



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# PRODUKCE POLYESTERŮ POMOCÍ EXTREMOFILNÍCH BAKTERIÍ

PRODUCTION OF POLYESTERS BY EXTREMOPHILIC BACTERIA

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kristína Bednárová

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2020

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1555/2019 Akademický rok: 2019/20  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Kristína Bednárová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Biotechnologie  
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Produkce polyesterů pomocí extremofilních bakterií

### Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše
2. Průkaz schopnosti produkce PHA u kmenů *Schlegelella thermodepolymerans*, *Schlegelella aquatica* a *Thermomonas hydrothermalis*
3. Metabolická charakterizace vybraných producentů PHA
4. Stanovení biotechnologického potenciálu vybraných kmenů

### 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.

-----  
Kristína Bednárová  
student(ka)

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

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

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

## ABSTRAKT

Predložená bakalárska práca sa zaoberá štúdiom produkcie polyhydroxyalkanoátov pomocou termofilných bakteriálnych kmeňov *Schlegelella thermodepolymerans*, *Schlegelella aquatica* a *Thermomonas hydrothermalis*. Cieľom práce bolo optimalizovať podmienky produkcie polyméru. U bakteriálnych kmeňov rodu *Schlegelella* bola potvrdená prítomnosť *phaC* génu na úrovni genotypu. U bakteriálneho kmeňa *Thermomonas hydrothermalis* sa preukázala schopnosť produkcie polyhydroxyalkanoátov na úrovni fenotypu. Experimentálne sa sledovala schopnosť využitia vybraných zdrojov uhlíku. Optimalizácia podmienok rastu zahŕňala výber substrátu a stanovenie teploty kultivácie, pri ktorých bola dosiahnutá najvyššia produkcia polyméru. Ďalej bola sledovaná schopnosť produkcie kopolymérov P(3HB-co-4HB) a P(3HB-co-3HV) za využitia prekursorov. Najvhodnejším substrátom pre produkciu P(3HB) bakteriálnym kmeňom *Schlegelella aquatica* bol glycerol, pričom kmeň bol metabolicky najaktívnejší pri teplote 45 °C. Kmeň *Thermomonas hydrothermalis* využíval 1,4-butándiolu na produkciu kopolyméru P(3HB-co-4HB) s extrémne vysokou frakciou 4HB. Optimálna teplota kultivácie bola 55 °C. Bakteriálny kmeň *Schlegelella thermodepolymerans* syntetizoval najvyššie koncentrácie P(3HB) spomedzi vybraných baktérií a to s využitím xylózy pri teplote 55 °C. Pre tento kmeň bol sledovaný vplyv aerácie na rast a produkciu PHA. Zároveň v snahe znížiť výrobné náklady bol kultivovaný na modelových hydrolyzátoch surovín bohatých na lignocelulózu. V závere bol kmeň kultivovaný vo väčšom produkčnom objeme v laboratórnom bioreaktore.

## KLÚČOVÉ SLOVÁ

Polyhydroxyalkanoáty, polyhydroxybutyrát, termofilné baktérie, *Schlegelella aquatica*, *Schlegelella thermodepolymerans*, *Thermomonas hydrothermalis*

## ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the study of the production of polyhydroxyalkanoates using thermophilic bacterial strains *Schlegelella thermodepolymerans*, *Schlegelella aquatica* and *Thermomonas hydrothermalis*. The aim of the thesis is to optimize the conditions of polymer production. In bacterial strains of the genus *Schlegelella*, *phaC* gene at the genotype level was confirmed. The ability to produce polyhydroxyalkanoates in the bacterial strain *Thermomonas hydrothermalis* at the phenotype level was demonstrated. The utilization of selected carbon sources was studied experimentally. The production of PHA was optimized by selecting the appropriate substrate and cultivation temperature. The effect of precursors on the production of copolymers P(3HB-co-4HB) and P(3HB-co-3HV) was observed. The most promising carbon substrate for bacterial strain *Schlegelella aquatica* was glycerol while the best metabolic activity was at 45 °C. Strain *Thermomonas hydrothermalis* was able to produce the copolymer P(3HB-co-4HB) with extreme high molar fraction of 4HB. Optimal cultivation temperature was 55 °C. The highest yield of P(3HB) among selected bacteria, synthesized *Schlegelella thermodepolymerans* cultivated on xylose at 55 °C. For this strain, the effect of aeration on biomass growth and PHA production was observed. In an effort to reduce production costs, *Schlegelella thermodepolymerans* was cultivated on model hydrolysates of lignocellulose-rich materials. Finally, batch cultivation in a larger production volume in laboratory fermentor was performed.

## KEY WORDS

Polyhydroxyalkanoates, polyhydroxybutyrate, thermophilic bacteria, *Schlegelella aquatica*, *Schlegelella thermodepolymerans*, *Thermomonas hydrothermalis*



## **Bibliografická citácia**

BEDNÁROVÁ, Kristína. *Produkce polyesterů pomoci extremofilních bakterií*. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123990>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Stanislav Obruča.

## **Prehlásenie**

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetka 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**

*Touto cestou by som sa veľmi rada poďakovala vedúcemu mojej bakalárskej práce doc. Ing. Stanislavovi Obručovi, Ph.D. za odborné vedenie, inšpiráciu pri štúdiu, cenné rady a pripomienky pri vypracovaní práce. Moje poďakovanie patrí tiež konzultantke Ing. Xénii Kouřilové za ochotu a pomoc pri práci v laboratóriu.*

*V neposlednej rade by som chcela poďakovať mojej rodine za láskavú podporu počas celého štúdia.*

## Obsah

1	Úvod.....	8
2	Teoretická časť.....	9
2.1	Polyestery.....	9
2.1.1	Polyhydroxyalkanoáty.....	9
2.1.1.1	Štruktúra a klasifikácia polyhydroxyalkanoátov.....	10
2.1.1.2	Vlastnosti PHA.....	11
2.1.1.3	Syntéza PHA.....	12
2.1.1.4	Substráty využívané pre mikrobiálnu produkciu PHA.....	14
2.1.1.5	Biologická odbúrateľnosť PHA.....	15
2.1.1.6	Využitie polyhydroxyalkanoátov.....	15
2.2	Extrémofilné baktérie.....	16
2.2.1	Termofilné baktérie.....	17
2.2.1.1	<i>Schlegelella thermodepolymerans</i> .....	19
2.2.1.2	<i>Schlegelella aquatica</i> .....	20
2.2.1.3	<i>Thermomonas hydrothermalis</i> .....	21
3	Experimentálna časť.....	22
3.1	Použitie mikroorganizmy, chemikálie a prístroje.....	22
3.1.1	Použitie mikroorganizmy.....	22
3.1.2	Použitie chemikálie.....	22
3.1.2.1	Použitie chemikálie na kultiváciu mikroorganizmov.....	22
3.1.2.2	Použitie komponenty na izoláciu DNA, PCR a elektroforézu.....	22
3.1.2.3	Chemikálie pre screening uhlíkatých zdrojov.....	23
3.1.2.4	Ostatné chemikálie.....	23
3.1.3	Použitie prístroje.....	23
3.2	Uchovávanie mikroorganizmov.....	24
3.3	Kultivácia mikroorganizmov.....	24
3.3.1	Príprava inokulačného médiá.....	24
3.3.2	Príprava minerálneho médiá a kultivácia baktérií.....	24
3.3.3	Screening využitia vybraných uhlíkatých zdrojov.....	25
3.3.4	Produkcia PHA s prídavkom prekursorov.....	26
3.3.5	Kultivácia kmeňa <i>S. thermodepolymerans</i> v prostredí modelových hydrolyzáto	

3.3.6	Kultivácia kmeňa <i>S. thermodepolymerans</i> v laboratórnom bioreaktore .....	27
3.3.7	Kultivácia kmeňa <i>S. thermodepolymerans</i> s limitáciou kyslíka.....	27
3.4	Použité metódy .....	27
3.4.1	Izolácia bakteriálnej DNA.....	27
3.4.1.1	Príprava lyzačného pufru .....	27
3.4.1.2	Izolácia bakteriálnej DNA .....	27
3.4.1.3	Spektrofotometrické stanovenie čistoty a koncentrácie izolovanej DNA ..	28
3.4.2	Polymerázová reťazová reakcia .....	28
3.4.3	Analýza produktov PCR pomocou agarózovej gélovej elektroforézy .....	29
3.4.4	Stanovenie obsahu biomasy spektrofotometricky .....	29
3.4.5	Stanovenie obsahu biomasy gravimetricky .....	29
3.4.6	Príprava vzoriek na GC-FID analýzu PHA.....	30
3.4.7	Analýza buniek transmisným elektrónovým mikroskopom.....	30
3.4.8	Stanovenie koncentrácie redukujúcich sacharidov pomocou kyseliny 3,5-dinitrosalicylovej .....	30
3.4.8.1	Príprava roztoku činidla kyseliny 3,5-dinitrosalicylovej .....	30
3.4.8.2	Stanovenie kalibračnej priamky.....	30
3.4.8.3	Stanovenie zbytkových redukujúcich sacharidov v kultivačných médiách	31
4	Výsledky a diskusia.....	32
4.1	Preukázanie schopnosti produkcie PHA bakteriálnych kmeňov pomocou molekulárno-biologických metód.....	32
4.2	Optimalizácia podmienok rastu pre biotechnologickú produkciu .....	33
4.2.1	Screening využitia vybraných zdrojov uhlíku .....	33
4.2.2	Stanovenie optimálneho zdroja uhlíku pre produkciu PHA.....	35
4.2.3	Optimalizácia teploty pre produkciu PHA .....	37
4.2.4	Vplyv prekursorov na rast biomasy, podiel a zloženie PHA .....	39
4.2.5	Stanovenie vplyvu kyslíka na množstvo produkovanej biomasy a PHA u kmeňa <i>Schlegelella thermodepolymerans</i> .....	41
4.2.6	Produkcija biomasy a PHB na modelových hydrolyzátoch u kmeňa <i>Schlegelella thermodepolymerans</i> .....	42
4.2.7	Kultivácia kmeňa <i>Schlegelella thermodepolymerans</i> v laboratórnom bioreaktore	44
5	Záver .....	47
6	Zoznam použitej literatúry .....	49

# 1 ÚVOD

Medzi popredné spoločenské témy súčasnosti patrí ochrana životného prostredia. Jednou z viacerých príčin, ktorou človek prispieva k zhoršovaniu podmienok života na Zemi je nadmerná spotreba plastov. Väčšina z bežne používaných plastov je vyrobená petrochemickou cestou, ktorá ponúka nízke výrobné náklady. Vďaka ich mimoriadnym vlastnostiam, stabilite a nízkej cene nahrádzajú čoraz viac materiály ako drevo, papier a kovy. Z tohto dôvodu sa neustále zvyšuje ich spotreba. Nevýhodou petrochemických produktov je ich neschopnosť biologicky sa odbúravať, čo spôsobuje akumuláciu plastového odpadu na skládkach a v oceánoch [1].

Povedomie o enviromentálnej záťaži vedie k celosvetovej snahe vyvíjať materiály s podobnými vlastnosťami, ktoré by boli biologicky rozložiteľné. Vďaka svojej biodegradabilite a vlastnostiam pútajú veľkú pozornosť aj polyhydroxyalkanoáty radiace sa do triedy lineárnych polyesterov. Sú syntetizované mikroorganizmami ako intracelulárne ukladanie uhlíka a energie. Prekážkou komerčnej výroby sú vysoké výrobné náklady a nízke výnosy. Výsledná cena produktu závisí najmä od výberu vhodného mikrobiálneho kmeňa, substrátu a podmienok kultivácie. Keďže takmer polovicu nákladov na fermentáciu PHA tvorí zdroj uhlíku, boli zamerané štúdie na využitie lacných obnoviteľných surovín [2, 3].

Pri výrobe PHA vykazuje veľké riziko mikrobiálna kontaminácia, ktorá by mohla ohroziť proces výroby. Z tohto dôvodu je pri výrobe kladený dôraz na sterilitu, ktorá taktiež zvyšuje náklady. Biotechnologický záujem preto priťahujú extrémofilné baktérie, ktoré rastú a prežívajú v extrémnych podmienkach. Termofilné baktérie prosperujú pri vyšších teplotách ako mezofilné baktérie, čo znižuje riziko kontaminácie a tak aj náklady spojené so sterilizáciou. V súčasnosti je preto zameraný výskum na hľadanie nových termofilných bakteriálnych kmeňov s vysokou produkčnou schopnosťou polyhydroxyalkanoátov [4].

## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1 Polyestery

Polyestery sa radia do skupiny polymérov, obsahujúcich esterovú funkčnú skupinu. Na základe usporiadania uhlíkov v hlavnom reťazci sú delené na lineárne termoplasty teda nasýtené polyestery a na reaktoplasty s rozvetvenou štruktúrou pričom v konečnom štádiu spracovania sú zosieťované. Ich rôznorodé fyzikálne a chemické vlastnosti vedú k ich širokému využitiu v každodennom živote. Vďaka tomu sa na trhu umiestňujú tretie spomedzi všetkých plastov hneď po polyetyléne a polypropyléne [5].

Esterové skupiny v polyesterovom reťazci sú polárne, pretože atóm karbonylového kyslíka má parciálny záporný náboj a karbonylový uhlík má naopak parciálny kladný náboj. Počas procesu zvlákňovania dochádza vďaka polarite k zarovnávaniu esterových skupín, čo spôsobuje pevnosť, pružnosť a húževnatosť polyesterových vlákien. Práve, preto sú polyesterové vlákna s obľubou využívané v textilnom priemysle. Využívajú sa ale aj v iných odvetviach, a to napríklad na výrobu fliaš, fólií, izolačných pásiiek alebo na povrchovú úpravu výrobkov z dreva [5].

Väčšina syntetických polymérov vrátane polyesterov, používaných ako suroviny v každodennom živote, sú obvykle jednorazové a pri návrate do životného prostredia sa rozkladajú stovky rokov. Spaľovaním plastového odpadu sa vytvárajú určité environmentálne záťaž, vrátane vysokých úrovní emisií oxidu uhličitého, či uvoľňovania toxických zlúčenín do ovzdušia. Neustále väčším problémom sú plasty, hromadiace sa v oceánoch a spôsobujúce smrť mnohých morských živočíchov, ktoré si ich zamieňajú s potravou [2, 5].

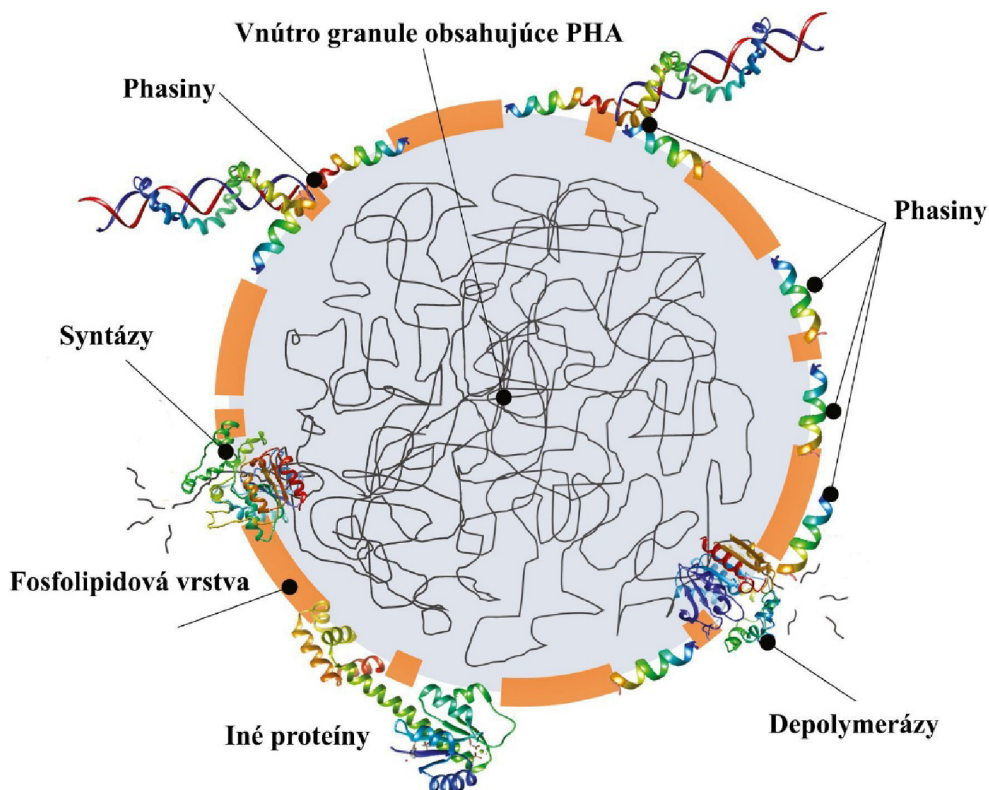
Riešením by mohli byť biodegradovateľné polyestery, ktoré vďaka svojim vlastnostiam priťahujú veľkú pozornosť. Pod pojmom biodegradácia možno rozumieť rozklad makromolekulárnych reťazcov pôsobením mikroorganizmov. Zvyčajne ide o dvojkrovový proces, ktorý zahŕňa fragmentáciu na oligoméry či monoméry a následnú mineralizáciu na oxid uhličitý, metán, vodu, biomasu a anorganické zlúčeniny. Produkty biodegradácie sa líšia od dostupnosti kyslíka v prostredí. Medzi biologicky odbúrateľné polyestery patria aj polyhydroxyalkanoáty [2, 6, 7].

#### 2.1.1 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) sú prirodzene sa vyskytujúce alifatické polyestery pozostávajúce z uhlíka, vodíka a kyslíka. Tieto biopolyméry sú syntetizované grampozitívnymi a gramnegatívnymi baktériami ako intracelulárne ukládanie uhlíka a energie [8, 9].

PHA sa akumulujú v baktériách počas nevyvážených rastových podmienok v dôsledku obmedzeného prísunu nevyhnutných živín, ako je dusík, fosfor alebo horčík, a nadbytku vhodného zdroja uhlíku. Ukladajú sa v cytoplazme buniek vo forme granúl, lipidických inklúzií, čo predstavuje výhodu uskladnenia prebytočného uhlíka (obrázok 1). Sú nerozpustné vo vode, vďaka čomu neovplyvňujú fyziologickú kondíciu mikroorganizmov. Povrch granúl je obklopený membránou zloženou z fosfolipidov a proteínov. Membránu tvoria katabolické proteíny, medzi ktoré patrí PHA syntáza a intracelulárna PHA depolymeráza, ale aj

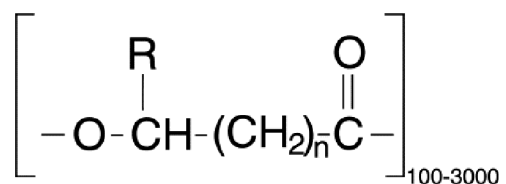
nekatabolické proteíny, ktoré sú označované ako phasíny. Proteíny ovplyvňujú ako počet, tak aj veľkosť PHA granúl, ktorá je zvyčajne v priemere 0,2-0,5 μm [2, 8, 10].



Obrázok 1: Schéma štruktúry PHA granule [11]

### 2.1.1.1 Štruktúra a klasifikácia polyhydroxyalkanoátov

Polyhydroxyalkanoáty sú lineárne polyesterové tvorené monomérmi *R*-hydroxyalkánovej kyseliny, ktoré sú spojené esterovou väzbou (obrázok 2). Esterová väzba je tvorená medzi karboxylovou skupinou jedného monoméru a hydroxylovou skupinou susedného monoméru [10, 12].



n = 1	R = H	Poly(3-hydroxypropionát)	P(3HP)
	R = CH <sub>3</sub>	Poly(3-hydroxybutyrát)	P(3HB)
	R = C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Poly(3-hydroxyvalerát)	P(3HV)
n = 2	R = C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	Poly(3-hydroxyhexanoát)	P(3HX)
	R = H	Poly(4-hydroxybutyrát)	P(4HB)
n = 3	R = H	Poly(5-hydroxyvalerát)	P(5HV)

Obrázok 2: Všeobecná štruktúra monomérovej jednotky PHA a príklady štruktúrnych derivátov [13]

V závislosti od typov baktérií, ich PHA syntáz a syntetických procesov sa PHA môžu syntetizovať s rôznymi monomérmi. Závisí zároveň aj na type monomérnych jednotiek, kedy rozoznávame buď homopolyméry, alebo heteropolyméry. Postranný reťazec R určuje typ monomérnej jednotky PHA. Môže byť rozvetvený, nerozvetvený, nasýtený či nenasýtený a môže obsahovať rôzne funkčné skupiny ako napríklad epoxidy alebo halogény. Doteraz bolo opísaných viac ako 150 monomérov rôznych štruktúr [9, 10].

Zaraďujú sa medzi opticky aktívne polyestery. Kyseliny 3-hydroxyalkánové sú všetky v *R*-konfigurácii kvôli stereošpecifickosti polymerizačného enzýmu, PHA syntázy. Len v jednom zriedkavom prípade bola zistená malá časť *S* monomérov. Najznámejší člen PHA je poly(3-hydroxybutyrát), obsahujúci opakujúce sa jednotky (*R*)-3HB. Monoméry sú polymerizované za vzniku polymérov s vysokou molekulovou hmotnosťou v rozmedzí 200 000 až 3 000 000 Da. Zvyčajne sa monomér opakuje 100krát až 30 000krát. Dĺžka polymérneho reťazca a hodnota molekulovej hmotnosti závisí od mikroorganizmu a podmienok rastu. Podľa počtu atómov uhlíka v monoméroch sú PHA klasifikované do troch skupín (tabuľka 1) [9, 10, 14].

Tabuľka 1: Klasifikácia PHA s príkladmi zástupcov polymérov [2, 9, 15]

Typ monomérov	Počet uhlíkov	Trieda PHA	Príklad polyméru
s krátkym reťazcom	3 až 5	scl-PHA short-chain length	poly(3-hydroxybutyrát) poly(4-hydroxybutyrát)
so strednou dĺžkou reťazca	6 až 14	mcl-PHA medium-chain length	poly(3-hydroxyhexanoát) poly(3-hydroxyoktanoát)
s dlhým reťazcom	viac ako 15	lcl-PHA long-chain length	poly(3-hydroxyhexadekanoát)

### 2.1.1.2 Vlastnosti PHA

Fyzikálno-chemické vlastnosti PHA sú podobné konvenčným plastom. Veľkou výhodou PHA je ich biologická odbúrateľnosť a možnosť výroby z obnoviteľných zdrojov. PHA sú netoxické a biokompatibilné, preto majú vynikajúci potenciál v domácej, poľnohospodárskej, priemyselnej a lekárskej oblasti. Polyhydroxyalkanoáty sú charakteristické tým, že majú vysoký stupeň polymerizácie, sú vysoko kryštalické, opticky aktívne, izotaktické a nerozpustné vo vode. Polyhydroxyalkanoáty s krátkou a strednou dĺžkou reťazca, sú niektorými vlastnosťami podobné polypropylénu (tabuľka 2), preto by v prípade zníženia nákladov na výrobu PHA mohli konkurovať tomuto plastu petrochemickej výroby [2, 16, 17].

Tabuľka 2: Porovnanie fyzikálnych vlastností scl-PHA, mcl-PHA a polypropylénu [18]

Vlastnosti	scl-PHA	mcl-PHA	polypropylén
kryštalinita [%]	40-80	20-40	70
teplota topenia [°C]	53-80	30-80	176
hustota [g.cm <sup>-3</sup> ]	1,25	1,05	0,91
pevnosť ťahu [MPa]	43	20	34
teplota skleného prechodu [°C]	-148-4	-40-150	-10
maximálne predĺženie [%]	6-1000	300-450	400
odolnosť voči UV žiareniu	dobrá	dobrá	slabá
odolnosť voči rozpúšťadlám	slabá	slabá	dobrá
biodegradabilita	dobrá	dobrá	žiadna

Vlastnosti polyhydroxyalkanoátov sa líšia v závislosti od dĺžky reťazca a zloženia monomérnych jednotiek. P(3HB) a P(3HB-co-3HV) sú kryštalické polyméry radiace sa do skupiny polyhydroxyalkanoátov s krátkym reťazcom. Sú tuhé a krehké. Vyznačujú sa vysokými teplotami topenia a nízkymi bodmi skleného prechodu. P(4HB) patrí tiež do skupiny scl-PHA, napriek tomu sa líši od zmienených polymérov. P(4HB) je poddajný termoplastický polyester. Mcl-PHA majú v porovnaní s scl-PHA nižšie teploty topenia a teploty skelného prechodu. Mcl-PHA sa radia medzi termoplastické elastoméry s nízkou kryštalinitou a pevnosťou v ťahu [8, 18].

### 2.1.1.3 Syntéza PHA

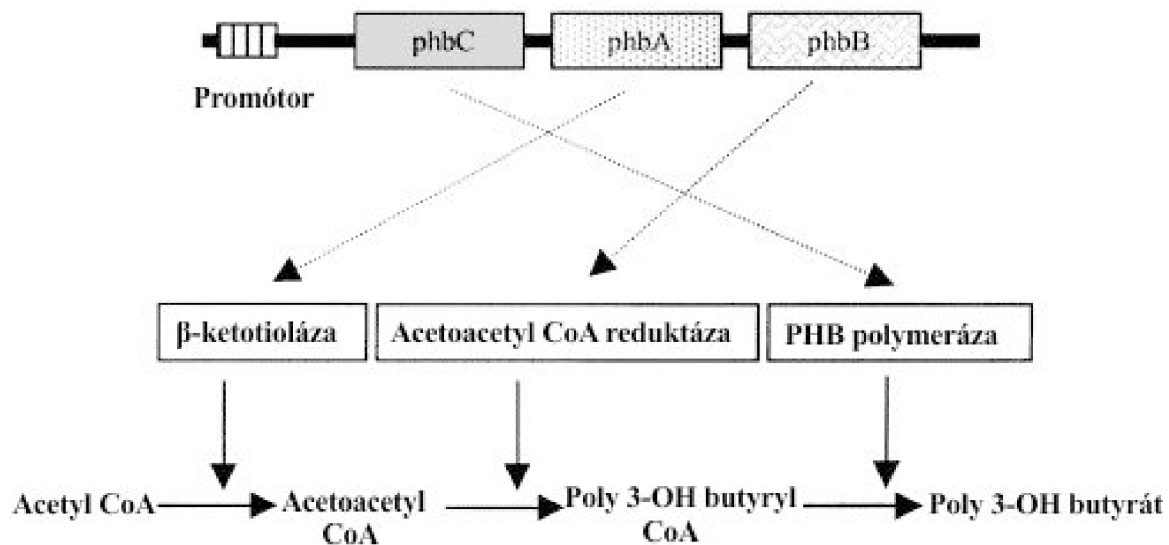
V roku 1959 boli Roger Yate Stanierom a spolupracovníkmi prvýkrát identifikované reakcie zapojené do metabolickej dráhy zodpovednej za biosyntézu PHB z kyseliny octovej. R. Y. Stanier študoval tvorbu PHB v *Rhodospirillum rubrum*. V tomto období však neboli identifikované špecifické enzýmy, ktoré katalyzovali reakcie na syntézu kyseliny 3-hydroxybutyrovej, teda monoméru pre vznik PHB. Ich objav nastal až v roku 1973, kedy nezávisle od seba Hans Günter Schlegel z Univerzity v Göttingene v Nemecku a Edwin Alfred Dawes z Univerzity v Hulle v Anglicku tieto enzýmy izolovali a následne ich charakterizovali. H. G. Schlegel skúmal metabolický cyklus výroby PHB v *Cupriavidus necator*, zatiaľ čo E. A. Dawes študoval cyklus výroby PHB v *Azotobacter beijerinckii*. Od objavov R. Y. Staniera, H. G. Schlegel a E. A. Dawesa sa uskutočnilo mnoho výskumov a bolo zistených množstvo poznatkov v tejto oblasti [19].

PHA sú syntetizované mnohými živými organizmami. Hlavnými producentami sú baktérie. PHA sa v bakteriálnych bunkách akumulujú až v 90 % suchej bunkovej hmoty. Hlavnými krokmi biosyntézy PHA je prísun substrátového monoméru a polymerizácia týchto monomérov. Polymerizáciou rozpustných medziproduktov na nerozpustné molekuly bunka nepodlieha zmenám svojho intracelulárneho osmotického stavu [10, 20, 21].

Pri biosyntéze hrajú kľúčovú rolu enzýmy s vysokou substrátovou špecifitou, nazývané ako PHA syntázy. Tieto enzýmy a iné proteíny súvisiace s metabolizmom PHA sú kódované v génoch, ktoré sú často zhlukované v bakteriálnych génomoch do operónov. Na obrázku 3 sú znázornené gény operónu *phb CAB*, ktorý kóduje tri enzýmy pôsobiace v biosyntetickej dráhe poly(3-hydroxybutyrátu). Gén kódujúci PHA syntázu je označovaný ako *phaC*.  $\beta$ -ketotioláza je kódovaná génom *phaA* a acetoacetyl-CoA reduktáza génom *phaB*. Gén *phaG* kóduje



3-hydroxyacyl-ACP-CoA transferázy a gén *phaJ*, je známy ako gén kódujúci enoyl-CoA hydratázu [10, 22].



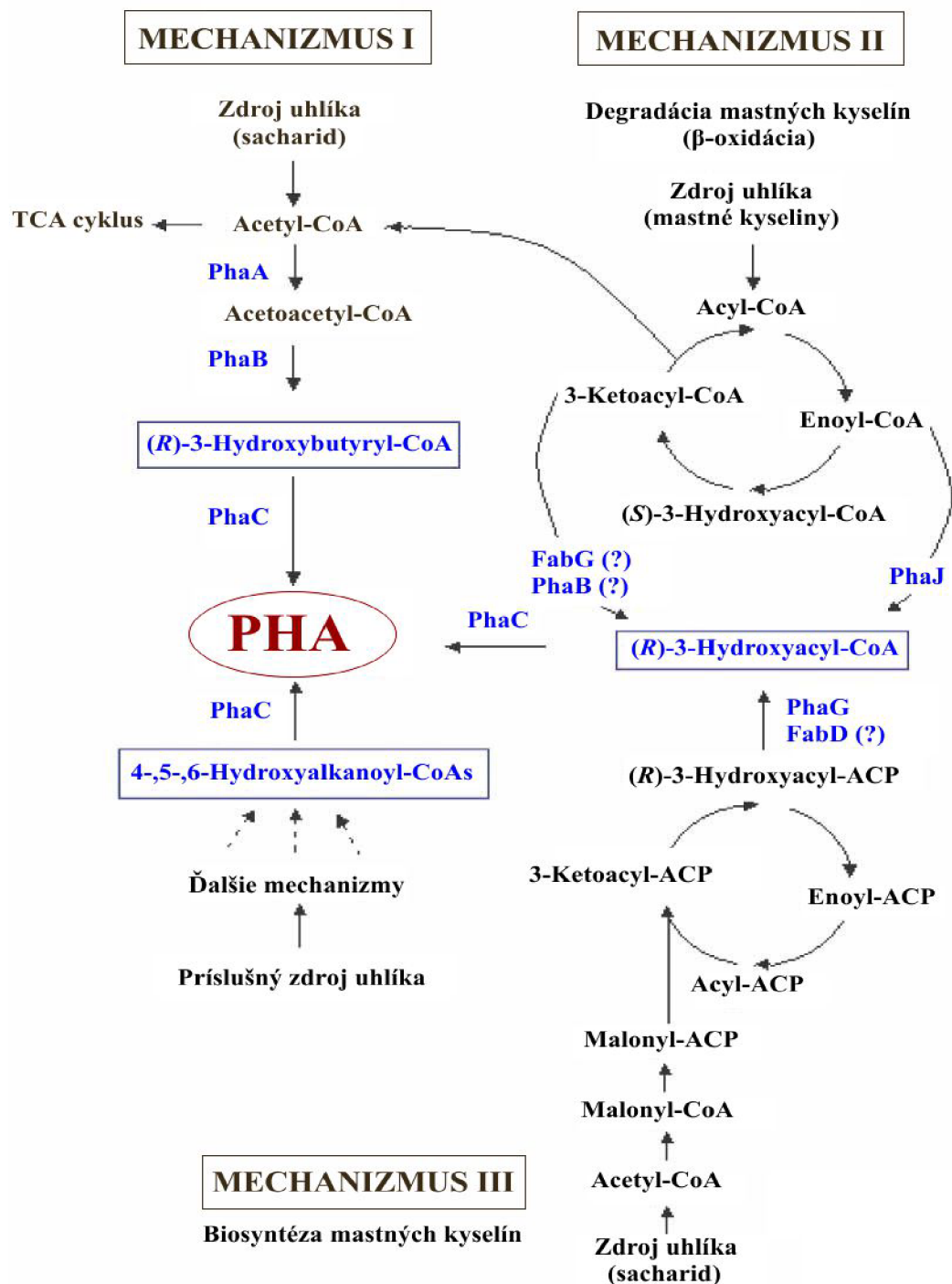
Obrázok 3: Biosyntetická dráha poly(3-hydroxybutyrátu) [17]

Použitie uhlíkového zdroja určuje typ monoméru syntetizovaného mikróbmi. V závislosti od zdroja uhlíku existujú tri dobre známe biosyntetické dráhy PHA (obrázok 4) [21].

Prvá biosyntetická dráha P(3HB) je zložená z troch enzymatických reakcií katalyzovaných tromi rôznymi enzýmami. V prvom kroku kondenzujú dve molekuly acetyl-CoA za účasti  $\beta$ -ketotiolázy (*PhaA*) za vzniku acetoacetyl-CoA. Acetoacetyl-CoA reduktáza (*PhaB*) umožňuje redukcii acetoacetyl-CoA pomocou NADH na 3-hydroxybutyryl-CoA. Nakoniec PHB syntáza (*PhaC*) polymerizuje 3-hydroxybutyryl-CoA na PHB, pričom sa uvoľní koenzým A. Polymerizačný enzým akceptuje iba (*R*)-izoméry. Počas normálneho rastu, teda pri dostatočnom prísune nevyhnutných živín, je  $\beta$ -ketotioláza inhibovaná voľným koenzýmom A, ktorý je produktom Krebsovho cyklu. Avšak počas stresových podmienok s obmedzeným množstvom živín, kedy je vstup acetyl-CoA do Krebsovho cyklu obmedzený, sa prebytok acetyl-CoA nasmeruje do biosyntézy PHB [17, 20].

Druhým mechanizmom je metabolizmus mastných kyselín, v ktorom vznikajú rôzne hydroxyalkanoátové monoméry.  $\beta$ -oxidáciou mastných kyselín sa vytvárajú substráty, ktoré môžu byť polymerizované PHA syntázami za vzniku polyhydroxyalkanoátov so strednou dĺžkou reťazca. V  $\beta$ -oxidačnom mechanizme *Aeromonas caviae* je medziprodukt, trans-2-enoyl-CoA, prevedený pomocou (*R*)-špecifickej enoyl-CoA hydratázy na (*R*)-hydroxyacyl-CoA [21].

Významný je aj tretí mechanizmus, pretože sa v ňom vytvárajú monoméry pre syntézu PHA zo štruktúrne nepríbuzných a jednoduchých lacných zdrojov uhlíka, ako je glukóza, sacharóza a fruktóza. Biosyntetickou dráhou mastných kyselín vznikajú (*R*)-3-hydroxyacylové medziprodukty, ktoré majú formu acylového nosičového proteínu (ACP). Pomocou enzýmu acyl-ACP-CoA transacylázy sú konvertované na formu CoA [21].



Obrázok 4: Biosynetické dráhy PHA [21]

#### 2.1.1.4 Substráty využívané pre mikrobiálnu produkciu PHA

Na výrobu PHA sa používa široká škála uhlíkatých substrátov, pričom hrá veľkú úlohu najmä cena, ale dôležitá je aj povaha substrátu. Pre produkciu PHA je dôležité poznať metabolizmus produkčného mikroorganizmu, aby mohol byť do produkčného média pridávaný vhodný prekursor. Približne 40-48 % celkových výrobných nákladov PHA súvisí so zdrojom uhlíka určeným na fermentáciu. Výrobné náklady biologicky odbúrateľných plastov v porovnaní s cenou plastov vyrobených z nerastných surovín sú vyššie. Preto sa v posledných rokoch výskum zameriava na vývoj výrobných procesov PHA, založených na priemyselných

odpadových produktoch, ako napríklad tukov a olejov z potravinárskeho priemyslu, syrovej srvátky, melasy, lignocelulóзовých surovín, poľnohospodárskych odpadových materiálov, využiteľných zložiek komunálneho odpadu, glycerolu, sacharidov, odpadovej vody, močoviny a širokej škály ďalších substrátov [8, 23].

#### **2.1.1.5 Biologická odbúrateľnosť PHA**

Pre spoločnosť sa čoraz zložitejším problémom stáva likvidácia odpadu. V roku 2018 bola celosvetová produkcia plastov okolo 359 miliónov ton pričom v roku 2015 bolo recyklovaných len 19,5 % plastového odpadu. Z tohto dôvodu bola skúmaná biologická odbúrateľnosť PHA v rôznych prírodných prostrediach [24, 25].

PHA depolymeráza je vylučovaná PHA degradujúcimi mikroorganizmami. V súčasnosti bolo identifikovaných viac ako 700 kmeňov mikroorganizmov, ktoré extracelulárne hydrolyzujú PHA na hydroxykyseliny rozpustné vo vode a následne využívajú produkty hydrolýzy ako zdroje uhlíka a energie pre rast [24].

Polyhydroxyalkanoáty sa degradujú po vystavení pôde, kompostu alebo morskému sedimentu. Biodegradácia závisí od mnohých faktorov, ako je mikrobiálna aktivita životného prostredia, exponovaná povrchová plocha, vlhkosť, teplota, pH a molekulová hmotnosť. V prípade PHA má význam aj zloženie polyméru a kryštalinita. Teplota má veľký vplyv pri rýchlosti degradácie. Zvyšovaním teploty sú organické zlúčeniny biologicky dostupnejšie a majú lepšiu rozpustnosť. Pri vyšších teplotách sa P(3HB) považuje za amorfný a lepšie dostupný degradujúcim enzýmom. Z toho dôvodu dochádza k jeho rýchlejšej degradácii. Degradáciu za vyššej teploty umožňujú termofilné baktérie. Je ale potrebné, aby si pri optimálnej reakčnej teplote zachovali svoju aktivitu. Biodegradácia PHA môže prebiehať za aeróbnych a anaeróbnych podmienok. Za aeróbnych podmienok vedie k vzniku oxidu uhličitého a vode, zatiaľ čo v anaeróbnych podmienkach sú produktmi degradácie oxid uhličitý a metán [17, 24].

#### **2.1.1.6 Využitie polyhydroxyalkanoátov**

PHA majú vďaka svojim vlastnostiam širokú škálu aplikácií. Využívajú sa najmä v potravinárstve, lekárstve a na poľnohospodárske účely. V potravinárskom priemysle môžu nahrádzať jednorazové obaly na potraviny, fólie, príbory, poháre a nádoby na jedno použitie. V poľnohospodárstve sa využívajú v hnojivách s riadeným uvoľňovaním. Pelety vyrobené z PHA sa v pôde postupne degradujú a obsah sa uvoľňuje po dlhšiu dobu, znižujú sa tak náklady na prácu. Okrem iného môžu byť využívané v každodennom živote ako obaly na sprchové gély a rôzne kozmetické produkty, blistre na lieky, kvetináče a fľaše. PHA sa môžu používať aj ako tavné lepidlá a netkané textílie. PHA latex sa využíva na pokrytie papiera alebo kartónu, čím vznikajú vode odolné materiály [17, 18, 26, 38].

Od roku 1960, kedy bolo schválené použitie prvého biopolyméru v medicíne, sa upriamuje pozornosť vedcov využiť PHA v lekárskom a farmaceutickom priemysle. Je to predovšetkým kvôli ich biologickej odbúrateľnosti a biokompatibilite. V ortopedickej a fixačnej aplikácii sa využívajú pri uzatváraní rán ako absorbovateľné materiály na šitie, pri ošetrovaní rán aplikáciou PHA ako umelej náhradnej kože a pri tkanivovej fixácii ako dlahy, kostné skrutky, chrupavky.

Ich veľkou výhodou oproti súčasne využívaným kovovým náhradám je, že pacient nemusí podstupovať reoperáciu, pretože nie je treba ich z tela vyoperovať. Implantát navyše môže obsahovať antibiotikum, ktoré zabráni rozvoju bakteriálnej infekcie [17, 26].

V tkanivovom inžinierstve sa bunky pestujú in vitro na biologicky odbúrateľných polyméroch, aby sa vytvorilo „tkanivo“ na účely implantácie. PHA má v lekárskej oblasti výraznú výhodu oproti silikónu, tradične používanému polyméru, o ktorom sa predpokladá, že má zhubné účinky a prispieva k rastu rakovinových buniek. Využitie nachádzajú tiež ako osteosyntetické materiály pri stimulácii rastu kostí a to vďaka svojim piezoelektrickým vlastnostiam. Značný prínos majú aj v kardiovaskulárnej chirurgii pri výrobe náhrad krvných ciev [17, 26, 27].

Výskumy ukázali, že PHA nano-rozmerov prenikajú hlboko do cieľových tkanív tela a majú dobrú absorpčnú účinnosť v bunkách. Preto majú vhodnú perspektívu byť súčasťou systému riadeného uvoľňovania liečiv [27].

## 2.2 Extrémofilné baktérie

Termín „extrémofilný“ opisuje akýkoľvek organizmus schopný žiť a rásť v extrémnych podmienkach, najmä podmienkach neprijateľných pre človeka. Prostredia, v ktorých sa nachádzajú, môžu mať extrémne vysoké alebo nízke pH, vysoké alebo nízke teploty, vysokú koncentráciu solí, vysoký tlak a ďalšie iné vlastnosti. Extrémofilné baktérie sú klasifikované podľa podmienok, v ktorých prosperujú (tabuľka 3). Tieto mikroorganizmy sú často schopné života nie len v prostredí s jedným extrémom, ale aj v takých oblastiach, kde je viac extrémnych faktorov. Preto sú nazývané ako „polyextrémofilné“ [28, 29].

Tabuľka 3: Klasifikácia extrémofilov a príklady bakteriálnych rodov [30, 60, 61]

faktor	označenie extrémofilov	optimálne podmienky	rod
teplota	hypertermofily	> 85 °C	<i>Thermophilum</i>
	extrémne termofily	65-85 °C	<i>Bacillus, Clostridium, Geobacillus, Thermotoga</i>
	mierne termofily	45-65 °C	<i>Pseudomonas, Bacillus, Geobacillus</i>
	psychrofilily	≤ 15 °C	<i>Psychrobacter, Alteromonas</i>
pH	acidofily	pH < 3	<i>Alkalibacterium</i>
	alkalofily	pH > 9	<i>Bacillus, Pseudoalteromonas</i>
salinita	halofily	5 M NaCl	<i>Halomonas</i>
tlak	piezofily	> 130 MPa	<i>Shewanella</i>
radiácia	rádiofilily	40-400 nm	<i>Deinococcus</i>
kovy	metalofily	tolerancia vysokých koncentrácií kovov	<i>Ralstonia</i>
kyslík	mikroaerofily	< 21 % O <sub>2</sub>	<i>Campylobacter</i>

Medzi extrémofilné mikroorganizmy sa radia nie len pravé extrémofily, ktoré vyžadujú jednu alebo viac extrémnych podmienok pre život, ale aj fakultatívne extrémofily. Optimálny rast fakultatívnych extrémofilov je za fyziologických podmienok, ale zároveň majú schopnosť tolerovať aj extrémne podmienky [29].

Extrémofily sa vyvinuli a prispôsobili svojmu prostrediu vývojom jedinečných mechanizmov, ktoré udržiavajú ich bunkové komponenty, ako sú proteíny, nukleové kyseliny a lipidy stabilné a aktívne. Schopnosť života je zaručená aj vďaka produkcii extrémofilných enzýmov (extremozým) a ochranných organických biomolekúl (extremolytov). Adaptácia enzýmov zodpovedá zmenám v aminokyselinovej sekvencii, ktoré sa prenášajú do variácií v štruktúre, flexibilitate, náboji a hydrofóbnosti enzýmov. Extrémofilné proteíny vykazujú značnú variabilitu pri adaptácii na podobné extrémne fyzikálne alebo chemické podmienky. Mechanizmy, ktoré umožňujú prežitie v extrémnych podmienkach sú pomerne zložité. Napríklad na zvládnutie vysokých koncentrácií soli produkujú extrémofily zvýšené množstvá kompatibilných rozpustených látok vo vnútri buniek alebo používajú iónové pumpy na udržanie osmotickej rovnováhy. V prostredí s nízkym pH používajú protónové pumpy na udržanie primeraného pH vo vnútri bunky. V nízkych alebo vysokých teplotách môžu modifikovať zloženie svojej cytoplazmatickej membrány. Naopak piezofily produkujú polynenasýtené mastné kyseliny a kompatibilné rozpustné látky a vytvárajú proteíny, ktoré im umožňujú prežiť pri vysokých hydrostatických tlakoch [31, 32, 33].

Prírodné prostredia, v ktorých sa extrémofily nachádzajú sú pre iné pozemské formy života neúnosné dokonca smrteľné. Príkladom je život v horúcich alkalických jazerách, v horúcich a kyslých prameňoch, v soľných jazerách, v hlbokomorských hydrotermálnych prieduchoch, v gejzíroch, v ľadovcoch a polárnych oblastiach. Sú prítomné aj v oblastiach kontaminovaných jadrovým odpadom a ťažkými kovmi. Z biotopov bolo v súčasnosti izolovaných mnoho rôznych extrémofilov a s ďalším rozvojom sa predpokladá ich nárast. [10, 31, 34, 35].

### 2.2.1 Termofilné baktérie

Termofily sú definované ako organizmy, ktoré nielen prežívajú, ale aj prosperujú pri vysokých teplotách. Prvýkrát boli objavené v roku 1888 Miguelom, ktorý charakterizoval termofily, ktoré tvorili aeróbne spóry a boli schopné rásť pri 70 °C. Od tohto momentu bolo preskúmaných a charakterizovaných veľa kmeňov termofilných baktérií. Najväčší záujem priťahovali hlavne baktérie patriace do rodov *Bacillus* a *Clostridium*. Predpokladá sa, že termofilné baktérie patria medzi jedny z prvých organizmov žijúcich na Zemi [32, 36].

Okrem prírodných prostredí akými sú napríklad gejzíry, horúce pramene a hydrotermálne prieduchy, kde teploty ľahko presahujú 100 °C, sa nachádzajú aj na miestach vytvorených človekom. Medzi tieto prostredia patria čističky odpadových vôd, priemyselné odpadové toky, komposty alebo aktivované kaly [29, 32, 37].

Podľa optimálnej teploty rastu ich možno rozdeliť na:

- Mierne termofily - optimálny rast od 45 do 65 °C
- Extrémne termofily - optimálny rast od 65 do 85 °C
- Hypertermofily - optimálny rast od 85 °C [30].

Medzi všetkými termofilmi je oveľa vyšší počet anaeróbov ako aeróbov. To je pravdepodobne spôsobené skutočnosťou, že kyslík je pri vyšších teplotách oveľa menej rozpustný, a preto nie je k dispozícii organizmu v metabolických procesoch. Väčšina termofilných anaeróbných eubaktérií je chemoorganoheterotrofná a využíva organické zlúčeniny ako zdroje energie a uhlíka. V skupine termofilných anaeróbných baktérií sa však pozoruje množstvo ďalších termofilov, ktoré získavajú energiu chemolitotrofne, fotoorganotrofne a fotoautotrofne [39].

Životná aktivita termofilných baktérií je stále preskúmaná len čiastočne. Na vývoj genómov termofilov mohli mať veľký vplyv enviromentálne zmeny a teplotné posuny, ktoré spôsobili toleranciu a schopnosť prežiť pri vysokých teplotách. Vývojové zmeny mohli byť výsledkom horizontálnych prenosov génov, génovými mutáciami alebo stratou génov. Predpokladá sa, že pre zachovanie genomickej stability je opravný systém DNA striktnejší, pretože pri vyšších teplotách je DNA menej stabilná [28, 40].

Mikroorganizmy majú približne polovicu génov usporiadaných do operónov. Je to z dôvodu rýchlejšej adaptácie na zmeny prostredia. U termofilov boli zaznamenané stabilnejšie operónové štruktúry ako u mezofilov. Bola tiež dokázaná takzvaná spolu-regulácia operónov pri gébovej expresii prostredníctvom globálnych regulátorov. Tento spôsob regulácie umožňuje účinný spôsob, ako organizmy reagujú na zmeny prostredia. Genómy prokaryot v porovnaní s eukaryotmi obsahujú málo intrónov, teda úsekov, ktoré sa neprekladajú do proteínov. Výsledkom je rýchla reprodukcia a znížená spotreba energie na syntézu nukleotidov. Zaujímavosťou je, že veľkosť genómov termofilov je vo všeobecnosti menšia ako veľkosť mezofilov. Bakterie žijúce pri teplotách nad 60 °C majú genómov menšie ako 4 Mbp, zatiaľ čo baktéri žijúce pri teplotách nižších ako 45 °C majú genómi väčšie ako 6 Mbp [40, 41, 42].

Genomická štruktúra termofilov sa považuje za stabilnejšiu v porovnaní s mezofilmi aj vďaka vyššiemu obsahu guanínu (G) a cytozínu (C) v genóme, ktorý je ukazovateľom stability DNA. Vysoký obsah GC zabezpečuje aj stabilnejšiu štruktúru tRNA a rRNA. Translačný mechanizmus je tak stabilný a účinný, a funkčné proteíny sa môžu syntetizovať v dostatočnom množstve [43, 44].

Proteíny zohrávajú veľkú rolu pri termoadaptácii. Zloženie a poradie aminokyselín v proteínoch termofilov je odlišné ako u mezofilov. Termofilné proteíny majú väčší obsah nabitých aminokyselín, ako je glutamát, lyzín a arginín. Kľúčovými prvkami pre existenciu termofilov sú proteíny súvisiace s glykolýzou. Termofilom poskytujú okamžitú energiu na zvládnutie tepelného stresu. Predpokladá sa, že stabilita proteínov je u termofilných baktérií spôsobená vyšším počtom disulfidových väzieb, iónových a hydrofóbných interakcií, vodíkových väzieb a soľných mostíkov. Tieto väzby podporujú tvorbu kompaktných štruktúr proteínov [45, 46, 47].

Príjem a vylučovanie nízkomolekulárnych látok reguluje bunková membrána. Priepustnosť membrány je závislá na teplote prostredia. Pri zmene rastovej teploty dochádza k rýchlej regulácii zloženia membránových lipidov [48].

V dôsledku rastu pri vysokej teplote a ich unikátnych makromolekulových vlastností môže byť metabolická rýchlosť týchto baktérií vysoká. Zvýšenou rýchlosťou rastu môže bunky termofilov dorastať do menších veľkostí ako bunky mezofilných baktérií. Napriek tomu sú

výťažky biomasy vyššie. Štúdie ukazujú, že termofilné procesy môžu byť stabilnejšie, rýchlejšie a lacnejšie. Termofilné baktérie demonštrujú mnoho výhod pre použitie v priemyselnom odvetví. Veľkou výhodou ich využitia v priemysle sú ich vysoké rýchlosti rastu, ktoré môžu dvakrát až trikrát urýchliť fermentačné procesy oproti technológiám používajúcich mezofilné baktérie. Použitím vysokoteplotného spracovania sa znižuje riziko nežiadúcej mikrobiálnej kontaminácie, znižuje sa šanca fágovej infekcie, zvyšuje sa rozpustnosť substrátov a zároveň sa znižuje ich viskozita. Vďaka týmto výhodám našli uplatnenie pri výrobe chemických surovín a palív, v enzýmovej technológii a pri biokonverzii odpadov [29, 49, 50].

Enzýmy produkované termofilnými mikroorganizmami teda termozýmy sú technologicky zaujímavé, pretože umožňujú uskutočniť reakcie, ktoré by pri použití mezofilných enzýmov z termodynamického hľadiska neboli možné. Udržiavajú si nie len tepelnú stabilitu, ale často zachovávajú svoju aktivitu aj v prítomnosti organických rozpúšťadiel a v prostredí s vysokou salinitou. Sú odolné voči proteolýze a chemickej denaturácii. V priemyselných procesoch sa využívajú ako biokatalyzátory a môžu nahrádzať mezofilné enzýmy. Termostabilitu si zachovávajú aj pri klonovaní a exprimovaní v mezofilných hostiteľoch. Tieto enzýmy majú široké uplatnenie v rôznych odvetviach. Za zmienku určite stojí uplatnenie v oblasti génového inžinierstva, ktoré využíva termofilné DNA polymerázy pri polymerázovej reťazovej reakcii na amplifikáciu DNA. Dôležitú úlohu v potravinárskom, papierenskom, farmaceutickom a chemickom priemysle hrajú termostabilné enzýmy degradujúce polyméry. Patria sem  $\alpha$ -amylázy s teplotným optimom 70 °C, hydrolýzujúce škrob, xylanázy využívané na bielenie papiera, lipázy s uplatnením v kozmetickom priemysle alebo termolýzín používaný pri syntéze dipeptidov. Medzi ďalšie patria alkoholdehydrogenázy, ktoré sú používané na syntézu opticky aktívnych alkoholov alebo kofaktorov ako sú NAD a NADP. V organickej syntéze sú užitočné aldolázy, transketolázy, hydroxynitrilové lyázy, ktoré sa podieľajú na tvorbe väzby uhlík-uhlík a transformácii nitrilov [29, 31, 51, 52].

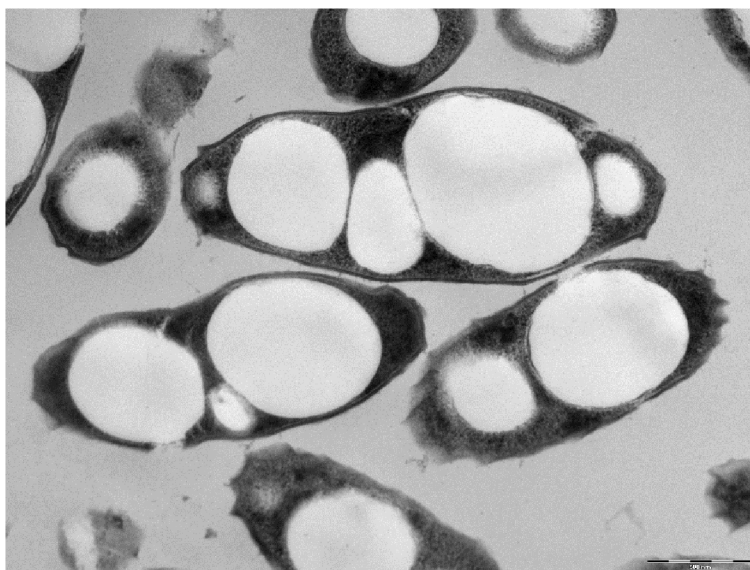
### 2.2.1.1 *Schlegelella thermodepolymerans*

*Schlegelella thermodepolymerans* je termofilná baktéria, ktorá sa zaraďuje do kmeňa Proteobaktérií. Baktéria bola prvýkrát izolovaná z aktivovaného kalu z Fayoum v Egypte za termofilných aeróbnych podmienok. Bunky tejto baktérie sú gramnegatívne, tyčinkovitého tvaru a nevytvárajú spóry. Ich pohyb je uskutočňovaný pomocou polárneho monotrichózneho bičíka. Rastie pri teplotách 37-60 °C. Optimálne pH pre rast je 7, ale prežíva v rozmedzí pH 6-9. Dĺžka buniek je 1-2  $\mu\text{m}$  a ich šírka je 0,5-0,6  $\mu\text{m}$ . Bakteriálne bunky dobre rastú v komplexných médiách. Kolónie na tuhom živnom médiu sú sfarbené do biela, sú nepriehľadné, ich povrch je hladký a sú vyvýšené. Baktérie neprodukujú pigmenty. Obsah G + C v DNA je 70 % [53].

Bakteriálne bunky *Schlegelella thermodepolymerans* kmeňa DSM 15344 sú na obrázku 5 pozorované pod transmisným elektrónovým mikroskopom. V cytoplazme buniek je vidieť PHA inklúzie. Bunky sú schopné degradovať poly(3-hydroxybutyrát), ako aj kopolymér poly(3-hydroxybutyrát-co-3-merkaptopropionát) obsahujúci 3-merkaptopropionát.

Zo *Schlegelella thermodepolymerans* bola izolovaná termostabilná PHA depolymeráza so substrátovou špecifitou na oxoesterové väzby PHA. Tento typ enzýmu nemôže štiepiť thioesterové väzby [53, 54].





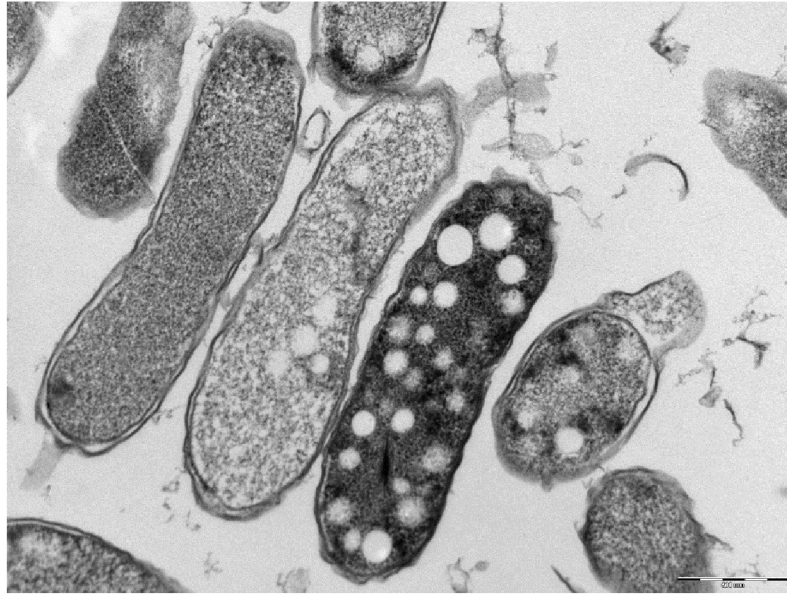
Obrázok 5: Akumulované PHA inklúzií v *Schlegelella thermodepolymerans* pozorovaná pod transmisným elektrónovým mikroskopom (mierka 500 nm)

### 2.2.1.2 *Schlegelella aquatica*

*Schlegelella aquatica* je mierne termofilná baktéria. Bola izolovaná v oblasti Tainan na južnom Taiwane z horúcich prameňov Guanzingling. Teplota vody z tohto horúceho prameňa sa pri odbere vzorky v roku 2005 pohybovala medzi 60-65 °C a pH bolo približne 8. *Schlegelella aquatica* je gramnegatívna baktéria, tyčinkovitého tvaru. Bakteriálne bunky netvorí spóry. Dĺžka buniek je v rozmedzí 0,8-2,0 µm a jej priemer 0,4 až 0,5 µm. Bunky baktérie *Schlegelella aquatica* sa vyskytujú jednotlivo a ich pohyb zaručuje polárny bičík. Rastie pri teplotách v rozmedzí 30-60 °C. Baktérie dokážu prežiť v prostredí s pH 6,0-8,0 optimálne je však pH 7,0. Farba kolónií na tuhom živnom médiu je biela alebo krémová pričom sú kruhového a konvexného tvaru s celými okrajmi. Bunky neprodukujú pigmenty. Obsah G + C v DNA je 69,2 % [55].

Baktéria má schopnosť tvoriť granule PHA, ktoré možno pozorovať na obrázku 6. Na obrázku možno pozorovať morfológiu bakteriálnej bunky *Schlegelella aquatica* kmeňa LMG 23380. Podľa výpočtov sekvenčnej podobnosti sa *Schlegelella aquatica* najviac zhoduje s rodovo príbuzným kmeňom *Schlegelella thermodepolymerans* [55].





Obrázok 6: Akumulované PHA inklúzií v *Schlegelella aquatica* pozorovaná pod transmisným elektrónovým mikroskopom (mierka 500 nm)

### 2.2.1.3 *Thermomonas hydrothermalis*

Kmeň *Thermomonas hydrothermalis* bol vyizolovaný z termálneho prameňa v São Gemil v strednom Portugalsku. Zaraďuje sa medzi gramnegatívne baktérie s tyčinkovitým tvarom bunky. Tento mikroorganizmus je prísne aeróbny a organotrofný [56].

Dĺžka buniek sa pohybuje v rozmedzí 2,0 až 4,0  $\mu\text{m}$  a ich šírka od 0,6 až 0,9  $\mu\text{m}$ . Bunky sú nepohyblivé. Tento druh vytvára kolónie sfarbené do svetlo hnedej s priemerom 0,5 až 2,0 mm. Pri starších kultúrach možno pozorovať vytvorenie hnedého pigmentu. Teplotné rozmedzie rastu je od 30 do 60 °C. Pri hraničných teplotách je rast veľmi slabý. Ideálne pH pre život tejto baktérie je od 6,5 až 8,5. Obsah G + C v DNA je 64,7 % [56].

## **3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ**

### **3.1 Použité mikroorganizmy, chemikálie a prístroje**

#### **3.1.1 Použité mikroorganizmy**

V praktickej časti bakalárskej práce boli na experimenty používané mikroorganizmy zakúpené z nemeckej zbierky Leibnitz Institut DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures a to bakteriálne kmene *Thermomonas hydrothermalis* DSM 14834 a *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344 a z belgickej zbierky BCCM-Belgian Coordinated Collections of Microorganisms a to kmeň *Schlegelella aquatica* LMG 23380.

#### **3.1.2 Použité chemikálie**

##### **3.1.2.1 Použité chemikálie na kultiváciu mikroorganizmov**

- Agar powder, Bacteriological (HiMedia, India)
- Citrát železito-amónny (Fluka, Česká republika)
- Dihydrát chloridu vápenatého (Lachema, Česká republika)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Heptahydrát síranu horečnatého (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Chlorid amónny (LachNer, Česká republika)
- Nutrient Broth w/1% peptone (HiMedia, India)
- Yeast Extract Powder (HiMedia, India)

##### **3.1.2.2 Použité komponenty na izoláciu DNA, PCR a elektroforézu**

- Agaróza (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- DNA štandard – FastGenne 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs, UK)
- Etyléndiamíntetraacetát sodný (LachNer, Česká republika)
- EDTA (LachNer, Česká republika)
- Glycerol (LachNer, Česká republika)
- Chlorid horečnatý (Thermo Scientific, USA)
- Kyselina boritá (Penta, Česká republika)
- Master mix One Taq Hot Start (2x koncentrovaný) (New England BioLabs, UK)
- Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe, Nemecko)
- PCR loading buff, Yellow load (Top-Bio, UK)
- Primery (Generi Biotech, Česká republika)
- Sterilná voda Aqua pro injectione (B. Braun Medical, Nemecko)

- Tris (hydroxymetyl) aminometán (LachNer, Česká republika)

### **3.1.2.3 Chemikálie pre screening uhlíkatých zdrojov**

- Arabinóza (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- 1,4-butándiol (Fluka, Švajčiarsko)
- $\gamma$ -butyrolakton (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- D-fruktóza (LachNer, Česká republika)
- D-galaktóza (LachNer, Česká republika)
- D-glukóza monohydrát (LachNer, Česká republika)
- Glycerol bezvodý (LachNer, Česká republika)
- Kyselina valérová (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Laktóza monohydrát (LachNer, Česká republika)
- Manóza (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Propionát sodný (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Sacharóza (LachNer, Česká republika)
- Škrob rozpustný (Penta, Česká republika)
- D-(+)-xylóza (HiMedia, India)

### **3.1.2.4 Ostatné chemikálie**

- Hydroxid sodný (LachNer, Česká republika)
- Chloroform (VWR Chemicals, USA)
- Kyselina benzoová (VWR Chemicals, USA)
- Kyselina 3,5-dinitrosalicilová (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Metanol (VWR CHEMICALS PROLABO, USA)
- Vínan sodno-draselný (Lachema, Česká republika)

### **3.1.3 Použité prístroje**

- Analytické váhy PA224C, Pioneer
- Bežné laboratórne sklo a vybavenie
- Blokový termostat Stuart SBH 200D, Bibby Scientific
- Duálny vizualizačný systém Ultra Viewer, Ultra Lum
- ELISA reader, BioTek, ELx808
- Laboratórny bioreaktor Biostat B-plus, Sartorius Biotech
- Laminárny box Aura mini, Bio air instruments – Euroclone

- Magnetická miešačka bez ohrevu technoKartell, TKO
- Mikrocentrifuga Sigma 1-14
- Nanofotometer, Implen, P300
- Plynový chromatograf s FID, Thermo Scientific, Trace 1300;  
Kolóna: DB-WAX 30 m by 0,25 mm
- Temperovaná trepačka, Heidolph, Incubator 1000
- Thermo-cycler MyCycler™, BIO-RAD
- Transiluminátor TVR 3121, Spectroline
- Váha Kern EW 620-3NM
- Vodný kúpeľ TW2, Julabo
- Vortex, Suspendor Bench Mixer, BENCHMARK
- Zdroj napätia MP 300 V, Major Science

### 3.2 Uchovávanie mikroorganizmov

Zbierkové baktérie boli dodané v lyofilyzovanej podobe a oživené podľa návodu dodávateľa. Oživené bakteriálne bunky boli kultivované v inokulačnom médiu. Mikroorganizmy boli uchovávané vo forme kryokonzerv v celkovom objeme 1,5 ml, kde ako kryoprotektant bol použitý 10% roztok glycerolu. Takto pripravené kryokonzervy boli skladované v hlbokomraziacom boxe pri teplote  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3 Kultivácia mikroorganizmov

#### 3.3.1 Príprava inokulačného média

Komplexné média boli pripravované do 100 ml Erlenmeyerových baniek v objeme 50 ml. Presné zloženie inokulačného média je uvedené v tabuľke 4. Do vysterilizovaných médií boli zaočkované bakteriálne kultúry. Inokulá sa kultivovali 24 hodín na trepačkách pri teplote  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  pri 180 rpm.

Tabuľka 4: Zloženie komplexného média Nutrient Broth

látka	koncentrácia [g/l]
beef extract	10
pepton	10
NaCl	5

#### 3.3.2 Príprava minerálneho média a kultivácia baktérií

Do 250 ml Erlenmeyerových baniek bolo pripravených 100 ml minerálneho média podľa zloženia uvedeného v tabuľke 5. Na kultiváciu bakteriálneho kmeňa *Thermomonas hydrothermalis* DSM 14834 bolo použité médium s koncentráciou yeast extraktu 3 g/l. Zvyšné dve baktérie boli kultivované pri koncentrácii 0,5 g/l yeast extraktu. V laminárnom boxe bol do sterilných produkčných médií vytemperovaných na  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  pridaný uhlíkový zdroj

s koncentráciou 20 g/l (s výnimkou prekursorov) a roztok stopových prvkov TES II, ktorého zloženie je uvedené v tabuľke 6. Do takto pripravených médií boli zaočkované bakteriálne inokulá v pomere 1:10. Termofilné mikroorganizmy boli kultivované na temperovaných trepačkách 72 hodín pri 180 rpm.

Tabuľka 5: Zloženie minerálneho média

<b>látka</b>	<b>koncentrácia [g/l]</b>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O	9
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5
NH <sub>4</sub> Cl	1
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,2
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,02
NH <sub>4</sub> Fe <sup>III</sup> citrát	0,0012
yeast extrakt	0,5/3,0
TES II	1 ml/l

Tabuľka 6: Zloženie roztoku stopových prvkov TES II

<b>látka</b>	<b>koncentrácia [g/l]</b>
EDTA	50
FeCl <sub>3</sub>	8,3
ZnCl <sub>2</sub>	0,84
CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,13
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,1
MnCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,016
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,1

### 3.3.3 Screening využitia vybraných uhlíkatých zdrojov

Vybrané bakteriálne kmene boli testované na schopnosť využitia 8 sacharidov a jedného nesacharidového zdroja uhlíku (tabuľka 7). Podľa postupu uvedeného v kapitole 3.3.2 boli pripravené minerálne média s roztokom stopových prvkov. Do jamiek sterilnej mikrotitračnej doštičky bolo napipetovaných 75 µl minerálneho média. Ďalej bolo pridaných 75 µl príslušného substrátu s koncentráciou 20 g/l. Nakoniec bolo do médií so substrátmi zaočkovaných 20 µl inokula daného bakteriálneho kmeňa. Každá vzorka bola pripravená v 3 paralelných stanoveniach. Kultivácia prebiehala 72 hodín pri teplote 50 °C. Pomocou prístroja ELISA reader boli premerané hodnoty absorbancie pri 630 nm na začiatku a po ukončení kultivácie.

Tabuľka 7: Zoznam použitých zdrojov uhlíku

	Zdroj uhlíku
1	glycerol
2	glukóza
3	fruktóza
4	galaktóza
5	manóza
6	xylóza
7	sacharóza
8	laktóza
9	škrob

### 3.3.4 Produkcia PHA s prídavkom prekurzorov

Cieľom kultivácie s využitím prekurzorov bolo sledovať schopnosť produkcie kopolymérov P(3HB-co-3HV) a P(3HB-co-4HB). Ako prekurzory sa použili: propionát sodný, kyselina valérová, 1,4-butandiol a  $\gamma$ -butyrolaktón. Ich presná koncentrácia je uvedená v tabuľke 8. Do minerálnych médií s prídavkom propionátu sodného a kyseliny valérovej bolo pridaných 20 g/l uhlíkového zdroju, ktorý bol pre každý bakteriálny kmeň experimentálne stanovený ako najvhodnejší zo skúmaných substrátov. Do médií bolo zaočkované inokulum v pomere 1:10. Kultivácia prebiehala 72 hodín pri teplote 50 °C. Po ukončení kultivácie bola získaná biomasa, ktorá bola ďalej analyzovaná pomocou plynovej chromatografie s FID detektorom.

Tabuľka 8: Zoznam použitých prekurzorov a ich koncentrácia

prekurzor	koncentrácia [g/l]
propionát sodný	2
kyselina valérová	2
1,4-butandiol	8
$\gamma$ -butyrolaktón	8

### 3.3.5 Kultivácia kmeňa *S. thermodepolymerans* v prostredí modelových hydrolyzátov

Modelové hydrolyzáty mäkkého a tvrdého dreva, ryžovej slamy, bagasy z cukrovej trstiny, pšeničnej slamy a otrubov slúžili ako substráty na kultiváciu baktérií. Na prípravu modelových hydrolyzátov boli použité sacharidy: glukóza, xylóza, arabinóza, manóza a galaktóza, ktorých presná koncentrácia je uvedená v tabuľke 9. Kultivácia prebiehala v minerálnom médiu s objemom 100 ml (tabuľka 5) a celková koncentrácia sacharidov v médiu činila 20 g/l. Postup prípravy produkčného média a spôsob kultivácie sa zhodoval s postupom uvedenom v kapitole 3.3.2. Teplota kultivácie bola 55 °C.

Tabuľka 9: Zloženie modelových substrátov

	koncentrácia [g/l]				
	glukóza	xylóza	arabínóza	manóza	galaktóza
mäkké drevo	16,6	1,0	0,1	2,0	0,3
tvrdé drevo	3,2	12,4	1,0	1,8	1,6
ryžová slama	4,2	13,4	2,4	-	-
bagasa z cukrovej trstiny	2,8	15,0	2,2	-	-
pšeničná slama	11,2	7,2	0,9	-	0,7
pšeničné otruby	0,8	12,4	6,8	-	-

### 3.3.6 Kultivácia kmeňa *S. thermodepolymerans* v laboratórnom bioreaktore

Na kultiváciu v bioreaktore sa pripravilo 3,5 l minerálneho média s koncentráciou yeast extraktu 0,5 g/l. Médium spolu s kultivačnou nádobou bolo pred začatím kultivácie vysterilizované. Ako substrát bola použitá xylóza s koncentráciou 20 g/l. Do média bolo naočkované inokulum v pomere 1:10. Kultivácia prebiehala v mechanicky miešanom sklenenom laboratórnom bioreaktore Biostat B-plus po dobu 24 hodín, pri teplote 55 °C a pH 7. Hodnota pH sa regulovala automaticky za použitia kyseliny a zásady. Obsah rozpusteného kyslíka bol regulovaný na 20 %. Počas kultivácie boli pravidelne odoberané vždy 2 paralelné vzorky biomasy s objemom 10 ml. Vzorky boli spracované podľa postupu stanovenia obsahu biomasy gravimetrickou metódou a koncentrácia P(3HB) v biomase bola stanovená pomocou plynovej chromatografie s FID detekciou.

### 3.3.7 Kultivácia kmeňa *S. thermodepolymerans* s limitáciou kyslíka

Kultivácia prebiehala v 250 ml Erlenmeyerových bankách pričom objem minerálneho média bol 50; 75; 100; 125; 150; 175 ml. Médium bolo pripravené podľa postupu uvedeného v kapitole 3.3.2 s koncentráciou xylózy 20 g/l. Inokulum bolo do médií zaočkované v pomere 1:20. Kultivácia prebiehala 72 hodín, pri teplote 55 °C a 180 rpm.

## 3.4 Použité metódy

### 3.4.1 Izolácia bakteriálnej DNA

#### 3.4.1.1 Príprava lyzačného pufru

Ako lyzačný pufr bol použitý 5 mM tris(hydroxymetyl)aminometán. Na jeho prípravu bolo v 100 ml destilovanej vody rozpustených 0,0605 g tris(hydroxymetyl)aminometánu. Použitím HCl bolo pH upravené na hodnotu 8,5. Pripravený roztok sa vysterilizoval a uchoval v mrazničke.

#### 3.4.1.2 Izolácia bakteriálnej DNA

Na izoláciu bakteriálnej DNA bola pomocou sterilnej jednorazovej bakteriologickej kľučky odobraná kultúra z Petriho misky, ktorá bola rozsuspendovaná v 100 µl lyzačného pufru (5 mM Tris-HCl, pH 8,5).

Na rozrušenie bunkových stien a membrán sa použila tepelná lýza, ktorá prebiehala v termobloku pri 98 °C po dobu 10 minút. Po termolýze bola suspenzia v Eppendorfovej skúmavke 10 minút centrifugovaná pri 10 000 rpm. Do čistej Eppendorfovej skúmavky bolo napipetovaných 60 µl supernatantu s uvoľnenou DNA. Vzorka bola uchovaná v mrazničke.

### 3.4.1.3 Spektrofotometrické stanovenie čistoty a koncentrácie izolovanej DNA

Pomocou spektrofotometra NanoPhotometer™ Implen (lid 10) bola stanovená koncentrácia a čistota vyizolovanej DNA. Ako blank bol použitý lyzačný pufoľ o objeme 1 µl. Boli zmerané vzorky s izolátmi DNA o objeme 1 µl a odčítané boli hodnoty koncentrácie v ng/µl. Keďže nukleové kyseliny absorbujú UV žiarenie s maximom absorpcie v oblasti vlnovej dĺžky okolo 260 nm a proteíny, ktoré znečisťujú vzorku, pri absorpčnom maxime okolo 280 nm, bol stupeň čistoty stanovený z pomeru absorpcie 260 a 280 nm (A260/A280).

### 3.4.2 Polymerázová reťazová reakcia

Po úspešnej izolácii chromozomálnej DNA boli prostredníctvom polymerázovej reťazovej reakcie amplifikované jej fragmenty. Pripravila sa PCR zmes, ktorej zloženie je uvedené v tabuľke 10. Amplifikácii boli podrobené úseky kódujúce gény *16S* rRNA a *phaC*. Na amplifikáciu *16S* rRNA génu boli použité primery 16S-F a 16S-R. Sekvencie primerov sú zobrazené v tabuľke 11. Zároveň bol amplifikovaný *phaC* gén s veľkosťou 551 bp pomocou primerov G-D a G1-R. Aby sa overilo, že nedošlo ku kontaminácii bola uskutočnená negatívna kontrola, v ktorej sa DNA nahradila PCR vodou. Pozitívna kontrola obsahovala DNA izolovanú z kmeňa *Cupriavidus necator* produkujúceho PHA.

Tabuľka 10: Zloženie PCR zmesi amplifikujúcej *16S* rRNA a *phaC* gény

PCR zložka	Objem [µl]
MasterMix	12,5
Mg <sup>2+</sup>	2,6
16S-F	1
16S-R	1
<i>phaC</i> G-D	1
<i>phaC</i> G1-R	1
DNA	2
PCR voda	3,9
<b>celkový objem</b>	<b>25</b>

Tabuľka 11: Zoznam použitých primerov, ich sekvencie a gény, ktoré amplifikujú

Amplifikovaný gén	Veľkosť [bp]	Primery	Sekvencia primeru
<i>16S</i> rRNA	1500	16S-F	5' AAGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'
		16S-R	5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3'
<i>phaC</i>	551	G-D	5' GTGCCGCC(GC)(CT)(AG)(GC)ATCAACAAGT 3'
		G1-R	5' GTTCCAG(AT)ACAG(GC)A(GT)(AG)TCGAA 3'

Pripravené vzorky boli umiestnené do termocykleru. Tabuľka 12 uvádza časovo-teplotný program polymerázovej reťazovej reakcie.



Tabuľka 12: Časovo-teplotný program termocyklieru pre amplifikáciu génov 16S rRNA a phaC

krok	teplota [°C]	čas [s]	počet cyklov
1	94	30	1
2	94	30	30
	55	30	
	68	90	
3	68	300	1
	4	60	

### 3.4.3 Analýza produktov PCR pomocou agarózovej gélovej elektroforézy

Na separáciu a identifikáciu DNA fragmentov sa použila agarózová gélová elektroforéza. Ako prvé bol pripravený 10x koncentrovaný TBE pufor (tabuľka 13), ktorý slúžil pri elektroforéze ako elektrolyt.

Tabuľka 13: Zloženie 10x koncentrovaného TBE pufru

látka	množstvo
tris(hydroxymetyl)aminometán	108 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	55 g
EDTA	9,3 g
destilovaná voda	1000 ml

Na základe očakávanej veľkosti amplikónov bol pripravený gél obsahujúci 2 % hm. agarózy, TBE pufor a 6 µl interkalačného farbiva Midori Green . Do nanášajúcich jamiek v géle bolo napipetovaných 10 µl zmesi, ktorá sa pripravila zmiešaním 10 µl PCR produktu a 3 µl nanášajúceho pufru. Zloženie nanášajúceho pufru je uvedené v tabuľke 14. Zároveň do jednej z jamiek bolo napipetovaných 5 µl štandardu s presne definovanou veľkosťou fragmentov. Gél bol vložený do elektroforetickej vane a prekryl sa vrstvou TBE pufru. Elektroforéza prebiehala 40 minút pri napätí 80 V. Po skončení bol gél pozorovaný pod UV transluminátorom.

Tabuľka 14: Zloženie nanášajúceho pufru

látka	množstvo
brómfenolová modrá	20 mg
glycerol	3 ml
destilovaná voda	7 ml

### 3.4.4 Stanovenie obsahu biomasy spektrofotometricky

Spektrofotometricky bola stanovená intenzita zákalu po 72 hodinovej kultivácii. Absorbancia bola meraná pri 630 nm a ako slepá vzorka sa použila destilovaná voda. Každá vzorka bola premeraná trikrát. Keďže sa nejedná o presnú metódu, získané výsledky boli použité len na porovnanie a overenie výsledkov z gravimetrického stanovenia.

### 3.4.5 Stanovenie obsahu biomasy gravimetricky

Po 72 hodinovej kultivácii bolo do centrifugačných skúmaviek odobratých 10 ml vzorky zo suspenzie buniek. Následne boli centrifugované pri 6000 rpm po dobu 5 minút. Bunky sa premyli a opäť zcentrifugovali za rovnakých podmienok. Supernatanty boli zliate a získaná biomasa bola sušená do konštantnej hmotnosti. Bunková hmota bola zvážená na analytických

váhach. Prostredníctvom získanej hmotnosti sa stanovila koncentrácia vyprodukovanej biomasy v g/l.

### **3.4.6 Príprava vzoriek na GC-FID analýzu PHA**

Prostredníctvom plynovej chromatografie s plameňovo ionizačným detektorom – GC-FID sa kvalitatívne a kvantitatívne stanovili polyhydroxyalkanoáty v biomase. Do vialiek bola navážená usušená biomasa v rozmedzí 8-11 mg. Biomasa bola rozpustená v 1 ml chloroformu a následne bola pridaná transesterifikačná zmes (15% roztok kyseliny sírovej v methanole s vnútorným štandardom kyselinou benzoovou 5 mg/ml) v objeme 0,8 ml. Uzavreté vialky boli umiestnené v termostate pri teplote 95 °C po dobu 3 hodiny. V termostate dochádzalo ku kyslo katalyzovanej hydrolýze polyhydroxyalkanoátov a následne k transesterifikácii monomérnych jednotiek za vzniku methylesterov. Po ochladení na laboratórnu teplotu sa do vzoriek pridalo 0,5 ml 0,05 M hydroxidu sodného. Vialky boli pretrepané a po ustálení fázového rozhrania bolo do čistých vialiek s pripraveným chloroformom o objeme 900 µl odobraných, 50 µl organickej fázy. Takto pripravené vzorky boli analyzované plynovým chromatografom s FID detekciou.

### **3.4.7 Analýza buniek transmisným elektrónovým mikroskopom**

Bunky bakteriálnych kmeňov *Schlegelella thermodepolymerans* a *Schlegelella aquatica* boli pozorované transmisným elektrónovým mikroskopom. Analýza bola uskutočnená v Biologickom centre Akadémie vied Českej republiky v Českých Budějoviciach. Sledované bunky boli kultivované 48 hodín na najlepšom uhlíkatom zdroji za optimálnej teploty. Na analýzu boli dodané v podobe bunkovej suspenzie.

### **3.4.8 Stanovenie koncentrácie redukujúcich sacharidov pomocou kyseliny 3,5-dinitrosalicylovej**

#### **3.4.8.1 Príprava roztoku činidla kyseliny 3,5-dinitrosalicylovej**

Pre prípravu roztoku činidla boli 2 g kyseliny 3,5-dinitrosalicylovej rozpustené v 100 ml destilovanej vody. Zmes sa zahrieva až do úplného rozpustenia kyseliny. Do vzniknutého roztoku bolo pridaných 40 ml 2 M NaOH. Za stáleho miešania bol do roztoku pridaný vínan sodno-draselný s hmotnosťou 60 g. Získané činidlo kyseliny 3,5-dinitrosalicylovej (DNS) sa kvantitatívne previedlo do odmernej banky a doplnilo destilovanou vodou na celkový objem 200 ml.

#### **3.4.8.2 Stanovenie kalibračnej priamky**

Pre stanovenie kalibračnej krivky bol pripravený roztok xylózy s koncentráciou 3 g/l. Do skúmaviek bolo napipetovaných 3,0; 2,4; 1,8; 1,2; 0,6; 0,1 ml tohto roztoku. Obsah skúmaviek bol doplnený destilovanou vodou na celkový objem 3 ml. Do čistých skúmaviek bolo odpipetovaných 0,5 ml zriedených roztokov a k nim pridaných 0,5 ml činidla DNS. Skúmavky sa zahrievajú 10 minút vo vodnom kúpeli pri teplote 70 °C. Po vyňatí boli ponechané v tme až do schladnutia a doplnené destilovanou vodou na objem 10 ml. Spektrofotometricky bola zmeraná absorbanca, pri vlnovej dĺžke 540 nm.

### ***3.4.8.3 Stanovenie zbytkových redukujúcich sacharidov v kultivačných médiách***

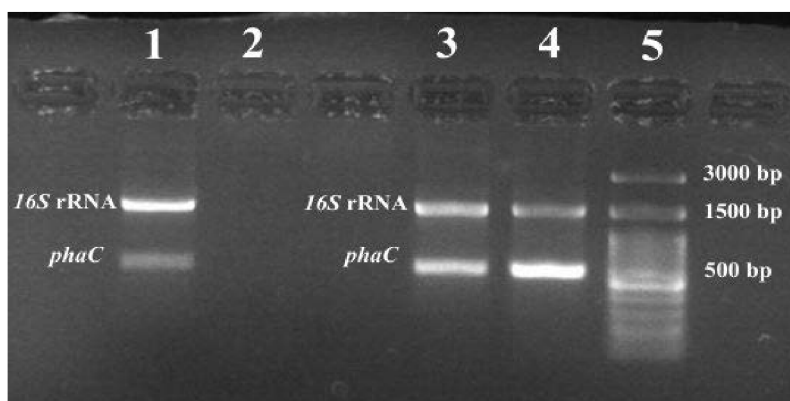
Koncentrácia zbytkových sacharidov bola stanovená zo supernatantov získaných centrifugáciou biomasy. Do skúmavky bolo napipetovaných 0,5 ml vhodne zriedenej vzorky (5x-20x) a 0,5 ml DNS činidla. Vzorky boli zahrievané vo vodnom kúpeli pri teplote 70 °C po dobu 10 minút. Po zahrievaní boli ponechané v tme. Vychladnuté vzorky boli doplnené na objem 10 ml a dôkladne premiešané. Následne bola premeraná absorbanca pri 540 nm. Súčasne sa za rovnakých podmienok pripravila slepá vzorka.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

### 4.1 Preukázanie schopnosti produkcie PHA bakteriálnych kmeňov pomocou molekulárno-biologických metód

Na overenie schopnosti produkcie PHA na úrovni genotypu boli použité molekulárno-biologické metódy. Primárne bola bakteriálna DNA vyizolovaná a stanovila sa jej koncentrácia a čistota. Keďže nukleové kyseliny absorbujú UV žiarenie s maximom absorbancie v oblasti vlnovej dĺžky okolo 260 nm a proteíny, ktoré znečisťujú vzorku, absorbujú pri absorpčnom maxime okolo 280 nm, bol stupeň čistoty stanovený z pomeru absorbancie pri 260 a 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ). U bakteriálneho kmeňa *Schlegelella thermodepolymerans* sa získaná koncentrácia vyizolovanej DNA rovnala hodnote 453 ng/ $\mu$ l, pričom pomer absorbancií bol 1,469. Koncentrácia izolovanej DNA z kmeň *Schlegelella aquatica* bola 237 ng/ $\mu$ l a čistota bola určená hodnotou 1,598. Čistá DNA by mala mať pomer absorbancií 260/280 pohybujúci sa okolo 1,8. Keďže namerané hodnoty sú nižšie možno konštatovať, že izolovaná DNA bola znečistená bielkovinami. DNA kmeňa *Thermomonas hydrothermalis* sa nepodarilo vyizolovať, schopnosť produkcie PHA preto nebola touto metódou overená.

Na replikáciu špecifických úsekov DNA bola použitá multiplex polymerázová reťazová reakcia. Amplifikácii boli podrobené úseky kódujúce gény *16S* rRNA a *phaC*. *16S* rRNA tvorí zložku menšej ribozomálnej podjednotky 30S, s veľkosťou 1500 bp. Keďže gén *16S* rRNA sa nachádza v genóme všetkých prokaryotických buniek používa sa na overenie prítomnosti bakteriálnej DNA. Súčasne bol amplifikovaný *phaC* gén s veľkosťou 551 bp. Gén *phaC* kóduje PHA syntázy I a II triedy. PCR produkty boli analyzované pomocou elektroforézy v agarózovom géle.



Obrázok 7: Gélová elektroforéza: (1) pozitívna kontrola, (2) negatívna kontrola, (3) *Schlegelella thermodepolymerans*, (4) *Schlegelella aquatica*, (5) DNA rebríček

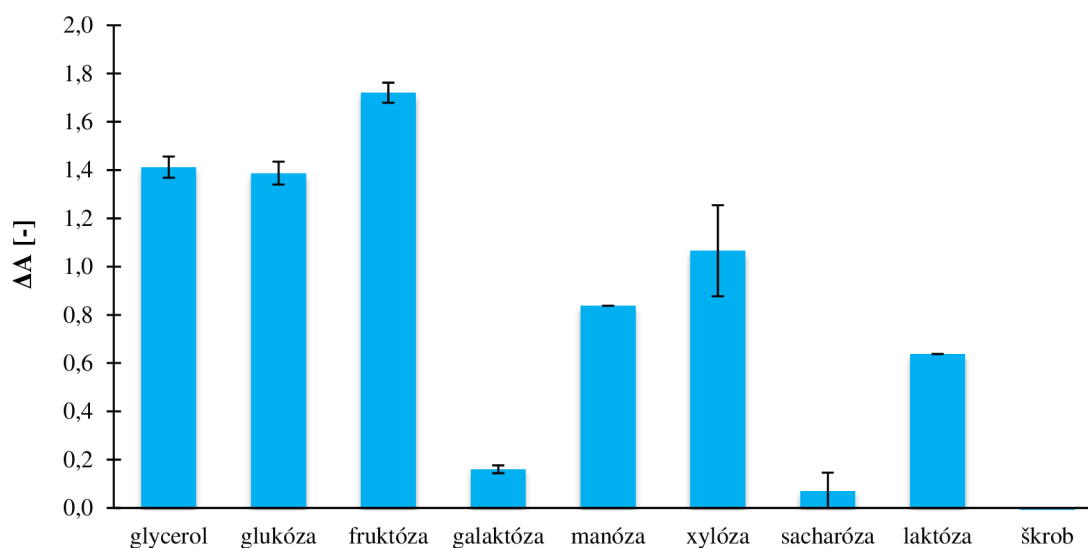
Z výsledkov elektroforézy zobrazených na obrázoku 7 vyplýva, že u skúmaných bakteriálnych kmeňov rodu *Schlegelella* bola potvrdená prítomnosť *phaC* génu. Zároveň sa overila prítomnosť *16S* rRNA. Oba kmene tak majú genetický potenciál akumulovať polyhydroxyalkanoáty v bunkách.

## 4.2 Optimalizácia podmienok rastu pre biotechnologickú produkciu

Pomocou molekulárno-biologických metód bolo potvrdené, že skúmané kmene rodu *Schlegelella* disponujú génom *phaC*, ktorý potenciálne umožňuje bunke syntetizovať PHA. U kmeňa *Thermomonas hydrothermalis* bolo v nasledujúcich experimentoch skúmané či baktéria dokáže syntetizovať daný polymér. Keďže sa jedná o termofilné baktérie je táto skutočnosť z biotechnologického hľadiska mimoriadne zaujímavá. Nasledujúce experimenty boli preto zamerané na optimalizáciu podmienok rastu. Optimálne podmienky produkcie PHA by pre priemysel znamenali efektívnu, energeticky aj ekonomicky výhodnú výrobu. Štúdium optimalizácie bolo zamerané na výber najvhodnejšieho zdroja uhlíku, teploty produkcie a vplyvu prekursorov na tvorbu PHA a kopolymérov.

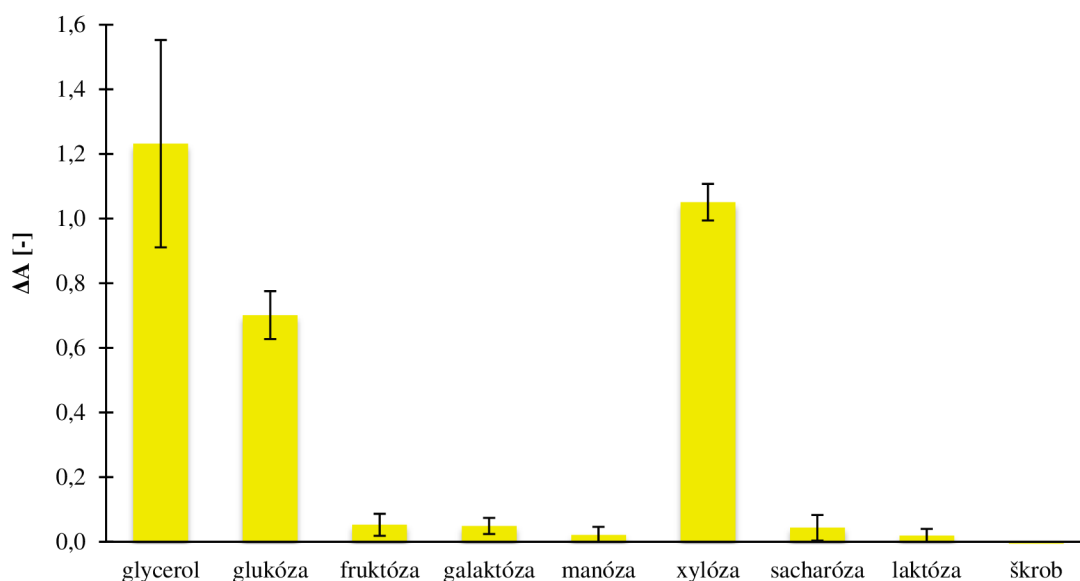
### 4.2.1 Screening využitia vybraných zdrojov uhlíku

U bakteriálnych kmeňov bola experimentálne sledovaná schopnosť využitia zdrojov uhlíku v produkčnom médiu. Medzi rýchle zdroje energie pre živé organizmy patria predovšetkým sacharidy. Preto bolo pre screening vybraných 8 sacharidov a súčasne jeden nesacharidový zdroj uhlíku. Na každom bakteriálnom kmeni bola pozorovaná schopnosť využiť vybrané substráty. Spomedzi sacharidov boli testované – glukóza, fruktóza, galaktóza, manóza, xylóza, sacharóza, laktóza a škrob. Ako nesacharidový zdroj uhlíku bol vybraný glycerol. Sledovaná bola zmena absorbancie na začiatku a po ukončení 72 hodinovej kultivácie.



Graf 1: Porovnanie využitia vybraných zdrojov uhlíku pre bakteriálny kmeň *Schlegelella thermodepolymerans*

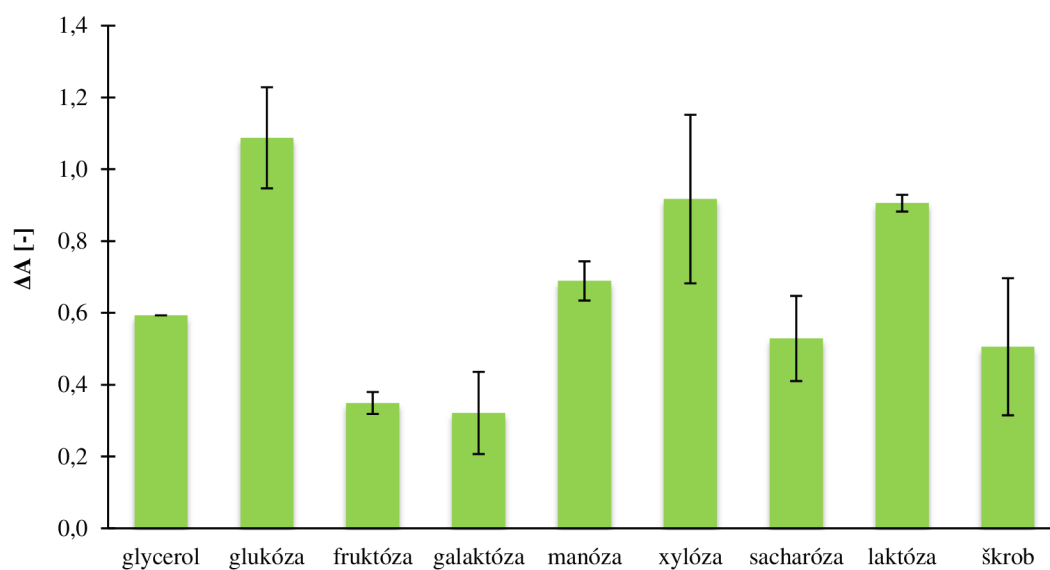
Na vyjadrenie nárastu biomasy bolo využité meranie optickej hustoty pri 630 nm. V grafe 1 sú zobrazené zdroje uhlíku, ktoré baktéria vedela efektívne využiť na rast a zároveň tie, ktoré boli len čiastočne využité. Kmeň *Schlegelella thermodepolymerans* podľa nameraných hodnôt optickej hustoty najlepšie prosperoval v prítomnosti fruktózy. Vo všeobecnosti lepšie prosperoval v prítomnosti monosacharidov teda glukózy a xylózy. Vysoká zmena zákalu sa zaznamenala aj v prítomnosti glycerolu. Naopak zmena optickej hustoty nebola badateľná v prítomnosti škrobu. *Schlegelella thermodepolymerans* pravdepodobne nedokáže efektívne transformovať škrob na menšie sacharidové jednotky.



Graf 2: Porovnanie využitia vybraných substrátov pre bakteriálny kmeň *Schlegelella aquatica*

Kmeň *Schlegelella aquatica* bol schopný intenzívneho rastu v prostredí glycerolu a dvoch monosacharidov a to xylózy a glukózy (graf 2). Zvyšné sacharidy neboli efektívne využité na rast biomasy. Zmena zákalu bola veľmi nízka. *Schlegelella aquatica* neutilizovala dostatočne ani disacharidy, sacharózu a laktózu. V prítomnosti glycerolu bola zaznamenaná najväčšia zmena absorbancie a to 1,232.

Kmene DSM 15344 a LMG 23380, ktoré sa zaraďujú do rovnakého rodu *Schlegelella* sa zhodujú v troch substrátoch, v ktorých dobre prosperujú. Dokonca namerané hodnoty optickej hustoty bunkových suspenzií sú veľmi podobné. Medzi tieto zdroje uhlíku patria glycerol, glukóza a xylóza. Veľmi nízky alebo žiadny rast bol pre obe kultúry zaznamenaný v médiách s obsahom galaktózy, sacharózy a škrobu.

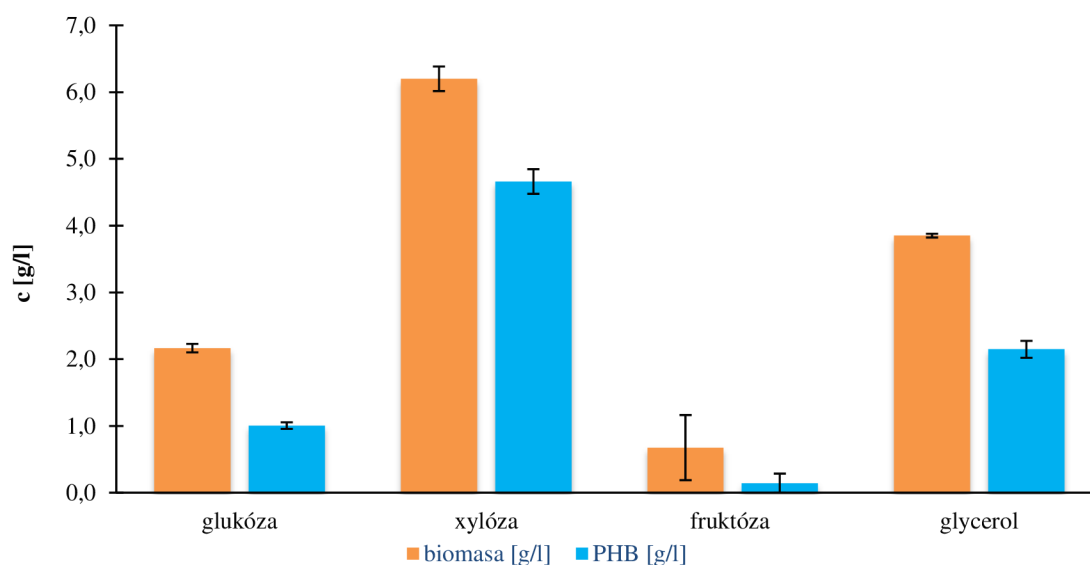


Graf 3: Porovnanie využitia vybraných zdrojov uhlíku pre bakteriálny kmeň *Thermomonas hydrothermalis*

Namerané optické hustoty pre kmeň *Thermomonas hydrothermalis* DSM 14834 ukazujú, že bunky dokážu pomerne účinne využívať všetky použité substráty (graf 3). Ako zdroj uhlíku dokáže využívať aj škrob, čo potvrdzuje, že bakteriálny kmeň je schopný produkcie amyláz, ktoré katalyzujú hydrolýzu škrobu. Potenciálna sa javí aj laktóza, ktorá by v biotechnologickom priemysle mohla byť získaná z odpadnej srvátky. Najvyššie hodnoty zmeny absorbancie boli namerané v prostredí glukózy a ďalej xylózy. Naopak najnižšie v prostredí galaktózy.

#### 4.2.2 Stanovenie optimálneho zdroja uhlíku pre produkciu PHA

Na určenie najvhodnejšieho zdroja uhlíku pre produkciu biomasy a polyhydroxybutyrátu (PHB) boli podľa screeningu v mikrotitračnej doštičke vybrané substráty s najlepšou utilizáciou. Kultivácia prebiehala v Erlenmeyerových bankách v prostredí minerálneho média. Po 72 hodinovej kultivácii pri 50 °C bola stanovená koncentrácia biomasy a podiel PHB.

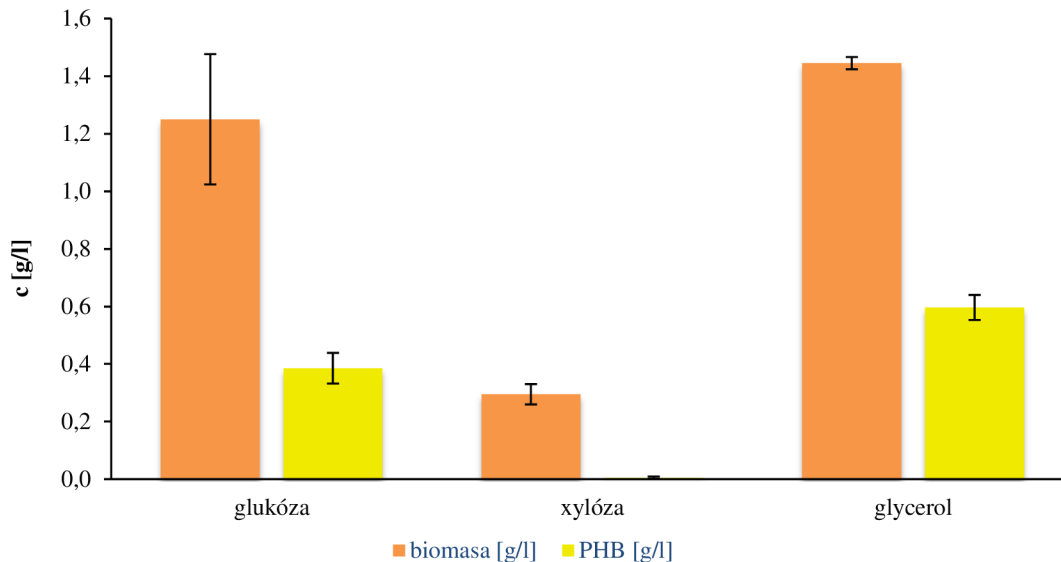


Graf 4: Koncentrácie biomasy a PHB po kultivácii kmeňa *Schlegelella thermodepolymerans* na vybraných substrátoch

Kmeň *Schlegelella thermodepolymerans* bol kultivovaný v prítomnosti glycerolu a troch monosacharidov. V grafe 4 je možno pozorovať, že utilizáciou xylózy dosiahla *Schlegelella thermodepolymerans* najväčšiu produkciu biomasy aj PHB. Produkcia PHA na xylóze bola dosť prekvapivá, pretože podľa literatúry táto baktéria xylózu vôbec neutilizuje [53]. Zároveň obsah PHB v biomase dosahoval až 75,18 %, pričom koncentrácia biomasy činila 6,2 g/l a PHB 4,66 g/l. Tieto čísla hovoria, že *Schlegelella thermodepolymerans* by mohla byť veľmi zaujímavou a potenciálne využitou v biotechnologickom priemysle. Xylóza je často prítomná v hemicelulóze ako základná štruktúrna komponenta. Vďaka tomu je hneď po glukóze druhým najrozšírenejším monosacharidom na svete. Ako lacný a ekologický zdroj xylózy by mohli byť zužitkované, niektoré lignocelulóзовé zvyšky ako napríklad ryžová slama, bagasa z cukrovej trstiny, pšeničná slama a otruby.

Kultivácia vo väčšom produkčnom objeme však nepotvrdila výsledky utilizácie fruktózy v mikrotitračnej doštičke. Hoci sa fruktóza v prvom meraní javila ako najvhodnejší zdroj uhlíku, pri stanovení koncentrácie biomasy a PHB dosiahla najnižších hodnôt. Pomerne vysoké

koncentrácie boli získané použitím glycerolu. Koncentrácia biomasy dosiahla hodnotu 3,85 g/l a PHB 2,15 g/l pričom percentuálny obsah PHB v biomase bol 55,79 %. Rast kultúry bol skúmaný aj na glukóze, kde koncentrácia získaného PHB tvorila len polovicu PHB získaného kultiváciou v prostredí glycerolu. PHB tvoril 46,44 % získanej biomasy.

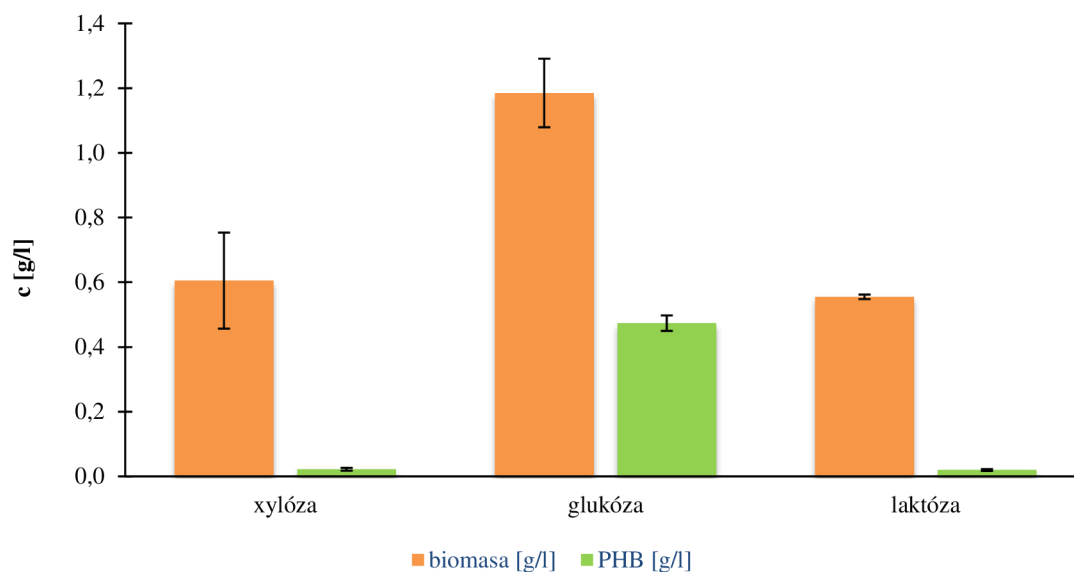


Graf 5: Koncentrácie biomasy a PHB po kultivácii kmeňa *Schlegelella aquatica* na vybraných substrátoch

Výsledky z grafu 5 ukazujú, že produkcie PHB bolo u kmeňa *Schlegelella aquatica* dosiahnuté iba u dvoch zdrojov uhlíku. Kmeň nebol schopný v dostatočnom množstve produkovať PHB inklúzie s využitím xylózy ako substrátu. Najvyššej produkcie PHB sa dosiahlo kultiváciou na nesacharidovom zdroji. Obsah PHB v biomase činil 41,28 %. Koncentrácia biomasy bola stanovená na hodnotu 1,45 g/l a PHB 0,60 g/l. Náklady na výrobu PHA by mohli byť znížené použitím odpadového glycerolu. Vzniká ako vedľajší produkt pri výrobe bionafty, hydrolýze tukov alebo v kozmetickom priemysle pri výrobe mydiel. Hoci odpadový glycerol poskytuje množstvo ekologických aj ekonomických výhod môže obsahovať nečistoty, ktoré môžu spôsobiť inhibíciu rastu. Preto v takýchto prípadoch treba dbať aj na vplyv nečistôt na mikroorganizmy [58]. V prostredí sacharidového zdroja glukózy bola získaná koncentrácia PHB o niečo nižšia ako pri glycerole. Koncentrácia vzniknutého PHB sa rovnala hodnote 0,39 g/l a biomasy 1,25 g/l.

Napriek tomu, že pri kultivácii v mikrotitračnej doštičke vykazovali bakteriálne kmene LMG 23380 a DSM 15344 podobné výsledky efektívne zužitkovaných substrátov, tak pri kultivácii vo väčšom objeme tomu tak nebolo. Kmeň *Schlegelella thermodepolymerans* je schopný produkovať vysoké koncentrácie PHB s využitím xylózy zatiaľ čo kmeň *Schlegelella aquatica* takúto schopnosť nemá. Zároveň koncentrácie PHB sú pri použití rovnakých substrátov niekoľko násobne nižšie u kmeňa *Schlegelella aquatica* oproti *Schlegelella thermodepolymerans*.



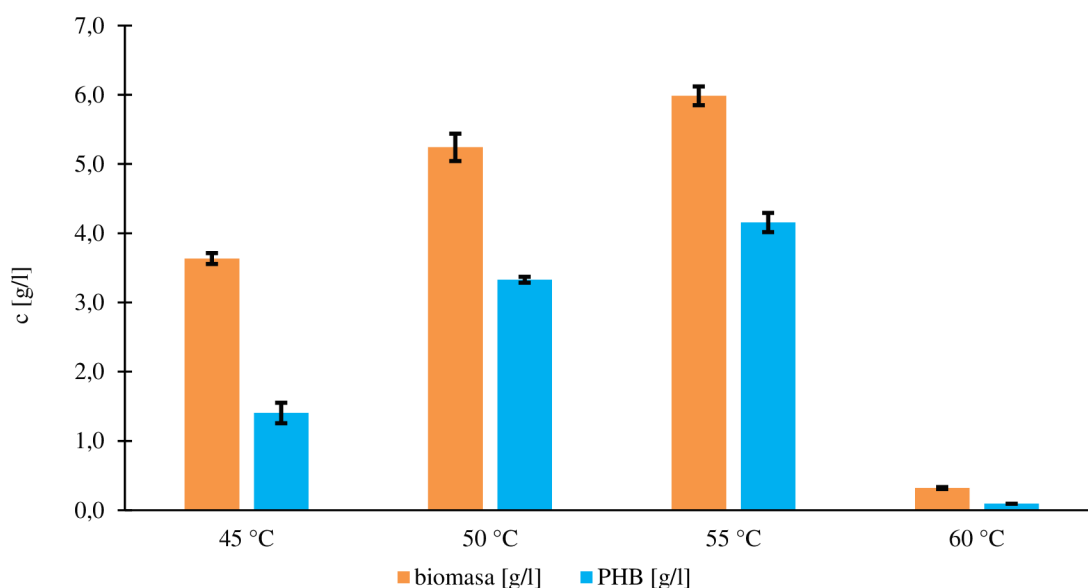


Graf 6: Koncentrácie biomasy a PHB po kultivácii kmeňa *Thermomonas hydrothermalis* na vybraných substrátoch

Podľa údajov z grafu 6 možno konštatovať, že bakteriálny kmeň *Thermomonas hydrothermalis* je schopný tvorby PHB a najvyššej produkcie dosahuje pri využití glukózy. Získané koncentrácie biomasy zo suspenzie bakteriálnych buniek dosahujú 1,19 g/l a PHB 0,47 g/l. Percentuálny obsah PHB v biomase je 39,95 %. Na fermentačné procesy môže byť zúžitkovaná glukóza vyrobená hydrolýzou odpadných surovín bohatých na škrob alebo sacharifikáciou celulózy z lignocelulóзовých zvyškov [57]. Rast kultúry bol ďalej skúmaný na xylóze a laktóze. Hoci bola u oboch sacharidov dosiahnutá produkcia biomasy, akumulácia PHA nebola dostatočná.

#### 4.2.3 Optimalizácia teploty pre produkciu PHA

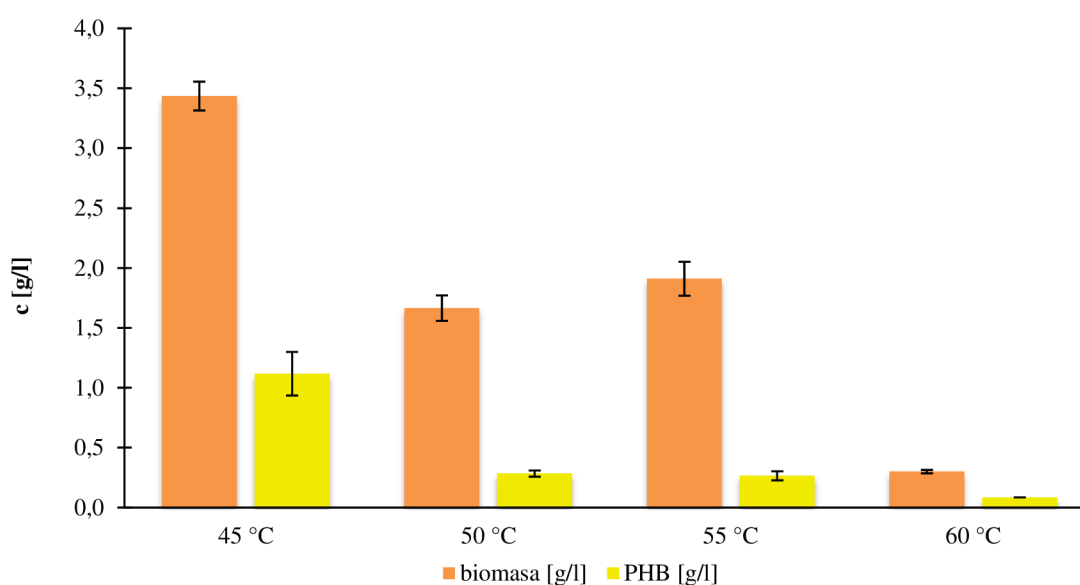
Pre každý živý organizmus na Zemi je špecifická rastová teplota, pri ktorej najlepšie prosperuje. Rovnako je tomu aj u baktérií, preto bol uskutočnený test na optimalizáciu teploty, pri ktorej dochádza k najvyššej produkcii PHA v bunkách. Keďže všetky skúmané bakteriálne kmene patria medzi termofilné mikroorganizmy, kultivácia prebiehala v rozmedzí teplôt od 45 °C do 60 °C. Baktérie boli kultivované v minerálnom médiu s najvhodnejším zdrojom uhlíku. Koncentrácia biomasy bola stanovená gravimetricky. Obsah získaného PHB v biomase bol analyzovaný prostredníctvom GC-FID.



Graf 7: Porovnanie kultivačných teplôt pre produkciu biomasy a PHB pomocou kmeňa *Schlegelella thermodepolymerans*

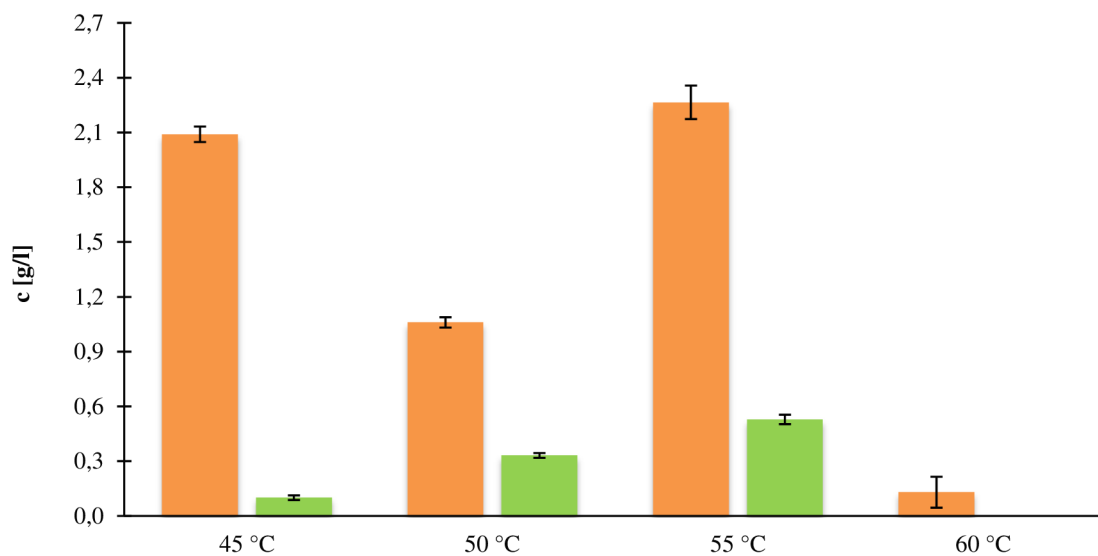
Produkcija biomasy a PHB sa u kmeňa *Schlegelella thermodepolymerans* zvyšovala s rastúcou teplotou kultivácie (graf 7). Výrazný zlom však nastal pri teplote 60 °C, ktorá obmedzila rast. Táto teplota inhibovala metabolické dráhy baktérie.

Pri teplote 55 °C boli namerané najvyššie koncentrácie biomasy teda 5,99 g/l a PHB 4,15 g/l. PHB bol obsiahnutý v 69,42 % biomasy. V biotechnologickom využití by mohla byť potenciálna aj teplota kultivácie 50 °C. Hoci by sa koncentrácia výťažku daného polyméru znížila, znížili by sa aj energetické náklady na výrobný proces. Získané výsledky sa prakticky zhodujú s literatúrou, ktorá uvádza optimálnu teplotu rastu bakteriálneho kmeňa v rozmedzí 50-55 °C [55]. Ako substrát pri kultivácii bola použitá xylóza.



Graf 8: Porovnanie kultivačných teplôt pre produkciu PHB pomocou kmeňa *Schlegelella aquatica*

K najintenzívnejšej produkcii PHB u kmeňa *Schlegelella aquatica* dochádzalo pri teplote 45 °C (graf 8), kedy vyprodukovaný polymér tvoril 32,53 % získanej biomasy. Koncentrácia PHB bola 1,12 g/l a bunkovej sušiny 3,44 g/l. Množstvo PHB tvoreného bakteriálnymi bunkami s využitím glycerolu sa znižovalo s rastúcou teplotou. Pri teplotách 50 °C a 55 °C boli koncentrácie izolovaného PHB veľmi podobné. Pri teplote 60 °C bol rast veľmi obmedzený. Z toho vyplýva, že metabolizmus kmeňa LMG 23380 je najaktívnejší pri 45 °C a zároveň pri tejto teplote si dokáže uskladniť najviac uhlíku vo forme polyhydroxyalkanoátov.



Graf 9: Porovnanie kultivačných teplôt pre produkciu PHB pomocou kmeňa *Thermomonas hydrothermalis*

Bakteriálny kmeň *Thermomonas hydrothermalis* izolovaný z termálneho prameňa v strednom Portugalsku dosiahol najintenzívnejšieho rastu pri teplote 55 °C (graf 9). Koncentrácia biomasy bola 2,27 g/l a PHB 0,53 g/l. Obsah PHB v sušine bol 23,34 %. Produkcia polyméru sa zvyšovala s rastúcou teplotou kultivácie až do dosiahnutia teplotného optima. Pri teplote 60 °C nebolo získané dostatočné množstvo biomasy, preto nebolo možné stanoviť koncentráciu PHB. Ako zdroj uhlíku pri kultivácii bola použitá glukóza.

#### 4.2.4 Vplyv prekursorov na rast biomasy, podiel a zloženie PHA

Aby polyhydroxyalkanoáty mohli byť využívané v rozličných aplikáciách ako ideálny biomateriál, je dôležité vylepšiť ich mechanické vlastnosti a náchylnosť k tepelnej degradácii. Uhlíkový substrát použitý pri produkcii PHA určuje štruktúru a vlastnosti získaného polyméru. Kombináciou viacerých monomérov je možné získať kopolymér s jedinečnými vlastnosťami. Významným faktorom, ktorý ovplyvňuje vlastnosti kopolyméru je aj pomer monomérnych jednotiek. Produkciu kopolymérov je možné dosiahnuť prídavkom prekursorov do kultivačného média. V nasledujúcom experimente bol skúmaný vplyv štyroch prekursorov na produkciu kopolymérov poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrátu) (P(3HB-co-4HB)) a poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerátu) (P(3HB-co-3HV)). Ako prekursor pre tvorbu P(3HB-co-4HB) boli použité  $\gamma$ -butyrolaktón a 1,4-butándiol. Kyselina valérová a propionát

sodný slúžili ako prekurzory pre tvorbu jednotiek 3-hydroxyvalerátu. Baktérie boli kultivované pri 50 °C.

Tabuľka 15: Výsledky vplyvu prekurzorov na produkciu kopolymérov použitím kmeňa *Schlegelella thermodepolymerans*

prekurzor	biomasa [g/l]	PHA		4HB [mol.%]	3HV [mol.%]	3HB [mol.%]
		[g/l]	[% hm.]			
γ-butyrolaktón	0,16 ± 0,01	-	-	-	-	-
1,4-butándiol	0,11 ± 0,04	-	-	-	-	-
k.valérová	0,10 ± 0,01	-	-	-	-	-
propionát sodný	5,08 ± 0,25	3,76 ± 0,00	76,78	-	6,63	93,37

Podľa výsledkov z tabuľky 15 možno konštatovať, že bakteriálny kmeň *Schlegelella thermodepolymerans* bol schopný prosperovať iba s využitím propionátu sodného ako prekurzoru 3HV. Koncentrácia získaného kopolyméru činila 3,76 g/l teda 76,78 % získanej biomasy, pričom molárna frakcia 3HV bola 6,63 mol.% a 3HB 93,37 mol.%. Výhodou získaného kopolyméru je, že obsahuje monomérmé jednotky 3HV, ktoré zvyšujú pevnosť v ťahu, flexibilitu a húževnatosť. 3-hydroxyvalerát zároveň znižuje teplotu topenie a kryštalinitu kopolyméru [57]. Kyselina valérová, 1,4-butándiol a γ-butyrolaktón dostatočne nepodporovali, prípadne dokonca inhibovali bakteriálny rast.

Tabuľka 16: Výsledky vplyvu prekurzorov na produkciu kopolymérov použitím kmeňa *Schlegelella aquatica*

prekurzor	biomasa [g/l]	PHA		4HB [mol.%]	3HV [mol.%]	3HB [mol.%]
		[g/l]	[% hm.]			
γ-butyrolaktón	0,11 ± 0,01	-	-	-	-	-
1,4-butándiol	0,03 ± 0,01	-	-	-	-	-
k.valérová	0,09 ± 0,01	-	-	-	-	-
propionát sodný	0,38 ± 0,02	0,12 ± 0,00	15,87	-	15,05	84,95

*Schlegelella aquatica* rovnako ako *Schlegelella thermodepolymerans* najlepšie využila propionát sodný (tabuľka 16). V porovnaní s kultiváciou bez prídavku propionátu sodného pri 50 °C sa výťažok bunkovej sušiny znížil na hodnotu 0,38 g/l pričom sa znížila aj koncentrácia akumulovaného polyméru na hodnotu 0,12 g/l. Kopolymér bol tvorený 15,05 mol.% 3HV a 84,95 mol.% 3HB. Negatívny vplyv na rast buniek kmeňa *Schlegelella aquatica* mala kyselina valérová, 1,4-butándiol a γ-butyrolaktón. Obmedzený rast v prostredí týchto prekurzorov bol pozorovaný aj u rodovo príbuzného kmeňa *Schlegelella thermodepolymerans*. Toxickými pre bakteriálne bunky mohli byť vysoké koncentrácie prekurzorov v kultivačnom médiu. Dôvodom môže byť aj neschopnosť metabolickej premeny týchto prekurzorov.

Tabuľka 17: Výsledky vplyvu prekursorov na produkciu kopolymérov použitím kmeňa *Thermomonas hydrothermalis*

prekurzor	biomasa [g/l]	PHA		4HB [mol. %]	3HV [mol. %]	3HB [mol. %]
		[g/l]	[% hm.]			
$\gamma$ -butyrolaktón	0,06 ± 0,03	-	-	-	-	-
1,4-butándiol	1,84 ± 0,04	1,01 ± 0,07	55,05	96,91	-	3,09
k.valérová	0,05 ± 0,03	-	-	-	-	-
propionát sodný	0,77 ± 0,51	0,16 ± 0,00	14,00	-	14,14	85,86

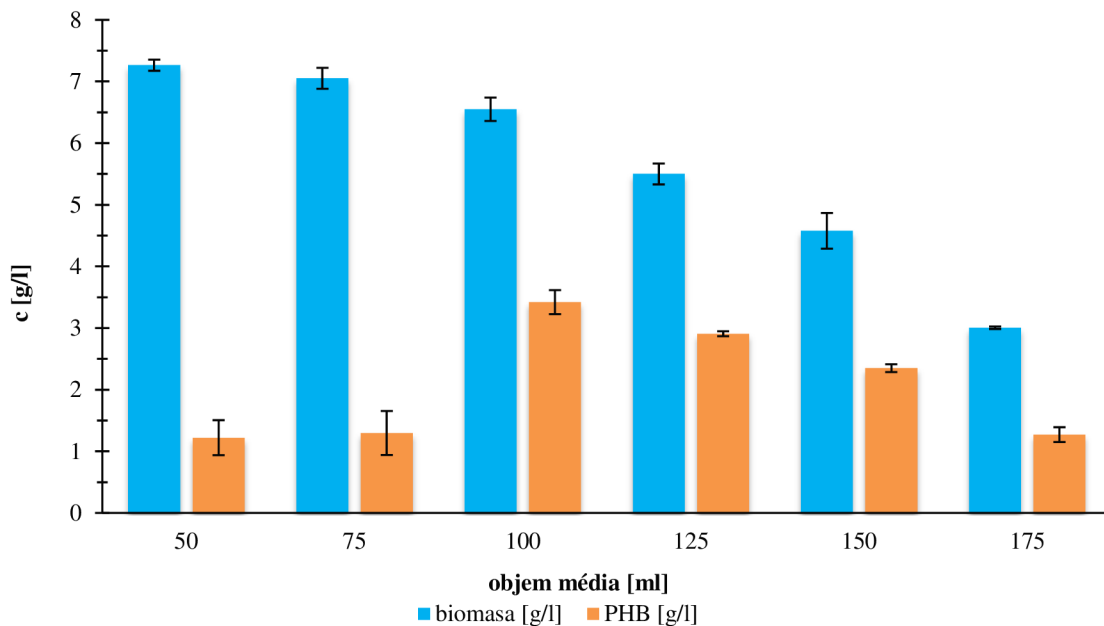
V tabuľke 17 je uvedené, že kmeň *Thermomonas hydrothermalis* je schopný produkovať nielen P(3HB-co-4HB), ale aj P(3HB-co-3HV). 1,4-butándiol a propionát sodný sa podieľajú na produkcii kopolymérov. U kyseliny valérovej a  $\gamma$ -butyrolaktónu bolo množstvo získanej biomasy takmer zanedbateľné. Využitím 1,4-butándiolu ako substrátu bolo pri kultivácii s teplotou 50 °C dosiahnuté zvýšenie koncentrácie biomasy v porovnaní s kultiváciou, kedy bola utilizovaná glukóza. Baktéria efektívne využila 1,4-butándiol ako zdroj uhlíku pre produkciu kopolyméru P(3HB-co-4HB), ktorého získaná koncentrácia bola 1,01 g/l. Výrazne sa zvýšil aj hmotnostný podiel PHA v biomase, ktorý bol rovný 55,05 %. V kopolymére bol 4HB obsiahnutý v 96,91 mol.% a 3HB tvoril iba 3,09 mol.%. Vďaka vysokému molárnemu obsahu P(4HB) by kopolymér mohol byť zaujímavý pre použitie v lekárskech aplikáciách. P(4HB) sa okrem biokompatibility a biologickej rozložiteľnosti vyznačuje vysokou elasticitou [59]. Aby však bola produkcia výhodná aj z ekonomického hľadiska, muselo by dôjsť k zvýšeniu množstva produkovanej biomasy a teda aj kopolyméru.

Produkcia kopolyméru P(3HB-co-3HV) bola dosiahnutá kombináciou propionátu sodného a glukózy ako zdroja uhlíku. Propionát sodný slúžil ako prekursor pre tvorbu 3HV jednotiek. Propionát sodný však zároveň obmedzoval rast buniek, pretože jeho prídavkom do kultivačného média bola znížená koncentrácia vyprodukovaného polyméru na hodnotu 0,16 g/l. Molárna frakcia 3HV bola 14,14 mol.%, a 3HB 85,86 mol.%.

#### 4.2.5 Stanovenie vplyvu kyslíka na množstvo produkovanej biomasy a PHA u kmeňa *Schlegelella thermodepolymerans*

Kmeň *Schlegelella thermodepolymerans* preukázal v predchádzajúcich štúdiách schopnosť produkovať výrazne vyššie koncentrácie PHA než ďalšie dva testované bakteriálne kmene. Preto v nasledujúcich experimentoch bola pozornosť zameraná práve na tento kmeň a podmienky kultivácie s cieľom zvýšiť produkciu biomasy a PHA a zároveň znížiť náklady na produkciu.

V prípade aeróbných baktérií môže obmedzený prísun kyslíka mať vplyv na rast a syntézu PHA. V kultivácii bol obmedzený prísun kyslíka zaistený rozdielnym objemom média v 250 ml Erlenmeyerových bankách. So zvyšujúcim objemom média sa znižovalo množstvo rozpusteného kyslíka. Objem média v bankách bol 50; 75; 100; 125; 150; 175 ml. Ako zdroj uhlíku bola použitá xylóza a do média bolo zaočkované inokulum v pomere 1:20. Teplota kultivácie bola 55 °C.



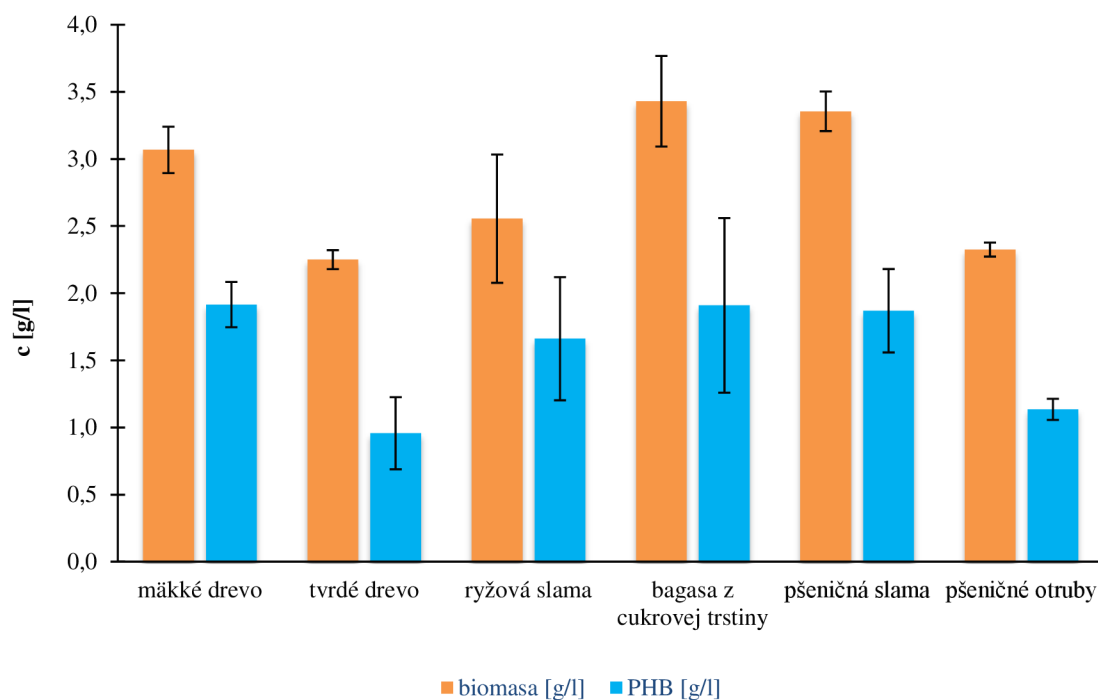
Graf 10: Porovnanie vplyvu kyslíka na produkciu biomasy a PHB

Z výsledkov v graf 10 možno sledovať nárast koncentrácie biomasy so zvyšujúcim prísunom kyslíka. Nemožno to však povedať o koncentrácii PHB, ktorá dosiahla najvyšších hodnôt v objeme média 100 ml. Percentuálny obsah PHB v sušine bol 52,31 %. Pozitívne výsledky boli získané aj pri kultivácii v 125 ml minerálneho média, kedy bol dosiahnutý najvyšší percentuálny obsah PHB v biomase a to 53,23 %. Koncentrácia získaného polyméru však bola o 0,51 g/l nižšia.

U kmeňa *Schlegelella thermodepolymerans* tak množstvo dostupného kyslíka zohráva významnú rolu pri syntéze PHA. Výsledky z grafu 10 potvrdzujú, že pri kultivácii je dôležité zabezpečiť optimálne množstvo kyslíka, pretože jeho nízke hladiny môžu spôsobiť u baktérií spomalenie rastu, čím sa zníži množstvo buniek schopných akumulovať PHA. Na druhú stranu čiastočná limitácia kyslíkom výrazne posilní syntézu PHA (viď skokový nárast PHA medzi 50 a 100 ml média v bankách).

#### 4.2.6 Produkcia biomasy a PHB na modelových hydrolyzátoch u kmeňa *Schlegelella thermodepolymerans*

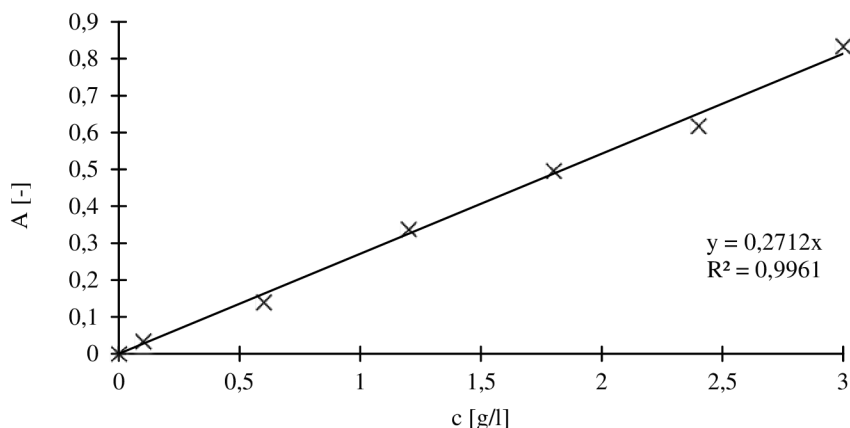
*Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344 dokáže efektívne využívať xylózu a glukózu na rast a zároveň tieto zdroje uhlíku akumulovať v podobe PHA inklúzií. Potencionálnym zdrojom týchto sacharidov by mohli byť lignocelulózy zvyšky. Hlavnými zložkami lignocelulózy je celulóza, hemicelulóza a nezkvasiteľný lignín. Hydrolyzou celulózy vzniká glukóza. Hydrolyzáty hemicelulózy sú bohaté najmä na xylózu, manózu, arabinózu a galaktózu, ktorých čisté formy sú fermentovateľné na PHA [57]. Na kultiváciu boli preto pripravené modelové hydrolyzáty surovín bohatých na lignocelulózu, medzi ktoré patrí: mäkké a tvrdé drevo, ryžová slama, bagasa z cukrovej trstiny, pšeničná slama a otruby. Kultivácia prebiehala za optimálnej teploty 55 °C.



Graf 11: Porovnanie modelových hydrolyzátoov ako substrátov pre produkciu biomasy a PHB

Bakteriálny kmeň *Schlegelella thermodepolymerans* najlepšie utilizoval modelový hydrolyzáat mäkkého dreva a bagasy z cukrovej trstiny (graf 11), kedy koncentrácia získaného PHB v oboch prípadoch dosiahla 1,91 g/l, pričom v prvom prípade tvorila 62,40 % biomasy a v druhom 54,70 % získanej bunkovej sušiny. Jedná sa taktiež o hydrolyzáaty s najväčším rozdielom podielu glukózy a xylózy. Hydrolyzáat mäkkého dreva obsahoval 16,6 g/l glukózy a len 1,0 g/l xylózy, zatiaľ čo hydrolyzáat bagasy z cukrovej trstiny obsahoval až 15,0 g/l xylózy a 2,8 g/l glukózy. Koncentrácia získaného PHB sa v porovnaní s kultiváciou na čistej xylóze pri 55 °C znížila a to o viac ako polovicu. Vzhľadom na vysoký podiel glukózy v hydrolyzáate mäkkého dreva sa v porovnaní s kultiváciou na čistej glukóze pri 50 °C produkcia zvýšila, čo mohlo byť ovplyvnené jednak kultiváciou pri vyššej teplote a zároveň prídavkom zvyšných monosacharidov do substrátu. O niečo nižšie koncentrácie polyméru boli získané kultiváciou na modelových hydrolyzátoch pšeničnej slamy, kedy bola koncentrácia získaného produktu 1,87 g/l s percentuálnym výťažkom 55,35 % a ryžovej slamy s koncentráciou PHB 1,66 g/l a obsahom PHB v biomase 60,24 %. Nižší výťažok biomasy aj PHB bol pri kultivácii v modelovom hydrolyzáate pšeničných otrúb. Percentuálny podiel polyméru v biomase bol 48,55 % a koncentrácia PHB 1,13 g/l. Produkcia v prostredí modelového hydrolyzáatu tvrdého dreva vykazovala najnižšie hodnoty koncentrácie PHB 0,96 g/l. V tomto prípade bolo získané aj najnižšie zastúpenie PHB v biomase a to 42,59 %. Nižšia produkcia mohla byť spôsobená nevhodnou kombináciou sacharidov.

Po 72 hodinovej kultivácii bola určená koncentrácia zvyškových sacharidov. Na stanovenie boli využité supernatanty z centrifugácie biomasy, ktoré boli podrobené reakcii s činidlom kyseliny 3,5-dinitrosalicylovej. Kalibračná krivka bola zostrojená z nameraných hodnôt absorbancií roztokov xylózy o presnej koncentrácii pri 540 nm (graf 12).



Graf 12: Kalibračná krivka pre stanovenie redukujúcich sacharidov pri 540 nm

Tabuľka 18: Koncentrácia zvyškových sacharidov v supernatante

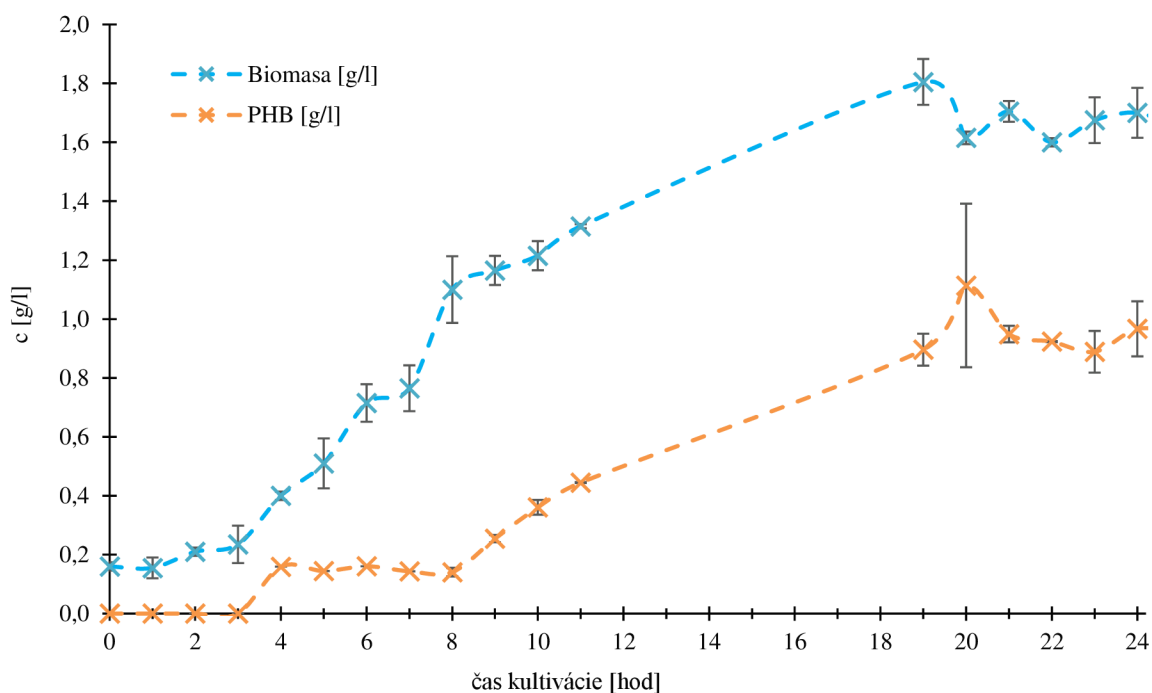
Modelové hydrolyzáty	Zvyškové sacharidy [g/l]	Spotrebované sacharidy [g/l]	Y <sub>P/S</sub> [-]
mäkké drevo	9,13 ± 0,38	10,87 ± 0,38	0,176
tvrdé drevo	11,58 ± 0,74	8,42 ± 0,74	0,114
ryžová slama	8,80 ± 0,70	11,2 ± 0,70	0,148
bagasa z cukrovej trstiny	9,33 ± 0,73	10,67 ± 0,73	0,179
pšeničná slama	9,89 ± 0,43	10,11 ± 0,43	0,185
pšeničné otruby	11,31 ± 0,73	8,69 ± 0,73	0,131

Vysoké koncentrácie sacharidov v supernatantoch získaných z médií s obsahom modelových hydrolyzátoz tvrdého dreva a pšeničných otrúb potvrdzujú nízke výťažky biomasy a PHB. Zdroj uhlíku nebol ani z polovice spotrebovaný a metabolická premena prebytočného uhlíku nebola dostatočná. Najnižšie množstvo zvyškových sacharidov bolo získané zo supernatantu s hydrolyzátoz ryžovej slamy (tabuľka 18). V prípade modelových hydrolyzátoz mäkkého dreva a bagasy z cukrovej trstiny sa výsledky zostatkových sacharidov takmer zhodujú, rovnako ako to bolo v prípade výťažku PHB. Najvyššia hodnota koeficientu výťažnosti bola nameraná na hydrolyzátoz pšeničnej slamy. Len o niečo nižšie hodnoty boli namerané na modelových hydrolyzátoz mäkkého dreva a bagasy z cukrovej trstiny. Výsledky zostatkových sacharidov sa u týchto hydrolyzátoz takmer zhodujú, rovnako ako to bolo v prípade výťažku PHB.

#### 4.2.7 Kultivácia kmeňa *Schlegelella thermodepolymerans* v laboratórnom bioreaktore

Bakteriálny kmeň *Schlegelella thermodepolymerans* pri kultivácii v 250 ml Erlenmeyerových bankách preukázal schopnosť využiť xylózu na rast a syntézu PHA so ziskom pomerne vysokých koncentrácií polyméru. Vzhľadom na pozitívne výsledky merania bol bakteriálny kmeň kultivovaný vo väčšom produkčnom objeme. Cieľom kultivácie bolo pozorovať rast a množstvo vyprodukovaného polyméru v čase. Kultivácia prebiehala v laboratórnom bioreaktore Biostat B-plus po dobu 24 hodín, pri teplote 55 °C, s 20 % obsahom rozpusteného kyslíka v médiu a pH 7. Pomer inokula v médiu bol 1:10 a koncentrácia xylózy 20 g/l. Jednalo sa o vsádzkovú kultiváciu.





Graf 13: Koncentrácia produkovanej biomasy a PHB v závislosti na čase kultivácie v bioreaktore

Na krivkách z grafu 13 možno pozorovať fázy rastu mikrobiálnej kultúry. Približne do 3. hodiny od začiatku kultivácie sa bunky adaptovali na prostredie teda boli v lag fáze. Po 3 hodinách kultivácie sa začalo delenie buniek. Dostatkem živín v médiu sa zvýšila metabolická aktivita baktérií, ktorá viedla k exponenciálnemu rastu. Dôkazom je narastajúca koncentrácia biomasy. Exponenciálna fáza rastu pravdepodobne trvala približne do 19. hodiny kultivácie. Počas tejto doby baktérie spotrebovali živiny na rast a tvorbu PHB inklúzií. V reakcii na obmedzený prísun nevyhnutných živín, najmä dusíku a za nadbytku xylózy, bunky približne od 9. hodiny syntetizovali PHB ako intracelulárny zdroj uhlíka a energie. Koncentrácia PHB sa zvyšovala s rastúcim počtom buniek. Medzi 19. a 20. hodinou došlo k postupnému ustáleniu počtu buniek v médiu a koncentrácia polyméru sa pomerne ustálila. Koncentrácia získanej biomasy v 20. hodine bola 1,62 g/l, PHB 1,11 g/l a percentuálny obsah PHB v biomase tvoril 68,87 %.

Tabuľka 19: Porovnanie percentuálneho obsahu PHB v biomase a ich koncentrácií získaných kultiváciou v E. banke a bioreaktore

	Biomasa [g/l]	PHB [g/l]	Obsah PHB [%]
<b>Kultivácia v Erlenmeyerovej banke</b>	5,99 ± 0,13	4,15 ± 0,14	69,42
<b>Kultivácia v bioreaktore</b>	1,62 ± 0,02	1,11 ± 0,28	68,87

V tabuľke 19 je zobrazené porovnanie získaných koncentrácií biomasy a PHB v bioreaktore a v menšom produkčnom objeme. Kultiváciou v bioreaktore sa koncentrácia získanej biomasy výrazne znížila. V menšom produkčnom objeme došlo k väčšiemu rastu baktérií, a teda na jednotku objemu bolo prítomných viac buniek, ktoré akumulovali PHA. Táto skutočnosť sa

odzrkadľuje aj na koncentrácii získaného PHB. Percentuálny obsah daného polyméru v biomase bol v oboch prípadoch takmer totožný. Potvrďuje to tak skutošnosť, že bakteriálny kmeň *Schlegelella thermodepolymerans* disponuje vysokou akumuláčnou schopnosťou polyhydroxyalkanoátov. Bolo by preto potrebné lepšie optimalizovať niektoré parametre kultivácie v bioreaktore.

## 5 ZÁVER

Polyhydroxyalkanoáty sa stali zaujímavými nielen vďaka schopnosti biologicky sa odbúravať, ale aj vďaka širokému spektru aplikácií, v ktorých sa dajú využiť. Problémom v uplatnení na trhu je ich vysoká výrobná cena. Z biotechnologického hľadiska sú stále viac a viac zaujímavejšie termofilné baktérie, ktoré dokážu prežívať a prosperovať pri teplotách, ktoré sú pre väčšinu organizmov neprijateľné. Zvýšenou teplotou fermentácie sa znižujú náklady spojené s výrobou. Z toho dôvodu bola bakalárska práca zameraná na termofilné bakteriálne kmene, ktorých schopnosť akumulácie PHA ešte nebola preskúmaná. Cieľom bolo zároveň optimalizovať podmienky pre produkciu polyméru a stanoviť metabolickú aktivitu mikroorganizmov. Predmetom štúdie boli bakteriálne kmene *Schlegelella thermodepolymerans*, *Schlegelella aquatica* a *Thermomonas hydrothermalis*.

U kmeňa *Schlegelella thermodepolymerans* bola pomocou molekulárno-biologických metód na úrovni genotypu potvrdená prítomnosť *phaC* génu. Primárne bol bakteriálny kmeň podrobený screeningu využitiel 1 nesacharidového a 8 sacharidových zdrojov uhlíku v mikrotitračnej doštičke. Najlepšie bola utilizovaná fruktóza, glycerol, glukóza a xylóza. Tieto zdroje uhlíku boli vybrané na kultiváciu v Erlenmeyerových bankách. Naopak baktéria neprosperovala v prostredí škrobu, sacharózy a galaktózy. 72 hodinovou kultiváciou v Erlenmeyerových bankách bol sledovaný vplyv vybraných substrátov na produkciu biomasy a PHB. Pozitívne výsledky boli získané kultiváciou s využitím xylózy, kedy koncentrácia získaného PHB dosiahla hodnotu 4,66 g/l pričom polymér bol obsiahnutý až v 75,18 % biomasy. Kultúra taktiež dobre prosperovala v prostredí glycerolu a glukózy. Ako najvhodnejšia teplota pre rast a produkciu PHA bola stanovená teplota 55 °C. Na produkciu kopolymérov boli využité prekursori a to kyselina valérová, propionát sodný,  $\gamma$ -butyrolaktón a 1,4-butándiol. Bakteriálna kultúra utilizovala propionát sodný za tvorby kopolyméru P(3HB-co-3HV). Na rast bakteriálneho kmeňa malo vplyv aj množstvo rozpusteného kyslíka v médiu. Kultivácia prebiehala v 250 ml Erlenmeyerových bankách s rozdielnym objemom minerálneho média. Najväčšia koncentrácia biomasy bola nameraná v najmenšom kultivačnom objeme s obsahom média 50 ml. Najväčšie množstvo polyméru však bolo nasyntetizované v produkčnom médiu s objemom 100 ml. To potvrdzuje skutočnosť, že parciálna limitácia kyslíkom výrazne podporuje akumuláciu PHA. Keďže biotechnologickou snahou je znížiť výrobné náklady, bol bakteriálny kmeň podrobený kultivácii na modelových hydrolyzátach surovín bohatých na lignocelulózu, ktoré vznikajú ako vedľajšie produkty výroby. Najlepšie boli zužitkované modelové hydrolyzáty bagasy z cukrovej trstiny a mäkkého dreva. V porovnaní s kultiváciou na xylóze sa však koncentrácia získaného PHB znížila o viac ako polovicu a zároveň sa znížil aj percentuálny obsah polyméru v biomase. Vďaka syntéze pomerne vysokých koncentrácií PHA za využitiel xylózy a vysokému percentuálnemu zastúpeniu v biomase, bol kmeň kultivovaný vo väčšom produkčnom objeme. Kultiváciou v bioreaktore bola pozorovaná doba trvania lag fázy, exponenciálnej a stacionárnej fázy rastu. Rast buniek však nebol dostatočný, čo malo vplyv aj na množstvo získaného produktu. Percentuálny obsah PHB v biomase sa zhodoval s percentuálnym obsahom získaným kultiváciou v menšom produkčnom objeme. Kultivácia v bioreaktore vyžaduje ďalšiu optimalizáciu podmienok pre dosiahnutie vyšších koncentrácií produktu.

Bakteriálny kmeň *Schlegelella aquatica* disponuje génom *phaC*, kódujúci PHA syntázu. Z vybraných 9 uhlíkových zdrojov boli pri kultivácii v mikrotitračnej doštičke najlepšie využité glycerol, xylóza a glukóza. Zvyšné testované sacharidy neboli efektívne využité na rast. Za najvhodnejší substrát pre produkciu biomasy a PHB bol na základe stanovení vybraný glycerol. Bakteriálne bunky mali najväčšiu schopnosť rastu a produkcie PHA pri teplote 45 °C. Koncentrácia polyméru v biomase pri danej teplote v prostredí glycerolu dosiahla hodnoty 1,12 g/l s percentuálnym obsahom v biomase 32,53 %. Podobne ako *Schlegelella thermodepolymerans* tak aj kmeň *Schlegelella aquatica* využíval propionát sodný na produkciu kopolyméru P(3HB-co-3HV). V prípade zvyšných prekurzorov bolo množstvo získanej biomasy veľmi nízke.

Poslednou študovanou baktériou bol termofilný kmeň *Thermomonas hydrothermalis*. Keďže sa nepodarilo izolovať bakteriálnu DNA, bola schopnosť produkcie PHA overená na úrovni fenotypu. Kmeň *Thermomonas hydrothermalis* využíval všetky vybrané zdroje uhlíku použité pri screeningu v mikrotitračnej doštičke. Najlepšie boli využité glukóza, xylóza a laktóza. Ako jediný spomedzi študovaných baktérií bol schopný rásť v prostredí škrobu. Najvyššia produkcia PHB bola dosiahnutá využitím glukózy. Bakteriálny kmeň však nevedel efektívne využiť xylózu a laktózu na produkciu polyhydroxyalkanoátov. Teplotné optimum pre rast je 55 °C. Kultiváciou v prostredí prekurzorov bola dosiahnutá produkcia kopolyméru P(3HB-co-4HB), ale aj P(3HB-co-3HV). 1,4-butándiol podporil tvorbu kopolyméru P(3HB-co-4HB) a koncentrácia PHA v bunkách sa zvýšila takmer o polovicu na hodnotu 1,01 g/l, v porovnaní s kultiváciou v prostredí glukózy. Zvýšil sa aj percentuálny obsah PHA v biomase na 55,05 %. Vzniknutý kopolymér bol unikátny extrémne vysokou molárnou frakciou 4HB a to až 96,91 mol.%. Využitím propionátu sodného baktéria síce dokázala produkovať P(3HB-co-3HV), no získané koncentrácie boli veľmi nízke.

Bakteriálne kmene *Thermomonas hydrothermalis* a *Schlegelella aquatica* síce za sledovaných podmienok dokážu produkovať polyhydroxyalkanoáty, no nie v koncentráciách, ktoré by boli pre priemysel zaujímavé.

## 6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] LUYT, Adriaan S. a Sarah S. MALIK. Can Biodegradable Plastics Solve Plastic Solid Waste Accumulation? *Plastics to Energy* [online]. Elsevier, 2019, 2019, s. 403-423 [cit. 2020-07-09]. DOI: 10.1016/B978-0-12-813140-4.00016-9. ISBN 9780128131404. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128131404000169>
- [2] ALBUQUERQUE, Priscilla B.S. a Carolina B. MALAFAIA. Perspectives on the production, structural characteristics and potential applications of bioplastics derived from polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, **107**, 615-625. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.09.026. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813017330453>
- [3] SALGAONKAR, Bhakti B. a Judith M. BRAGANÇA. Production of polyhydroxyalkanoates by extremophilic microorganisms through valorization of waste materials. *Advances in Biological Science Research* [online]. Elsevier, 2019, 2019, s. 419-443 [cit. 2020-07-09]. DOI: 10.1016/B978-0-12-817497-5.00026-4. ISBN 9780128174975. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128174975000264>
- [4] KOLLER, Martin. Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters by Extremophiles? *MOJ Polymer Science* [online]. 2017, **1**(2) [cit. 2020-07-09]. DOI: 10.15406/mojps.2017.01.00011. ISSN 25749773. Dostupné z: <https://medcraveonline.com/MOJPS/production-of-poly-hydroxyalkanoate-pha-biopolyesters-by-extremophiles.html>
- [5] PLOSZAJSKI, Anna. Polyester. *Materials World* [online]. London: Taylor & Francis, 2014, **22**(11), 60-62 [cit. 2019-11-09]. ISSN 09678638. Dostupné z: <http://search.proquest.com/docview/1642539754/>
- [6] SHIMAO, Masayuki. Biodegradation of plastics. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2001, **12**(3), 242-247 [cit. 2020-04-07]. DOI: 10.1016/S0958-1669(00)00206-8. ISSN 09581669. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166900002068>
- [7] AGARWAL, Seema. Biodegradable Polymers: Present Opportunities and Challenges in Providing a Microplastic-Free Environment. *Macromolecular Chemistry and Physics* [online]. 2020, **221**(6) [cit. 2020-05-13]. DOI: 10.1002/macp.202000017. ISSN 1022-1352. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/macp.202000017>
- [8] ALTUN, Müslüm. Polyhydroxyalkanoate production using waste vegetable oil and filtered digestate liquor of chicken manure. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 2019, **49**(5), 493-500. DOI: 10.1080/10826068.2019.1587626. ISSN 1082-6068. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10826068.2019.1587626>

- [9] KESHAVARZ, Tajalli a Ipsita ROY. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 2010, **13**(3), 321-326 [cit. 2019-11-10]. DOI: 10.1016/j.mib.2010.02.006. ISSN 13695274. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527410000275>
- [10] SUDESH, K, H ABE a Y DOI. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science* [online]. 2000, **25**(10), 1503-1555 [cit. 2019-11-10]. DOI: 10.1016/S0079-6700(00)00035-6. ISSN 00796700. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670000000356>
- [11] MAESTRO, Beatriz a Jesús M. SANZ. Polyhydroxyalkanoate-associated phasins as phylogenetically heterogeneous, multipurpose proteins. *Microbial Biotechnology* [online]. 2017, **10**(6), 1323-1337 [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.1111/1751-7915.12718. ISSN 1751-7915. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1751-7915.12718>
- [12] MOŹEJKO-CIESIELSKA, Justyna a Robert KIEWISZ. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiological Research* [online]. 2016, **192**, 271-282 [cit. 2019-11-10]. DOI: 10.1016/j.micres.2016.07.010. ISSN 09445013. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S094450131630043X>
- [13] WU, Hsan-Au, Der-Shyan SHEU a Chia-Yin LEE. Rapid differentiation between short-chain-length and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria with spectrofluorometry. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2003, **53**(1), 131-135 [cit. 2019-11-10]. DOI: 10.1016/S0167-7012(02)00232-4. ISSN 01677012. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701202002324>
- [14] RAZA, Zulfiqar Ali, Sharjeel ABID a Ibrahim M. BANAT. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation* [online]. 2018, **126**, 45-56 [cit. 2019-11-10]. DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.10.001. ISSN 09648305. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830517300276>
- [15] GAO, Xue, Jin-Chun CHEN, Qiong WU a Guo-Qiang CHEN. Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2011, **22**(6), 768-774 [cit. 2019-11-10]. DOI: 10.1016/j.copbio.2011.06.005. ISSN 09581669. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166911006173>
- [16] IWATA, Tadahisa. Biologisch abbaubare und biobasierte Polymere: die Perspektiven umweltfreundlicher Kunststoffe. *Angewandte Chemie* [online]. 2015, **127**(11), 3254-3260 [cit. 2019-11-10]. DOI: 10.1002/ange.201410770. ISSN 00448249. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ange.201410770>
- [17] REDDY, C.S.K, R GHAI, RASHMI a V.C KALIA. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology* [online]. 2003, **87**(2), 137-146 [cit. 2019-11-

- 20]. DOI: 10.1016/S0960-8524(02)00212-2. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852402002122>
- [18] AKARAONYE, Everest, Tajalli KESHAVARZ a Ipsita ROY. Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* [online]. 2010, **85**(6), 732-743 [cit. 2019-11-21]. DOI: 10.1002/jctb.2392. ISSN 02682575. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.2392>
- [19] LENZ, Robert W. a Robert H. MARCHESSAULT. Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology. *Biomacromolecules* [online]. 2005, **6**(1), 1-8 [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.1021/bm049700c. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm049700c>
- [20] VERLINDEN, R.A.J., D.J. HILL, M.A. KENWARD, C.D. WILLIAMS a I. RADECKA. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2007, **102**(6), 1437-1449 [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x. ISSN 1364-5072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x>
- [21] PHILIP, S., T. KESHAVARZ a I. ROY. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* [online]. 2007, **82**(3), 233-247 [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.1002/jctb.1667. ISSN 02682575. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.1667>
- [22] REHM, Bernd H.A. a Alexander STEINBÜCHEL. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 1999, **25**(1-3), 3-19 [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.1016/S0141-8130(99)00010-0. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813099000100>
- [23] ANJUM, Anbreen, Mohammad ZUBER, Khalid Mahmood ZIA, Aqdas NOREEN, Muhammad Naveed ANJUM a Shazia TABASUM. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2016, **89**, 161-174 [cit. 2019-11-10]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813016303774>
- [24] ELBANNA, Khaled, Tina LÜTKE-EVERSLOH, Dieter JENDROSSEK, Heinrich LUFTMANN a Alexander STEINBÜCHEL. Studies on the biodegradability of polythioester copolymers and homopolymers by polyhydroxyalkanoate (PHA)-degrading bacteria and PHA depolymerases. *Archives of Microbiology* [online]. 2004, **182**(2-3) [cit. 2019-12-01]. DOI: 10.1007/s00203-004-0715-z. ISSN 0302-8933. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00203-004-0715-z>

- [25] WANG, T. Plastic Waste Worldwide - Statistics & Facts. *www.statista.com* [online]. 2020 [cit. 2020-04-07]. Dostupné z: [https://www.statista.com/topics/5401/global-plastic-waste/#dossierSummary\\_\\_chapter\\_2](https://www.statista.com/topics/5401/global-plastic-waste/#dossierSummary__chapter_2)
- [26] Chee, J. Y., Yoga, S. S., Lau, N. S., Ling, S. C., Abed, R. M., & Sudesh, K. (2010). Bacterially produced polyhydroxyalkanoate (PHA): converting renewable resources into bioplastics. Current research, technology and education topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, 2, 1395-1404. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/3dd4/e9d52c0c01f6f73870f15f09d608cac38114.pdf>
- [27] KIM, So Yeon, Il Gyun SHIN a Young Moo LEE. Preparation and characterization of biodegradable nanospheres composed of methoxy poly(ethylene glycol) and dl-lactide block copolymer as novel drug carriers. *Journal of Controlled Release* [online]. 1998, **56**(1-3), 197-208 [cit. 2019-11-21]. DOI: 10.1016/S0168-3659(98)00083-2. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365998000832>
- [28] AVERHOFF, Beate a Volker MÜLLER. Exploring research frontiers in microbiology: recent advances in halophilic and thermophilic extremophiles. *Research in Microbiology* [online]. 2010, **161**(6), 506-514 [cit. 2019-11-29]. DOI: 10.1016/j.resmic.2010.05.006. ISSN 09232508. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923250810001142>
- [29] CANGANELLA, Francesco a Juergen WIEGEL. Extremophiles: from abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond. *Naturwissenschaften* [online]. 2011, **98**(4), 253-279 [cit. 2019-11-29]. DOI: 10.1007/s00114-011-0775-2. ISSN 0028-1042. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00114-011-0775-2>
- [30] GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, Roberto, Pablo FUCIÑOS a María Luisa RÚA. An Overview on Extremophilic Esterases. SANI, Rajesh K. a R. Navanietha KRISHNARAJ, ed. *Extremophilic Enzymatic Processing of Lignocellulosic Feedstocks to Bioenergy* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017, 2017-06-24, s. 181-204 [cit. 2020-04-08]. DOI: 10.1007/978-3-319-54684-1\_10. ISBN 978-3-319-54683-4. Dostupné z: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-54684-1\\_10](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-54684-1_10)
- [31] RADDADI, Noura, Ameer CHERIF, Daniele DAFFONCHIO, Mohamed NEIFAR a Fabio FAVA. Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2015, **99**(19), 7907-7913 [cit. 2019-11-29]. DOI: 10.1007/s00253-015-6874-9. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-015-6874-9>
- [32] SARMIENTO, Felipe, Rocío PERALTA a Jenny M. BLAMEY. Cold and Hot Extremozymes: Industrial Relevance and Current Trends. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. 2015, **3** [cit. 2019-11-30]. DOI: 10.3389/fbioe.2015.00148. ISSN 2296-4185. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fbioe.2015.00148/abstract>



- [33] ELLEUCHE, Skander, Carola SCHRÖDER, Kerstin SAHM a Garabed ANTRANIKIAN. Extremozymes—biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2014, **29**, 116-123 [cit. 2019-11-30]. DOI: 10.1016/j.copbio.2014.04.003. ISSN 09581669. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166914000755>
- [34] SCHRÖDER, Carola, Christin BURKHARDT a Garabed ANTRANIKIAN. What we learn from extremophiles. *ChemTexts* [online]. 2020, **6**(1) [cit. 2020-03-21]. DOI: 10.1007/s40828-020-0103-6. ISSN 2199-3793. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s40828-020-0103-6>
- [35] RAMPELOTTO, Pabulo. Extremophiles and Extreme Environments. *Life* [online]. 2013, **3**(3), 482-485 [cit. 2020-04-08]. DOI: 10.3390/life3030482. ISSN 2075-1729. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2075-1729/3/3/482>
- [36] ADIGUZEL, Ahmet, Hakan OZKAN, Ozlem BARIS, Kadriye INAN, Medine GULLUCE a Fikrettin SAHIN. Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2009, **79**(3), 321-328 [cit. 2019-11-30]. DOI: 10.1016/j.mimet.2009.09.026. ISSN 01677012. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701209003121>
- [37] SATYANARAYANA, Tulasi, Jennifer LITTLECHILD a Yutaka KAWARABAYASI, ed. *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013 [cit. 2020-04-11]. DOI: 10.1007/978-94-007-5899-5. ISBN 978-94-007-5898-8.
- [38] POLTRONIERI, Palmiro a Prasun KUMAR. Polyhydroxyalcanoates (PHAs) in Industrial Applications. MARTÍNEZ, Leticia Myriam Torres, Oxana Vasilievna KHARISSOVA a Boris Ildusovich KHARISOV, ed. *Handbook of Ecomaterials* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017, 2017-09-12, s. 1-30 [cit. 2020-07-17]. DOI: 10.1007/978-3-319-48281-1\_70-1. ISBN 978-3-319-48281-1. Dostupné z: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-48281-1\\_70-1](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-48281-1_70-1)
- [39] SINGH, Om V. *Extremophiles: sustainable resources and biotechnological implications*. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, c2012. ISBN 9781118394120.
- [40] WANG, Quanhui, Zhen CEN a Jingjing ZHAO. The Survival Mechanisms of Thermophiles at High Temperatures: An Angle of Omics. *Physiology* [online]. 2015, **30**(2), 97-106 [cit. 2020-04-11]. DOI: 10.1152/physiol.00066.2013. ISSN 1548-9213. Dostupné z: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/physiol.00066.2013>
- [41] YOON, S. H., D. J. REISS, J. C. BARE, et al. Parallel evolution of transcriptome architecture during genome reorganization. *Genome Research* [online]. 2011, **21**(11), 1892-1904 [cit. 2020-04-11]. DOI: 10.1101/gr.122218.111. ISSN 1088-9051. Dostupné z: <http://genome.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/gr.122218.111>
- [42] VAN NOORT, Vera, Bettina BRADATSCHE, Manimozhayan ARUMUGAM, et al. Consistent mutational paths predict eukaryotic thermostability. *BMC*

- Evolutionary Biology* [online]. 2013, **13**(1) [cit. 2020-04-11]. DOI: 10.1186/1471-2148-13-7. ISSN 1471-2148. Dostupné z: <http://bmcevolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2148-13-7>
- [43] MUSTO, Hector, Hugo NAYA, Alejandro ZAVALA, Hector ROMERO, Fernando ALVAREZ-VALIN a Giorgio BERNARDI. The correlation between genomic G + C and optimal growth temperature of prokaryotes is robust: A reply to Marashi and Ghalanbor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2005, **330**(2), 357-360 [cit. 2020-04-11]. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.02.133. ISSN 0006291X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X05004079>
- [44] CHEN, Zhen, Bo WEN, Quanhui WANG, et al. Quantitative Proteomics Reveals the Temperature-Dependent Proteins Encoded by a Series of Cluster Genes in *Thermoanaerobacter Tengcongensis*. *Molecular & Cellular Proteomics* [online]. 2013, **12**(8), 2266-2277 [cit. 2020-04-11]. DOI: 10.1074/mcp.M112.025817. ISSN 1535-9476. Dostupné z: <http://www.mcponline.org/lookup/doi/10.1074/mcp.M112.025817>
- [45] SHIH, Tsung-Wei a Tzu-Ming PAN. Stress responses of thermophilic *Geobacillus* sp. NTU 03 caused by heat and heat-induced stress. *Microbiological Research* [online]. 2011, **166**(5), 346-359 [cit. 2020-04-11]. DOI: 10.1016/j.micres.2010.08.001. ISSN 09445013. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944501310000753>
- [46] BOUTZ, Daniel R., Duilio CASCIO, Julian WHITELEGGE, L. Jeanne PERRY a Todd O. YEATES. Discovery of a Thermophilic Protein Complex Stabilized by Topologically Interlinked Chains. *Journal of Molecular Biology* [online]. 2007, **368**(5), 1332-1344 [cit. 2020-04-11]. DOI: 10.1016/j.jmb.2007.02.078. ISSN 00222836. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283607002835>
- [47] VIEILLE, Claire, Doug S. BURDETTE a J. Gregory ZEIKUS. *Thermozymes* [online]. Elsevier, 1996, 1996, s. 1-83 [cit. 2020-04-15]. Biotechnology Annual Review. DOI: 10.1016/S1387-2656(08)70006-1. ISBN 9780444824448. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1387265608700061>
- [48] KOGA, Yosuke. Thermal Adaptation of the Archaeal and Bacterial Lipid Membranes. *Archaea* [online]. 2012, **2012**, 1-6 [cit. 2020-04-14]. DOI: 10.1155/2012/789652. ISSN 1472-3646. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/archaea/2012/789652/>
- [49] ZEIKUS, J.G. Thermophilic bacteria: Ecology, physiology and technology. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 1979, **1**(4), 243-252 [cit. 2019-11-30]. DOI: 10.1016/0141-0229(79)90043-7. ISSN 01410229. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0141022979900437>

- [50] KAMBOUROVA, Margarita. Thermostable enzymes and polysaccharides produced by thermophilic bacteria isolated from Bulgarian hot springs. *Engineering in Life Sciences* [online]. 2018, **18**(11), 758-767 [cit. 2020-04-15]. DOI: 10.1002/elsc.201800022. ISSN 16180240. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elsc.201800022>
- [51] BRUINS, Marieke E., Anja E. M. JANSSEN a Remko M. BOOM. Thermozymes and Their Applications: A Review of Recent Literature and Patents. *Applied Biochemistry and Biotechnology* [online]. 2001, **90**(2), 155-186 [cit. 2020-04-15]. DOI: 10.1385/ABAB:90:2:155. ISSN 0273-2289. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1385/ABAB:90:2:155>
- [52] KUMAR, Sumit, Arun K. DANGI, Pratyosh SHUKLA, Debabrat BAISHYA a Sunil K. KHARE. Thermozymes: Adaptive strategies and tools for their biotechnological applications. *Bioresource Technology* [online]. 2019, **278**, 372-382 [cit. 2020-04-15]. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.01.088. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852419301087>
- [53] ELBANNA, K. Schlegelella thermodepolymerans gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic bacterium that degrades poly(3-hydroxybutyrate-co-3-mercaptopropionate). *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* [online]. 2003, **53**(4), 1165-1168 [cit. 2019-12-01]. DOI: 10.1099/ijs.0.02562-0. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.02562-0>
- [54] LUTKE-EVERSLÖH, T. Caenibacterium thermophilum is a later synonym of Schlegelella thermodepolymerans. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* [online]. 2004, **54**(6), 1933-1935 [cit. 2019-12-01]. DOI: 10.1099/ijs.0.63204-0. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.63204-0>
- [55] CHOU, Y.-J., S.-Y. SHEU, D.-S. SHEU, J.-T. WANG a W.-M. CHEN. Schlegelella aquatica sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from a hot spring. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* [online]. 2006, **56**(12), 2793-2797 [cit. 2019-12-01]. DOI: 10.1099/ijs.0.64446-0. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.64446-0>
- [56] ALVES, Marta P., Fred A. RAINEY, M. Fernanda NOBRE a Milton S. DA COSTA. Thermomonas hydrothermalis sp. nov., A New Slightly Thermophilic  $\gamma$ -Proteobacterium Isolated from a Hot Spring in Central Portugal. *Systematic and Applied Microbiology* [online]. 2003, **26**(1), 70-75 [cit. 2019-12-01]. DOI: 10.1078/072320203322337335. ISSN 07232020. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0723202004701617>
- [57] JIANG, Guozhan, David HILL, Marek KOWALCZUK, Brian JOHNSTON, Grazyna ADAMUS, Victor IRORERE a Iza RADECKA. Carbon Sources for Polyhydroxyalkanoates and an Integrated Biorefinery. *International Journal of*

*Molecular Sciences* [online]. 2016, **17**(7) [cit. 2020-06-21]. DOI: 10.3390/ijms17071157. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/17/7/1157>

- [58] MOTHEs, G., C. SCHNORPFEIL a J.-U. ACKERMANN. Production of PHB from Crude *Glycerol*. *Engineering in Life Sciences* [online]. 2007, **7**(5), 475-479 [cit. 2020-06-21]. DOI: 10.1002/elsc.200620210. ISSN 16180240. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elsc.200620210>
- [59] RAMACHANDRAN, Hema, Nurhezreen Md IQBAL, Coswald Stephen SIPAUT a Amirul Al-Ashraf ABDULLAH. Biosynthesis and Characterization of Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) Terpolymer with Various Monomer Compositions by *Cupriavidus* sp. USMAA2-4. *Applied Biochemistry and Biotechnology* [online]. 2011, **164**(6), 867-877 [cit. 2020-06-21]. DOI: 10.1007/s12010-011-9180-8. ISSN 0273-2289. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12010-011-9180-8>
- [60] PREISS, Laura, David B. HICKS, Shino SUZUKI, Thomas MEIER a Terry Ann KRULWICH. Alkaliphilic Bacteria with Impact on Industrial Applications, Concepts of Early Life Forms, and Bioenergetics of ATP Synthesis. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. 2015, **3** [cit. 2020-07-17]. DOI: 10.3389/fbioe.2015.00075. ISSN 2296-4185. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fbioe.2015.00075/abstract>
- [61] SALGAONKAR, Bhakti B. a Judith M. BRAGANÇA. Production of polyhydroxyalkanoates by extremophilic microorganisms through valorization of waste materials. *Advances in Biological Science Research* [online]. Elsevier, 2019, 2019, s. 419-443 [cit. 2020-07-17]. DOI: 10.1016/B978-0-12-817497-5.00026-4. ISBN 9780128174975. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128174975000264>