



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**KYSELINA OCTOVÁ JAKOŽTO VEDLEJŠÍ PRODUKT
METABOLISMU BAKTERIÍ PRODUKUJÍCÍ PHA**

ACETIC ACID AS A SIDE PRODUCT OF METABOLISM OF PHA PRODUCING BACTERIA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Lenka Ryšavá

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2016



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0994/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Lenka Ryšavá	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)	
Vedoucí práce	doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Dan Kučera	

Název bakalářské práce:

Kyselina octová jakožto vedlejší produkt metabolismu bakterií produkující PHA

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na téma metabolismus kyseliny octové (acetate switch) u bakterií
2. Experimentální studium produkce kyseliny octové u PHA produkujících bakterií

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2016

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Lenka Ryšavá
Student(ka)

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Předložená bakalářská práce je zaměřena na experimentální studium produkce kyseliny octové jakožto vedlejšího produktu metabolismu bakterií produkující PHA. Praktická část této bakalářské práce se zabývá vlivem přidaného substrátu do média na nárůst biomasy, na produkci PHA a na tvorbu organických kyselin u kmenů, které potenciálně nacházejí své uplatnění při průmyslové produkci PHA – *Cupriavidus necator* H16, *Burkholderia sacchari*, *Burkholderia cepacia*. Nejvyšších výtěžků organických kyselin bylo dosaženo u bakterie *Burkholderia sacchari* při kultivaci na minerálním médiu s glukózou jako substrátem. Následující část práce je zaměřena na stanovení viability mikroorganismů pomocí průtokové cytometrie, kde bakterie *Cupriavidus necator* H16, *Burkholderia sacchari*, *Burkholderia cepacia* byly vystaveny vybraným stresovým faktorům.

ABSTRACT

The Bachelor's thesis deals with experimental study production of acetic acid as a side product of metabolism of PHA producing bacteria. Experimental part of work deals with the impact of used substrate on the biomass growth, PHA production and the formation of organic acids in strains that can potentially find their application in industrial production of PHA – *Cupriavidus necator* H16, *Burkholderia sacchari*, *Burkholderia cepacia*. The highest yields of organic acid have been reached on *Burkholderia sacchari* when cultivated on mineral medium with glucose. The last part of the thesis is focused on determining the viability of micro-organisms using flow cytometry where bacteria *Cupriavidus necator* H16, *Burkholderia sacchari*, *Burkholderia cepacia* were exposed to selected stress factors.

KLÍČOVÁ SLOVA

Polyhydroxyalkanoáty (PHA), acetát, přepnutí metabolismu acetátu, *Cupriavidus necator* H16, *Burkholderia sacchari*, *Burkholderia cepacia*.

KEYWORDS

Polyhydroxyalkanoates (PHAs), acetate, acetate switch, *Cupriavidus necator* H16, *Burkholderia sacchari*, *Burkholderia cepacia*.

RYŠAVÁ, L. *Kyselina octová jakožto vedlejší produkt metabolismu bakterií produkující PHA*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 49 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala doc. Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D. za jeho odborné rady, trpělivost a vstřícnost během vedení mé bakalářské práce. Konzultantovi Ing. Danu Kučerovi patří také můj dík za ochotu a pomoc při práci v laboratoři. Za vstřícný přístup bych chtěla dále poděkovat prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. V neposlední řadě bych ráda poděkovala svým rodičům a příteli za podporu a pomoc během celé doby mého studia.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Metabolické cesty kyseliny octové u bakterií	8
2.1.1	Přepnutí metabolismu acetátu	8
2.1.2	Důvody vylučování kyseliny octové buňkou	12
2.1.3	Utilizace kyseliny octové	13
2.2	Polyhydroxyalkanoáty (PHA)	13
2.2.1	Historie.....	13
2.2.2	Představení PHA	14
2.2.3	Typy PHA	14
2.2.4	Fyzikálně-chemické vlastnosti PHA	16
2.3	Metabolismus biosyntézy	17
2.3.1	Popis metabolismu	17
2.3.2	Regulace biosyntézy P(3HB) na enzymatické úrovni.....	19
2.3.3	Zdroje uhlíku.....	19
2.4	Vybraní bakteriální producenti PHA.....	20
2.4.1	<i>Cupriavidus necator</i> H16.....	20
2.4.2	<i>Burkholderia cepacia</i>	20
2.4.3	<i>Burkholderia sacchari</i>	20
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	21
3.1	Použité bakterie, chemikálie, materiál a přístroje	21
3.1.1	Použité bakteriální kmeny	21
3.1.2	Přístrojové vybavení.....	21
3.1.3	Použité chemikálie pro kultivaci mikroorganismů	21
3.1.4	Ostatní chemikálie.....	21
3.2	Kultivace bakterií	21
3.2.1	Příprava inokula	21
3.2.2	Živné média.....	22
3.2.3	Zaočkování bakterií za účelem produkce PHA.....	22
3.3	Stanovení biomasy	23
3.4	Stanovení obsahu PHA v biomase	23
3.4.1	Stanovení kalibrační přímky	24

3.5	Stanovení koncentrace organických kyselin	24
3.6	Stanovení koncentrace redukujících sacharidů	25
3.7	Porovnání produkce PHA a organických kyselin u různých druhů bakterií	25
3.8	Stanovení viability po působení stresových faktorů	25
3.8.1	Stresový faktor – kyselina octová a kyselina mléčná.....	26
4	VÝLEDKY A DISKUZE.....	27
4.1	Kalibrace metod	27
4.1.1	Spektrofotometrické a gravimetrické stanovení koncentrace biomasy.....	27
4.1.2	Stanovení PHA plynovou chromatografií s FID detektorem.....	30
4.1.3	Stanovení redukujících sacharidů pomocí DNS metody	31
4.2	Studium produkce biomasy, podílu P(3HB) a koncentrace organických kyselin z vybraných substrátů.....	34
4.3	Růstové charakteristiky u bakterie <i>Burkholderia sacchari</i>	36
4.4	Stanovení viability buněk průtokovou cytometrií	38
4.4.1	Viabilita buněk po přidavku kyseliny octové.....	38
4.4.2	Viabilita po přidavku kyseliny mléčné	39
5	ZÁVĚR.....	41
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	42
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	49

1 ÚVOD

Kyselina octová je jedna z mnoha možných vedlejších produktů PHA produkujících bakterií. Bakterie produkují kyselinu octovou za účelem přežití. Pokud buňky ze svého okolí vyčerpají primární zdroj uhlíku, dochází k tzv. přepnutí acetátu. Z fáze rychlého růstu se buňka přepne do fáze pomalejšího růstu, kde dochází k importu a utilizaci kyseliny octové jakožto sekundárního zdroje energie.

V 19. století byla snaha o identifikaci aktivní formy acetátu. Na místo toho byly objeveny a charakterizovány jednotlivé složky a meziproducty metabolismu acetátu. Za následujících 30 let byla objevena aktivní forma acetátu, která je označována jako acetylkoenzym A (acetyl-CoA). Acetylkoenzym A je centrálním metabolitem. Tento centrální metabolit je využíván především v syntéze hlavního produktu P(3HB), ale také určitá část může být přeměněna na kyselinu octovou, která se tvoří jako zásoba energie v asimilační fázi pro případ, kdyby došlo k vyčerpání primárního zdroje uhlíku. V disimilační fázi tuto kyselinu využívá jako sekundární zdroj uhlíku.

Polyhydroxyalkanoáty jsou organické biopolymery produkované řadou bakterií jako zásobní látky. Degradace těchto zásobních látek umožňuje bakteriím přežít a zvyšuje jejich odolnost vůči měnícím se podmínkám. Tyto biopolymery jsou do budoucna dobrou alternativou za syntetické plasty.

Oproti organickým biopolymerům jsou syntetické plasty v dnešní době velmi dobře cenově dostupné. Díky vynikajícím fyzikálně-chemickým vlastnostem mají širokou možnost využití v praxi. Využívají se při náhradě některých materiálů, jako je například dřevo, kov nebo sklo. Velkou nevýhodou je doba rozkladu, která se u těchto syntetických plastů pohybuje okolo několika desítek až stovek let. Tento fakt bohužel představuje závažný problém pro životní prostředí. Likvidace konvekčních plastů se provádí spalováním, což vede k uvolňování mnoha toxických látek do ovzduší.

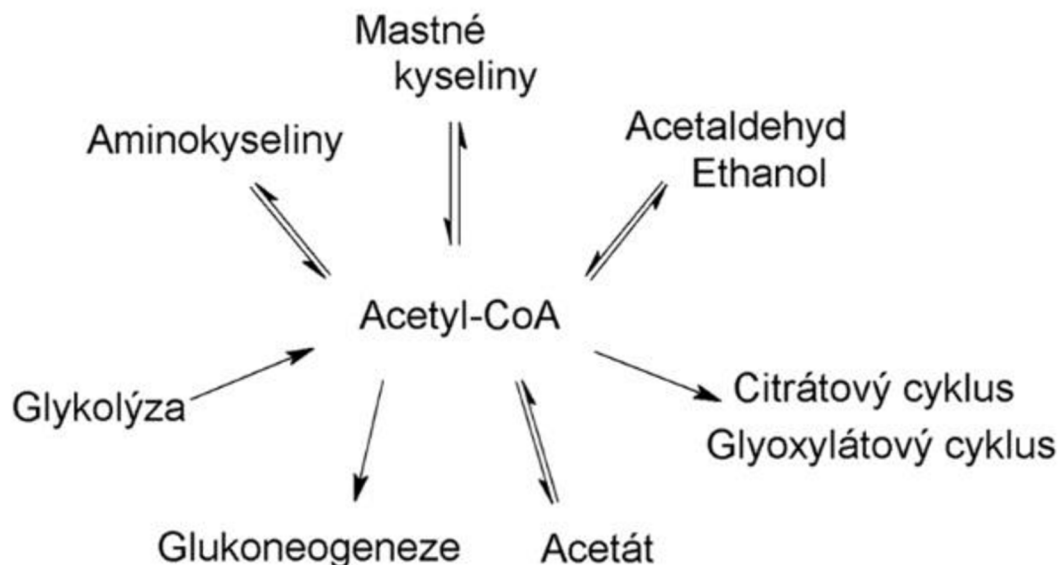
Z důvodu velké poptávky po syntetických plastech se stalo důležitým tématem výzkumu hledání nových materiálů s podobnými vlastnostmi syntetickým plastům, ale s tím rozdílem, že by měly být jednoduše rozložitelné a díky tomu moc nezatěžovaly životní prostředí.

Z biotechnologického hlediska je žádoucí, aby co největší část vzniklého acetyl-CoA vstupovala do PHA biosyntetické dráhy a nebyla neúčelně vyloučena ve formě acetátu. Proto bylo cílem této práce prozkoumat vztah mezi metabolismem kyseliny octové a PHA biosyntetickou dráhou u vybraných mikrobiálních producentů PHA.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Metabolické cesty kyseliny octové u bakterií

Studium metabolismu acetátu má za sebou bohatou minulost. V průběhu snahy identifikovat aktivovaný acetát, která se mimochodem odehrávala v 40. a 50. letech 20. století, byly objeveny a charakterizovány jednotlivé složky a meziprodukty metabolismu acetátu. Nyní už víme, že aktivní forma acetátu je označována jako acetylkoenzym A (acetyl-CoA). Je to meziprodukt, který je hlavní součástí mnoha metabolických cest, jak je znázorněno na obr. č. 1 [1, 2, 3].



Obr. č. 1: Acetyl-CoA „sedí“ na křižovatce centrálního metabolismu [6].

Během následujících třiceti let ustoupilo studium metabolismu z popředí a produkce acetátu byla analyzována pouze vědci zabývajícími se převážně fermentací. Příležitostně se obecný zájem o přepnutí metabolismu acetátu znovu objevil, ovšem výraznější pozornosti se dočkal až v roce 1990. Tento obnovený zájem byl způsoben především tvrzením, že acetyl fosfát (acetyl-P) jakožto meziprodukt může fungovat jako globální signální molekula [4].

Pozornost také vzbudil z důvodu asimilace acetyl aktivujícího enzymu (AMP-ACS). Acetyl-CoA syntetáza (AMP-ACS) je prototypem enzymu, který je zapojený do syntézy mastných kyselin, antibiotik nebo protinádorových léčiv [5].

2.1.1 Přepnutí metabolismu acetátu

Bakteriální buňky, které mají snahu přežít přechod mezi růstovou a stacionární fází, se musí přepnout z fyziologického programu, který jim umožňuje rychlý růst v přítomnosti živin, do takového programu, který zvyšuje jejich přežití v nepřítomnosti zmiňovaných živin. Přepnutí nastane právě tehdy, když bakteriální buňky přechází z programu rychlého růstu, kdy produkují a vylučují acetát (tzv. disimilace), do programu pomalejšího růstu umožňujícího import a utilizaci (tzv. asimilace) uvolněného a vyloučeného acetátu. Přepnutí metabolismu acetátu lze tedy definovat jako okamžik, kdy disimilace acetátu je rovna jeho asimilaci [6].

Toto přepnutí metabolismu acetátu nastane v případě, když buňky vyčerpají ze svého okolí zdroj uhlíku na produkci acetátu, například D-glukózu nebo L-serin, a začnou se spoléhat na jednu ze svých schopností, tedy využívat dříve vyprodukovaný acetát. Tato fyziologická událost nemůže nastat, pokud již došlo k přepnutí metabolismu, tím pádem nemůže docházet k asimilaci acetátu [6].

Aerobní růst bakterií rodu *Proteobacteria* je uskutečněn přechodem od disimilace k asimilaci dvěma aktivačními acetátovými dráhami. Zatímco disimilační funkce je zprostředkována pomocí PTA-ACKA dráhy (viz kapitola 2.1.1.2), asimilační funkce je realizována především prostřednictvím AMP-ACS dráhy (viz kapitola 2.1.1.3) [6, 16].

Vzhledem k tomu, že acetát volně prostupuje v nedisociované formě membránou, lze usuzovat, že u asimilace není nutný žádný transportní systém. Ovšem za určitých podmínek je prokázána značná absorpce acetátu, což naznačuje, že takový systém existuje [6].

V poslední době vědci objevili existenci enzymu acetát permeázy (ActP) a poskytli důkazy o existenci druhého acetátového metabolického přenašeče. Převládá názor, že tyto metabolické systémy hrají klíčovou roli při vychytávání mikromolárních koncentrací kyseliny octové [7].

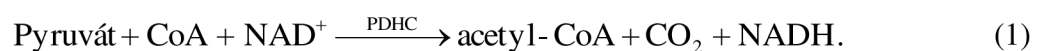
2.1.1.1 Vznik acetylkoenzymu A

Pro vznik pyruvátu je potřeba přítomnost D-glukózy nebo L-serinu. Bakteriální buňky nejprve musí oxidačně dekarboxylovat pyruvát na acetylkoenzym A. Konverze pyruvátu na acetylkoenzym A může probíhat za aerobních podmínek i anaerobních podmínek [6].

Při anaerobních podmínkách z důvodu nedostatku kyslíku nemůže docházet k oxidační dekarboxylaci pyruvátu, neboť by došlo k hromadění redukovaných koenzymů oxidoreduktáz (NADH, FADH₂) v dýchacím řetězci. Jiným druhem anaerobního odbourávání je tzv. ethanolové kvašení, kterým disponují například kvasinky. Pyruvát je poté anaerobně odbouráván na ethanol [8].

2.1.1.1.1 Aerobní přeměna pyruvátu

Za aerobních podmínek je přítomen kyslík. Pyruvát přechází z cytoplasmy do mitochondrií a oxiduje se na acetylkoenzym A. Tato část dráhy je znázorněna zelenou barvou na obr. č. 3. Děj je popsán rovnicí:



Jde o takzvanou oxidační dekarboxylaci pyruvátu. Tato reakce je nevratná [8]. Oxidační dekarboxylace je reakce katalyzována pyruvátdehydrogenázou (PDHC). Reakcí vznikají z jedné molekuly glukózy dvě molekuly NADH [6].

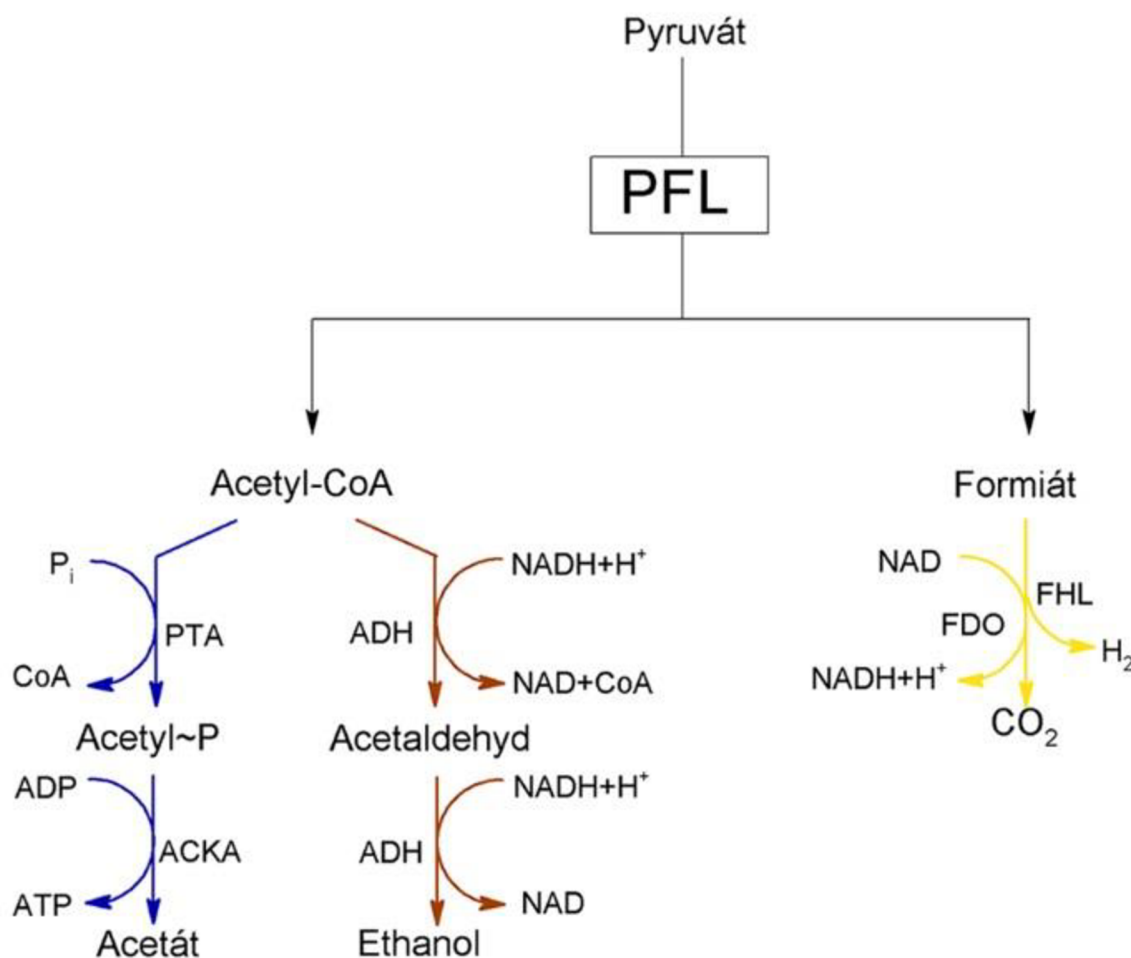
Výsledný acetyl-CoA může následně vstupovat do řady metabolických drah, z nichž některé vedou ke vzniku acetátu (viz kapitoly 2.1.1.2 a 2.1.1.3) [9].

2.1.1.1.2 Anaerobní přeměna pyruvátu

Za anaerobních podmínek nedochází k oxidační dekarboxylaci pyruvátu. Může dojít k přeměně pyruvátu na laktát za katalýzy laktát dehydrogenázou (LDH). Další přeměna pyruvátu je katalyzována enzymem pyruvát-formiát lyázou (PFL). Pomocí tohoto enzymu se pyruvát přemění na acetyl-CoA a na formiát [10].

Výsledný acetyl-CoA má dvě možnosti přeměny. První alternativou je přeměna z acetyl-CoA na acetát. Tento děj je detailně popsán v kapitolách 2.1.1.2 a 2.1.1.3. Obr. č. 2 a obr. č. 3 tuto část zvýrazňuje modře. Obr. č. 2 vyznačuje hnědou barvou přeměnu acetyl-CoA na ethanol. Tato reakce je katalyzována enzymem alkoholdehydrogenáza (ADH) a je druhou možností konverze [6].

Osud formiátu vytvořeného enzymem PFL je závislý na pH prostředí. Formiát je vylučován při neutrálním pH. Podle dostupnosti kyslíku a při nižší hodnotě pH se formiát rozkládá na oxid uhličitý dvěma způsoby. Buď pomocí aerobní formiát-dehydrogenázy (FDO), nebo na oxid uhličitý a vodík pomocí formiát-vodíku lyázy (FHL) [11, 12]. Obr. č. 2 znázorňuje celou přeměnu formiátu na oxid uhličitý žlutě.



Obr. č. 2: Přeměna pyruvátu pomocí enzymu PFL. Černá - přeměna pyruvátu na acetyl-CoA a na formiát, modrá - přeměna acetyl-CoA na acetát, hnědá - přeměna acetyl-CoA na ethanol, žlutá - přeměna formiátu na oxid uhličitý [6].

2.1.1.2 PTA-ACKA dráha

U bakterií je PTA-ACKA dráha katalyzována enzymy fosfát acetyltransferázou (PTA) [13] a acetát fosfotransferázou (ACKA). Enzym PTA reverzibilně převádí acetylkoenzym A a anorganický fosfát (P_i) na koenzym A (CoA) a dojde ke vzniku acetyl~P. Zatímco enzym ACKA reverzibilně převádí acetyl~P a adenosindifosfát (ADP) na adenosintrifosfát (ATP)

a vzniká acetát. Tuto metabolickou dráhu znázorňuje obr. č. 2 modře. Acetát volně difunduje přes buněčnou membránu do okolního prostředí [6].

Hlavní úlohou acetyl~P je, že funguje jako zdroj fosfátu. V molekule acetyl~P je uloženo více energie než v molekule ATP nebo v jiných fosforylovaných sloučeninách, jedinou výjimkou je fosfoenolpyruvát (PEP). Proto acetyl~P hraje klíčovou roli při fosforylaci molekuly ATP u reakce, která je katalyzována enzymem ACKA [14].

Reverzibilní PTA-ACKA dráha má nízkou afinitu, hodnoty K_m jsou v rozsahu 7 – 10 mM pro substráty. Proto anabolický děj funguje jen pro velké množství kyseliny octové [15].

2.1.1.3 AMP-ACS dráha

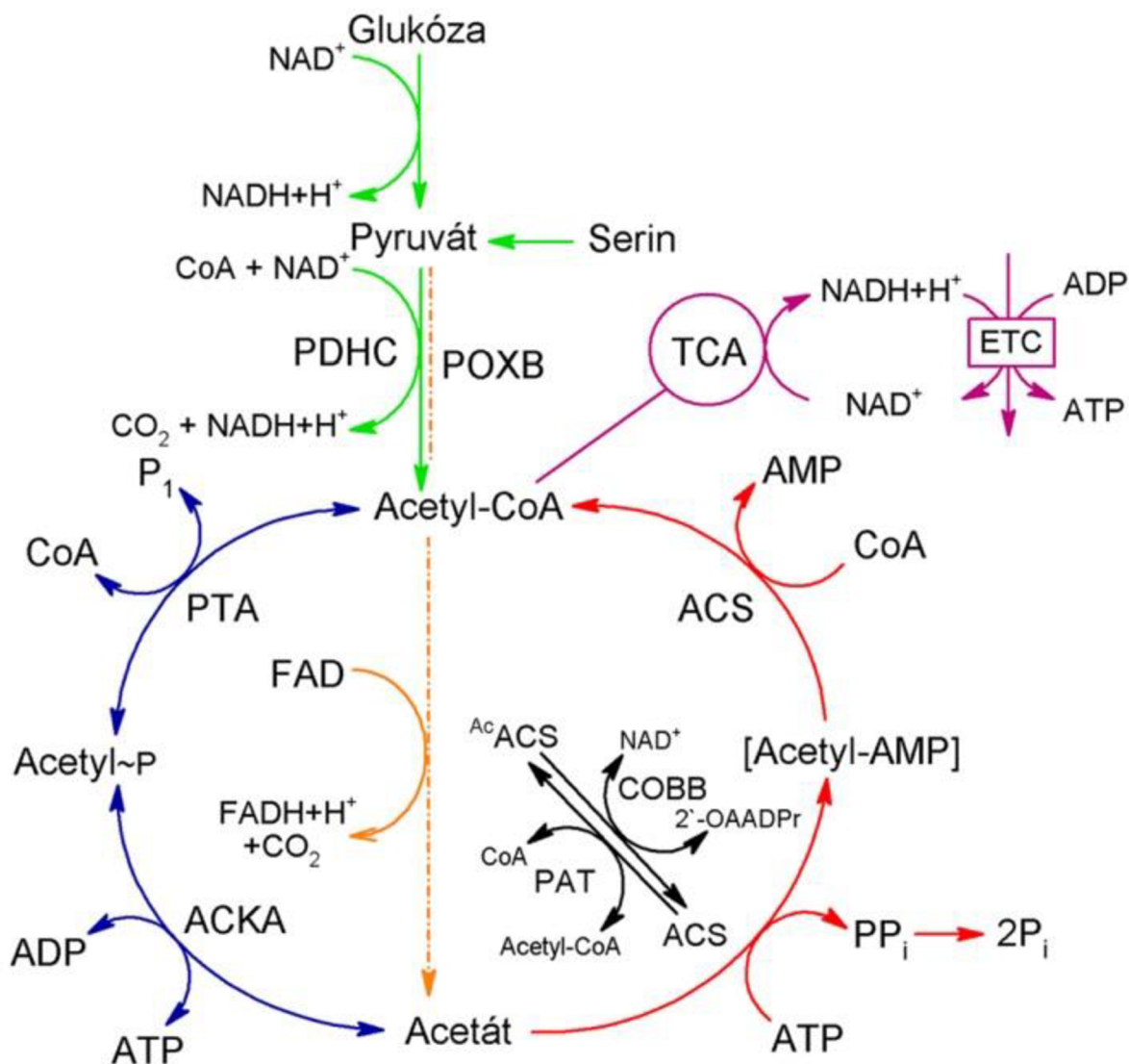
Dráha AMP-ACS navazuje na dráhu PTA-ACKA. Na obr. č. 3 je tato asimilace acetátu zvýrazněna červeně. Metabolická přeměna vyžaduje vysoce afinitní enzym acetyl-CoA syntetázu (ACS). Tato cesta je u bakterií katalyzována acetyl aktivujícím enzymem (AMP-ACS) [15].

Pyrofosfatáza (PPáza) degraduje pyrofosforečnan (PPi) na anorganický fosfát (Pi), který zajistí, aby reakcí vznikl acetyl-CoA. Pro vznik acetyl-CoA syntetázy (^{Ac}ACS) je třeba využít acetyl-CoA jako dárce acetylu. Vzniklý enzym je neaktivní. K jeho aktivaci dochází v případě, když dojde k vyčerpání glykolytických zdrojů uhlíku. Pomocí NAD⁺ dojde k aktivaci acetyl-CoA syntetázy (ACS). Aktivní acetyl-CoA syntetáza (ACS) produkuje acetyl-CoA a ten následně vstupuje do citrátového cyklu. Krebsův cyklus poskytuje elektrony do dýchacího řetězce ve formě NADH, jehož primárním produktem je molekula adenosintrifosfátu (ATP). Obr. č. 3 zobrazuje tuto část metabolické dráhy fialovou barvou [6].

I když *in vitro* je reakce reverzibilní, *in vivo* je reakce nevratná z důvodu přítomnosti intracelulární pyrofosfatázy. Tato cesta je vysoce afinitní, hodnoty K_m jsou asi okolo 200 μM pro substráty, a proto funguje anabolický děj pouze pro malé množství kyseliny octové [17].

2.1.1.4 Enzym pyruvát oxidáza (POXB)

Působením enzymu pyruvát oxidázy (POXB) může také být vylučován acetát. Až do nedávna POXB nebyl objasněn. Tento enzym katalyzuje oxidační dekarboxylaci pyruvátu na acetát přímou cestou. Reakcí vzniká oxid uhličitý a redukuje se flavinadenindinukleotid (FAD) na FADH₂ [18, 19]. Zatímco PDHC a PFL jsou považovány za důležité enzymy, tak POXB obecně byl považován za nadbytečný. Důkazy však naznačují, že POXB poskytuje energii a acetylové zbytky (jako například acetyl-CoA) za mikroaerofilních podmínek. Obr. č. 3 vyznačuje tuto část oranžovou barvou [20].



Obr. č. 3: Přepnutí metabolismu acetátu. Zelená - aerobní přeměna pyruvátu na acetyl-CoA, modrá - PTA-ACKA dráha, oranžová - přeměna pyruvátu pomocí enzymu POXB na acetát, červená - AMP-ACS dráha, fialová - cyklus trikarboxylových kyselin (citrátový cyklus) a dýchací řetězec [6].

2.1.2 Důvody vylučování kyseliny octové buňkou

Pyruvát se přemění přes acetyl-CoA rovnou až na acetát (viz kapitola 2.1.1.3 a 2.1.1.4). Na obr. č. 2 a obr. č. 3 je tato část zvýrazněna modře. Vylučování kyseliny octové do prostředí vyplývá z nutnosti regenerace NAD^+ spotřebované glykolýzou. Dále je třeba recyklovat koenzym A (CoA) potřebný pro konverzi pyruvátu na acetyl-CoA. Vzhledem k tomu, že v Krebsově cyklu dochází k oxidaci acetyl-CoA na oxid uhličitý, nastane vylučování kyseliny octové vždy, když Krebsův cyklus nefunguje správně nebo když je vyšší přívod uhlíku do buněk než je kapacita ostatních ústředních metabolických drah. K tvorbě acetátu dochází při anaerobní fermentaci [6, 12, 21, 22, 23].

Acetát vzniká rovněž i aerobně při přebytku glukózy, ve fázi růstu inhibuje dýchání. Tento proces se nazývá bakteriální Crabtree efekt [21, 24]. Díky Crabtree efektu až 15 % glukózy může být vyloučeno v podobě kyseliny octové. Ta byla dlouho považována za pouhý vedlejší

produkt metabolismu [21]. Nedávný výzkum naznačuje, že vzniklý acetát z acetyl-CoA umožňuje rychlejší růst, protože se uvolní koenzym A, který je potom využíván enzymem 2-ketoglutarátdehydrogenázou (KGDH) v Krebsově cyklu (TCA) [25].

2.1.3 Utilizace kyseliny octové

Acetát, jako kyselina octová, stejně jako jiné slabé kyseliny, je toxický [26]. Ve své nedisociované nebo kyselé podobě, se jedná o lipofilní slabou kyselinu, která snadno proniká membránou, proti koncentračnímu gradientu. Jakmile projde přes membránu, rozdělí se na proton a aniont. Proton okyseluje cytoplazmu. Anion zvyšuje vnitřní osmotický tlak a zasahuje do biosyntézy methioninu. Nicméně, acetát je také potenciálním zdrojem uhlíku i energie. Proto je bakterie schopna provést přepnutí metabolismu acetátu, který umožňuje náročné odstranění tohoto potenciálního toxinu z jejího prostředí. Utilizace kyseliny octové nastane v případě, že bakteriální buňky vyčerpají ze svého okolí zdroj uhlíku na produkci acetátu, například D-glukózu nebo L-serin. Následně po vyčerpání těchto uhlíkatých zdrojů začne buňka opět využívat vyprodukovaný acetát, který dříve sama vyrobila. Tato fyziologická událost nenastane, pokud už k přepnutí metabolismu došlo, nemůže dojít k asimilaci acetátu [6].

2.2 Polyhydroxyalkanoáty (PHA)

2.2.1 Historie

Na počátku minulého století byly v bakteriálních buňkách *Azotobacter chroococcum* objeveny intracelulární granule, které jsou rozpustné v chloroformu [29].

Francouzský mikrobiolog Maurice Lemoigne učinil první objev PHA v roce 1926. Identifikoval složení granulí izolovaných z buněk bakterie *Bacillus megaterium* a později je označil jako poly(R-3-hydroxybutyrát) (P(3HB)), tedy přírodní polymer patřící do skupiny polyhydroxyalkanoátů (PHA) [29, 30]. P(3HB) byl dále nalezen v gram pozitivních i gram negativních bakteriích a archebakteriích [29].

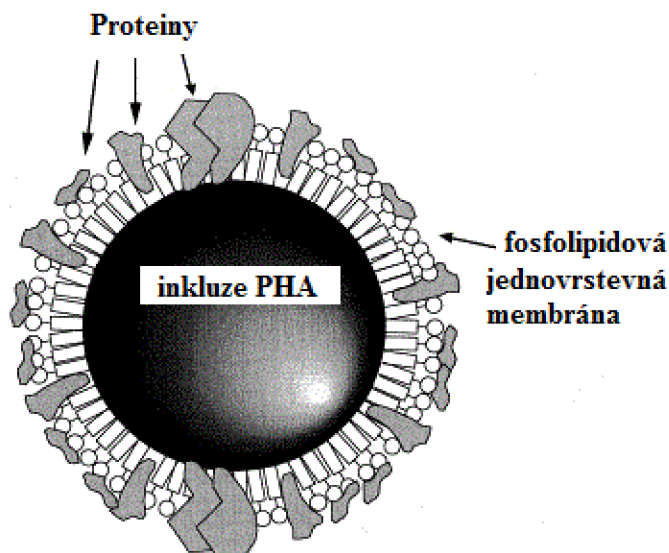
Koncem 50. let 20. století bylo zjištěno, že bakterie ukládají intercelulární rezervy v podobě P(3HB), pokud médium obsahuje nadbytek uhlíku a nedostatek dusíku [31]. Macrae a Wilkinson z toho také vydedukovali, že bakterie produkují P(3HB) jako intracelulární zásobní látku [30].

V roce 1976 se společnost Imperial Chemical Industry (ICI Ltd., UK) rozhodla průmyslově vyrábět P(3HB) jakožto jeden z alternativních zdrojů pro výrobu tradičních plastů. Kopolymer poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) (P(3HB-co-3HV)), který společnost vynalezla, je na trhu znám pod názvem Biopol™. Značnou nevýhodou je cena tohoto kopolymeru, která je vyšší než u tradičních plastů [32]. S vývojem genového inženýrství jsou prováděny genové manipulace i při produkci PHA. Cílem přípravy nových geneticky modifikovaných kmenů bakterií je snaha snížit celkové náklady na produkci bioplastů [33].

V roce 1996 americká firma Monsanto zakoupila práva na výrobu Biopolu™, která využívala k výrobě P(3HB) geneticky modifikované rostliny a tím snížila cenu konečného produktu [32].

2.2.2 Představení PHA

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou skupinou polyesterů, jejichž molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí $10^5 - 10^6$ Da [32]. Karboxylová skupina jednoho monomeru tvoří esterovou vazbu s hydroxylovou skupinou sousedního monomeru [34]. PHA jsou produkovány pomocí bakteriální fermentace z cukrů nebo lipidů [27]. V buňkách je PHA uloženo ve formě cytoplazmatických inkluzí o velikosti 0,2 – 0,5 μm . Velikost a počet granulí závisí na druhu bakterie. Granule jsou složeny z PHA, lipidů a proteinů. Fosfolipidy a proteiny tvoří povrch granule. Uprostřed granule se nachází polymer (viz obr. č. 4) [29].



Obr. č. 4: Struktura PHA granule in vivo [28].

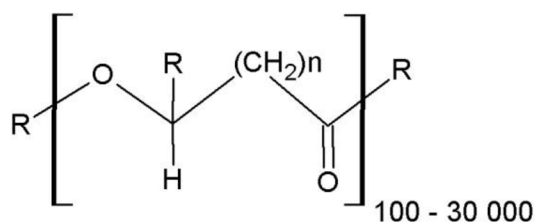
Kultivovat bakterie lze na různých médiích obsahujících substrát, například sacharidy, organické kyseliny nebo oleje. Existuje také možnost inkorporovat více než 150 druhů monomerních jednotek do struktury PHA. Nejenže monomerní jednotky lze inkorporovat do struktury PHA, ale dokonce je lze mezi sebou i různě kombinovat. Výrazně se tak zlepšují vlastnosti vzniklého polymeru. Nejvýznamnější vlastností takto vzniklých biopolymerů je jejich rozložitelnost. Tyto poznatky byly využity k přiblížení výroby rozložitelných bioplastů [27, 28].

2.2.3 Typy PHA

Podle toho, jaký zdroj uhlíku je použit při kultivaci, jsou mikroorganismy schopny různými biochemickými cestami syntetizovat různé typy PHA [32]. PHA dělíme podle počtu uhlíků, které monomer obsahuje, do 3 skupin:

- PHA obsahující tři až pět atomů uhlíku v monomeru PHA (PHA s krátkým řetězcem) nazýváme SCL (short-chain-length),
- polymery mající šest až čtrnáct uhlíků v monomerní jednotce PHA (PHA se středně dlouhým řetězcem) se nazývají MCL (medium-chain-length) [32],
- poslední skupina LCL (long-chain-length) PHA (PHA s dlouhým řetězcem), které mají v molekule více jak čtrnáct atomů uhlíku [38].

Obr. č. 5 uvádí obecný vzorec struktury PHA s různými jednotkami.



n = 1	R = hydrogen	Poly(3-hydroxypropionát)
	R = methyl	Poly(3-hydroxybutyrát)
	R = ethyl	Poly(3-hydroxyvalerát)
	R = propyl	Poly(3-hydroxyhexanoát)
	R = pentyl	Poly(3-hydroxyoktanoát)
	R = nonyl	Poly(3-hydroxydodekanoát)
n = 2	R = hydrogen	Poly(4-hydroxybutyrát)
	R = methyl	Poly(4-hydroxyvalerát)
n = 3	R = hydrogen	Poly(5-hydroxyvalerát)
	R = methyl	Poly(5-hydroxyhexanoát)
n = 4	R = hexyl	Poly(6-hydroxydodekanoát)

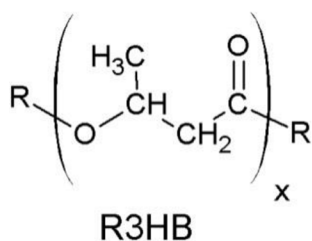
Obr. č. 5: Obecná struktura PHA [41].

2.2.3.1 SCL (short-chain-length) PHA

SCL (Short-chain-length) PHA je tvořena monomerními jednotkami, které jsou složeny z (R)-3-hydroxy kyselin se třemi až pěti atomy uhlíku v molekule. Jejich nejvýznamnějším zástupcem je poly(3-hydroxybutyrát), který je produkovaný řadou bakterií, například *Cupriavidus necator* (*Ralstonia eutropha*) [36]. Bakterie je vyobrazena na obr. č. 8.

Poly-3-hydroxyvalerát P(3HV) je dalším zástupcem skupiny SCL PHA, který tvoří pěti uhlíkatou kostru monomerních jednotek. Pokud je bakterie kultivována na směsném médiu, jako je například směs glukózy a valerátu, tak vznikají kopolymery s nahodilým uspořádáním jednotlivých monomerních jednotek [36]. Koncentrace jednotlivých substrátů v živném médiu udává procentuální zastoupení jednotlivých monomerních jednotek [39].

P(3HB) – poly(3-hydroxybutyrát) patří mezi nejznámější SCL PHA, který obsahuje čtyři uhlíky [43]. Obr. č. 6 znázorňuje obecné schéma P(3HB).



X = 120 – 200; malá molekulová hmotnost P(3HB)
 X = 1000 – 20 000; velká molekulová hmotnost P(3HB)
 X = 100 000; ultra velká molekulová hmotnost P(3HB)

Obr. č. 6: Obecné schéma P(3HB) [43].

P(3HB) se vyskytuje v oligomerní formě s nízkou molekulovou hmotností od 120 do 200 monomerních jednotek (12 000 Da). Tato forma se nachází v mikroorganismech, rostlinách a dokonce i v živočišné říši včetně člověka. V membránách se vyskytuje PHA ve formě PHB-Na-polyfosfátového komplexu, kde plní funkci membránového iontového přenašeče v membráně buněk [32].

U prokaryotických buněk byl především nalezen vysokomolekulární P(3HB) (200 000 až 3 000 000 Da), který funguje jako zásobní zdroj energie a uhlíku. V buňkách je lineární vysokomolekulární polyester P(3HB) uložen jako nerozpustná inkluze [43]. Bod tání tohoto polymeru je okolo 180 °C a krystaličnost je v rozmezí 55 - 80 % [44].

Fyzikální vlastnosti P(3HB) jsou velmi blízké polypropylenu (PP). P(3HB) je však mnohem tvrdší a křehčí materiál, který je v porovnání s PP velmi termicky nestabilní [44]. Křehkost P(3HB) je způsobena výskytem velkého množství krystalických center v molekule. [45].

2.2.3.2 MCL (medium-chain-length) PHA

MCL (medium-chain-length) PHA jsou polymery, jejichž hlavní monomerní jednotku tvoří 3-hydroxykyseliny s šesti až čtrnácti atomy uhlíku, které jsou zastoupené především hydroxyoktanoátovou monomerní jednotkou [28, 36]. V roce 1983 byl objeven polyester, který obsahoval především hydroxyoktanoátovou jednotku. Tento polyester se stal tak prvním polymerem z nové skupiny sloučenin nazývané MCL PHA, které mohou obsahovat široké spektrum různých monomerů [40]. V některých polymerech bylo dokonce nalezeno více než 90 monomerů tvořených 3-hydroxykyselinami s nenasycenými, nasycenými, přímými nebo větvenými postranními řetězci, ale také monomery s rozdílnými funkčními skupinami na postranním řetězci, jako jsou halogenatomy, epoxy, hydroxy, kyano, karbonyl a esterifikované karbonylové skupiny [32].

Pokud jsou v živném médiu přítomné různé uhlíkové zdroje, jako například alifatické alkany, alkanoáty a alkoholy nebo alifatické mastné kyseliny, jsou tyto polymery syntetizovány především bakteriemi rodu *Pseudomonas*. Bakterie jsou schopné syntetizovat MCL PHA i z glukózy a mnoha dalších strukturně podobných uhlíkových zdrojů [39].

2.2.4 Fyzikálně-chemické vlastnosti PHA

Z důvodu unikátních fyzikálně-chemických vlastností jsou PHA zkoumány a využívány k praktickým účelům. Můžeme je zařadit mezi termoplasty nebo elastomery. Termoplastické vlastnosti umožňují lisování či vyrábění filmů a vláken [29].

P(3HB) nevykazuje toxicitu a je biokompatibilní s epitelovými buňkami a chondrocyty. Ve vodě je P(3HB) nerozpustný, ale naopak v chloroformu se velmi dobře rozpouští. Přídavkem methanolu nebo ethanolu lze tento polymer z roztoku vysrážet. Vysoké molekulové hmotnosti jsou způsobeny tím, že polymer dosahuje vysokého stupně polymerizace [39, 60]. P(3HB) je velmi křehký, lámavý a tuhý. Vysoká teplota tání, která dosahuje hodnoty 175 °C, znesnadňuje průmyslové zpracování, a je velmi blízká teplotě degradace polymeru na kyselinu krotonovou [62]. PHA jsou biodegradabilní jak za aerobních podmínek, kdy dochází k rozkladu materiálu až na oxid uhličitý a vodu, tak za anaerobních podmínek, kdy dochází k rozkladu na metan a oxid uhličitý [60].

SCL PHA vykazují spíše termoplastické vlastnosti díky relativně vysokému podílu krystalických struktur. MCL PHA mají vysokou roztažnost. Jsou to termoplastické elastomery s minimem krystalických struktur a pevností v tahu [42]. SCL PHA mají nižší teploty tání a vyšší teploty skelného přechodu než MCL PHA [60]. Jejich vlastnosti jsou uvedeny v tab. č. 1.

Tab. č. 1: Fyzikální a chemické vlastnosti P(3HB) a polypropylenu (PP) [63].

Vlastnost	SCL PHA	MCL PHA	PP
Teplota tání [°C]	175	30 až 80	176
Teplota skelného přechodu [°C]	15	-36	-10
Hustota [g/cm ³]	1,25	1,05	0,91
Krystalizace [%]	40 až 80	20 až 40	70
Pevnost v tahu [MPa]	40	9	34
Roztažnost [%]	6 až 1000	300 až 400	400
Rezistence vůči rozpouštědlům	nízká	nízká	dobrá
Odolnost vůči UV	dobrá	dobrá	nízká
Biodegradabilita	dobrá	dobrá	žádná

Přítomnost různých monomerních jednotek v jednotlivých polymerech umožňuje mnohem lepší fyzikální a chemické vlastnosti, které jsou pozorovány u různých kopolymerů. Záleží však na tom, v jakém podílu jsou zastoupeny další monomerní jednotky v polymeru [61]. Vlastnosti vybraných kopolymerů jsou uvedeny v tab. č. 2.

Tab. č. 2: Srovnání fyzikálních vlastností různých PHA a syntetického PP [28,60].

Vlastnost	P(3HB)	P(3HB-co-20% 3HV)	PP
Teplota tání [°C]	180	145	176
Teplota skelného přechodu [°C]	4	-1	-10
Roztažnost [%]	5	50	400
Pevnost v tahu [MPa]	40	20	34,5

2.3 Metabolismus biosyntézy

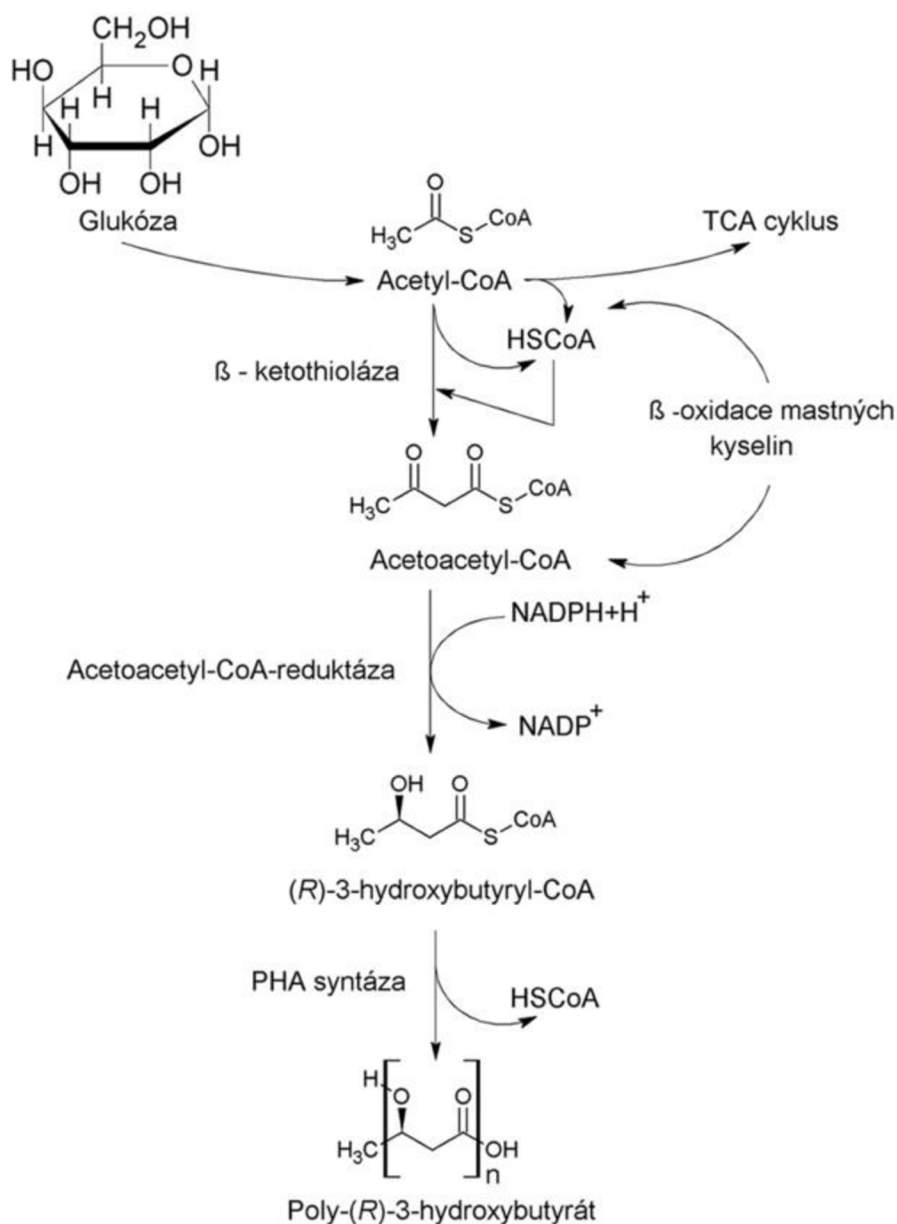
V posledních letech je cílem výzkumu vyrobit PHA vhodných fyzikálních vlastností z obnovitelných zdrojů uhlíku [37]. Mikroorganismy jsou schopné zpracovávat velké množství různých druhů uhlíkatých substrátů. Rozmanitost stereospecifity PHA syntáz umožňuje mikroorganismům začlenit uhlíkaté řetězce, které jsou metabolicky aktivované thioesterovou vazbou na koenzym A, do polymerní struktury PHA [41]. Z tohoto důvodu je velká část výzkumu zaměřena na činnost enzymů podílejících se na tvorbě PHA [46]. U biosyntézy je důležitá přítomnost klíčových enzymů. Nejvýznamnější klíčový enzym je PHA syntáza [41].

Metabolické dráhy biosyntézy PHA a jejich regulace jsou taktéž studovány stejně jako genové technologie. Genové technologie v posledních letech napomáhají objasnit mechanismus tvorby PHA pomocí mutantních kmenů mikroorganismů [46].

2.3.1 Popis metabolismu

V bakteriální říši se vyskytuje několik metabolických drah biosyntézy PHA. Byly identifikovány a prozkoumány zatím čtyři hlavní metabolické dráhy pro biosyntézu a inkorporaci většiny známých konstituentů bakteriálních PHA [29, 41]. Biosyntéza PHA u bakterií *Cupriavidus necator* H16 (s dřívějšími názvy *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes eutrophus* nebo *Wautersia eutropha*) [62] (viz obr. č. 8) na sacharidovém substrátu v médiu je nejvýznamnější a nejprozkoumanější dráhou.

Sacharidový substrát v médiu je rozložen základními katabolickými drahami na acetyl-CoA, který je prvním krokem ze tří stupňové přeměny acetyl-CoA na P(3HB) [41, 47]. Acetoacetyl-CoA vznikne během biologické Claisenovy kondenzace, která je katalyzována biosyntetickým enzymem β -ketothiolázou. Kondenzace je mezi dvěma jednotkami acetyl-CoA, kdy se vytvoří vazba mezi jedním uhlíkem jedné a druhým uhlíkem druhé jednotky acetyl-CoA. V druhém kroku biosyntézy probíhá selektivní redukce acetoacetyl-CoA na (R)-3-hydroxybutyryl-CoA. Průběh toho kroku je katalyzován NADPH-dependentní acetoacetyl-CoA reduktázou. Poslední krok je katalyzován enzymem PHA syntázou, která spojuje nasyntetizované enantiomerní jednotky (R)-3-hydroxybutyryl-CoA za vzniku esterové vazby a vytváří tak rostoucí řetězec P(3HB) [29, 41, 47, 48, 58]. Popsané schéma je znázorněno na obr. č. 7.



Obr. č. 7: Syntéza P(3HB) pomocí enzymů [32].

Pětistupňová metabolická dráha je druhým typem biosyntézy PHA u fotosyntetizujících bakterií *Rhodospirillum rubrum* (*Rhodopseudomonas rubrum*). Odlišnost od výše zmíněné dráhy je až v druhém kroku, kdy acetoacetyl-CoA je nejprve za přítomnosti NADPH-dependentní acetoacetyl-CoA reduktázy redukován na (S)-3-hydroxybutyryl-CoA, který je následně pomocí dvou enoyl-CoA-hydratáz přeměněn na jedinou stereomerní formu substrátu vhodnou pro PHA syntázu, tedy na (R)-3-hydroxybutyryl-CoA [57].

Třetí dráha začíná aktivací mastných kyselin thioesterovou vazbou na koenzym A, aby daná sloučenina mohla vstoupit do β -oxidace mastných kyselin. Byla objevena u bakterií patřících k rodu *Pseudomonas* do rRNA homologické skupiny I. Do MCL PHA struktury jsou zabudovávány meziproducty z β -oxidace mastných kyselin. Zdrojem uhlíku pro polymer jsou tedy mastné kyseliny [41, 47]. V β -oxidaci je aktivovaná mastná kyselina převedena na *trans*-2-enoyl-CoA a (S)-3-hydroxyacyl-CoA na 3-ketoacyl-CoA. 3-ketoacyl-CoA je následně štěpen β -ketothiolázou na acetyl-CoA a na acyl-CoA [39, 47]. K úplnému rozkladu mastných kyselin na acetyl-CoA, případně propionyl-CoA v případě mastných kyselin s lichým počtem uhlíků, nedochází. β -oxidace běží jen do doby, kdy se objeví vhodné intermediáty pro syntézu PHA, které jsou okamžitě převedeny vhodným enzymovým vybavením mikroorganismu na (R)-3-hydroxyacyl-CoA. PHA syntetáza začlení (R)-3-hydroxyacyl-CoA do nově vznikajícího polymeru [49, 50].

Biosyntézu PHA čtvrtého typu využívají bakterie z rodu *Pseudomonas* patřící do rRNA homologické skupiny II. V anabolické dráze mastných kyselin (*de novo* syntéza mastných kyselin) jsou syntetizovány prekurzory kopolymerů MCL PHA. Prekurzory jsou syntetizovány z acetyl-CoA [29, 39].

U posledního typu biosyntézy PHA v bakteriálních buňkách je důležitá přítomnost metabolické dráhy mající jako výstupní produkt 4-hydroxyalkanové kyseliny, které jsou přímo přeměněny na odpovídající thioester koenzymu A za katalýzy CoA transferázou nebo thiokinázou [52].

2.3.2 Regulace biosyntézy P(3HB) na enzymatické úrovni

Regulace syntézy P(3HB) je ovlivněna intracelulární koncentrací acetyl-CoA a volného koenzymu A. Pokud má mikroorganismus při kultivaci dostatek dusíku, je acetyl-CoA metabolizován v citrátovém cyklu (TCA) a vznikající NADH je průběžně odbouráván. V málo bohatém médiu, tedy v médiu neobsahující dusík, dochází v průběhu kultivace ke zvyšování koncentrace NADH. Tato zvýšená koncentrace inhibuje enzymy v citrátovém cyklu (TCA), tudíž acetyl-CoA nemůže být odbouráván pomocí TCA a dochází tak k syntéze P(3HB) pomocí výše zmíněného metabolismu. Z acetyl-CoA (pocházejícího z TCA) se uvolní koenzym A, který inhibuje enzym 3-ketothiolázu [59]. Celá tato biosyntéza je vyobrazena na obr. č. 7.

2.3.3 Zdroje uhlíku

Jaký typ PHA mikroorganismus bude produkovat, závisí na spoustě okolností. Především na biochemické dráze mikroorganismu, na zdroji uhlíku a na substrátové specifitě PHA syntázy [56].

Při průmyslové výrobě je velmi důležitá cena zdroje uhlíku. Cukry, rostlinné oleje a škrob se nejčastěji používají jako obnovitelné zdroje rostlinného původu pro mikrobiální produkci

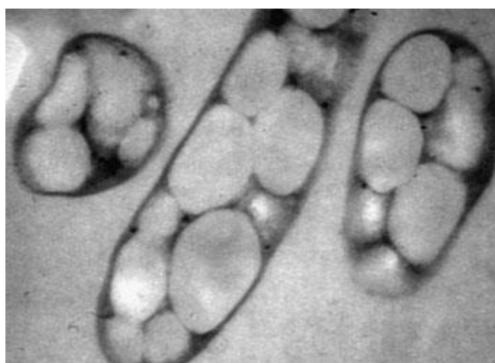
PHA. Různé druhy odpadních materiálů mohou být použity jako zdroj uhlíku. Také oxid uhličitý ze vzduchu je nepřímo využíván rostlinami jako zdroj uhlíku [53, 54, 55]. Při použití jednoduchého cukru jako zdroje uhlíku je na výrobu 1 kg PHA spotřeba 2,5 kg glukózy [56].

2.4 Vybraní bakteriální producenti PHA

2.4.1 *Cupriavidus necator* H16

Cupriavidus necator H16 (*Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes eutrophus* neboli *Wautersia eutropha*) je nejlépe prostudovanou bakterií pro produkci PHA v jednoduchém minerálním médiu. Optimální teplota pro růst je 30 °C [66].

Jedná se o gramnegativní, tyčinkovité, půdní, nesporulující bakterie s fakultativně anaerobním metabolismem. Má schopnost využívat H₂ jako donor elektronů. V nepřítomnosti kyslíku se organismus řadí mezi denitrifikační bakterie, které za anaerobních podmínek mohou jako konečný akceptor elektronů využívat dusičnany. Jako zdroj energie slouží celá řada organických látek. Pokud je kultivována na živiny bohatém médiu, převládá aerobní metabolismus [66, 67].



Obr. č. 8: Bakterie *Cupriavidus necator* H16 (*Ralstonia eutropha*) [64].

2.4.2 *Burkholderia cepacia*

Jedná se o gramnegativní bakterii. *Burkholderia cepacia* CCM 2656 je schopna využívat velké množství uhlíkových zdrojů a také umí produkovat především P(3HB) a P(3HV). Při specifických kultivačních podmínkách dokáže produkovat i kopolymer hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu P(3HB-co-3HV) [65].

2.4.3 *Burkholderia sacchari*

Burkholderia sacchari DSM 17165 je také gramnegativní bakterie. V případě, že zdrojem uhlíku je sacharóza, dokáže shromáždit PHB až do 68 % buněčné sušiny. Tato bakterie je také schopná včlenit 3HV do PHA [68].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité bakterie, chemikálie, materiál a přístroje

3.1.1 Použité bakteriální kmeny

V experimentální části práce byly použity bakteriální kultury *Burkholderia cepacia* CCM 2656, *Burkholderia sacchari* DSM 17165 a *Cupriavidus necator* H16 CCM 3726, které byly získány z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

3.1.2 Přístrojové vybavení

- plynový chromatograf Trace GC Ultra FID detector, Finnigan (USA);
kolona DB-WAX 30 m by 0,25 mm;
- iontový chromatograf Metrohm 850 Professional IC;
kolona Metrosep Organic Acids 250/7.8;
- průtokový cytometr Apogee A50, Apogee Flow Systems (GB);
- váhy Kern EW 620-3NM (DE);
- analytické váhy Boeco (DE);
- laminární box Aura mini, BioAir Instruments (USA);
- vortex TK3S, Kartell spa (USA);
- termostat LS-35 (ČR);
- centrifuga Hettich Zentrifugen (DE);
- mikrocentrifuga Sigma 1-14 (DE);
- temperovaná třepačka Heidolph Unimax 1010, Labicom s.r.o. (ČR);
- nanofotometr P-Class P 300 - Implen (UK);
- běžné laboratorní sklo a vybavení.

3.1.3 Použité chemikálie pro kultivaci mikroorganismů

Burkholderia cepacia: Nutrient Broth, Himedia (India);
Cupriavidus necator H16: Nutrient Broth, Himedia (India);
Burkholderia sacchari: Yeast Extract;
Proteose Peptone;
Casamino Acids;
Glucose;
Soluble Starch;
Na-pyruvate;
K₂HPO₄.

3.1.4 Ostatní chemikálie

- Propidium jodid (eBioscience);

Všechny ostatní chemikálie byly čistoty p.a. a vyšší.

3.2 Kultivace bakterií

3.2.1 Příprava inokula

Pro kultivaci inokula *Cupriavidus necator* H16, *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari* bylo připraveno tekuté živné médium. Inokulum bylo připraveno do 100 ml

Erlenmeyerových baněk v objemu 50 ml tekutého živného média. Připravená média byla sterilována v tlakovém hrnci s uzavřeným ventilem po dobu 60 minut.

Po vysterilování a ochlazení na pokojovou teplotu byla ve sterilním laminárním boxu do Erlenmeyerových baněk z disku očkována bakterie *Cupriavidus necator* H16 a z agarové plotny byla pomocí bakteriologické kličky očkována *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari*. Připravená inokula byla kultivována 24 hodin při 30 °C na třepačce při 170 rpm.

3.2.2 Živné média

Pro přípravu inokula bakterie *Burkholderia cepacia* a *Cupriavidus necator* H16 bylo použito komerčně dostupné tekuté živné médium Nutrient Broth o složení:

Látka	Množství
Beef extrakt	10 g
Pepton	10 g
NaCl	5 g
Agar	2 g
Destilovaná voda	1 000 ml

Pro přípravu inokula bakterie *Burkholderia sacchari* bylo použito tekuté živné médium o složení:

Látka	Množství
Yeast Extract	0,5 g
Proteose Peptone	0,5 g
Casamino Acids	0,5 g
Glukóza	10 g
Škrob	0,5 g
Pyruvát sodný	0,3 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,05 g
Destilovaná voda	1 000 ml

3.2.3 Zaočkování bakterií za účelem produkce PHA

Za účelem produkce polyhydroxyalkanoátů (PHA) bylo připravené inokula přeočkováno do připravených minerálních medií. Do Erlenmeyerových baněk o objemu 250 ml bylo připraveno 100 ml daného media.

Složení produkčního minerálního media pro *Cupriavidus necator* H16:

Látka	Množství
(NH ₄) ₂ SO ₄	3 g
KH ₂ PO ₄	1,02 g
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	11,1 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2 g
Roztok stopových prvků	1 ml
Substrát	20 g
Destilovaná voda	1 000 ml

Byly předem připraveny roztoky substrátů glukózy, fruktózy a glycerolu o koncentraci 20 g/l. Připravené substráty byly sterilovány v tlakových hrncích po dobu 60 minut. Sterilizace probíhala v tlakovém hrnci s otevřeným kohoutem. Po vysterilování a vychlazení všech roztoků a médií bylo v laminárním boxu napipetováno do minerálního média 5 ml substrátu, 100 µl roztoku MES a 5 ml inokula *Cupriavidus necator* H16. Připravené kultury byly po dobu 48 hodin kultivovány na třepačce při 30 °C.

Složení produkčního minerálního média pro *Burkholderia cepaciae* a *Burkholderia sacchari*:

Látka	Množství
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,75 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	9,082 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,1 g
NH ₄ -Fe(III) citrát	0,06 g
Roztok stopových prvků	1 ml
Destilovaná voda	1 000 ml

Byly připraveny roztoky jednotlivých substrátů o koncentraci 20 g/l. Jako substrát byly použity roztoky glukózy, galaktózy, manózy a xylózy. Připravené substráty byly sterilovány v tlakových hrncích po dobu 60 minut. Sterilizace probíhala v tlakovém hrnci s otevřeným kohoutem.

Po vysterilování a vychlazení všech roztoků a médií bylo v laminárním boxu napipetováno do minerálního média 5 ml substrátu, 100 µl roztoku TES a 5 ml inokula *Burkholderia cepaciae*. Stejný postup byl použit u bakterie *Burkholderia sacchari*. Připravené kultury byly po dobu 48 hodin kultivovány na třepačce při 30 °C.

3.3 Stanovení biomasy

Obsah biomasy byl stanoven spektrofotometrickou metodou, která je založena na principu měření zákalu. Kultura ve zkumavce byla šedesátkrát naředěna přidáním 2 950 µl destilované vody a 50 µl vzorku. Následně byla změřena absorbance při vlnové délce 630 nm. Destilovaná voda byla použita jako blank.

Dosazením absorbance do regresní přímky z předem stanovené kalibrační křivky byl vypočten obsah biomasy v g/l.

3.4 Stanovení obsahu PHA v biomase

Současně se stanovováním biomasy byl stanovován obsah polyhydroxyalkanoátů. Pro stanovení bylo použito 10 ml suspenze buněk. Suspenze byla centrifugována při 8 000 rpm po dobu 5 min, supernatant byl slit a uschován pro další analýzu v mrazáku (viz kapitola 3.6). Biomasa byla rozsuspendována v 10 ml destilované vody a následně byla stočena při 8 000 rpm po dobu 5 minut. Supernatant byl opět slit a biomasa byla rozsuspendována a převedena do zkumavek typu Eppendorf, ve kterých byla opět stočena (10 000 rpm po dobu 5 minut). Supernatant byl slit a biomasa byla vysušena do konstantní hmotnosti v termostatu.

Pro stanovení PHA bylo nutné je převést na methylestery pomocí kyselí katalyzované esterifikace. Do vialek bylo s přesností na 0,1 mg naváženo 10 mg vysušené biomasy. K navážce byl přidán 1 ml chloroformu a 0,8 ml 15% kyseliny sírové v methanolu. Vialky byly posléze zazátkovány a ponechány v termostatu po dobu 3 hod při teplotě 94 °C. Jakmile proběhla esterifikace, byly směsi extrahovány v 1 ml 0,05 mol/dm³ roztoku NaOH a pro analýzu bylo odebráno 50 µl chloroformové fáze. Ke každému vzorku bylo přidáno 950 µl chloroformu.

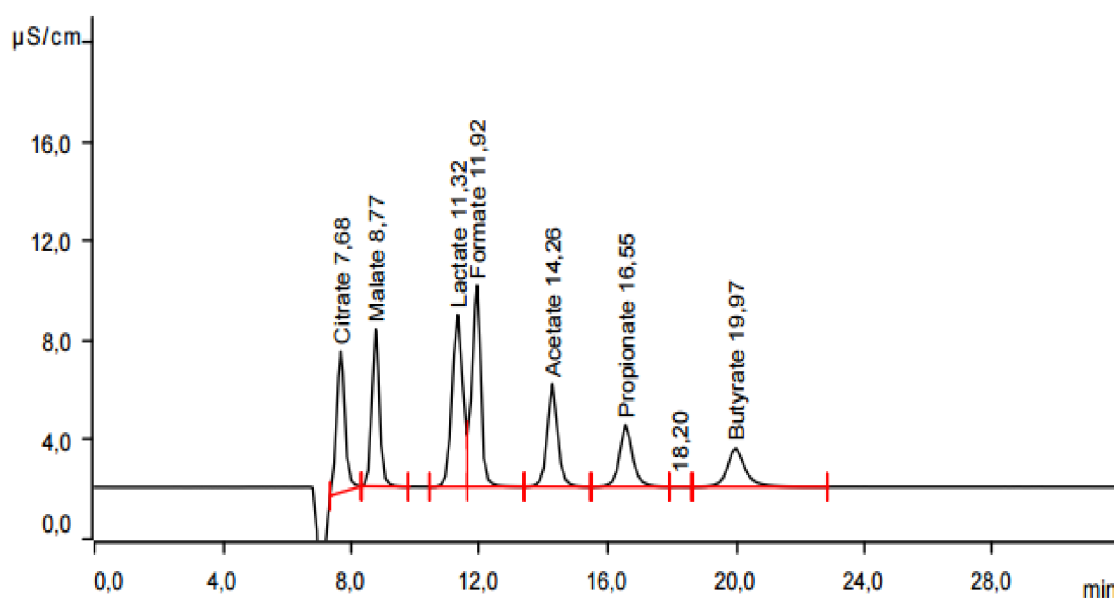
Pro analýzu připravených vzorků a proměření kalibračních roztoků byl použit plynový chromatograf s FID (plamenovým ionizačním) detektorem.

3.4.1 Stanovení kalibrační přímky

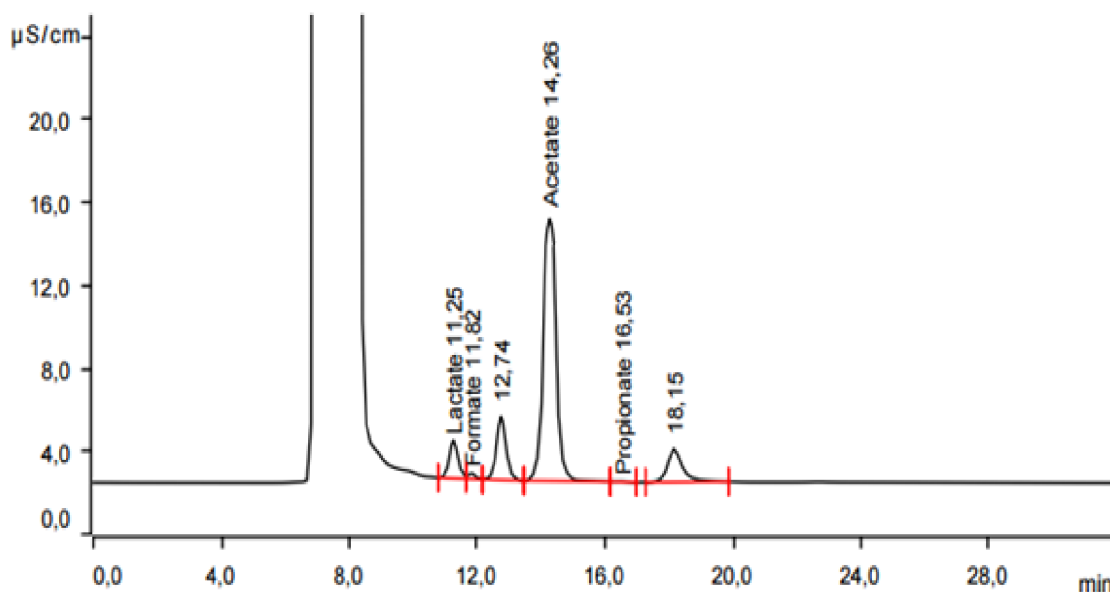
Standards pro kalibrační přímku byly zhotoveny ze zásobního roztoku, který obsahoval 48,9 mg PHB a 4 ml chloroformu. Takto připravené roztoky byly po dobu 20 minut při 70 °C v termostatu. Standardy byly v koncentracích 0,05; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1 mg/ml pipetovány do vialek a doplněny na 1 ml chloroformem. K roztokům bylo přidáno 0,8 ml 15% kyseliny sírové v methanolu a uzavřené vialky byly umístěny do termostatu po dobu 3 hod při teplotě 94 °C. Po esterifikaci byly směsi extrahovány v 1 ml 0,05 mol/dm³ roztoku NaOH. Pro analýzu bylo odebráno 50 µl chloroformové fáze do nové vialky a 950 µl chloroformu. Jednotlivé standardy byly analyzovány na plynovém chromatografu s FID detektorem.

3.5 Stanovení koncentrace organických kyselin

V získaných supernatantech byla stanovena koncentrace organických kyselin. Supernatanty byly ve zkumavce dvakrát zředěny přidáním 5 ml destilované vody k 5 ml vzorku. Vzorky byly analyzovány pomocí iontové chromatografie s vodivostním detektorem.



Graf č. 1: Chromatogram IC standardu organických kyselin.



Graf č. 2: Typový chromatogram IC vzorku organických kyselin.

3.6 Stanovení koncentrace redukujících sacharidů

V získaných supernatantech byly stanovené koncentrace jednotlivých sacharidů. Jako činidlo byla použita kyselina 3,5-dinitrosalicylová. Do zkumavky bylo pipetováno 0,1 ml vzorku supernatantu, poté bylo přidáno 0,4 ml destilované vody a 0,5 ml činidla (1 g kyseliny 3,5-dinitrosalicylové, 20 ml hydroxidu sodného o koncentraci 2 mol/dm³, 50 ml vody, 30 g vinanu sodnodraselného). Zkumavky byly následně umístěny po dobu 10 minut do vodní lázně, která byla temperována na teplotu 70 °C. Po vychlazení bylo ke vzorkům přidáno 10 ml destilované vody. Poté byla pomocí spektrofotometru změřena absorbance při vlnové délce 540 nm. Jako blank byla použita směs destilované vody s činidlem v poměru 1:1. Jednotlivé koncentrace substrátů byly vypočteny pomocí kalibračních křivek.

3.7 Porovnání produkce PHA a organických kyselin u různých druhů bakterií

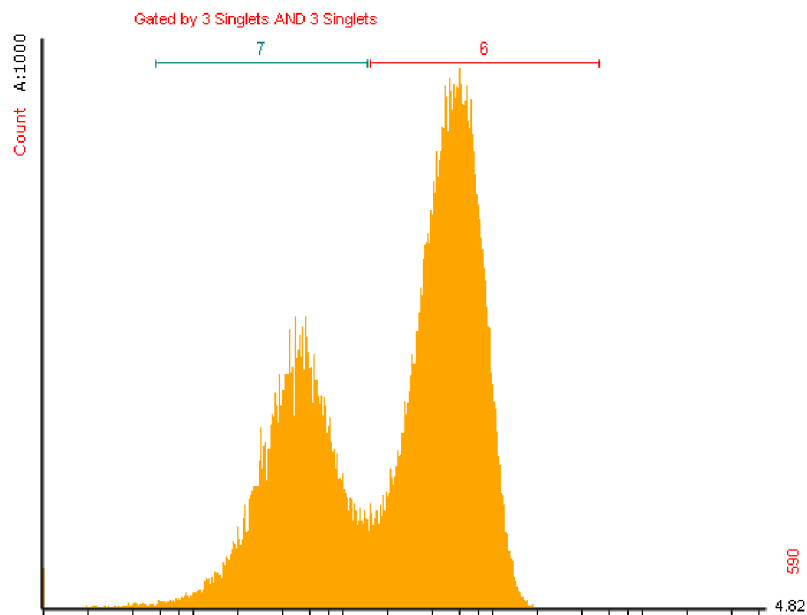
V tomto experimentu byli porovnáváni tři různí producenti PHA a kyseliny octové - *Cupriavidus necator* H16, *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari*. Bakteriální druhy byly porovnávány po 48 hod růstu na produkčním médiu. Porovnáván byl obsah biomasy, obsah PHA v biomase (viz kapitola 3.4), koncentrace kyseliny octové a kyseliny mléčné (viz kapitola 3.5).

3.8 Stanovení viability po působení stresových faktorů

Ke stanovení viability buněk na průtokovém cytometru bylo použito fluorescenční barvivo a propidium jodid. Živé buňky s neporušenou membránou jsou schopné vyloučit barvivo, které snadno proniká do buněk s porušenou membránou, tedy do mrtvých buněk. V mrtvých buňkách se propidium jodid interkaluje do DNA.

Pro posouzení vlivu schopnosti hromadit PHA na odolnost vůči stresovým faktorům byly porovnávány kmeny *Cupriavidus necator* H16, *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari*.

Procentuální hodnoty viability byly odečítány z histogramů. Ukázkový histogram znázorňuje graf č. 3.



Graf č. 3: Typový histogram vzorku stanovovaný pomocí metody průtoková cytometrie.

3.8.1 Stresový faktor – kyselina octová a kyselina mléčná

Z kultur *Cupriavidus necator* H16, *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari* v minerálním médiu bylo odpipetováno do zkumavek typu Eppendorf vždy 1 ml vzorku. Roztoky byly centrifugovány 5 minut při 10 000 rpm. Supernatant byl slit a buňky v první zkumavce byly rozsuspendovány v 1 ml PBS pufru, v druhé zkumavce byly rozsuspendovány v 1 ml kyseliny octové o koncentraci 0,1 g/l, ve třetí zkumavce byla rozsuspendace provedena v 1 ml kyseliny octové o koncentraci 1 g/l přidáno a v poslední zkumavce byly buňky rozsuspendovány v 1 ml kyseliny octové o koncentraci 10 g/l. Následně byly buňky v tomto prostředí ponechány 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby expozice byly buňky centrifugovány při 10 000 rpm po dobu 5 minut. Supernatanty byly slity a k jednotlivým vzorkům bylo přidáno 1 ml PBS pufru.

Složení PBS pufru:

Látka	Množství
NaCl	0,8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Destilovaná voda	1 000 ml

Po rozsuspendování byly všechny vzorky 100 krát zředěny do nových zkumavek a to na celkový objem 1 ml (10 µl vzorku + 990 µl PBS pufru). Do zředěných vzorků bylo přidáno 5 µl roztoku propidium jodidu (koncentrace 1 mg/ml). Po přidání propidium jodidu byly vzorky inkubovány 10 minut v temnu. Viabilita buněk v jednotlivých vzorcích byla po protřepání a uplynutí 10 min, změřena na průtokovém cytometru.

Stejný experiment byl proveden s kyselinou mléčnou. Byl použit a dodržen stejný postup jako u stanovení viability s kyselinou octovou.

4 VÝLEDKY A DISKUZE

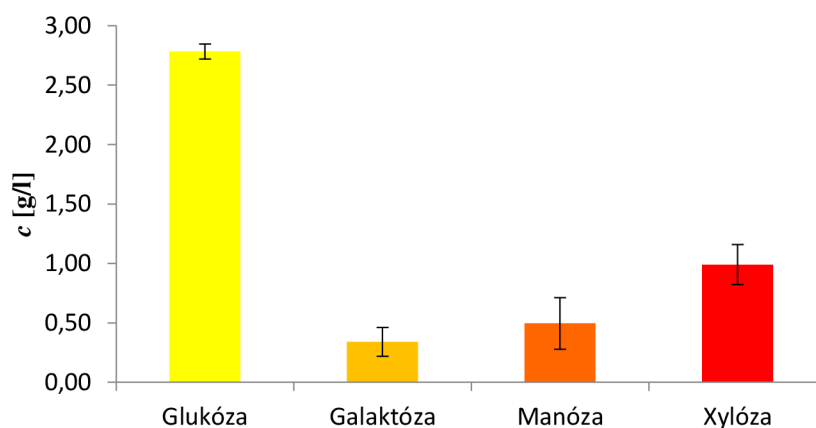
4.1 Kalibrace metod

4.1.1 Spektrofotometrické a gravimetrické stanovení koncentrace biomasy

Kalibrační přímka zákalu a množství suché biomasy byla stanovena pomocí spektrofotometrického měření zákalu suspenze buněk při vlnové délce 630 nm. Kalibrační řada byla sestavena přesným ředěním kultury o známé koncentraci biomasy. Počáteční hmotnost sušiny byla stanovena ve třech paralelních měřeních.

Tab. č. 3: Gravimetrické stanovení koncentrace sušiny biomasy u bakterie *Burkholderia cepacia* kultivované na různých cukerných substrátech.

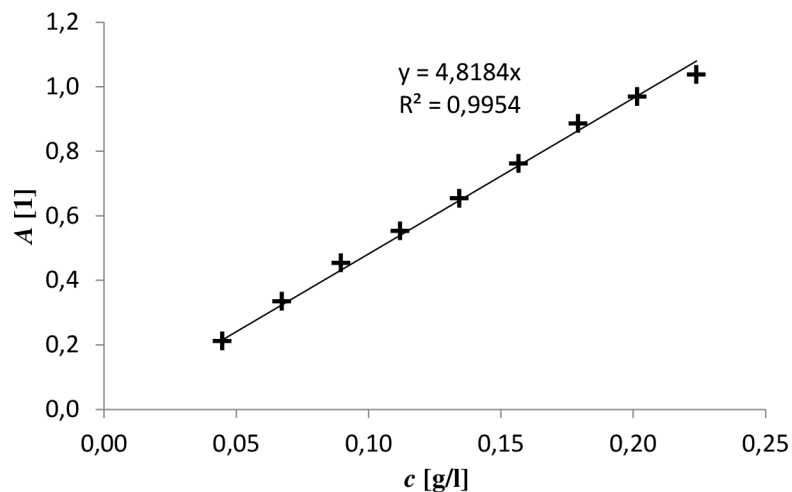
Substrát	Hmotnost [g]	Koncentrace sušiny biomasy [g/l]
Glukóza	0,0269 ± 0,0011	2,69 ± 0,11
Galaktóza	0,0034 ± 0,0012	0,34 ± 0,12
Manóza	0,0050 ± 0,0022	0,50 ± 0,22
Xylóza	0,0099 ± 0,0017	0,99 ± 0,17



Graf č. 4: Množství biomasy v sušině u bakterie *Burkholderia cepacia*.

Tab. č. 4: Závislost absorpance na koncentraci biomasy u bakterie *Burkholderia cepacia*.

Koncentrace biomasy [g/l]	A ₆₃₀ [1]
0,224	1,038
0,202	0,969
0,179	0,886
0,157	0,762
0,134	0,654
0,112	0,553
0,070	0,453
0,067	0,334
0,045	0,212

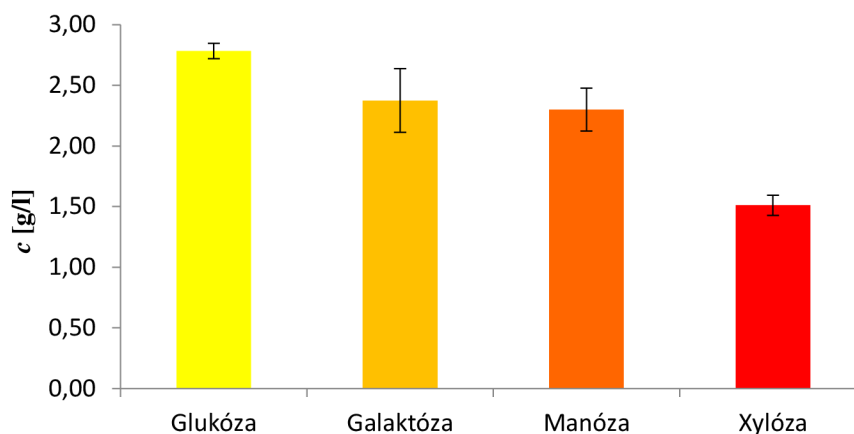


Graf č. 5: Kalibrační závislost absorbance na koncentraci u bakterie *Burkholderia cepacia*.

Z grafické závislosti absorbance na koncentraci biomasy bakterie *Burkholderia cepacia* byla sestavena kalibrační závislost $y = 4,8184x$. Regresní koeficient je $R^2 = 0,9954$.

Tab. č. 5: Gravimetrické stanovení koncentrace sušiny biomasy u bakterie *Burkholderia sacchari* kultivované na různých cukerných substrátech.

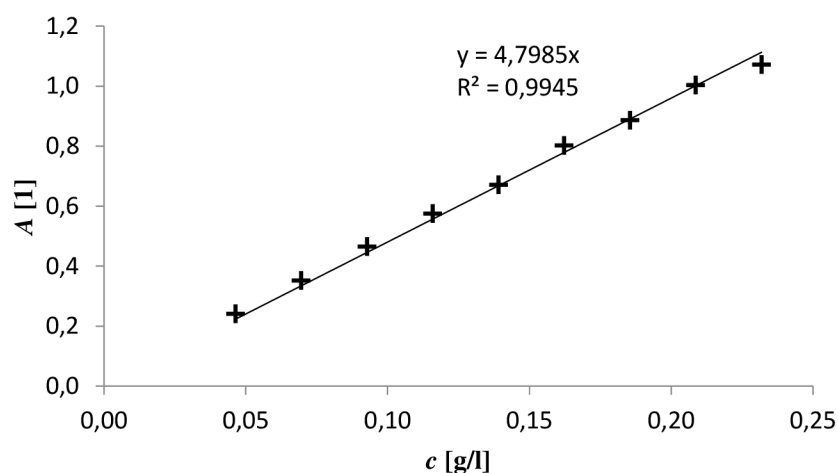
Substrát	Hmotnost [g]	Koncentrace sušiny biomasy [g/l]
Glukóza	$0,0278 \pm 0,0006$	$2,78 \pm 0,06$
Galaktóza	$0,0238 \pm 0,0026$	$2,38 \pm 0,26$
Manóza	$0,0230 \pm 0,0018$	$2,30 \pm 0,18$
Xylóza	$0,0151 \pm 0,0008$	$1,51 \pm 0,08$



Graf č. 6: Množství biomasy v sušině u bakterie *Burkholderia sacchari*

Tab. č. 6: Závislost absorbance na koncentraci biomasy u bakterie *Burkholderia sacchari*.

Koncentrace biomasy [g/l]	A ₆₃₀ [1]
0,232	1,071
0,209	1,003
0,186	0,886
0,162	0,802
0,139	0,671
0,116	0,575
0,093	0,465
0,070	0,352
0,046	0,241

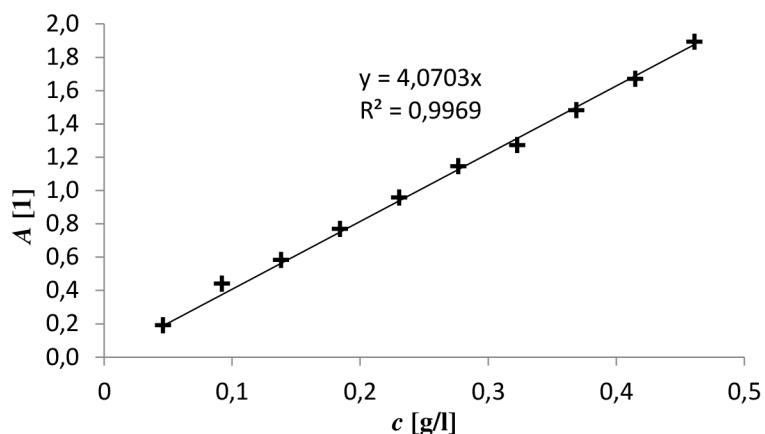


Graf č. 7: Závislost absorbance na koncentraci u bakterie *Burkholderia sacchari*.

Z grafické závislosti absorbance na koncentraci biomasy bakterie *Burkholderia sacchari* byla sestavena kalibrační závislost $y = 4,7985x$. Regresní koeficient je $R^2 = 0,9945$.

Tab. č. 7: Gravimetrické stanovení koncentrace sušiny biomasy u bakterie *Cupriavidus necator H16* kultivované na různých cukerných substrátech.

Substrát	Hmotnost [g]	Koncentrace sušiny biomasy [g/l]
Fritovací olej	0,0244 ± 0,0011	2,44 ± 0,11
Fruktóza	0,0194 ± 0,0009	1,93 ± 0,09
Glycerol	0,0122 ± 0,0006	1,22 ± 0,06



Graf č. 8: Závislost absorbance na koncentraci u bakterie *Cupriavidus necator* H16 [69].

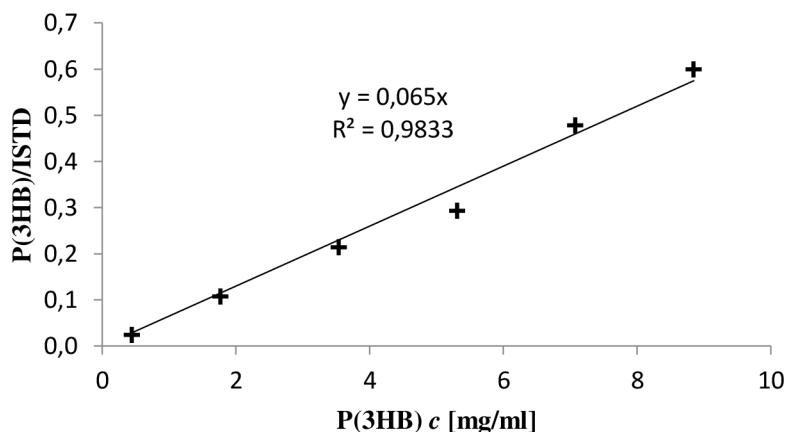
Pro grafickou závislost absorbance na koncentraci biomasy bakterie *Cupriavidus necator* H16 byla tato data získána z odborné práce, která byla taktéž uskutečněna na školícím pracovišti Fakulty chemické VUT v Brně. Na základě těchto dat byla sestavena kalibrační závislost $y = 4,0703x$. Regresní koeficient je $R^2 = 0,9969$ [69].

4.1.2 Stanovení PHA plynovou chromatografií s FID detektorem

Kalibrační přímky pro stanovení koncentrace P(3HB) byly sestrojeny ředěním roztoku standardů o známé koncentraci a následně analyzovány na plynové chromatografii s FID detektorem.

Tab. č. 8: Závislost plochy píku chromatogramu na koncentraci P(3HB).

Koncentrace P(3HB) [mg/l]	P(3HB)/ISTD [1]
0,442	0,023 8
1,769	0,107 1
3,538	0,213 7
5,306	0,292 8
7,075	0,478 1
8,844	0,599 7



Graf č. 9: Kalibrační závislost poměru plochy píku na koncentraci P(3HB).

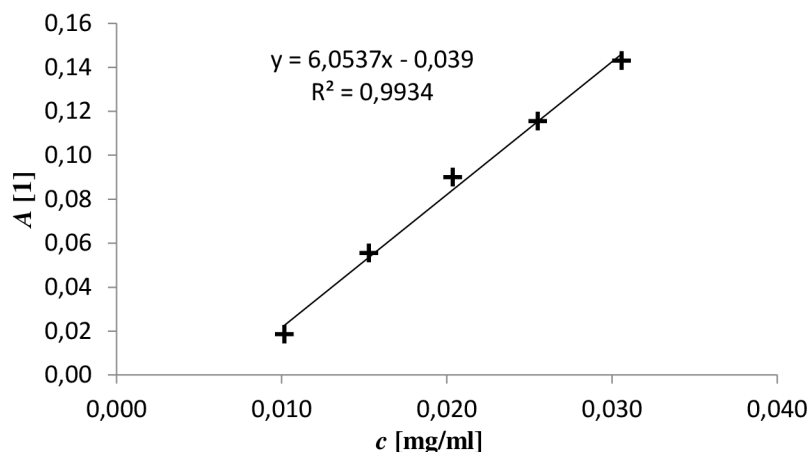
Ze závislosti koncentrace P(3HB) na ploše píku byla sestrojena rovnice kalibrační přímky $y = 0,065x$. Regresní koeficient je $R^2 = 0,9833$.

4.1.3 Stanovení redukujících sacharidů pomocí DNS metody

Kalibrační řady pro stanovení jednotlivých sacharidů byly připraveny ředěním roztoků jednotlivých sacharidů o známé koncentraci. Po reakci s DNS činidlem a po vhodném zředění byla změřena jejich absorbance při vlnové délce 540 nm.

Tab. č. 9: Závislost absorbance na koncentraci glukózy.

Koncentrace glukózy [g/l]	A ₅₄₀ [1]
0,010	0,019
0,015	0,056
0,020	0,090
0,026	0,116
0,031	0,143

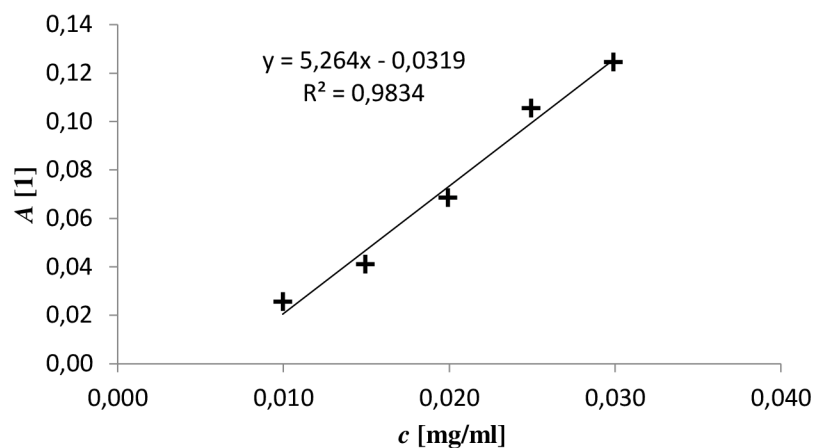


Graf č. 10: Závislost absorbance na koncentraci glukózy.

Ze závislosti absorbance na koncentraci glukózy byla stanovena rovnice kalibrační přímky $y = 6,0537x - 0,039$. Regresní koeficient je $R^2 = 0,9934$.

Tab. č. 10: Závislost absorbance na koncentraci galaktózy.

Koncentrace galaktózy [g/l]	A ₅₄₀ [1]
0,010	0,019
0,015	0,056
0,020	0,090
0,026	0,116
0,031	0,143

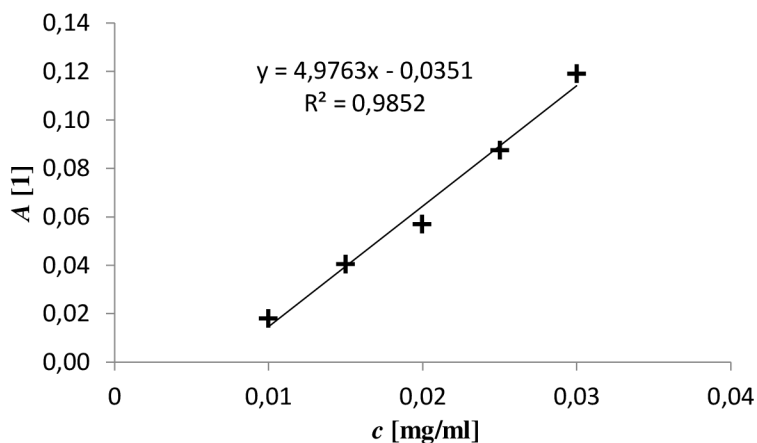


Graf č. 11: Závislost absorbance na koncentraci galaktózy.

Ze závislosti absorbance na koncentraci galaktózy byla stanovena rovnice kalibrační přímky $y = 5,264x - 0,0319$. Regresní koeficient je $R^2 = 0,9834$.

Tab. č. 11: Závislost absorbance na koncentraci manózy.

Koncentrace manózy [g/l]	A_{540} [1]
0,010	0,019
0,015	0,056
0,020	0,090
0,026	0,116
0,031	0,143

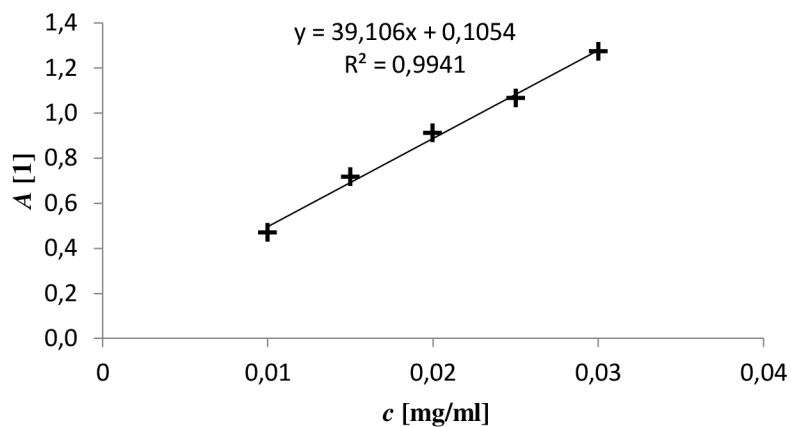


Graf č. 12: Závislost absorbance na koncentraci manózy.

Ze závislosti absorbance na koncentraci manózy byla stanovena rovnice kalibrační přímky $y = 4,9763x - 0,0351$. Regresní koeficient je $R^2 = 0,9852$.

Tab. č. 12: Závislost absorbance na koncentraci xylózy.

Koncentrace xylózy [g/l]	A ₅₄₀ [1]
0,010	0,470
0,015	0,717
0,020	0,911
0,025	1,066
0,031	1,274

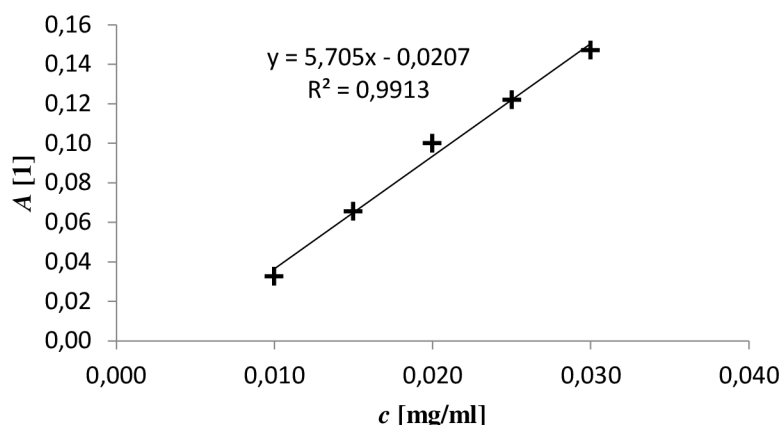


Graf č. 13: Závislost absorbance na koncentraci xylózy.

Ze závislosti absorbance na koncentraci xylózy byla stanovena rovnice kalibrační přímky $y = 39,106x + 0,1054$. Regresní koeficient je $R^2 = 0,9941$.

Tab. č. 13: Závislost absorbance na koncentraci fruktózy.

Koncentrace fruktózy [g/l]	A ₅₄₀ [1]
0,010	0,033
0,015	0,066
0,020	0,100
0,025	0,122
0,030	0,147



Graf č. 14: Závislost absorbance na koncentraci fruktózy

Ze závislosti absorbance na koncentraci fruktózy byla stanovena rovnice kalibrační přímky $y = 5,705x - 0,0207$. Regresní koeficient je $R^2 = 0,9913$.

4.2 Studium produkce biomasy, podílu P(3HB) a koncentrace organických kyselin z vybraných substrátů

U bakterií *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari* bylo sledováno ovlivnění produkce biomasy a podíl PHA v sušině při kultivaci na jednotlivých substrátech. Použitým substrátem byla glukóza, manóza, galaktóza a xylóza. U *Cupriavidus necator* H16 byla také sledována produkce biomasy a podíl PHA v sušině, ale byly přidávány jiné substráty, a to konkrétně glycerol, fritovací olej a fruktóza. Po 48 hodinách byla kultivace ukončena a následně byla v jednotlivých vzorcích stanovena biomasa, obsah PHA v biomase, koncentrace organických kyselin v médiu a také koncentrace zbytkového substrátu. Výsledky těchto experimentů jsou prezentovány v tabulkách č. 14, 15 a 16.

Tab. č. 14: Stanovení biomasy, PHA, koncentrace organických kyselin a koncentrace substrátu u *Burkholderia cepacia*.

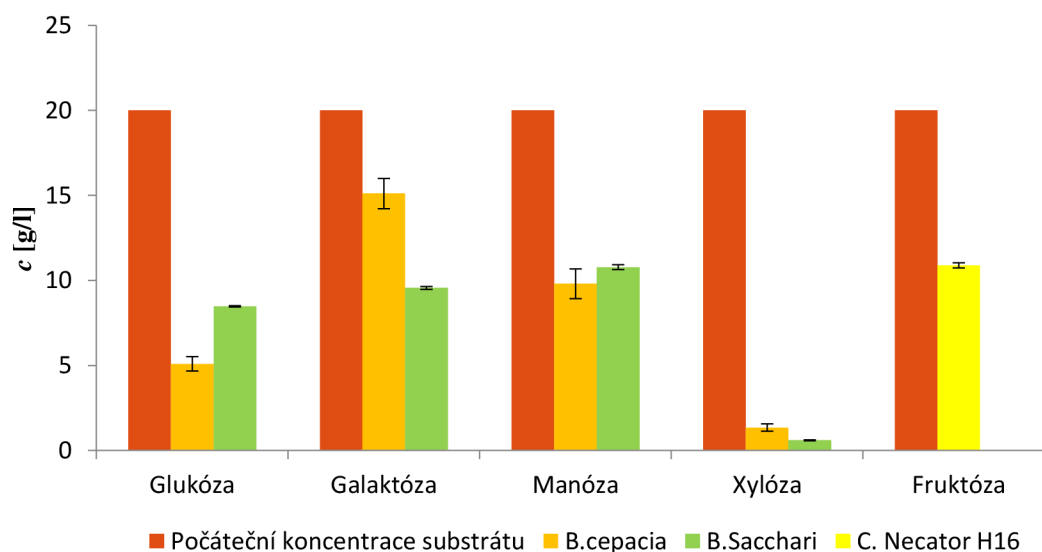
Substrát	Koncentrace biomasy [g/l]	Koncentrace PHA [g/l]	Koncentrace PHA v sušině [%]	Koncentrace kys. octové [mg/l]	Koncentrace kys. mléčné [mg/l]	Koncentrace zbylého substrátu [g/l]
Glukóza	2,69 ± 0,11	1,58 ± 0,06	58,70	17,46 ± 0,15	1,76 ± 0,16	5,09 ± 0,42
Galaktóza	0,34 ± 0,12	0	0	0,25 ± 0,26	12,84 ± 0,40	15,11 ± 0,89
Manóza	0,50 ± 0,22	0	0	4,61 ± 0,35	5,21 ± 0,90	9,80 ± 0,87
Xylóza	0,17 ± 0,99	0,07 ± 0,01	6,71	0,15 ± 0,09	0	1,35 ± 0,22

Tab. č. 15: Stanovení biomasy, PHA, koncentrace organických kyselin a koncentrace substrátu u *Burkholderia sacchari*.

Substrát	Koncentrace biomasy [g/l]	Koncentrace PHA [g/l]	Koncentrace PHA v sušině [%]	Koncentrace kys. octové [mg/l]	Koncentrace kys. mléčné [mg/l]	Koncentrace zbylého substrátu [g/l]
Glukóza	2,78 ± 0,06	1,96 ± 0,04	70,29	50,11 ± 0,95	302,58 ± 5,68	8,48 ± 0,04
Galaktóza	2,38 ± 0,26	1,22 ± 0,13	51,42	4,54 ± 0,35	330,22 ± 2,97	9,56 ± 0,09
Manóza	2,30 ± 0,18	1,23 ± 0,10	53,42	2,85 ± 0,25	48,47 ± 2,10	10,77 ± 0,14
Xylóza	1,51 ± 0,99	0,35 ± 0,02	21,67	24,60 ± 0,67	0	0,61 ± 0,03

Tab. č. 16: Stanovení biomasy, PHA a koncentrace substrátu u *Cupriavidus necator* H16.

Substrát	Koncentrace biomasy [g/l]	Koncentrace PHA [g/l]	Koncentrace PHA v sušině [%]	Koncentrace zbylého substrátu [g/l]
Fritovací olej	2,44 ± 0,11	2,07 ± 0,09	84,90	–
Fruktóza	1,93 ± 0,09	1,49 ± 0,07	51,42	10,88 ± 0,15
Glycerol	1,22 ± 0,06	0,70 ± 0,03	53,42	–



Graf č. 15: Znárodnění počátečního množství substrátu a využitého množství substrátu u bakterie *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia sacchari* a *Cupriavidus necator* H16.

Koncentrace biomasy byly velmi odlišné v závislosti na použitém substrátu. Výraznější rozdíl v koncentracích biomasy byl zaznamenán u *Burkholderia cepacia*. Glukóza se ukázala jako nejvýhodnější substrát pro tvorbu biomasy. U ostatních použitých zdrojů uhlíku byla produkce biomasy takřka nulová. Pro bakterii *Cupriavidus necator* H16 byl zaznamenán nejvyšší nárůst biomasy s použitím fruktózy jako substrátu. U *Burkholderia sacchari* bylo dosaženo nejvyšší produkce biomasy při použití glukózy jako zdroje uhlíku. Trochu nižšího obsahu biomasy bylo dosaženo při použití epimerů glukózy, konkrétně galaktózy a manózy.

Při použití substrátu xylózy byla produkce biomasy výrazně nižší, než při použití výše zmíněných substrátů.

Nejvyšší obsah P(3HB) byl pozorován u bakterie *Cupriavidus necator* H16 a to při kultivaci na odpadním fritovacím oleji, kdy polymer představoval téměř 85 % suché váhy biomasy. Při kultivaci na fruktóze i glycerolu byl obsah P(3HB) nižší a to cca 50 %. Zajímavé je, že u bakterie *Burkholderia cepacia* došlo k významné akumulaci polymeru jen při kultivaci na glukóze (obsah P(3HB) v biomase byl 58,70 %), při kultivaci na ostatních cukerných substrátech nebylo P(3HB) v biomase detekováno nebo se nacházelo jen ve velice malém množství. Naopak velice perspektivním producentem P(3HB) se zdá být *Burkholderia sacchari*, u které bylo při kultivaci na glukóze dosaženo obsahu P(3HB) v biomase téměř 70,29 %. Solidních výtěžků bylo dosaženo i na galaktóze a manóze a také obsah polymeru v biomase kultivované na xylóze nebyl zanedbatelný.

Koncentrace organických kyselin byla stanovena pomocí iontové chromatografie. Nejvyšší obsah kyseliny octové a kyseliny mléčné byl zjištěn u *Burkholderia sacchari* při kultivaci na glukóze. Naopak u *Cupriavidus necator* H16 nebyla zaznamenána žádná produkce organických kyselin. Z toho vyplývá, že pravděpodobně u této bakterie nedochází k exkreci acetátu a vzniklý acetyl-CoA využije převážně na syntézu P(3HB). Možná i díky této metabolické skutečnosti je *Cupriavidus necator* H16 považována za nejproduktivnější bakterii pro průmyslovou biotechnologickou produkci PHA.

Zajímavá je skutečnost, že u *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari* byl v kultivačním médiu detekován také laktát. Ten primárně vzniká anaerobně redukcí pyruvátu. Přítomnost laktátu tedy může indikovat parciální limitaci bakteriální kultury kyslíkem, což by při kultivaci v Erlenmeyerových baňkách nebylo překvapivé. Alternativně se také může jednat o laktát, který vzniká při metabolizaci některých aminokyselin, například alaninu.

Celkově je nutné konstatovat, že obsahy organických kyselin v kultivačních médiích byly spíše nízké. V předchozí práci [70] byly při kultivaci na hydrolyzátu kukuřičné biomasy detekovány koncentrace kyseliny octové v g/l. V našem případě bylo dosaženo nejvyšších koncentrací acetátu v desítkách miligramů na litr kultivačního média. Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben odlišným kultivačním médiem. Není vyloučené, že v případě kultivace na hydrolyzátu kukuřičné biomasy část acetátu vznikla již při přípravě hydrolyzátu deacetylací hemicelulózy.

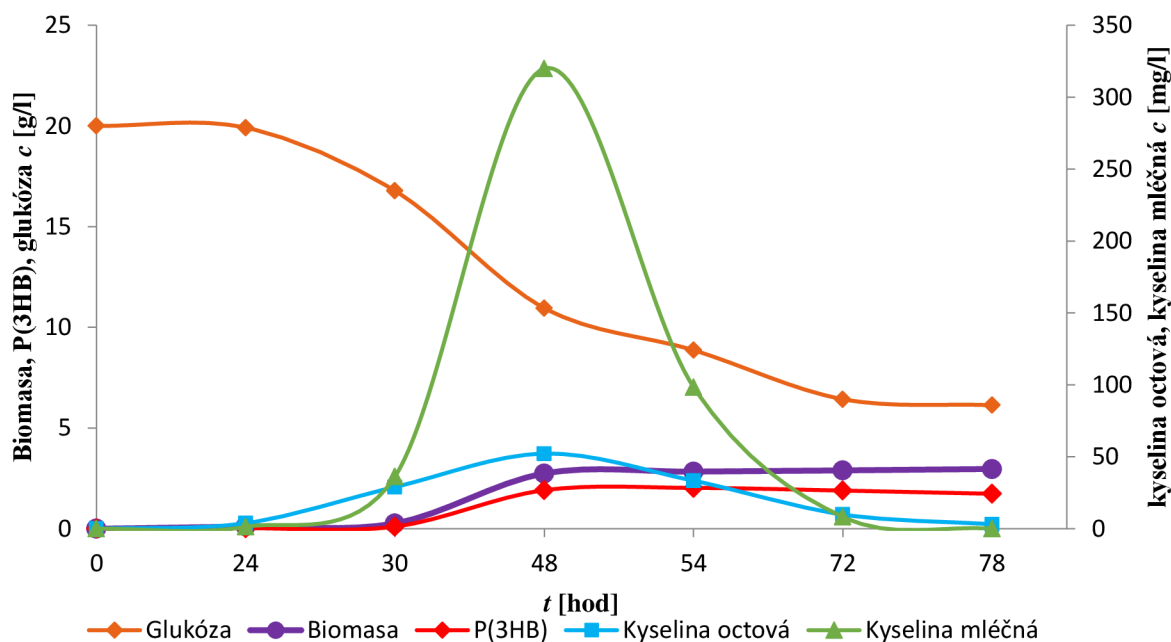
4.3 Růstové charakteristiky u bakterie *Burkholderia sacchari*

Cílem tohoto experimentu bylo stanovit koncentraci kyseliny octové a kyseliny mléčné, obsah biomasy a P(3HB) v jednotlivých fázích růstové křivky u bakterie *Burkholderia sacchari* (která byla identifikována jako slibný producent P(3HB) a zároveň u ní byla detekována schopnost exkrece acetátu a laktátu). Pro experiment byla vybrána jako substrát glukóza, která se ukázala být nejvhodnějším substrátem pro tuto bakterii.

Koncentrace kyseliny octové byla zjišťována kvůli nalezení přechodu mezi fází rychlého růstu (disimilace), kdy bakterie produkují a vylučují acetát, až do programu pomalého růstu (asimilace), kdy dochází k importu a utilizaci kyseliny octové jak je uvedeno v kapitole 2.1.3. Při experimentu bylo rovněž zjištěno, jak koncentrace kyseliny octové ovlivňuje růst a produkci P(3HB).

Tab. č. 17: Obsah P(3HB) v biomase, koncentrace substrátu, koncentrace kyseliny mléčné a kyseliny octové v různých časech kultivace při použití glukózy jako substrátu.

Čas [hod]	Koncentrace biomasa [g/l]	Koncentrace P(3HB) [g/l]	Koncentrace P(3HB) [%]	Koncentrace kys. octová [mg/l]	Koncentrace kys. mléčná [mg/l]	Koncentrace glukóza [g/l]
0	0	0	0	0	0	20,00
24	0,11 ± 0,07	0,03 ± 0,02	22,85	3,87 ± 0,16	1,36 ± 0,23	19,50 ± 0,58
30	0,27 ± 0,14	0,11 ± 0,06	39,93	29,03 ± 3,13	36,34 ± 0,40	16,75 ± 0,04
48	2,75 ± 0,03	1,91 ± 0,02	69,75	52,22 ± 0,48	319,85 ± 10,15	10,02 ± 1,32
54	2,84 ± 0,02	2,03 ± 0,01	71,49	33,38 ± 8,74	98,48 ± 5,96	8,61 ± 0,37
72	2,90 ± 0,05	1,89 ± 0,04	65,39	9,90 ± 2,04	8,27 ± 2,04	6,66 ± 0,32
78	2,97 ± 0,05	1,74 ± 0,03	58,47	3,09 ± 0,55	0	6,00 ± 0,19



Graf č. 16: Růstové charakteristiky bakterie *Burkholderia sacchari* kultivované na glukóze.

Z naměřených hodnot pro koncentraci biomasy v médiu vyplývá, že probíhal její rychlý nárůst až do 48. hodiny. Poté byl nárůst biomasy méně dynamický, přičemž bakterie stále pomalu rostla. Koncentrace glukózy v médiu postupně klesala, protože bakterie tento substrát využívala jako primární zdroj uhlíku. Obsah P(3HB) vzrůstal až do 54. hodiny. Následně došlo k mírnému poklesu obsahu P(3HB), který byl pravděpodobně způsobený tím, že bakterie je schopná P(3HB) využívat jako zdroj uhlíku při vyčerpání primárních živin z média.

Množství kyseliny octové velmi rychle narůstalo do 48. hodiny, z čehož lze usuzovat, že se jedná o fázi disimilační, kdy bakterie dynamicky roste. Následně od 48. hodiny došlo k poklesu koncentrace kyseliny octové a tedy jejího využití jako zdroje energie po vyčerpání primárních živin v médiu.

Kyselina mléčná má mnohem rychlejší nárůst koncentrace oproti kyselině octové. Do 48. hodiny se koncentrace kyseliny mléčné výrazně zvýšila, poté došlo k velmi rychlému snížení její koncentrace. Průběh křivek pro koncentraci organických kyselin je stejný, domnívám se, že kyselina mléčná je dalším sekundárním zdrojem uhlíku po vyčerpání primárních zdrojů. V 78. hodině byla hodnota koncentrace dokonce nulová, pravděpodobně z důvodu toho, že bakterie ji využila ve svůj prospěch jako sekundární zdroj uhlíku. Zároveň je možné, že nárůst laktátu během dynamického růstu kultury je spojen s limitací kyslíkem, kdy rychle rostoucí kultura při dočasném nedostatku kyslíku část svých redukovaných koenzymů regenerovala prostřednictvím redukce pyruvátu spojeného s exkrecí laktátu.

U *Burkholderia sacchari* kultivované na glukóze byl neoptimálnější čas pro izolaci P(3HB) z buněk a množství kyseliny octové a kyseliny mléčné ve 48. hodině kultivace. Je zajímavé, že přepnutí metabolismu acetátu (disimilace – asimilace) (48. hodina) časově do velké míry koreluje s přepnutím metabolismu P(3HB) z módu akumulace do programu utilizace (54. hodina) a to i přesto, že primární zdroj uhlíku byl v médiu stále přítomen v relativně vysoké koncentraci.

4.4 Stanovení viability buněk průtokovou cytometrií

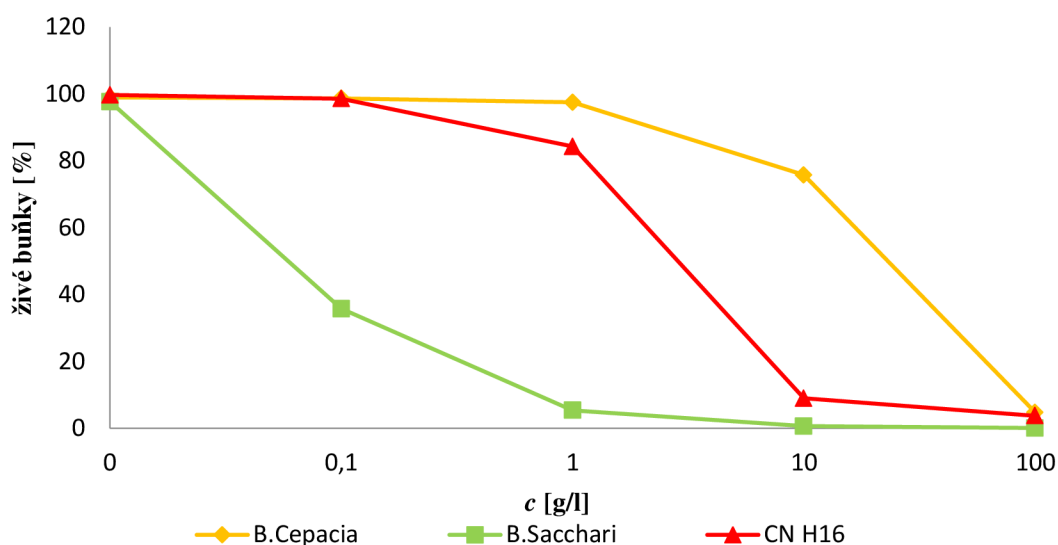
V rámci dalšího experimentu byla posouzena akutní toxicita acetátu a laktátu pro námi testované bakteriální kultury – *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia sacchari* a *Cupriavidus necator* H16. Mikroorganismy byly vystaveny různým koncentracím kyseliny octové a mléčné po dobu 60 minut a následně byla stanovena viabilita mikrobiálních kultur pomocí průtokového cytometru.

4.4.1 Viabilita buněk po přidavku kyseliny octové

Prvním stresem, kterému byly bakterie vystaveny, byla kyselina octová v různých koncentracích. Změna vnějšího pH ovlivňuje růst bakterie, ale také metabolické procesy, což vede ke změně poměrů produktů. Kyselina octová byla aplikována v koncentracích 0,1; 1; 10 nebo 100 g/l a po 60 minutách byla posouzena viabilita buněk *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia sacchari*, které byly kultivovány 48 hodin v minerálním médiu s glukózou jako jediným zdrojem uhlíku. *Cupriavidus Necator* H16 byla kultivována 48 hodin v minerálním médiu s fruktózou, která je zdrojem uhlíku.

Tab. č. 18: Množství živých buněk po působení různými koncentracemi kyseliny octové.

Koncentrace kyseliny octové [g/l]	Živé buňky [%]		
	<i>B. sacchari</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>C. necator</i> H16
0	97,7	99,0	99,7
0,1	35,8	98,7	98,6
1	5,4	97,5	84,3
10	0,7	75,8	9,0
100	0,1	4,8	3,8



Graf č. 17: Závislost živých buněk v % na koncentraci kyseliny octové.

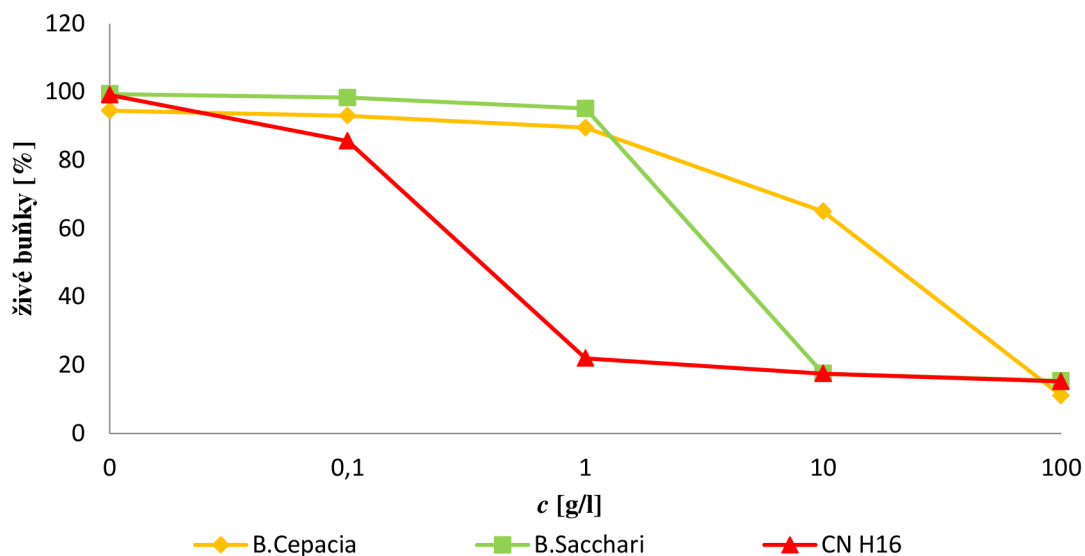
Z průběhu křivek výše uvedeného grafu č. 17 je patrné, že kmeny *Cupriavidus necator* H16 a *Burkholderia cepacia* jsou mnohem odolnější vůči kyselině octové, protože u obou těchto bakterií došlo k větší úmrtnosti buněk až při koncentraci 1 g/l. U bakterie *Burkholderia sacchari* došlo k velkému snížení živé populace již při koncentraci 0,1 g/l.

4.4.2 Viabilita po přidavku kyseliny mléčné

Dalším stresem, kterému byly bakterie vystaveny, byla kyselina mléčná v různých koncentracích. Kyselina mléčná byla aplikována v koncentracích 0,1; 1; 10 nebo 100 g/l a po 60 minutách byla posouzena viabilita buněk *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia sacchari* a *Cupriavidus Necator* H16, které byly kultivovány za stejných podmínek jako u stresového faktoru v podobě kyseliny octové.

Tab. č. 19: Množství živých buněk po působení různými koncentracemi kyseliny mléčné.

Koncentrace kyseliny octové [g/l]	Živé buňky [%]		
	<i>B. sacchari</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>C. necator</i> H16
0	99,4	94,5	99,1
0,1	98,3	93,0	85,6
1	95,1	89,5	22,0
10	17,5	65,0	17,5
100	15,4	11,1	15,2



Graf č. 18: Závislost živých buněk v % na koncentraci kyseliny mléčné.

Z výše uvedeného grafu č. 18 vyplývá, že *Cupriavidus necator* H16 se jeví jako nejméně odolná vůči kyselině mléčné. Je vidět, že už při koncentraci kyseliny mléčné 0,1 g/l dochází k prudkému úhynu a viabilita populace se sníží až k 15%. Zato *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari* jsou mnohem odolnější vůči působení kyseliny mléčné, protože u obou těchto bakterií došlo k větší úmrtnosti buněk až při koncentraci kyseliny mléčné nad 1 g/l. *Burkholderia sacchari* vykazuje daleko větší úmrtnost v závislosti na zvyšování koncentrace kyseliny mléčné než *Burkholderia cepacia*.

5 ZÁVĚR

V rámci této bakalářské práce byla studována produkce kyseliny octové a polyhydroxyalkanoátů bakteriemi *Cupriavidus necator* H16, *Burkholderia sacchari* a *Burkholderia cepacia*, které jsou často uvažovány jako průmysloví producenti PHA. V rámci práce byla provedena jejich kultivace na několika substrátech a byly porovnány výtěžky PHA, biomasy a také exkrece organických kyselin – především acetátu, ale také laktátu. Taktéž byla u všech výše zmíněných bakterií zkoumána toxicita kyseliny octové a kyseliny mléčné na průtokovém cytometru.

Jako nejvhodnější substrát z hlediska nárůstu biomasy se při kultivaci u bakterií *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari* ukázala glukóza. Při použití glukózy jako zdroje uhlíku obsahovala biomasa zároveň největší procentuální podíl P(3HB) v sušině, v případě *Burkholderia sacchari* to pak bylo téměř 75 % suché hmoty buněk. Celkově byla nejvyšší produkce biomasy a zároveň nejvyšší podíl P(3HB) zjištěn u bakterie *Cupriavidus necator* H16, která byla kultivována na fritovacím oleji. Podíl P(3HB) v sušině byl v tomto případě stanoven na 84,9 % suché hmoty buněk.

Bylo zjištěno, že u bakterií *Burkholderia sacchari* a *Burkholderia cepacia* dochází k přeměně acetylkoenzymu A na acetát, ten je následně buňkami transportován do kultivačního média. Nicméně stanovené koncentrace acetátu jsou spíše nízké, nejvyšší koncentrace kyseliny octové byla stanovena u bakterie *Burkholderia sacchari* při kultivaci na glukóze, konkrétně 50 mg/ml. U kmene *Cupriavidus necator* H16 nebyla v kultivačním médiu detekována žádná organická kyselina, z čehož vyplývá, že u této bakterie produkující PHA nedochází k neúčelné přeměně acetylkoenzymu A na acetát, což umožňuje efektivní produkci P(3HB).

U *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari* byl zároveň v kultivačním médiu detekován laktát a to v koncentracích přesahující acetát. Je pravděpodobné, že laktát vznikl při částečné limitaci kyslíkem, která je pro kultivaci v Erlenmeyerových baňkách typická.

V dalším experimentu byla proměřena růstová křivka bakterie *Burkholderia sacchari* kultivované na glukóze a také byly stanoveny organické kyseliny v kultivačním médiu v průběhu růstu. Během exponenciální růstové fáze docházelo k exkreci acetátu a laktátu, následně došlo k opětovné utilizaci těchto metabolitů. K acetátovému přepnutí tedy dochází okolo 48. hodiny kultivace. Zajímavé je, že přepnutí metabolismu acetátu se časově shoduje s přepnutím metabolismu P(3HB), protože po 48. hodině přestala kultura akumulovat tento polymer a naopak započala s jeho utilizací.

Dalším parciálním úkolem této bakalářské práce bylo studium akutní toxicity acetátu a laktátu pro vybrané bakteriální kultury. Jednotlivé bakteriální kmeny byly exponovány různými koncentracemi organických kyselin (0,1 – 100 g/l) po dobu 60 minut a následně byla stanovena viabilita bakteriálních kultur pomocí průtokové cytometrie. Nejodolnější bakterií vůči působení stresového faktoru ve formě organických kyselin je *Burkholderia cepacia*. U *Cupriavidus necator* H16 byla odolnost vůči kyselině octové vcelku vysoká, nicméně tato kultura naopak vykazuje vysokou citlivost k laktátu, který již při koncentraci 1 g/l usmrtil velkou část buněk.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] BENTLEY, Ronald, 2000, *From 'reactive C2 units' to acetyl coenzyme A: a long trail with an acetyl phosphate detour*. Trends in Biochemical Sciences [online]. 2000. Vol. 25, no. 6p. 302-305. DOI 10.1016/S0968-0004(00)01590-5. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000400015905>
- [2] KENNEDY, E. P., 2000, *Hitler's Gift and the Era of Biosynthesis: a long trail with an acetyl phosphate detour*. Journal of Biological Chemistry [online]. 2000. Vol. 276, no. 46p. 42619-42631. DOI 10.1074/jbc.R100051200. Dostupné z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.R100051200>
- [3] KENNEDY, E. P., 2001, *Author Index: a long trail with an acetyl phosphate detour*. FEBS Letters [online]. 14 December 2001. Vol. 509, no. 3p. -. DOI 10.1016/S0014-5793(01)03237-2. Dostupné z: [http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793\(01\)03237-9](http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793(01)03237-9)
- [4] WANNER, B. L., SCHULTZ, Sabine, BOMKE, Jörg, PILS, Thomas, LEHMANN, Wolf D. and KNAPPE, Joachim, 1993, *Gene regulation by phosphate in enteric bacteria: a long trail with an acetyl phosphate detour*. Journal of Cellular Biochemistry [online]. 1993. Vol. 51, no. 1p. 47-54. DOI 10.1002/jcb.240510110. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.240510110>
- [5] STARAI, V.J., ESCALANTE-SEMERENA, J.C., BOMKE, Jörg, PILS, Thomas, LEHMANN, Wolf D. and KNAPPE, Joachim, 2004, *Acetyl-coenzyme A synthetase (AMP forming): a long trail with an acetyl phosphate detour*. Cellular and Molecular Life Sciences [online]. 2004. Vol. 61, no. 16p. -. DOI 10.1007/s00018-004-3448-x. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-004-3448-x>
- [6] WOLFE, A. J. *The Acetate Switch*. Microbiology and Molecular Biology Reviews [online]. 2005, vol. 69, issue 1, s. 12-50 [cit. 2015-03-22]. DOI: 10.1128/membr.69.1.12-50.2005. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1082793/>
- [7] WOLFE, A. J. *Quorum Sensing "Flips" the Acetate Switch*. Journal of Bacteriology [online]. 2008, vol. 190, issue 17, s. 5735-5737 [cit. 2015-03-22]. DOI: 10.1128/jb.00825-08. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2519541/#!po=3.33333>
- [8] GIMENEZ, R., M. F. NUNEZ, J. BADIA, J. AGUILAR a L. BALDOMA. *The Gene yjcG, Cotranscribed with the Gene acs, Encodes an Acetate Permease in Escherichia coli*. Journal of Bacteriology [online]. 2003, vol. 185, issue 21, s. 6448-6455 [cit. 2015-04-02]. DOI: 10.1128/jb.185.21.6448-6455.2003. Dostupné z: <http://jb.asm.org/content/185/21/6448.full>
- [9] QUAIL, M. A., HAYDON, D. J. and GUEST, J. R., 1994, *The pdhR-aceEF-lpd operon of Escherichia coli expresses the pyruvate dehydrogenase complex: the anaerobically induced pyruvate formate-lyase system of Escherichia coli*. Molecular Microbiology [online]. 1994. Vol. 12, no. 1p. 95-104. DOI 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00998.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00998.x>

- [10] KNAPPE, Joachim and SAWERS, Gary, 1990, *A radical-chemical route to acetyl-CoA: the anaerobically induced pyruvate formate-lyase system of Escherichia coli*. FEMS Microbiology Letters[online]. 1990. Vol. 75, no. 4p. 383-398. DOI 10.1111/j.1574-6968.1990.tb04108.x. Dostupné z: <http://femsre.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1111/j.1574-6968.1990.tb04108.x>
- [11] ALEXEEVA, S., B. DE KORT, G. SAWERS, K. J. HELLINGWERF a M. J. T. DE MATTOS. *Effects of Limited Aeration and of the ArcAB System on Intermediary Pyruvate Catabolism in Escherichia coli*. Journal of Bacteriology [online]. 2000, 182(17), 4934-4940 [cit. 2016-04-10]. DOI: 10.1128/JB.182.17.4934-4940.2000. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.182.17.4934-4940.2000>
- [12] ROSSMANN, R., G. SAWERS a A. BÖCK. *Mechanism of regulation of the formate-hydrogenlyase pathway by oxygen, nitrate, and pH: definition of the formate regulon*. Molecular Microbiology [online]. 1991, 5(11), 2807-2814 [cit. 2016-04-10]. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1991.tb01989.x. ISSN 0950-382x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.1991.tb01989.x>
- [13] MATSUYAMA, Asahi, Hideko YAMAMOTO-OTAKE, Jeff HEWITT, Ross T.A. MACGILLIVRAY a Eiichi NAKANO. *Nucleotide sequence of the phosphotransacetylase gene of Escherichia coli strain K12*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression [online]. 1994, 1219(2), 559-562 [cit. 2016-04-10]. DOI: 10.1016/0167-4781(94)90089-2. ISSN 01674781. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0167478194900892>
- [14] WANNER, B. L. *Gene regulation by phosphate in enteric bacteria*. Journal of Cellular Biochemistry [online]. 1993, 51(1), 47-54 [cit. 2016-04-10]. DOI: 10.1002/jcb.240510110. ISSN 0730-2312. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.240510110>
- [15] BROWN, T. D. K., M. C. JONES-MORTIMER a H. L. KORNBERG. *The Enzymic Interconversion of Acetate and Acetyl-coenzyme A in Escherichia coli*. Journal of General Microbiology [online]. 1977,102(2), 327-336 [cit. 2016-04-10]. DOI: 10.1099/00221287-102-2-327. ISSN 0022-1287. Dostupné z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-102-2-327>
- [16] KARAN, Dev, Jean R. DAVID a Pierre CAPY. *Molecular evolution of the AMP-forming Acetyl-CoA synthetase*. Gene [online]. 2001, 265(1-2), 95-101 [cit. 2016-04-10]. DOI: 10.1016/S0378-1119(01)00358-4. ISSN 03781119. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111901003584>
- [17] GIMENEZ, R., M. F. NUNEZ, J. BADIA, J. AGUILAR a L. BALDOMA. *The Gene yjcG, Cotranscribed with the Gene acs, Encodes an Acetate Permease in Escherichia coli*. Journal of Bacteriology [online]. 2003,185(21), 6448-6455 [cit. 2016-04-10]. DOI: 10.1128/JB.185.21.6448-6455.2003. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.185.21.6448-6455.2003>
- [18] BERTAGNOLLI, B.L. a L.P. HAGER. *Role of Flavin in Acetoin Production by Two Bacterial Pyruvate Oxidases*. Archives of Biochemistry and Biophysics [online].

- 1993, 300(1), 364-371 [cit. 2016-04-10]. DOI: 10.1006/abbi.1993.1049. ISSN 00039861. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986183710490>
- [19] *The Enzymes of Biological Membranes* [online]. Boston, MA: Springer US, 1976 [cit. 2016-04-10]. ISBN 978-1-4899-2695-1.
- [20] CHANG, Ying-Ying, Ai-Yu WANG a John E. CRONAN. *Expression of Escherichia coli pyruvate oxidase (PoxB) depends on the sigma factor encoded by the rpoS(katF) gene*. *Molecular Microbiology* [online]. 1994, 11(6), 1019-1028 [cit. 2016-04-10]. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00380.x. ISSN 0950-382x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00380.x>
- [21] HOLMS, Harry. *Flux analysis and control of the central metabolic pathways in Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 1996, 19(2), 85-116 [cit. 2016-04-10]. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1996.tb00255.x. ISSN 1574-6976. Dostupné z: <http://femsre.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.1996.tb00255.x>
- [22] LEE, Sang Yup. *High cell-density culture of Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology* [online]. 1996, 14(3), 98-105 [cit. 2016-04-10]. DOI: 10.1016/0167-7799(96)80930-9. ISSN 01677799. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0167779996809309>
- [23] MAJEWSKI, R. A. a M. M. DOMACH. *Simple constrained-optimization view of acetate overflow in E. coli*. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 1990, 35(7), 732-738 [cit. 2016-04-10]. DOI: 10.1002/bit.260350711. ISSN 0006-3592. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.260350711>
- [24] RINAS, Ursula, Heinrich-Andreas KRACKE-HELM a Karl SCHÜGERL. *Glucose as a substrate in recombinant strain fermentation technology*. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 1989,31(2), 163-167 [cit. 2016-04-10]. DOI: 10.1007/BF00262456. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00262456>
- [25] EL-MANSI, Mansi. *Flux to acetate and lactate excretions in industrial fermentations: physiological and biochemical implications*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [online]. 2004, 31(7), 295-300 [cit. 2016-04-10]. DOI: 10.1007/s10295-004-0149-2. ISSN 1367-5435. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-004-0149-2>
- [26] BJORNSDOTTIR, K., F. BREIDT a R. F. MCFEETERS. *Protective Effects of Organic Acids on Survival of Escherichia coli O157: H7 in Acidic Environments*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2006, 72(1), 660-664 [cit. 2016-04-10]. DOI: 10.1128/AEM.72.1.660-664.2006. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.72.1.660-664.2006>
- [27] BERG, Jeremy M, John L TYMOCZKO a Lubert STRYER. *Biochemistry: The Citric Acid Cycle Oxidizes Two-Carbon Units*. 5th ed. New York: W. H. Freeman, 2002. Section 17.1, ISBN 0-7167-8724-5. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22427/>
- [28] KOBAYASHI, T., M. SHIRAKI, T. ABE, A. SUGIYAMA a T. SAITO. *Purification and Properties of an Intracellular 3-Hydroxybutyrate-Oligomer Hydrolase (PhaZ2) in*

- Ralstonia eutropha* H16 and Its Identification as a Novel Intracellular Poly(3-Hydroxybutyrate) Depolymerase. *Journal of Bacteriology* [online]. 2003, vol. 185, issue 12, s. 3485-3490 [cit. 2015-04-05]. DOI: 10.1128/jb.185.12.3485-3490.2003. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC156217/>
- [29] SUDESH, K, H ABE, Y DOI a Chi ZHANG. *Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters*. *Progress in Polymer Science* [online]. 2000, vol. 25, issue 10, s. 1-24 [cit. 2015-04-05]. DOI: 10.1002/9783527656950.ch1. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0079670000000356#>
- [30] KHANNA, Shilpi a Ashok K. SRIVASTAVA. *Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates*. *Process Biochemistry* [online]. 2005, vol. 40, issue 2, s. 607-619 [cit. 2015-04-07]. DOI: 10.1016/j.procbio.2004.01.053. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959204000949>
- [31] Lemoigne, M.: *Produits de déshydratation et de polymérisation de l'acide -oxybutyrique*. *Bulletin de la Societe de Chimie Biologique*, 1926, vol. 8, pp. 770-782. ISSN 0037-9042.
- [32] Macrae, R. M., Wilkinson, J. F.: *The influence of cultural conditions on poly- β -hydroxybutyrate synthesis in Bacillus megaterium*. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*, 1958, vol. 27, pp. 73-78. ISSN 0308-2105.
- [33] Flickinger, M. C., Drew, S. W.: *Encyclopedia of bioprocess technology -fermentation, biocatalysis, and bioseparation*, Volumes 1-5: New Youk: John Wiley & Sons, 1999. 2024-2133. ISBN 15-9124-457-9.
- [34] LUENGO, José M, Belén GARCÍA, Angel SANDOVAL, Germán NAHARRO, Elías R OLIVERA, Phillip HENNA, Stuart COLES a Jian YU. *Bioplastics from microorganisms*. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, vol. 6, p. 251-260. [online]. [cit. 2015-04-07].
- [35] Madison, L. L., Huisman, G. W.: *Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1999, vol. 63. p. 21-53. Dostupné z: <http://mmbbr.asm.org/content/63/1/21.full?sid=f81d1e6a-8ce4-425b-81ee-f251b2c5b17a>
- [36] POVOLO, Silvana, Paolo TOFFANO, Marina BASAGLIA a Sergio CASELLA. *Polyhydroxyalkanoates production by engineered Cupriavidus necator from waste material containing lactose*. *Bioresource Technology* [online]. 2010, vol. 101, issue 20, pp. 7902-7907 [cit. 2015-04-07]. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.05.029.
- [37] 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, vol. 102, issue 6, pp. 1437-1449 [cit. 2015-04-07]. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x.
- [38] Braunegg, G., Bona, R., Koller, M.: *Sustainable Polymer Production*. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 2004, vol. 43, pp. 1779-1793. ISSN 0360-2559.

- [39] Zinn, M., Witholt, B., Egli, T.: *Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, vol. 53, p. 5-21.
- [40] Steinbuchel, A. et al: *Biosynthesis of polyesters in bacteria and recombinant organisms*. *Polymer Degradation and Stability*, 1998, vol. 59, p. 177-182.
- [41] Green, P. R. et al: *Formation of Short Chain Length/Medium Chain Length Polyhydroxyalkanoate Copolymers by Fatty Acid-Oxidation Inhibited *Ralstonia eutropha**. *Biomacromolecules*, 2002, vol. 3, p. 208-213.
- [42] Lee, S. Y.: *Bacterial Polyhydroxyalkanoates*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, Vol. 49, P. 1-14.
- [43] Solaiman, D. K. Y, Ashby, R. D., Hotchkiss, A. T., Foglia, T. A.: *Biosynthesis of mediumchain-length poly(hydroxyalkanoates) from soy molasses*. *Biotechnology letters*, 2006, vol. 28, p. 157-162.
- [44] Bastioli, C.: *Handbook of Biodegradable Polymers*. Shawbury, Shrewsbury, Shropshire: Smithers Rapra, 2005, 552 p. ISBN 1-85957-389-4.
- [45] Bassett, D. C.: *Developments in Crystalline Polymers*, vol. 2. London: Elsevier, 1988, 346 p. ISBN 1-85166-133-6.
- [46] Kusaka, S., Iwata, T., Doi, Y.: *Properties and biodegradability of ultra-high-molecularweight poly[(R)-3-hydroxybutyrate] produced by a recombinant *Escherichia coli**. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1999, vol. 25, pp. 87-94. ISSN 0141-8130.
- [47] Kessler, B., Witholt, B.: *Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism*. *Journal of Biotechnology*, 2001, vol. 86, pp. 97-104. ISSN 0168-1656.
- [48] Naik, S., Gopal, S. K. V., Somal, P.: *Bioproduction of polyhydroxyalkanoates from bacteria: a metabolic approach*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, vol. 24, p. 2307-2314.
- [49] Lee, S. Y., Choi, J.: *Production and degradation of polyhydroxyalkanoates in waste environment*. *Waste Management*, 1999. Vol. 19, p. 133-139.
- [50] Wang, J., Yu, H. Q.: *Biosynthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) and extracellular polymeric substances (EPS) by *Ralstonia eutropha* ATCC 17699 in batch cultures*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, vol. 75, p. 871-878.
- [51] Pavolo, S., et al: *Polyhydroxyalkanoates production by engineered *Cupriavidus necator* from waste material containing lactose*. *Bioresource Technology*, 2010, Vol. 101, p. 7902-7907.
- [52] Lee, E. Y., Choi, Ch. Y.: *Biosynthesis and Biotechnological Production of Degradable Polyhydroxyalkanoic Acid*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*., 1997, vol. 2, p. 1-10.
- [53] Seo, M. Ch., Shin, H. D., Lee, Y. H.: *Transcription level of granule-associated *phaP* and *phaR* genes and granular morphogenesis of poly- β -hydroxyalkanoate granules in *Ralstonia eutropha**. *Biotechnology Letters*, 2004, vol. 26, p. 617-622.
- [54] Ahn, W. S., Park, S. J., Lee, S. Y.: *Production of Poly(3-Hydroxybutyrate) by Fed-Batch Culture of Recombinant *Escherichia coli* with a Highly Concentrated Whey*

- Solution. Applied and Environmental Microbiology*, 2000, vol. 66, pp. 3624-3627. ISSN 0099-2240.
- [55] Page, W. J.: *Production of polyhydroxyalkanoates by Azotobacter vinelandii UWD in beet molasses culture*. FEMS Microbiological Letters, 1992, vol. 103, pp. 149-157. ISSN 0378-1097.
- [56] Yu, J.: *Production of PHA from starchy wastewater via organic acids*. Journal of Biotechnology, 2001, vol. 86, pp. 105-112. ISSN 0168-1656.
- [57] MUELLER, H. M. a D. SEEBACH. ChemInform Abstract: *Poly(hydroxyalkanoates)*. ChemInform [online]. 1993, vol. 24, issue 29, no-no [cit. 2015-04-20]. DOI: 10.1002/chin.199329340.
- [58] Moskowitz, G. J., Merrick, J. M.: *Metabolism of poly- β -hydroxybutyrate. II. Enzymic synthesis of D-(-)- β -hydroxybutyryl coenzyme A by an enoyl hydratase from Rhodospirillum rubrum*. Biochemistry, 1969, vol. 8, pp. 2748-2755. ISSN 0006-2960.
- [59] Haywood, G. W., Anderson, A. J., Dawes E. A.: *The importance of PHB-synthase substrate specificity in polyhydroxyalkanoate synthesis by Alcaligenes eutrophus*. FEMS Microbiological Letters, 1989, vol. 57, pp. 1-6. ISSN 0378-1097.
- [60] Eggink, G., Van der Wal, H., Huijberts, G. N. M., de Waard P.: *Oleic acid as a substrate for poly-3-hydroxyalkanoate formation in Alcaligenes eutrophus and Pseudomonas putina*. Industrial Crops and Products, 1993, vol. 1, pp. 157-163. ISSN 0926-6690.
- [61] Akaraonye, E., Keshavarz, T., Roy, I.: *Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2010, vol. 85, p. 732-743.
- [62] Tokiwa, Y., Ugwu, Ch., U.: *Biotechnological production of (R)-3-hydroxybutyric acid monomer*. Journal of Biotechnology, 2007, vol. 132, p. 264-272.
- [63] PANCHAL, Bijal, BAGDADI, Andrea and ROY, Ipsita, *Polyhydroxyalkanoates: The Natural Polymers Produced by Bacterial Fermentation*. [online]. P. 397. DOI 10.1007/978-3-642-20940-6_12.
Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-20940-6_12
- [64] EcoBioMaterial.com [online]. c2015 [cit. 2010-05-06]. *Physiology of PHA Metabolism*. Dostupné z: <http://www.ecobiomaterial.com/who-i-am/physiology-of-pha-metabolism/>
- [65] PAN, W., PERROTTA, J. A. and co.: *Production of polyhydroxyalkanoates by Burkholderia cepacia ATCC 17759 using a detoxified sugar maple hemicellulosic hydrolysate*. Journal of Industrial Microbiology, 2012, vol. 39, issue 3, p. 459-469. DOI: 10.1007/s10295-011-1040-6.
- [66] Schembri, M. A., Bayla, R. C., Davies, J. K.: *Phosphate Concentration Regulates Transcription of the Acinetobacter Polyhydroxyalkanoic Acid Biosynthetic Genes*. 1995, Journal of Bakteriology, Vol. 177, Is. 15, p. 4501-4507.
- [67] Pohlmann, A et all.: *Genome sequence of the bioplastic-producing "Knallgas" bacterium Ralstonia eutropha HI6*, Nature Biotechnology, 2006, Vol. 24, p. 1257-1262. ISSN: 1087-0156.

- [68] RODRÍGUEZ-CONTRERAS, A., KOLLER, M. and co.: *Influence of glycerol on poly(3-hydroxybutyrate) production by Cupriavidus necator and Burkholderia sacchari*. Biochemical Engineering Journal, 2015, vol. 94, no. 1, p. 50-57. DOI: 10.1016/j.bej.2014.11.007.
- [69] ŠNAJDAR, O. *Controlled biotechnological production of polyhydroxyalkanoates*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 85 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
- [70] DINGOVÁ, T. *Produkce polyhydroxyalkanoátů z vybraných odpadních substrátů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 49 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

PHA	polyhydroxyalkanoáty
PHB	polyhydroxybutyrát
acetyl-CoA	acetyl-koenzym A
acetyl~P	acetyl-fosfát
AMP-ACS	acetyl aktivujícím enzym
ACS	acetyl koenzym A syntetáza
PTA	fosfát acetyltransferáza
ACKA	acetát fosfotransferáza
ActP	acetát permeáza
PDHC	pyruvátdehydrogenáza
NADH	redukováná forma nikotinadenindinukleotidu
FADH ₂	redukováná forma flavinadenindinukleotidu
LDH	laktátdehydrogenáza
PFL	pyruvát-formiát lyáza
FDO	formiát dehydrogenáza
FHL	formiát-vodíku lyáza
ADH	alkoholdehydrogenáza
P _i	anorganický fosfor
PP _i	pyrofosforečnan
ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
PEP	fosfoenolpyruvát
PPáza	pyrofosfatáza
NAD ⁺	oxidovaná forma nikotinadenindinukleotidu
POXB	pyruvátoxidáza
FAD	oxidovaná forma flavinadenindinukleotidu
KGDH	2-ketoglutarát dehydrogenáza
P(3HB)	poly-(3-hydroxybutyrát)
MCL PHA	medium-chain-length polyhydroxyalkanoáty
SCL PHA	short-chain-length polyhydroxyalkanoáty
CH ₄	methan
NADPH	redukováná forma nikotinadenindinukleotidfosfátu
PP	polypropylen
PHB	polyhydroxybutyrát
P(3HB-co-3HV)	poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát)
3HV	3-hydroxyvalerát
TCA	cyklus trikarboxylových kyselin (Krebsův cyklus, citrátový cyklus)