



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

MOŽNOSTI VYUŽITÍ VIBRAČNÍ SPEKTROSKOPIE PŘI IN-SITU ANALÝZE PHA V MIKROBIÁLNÍ BIOMASE

INVOLVEMENT OF VIBRATIONAL SPECTROSCOPY IN THE IN-SITU ANALYSIS OF PHA IN BACTERIAL BIOMASS.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Barbora Kevélyová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2024

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1843/2022 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Barbora Kevélyová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Procesy a materiály medicínských aplikací
Vedoucí práce: **doc. Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Možnosti využití vibrační spektroskopie při in-situ analýze PHA v mikrobiální biomase

Zadání diplomové práce:

- Vypracovat literární rešerši na téma: i. metody kvalitativní a kvantitativní analýzy polyhydroxyalkanoátů v bakteriální biomase, ii. pokročilé techniky měření a vyhodnocení vibračních spekter při analýze minoritních komponent v biologických matricích.
- Vytvořit dostatečně širokou spektrální knihovnu vibračních spekter bakteriální biomasy s obsahem PHA o různé kvalitě (monomerním složení) i různém celkovém obsahu.
- Na získaný soubor spekter aplikovat metody pokročilého zpracování a vyhodnocení zvolené na základě literární rešerše.
- Vyhodnotit výhody a limity technik vibrační spektroskopie při in-situ analýze PHA v bakteriální biomase. Doporučit optimální postup měření, zpracování a vyhodnocení spektrálních dat.

Termín odevzdání diplomové práce: 29.4.2024:

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

Bc. Barbora Kevélyová
studentka

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Cieľom tejto diplomovej práce bolo štúdium polyhydroxyalkanoátov v mikrobiálnej biomase pomocou metódy ATR-FTIR. Ďalej bola zvolená štatistická metóda PCA pre vyhodnotenie nameraných dát a pozorované korelácie či odlišnosti. Bakteriálny producenti boli *Aneurinibacillus thermoaerophilus* H1, AH30 a AFn2, *Cupriavidus malaysiensis* DSM 25816, DSM 19416 a DSM 19379 a tri kmene *Schlegelella thermodepolymerans* M 15344, DSM 15264 a LMG 21645. Skúmané boli rozličné heteropolyméry s rôznym obsahom monomérov a celkovým obsahom PHA. Monoméry vo vzorkách boli 3-hydroxybutyrát, 4-hydroxybutyrát, 3-hydroxyvalerát, 4-hydroxyvalerát, 5-hydroxyvalerát a 4-hydroxyhexanoát. Ako porovnávací analýza pre presné kvantitatívne a kvalitatívne stanovenie polyhydroxyalkanoátov vo vzorkách bola prevedená plynová chromatografia. Spektrá získané metódou FTIR boli porovnávané a boli hľadané signifikantné píky, ktoré súvisia s kvalitatívnymi vlastnosťami PHA, konkrétne monomérom zložením a stupňom kryštalinity. Na zozbierané dáta z FTIR bola úspešne aplikovaná štatistická metóda PCA, pomocou ktorej boli sledované najmä kvalitatívne rozdiely medzi vzorkami. Najdôležitejšie rozdiely boli pozorované v prípade prítomnosti monoméru 4-hydroxybutyrátu a 4-hydroxyhexanoátu, a týkali sa stupňa kryštalinity vzoriek. Analýza nepreukázala potenciál pri semi-kvantitatívnom stanovení PHA v biomase. Rozdiely medzi mikroorganizmami neboli pozorované. Postup vyhodnotenia FTIR spektier pomocou PCA by bolo vhodné do budúcnosti využiť pri štúdiu biomasy s obsahom rozličných monomérových jednotiek, najmä hydroxyvalerátov v prípade ich vyššieho obsahu vo vzorke.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

polyhydroxyalkanoáty, bioplasty, kopolyméry, hydroxyvalerát, hydroxybutyrát, hydroxyhexanoát, vibračná spektroskopia, FTIR, PCA, spektrálna analýza

ABSTRACT

The aim of this thesis was the study of polyhydroxyalkanoates in bacterial biomass using the ATR-FTIR method. Furthermore, the PCA method was chosen to evaluate the measured data and observe correlations or differences among the spectra of various biomass samples. The bacterial producers were *Aneurinibacillus thermoaerophilus* H1, AH30 and AFn2, *Cupriavidus malaysiensis* DSM 25816, DSM 19416 and DSM 19379 and three strains of *Schlegelella thermodepolymerans* M 15344, DSM 15264 and LMG 21645. Various heteropolymers with different monomer content and total PHA content were investigated. The monomers in the samples were 3-hydroxybutyrate, 4-hydroxybutyrate, 3-hydroxyvalerate, 4-hydroxyvalerate, 5-hydroxyvalerate and 4-hydroxyhexanoate. As the reference method for accurate quantitative and qualitative determination of polyhydroxyalkanoates in the samples, gas chromatography was performed. The spectra obtained by the FTIR method were compared and significant peaks related to the qualitative properties of PHA, namely monomer composition and crystallinity, were searched for. The PCA statistical method was successfully applied to the collected data from FTIR, with the help of which the qualitative differences between the samples were monitored. The most significant differences were observed in the presence of monomers 4-hydroxybutyrate and 4-hydroxyhexanoate, and they were related to the crystallinity of the samples. The analysis did not show potential for semi-quantitative determination of PHA in biomass. Differences between microorganisms were not observed. The procedure for evaluating FTIR spectra using PCA could in the future be used in the study of biomass containing various monomeric units, especially hydroxyvalerates in case of their higher content within the sample.

KEYWORDS

polyhydroxyalkanoates, bioplastics, copolymers, hydroxyvalerate, hydroxybutyrate, hydroxyhexanoate, vibrational spectroscopy, FTIR, PCA, spectral analysis

KEVÉLYOVÁ, Barbora. *Možnosti využití vibrační spektroskopie při in-situ analýze PHA v mikrobiální biomase*. Brno, 2024. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/148676>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Petr Sedláček.

Prehlásenie

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

.....
Kevélyová Barbora

Podakovanie

Touto cestou by som sa chcela poďakovať vedúcemu mojej diplomovej práce doc. Ing. Petrovi Sedláčkovi, PhD. za príjemný prístup, podporu a pomoc pri vedení diplomovej práce. Vďaka patrí aj mojej konzultantke Ing. Eve Slaninovej Ph.D. za trpezlivosť a pomoc pri práci v laboratóriu. Najviac by som chcela poďakovať svojej rodine a blízkym, ktorí vždy stáli pri mne a podporovali ma.

OBSAH

1	Úvod	8
2	Teoretická časť	9
2.1	Polyhydroxyalkanoáty	9
2.1.1	Štruktúra polyhydroxyalkanoátov	10
2.1.2	Vlastnosti polyhydroxyalkanoátov	10
2.1.3	Biosyntéza a odbúravanie polyhydroxyalkanoátov	12
2.1.4	Prehľad najznámejších homopolymérov a kopolymérov	15
2.1.5	Využitie polyhydroxyalkanoátov	17
2.2	Metódy analýzy polyhydroxyalkanoátov v biomase	18
2.2.1	Chromatografické metódy	19
2.2.2	Termogravimetrická analýza a diferenčná skenovacia kalorimetria	20
2.2.3	Spektroskopia nukleárnej magnetickej rezonancie	20
2.2.4	Vibračná spektroskopia.....	21
2.2.5	Iné analytické metódy	22
2.3	Aplikácia infračervenej spektroskopie a metódy jej vyhodnotenia pri štúdiu polyhydroxyalkanoátov – súčasný stav riešenej problematiky	23
3	Experimentálna časť.....	28
3.1	Chemikálie, baktérie a prístroje použité v práci	28
3.1.1	Zoznam chemikálií.....	28
3.1.2	Zoznam prístrojov	28
3.1.3	Použité baktérie.....	29
3.2	Kultivácie baktérií	29
3.2.1	Inokulum a rastové médium.....	29
3.2.2	Minerálne médiá, substráty a kultivácia	30
3.2.3	Získanie vysušenej biomasy	33
3.3	Analýza vzoriek suchej biomasy s obsahom polyhydroxyalkanoátov	33
3.3.1	Gravimetrické stanovenie biomasy.....	33
3.3.2	Plynová chromatografia	33
3.3.3	Infračervená spektroskopia	33
3.4	Analýza spektier	35
4	Výsledky a diskusia.....	36
4.1	Výsledky chromatografickej analýzy vzoriek	36
4.2	Infračervené spektrá vzoriek biomasy s obsahom polyhydroxyalkanoátov	40
4.2.1	Charakteristické píky pri spektrálnej analýze polyhydroxyalkanoátov	40

4.3	Analýza hlavných komponentov	43
4.3.1	Porovnanie všetkých kmeňov mikroorganizmov.....	43
4.3.2	Výsledky pre kmene producenta <i>Cupriavidus malaysiensis</i>	46
4.3.3	Porovnanie kultivácií dvoch kmeňov <i>Cupriavidus malaysiensis</i> za využitia rovnakého substrátu pri kultivácií	48
4.3.4	Porovnanie vzoriek obsahujúcich monomér 4-hydroxybutyrát a monomér 4-hydroxyvalerát	49
4.3.5	Porovnanie vzoriek obsahujúcich monomér 4-hydroxybutyrát a 3-hydroxyvalerát	51
4.3.6	Vzorky obsahujúce komplexné kopolyméry	52
4.3.7	Prítomnosť monoméru 4-hydroxyhexanoátu.....	55
4.3.8	Obsah polyhydroxyalkanoátov v biomase	56
5	Záver	59
6	Zoznam použitej literatúry	61
7	Zoznam použitých skratiek a symbolov.....	68
8	Prílohy.....	69

1 ÚVOD

Plasty sú vďaka svojim ideálnym fyzikálnym a chemickým vlastnostiam využívané vo všetkých odvetviach priemyslu a i v každodennom živote. Nahrádzajú ostatné stavebné materiály a látky využívané k tvorbe rozličných produktov (sklo, drevo, kovy). Vyrábajú sa z nich mnohé komponenty, nádoby, obaly, tašky, spotrebný tovar a množstvo jednorazových výrobkov (plastové poháre, príbory, slamky). Možnosti modifikácie týchto syntetických polymérov sa zdajú byť nekonečné. Prídavkom rôznych aditívnych látok či miešaním s inými materiálmi vieme doceliť požadovaných charakteristík ako sú tvar, pevnosť, elasticita, farba a iné.

Syntetické polyméry sú však ťažko recyklovateľné, nedegradujú v prírode a produkty ich rozkladu bývajú často toxické. Plastové výrobky sú vo veľkom spotrebovávané a končia na smetných skládkach, v pôde a vo vode – pričom momentálne predstavuje riziko nielen samotný odpad v podobe týchto materiálov, ale aj ich fyzický rozklad na takzvané mikroplasty – malé čiastočky plastu, ktoré sa môžu nachádzať všade, vrátane napríklad potravín a ľudského tela. V konečnom výsledku mikroplasty zahltili celý prírodný reťazec. Tieto skutočnosti spolu s neprestávajúcou výrobou obrovského množstva nového syntetického plastu, ktorý je tak neustále akumulovaný, vedú k diskusii ohľadom environmentálnej záťaže a pokusu riešiť tento globálny problém.

Snaha o nahradenie týchto materiálov ekologickjším variantom je predkladaná už desaťročia. Zlúčeniny, ktoré majú podobne vhodné vlastnosti ako klasický plast, ale sú biodegradabilné a prípadne biokompatibilné nazývame bioplasty. Ich výhodou oproti syntetickým plastom je aj to, že sú z obnoviteľných prírodných zdrojov.

Polyhydroxyalkanoáty patria medzi biopolyméry. Ide o mikrobiálne polyestery s potenciálnym využitím vo viacerých odvetviach priemyslu. Tieto látky sú už roky skúmané vedeckou komunitou. Sú optimalizované možnosti ich produkcie z bakteriálnych zdrojov, implementované bolo aj využitie organického odpadu ako substrátu (a teda možnosť jeho recyklácie), ďalej sú tiež skúmané možnosti extrakcie a purifikácie polyhydroxyalkanoátov. V neposlednom rade sú pozorované možnosti modifikácie a kontrolovanej biotechnologickej produkcie požadovaného polyesteru. Problémom produkcie týchto polymérov je finančná náročnosť výroby. Kľúčovou informáciou v procese biotechnologickej výroby je okrem kvantifikácie produktu aj kvalitatívna stránka výsledného produktu. Je dôležité presne a rýchlo stanoviť množstvo, typ a stav v akom sa polymér v kultivovanej biomase nachádza.

Doteraz využívané analytické metódy za týmto účelom sú však finančne i časovo náročné, čo ovplyvňuje finálnu cenu takto produkovaných bioplastov. Hľadajú sa preto rôzne metódy, ktoré by celý proces zjednodušili a hlavne urýchlili. Jedna z potenciálne využiteľných techník je infračervená spektroskopia. Je to rýchla a nedeštruktívna analýza vzoriek. Táto práca je zameraná na štúdium polyhydroxyalkanoátov priamo v biomase pomocou tejto analytickej metódy, čo by v pozitívnom výsledku znamenalo rozšírenie potenciálu ich produkcie a využitia v oblasti biomedicíny, obalových materiálov a iných odvetví.

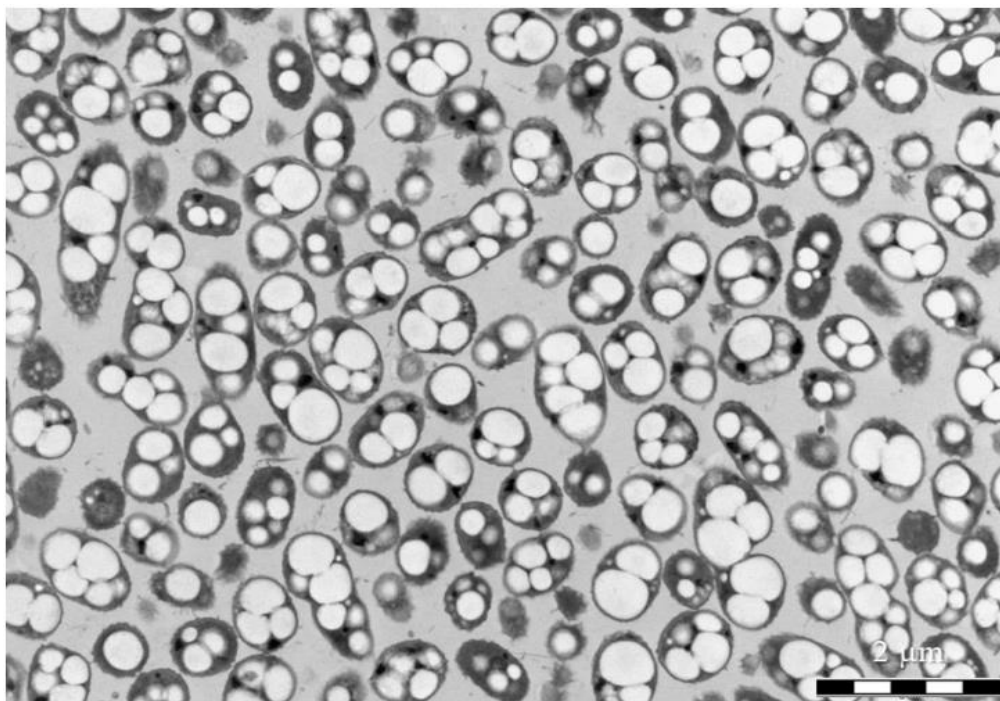
2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (skrátene PHA) sú intracelulárne polyméry produkované rozličnými kmeňmi grampozitívnych a gramnegatívnych baktérií [1], a tiež niektorými zástupcami archeí, kvasiniek či rias [2]. Biosyntéza bola pozorovaná za anaeróbných aj aeróbných podmienok. Sú lokalizované v cytoplazme bunky. Nachádzajú sa tu vo forme granúl o veľkosti 0,2–0,5 μm (viď obrázok 1) [3]. Prvýkrát boli definované v roku 1926 mikrobiológom M. Lemoigne v baktérii *Bacillus megaterium*, ktorá produkovala biopolymér poly(3-hydroxybutyrát) [4]. Množstvo PHA, ktoré sú bunky schopné syntetizovať môže dosahovať až 90 hmotnostných percent celkovej bunkovej sušiny [5].

U niektorých mikroorganizmov je ich syntéza prirodzená vo fáze rastu (napr. rekombinantná *Escherichia coli* či *Alcaligenes latus*) [6], väčšinou sú však produkované v dôsledku nepriaznivých podmienok prostredia – za nadbytku vhodného zdroja uhlíka a zároveň nedostatku biogénnych prvkov ako sú dusík, fosfor, draslík či horčík (producenti *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas oleovorans*, *Cupriavidus necator*) alebo napríklad aj pri fluktuácii pH rastového média [7].

Okrem toho, že polyhydroxyalkanoáty slúžia ako potenciálna zásoba energie a uhlíku, bola preukázaná aj ich vlastnosť chrániť bunky v prípade vystaveniu stresovým faktorom akými sú osmotický stres, výkyvy teploty, prítomnosť ťažkých kovov [8], UV expozícia, zmeny pH a iné podmienky [9]. PHA preukázalo v mikroorganizmoch tiež fyziologické funkcie – napr. spúšťa sporuláciu v *Bacilli* alebo u diazotrofov podporuje predĺženú fixáciu dusíka v tme, či udržiava produkciu energie a oxidáciu NADH [10].

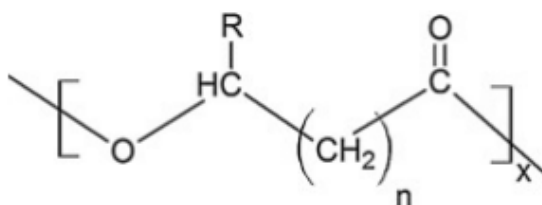


Obrázok 1: Granule PHA v baktériách *Cupriavidus necator* H16 CCM 3726 – snímka z transmissného elektrónového mikroskopu [3]

2.1.1 Štruktúra polyhydroxyalkanoátov

Z chemického hľadiska sú polyhydroxyalkanoáty polyestery 3-, 4-, 5- a 6- hydroxyalkánových kyselín. Karboxylová skupina jedného monoméru je spojená esterovou väzbou s hydroxylovou skupinou susedného monoméru, pričom tieto látky majú vysoký stupeň polymerácie a vzniknutý polymér obsahuje zvyčajne 600 až 35 000 monomérov [11]. Bolo opísaných vyše 150 rozličných typov monomérov. Syntetizované môžu byť homopolyméry aj heteropolyméry s molekulárnou hmotnosťou od 50 000 Da do 20 000 000 Da [12]. Štruktúru PHA môžeme vidieť na obrázku 2. Vedľajší reťazec môže byť rozvetvený, nerozvetvený, nasýtený či nenasýtený. Môže obsahovať rôzne funkčné skupiny [13].

Polyhydroxyalkanoáty môžeme rozdeliť podľa počtu atómov uhlíku v monomére. Monomér, ktorý obsahuje do 5 uhlíkov spadá do skupiny PHA s krátkym reťazcom, tzv. *scl*-PHA (z angl. *short chain length polyhydroxyalkanoate*). Sem sa radia napríklad poly(3-hydroxybutyrát) či poly(3-hydroxyvalerát) [14]. Monoméry so stredne dlhými reťazcami (*mcl*-PHA – z angl. *medium chain length polyhydroxyalkanoate*) sú zložené z 6–14 atómov C. V prípade, že monomér obsahuje 15 a viac uhlíkových atómov sa jedná o *lcl*-PHA (z angl. *long chain length polyhydroxyalkanoate*) – napr. poly(3-hydroxypentadekanoát) [15].



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

Obrázok 2: Všeobecný vzorec monoméru polyhydroxyalkanoátu a prehľad niektorých derivátov [12]

2.1.2 Vlastnosti polyhydroxyalkanoátov

Polyhydroxyalkanoáty sú látky hydrofóbneho charakteru, rozpustné v chloroforme. Keďže majú natívne granule lipidovú povahu, je možné ich farbiť napríklad Nílskou červeňou či Sudánskou čerňou B. V cytoplazme sa vyskytujú v amorfnom stave [16]. Sú to izotaktické a opticky aktívne látky, a až na pár výnimiek sa vyskytujú prevažne v konfigurácii *R* v dôsledku stereošpecifity PHA-syntázy [17]. Majú vysoký pomer objemu k ich povrchu a sú pomerne rezistentné voči UV žiareniu [14].

Mechanickými a fyzikálnymi vlastnosťami sú polyhydroxyalkanoáty podobné syntetickým polymérnym látkam. Všeobecne sú termoplastická, elasticita, pevnosť v ťahu, priestupnosť kyslíka a iné vlastnosti úzko späté s monomérnym zložením a dĺžkou reťazca PHA [18], pričom výsledná štruktúra polyméru závisí od typu producenta a podmienkach kultivácie (typ substrátu

a prostredie) [19]. V tabuľke 1 je prehľad meniacich sa vlastností polyméru v závislosti na jeho monomérom zložení [20]. Podľa typu syntetizovaného polyhydroxyalkanoátu teda vieme získať rad polymérov s nami požadovanými vlastnosťami. Okrem toho je možné PHA modifikovať chemicky a upraviť tým ich materiálové vlastnosti [21]. Miešanie je tiež efektívny postup pre získanie nových polymérnych materiálov s vylepšenými vlastnosťami [22].

Tabuľka 1: Prehľad termálnych a mechanických vlastností polymérov v závislosti na monomérom zložení – T_m je teplota topenia, T_g teplota skelného prechodu polyméru [20]

Monomérne zloženie PHA	Zastúpenie monomérov [%]	T_m [°C]	T_g [°C]	Modul pružnosti [GPa]	Predĺženie pri pretrhnutí [%]	Pevnosť v ťahu [MPa]
Homopolyméry						
3HB	100	171–179	2.5–10	1.1–3.5	04–5.0	19–40
4HB	100	53	- 48	149	1000	104
Kopolyméry						
3HB:HV	95:05:00	170	2.2	–	–	–
	80–90:10–20	137–156	- 1.0 až 1.7	0.8–1.2	50–100	20–30
	70–8–:20–30	138–139	- 6 až - 0.1	1.37	30	70
	50–60:40–50	113–138	- 16 až - 10	–	–	–
	30:70	87	- 13	–	–	–
3HB:4HB	95:05:00	169	- 2	1.23	10.7	1.36
	84:16:00	150	- 7	–	–	–
	76:24:00	161	- 5	0.79	22.2	0.87
	62:38:00	152	- 10	0.66	48	2.98
3HB:3HHx	88–90:10–12	96–127	- 1.2	0.5	113–400	9.4–21
3HB:4HV	90:10:00	159	–	–	242	24

Polyméry s kratšími reťazcami, teda *scl*-PHA, sú tuhé, termoplastické a krehké. Tieto kvality súvisia s ich kryštalinitou, ktorá dosahuje až 80 % [23]. Naopak *mcl*-PHA vykazujú podstatne flexibilnejšie vlastnosti, čo je vhodné pre praktickú aplikáciu – sú menej kryštalické (približne 25 %) a málo krehké. Majú tiež nízku teplotu skelného prechodu. Sú to elastoméry, vykazujú nízku pevnosť v ťahu a vysoké predĺženie pri pretrhnutí [24].

Významným atribútom polyhydroxyalkanoátov je ich biokompatibilita, sú schopné odbúravať sa prirodzene v ľudskom tele na netoxické látky, čo rozširuje aplikačný potenciál týchto materiálov [6]. Vďaka biodegradabilite predstavujú menšiu záťaž pre životné prostredie. Ich recyklácia je taktiež jednoduchšia v porovnaní so syntetickým plastom [15].

2.1.3 Biosyntéza a odbúravanie polyhydroxyalkanoátov

Ako už bolo opísané v kapitole 2.1, polyhydroxyalkanoáty sú prevažne produkované intracelulárne pri nadbytku zdroja uhlíka a vo väčšine prípadov za nedostatku biogénnych prvkov (N, P, K, Mg atď.). Typ a kvantita syntetizovaného polyhydroxyalkanoátu závisí od viacerých faktorov ako sú substrát, kultivačné podmienky, druh mikroorganizmu či typ prítomných PHA syntáz. Významnými mikrobiálnymi producentmi PHA sú *Cupriavidus necator*, *Schlegelella thermodepolymerans*, *Alcaligenes latus*, *Pseudomonas putida*, *Aneurinibacillus thermoaerophilus*, rekombinantná *Escherichia coli*, *Azotobacter sp.* a mnoho iných [20].

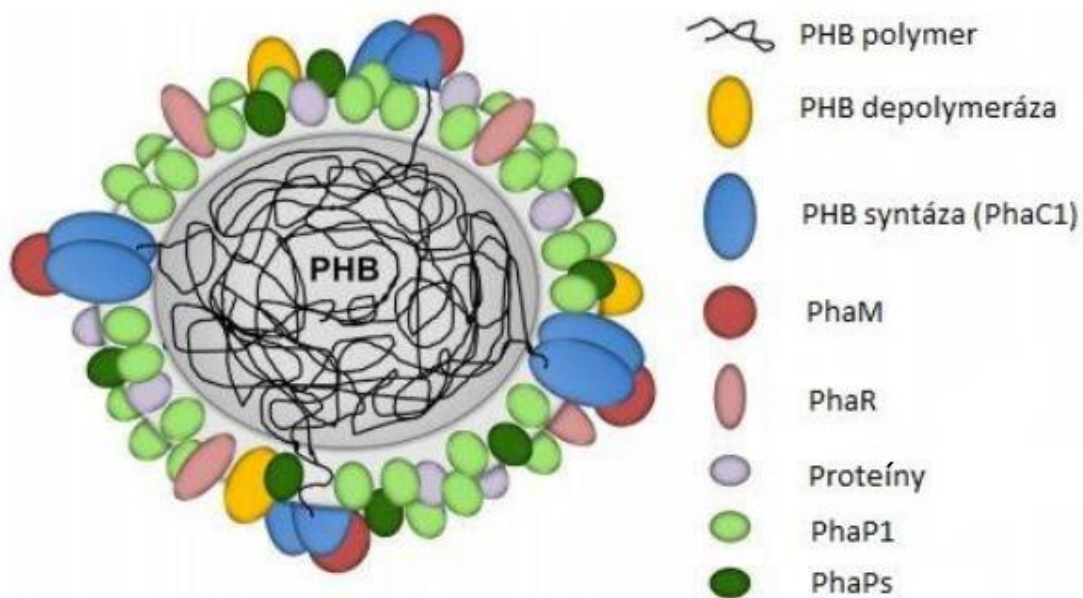
2.1.3.1 Kľúčové enzýmy biosyntézy polyhydroxyalkanoátov

PHA syntázy (PhaC) sú hlavnými enzýmami zapojenými do biosyntézy polyhydroxyalkanoátov. Fungujú na základe polymerizácie monomérnych substrátov – hydroxyalkanoátov. Majú vysokú substrátovú špecifitu a nachádzajú sa na povrchu inklúzií polyhydroxyalkanoátov spolu s ďalšími proteínmi (viď ilustračný obrázok 3) [25]. Ich štruktúra bola rozsiahle skúmaná v baktérii *Cupriavidus necator*. PHA syntázy sa delia do štyroch hlavných tried podľa ich primárnych sekvencií, substrátovej špecificity a zloženia podjednotky [26].

Trieda I zahŕňa enzýmy pozostávajúce iba z jedného typu PhaC a ten tvorí homodimér, pričom za využitia týchto enzýmov je uprednostnená tvorba monomérov s krátkym reťazcom (*scl*-PHA). Tieto syntázy sú zložené z dvoch domén – N-terminálnej domény, ktorej funkcia ešte nie je celkom objasnená, a C-terminálnej katalytickej domény, ktorá obsahuje miesto pre katalýzu. Enzýmy I triedy dosahujú molekulových hmotností v rozmedzí od 63 do 73 kDa [27].

Trieda II obsahuje dva typy syntáz – PhaC1 a PhaC2. Uprednostňuje prevažne tvorbu monomérov so strednou dĺžkou reťazca (*mcl*-PHA). Tiež sa predpokladá, že tieto enzýmy majú dvojdoménové štruktúry s molekulovými hmotnosťami približne 62 kDa. Nachádzajú sa hlavne v bakteriálnych kmeňoch *Pseudomonas* [28].

Syntázy triedy III a IV tvoria heterodiméry zahŕňajúce PhaC-PhaE a PhaC-PhaR a rovnako ako trieda I podporujú syntézu *scl*-PHA. Veľkosť podjednotky PhaC je v rozmedzí od 39 do 53 kDa, zatiaľ čo podjednotka PhaE sa pohybuje od 20 do 43 kDa [29].



Obrázok 3: Ilustračný obrázok granule polyhydroxybutyrátu – na povrchu lipidovej granule sú proteíny a syntázy [24]

2.1.3.2 Dráhy biosyntézy polyhydroxyalkanoátov

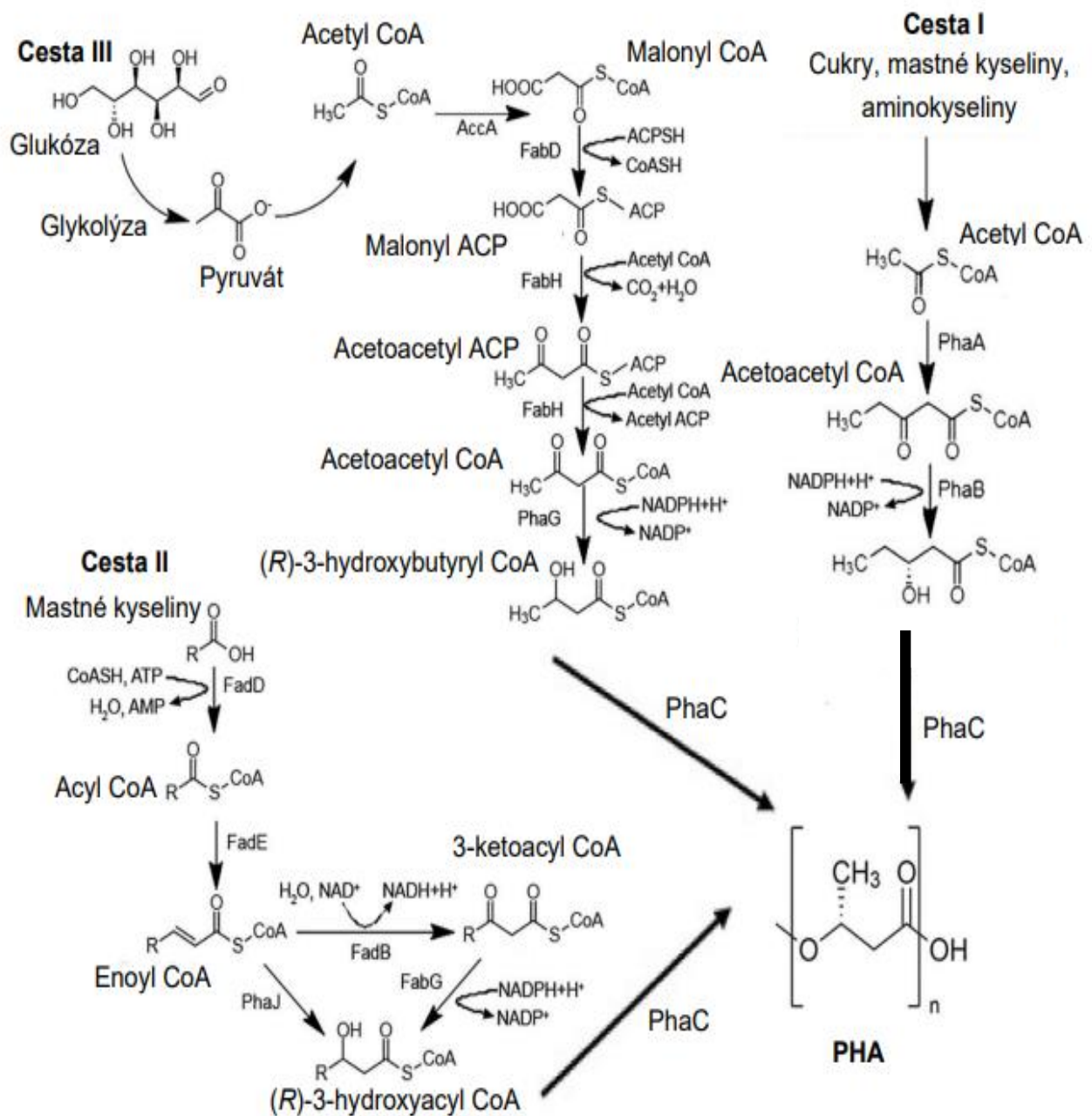
Samotná biosyntéza polyhydroxyalkanoátov je prepojená s biochemickými procesmi buniek, a to cez metabolické dráhy ako sú glykolýza, citrátový cyklus a syntéza mastných kyselín [30]. Pri vysokom pomere C:N sú dva enzýmy Krebsovho cyklu (citrátsyntáza a izocitrátdehydrogenáza) inhibované, čo vedie k zablokovaniu tejto metabolickej dráhy. Výsledkom je akumulácia acetyl-CoA a aktivácia enzýmov β -ketotiolázy, acetoacetylreduktázy a PHA syntázy. Za týchto podmienok prebieha biosyntéza polyhydroxyalkanoátov ako sekundárnych metabolitov [31]. Na obrázku 4 je schéma troch hlavných dráh mikrobiálnej syntézy polyhydroxyalkanoátov [32].

Dráha I využíva prekursor acetyl-CoA z Krebsovho cyklu. Ten kondenzuje sám so sebou za pomoci enzýmu PhaA (β -ketotioláza) a vzniká acetoacetyl-CoA. Následne je tento produkt redukovaný enzýmom PhaB (NADPH-dependntná reduktáza) na (R)-3-hydroxyacyl-CoA. Nakoniec dochádza za prítomnosti syntázy PhaC k polymerizácii tohoto monoméru, čím vzniká PHA [25].

Biosyntéza pomocou dráhy II využíva substráty z β -oxidačnej dráhy mastných kyselín. Acyl-CoA sa mení na 3-hydroxyacyl-CoA, ten je v ďalších krokoch enzymaticky polymerizovaný na polyhydroxyalkanoáty (prítomné enzýmy sú 3-ketoacyl-CoA reduktáza, epimeráza, (R)-enoyl-CoA hydratáza/enoyl-CoA hydratáza I, PHA syntázy). Touto cestou baktérie prevažne syntetizujú *mcl*-PHA [33].

Pri syntéze cez dráhu III sú využívané enzýmy 3-hydroxyacyl-ACP-CoA transferáza a malonyl-CoA-ACP transacyláza [33]. Jedná sa o špecifickú biosyntézu polyhydroxyalkanoátov z jednoduchých zdrojov uhlíka, ktoré sa od seba líšia štruktúrou – fruktóza, sacharóza

a glukóza. Dochádza k tvorbe 3-hydroxyacyl-ACP, ten sa následne mení na 3-hydroxyacyl-CoA. Tento prekursor je za pomoci syntázy PhaC premieňaný na polyhydroxyalkanoát [34].



Obrázok 4: Dráhy biosyntézy PHA [32]

Okrem toho existujú aj ďalšie, omnoho komplikovanejšie biosyntetické dráhy pre mikrobiálnu produkciu polyhydroxyalkanoátov. Príkladom je syntéza P(3HB-co-4HB), pričom rôzne monomérmne zloženie je možné docieľiť prídavkom rozličných prekursorov (substrátov) [3]. Využitím uhlíkatých zdrojov 1,4-butandiolu či γ -butyrolaktonu, ktoré sú štruktúrne podobné monoméru 4HB, podporíme syntézu monoméru 4HB v danom kopolyméri. Naopak pre zvýšenú akumuláciu monoméru 3HB bola efektívne využitá glukóza [35].

2.1.3.3 Degradácia polyhydroxyalkanoátov

Ako už bolo spomenuté, polyhydroxyalkanoáty patria medzi biodegradabilné zlúčeniny. Keďže sú PHA produkované mikroorganizmami, najlepšie poznatky o degradácii týchto prírodných polyesterov pochádzajú zo štúdií o PHA depolymerázach. To sú látky taktiež produkované mikroorganizmami [36].

PHA depolymerázy sú karboxylesterázy a patria do skupiny α/β -hydroláz [37]. Katalytická doména týchto enzýmov je zložená triádou S-H-D (serínové, histidínové a aspartátové zvyšky). Takéto katalytické miesto je prítomné aj v lipázach, esterázach a serínových proteázach [38]. Majú vysokú substrátovú špecifitu a proces biodegradácie závisí na stave polyhydroxyalkanoátu – existujú rozdiely medzi degradáciou amorfnej a kryštalickej formy [39].

Depolymerázy môžu byť extracelulárne alebo intracelulárne. V prípade extracelulárnych depolymeráz prebieha degradácia PHA mimo bunky, pričom sú potrebné enzýmy produkované buď rovnakým alebo aj iným mikroorganizmom ako konkrétny polyhydroxyalkanoát, ktorý je následne hydrolyzovaný [40]. Tieto enzýmy sú schopné degradovať PHA v kryštalickej forme. Degradácia PHA priamo v bunke je podmienená metabolizmom mikroorganizmu a zúčastňujú sa jej intracelulárne PHA depolymerázy, ktoré rozkladajú PHA v natívnej (amorfnej) forme. Baktérie sú vďaka tomuto procesu schopné využiť zásobu energie a uhlíka, ktoré predtým uložili do týchto granúl PHA biosyntetickou dráhou [41].

Všeobecne je degradácia polyhydroxyalkanoátov je závislá na podmienkach v okolí daného procesu, napríklad prístup kyslíka a vody. Polyhydroxyalkanoáty sa podobne ako iné polyméry najskôr štiepia na menšie časti (oligoméry až monoméne jednotky) pomocou depolymeráz. Následne dôjde k rozkladu týchto produktov na jednoduchšie zlúčeniny, v aeróbnom prostredí sa rozpadnú až na vodu a oxid uhličitý. V prípade nedostatku kyslíka vzniká metán a voda [31].

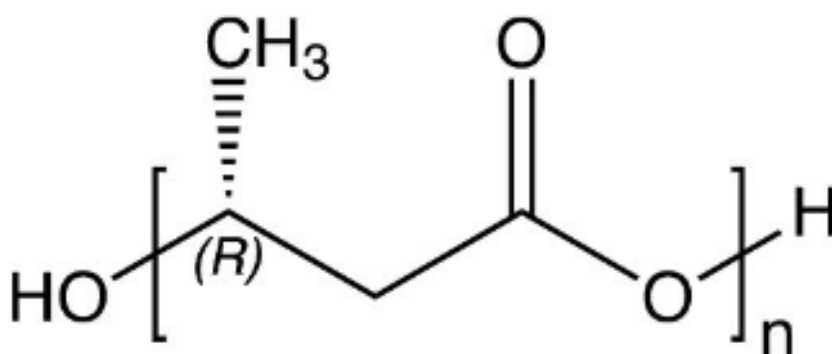
V prostredí sú PHA pomerne dobre odbúrateľné, k degradácii môže dochádzať aj inak ako za pomoci mikrobiálnych depolymeráz – príkladom je tepelná degradácia, chemická hydrolýza či žiarenie [33].

2.1.4 Prehľad najznámejších homopolymérov a kopolymérov

Najrozšírenejšími polymérmí skupiny PHA sú homopolyméry poly(3-hydroxybutyrát), poly(3-hydroxyvalerát) a polyhydroxyhexanoát. Ďalej sú z hľadiska vlastností zaujímavé kopolyméry ako je napríklad poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát), poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyhexanoát) alebo semikryštalický poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) [42].

Najznámejším zástupcom polyhydroxyalkanoátov produkovaný veľkým množstvom baktérií je jednoduchý lineárny homopolymér poly(3-hydroxybutyrát) – P(3HB), ktorý patrí do skupiny *scl*-PHA. Skladá sa z monomérnych jednotiek *R*-3-hydroxybutyrátu a jedná sa o opticky aktívnu zlúčeninu, ktorej vzorec je na obrázku 5 [43].

Svojimi vlastnosťami je podobný syntetickému polypropylénu. Je krehký, má piezoelektrické vlastnosti a nie je flexibilný [44]. Izolovaný polymér je semikryštalický (tenké laminárne kryštály) a termoplastický, čo limituje jeho praktickú aplikáciu v materiálovom odvetví [45]. Problémom je aj fakt, že teplota degradácie P(3HB) je len o niekoľko stupňov vyššia ako jeho teplota topenia, čo spôsobuje nestabilitu v štádiu spracovania [46]. Tieto prekážky je možné riešiť rôznymi modifikáciami polyméru, ako už bolo spomenuté v kapitole 2.1.2. Biosyntéza a biodegradácia intracelulárneho P(3HB) prebiehajú v bunkách súčasne, metabolizmus P(3HB) má teda cyklický mechanizmus. Produktom degradácie P(3HB) je monomér 3-hydroxybutyrát (3HB), ktorý ovplyvňuje intracelulárny osmotický tlak a pH v cytoplazme bunky, čím slúži ako potenciálna ochrana mikroorganizmu pred spomínanými stresovými faktormi [47].



Obrázok 5: Vzorec P(3HB) [41]

Ďalším zaujímavým homopolymérom je poly(4-hydroxybutyrát) – P(4HB), ktorý má vyššiu flexibilitu, je termoplastický a chemicky je najviac zhodný s kyselinou polyglykolovou (PGA). Má vysokú pevnosť v ťahu [30]. Jeho degradáciou vzniká 4-hydroxybutyrát, čo je látka telu vlastná a tento homopolymér je preto ľahko vstrebateľný [48].

Skúmané je aj veľké množstvo kopolymérov. Vďaka rozličným monomérnym jednotkám a pomeru monomérneho zastúpenia v heteropolyméri má každý jedinečné vlastnosti, čo predstavuje možnosť ich využitia v akejkoľvek sfére podľa požiadaviek na daný materiál.

Poly(3-hydroxybutyrát-*co*-3-hydroxyvalerát) – PHBV, je charakterizovaný ako menej kryštalický polymér, ktorý je flexibilnejší ako samotný P(3HB). Vlastnosti je možné upravovať zmenou obsahu 3-hydroxyvalerátu (3HV) v kopolyméri. So zvyšujúcim sa zastúpením 3HV dochádza k poklesu Youngovho modulu a k nárastu rázovej húževnatosti. Zvyčajne sa vyrába pridaním kyseliny valérovej do fermentačného média pri kultivácii [49].

Poly(3-hydroxybutyrát-*co*-4-hydroxybutyrát) – P(3HB-*co*-4HB), je momentálne jedným z najviac skúmaných kopolymérov PHA. Jeho štruktúru môžeme vidieť na obrázku 6 [35]. So stúpajúcim obsahom kyseliny 4-hydroxymaslovej (4HB) má elastoménejší charakter a vynikajúce predĺženie pri pretrhnutí [44]. Prevala 4HB monoméru tiež znižuje teplotu skelného prechodu a zvyšuje tepelnú stabilitu tohto bioplastu [50]. Monomér 4HB vylepšuje aj biokompatibilitu a *in-vivo* degradáciu daného kopolyméru. Monomérne zloženie je ovplyvniteľné pomocou pomeru substrátov pri kultivácii. Prídavkom prekursorov ako sú

Hydrofobicita týchto materiálov môže byť využitá pri produkcii vodeodolných materiálov. Poly(3-hydroxybutyrát) nie je lepkavý po roztavení, čo je výhodná vlastnosť pre materiály v textilnom priemysle [54]. V neposlednom rade je možné ich využiť aj pri výrobe lepidiel a farieb [13].

Biokompatibilita PHA posilňuje ich uplatnenie vo farmaceutickom priemysle či v medicíne. Vo forme nanočastíc môžu byť využité ako nosiče liečiv [55]. Napríklad P(3HB) bol využitý ako transportný systém pre rubomycín a preukázal dobrú stabilitu. Ako matricový nosič liečiv bol skúmaný aj biopolymér P(3HB-co-3HV). Pri cieleňom uvoľňovaní antibiotík pomocou P(3HB-co-3HV) sa zistilo, že rýchlosť uvoľňovania liečiva súvisela s obsahom monoméru 3HV [11]. P(3HB-co-4HB) má využitie v kardiovaskulárnom odvetví, pri hojení rán. Ďalej sa aplikuje v ortopédii či tkanivovom inžinierstve [56]. P(4HB) je biologicky odbúrateľný a produktom rozpadu je 4-hydroxybutyrát, čo je prirodzene sa vyskytujúca látka v cicavcoch. Od roku 2007 je jediným polyhydroxyalkanoátom schváleným FDA (z angl. *Food and drug administration* – Americká správa potravín a liečiv) pre lekárske účely [57]. PHBV má dobrú absorpčnú kapacitu, je netoxický, piezoelektrický a termoplastický. Tieto charakteristiky robia kopolymér zaujímavým v biomedicínskych aplikáciách – systémy s riadeným uvoľňovaním liečiv, stenty, vstrebateľné chirurgické nite, biosenzory a iné [58].

2.2 Metódy analýzy polyhydroxyalkanoátov v biomase

Bioplasty na bázi PHA by mohli nahradiť syntetické materiály vyrábané z fosílnych zdrojov. Vďaka biodegradabilite, jednoduchej recyklovateľnosti a biokompatibilite sú menšou záťažou pre životné prostredie a je možné ich aplikovať v rozličných odvetviach, vid' kapitola 2.1.5. Najvhodnejšou metódou získavania polyhydroxyalkanoátov je mikrobiálna výroba. Trvalo udržateľná produkcia PHA zahŕňa rôzne technické aspekty – voľba vhodných substrátov pri kultivácii, samotný biotechnologický proces kultivácie, a tiež následné izolovanie a spracovanie polyesteru ako intracelulárneho produktu z biomasy [20].

Produkcia polyhydroxyalkanoátov je však finančne náročná. Závislosť produkcie na zdroji uhlíka je možné riešiť pomerne jednoducho. Ako uhlíkatý substrát vedľa mikroorganizmy využiť napríklad odpadné látky, oleje a iné vedľajšie produkty z potravinárskeho priemyslu, ďalej tiež odpady z agrikultúry [35].

Celkové náklady produkcie bioplastov ovplyvňuje aj metóda izolácie a purifikácie PHA z biomasy. Boli skúmané a vyvinuté extrakčné metódy na báze vhodných rozpúšťadiel, prípadne chemických, enzymatických a mechanických postupov. Nedávno boli implementované nové stratégie s implementáciou tzv. „zelených rozpúšťadiel“ v špecifických podmienkach, iónových kvapalín, superkritických rozpúšťadiel, hypotonickovej bunkovej dezintegrácie na uvoľnenie granúl PHA a aniónových povrchovo aktívnych látok [59].

Pre efektívnu priemyselnú mikrobiálnu produkciu polyhydroxyalkanoátov je dôležitý samotný kultivačný proces. Voľba vhodného mikroorganizmu, substrátov a podmienok je základným krokom k finálnemu produktu, avšak optimalizácia celého procesu pre najlepší možný kvalitatívny a kvantitatívny výtťažok je veľmi významným bodom pre lacno dostupnú produkciu polyhydroxyalkanoátov vo väčšom množstve. Preto sú skúmané rôzne metódy kvantifikácie a kvalitatívnej analýzy PHA priamo v biomase, čo umožní monitorovanie

výrobného procesu „online“. Keďže maximálny obsah PHA v biomase je kritickým faktorom v prípade posúdenia efektivity celého kultivačného kroku, tento prístup monitorovania by jednoducho ovplyvnil výsledný výťažok a slúžil by tiež ako kontrolný bod kvality [60]. Priame postupy analýzy bez predchádzajúcej extrakcie a purifikácie vzoriek tiež minimalizujú kroky spôsobujúce chyby, vyžadujú menej času a materiálov a výsledkom je metóda vhodná pre rutinné využitie.

Mnohé z doteraz úspešne aplikovaných analytických metód sú však náročnou záležitosťou, je preto snahou zvoliť vhodnú metódu, ktorá by bola efektívna a rýchlejšia [35]. Prehľad niektorých využívaných analýz pri štúdiu PHA je diskutovaný v nasledujúcich kapitolách.

2.2.1 Chromatografické metódy

Plynová chromatografia (GC) je najčastejším a veľmi presným analytickým nástrojom k získaniu informácií o bakteriálnom PHA. Problémom je však nielen zdĺhavá príprava vzoriek a priebeh analýzy, ale tiež cena. Pred samotnou analýzou plynovou chromatografiou musia byť vzorky podrobené procesu transesterifikácie, aby boli PHA transformované na prchavé methylestery monomérnych jednotiek. Ďalšou prekážkou, s ktorou sa stretli pri výskume [61] je fakt, že v prípade prítomnosti nenasýtených bočných reťazcov v *mcl*-PHA bola aplikácia tejto analytickej metódy pri kvantifikácii PHA neúspešná. Dôvodom bola tvorba nadmerného množstva vedľajších zlúčenín, ktoré interferovali s typickými píkmi polyesterov. Vymysleli teda postup, vďaka ktorému zabránili tvorbe vedľajších produktov – prídavkom Lewisovej kyseliny (fluorid boritý) v metanole, v bezvodom prostredí. V porovnaní s klasickou metódou, ktorá využíva transesterifikáciu (kys. chlorovodíková a propanol) sa objavilo iba niekoľko prídavných píkov a výsledky tak neboli skreslené. Táto metóda sa preukázala ako vhodný postup pri analýze purifikovaných polymérov *mcl*-PHA, ale aj polyhydroxyalkanoátov priamo v biomase bez predchádzajúcej izolácie. Bol využitý plameňovo-ionizačný detektor (FID). Metóda GC-FID tiež do značnej miery závisí od zahrnutia vhodných analytických štandardov PHA [61]. Dostupnosť rozličných štandardov je však obmedzená, keďže skupina monomérnych jednotiek PHA je rozmanitá.

Na druhej strane, plynová chromatografia v spojení s hmotnostnou spektrometriou (GC-MS) umožňuje identifikovať PHA prostredníctvom porovnania vzoru hmotnostných spektier so štandardnou referenčnou knižnicou – NIST (z angl. *National Institute of Standards and Technology*), ktorá má už vytvorenú širokú škálu dostupných referencií. V jednej štúdií bola využitá tandemová metóda plynovej chromatografie a hmotnostnej spektrometrie na kvantifikáciu polyhydroxyalkanoátov obsahujúcich 4-uhlíkové až 16-uhlíkové monoméry, a to dokonca aj bez použitia analytických štandardov pre GC. Medzi počtom uhlíkov PHA a retenčným časom/faktorom odozvy bola preukázaná silná lineárna korelácia [62].

Počas kyslého štiepenia hlavného reťazca polyméru v konvenčných analytických testoch vznikajú už spomínané vedľajšie produkty, ktoré interferujú s výsledkami [61]. Bola preto skúmaná ďalšia metóda – redukčná depolymerizácia *mcl*-PHA. Tento postup viedol k tvorbe monomérnych diolov. Tie je možné oddeliť a kvantifikovať pomocou HPLC/MS (vysokoúčinná kvapalinová chromatografia v tandeme s hmotnostnou spektrometriou). Redukcia sa uskutočňuje pri izbovej teplote tetrahydridohlinitanom lítym po dobu 5–15 minút.

Nová metóda je rýchlejšia a jednoduchšia ako predchádzajúce a je kvantitatívna. Hoci táto jedнокroková príprava vzorky nasledovaná HPLC-MS detekciou produktov bola doteraz aplikovaná a validovaná len pre izolované a purifikované PHA, predpokladá sa jej budúca implementácia a optimalizácia aj pri štúdiu PHA priamo v biomase [63].

2.2.2 Termogravimetrická analýza a diferenčná skenovacia kalorimetria

Termogravimetrická analýza (TGA) je lacný a rýchly spôsob tepelnej analýzy vzoriek pri charakterizácii zloženia rôznych materiálov. Táto metóda je založená na princípe kontinuálneho vyhodnocovania zmien hmotnosti vzorky v závislosti na zmene teploty a/alebo času. Proces prebieha za zvolených podmienok ohrevu a ochladzovania, pričom celá analýza môže prebiehať v atmosfére dusíka, kyslíka, argónu, vzduchu alebo vákua [64]. Kinetika degradačnej reakcie TGA hodnotí stabilitu materiálu za rôznych tepelných podmienok. To je dôležité pre polyméry používané v priemysle, pretože poskytuje cenné informácie týkajúce sa štrukturálnych zmien vo vzorke [65].

Termogravimetrická analýza bola prevedená pri štúdiu tepelnej stability biosyntetizovaného polyhydroxyalkanoátu [66]. Taktiež bola využitá k analýze PHA produkovaného baktériou *Bacillus subtilis*. Teplota sa menila o 50 °C každú minútu, pričom začiatok experimentu bol pri 0 °C. Analýza prebiehala v inertnej atmosfére s dusíkom. Vzorka bola stabilná až do dosiahnutia teploty 237 °C. Nad touto teplotou došlo k zmene hmotnosti z dôvodu odparenia molekúl vody, následne hmotnosť klesala iba v niektorých špecifických intervaloch. Proces úbytku hmotnosti bol ustálený pri teplote 656 °C. Tieto úbytky súvisia s degradáciou polyméru [67].

Metóda diferenčná skenovacia kalorimetria (DSC) patrí taktiež medzi techniky termickej analýzy. Má využitie pri určení skelných prechodov a kryštalizácií látok. Princípom je rozdiel tepelného toku medzi referenčnou a mernou celou – tá obsahuje vzorku. Obe nádoby sú ohrievané/chladené konštantnou rýchlosťou. Keďže v mernej cele sa nachádza vzorka, tepelný tok sa bude líšiť voči referenčnej cele z dôvodu špecifickej štruktúry vzorky a teda jej fázových zmien počas tohto procesu [25].

V štúdií [67] boli výsledkom DSC analýzy vzorky polyhydroxyalkanoátu produkovaného baktériou *B. subtilis* dva píky. Analýza prebiehala v teplotnom rozmedzí 20–200 °C s krokom 10 °C za minútu. Prvý pík mal maximum pri 115 °C a značil odparenie molekúl vody, pričom bol endotermický. Ďalej mala reakcia exotermický charakter, blízko 167 °C pravdepodobne došlo k rekryštalizácií.

2.2.3 Spektroskopia nukleárnej magnetickej rezonancie

V intenzívnom magnetickom poli môžu niektoré atómové jadrá absorbovať energiu emitovaného žiarenia a byť diferencované v rámci tej istej molekuly. Spektroskopia nukleárnej magnetickej rezonancie (NMR) analyzuje zodpovedajúci frekvenčný rozsah tejto energie a čas potrebný na to, aby sa jadrá vrátili na izbovú teplotu – čo je takzvaný relaxačný čas. Molekulárny pohyb a interakcie s rôznymi magnetickými prostrediami predstavujú rôzny relaxačný čas jadier. Vieme tak určiť molekulárnu konformáciu, fyzikálno-chemické vlastnosti, pozorovať fázové zmeny, rozpustnosť a difúziu molekúl [68]. NMR spektroskopia bola viackrát využitá vo vedeckej sfére na skúmanie rôznych aspektov PHA – ich kopolymérne

zloženie, sekvenciu väzieb či štúdium metabolických dráh. Avšak čas merania pomocou tejto analytickej metódy môže byť veľmi zdĺhavý, preto NMR nie je až tak vhodnou analýzou na rutinné stanovenie zloženia kopolymérov [69].

V prípade experimentu [70] bola vyvinutá metóda protónovej nukleárnej magnetickej rezonancie pre kvantitatívnu analýzu obsahu polyhydroxyalkanoátu v *Cupriavidus necator* H16, *Azotobacter vinelandii* a zmiešaných mikrobiálnych kultúrach z odpadovej vody. Na rozdiel od predchádzajúcich metód bola zavedená jedнокroková extrakčná metóda PHA, čím sa uľahčila priama analýza ^1H NMR. Bol použitý deuterovaný chloroform. Presnosť metódy bola overená porovnaním s plynovou chromatografiou (GC). Uskutočnilo sa aj fluorescenčné farbenie nílskou modrou, ktoré slúžilo ako nezávislý a kvalitatívny indikátor intracelulárneho obsahu PHA. Podľa výsledkov danej štúdie je táto metóda vhodná pre nedeštruktívnu kvantifikáciu celkového obsahu PHA a stanovenie zloženia kopolyméru v rôznych kultúrach. Iný výskum tiež ukázal, že bolo možné použiť ^{13}C NMR spektrá lyofilizovaných vzoriek *Pseudomonas sp.* na priame a nedeštruktívne monitorovanie P(3HB) nahromadeného týmto organizmom [71].

2.2.4 Vibračná spektroskopia

Vibračná spektroskopia poskytuje informácie o makromolekulách s ohľadom na ich zloženie, štruktúru, konformácie a intra/intermolekulové interakcie. Metódy vibračnej spektroskopie fungujú na princípe pozorovania rotačne-vibračných energetických prechodov. Dôležitá je v tomto prípade zmena dipólového momentu molekuly [35]. Vibrácie molekúl sú periodické zmeny dĺžky väzieb medzi atómami a väzbových uhlov. Infračervené žiarenie je elektromagnetické žiarenie, ktoré má vlnovú dĺžku väčšiu ako viditeľné svetlo a kratšiu než mikrovlny.

Interakciou elektromagnetického žiarenia so študovanými látkami získavame vibračné spektrá (závislosť absorbancie/transmitancie na vlnovej dĺžke/vlnovom čísle). Vibračné spektrum sa delí na dve oblasti. Prvá oblasť v rozmedzí $4\ 000\text{--}1\ 500\ \text{cm}^{-1}$ obsahuje charakteristické píky pre rôzne špecifické väzby molekúl, vďaka čomu vieme určiť prítomnosť istých funkčných skupín v danej zlúčenine. Rozsah vlnových čísel $1\ 500\text{--}400\ \text{cm}^{-1}$ prislúcha tzv. odtlačku prstu (z angl. *fingerprint region*). Ten je jedinečný pre každú látku [35].

Najviac využívané metódy vibračnej spektroskopie v biofyzikálnych štúdiách a analýzach sú infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou (FTIR – z angl. *Fourier transform infrared spectroscopy*) a Ramanova spektroskopia [72].

Analýza pomocou FTIR je rýchla a efektívna. Táto metóda nie je voči vzorkám deštruktívna a nevyžaduje ani využitie rozličných toxických rozpúšťadiel. Výhodou je fakt, že pre samotnú analýzu postačuje malé množstvo vzorky. Nevýhodou je možná interferencia vody (či už vo vzorke alebo vo forme vzdušnej vlhkosti) a oxidu uhličitého. Sleduje sa ňou prevažne vibrácia polárnej väzby. Často je spájaná s ATR technikou (z angl. *attenuated total reflection* – zoslabený úplný odraz), ktorá je založená na znásobenom úplnom odraze dopadajúceho žiarenia na fázovom rozhraní vzorky a kryštálu – napr. diamant či germánium, podmienkou je vysoký index lomu kryštálu [73].

Ramanova spektroskopia je často doplnkovou technikou k FTIR analýze. Je to neinvazívna metóda a funguje na princípe Ramanovho rozptylu – neelastický rozptyl monochromatického žiarenia (laser). Využíva sa najmä pri štúdiu nepolárnych väzieb [74].

Infračervená spektroskopia môže byť založená aj na meraní žiarenia ktoré vzorkou prechádza. V takom prípade ide o transmisnú spektroskopickú techniku. Najviac používaná je metóda KBr tabliet. KBr (bromid draselný) je kryštalická látka odolná voči teplu, avšak vykazuje hygroskopické vlastnosti. Príprava takýchto vzoriek je náročnejšia v porovnaní s ostatnými metódami v tejto kapitole [75].

Keďže je táto diplomová práca zameraná na využitie infračervenej spektroskopie pri štúdiu PHA, konkrétne aplikácie a výskum v danej oblasti sú zhrnuté v kapitole 2.3 o súčasnom stave riešenej problematiky.

2.2.5 Iné analytické metódy

Okrem už spomenutých analytických metód existuje ešte škála rozličných techník, ktoré je možno úspešne využiť pri štúdiu PHA – UV-VIS spektroskopia, turbidimetria, prietoková cytometria a iné analytické metódy [76].

Napríklad kombinácia fluorescenčnej in-situ hybridizácie (FISH – z angl. *fluorescent in-situ hybridization*) s technikami farbenia pri štúdiu životaschopnosti buniek umožňuje pozorovať intracelulárne PHA v mikroorganizmoch, ale aj v komplexných mikrobiálnych systémoch [77].

S využitím chemického farbenia buniek a následnej analýzy obrazu bola tiež skúmaná distribúcia PHA v biomase – v štúdií [78] úspešne aplikovali CLSM (z angl. *confocal laser scanning microscopy* – konfokálna skenovacia mikroskopia využívajúca laser) pre zistenie frakcie baktérií uchovávajúcich PHA a priemerný obsah PHA v týchto baktériách.

V ďalšom experimente sú uvádzané poznatky z kinetických štúdií tvorby a degradácie granúl polyhydroxyalkanoátov v mikroorganizme *W. eutropha* získaných pomocou transmisnej elektrónovej mikroskopie (TEM – z angl. *transmission electron microscopy*). V rastovom médiu bol prvýkrát odhalený fenotyp buniek v skorých (počiatočných) štádiách tvorby granúl. V strede buniek boli pozorované tmavo zafarbené „mediačné prvky“ s pripojenými malými granulami. Predpokladá sa, že slúžia ako nukleačné miesta pre iniciáciu tvorby granúl PHA. Snímky TEM tiež odhalili, že keď boli bunky zavedené do média s obmedzeným množstvom dusíka, veľkosť buniek sa zväčšila dvojnásobne až trojnásobne a bunky počas rastu podstúpili aj ďalšie objemové zmeny [79].

2.3 Aplikácia infračervenej spektroskopie a metódy jej vyhodnotenia pri štúdiu polyhydroxyalkanoátov – súčasný stav riešenej problematiky

V kapitole 2.2 boli diskutované najčastejšie používané metódy pri kvantitatívnej a kvalitatívnej analýze polyhydroxyalkanoátov. Väčšina týchto metód síce ponúka presné výsledky o vlastnostiach a množstve PHA, často je však potrebné polyhydroxyalkanoáty z biomasy extrahovať, purifikovať alebo vzorky podrobiť rozličným iným krokom pred ich samotnou analýzou – napríklad transesterifikácia PHA pre možnosť ich rozboru pomocou GC-FID. Celý proces je preto náročný na čas a často nebýva lacný. Mnoho z týchto analýz je tiež vhodných skôr pre vedecké účely než priemysel. Z tohoto dôvodu je snahou zvoliť a úspešne aplikovať v praxi techniku, ktorá by bola presná, efektívna, rýchla a lacná. Medzi sľubné analytické metódy, ktoré by mohli štúdium mikrobiálnych polyesterov urýchliť a prípadne umožniť online screening priamo pri biotechnologickej výrobe týchto látok patrí infračervená (vibračná) spektroskopia [80]. O tom svedčí aj mnoho štúdií, ktoré sa snažia túto metódu optimalizovať a využiť.

Topenie a kryštalizácia P(3HB) a P(3HB-co-3HHx) boli pozorované pomocou in-situ FTIR v kombinácii s DSC metódou. Počas topenia sa intenzity charakteristických píkov kryštalinity znižovali (pri 980, 1 230, 1 275 a 1 724 cm^{-1}) a naopak amorfných pásov (1 186 a 1 740 cm^{-1}) zvyšovali. Opak tohoto trendu bol zas pozorovaný počas kryštalizácie. Zistilo sa tiež, že pomer absorpcie pásu pri 1 230 cm^{-1} k referenčnému pásu pri 1 453 cm^{-1} môže účinne a nedeštruktívne stanoviť kryštalinitu PHA metódou FTIR. Metóda by sa mohla ďalej použiť na štúdium sekundárnej kryštalizácie PHA [81].

Experiment [82] skúmal možnosti využitia ATR-FTIR pri štúdiu in-situ natívnych P(3HB) granúl nahromadených v mikrobiálnych bunkách suspendovaných vo vodnom roztoku. Pre meranie nebola prevedená žiadna úprava vzorky, dokonca ani jej sušenie. Okamžitá kryštalinita biopolyesteru v bunke je meraná počas stabilnej sekundárnej fázy absorpcie infračerveného žiarenia. Teda po počiatkovej fáze (0–5 minút), v ktorej signálu dominuje voda a pred finálnou fázou (30+ minút), v ktorej nadmerná dehydratácia môže spôsobiť umelú kryštalizáciu PHA. Pík 1 184 cm^{-1} je najcitlivejší na konformačné zmeny prítomné v natívnom polyestere [82].

Infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou (FTIR) bola v použitá aj na rýchlu kvantifikáciu polyhydroxyalkanoátov v zmiešanej a čistej kultúre bakteriálnej biomasy. Na výsledné spektrá FTIR boli aplikované tri rôzne metódy štatistickej analýzy – regresia, metóda najmenších štvorcov (PLS) a nelineárna analýza. Výsledky boli vzťahované k plynovej chromatografii, ktorá slúžila ako referencia. Všetky metódy dokázali pomerne rovnako určiť obsah PHA v biomase zmiešanej kultúry v rozsahu PHA 0–44 % hmotn. obsahu sušiny. Avšak pre koncentrácie PHA v rozmedzí 0–93 % obsahu sušenej biomasy bola metóda PLS najúčinnějšía [83].

V inej štúdií tiež aplikovali na spektrá získané technikou FTIR štatistickú metódu PLS. Celkovo bolo získaných 237 opakovaných spektier z 34 vzoriek, ktoré obsahovali biomasu s poly-3-hydroxybutyrátom. Využitá bola rekombinantná *Escherichia coli*. Presný obsah PHA bol stanovený plynovou chromatografiou. Pomocou PLS regresie dokázali priradiť infračervené spektrá k referenčnému obsahu PHA a korelačný koeficient medzi jednotlivými nameranými hodnotami týmito rozdielnymi technikami bol 0,988 [84].

Vybrané kopolyméry P(3HB-*co*-4HV) a P(3HB-*co*-4HHx) boli študované pomocou infračervenej spektrometrie s Fourierovou transformáciou napríklad aj v diplomovej práci [11]. Bol pozorovaný pomer píkov 1 230 cm⁻¹ a 1 180 cm⁻¹. V prípade, že je absorbanca vyššia pri píku 1 180 cm⁻¹ je PHA v amorfnom stave. V tejto práci bol nameraný väčší pomer týchto píkov pri P(3HB-*co*-4HV) produkovaným baktériou AH30. To znamená, že je menej kryštalický ako P(3HB-*co*-4HHx) biosyntetizovaný baktériou AFN2 [11].

Poly(3-hydroxybutyrát-*co*-3-hydroxyvalerát) – P(3HB-*co*-14%HV) bol v článku [85] podrobený 2D korelačnej FTIR analýze, pričom boli skúmané zmeny súvisiace s kryštalizáciou vzorky. Aplikovaním PCA (analýza hlavných komponent) na tieto dáta bolo ďalej potvrdené, že hlavným faktorom zmeny je stav polyhydroxyalkanoátu. Podobne ako v [81] sa preukázal nárast píkov typických pre kryštalický stav v prípade, že píky charakterizujúce amorfnú fázu klesali, a tiež naopak. Ukázalo sa, že PCA je vhodná metóda vyhodnotenia FTIR spektier pri stanovení počtu dynamických znakov a umožňuje relatívne a objektívne sledovanie kinetiky kryštalizácie [85].

Ramanova spektroskopia bola využitá pri kvantitatívnej analýze homopolyméru P(3HB). Baktérie *Cupriavidus necator* H16 s rôznym obsahom polyméru sú porovnávané so zvolenými referenčnými internými štandardmi PHA. Táto štúdia vytvorila kalibračné krivky, ktoré pokrývajú možný obsah polyhydroxyalkanoátu P(3HB) v bunkách až do 90 % celkovej hmotnosti sušiny. Hlavným znakom PHA je pozorovaný pík v oblasti 1 736 cm⁻¹, ktorý predstavuje vibráciu väzby karbonylovej skupiny a značí tak prítomnosť polyesteru. V spektrálnej oblasti 800–1 800 cm⁻¹ boli vybrané dva vnútorné referenčné štandardy – DNA pri 786 cm⁻¹ a amid I pri 1 662 cm⁻¹. Výsledky spektrálnej analýzy boli porovnávané s výsledkami plynovej chromatografie [86].

V podobnej štúdií [87] boli pozorované spektrálne zmeny indukované prítomnosťou intracelulárneho poly-3-hydroxybutyrátu pomocou Ramanovej spektroskopie. V experimente bol použitý producent PHA *Cupriavidus necator* DSM 428 (H16), jeho mutantný kmeň DSM 541 – neprodukuje PHA, a tiež čistý extrahovaný P(3HB). Intenzita Ramanovho pásma pri vlnovom čísle 1734 cm⁻¹ sa prejavila ako vhodná oblasť monitoringu produkcie a spotreby P(3HB). Výsledky boli lineárne závislé od koncentrácie P(3HB), ktorá bola stanovená paralelnou HPLC analýzou [87].

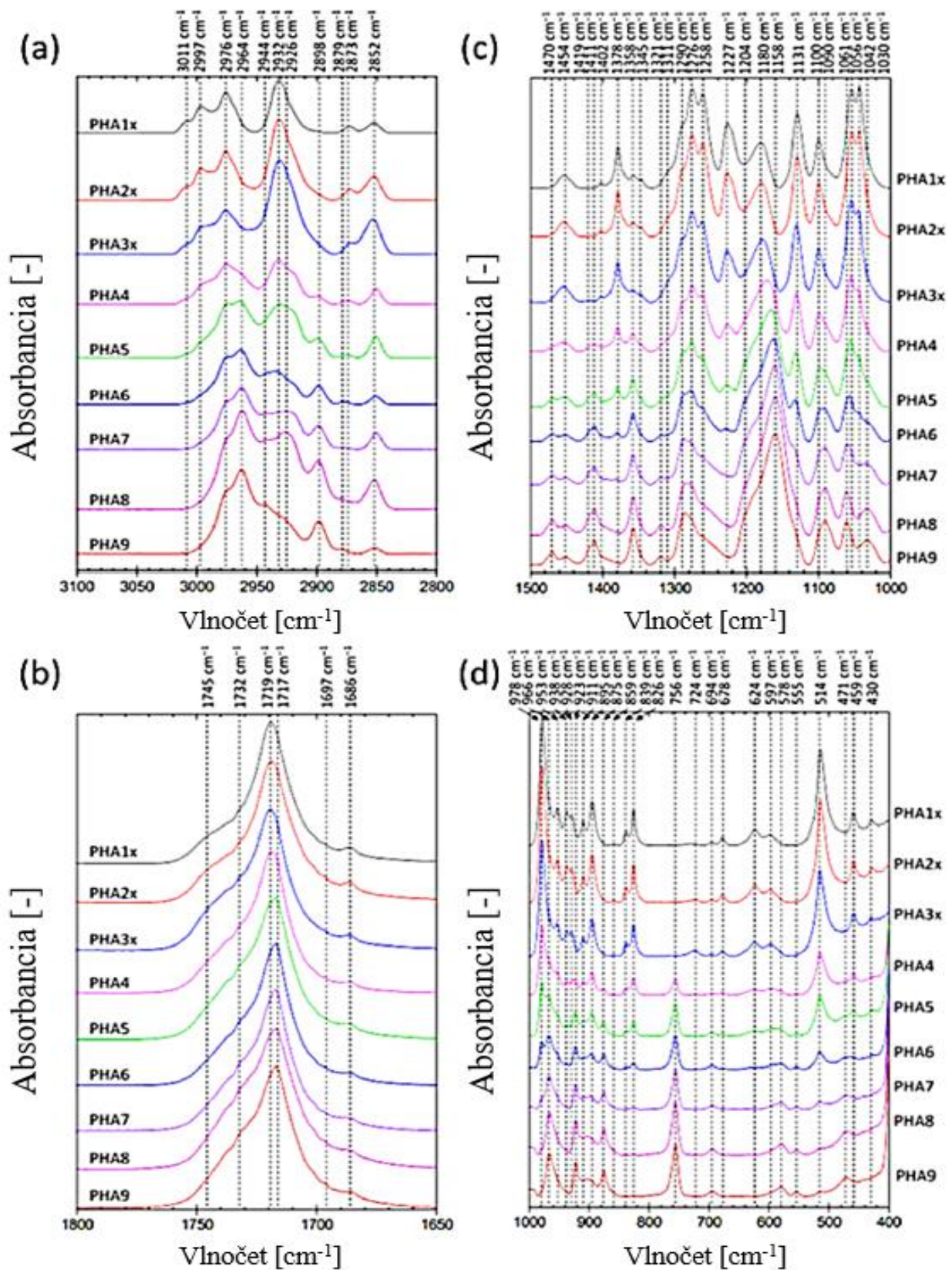
Ďalej bol kombináciou fluorescenčného zobrazovania a Ramanovej spektroskopie pozorovaný poly-3-hydroxybutyrát z kvalitatívneho hľadiska a jeho vplyv na identifikáciu samotného mikroorganizmu. Baktérie akumulujú intracelulárne PHA v rôznych formách v závislosti od bunkovej aktivity. V stacionárnej fáze je tento polyester prítomný v kryštalickej forme, zatiaľ čo v exponenciálnej fáze je v stave amorfnom. Keďže identifikácia rôznych baktérií patriacich do rôznych skupín bola pozorovaná len pre baktérie s amorfným PHA, výsledok štúdie značí vplyv veku mikroorganizmov na výsledky ich identifikácie. Baktérie v exponenciálnej fáze boli úspešne identifikované pomocou mikro-Ramanovej spektroskopie – tá dokonca rozlišuje medzi baktériami rovnakého druhu, ale kultivovanými za rôznych podmienok. Prítomnosť poly-3-hydroxybutyrátu v mikrobiálnych bunkách nebráni Ramanovej spektroskopickému identifikácii, pokiaľ sú mikroorganizmy vo fáze exponenciálneho rastu [88].

V [89] je prezentovaný iný postup na stanovenie zloženia kopolyméru poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerátu) (P3HBV) pomocou ATR-FTIR. Je založený na lineárnej závislosti zvolenej a normalizovanej intenzity absorpčného pásu s molárnym zlomkom opakujúcich sa monomérnych jednotiek. Rozdiely v kryštalinite vzorky ovplyvňujú reprodukovateľnosť výsledkov, preto vzorku polyméru rýchlo ochladili z taveniny priamo na povrchu ATR a následne analyzovali. Analyzovali sa údaje získané zo 14 vzoriek s molárnou frakciou 3-hydroxybutyrátových opakujúcich sa jednotiek (X3HB) v rozsahu od 0,15 do 1. Analýza údajov ukázala, že normalizovaná intenzita pásu pri 968 cm^{-1} a $1\,004\text{ cm}^{-1}$ je najspoľahlivejšia na predpovedanie zloženia P3HBV. Navrhovaná metóda sa ukázala ako užitočná pre jednoduchý a rýchly odhad zloženia P3HBV.

Okrem štúdia PHA priamo v biomase pomocou FTIR techniky boli skúmané aj extrahované polyhydroxyalkanoáty vo forme fólií [90]. Experiment zahŕňal niekoľko vzoriek s rozličným monomérnym zložením kopolyméru P(3HB-co-4HB), jednu vzorku kopolyméru P(3HB-co-4HB-co-3HV) a jednu vzorku homopolyméru P(3HB) – vid' tabuľka 2. Producenti polyhydroxyalkanoátov boli *Aneurinibacillus* sp. H1 a *Cupriavidus Necator* H16. Výsledné spektrá preukázali podľa očakávaní rozdielnosť v chemickej štruktúre jednotlivých polymérov. Identifikované boli viaceré významné píky či ich posuny (obrázok 7), ktoré sú špecifické pre prítomné monoméry a ich pomer. Znižovaním množstva monoméru 3-hydroxybutyrátu a zvyšovaním prítomnosti 4-hydroxybutyrátu sa najskôr znižovala kryštalinita vzorky. Pri vyššom obsahu 4-hydroxybutyrátu bola vzorka opäť kryštalickejšia. To svedčí o postupnej zmene kryštalickej mriežky vo vzorke. P(3HB) a P(4HB) teda nie sú štrukturálne izomorfy a kryštalit tak nevie inkorporovať iný typ monoméru do svojej štruktúry bez značnej deformácie.

Tabuľka 2: Prehľad vzoriek zo štúdie [90]

Názov vzorky	Bakteriálny producent	Monomérne zloženie		
		3HB [mol. %]	4HB [mol. %]	3HV [mol. %]
PHA1x	<i>C. necator</i> H16	100%	–	–
PHA2x	<i>C. necator</i> H16	98.5%	1.5%	–
PHA3x	<i>C. necator</i> H16	93.5%	6.5%	–
PHA4	<i>Aneurinibacillus</i> sp. H1	64%	36%	–
PHA5	<i>Aneurinibacillus</i> sp. H1	58%	42%	–
PHA6	<i>Aneurinibacillus</i> sp. H1	26%	74%	–
PHA7	<i>Aneurinibacillus</i> sp. H1	16%	84%	–
PHA8	<i>Aneurinibacillus</i> sp. H1	10%	90%	–
PHA9	<i>Aneurinibacillus</i> sp. H1	13%	54%	33%



Obrázok 7: Signifikantné píky FTIR vo vzorkách štúdie [90]

Väčšina doteraz úspešne aplikovaných metód infračervenej spektroskopie súvisí so štúdiom homopolymérov. Dôležité je však skúmať kopolyméry a ich monoméne zloženia z dôvodu ich vhodných fyzikálnych vlastností a teda potenciál na aplikáciu v praxi. Pri obširnej spektrálnej analýze pracujeme s veľkým množstvom dát, čo predstavuje náročný proces vyhodnocovania a hľadania informácií. Snahou je zjednodušiť tento krok a aplikovať rôzne štatistické metódy, ako je napríklad PCA, na súbor spektier. Výsledkom je potenciálna optimalizácia rýchlosti a presnosti merania a vyhodnocovania kvalitatívnych a kvantitatívnych vlastností vzoriek skrz metódy vibračnej spektroskopie. Cieľom tejto diplomovej práce je práve skúmať možnosti využitia FTIR ako metódy pre kvantitatívne a kvalitatívne stanovenie polyhydroxyalkanoátov v biomase, a práca nadväzuje na bakalársku prácu [35].

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

Experimentálna časť tejto diplomovej práce je zameraná na analýzu vzoriek biomasy obsahujúcej polyhydroxyalkanoáty pomocou metódy ATR-FTIR, pričom ako referencia slúžia výsledky GC-FID. Okrem samotného pozorovania spektier bola snaha na výsledné spektrá aplikovať analýzu hlavných komponentov. Vzorky použité v tejto práci pochádzajú ako z vlastnej bakalárskej práce na ktorú nadväzujem [35], tak i z paralelne prebiehaných kultivácií v rámci iných prác [11], [32], [33], [91], [92] a z vlastných kultivácií autorkou tejto diplomovej práce. Biomasy prevzaté z iných prác mali vlastné značenie. Vzorky v tejto práci majú z tohto dôvodu ponechané pôvodné označenie, ktoré prislúcha kódovanie z daných kultivácií/prác.

3.1 Chemikálie, baktérie a prístroje použité v práci

3.1.1 Zoznam chemikálií

V tejto časti sú vypísané chemikálie použité pri práci s mnou pripravenými vzorkami.

- 1,4-butandiol (Sigma-Aldrich)
- Citrát železito-amonný (Fluka)
- Destilovaná voda
- Dihydrát chloridu vápenatého (LachNer)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich)
- Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Sigma-Aldrich)
- Dusičnan amonný (LachNer)
- Etanol (LachNer)
- Glycerol bezvodý (LachNer)
- Heptahydrát síranu horečnatého (Sigma-Aldrich)
- Hydroxid sodný (LachNer)
- Chlorid draselný (LachNer)
- Chlorid sodný (LachNer)
- Chloroform (Penta)
- Isopropylalkohol (Penta)
- Kyselina benzoová (LachNer)
- Kyselina sírová (LachNer)
- Metanol (LachNer)
- Nutrient Broth (Himedia)
- Roztoky stopových prvkov
- Síran amonný (Sigma-Aldrich)
- Trypton (Sigma-Aldrich)
- Yeast Extract Powder (Himedia)
- γ -butyrolakton (Sigma-Aldrich)

3.1.2 Zoznam prístrojov

V tejto časti sú vypísané prístroje použité pri práci s mnou pripravenými vzorkami.

- Analytické váhy Boeco
- Autokláv

- Centrifuga, Hettich MIKRO 200
- Inkubátor, LTE Scientific, IP60
- Laboratórne sklo a ďalšie laboratórne pomôcky
- Laboratórne váhy, Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH
- Laminárny box Aura mini, Bio Air Instruments
- Magnetická miešačka, Lavat
- Odstredivka, Boeco U-32R
- Plynový chromatograf, GC-FID, Thermo, TRACE 1300
- Spektrofotometer Nicolet iS50, ThermoFisher Scientific
- Temperovaná trepačka, Heidolph1000, Labicom s.r.o
- Termoblok, Stuart, SBH130D
- Termostat, LS-35
- Tlakový sterilizačný hrniec, Orava
- Vortex, Heidolph Reax Top

3.1.3 Použité baktérie

V rámci tejto diplomovej práce boli použité vzorky kultivovanej biomasy z viacerých prác a PHA bolo produkované nasledujúcimi mikroorganizmami:

- *Cupriavidus malaysiensis* (DSM 19416, DSM 19379, DSM 25816)
- *Aneurinibacillus thermoaerophilus* (H1, AFn2, AH30)
- *Schlegelella thermodepolymerans* (DSM 15264, M 15344, LMG 21645)

Kmene *Aneurinibacillus thermoaerophilus* sú z Českej zbierky mikroorganizmov, boli izolované na Fakulte chemickej VUT v Brne.

Všetky tri kmene *Cupriavidus malaysiensis* boli zakúpené z nemeckej zbierky Liebnitz Institut DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures.

Kmeň *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15264 bol tiež zakúpený z nemeckej zbierky Liebnitz Institut DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, *Schlegelella thermodepolymerans* M 15344 je znovu lyofilizovaná baktéria z pôvodného kmeňa DSM 15344 taktiež z nemeckej zbierky. Z belgickej zbierky naopak pochádzal kmeň LMG 21645.

3.2 Kultivácie baktérií

Ako už bolo spomenuté, niektoré vzorky biomasy pre účely experimentálnej časti boli prevzaté z predchádzajúcej bakalárskej práce [35] alebo získané z iných výskumných či záverečných prác prebiehajúcich na Chemickej fakulte VUT v Brne. Keďže práca nie je zameraná priamo na kultivácie, táto kapitola iba stručne zhrňuje prípravu vzoriek biomasy obsahujúcej polyhydroxyalkanoáty. Podmienky kultivácie, ktoré sa pre jednotlivé organizmy líšili sú vždy uvedené v príslušnom kroku. Inak bol postup prípravy vzoriek jednotný.

3.2.1 Inokulum a rastové médium

Kryoskúmavky obsahujúce dané kmene baktérií spolu s kryoprotektantom (10 % roztok glycerolu) boli skladované pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v mrazničke. Objem každej kryoskúmavky bol 1,5 ml.

Po vybratí z mrazničky sa nechali odstáť, aby dosiahli izbovej teploty pred samotným očkovaním do média.

Bolo pripravené médium Nutrient Broth o koncentrácií $25 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v destilovanej vode, ktoré sa rozdelilo po 50 ml do Erlenmeyerových baniek (objem baniek bol 100 ml). Pripravený roztok NB bol sterilizovaný v tlakovom hrnci. Médium Nutrient broth obsahovalo:

- Beefextract $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
- Peptón $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
- NaCl $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$

Po sterilizácii boli banky zahriate na optimálnu rastovú teplotu organizmu pomocou termostatu. Následne bolo do baniek zaočkovaných 0,5 ml objemu kryoskúmavky. Tento proces prebiehal v sterilnom laminárnom boxe. Po dobu 24 hodín sa inokulá miešali na temperovanej miešačke. Rýchlosť a teplota optimálna pre kultiváciu daného MO sú uvedené v tabuľke 3.

Tabuľka 3: Podmienky nastavené pri kultivácii jednotlivých mikroorganizmov

Mikroorganizmus	Teplota	Otáčky
<i>Cupriavidus malaysiensis</i> (všetky kmene)	30 °C	180 rpm
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> H1	45 °C	180 rpm
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> AfN2, AH30	50 °C	190 rpm
<i>Schlegelella thermodepolymerans</i> (všetky kmene)	50 °C	160 rpm

3.2.2 Minerálne médiá, substráty a kultivácia

Pripravené boli minerálne produkčné médiá špecifické pre každého producenta (viď tabuľka 4). 100 ml minerálneho média bolo napipetovaných do Erlenmeyerových baniek (250 ml). Do takto nachystaných médií boli pridané substráty o rôznych koncentráciách, ktoré slúžia ako prekurzor pre biosyntézu intracelulárneho PHA (viď tabuľky 5 až 8). Nakoniec boli produkčné médiá taktiež sterilizované v tlakovom hrnci. V poslednom kroku bolo zaočkované narastené inokulum (5 objemových %) do produkčných médií. Kultivácie na vyhriatej trepačke prebiehali po dobu 72 hodín.

Zloženie roztokov stopových prvkov TES II a MES:

TES II

- EDTA $50 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
- FeCl₃ $8,3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
- ZnCl₂ $0,84 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
- CuCl₂·2 H₂O $0,13 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
- CoCl₂·6 H₂O $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
- MnCl₂·6 H₂O $0,016 \text{ l}$
- H₃BO₃ $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$

MES

- FeCl₃·6H₂O 9,7 g
- CaCl₂·2H₂O 7,8 g
- CuSO₄·5H₂O 0,156 g
- CoCl₂·2H₂O 0,119 g
- NiCl₂·4H₂O 0,118 g
- 0,1 M HCl 1000 ml

Tabuľka 4: Minerálne médiá

<i>Cupriavidus malaysiensis</i> (DSM 19379, DSM 19416, DSM 25816)		<i>Schlegelella thermodepolymerans</i> (DSM 15264, M 15344, LMG 21645)	
KH ₂ PO ₄	1,02 g	KH ₂ PO ₄	1,5 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	11,1 g	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	9,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g	NH ₄ Cl	1,0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
MES	1 ml	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,02 g
destilovaná voda	1 000 ml	Fe ^{III} NH ₄ citrát	0,0012 g
		kvasničný extrakt	0,5 g
		TES II	1 ml
		destilovaná voda	1 000 ml
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> H1 (CCM 8960)		<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> (AFn2, AH30)	
KH ₂ PO ₄	1,5 g	KH ₂ PO ₄	1,5 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	9,0 g	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	9,0 g
NH ₄ NO ₃	1,0 g	NH ₄ Cl	1,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,02 g	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,015 g
Fe ^{III} NH ₄ citrát	0,0012 g	Fe ^{III} NH ₄ citrát	0,0012 g
trypton	0,5 g	kvasničný extrakt	0,5 g
TES II	1 ml	TES II	1 ml
destilovaná voda	1 000 ml	destilovaná voda	1 000 ml

Tabuľka 5: Substráty pre producentov *C. malaysiensis* a *A. thermoaerophilus* H1

Producent	Značenie vzoriek	1,4-butandiol [g·l ⁻¹]	glycerol [g·l ⁻¹]	γ-butyrolakton [g·l ⁻¹]
3 kmene <i>Cupriavidus malaysiensis</i>	2*, 3*, 5*	8	-	-
	1*, 4*, 6*	-	-	8
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> H1 (3 sady vzoriek)	2	4	2	-
	4	4	4	-
	6	4	6	-
	8	4	8	-
	20	4	20	-

Tabuľka 6: Substráty pre vzorky producentov *A. thermoaerophilus* AH30 a AFn2

Producent	Značenie vzoriek	Substráty	Koncentrácia substrátov [g·l ⁻¹]
AH30	A	γ-valerolakton + glycerol	4+4
AFn2	B	γ-hexalakton + glycerol	4+4
AFn2	C	δ-valerolakton + glycerol	4+4

Tabuľka 7: Prehľad substrátov pre ďalšie vzorky obsahujúce kmene AH30 a AFn2

Producent	Značenie vzoriek	Substráty	Koncentrácia substrátov [g·l ⁻¹]
H1	a_1	γ-butyrolakton + glukóza	4+4
AFn2	a_2	δ-valerolakton	4
AFn2	a_3	γ-valerolakton + glukóza	4+4
H1	a_4	1,4-butandiol + glycerol	4+4
AFn2	a_5	kyselina hexanová + glukóza	2+20

Tabuľka 8: Substráty a doby ich prídavku pri kultivácii kmeňov *S. thermodepolymerans*

Producent	Značenie vzoriek	Substráty	Koncentrácia substrátu [g·l ⁻¹]	Xylóza [g·l ⁻¹]	Doba prídavku substrátu	
<i>Schlegelella thermodepolymerans</i> M 15344	1-2	kys. levulová	2	20	0h	
	5-6	propanol	2	20		
	9-10	propionát sodný	2	20		
	<i>Schlegelella thermodepolymerans</i> DSM 15264	11-12	kys. levulová	2	20	24h
		15-16	propanol	2	20	
		17-18	n-amyalkohol	2	20	
		19-20	propionát sodný	2	20	
21-22		kys. levulová	2	20	0h	
25-26		propanol	2	20		
27-28	n-amyalkohol	2	20			
<i>Schlegelella thermodepolymerans</i> LMG 21645	29-30	propionát sodný	2	20	24h	
	41-42	kys. levulová	2	20		
	43-44	kys. valerová	2	20		
	45-46	propanol	2	20		
	47-48	n-amyalkohol	2	20		
	49-50	propionát sodný	2	20		
	31-32	kys. levulová	2	20		0h
35-36	propanol	2	20			
37-38	n-amyalkohol	2	20			
<i>Schlegelella thermodepolymerans</i> LMG 21645	53-54	kys. valerová	2	20	24h	
	55-56	propanol	2	20		
	57-58	n-amyalkohol	2	20		
	59-60	propionát sodný	2	20		

3.2.3 Získanie vysušenej biomasy

Bolo odobratých 10 ml kultivačného média do centrifugačných skúmaviek a biomasa bola odstredená (5 minút pri 5 000 rpm). Následne bola usadenina premytá destilovanou vodou, rozsuspendovaná na vortexe a proces centrifugácie sa znovu zopakoval. Odstredená biomasa sa uložila do sušiarne pri 70 °C, čím sme časom získali vzorky vysušenej biomasy obsahujúcej PHA – tá je už ďalej podrobená plynovej chromatografii a spektrálnej analýze metódou ATR-FTIR.

3.3 Analýza vzoriek suchej biomasy s obsahom polyhydroxyalkanoátov

3.3.1 Gravimetrické stanovenie biomasy

Vysušené vzorky biomasy boli zvážené na analytických váhach. Hmotnosť jednotlivých vzoriek slúži k stanoveniu hmotnosti celkovej biomasy gravimetricky a následným výpočtom pri vyhodnocovaní dát GC-FID. Vzorky boli vážené v rámci iných prác, či mojej už spomínanej bakalárskej práce [35].

3.3.2 Plynová chromatografia

Za účelom presného stanovenia obsahu polyhydroxyalkanoátov a ich monoméneho zloženia bola vysušená biomasa podrobená analýze plynovou chromatografiou (GC-FID). Aby však boli PHA detekovateľné a mohli byť stanovené metódou GC-FID, je potreba najprv previesť transesterifikáciu.

Biomasa bola navážená do krimpovacích fľaštičiek na analytických váhach s hmotnosťou v rozmedzí 8–11 mg (v niektorých prípadoch boli vzorky v dupletoch). Do vialiek bolo napipetovaných 1 ml chloroformu a 0,8 ml transesterifikačnej zmesi – 5 mg/ml kyseliny benzoovej (ISTD – interný štandard) a 15% kyseliny sírovej v methanole. Vialky boli následne uzavreté pomocou krimpovacích kliešťov so špeciálnym vrchnákom. Esterifikácia prebiehala po dobu 3 hodín v termobloku za teploty 94 °C.

Po reakcii sa vzorky nechali vychladnúť a boli prevedené do väčších sklenených fľaštičiek. Prídavkom 0,5 ml 50 mM NaOH sa zabezpečila purifikácia vzorku – po napipetovaní, pretrepaní a odstátí sa vytvorili dve fáze (vodná a organická). Vodná fáza obsahujúca NaOH sa nachádzala hore a zachytávala nečistoty, spodná fáza obsahovala chloroform s rozpustenými polyhydroxyalkanoátmi.

V poslednom kroku bolo do chromatografických vialiek napipetovaných 0,9 ml isopropanolu a 50 µl spodnej fáze, ktorá obsahuje methylestery PHA. Vzorky boli analyzované pomocou GC-FID. Zároveň boli analyzované aj štandardy a vytvorená kalibračná krivka, v prípade, že nebola poskytnutá z iných experimentov.

3.3.3 Infračervená spektroskopia

Vzorky vysušenej biomasy boli podrobené rýchlej a nedeštruktívnej analýze metódou ATR-FTIR. Pre analýzu bol použitý spektrofotometer Nicolet iS50 od spoločnosti ThermoFisher Scientific, vybavený vstavaným jednodrazovým diamantovým ATR kryštálom (obrázok 8).

V prvom kroku bol spustený software OMNIC na počítači pripojenom k prístroju, čím sa spustil aj spektrofotometer. Nastavili sa podmienky merania (32 skenov, rozlíšenie 4 cm^{-1}). Pozadím v danom experimente bol vždy vzduch. Rozsah spektra bol $400\text{--}4\,000\text{ cm}^{-1}$.

Ďalej sme sa uistili, že kryštál, na ktorý sa aplikuje vzorka je správne vyčistený a vysušený pomocou destilovanej vody, buničiny a etanolu. Bolo zmerané a skontrolované pozadie (blank). Nadmerné množstvo vody či CO_2 v okolí ovplyvňuje výsledné meranie, je preto veľmi dôležité správne nastavenie v tomto kroku.

Pre samotnú analýzu bolo špachtličkou nanosené malé množstvo biomasy na povrch kryštálu, pričom bola snaha o rovnomerné pokrytie plochy. Niektoré vzorky biomasy bolo potreba pred meraním rozdrviť pomocou lyžičky alebo špachtličky (výskyt veľkých a hrubých kusov biomasy v niektorých prípadoch). Vzorka bola fixovaná špeciálnym nástavcom – špičkou. Následne už bola prevedená samotná spektrálna analýza každého vzorku. Každá vzorka bola podľa potreby premeraná minimálne 10- až 12-krát. Medzi jednotlivými meraniami bol kryštál vždy dôkladne vyčistený a vysušený. Pozadie bolo pravidelne kontrolované, v prípade potreby nastavené nanovo. Výsledné spektrá boli uložené. Po meraní bol kryštál opäť očistený a vysušený.



Obrázok 8: Spektrofotometer Nicolet iS50 použitý pri realizovaných analýzach

3.4 Analýza spektier

Analýza hlavných komponentov (PCA) je bežne používaná viacrozmerná štatistická technika na extrakciu a interpretáciu rozptylu v súbore dát. Základnou myšlienkou modelovania PCA je nahraďiť komplexný viacrozmerný súbor údajov (napríklad spektroskopické údaje) zjednodušenou verziou, ktorá zahŕňa menej rozmerov, ktoré sa označujú ako hlavné komponenty (z angl. *principal component* – hlavná komponenta, v tejto práci skrátene PC). Stále sa však nové rozmery podobajú pôvodným informáciám dostatočne na to, aby ich bolo možné brať do úvahy ako aproximované [93].

Jedným z mnohých výstupov analýzy PCA je takzvaný „*loading plot*“ – tieto grafy sú vypočítané pre každú PC a naznačujú, ktoré premenné (v našom prípade vlnové čísla) prispievajú k rozptylu vysvetlenému touto konkrétnou komponentou PC. Absolútna hodnota zaťaženia pre danú premennú (vlnové číslo) priamo súvisí s príspevkom tejto premennej k vysvetlenému/modelovanému rozptylu. Znamienko (kladné alebo záporné) a hodnota „*loadingu*“ pre danú premennú vyjadruje relatívnu proporcionalitu premenných z hľadiska ich príspevku k rozptylu v údajoch [85].

Na namerané spektrá bola aplikovaná PCA pomocou softwaru Raman, ktorý bol naprogramovaný na Ústavu prístrojové techniky, Akadémie vied Českej republiky a zdarma poskytnutý pracovisku autorky práce [94]. Program slúži k vyhodnoteniu FTIR dát práve touto štatistickou metódou. Súbory spektier boli cez excel prevedené do formátu textového súboru a otvorené pomocou tejto aplikácie. Nasledovala zdĺhavé skúmanie potenciálne využiteľných informácií, ktoré dané spektrá predstavovali, porovnávali sa dáta z rôznych vzoriek navzájom. Hľadali sa pritom odlišnosti či podobnosti, ktoré by súviseli s obsahom či zložením polyhydroxyalkanoátu v konkrétnych vzorkách.

Pred prevedením samotnej PCA metódy bola v prípade potreby upravená základná línia spektra (z angl. *baseline*) pomocou nástroja v softwari Raman – rolovací kruh (z angl. *rolling circle*). Polomer kruhu (z angl. *radius*) bol nastavený na 1000 pixelov a jeho prechod bol nastavený na 10-krát. Ďalej boli dáta v softwari normalizované na pík, ktorý je charakteristický pre biomasu – amid II ($1\ 540\ \text{cm}^{-1}$). Tento krok zabezpečí korekciu v prípade rozdielov nameranej intenzity absorpcie. Tie môžu byť spôsobené napríklad nerovnomerným pokrytím kryštálu vzorkou pri meraní. Výsledky PCA boli vynesené do grafov pomocou programu Excel.

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

4.1 Výsledky chromatografickej analýzy vzoriek

Ako už bolo spomenuté v kapitole 3.3.2, pre presné stanovenie obsahu polyhydroxyalkanoátov a ich monoméneho zloženia bola použitá plynová chromatografia s plameňovo-ionizačným detektorom. Kalibračné krivky pre výpočty boli získané z nameraných dát štandardov a zostrojené softwarom, alebo poskytnuté z iných experimentov podľa potreby. Pomocou týchto rovníc bolo vypočítané celkové množstvo bioplastu obsiahnutého v sušine a tiež zastúpenie jednotlivých monomérov v heteropolyméroch. V prípade niektorých vzoriek poskytnutých z iných prác boli dodané iba konečné výsledky GC-FID – percentuálne pomery monomérov a zastúpenie PHA vo vzorkách. Pre účely tejto práce sú uvádzané najdôležitejšie výsledné parametre – obsah a monoméne zloženie PHA. Údaje sú prehľadne zhrnuté v nasledujúcich tabuľkách.

Tabuľka 9: Prvá kultivačná sada baktérie *Aneurinibacillus thermoaerophilus* H1, ktorá obsahuje kopolymér P(3HB-co-4HB)

Označenie vzorky	3HB [g·l ⁻¹]	4HB [g·l ⁻¹]	PHA [g·l ⁻¹]	PHA [%]	3HB [%]	4HB [%]	Odchýlka PHA [%]	Odchýlka 3HB a 4HB [%]
H1_2	1,126	1,892	3,017	32,63	37,36	62,64	0,66	6,23
H1_4	1,427	1,020	2,447	27,21	58,39	41,61	1,44	5,77
H1_6	1,672	0,807	2,479	25,53	66,52	33,48	3,13	13,28
H1_8	1,406	0,720	2,126	24,72	66,14	33,86	-	-
H1_20	2,183	0,028	2,211	25,96	98,70	1,30	5,29	0,36

Tabuľka 10: Druhá kultivačná sada baktérie *Aneurinibacillus thermoaerophilus* H1, ktorá obsahuje kopolymér P(3HB-co-4HB)

Označenie vzorky	3HB [g·l ⁻¹]	4HB [g·l ⁻¹]	PHA [g·l ⁻¹]	PHA [%]	3HB [%]	4HB [%]	Odchýlka PHA [%]	Odchýlka 3HB a 4HB [%]
H1_2_R	1,211	2,227	3,437	38,94	35,34	64,66	1,96	4,55
H1_4_R	3,501	0,248	3,748	34,58	93,34	6,66	3,63	1,03
H1_6_R	3,651	0,240	3,890	38,04	92,19	7,81	6,52	8,94
H1_8_R	4,610	0,037	4,646	47,20	99,21	0,79	1,80	0,12
H1_20_R	4,194	0,033	4,227	40,04	99,22	0,78	5,24	0,11

Tabuľka 11: Tretia kultivačná sada baktérie *Aneurinibacillus thermoaerophilus* H1, ktorá obsahuje kopolymér P(3HB-co-4HB)

Označenie vzorky	3HB [g·l ⁻¹]	4HB [g·l ⁻¹]	PHA [g·l ⁻¹]	PHA [%]	3HB [%]	4HB [%]	Odchýlka PHA [%]	Odchýlka 3HB a 4HB [%]
H1_2_LD	1,312	2,212	0,062	40,04	37,27	62,73	0,29	1,95
H1_4_LD	2,084	1,310	0,058	39,68	61,41	38,59	0,73	0,47
H1_6_LD	2,304	1,601	0,064	43,90	59,65	40,35	5,85	10,40

Z výsledkov chromatografie vzoriek baktérie *Aneurinibacillus thermoaerophilus* H1 produkujúcej P(3HB-co-4HB) môžeme konštatovať, že prídavkom glycerolu ako prekursoru pre tvorbu PHA bola podporená syntéza monoméru 3-hydroxybutyrátu. Vzorky obsahujúce väčšie množstvo 1,4-BD než glycerolu teda obsahujú väčšie množstvo 4-hydroxybutyrátu v kopolyméri – napríklad vzorka H1_2. Vzorky s veľkým množstvom glycerolu sa už od tohoto trendu mierne odchyľujú. Porovnaním vzoriek H1_8_R a H1_20_R z Tabuľka 10 vieme zhodnotiť, že percentuálne zastúpenie monoméru 4HB sa zvýšením glycerolu už nezmenilo. V týchto vzorkách všeobecne drasticky presahuje monomér 3HB.

Medzi prvou a druhou kultivačnou radou je možné pozorovať rozdiel v zmene monoméreného zloženia P(3HB-co-4HB). V prípade druhej sady obsahujú všetky vzorky okrem H1_2_R iba malé množstvo % zastúpenia 4HB. Kultivácie prebiehali rovnakým postupom. Rozdiel mohol byť spôsobený nepresným pipetovaním substrátov a prípravou zmesi z dôvodu vyššej viskozity týchto látok. Napriek tomu, že kultivačné podmienky boli pri všetkých troch radách zachované pozorujeme rozdiel aj medzi celkovým množstvom vyprodukovaného polyhydroxyalkanoátu. Porovnaním prvej kultivačnej sady so zvyšnými dvomi pozorujeme, že celková kvantita PHA vo vzorkách je nižšia. Takéto odchýlky môžu byť spôsobené neopatrnosťou pri kultivačnom procese, ale treba brať v úvahu fakt, že sa jedná o prácu so živými MO a výsledky sa tak môžu líšiť aj v prípade, že experiment opakujeme úplne rovnakým postupom.

Tabuľka 12: Kultivačná sada troch rozličných kmeňov baktérie *Cupriavidus malaysiensis*, ktorá produkuje kopolymér P(3HB-co-4HB)

Kmeň	Označenie vzorky	3HB [g·l ⁻¹]	4HB [g·l ⁻¹]	PHA [g·l ⁻¹]	PHA [%]	3HB [%]	4HB [%]	Odchýlka PHA [%]	Odchýlka 3HB a 4HB [%]
CM 25816	1*	3,134	0,332	3,466	42,79	90,41	9,59	4,09	0,16
CM 25816	2*	1,115	0,092	1,207	12,19	92,35	7,65	0,29	0,18
CM 19379	3*	2,745	0,614	3,358	30,81	81,78	18,22	1,51	2,02
CM 19379	4*	4,506	0,466	4,972	53,95	90,62	9,38	21,54	0,07
CM 19416	5*	1,390	0,258	1,648	19,17	84,27	15,73	1,55	1,27
CM 19416	6*	3,940	0,420	4,360	40,95	90,38	9,62	3,77	0,23

Z tabuľky 12 vieme posúdiť, že v prípade baktérie *Cupriavidus malaysiensis* bol pre biosyntézu polyméru vhodnejší substrát γ -butyrolakton, keďže tieto vzorky celkovo obsahovali väčšie množstvo polyhydroxyalkanoátov (vzorky 1*, 4* a 6*). Najväčšie množstvo monoméru 4HB sa nachádzalo vo vzorke kmeňa CM 19379, ktorý ako prekursor využíval 1,4-butandiol (t.j.

vzorka 3*). V prípade kmeňov CM 19379 a 19416 sa zdá byť substrát 1,4-BD vhodnejším prekursorom k syntéze 4HB, avšak pri CM 25816 bol pozorovaný opak.

Tabuľka 13: Výsledné monoméne zloženie kultivácií baktérie *Aneurinibacillus* typu AH30 a AFn2; tieto baktérie produkovali rôzne heteropolyméry

Kmeň	Označenie vzorky	3HB [%]	3HV [%]	4HV [%]	4HHx [%]	5HV [%]	PHA [%]
AH30	A	73,97	1,61	24,41	-	-	44,52
AFn2	B	88,36	4,05	-	7,59	-	20,37
AFn2	C	69,20	-	-	-	30,80	38,29

Využitím dvoch typov baktérie *Aneurinibacillus* (AH30 a AFn2) s prídavkom rozličných substrátov boli produkované heteropolyméry. Baktéria AH30 rástla na prekuzore γ -valerolakton a produkovala pomerne vysoké množstvo P(3HB-co-3HV-co-4HV). Baktéria AFn2 bola kultivovaná s prekuzorom δ -valerolakton, kedy syntetizovala P(3HB-co-5HV), ale aj γ -hexalaktonom – v tomto prípade sa tvoril komplexný P(3HB-co-3HV-co-4HHx), celkové množstvo PHA v biomase však bolo nižšie. To potvrdzuje fakt, že substrát má vplyv na typ produkovaného polyhydroxyalkanoátu. Monoméne zloženie a celkový obsah PHA vo vzorkách sú uvedené v Tabuľka 13.

Tabuľka 14: Výsledné monoméne zloženie pre vzorky a_1 až a_5, kultivácia kmeňov baktérie *Aneurinibacillus* AFn2 a H1

Kmeň	Označenie vzorky	PHA [%]	3HB [%]	4HB [%]	3HV [%]	4HV [%]	5HV [%]
H1	a_1	58,51	33,33	66,06	0,55	-	-
AFn2	a_2	50,84	64,84	-	2,20	-	32,97
AFn2	a_3	49,00	48,98	-	-	51,02	-
H1	a_4	80,68	25,35	74,65	-	-	-
AFn2	a_5	50,03	91,88	-	1,59	-	-

Ďalšia poskytnutá sada vzoriek taktiež pochádzala z kultivácií baktérie *Aneurinibacillus thermoaerophilus*. Konkrétne sa jednalo o kmene AFn2 a H1, ktoré produkovali heteropolyméry a výsledky z plynovej chromatografie týchto vzoriek môžeme vidieť v Tabuľka 14. Vzorka a_4 obsahovala jednoduchší kopolymér P(3HB-co-4HB) vo vysokom zastúpení (80,68 %), kultivácia prebiehala za využitia 1,4-butandiolu a glycerolu. Vzorka a_1 obsahovala v syntetizovanom heteropolyméri aj monomér 3-hydroxyvalerát, ale len vo veľmi malom množstve (0,55 %). Vzorky biomasy, ktorá ako substrát využívala δ - alebo γ -valerolakton (a_2 a a_3) obsahovali podľa očakávaní vyššie množstvá monomérov hydroxyvalerátu. Vo vzorke a_5 sa nachádzal kopolymér P(3HB-co-3HV), pričom monoméne zastúpenie 3HV bolo pomerne nízke. Vhodným prekuzorom pre syntézu monoméru 3-, 4- či 5-hydroxyvalerátu je na základe týchto kultivácií valerolakton.

V neposlednom rade boli získané aj vzorky typov baktérie *Schlegelella thermodepolymerans*, ktorá bola kultivovaná využitím rozličných substrátov. Vo všetkých prípadoch vzorky obsahovali kopolymér P(3HB-co-3HV). Vzorky sa líšili aj dobou prídavkom daného prekurzora (viď tabuľka 8, v kapitole o kultiváciách), to však pre účely tejto práce nie je podstatné, dôležitý je obsah a zloženie PHA pre porovnanie s prevedenou spektrálnou analýzou na ATR-FTIR.

Poskytnuté vzorky obsahujú vysoké množstvo celkového PHA v biomase, vo väčšine prípadov s prevažujúcim monomérom 3-hydroxybutyrátom. V prípade vzorky 5-6 (v tabuľke 15 vyznačená červenou) bol produkovaný iba jednoduchý homopolymér poly(3-hydroxybutyrát) a v porovnaní s ostatnými kultiváciami iba v malom množstve. Pre účely tejto práce teda nebol použitý, keďže práca je zameraná na heteropolyméry. Výsledky GC analýzy vzoriek *S. thermodepolymerans* sú uvedené v tabuľke 15.

Tabuľka 15: Kultivácie baktérie *Schlegelella thermodepolymerans* za rôznych podmienok s prídavkom rozličných substrátov – produkovala kopolymér P(3HB-co-3HV)

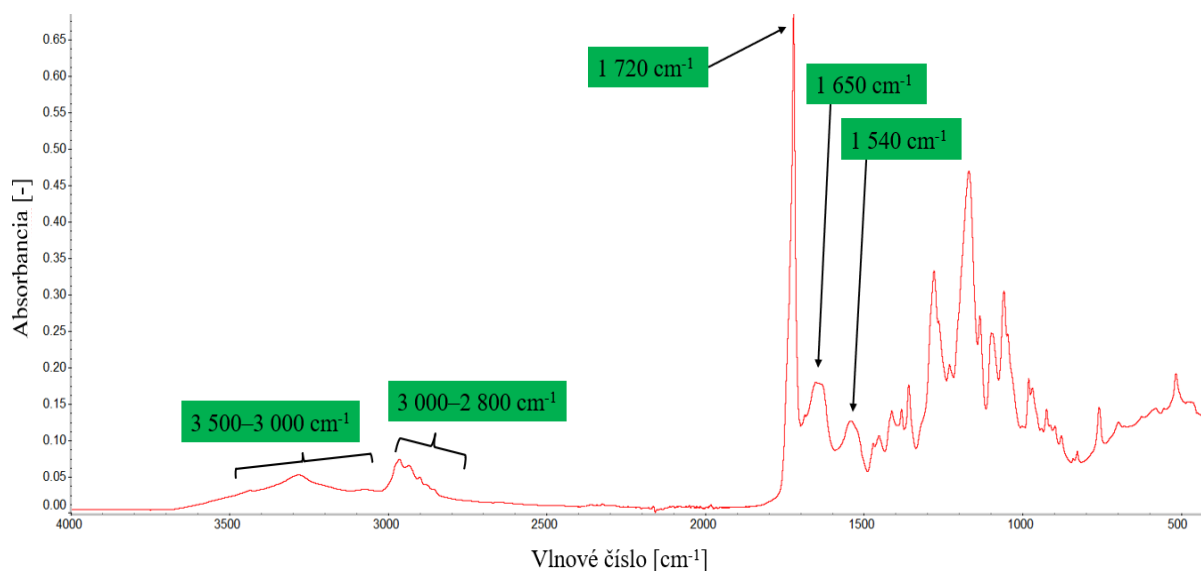
Kmeň	Označenie vzorky	PHA [%]	3HB [%]	3HV [%]
M 15344	1-2	74,96	84,56	15,44
	5-6	8,58	100,00	0,00
	9-10	54,34	99,40	0,60
	11-12	61,45	85,57	14,43
	15-16	57,38	82,11	17,89
	17-18	45,45	88,87	11,13
	19-20	58,57	87,64	12,36
DSM 15264	21-22	74,97	96,95	3,05
	25-26	76,36	99,63	0,37
	27-28	60,55	90,12	9,88
	29-30	69,25	95,23	4,77
	41-42	81,45	94,61	5,39
	43-44	84,56	94,11	5,89
	45-46	86,80	99,68	0,32
	47-48	85,14	95,89	4,11
LMG 21645	49-50	82,29	92,53	7,47
	31-32	66,44	96,60	3,40
	35-36	63,09	99,57	0,43
	37-38	69,39	84,84	15,16
	53-54	69,87	94,38	5,62
	55-56	74,83	99,66	0,34
	57-58	88,00	96,56	3,44
59-60	73,23	84,12	15,88	

4.2 Infračervené spektrá vzoriek biomasy s obsahom polyhydroxyalkanoátov

Na FTIR s nastavcom ATR sa sledovali pásy a píky charakteristické pre polyhydroxyalkanoáty. Pred touto analýzou sušenú biomasu nebolo potrebné nijak upravovať a celý proces je nedeštruktívny voči vzorkám. Dôležité píky boli skúmané na základe predchádzajúcej bakalárskej práce, na ktorú sa nadväzuje [35] a tiež podľa rešerše v kapitole 2.3. Pre každú vzorku bolo nameraných 10–14 spektier a všetky vzorky boli merané postupom a s nastavením uvedeným na str. 33.

4.2.1 Charakteristické píky pri spektrálnej analýze polyhydroxyalkanoátov

Prvým krokom k pochopeniu nameraného infračerveného spektra je vyhľadanie a priradenie charakteristických píkov pre zlúčeninu, ktorú analyzujeme. Pre polyhydroxyalkanoáty existuje niekoľko takýchto významných píkov. Píky boli identifikované na základe rešerše z kapitoly 2.3 a tiež s využitím poznatkov z bakalárskej práce [35]. Príklad spektra s vyznačenými dôležitými píkami a ich vlnovými číslami (vlnočet) je zobrazený na obrázkoch 9 a 10. Pre tento účel bola zvolená vzorka s označením H1_2, vid' kapitola 4.1.



Obrázok 9: Vybrané spektrum vzorky H1_2 v rozsahu 4 000–400 cm^{-1} , ktorá obsahuje P(3HB-co-4HB). Obsah PHA je podľa GC približne 32 %, v monomérnom zastúpení prevažuje 4HB.

V oblasti 3 500–3 000 cm^{-1} sa nachádza široký vibračný pás s nízkymi hodnotami absorbancie. Predstavuje vibrácie väzieb skupín O-H, či už viazaných (H-mostíky) alebo voľných. V tejto oblasti sa preto prejavuje výskyt rozličných látok v biomase, t.j. polysacharidov, cukrov, proteínov, ale tiež prítomnosť vody vo vzorke. Nízka intenzita nasvedčuje minimálnej vlhkosti vzorky. Okrem toho sa v rozmedzí 3 300–3 400 cm^{-1} nachádza aj pík amidu A z proteínov.

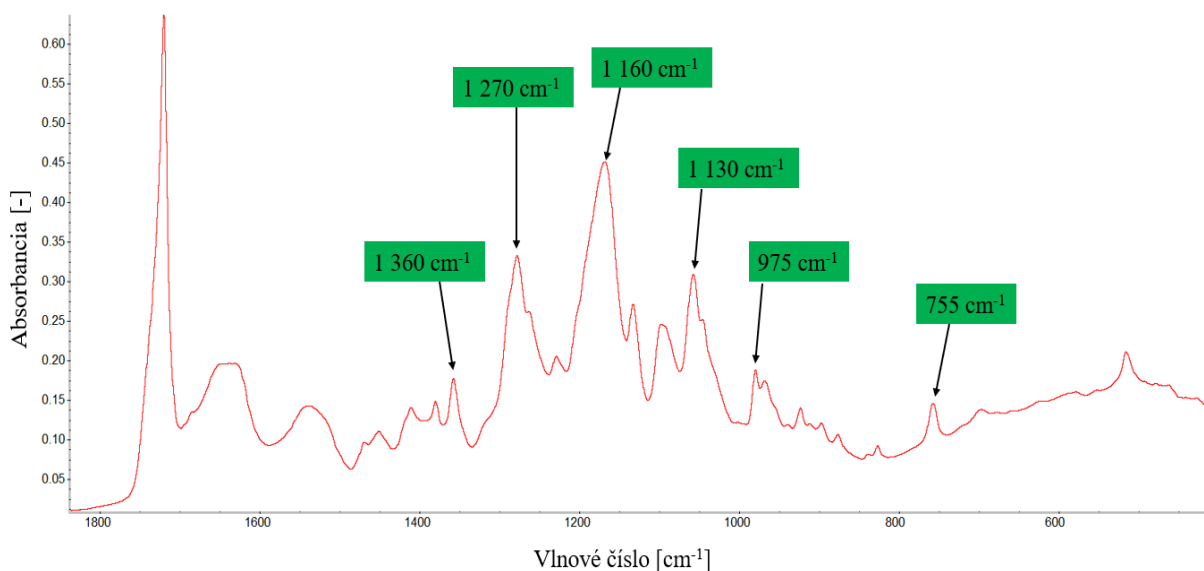
Vlnočty 3 000–2 800 cm^{-1} zahŕňajú skupiny $-\text{CH}_3$ a $-\text{CH}_2$. Prejavuje sa tu teda vibrácia väzieb C-H uhlíkov. Pík má taktiež nízku intenzitu, mení sa v závislosti na type PHA. Oblasť súvisí aj s prítomnosťou zvyškov mastných kyselín (lipidov), ktoré sa pri meraní PHA v biomase často výrazne prejavujú v spektre.

Najdôležitejší a zároveň najpozorovateľnejší pík pri analýze polyhydroxyalkanoátov má vlnočet 1 720 cm^{-1} . Je to úzky pík s veľmi veľkou intenzitou, ktorý je spojený s valenčnými

vibráciami väzieb C=O karboxylovej skupiny – v prípade PHA teda hlavne v esteroch. Intenzita tohto píku súvisí s obsahom polyhydroxyalkanoátov vo vzorke. Porovnanie tohto píku pre dve vzorky s rozličnou kvantitou PHA je v prílohe 1. Okrem toho ohyb píku smerom vpravo v spektre slúži ako predpoklad vysokého stupňa kryštalinity vzorky.

Ďalej je v spektre možné pozorovať aj dva menšie a širšie píky, a to pri vlnočtoch $1\ 650\text{ cm}^{-1}$ a $1\ 540\text{ cm}^{-1}$. Tie súvisia s prítomnosťou biomasy vo vzorkách. Konkrétne pík $1\ 650\text{ cm}^{-1}$ prislúcha amidu I a ide o naťahovanie väzby C=O. Pík $1\ 540\text{ cm}^{-1}$ je amid II, jedná sa o kombináciu naťahovania a ohybov väzby N-H.

Ako už bolo spomínané v kapitole 2.2.4, oblasť $1\ 500\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ predstavuje tzv. „*fingerprint*“ a je jedinečná pre každú látku. Hlavné rozdiely medzi jednotlivými vzorkami boli preto pozorované najmä v tejto oblasti. Na obrázku 10 sú znázornené niektoré píky charakteristické pre vzorku obsahujúcu poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát).



Obrázok 10: Vybrané spektrum vzorky H1_2 v rozsahu $1\ 800\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, ktorá obsahuje P(3HB-co-4HB). Obsah PHA je podľa GC približne 32 %, pričom v monomérnom zastúpení prevažuje 4HB.

Pík $1\ 360\text{ cm}^{-1}$ je charakteristický pre prítomnosť monoméru 4-hydroxybutyrátu vo vzorke. V práci [35] bol opísaný aj pík pri vlnočte $1\ 380\text{ cm}^{-1}$, ktorý je spájaný s „dáždnikovým efektom“, vibráciou metylovej skupiny. Ten reprezentuje zastúpenie 3-hydroxybutyrátu v polyméri. Vďaka spektru môžeme jasne konštatovať, že pík signifikantný pre 4HB (t.j. $1\ 360\text{ cm}^{-1}$) je intenzívnejší – čo je z výsledkov plynovej chromatografie v samotnej vzorke potvrdené.

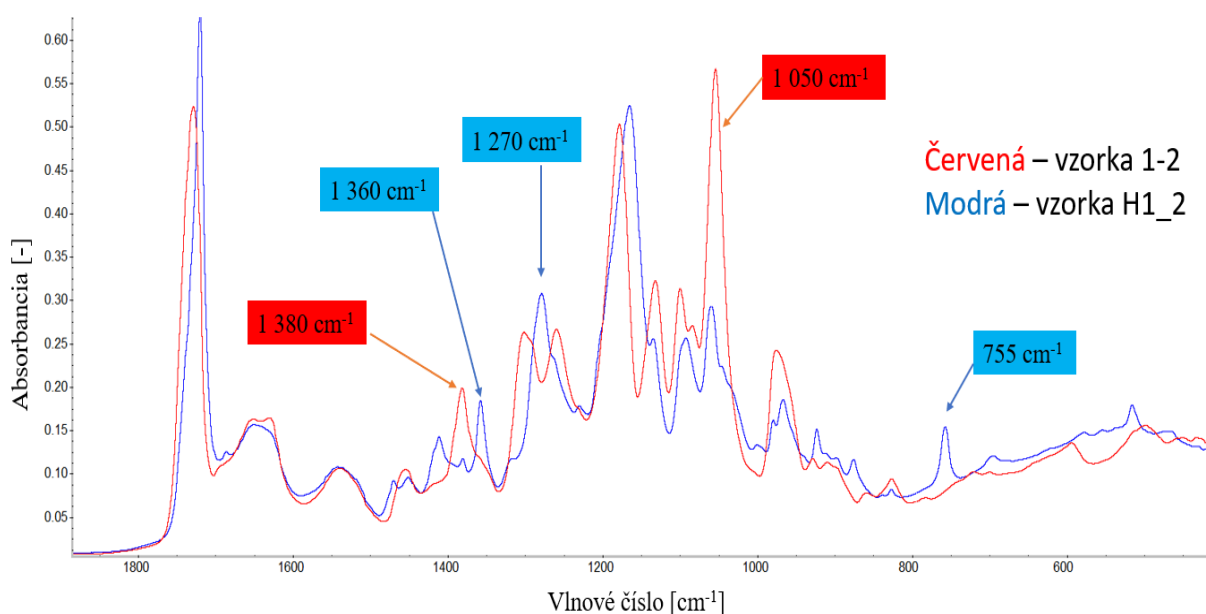
K oblasti $1\ 320\text{--}1\ 100\text{ cm}^{-1}$ je pripisované naťahovanie väzieb C-O-C a C-C-O, prípadne vibrácie väzieb C-O (polysacharidy a lipidy v dôsledku prítomnosti biomasy). Pri $1\ 270\text{ cm}^{-1}$ býva pík, ktorý súvisí s kryštalickou formou polyhydroxyalkanoátu. Naopak amorfnosť vzorky býva spájaná s píkom o hodnote $1\ 160\text{ cm}^{-1}$.

V štúdií [90] bol pozorovaný aj pík v okolí $1\,130\text{ cm}^{-1}$, ktorý pravdepodobne súvisí s množstvom 3-hydroxybutyrátu vo vzorke. Pík 978 cm^{-1} bol tiež spojený s kryštalitmi 3HB, my sme v spektre pozorovali pík 975 cm^{-1} .

Pík 755 cm^{-1} bol taktiež odpozorovaný v nami nameraných spektrách. Jeho intenzita sa vizuálne menila s typom analyzovanej vzorky a súvisí s monomérom zložením kopolyméru P(3HB-co-4HB). V spomínanej štúdií [90] bola pozorovaná stúpajúca intenzita píku 756 cm^{-1} so zvyšujúcim sa množstvom 4-hydroxybutyrátu vo vzorke.

4.2.1.1 Porovnanie spektier kopolymérov – príklad možnosti kvalitatívnej analýzy polyhydroxyalkanoátov v biomase identifikáciou signifikantných píkov

Pozorovaním rozličných vzoriek, ktoré obsahovali kopolymér P(3HB-co-4HB) a kopolymér P(3HB-co-3HV) boli nájdené isté rozdiely. Pre názornú ukážku sú v tejto práci použité spektrá vzorky H1_2 a 1-2 (viď kapitola 4.1).



Obrázok 11: Porovnanie časti spektier ($1\,800\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) s rozličným typom kopolyméru a vyznačenie pozorovaných zmien u niektorých píkov. Červené spektrum prislúcha vzorke obsahujúcej P(3HB-co-3HV) a modré P(3HB-co-4HB).

Vzorka H1_2 obsahuje 32,63 % kopolyméru P(3HB-co-4HB), pričom v miernej prevahe je monomér 4HB. Vo vzorke 1-2 sa nachádza takmer 75 % polyhydroxyalkanoátu P(3HB-co-3HV) produkovaného baktériou *Schlegelella thermodepolymerans*, avšak z hľadiska monomérom zloženia obsahuje iba okolo 15 % monoméru 3HV. Prevažuje teda monomér 3HB.

Vzhľadom k rozličnému zloženiu reťazcov kopolymérov pozorujeme miernu zmenu v oblasti charakterizujúcu uhl'ovodíkové reťazce, ktorú je možno pozorovať na obrázku v prílohe 2. Tam môžeme pozorovať aj už spomínaný ohyb píku vpravo v dôsledku vyššej kryštalinity.

Dobre viditeľným rozdielom v spektrách je prítomnosť vysokého píku pri $1\,380\text{ cm}^{-1}$ pre vzorku 1-2 (červená), zatiaľ čo druhá vzorka má tento pík v spektre iba nízkej intenzity. Ako

už bolo spomenuté tento pík značí prítomnosť väčšieho množstva monomérnych jednotiek 3-hydroxybutyrátu. To potvrdzujú aj Výsledky chromatografickej analýzy vzoriek.

Táto vzorka obsahuje aj veľmi intenzívny pík pri $1\ 050\ \text{cm}^{-1}$. Ten je často spájaný s vibráciou alifatickej esterovej skupiny. Bol však opísaný [90] aj posun tohto píku so zvyšujúcim sa obsahom 4HB a znižujúcim sa obsahom 3HB vo vzorke (z $1\ 056\ \text{cm}^{-1}$ na $1\ 061\ \text{cm}^{-1}$). Intenzívny pík pri $1\ 050\ \text{cm}^{-1}$ v našom spektre tak môže byť aj z dôvodu vysokého obsahu monoméru 3-hydroxybutyrátu vo vzorke 1-2.

V prípade vzorky H1_2 (modrá) môžeme naopak pozorovať prítomnosť pomerne intenzívneho píku pri $1\ 360\ \text{cm}^{-1}$, ktorý indikuje prítomnosť 4-hydroxybutyrátu. To značí významný rozdiel medzi monomérnym zložením kopolymérov jednotlivých zložiek, čo slúži ku kvalitatívnej analýze PHA. Toto spektrum má intenzívny pík aj pri $1\ 270\ \text{cm}^{-1}$, ktorý súvisí s kryštalinitou. To teda potvrdzuje predtým spomenutý predpoklad, že vzorka H1_2 (modré spektrum) je kryštalickejšia na základe ohybu píku charakteristického pre esterovú skupinu.

V neposlednom rade sa vo vzorke H1_2 obsahujúcej P(3HB-co-4HB) nachádza pík pri vlnočte $755\ \text{cm}^{-1}$, zatiaľ čo vo vzorke s P(3HB-co-3HV) tento pík chýba. Ako už bolo spomenuté v 4.2.1, súvisí s prítomnosťou vysokého podielu monoméru 4-hydroxybutyrátu v kopolyméri.

Podobným spôsobom boli pomocou doterajších znalostí a rešerše hľadané malé rozdiely vo viacerých vzorkách, ktoré by slúžili ku kvalitatívnemu stanoveniu polyhydroxyalkanoátov in-situ pomocou analýza ATR-FTIR. Nie vždy bolo možné pozorovať spektrálne zmeny aké boli demonštrované v tejto časti práce. Najviac viditeľné rozdiely vo výsledných meraniach bolo možné skúmať na základe prítomnosti monoméru 4-hydroxybutyrátu vo vzorke.

4.3 Analýza hlavných komponentov

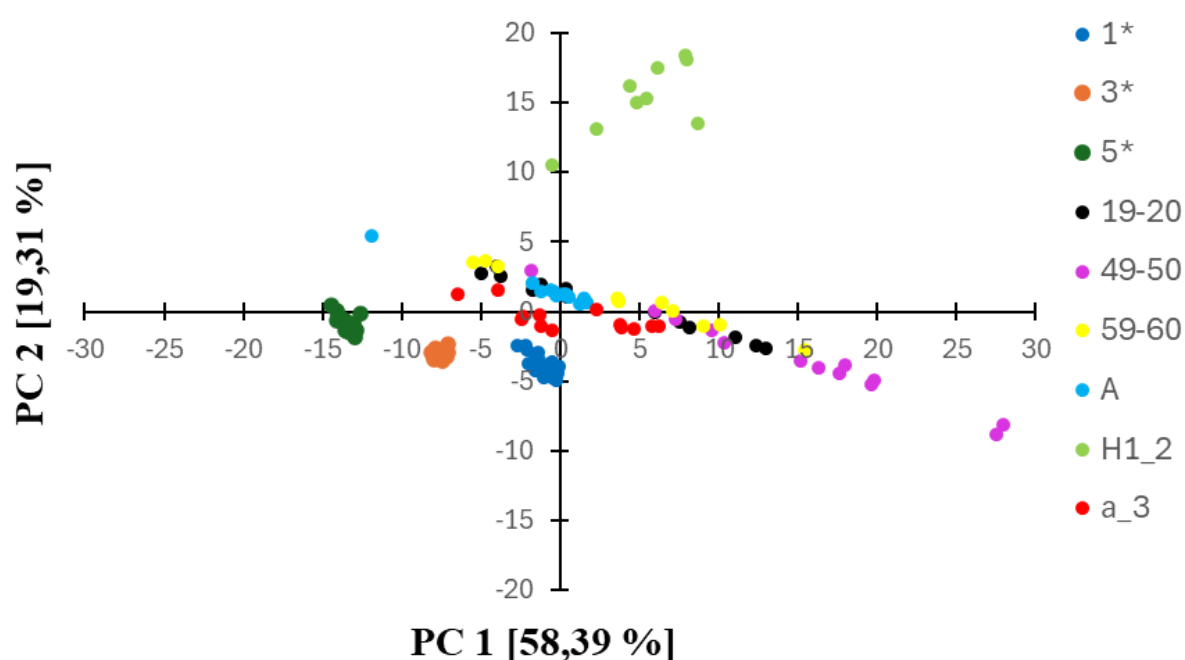
Dôležitou časťou tejto diplomovej práce bolo využitie zvolenej štatistickej metódy k vyhodnoteniu väčšieho množstva spektier získaných pomocou FTIR. Konkrétne bola aplikovaná analýza hlavných komponentov. PCA slúži k redukcii viacrozmerých dát, triedi vzorky podľa spoločných znakov. Z veľkého množstva pôvodných parametrov sa vytvorí pár premenných, ktoré najviac popisujú variabilitu vzoriek. Snahou bolo úspešne aplikovať túto metódu a porovnať rozličné kultivácie s rozdielnymi polyhydroxyalkanoátmi. Zistenia sú zhrnuté v tejto kapitole.

4.3.1 Porovnanie všetkých kmeňov mikroorganizmov

V tejto časti práce bola snaha pomocou PCA spektier nájsť rozdiely medzi jednotlivými kmeňmi mikroorganizmov, ktoré produkovali rozličné polyhydroxyalkanoáty. Boli vybrané vzorky každého typu MO, prehľad možno vidieť v tabuľke 16. Pred samotnou PCA bola spektrám upravená baseline (viď 3.4), dáta boli normalizované na pík $1\ 540\ \text{cm}^{-1}$ a pozorované bolo rozmedzie spektra $400\text{--}1\ 700\ \text{cm}^{-1}$.

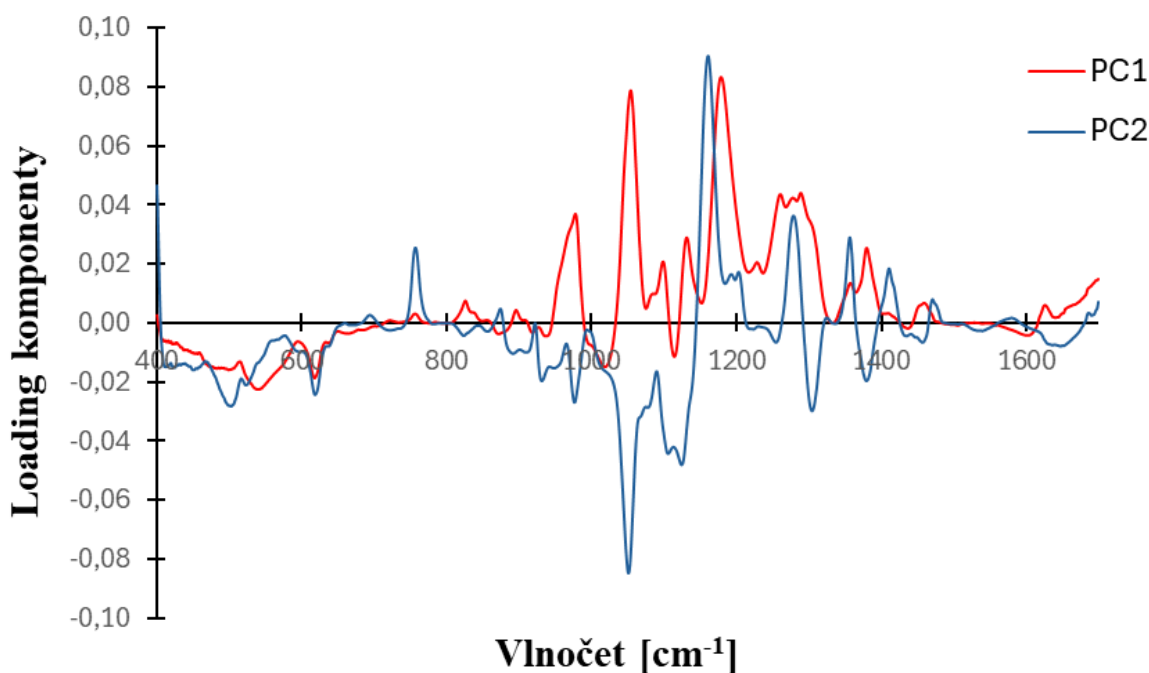
Tabuľka 16: Prehľad analyzovaných vzoriek

Označenie	Kmeň	PHA [%]	3HB [%]	4HB [%]	3HV [%]	4HV [%]
1*	DSM 25816	42,79	90,41	9,59	-	-
3*	DSM 19379	30,81	81,78	18,22	-	-
5*	DSM 19416	19,17	84,27	15,73	-	-
19-20	M 15344	58,57	87,64	-	12,36	-
49-50	DSM 15264	82,29	92,53	-	7,47	-
59-60	LMG 21645	73,23	84,12	-	15,88	-
H1_2	H1	32,63	37,36	62,64	-	-
a_3	AFn2	49,00	48,98	-	-	51,02
A	AH30	44,10	74,87	-	1,70	23,43



Graf 1: Výsledky PCA analýzy pre sledované kmene mikroorganizmov

Z výsledkov PCA na grafe 1 môžeme zhodnotiť, že sledované kmene MO sa do osobitných zón rozdelili iba čiastočne. Najväčšiu odlišnosť možno pozorovať pri vzorke H1_2, ktorá pozitívne koreluje s PC1 aj s PC2. jedná sa o bakteriálny kmeň *Aneurinibacillus thermoaerophilus* H1 a vzorka obsahovala kopolymér P(3HB-co-4HB), s vysokým zastúpením monoméru 4-hydroxybutyrátu. Pre vzorky 3* a 5* je viditeľná negatívna korelácia s PC1. Vzorky baktérie *Schlegelella thermodepolymerans* (19-20, 49-50, 59-60) sa celkovo horšie zoskupovali. Dôvodom môže byť nehomogénnosť analyzovanej biomasy. Vzorka 49-50 (kmeň DSM 15264) o niečo viac pozitívne koreluje s PC1 než ostatné kmene tejto baktérie.



Graf 2: Loadingy PC1 a PC2 pre sadu vzoriek sledovaných kmeňov MO

Z loadingu PC1 pre danú analýzu je zrejmé, že najviac k odlišnosti pre vzorky H1_2 a 49-50 prispievali píky 980 cm^{-1} , $1\ 050\text{ cm}^{-1}$ a $1\ 380\text{ cm}^{-1}$, ktoré súvisia s množstvom monoméru 3-hydroxybutyrátu. Ďalej bol viditeľný aj pík $1\ 164\text{ cm}^{-1}$, čo znamená, že polyhydroxyalkanoát vo vzorkách bol v amorfnom stave. Pre vzorky 3* a 5*, ktoré naopak negatívne korelujú s PC1 sú dôležité píky 620 cm^{-1} , $1\ 030\text{ cm}^{-1}$ a $1\ 115\text{ cm}^{-1}$. Pík $1\ 030\text{ cm}^{-1}$ súvisí s obsahom monoméru 4-hydroxybutyrátu v kopolyméri.

Zaujímavá je pozitívna korelácia H1_2 s PC2, keďže ide o jedinú vzorku pre ktorú hrá PC2 výraznú rolu. Z loadingu PC2 vyplýva, že významným je pík 755 cm^{-1} – vzorka obsahuje vysoké množstvo 4-hydroxybutyrátu a pre ten je daný pík špecifický. Ďalej je možné pozorovať pík $1\ 160\text{ cm}^{-1}$, ktorý predstavuje amorfnoť vzorky, a tiež $1\ 280\text{ cm}^{-1}$ a $1\ 360\text{ cm}^{-1}$, ktoré indikujú vysoký podiel 4-hydroxybutyrátu.

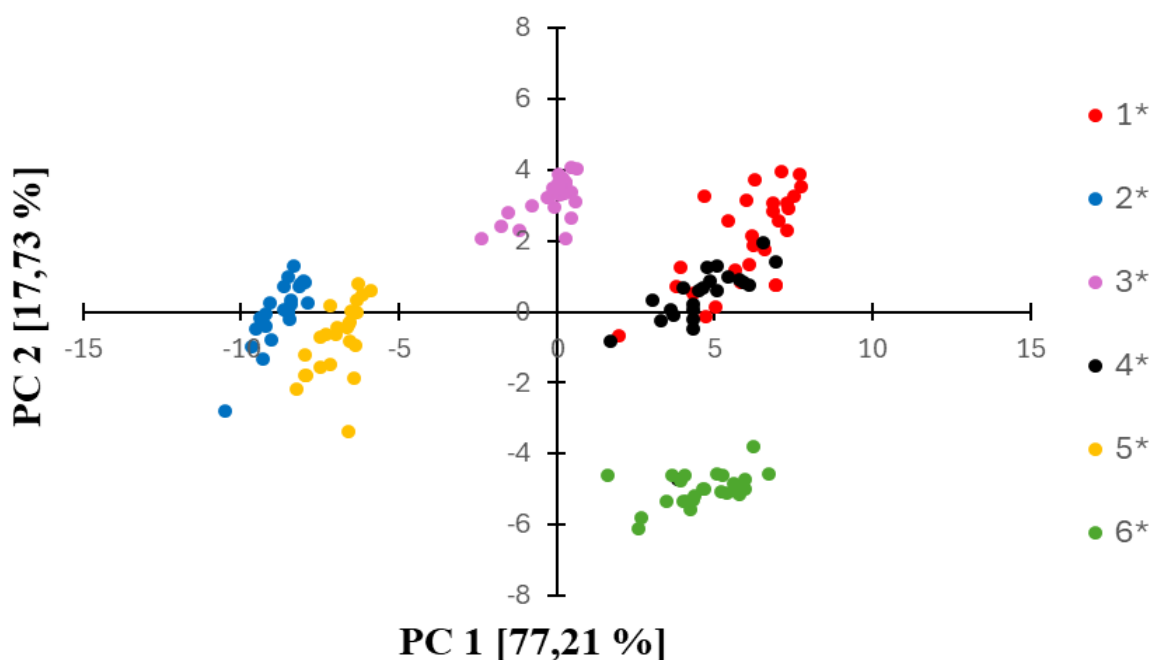
Celkovo môžeme zhodnotiť, že najviac odlišností vo vzorkách s kopolymérmi je pozorovateľných, ak sa v nich nachádza monomér 4-hydroxybutyrát vo väčšom množstve. Keďže vzorky *C. malaysiensis* (1*, 3* a 5*) sa v prípade prevedenej PCA dobre zoskupovali, sú rozobrané v ďalšej kapitole.

4.3.2 Výsledky pre kmene producenta *Cupriavidus malaysiensis*

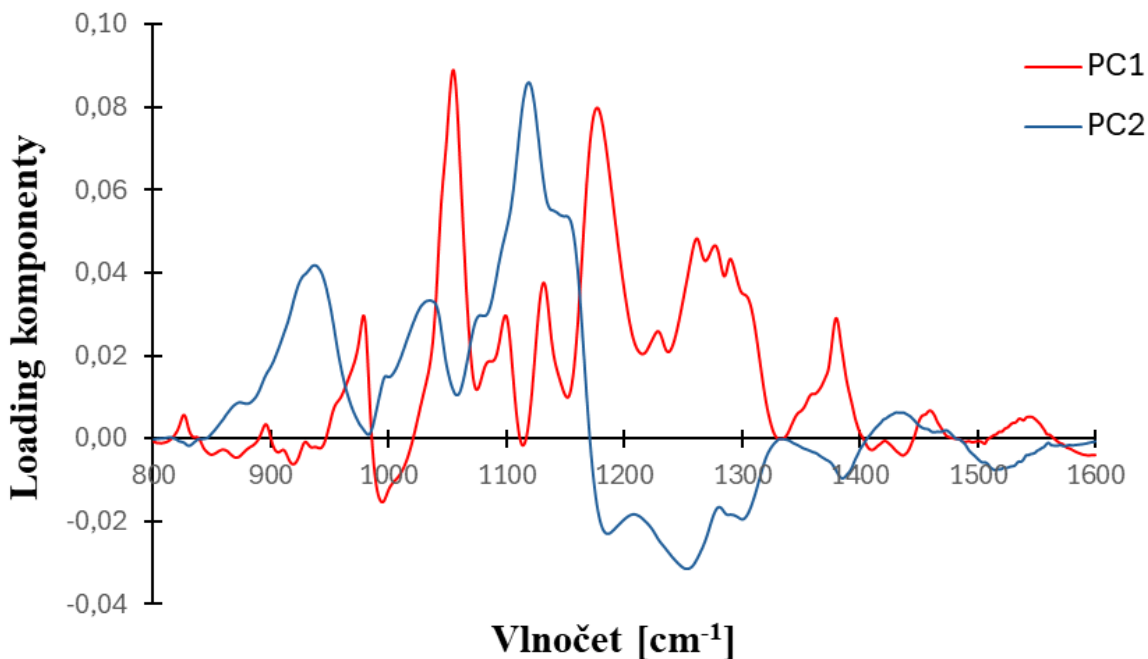
PCA vzoriek *Cupriavidus malaysiensis* preukázala niekoľko rozdielov medzi kmeňmi. Pred PCA boli vzorky normalizované na amid II ($1\ 540\ \text{cm}^{-1}$), bola upravená baseline a analyzované bolo spektrum v rozmedzí $800\ \text{cm}^{-1}$ až $1\ 600\ \text{cm}^{-1}$. Z loadingov môžeme usúdiť, že najviac rozdielov v týchto vzorkách bolo kvôli kvalitatívnym vlastnostiam PHA – či už kryštalickosť/amorfnosť alebo monomérmé zloženie kopolyméru.

Tabuľka 17: Obsah a monomérmé zloženie PHA pre vzorky 1* až 6*, kmene *C. malaysiensis*

Kmeň	Substrát	Označenie	PHA [%]	3HB [%]	4HB [%]
DSM 25816	γ -butyrolakton	1*	42,79	90,41	9,59
	1,4-BD	2*	12,19	92,35	7,65
DSM 19379	1,4-BD	3*	30,81	81,78	18,22
	γ -butyrolakton	4*	53,95	90,62	9,38
DSM 19416	1,4-BD	5*	19,17	84,27	15,73
	γ -butyrolakton	6*	40,95	90,38	9,62



Graf 3: PCA vzoriek 1* až 6*. Producentom sú tri kmene *Cupriavidus malaysiensis*. Vzorky obsahujú kopolymér P(3HB-co-4HB) v rôznom množstve a s rozličným monomérmým zastúpením.



Graf 4: Loadiny PC1 a PC2 pre vzorky 1* až 6*

Bolo pozorované zoskupenie (korelácia) vzoriek 1* a 4* v pozitívnej časti PCA grafu, pričom najväčší vplyv mala práve komponenta PC1. Vzorky, ktoré pozitívne korelujú s PC1 vykazujú intenzívne píky v oblasti $1\ 050\ \text{cm}^{-1}$, ktorý intenzívne s množstvom 3HB vo vzorke. Ďalej bol významný pík $1\ 180\ \text{cm}^{-1}$, ktorý súvisí s amorfnoťou polyhydroxyalkanoátov. Preukázal sa aj pík $1\ 380\ \text{cm}^{-1}$, čo je už spomínaný dáždnikový efekt metylovej skupiny. Zoskupenie týchto vzoriek dáva zmysel v závislosti na výsledkoch GC a teda obsahu a kvality PHA (vid' Tabuľka 17). Obe vzorky boli kultivované na rovnakom substráte, jedná sa však o iný kmeň.

Naopak vzorky 2* a 5* spoločne negatívne korelujú s komponentou PC1. Tu sa preukázal bod $990\ \text{cm}^{-1}$, čo by mohlo súvisieť s kryštalitmi vo vzorke. Na tieto vzorky tiež nemala výrazný vplyv PC2. Tieto vzorky boli kultivované za využitia substrátu 1,4-BD a obsahujú menšie množstvo celkového PHA než vzorky 1* a 4*.

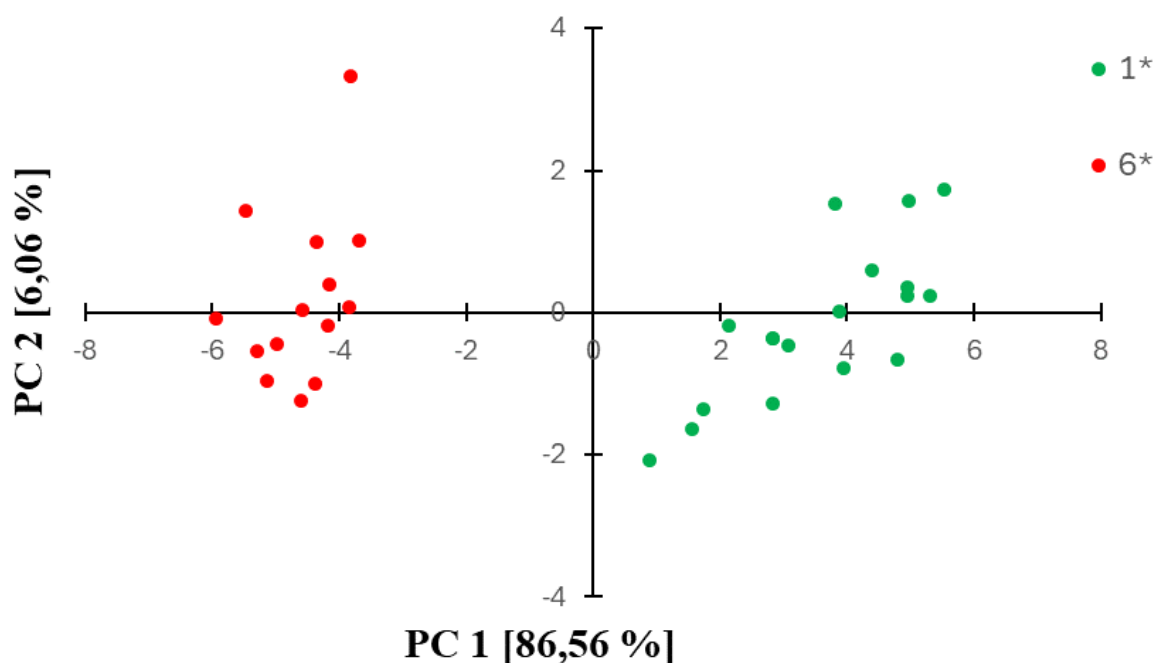
Komponenta PC2 hrala rolu pri vzorke 3*, ktorá je v rámci jej osi posunutá v pozitívnom smere. Pozorované píky opäť pravdepodobne súvisia s obsahom 3HB a sú to $1\ 120\ \text{cm}^{-1}$ a $938\ \text{cm}^{-1}$. Vzorka 6* negatívne koreluje s PC2 komponentou a mierne pozitívne koreluje aj s PC1. Pozorovaný pík je v okolí $1\ 250\ \text{cm}^{-1}$, je pripisovaný absorbcii metylu a súvisí s obsahom 3-hydroxybutyrátu.

4.3.3 Porovnanie kultivácií dvoch kmeňov *Cupriavidus malaysiensis* za využitia rovnakého substrátu pri kultivácií

Vzhľadom k výsledkom predchádzajúcej kapitoly sme sa bližšie pozreli na rozdiely medzi vzorkami 1* a 6*. Jedná sa o rozličné kmene baktérie *Cupriavidus malaysiensis*, ktoré rástli na rovnakom substráte (γ -butyrolakton). Obsah PHA a kvalitatívne zloženie kopolyméru sú pre tieto vzorky veľmi podobné. V tomto prípade bola analýza prevedená po normalizácii na amid II ($1\ 540\ \text{cm}^{-1}$) a upravení baseline. Sledované rozmedzie spektra je $400\ \text{cm}^{-1}$ až $4\ 000\ \text{cm}^{-1}$.

Tabuľka 18: Obsah a monomézne zloženie vzoriek 1* a 6*

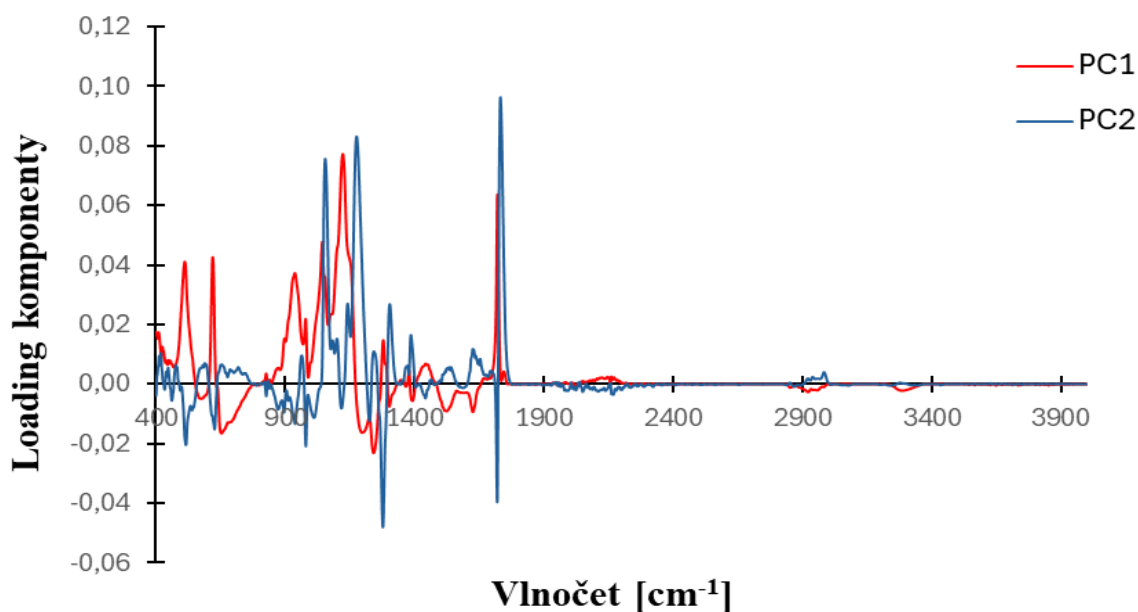
Kmeň	Substrát	Označenie	PHA [%]	3HB [%]	4HB [%]
DSM 25816	γ -butyrolakton	1*	42,79	90,41	9,59
DSM 19416	γ -butyrolakton	6*	40,95	90,38	9,62



Graf 5: PCA vzoriek 1* a 6*

Z PCA grafu vyplýva, že vzorka 1* (kmeň DSM 25816) pozitívne koreluje s PC1. Naopak vzorka 6* kmeňa DSM 19379 koreluje negatívne. Rozptyl bodov pravdepodobne súvisí s nehomogenosťou vysušenej biomasy pri meraní.

Z loadingu PC1 môžeme pozorovať že pre vzorku 1* hrali najdôležitejšiu rolu najmä píky $1\ 720\ \text{cm}^{-1}$ (špecifický pre obsah PHA v sušine), ďalej $1\ 160\ \text{cm}^{-1}$ čo predstavuje amorfnosť vzorky. Vzorka 6* negatívne koreluje s PC1 a signifikantný pík je $1\ 270\ \text{cm}^{-1}$, ktorý súvisí s kryštalickosťou. V rámci loadingu 2 sa opäť preukázali píky $1\ 050\ \text{cm}^{-1}$, $1\ 180\ \text{cm}^{-1}$ a signifikantne aj pík $1\ 720\ \text{cm}^{-1}$.



Graf 6: Loadingy PC1 a PC2 pre PCA vzoriek 1* a 6*

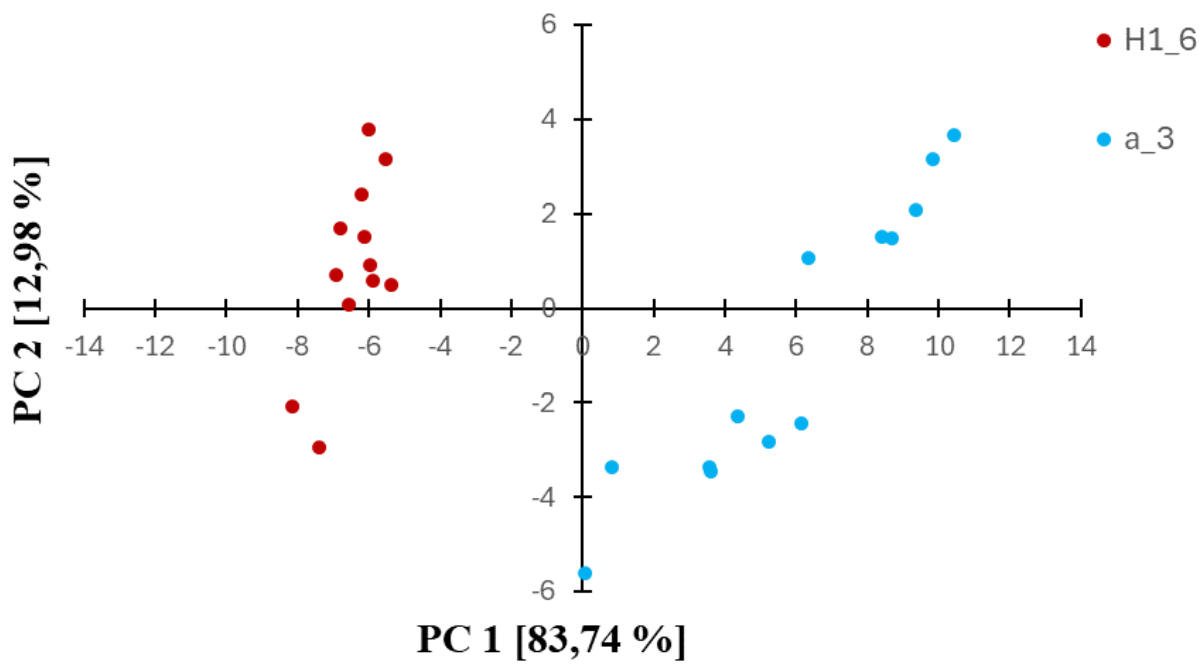
4.3.4 Porovnanie vzoriek obsahujúcich monomér 4-hydroxybutyrát a monomér 4-hydroxyvalerát

Ďalej boli porovnané vzorky, ktoré sa líšili typom jedného monoméru v kopolyméri. Konkrétne bol sledovaný monomér 4-hydroxybutyrát a monomér 4-hydroxyvalerát. Vzorky boli normalizované na amid II ($1\,540\text{ cm}^{-1}$), bola upravená baselina a pozorované spektrum v oblasti 400 cm^{-1} až $1\,600\text{ cm}^{-1}$.

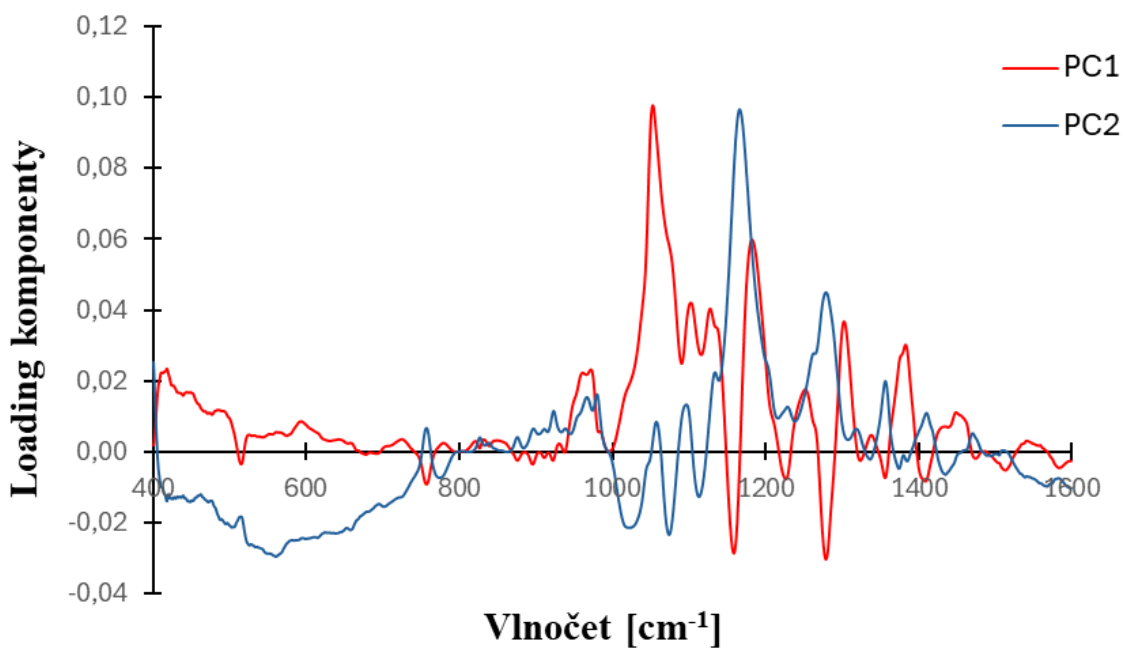
Z PCA môžeme opäť posúdiť, že najviac dáta rozdeľuje PC1. Vzorka obsahujúca 4HV monomér s PC1 koreluje pozitívne (a_3), zatiaľ čo vzorka so 4HB negatívne. Pri hodnotení PC2 je znovu viditeľný široký rozptyl. Na základe loadingu PC1 pre vzorku s obsahom 4HV, k rozdielu najviac prispievajú píky $1\,180\text{ cm}^{-1}$ a $1\,050\text{ cm}^{-1}$. Malé píky možno pozorovať aj pri $1\,285\text{ cm}^{-1}$ a $1\,380\text{ cm}^{-1}$. Z loadingu PC2 možno pozorovať pozitívny pík $1\,160\text{ cm}^{-1}$. Pre vzorku s obsahom 4HB, ktorá koreluje s PC1 negatívne, je z loadingu PC1 najdôležitejší negatívny pík $1\,160\text{ cm}^{-1}$ a $1\,279\text{ cm}^{-1}$, tie nesú informáciu o kryštalickosti vzorky.

Tabuľka 19: Monomérne zloženie PHA vo vzorkách a_3 a H1_6

Označenie	Kmeň	PHA [%]	3HB [%]	4HB [%]	3HV [%]	4HV [%]
a_3	AFn2	49,00	48,98	-	-	51,02
H1_6	H1	25,53	66,52	33,48	-	-



Graf 7: Analýza vzoriek H1_6 a a_3



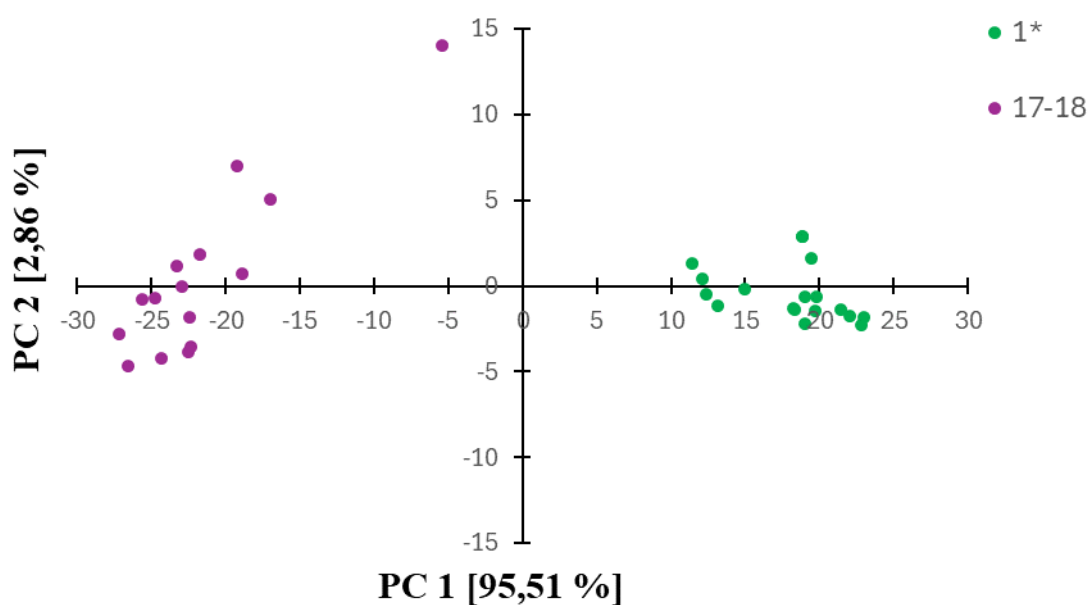
Graf 8: Loadiny PC1 a PC2 pre PCA vzoriek H1_6 a a_3

4.3.5 Porovnanie vzoriek obsahujúcich monomér 4-hydroxybutyrát a 3-hydroxyvalerát

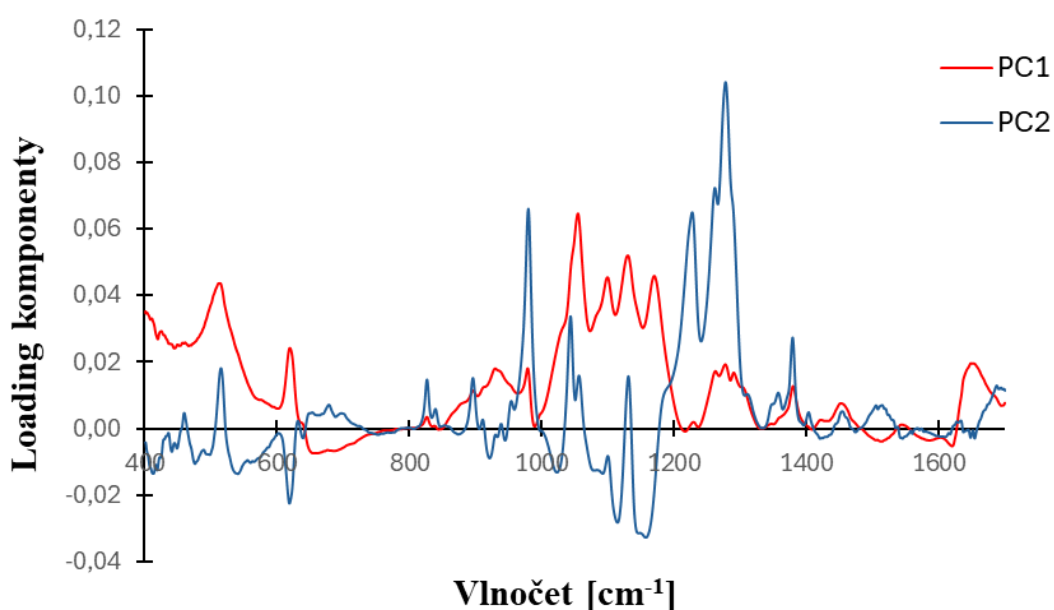
Ďalej boli porovnávané vzorky, pričom jedna obsahovala v kopolyméri monomér 3HV (17-18) a druhá 4HB (1*). Dáta boli normalizované na amid II ($1\ 540\ \text{cm}^{-1}$), bola upravená baseline a vyhodnotené spektrum v rozmedzí $400\text{--}1\ 700\ \text{cm}^{-1}$.

Tabuľka 20: Vzorky 1* a 17-18, líšia sa monomérnym zložením PHA

Označenie	Kmeň	PHA [%]	3HB [%]	4HB [%]	3HV [%]
1*	DSM 25816	42,79	90,41	9,59	-
17-18	M 15344	45,45	88,87	-	11,13



Graf 9: PCA pre vzorky 1* a 17-18



Graf 10: Loadiny PC1 a PC2 pre analýzu vzoriek 1* a 17-18

Z výsledkov opäť vyplýva že najviac dáta rozdelila stanovená PC1. Vzorka s obsahom 4HB koreluje s PC1 pozitívne, vzorka s monomérom 3HV negatívne. Pre vzorku 1* z loadingu PC1 vyšli dôležité píky 621 cm^{-1} , $1\,056\text{ cm}^{-1}$ a tiež píky v oblasti nat'ahovania väzieb C-O-C či C-C-O. Pre vzorku negatívne korelujúcu s PC1 bolo možné pozorovať najmä oblasť v okolí 621 cm^{-1} .

Snahou bolo nájsť aj významné rozdiely pre vzorku obsahujúcu monomér 3HV. Porovnané boli vzorky a_1 a a_5. Vo vzorke však bolo veľmi malé zastúpenie daného monoméru a odlišnosti sa prejavili opäť najmä z dôvodu prítomnosti monoméru 4HB v jednej zo vzoriek. Príslušná PCA je uvedená v prílohe 3.

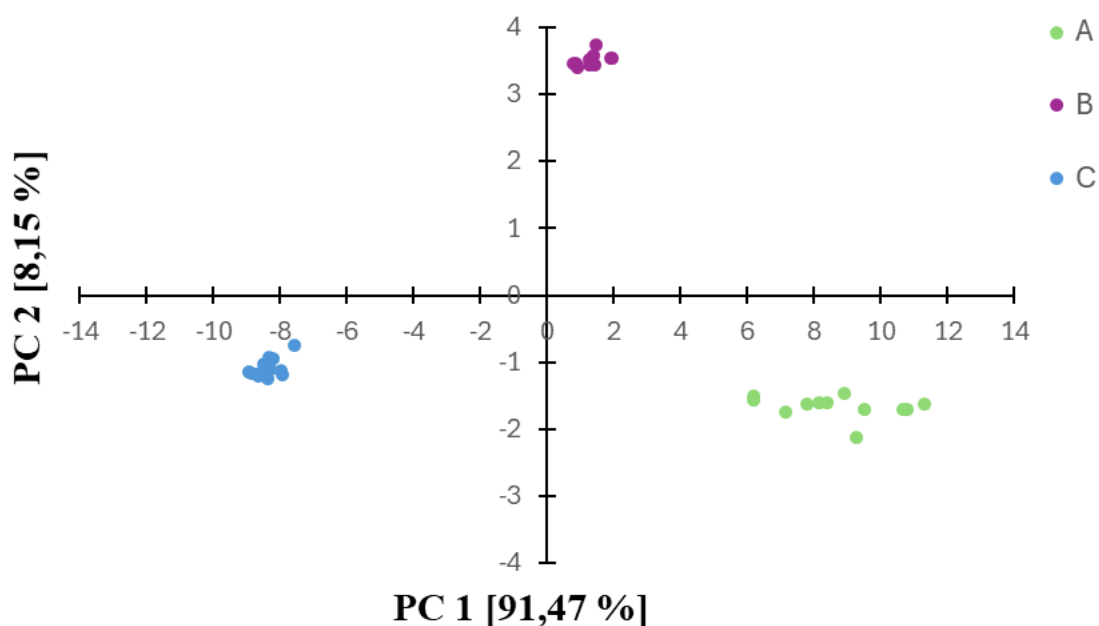
4.3.6 Vzorky obsahujúce komplexné kopolyméry

Vyhodnotené boli aj vzorky A, B a C, ktoré obsahovali zložené kopolyméry PHA s rozličným zastúpením monomérov (viď 4.1). Vzorky boli normalizované na amid II ($1\,540\text{ cm}^{-1}$), bola upravená baseline a PCA aplikovaná na celý rozsah spektra.

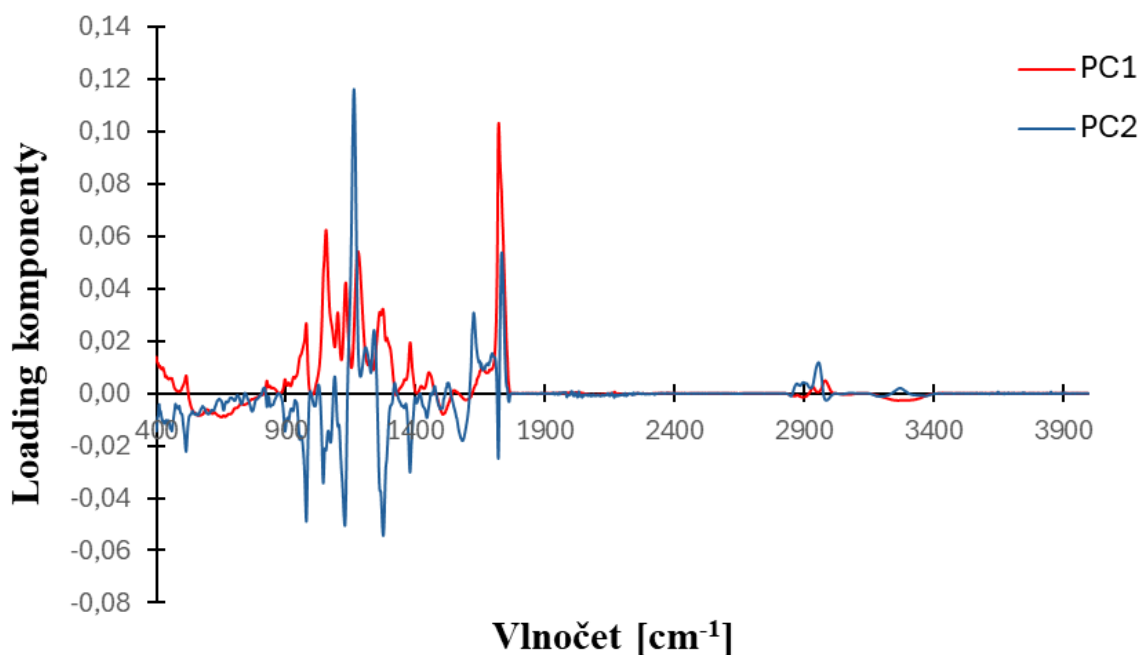
V tomto prípade sa dátové rady veľmi pekne zoskupili, čo preukazuje homogénnosť analyzovanej biomasy. Jednotlivé vzorky sa zároveň rozdelili pozdĺž osi komponenty PC1. Vzorka C s PC1 korelovala negatívne, vzorka A pozitívne a na vzorku B PC1 nemala veľký vplyv. Naopak pre vzorku B hrala dôležitú rolu pozitívna korelácia s komponentou PC2.

Tabuľka 21: Zloženie PHA v biomasách vzoriek A, B a C

Kmeň	Označenie vzorky	3HB [%]	3HV [%]	4HV [%]	4HHx [%]	5HV [%]	PHA [%]
AH30	A	73,97	1,61	24,41	-	-	44,52
AFn2	B	88,36	4,05	-	7,59	-	20,37
AFn2	C	69,20	-	-	-	30,80	38,29



Graf 11: PCA pre vzorky A, B a C obsahujúcich heteropolyméry



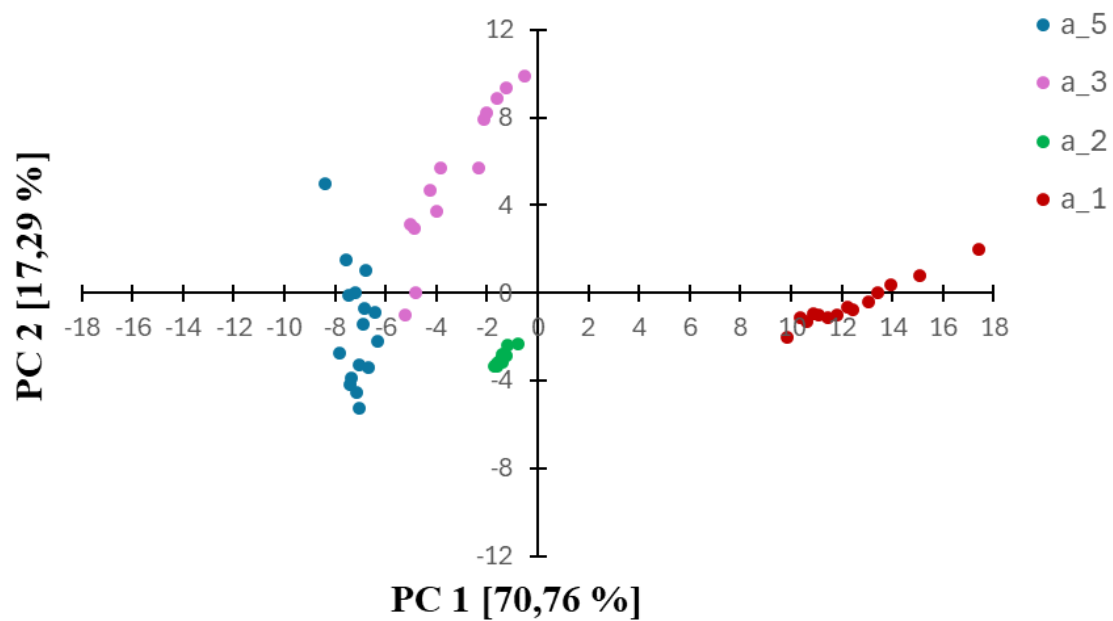
Graf 12: Loadiny PC1 a PC2 pre PCA vzoriek A, B a C

Pre vzorku A, ktorá pozitívne koreluje s PC1 z loadingu PC1 môžeme pozorovať píky 1 720 cm^{-1} (obsah polyesteru, a teda PHA), 1 050 cm^{-1} a 974 cm^{-1} . Negatívnu koreláciu má vzorka C. Vzorka B, ktorá obsahuje v heteropolyméri monomér 4-hydroxyhexanoát z grafu loadingu PC2 vykazuje intenzívny pík pri 1 160 cm^{-1} , ale tiež malý pík v oblasti 2 965 cm^{-1} a ten súvisí s asymetrickým naťahovaním C-H metylénovej skupiny.

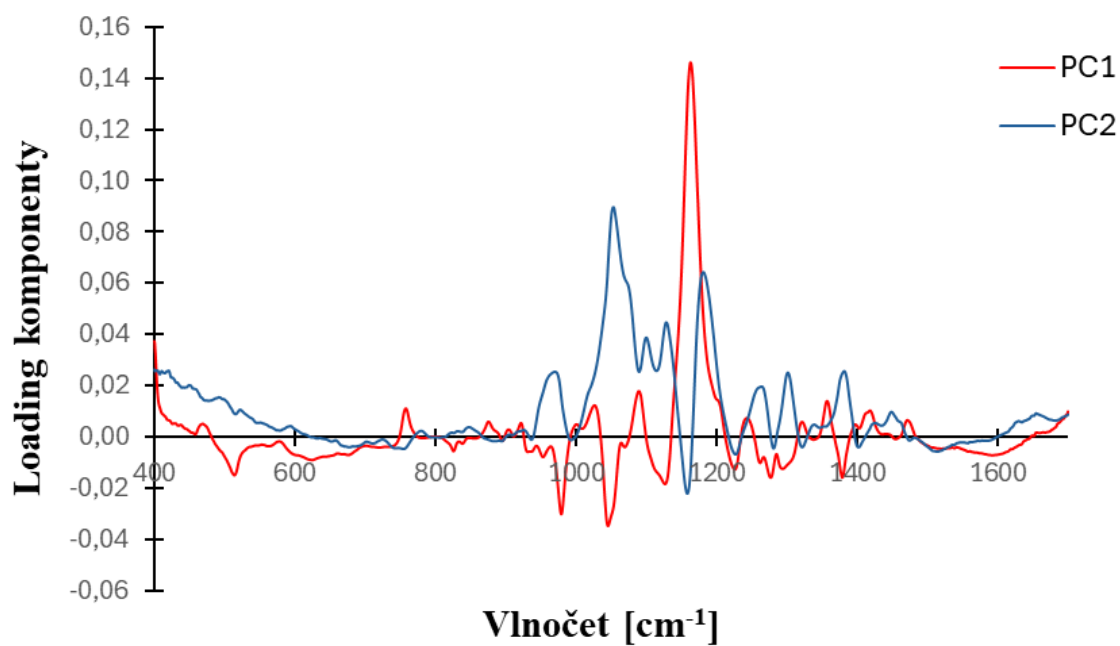
PCA analýza bola prevedená aj na celé spektrum po normalizácii na amid II pre sadu obsahujúcu rozličné komplexné polyhydroxyalkanoáty produkované baktériou *A. thermoaerophilus*. Z výsledkov vyplýva, že vzorka a_1 pozitívne koreluje s PC1. Najvýraznejší je pík 1 160 cm^{-1} . Táto vzorka obsahovala v heteropolyméri vysoký podiel monoméru 4HB. Vzorka a_5 obsahovala prevažne 3HB a iba veľmi malé množstvo 3HV, negatívne koreluje s PC1. Z loadingu PC1 sú pre ňu dôležité píky 980 cm^{-1} a 1 380 cm^{-1} (indikátor monoméru 3HB). Vzorka a_3 pozitívne koreluje s PC2, obsahuje monomér 4HV. Z loadingu PC2 sú dôležité známe píky 970 cm^{-1} , 1 050 cm^{-1} a 1 180 cm^{-1} .

Tabuľka 22: Vzorky heteropolymérov

Kmeň	Označenie vzorky	PHA [%]	3HB [%]	4HB [%]	3HV [%]	4HV [%]	5HV [%]
H1	a_1	58,51	33,33	66,06	0,55	-	-
AFn2	a_2	50,84	64,84	-	2,20	-	32,97
AFn2	a_3	49,00	48,98	-	-	51,02	-
H1	a_4	80,68	25,35	74,65	-	-	-
AFn2	a_5	50,03	91,88	-	1,59	-	-



Graf 13: PCA analýza vzoriek heteropolymérov



Graf 14: Loadings PC1 a PC2

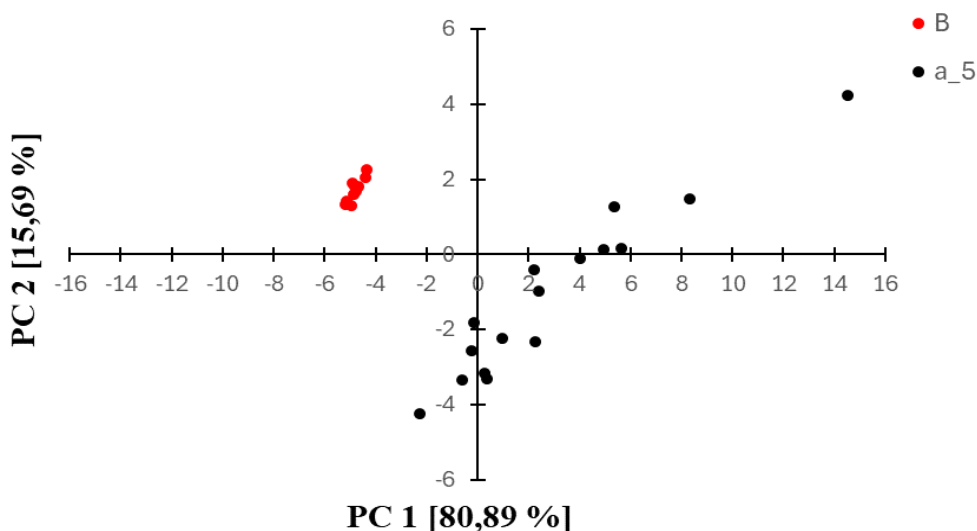
4.3.7 Prítomnosť monoméru 4-hydroxyhexanoátu

Ďalej boli ešte porovnané vzorky B a a_5, ktoré sa líšili o monomér 4HHx. Konkrétne sa nachádzal v kopolyméri vzorky B, ktorá negatívne koreluje s PC1 a pozitívne s PC2. Vzorka a_5 naopak prevažne pozitívne koreluje s PC1, avšak tu sa opäť preukazuje nehomogénnosť biomasy. Spektrám bola upravená baseline a boli normalizované na amid II ($1\ 540\ \text{cm}^{-1}$).

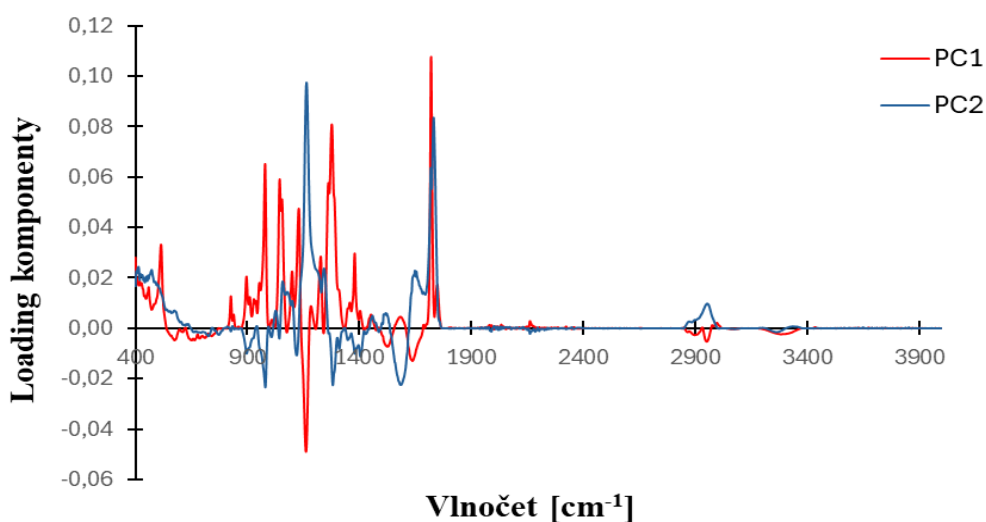
Tabuľka 23: PHA vo vzorkách B a a_5

Kmeň	Označenie	PHA [%]	3HB [%]	3HV [%]	4HHx [%]
AFn2	B	20,79	88,13	3,93	7,94
AFn2	a_5	50,03	91,88	1,59	-

Z loadingu PC1 je značné, že píky pre pozitívnu PC1 sú $1\ 720\ \text{cm}^{-1}$, $1\ 380\ \text{cm}^{-1}$, $1\ 280\ \text{cm}^{-1}$, $1\ 050\ \text{cm}^{-1}$ a $976\ \text{cm}^{-1}$. Pre negatívnu koreláciu s PC1 je výrazný pík v oblasti $1\ 160\ \text{cm}^{-1}$ a malý pík pri $2\ 965\ \text{cm}^{-1}$.



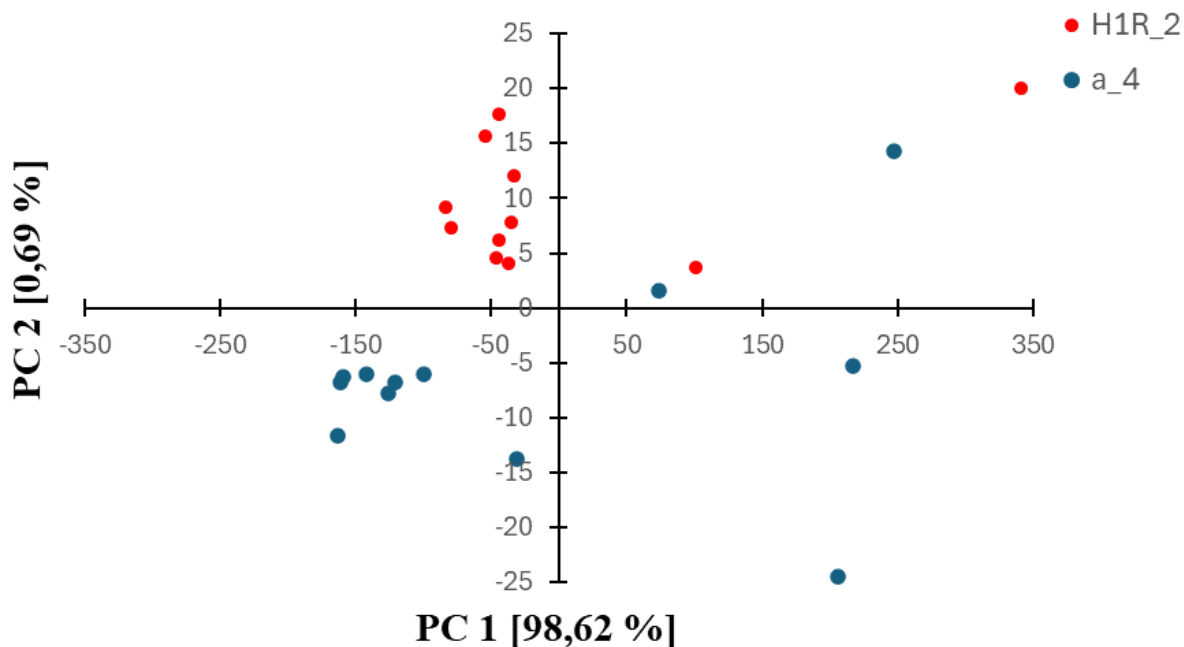
Graf 15: PCA pre vzorky B (s obsahom monoméru 4-hydroxyhexanoátu) a a_5 (bez 4HHx)



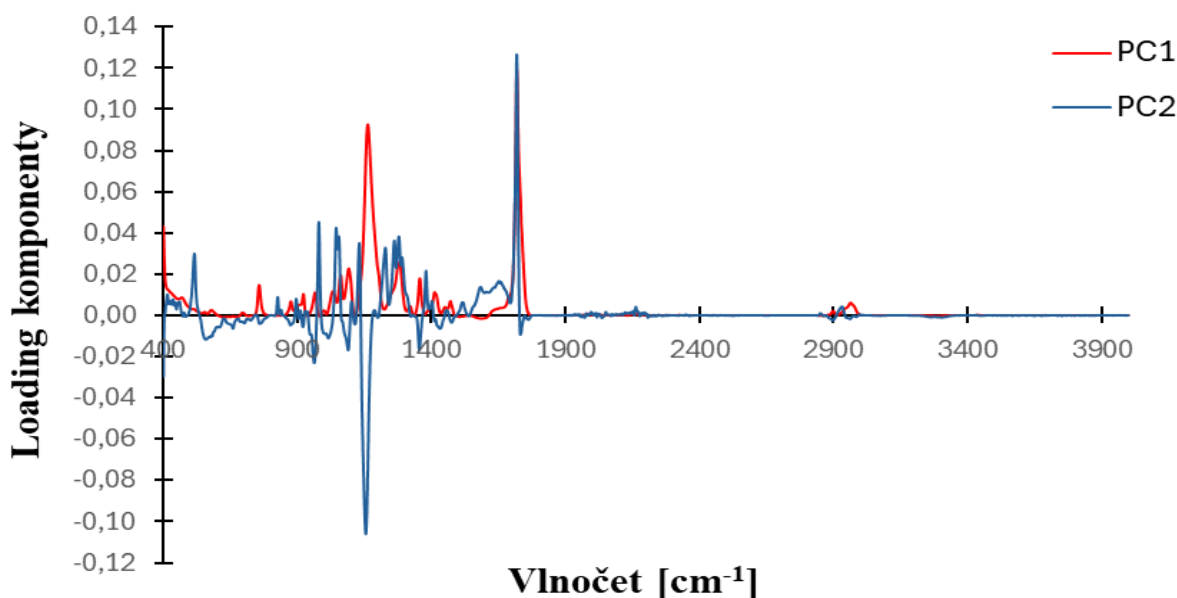
Graf 16: Loadingy PC1 a PC pre PCA vzoriek B a a_5

4.3.8 Obsah polyhydroxyalkanoátov v biomase

Snahou bolo tiež aplikovať túto metódu na rozličné obsahy PHA vo vzorkách. Pri využití spektier s väčším rozsahom vlnočtu prispievali k výsledným odlišnostiam najmä kvalitatívne vlastnosti. Spektrám bola opäť upravená baseline, boli normalizované na amid II ($1\,540\text{ cm}^{-1}$).



Graf 17: PCA pre vzorky s rozdielnym obsahom PHA aplikované na $400\text{--}4\,000\text{ cm}^{-1}$



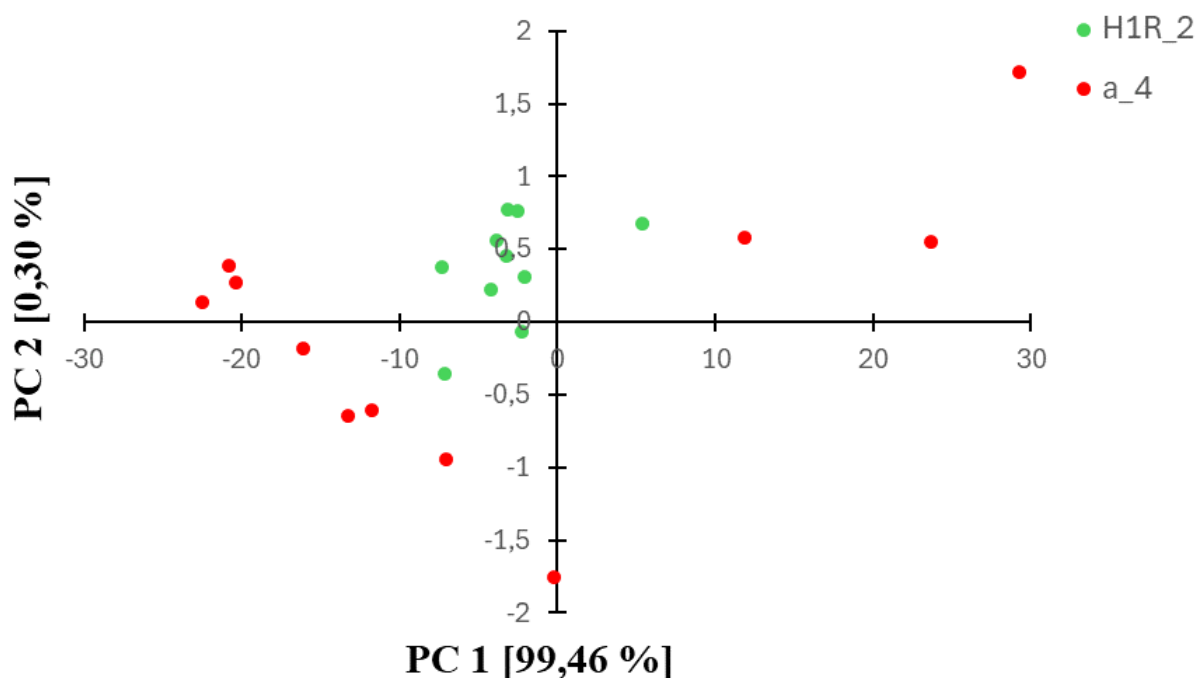
Graf 18: Loadiny PC1 a PC2 pre PCA vzoriek H1R_2 a a_4 aplikovanú na celé spektrum

Tabuľka 24: Výsledky GC pre vzorky H1R_2 a a_4

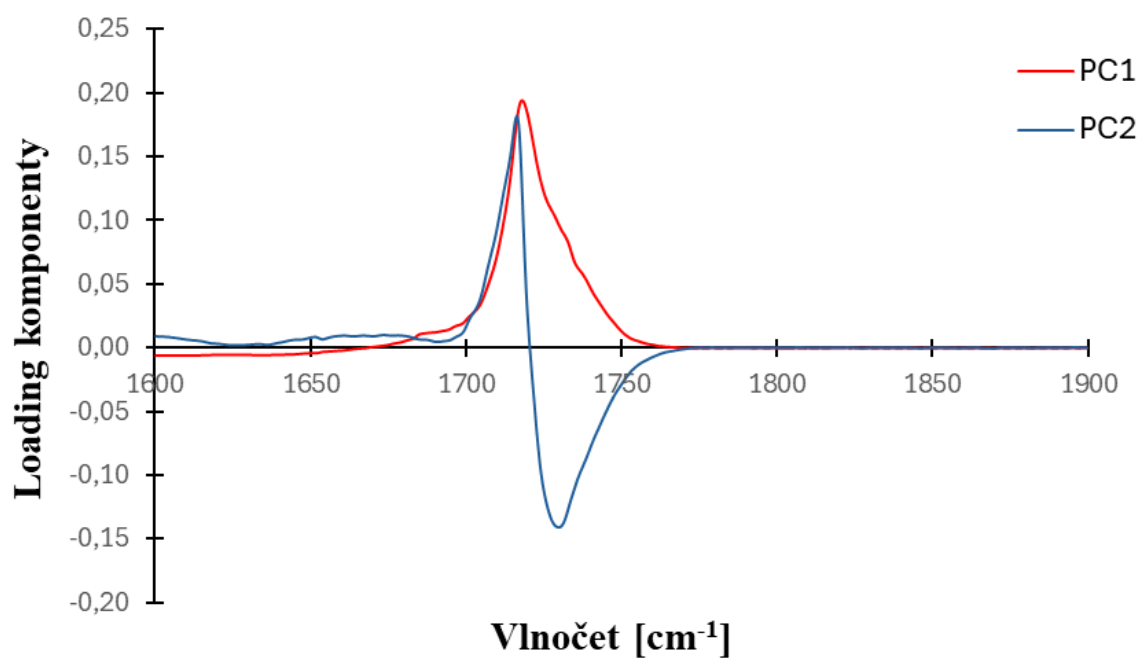
Kmeň	Vzorka	PHA [%]	3HB [%]	4HB [%]
H1	H1R_2	38,94	35,34	64,66
H1	a_4	80,68	25,35	74,65

Z výsledkov PCA aplikovanej na celé spektrum vzoriek s rozdielnym obsahom PHA je možné konštatovať, že najdôležitejším príspevkom k rozdielnosti sú opäť píky spojené s kvalitatívnymi vlastnosťami PHA v biomase. Obe vzorky ukázali istú nehomogénnosť vyhodnocovanej biomasy. Vzorka s nižším obsahom PHA (H1R_2) negatívne koreluje s PC1 a pozitívne koreluje s PC2. Vzorka s vysokým obsahom PHA v biomase (a_4) negatívne koreluje aj s PC1 aj s PC2. Z loadingov PC1 a PC2 je možné pozorovať píky $1\,720\text{ cm}^{-1}$, $1\,160\text{ cm}^{-1}$, $1\,050\text{ cm}^{-1}$, $1\,380\text{ cm}^{-1}$ a 977 cm^{-1} .

Ďalej sme sa zamerali na bližšie vyhodnotenie s využitím píku typického pre polyestery ($1\,720\text{ cm}^{-1}$). Cieľom bolo zistiť, či sa prejaví jeho intenzita alebo zmena tvaru. Výsledky PCA sú uvedené na grafoch 19 a 20. Napriek tomu, že sa vzorky líšili obsahom PHA nám intenzita píku $1\,720\text{ cm}^{-1}$ neumožnila ich rozdelenie. Prejavil sa tvar píku, pre loading PC2 vyšla v podstate derivácia píku pre loading PC1 (posun vľavo pre pozitívnu PC2 a vpravo pre negatívnu PC2).



Graf 19: PCA vzoriek H1R_2 a a_4 aplikovaná na rozsah spektra $1\,600\text{--}1\,900\text{ cm}^{-1}$



Graf 20: Loadiny PC1 a PC2 pre PCA vzoriek H1R_2 a a_4 (1 600–1 900 cm⁻¹)

5 ZÁVER

Cieľom tejto diplomovej práce bola rešerš ohľadne rozličných metód pre kvantitatívne a kvalitatívne stanovenie polyhydroxyalkanoátov in situ, pričom experimentálna časť bola zameraná na analýzu pomocou vibračnej spektroskopie. Snahou bolo aj využitie štatistickej metódy pre vyhodnotenie veľkej sady spektier vzoriek s rozličnými obsahmi polymérov, ktoré sa líšili monomérom zložením.

V práci boli použité vzorky biomasy s obsahom polyhydroxyalkanoátov, ktoré syntetizovali rozličné mikroorganizmy. Bakteriálny producenti boli *Aneurinibacillus thermoaerophilus* sp. H1, AH30 a AFn2, ďalej tiež tri kmene producenta *Cupriavidus malaysiensis* (25816, 19416 a 19379) a kmene *Schlegelella thermodepolymerans* (M 15344, DSM 15264 a LMG 21645). Vzorky boli zbierané priebežne v rámci iných záverečných prác a projektov, niektoré vzorky boli zachované z predchádzajúcej bakalárskej práce alebo kultivované v rámci tejto práce.

Biomasa obsahovala rôzne typy polyhydroxyalkanoátov, konkrétne sa skúmali heteropolyméry. Polyméry vo vzorkách sú poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát), poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát), poly(3-hydroxybutyrát-co-5-hydroxyvalerát), poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxyvalerát), poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát-co-4-hydroxyvalerát), poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát-co-5-hydroxyvalerát), poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát-co-4-hydroxybutyrát) a poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát-co-4-hydroxyhexanoát). Typ polyhydroxyalkanoátu a zastúpenie jednotlivých monomérov záviselo ako od kmeňa mikroorganizmu, tak i od substrátu, ktorý sa pri kultivácii použil ako prekursor. Na základe výsledkov plynovej chromatografie bolo opäť potvrdené, že so zvyšujúcim sa glycerolom v produkčnom médiu stúpa zastúpenie monoméru 3-hydroxybutyrátu v kopolyméri, zatiaľ čo pre syntézu 4-hydroxybutyrátu je vhodnejší prekursor 1,4-butandiol. Bakteriálne kmene *C. malaysiensis* produkovali väčšie množstvo celkového PHA za využitia substrátu γ -butyrolakton. Vhodným substrátom pre syntézu monoméru 3-, 4- či 5-hydroxyvalerátu je valerolakton.

Hlavnou analytickou metódou v tejto práci je technika ATR-FTIR. Vzorky vysušenej biomasy boli analyzované a výsledné spektrá boli porovnávané s plynovou chromatografiou, ktorá poskytla presné informácie ohľadom kvantitatívnych a kvalitatívnych charakteristík polymérov v biomase.

Výsledné spektrá boli skúmané na základe rešerše. V kapitole 4.2 sú pozorované rozdiely v spektrách a hľadané signifikantné píky, ktoré by slúžili k úspešnej kvalitatívnej analýze PHA v biomase. Najlepšie rozdiely boli pozorované medzi kopolymérmi P(3HB-co-4HB) a P(3HB-co-3HV). Dôležité boli píky $1\ 380\ \text{cm}^{-1}$ a $1\ 360\ \text{cm}^{-1}$. Oblasť $1\ 380\ \text{cm}^{-1}$ značí zastúpenie monoméru 3-hydroxybutyrátu vo vzorke. Pík $1\ 360\ \text{cm}^{-1}$ súvisí s obsahom 4-hydroxybutyrátu. Pík $755\ \text{cm}^{-1}$ taktiež súvisí s množstvom monoméru 4-hydroxybutyrátu v kopolyméri P(3HB-co-4HB).

V spektrách bol tiež pozorovaný stav v akom sa daný polymér nachádza – kryštalinita a amorfnosť látok je dôležitá súčasť kvalitatívnej analýzy v prípade potenciálnej aplikácie materiálu v praxi. Píky spájané s formou v akej sa polyhydroxyalkanoát objavuje v biomase sú

1 270 cm^{-1} pre kryštalickú formu a 1 160 cm^{-1} pre formu natívnu – amorfnú. Zároveň bol indikátorom kryštalickosti aj ohyb esterového píku 1 720 cm^{-1} .

Okrem vyhodnocovania spektier pomocou referenčných píkov a oblastí bola práca zameraná aj na využiteľnosť zvolenej štatistickej metódy pri vyhodnocovaní nadmerného množstva spektrálnych dát. V prípade týchto experimentov bola zvolená a aplikovaná analýza hlavných komponent (PCA). Pomocou softwaru, ktorý bol vytvorený práve na vyhodnotenie spektier touto metódou, boli skúmané odlišnosti či podobnosti rozličných vzoriek. Táto časť teda zahŕňala veľké množstvo pokusov úspešne skombinovať rozdielne vzorky v rámci jednej analýzy a dostať tak výsledný graf, ktorý by popísal v čom sa jednotlivé vzorky líšili. Z výsledkov môžeme skonštatovať, že PCA potvrdila predpoklady vizuálneho zhodnotenia spektier.

Rozdielnosti monoméreného zloženia boli pozorované pri už spomínaných píkoch charakteristických pre 3-hydroxybutyrát a 4-hydroxybutyrát. Najmä 4-hydroxybutyrát výrazne ovplyvňoval výsledné rozdelenie vzoriek. Pozorované bolo aj oddelenie vzorky s monomérom 4-hydroxyhexanoátu od ostatných vzoriek obsahujúcich hydroxyvaleráty. Najviac sa prejavovali práve kvalitatívne vlastnosti polyhydroxyalkanoátov, a teda ich monomérené zloženie a kryštalickosť. Ostatné monomérené príspevky sa signifikantne neprejavovali v žiadnych pokusoch. Vhodné by preto bolo do budúcnosti sa zamerať na aplikáciu tohto postupu hlavne pri kopolyméroch obsahujúcich monoméry hydroxyvalerátu v oveľa väčších koncentráciách ako bolo v tejto práci.

Na základe výsledkov tejto práce môžeme konštatovať, že PCA metóda bola úspešne aplikovaná pri kvalitatívnej analýze in-situ, najmä v prípadoch prítomnosti monoméru 4-hydroxybutyrátu. Využitie tejto metódy pri semi-kvantitatívnej či kvantitatívnej analýze zatiaľ nebolo úspešné. Dôvodom zrejme bude vplyv rozličných monomérov na výsledné meranie píkov charakteristických pre obsah PHA v biomase.

Výhodou FTIR je rýchlosť merania, nevýhodou je nízka detekčná citlivosť. Nevýhodou využitia PCA pri analýze FTIR spektier je fakt, že redukovaním dimenzií dochádza k strate informácií. Taktiež pri vzorkách, ktoré mali nehomogénnu biomasu boli pozorované veľké rozdiely v nameraných spektrách a ich výsledných PCA grafoch. Vhodné by bolo ďalej preskúmať možnosti aplikácie tejto štatistickej metódy pri vyhodnotení FTIR spektier pri komplexnejších heteropolyméroch a pozorovať príspevky jednotlivých monomérov.

6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] C. S. K. Reddy, R. Ghai, Rashmi, a V. C. Kalia, „Polyhydroxyalkanoates: an overview", *Bioresource Technology*, roč. 87, č. 2, s. 137–146, dub. 2003, doi: 10.1016/S0960-8524(02)00212-2.
- [2] S. Behera, M. Priyadarshane, Vandana, a S. Das, „Polyhydroxyalkanoates, the bioplastics of microbial origin: Properties, biochemical synthesis, and their applications", *Chemosphere*, roč. 294, s. 133723, kvě. 2022, doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.133723.
- [3] I. Pernicová, „Identifikace a izolace PHA produkujících bakterií", Dizertační práce, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií, Vedoucí práce: Ing. Stanislav Obruča, Ph.D, Brno, 2021. [Online]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/133858>
- [4] A. A. Alves, E. C. Siqueira, M. P. S. Barros, P. E. C. Silva, a L. M. Houllou, „Polyhydroxyalkanoates: a review of microbial production and technology application", *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, roč. 20, č. 3, s. 3409–3420, bře. 2023, doi: 10.1007/s13762-022-04213-9.
- [5] A. K. Bhuwal, G. Singh, N. K. Aggarwal, V. Goyal, a A. Yadav, „Isolation and Screening of Polyhydroxyalkanoates Producing Bacteria from Pulp, Paper, and Cardboard Industry Wastes", *Int J Biomater*, roč. 2013, s. 752821, 2013, doi: 10.1155/2013/752821.
- [6] K. Drábková, „Biotechnologická produkce PHA pomocí *Cupriavidus malaysiensis*", Diplomová práce, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie, Vedoucí práce: Ing. Stanislav Obruča, Ph.D, Brno, 2019. [Online]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zavprace/detail/113527>
- [7] M. Kumar *et al.*, „Bacterial polyhydroxyalkanoates: Opportunities, challenges, and prospects", *Journal of Cleaner Production*, roč. 263, s. 121500, srp. 2020, doi: 10.1016/j.jclepro.2020.121500.
- [8] I. Novackova *et al.*, „The role of polyhydroxyalkanoates in adaptation of *Cupriavidus necator* to osmotic pressure and high concentration of copper ions", *International Journal of Biological Macromolecules*, roč. 206, s. 977–989, kvě. 2022, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.03.102.
- [9] „Identification and Isolation of Genes Involved in Poly(β -Hydroxybutyrate) Biosynthesis in *Azospirillum brasilense* and Characterization of a *phbC* Mutant". Viděno: 20. březen 2024. [Online]. Dostupné z: <https://journals.asm.org/doi/epdf/10.1128/aem.68.6.2943-2949.2002?src=getfr>
- [10] S. Obruca, P. Sedlacek, M. Koller, D. Kucera, a I. Pernicova, „Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications", *Biotechnology Advances*, roč. 36, č. 3, s. 856–870, kvě. 2018, doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.12.006.
- [11] V. Řeháková, „Studium produkce polyhydroxyalkanoátů pomocí vybraných termofilních zástupců rodu *Aneurinibacillus*", Diplomová práce, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie, Vedoucí práce: Ing. Iva Pernicová, Ph.D, Brno, 2022. [Online]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/138827>
- [12] D. Tan, Y. Wang, Y. Tong, a G.-Q. Chen, „Grand Challenges for Industrializing Polyhydroxyalkanoates (PHAs)", *Trends in Biotechnology*, roč. 39, č. 9, s. 953–963, zář. 2021, doi: 10.1016/j.tibtech.2020.11.010.
- [13] K. Bednárová, „Produkce polyesterů pomocí extremofilních bakterií", Bakalářská práce, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií, Vedoucí práce: doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D, Brno, 2020. [Online]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123990>

- [14] V. Sharma, R. Sehgal, a R. Gupta, „Polyhydroxyalkanoate (PHA): Properties and Modifications", *Polymer*, roč. 212, s. 123161, led. 2021, doi: 10.1016/j.polymer.2020.123161.
- [15] T. Keshavarz a I. Roy, „Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda", *Current Opinion in Microbiology*, roč. 13, č. 3, s. 321–326, čer. 2010, doi: 10.1016/j.mib.2010.02.006.
- [16] P. Sedlacek *et al.*, „What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments", *Appl Microbiol Biotechnol*, roč. 103, č. 4, s. 1905–1917, úno. 2019, doi: 10.1007/s00253-018-09584-z.
- [17] K. Sudesh, H. Abe, a Y. Doi, „Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters", *Progress in Polymer Science*, roč. 25, č. 10, s. 1503–1555, pro. 2000, doi: 10.1016/S0079-6700(00)00035-6.
- [18] V. C. Kalia, Ed., *Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates*. Singapore: Springer, 2019. doi: 10.1007/978-981-13-3759-8.
- [19] S. Y. Lee, „Bacterial polyhydroxyalkanoates", *Biotechnology and Bioengineering*, roč. 49, č. 1, s. 1–14, 1996, doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19960105)49:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-P.
- [20] R. Sehgal a R. Gupta, „Polyhydroxyalkanoate and its efficient production: an eco-friendly approach towards development", *3 Biotech*, roč. 10, č. 12, s. 549, pro. 2020, doi: 10.1007/s13205-020-02550-5.
- [21] S. Philip, T. Keshavarz, a I. Roy, „Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications", *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, roč. 82, č. 3, s. 233–247, 2007, doi: 10.1002/jctb.1667.
- [22] Z. Li, J. Yang, a X. J. Loh, „Polyhydroxyalkanoates: opening doors for a sustainable future", *NPG Asia Mater*, roč. 8, č. 4, Art. č. 4, dub. 2016, doi: 10.1038/am.2016.48.
- [23] P. B. S. Albuquerque a C. B. Malafaia, „Perspectives on the production, structural characteristics and potential applications of bioplastics derived from polyhydroxyalkanoates", *International Journal of Biological Macromolecules*, roč. 107, s. 615–625, úno. 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.09.026.
- [24] Z. A. Raza, S. Riaz, a I. M. Banat, „Polyhydroxyalkanoates: Properties and chemical modification approaches for their functionalization", *Biotechnology Progress*, roč. 34, č. 1, s. 29–41, 2018, doi: 10.1002/btpr.2565.
- [25] D. Černayová, „Metody stanovení obsahu polyhydroxyalkanoátů v bakteriálních buňkách", Bakalářská práce, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie, Vedoucí práce: Ing. Petr Sedláček, Ph.D, Brno, 2018. [Online]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/81436>
- [26] M. F. Chek *et al.*, „Structure of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase PhaC from *Chromobacterium* sp. USM2, producing biodegradable plastics", *Sci Rep*, roč. 7, č. 1, Art. č. 1, čvc. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-05509-4.
- [27] R. M. Sivashankari *et al.*, „Exploring Class I polyhydroxyalkanoate synthases with broad substrate specificity for polymerization of structurally diverse monomer units", *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, roč. 11, 2023, Viděno: 4. květen 2023. [Online]. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2023.1114946>
- [28] N. Niamsiri, S. C. Delamarre, Y.-R. Kim, a C. A. Batt, „Engineering of Chimeric Class II Polyhydroxyalkanoate Synthases", *Appl Environ Microbiol*, roč. 70, č. 11, s. 6789–6799, lis. 2004, doi: 10.1128/AEM.70.11.6789-6799.2004.
- [29] S. Zher Neoh *et al.*, „Polyhydroxyalkanoate synthase (PhaC): The key enzyme for biopolyester synthesis", *Current Research in Biotechnology*, roč. 4, s. 87–101, led. 2022, doi: 10.1016/j.crbiot.2022.01.002.

- [30] J. Liczka, „Krystalizace mikrobiálních polyesterů – metody studia, biologické konsekvence“, Bakalářská práce, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie, Vedoucí práce: Ing. Petr Sedláček, Ph.D, Brno, 2019. [Online]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/173413>
- [31] S. Ray a V. C. Kalia, „Polyhydroxyalkanoate Production and Degradation Patterns in Bacillus Species“, *Indian J Microbiol*, roč. 57, č. 4, s. 387–392, pro. 2017, doi: 10.1007/s12088-017-0676-y.
- [32] V. Černý, „Produkce kopolymerů na bázi polyhydroxyalkanoátů pomocí bakterie Schlegelella thermodepolymerans“, Bakalářská práce, Vysoké učení technické v Brně, Brno, 2023. [Online]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/148652>
- [33] L. Drotárová, „Příprava a posouzení aplikačního potenciálu biodegradabilních filmů na bázi kopolymerů PHA“, Diplomová práce, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie, Vedoucí práce: Ing. Petr Sedláček, Ph.D, Brno, 2022. [Online]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139076>.
- [34] A. V. Samrot *et al.*, „The Synthesis, Characterization and Applications of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) and PHA-Based Nanoparticles“, *Polymers (Basel)*, roč. 13, č. 19, s. 3302, zář. 2021, doi: 10.3390/polym13193302.
- [35] B. Kevélyová, „Využití vibrační spektroskopie při in-situ kvalitativní a kvantitativní analýze polyhydroxyalkanoátů v bakteriální biomase“, Bakalářská práce, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie, Vedoucí práce: Ing. Petr Sedláček, Ph.D, Brno, 2021. [Online]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/201183>
- [36] D. Jendrossek a R. Handrick, „Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates“, *Annual Review of Microbiology*, roč. 56, č. 1, s. 403–432, 2002, doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160838.
- [37] M. Knoll, T. M. Hamm, F. Wagner, V. Martinez, a J. Pleiss, „The PHA Depolymerase Engineering Database: A systematic analysis tool for the diverse family of polyhydroxyalkanoate (PHA) depolymerases“, *BMC Bioinformatics*, roč. 10, s. 89, bře. 2009, doi: 10.1186/1471-2105-10-89.
- [38] N. A. Tarazona, R. Machatschek, a A. Lendlein, „Influence of Depolymerases and Lipases on the Degradation of Polyhydroxyalkanoates Determined in Langmuir Degradation Studies“, *Advanced Materials Interfaces*, roč. 7, č. 17, s. 2000872, 2020, doi: 10.1002/admi.202000872.
- [39] A. N. Boyandin *et al.*, „Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates in tropical soils“, *International Biodeterioration & Biodegradation*, roč. 83, s. 77–84, zář. 2013, doi: 10.1016/j.ibiod.2013.04.014.
- [40] T. Morohoshi, T. Oi, T. Suzuki, a S. Sato, „Identification and characterization of a novel extracellular polyhydroxyalkanoate depolymerase in the complete genome sequence of *Undibacterium* sp. KW1 and YM2 strains“, *PLOS ONE*, roč. 15, č. 5, s. e0232698, 5 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0232698.
- [41] D. Gao, A. Maehara, T. Yamane, a S. Ueda, „Identification of the intracellular polyhydroxyalkanoate depolymerase gene of *Paracoccus denitrificans* and some properties of the gene product“, *FEMS Microbiology Letters*, roč. 196, č. 2, s. 159–164, bře. 2001, doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10558.x.
- [42] P. Poltronieri a P. Kumar, „Polyhydroxyalkanoates (PHAs) in Industrial Applications“, in *Handbook of Ecomaterials*, L. M. T. Martínez, O. V. Kharissova, a B. I. Kharisov, Ed., Cham: Springer International Publishing, 2019, s. 2843–2872. doi: 10.1007/978-3-319-68255-6_70.

- [43] „Poly[(R)-3-Hydroxybutyric Acid] (PHB)". Viděno: 5. květen 2023. [Online]. Dostupné z: <https://www.polysciences.com/india/poly-3-hydroxybutyric-acid>
- [44] A. Rodriguez-Contreras, „Recent Advances in the Use of Polyhydroxyalkanoates in Biomedicine", *Bioengineering (Basel)*, roč. 6, č. 3, s. 82, zář. 2019, doi: 10.3390/bioengineering6030082.
- [45] S. Kusaka, H. Abe, S. Y. Lee, a Y. Doi, „Molecular mass of poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] produced in a recombinant Escherichia coli", *Appl Microbiol Biotechnol*, roč. 47, č. 2, s. 140–143, úno. 1997, doi: 10.1007/s002530050902.
- [46] T. U. Khang *et al.*, „Rapid analysis of polyhydroxyalkanoate contents and its monomer compositions by pyrolysis-gas chromatography combined with mass spectrometry (Py-GC/MS)", *International Journal of Biological Macromolecules*, roč. 174, s. 449–456, bře. 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.01.108.
- [47] S. Obruca, P. Sedlacek, F. Mravec, O. Samek, a I. Marova, „Evaluation of 3-hydroxybutyrate as an enzyme-protective agent against heating and oxidative damage and its potential role in stress response of poly(3-hydroxybutyrate) accumulating cells", *Appl Microbiol Biotechnol*, roč. 100, č. 3, s. 1365–1376, úno. 2016, doi: 10.1007/s00253-015-7162-4.
- [48] S. F. Williams, S. Rizk, a D. P. Martin, „Poly-4-hydroxybutyrate (P4HB): a new generation of resorbable medical devices for tissue repair and regeneration", *Biomedizinische Technik/Biomedical Engineering*, roč. 58, č. 5, s. 439–452, říj. 2013, doi: 10.1515/bmt-2013-0009.
- [49] A. L. Rivera-Briso a Á. Serrano-Aroca, „Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate): Enhancement Strategies for Advanced Applications", *Polymers (Basel)*, roč. 10, č. 7, s. 732, čvc. 2018, doi: 10.3390/polym10070732.
- [50] M. Jo, Y. Jang, E. Lee, S. Shin, a H.-J. Kang, „The Modification of Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by Melt Blending", *Polymers*, roč. 14, č. 9, Art. č. 9, led. 2022, doi: 10.3390/polym14091725.
- [51] P. Murugan, C.-Y. Gan, a K. Sudesh, „Biosynthesis of P(3HB-co-3HHx) with improved molecular weights from a mixture of palm olein and fructose by *Cupriavidus necator* Re2058/pCB113", *International Journal of Biological Macromolecules*, roč. 102, s. 1112–1119, zář. 2017, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.006.
- [52] H. Tang, S. Neoh, a K. Sudesh, „A review on poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) [P(3HB-co-3HHx)] and genetic modifications that affect its production", *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, roč. 10, pro. 2022, doi: 10.3389/fbioe.2022.1057067.
- [53] K. Krupičková, „Isolace, charakterizace a aplikace biomedicínsky významného polymeru P(3HB-co-4HB)", Diplomová práce, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie, Vedoucí práce: Ing. Stanislav Obruca, Ph.D, Brno, 2020. [Online]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/191033>
- [54] „(PDF) Recent updates on economic use of poly hydroxybutyrate (PHB): A green alternative to plastics". Viděno: 6. květen 2023. [Online]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/324518366_Recent_updates_on_economic_use_of_poly_hydroxybutyrate_PHB_A_green_alternative_to_plastics
- [55] P. Šarköziiová, „Produkce PHA pomocí extremofilních bakterií", Bakalářská práce, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie, Vedoucí práce: doc. Ing. Stanislav Obruca, Ph.D, Brno, 2020. [Online]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123994>
- [56] S. Vigneswari *et al.*, „Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer with manipulated variables and its properties", *Journal of*

- Industrial Microbiology and Biotechnology*, roč. 36, č. 4, s. 547–556, dub. 2009, doi: 10.1007/s10295-009-0525-z.
- [57] C. Utsunomia, Q. Ren, a M. Zinn, „Poly(4-Hydroxybutyrate): Current State and Perspectives", *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, roč. 8, 2020, Viděno: 5. květen 2023. [Online]. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2020.00257>
- [58] Ł. Kaniuk a U. Stachewicz, „Development and Advantages of Biodegradable PHA Polymers Based on Electrospun PHBV Fibers for Tissue Engineering and Other Biomedical Applications", *ACS Biomater. Sci. Eng.*, roč. 7, č. 12, s. 5339–5362, pro. 2021, doi: 10.1021/acsbio.1c00757.
- [59] M. Koller, „Established and advanced approaches for recovery of microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters from surrounding microbial biomass", *The EuroBiotech Journal*, roč. 4, s. 113–126, čvc. 2020, doi: 10.2478/ebtj-2020-0013.
- [60] Á. Estévez-Alonso, R. Pei, M. C. M. van Loosdrecht, R. Kleerebezem, a A. Werker, „Scaling-up microbial community-based polyhydroxyalkanoate production: status and challenges", *Bioresource Technology*, roč. 327, s. 124790, kvě. 2021, doi: 10.1016/j.biortech.2021.124790.
- [61] P. Furrer *et al.*, „Quantitative analysis of bacterial medium-chain-length poly([R]-3-hydroxyalkanoates) by gas chromatography", *Journal of Chromatography A*, roč. 1143, č. 1, s. 199–206, bř. 2007, doi: 10.1016/j.chroma.2007.01.002.
- [62] G.-Y. A. Tan *et al.*, „Enhanced gas chromatography-mass spectrometry method for bacterial polyhydroxyalkanoates analysis", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, roč. 117, č. 3, s. 379–382, bř. 2014, doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.08.020.
- [63] A. Grubelnik, L. Wiesli, P. Furrer, D. Rentsch, R. Hany, a V. R. Meyer, „A simple HPLC-MS method for the quantitative determination of the composition of bacterial medium chain-length polyhydroxyalkanoates", *Journal of Separation Science*, roč. 31, č. 10, s. 1739–1744, 2008, doi: 10.1002/jssc.200800033.
- [64] S. Loganathan, R. B. Valapa, R. K. Mishra, G. Pugazhenthii, a S. Thomas, „Chapter 4 - Thermogravimetric Analysis for Characterization of Nanomaterials", in *Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization*, S. Thomas, R. Thomas, A. K. Zachariah, a R. K. Mishra, Ed., in *Micro and Nano Technologies*, Elsevier, 2017, s. 67–108. doi: 10.1016/B978-0-323-46139-9.00004-9.
- [65] T. C. Guimarães, E. S. Araújo, M. L. Hernández-Macedo, a J. A. López, „Polyhydroxyalkanoates: Biosynthesis from Alternative Carbon Sources and Analytic Methods: A Short Review", *J Polym Environ*, roč. 30, č. 7, s. 2669–2684, čvc. 2022, doi: 10.1007/s10924-022-02403-7.
- [66] S. Evangeline a T. B. Sridharan, „Biosynthesis and statistical optimization of polyhydroxyalkanoate (PHA) produced by *Bacillus cereus* VIT-SSR1 and fabrication of biopolymer films for sustained drug release", *International Journal of Biological Macromolecules*, roč. 135, s. 945–958, srp. 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.05.163.
- [67] S. Kuppusamy a S. Kuppusamy, „Characterization of polyhydroxyalkanoates produced by *Bacillus subtilis* isolated from soil samples", Viděno: 6. květen 2023. [Online]. Dostupné z: https://www.academia.edu/28115403/Characterization_of_polyhydroxyalkanoates_produced_by_Bacillus_subtilis_isolated_from_soil_samples
- [68] M. K. Singh a A. Singh, „Chapter 14 - Nuclear magnetic resonance spectroscopy", in *Characterization of Polymers and Fibres*, M. K. Singh a A. Singh, Ed., in *The Textile Institute Book Series*, Woodhead Publishing, 2022, s. 321–339. doi: 10.1016/B978-0-12-823986-5.00011-7.

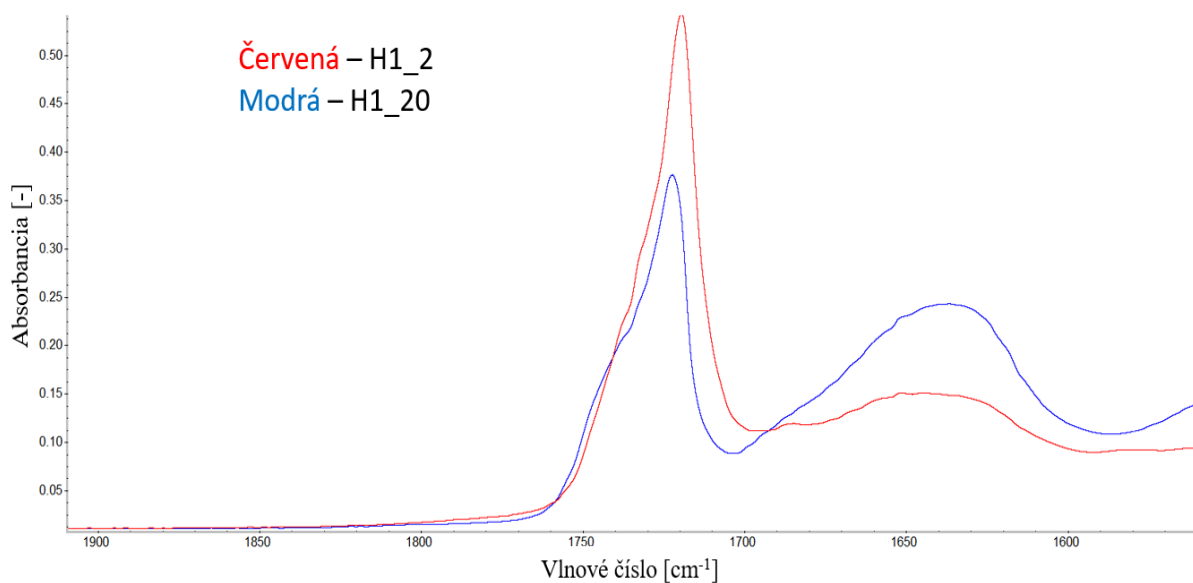
- [69] K. M. Bonthron, J. Clauss, D. M. Horowitz, B. K. Hunter, a J. K. M. Sanders, „The biological and physical chemistry of polyhydroxyalkanoates as seen by NMR spectroscopy", *FEMS Microbiology Letters*, roč. 103, č. 2, s. 269–277, pro. 1992, doi: 10.1016/0378-1097(92)90320-N.
- [70] E. Linton, A. Rahman, S. Viamajala, R. C. Sims, a C. D. Miller, „Polyhydroxyalkanoate quantification in organic wastes and pure cultures using a single-step extraction and ¹H NMR analysis", *Water Sci Technol*, roč. 66, č. 5, s. 1000–1006, 2012, doi: 10.2166/wst.2012.273.
- [71] G. S. Jacob, J. R. Garbow, a J. Schaefer, „Direct measurement of poly(beta-hydroxybutyrate) in a pseudomonad by solid-state ¹³C NMR", *J Biol Chem*, roč. 261, č. 36, s. 16785–16787, pro. 1986.
- [72] „Research". Viděno: 7. květen 2023. [Online]. Dostupné z: <https://www.imc.cas.cz/en/research/research-departments/structure-and-dynamics-of-macromolecules/vibrational-spectroscopy/research>
- [73] J. M. Anderson a G. Voskerician, „14 - The challenge of biocompatibility evaluation of biocomposites", in *Biomedical Composites*, L. Ambrosio, Ed., in Woodhead Publishing Series in Biomaterials. , Woodhead Publishing, 2010, s. 325–353. doi: 10.1533/9781845697372.3.325.
- [74] R. Withnall, „Raman Spectroscopy", in *Encyclopedia of Modern Optics (Second Edition)*, B. D. Guenther a D. G. Steel, Ed., Oxford: Elsevier, 2005, s. 354–368. doi: 10.1016/B978-0-12-809283-5.00960-5.
- [75] T. Shamala, D. Somashekara, R. Davis, K. S. Kumari, S. V. N. Vijayendra, a B. Raj, „Production and characterization of bacterial polyhydroxyalkanoate copolymers and evaluation of their blends by Fourier transform infrared spectroscopy and scanning electron microscopy.", *Indian J. Microbiology*, roč. 49, s. 251–258., zář. 2009, doi: 10.1007/s12088-009-0031-z.
- [76] V. Saranya *et al.*, „Quantification of intracellular polyhydroxyalkanoates by virtue of personalized flow cytometry protocol", *Curr Microbiol*, roč. 65, č. 5, s. 589–594, lis. 2012, doi: 10.1007/s00284-012-0198-0.
- [77] J. L. Nielsen, C. Kragelund, a P. H. Nielsen, „Combination of Fluorescence In Situ Hybridization with Staining Techniques for Cell Viability and Accumulation of PHA and polyP in Microorganisms in Complex Microbial Systems", in *Bioremediation: Methods and Protocols*, S. P. Cummings, Ed., in Methods in Molecular Biology. , Totowa, NJ: Humana Press, 2010, s. 103–116. doi: 10.1007/978-1-60761-439-5_7.
- [78] R. Pei, G. Vicente-Venegas, M. C. M. Van Loosdrecht, R. Kleerebezem, a A. Werker, „Quantification of polyhydroxyalkanoate accumulated in waste activated sludge", *Water Research*, roč. 221, s. 118795, srp. 2022, doi: 10.1016/j.watres.2022.118795.
- [79] J. Tian, A. J. Sinskey, a J. Stubbe, „Kinetic Studies of Polyhydroxybutyrate Granule Formation in *Wautersia eutropha* H16 by Transmission Electron Microscopy", *Journal of Bacteriology*, roč. 187, č. 11, s. 3814–3824, čer. 2005, doi: 10.1128/JB.187.11.3814-3824.2005.
- [80] K. Hong, S. Sun, W. Tian, G. Q. Chen, a W. Huang, „A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy", *Appl Microbiol Biotechnol*, roč. 51, č. 4, s. 523–526, dub. 1999, doi: 10.1007/s002530051427.
- [81] J. Xu, B.-H. Guo, R. Yang, Q. Wu, G.-Q. Chen, a Z.-M. Zhang, „In situ FTIR study on melting and crystallization of polyhydroxyalkanoates", *Polymer*, roč. 43, č. 25, s. 6893–6899, led. 2002, doi: 10.1016/S0032-3861(02)00615-8.

- [82] M. Porter a J. Yu, „Monitoring the in situ crystallization of native biopolyester granules in *Ralstonia eutropha* via infrared spectroscopy", *Journal of Microbiological Methods*, roč. 87, č. 1, s. 49–55, říj. 2011, doi: 10.1016/j.mimet.2011.07.009.
- [83] I. Isak *et al.*, „Quantification of polyhydroxyalkanoates in mixed and pure cultures biomass by Fourier transform infrared spectroscopy: comparison of different approaches", *Letters in Applied Microbiology*, roč. 63, č. 2, s. 139–146, srp. 2016, doi: 10.1111/lam.12605.
- [84] M. Kansiz, H. Billman-Jacobe, a D. McNaughton, „Quantitative Determination of the Biodegradable Polymer Poly(β -hydroxybutyrate) in a Recombinant *Escherichia coli* Strain by Use of Mid-Infrared Spectroscopy and Multivariate Statistics", *Appl Environ Microbiol*, roč. 66, č. 8, s. 3415–3420, srp. 2000.
- [85] M. Kansiz, A. Domínguez-Vidal, D. McNaughton, a B. Lendl, „Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy for monitoring and determining the degree of crystallisation of polyhydroxyalkanoates (PHAs)", *Anal Bioanal Chem*, roč. 388, č. 5, s. 1207–1213, čvc. 2007, doi: 10.1007/s00216-007-1337-5.
- [86] O. Samek *et al.*, „Quantitative Raman Spectroscopy Analysis of Polyhydroxyalkanoates Produced by *Cupriavidus necator* H16", *Sensors*, roč. 16, č. 11, Art. č. 11, lis. 2016, doi: 10.3390/s16111808.
- [87] J. De Gelder *et al.*, „Monitoring Poly(3-hydroxybutyrate) Production in *Cupriavidus necator* DSM 428 (H16) with Raman Spectroscopy", *Anal. Chem.*, roč. 80, č. 6, s. 2155–2160, bře. 2008, doi: 10.1021/ac702185d.
- [88] V. Ciobotă, E.-M. Burkhardt, W. Schumacher, P. Rösch, K. Küsel, a J. Popp, „The influence of intracellular storage material on bacterial identification by means of Raman spectroscopy", *Anal Bioanal Chem*, roč. 397, č. 7, s. 2929–2937, srp. 2010, doi: 10.1007/s00216-010-3895-1.
- [89] S. Alfano, F. Pagnanelli, a A. Martinelli, „Rapid Estimation of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Composition Using ATR-FTIR", *Polymers (Basel)*, roč. 15, č. 20, s. 4127, říj. 2023, doi: 10.3390/polym15204127.
- [90] P. Sedlacek *et al.*, „Introducing the Newly Isolated Bacterium *Aneurinibacillus* sp. H1 as an Auspicious Thermophilic Producer of Various Polyhydroxyalkanoates (PHA) Copolymers–2. Material Study on the Produced Copolymers", *Polymers*, roč. 12, s. 1298, čer. 2020, doi: 10.3390/polym12061298.
- [91] L. Marková, „Biotechnologická produkce PHA pomocí vybraných termofilních bakterií", Diplomová práce, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií, Vedoucí práce: Ing. Iva Pernicová, Ph.D, Brno, 2023. [Online]. Dostupné z: https://www.vut.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=251802
- [92] Z. Apsalikova, „Tailoring transport properties of controlled release systems based on polyhydroxyalkanoates", Diplomová práce, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie, Vedoucí práce: doc. Ing. Petr Sedláček, Ph.D, Brno, 2023. [Online]. Dostupné z: https://www.vut.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=251832
- [93] C. Syms, „Principal Components Analysis☆", in *Encyclopedia of Ecology (Second Edition)*, B. Fath, Ed., Oxford: Elsevier, 2019, s. 566–573. doi: 10.1016/B978-0-12-409548-9.11152-2.
- [94] K. Mlynáriková *et al.*, „Influence of Culture Media on Microbial Fingerprints Using Raman Spectroscopy", *Sensors*, roč. 15, č. 11, Art. č. 11, lis. 2015, doi: 10.3390/s151129635.

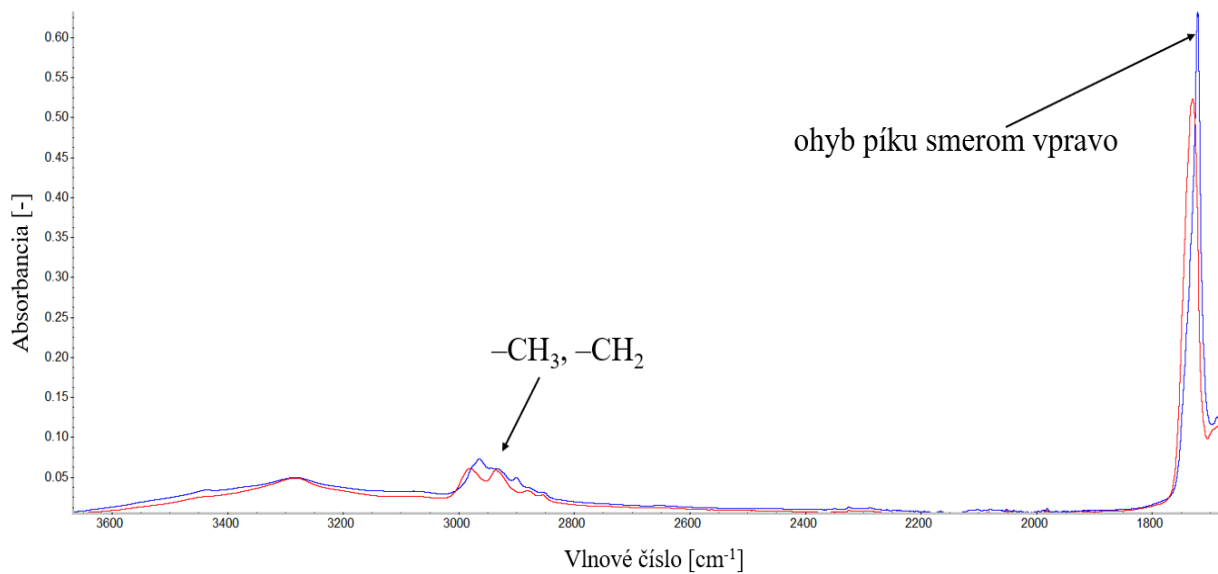
7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

1,4-BD	1,4-butandiol
3HB/4HB	3-hydroxybutyrát/4-hydroxybutyrát
3HV/4HV/5HV	3-hydroxyvalerát/4-hydroxyvalerát/5-hydroxyvalerát
ATR-FTIR	Infračervená spektroskopia s využitím Fourierovej transformácie a metódy úplného zoslabeného odrazu (z angl. <i>attenuated total reflectance</i>)
CM	<i>Cupriavidus malaysiensis</i>
DSC	diferenčná skenovacia kalorimetria
GC-FID	plynová chromatografia s plameňovým ionizačným detektorom
Glu	glukóza
Gly	glycerol
H1/AH30/AFn2	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> H1/AH30/AFn2
4HHx	4-hydroxyhexanoát
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
ISTD	interný buncový štandard
<i>lcl</i> -PHA	polyhydroxyalkanoáty s dlhým reťazcom
<i>mcl</i> -PHA	polyhydroxyalkanoáty so stredne dlhým reťazcom
MO	mikroorganizmus
NMR	nukleárna magnetická rezonancia
P(3HB)	poly(3-hydroxybutyrát)
P(3HB- <i>co</i> -3HV)/PHBV	poly(3-hydroxybutyrát- <i>co</i> -3-hydroxyvalerát)
P(3HB- <i>co</i> -3HV- <i>co</i> -4HHx)	poly(3-hydroxybutyrát- <i>co</i> -3-hydroxyvalerát- <i>co</i> -4-hydroxyvalerát)
P(3HB- <i>co</i> -3HV- <i>co</i> -4HV)	poly(3-hydroxybutyrát- <i>co</i> -3-hydroxyvalerát- <i>co</i> -4-hydroxyvalerát)
P(3HB- <i>co</i> -4HB)	poly(3-hydroxybutyrát- <i>co</i> -4-hydroxybutyrát)
P(3HB- <i>co</i> -5HV)	poly(3-hydroxybutyrát- <i>co</i> -5-hydroxyvalerát)
P(4HB)	poly(4-hydroxybutyrát)
PCA	z angl. <i>principal component analysis</i> – analýza hlavných komponentov
PGA	polyglykolid
PHA	polyhydroxyalkanoát/y
PLS	partial least squares – metóda najmenších štvorcov
<i>scl</i> -PHA	polyhydroxyalkanoáty s krátkym reťazcom
TGA	termogravimetrická analýza
γ BL	γ -butyrolakton

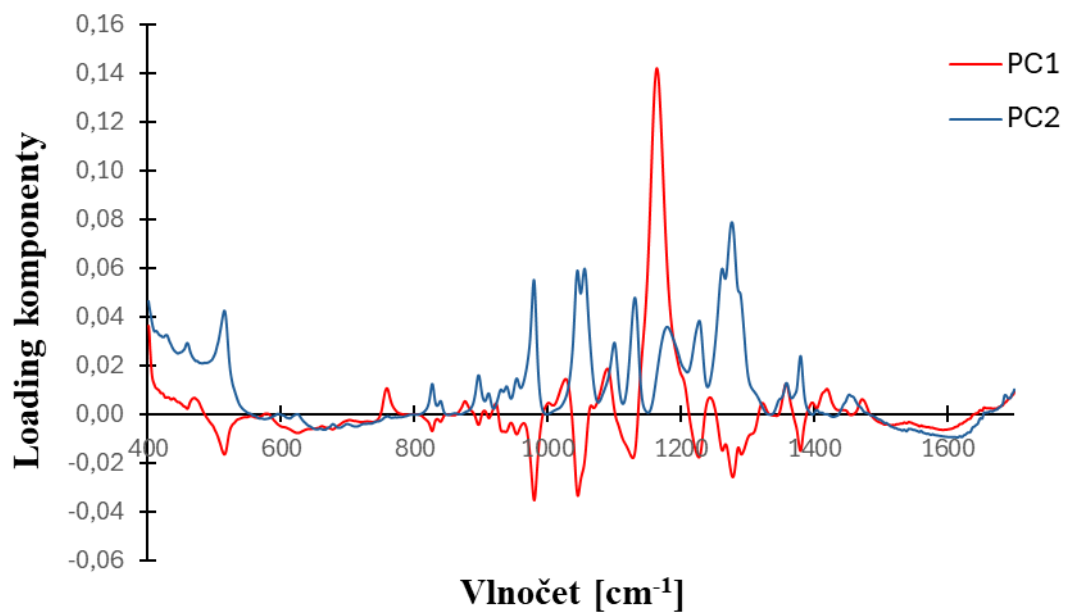
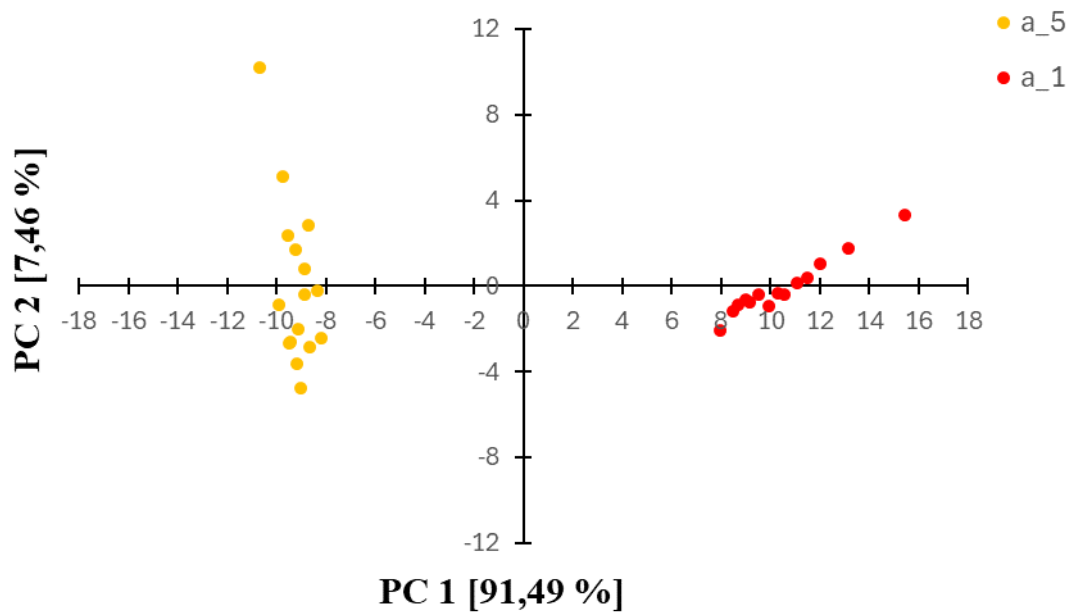
8 PRÍLOHY



Príloha 1: Intenzita píku v oblasti 1 720 cm⁻¹ súvisí s obsahom PHA



Príloha 2: Rozdiely v dvoch spektrách PHA a pozorovaný ohyb píku smerom vpravo typický pre kryštalickú formu PHA



Príloha 3: PCA pre vzorky a_1 a a_5