

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2020

Lenka Drotárová



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

# OSMOTICKÝ STRES JAKO NÁSTROJ EVOLUČNÍHO INŽENÝRSTVÍ BAKTERIÍ

ADAPTATION TO ADVERSE OSMOTIC CONDITIONS AS A TOOL FOR EVOLUTIONARY ENGINEERING OF BACTERIA

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Lenka Drotárová

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2020

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1507/2019 Akademický rok: 2019/20  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Lenka Drotárová**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Osmotický stres jako nástroj evolučního inženýrství bakterií

### Zadání bakalářské práce:

1. Vypracovat aktuální literární rešerši zaměřenou na koncept evolučního inženýrství bakterií.
2. Na základě literární rešerše navrhnout sérii experimentů, při nichž bude využita opakovaná expozice hyper– nebo hypo– osmotických podmínek jako prostředek evolučního inženýrství bakterií.
3. Analyzovat původní i exponované kmeny vybranými metodami biologické, chemické a fyzikálně–chemické analýzy.
4. Na základě výsledků provedených analýz posoudit využitelnost osmotického stresu jako nástroje evolučního inženýrství bakterií.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2020:

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

-----  
Lenka Drotárová  
student(ka)

-----  
Ing. Petr Sedláček, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **Abstrakt**

Bakalárska práca sa zaoberá využitím osmotického stresu ako nástroja evolučného inžinierstva PHA produkujúcich bakteriálnych kmeňov. Cieľom práce je posúdiť využiteľnosť adaptácie mikroorganizmov na hypoosmotické prostredie ako inžinierskeho nástroja na ovplyvnenie efektivity biosyntézy PHA. Teoretická časť práce sa zaoberá princípom evolučného inžinierstva, metódami tejto stratégie a vplyvom fyzikálnych faktorov na mikroorganizmus. V rámci experimentálnej časti bol realizovaný experiment adaptívnej laboratórnej evolúcie s využitím bakteriálneho kmeňa *Halomonas halophila* CCM 3662. Ako stresový faktor počas sériovej kultivácie bol aplikovaný osmotický tlak v podobe zníženej koncentrácie soli v produkčnom médiu. Za účelom vyvinutia PHA produkujúcich adaptovaných mutantných kmeňov boli jednotlivé pasáže analyzované pomocou metód spektrofotometrie, gravimetrie a GC-FID. Na základe výsledkov dlhodobej kultivácie bol zistený adaptačný potenciál kmeňa HH35, kultivovaného pri 35 g/l NaCl, u ktorého obsah biomasy a koncentrácia PHB vykazovali najvyššie hodnoty. Z jednotlivých generácií kmeňa HH35 bola pre podrobnejšiu analýzu vybraná 15. pasáž a 30. pasáž, ktoré spolu s kontrolným divokým kmeňom *H. halophila*, boli podrobené hyperosmotickému a hypoosmotickému šoku. Pomocou metód FC a TGA bola sledovaná stresová odpoveď bakteriálnych kmeňov, v snahe zistenia viability buniek či potenciálnych morfológických zmien. Vyizolované polyméry boli charakterizované FTIR analýzou.

## **Abstract**

This bachelor thesis deals with the application of osmotic stress as a tool for evolutionary engineering of PHA producing bacterial strains. The aim of this thesis is to evaluate a bacterial adaptation to hypoosmotic environment, as an engineering tool in order to increase the production of PHA. The theoretical part focuses on the evolutionary engineering principle, methods of the strategy and the effect of physical factors on microorganism. The aim of experimental part was to performed an adaptive evolutionary experiment with the bacterial strain *Halomonas halophila* CCM 3662. Reduced osmotic pressure was used as a stressing factor during the serial cultivation. In order to generate PHA producing mutant strains, each passage was characterized using spectrophotometric and gravimetric method and by GC-FID. It was found that after the long-term cultivation, the mutant strain HH35, cultivated in 35 g/l NaCl, was associated with the highest biomass and PHB concentration. The 15th and 30th passages, along with the wild type strain *H. halophila* were subjected to further cell-robustness analysis with the application of hyper- and hypoosmotic shock. The stress response, viability of cells and morphological changes were analyzed using FC and TGA methods. Isolated polymers were characterized using FTIR analysis.

## **Kľúčové slová**

Evolučné inžinierstvo, sériová kultivácia, osmotický stres, polyhydroxyalkanoáty (PHA), *Halomonas halophila*

## **Keywords**

Evolutionary engineering, serial cultivation, osmotic stress, polyhydroxyalkanoates (PHA), *Halomonas halophila*

DROTÁROVÁ, Lenka. *Osmotický stres jako nástroj evolučního inženýrství bakterií*[online]. Brno, 2020 [cit. 2020-07-23]. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123417>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Petr Sedláček.

### **Prehlásenie**

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

.....

podpis študenta

### **Pod'akovanie**

Na úvod by som rada poďakovala vedúcemu mojej bakalárskej práce Ing. Petrovi Sedláčkovi, Ph.D., za odbornú pomoc a cenné rady pri spracovaní výsledkov či písaní teoretickej časti práce. Ďalej by som veľmi rada poďakovala konzultantke mojej práce Ing. Eve Slaninovej za veľkú pomoc pri práci v laboratóriu a pri spracovaní výsledkov. Taktiež moja vďaka za pomoc pri práci v laboratóriu patrí Ing. Ivane Nováčkovej. Nakoniec by som sa chcela poďakovať mojej rodine a priateľom za podporu.

## OBSAH

1	ÚVOD .....	7
2	TEORETICKÁ ČASŤ.....	8
2.1	Evolučné inžinierstvo.....	8
2.1.1	Vývoj evolučného inžinierstva .....	8
2.1.2	Charakteristika a princíp.....	8
2.1.3	Stratégie evolučného inžinierstva .....	9
2.1.4	Skríning mutantných kmeňov .....	12
2.1.5	Aplikácia konceptu evolučného inžinierstva .....	13
2.2	Vplyv fyzikálnych stresov na baktérie.....	13
2.2.1	Vplyv teploty .....	13
2.2.2	Pôsobenie UV žiarenia.....	14
2.2.3	Osmotický stres.....	15
2.3	Modelový mikroorganizmus <i>Halomonas halophila</i> .....	15
2.3.1	Morfológia baktérií rodu <i>Halomonas</i> .....	15
2.3.2	Polyhydroxybutyrát .....	16
2.3.3	Aplikačný potenciál <i>H. halophila</i> ako producenta PHB.....	17
2.4	Súčasný trendy v biotechnologických aplikáciách evolučného inžinierstva .....	18
2.4.1	Využitie evolučného inžinierstva na zlepšenie rastu a fermentácie kvasiniek <i>Saccharomyces pastorianus</i> v hyperosmotických podmienkach .....	18
2.4.2	Využitie riadenej evolúcie na zlepšenie rastu a produkcie rekombinantného proteínu rHSA v kvasinkách <i>Pichia pastoris</i> .....	18
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....	20
3.1	Použité mikroorganizmy, chemikálie a prístroje .....	20
3.1.1	Použité mikroorganizmy.....	20
3.1.2	Použité chemikálie .....	20
3.1.3	Použité prístroje .....	20
3.2	Kultivácia mikroorganizmov <i>Halomonas halophila</i> CCM 3662.....	21
3.2.1	Príprava komplexných inokúl a kultivácia .....	21
3.2.2	Kultivácia v produkčnom médiu.....	21
3.3	Adaptačné experimenty.....	22
3.3.1	Sériová kultivácia – pasážovanie.....	22
3.3.2	Stanovenie obsahu biomasy.....	23
3.3.3	Stanovenie obsahu PHB v biomase .....	24

3.4	Porovnanie tolerancie adaptovaných kmeňov a divokého kmeňa <i>H. halophila</i> na osmotický stres .....	24
3.4.1	Kultivácia adaptovaných kmeňov a divokého kmeňa pri zmenenej osmolarite .....	24
3.4.2	Expozícia adaptovaných kmeňov a divokého kmeňa osmotickému šoku	26
4	VÝSLEDKY A DISKUSIA .....	28
4.1	Adaptačný experiment s nižšou intenzitou hypoosmotického stresu .....	28
4.1.1	Obsah biomasy v jednotlivých pasážach sériovej kultivácie .....	28
4.1.2	Obsah PHB v jednotlivých pasážach sériovej kultivácie .....	29
4.2	Adaptačný experiment s vyššou intenzitou hypoosmotického stresu .....	31
4.2.1	Obsah biomasy kmeňov adaptovaných na hypoosmotický stres .....	31
4.2.2	Obsah PHB akumulovaného mutantnými kmeňmi adaptovanými na hypoosmotický stres .....	35
4.3	Porovnanie tolerancie adaptovaných kmeňov a divokého kmeňa <i>H. halophila</i> na osmotický stres .....	38
4.3.1	Porovnanie rastových a produkčných vlastností bakteriálnych kmeňov v prostredí o rôznej salinite .....	38
4.3.2	Expozícia adaptovaných a divokého kmeňa osmotickému šoku .....	42
5	ZÁVER .....	48
6	ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV .....	51
7	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK .....	56
8	PRÍLOHY .....	57
8.1	Kalibračná krivka pre stanovenie obsahu PHB v biomase .....	57
8.2	Optimalizácia podmienok - stanovenie obsahu PHB pomocou GC-FID .....	58
8.3	Spektrofotometrické stanovenie obsahu biomasy .....	58
8.4	Porovnanie tolerancie adaptovaných mutantov a divokého kmeňa - spektrofotometrické stanovenie obsahu biomasy .....	59

# 1 ÚVOD

Evolúcia ako nezastaviteľný proces vývoja, či už organizmov alebo prírody v čase a priestore, je neoddeliteľnou súčasťou našej existencie. Prírodný výber a postupná variácia viedla k vzniku nových druhov jedincov s určitým genotypom a teda aj fenotypom. Postupom času bolo zistené, že hlavným zdrojom variability sú náhodné mutácie, ktoré sú vyvolané určitými faktormi, pričom práve tieto mutácie sa považujú za hnaciu silu evolúcie. Organizmus si však tieto mutácie nevyberá, vznikajú spontánne a ich následky môžu mať rôzny charakter. Napriek výskytu určitých mutácií, ktoré môžu mať až fatálny dopad na organizmus, sa mutácie považujú za významný proces vedúci k vzniku nových druhov.

Štúdiom tohto procesu vznikla myšlienka cieleného zavádzania mutácií do génov vybraných organizmov, za účelom vytvorenia organizmu s vylepšenými vlastnosťami a funkciami. Práve týmito metódami sa zaoberá aj evolučné inžinierstvo, ktorého stratégia je postavená na idei vytvorenia požadovaných vlastností, ako napríklad zvýšená produkcia určitého metabolitu, prirodzenou cestou. Vďaka tejto myšlienke by evolučné inžinierstvo mohlo predstavovať nástroj pre efektívnejšiu a finančne menej náročnejšiu produkciu materiálov, ktorých príprava je limitovaná práve vysokými nákladmi na ich realizáciu.

Jedným z týchto materiálov by mohli byť práve polyhydroxyalkanoáty (PHA), biologicky degradovateľné biopolyméry produkované mikroorganizmami, ktoré sa v poslednej dobe stali centrom záujmu nie jedného výskumu. Nahradenie syntetických petrochemických plastov, perspektívnymi bioplastami na báze PHA, by predstavovalo výrazne pozitívny dopad na environmentálne prostredie. Syntézu tohto polyméru v praxi, však doteraz limituje vysoká cena. Preto sa naskytuje myšlienka, posúdiť využitie konceptu evolučného inžinierstva ako nástroja na zvýšenie efektivity produkcie PHA bakteriálnymi kmeňmi.



## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1 Evolučné inžinierstvo

#### 2.1.1 Vývoj evolučného inžinierstva

Počiatky experimentálnej evolúcie siahajú do druhej polovice 19. storočia, kde prvotnú teóriu evolúcie prirodzeným výberom sformuloval Charles Darwin v roku 1859 v jeho knihe „O pôvode druhov“ [1]. Darwinova teória položila základy v štúdiu evolúcie a inšpirovala mnohých vedcov v ďalšom experimentálnom výskume. Louis Pasteur sa zaoberal vývojom patogénnych zárodkov a ich možným prepuknutím v ochorenie, čo sa stalo konceptom teórie o choroboplodných zárodkoch [1]. V tejto práci neskôr pokračoval aj Robert Koch, ktorý skúmal vývoj mikrobiálnych kultúr a ich vzťah k ochoreniu, čo viedlo k sformulovaniu Kochových postulátov [1].

Prvé experimenty adaptívnej laboratórnej evolúcie (ALE) publikoval William Dallinger pred viac ako 100 rokmi, ktorý chcel dosiahnuť ďalšie dôkazy o Darwinovom zákone súbežnej adaptácie na súčasné zmeny životného prostredia [3]. Predmetom jeho záujmu sa stali jednobunkové organizmy s krátkym životným cyklom v priemere 4 minúty, čo predstavovalo vznik 360 generácií za deň. Pozoroval vplyv zvyšujúcej sa teploty a toleranciu mikroorganizmov voči zmeneným podmienkam, pričom dochádzalo k vývinu nových druhov [2, 3].

Od 60. rokov sa záujem o využívanie ALE značne zvýšil u inžinierstva mikrobiálnych kmeňov. Štúdiom priemyselných mikroorganizmov, ako výhodných modelov pre aplikáciu ALE, zaznamenalo veľký počet experimentov pre konštrukciu mutantných kmeňov s istými evolučnými výhodami. Ako modelový mikroorganizmus sa využíva predovšetkým baktéria *Escherichia coli* ako zástupca prokaryotickej ríše a *Saccharomyces cerevisiae* ako zástupca eukaryotickej ríše [2, 3].

Nedávny vývoj v oblasti DNA sekvenčných technológií umožňuje vyhodnotenie vyvinutých populácií aj na molekulárnej úrovni. Vďaka týmto prístupom ALE nachádza využitie ako nástroj na objavovanie a pochopenie nových biologických mechanizmov. Tieto mechanizmy, ako napríklad predtým necharakterizované aktivity enzýmov, môžu byť ďalej použité pri rozvoji kmeňových aktivít a k zefektívneniu produkcie metabolitov [2, 3].

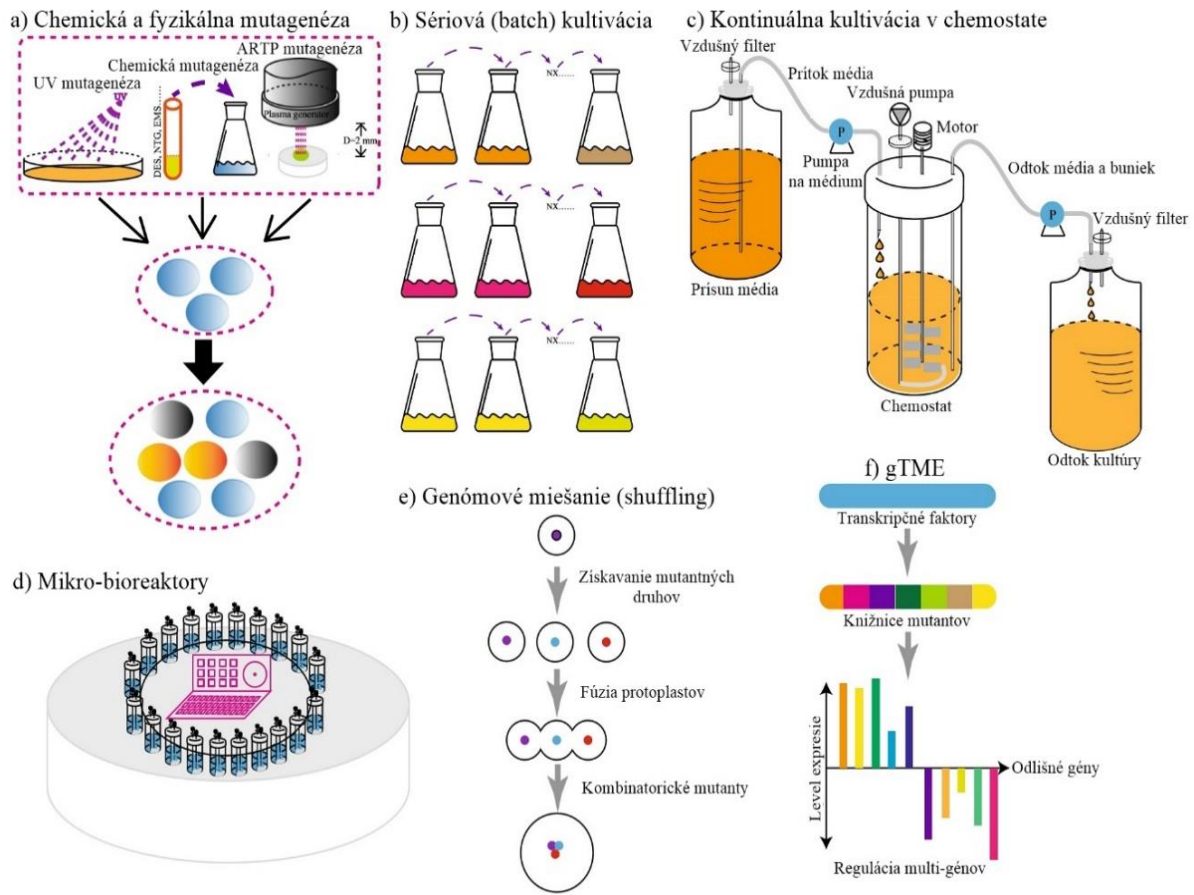
#### 2.1.2 Charakteristika a princíp

Predstava inžinierstva ako konceptu návrhov pre vytvorenie objektov, vypracovaných na základe už známych princípov a metód bohužiaľ nepostačuje na navrhnutie a prípravu látok s požadovanými vlastnosťami a funkciami. Alternatívou pre vyriešenie tohto problému je práve evolučné inžinierstvo, ktoré využíva princíp prirodzeného vývoja, variáciou a výberom. Komplementárna stratégia napodobňujúca evolučný vývoj ponúka vedecké a aplikované výhody pre navrhnutie biopolymérov, nukleových kyselín a proteínov s požadovanými vlastnosťami. Využitím riadenej evolúcie, teda vývoja do požadovaného smeru, dochádza zavedením mutácií do génov k vytváraniu genetickej diverzity. Získaná variabilita prispieva k vývinu kmeňov, ktoré sú za neustáleho skríningu triedené tak, aby sa získali len mutantné kmene s požadovaným fenotypom. V biologickom a chemickom výskume priemyselne

využívaných mikrobiálnych organizmov je bežnou metódou na množenie populácie a zisk produktov so zlepšenými vlastnosťami, ako je environmentálna tolerancia a odolnosť voči selekčným tlakom [4]. Pod selekčným tlakom môžeme chápať rôzne stresové faktory ako napríklad teplota, pH prostredia, osmolarita, toxicita, obsah solí atď. Aplikáciou určitého stresu, či ich kombináciou na skúmané bunky sa sleduje zmena fenotypu daného kmeňa v rôznych časových horizontoch. Hlavnou výhodou tejto techniky je napodobnenie prirodzeného vývoja, s tým rozdielom, že tento vývoj prebieha rýchlejšie a efektívnejšie. Počas kultivácie vznikajú adaptívne mutanty, teda jedinci so zvýšenou odolnosťou, ktoré ďalej rozširujú populáciu s vyvinutým tolerančným fenotypom. Zložité dynamické interakcie v bunkových systémoch a komplikované predpovedanie sekundárnych odpovedí a vedľajších účinkov, často obmedzujú použitie metabolického inžinierstva, ktorého postupy sú prevažne založené na už známych a dostupných molekulárnych znalostiach [5]. Riešením týchto obmedzení by mohlo byť práve použitie stratégií evolučného inžinierstva, ktoré nevyžadujú podrobnú znalosť o genetickom pozadí pre daný fenotypový znak [3-6].

### **2.1.3 Stratégie evolučného inžinierstva**

Evolučné inžinierstvo zahŕňa viacero možností laboratórneho prevedenia experimentu riadenej evolúcie ako znázorňuje Obrázok 1. Stratégie sú zamerané na zavádzanie mutácií či prepis genómu, ktoré zvyšujú genetickú diverzitu populácie, čím sa zvyšuje aj efektívnosť evolučného inžinierstva. Každá stratégia má svoje výhody ako aj nevýhody, ktorými väčšinou býva dlhá doba kultivácie, či zvýšená frekvencia nevýhodných mutácií. Postupom času však došlo k zavedeniu nových metód, v snahe zvýšiť efektívnosť a eliminovať nežiaduce zmeny. Inverzné techniky využívané na zlepšenie požadovaných vlastností priemyselných mikroorganizmov, ktorých základom je napodobniť prirodzený vývoj, sú založené na množení buniek mikroorganizmov za pôsobenia selekčného tlaku, čím dochádza k vzniku genetickej diverzity [4]. Predpokladaným výsledkom stratégie je optimalizácia fenotypu a adaptácia mutantných kmeňov na neprirodzené podmienky. Tieto kmene sú následne vyselektované a analyzované pomocou vysokovýkonných skriningových prístupov (agarové alebo mikrotitračné dosky, fluorescenčné značenie), ktoré umožňuje rýchlu identifikáciu vyvinutých mutantných kmeňov s požadovanými vlastnosťami [3, 4].



Obrázok 1: Stratégie evolučného inžinierstva [4], ktorých princíp je bližšie popísaný v kapitolách 2.1.3.1 - 2.1.3.4

### 2.1.3.1 Fyzikálna a chemická mutagenéza

Mutagenéza sa považuje za významný zdroj genetickej diverzity v populáciách. Tento proces môže byť docielený viacerými metódami, najčastejšie vystavením organizmu rôznym chemickým či fyzikálnym mutagénom (viď Obrázok 1). Medzi chemické mutagény patria modifikácie a analógie báz, ktoré sú začlenené do DNA počas replikácie, čím dochádza k výmene špecifických nukleotidov a tzv. „*frame-shiftingu*“ [4]. Niektoré mutagény vrátane etylmetánsulfonátu (EMS) môžu spôsobovať aj deléciu určitej dĺžky DNA [5]. Fyzikálne mutagény ako UV žiarenie alebo ionizačné žiarenie (RTG,  $\gamma$  žiarenie) vyvolávajú štruktúrne poškodenia DNA, dokonca pri vystavení vysokých dávok môže dôjsť až k usmrteniu buniek. Využitie týchto mutagénov môže zvýšiť rýchlosť a frekvenciu mutácií až 1000× viac, ako v prípade spontánnej mutácie, čím je docielený vznik veľkej genetickej variability. Vysoká frekvencia mutácií ale nemusí byť vždy výhodná pri prevádzaní experimentov. Väčšina mutácií nemá žiadny vplyv na bunky, alebo môže mať opačne až škodlivý účinok. Nízka frekvencia užitočných mutácií a nekontrolovateľný priebeh predstavujú značný problém pri použití týchto metód. Riešením by mohla byť nová metóda ARTP (*atmospheric and room temperature plasma*) mutagenézy, ktorá si v poslednej dobe získala veľkú pozornosť. Metóda ARTP je založená na použití plazmového prúdu rádiovfrekvenčného žiarenia s atmosférickým tlakom, ktorý je schopný mutagenézy s vyššou účinnosťou [3-5, 7].

### **2.1.3.2 Adaptívna laboratórna evolúcia**

Pre pochopenie základných mechanizmov na molekulárnej úrovni a adaptácie na vyvolané zmeny je adaptívna laboratórna evolúcia vhodným a často používaným nástrojom v rôznych biologických štúdiách. Vedecký prístup využívajúci vývoj v riadenom smere má značne dlhšiu dobu kultivácie ako vyššie spomínaná mutagenéza, ktorá môže trvať niekoľko týždňov až roky. ALE ponúka 2 typy metód, a to sériové dávkovanie a kultiváciu v bioreaktoroch /chemostatoch (viď Obrázok 1) [4].

Sériové dávkovanie/kultivácia sa uskutočňuje v jednoduchých Erlenmayerových bankách, kde prebieha propagácia buniek v paralelných kultúrach za laboratórnych podmienok. Je nutné neustále trepanie na trepačkách, aby bola zabezpečená homogenita várky. Kultivačné banky sú obvykle uzavreté vatovými špuntami, vďaka ktorým preniká plyn do banky len difúziou. V pravidelných intervaloch sa alikvotná časť exponenciálne rastúcich buniek prenesie do novej banky s čerstvým médiom na ďalšie kolo propagácie. Tento proces sa nazýva aj pasážovanie, kde každé ďalšie preočkovanie predstavuje novú pasáž. Počet pasáží sa líši v závislosti od jednotlivého experimentu. Experimenty sa môžu tiež vykonávať na mikrotitračných doskách či agarových platniach, kde sa môžu pestovať až stovky mikrobiálnych kultúr paralelne. Ide o pomerne jednoduchú a finančne veľmi dostupnú metódu. Nevýhodou tejto metódy môže byť príliš dlhá doba kultivácie, prípadne nekontrolované podmienky pre rast [4, 8, 9].

Kultivácia v bioreaktoroch respektíve chemostatoch, predstavuje kontinuálnu kultiváciu s konštantným prívodom živín a separáciou náhodných jedincov populácie a odpadu. Jedná sa o automatizovanú kultiváciu mikroorganizmov, ktorej výhoda spočíva v zachovaní takmer konštantných hodnôt v procesných parametroch ako je pH, hustota buniek alebo rastová rýchlosť. Na rozdiel od sériového dávkovania je kultivácia v chemostate založená na raste buniek s obmedzeným príjmom živín. Najčastejšie sa jedná o toleranciu na obmedzené množstvo cukrov ako glukózy alebo glycerolu. Je taktiež potrebné zabezpečiť premiešavanie a prevzdušňovanie várky, aby sa zabránilo usadzovaniu rýchlo sedimentujúcich buniek a došlo tak ku koncentračnej aj teplotnej homogenite kultivácie. V porovnaní so sériovou kultiváciou ide o finančne náročnejšiu techniku. Okrem chemostatu sa na kontinuálnu kultiváciu využívajú aj turbidistaty s konštantnou koncentráciou biomasy a auxostaty, ktorých konštantný parameter súvisí s rastom (substrát, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) [4, 8, 9].

### **2.1.3.3 Evolúcia na úrovni genómu**

Cielená úprava genómu predstavuje ďalšiu možnosť vývoja mikrobiálnych kmeňov so zlepšenými vlastnosťami. Genómová rekombinácia sa ukázala ako účinný nástroj v evolučnom vývoji, predovšetkým prínosom rôznych informácií o genetickom základe komplexných fenotypov. Zmeny na úrovni genómu sú zvyčajne uskutočňované pohlavnou alebo *in vivo* rekombináciou či fúziou protoplastov [10]. Novým nástrojom na zefektívnenie tradičných postupov by mohlo byť globálne transkripčné inžinierstvo (gTME), ktoré sa zameriava na transkripčné faktory a generuje diverzitu na úrovni transkripcie, pričom dochádza k vytvoreniu súboru variantov s heterogénnymi fenotypmi (viď Obrázok 1) [10-12].

### **2.1.3.4 Asistované evolučné inžinierstvo**

Metódy asistovaného evolučného inžinierstva v spojení s vysoko výkonným skríningom mikrobiálnych buniek sú schopné prekonať limity klasických metód pri obmedzených znalostiach o genetickom základe. Asistovaná evolúcia zahŕňa rôzne prístupy, ktoré využívajú napríklad biosenzory na riadenie evolúcie, či fluorescenčné farbenie na vizualizáciu a triedenie mutovaných jedincov [4].

Biosenzor predstavuje molekulárne zariadenie, ktoré reaguje ako na metabolity, tak aj na selekčný tlak. Môže sa jednať buď o regulátory, riadené transkripčným faktorom alebo o sekundárne RNA štruktúry s ligandami špecifickými na určitý metabolit [15]. Dokáže špecificky detegovať daný metabolit a vďaka prevedeniu tohto signálu na pozorovateľný fenotyp, je možné cielene riadiť jeho produkciu. Biosenzorom riadená evolúcia využíva fluorescenčný výstup biosenzora na riadenie selekčného tlaku k zvýšeniu produkcie požadovaného metabolitu. Bunky sa ďalej triedia pomocou fluorescenčne aktivovaných buniek (FACS), pričom sa izolujú bunky s najvyšším fluorescenčným výstupom. Použitím separácie na princípe FACS s biosenzorom, ktorý nie je geneticky kódovaný bunkami podliehajúce evolúcii, je možné predísť falošne pozitívnym jedincom v populácii, ktorí môžu negatívne ovplyvniť výsledky experimentu [15]. Aby biosenzorom riadená evolúcia bola čo najefektívnejšia a bolo by možné objasniť novovzniknuté mutácie, je potrebné vybrať celé genómy a sekvenovať ich [13-15].

Spätne regulovaný vývoj fenotypu (FREP) je adaptívny kontrolný systém, ktorý reguluje rýchlosť mutácie, tak aby vznikala dostatočná genetická diverzita a zvyšovala sa koncentrácia cieľového metabolitu. Použitím senzora sa meria koncentráciu metabolitu, na základe čoho ovplyvňuje zmenu rýchlosti mutácií [16].

VERT alebo vizualizácia evolučného vývoja v reálnom čase dokáže identifikovať adaptívne javy pomocou vizuálneho stanovenia relatívnych podielov fluorescenčne značených buniek. Mikrobiálne bunky sú značené špeciálnymi plazmidmi, ktoré kódujú fluorescenčné proteíny. Počas kontinuálnej evolúcie dochádza k zvyšovaniu selekčného tlaku ak je zaznamenaná adaptácia organizmov, čím sa zvýši relatívny podiel niektorej farebne značenej populácie [17].

### **2.1.4 Skríning mutantných kmeňov**

Všetky experimenty evolučného inžinierstva pozostávajú z dvoch krokov: generovanie genetickej diverzity a vysokovýkonný skríning (HTS) alebo selekcia. V posledných rokoch boli vyvinuté rôzne metódy skríningu, preto výber vhodného prístupu HTS je dôležitým aspektom úspešného a efektívneho experimentu. Pri analýze mutantov sa skríning často kombinuje so selekciou, pomocou ktorej sa eliminujú nežiadúce varianty a vyberú sa len jednotlivci s cieľovými fenotypmi [18, 19].

#### **2.1.4.1 Mikrotitračné a agarové dosky**

Tradičnými a bežne používanými skríningovými prístupmi sú analýzy na mikrotitračných alebo agarových doskách. Jedná sa o veľmi jednoduché a dostupné metódy, založené na vizuálnej identifikácii mutovaných jedincov. Pri skríningu na agarovej platni sa bakteriálne kolónie inkubujú zároveň s enzýmom a substrátom, kde premena substrátu na produkt je sprevádzaná

vizuálnym javom ako zmena farby alebo fluorescencia. Pri sledovaní enzýmovej aktivity sa využívajú kolorimetrické a fluorometrické testy. V prípade čiastočného vymiznutia produktu (vyblednutia jeho zafarbenia), je možné spektrofotometricky pozorovať intenzitu absorpcie alebo fluorescencie pomocou špeciálnych čítačiek [20, 21].

#### **2.1.4.2 Triedenie fluorescenčne aktivovaných buniek**

FACS predstavuje spôsob triedenia fluorescenčne farbených buniek v suspenzii na základe intenzity fluorescenčného signálu. Ide o špeciálny typ prietokovej cytometrie, kde prúd jednotlivých buniek prechádza laserovým lúčom, pričom je detegovaný rozptyl svetla v priamom a bočnom smere a intenzita fluorescencie. Bunky o určitom signály sú zachytávané do zberného systému. Na značenie buniek sa bežne využívajú fluorescenčné sondy ako fluorescenčné proteíny, napríklad zelený fluorescenčný proteín (GFP) alebo fluorescenčne značené protilátky. Jedná sa o rýchlu a vysoko efektívnu techniku, ktorá umožňuje multiparametrovú analýzu čo sa týka fyzikálnych aj chemických vlastností buniek [4, 22].

#### **2.1.5 Aplikácia konceptu evolučného inžinierstva**

Metódy evolučného inžinierstva sú využívané predovšetkým k vývoju mikroorganizmov využiteľných v priemysle s vylepšenými komplexnými fenotypmi, ako je zvýšená produkcia metabolitov či lepšie odolávanie selekčným tlakom. Zlepšenie environmentálnej tolerancie na určité chemické látky umožňuje doceliť vyššiu efektivitu vo výrobe biopalív z obnoviteľných zdrojov a zvýšenie výťažku produktu umožní značný zisk biodegradabilných látok. Predpokladá sa, že kombináciou s inými vývojovými stratégiami ako je systémová biológia, metabolické inžinierstvo a genetika, či spojením s analytickými technikami a bioinformatikou, sa stane evolučné inžinierstvo mocným nástrojom pri modelovaní bunkových funkcií a prinesie riešenia na identifikáciu mechanizmov na molekulárnej úrovni [4, 12].

### **2.2 Vplyv fyzikálnych stresov na baktérie**

Mikroorganizmy musia počas kultivácie odolávať rôznym stresovým faktorom prostredia, ktoré majú vplyv na ich prežívanie. Stály rast a pravidelná reprodukcia je podmienená optimálnymi fyziologickými podmienkami. V neprirodzených podmienkach sú nútené vyvíjať rôzne regulačné a obranné mechanizmy aby odolali týmto zmenám. Pôsobenie stresov má rôzne stupne, teda nemusí mať hneď letálny dopad na organizmus. Pri miernom vychýlení z optimálnych hodnôt sa začnú prejavovať zmeny vo vlastnostiach, ktoré môžu byť evolučné (dlhodobé pôsobenie) alebo fyziologické (rýchle odpovede). U rôznych organizmov sa tieto zmeny môžu líšiť, obvykle však ide o zmenu rýchlosti rastu a rozmnožovania, či aktiváciu/deaktiváciu metabolických dráh [23]. Za stresové faktory sú považované všetky vonkajšie vplyvy, ktoré vyvolávajú u organizmov odpoveď. Tieto faktory sa z biologického hľadiska delia na abiotické (neživé), čo sú fyzikálne a chemické vplyvy, a na biotické (živé), napríklad pôsobenie ostatných organizmov [23].

#### **2.2.1 Vplyv teploty**

Teplota, ako jeden z najdôležitejších parametrov prostredia, v značnej miere ovplyvňuje prežívanie mikroorganizmov. Závislosť rastu či rozmnožovania na teplote nie je symetrická, pretože bunky dokážu tolerovať len úzke teplotné rozmedzie, pričom každá vyššia odchýlka výrazne zasahuje do činnosti bunky. U jednotlivých skupín mikroorganizmov sa ich teplotná

tolerancia líši. Nízke teploty spôsobujú spomalenie rýchlosti delenia, až úplne zastavenie pri extrémne nízkych hodnotách, ale obvykle nemajú letálne následky. To znamená, že mikroorganizmy sú schopné rásť aj pri nižších teplotách ako je ich optimálna teplota rastu [23-26].

Dôležitý faktor je rýchlosť chladenia. Čím je táto rýchlosť pomalšia, tým viac dochádza k poškodeniu buniek, nikdy nie však k úplnému vyhubeniu populácie. Ak je zmrazovanie prevedené rýchlo, bunky zamrznú, ale prežijú, čo je princíp dlhodobého uchovávaní kultúr v kryoskúmavkách s vhodnými ochrannými látkami tzv. kryoprotektanty (napr. glycerín). Zvýšenie teploty naopak vedie k poškodeniu bunkových štruktúr alebo usmrteniu, čo sa v praxi využíva pri ich likvidácii. Pri vystavení organizmu vysokým teplotám dochádza k denaturácii proteínov vrátane enzýmov, čo negatívne ovplyvňuje rýchlosť a smer metabolickej dráhy. Taktiež dochádza k zmene zloženia, štruktúry a transportných vlastností cytoplazmatickej membrány a jej poškodeniu. Zvýšením teploty sa znižuje rigidnosť zvyškov mastných kyselín fosfolipidov a membrána sa stáva tekutejšou [26]. Periférne a integrálne proteíny zabudované v membráne denaturujú, čo môže zvýšiť jej priepustnosť, a tým sa umožní pohyb proteínov a iných molekúl cez membránu, prípadne vstup potenciálne škodlivých látok do vnútra bunky [23-26].

### 2.2.2 Pôsobenie UV žiarenia

Medzi ďalšie výrazne negatívne vplyvy na životaschopnosť buniek patrí elektromagnetické žiarenie. Práve vplyv ultrafialového žiarenia (UVR) sa považuje za prvotného pôvodcu prirodzenej evolúcie proteínov a enzýmov, v dobách kedy ozónová vrstva nebola úplne vybudovaná, čím nebránila v prechode UVR. Silné mutagénne účinky UV žiarenia (vlnové dĺžky v oblasti 100-400 nm) pôsobia letálne na mikroorganizmy. Predovšetkým UV žiarenie s vlnovou dĺžkou v oblasti 260-265 nm, ktoré je absorbované nukleovými kyselinami, čím dochádza k zmenám a poškodeniu genetickej informácie [27, 28].

Poškodenia DNA indukované UV žiarením vedú k nesprávnemu zaradeniu báz počas replikácie, vzniku dimérov susedných nukleotidov a hydrolytickým či oxidačným poškodeniam. Výsledkom hydrolytických poškodení môže byť deaminácia, pri ktorej sa jedna báza môže previesť na inú, alebo dôjde k depurinácii/depyrimidácii, teda k úplnému odstráneniu jednotlivej bázy, čo má za následkom prerušenie reťazcov až delécie chromozómov [27, 28].

Odolnosť a mechanizmus ochrany voči účinkom UVR sa u jednotlivých mikroorganizmov líši. Napríklad pigmentácia spór hrá významnú rolu pri ochrane proti UV žiareniu. Baktérie alebo kvasinky obsahujúce karotenoidné farbivá sú rezistentnejšie voči žiareniu absorbujú menej UV svetla na rozdiel od bezfarebných mikroorganizmov. Konkrétne, syntéza karotenoidných pigmentov predstavuje antioxidačnú obranu proti oxidačnému stresu vyvolaným UV žiarením [29]. Medzi odolné organizmy patria endospóry rodu *Bacillus*, ktoré vykazujú široké spektrum pigmentácie. Okrem toho sa zvýšená odolnosť pripisuje aj iným špecifickým vlastnostiam spór ako zmenená fotochémia DNA vedúca k vzniku fotoproduktu (5-tyminyl-5,6-dihydrotymin), akumulácia kyseliny dipikolínovej (DPA) ako  $Ca^{2+}$  chelát či prítomnosť hrubého proteínového obalu spór [30]. Naopak u niektorých druhov môže už len krátke vystavenie pôsobiť smrteľne.

Táto skutočnosť sa využíva pri sterilizácii prostredia pomocou germicídnej UV lampy, ktorá použitím krátkovlnného ultrafialového svetla UV-C (100-280 nm) s vlnovou dĺžkou okolo 260 nm, inaktivuje alebo usmrčuje mikroorganizmy. Metóda ultrafialového germicídneho ožarovania (UVGI) sa využíva predovšetkým k dezinfekcii vzduchu, pitnej a odpadovej vody alebo na sterilizáciu zdravotníckych nástrojov [27-32].

### 2.2.3 Osmotický stres

Ak je bunka vystavená prostrediu s výrazne odlišnou osmolaritou, dochádza k narušeniu homeostázy v dôsledku zvýšenia koncentračného gradientu množstva iónov a ďalších osmoticky aktívnych látok v intracelulárnom resp. extracelulárnom prostredí. Odolnosť organizmu voči osmotickému stresu výrazne ovplyvňuje štruktúru buniek a schopnosť baktérii prežívať a rásť. V dôsledku zvýšenia extracelulárnej osmolarity (hypertonické prostredie) dochádza k transportu vody von z buniek, čo vedie k zmenšeniu objemu, dehydratácii cytoplazmy a poškodeniu plazmatickej membrány počas tzv. plazmolýzy. V procese plazmolýzy dochádza k zmene štruktúry fosfolipidov, čo má za následok zvýšenie tekutosti plazmatickej membrány [33]. Naopak v prostredí so zníženou koncentráciou osmoticky aktívnych látok (hypotonické prostredie), je indukovaný transport vody do bunky, čím sa zväčšuje jej objem a zvyšuje sa vnútorný turgor (tlak). Vďaka prítomnosti peptidoglykánovej bunkovej steny, zabráňujúcej prasknutiu bunky, sú baktérie viacej odolnejšie voči hypoosmotickému prostrediu než eukaryotické bunky. Premennivosť osmolarity prostredia je bežným javom, na základe ktorého si organizmy vyvinuli rôzne obranné mechanizmy, pomocou ktorých sa snažia vyrovnať koncentráciu na oboch stranách membrány. Osmoregulačné procesy odpovedajú na zvýšenie resp. zníženie osmotického tlaku prostredia, čím sa snažia o udržanie všetkých fyziologických funkcií nevyhnutných pre život. Bežným obranným mechanizmom v nepriaznivých podmienkach je akumulácia a uvoľňovanie anorganických iónov ( $K^+$ ) alebo organických osmolytov (trehalóza, glutamát) [37]. Pri vystavení hypertonickému prostrediu dochádza v bunke k hromadeniu alebo biosyntéze osmolytov, ktoré sa následne uvoľňujú do okolitého prostredia, ak je bunka vystavená hypotonickým podmienkam [33-37].

## 2.3 Modelový mikroorganizmus *Halomonas halophila*

*Halomonas halophila*, tiež známa ako *Deleya halophila*, je zástupcom gramnegatívnych aeróbných tyčinkiek, pôvodne izolovaná z hyperslaných pôd v blízkosti Alicante v Španielsku [39]. Patrí medzi mierne halofilné baktérie, u ktorých je optimálna koncentrácia NaCl pre rast 7,5 % (hm./obj.), pričom maximálna hranica tolerancie je až 30 % (hm./obj.). Na základe požiadaviek na soľ sa prevažne vyskytujú v hyperslaných vodách a slaných pôdach. Čo sa týka požiadaviek na fyzikálne vlastnosti prostredia sú univerzálne a dokážu rásť v rôznych teplotných a pH rozmedziach. Teplotné optimum pre rast je 30-37 °C, pričom tolerujú teploty od 15-45 °C. Vyhovujúce hodnoty pH sa pohybujú v oblasti od pH 5 až 10 [38-40].

### 2.3.1 Morfológia baktérií rodu *Halomonas*

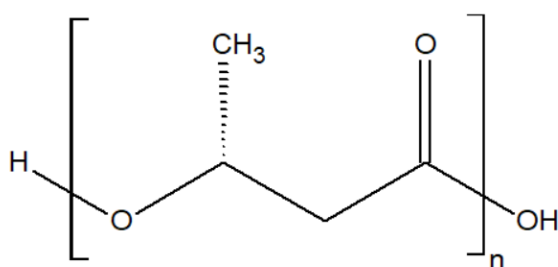
Baktérie rodu *Halomonas* majú bunky tyčinkovitého tvaru, ktoré môžu byť buď rovné alebo zakrivené. Na povrchu buniek sa nachádzajú laterálne alebo peritrichové bičiky, zodpovedné za bunkový pohyb. Bakteriálne kolónie sú obvykle bieleho alebo svetlo žltého zafarbenia, ktoré v neskoršom štádiu vývoja bunky môže prejsť až na svetlo hnedé. Veľkosť buniek je približne



0,6–0,8 × 1,6–1,9 μm [41]. Objem a veľkosť buniek môže byť v značnej miere ovplyvnená množstvom intracelulárnych granúl, ktoré sa vytvárajú za nepriaznivých podmienok ako zásobné látky. Akumulujú sa vo vnútri buniek vo forme amorfných granúl, obsahujúcich polymér polyhydroxybutyrát, ktoré slúžia ako bunkové inklúzie, čím zvyšujú odolnosť bunky za pôsobenia rôznych stresových faktorov [38]. U baktérií rodu *Halomonas* môžu tieto nahromadené intracelulárne granule predstavovať až 82 % sušiny buniek [38, 41-42].

### 2.3.2 Polyhydroxybutyrát

Ako bolo zmienené vyššie v kapitole 2.3.1 baktérie rodu *Halomonas* akumulujú intracelulárne granule, ktorých základnou zložkou je polyhydroxybutyrát (PHB). Jedná sa o polymér patriaci do skupiny polyhydroxyalkanoátov (PHA), konkrétne scl-PHA (*short-chain-length* PHA), teda polyhydroxyalkanoáty s krátkym reťazcom. Z chemického hľadiska sú to lineárne polyestery hydroxyalkánových kyselín (viď Obrázok 2). PHB ako intracelulárny polymér je produkovaný radom mikroorganizmov [38, 42].

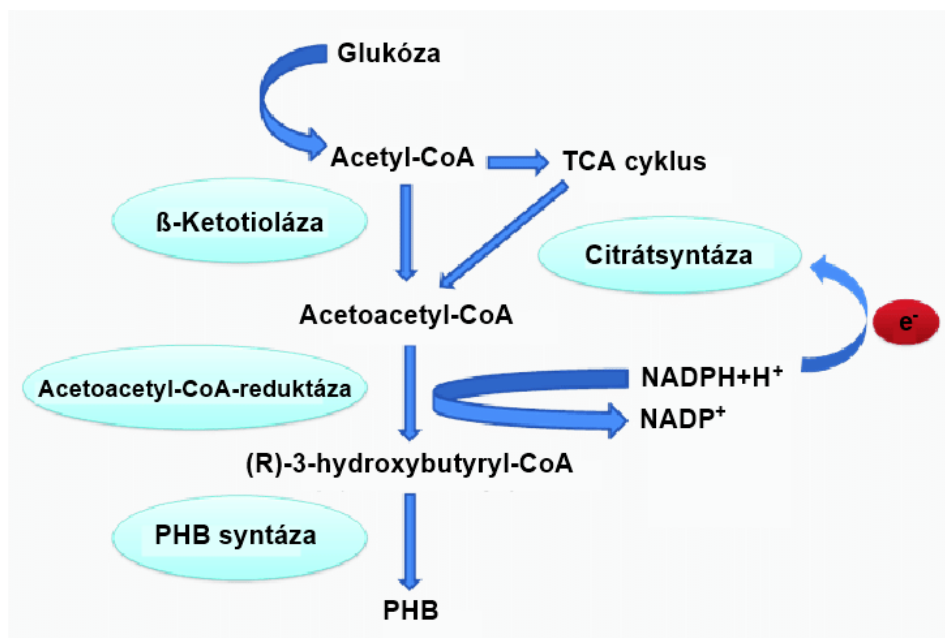


Obrázok 2: Chemická štruktúra PHB

Granule PHB sa vytvárajú ako rezervný zdroj uhlíka a energie v limitujúcich podmienkach s obmedzeným množstvom živín a v prebytku uhlíka. Existujú však aj mikroorganizmy, ktoré môžu produkovať PHA aj bez limitácie potrebných živín, na základe čoho sa delia na dve skupiny. Prvá skupina predstavuje mikroorganizmy, ktoré syntetizujú PHA za limitujúcich podmienok, patria sem zástupcovia ako *Cupriavidus necator* alebo *Bacillus subtilis* [44]. Do druhej skupiny mikroorganizmov prirodzene produkujúcich PHA sa radia napríklad *Alcaligenes latus* či rekombinantná *Escherichia coli* [42-44].

#### 2.3.2.1 Mikrobiálna biosyntéza PHB

Pre mikrobiálnu syntézu PHA boli popísané viaceré biosyntetické dráhy. Pri produkcii PHB sa najčastejšie vychádza z jednej dráhy (viď Obrázok 3), začínajúcej kondenzáciou dvoch molekúl acetyl-CoA za vzniku acetoacetyl-CoA, ktorý je následne redukovaný pomocou NADPH-dependetnej acetoacetyl-CoA reduktázy na (*R*)-3-hydroxybutyryl-CoA [44]. Konečným krokom je polymerizačná reakcia dvoch monomérov katalyzovaná PHB syntázou, kde dochádza k vzniku poly(3-hydroxybutyrátu) (P(3HB)) [44-45].



Obrázok 3: Biosyntetická dráha tvorby PHB [44]

### 2.3.2.2 Fyzikálne vlastnosti PHB

Dôvodom rozsiahlych štúdií PHA, je predovšetkým ich potenciál biologicky degradovateľných bioplastov, získaných z obnoviteľných zdrojov, ktorých vlastnosti sa významne podobajú petrochemicky vytvoreným plastom. PHB patrí medzi najslubnejšie bioplasty a je často využívaný ako ekologickejšia alternatíva syntetických polymérov ako sú polypropylén alebo polyetylén. Výhodou PHB sú lepšie biologické vlastnosti, predovšetkým biokompatibilita a už zmienená biodegradabilita. V závislosti od konkrétneho zloženia monomérnych jednotiek majú polyhydroxyalkanoáty rôzne mechanické vlastnosti, od kryštalických a pružných po elastické vlastnosti. Krehká povaha PHB je spôsobená sekundárnou kryštalizáciou počas dlhšieho skladovania po počiatočnej kryštalizácii, kedy dochádza k reorganizácii lamelárnych kryštálov. Tomuto krehnutiu sa dá jednoducho predísť žiňaním po počiatočnej kryštalizácii. Fyzikálne vlastnosti môžu byť zlepšené začlenením viacerých druhov monomérnych jednotiek PHA do štruktúry, čím sa ovplyvní kryštalinita, tuhosť či teplota topenia látky [44-46].

### 2.3.3 Aplikačný potenciál *H. halophila* ako producenta PHB

Halofilné baktérie rodu *Halomonas* sú považované za potenciálne mikrobiálne továrne na produkciu PHB, nakoľko akumulujú tento polymér, mimo iné aj za účelom odolávania osmotickému tlaku. Z biotechnologického hľadiska ich vysoký potenciál spočíva najmä v ekonomicky dostupnej výrobe. Produkčné médium pre kultiváciu bakteriálnych kultúr môže byť pripravené z relatívne lacných substrátov, ako sú (agro)priemyselné odpady a prebytočné materiály. Výhodou je, že aj napriek lacným substrátom môže byť dosiahnutý vysoký podiel výsledného metabolitu. Ďalšou výhodou je aj obsah soli v médiu, ktoré chráni mikrobiálnu kultúru pred kontamináciou. Taktiež bolo zistené, že už aj malým odchýlením od optimálnej koncentrácie soli v médiu, je možné vyprodukovať vyššie koncentrácie PHB s rôznymi preddefinovanými materiálovými vlastnosťami [38, 43].

## 2.4 Súčasné trendy v biotechnologických aplikáciách evolučného inžinierstva

Stratégia evolučného inžinierstva upútala v poslednej dobe veľkú pozornosť, najmä v roku 2018 kedy bola profesorka chemického inžinierstva Frances H. Arnold udelená Nobelova cena za chémiu za jej výskum v oblasti riadeného vývoja enzýmov. Výsledky preukázali, že riadená evolúcia skutočne predstavuje revolučný prístup pri hľadaní proteínov a iných biologických molekúl s novými vylepšenými vlastnosťami [47].

### 2.4.1 Využitie evolučného inžinierstva na zlepšenie rastu a fermentácie kvasiniek *Saccharomyces pastorianus* v hyperosmotických podmienkach

V nasledovnej štúdií sa *Ekberg a kol.* (2013) zaoberali využiteľnosťou evolučného inžinierstva na zlepšenie rastu kvasiniek *Saccharomyces pastorianus* v hyperosmotických podmienkach a vplyvom tohto stresu na ich fermentačnú výkonnosť. Experiment bol zameraný na vývoj geneticky stabilných pivovarských kvasiniek, schopných rastu v prostredí vysokej osmotickej sily, s cieľom zvýšiť rýchlosť fermentačných procesov. Kvasinky boli mutagenizované prídavkom EMS (etyl metánsulfonát) a následne boli pripravené zásobné suspenzie mutagénnych kvasiniek v glycerole. Kultivácia kvasiniek v YP médiu (Yeast Extract, Peptón, Manitol, metanol) obsahujúcom maltózu a sorbitol (210 g/l) prebiehala v Erlenmayerových bankách za neustáleho trepania a po dosiahnutí určitej hodnoty optickej hustoty bola kultúra preočkovaná do čerstvého média. Po vystavení hyperosmotickým podmienkam boli kvasinky prenesené na agarové platne bez sorbitolu a so sorbitolom. Na doskách s obsahom sorbitolu sa neošetrené populácie objavili po 4 dňoch inkubácie, zatiaľ čo populácie vystavené osmotickému tlaku po dobu 27 cyklov sa prvé kolónie objavili už po 2 dňoch. Fermentácia mladiny s vybranými kmeňmi prebiehala vo valcových kónických nádobách pri 15 °C. Osmotolerantné kmene vykazujúce rýchly rast na sorbitole preukazovali výrazne rýchlejšiu dobu fermentácie a akumulovali významne menej intracelulárnej trehalózy ako pôvodné kmene. Trehalóza sa hromadí v bunkách kvasiniek v stresových podmienkach, s účelom stabilizácie bunkových membrán a proteínov. Je však známe, že vysoké koncentrácie trehalózy pri stresovej reakcii môže inhibovať fermentáciu. Výsledky teda naznačujú, že počas evolúcie kvasiniek došlo k zjavnej adaptácii na osmotický stres, pričom fermentačná výkonnosť a kvalita produktu nebola negatívne ovplyvnená [48].

### 2.4.2 Využitie riadenej evolúcie na zlepšenie rastu a produkcie rekombinantného proteínu rHSA v kvasinkách *Pichia pastoris*

Metódy adaptívneho laboratórneho vývoja boli využité v rôznych výskumoch a štúdiách za účelom vylepšenia mikrobiálnych kmeňov pre biotechnologické účely. V snahe zanalyzovať prínosy riadenej evolúcie, bol vykonaný experiment pod vedením *Mosera a kol.* (2017), ktorý sa zameril na zlepšenie rastu a produkcie rekombinantného proteínu v methylotrófných kvasinkách *Pichia pastoris*. Dlhodobá sériová kultivácia sa uskutočňovala po dobu 250 generácií v rastovom médiu, kde slúžil ako zdroj uhlíka metanol. Boli použité média YPM obsahujúce Yeast Extract, Peptón, Manitol, 1% metanol o pH 7.4 a BMM (Buffered Minimal Methanol) obsahujúce fosforečnan draselný, biotín, Yeast Nitrogen Base, 1% metanol. YPM predstavovalo bohatý zdroj živín pre rast, na rozdiel od BMM, ktoré naopak obmedzovalo rastové podmienky. Na 24 jamkových doštičkách boli kultivované 4 populácie pre obe rastové podmienky a v 24-hodinových intervaloch boli prenesené na novú čerstvú dosku, pričom každá

pasáž bola následne analyzovaná. Pomocou rastových testov boli vyselektované mutantné kmene na identifikáciu mutácií s pozorovanými rastovými fenotypmi. Počas experimentu boli populácie analyzované z hľadiska rýchlosti rastu a výťažku biomasy. Celkovo bolo pozorované významne zlepšenie rýchlosti rastu na oboch médiách. Populácie kultivované v YPM médiu dosiahli rast 4,3 generácií za deň, na rozdiel od populácií v BMM médiu, kde sa počet generácií pohyboval okolo 3,4 generácií za deň. Celkový počet bunkových delení bol v rozmedzí od  $10^{9,96}$  do  $10^{10,02}$  pre YPM kultúry a  $10^{9,63}$  až  $10^{9,69}$  pre BMM kultúry. Výťažok biomasy bol stanovovaný z každej pasáže pomocou merania optickej hustoty  $OD_{600}$ , pomocou ktorej bol vypočítaný počet bunkových delení. Najväčší výťažok bol pozorovaný u populácií prispôbených na BMM médium, ktorých hodnota  $OD_{600}$  dosiahla v priemere zvýšenie o 77 % v porovnaní s pôvodným divokým kmeňom. Resekvencia genómu odhalila zlepšenie rastového výkonu a produkcie rekombinantných proteínov v médiách na báze metanolu. Niektoré klony vyvíjané v BMM s vysokou počiatočnou koncentráciou biomasy ( $OD_{600} = 4$ ) vykazovali zvýšenie výťažku proteínov rHSA o 28 %, zatiaľ čo klony s nízkou počiatočnou koncentráciou ( $OD_{600} = 0,2$ ) vykazovali zvýšenie o 78 %. Výsledky tejto štúdie dokazujú, že potenciál stratégie ALE sa dá využiť nie len na zlepšenie tolerancie voči stresu, ale aj na zvýšenie produkcie proteínov v *P. pastoris* [49].

## 3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 3.1 Použité mikroorganizmy, chemikálie a prístroje

#### 3.1.1 Použité mikroorganizmy

Pri prevádzaní experimentálnych pokusov bol používaný bakteriálny kmeň *Halomonas halophila* CCM 3662 získaný z Českej zbierky mikroorganizmov.

#### 3.1.2 Použité chemikálie

- Dihydrát dihydrogénfosforečnanu sodného, Lach-Ner
- Dihydrogénfosforečnan draselný, Lach-Ner
- Dodekahydrát hydrogénfosforečnanu sodného, Lach-Ner
- D-Glukóza monohydrát, Lach-Ner
- Heptahydrát síranu horečnatého, Lach-Ner
- Hydroxid sodný, Lach-Ner
- Chlorid sodný, Lach-Ner
- Chloroform, VWR International
- Peptón, bakteriologický, HiMedia
- Síran amónny, Lach-Ner
- Yeast extract, HiMedia

#### 3.1.3 Použité prístroje

- Analytické váhy, Ohaus Pioneer
- Centrifúga, Sigma 1-14
- Centrifúga, Hettich EBA 20
- Laminárny box Aura mini, BioAir Instruments - Euroclone
- Magnetická miešačka bez ohrevu, Biosan MMS-3000
- Nanofotometer, Implen, P 300
- Plynový chromatograf s FID, Thermo Scientific, Trace 1300; kolóna: DB-WAX 30 m by 0,25 mm
- Prietokový cytometer, Apogee Flow Systems, Apogee A50
- SEC chromatograf s kolónou PLgel mixed-C 5  $\mu\text{m}$ , 300 by 7,5 mm, Agilent Technologies; detektory: MALS – DAWN HELEOS II, diferenčný refraktometer OPTILAB T-REX, Wyatt Technology
- Spektrometer Nicolet iS50 FTIR, Thermo Scientific
- Temperovaná trepačka, Heidolph, Inkubator 1000
- Termoblok, Stuart, SBH130D
- Termogravimetrický (TGA) analyzátor Q5000, TA Instruments
- Váhy, Kern EW 620-3NM
- Vortex, Benchmark, BenchMixer
- Bežné laboratórne sklo a vybavenie

## 3.2 Kultivácia mikroorganizmov *Halomonas halophila* CCM 3662

### 3.2.1 Príprava komplexných inokúl a kultivácia

Ako inokulum pre baktérie *Halomonas halophila* CCM 3662 bolo pripravené submerzné komplexné médium o optimálnej koncentrácii NaCl (66 g/l). Inokulá boli uchovávané v Erlenmayerových bankách o objeme 100 ml s 50 ml média, vždy v paralelných prevedeniach.

Zloženie komplexného inokula:

- Peptón 15 g
- Yeast extract 3 g
- glukóza 1 g
- NaCl 66 g
- destilovaná voda 1 000 ml

Jednotlivé chemikálie boli navážené na laboratórnych váhach a následne boli rozpustené v destilovanej vode za súčasného miešania na magnetickej miešačke. Banky s médium boli sterilizované v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom po dobu 30 min pri teplote 220 °C. Vysterilizované média boli ochladené na laboratórnu teplotu. V sterilnom laminárnom boxe boli média zaočkované pomocou sterilnej bakteriologickej kľičky z Petriho misky celkovo trikrát. Zaočkované inokulá boli kultivované na temperovanej trepačke po dobu 24 hodín pri teplote 30 °C a 180 rpm.

### 3.2.2 Kultivácia v produkčnom médiu

Po kultivácii inokula v komplexnom médiu, bola bakteriálna kultúra preočkovaná do produkčného média s obsahom glukózy ako zdrojom uhlíka. Za účelom zvýšenia produkcie biomasy so zvýšeným obsahom PHA, bol aplikovaný osmotický stres v podobe zníženia optimálnej koncentrácie NaCl v médiu (66 g/l). Média boli pripravované do Erlenmayerových baniek o objeme 250 ml so 100 ml média.

Zloženie produkčného média:

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3,00 g
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,02 g
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  11,10 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,20 g
- NaCl 65; 60; 55; 50; 45; 40; 35; 30 g
- glukóza 5 ml
- roztok MES\* 0,1 ml
- destilovaná voda 1 000 ml

Samostatne boli pripravené zásobné roztoky glukózy o koncentrácii 400 g/l a stopových prvkov MES.

\*Zloženie roztoku MES:

- FeCl<sub>3</sub> 9,70 g
- CaCl<sub>2</sub> 7,80 g
- CuSO<sub>4</sub> 0,156 g
- CoCl<sub>2</sub> 0,119 g
- NiCl<sub>2</sub> 0,118 g
- CrCl<sub>2</sub> 0,062 g
- 0,1 mol/l HCl 1 000 ml

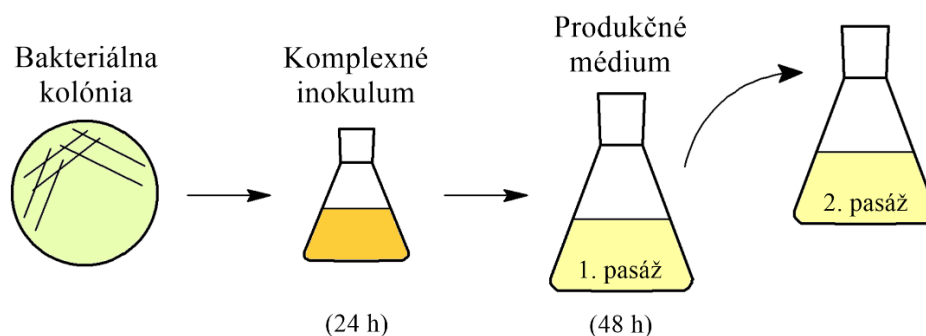
Rovnako ako pri príprave inokula boli jednotlivé navážky rozpustené v destilovanej vode za súčasného miešania na magnetickej miešačke. Banky s médiom boli sterilizované v tlakovom hrnci so zatvoreným ventilom po dobu 30 min. Roztok glukózy bol sterilizovaný pri otvorenom ventilu. Vysterilizované produkčné média boli ochladené na laboratórnu teplotu. V sterilnom laminárnom boxe boli do médií pridané roztoky glukózy a stopových prvkov MES. Následne boli zaočkované 5 obj. % kultúry z inokula. Zaočkované média boli kultivované na temperovanej trepačke po dobu 48 hodín pri teplote 30 °C a 180 rpm.

### 3.3 Adaptačné experimenty

Za účelom získania adaptovaných kmeňov s využitím konceptu evolučného inžinierstva bol na bakteriálne kmene aplikovaný selekčný tlak v podobe hypoosmotického stresu. Konkrétne bol bakteriálnym kmeňom pri paralelnej kultivácii znižovaný obsah soli v produkčnom médiu z ich optimálnej koncentrácie 66 g/l na 65; 60; 55 resp. 50 g/l (výsledky vid' kapitola 4.1) a 45; 40; 35 a 30 g/l NaCl (výsledky vid' kapitola 4.2). V snahe získať mutanty schopné rastu a súčasnej produkcie PHB, bola za limitnú koncentráciu soli v médiu zvolená hodnota 30 g/l NaCl, nakoľko z predchádzajúcich experimentov vyplynulo, že nižšie koncentrácie soli sú už pre divoký kmeň *H. halophila* letálne. U všetkých realizovaných adaptačných experimentov bola využitá stratégia sériovej kultivácie (vid' kapitola 3.3.1)

#### 3.3.1 Sériová kultivácia – pasážovanie

Experiment bol prevádzaný použitím metódy sériovej kultivácie v jednoduchých bankách (vid' Obrázok 4). Vždy po 48 hodinách bolo nové produkčné médium zaočkované 5 obj. % kultúry starého produkčného média. Z komplexného inokula boli zaočkované médiá s koncentraciami 65-50 g/l NaCl. Po získaní 2. pasáže boli pomocou kultúry z média so 65 g/l NaCl, zaočkované nové média s koncentraciami 45-30 g/l NaCl. Ďalšie preočkovanie bolo prevádzané vždy do média s rovnakou koncentraciou soli ako malo predchádzajúce médium. Sériová kultivácia bola ukončená po dosiahnutí 30. pasáže. Z pasáží 9, 15 a 30 bola kultúra prenesená do kryoskúmaviek a uchovaná pri teplote -70 °C pre neskoršiu analýzu.



Obrázok 4: Schéma sériovej kultivácie

Pre jednoduchšie opisovanie boli následne zavedené skrátené označenia mutantných bakteriálnych kmeňov (viď Tabuľka 1).

Tabuľka 1: Skrátené označenia bakteriálnych kmeňov

kmeň + koncentrácia NaCl v kultivačnom médiu	označenie
mutantný kmeň <i>H. halophila</i> , 45 g/l NaCl	HH45
mutantný kmeň <i>H. halophila</i> , 40 g/l NaCl	HH40
mutantný kmeň <i>H. halophila</i> , 35 g/l NaCl	HH35
mutantný kmeň <i>H. halophila</i> , 30 g/l NaCl	HH30

### 3.3.2 Stanovenie obsahu biomasy

#### 3.3.2.1 Spektrofotometrické stanovenie obsahu biomasy

Koncentrácia buniek v produkčnom médiu po 48 hodinách bola stanovovaná pomocou merania optickej hustoty pri vlnovej dĺžke 630 nm oproti destilovanej vode. Meranie bolo prevádzané vždy pre každú pasáž. Z každého média pasáže, bola odobratá vzorka kultúry, ktorá bola pred meraním 50krát zriedená v kyvete destilovanou vodou na celkový objem 1 ml. Meranie vzorky bolo opakované vždy 3krát.

#### 3.3.2.2 Gravimetrické stanovenie obsahu biomasy

Pre stanovenie obsahu biomasy v médiu bolo z každého média pasáže odobratých 10 ml kultúry do centrifugačnej skúmavky vždy v dvoch paralelných prevedeniach. Vzorky kultúry boli odstredené v centrifúge pri 6 000 rpm po dobu 5 minút. Po centrifugácii bol supernatant zliaty a sediment bol premytý 10 ml destilovanej vody. Po dispergácii zmesi na vortexe boli vzorky druhýkrát odstredené v centrifúge. Supernatant bol opäť zliaty a skúmavky so sedimentom boli usušené v sušiarňi pri 70 °C po dobu minimálne 24 hodín, dokým vzorky nedosiahli konštantnú hmotnosť. Po vysušení obsahu skúmavky boli vzorky zvážené na analytických váhach, na základe čoho bol stanovený obsah biomasy (v jednotkách g/l). Gravimetrické stanovenie bolo prevádzané vždy pre každú pasáž.



### 3.3.3 Stanovenie obsahu PHB v biomase

Obsah PHB vo vzorkách vysušenej biomasy bol stanovený s použitím plynovej chromatografie s plameňovou ionizačnou detekciou (FID). Princípom analýzy je kyslo katalyzovaná hydrolyza polyesterov nahromadených v biomase a následná esterifikácia monomérnych jednotiek, za vzniku prchavých metylesterov 3-hydroxylakánových kyselín, ktoré je možné pomocou metódy GC-FID kvantitatívne aj kvalitatívne stanoviť.

#### 3.3.3.1 Príprava štandardných roztokov pre stanovenie kalibračnej krivky

K rôznym navážkam (2-11 mg) polyméru P(3HB) bol pridaný 1 ml chloroformu a 0,8 ml vnútorného štandardu (15 % kyselina sírová v metanole a 5 mg/ml ISTD, kyselina benzoová), takto pripravené vialky boli ďalej zakrimpované a uložené do termobloku k trojhodinovej esterifikácii pri 90 °C. Po vychladení boli extrahované 50 mmol/l roztokom NaOH. Do vialiek s chloroformom bolo pridaných 50 µl spodnej fázy zmesi. Takto pripravené štandardné roztoky boli analyzované na plynovom chromatografe GC-FID a na základe výsledkov bola zhotovená kalibračná závislosť pomeru plochy píku na koncentrácii polyméru.

#### 3.3.3.2 Príprava vzoriek pre GC-FID analýzu

Z vysušenej biomasy (príprava vid' kapitola 3.3.2.2) bolo odobraných približne 10 mg vzorky do krimpovacích vialiek, vždy v dvoch paralelných prevedeniach. Vzorky boli pripravené rovnakým postupom ako štandardy (vid' kapitola 3.3.3.1). Pripravené vzorky boli spoločne so štandardmi analyzované na plynovom chromatografe. GC-FID analýza bola prevádzaná vždy pre každú pasáž.

## 3.4 Porovnanie tolerancie adaptovaných kmeňov a divokého kmeňa *H. halophila* na osmotický stres

Pre posúdenie vhodnosti aplikácie evolučného inžinierstva na mikroorganizmy *Halomonas halophila* za účelom zlepšenia produkcie PHB boli porovnávané schopnosti tolerancie voči osmotickému stresu u adaptovaných mutantov a divokého kmeňa. Boli použité mutantné kmene získané z 15. a 30. pasáže, pri koncentrácii 35 g/l NaCl (HH35) a divoký kmeň *Halomonas halophila* CCM 3662. U divokého typu sa sledovala tolerancia voči hypoosmotickému prostrediu (35 g/l NaCl), naopak u adaptovaných mutantných kmeňov sa sledovala tolerancia na hyperosmotický stres (66 g/l NaCl).

### 3.4.1 Kultivácia adaptovaných kmeňov a divokého kmeňa pri zmenenej osmolarite

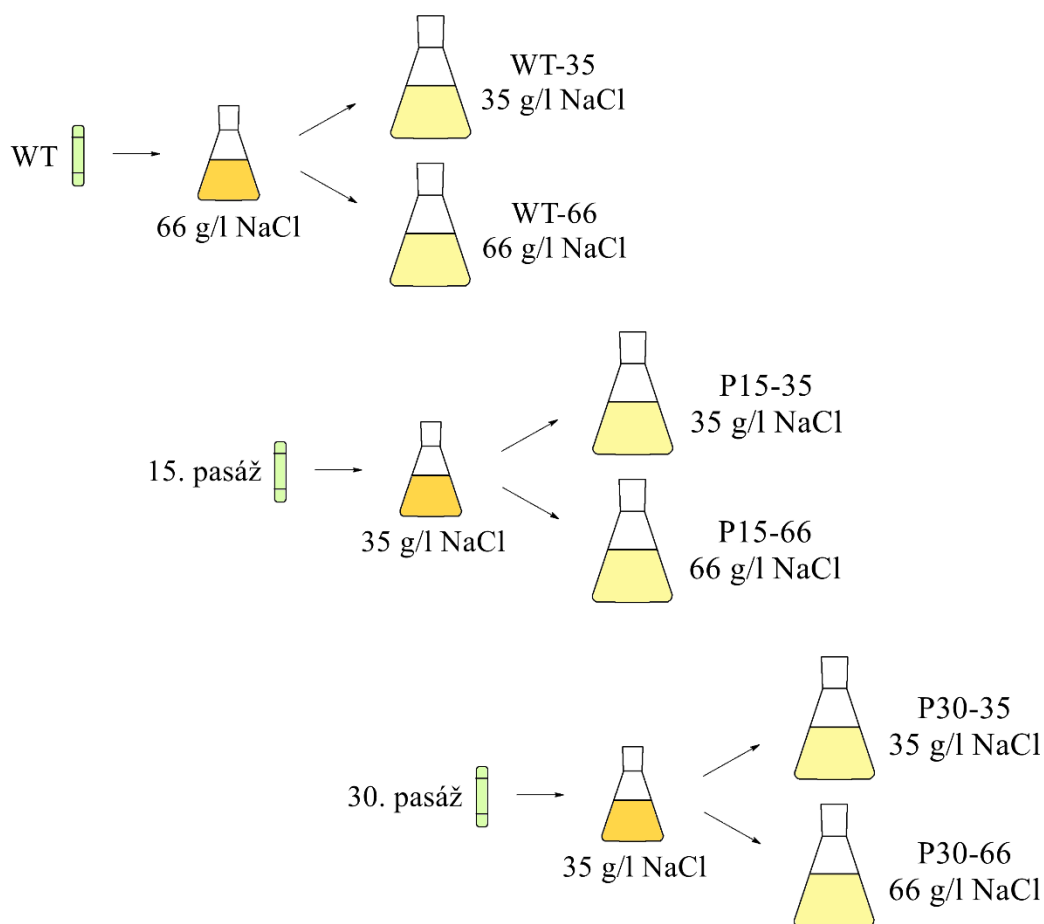
Kultivácia mikroorganizmov prebiehala vždy pri dvoch koncentráciách NaCl paralelne, a to 35 g/l a 66 g/l. Boli pripravené komplexné inokulá (príprava vid' kapitola 3.2.1) s koncentráciou NaCl 35 g/l u mutantných kmeňov a 66 g/l u divokého kmeňa. Inokulá boli zaočkované z kryoskúmaviiek. Pre ďalšie opisovanie boli zavedené skrátené označenia kmeňov, vid' Tabuľka 2.

Tabuľka 2: Označenia bakteriálnych kmeňov

kmeň + koncentrácia NaCl v kultivačnom médiu	označenie
divoký kmeň <i>H. halophila</i> , 35 g/l NaCl	WT-35
divoký kmeň <i>H. halophila</i> , 66 g/l NaCl	WT-66

mutantný kmeň <i>H. halophila</i> - 15. pasáž, 35 g/l NaCl	P15-35
mutantný kmeň <i>H. halophila</i> - 15. pasáž, 66 g/l NaCl	P15-66
mutantný kmeň <i>H. halophila</i> - 30. pasáž, 35 g/l NaCl	P30-35
mutantný kmeň <i>H. halophila</i> - 30. pasáž, 66 g/l NaCl	P30-66

Následne bola bakteriálna kultúra preočkovaná z inokula do dvoch produkčných médií s koncentraciami NaCl 35 g/l a 66 g/l (príprava a kultivácia vid' kapitola 3.2.2). Pre lepšie porozumenie je postup kultivácie bakteriálnych kmeňov znázornený na nasledujúcej schéme (vid' Obrázok 5).



Obrázok 5: Schéma kultivácie bakteriálnych kmeňov

### 3.4.1.1 Stanovenie obsahu biomasy a akumulovaného PHB

Stanovenie obsahu biomasy bolo prevádzané spektrofotometricky a gravimetricky rovnakým postupom ako v kapitole 3.3.2. Na stanovenie obsahu PHB v biomase bola použitá GC-FID analýza (postup vid' kapitola 3.3.3). Vzorky boli analyzované v dvoch, prípadne troch paralelných prevedeniach za účelom eliminácie chyby merania. Celá kultivačná séria bola prevedená v dvoch opakovaníach.

### 3.4.1.2 *Izolácia a charakterizácia polyméru PHB vyprodukovaného bakteriálnymi kmeňmi*

Na charakterizáciu fyzikálno-chemických vlastností PHB mutantných kmeňov a divokého typu, boli vyizolované polymérne filmy. Na analýzu boli použité pasáže 15 a 30 (35 g/l NaCl) a divoký typ, ktoré boli uchované v kryoskúmavkách. Kultivácia (viď kapitola 3.2) prebiehala pri dvoch koncentráciách NaCl, a to pri 35 a 66 g/l.

Ku cca 100 mg vysušenej biomasy (viď kapitola 3.3.2.2) v pyrex skúmavkách bolo pridaných 10 ml chloroformu a zmes bola extrahovaná v termobloku pri 70 °C po dobu 24 hodín. Po ukončení extrakcie boli skúmavky vychladené a prefiltrované cez hladký filter do Petriho misky. V digestóriu bol zo zmesi odparený chloroform a vyizolovaný polymér bol získaný vo forme filmu.

Izolované filmy PHB boli analyzované pomocou infračervenej spektroskopie s Fourierovou transformáciou (FTIR) na analyzátore Nicolet iS50 (Thermo Scientific) meracou technikou zoslabeného úplného odrazu (ATR) s použitím jednodrazového diamantového kryštálu. FTIR spektrá boli zmerané ako priemer 32 skenov v spektrálnom rozsahu 4 000 – 400 cm<sup>-1</sup> s rozlíšením 2 cm<sup>-1</sup>.

### 3.4.2 **Expozícia adaptovaných kmeňov a divokého kmeňa osmotickému šoku**

K analýze boli zvolené pasáže 15 a 30 (35 g/l NaCl), ktoré boli uchované v kryoskúmavkách pri teplote -80 °C. Na porovnanie vlastností bol použitý divoký kmeň *Halomonas halophila* CCM 3662. Pasáže boli oživené a následne rozkultivované (viď kapitola 3.2). Po 48 hodinách v produkčnom médiu bolo odobraných 10 ml kultúry, ktorá bola centrifugovaná pri 6 000 rpm po dobu 5 minút. Potom bol supernatant zliaty a sediment bol použitý na vystavenie osmotickému šoku. Pre porovnanie bola pripravená aj kontrola.

#### 3.4.2.1 *Hyperosmotický šok*

Ako hyperosmotické prostredie bol použitý fosfátový tlmiači roztok s koncentráciou soli 200 g/l NaCl. Na premývanie a kontrolu bol pripravený 50mM fosfátový roztok (pH = 7,4) s koncentráciou 35 g/l NaCl (66 g/l NaCl u divokého kmeňa).

Zloženie 50mM fosfátového roztoku (pH = 7,4):

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O            13,9 g
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O            1,8 g
- NaCl                            200 g; 35 g; 66 g
- destilovaná voda            1 000 ml

Jednotlivé chemikálie boli navážené na laboratórnych váhach a následne boli rozpustené v destilovanej vode za súčasného miešania na magnetickej miešačke.

Ku sedimentu kultúry bolo pridaných 10 ml fosfátového roztoku s 35 g/l NaCl u mutantných kmeňov, resp. 66 g/l NaCl u divokého kmeňa. Po dispergácii na vortexe bola zmes odstredená pri 6 000 rpm po dobu 5 minút. Supernatant bol opäť zliaty a k sedimentu bolo pridaných 10 ml fosfátového roztoku s 200 g/l NaCl. Po dispergácii bol obsah skúmavky prenesený do

Erlenmayerovej banky o objeme 50 ml a bol uložený na trepačku na 2 hodiny pri teplote 30 °C a 180 rpm.

#### **3.4.2.2 *Hypoosmotický šok***

Sediment kultúry bol premytý 10 ml destilovanej vody. Po dispergácii na vortexe bola zmes odstredená pri 6 000 rpm po dobu 5 minút. Supernatant bol zliaty a k sedimentu bolo pridaných 10 ml destilovanej vody. Po dispergácii bol obsah skúmavky prenesený do Erlenmayerovej banky o objeme 50 ml a bol uložený na trepačku na 1 hodinu pri teplote 30 °C a 180 rpm.

#### **3.4.2.3 *Kontrola***

Ku sedimentu kultúry bolo pridaných 10 ml fosfátového roztoku s 35 g/l NaCl u mutantných kmeňov, resp. 66 g/l NaCl u divokého kmeňa (viď kapitola 3.4.2.1). Po dispergácii na vortexe bola zmes odstredená pri 6 000 rpm po dobu 5 minút. Supernatant bol zliaty, k sedimentu bolo pridaných 10 ml fosfátového roztoku s 35 g/l NaCl (resp. 66 g/l NaCl) a zmes bola dispergovaná. Obsah skúmavky bol prenesený do Erlenmayerovej banky o objeme 50 ml a bol uložený na trepačku na 1 hodinu pri teplote 30 °C a 180 rpm.

#### **3.4.2.4 *Termogravimetrická analýza bakteriálnych buniek po pôsobení osmotického šoku***

Pre termogravimetrickú analýzu bola bakteriálna kultúra vystavená hyperosmotickému a hypoosmotickému šoku (viď. kap. 3.4.2.1 - 3.4.2.3). Po uplynutí určitej doby kultivácie v danom prostredí, boli odobrané 2 ml kultúry do eppendorfky, ktorá bola následne 2 minúty centrifugovaná pri 14 800 rpm. Bunková suspenzia bola dosušená vatovou tyčinkou od prebytočnej kvapaliny a bola premeraná na termogravimetrickom analyzátore Q5000 (TA Instruments) metódou izotermickej kalorimetrie.. Panvička so vzorkou bola zahriata na 70 °C a po dobu 40 minút bola zaznamenávaná hmotnosť vzorky pri tejto teplote. Následne bola vzorka zahriata na teplotu 200 °C, pri ktorej sa udržiavala 10 minút, kvôli dosušeniu zvyškovej vody vo vzorke.

#### **3.4.2.5 *Stanovenie viability baktérií po pôsobení osmotického šoku pomocou prietokovej cytometrie***

Viabilita baktérií bola sledovaná po prekonaní hyperosmotického a hypoosmotického šoku. Pre porovnanie bola prevedená aj kontrola v prostredí bez pôsobenia osmotického stresu.

Po uplynutí určitej doby kultivácie v danom prostredí (viď kapitola 3.4.2.1 - 3.4.2.3), bolo z Erlenmayerových baniek odobratých 5 µl bakteriálnej kultúry, ktoré boli následne zriedené 995 µl 50mM fosfátového roztoku. Pripravené zriedené vzorky boli ofarbené roztokom propidium jodidu a po uplynutí približne 10 min bola premeraná viabilita buniek na prietokovom cytometri Apogee A50 (Apogee Flow Systems).

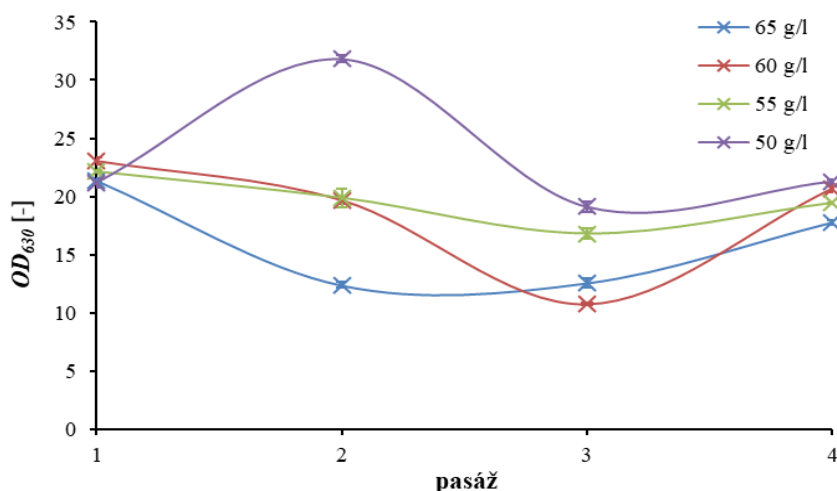
## 4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

### 4.1 Adaptačný experiment s nižšou intenzitou hypoosmotického stresu

Pre optimalizáciu postupu experimentov a základný skríning vhodných stresových dávok pre následnú systematickú štúdiu evolučného inžinierstva s použitím osmotického stresu, bol prevedený krátkodobý experiment. V experimente bol na pôvodný bakteriálny kmeň *H. halophila* aplikovaný mierny osmotický stres v podobe zníženia optimálnej koncentrácie 66 g/l NaCl v médiu na 65; 60; 55 a 50 g/l NaCl (príprava a kultivácia vid' kapitola 3.2). Sériová kultivácia (vid' kapitola 3.3.1) bola prevádzaná po dobu 4 pasáží, za účelom zistenia schopnosti tolerancie baktérií už na mierne odchýlky od optimálnych hodnôt.

#### 4.1.1 Obsah biomasy v jednotlivých pasážach sériovej kultivácie

Základný skríning obsahu biomasy v kultivačnom médiu bol realizovaný spektroskopicky. Vzorky (príprava vid' kapitola 3.3.2.1) s koncentráciou 65-50 g/l NaCl v kultivačnom médiu boli pred analýzou zriedené 50krát. Každá vzorka bola premeraná 3krát pri vlnovej dĺžke 630 nm oproti destilovanej vode.

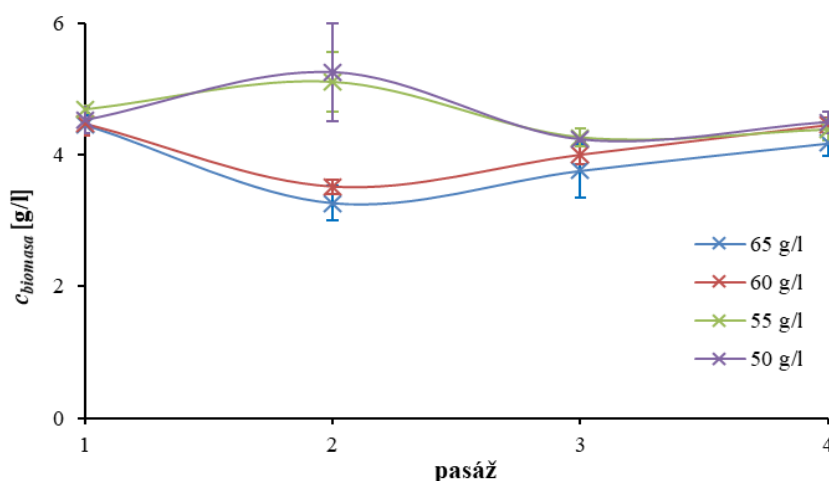


Obrázok 6: Hodnoty optickej hustoty pri 630 nm jednotlivých pasáží sériovej kultivácie *H. Halophila* pri rôznych koncentráciách NaCl mierne znížených oproti optimu

Výsledky spektrofotometrického merania ukázali schopnosť halofilného bakteriálneho kmeňa *H. Halophila* tolerovať mierne zníženú koncentráciu NaCl v médiu. Pri žiadnej hodnote koncentrácie nedošlo k usmrteniu kultúry, na základe čoho bolo usúdené, že v experimente je možné pokračovať. Z hodnôt vyplýva, že najväčší obsah biomasy bol nameraný práve pri najnižšej koncentrácii, a to 50 g/ NaCl u 2. pasáže, pričom najmenší obsah bol zaznamenaný pri 60 g/l NaCl u 3. pasáže (vid' Obrázok 6). Hodnoty u poslednej 4. pasáže, poklesli len veľmi nepatrne poklesli oproti hodnotám z 1. pasáže. U kmeňa rastúcom pri 50 g/l bol zaznamenaný dokonca malý nárast o 0,47 % oproti 1. pasáži.

Pre potvrdenie záveru spektroskopického skríningu obsahu buniek pri úvodnom adaptačnom experimente bol obsah biomasy stanovovaný aj gravimetrickou metódou, nakoľko sa táto metóda považuje za presnejšiu ako spektrofotometrické stanovenie. Vysušené vzorky (príprava

vid' kapitola 3.3.2.2) s koncentráciou 65-50 g/l NaCl v médiu boli zvážené na analytických váhach.



Obrázok 7: Gravimetricky stanovený obsah biomasy v jednotlivých pasážach sériovej kultivácie *H. Halophila* pri rôznych koncentráciách NaCl mierne znížených oproti optimu

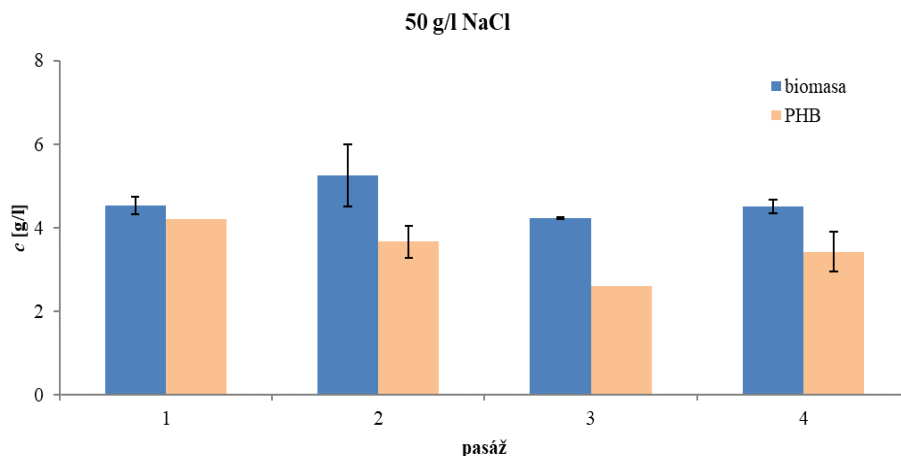
Ako je možné vidieť na výsledkoch, trend hodnôt sa úplne nezhoduje s hodnotami získanými pomocou merania optickej hustoty, preto sa ďalej vykonávali obe metódy stanovenia obsahu biomasy, v snahe eliminácie chyby merania. Z výsledkov ale taktiež vyplýva, že najväčší obsah biomasy (5,25 g/l) bol zaznamenaný v 2. pasáži pri koncentrácii 50 g/l NaCl a najnižší (3,26 g/l) v 2. pasáži pri 65 g/l NaCl (vid' Obrázok 7). Hodnoty u poslednej 4. pasáže pri všetkých koncentráciách iba mierne poklesli oproti 1. pasáži, pričom pokles nebol ani u jedného kmeňa väčší ako 7 %.

Krátkodobý experiment optimalizácie podmienok preukázal, že stratégia evolučného inžinierstva použitá na bakteriálny kmeň *Halomonas halophila* s využitím hypoosmotického stresu ako selekčného faktoru môže byť aplikovateľná. Baktérie, aj napriek svojej halofilnej povahe, boli schopné tolerovať zníženie osmolarity kultivačného prostredia. Podľa obidvoch stanovení obsahu biomasy nedošlo pri žiadnej hodnote koncentrácie NaCl k usmrteniu populácie, a aj po 4 pasážach sériovej kultivácie, bola koncentrácia buniek takmer totožná s hodnotami ako na začiatku experimentu.

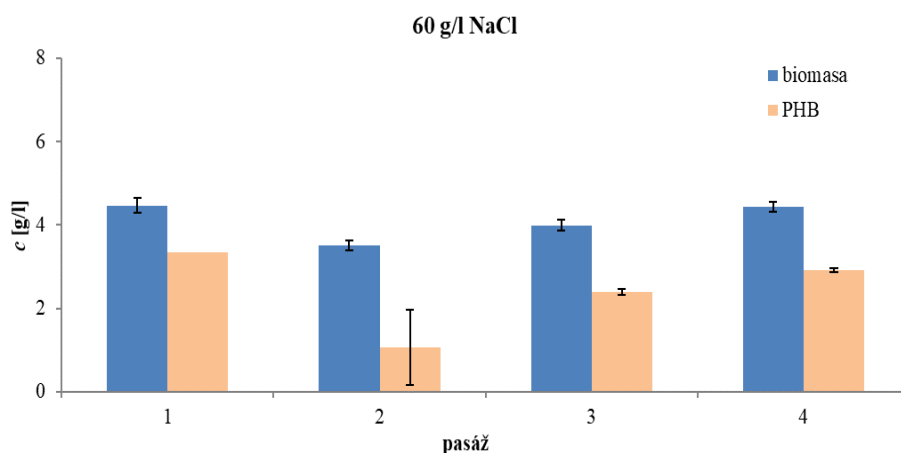
#### 4.1.2 Obsah PHB v jednotlivých pasážach sériovej kultivácie

Jedným z kľúčových cieľov práce, bolo overiť vzťah medzi salinitou kultivačného média a mierou akumulácie PHB v bunkách, a v nadväznosti na to, posúdiť využiteľnosť aplikácie osmotického stresu v spojení s evolučným inžinierstvom za účelom zvýšenej produkcie PHB. Preto aj v úvodnom experimente, zameranom na expozíciu kmeňa *H. halophila* nízkym dávkam hypoosmotického stresu, bol meraný obsah akumulovaného polyméru vo vzorkách metódou GC-FID (príprava vid' kapitola 3.3.3.2). Z výsledných chromatogramov boli odčítané plochy píkovej daného analytu (3HB) a pomocou kalibračnej priamky (vid' príloha kapitola 8.1) bol prepočítaný obsah PHB v biomase. Stanovené obsahy sú znázornené na nasledujúcich

grafických závislostiach (viď Obrázok 8 a Obrázok 9) a v prílohe v kapitola 8.2, a to pre prehľadnosť v porovnaní s celkovým obsahom biomasy.



Obrázok 8: Porovnanie obsahu PHB a celkového obsahu biomasy v jednotlivých pasážach sériovej kultivácie *H. Halophila* pri 50 g/l NaCl



Obrázok 9: Porovnanie obsahu PHB a celkového obsahu biomasy v jednotlivých pasážach sériovej kultivácie *H. Halophila* pri 60 g/l NaCl

Z vyhodnotenia bolo zistené, že baktérie aj za pôsobenia hyposmotického stresu akumulovali intracelulárne granule PHB. Bakteriálny kmeň kultivovaný pri 50 g/l NaCl v médiu vykazoval najvyššie hodnoty akumulovaného PHB a to až 95,94 % hmotnosti sušiny (1. pasáž), čo predstavuje koncentráciu 4,2 g/l PHB v biomase (viď Obrázok 8). Najnižší obsah PHB bol vyprodukovaný kmeňom rastúcim pri 60 g/l NaCl, kde bola priemerná produkcia PHB o 30 % menšia (viď Obrázok 9). Po krátku dobu riadenej evolúcie si bakteriálny kmeň pri 50 g/l NaCl udržal najvyššie hodnoty obsahu PHB zo všetkých koncentrácií NaCl (viď príloha kapitola 8.2), pričom po 4. pasážach baktérie produkovali o 18,57 % menej PHB ako v 1. pasáži.

Z výsledkov stanovenia obsahu PHB ďalej vyplýva, že obsah naakumulovaného PHB u poslednej pasáže neklesol pri žiadnej koncentrácii NaCl pod 60 % suchej hmotnosti biomasy, čo predstavovalo ďalšiu motiváciu pre pokračovanie v experimente evolučného inžinierstva.

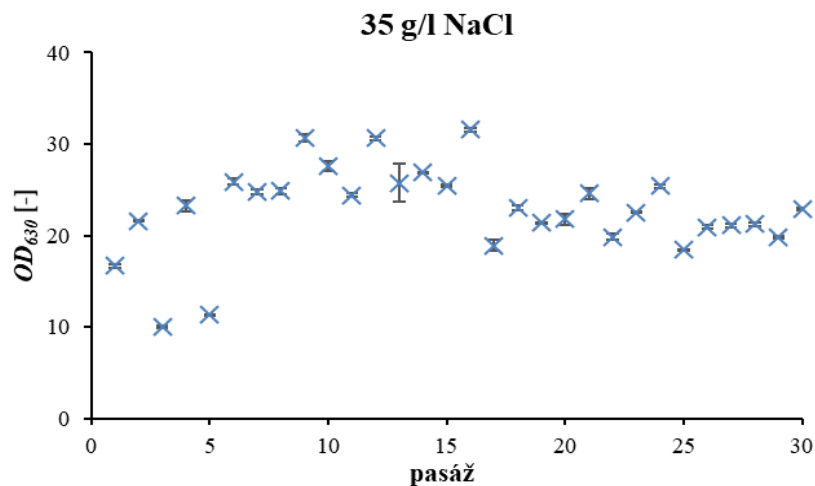
## 4.2 Adaptačný experiment s vyššou intenzitou hypoosmotického stresu

Z výsledkov úvodného experimentu zameraného predovšetkým na optimalizáciu experimentálnych podmienok, vyplynula dobrá tolerancia použitého kmeňa *H. Halophila* na mierne zníženie salinity kultivačného prostredia. V nadväzujúcom systematickom evolučnom experimente, ktorý tvorí hlavnú experimentálnu časť práce, boli preto čiastočne adaptované bakteriálne kmene vystavené ešte väčšiemu osmotickému stresu (zníženie na 45; 40; 35; 30 g/l NaCl), v snahe zvýšenia intenzity selekčného faktoru a prípadne zistenia hranice minimálnej koncentrácie soli, nevyhnutnej pre rast buniek.

### 4.2.1 Obsah biomasy kmeňov adaptovaných na hypoosmotický stres

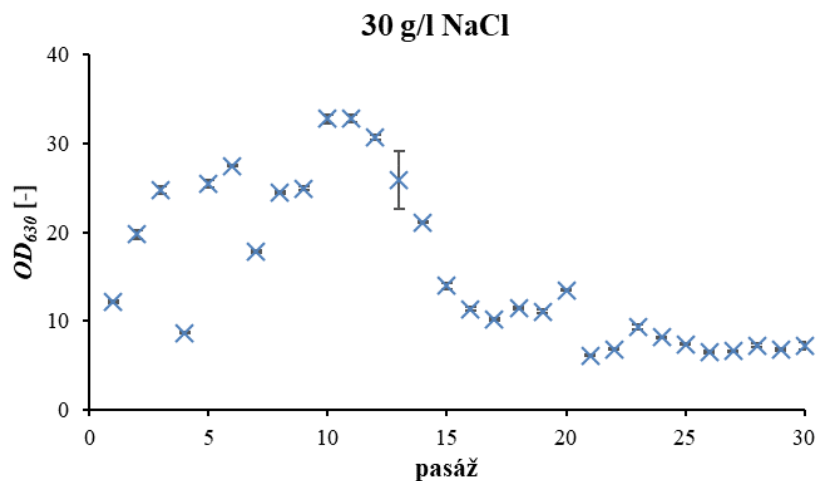
Počas adaptívnej laboratórnej evolúcie pri aplikácii vyššej miery selekčného tlaku v podobe hypoosmotického stresu, bol stanovovaný obsah biomasy v závislosti na počte pasáží, za účelom zistenia schopnosti tolerancie voči tomuto stresu. Meranie prebiehalo u každej pasáže pri všetkých koncentráciách NaCl samostatne (45-30 g/l). Stanovenie bolo uskutočnené spektroskopicky a gravimetricky, a to vždy v dvoch paralelných prevedeniach, za účelom vyššej presnosti stanovenia obsahu.

Pri spektroskopickom stanovení obsahu biomasy boli vzorky (príprava viď 3.3.2.1) pred samotným meraním zriedené 50krát (prípadne 20krát), aby namerané hodnoty spadali do oblasti, kde dochádza k lineárnej korelácii hodnoty optickej hustoty a koncentrácie buniek. Množstvo biomasy bolo po premeraní prepočítané na pôvodnú nezriedenú kultúru.



Obrázok 10: Hodnoty optickej hustoty pri 630 nm jednotlivých pasáží kmeňa HH35





Obrázok 11: Hodnoty optickej hustoty pri 630 nm jednotlivých pasáží kmeňa HH30

Spektrofotometricky bol sledovaný vývoj bakteriálnych kultúr po dobu 30 pasáží sériovej kultivácie. Hodnoty optickej hustoty kmeňov HH35 a HH30 vid' Obrázok 10 a Obrázok 11, pre kmene HH45 a HH40 vid' príloha kapitola 8.3.

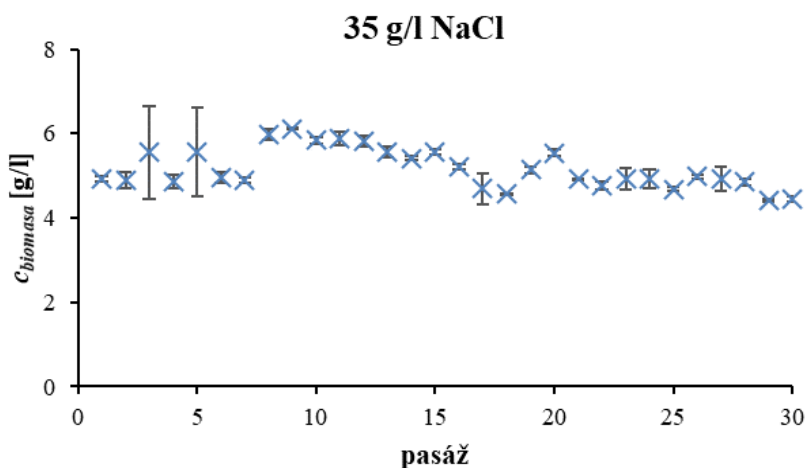
Vzhľadom na viditeľné odchýlky a nie veľmi konštantné hodnoty, bolo spektrofotometrické stanovenie viac-menej orientačné. Napriek týmto odchýlkam je stále možné pozorovať, že priemere najväčší obsah biomasy bol vyprodukovaný adaptovaným kmeňom HH35 rastúcim pri koncentrácii 35 g/l NaCl (vid' Obrázok 10), pričom u 30. pasáže došlo k zvýšeniu obsahu biomasy až o 37,37 % oproti 1. pasáži. Naopak najnižšiu toleranciu na nepriaznivé podmienky vykazoval bakteriálny kmeň HH30 (vid' Obrázok 11). Po dosiahnutí maximálneho obsahu biomasy u 11. pasáže ( $OD_{630} = 32,82$ ), začala koncentrácia buniek v kultúre výrazne klesať až do ukončenia experimentu, kedy obsah biomasy poklesol až o 41,15 % oproti počiatočnej hodnote.

Obsah celkovej biomasy v bakteriálnych kultúrach bol podobne ako v úvodnom experimente stanovovaný taktiež pomocou gravimetrickej metódy (vid' kapitola 3.3.2.2). Keďže pri gravimetrickom stanovovaní nedochádzalo k vzniku značne viditeľných odchýlok, bola táto metóda považovaná za presnejšiu ako stanovenie pomocou merania optickej hustoty. Gravimetricky stanovené obsahy biomasy pre vybrané pasáže adaptovaných kmeňov znázorňuje Tabuľka 3.

Tabuľka 3: Gravimetrické stanovenie obsahu biomasy u adaptovaných kmeňov

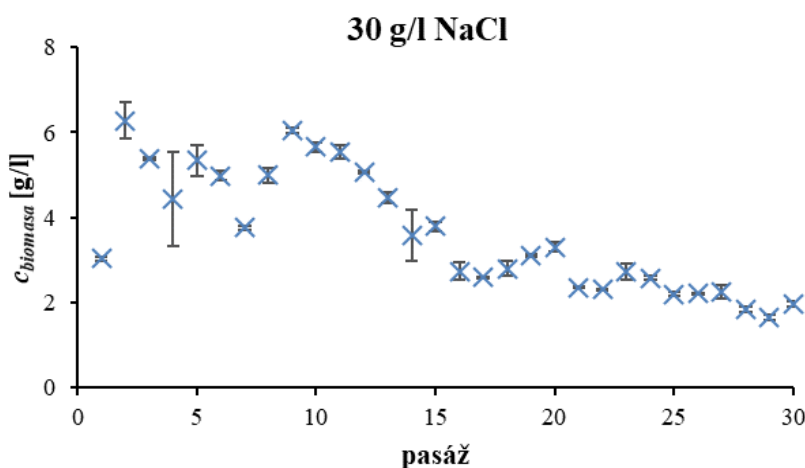
adaptovaný kmeň	pasáž	$\phi c_{biomasa}$ [g/l]
HH45	1	$4,18 \pm 0,16$
	15	$3,92 \pm 0,06$
	30	$4,22 \pm 0,40$
HH40	1	$4,24 \pm 0,06$
	15	$4,12 \pm 0,21$
	30	$4,05 \pm 0,10$
HH35	1	$4,93 \pm 0,06$
	15	$5,58 \pm 0,06$

<b>HH30</b>	30	$4,45 \pm 0,05$
	1	$3,03 \pm 0,05$
	15	$3,79 \pm 0,11$
	30	$1,95 \pm 0,06$



Obrázok 12: Obsah biomasy jednotlivých pasáží kmeňa HH35

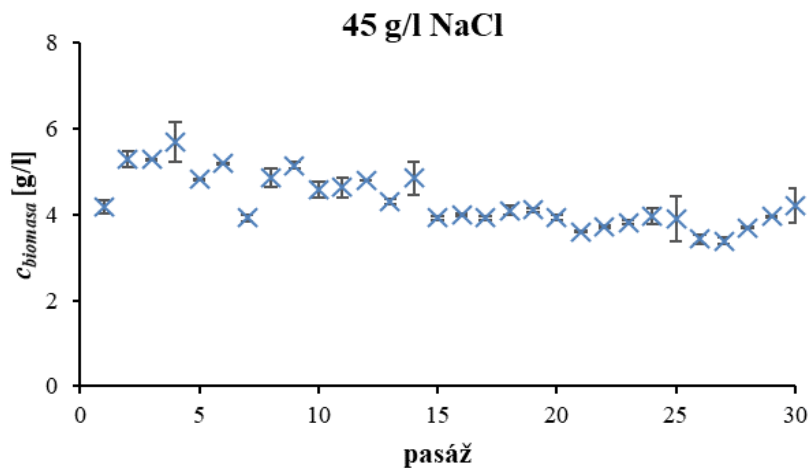
V priemere najväčší obsah biomasy bol za celú dobu kultivácie vyprodukovaný kmeňom kultivovaným pri koncentrácii 35 g/l NaCl, pričom najvyššia hodnota bola zaznamenaná u 9. pasáže (6,12 g/l) (viď Obrázok 12). U tohto kmeňa bola pozorovaná značná adaptácia na osmotický stres v priebehu celej kultivácie, počas ktorej si mutantný kmeň HH35 zachoval takmer konštantné hodnoty obsahu biomasy. Po ukončení experimentu riadenej evolúcie došlo k poklesu koncentrácie buniek iba o 9,74 % oproti 1. pasáži, pričom táto finálna hodnota bola stále najvyššia v porovnaní s ostatnými kmeňmi (viď Tabuľka 3).



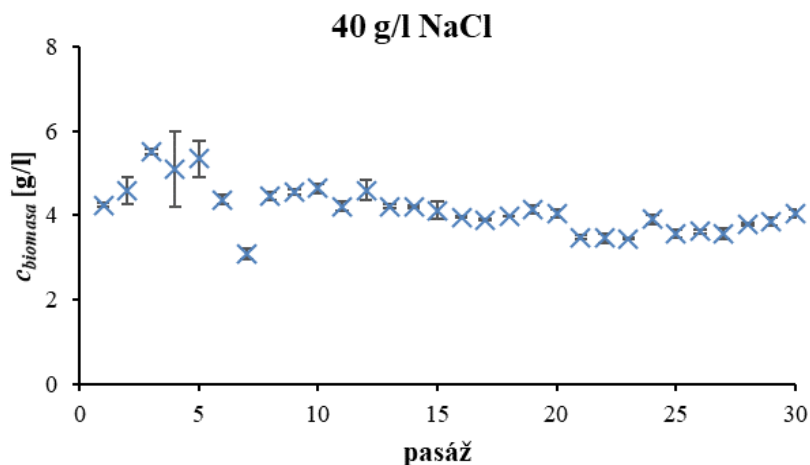
Obrázok 13: Obsah biomasy jednotlivých pasáží kmeňa HH30

Najmenšiu toleranciu na osmotický stres vykazoval kmeň rastúci pri 30 g/l NaCl. Napriek zaznamenaní pomerne vysokého obsahu biomasy u 9. pasáže (6,04 g/l), dochádzalo od tohto

bodou k náhlemu poklesu koncentrácie buniek, a to až na hodnotu 1,95 g/l u 30. pasáže (viď Obrázok 13). Oproti hodnotám na začiatku experimentu teda obsah biomasy poklesol o 35,64 %. Nízky obsah biomasy v bakteriálnych kultúrach kmeňa HH30, mohol byť spôsobený príliš nízkou koncentráciou soli v médiu, ktorá halofilným baktériám obmedzovala rastové podmienky. Taktiež sa nevylučuje možnosť, že tieto nízke hodnoty mohli byť spôsobené potenciálnou kontamináciou určitej bakteriálnej kultúry, ktorá v procese sériovej kultivácie ďalej expandovala.



Obrázok 14: Obsah biomasy jednotlivých pasáží kmeňa HH45



Obrázok 15: Obsah biomasy jednotlivých pasáží kmeňa HH40

Kmene *H. Halophila* sériovo kultivované pri 45 a 40 g/l NaCl, vykazovali veľmi podobné hodnoty obsahu biomasy počas celého experimentu (viď Tabuľka 3). Maximálne hodnoty dosiahli v 3. a 4. pasáži a priemerný obsah biomasy v bakteriálnych kultúrach bol 4,31 g/l (HH45) a 4,13 g/l (HH40). Po 7. pasáži bola pozorovaná adaptácia, ktorá sa prejavila v podobe takmer konštantných hodnôt koncentrácie buniek až do ukončenia experimentu riadenej evolúcie (viď Obrázok 14 a Obrázok 15). U poslednej pasáže kmeňa HH45, bola koncentrácia skoro totožná, dokonca nepatrne vyššia, v porovnaní s koncentráciou buniek v prvej pasáži,

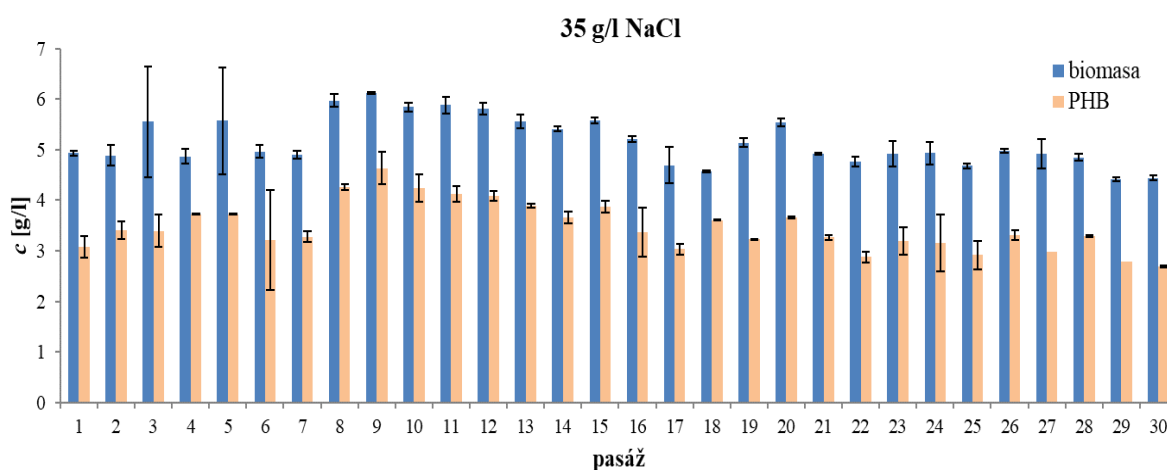
pričom obsah biomasy kmeňa HH40 poklesol oproti počiatočnej hodnote len o 4,48 %. Z výsledkov teda vyplýva, že oba kmene sa na osmotický stres dokázali adaptovať.

#### 4.2.2 Obsah PHB akumulovaného mutantnými kmeňmi adaptovanými na hypoosmotický stres

Prostredníctvom GC-FID analýzy bola opäť sledovaná produkcia polyméru PHB u jednotlivých pasáží sériovej kultivácie *H. Halophila* pri jednotlivých koncentráciách NaCl. Stanovenie bolo uskutočnené vždy v dvoch paralelných pokusoch, za účelom zvýšenia presnosti stanovenia. Výsledky stanovenia obsahu PHB pre vybrané pasáže vid' Tabuľka 4, pre všetky pasáže vid' Obrázok 16 - Obrázok 19.

Tabuľka 4: Stanovenie obsahu biomasy a PHB u adaptovaných kmeňov

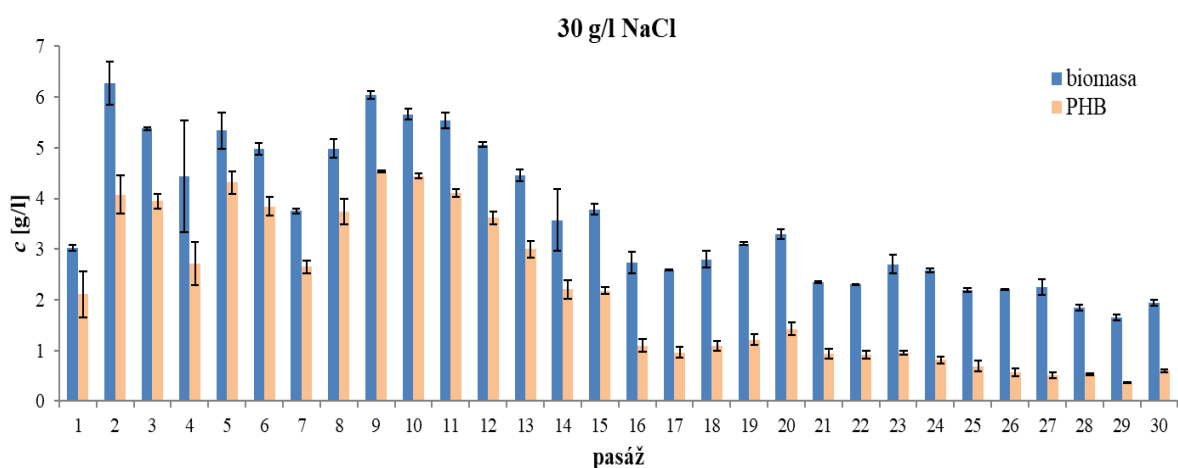
adaptovaný kmeň	pasáž	$c_{biomasa}$ [g/l]	PHB [hm. %]	PHB [g/l]
HH45	1	4,18 ± 0,16	63,01 ± 2,30	2,63 ± 0,00
	15	3,92 ± 0,06	56,48 ± 1,02	2,21 ± 0,01
	30	4,22 ± 0,40	58,70 ± 4,79	2,46 ± 0,03
HH40	1	4,24 ± 0,06	63,49 ± 2,01	2,69 ± 0,12
	15	4,12 ± 0,21	60,64 ± 3,20	2,49 ± 0,01
	30	4,05 ± 0,10	58,49 ± 2,18	2,37 ± 0,03
HH35	1	4,93 ± 0,06	62,41 ± 3,48	3,08 ± 0,21
	15	5,58 ± 0,06	69,60 ± 1,32	3,88 ± 0,12
	30	4,45 ± 0,05	60,60 ± 0,22	2,69 ± 0,02
HH30	1	3,03 ± 0,05	69,58 ± 13,81	2,11 ± 0,45
	15	3,79 ± 0,11	57,64 ± 0,21	2,18 ± 0,07
	30	1,95 ± 0,06	30,88 ± 0,55	0,60 ± 0,03



Obrázok 16: Obsah biomasy a PHB u jednotlivých pasáží kmeňa HH35

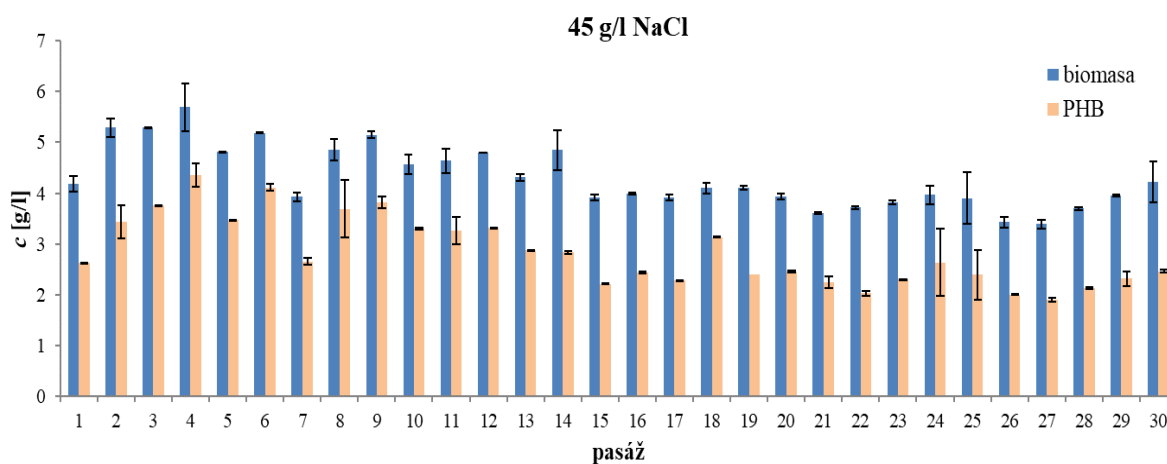
Najvyššia produkcia polyméru PHB bola zaznamenaná u mutantného kmeňa HH35, u ktorého bol počas riadenej evolúcie priemerný obsah PHB 3,47 g/l. Maximálny obsah bol

vyprodukovaný kmeňom HH35 v 9. pasáži, kedy jeho koncentrácia vzrástla od začiatku experimentu o 50,32 % na 4,63 g/l PHB. Z dlhodobého pozorovania si tento kmeň udržal pomerne konštantne vysoké hodnoty obsahu polyméru PHB, v porovnaní s ostatnými kmeňmi, a to aj po ukončení experimentu (viď Tabuľka 4). Napriek zaznamenaniu určitého nárastu koncentrácie PHB v priebehu sériovej kultivácie, došlo u poslednej pasáže k poklesu obsahu PHB o 12,66 % oproti prvej pasáži (viď Obrázok 16). Z vysokého obsahu biomasy, sprevádzaného zvýšenou produkciou PHB vyplýva, že mutantný kmeň HH35 vykazoval najlepšie adaptačné schopnosti na osmotický stres, podľa čoho bola koncentrácia 35 g/l NaCl v médiu posúdená za najvhodnejšiu pre ďalšie analýzy.

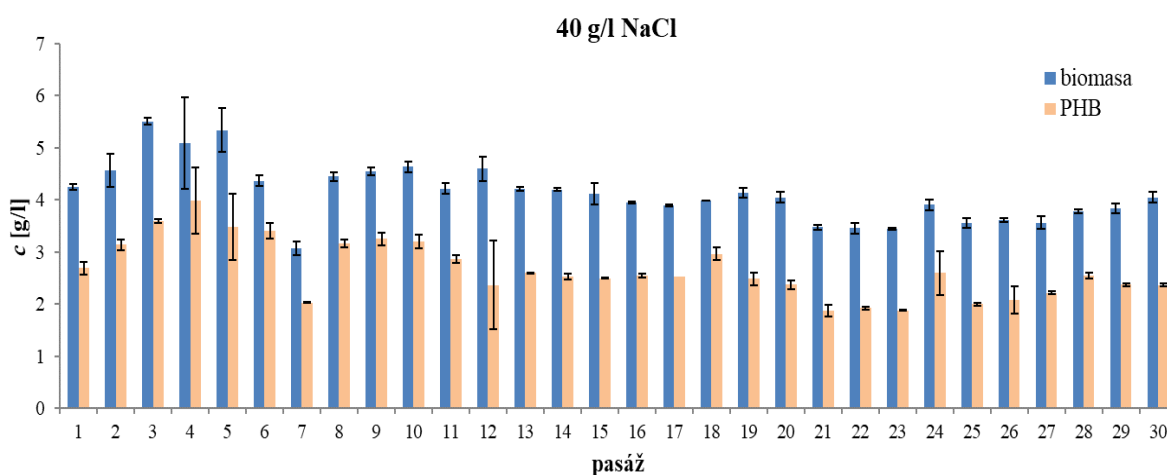


Obrázok 17: Obsah biomasy a PHB u jednotlivých pasáží kmeňa HH30

Osmotickému stresu najmenej odolával kmeň HH30, čo sa prejavilo ako na biomase, tak aj na produkcii polyméru. Na základe stanovenia obsahu biomasy bolo jasné, že dochádzalo k postupnému vymieraniu bakteriálnej kultúry, čo značne ovplyvňovalo aj intracelulárnu produkciu PHB. Obsah polyméru klesol u 29. pasáže až na 0,36 g/l PHB, čo bola najnižšia zaznamenaná hodnota spomedzi všetkých mutantných kmeňov. Navzdory tomu, že kmeň HH30 do 9. pasáže vykazoval zvýšenie produkcie PHB, dochádzalo od tohto momentu k značnému poklesu, kedy produkcia PHB u poslednej pasáže bola v porovnaní s prvou pasážou nižšia až o 71,56 % (viď Obrázok 17). Z výsledkov je teda možné pozorovať, že koncentrácia 30 g/l NaCl v médiu je príliš nízka a nie je vhodná pre dlhodobý experiment adaptívnej evolúcie.



Obrázok 18: Obsah biomasy a PHB u jednotlivých pasáží kmeňa HH45



Obrázok 19: Obsah biomasy a PHB u jednotlivých pasáží kmeňa HH40

Kmene HH45 a HH40 rovnako ako pri stanovení obsahu biomasy, vykazovali podobné hodnoty aj v produkcii PHB (viď Tabuľka 4). Priemerne vyprodukované množstvo PHB bolo 2,83 g/l u kmeňa HH45 a 2,65 g/l u kmeňa HH40. Oba kmene zaznamenali maximálne hodnoty u 4. pasáže (HH45: 4,35 g/l; HH40: 3,99 g/l), po ktorej produkcia polyméru mierne klesla. Z dlhodobého hľadiska bol však u týchto kmeňov zaznamenaný najmenší rozdiel v porovnaní hodnôt na začiatku a na konci experimentu, a to konkrétne u kmeňa HH45, u ktorého došlo k poklesu len o 6,46 % (viď Obrázok 18). Adaptačná schopnosť týchto dvoch kmeňov bola veľmi podobná. Oba kmene znášali osmotický stres pomerne dobre, ale čo sa týka pomeru biomasy a PHB, hodnoty neboli také perspektívne ako u kmeňa HH35.

Pôsobenie osmotického stresu vyvolalo určité zvýšenie koncentrácie PHB u každého kmeňa, z čoho vyplýva, že zmena osmotického tlaku môže byť pozitívnym nástrojom na zvýšenie produkcie určitých metabolitov. Z hľadiska konceptu evolučného inžinierstva, však k dosiahnutiu maximálnych hodnôt produkcie PHB došlo v rôznych pasážach. U kmeňov HH45 a HH40 bolo maximum produkcie v 4. pasáži a u kmeňov HH30 a HH35 v 9. pasáži, teda krátkodobá sériová kultivácia sa ukázala efektívnejšia ako dlhodobá. Okrem kmeňa HH30

si však ostatné mutantné kmene udržali pomerne konštantné hodnoty po zvyšok evolúcie, z čoho bolo možné pozorovať určitú adaptáciu. Kvôli obmedzeným časovým podmienkam bola riadená evolúcia uskutočnená len po dobu 30. pasáží, čo z klasických prístupov evolučného inžinierstva nie je dostatočne dlhá doba na adaptáciu organizmov na rozdielne podmienky. Preto je možné, že ak by experiment prebiehal po dlhšiu dobu ako 30. pasáží, mohlo by dôjsť k zvýšeniu schopnosti tolerancie. Pri návrhu takéhoto nadväzujúceho experimentu, je však možné na základe tu uvedených výsledkov odporučiť koncentráciu 35 g/l NaCl ako vhodnú mieru selekčného tlaku.

### **4.3 Porovnanie tolerancie adaptovaných kmeňov a divokého kmeňa *H. halophila* na osmotický stres**

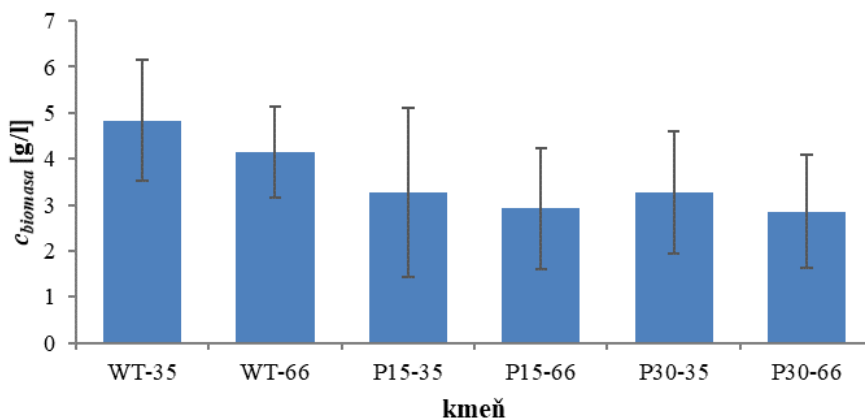
#### **4.3.1 Porovnanie rastových a produkčných vlastností bakteriálnych kmeňov v prostredí o rôznej salinite**

Pre porovnanie schopnosti tolerovať rôzne osmotické prostredia, bol vybraný mutantný kmeň HH35 rastúci pri 35 g/l NaCl v médiu a divoký kmeň *Halomonas halophila*. Kmeň HH35 bol zvolený na základe vyhodnotenia uskutočnených analýz, kde vykazoval najlepšie adaptačné schopnosti a najväčšiu produkciu PHB spomedzi ostatných kmeňov. Pre analýzu boli vybrané pasáže 15 a 30. Adaptované kmene a divoký typ boli kultivované pri 35 resp. 66 g/l NaCl aby sa porovnala ich robustnosť – rozdiel rastových a produkčných schopností pri náhlejšej zmene z ich optimálnych podmienok na prostredie so zmeneným osmotickým tlakom (kultivácia vid' kapitola 3.4.1). Experimenty boli prevedené v troch sériách pokusov aby sa eliminovali chyby merania.

##### **4.3.1.1 Porovnanie obsahu biomasy pri kultivácii divokého a adaptovaných kmeňov v prostredí o rôznej salinite**

Stanovenie obsahu biomasy v jednotlivých bakteriálnych kultúrach bolo uskutočnené pomocou spektrofotometrickej a gravimetrickej metódy. Príprava vzoriek vid' kapitola 3.3.2.

Nakoľko spektrofotometrická metóda bola kvôli väčšej chybe merania považovaná len za orientačnú, bola pre vyhodnotenie použitá predovšetkým gravimetrická analýza. Výsledky spektrofotometrického stanovenia obsahu biomasy vid' príloha kapitola 8.4. Pomocou presnejšej gravimetrickej metódy bol stanovený obsah biomasy vo vzorkách jednotlivých kmeňov po 48 hodinách kultivácie.



Obrázok 20: Gravimetrické stanovenie obsahu biomasy pri porovnaní jednotlivých kmeňov

Z výsledkov je možné pozorovať, že najväčší obsah biomasy bol zaznamenaný u divokého kmeňa (vid' Obrázok 20), adaptované kmene vykazujú nižšiu produkciu biomasy, a to ako pri osmolarite, na ktorú boli adaptované, tak aj pri vyššom obsahu soli. Za určitý experimentálny prejav adaptácie kmeňov na nižšiu salinitu by mohla byť považovaná nižšia produkcia biomasy oboch adaptovaných kmeňov pri vyššej koncentrácii soli. Mierne vyššie hodnoty sa vyskytovali u kmeňov P15-35 a P30-35, teda opätovné vloženie do optimálneho prostredia nemalo pozitívny vplyv na produkciu biomasy. Najnižší obsah biomasy bol zaznamenaný u kmeňa P30-66, a to 2,85 g/l biomasy. Na druhej strane, napriek známej optimálnej koncentrácii 66 g/l NaCl pre divoký kmeň bola vyššia hodnota obsahu biomasy aj v jeho prípade prekvapivo zaznamenaná u kmeňa WT-35 (kultivovaný pri 35 g/l NaCl), a to 4,84 g/l. Pre vysvetlenie tohto javu a vyvodenie jednoznačnejších záverov o rastových vlastnostiach porovnávaných kmeňov by bola nutná hlbšia analýza kinetiky rastu (porovnanie tvaru rastových kriviek).

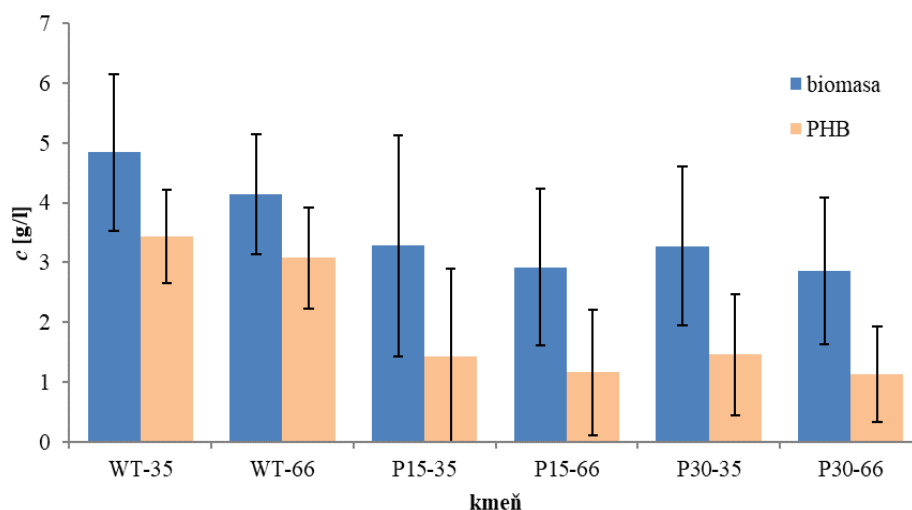
#### 4.3.1.2 Porovnanie obsahu PHB pri kultivácii divokého a adaptovaných kmeňov v prostredí o rôznej salinite

Stanovenie obsahu PHB naakumulovaného bakteriálnymi kmeňmi prostredníctvom plynovej chromatografie, bolo prevádzané rovnako ako v kapitole. Príprava vzoriek vid' kapitola 3.3.3.2.

Tabuľka 5: Hodnoty obsahu biomasy a PHB pri porovnaní jednotlivých kmeňov

kmeň	$C_{biomasa}$ [g/l]	PHB [hm. %]	PHB [g/l]
<b>WT-35</b>	4,84 ± 1,31	71,61 ± 2,98	3,44 ± 0,78
<b>WT-66</b>	4,15 ± 1,00	74,04 ± 5,45	3,08 ± 0,85
<b>P15-35</b>	3,28 ± 1,85	36,39 ± 19,64	1,42 ± 1,48
<b>P15-66</b>	2,92 ± 1,32	35,12 ± 16,41	1,16 ± 1,05
<b>P30-35</b>	3,27 ± 1,33	39,52 ± 19,15	1,46 ± 1,02
<b>P30-66</b>	2,85 ± 1,23	34,69 ± 17,03	1,13 ± 0,79





Obrázok 21: Stanovenie obsahu biomasy a PHB pri porovnaní jednotlivých kmeňov

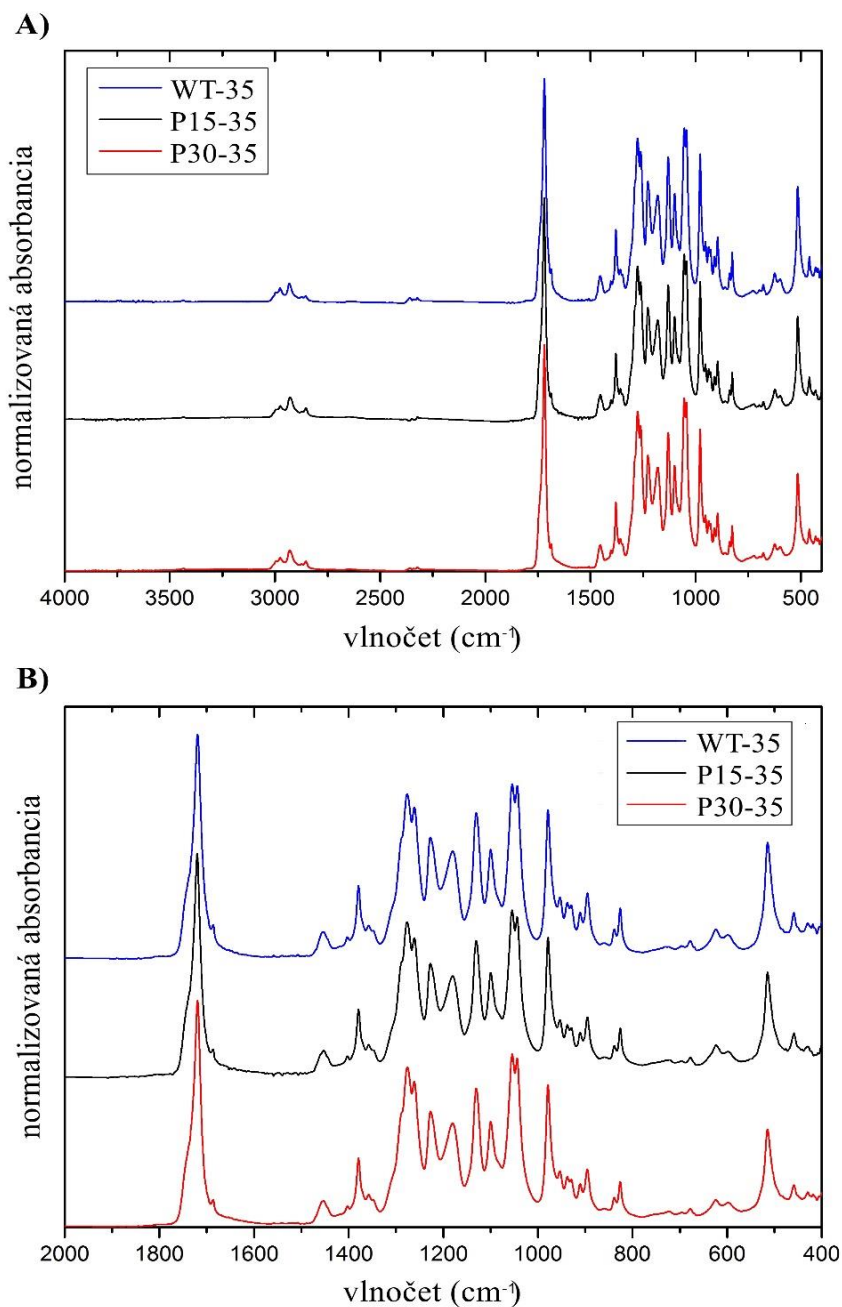
Na základe vyhodnotenia je možné pozorovať, že maximálna produkcia PHB bola u divokého kmeňa WT-35, a to 3,44 g/l (viď Tabuľka 5 a Obrázok 21). Oproti optimálnym podmienkam, v ktorých rástol kmeň WT-66, bola táto koncentrácia vyššia 10,47 %, z čoho vyplýva, že osmotický stres v určitej miere pozitívne ovplyvnil produkciu PHB u divokého kmeňa, nie však veľmi výrazne. U mutantných kmeňov boli hodnoty takmer zhodné ako v prípade stanovenia obsahu biomasy (viď Obrázok 21). Maximálny obsah PHB u adaptovaných mutantov bol vyprodukovaný kmeňom P30-35, u ktorého bol zaznamenaná koncentrácia PHB 1,46 g/l. Táto hodnota je ale podstatne nižšia ako u výsledkov z adaptívnej evolúcie (viď Tabuľka 4), kde tento kmeň vyprodukoval 2,69 g/l PHB. Rozdiely mohli byť spôsobené kontamináciou, prípadne rôznym spôsobom kultivácie, nakoľko bakteriálne kmene boli dlhú dobu uložené v kryoskúmavkách. Kmeň P30-66 vykazoval najnižšie hodnoty koncentrácie biomasy, čo viedlo aj ku najnižšej produkcii PHB, a to 1,13 g/l.

Porovnaním mutantných kmeňov a divokého typu *Halomonas halophila*, bolo zistené, že osmotický stres má pozitívny vplyv na produkciu PHB. Divoký kmeň vykazoval mierne vyššie hodnoty v nepriaznivých podmienkach (35 g/l NaCl) ako v optimálnom prostredí (66 g/l NaCl), nakoľko dochádzalo k akumulovaniu intracelulárnych granúl PHB, za účelom odolávania vyvolanému stresu. U mutantných kmeňov, ktoré už prešli pôsobením osmotického stresu v podobe dlhodobej adaptívnej evolúcie, kde prebiehala kultivácia pri 35 g/l NaCl, už však nezaznamenali nárast pri opätovnom vložení do média s ich pôvodnou optimálnou koncentráciou NaCl (66 g/l). Pri porovnaní produkcie PHB s divokým kmeňom WT-35, bola koncentrácia PHB až o 67,15 % nižšia ako u adaptívneho kmeňa P30-35. Teda ďalšia úroveň osmotického stresu už nepôsobila priaznivo na produkciu PHB, čo sa preukázalo značným znížením koncentrácie naakumulovaného polyméru.

#### 4.3.1.3 Porovnanie chemickej štruktúry PHB produkovaného adaptovanými kmeňmi a divokým kmeňom

Na charakterizáciu vyizolovaného polyméru PHB bola použitá infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou (postup viď kapitola 3.4.1.2). Výstupom bolo spektrum zostrojené zo závislosti absorpcie na vlnočete v strednej infračervenej oblasti. Pomocou

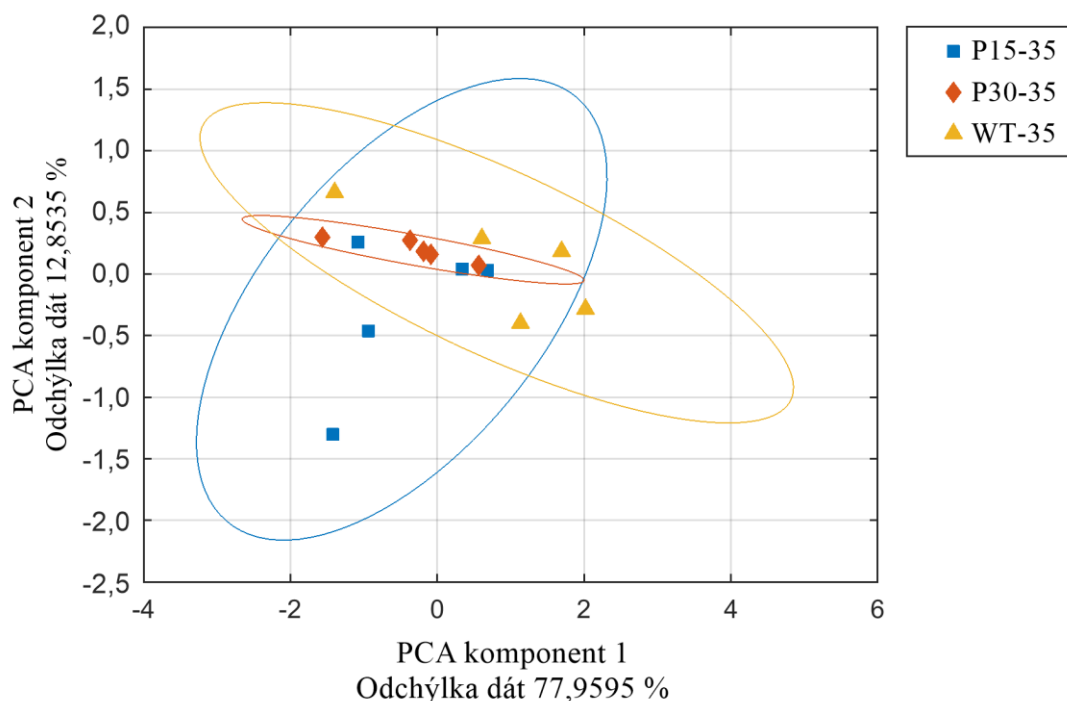
získaného spektra boli vzorky PHB analyzované z hľadiska chemickej štruktúry a také so zameraním na kryštalinitu a amorfnosť látky. Na analýzu boli použité vyizolované polymérne filmy (príprava vid' kapitola 3.4.1.2) mutantných kmeňov P15-35, P30-35 a divoký kmeň WT-35, všetky kultivované pri 35 g/l NaCl (kultivácia vid' kapitola 3.4.1).



Obrázok 22: **A)** FTIR spektrum vyizolovaného PHB u divokého kmeňa WT-35 a mutantných kmeňov P15-35 a P30-35, **B)** FTIR detailné spektrum v oblasti 2 000 – 400 cm<sup>-1</sup>

Analýza FTIR bola použitá v snahe zistiť, či pôsobením stresového faktora došlo k zmene základnej chemickej príp. fyzikálnej štruktúry (tj. stupňa kryštalinity) polyméru. Vyhodnotenie bolo založené na charakteristických vibračných pásoch, ktoré poskytujú informácie o určitej chemickej väzbe. Pík s najvyššou intenzitou v oblasti 1 700 – 1 800 cm<sup>-1</sup> predstavuje

karbonylovú skupinu, v tomto prípade ide o esterovú väzbu. V oblasti  $1\ 400 - 800\ \text{cm}^{-1}$  sa vyskytuje viacero intenzívnych pík, ktoré vypovedajú o kryštalickej štruktúre. Vysoká hodnota absorpcie pri vlnočete  $1\ 277\ \text{cm}^{-1}$  je charakteristická pre vyššiu kryštalinitu, zatiaľ čo pík pri  $1\ 180\ \text{cm}^{-1}$  vypovedá o amorfности látky. Z detailných spektier (viď Obrázok 22) je možné pozorovať, že vplyvom adaptívnej evolúcie s aplikáciou osmotického stresu nedošlo k žiadnym viditeľným zmenám v štruktúre polyméru PHB.



Obrázok 23: PCA analýza divokého kmeňa WT-35 a mutantných kmeňov P15-35 a P30-35

Pre podrobnejšiu štúdiu korelácie vybraných kmeňov, bola prevedená analýza hlavných komponentov (PCA). Pomocou štatistickej PCA metódy boli pre viacrozmernú analýzu softwarom vybrané komponenty 1 a 2, na základe ktorých sa sledovala pozitívna a negatívna korelácia medzi prvkami jednotlivých kmeňov. Z grafickej projekcie (viď Obrázok 23) je viditeľné, že množiny prvkov sledovaných kmeňov sa nerozdelili do osobitných zón, čo znamená, že nebola zistená žiadna výrazná odlišnosť v chemickej štruktúre ani v stupni kryštalinity vyzislovaného polyméru PHB medzi jednotlivými kmeňmi.

#### 4.3.2 Expozícia adaptovaných a divokého kmeňa osmotickému šoku

Okrem posúdenia rastových a produkčných schopností adaptovaných kmeňov pri rôznej salinite kultivačného prostredia, bola ďalej posúdená schopnosť kmeňov odolávať intenzívnemu hyper- resp. hypo-osmotickému šoku. Bunky boli exponované prostrediu o extrémne nízkej resp. vysokej salinite a následne bola stanovená viabilita buniek metódou prietokovej cytometrie a ich integrita pomocou metódy izotermickej termogravimetrie.

##### 4.3.2.1 Termogravimetrická analýza bakteriálnych buniek

Metóda izotermickej termogravimetrie, bola použitá na analýzu zmien v integrite bunky, v dôsledku pôsobenia hyperosmotického (200 g/l NaCl) a hypoosmotického šoku (destilovaná

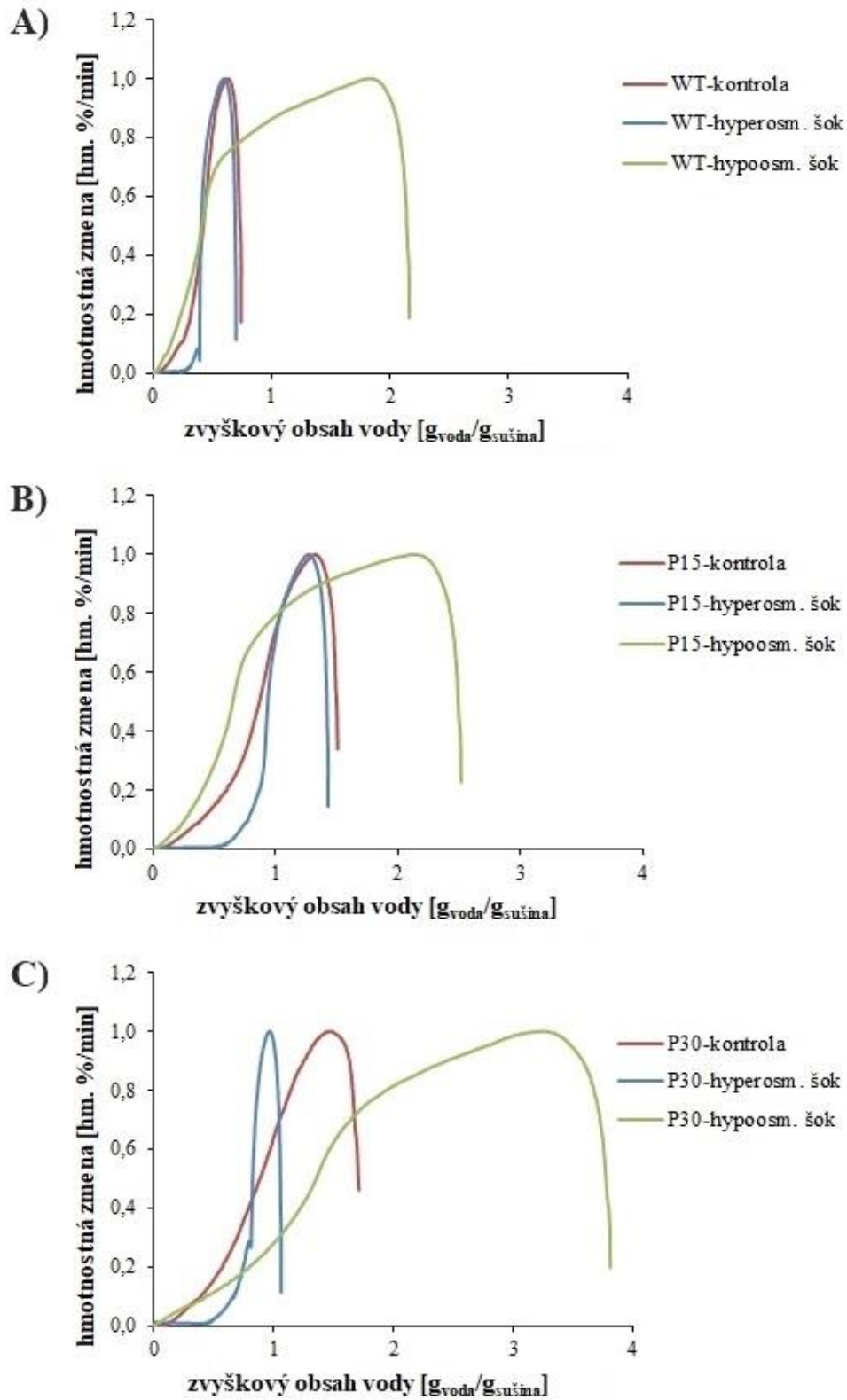
voda). Na TGA stanovenie boli použité mutantné kmene získané z 15. pasáže (P15-35) a 30. pasáže (P30-35) kultivované pri koncentrácii 35 g/l NaCl. Ako kontrola pre porovnanie prípadných zmien bol použitý divoký kmeň *H. halophila* (WT-66) kultivovaný pri 66 g/l NaCl. Príprava a postup vid' kapitola 3.4.2. Technika termickej analýzy bola optimalizovaná v štúdií pod vedením *Sedláčka a kol.* (2019), v ktorej bol sledovaný vplyv PHA na zachovanie integrity buniek u baktérií *C. necator* a *H. halophila* [34]. Na základe tejto práce bola prevedená TGA analýza na mutantných kmeňoch *H. halophila* po ukončení adaptívnej evolúcie. V prípade halofilných baktérií je vyhodnotenie analýzy obťažnejšie, kvôli vysokému obsahu soli, ktorý môže značne ovplyvniť výsledky.

Pomocou termogravimetrickej metódy bola sledovaná zmena hmotnosti vzorky v závislosti na čase pri konštantnej teplote (70°C). Výsledné termogramy zhotovené už pre závislosť zmeny hmotnosti na zvyškovom obsahu vody, boli normalizované na maximálnu hmotnostnú zmenu, kvôli jasnejšej viditeľnosti zmien (vid' Obrázok 24). Krivky priebehu rýchlosti sušenia sa vyznačujú 3 typickými stupňami: v prvom stupni dochádza k náhlemu nárastu rýchlosti sušenia, kedy sa vzorka zahrieva na požadovanú teplotu analýzy v TGA analyzátoře; v druhom stupni, vyznačujúcim sa takmer konštantnou rýchlosťou, nastáva odparenie extracelulárnej vody; v tretej fáze po prekonaní kritického obsahu vody sa rýchlosť sušenia výrazne znižuje a dochádza k vyparovaniu intracelulárnej vody [34].

Na termogramoch je možné pozorovať, že krivky sušenia po hypoosmotickom šoku mali typický trojstupňový tvar, zatiaľ čo krivky kontroly a hyperosmotického šoku tento tvar nedosiahli, a tým pádom nebolo možné presne určiť okamih zmeny mechanizmu sušenia, a tomu odpovedajúci kritický obsah vody (vid' Obrázok 24). Táto zmena tvaru krivky by podľa vyššie publikovaných experimentov mohla naznačovať, že v dôsledku pôsobenia hyperosmotického šoku došlo k poškodeniu membrány, až plazmolýze, čím bunka stratila bariéru spôsobujúcu zmenu rýchlosti sušenia. Krivky kontrolných kultúr bez aplikácie osmotického šoku, však vykazovali podobný trend. Ako pravdepodobnejšie vysvetlenie sa preto javí, že v prípade kontrolných a hyperosmoticky namáhaných vzoriek, dochádza z dôvodu vysokej mobility vody cez bunkovú stenu, k postupnému uvoľňovaniu intracelulárnej vody v priebehu celého sušiacieho experimentu, čo je spojené s absenciou jasného kritického bodu, predstavujúceho náhlu zmenu sušiacieho mechanizmu. Charakter sušenia je pravdepodobne ovplyvnený aj prítomnosťou PHB v bunkách. Granule polyméru majú vplyv na aktivitu intracelulárnej vody, a tým pádom ovplyvňujú jej transport medzi extracelulárnym a intracelulárnym priestorom.

V prípade kriviek hypoosmotického šoku, bol trend u všetkých kmeňov takmer podobný a hranice oddelenia daných vôd boli jasne viditeľné, z čoho je možné usúdiť, že v určitom okamihu dochádza pri sušení vzorky k zmene transportného mechanizmu (vid' Obrázok 24). To by mohlo byť známkou hypoosmotickej lýzy buniek, ktorá spôsobuje uvoľnenie intracelulárnych komponentov do okolitého roztoku. V priebehu sušiacieho experimentu je potom najprv odparovaná voľná voda a v určitom okamihu sa mechanizmus sušenia skokovo zmení s tým, ako v systéme ostáva iba voda pevne viazaná na hydratované bunkové komponenty.

Aj napriek obťažnému stanoveniu v prípade kontrolných a hyperosmoticky namáhaných vzoriek, bol pre všetky termogramy určený kritický obsah vody (lineárnou regresiou dvoch susedných trendov v termograme pomocou softwaru OriginLab). U divokého kmeňa WT-66 bol kritický obsah vody najnižší, pričom smernica sušenia intracelulárnej vody klesala najstrmšie. Príčina zvýšenej strmosti bola pravdepodobne spôsobené znížením obsahu intracelulárnej vody vplyvom osmotického stresu, ktorá bola pevne viazaná na bunkové povrchy, a tým dochádzalo k odparovaniu iba najmenej viazanej vody. V porovnaní s adaptívnymi kmeňmi bola najvyššia hodnota kritického obsahu vody zaznamenaná u kmeňa P30-35, u ktorého aj strmosť smernice sušenia intracelulárnej vody klesala výrazne menej. Tento posun hodnoty kritického obsahu vody značil o tom, že bunky boli v tomto prípade viacej hydratované, teda obsahovali väčšie množstvo intracelulárnej vody, čím klesala aj rýchlosť sušenia. U tohto kmeňa bol výrazný aj štart sušenia, ktorý sa pohyboval v okolí hodnoty 4 gramy vody na gram sušiny, na rozdiel od ostatných kmeňov, kde sušenie začínalo okolo 2,5 gramu vody na gram sušiny. Z tvaru krivky je možné usúdiť, že mutantný kmeň P30-35 zvládal hypoosmotický šok najlepšie a bunky po prekonaní stresu ostali aspoň čiastočne nepoškodené. Na základe uvedených výsledkov je možné povedať, že adaptívna laboratórna evolúcia s aplikáciou osmotického stresu mala pozitívny efekt na odolnosť bakteriálnych buniek v extrémnom hypoosmotickom prostredí.



Obrázok 24: Normalizované výsledky izotermickej termogravimetrie, **A)** Termogram pre divoký kmeň WT-66; **B)** Termogram pre mutantný kmeň P15-35; **C)** Termogram pre mutantný kmeň P30-35

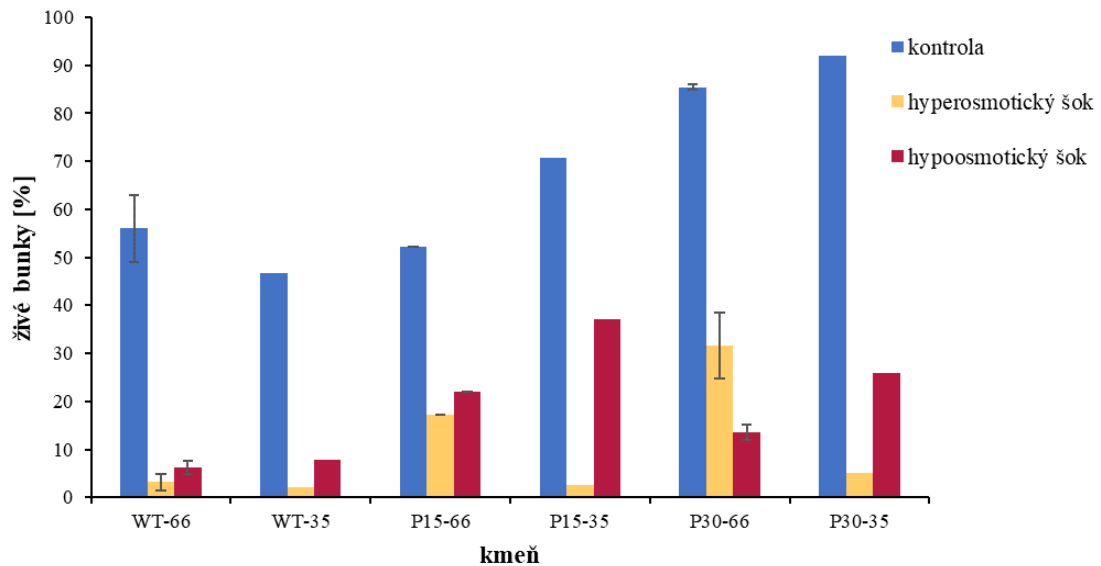
#### 4.3.2.2 Stanovenie viability baktérií po pôsobení osmotického šoku pomocou prietokovej cytometrie

Stanovenie množstva živých buniek (viabilita) v bakteriálnych kultúrach jednotlivých kmeňov, bolo prevádzané pomocou metódy prietokovej cytometrie. Viabilita buniek bola sledovaná po vystavení náhlemu osmotickému šoku v podobe hyperosmotického prostredia (fosfátový roztok s 200 g/l NaCl) a hypoosmotického prostredia (destilovaná voda). Príprava vid' kapitola 3.4.2.5. Z výsledných histogramov boli odčítané množstvá živých a mŕtvych buniek na celkový počet cca 10 000 buniek vo vzorke, ktoré boli následne prevedené na percentuálne zastúpenie.

Tabuľka 6: Percentá živých buniek v bakteriálnych kultúrach po pôsobení hyperosmotického a hypoosmotického šoku

kmeň	živé bunky [%]		
	kontrola	hyperosmotický šok	hypoosmotický šok
WT-66	55,97 ± 7,03	3,16 ± 1,71	6,26 ± 1,28
WT-35	46,70 ± 0,00	2,21 ± 0,00	7,86 ± 0,00
P15-66	52,11 ± 0,56	17,13 ± 6,88	21,91 ± 1,63
P15-35	70,72 ± 0,00	2,66 ± 0,00	37,17 ± 0,00
P30-66	85,40 ± 0,08	31,70 ± 0,90	13,48 ± 2,02
P30-35	91,92 ± 0,64	5,19 ± 1,47	25,88 ± 0,36

Nakoľko meranie viability prebiehalo v prostredí fosfátového roztoku bez obsahu NaCl, je viditeľné, že percentá živých buniek u kontroly (bez pôsobenia osmotického šoku) sú pomerne dosť nízke (vid' Tabuľka 6). Pôsobeniu hyperosmotického šoku dobre odolával iba kmeň P30-66, u ktorého bolo percentuálne zastúpenie živých buniek 31,70 %. Extrémne vysoké koncentrácie soli naopak najhoršie zvládal divoký kmeň WT-35, u ktorého bolo len 2,21 % živých buniek. Na hypoosmotický šok sa najlepšia znášanlivosť prejavila u kmeňa P15-35 (37,17 % živých buniek) a taktiež u kmeňa P30-35 (25,88 % živých buniek).



Obrázok 25: Percentuálne zastúpenie živých buniek v bakteriálnych kultúrach po pôsobení hyperosmotického a hypoosmotického šoku

Na základe výsledkov je možné usúdiť, že extrémnym osmotickým šokom jednoznačne odolávali lepšie adaptované kmene ako divoký kmeň (viď Obrázok 25), u ktorého ani v jednom prípade nebolo zastúpenie živých buniek vyššie ako 10 %. Všeobecne mutantné kmene zvládali lepšie hypoosmotický šok, čo by mohlo nasvedčovať tomu, že adaptívna laboratórna evolúcia s aplikáciou osmotického stresu pozitívne ovplyvnila znášanlivosť aj na prostredie s extrémne nízkym obsahom soli.



## 5 ZÁVER

Cieľom bakalárskej práce bola príprava PHA produkujúcich bakteriálnych kmeňov adaptovaných na osmotický stres, využitím metódy riadeného evolučného inžinierstva.

Na evolučný experiment boli použité bakteriálne kmene *Halomonas halophila* CCM 3662, ktoré sa vyznačujú akumulovaním intracelulárnych granúl PHB ako v priaznivých tak aj v nepriaznivých podmienkach. Priaznivé podmienky prostredia pre halofilné baktérie, zabezpečuje predovšetkým vysoký obsah soli (optimum 66 g/l NaCl v médiu), ďalej zdroj živín ako glukóza či stopové prvky a optimálna teplota 30 °C. V snahe doceliť zvýšenú produkciu PHB, ktorý sa akumuluje ako ochranný mechanizmus v nepriaznivých podmienkach, bola optimálna koncentrácia soli postupne znížená až na 30 g/l NaCl v médiu.

Samotnému experimentu riadenej evolúcie predchádzala optimalizácia podmienok a posúdenie vhodnosti metódy sériovej kultivácie v podobe krátkodobého experimentu. Bakteriálnym kmeňom bola znížená koncentrácia soli v médiu na 65; 60; 55 a 50 g/l NaCl, pričom kultivácia prebiehala po dobu 4 pasáží. Pomocou spektrofotometrie a gravimetrie bola stanovený obsah biomasy v jednotlivých pasážach a metódou GC-FID bol stanovený obsah PHB v biomase. Na základe výsledkov, v ktorých neboli pozorované žiadne fatálne ani výrazné dopady na bakteriálne kmene, pričom koncentrácie PHB sa pohybovali v typických až zvýšených hodnotách, bola potvrdená vhodnosť dlhodobého evolučného experimentu.

Počas dlhodobej adaptívnej evolúcie bola bakteriálnych kmeňom výraznejšie znížená koncentrácia soli v médiu na 45; 40; 35 a 30 g/l NaCl. Sériová kultivácia prebiehala po dobu 30 pasáží, každá jednotlivá pasáž bola analyzovaná. Obsah biomasy bol sledovaný pomocou spektrofotometrickej metódy a presnejšie pomocou gravimetrie. Zo všetkých mutantných kmeňov sa najlepšie ukázal kmeň HH35, rastúci pri 35 g/l NaCl v médiu, ktorý si počas celej evolúcie udržiaval najvyššie hodnoty obsahu biomasy. Taktiež z evolučného hľadiska kmeň HH35 preukázal najlepšiu schopnosť adaptácie na osmotický stres, kedy po 30 pasážach sa obsah biomasy udržal na hodnote 4,45 g/l, pričom oproti 1. pasáži nastal pokles len o 9,74 %. Kmene HH45 a HH40 si v priebehu kultivácie udržiavali o niečo nižšie hodnoty oproti kmeňu HH35, napriek tomu u nich bol obsah biomasy stále pomerne vysoký. Kmeň HH45 dokonca zaznamenal nepatrný nárast u 30. pasáže, v porovnaní s hodnotami na začiatku experimentu. Oba kmene tak vykazovali schopnosť adaptácie na nepriaznivé podmienky indukované osmotickým tlakom. Najmenšie adaptačné schopnosti vykazoval mutantný kmeň HH30, u ktorého bol pozorovaný radikálny úbytok biomasy na konci experimentu.

Vplyv osmotického stresu na produkciu polyméru PHB u adaptovaných mutantov bol sledovaný pomocou plynovej chromatografie GC-FID. Rovnako ako v prípade stanovenia obsahu biomasy sa ako najperspektívnejší ukázal mutantný kmeň HH35, ktorého priemerná produkcia PHB bola najvyššia zo sledovaných kmeňov. V priebehu experimentu bol zaznamenaný nárast obsahu PHB až na 4,63 g/l (9. pasáž), po ktorom nasledoval mierny pokles, pričom do ukončenia adaptívnej evolúcie sa koncentrácia PHB udržiavala v pomerne stabilných hodnotách. Hodnoty obsahu PHB u 30. pasáže po ukončení experimentu síce mierne klesli v porovnaní s 1. pasážou, no napriek tomu bol tento obsah (2,69 g/l PHB) stále najvyšší spomedzi ostatných mutantných kmeňov. Na základe týchto výsledkov bolo usúdené, že kmeň

HH35 preukázal najlepšiu adaptáciu na osmotický stres, pravdepodobne práve vďaka vysokému obsahu naakumulovaných granúl PHB. Nakoľko ostatné kmene nevykazovali tak výrazné výsledky, bol mutantný kmeň HH35 vybraný pre ďalšie analýzy, na základe jeho vysokého potenciálu v adaptačných schopnostiach.

Po ukončení riadenej evolúcie boli navrhnuté ďalšie experimenty v snahe porovnať schopnosť adaptácie mutantného kmeňa HH35 na osmotický stres so schopnosťami divokého kmeňa *H. halophila*. Pre experiment bola zvolená 15. a 30. pasáž adaptovaného kmeňa HH35. Všetky bakteriálne kmene boli kultivované pri pôvodne optimálnych 66 g/l NaCl a pri stresových 35 g/l NaCl v médiu. Pri stanovení obsahu biomasy a PHB sa mutantné kmene nepreukázali ako produktívnejšie, nakoľko hodnoty koncentrácie biomasy aj PHB boli výrazne nižšie ako u divokého kmeňa. Na základe tohto vyhodnotenia by sa evolučné inžinierstvo neukázalo ako výhodný nástroj na prípravu fenotypovo vylepšených mutantov, avšak výsledky tohto experimentu sa značne nezhodovali s výsledkami z dlhodobej evolúcie, čo mohlo byť spôsobené prípadnou kontamináciou vzoriek. Aplikácia osmotického stresu sa naopak preukázala pozitívnym efektom na produkciu PHB, kedy u divokého kmeňa kultivovanom v stresových podmienkach (35 g/l NaCl) došlo k zvýšeniu produkcie PHB o 10,47 %.

Okrem adaptácie na relatívne mierny osmotický stres, bola sledovaná aj stresová odpoveď na extrémny hyperosmotický a hypoosmotický šok. Pomocou prietokovej cytometrie bola stanovená viabilita buniek bakteriálnych kmeňov po prekonaní šoku. Z výsledkov bolo zistené, že mutantné kmene zvládali oba druhy šokov jednoznačne lepšie ako divoký kmeň. Zatiaľ čo u divokého kmeňa nepresiahlo množstvo živých buniek ani 10%, u mutantných kmeňov boli tieto hodnoty výrazne vyššie. Všeobecne zvládali lepšie hypoosmotický šok, kde bola stanovená viabilita na 25,88 % živých buniek u kmeňa P30-35 a až 37,17 % živých buniek u kmeňa P15-35. Stresová odpoveď baktérií na osmotický šok bola sledovaná aj pomocou metódy TGA, kde bola reakcia sledovaná na bunkovej úrovni. Opäť sa preukázala lepšia schopnosť tolerancie na hypoosmotický šok, či už u mutantných kmeňov alebo u divokého typu. Najväčšiu odolnosť preukázal mutantný kmeň P30-35, u ktorého bola hodnota kritického obsahu vody najvyššia, čím boli bunky dostatočne hydratované. Na termograme bolo viditeľné, že bunky si zachovali svoju integritu a nedošlo k narušeniu transportného mechanizmu.

Na charakterizáciu vlastností vyizolovaných polymérov bola použitá metóda FTIR, pomocou ktorej boli vzorky PHB analyzované z hľadiska kryštalinity a amorfnosti látky. Neboli zistené žiadne rozdiely medzi vlastnosťami polyméru vyprodukovaného mutantnými adaptívnymi kmeňmi a divokým kmeňom.

Z uvedených výsledkov je možné konštatovať, že evolučné inžinierstvo má veľkú perspektívu v príprave fenotypovo vylepšených a odolnejších mutantov. Nakoľko metóda sériovej kultivácie je materiálovo aj finančne nenáročná a jednoducho realizovateľná, bola posúdená za veľmi výhodnú a efektívnu metódu. Jediný negatívny aspekt by v tomto prípade predstavovala časová náročnosť, keďže evolučné experimenty sú typické vysokými počtami generácií. Tým pádom aj v tomto experimente by mohlo dôjsť k výraznejším výsledkom, ak by sa v kultivácii pokračovalo dlhšie, ako po dobu 30 pasáží. Aplikácia osmotického stresu ako nástroja evolúcie, u ktorej išlo v podstate iba o znižovanie obsahu soli, a tým aj znižovanie nákladov na kultiváciu,

sa preukázala vysokou efektívnosťou a predovšetkým pozitívnym vplyvom na zvýšenú produkciu PHB u halofilných baktérií.

## 6 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] TURNER, Raphael. Essentials of Microbiology. United Kingdom: ED-TECH PRESS, 2018. ISBN 978-1788821698.
- [2] LOSOS, Jonathan B., c2011. *In the light of evolution: essays from the laboratory and field*. Greenwood Village, Colo.: Roberts and Co. ISBN 978-0-9815194-9-4.
- [3] SHEPELIN, Denis, Anne HANSEN, Rebecca LENNEN, Hao LUO, Markus HERRGÅRD, Jian CHEN a Guocheng DU, 2018. Selecting the Best: Evolutionary Engineering of Chemical Production in Microbes. *Genes*. **9**(5), 4615-4627. DOI: 10.3390/genes9050249. ISSN 2073-4425.
- [4] ZHU, Zhengming, Juan ZHANG, Xiaomei JI, Zhen FANG, Zhimeng WU, Jian CHEN a Guocheng DU, 2018. Evolutionary engineering of industrial microorganisms-strategies and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **102**(11), 4615-4627. DOI: 10.1007/s00253-018-8937-1. ISSN 0175-7598.
- [5] SAUER, Uwe, Anne HANSEN, Rebecca LENNEN, Hao LUO, Markus HERRGÅRD, Jian CHEN a Guocheng DU, 2001. Evolutionary Engineering of Industrially Important Microbial Phenotypes: Evolutionary Engineering of Chemical Production in Microbes. *Metabolic Engineering*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2001-8-30, **9**(5), 129-169. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. DOI: 10.1007/3-540-45300-8\_7. ISBN 978-3-540-41848-1. ISSN 2073-4425.
- [6] ALKIM, Ceren, Burcu TURANLI-YILDIZ, Z. Petek ÇAKAR, Zhen FANG, Zhimeng WU, Jian CHEN a Guocheng DU, 2014. Evolutionary Engineering of Yeast. *Yeast Metabolic Engineering*. New York, NY: Springer New York, 2014-3-26, **102**(11), 169-183. Methods in Molecular Biology. DOI: 10.1007/978-1-4939-0563-8\_10. ISBN 978-1-4939-0562-1. ISSN 0175-7598.
- [7] ZHANG, Xin, Xiaomei ZHANG, Guoqiang XU, et al., 2018. Integration of ARTP mutagenesis with biosensor-mediated high-throughput screening to improve l-serine yield in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **102**(14), 5939-5951. DOI: 10.1007/s00253-018-9025-2. ISSN 0175-7598.
- [8] DRAGOSITS, Martin a Diethard MATTANOVICH, 2013. Adaptive laboratory evolution – principles and applications for biotechnology. *Microbial Cell Factories*. **12**(1). DOI: 10.1186/1475-2859-12-64. ISSN 1475-2859.
- [9] BACHMANN, Herwig, Jack T PRONK, Michiel KLEEREBEZEM a Bas TEUSINK, 2015. Evolutionary engineering to enhance starter culture performance in food fermentations. *Current Opinion in Biotechnology*. **32**, 1-7. DOI: 10.1016/j.copbio.2014.09.003. ISSN 09581669.
- [10] BIOT-PELLETIER, Damien a Vincent J. J. MARTIN, 2014. Evolutionary engineering by genome shuffling. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **98**(9), 3877-3887. DOI: 10.1007/s00253-014-5616-8. ISSN 0175-7598.
- [11] TAN, Furong, Bo WU, Lichun DAI, et al., 2016. Using global transcription machinery engineering (gTME) to improve ethanol tolerance of *Zymomonas mobilis*. *Microbial Cell Factories*. **15**(1). DOI: 10.1186/s12934-015-0398-y. ISSN 1475-2859.

- [12] PATNAIK, Ranjan, c2013. *Engineering complex phenotypes in industrial strains*. Hoboken, N.J.: Wiley. ISBN 978-0470610756.
- [13] MAHR, Regina, Cornelia GÄTGENS, Jochem GÄTGENS, Tino POLEN, Jörn KALINOWSKI a Julia FRUNZKE, 2015. Biosensor-driven adaptive laboratory evolution of l -valine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Metabolic Engineering*. **32**, 184-194. DOI: 10.1016/j.ymben.2015.09.017. ISSN 10967176.
- [14] LIU, Yongfei, Yinyin ZHUANG, Dongqin DING, Yiran XU, Jibin SUN a Dawei ZHANG, 2017. Biosensor-Based Evolution and Elucidation of a Biosynthetic Pathway in *Escherichia coli*. *ACS Synthetic Biology*. **6**(5), 837-848. DOI: 10.1021/acssynbio.6b00328. ISSN 2161-5063.
- [15] WILLIAMS, Thomas C., Isak S. PRETORIUS, Ian T. PAULSEN, Yiran XU, Jibin SUN a Dawei ZHANG, 2016. Synthetic Evolution of Metabolic Productivity Using Biosensors. *Trends in Biotechnology*. **34**(5), 371-381. DOI: 10.1016/j.tibtech.2016.02.002. ISSN 01677799.
- [16] CHOU, Howard H., Jay D. KEASLING, Jochem GÄTGENS, Tino POLEN, Jörn KALINOWSKI a Julia FRUNZKE, 2013. Programming adaptive control to evolve increased metabolite production. *Nature Communications*. **4**(1), 184-194. DOI: 10.1038/ncomms3595. ISSN 2041-1723.
- [17] REYES, Luis H., Maria P. ALMARIO, James WINKLER, Margarita M. OROZCO, Katy C. KAO a Julia FRUNZKE, 2012. Visualizing evolution in real time to determine the molecular mechanisms of n-butanol tolerance in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*. **14**(5), 579-590. DOI: 10.1016/j.ymben.2012.05.002. ISSN 10967176.
- [18] XIAO, Han, Zehua BAO, Huimin ZHAO a Bas TEUSINK, 2015. High Throughput Screening and Selection Methods for Directed Enzyme Evolution. *Current Opinion in Biotechnology*. **54**(16), 4011-4020. DOI: 10.1021/ie503060a. ISSN 0888-5885.
- [19] COBB, Ryan E., Ran CHAO, Huimin ZHAO a Bas TEUSINK, 2013. Directed evolution: Past, present, and future. *AIChE Journal*. **59**(5), 1432-1440. DOI: 10.1002/aic.13995. ISSN 00011541.
- [20] XIAO, Han, Zehua BAO, Huimin ZHAO a Bas TEUSINK, 2015. High Throughput Screening and Selection Methods for Directed Enzyme Evolution: Past, present, and future. *AIChE Journal*. **54**(16), 4011-4020. DOI: 10.1021/ie503060a. ISSN 0888-5885.
- [21] LEEMHUIS, Hans, Ronan M. KELLY, Lubbert DIJKHUIZEN a Bas TEUSINK, 2009. Directed evolution of enzymes: Library screening strategies. *IUBMB Life*. **61**(3), 222-228. DOI: 10.1002/iub.165. ISSN 15216543.
- [22] BONNER, W. A., H. R. HULETT, R. G. SWEET a L. A. HERZENBERG, 1972. Fluorescence Activated Cell Sorting: Library screening strategies. *Review of Scientific Instruments*. **43**(3), 404-409. DOI: 10.1063/1.1685647. ISSN 0034-6748.
- [23] ŠIMONOVÍČOVÁ, Alexandra., 2013. *Environmentálna mikrobiológia*. 1. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave. ISBN 978-80-223-3382-5.
- [24] ROSE, Anthony H., 1976. *Chemical microbiology: an introduction to microbial physiology*. 3d ed. New York: Plenum Press. ISBN 978-0-306-30888-8.

- [25] MOAT, Albert G., John Watkins FOSTER a Michael P. SPECTOR, c2002. *Microbial physiology: an introduction to microbial physiology*. 4th ed. New York: Wiley-Liss. ISBN 04-713-9483-1.
- [26] SCHÖFFL, Fritz, Ralf PRÄNDL a Andreas REINDL, 1998. Regulation of the Heat-Shock Response: Fig. 1. *Plant Physiology*. **117**(4), 1135-1141. DOI: 10.1104/pp.117.4.1135. ISSN 0032-0889.
- [27] RASTOGI, Rajesh P., Ralf RICHA, Ashok KUMAR, Madhu B. TYAGI a Rajeshwar P. SINHA, 2010. Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair: Fig. 1. *Journal of Nucleic Acids*. **2010**(4), 1-32. DOI: 10.4061/2010/592980. ISSN 2090-021X.
- [28] GOLDMAN, Robert P., Michael TRAVISANO, Ashok KUMAR, Madhu B. TYAGI a Rajeshwar P. SINHA, 2011. EXPERIMENTAL EVOLUTION OF ULTRAVIOLET RADIATION RESISTANCE IN ESCHERICHIA COLI: Fig. 1. *Evolution*. **65**(12), 3486-3498. DOI: 10.1111/j.1558-5646.2011.01438.x. ISSN 00143820.
- [29] MATHEWS, Micheline M., Norman I. KRINSKY, Ashok KUMAR, Madhu B. TYAGI a Rajeshwar P. SINHA, 1965. THE RELATIONSHIP BETWEEN CAROTENOID PIGMENTS AND RESISTANCE TO RADIATION IN NON-PHOTOSYNTHETIC BACTERIA: Fig. 1. *Photochemistry and Photobiology*. **4**(4), 813-817. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1965.tb07923.x. ISSN 0031-8655.
- [30] MOELLER, Ralf, Gerda HORNECK, Rainer FACIUS, Erko STACKEBRANDT a Rajeshwar P. SINHA, 2005. Role of pigmentation in protecting Bacillus sp. endospores against environmental UV radiation: Fig. 1. *FEMS Microbiology Ecology*. **51**(2), 231-236. DOI: 10.1016/j.femsec.2004.08.008. ISSN 01686496.
- [31] ÓRDENES-AENISHANSLINS, N., G. ANZIANI-OSTUNI, M. VARGAS-REYES, J. ALARCÓN, A. TELLO a J.M. PÉREZ-DONOSO, 2016. Pigments from UV-resistant Antarctic bacteria as photosensitizers in Dye Sensitized Solar Cells: Fig. 1. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. **162**(2), 707-714. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.08.004. ISSN 10111344.
- [32] GREEN, Christopher F., Pasquale V. SCARPINO, M. VARGAS-REYES, J. ALARCÓN, A. TELLO a J.M. PÉREZ-DONOSO, 2001. The use of ultraviolet germicidal irradiation (UVGI) in disinfection of airborne bacteria: Fig. 1. *Environmental Engineering and Policy*. **3**(1), 101-107. DOI: 10.1007/s100220100046. ISSN 1433-6618.
- [33] STORZ, Gisela a Regine HENGGE, 2011. Osmotic Stress. *Bacterial Stress Responses, Second Edition*. American Society of Microbiology, 2011-1-1, 133-156. DOI: 10.1128/9781555816841.ch9. ISBN 9781555816216.
- [34] SEDLACEK, Petr, Eva SLANINOVA, Martin KOLLER, Jana NEBESAROVA, Ivana MAROVA, Vladislav KRZYZANEK a Stanislav OBRUCA, 2019. PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances: Fig. 1. *New Biotechnology*. American Society of Microbiology, 2011-1-1, **49**(1), 129-136. DOI: 10.1016/j.nbt.2018.10.005. ISBN 9781555816216. ISSN 18716784.
- [35] KRÄMER, Reinhard, 2010. Bacterial stimulus perception and signal transduction: Response to osmotic stress. *The Chemical Record*. American Society of Microbiology,

- 2011-1-1, **10**(4), 217-229. DOI: 10.1002/tcr.201000005. ISBN 9781555816216. ISSN 15278999.
- [36] STORZ, Gisela a Regine HENGGE, c2011. *Bacterial stress responses*. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press. ISBN 15-558-1621-5.
- [37] BURG, Maurice B. a Joan D. FERRARIS, 2008. Intracellular Organic Osmolytes: Function and Regulation. *Journal of Biological Chemistry*. **283**(12), 7309-7313. DOI: 10.1074/jbc.R700042200. ISSN 0021-9258.
- [38] KUCERA, Dan, Iva PERNICOVÁ, Adriana KOVALCIK, et al., 2018. Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*: Function and Regulation. *Bioresource Technology*. **256**(12), 552-556. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.02.062. ISSN 09608524.
- [39] QUESADA, E., A. VENTOSA, F. RUIZ-BERRAQUERO, et al., 1984. *Deleya halophila*, a New Species of Moderately Halophilic Bacteria: Function and Regulation. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **34**(3), 287-292. DOI: 10.1099/00207713-34-3-287. ISSN 0020-7713.
- [40] KAWATA, Yoshikazu, Lian-Hua SHI, Kazunori KAWASAKI, et al., 2012. Taxonomic characterization and metabolic analysis of the *Halomonas* sp. KM-1, a highly bioplastic poly(3-hydroxybutyrate)-producing bacterium: Function and Regulation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **113**(4), 456-460. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.11.018. ISSN 13891723.
- [41] VREELAND, Russell H., 2015. *Halomonas*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. United Kingdom: John Wiley & Sons, Bergey's Manual Trust. ISBN 9781118960608.
- [42] GAO, Meirong, Dongdong DU, Zhenxing BO a Liying SUI, 2019. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB)-accumulating *Halomonas* improves the survival, growth, robustness and modifies the gut microbial composition of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture*. **500**, 607-612. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.10.032. ISSN 00448486.
- [43] JIANG, Xiao-Ran, Zhi-Hao YAO, Guo-Qiang CHEN a Liying SUI, 2017. Controlling cell volume for efficient PHB production by *Halomonas*: Plastic Made and Degraded by Microorganisms. *Metabolic Engineering*. New York, NY: Springer New York, 1999, **44**(2), 30-37. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. DOI: 10.1016/j.ymben.2017.09.004. ISBN 978-1-4612-7167-3. ISSN 10967176.
- [44] SHARMA, Neha, Zhi-Hao YAO, Guo-Qiang CHEN a Liying SUI, 2019. Polyhydroxybutyrate (PHB) Production by Bacteria and its Application as Biodegradable Plastic in Various Industries. *Academic Journal of Polymer Science*. **2**(3), 30-37. DOI: 10.19080/AJOP.2019.02.555587. ISSN 26418282.
- [45] KHANNA, Shilpi, Ashok K. SRIVASTAVA, Guo-Qiang CHEN a Liying SUI, 2005. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*. **40**(2), 607-619. DOI: 10.1016/j.procbio.2004.01.053. ISSN 13595113.
- [46] HANKERMEYER, Christine R., Ronald S. TJEERDEMA, Guo-Qiang CHEN a Liying SUI, 1999. Polyhydroxybutyrate: Plastic Made and Degraded by Microorganisms. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. New York, NY: Springer New

- York, 1999, **40**(2), 1-24. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. DOI: 10.1007/978-1-4612-1496-0\_1. ISBN 978-1-4612-7167-3. ISSN 13595113.
- [47] DRUMMOND, D. Allan, Jesse D. BLOOM, Guo-Qiang CHEN a Liying SUI, 2019. A Nobel Prize for evolution: Plastic Made and Degraded by Microorganisms. *Evolution*. New York, NY: Springer New York, 1999, **73**(3), 630-631. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. DOI: 10.1111/evo.13697. ISBN 978-1-4612-7167-3. ISSN 0014-3820.
- [48] EKBERG, Jukka, Jari RAUTIO, Laura MATTINEN, Virve VIDGREN, John LONDESBOROUGH, Brian R. GIBSON a Martin DRAGOSITS, 2013. Adaptive evolution of the lager brewing yeast *Saccharomyces pastorianus* for improved growth under hyperosmotic conditions and its influence on fermentation performance: Plastic Made and Degraded by Microorganisms. *FEMS Yeast Research*. New York, NY: Springer New York, 1999, **13**(3), 335-349. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. DOI: 10.1111/1567-1364.12038. ISBN 978-1-4612-7167-3. ISSN 15671356.
- [49] MOSER, Josef W., Roland PRIELHOFER, Samuel M. GERNER, Alexandra B. GRAF, Iain B. H. WILSON, Diethard a Martin DRAGOSITS, 2017. Implications of evolutionary engineering for growth and recombinant protein production in methanol-based growth media in the yeast *Pichia pastoris*: Plastic Made and Degraded by Microorganisms. *Microbial Cell Factories*. New York, NY: Springer New York, 1999, **16**(1), 630-631. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. DOI: 10.1186/s12934-017-0661-5. ISBN 978-1-4612-7167-3. ISSN 1475-2859.



## 7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

ALE	adaptívna laboratórna evolúcia
EMS	etylmetánsulfonát
ARTP	mutagenéza plazmou pri atmosférickom tlaku a izbovej teplote
gTME	globálne transkripčné inžinierstvo
FACS	metóda prietokovej cytometrie s využitím triedenia fluorescenčne aktivovaných buniek
FREP	spätne regulovaný vývoj fenotypu
VERT	vizualizácia evolučného vývoja v reálnom čase
HTS	vysokovýkonný skríning
GFP	zelený fluorescenčný proteín
UVR	ultrafialové žiarenie
UV-C	krátkovlnné ultrafialové žiarenie
UVGI	metóda ultrafialového germicídneho ožarovania
PHB	polyhydroxybutyrát
PHA	polyhydroxyalkanoát
scl-PHA	polyhydroxyalkanoáty s krátkym reťazcom
P(3HB)	poly(3-hydroxybutyrát)
BMM	Buffered Minimal Methanol medium
rpm	otáčky za minútu
MES	kyselina 2-(N-morfolino)etánsulfónová
GC-FID	plynová chromatografia s plameňovo ionizačným detektorom
ISTD	interný štandard
SEC-MALS	vylučovacia chromatografia s detektorom statického rozptylu svetla vo viacerých uhloch
TGA	termogravimetria
FTIR	infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou
PCA	analýza hlavných komponentov

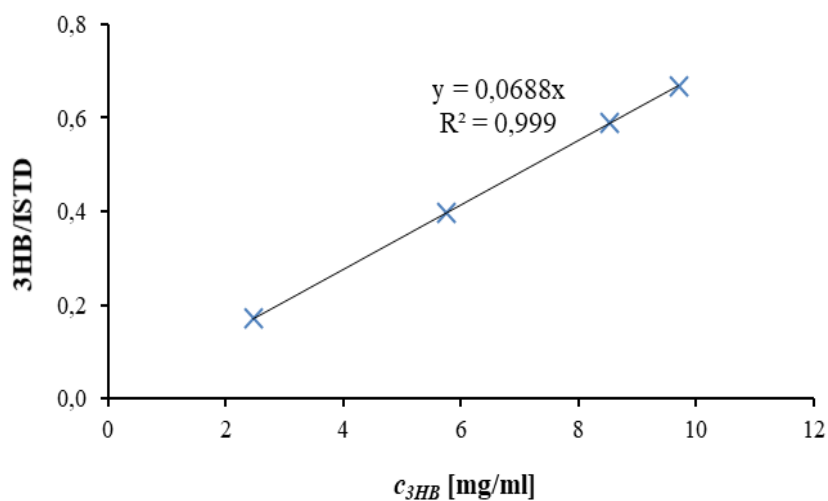
## 8 PRÍLOHY

### 8.1 Kalibračná krivka pre stanovenie obsahu 3HB v biomase

Kalibračná rada štandardných roztokov o známej koncentrácii polyméru P(3HB) (príprava vid' kapitola 3.3.3.1) boli premerané na plynovom chromatografe. Z výstupných chromatogramov boli zistené pomery plochy píkovej látky (3HB) ku ploche píku vnútorného štandardu (ISTD), ktoré boli následne vynesené do závislosti na koncentrácii látky (vid' Obrázok 26). Na základe kalibračnej priamky bol stanovený obsah 3HB v biomase.

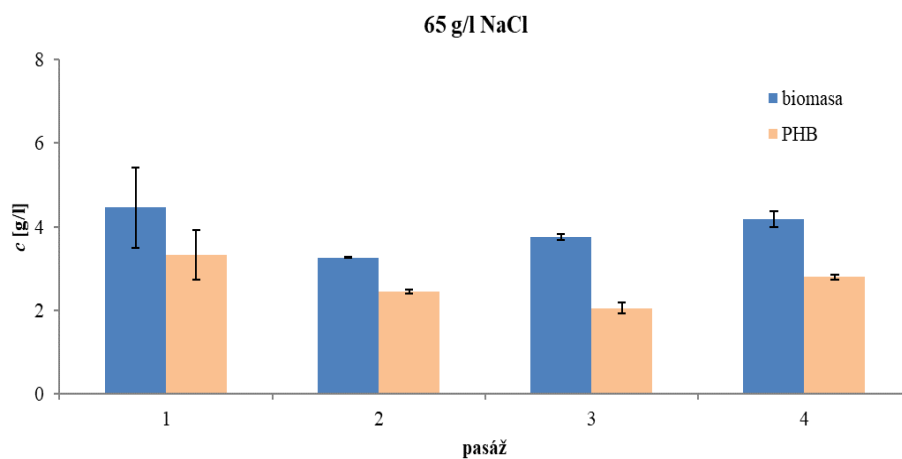
Tabuľka 7: Pomery plochy píkovej látky zistené z chromatogramov kalibračných roztokov

č.	$c_{3HB}$ [mg/ml]	pomer plôch píkovej látky 3HB/ISTD
1	2,467	0,170
2	5,758	0,397
3	8,539	0,588
4	9,700	0,668

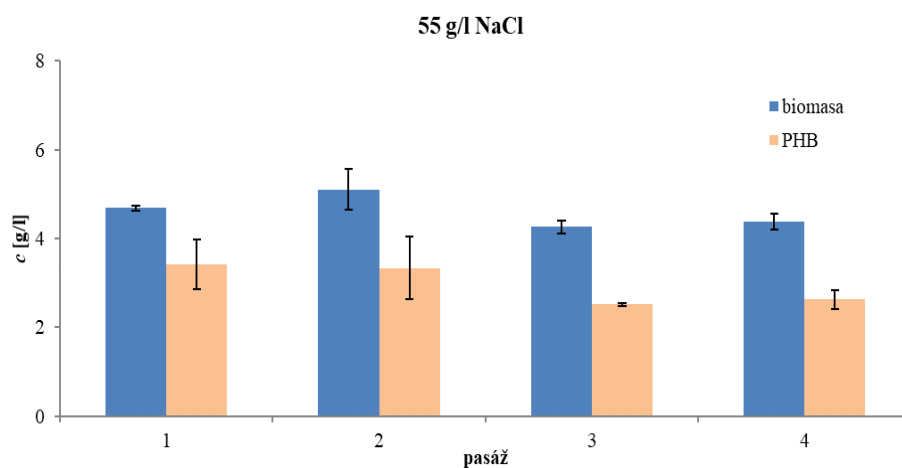


Obrázok 26: Kalibračná priamka 3HB

## 8.2 Optimalizácia podmienok - stanovenie obsahu PHB pomocou GC-FID

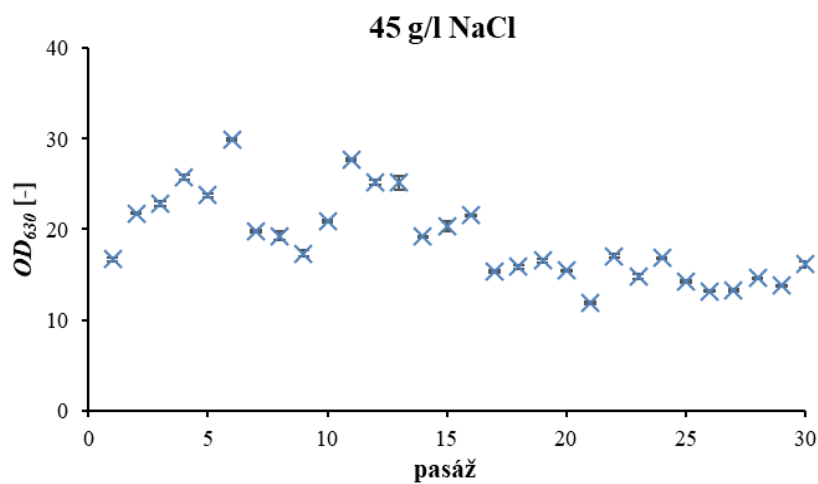


Obrázok 27: Závislosť obsahu biomasy a PHB na počte pasáží pri koncentrácii 65 g/l NaCl

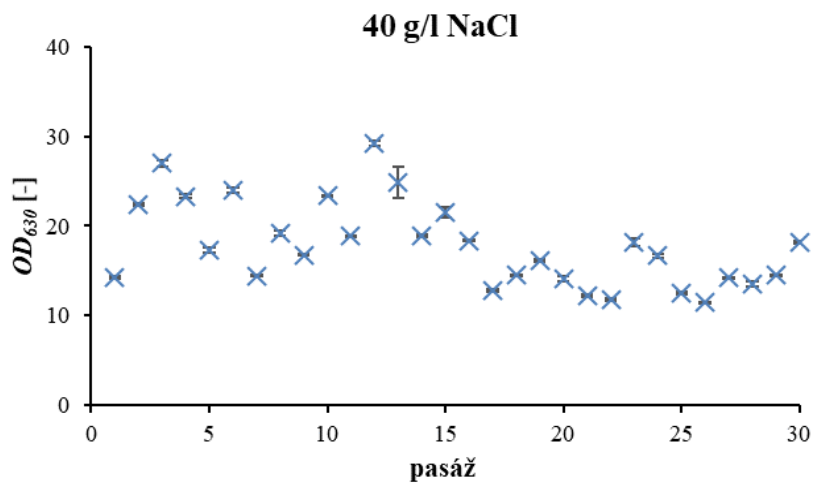


Obrázok 28: Závislosť obsahu biomasy a PHB na počte pasáží pri koncentrácii 55 g/l NaCl

## 8.3 Spektrofotometrické stanovenie obsahu biomasy

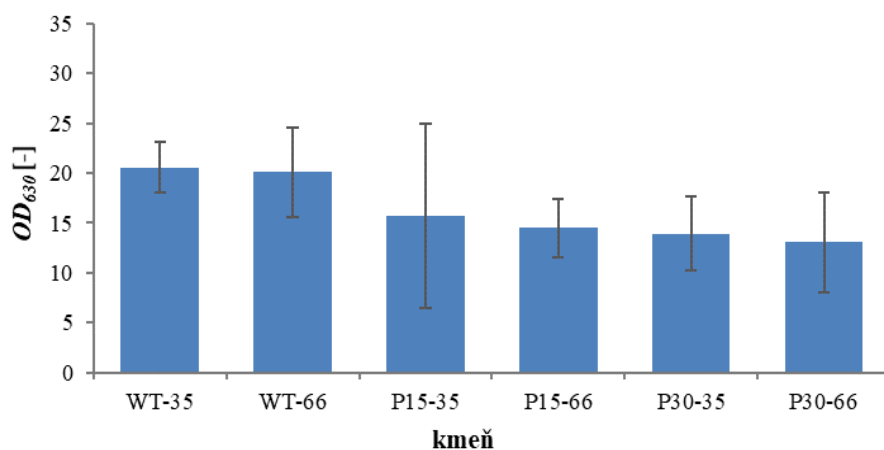


Obrázok 29: Hodnoty optickej hustoty pri 630 nm jednotlivých pasáží kmeňa HH45



Obrázok 30: Hodnoty optickej hustoty pri 630 nm jednotlivých pasáží kmeňa HH40

#### 8.4 Porovnanie tolerancie adaptovaných mutantov a divokého kmeňa - spektrofotometrické stanovenie obsahu biomasy



Obrázok 31: Hodnoty optickej hustoty pri 630 nm u jednotlivých kmeňov