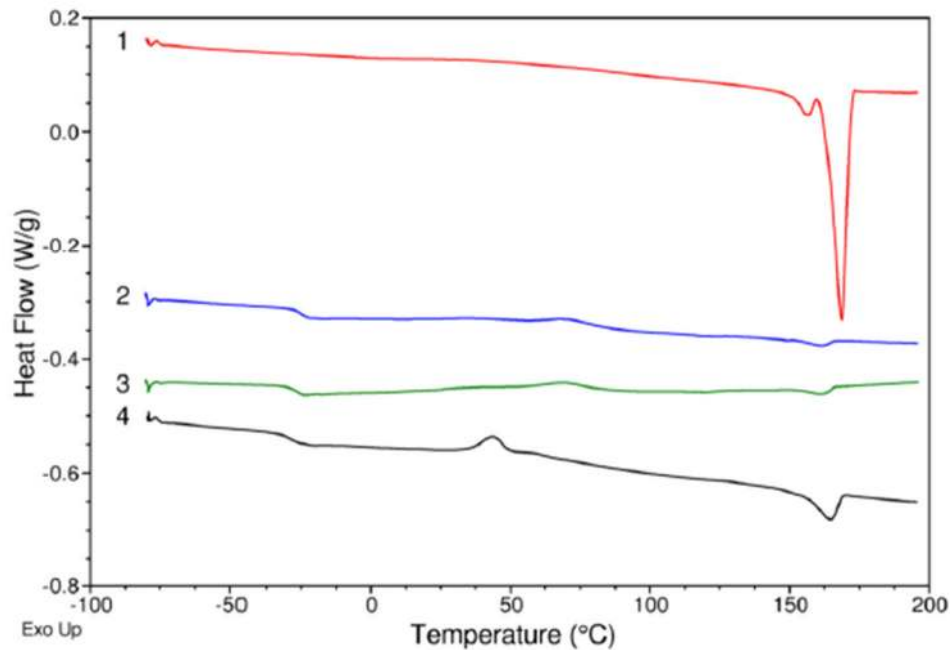


Figure 1. Results of DSC analysis of isolated polymers.

#### 4. Conclusions

To sum-up, in flask experiments, we have developed a two-stage cultivation strategy which is based on the application of glycerol and 1,4-butanediol as the carbon substrates in the first stage of cultivation, after that the cells are transferred into nitrogen-limited cultivation media with 1,4-butanediol and valeric acids. This cultivation strategy provides high PHA yields and PHA content in bacterial cells. Moreover, the P(3HB-co-3HV-co-4HB) terpolymer with low 3HB fraction and high 3HV and 4HB contents is obtained. The material properties of obtained polymers were consistent with materials produced in previous studies aimed at the production of P(3HB-co-3HV-co-4HB) terpolymers. In our future experiments, we will transfer the process into laboratory bioreactors to evaluate its suitability for industrial production of PHA.

**Author Contributions:** Conceptualization—D.K. and S.O.; Data curation—D.K. and I.P.; Formal analysis—D.K. and P.S.; Funding acquisition—S.O.; Investigation—S.O.; Methodology—S.O.; Project administration—S.O.; Resources—S.O.; Supervision—S.O.; Validation—I.N. and I.P.; Visualization—D.K.; Writing—original draft—D.K.; Writing—review & editing—P.S. and S.O.

**Funding:** This study was funded by the project GA19-20697S of the Czech Science Foundation (GACR). Further, Ivana Novackova is Brno Ph.D. Talent Scholarship Holder—Funded by the Brno City Municipality.

**Acknowledgments:** Authors kindly thank to Leona Kubikova for all the help with TGA and DSC measurement and to Michal Kalina for determination of molecular weight analysis by SEC-MALS.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. Kourmentza, C.; Plácido, J.; Venetsaneas, N.; Burniol-Figols, A.; Varrone, C.; Gavala, H.N.; Reis, M.A. Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Bioengineering* **2017**, *4*, 55. [CrossRef]
2. Obruca, S.; Sedlacek, P.; Koller, M.; Kucera, D.; Pernicova, I. Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. *Biotechnol. Adv.* **2018**, *36*, 856–870. [CrossRef] [PubMed]
3. Slaninova, E.; Sedlacek, P.; Mravec, F.; Mullerova, L.; Samek, O.; Koller, M.; Hesko, O.; Kucera, D.; Marova, I.; Obruca, S. Light scattering on PHA granules protects bacterial cells against the harmful effects of UV radiation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 1923–1931. [CrossRef]
4. Haas, C.; Steinwandter, V.; De Apodaca, E.D.; Madurga, B.M.; Smerilli, M.; Dietrich, T.; Neureiter, M. Production of PHB from chicory roots - Comparison of three *Cupriavidus necator* strains. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **2015**, *29*, 99–112. [CrossRef]
5. Verlinden, R.A.J.; Hill, D.J.; Kenward, M.A.; Williams, C.D.; Piotrowska-Seget, Z.; Radecka, I.K. Production of polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by *Cupriavidus necator*. *Amb Express* **2011**, *1*, 1–8. [CrossRef] [PubMed]
6. Ciesielski, S.; Mozejko, J.; Pisutpaisal, N. Plant oils as promising substrates for polyhydroxyalkanoates production. *J. Clean. Prod.* **2015**, *106*, 408–421. [CrossRef]
7. Jiang, G.; Hill, D.J.; Kowalczyk, M.; Johnston, B.; Adamus, G.; Irorere, V.; Radecka, I. Carbon sources for polyhydroxyalkanoates and an integrated biorefinery. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1157. [CrossRef] [PubMed]
8. Moita, R.; Fréches, A.; Lemos, P.C. Crude glycerol as feedstock for polyhydroxyalkanoates production by mixed microbial cultures. *Water Res.* **2014**, *58*, 9–20. [CrossRef]
9. Obruca, S.; Benesova, P.; Marsalek, L.; Marova, I. Use of lignocellulosic materials for PHA production. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **2015**, *29*, 135–144. [CrossRef]
10. Meixner, K.; Kovalcik, A.; Sykacek, E.; Gruber-Brunhumer, M.; Zeilinger, W.; Markl, K.; Haas, C.; Fritz, I.; Mundigler, N.; Stelzer, F.; et al. Cyanobacteria Biorefinery—Production of poly(3-hydroxybutyrate) with *Synechocystis salina* and utilisation of residual biomass. *J. Biotechnol.* **2018**, *265*, 46–53. [CrossRef]
11. Troschl, C.; Meixner, K.; Drosig, B. Cyanobacterial PHA Production—Review of Recent Advances and a Summary of Three Years' Working Experience Running a Pilot Plant. *Bioengineering* **2017**, *4*, 26. [CrossRef]
12. Sedlacek, P.; Slaninova, E.; Enev, V.; Koller, M.; Nebesarova, J.; Marova, I.; Hrubanova, K.; Krzyzanek, V.; Samek, O.; Obruca, S. What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 1905–1917. [CrossRef]
13. Koller, M. Chemical and biochemical engineering approaches in manufacturing polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters of tailored structure with focus on the diversity of building blocks. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **2018**, *32*, 413–438. [CrossRef]
14. Lee, W.H.; Azizan, M.N.M.; Sudesh, K. Effects of culture conditions on the composition of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Comamonas acidovorans*. *Polym Degrad Stab.* **2004**, *84*, 129–134. [CrossRef]
15. Rodríguez-Contreras, A.; Calafell-Monfort, M.; Marqués-Calvo, M.S. Enzymatic degradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by commercial lipases. *Polym. Degrad. Stabil.* **2012**, *97*, 597–604. [CrossRef]
16. Saito, Y.; Nakamura, S.; Hiramitsu, M.; Doi, Y. Microbial synthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Polym. Int.* **1996**, *39*, 167–174. [CrossRef]
17. Singh, A.K.; Srivastava, J.K.; Chandel, A.K.; Sharma, L.; Mallick, N.; Singh, S.P. Biomedical applications of microbially engineered polyhydroxyalkanoates: an insight into recent advances, bottlenecks, and solutions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 2007–2032. [CrossRef]
18. Chanprateep, S.; Kulpreecha, S. Production and characterization of biodegradable terpolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) by *Alcaligenes* sp. A-04. *J. Biosci. Bioeng.* **2006**, *101*, 51–56. [CrossRef]
19. Lee, Y.H.; Kang, M.S.; Jung, Y.M. Regulating the molar fraction of 4-hydroxybutyrate in poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) biosynthesis by *Ralstonia eutropha* using propionate as a stimulator. *J. Biosci. Bioeng.* **2000**, *89*, 380. [CrossRef]

20. Cavaleiro, J.M.; Raposo, R.S.; de Almeida, M.C.M.; Cesário, M.T.; Sevrin, C.; Grandfils, C.; Da Fonseca, M.M.R. Effect of cultivation parameters on the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Biores. Technol.* **2012**, *111*, 391. [[CrossRef](#)]
21. Hermann-Krauss, C.; Koller, M.; Muhr, A.; Fasl, H.; Stelzer, F.; Brauneegg, G. Archaeal production of polyhydroxyalkanoate (PHA) co-and terpolyesters from biodiesel industry-derived by-products. *Archaea* **2013**, *2013*, 129268. [[CrossRef](#)]
22. Ramachandran, H.; Iqbal, N.M.; Sipaut, C.S.; Abdullah, A.A.A. Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate). Terpolymer with various monomer compositions by *Cupriavidus* sp. USMAA2-4. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2011**, *164*, 867–877. [[CrossRef](#)]
23. Obruca, S.; Marova, I.; Melusova, S.; Mravcova, L. Production of polyhydroxyalkanoates from cheese whey employing *Bacillus megaterium* CCM 2037. *Ann. Microbiol.* **2011**, *61*, 947–953. [[CrossRef](#)]
24. Brandl, H.; Gross, R.A.; Lenz, R.W.; Fuller, R.C. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(beta-hydroxyalkanoates) for potential application as a biodegradable polyester. *Appl. Environ. Microb.* **1988**, *54*, 1977–1982.
25. Kucera, D.; Pernicová, I.; Kovalcik, A.; Koller, M.; Mullerova, L.; Sedlacek, P.; Mravec, F.; Nebesarova, J.; Kalina, M.; Marova, I.; et al. Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*. *Biores. Technol.* **2018**, *256*, 552–556. [[CrossRef](#)]
26. Amirul, A.A.; Yahya, A.R.M.; Sudesh, K.; Azizan, M.N.M.; Majid, M.I.A. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer by *Cupriavidus* sp. USMAA1020 isolated from Lake Kulim, Malaysia. *Biores. Technol.* **2008**, *99*, 4903–4909.
27. Rahayu, A.; Zaleha, Z.; Yahya, A.R.M.; Majid, M.I.A.; Amirul, A. A Production of copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) through a one-step cultivation process. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *24*, 2403–2409. [[CrossRef](#)]
28. Lopar, M.; Špoljarić, I.V.; Cepanec, N.; Koller, M.; Brauneegg, G.; Horvat, P. Study of metabolic network of *Cupriavidus necator* DSM 545 growing on glycerol by applying elementary flux modes and yield space analysis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *41*, 913–930. [[CrossRef](#)]
29. Lindenkamp, N.; Peplinski, K.; Volodina, E.; Ehrenreich, A.; Steinbuchel, A. Impact of multiple beta-ketothiolase deletion mutations in *Ralstonia eutropha* H16 on the composition of 3-mercaptopropionic acid-containing copolymers. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 5373–5382. [[CrossRef](#)]
30. Fahima Azira, T.M.; Nursolehah, A.A.; Norhayati, Y.; Majid, M.I.A.; Amirul, A.A. Biosynthesis of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) terpolymer by *Cupriavidus* sp. USMAA2-4 through two-step cultivation process. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *27*, 2287–2295. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 10 SEZNAM ZKRATEK

3HB	3-hydroxybutyrát
3HV	3-hydroxyvalerát
3HHD	3-hydroxyhexadekanoát
3HOD	3-hydroxyoctadekanoát
4HB	4-hydroxybutyrát
A	absorbance
aPHB	uměle vytvořená granule PHB
CCM	Czech collection of Microorganisms
CoA	koenzym A
DO	dissolved oxygen
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EI	evolučního inženýrství
EPS	extracelulární polymerní látka
FBP	fruktóza-1,6-bisfosfát
FID	plamenový ionizační detektor
FLIM	fluorescence life-time imaging
FTIR	infračervená spektroskopie s Furierovou transformací
GBL	gama-butyrolakton
HA	hydroxyalkanové
HMF	hydroxymethylfurfural
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
iPHB	intracelulární PHB
LCL	longchain-length
MCL	mediumchain-length
MMS	methyl methansulfonát
NB	Nutrient Broth
nPHA	nativní granule PHB
NR	Nilská červeň
PDI	polydisperzita
PHB	polyhydroxybutyrát
P3HB	poly-3-hydroxybutyrát
P4HB	poly-4-hydroxybutyrát
PHV	polyhydroxyvalerát
<i>PhaC</i>	PHA syntáza
SCG	kávová sedlina - spent coffee grounds
SCL	shortchain-length
T <sub>g</sub>	teplota skelného přechodu
T <sub>m</sub>	teplota tání

# 11 PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORA

## Publikace v recenzovaných časopisech s impaktovým faktorem:

NOVACKOVA, I.; KUCERA, D.; PORIZKA, J.; PERNICOVA, I.; SEDLACEK, P.; KOLLER, M.; KOVALCIK, A.; OBRUCA, S. Adaptation of *Cupriavidus necator* to levulinic acid for enhanced production of P(3HB-co-3HV) copolyesters. *Biochemical Engineering Journal*, 2019, roč. 151. doi:10.1016/j.bej.2019.107350

PERNICOVA, I.; KUCERA, D.; NEBESAROVA, J.; KALINA, M.; NOVACKOVA, I.; KOLLER, M.; OBRUCA, S. Production of polyhydroxyalkanoates on waste frying oil employing selected *Halomonas* strains. *Bioresource Technology*. 2019. doi:10.1016/j.biortech.2019.122028

KUČERA, D.; PERNICOVÁ, I.; KOVALČÍK, A.; KOLLER, M.; MÜLLEROVÁ, L.; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; NEBESÁŘOVÁ, J.; KALINA, M.; MÁROVÁ, I.; KRZYŽÁNEK, V.; OBRUČA, S. Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*. *Bioresource Technology*, 2018, roč. 256, č. 1, s. 552-556. ISSN: 0960-8524.

OBRUČA, S.; SEDLÁČEK, P.; KOLLER, M.; KUČERA, D.; PERNICOVÁ, I. Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. *Biotechnology Advances*, 2018, roč. 36, č. 3, s. 856-870. ISSN: 0734-9750.

SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; MÜLLEROVÁ, L.; SAMEK, O.; KOLLER, M.; HESKO, O.; KUČERA, D.; MÁROVÁ, I.; OBRUČA, S. Light scattering on PHA granules protects bacterial cells against the harmful effects of UV radiation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, roč. 102, č. 4, s. 1923-1931. ISSN: 1432-0614.

OBRUČA, S.; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; KRZYZANEK, V.; NEBESAROVA, J.; SAMEK, O.; KUČERA, D.; BENEŠOVÁ, P.; HRUBANOVA, K.; MILÉŘOVÁ, M.; MÁROVÁ, I. The presence of PHB granules in cytoplasm protects non-halophilic bacterial cells against the harmful impact of hypertonic environments. *New Biotechnology*, 2017, roč. 39, č. A, s. 68-80. ISSN: 1871-6784.

BENEŠOVÁ, P.; KUČERA, D.; MÁROVÁ, I.; OBRUČA, S. Chicken feather hydrolysate as an inexpensive complex nitrogen source for PHA production by *Cupriavidus necator* on waste frying oils. *LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY*, 2017, roč. 65, č. 2, s. 182-188. ISSN: 0266-8254.

SAMEK, O.; OBRUČA, S.; ŠILER, M.; SEDLÁČEK, P.; BENEŠOVÁ, P.; KUČERA, D.; MÁROVÁ, I.; JEŽEK, J.; BERNATOVÁ, S.; ZEMÁNEK, P. Quantitative Raman Spectroscopy Analysis of Polyhydroxyalkanoates Produced by *Cupriavidus necator* H16. *SENSORS*, 2016, roč. 16, č. 11, s. 1-7. ISSN: 1424-8220.

OBRUČA, S.; SEDLÁČEK, P.; KRZYZANEK, V.; MRAVEC, F.; HRUBANOVA, K.; SAMEK, O.; KUČERA, D.; BENEŠOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. Accumulation of Poly(3-



hydroxybutyrate) Helps Bacterial Cells to Survive Freezing. PLOS ONE, 2016, roč. 11, č. 6, s. 1-16. ISSN: 1932-6203.

MRAVEC, F.; OBRUČA, S.; KRZYŽÁNEK, V.; SEDLÁČEK, P.; HRUBANOVÁ, K.; SAMEK, O.; **KUČERA, D.**; BENEŠOVÁ, P.; NEBESÁŘOVÁ, J. Accumulation of PHA granules in *Cupriavidus necator* as seen by confocal fluorescence microscopy. FEMS Microbiology Letters, 2016, roč. 363, č. 10, s. 1-6. ISSN: 0378-1097.

OBRUČA, S.; BENEŠOVÁ, P.; **KUČERA, D.**; PETRIK, S.; MÁROVÁ, I. Biotechnological conversion of spent coffee grounds into polyhydroxyalkanoates and carotenoids. New Biotechnology, 2015, roč. 32, č. 6, s. 569-574. ISSN: 1871-6784.

### **Publikace v recenzovaných časopisech zařazených do databáze Scopus:**

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

PERNICOVA, I.; **KUCERA, D.**; NOVACKOVA, I.; VODICKA, J.; KOVALCIK, A.; OBRUCA, S. Extremophiles - Platform Strains for Sustainable Production of Polyhydroxyalkanoates. Materials Science Forum, 2019, roč. 955, s. 74-79. doi:10.4028/www.scientific.net/MSF.955.74

KOVALČÍK, A.; **KUČERA, D.**; MATOUŠKOVÁ, P.; PERNICOVÁ, I.; OBRUČA, S.; KALINA, M.; ENEV, V.; MÁROVÁ, I. Influence of removal of microbial inhibitors on PHA production from spent coffee grounds employing *Halomonas halophila*. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2018, roč. 6, č. 2, s. 3495-3501. ISSN: 2213-3437.

**KUČERA, D.**; BENEŠOVÁ, P.; LADICKÝ, P.; PEKAŘ, M.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. Production of Polyhydroxyalkanoates Using Hydrolyzates of Spruce Sawdust: Comparison of Hydrolyzates Detoxification by Application of Overliming, Active Carbon, and Lignite. Bioengineering, 2017, roč. 4, č. 2, s. 1-9. ISSN: 2306-5354.

OBRUČA, S.; DOSKOČIL, L.; KRZYZANEK, V.; HRUBANOVA, K.; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; SAMEK, O.; **KUČERA, D.**; BENEŠOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. Polyhydroxyalkanoates in Bacterial Cells - More Than just Storage Materials. Materials Science Forum, 2016, č. 851, s. 20-25. ISSN: 0255-5476.

### **Sborníky s plným udedením textu:**

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

**KUČERA, D.**; SAMEK, O.; MÜLLEROVÁ, L.; BENEŠOVÁ, P.; OBRUČA, S. Comparison of flow cytometry and Raman spectroscopy as methods for rapid determination of intracellular content of polyhydroxyalkanoates in bacterial cells. 4th International Conference on Chemical Technology ICCT 2016 Sborník příspěvků. 2016. ISBN: 978-80-86238-91- 3.

BENEŠOVÁ, P.; **KUČERA, D.**; OBRUČA, S.; MATOUŠKOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. USAGE OF WASTE MATERIALS AS THE POTENTIAL SUBSTRATE FOR PRODUCTION OF MICROBIAL BIOPOLYMERS. ICCT2016 Sborník abstraktů. Praha: 2016. s. 5-5. ISBN: 970-80-86238-91- 3.

OBRUČA, S.; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; SAMEK, O.; KRZYZANEK, V.; **KUČERA, D.**; BENEŠOVÁ, P.; DOSKOČIL, L.; MÁROVÁ, I. Polyhydroxyalkanoates in bacterial cells – more than just storage materials. Chemistry and Life 2015, Book of Abstracts. 1. Brno: Fakulta chemická VUT v Brně, 2015. s. 39-40. ISBN: 978-80-214-5228- 2.

OBRUČA, S.; **KUČERA, D.**; DINGOVÁ, T.; BENEŠOVÁ, P.; POŘÍZKA, J.; MÁROVÁ, I. Biotechnological production of polyhydroxyalkanoates on various lignocellulose-based agricultural wastes. Chemistry and Life 2015, Book of Abstracts. 1. Brno: Fakulta chemická VUT v Brně, 2015. s. 38-39. ISBN: 978-80-214-5228- 2.

#### **Abstrakty mezinárodních konferencí:**

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

KOVALČÍK, A.; MATOUŠKOVÁ, P.; **KUČERA, D.**; OBRUČA, S.; MÁROVÁ, I. Why Polyphenols Present In Spent Coffee Grounds Inhibit The Growth Of Bacteria Producing Polyhydroxyalkanoates?. In Papers of the 26th European Biomass Conference. Setting the course for a biobased economy. Extracted from the Proceedings of the International Conference held in Copenhagen, Denmark, 14 - 17 May 2018. European Biomass Conference And Exhibition Proceedings. Florence, Italy: ETA - Florence Renewable Energies, 2018. s. 960-964. ISSN: 2282-5819.

KOVALČÍK, A.; PERNICOVÁ, I.; **KUČERA, D.**; OBRUČA, S.; MATOUŠKOVÁ, P.; KUNDRÁT, V.; MÁROVÁ, I. Properties of biogenic PHA nanofibrous materials originated from strains *Burkholderia* species and *Pseudomonas* species using grape pomace medium. Program Agenda & Abstracts, 25th Annual Meeting of the BioEnvironmental Polymer Society, August 15-17, 2018, Rensselaer Polytechnic University, Troy, New York. Troy, New York, USA: Rensselaer Polytechnic University, 2018. s. 37-37.

CHYTILOVÁ, A.; DRÁBKOVÁ, K.; STREČANSKÁ, P.; ENEV, V.; **KUČERA, D.**; BENEŠOVÁ, P.; OBRUČA, S. Production and characterization of extracellular polysaccharide of extremely halophilic Archaea *Haloferax mediterranei*. 6th Central European Congress of Life Sciences Eurobiotech. Krakow: 2017. s. 156-157.

OBRUČA, S.; **KUČERA, D.**; PERNICOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; SAMEK, O.; KRZYZANEK, V.; NEBESAROVA, J.; MÜLLEROVÁ, L.; CHYTILOVÁ, A.;

SLANINOVÁ, E.; MÁROVÁ, I. Capability of polyhydroxyalkanoates accumulation enhances stress resistance and cell robustness of bacteria. Eurobiotech: Programme and Abstract Book. 1. Krakow: Targi w Krakowie, 2017. s. 154-154.

**KUČERA, D.**; BENEŠOVÁ, P.; KOVÁŘOVÁ, M.; OBRUČA, S. Strategies to improve the yield of PHAs produced from wood material. Eurobiotech - 6th Central European Congress Life Sciences. Krakov: 2017. s. 160-160.

OBRUČA, S.; **KUČERA, D.**; BENEŠOVÁ, P.; PERNICOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; SAMEK, O.; KRZYZANEK, V.; MÜLLEROVÁ, L.; CHYTILOVÁ, A.; SLANINOVÁ, E. Integrating production of PHA into bio-refinery concept: considering the impact of non-optimal cultivation conditions. 9th European Symposium on Biopolymers: Book of Abstracts. 1. Toulouse, Francie: 2017. s. 28-29.

**KUČERA, D.**; OBRUČA, S.; BENEŠOVÁ, P.; LADICKÝ, P.; MÁROVÁ, I. Utilization of sawdust hydrolysates for polyhydroxyalkanoate production by *Burkholderia* sp. RRB-12 The 12th International Conference on Renewable Resources & Biorefineries 2016.

**KUČERA, D.**; OBRUČA, S.; BENEŠOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. Možnosti znacení polyhydroxyalkanoátů a jejich produkce na odpadních substrátech. 16. slovenská studentská vedecká konferencia v odbore chémie a chemickej a potravinárskej technológie. Bratislava: FCHPT STU v Bratislave, 2014. s. 95-96. ISBN: 978-80-227-4268- 9.

#### **Abstrakty národních konferencí:**

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

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

KOVALČÍK, A.; **KUČERA, D.**; OBRUČA, S.; HUDEČKOVÁ, H.; MÁROVÁ, I. Biological valorization strategy for converting spent coffee grounds into biopolymers and chemicals. 7th meeting on Chemistry & Life 2018, September 12-14 2018. 2018. s. 26-26. ISBN: 978-80-214-5488-0.

PERNICOVÁ, I.; KRATOCHVÍLOVÁ, O.; **KUČERA, D.**; OBRUČA, S. Screening produkce biosurfaktantů u vybraných bakterií produkující polyhydroxyalkanoáty. XXVII. konference mladých mikrobiologů Tomáškovy dny 2018. Brno: Masarykova univerzita, 2018. s. 75-75. ISBN: 978-80-210-8963-1.

PERNICOVÁ, I.; KRATOCHVÍLOVÁ, O.; **KUČERA, D.**; OBRUČA, S. Screening of biosurfactants excretion among selected bacteria. 7th Meeting on Chemistry and Life 2018.

Book of abstracts. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, 2018. s. 142-142. ISBN: 978-80-214-5488-0.

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

KUČERA, D.; PERNICOVÁ, I.; KOVALČÍK, A.; OBRUČA, S. Accumulation of PHAs by halophilic strain *Halomonas halophila*. XVIII. setkání biochemiků a molekulárních biologů. Brno: Masarykova Univerzita, 2017. s. 75-75. ISBN: 978-80-210-8765-1.

OBRUČA, S.; KUČERA, D.; BENEŠOVÁ, P.; PERNICOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; SAMEK, O.; KRZYZANEK V.; MÁROVÁ, I. Integrating production of PHA into bio-refinery concept – shedding light also on specific consequences of non- optimal cultivation conditions. Biotech 2017 Book of Abstracts. 1. Praha: ICT Prague, 2017. s. 52-53. ISBN: 978-80-7080-989- 0.

KUČERA, D.; BENEŠOVÁ, P.; LADICKÝ, P.; OBRUČA, S. Production polyhydroxyalkanoates using hydrolysates of spruce sawdust. 5th International Conference on Chemical Technology ICCT 2016. 2017. ISBN: 978-80-86238-62-3.

PERNICOVÁ, I.; KUČERA, D.; VLASÁKOVÁ, T.; OBRUČA, S. Isolation and characterization of extremophiles for biotechnological production of polyhydroxyalkanoates. XVIII. Setkání biochemiků a molekulárních biochemiků. 1. Brno: Masarykova univerzita v Brně, 2017. s. 82-82. ISBN: 978-80-210-8765-1.

BENEŠOVÁ, P.; KUČERA, D.; OBRUČA, S.; MATOUŠKOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. Usage of waste materials as the potential substrate for production of microbial biopolymers. In Proceedings of the 4th International Conference on Chemical Technology. 1. Prague: Ocean Design, 2016. s. 483-487. ISBN: 978-80-86238-94- 4.

OBRUČA, S.; KUČERA, D.; DINGOVÁ, T.; BENEŠOVÁ, P.; POŘÍZKA, J.; MÁROVÁ, I. Biotechnological production of polyhydroxyalkanoates on various lignocellulose- based agricultural wastes. Czech Chemical Society Symposium Series, 2015, roč. 13, č. 2, s. 114-116. ISSN: 2336-7210.

OBRUČA, S.; BENEŠOVÁ, P.; PETRIK, S.; KUČERA, D.; EREMKA, L.; MÁROVÁ, I. Utilization of various waste substrates for biotechnological production of biopolymers and other high value products. BioTech 2014 & 6th Czech-Swiss Symposium: Book of Abstracts. 1. Praha: ICT Prague Press, 2014. s. 79-80. ISBN: 978-80-7080-887- 0.