



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

VYUŽITÍ VIBRAČNÍ SPEKTROSKOPIE PŘI IN-SITU KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ ANALÝZE POLYHYDROXYALKANOÁTŮ V BAKTERIÁLNÍ BIOMASE

UTILIZATION OF VIBRATIONAL SPECTROSCOPY FOR IN-SITU QUALITATIVE AND QUANTITATIVE
ANALYSIS OF POLYHYDROXYALKANOATES IN MICROBIAL BIOMASS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Barbora Kevélyová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1642/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Barbora Kevélyová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Využití vibrační spektroskopie při in-situ kvalitativní a kvantitativní analýze polyhydroxyalkanoátů v bakteriální biomase

Zadání bakalářské práce:

- 1) Vypracovat aktuální literární rešerši na téma dostupných metod in-situ strukturní analýzy polyhydroxyalkanoátů (PHA) v bakteriální biomase.
- 2) Navrhnout vhodnou techniku vibrační spektroskopie pro in-situ analýzu PHA v mikrobiální biomase.
- 3) Zvolenou technikou změřit vibrační spektra vzorkové sady biomas s obsahem PHA.
- 4) Na základě analýzy získaných spekter diskutovat výhody a limitace testované techniky při kvalitativní a kvantitativní analýze PHA v bakteriální biomase.

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

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

Barbora Kevélyová
student(ka)

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo zhodnotiť využiteľnosť vybranej metódy vibračnej spektroskopie pre kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu biomasy, ktorá obsahuje polyhydroxyalkanoáty. Bola zvolená metóda infračervenej spektroskopie s Fourierovou transformáciou, ktorá využíva tzv. zoslabený úplný odraz (ATR-FTIR). Poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát) bol skúmaný v baktériách *Cupriavidus malaysiensis*, *Thermomonas hydrothermalis* a *Aneurinibacillus thermoaerophilus* sp. H1. Vyhodnotením infračervených spektier boli získané dáta, ktoré sa následne porovnali s výsledkami prevedenej plynovej chromatografie. Boli tiež pozorované vizuálne zmeny v spektrách a stav kryštalinity. Pri kvantitatívnej analýze kopolyméru v biomase metódou ATR-FTIR nebola pozorovaná korelácia dát s výsledkami plynovej chromatografie. Táto metóda teda nie je vhodná pre stanovenie celkového obsahu poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) v biomase v prípade nami nastaveného experimentu a použitých baktérií. Na druhej strane bola daná metóda úspešne využitá pri kvalitatívnej analýze kopolyméru in-situ v biomase producenta *Aneurinibacillus thermoaerophilus* sp. H1. Miera korelácie dát bola v danom experimente dosť vysoká. ATR-FTIR je teda vhodná analytická metóda pre stanovenie monomérneho zloženia kopolyméru poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát) priamo v biomase pri tejto baktérii. Porovnaním s producentom *Cupriavidus malaysiensis* sa ukázalo, že táto metóda nie je univerzálna pre všetky typy nami skúmaných mikroorganizmov.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Polyhydroxyalkanoáty, poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát), vibračná spektroskopia, ATR-FTIR, kvantitatívna a kvalitatívna analýza PHA

ABSTRACT

The aim of this bachelor thesis was to evaluate the applicability of selected methods of vibrational spectroscopy for qualitative and quantitative analysis of biomass, which contains polyhydroxyalkanoates. Fourier-transform infrared spectroscopy, that uses attenuated total reflection technique (ATR-FTIR), was chosen for this experiment. Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) has been studied in *Cupriavidus malaysiensis*, *Thermomonas hydrothermalis* and *Aneurinibacillus thermoaerophilus* sp. H1. Data were obtained by evaluating the infrared spectra, which were then compared with the results of performed gas chromatography. Visual changes in the spectra were also observed along with crystallinity. No correlation was detected between the data obtained by gas chromatography and by the method ATR-FTIR in quantitative analysis. Thus, this method is not suitable for determining the content of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in biomass in the set experiment and the bacteria used. On the other hand, the method was successfully used for in-situ qualitative analysis of copolymer in the samples of *Aneurinibacillus thermoaerophilus* sp. H1. The degree of data correlation was relatively high in the given experiment. With these findings, ATR-FTIR is a suitable analytical method for determining the monomer composition of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in this strain. Comparison with the PHA producer *Cupriavidus malaysiensis* showed that this method is not universal for all types of microorganisms observed in this thesis.

KEYWORDS

Polyhydroxyalkanoates, poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate), vibrational spectroscopy, ATR-FTIR, quantitative and qualitative analysis of PHA

KEVÉLYOVÁ, Barbora. *Využití vibrační spektroskopie při in-situ kvalitativní a kvantitativní analýze polyhydroxyalkanoátů v bakteriální biomase*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131156>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

Prehlásenie

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

.....
Kevélyová Barbora

Podakovanie

Touto cestou by som sa chcela poďakovať vedúcemu mojej bakalárskej práce Ing. Petrovi Sedláčkovi, PhD. za odborné konzultácie, príjemný prístup, podporu a motiváciu pri vedení mojej práce. Veľká vďaka patrí tiež mojej konzultantke Ing. Eve Slaninovej Ph.D. za ochotu, trpezlivosť, cenné rady a za vedenie práce v laboratóriu. Ďakujem tiež všetkým ostatným vyučujúcim, ktorí ma toho veľa naučili, pomohli mi a vytvorili príjemnú atmosféru nielen počas tohoto roku, ale aj počas celého štúdia. V neposlednom rade by som chcela poďakovať svojej rodine a kamarátom, ktorí v týchto ťažkých časoch stáli pri mne a podporovali ma.

OBSAH

1	Úvod	8
2	Teoretická časť	9
2.1	Polyhydroxyalkanoáty	9
2.1.1	Štruktúra a fyzikálno-chemické vlastnosti polyhydroxyalkanoátov	10
2.1.2	Poly(3-hydroxybutyrát) a kopolymér P(3HB-co-4HB).....	11
2.1.3	Biosyntéza a biodegradácia PHA	12
2.1.4	Vybrané modelové baktérie	14
2.2	Vibračná spektroskopia	16
2.2.1	Metódy vibračnej spektroskopie	16
2.3	Využitie vibračnej spektroskopie pri analýze polyhydroxyalkanoátov	17
3	Experimentálna časť	21
3.1	Chemikálie, prístroje a baktérie použité pri práci	21
3.1.1	Zoznam chemikálií	21
3.1.2	Zoznam prístrojovej techniky	21
3.1.3	Použité baktérie.....	22
3.2	Kultivácie baktérií	22
3.2.1	Inokulum.....	22
3.2.2	Minerálne médium a substráty	22
3.2.3	Očkovanie	24
3.2.4	Príprava sušenej biomasy	24
3.2.5	Rastová krivka.....	24
3.3	Analýza biomasy obsahujúcej PHA.....	25
3.3.1	Spektrofotometrické stanovenie rastu bakteriálnych kultúr	25
3.3.2	Gravimetrické stanovenie biomasy	25
3.3.3	Esterifikácia a plynová chromatografia	25
3.3.4	ATR-FTIR	26
4	Výsledky a diskusia.....	27
4.1	Rastová krivka baktérie <i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> H1.....	27
4.2	Meranie optickej hustoty bakteriálnych kultúr	28
4.3	Gravimetrické stanovenie biomasy	30
4.4	Výsledky plynovej chromatografie	31
4.5	Výsledky vybranej metódy vibračnej spektroskopie ATR-FTIR	32
4.5.1	Opis spektra a charakterizácia vybraných píkav pre analýzu PHA v biomase.....	32
4.5.2	Využitelnosť metódy ATR-FTIR pre kvantitatívnu analýzu PHA v biomase	34

4.5.3	Využitelnosť metódy ATR-FTIR pre kvalitatívnu analýzu PHA v biomase.....	36
5	Záver	42
6	Zoznam použitej literatúry	44
7	Zoznam použitých skratiek a symbolov.....	49
8	Prílohy	50

1 ÚVOD

V dnešnej konzumnej dobe zahlcujeme životné prostredie ťažko rozložiteľným syntetickým odpadom, čo prispieva ku globálnemu environmentálnemu problému. Plastické hmoty sa vďaka svojim vhodným fyzikálnym a chemickým vlastnostiam používajú všade, avšak nie sú biodegradabilné a zaťažujú tak ekosystém.

Syntetické polymérne materiály sú dobre tvarovateľné, dokážu nadobudnúť požadovanú pevnosť, pomocou aditív sa dá upraviť ich pružnosť, farba, odolnosť a ďalšie iné vlastnosti. Vďaka pomerne nízkym nákladom na ich výrobu a širokej dostupnosti sú hromadne využívané. Časom nahradili klasické materiály akými sú drevo, kov a sklo vo väčšine odvetviach. Z plastov sa taktiež vyrábajú rozličné komponenty, obaly, nádoby, široká škála jednorazových výrobkov, spotrebného tovaru a mnoho iného. Využitie a aj samotná výroba plastov vo svete stále stúpa, avšak doba ich odbúravania v prostredí je neporovnateľne dlhšia ako životnosť samotného výrobku. Najväčším problémom je hromadenie plastov v moriach a na skládkach. Tento odpad sa v prostredí rozpadá na mikroplasty, ktoré sú za posledné desaťročia akumulované v živých organizmoch, vrátane ľudského tela.

Už roky sa hľadajú a testujú rôzne ekologickejšie alternatívy, ktoré by nahradili polyméry fosílného pôvodu. V prípade takéhoto materiálu je veľmi dôležité, aby mal vlastnosti podobné syntetickému plasty, ale bol v prírode plne rozložiteľný a nehromadil sa tak vo forme odpadu. Takéto látky sa nazývajú bioplasty, sú z prírodných obnoviteľných zdrojov a jedným z príkladov je skupina zlúčenín nazývaných polyhydroxyalkanoáty.

Polyhydroxyalkanoáty, často označované skratkou PHA, sú pomerne rozšírené prírodné polyestery, ktoré by mohli v budúcnosti nahradiť syntetické materiály vo vybraných odvetviach. Vedecká komunita sa už desaťročia vo veľkom zaoberá ich vlastnosťami, štruktúrou a možnosťou izolácie týchto látok z rôznych zdrojov. Viacero druhov mikroorganizmov produkuje PHA za rozličných podmienok, či už vo forme homopolymérov alebo heteropolymérov.

Množstvo, druh a stav v akom sa nachádza polymér v mikroorganizme sú kľúčovými informáciami pri potenciálnom spracovávaní tejto suroviny. Klasické metódy stanovenia kvality a kvantity PHA poskytujú síce veľmi detailné a presné informácie, sú však časovo a finančne náročné, čo veľmi ovplyvňuje výslednú cenu celého procesu výroby. Z tohto dôvodu sa hľadajú spôsoby, akými by sa daný proces urýchlil a uľahčila sa tým izolácia a celková produkcia týchto polymérov. Využitím efektívnejších analytických metód je možné do istej miery získať informácie o PHA podstatne rýchlejšie a jednoduchšie.

Metódy vibračnej spektroskopie sú veľmi vhodné pre rýchly screening bez potreby zložitej prípravy vzorky pre analýzu. Dôležité je posúdiť vhodnosť a presnosť týchto metód pre analýzu PHA in-situ, čo je aj cieľom tejto bakalárskej práce.

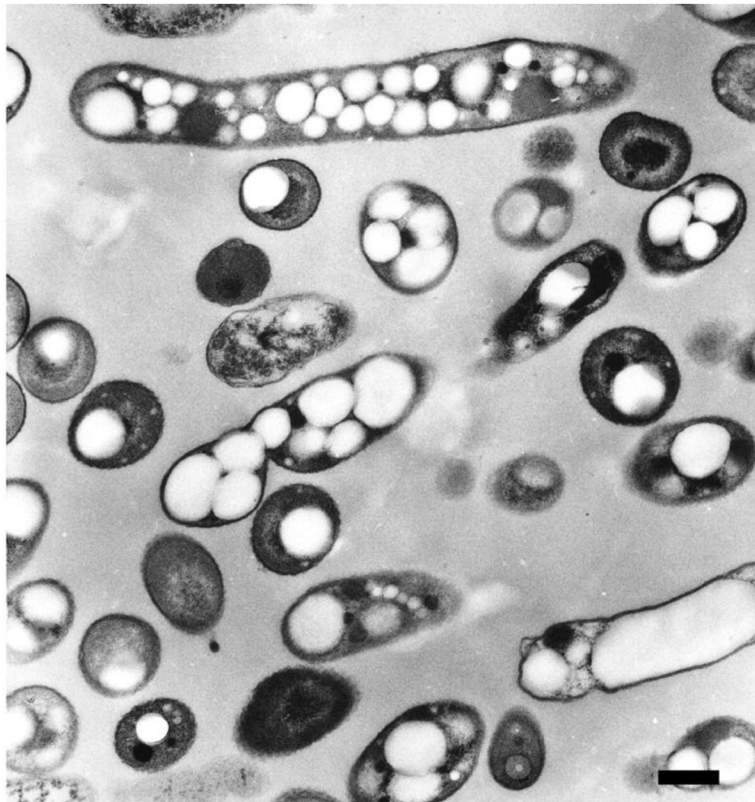
2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) sú alifatické polyestery produkované rôznymi kmeňmi grampozitívnych i gramnegatívnych baktérií, a tiež niektorými kmeňmi archeónov. Vyskytujú sa vo forme granúl v cytoplazme bunky (viď obrázok č.1) a od okolitého prostredia cytoplazmy ich oddeľuje vrstva proteínov (tzv. phasinov) na ich povrchu. Baktérie ich produkujú v nadbytku uhlíkového substrátu a zároveň pri nedostatku živín pre ich samotný rast ako sú napr. fosfor, dusík a kyslík. Inklúzie rozpustné v chloroforme boli prvýkrát pozorované už začiatkom minulého storočia v *Azotobacter chroococcum*. Lemoigne v roku 1923 identifikoval chemicky podobné látky v baktérii *Bacillus megaterium* ako polyestery kyseliny 3-hydroxybutánovej [1, 2, 3].

Aj keď sú tieto prírodné polyestery produkované predovšetkým za účelom zásoby zdroju energie pre mikroorganizmy, slúžia tiež ako ochrana bunky pri vystavení mikroorganizmu extrémnym podmienkam a fyzikálnemu stresu (vysoké a nízke teploty, osmotický šok, oxidačný stres a iné) [4, 5].

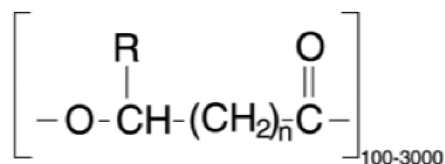
Najrozšírenejšími polymérmí tohto typu, ktoré sa používajú, sú homopolymér poly(3-hydroxybutyrát) a kopolymér poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát). Ďalšie bioplasty patriace do tejto skupiny sú napríklad poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyhexanoát) alebo semikryštalický poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) [6].



Obrázok č. 1: Granule PHA v mikroorganizme *Wautersia Eutropha* H16 viditeľné pod transmisným elektrónovým mikroskopom [7]

2.1.1 Štruktúra a fyzikálno-chemické vlastnosti polyhydroxyalkanoátov

PHA sú zo štruktúrneho hľadiska biopolyestery 3- až 6- hydroxyalkánových kyselín s lineárnym reťazcom (obecnú štruktúru môžeme vidieť na obrázku č. 2). Molekuly týchto bioplastov môžu obsahovať až 35 000 monomérnych jednotiek a každý monomér má postranný reťazec, ktorým je prevažne nasýtená či nenasýtená alkylová skupina. Vzácnne sa vyskytujú aj alkylové skupiny rozvetvené alebo substituované [8, 9].



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 č. 2: Obecná štruktúra monoméru PHA a príklady derivátov [10]

Keď je makromolekula zložená z rovnakých monomérnych jednotiek, jedná sa o homopolymér. V prípade, že sa v reťazci vyskytujú ďalšie druhy monomérnych jednotiek, PHA tvoria kopolyméry alebo heteropolyméry. Podľa toho, aký počet atómov uhlíku sa nachádza v monomére polyhydroxyalkanoátu delíme tieto polyestery do troch základných skupín [11].

Ak monomér obsahuje maximálne 5 uhlíkových atómov, jedná sa o skupinu polyhydroxyalkanoátov s krátkym reťazcom, tzv. *scl*-PHA (z angl. short chain length PHA). Patria sem jednoduchý poly(3-hydroxybutyrát) a poly(4-hydroxybutyrát). Sú vysoko kryštalické, tuhé a krehké, čo nepredstavuje vhodné fyzikálne vlastnosti pre praktické využitie polyméru. V porovnaní s PHA s dlhším reťazcom majú vyššie teploty topenia [11, 12, 13, 14]. Skupina so stredne dlhými reťazcami, *mcl*-PHA (z angl. medium chain length PHA), má monomérene jednotky zložené zo 6–14 atómov uhlíka. Patria sem prevažne flexibilnejšie polyestery, napríklad poly(3-hydroxyoktanoát) produkovaný kmeňom baktérií *Pseudomonas*. Majú lepšie mechanické vlastnosti ako *scl*-PHA, nízku teplotu skleneného prechodu a sú to elastoméry – vykazujú vysoké predĺženie v ťahu a nízku pevnosť v ťahu [11, 12, 13, 15]. [1] Posledná skupina PHA tvorí dlhé polymérne reťazce s viac ako 15 atómami uhlíka v monoméroch a nazýva sa *lcl*-PHA (z angl. long chain length PHA) [15].

Ako už bolo spomenuté, PHA sú zvyčajne tvorené z tisícok monomérov rovnakého či rozdielneho typu a tieto látky majú všeobecne vysoký stupeň polymerácie. Bolo identifikovaných viac ako 150 rozličných monomérnych jednotiek, pričom PHA majú prevažne molekulárne hmotnosti 50 000 až 3 000 000 Da. Nedávno sa pozorovala aj syntéza ešte väčších makromolekúl PHA, až do 20 MDa [16, 17].

Mechanickými a fyzikálnymi vlastnosťami sú tieto zlúčeniny veľmi podobné syntetickým polymérom. Fyzikálne vlastnosti polyméru – pevnosť, elasticita, termoplasticitu či predĺženie pri pretrhnutí – závisia striktno od molekulovej hmotnosti (teda dĺžky reťazca) a od

monomérneho zloženia. Vlastnosti PHA však môžu byť upravené aj modifikáciou ich povrchu alebo naviazaním rôznych anorganických látok do ich štruktúry. Ďalším dôležitým parametrom PHA je dobrá odolnosť voči UV žiareniu a teda aj ochrana samotného mikroorganizmu pred UV žiarením – vďaka zhlukovaniu inklúzií okolo jadra, čo zabezpečuje ochranu DNA. Majú hydrofóbny charakter a sú teda i nerozpustné vo vode [4, 6, 11, 18].

PHA sa radia medzi opticky aktívne látky. V mikroorganizmoch sa vyskytujú v rôznej forme od amorfných až po vysoko kryštalické, pričom ich kryštalinita je spojená ako s kvantitou polyméru, tak aj s jeho monomérnym zložením. V amorfnej forme sú mikroorganizmy pomocou intracelulárnych PHA depolymeráz schopné degradovať tieto polyméry, čo umožňuje ich využitie ako zdroj energie pre bunku [3, 6, 19].

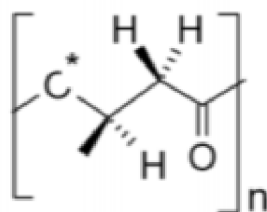
Tieto zlúčeniny sú pomerne ľahko recyklovateľné a okrem toho sa aj sami prirodzene rozkladajú na jednoduché zlúčeniny za vhodných podmienok v prostredí. Okrem biodegradability sú výnimočné aj svojou biokompatibilitou. Nie sú toxické a sú prirodzene odbúrateľné v tele, čo umožňuje bezpečné využitie nielen v medicínskych aplikáciách, ale aj v odvetviach agrikultúry, potravinárstva a kozmetického priemyslu [11, 16].

2.1.2 Poly(3-hydroxybutyrát) a kopolymér P(3HB-co-4HB)

Poly(3-hydroxybutyrát) je najrozšírenejším zásobným lineárnym homopolymérom zo skupiny PHA a svojimi vlastnosťami sa podobá syntetickému polypropylénu. P(3HB) má dobré termoplastické vlastnosti, je semikryštalický a nepodlieha hydrolyze. Z hľadiska stereochemie sa jedná o opticky aktívnu látku s izotaktickou štruktúrou v *R*-konfigurácií [4, 20].

Jeho metabolizmus v mikroorganizmoch vykazuje cyklický charakter, keďže jeho syntéza a biodegradácia prebiehajú zároveň. V tomto P(3HB) cykle polymér degraduje na svoj monomér 3-hydroxybutyrát (3HB), ktorý podobne ako jeho polymér hrá dôležitú rolu pri ochrane mikroorganizmu v prípade nepriaznivých podmienok, keďže ovplyvňuje intracelulárny osmotický tlak a pH v cytoplazme bunky [21].

Krehkosť P(3HB) však obmedzuje možnosti použitia tohoto polyméru, čo sa dá upraviť prídavkom iných monomérov do polymérneho reťazca a teda tvorbou kopolymérov či heteropolymérov.

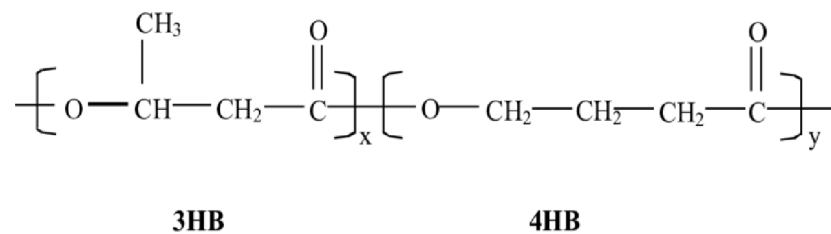


Obrázok č. 3: Štruktúra monomérnej jednotky P(3HB) [4]

Oproti tomu homopolymer poly(4-hydroxybutyrát) je vstrebateľný a chemicky podobný polyglykolidu (PGA). Jedná sa o flexibilný a termoplastický polymér. Degradáciou sa opäť rozkladá na svoj monomér 4-hydroxybutyrát (4HB), ktorý je prirodzenou zložkou v telách cicavcov [22].

Okrem homopolymérov sú hojne využívané aj kopolymery, vďaka vhodným fyzikálnym vlastnostiam ktoré vykazujú. V prípade tvorby kopolyméru z monomérov 3HB a 4HB za vzniku poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrátu) ich pomer určuje vlastnosti daného kopolyméru, čo rozširuje možnosti jeho aplikácie v praxi. Množstvo frakcie 4HB tiež ovplyvňuje kryštalinitu, a teda i elasticitu kopolyméru. Tvorbou kopolyméru so 4-hydroxybutyrátom sa nielen zlepšia mechanické vlastnosti samotného polyméru, ale aj zvýši jeho biokompatibilita a následná in-vivo biodegradácia v porovnaní s inými PHA, čo umožňuje široké využitie tejto látky ako materiálu aj v medicínskych aplikáciách [23, 24, 25].

Výsledné monomérmé zloženie P(3HB-co-4HB) pri produkcii sa dá ovplyvniť pridaným typom zdroja uhlíka. 3HB monomér vzniká prevažne využitím jednoduchých sacharidov (glukóza, fruktóza) alebo kyseliny maslovej. Substráty γ -butyrolakton, 1,4-butandiol a 4-hydroxybutyrová kyselina sú naopak vhodné pre biosyntézu 4HB monoméru. Kopolymér P(3HB-co-4HB) (obecná štruktúra vid' obrázok č. 4) bol prvýkrát pozorovaný v *Ralstonia eutropha* H16 (po novom *Cupriavidus Necator*) v roku 1988 [23, 25].



Obrázok č. 4: Chemická štruktúra P(3HB-co-4HB) [26]

2.1.3 Biosyntéza a biodegradácia PHA

Mikroorganizmy schopné syntézy týchto látok teda tvoria za určitých podmienok inklúzie PHA v cytoplazme, ktoré vedú reverzne využiť ako zdroj energie a živín. Substráty predstavujúce zdroj uhlíka pre tvorbu PHA môžu byť rôzne a určujú typ vznikajúceho polyesteru. Ten však závisí aj od ostatných kultivačných podmienok, mikroorganizmu a typu PHA syntézy.

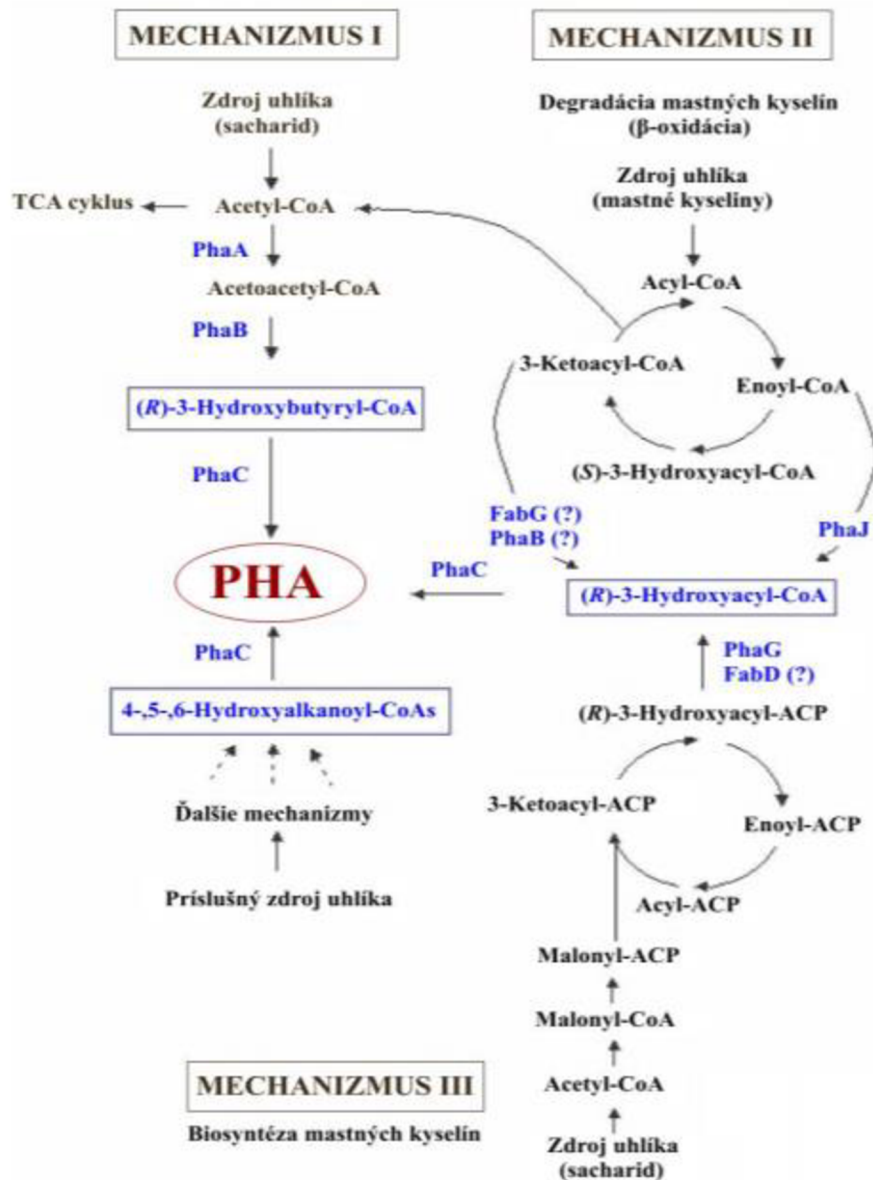
Biosyntéza polyhydroxyalkanoátov je spojená s ostatnými metabolickými dráhami mikroorganizmu ako sú glykolýza, β -oxidácia či Krebsov cyklus. V prípade, že je zabránené vstupu acetyl-CoA do Krebsovho cyklu pri nedostatku živín sa aktivujú príslušné enzýmy a prebytočný acetyl-CoA sa využije pri syntéze PHA. Tieto mikrobiálne polyméry sú teda produkované ako sekundárne metabolity [6].

Najlepšie preskúmaná je syntéza *scl*-PHA (vid' Obrázok č. 5) a to konkrétne homopolyméru P(3HB) v baktériách *Cupriavidus necator* H16. Tá sa skladá z troch hlavných krokov. V prvom kroku dôjde ku kondenzácii dvoch molekúl acetyl-CoA za vzniku acetoacetyl-CoA. Túto reakciu zabezpečuje enzým 3-ketothioláza označovaný ako phaA. Ten je následne pomocou enzýmu acetoacetyl-CoA reductázy (phaB) redukovaný na 3-hydroxybutyryl-CoA. Posledným krokom syntézy je polymerizácia 3-hydroxybutyryl-CoA na poly(3-hydroxybutyrát) za účasti enzýmu PHA syntázy (phaC). Pri tejto reakcii sa odštiepi CoA. Vysoká substrátová špecifita tohto enzýmu zabezpečuje, že do polyméru sa viažu len izoméry v konfigurácii *R* [27, 28].

V prípade využitia iného zdroja uhlíku než sú sacharidy poznáme ešte dve ďalšie dráhy syntézy PHA v mikroorganizmoch. Jedna z nich je spojená s β -oxidáciou mastných kyselín, pričom pri

využití vhodného substrátu touto cestou vznikajú polyhydroxyalkanoáty so stredne dlhou dĺžkou reťazca [11, 29].

Tretím mechanizmom je špecifická biosyntéza polyhydroxyalkanoátov z jednoduchých zdrojov uhlíka, ktoré sa od seba líšia štruktúrou – fruktóza, sacharóza a glukóza. Využíva sa taktiež metabolická dráha mastných kyselín, kde vzniká 3-hydroxyacylový medziprodukt a ten je následne transacylázou zmenený na formu CoA [11].



Obrázok č. 5: Prepojenie biosyntetických dráh PHA využívajúcich rôzne zdroje uhlíka [26]

V prípade biosyntézy kopolymérov ako je napríklad P(3HB-co-4HB) hrá dôležitú rolu kombinácia dvoch alebo viacerých uhlíkatých zdrojov. Využitím substrátov podobným zloženiu 4HB, ako sú napríklad 1,4-butandiol a γ -butyrolakton, v baktériách akumulujú polyhydroxyalkanoáty s rozličnými monomérnymi kompozíciami, pričom tieto substráty podporujú tvorbu monoméru 4HB. Pre syntézu 3HB monomérov sa používajú napr. kyselina maslová a glukóza. Geneticky upravená baktéria *Escherichia coli* je zatiaľ ako jediná pozorovaná schopná syntézy tohoto kopolyméru iba z jedného zdroja uhlíka – glukózy. Po

prvýkrát bola biosyntéza P(3HB-*co*-4HB) pozorovaná v baktérii *Cupriavidus necator* za využitia 4-hydroxybutyrátu a 1,4-butandiolu. Detaily tejto dráhy sú zatiaľ stále skúmané [30]. Už na úvod bolo poznamenané, že polyhydroxyalkanoáty patria medzi zlúčeniny schopné biodegradovať. Mikroorganizmy sú schopné rozkladať naakumulované PHA na uhlík a energiu. V tomto procese sú významné enzýmy depolymerázy v bunke. Bol zmienovaný fakt, že PHA majú v natívnom stave v bunke amorfnú formu. PHA-depolymerázy zapojené do procesu rozkladu týchto zlúčenín priamo v bunke sú teda špecificky orientované na intracelulárnu degradáciu a produkuje ich bunka v ktorej sa PHA štiepi. Okrem toho však môžu byť PHA hydrolizované aj extracelulárne (prostredníctvom extracelulárnych PHA-depolymeráz), pričom PHA uvoľnené z bunky je väčšinou vysoko kryštalické (označuje sa aj ako denaturované PHA) [22, 31].

Samotná biodegradácia PHA v prostredí bunky je závislá od okolitých podmienok ako je prístup kyslíka či vody, a tiež od typu mikrobiálneho polyesteru. Proces je komplexný, ale vieme ho rozdeliť do dvoch hlavných krokov. Najprv prebehne štiepenie PHA na menšie jednotky (monoméry či zmes oligomérov) podľa typu pracujúcej depolymerázy. Potom dôjde k rozpadu na jednoduchšie zlúčeniny, pričom tie sa líšia v závislosti od prístupu kyslíka. V prípade dostatočného množstva kyslíka v prostredí PHA degraduje na oxid uhličitý a vodu. V anaeróbných podmienkach vzniká namiesto oxidu uhličitého metán. Zatiaľ bola preukázaná iba biodegradácia monomérov o konfigurácii *R* [32, 33].

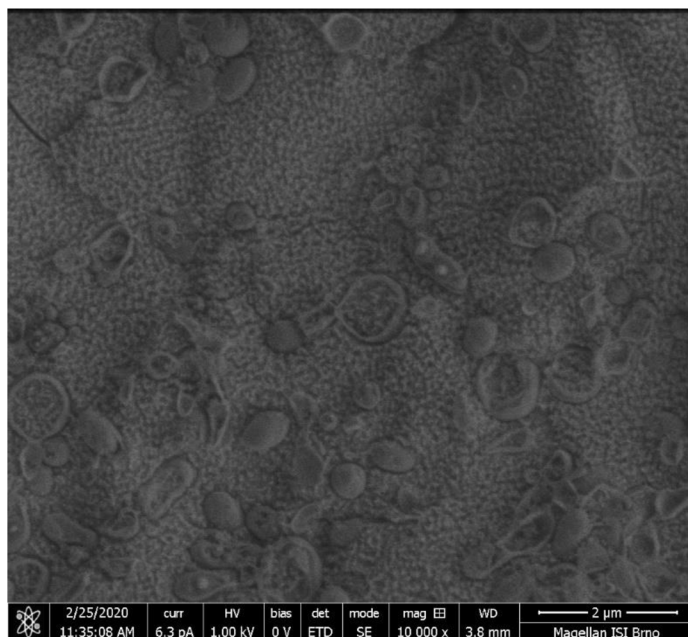
2.1.4 Vybrané modelové baktérie

V tejto bakalárskej práci boli PHA produkované baktériami *Cupriavidus malaysiensis*, *Thermomonas hydrothermalis* a *Aneurinibacillus thermoaerophilus* sp. H1.

Thermomonas hydrothermalis (Obrázok č.6 a Obrázok č. 7) je druh γ -proteobaktérie prvýkrát izolovaný na území centrálného Portugalsku z horúcich prameňov. Optimálna rastová teplota tohto termofilného mikroorganizmu je 50 °C. Baktéria je organotrofná a aeróbná. Bunečná stena obsahuje okrem proteínov a glykolipidov aj amfifilné lipopolysacharidy, ktoré chránia organizmus v extrémnejších podmienkach. Táto baktéria produkuje P(3HB-*co*-4HB) za určitých podmienok a s využitím vhodného substrátu [34, 35].



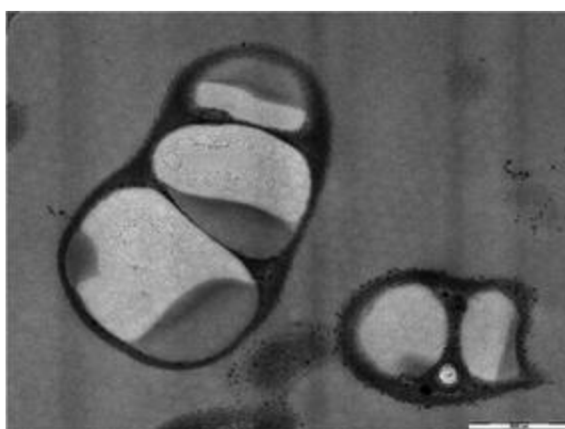
Obrázok č.6: Bakteriálny kmeň *Thermomonas hydrothermalis* [35]



Obrázok č. 7: Baktéria *Thermomonas hydrothermalis* - meranie metódou Kryosem (obrázok poskytla FCH VUT Brno)

Ďalším pozorovaným producentom PHA v tejto bakalárskej práci je grampozitívna *Aneurinibacillus thermoaerophilus* sp. H1. Je to taktiež termofilná baktéria, jej optimálna teplota pre rast je 45–50 °C a vhodné pH pre tento mikroorganizmus sa nachádza v neutrálnej oblasti. Baktéria za prítomnosti glycerolu ako substrátu syntetizuje poly(3-hydroxybutyrát), a je tiež schopná produkcie kopolymérov a terpolymérov s vysokými frakciami monomérov 3-hydroxyvalerátu či 4-hydroxybutyrátu [36].

Rod *Cupriavidus* má viacero zástupcov, pričom *Cupriavidus Necator* je dlhodobo skúmaná baktéria syntetizujúca PHA. *Cupriavidus malaysiensis* je novo izolovaným príbuzným druhom. Biosyntéza P(3HB-co-4HB) je v tejto práci pozorovaná v troch rôznych kmeňoch tejto baktérie (DSM 25816, DSM 19379 a DSM 19416). Sú to gramnegatívne tyčinkovité baktérie, ktoré netvorí spóry a nie sú patogénne [22, 37].



Obrázok č. 8: *Cupriavidus malaysiensis* pod transmisným elektrónovým mikroskopom obsahujúce veľké granule PHA [38]

2.2 Vibračná spektroskopia

Princíp vibračnej spektroskopie spočíva v pozorovaní rotačne-vibračných energetických prechodov molekuly v závislosti na zmene dipólového momentu molekuly. Pod vibráciou molekuly rozumieme periodické skracovanie alebo predlžovanie väzieb medzi atómami, či zmenu uhlov medzi atómami. Medzi najviac využívané metódy vibračnej spektroskopie radíme dve široko využívané techniky – infračervenú spektroskopiu (FTIR, z angl. Fourier transform infrared) a Ramanovu spektroskopiu [39, 40].

Infračervené žiarenie je elektromagnetické žiarenie, ktoré má vlnovú dĺžku väčšiu ako viditeľné svetlo a kratšiu než mikrovlny (760 nm – 1 mm). Pri vystavení vzorky zdroju infračerveného žiarenia je časť energie (kvantum) pohltaná látkou a zvyšná energia ňou prejde alebo sa odrazí. Následne vďaka týmto interakciám vieme získať vibračné spektrum s charakteristickými pásmami, ktoré nám poskytnú informácie o zložení látky [39].

Vibračnou spektroskopiou vieme stanoviť zloženie zmesí, štruktúru molekúl, funkčné skupiny, konformácie, kvantitu látky, študovať priebeh intramolekulárnych a intermolekulárnych reakcií a iné [39, 40].

Výstupom tejto analytickej metódy je spektrum analytu v infračervenej oblasti, ktoré predstavuje grafickú závislosť absorbancie (alebo transmitancie) na vlnovej dĺžke žiarenia. Absorbancia je záporný dekadický logaritmus transmitancie a vlnové číslo je prevrátenou hodnotou vlnovej dĺžky. Vlnočet (vlnové číslo) sa vyjadruje v recipročných centrimetroch [41]. FTIR spektra obsahujú charakteristické absorpčné oblasti pre rôzne funkčné skupiny, z ktorých je možné vytvoriť spektrálnu knižnicu a tú následne využívať pri analýze rôznych iných zlúčenín obsahujúcich totožné funkčné skupiny. Absorbované môže byť iba žiarenie, ktorého energia je totožná s energiou príslušných vibračných prechodov. Tie sa pre každú skupinu atómov líšia, čo umožňuje kvalitatívnu analýzu vzoriek rozličných zlúčenín [42].

Vibračné spektrum vieme rozdeliť na dve hlavné oblasti. Prvá z nich obsahuje charakteristické píky pre rozličné špecifické väzby, vďaka ktorej vieme určiť prítomnosť istej funkčnej skupiny v zlúčenine. Pre organické molekuly ju predstavuje oblasť v hodnotách 4 000–1 500 cm^{-1} . Hodnoty 1 500–400 cm^{-1} prislúchajú tzv. odtlačku prstu a tento úsek je charakteristický pre každú látku [43].

2.2.1 Metódy vibračnej spektroskopie

Metódy vibračnej spektroskopie sú bežne používané v biofyzikálnych štúdiách a analýzach. Najrýchlejšie a najčastejšie používané metódy tohto typu pre charakterizáciu polymérov sú už spomínané analytické metódy FTIR a Ramanova spektroskopia [44].

Metóda FTIR je veľmi rýchla, efektívna a nedeštruktívna. Sledujeme ňou prevažne vibráciu polárnej väzby. Meranie môže rušiť vzdušná vlhkosť a oxid uhličitý. Ramanova spektroskopia poskytuje doplnujúce informácie k metóde FTIR, ide o neinvazívnu metódu fungujúcu na princípe Ramanovho rozptylu, čo je neelastický rozptyl monochromatického žiarenia (väčšinou laser), a pozorujeme ňou prevažne nepolárne väzby [39].

V tejto práci je používaná metóda infračervenej spektroskopie s Fourierovou transformáciou, ktorý využíva tzv. zoslabený úplný odraz (ATR, z angl. Attenuated total reflection). ATR-FTIR teda patrí medzi reflexné spektroskopické techniky. Výhodou metódy je minimálna príprava vzorku pre analýzu a jeho prípadné znovu použitie pri opakovanom meraní (metóda je

nedeštruktívna). Pri tejto metóde tiež nie sú používané toxické rozpúšťadlá a samotné meranie je možné automatizovať. V princípe ide o znásobený úplný odraz žiarenia na fázovom rozhraní medzi meranou vzorkou a kryštálom. Kryštál je z materiálu, ktorý má vysoký index lomu (napríklad diamant či germánium) a medzi analyzovanou vzorkou a povrchom kryštálu je dokonalý kontakt. Laserové lúče musia pri dopade vyhovieť podmienke úplného odrazu. Žiarenie preniká analyzovaným materiálom, nastáva vnútorný odraz a v prípade absorbovania žiarenia vzorkou bude táto zložka vo výsledných odrážaných lúčoch slabšia [39, 45].

Okrem toho ešte existuje aj ďalšia analytická metóda vibračnej spektroskopie, ktorá pozoruje odraz laserového lúča. V tomto prípade sa však časť žiarenia dopadajúceho na vzorku po odraze od častíc rozptýli. Metóda teda využíva difúznej reflektancie, čo plynie aj z jej názvu DRIFTS (z angl. diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy). Meranie závisí na veľkosti častíc analytu, z hľadiska reprodukovateľnosti experimentu je teda potrebné mať vo vzorkách častice o približne rovnakej veľkosti [46, 47].

Metódy vibračnej spektroskopie môžu byť založené aj na meraní žiarenia prechádzajúceho vzorkou. V takom prípade ide o transmisné spektroskopické techniky. Najvyužívanejšia metóda tohto typu využíva tablety kryštalickeho KBr, ktoré sú odolné voči teplu a pomocou nich je možné stanoviť veľké množstvo rozličných látok. Príprava vzoriek pre túto analýzu je však náročná a látka KBr je navyše hygroskopická [48].

2.3 Využitie vibračnej spektroskopie pri analýze polyhydroxyalkanoátov

Prírodné polyméry PHA vďaka schopnosti prirodzeného rozkladu nepredstavujú záťaž pre životné prostredie a ich biokompatibilita umožňuje využitie v medicíne, farmakológii, pri poľnohospodárstve, v kozmetickom, ale i v iných priemysloch. Problémom masovej produkcie PHA je však podstatne vyššia cena oproti výrobe syntetických polymérnych látok, keďže ich produkcia závisí na zdroji uhlíka. To sa dá vyriešiť využitím rôznych odpadových látok alebo vedľajších produktov z potravinárstva a agrikultúry vo forme substrátu pre PHA produkujúce baktérie.

Produkcia PHA vo veľkom je ale náročná z hľadiska kvantitatívnej aj kvalitatívnej analýzy. Metódy používané na presné stanovenie obsahu PHA v bunkách (najčastejšie plynová chromatografia, ďalej sú to gravimetria, UV spektroskopia, optická fluorescencia), sú veľmi zdĺhavé, finančne náročné a vyžadujú špecifickú prípravu vzoriek pre samotnú analýzu. Je preto potrebné hľadať alternatívy analýzy, ktoré budú rýchle, spoľahlivé a vhodné na použitie pri biotechnologickej produkcii PHA – jednou z možností je využitie vibračnej spektroskopie. Ramanova spektroskopia sa experimentálne ukázala ako vhodná metóda pri stanovení presného obsahu poly(3-hydroxybutyrátu) syntetizovaného baktériou *Cupriavidus necator* H16. Z charakteristických Ramanových pík pre P(3HB) bol zvolený pás v oblasti 1736 cm^{-1} pretože v tejto oblasti nenastáva interferencia píkmi iných biomolekúl nachádzajúcich sa v bakteriálnej kultúre (DNA, lipidy, amidy a iné). Tento pík predstavuje valenčný vibračný stav karbonylovej skupiny C=O obsiahnutej v PHA. Dôležitým bodom tejto analýzy bolo vytvorenie modelov kalibračných kriviek pomocou štandardov a porovnanie dát s výsledkami plynovej chromatografie. Takto štandardizovaná kalibračná krivka pre daný mikroorganizmus a príslušné syntetizované PHA umožňuje kvantitatívnu analýzu veľkého obsahu polyméru pomocou metódy IČ [1]. Podobnými metódami bola zisťovaná korelácia dát získaných

metódou HPLC s hodnotami pozorovanými pri Ramanovej spektroskopii v rozličných vzorkách biomasy v dvoch ďalších štúdiách [49, 50]. Vo všetkých týchto experimentoch bola preukázaná lineárna závislosť medzi typmi analýzy (GC a IČ), čo potvrdzuje vhodnosť využitia metódy vibračnej spektroskopie pre kvantitatívnu analýzu PHB v baktériách.

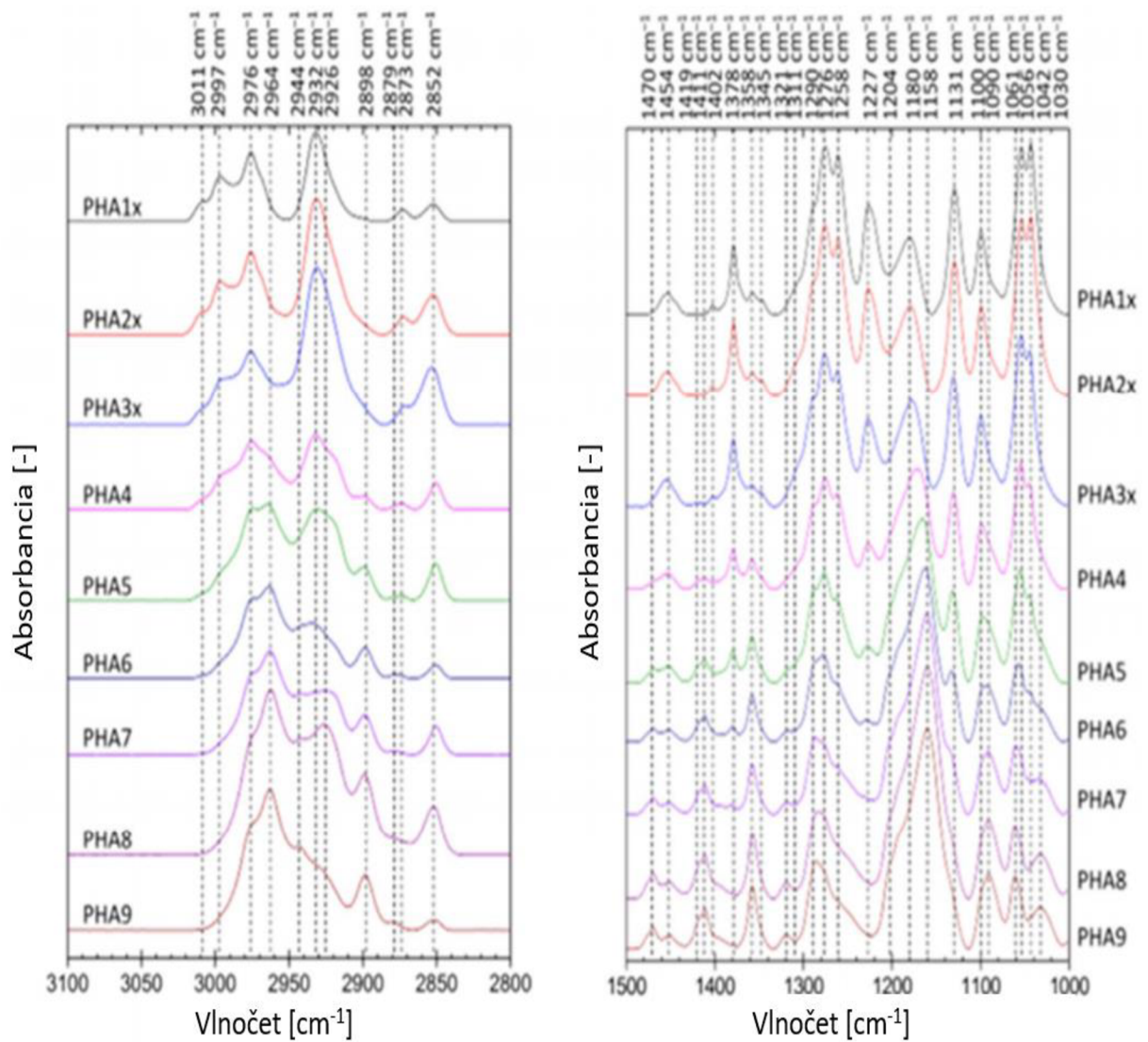
Vibračná spektroskopia sa dá využiť aj pri kvalitatívnej analýze mikrobiálnych polyesterov. Je dôležité sledovať monoméne zloženie v prípade heteropolymérov a kryštalinitu daného PHA. Napriek tomu, že sa jedná o termodynamicky nevýhodný stav, sa PHA prirodzene vyskytuje v bunkách prevažne v amorfnej forme, ktorá prirodzene vykazuje podstatne lepšiu elasticitu a flexibilitu ako čistá kryštalická forma. Rozlíšiť kryštalický a amorfný stav polyhydroxyalkanoátov je preto nevyhnutné pre ich následnú materiálnu aplikáciu – kryštalické polyméry sa ťažšie spracúvajú a sú krehké, preto je potrebné skúmať sklony PHA k prechodom z amorfných na kryštalické štruktúry (a naopak), schopnosť ovplyvniť tieto deje a analýzu kryštalinity, či už v biomase alebo v extrahovanom bioplaste [6, 19]. Vieme, že pri analýze pomocou metódy FTIR je vibračný pás pre skupinu C=O (estery) v oblasti 1 725–1 740 cm^{-1} . V prípade, že je tento pík viditeľne asymetrický a naklonený vpravo je PHA v kryštalickej forme – ide o vizuálne vyhodnotenie spektra. Predchádzajúce štúdie však zistili aj charakteristický vibračný pás pre amorfný stav P(3HB) metódou FTIR, ktorého pík leží na 1 180 cm^{-1} , zatiaľ čo vibračné pásy typicky spojené s kryštalinitou sú v úsekoch 1276 cm^{-1} a 1 227 cm^{-1} . Intenzita oboch týchto pásov v danej štúdií klesala s klesajúcim obsahom monoméru 3HB v kopolyméri P(3HB-co-4HB) [36].

Taktiež boli identifikované aj ďalšie píky závislé na monomérom zložení polyméru (viď Obrázok č. 9 a Obrázok č. 10). Pozorovaný bol napríklad pík 2 964 cm^{-1} , ktorý rástol so stúpajúcim frakčným obsahom monoméru 4HB. S množstvom 4HB monomérnych jednotiek v kopolyméri začal rásť aj pík slabšej intenzity o hodnote vlnočetu 1 358 cm^{-1} , pričom pík nachádzajúci sa tesne vedľa (1 378 cm^{-1}) sa vo vzorkách s vyššou koncentráciou 4HB vytratil. Pri pozorovaní spektier v nižších hodnotách vlnočetu boli najsignifikantnejšie zmeny v oblastiach 756 cm^{-1} a 514 cm^{-1} . Zatiaľ čo sa intenzita píku 756 cm^{-1} so stúpajúcim množstvom 4HB v kopolyméri zvyšovala, vo vzorkách s menším množstvom 3HB pík 514 cm^{-1} takmer úplne zmizol. Podľa týchto zistení boli vyberané aj hodnoty analyzovaných píkov v tejto bakalárskej práci [36]. Zmenou monoméneho zloženia bola v tomto experimente pozorovaná aj zmena kryštalickej mriežky z P(3HB) na P(4HB) za prítomnosti istých deformácií, čo potvrdilo fakt, že tieto dva kryštalinity nie sú štruktúrne izomorfné. Percentuálna kvantifikácia kryštalinity a detailnejší morfológický tvar bioplastu však neboli touto metódou získané. Výsledky boli pozorované pri analýze vyextrahovaného a purifikovaného polyméru vo forme polymérneho filmu [36].

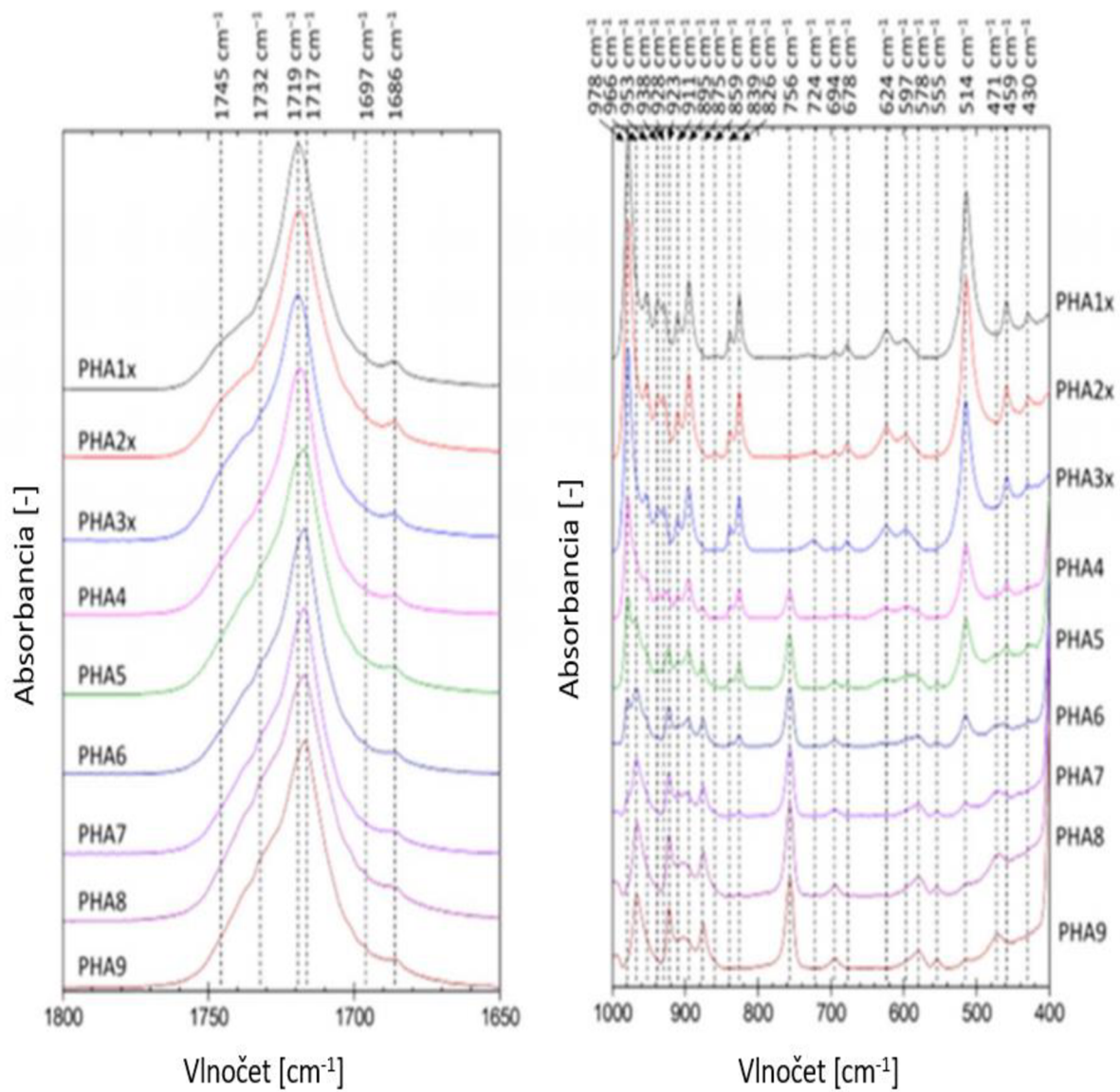
Kinetika kryštalizácie PHA v biologicky deaktivovanej baktérii *Cupriavidus necator* H16 uchováanej v kyslom prostredí bola taktiež úspešne skúmaná metódou FTIR in-situ [51].

Okrem toho bola pozorovaná dehydratácia vzoriek a kryštalizácia PHA pomocou metódy ATR-FTIR. V tejto štúdií sa sledovali dve sady vzoriek – okrem klasického biopolyméru v baktériách experiment zahŕňal aj bunky predtým podrobené stresovým faktorom ako sú zmena pH alebo zmena teploty. Z výsledkov vyplýva, že PHA v baktériách, ktoré predtým neboli vystavené extrémnym podmienkam, nekryštalizuje pri bežnom vysychaní vzorky. Avšak na druhej strane, nie všetky vzorky v prípade vystavenia baktérii nepriaznivým podmienkam podliehali

kryštalizácií. Bolo zistené, že pre samotnú kryštalizáciu PHA nestačí koagulácia inklúzií v bunkách, ale dôležitú rolu hrá aj intragranulárna voda, ktorá má plastifikačný účinok na polymér [19].



Obrázok č. 9: Zmeny v intenzitách a posunoch píkov pozorované v štúdií [36]



Obrázok č. 10: Ďalšie zmeny v intenzitách a posunoch píkov pozorované v štúdií [36]

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Chemikálie, prístroje a baktérie použité pri práci

3.1.1 Zoznam chemikálií

1,4-butandiol (Sigma-Aldrich)
Citrát železito-amonný (Fluka)
Dihydrát chloridu vápenatého (Lach-Ner)
Dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich)
Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Sigma-Aldrich)
Dusičnan amonný (Lach-Ner)
Glycerol bezvodý (Lach-Ner)
Heptahydrát síranu horečnatého (Sigma-Aldrich)
Hydroxid sodný (Lach-Ner)
Chlorid draselný (Lach-Ner)
Chlorid sodný (Lach-Ner)
Chloroform (Penta)
Isopropylalkohol (Penta)
Kyselina benzoová
Kyselina sírová
Methanol
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 prístrojovej techniky

Analytické váhy, Boeco
Autokláv
Centrifuga, Boeco U-32R
Centrifuga, Hettich MIKRO 200
FTIR spektrofotometer Nicolet iS50, ThermoFisher Scientific
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
Plynový chromatograf, GC-FID, Thermo, TRACE 1300
Soxtherm, Gerhard
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 tejto bakalárskej práci boli použité baktérie *Cupriavidus malaysiensis* (kmene DSM 19416, DSM 19379 a DSM 25816) a *Thermomonas hydrothermalis* (DSM 14834), ktoré boli zakúpené od Leibnitz Institut DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures. Ďalšou kultivovanou baktériou je *Aneurinibacillus thermoaerophilus* H1 (CCM 8960) z Českej zbierky mikroorganizmov, ktorý bol izolovaný na Fakulte chemickej VUT v Brne.

3.2 Kultivácie baktérií

Kryoskúmavky o objeme 1,5 ml obsahujúce dané kmene baktérií s kryoprotektantom boli skladované pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v mrazničke. Pred očkovaním boli vybrané a prirodzene zahriate na izbovú teplotu. Celkovo boli pripravené dve identické sady kultivácií baktérie *Aneurinibacillus thermoaerophilus* H1, po jednej kultivácií všetkých troch kmeňov *Cupriavidus malaysiensis* a jedna kultivácia baktérie *Thermomonas hydrothermalis*.

Baktérie majú pri kultivácií rozličné optimálne teploty pre rast:

<i>Cupriavidus malaysiensis</i>	30 °C
<i>Thermomonas hydrothermalis</i>	50 °C
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> H1	45 °C

3.2.1 Inokulum

Príprava inokula pre baktérie je prvým krokom k produkcii biomasy. Najprv 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 (100 ml). Tie boli následne zaštipľované, prekryté alobalom a takto pripravený roztok NB sa podrobil sterilizácií v tlakovom hrnci.

Po sterilizácií bolo do baniek s NB zahriatych na optimálnu rastovú teplotu organizmu pomocou termostatu (vhodné prostredie pre jednotlivé termofilné baktérie) zaočkovaných 0,5 ml baktérií z kryoskúmavky v sterilnom laminárnom boxe. Pripravené inokulá sa nechali 24 hodín zobúdzat' na temperovanej trepačke pri 180 rpm a pri optimálnej teplote daného bakteriálneho kmeňa. Následne bolo zaočkované inokulom produkčné minerálne médium (viď. podkapitola 3.2.2).

Nutrient Broth obsahuje látky:

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

3.2.2 Minerálne médium a substráty

Boli pripravené špecifické živné médiá pre každého producenta. Do Erlenmeyerových baniek (250 ml) bolo daných po 100 ml minerálneho média (zloženie je v tabuľke č.1). Do takto pripravených médií boli pridané substráty o rôznych koncentráciách (viď tabuľka č. 2), ktoré predstavovali nadbytok uhlíka, a teda prekursor pre biosyntézu PHA danými baktériami. Minerálne médiá boli taktiež vysterilizované v tlakovom hrnci. V prípade kultivácií baktérie

Thermomonas hydrothermalis bola použiteľná iba vzorka so substrátom 1,4-butandiol, na substráte γ -butyrolakton bakteriálny kmeň nerástol.

Tabuľka 1: Zloženie minerálnych médií pre jednotlivé mikroorganizmy

Zloženie minerálneho média					
<i>Cupriavidus malaysiensis</i> (DSM 19379, DSM 19416, DSM 25816)		<i>Thermomonas hydrothermalis</i> (DSM 14834)		<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> H1 (CCM 8960)	
KH ₂ PO ₄	1,02 g	KH ₂ PO ₄	1,5 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	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	9,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0 g	NH ₄ Cl	1,0 g	NH ₄ NO ₃	1,0 g
MES	1 ml	Fe ^{III} NH ₄ citrát	0,012	Fe ^{III} NH ₄ citrát	0,0012 g
destilovaná voda	1 000 ml	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,02 g	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,02 g
		TES II	1 ml	Trypton	0,5 g
		destilovaná voda	1 000 ml	TES II	1 ml
				destilovaná voda	1 000 ml

Tabuľka 2: Pridavky substrátov

Koncentrácie substrátov				
Producent		1,4-butandiol [g·l ⁻¹]	glycerol [g·l ⁻¹]	γ -butyrolakton [g·l ⁻¹]
<i>Cupriavidus malaysiensis</i> (pre každý kmeň)	<i>a</i>	8	-	-
	<i>b</i>	-	-	8
<i>Thermomonas hydrothermalis</i>	<i>th</i>	8	-	-
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> H1	<i>c1</i>	4	2	-
	<i>c2</i>	4	4	-
	<i>c3</i>	4	6	-
	<i>c4</i>	4	8	-
	<i>c5</i>	4	20	-

Zloženie roztokov stopových prvkov:

TES II

- EDTA 50 g·l⁻¹
- FeCl₃ 8,3 g·l⁻¹
- ZnCl₂ 0,84 g·l⁻¹
- CuCl₂·2 H₂O 0,13 g·l⁻¹
- CoCl₂·6 H₂O 0,1 g·l⁻¹
- MnCl₂·6 H₂O 0,016 l
- H₃BO₃ 0,1 g·l⁻¹

MES

- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 9,7 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7,8 g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,156 g
- $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,119 g
- $\text{NiCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,118 g
- 0,1 M HCl 1000 ml

3.2.3 Očkovanie

Do pripraveného produkčného média bolo zaočkované narastené inokulum (5 objemových %). Nasledovala kultivácia na vyhriatej trepačke (podľa potreby mikroorganizmu) pri 180 rpm po dobu 72 hodín. Celkovo bolo z každej koncentrácie po tri Erlenmeyerove banky – triplety.



Obrázok 11: Erlenmeyerove baničky s nakultivovanými baktériami

3.2.4 Príprava sušenej biomasy

Z narastených kultúr bolo odobraných 10 ml objemu do centrifugačných skúmaviek. Prebehlo odstredenie po dobu 5 minút pri 5 000 rpm. Usadená biomasa bola zliata a premytá destilovanou vodou. Rozsuspendovaním na vortexe vznikla zmes, ktorá bola opäť scentrifugovaná. Tento proces prečistenia bol zopakovaný ešte raz. Takto pripravená biomasa v skúmavkách bola umiestnená do sušiarne. Vysušená biomasa bola zvážená a použitá pri analýzach GC-FID a ATR-FTIR.

3.2.5 Rastová krivka

Boli tiež prichystané kultivácie pre rastovú krivku baktérie *Aneurinibacillus thermoaerophilus* H1 podľa vyššie uvedených tabuliek pre rozdielne koncentrácie glycerolu ($c_1 - c_5$) (viď kapitola

3.2.2). Takto zaočkované kultúry boli miešané na vyhriatej trepačke a odoberalo sa z nich v dubletoch po 10 ml do oboch skúmaviek v časových intervaloch: 12, 24, 36, 42, 48, 60, 66 a 72 hodín. V samotnej analýze boli vynechané kultivácie v časoch 42 a 66 hodín.

Odobrané vzorky sa scentrifugovali, pri 6 000 rpm po dobu 5 minút, supernatant bol zliaty a biomasa bola premytá 3 ml destilovanej vody. Po opätovnej centrifugácii a zliatí supernatantu boli skúmavky umiestnené do sušiarne a následne bola suchá biomasa zvážená a podrobená GC-FID a ATR-FTIR analýze ako všetky ostatné vzorky.

3.3 Analýza biomasy obsahujúcej PHA

3.3.1 Spektrofotometrické stanovenie rastu bakteriálnych kultúr

Meraním absorbancie vieme zistiť približné zmeny koncentrácií v pripravených vzorkách a jedná sa tak o dodatočnú analýzu bakteriálnych kultúr. Pri vhodne zvolenej vlnovej dĺžke 630 nm bola v kremenných kyvetách zmeraná absorbanca vybraných narastených médií. Meranie jedného vzorku prebehlo dvakrát až trikrát. Ako blank bol použitý pufr PBS (pH 7,42).

Zloženie PBS na 1 l destilovanej vody:

Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1,44 g
NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g

3.3.2 Gravimetrické stanovenie biomasy

Vysušené vzorky biomasy získané z odobraných 10 ml kultúry boli zvážené na analytických váhach. Týmto postupom vieme zo získaných dát jednoducho stanoviť hmotnosť celkovej biomasy gravimetricky.

3.3.3 Esterifikácia a plynová chromatografia

Vysušená biomasa obsahujúca PHA bola pre účely kvantitatívnej a kvalitatívnej analýzy podrobené plynovej chromatografii. Vzorky však museli byť pre danú analýzu pomocou GC-FID upravené. Bolo potrebné previesť PHA na prchavé methylestery, takže boli vzorky najskôr podrobené transesterifikácií.

Malé množstvo vysušenej biomasy o hmotnosti 8–11 mg bolo v dupletoch navážené na analytických váhach do krimpovacích vialiek. Pridal sa 1 ml chloroformu a 0,8 ml tzv. transesterifikačnej zmesi. Tá je zložená z 5 mg/ml kyseliny benzoovej ako interného buncného štandardu (ISTD) a 15% kyseliny sírovej v methanole. Takto pripravené vialky boli uzavreté špeciálnymi vrchnáčikmi pomocou krimpovacích kliešťov a podrobené trojhodinovej esterifikácii v termobloku pri 94 °C.

Po vychladnutí boli vialky zbavené vrchnáčikov a vzorky boli preliate do väčších sklenených vialiek. Na prečistenie bolo k vzorku pridaných 0,5 ml 50 mM NaOH. Po premiešaní a odstátí sa vytvorili dve fáze – vodná a organická. Vodná fáza obsahujúca NaOH sa nachádzala hore, zatiaľ čo spodná fáza obsahovala chloroform s rozpustenými PHA.

Do chromatografických vialiek bolo napipetovaných 0,9 ml isopropanolu a 50 µl spodnej fáze obsahujúcej methylestery. Takto pripravené vzorky boli podrobené chromatografickej analýze. Zároveň boli analyzované štandardy, a teda čistý kopolymér o koncentrácií 2–10 mg/ml, z ktorého vznikla pomocou softwaru kalibračná krivka.

3.3.4 ATR-FTIR

Malé množstvá vysušenej biomasy každého vzorku sa odobrali do Eppendorfových skúmaviiek. Vysušená biomasa bola analyzovaná na spektrofotometri Nicolet iS50 spoločnosti ThermoFisher Scientific. Na meranie tejto metódy bol použitý nástavec ATR-FTIR. Bol spustený software OMNIC a nastavené podmienky merania (32 skenov o rozlíšení 4 cm^{-1}). Blank experimentu bol vzduch. Bolo zmerané pozadie (blank) a skontrolovaná jeho správnosť, pretože nadmerné množstvo vody alebo CO_2 vo vzduchu, či znečistenie kryštálu ovplyvňuje výsledné meranie. Malé množstvo biomasy bolo nanosené na kryštál spektrofotometru a následne bola prevedená spektrálna analýza každého vzorku trikrát až päťkrát, podľa potreby a tiež podľa dostupného množstva pripravenej biomasy. V prípade merania rastovej krivky bolo dostupné iba malé množstvo biomasy z každej vzorky postačujúce na jedno zmeranie spektra.



Obrázok č. 12: Spektrofotometer Nicolet iS50

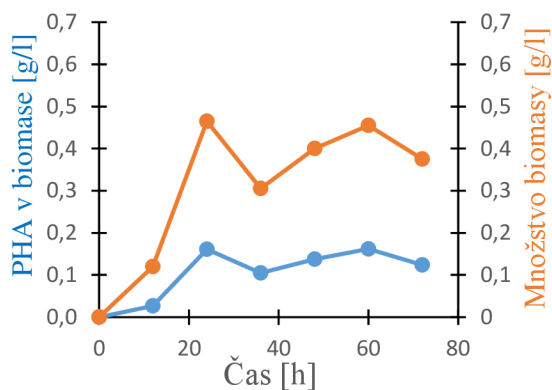


Obrázok č. 13: Eppendorfove skúmavky obsahujúce vysušenú biomasu pripravenú k analýze metódou ATR-FTIR

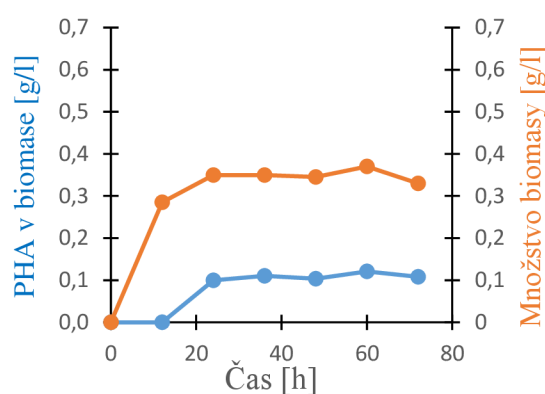
4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

4.1 Rastová krivka baktérie *Aneurinibacillus thermoaerophilus* H1

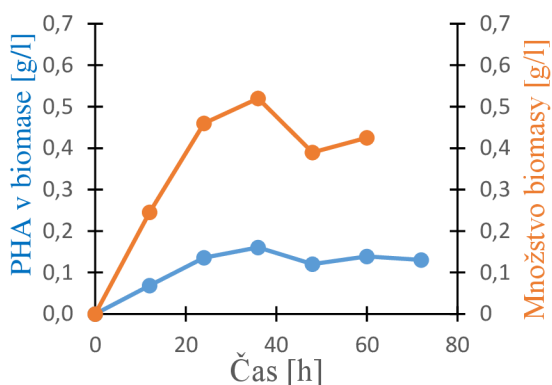
Popri ostatných kultiváciách bol pozorovaný aj rast biomasy a akumulácia PHA v baktérii *Aneurinibacillus thermoaerophilus* H1 v závislosti na dobe kultivácie. Experiment bol prevedený s kultiváciami H1 o rôznych koncentráciách (viď kapitola 3.2.5). Z výsledkov plynovej chromatografie a dopočítaných potrebných hodnôt boli vytvorené grafy závislosti akumulovaného PHA v biomase a celkového množstva narastenej biomasy na kultivačnej dobe.



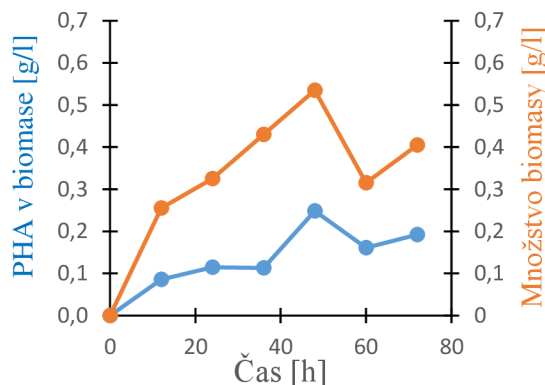
Obrázok č. 14: Rastová krivka pri koncentrácii glycerolu 2 g/l



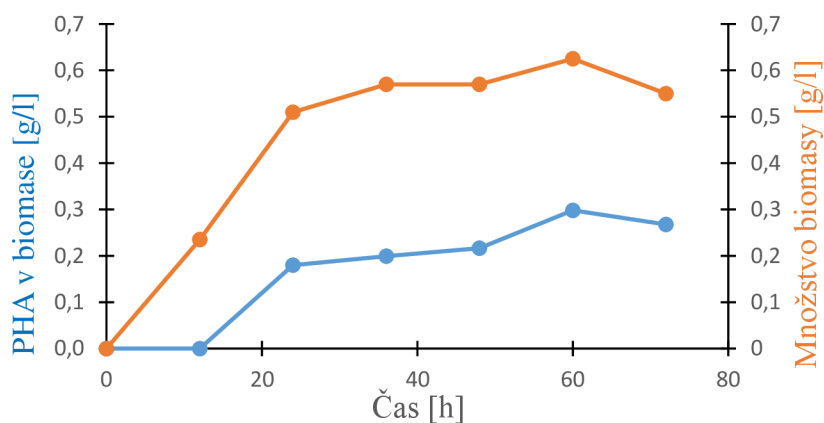
Obrázok č. 15: Rastová krivka pri koncentrácii glycerolu 4 g/l



Obrázok č. 16: Rastová krivka pri koncentrácii glycerolu 6 g/l



Obrázok č. 17: Rastová krivka pri koncentrácii glycerolu 8 g/l



Obrázok č. 18: Rastová krivka pri koncentrácii glycerolu 20 g/l

Tabuľka 3: Obsah 4HB monoméru v mol. % dopočítaný z GC analýzy

4HB frakcia v kopolyméri [mol. %]					
Koncentrácia glycerolu [g/l]	2	4	6	8	20
12 h	4,85	-	-	-	-
24 h	17,15	3,02	1,98	0,75	-
36 h	40,38	19,58	5,11	1,91	0,65
48 h	43,38	20,23	8,24	12,39	0,73
60 h	43,98	19,22	8,99	14,21	0,66
72 h	43,33	19,35	9,38	12,67	0,6

Pomocou rastových kriviek bol sledovaný rast biomasy a v nej obsiahnutého PHA. Pri kultivácií boli použité dva substráty (viď. kapitola 3.2.5), pričom sa menila iba koncentrácia glycerolu a koncentrácia 1,4 butandiolu bola konštantná. Z výsledných grafov plynie, že za prítomnosti vyššej koncentrácie glycerolu bol podporený rast kultúry, a teda zároveň aj množstva PHA obsiahnutého v biomase. Najlepšie je tento fakt viditeľný pri porovnaní grafu narastenej biomasy za 72 hodín o koncentrácií glycerolu 20 g/l (viď obrázok č. 18) s ostatnými rastovými krivkami. Na všetkých grafoch (obrázky 14 až 18) stúpalo množstvo PHA pomerne rovnakým trendom ako rástla biomasa. Na krivkách je vidno občasné výkyvy od tohto trendu hodnôt, ktorý môže byť spôsobený zlým odobraním vzorky v daný čas (nepremiešanie kultivačnej baničky) alebo chybami pri vážení (vzhľadom k veľmi malým množstvám vzorku). Ako už bolo spomenuté v kapitole 3.2.5, vzorky boli odoberané do dvoch paralelných skúmaviek. Po vysušení biomasy však bolo analytu v skúmavkách tak málo, že musel byť pre zvaženie a ďalšiu prácu so vzorkami (GC) prevedený na jednu vzorku. To vysvetľuje absenciu odchyľiek vo výpočtoch a následne teda aj chybových úsečiek v samotných grafoch.

Plynovou chromatografiou bol zistený obsah 4HB a 3HB monomérov v každej z biomás. Výsledky pre monomér 4HB sú zhrnuté v tabuľke č. 3. V počiatočných hodinách kultivačnej doby kultúra neobsahovala PHA. Okrem vzorky s použitím glycerolu o koncentrácií 2 g/l nebolo v žiadnej vzorke zistené zastúpenie monoméru 4HB ani po 12 hodinách (prvý odber biomasy z kultivačnej baničky).

Z dát GC vyplýva, že najviac mol. % 4HB obsahoval kopolymér pri koncentrácií glycerolu 2 g/l. Obsah 4HB samozrejme stúpал s dobou kultivácie pri každej z koncentrácií. So stúpajúcim množstvom glycerolu vo vzorke však obsah 4HB v kopolyméri klesal, čo je dané faktom, že pre podporu syntézy tohto monoméru je vhodnejší prekurzor 1,4-butandiol. Ten bol však v každej kultivácií o rovnakej koncentrácií (4 g/l). Glycerol je naopak vhodným substrátom pre tvorbu 3HB monomérov.

Zo vzoriek rastovej krivky boli orientačne premerané aj spektrá metódou ATR-FTIR, ktoré sa následne používali pri analýze spektrálnej rady pre baktériu H1.

4.2 Meranie optickej hustoty bakteriálnych kultúr

Optická hustota narastených minerálnych médií bola zmeraná pri vlnovej dĺžke 630 nm za použitia PBS ako blanku. Vzorky boli zriedené podľa potreby na 1 ml do kremennej kvety – absorbančné hodnoty musia byť menšie 1. Kultúry s vizuálne nízkym zákalom boli riedené v menšom merítke, aby bolo naopak možné namerať absorbancie väčšie ako hodnota 0,1.

Meranie každého vzorku bolo prevedené dvakrát alebo trikrát. Vypočítala sa priemerná hodnota absorpcie, tá sa prepočítala na výslednú hodnotu a jej odchýlku. Zhrnutie všetkých výsledných hodnôt a riedení je v tabuľkách 4 až 6.

Tabuľka 4: Zhrnutie výsledkov merania optickej hustoty biomasy baktérie H1

1. sada <i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> H1				
gly+1,4BD [g/l]	Priemerná A [-]	Riedenie	Výsledná hodnota	Odchýlka [-]
2+4	0,585	10×	5,85	0,46
4+4	0,641	10×	6,41	1,59
6+4	0,824	10×	8,24	0,85
8+4	0,765	10×	7,65	1,41
20+4	0,952	10×	9,52	0,57
2. sada <i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> H1				
gly+1,4BD [g/l]	Priemerná A [-]	Riedenie	Výsledná hodnota	Odchýlka [-]
2+4	0,229	50×	11,47	3,06
4+4	0,126	50×	6,32	2,11
6+4	0,230	50×	11,50	1,20
8+4	0,210	50×	10,50	1,82
20+4	0,212	50×	10,60	6,32

Tabuľka 5: Zhrnutie výsledkov merania optickej hustoty biomasy baktérii druhu *Cupriavidus malaysiensis*

Kmeň	Typ substrátu	c substrátu [g/l]	Priemerná A [-]	Riedenie	Výsledná hodnota	Odchýlka [-]
DSM 19379	1,4-BD	8	0,924	20×	18,48	0,48
	γ-BL	8	0,913	20×	18,25	0,12
DSM 19416	1,4-BD	8	0,707	20×	14,15	0,21
	γ-BL	8	0,933	20×	18,66	0,11
DSM 25816	1,4-BD	8	0,533	20×	10,66	0,80
	γ-BL	8	0,936	20×	18,73	0,22

Tabuľka 6: Optická hustota pre *Thermomonas hydrothermalis*

<i>Thermomonas hydrothermalis</i>				
1,4BD [g/l]	Priemerná A [-]	Riedenie	Výsledná hodnota	Odchýlka [-]
8	0,211	50×	10,53	2,51

4.3 Gravimetrické stanovenie biomasy

Biomasa vzniknutá z vysušenia 10 ml bakteriálnej kultúry bola zvážená a jednotlivé triplety boli spriemerované. Vypočítala sa relatívna odchýlka a prepočítala sa hmotnosť biomasy v celkovom objeme na príslušnú koncentráciu v g/l. V prípade sady č. 1 baktérie H1 boli k dispozícii iba výsledné hodnoty biomasy vo vzorke, čo vysvetľuje absenciu odchýlok v tejto rade. Výsledky sú uvedené v tabuľkách 7 a 8.

Tabuľka 7: Prehľadné zhrnutie hmotností pripravených biomás

1. sada <i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> H1		2. sada <i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> H1		
gly+1,4BD [g/l]	Biomasa [g/l]	gly+1,4BD [g/l]	Biomasa [g/l]	Odchýlka
2+4	1,62	2+4	2,17	0,32
4+4	1,39	4+4	1,37	0,46
6+4	1,38	6+4	2,20	0,26
8+4	1,96	8+4	2,07	0,15
20+4	1,75	20+4	1,60	0,10
<i>Cupriavidus malaysiensis</i>				
Kmeň	Typ substrátu	c substrátu [g/l]	Biomasa [g/l]	Odchýlka
DSM 19379	1,4-BD	8	2,50	0,20
	γ -BL	8	5,70	0,10
DSM 19416	1,4-BD	8	7,00	0,20
	γ -BL	8	4,17	0,25
DSM 25816	1,4-BD	8	5,83	0,15
	γ -BL	8	1,33	0,32

Tabuľka 8: Výsledky merania pre *Thermomonas hydrothermalis*

<i>Thermomonas hydrothermalis</i>		
1,4-BD [g/l]	Biomasa [g/l]	Odchýlka
8	1,70	0,61

Porovnaním výsledkov zo spektrofotometrickej a gravimetrickej analýzy by mala byť potvrdená korelácia dát. To však nebolo úplne preukázané v prípade nášho merania. Napríklad v prípade baktérie H1 sa nie vždy preukázala vyššia výsledná hodnota absorbancie pri vyššom množstve biomasy v kultivácii, ako by to bolo očakávané. Naopak niektoré hodnoty pri vzorkách s vyšším obsahom biomasy mali nižšie hodnoty získané zo spektrofotometrického stanovenia oproti vzorkám s menším množstvom biomasy.

Najviac biomasy vyprodukovala baktéria *C. malaysiensis* (konkrétne kmeň 19416) na substráte 1,4-butandiol. Táto baktéria celkovo produkovala viac biomasy ako baktérie H1, čo je možné pozorovať aj na nameranej optickej hustote pre tieto kultivácie – zo všetkých pozorovaných MO boli hodnoty tejto rady najvyššie.

4.4 Výsledky plynovej chromatografie

Dôležitou analýzou, ktorá presne stanovila množstvo PHA v biomase a monomérene zastúpenie v kopolyméroch bola GC-FID. Paralelne pripravené vzorky vysušenej biomasy boli nachystané podľa návodu v kapitole 3.3.3 a podrobené analýze plynovou chromatografiou. Kalibračné krivky pre výpočet a analýzu vzoriek z GC-FID boli získané z nameraných dát štandardov a zostrojené softwarom. Za pomoci príslušných rovníc kalibračných priamok boli prevedené výpočty potrebných hodnôt. Výpočtami sa zistilo percentuálne zastúpenie zložiek 3HB a 4HB v kopolyméri a celkové množstvo PHA obsiahnutého v sušine.

Všetky výsledky a výpočty sú uvedené v tabuľkách 9 až 11. Výsledky plynovej chromatografie sú v ďalšej kapitole porovnávané s výsledkami metódy ATR-FTIR.

Tabuľka 9: Výsledky plynovej chromatografie pre kultiváciu *Thermomonas hydrothermalis*

1,4-BD [g/l]	Biomasa [g/l]	4HB v kopolyméri [mol. %]	Odchýlka 4HB	Priemer PHA [%]	Odchýlka PHA	Celkový obsah PHA v biomase [g/l]
8	1,70	81,14	5,36	23,73	6,54	0,40

Tabuľka 10: Výsledky plynovej chromatografie pre obe sady kultivácie baktérie *A. thermoaerophilus*

1. sada <i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> H1						
gly+1,4BD [g/l]	Biomasa [g/l]	4HB v kopolyméri [mol. %]	Odchýlka 4HB	Priemer PHA [%]	Odchýlka PHA	Celkový obsah PHA v biomase [g/l]
2+4	1,62	62,64	6,23	32,63	0,66	0,53
4+4	1,39	41,61	5,77	27,21	1,44	0,38
6+4	1,38	33,48	13,28	25,53	3,13	0,35
8+4	1,96	33,86	-	24,72	-	0,48
20+4	1,75	1,30	0,36	25,96	5,29	0,45
2. sada <i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> H1						
gly+1,4BD [g/l]	Biomasa [g/l]	4HB v kopolyméri [mol. %]	Odchýlka 4HB	Priemer PHA [%]	Odchýlka PHA	Celkový obsah PHA v biomase [g/l]
2	2,17	64,66	4,55	38,94	1,96	0,84
4	1,37	6,66	1,03	34,58	3,63	0,47
6	2,20	7,81	8,94	38,04	6,52	0,84
8	2,07	0,79	0,12	47,20	1,80	0,98
20	1,60	0,78	0,11	40,04	5,24	0,64

Tabuľka 11: Výsledky plynovej chromatografie pre vzorky baktérie *C. malaysiensis*

Kmeň	Subs. $c = 8$ g/l	Biomasa [g/l]	4HB v kopolyméri [mol. %]	Odch. 4HB	Priemer PHA [%]	Odch. PHA	Celkový obsah PHA v biomase [g/l]
CM 19379	1,4-BD	2,50	18,22	2,02	30,81	1,51	0,77
	γ -BL	5,70	9,38	0,07	53,95	21,54	3,08
CM 19416	1,4-BD	7,00	15,73	1,27	19,17	1,55	1,34
	γ -BL	4,17	9,62	0,23	40,95	3,77	1,71
CM 25816	1,4-BD	5,83	7,65	0,18	12,19	0,29	0,71
	γ -BL	1,33	9,59	0,16	42,79	4,09	0,57

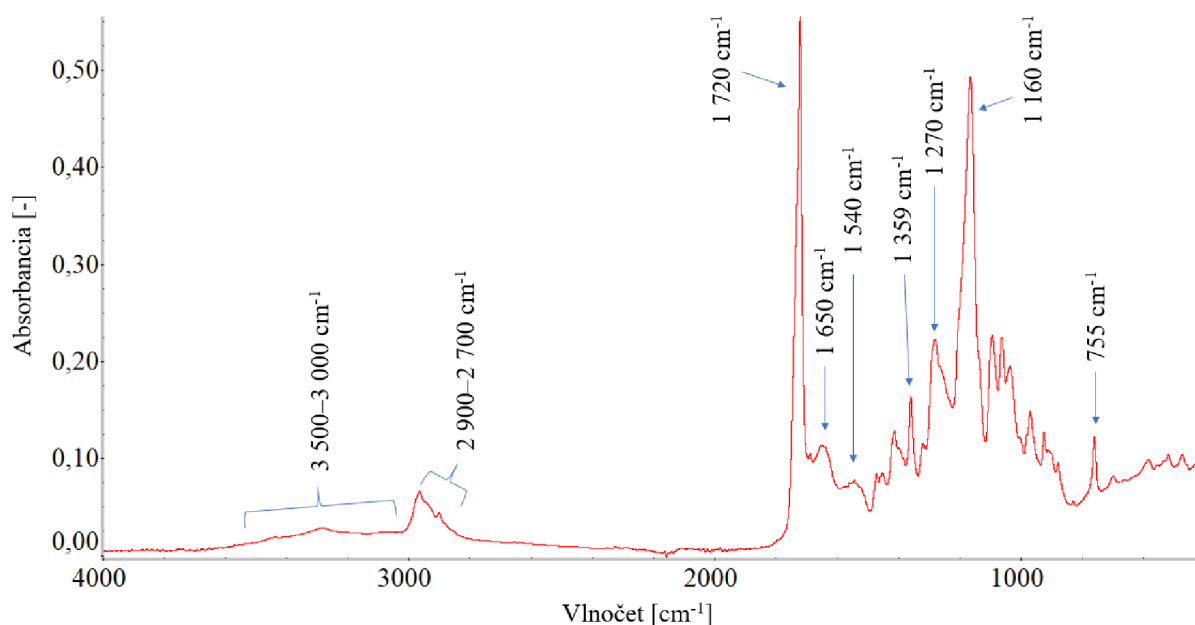
Z výsledkov plynovej chromatografie vyplýva, že pre baktériu H1 so zvyšujúcou sa koncentráciou glycerolu vo vzorke množstvo monoméru 4HB klesá (rovnako ako pri rastovej krivke vytvorenej pre tento mikroorganizmus). Najväčší podiel mol. % 4HB bolo pozorované v baktérii *Thermomonas hydrothermalis*. *Cupriavidus malaysiensis* obsahoval v kopolyméri väčšie množstvá 4HB vo vzorkách využívaných substrát γ -butyrolakton.

4.5 Výsledky vybranej metódy vibračnej spektroskopie ATR-FTIR

Metódou ATR-FTIR sa sledovali vibračné stavy molekúl a charakteristické pásy pre IČ polyhydroxyalkanoátov. Sušenú biomasu nebolo treba pred analýzou na ATR kryštáli nijak upravovať. Konkrétne pásy a píky pre spracovanie boli identifikované a vybrané podľa predchádzajúcich štúdií (viď kapitola 2.3) a tiež vizuálneho zhodnotenia nameraných spektier.

4.5.1 Opis spektra a charakterizácia vybraných píkov pre analýzu PHA v biomase

Identifikácia píkov a oblastí spektra bola teda prvým krokom k úspešnej analýze vzoriek FTIR. Na obrázku č. 19 máme príklad spektra biomasy obsahujúcej kopolymér P(3HB-co-4HB). Je to spektrum vzorky z merania druhej sady biomás získaných kultiváciou baktérie H1 (konc. glycerolu je 2 g/l). Z výsledkov plynovej chromatografie vieme, že vzorka obsahuje vyššiu frakciu monoméru 4HB.



Obrázok č. 19: ATR-FTIR spektrum vybranej vzorky o koncentrácii glycerolu 2 g/l z druhej kultivačnej sady H1

V spektre je v rozpätí 3 500–3 000 cm^{-1} pozorovaný pomerne široký pás, v prípade referenčnej vzorky s nízkou intenzitou absorpcie. V týchto oblastiach nastávajú vibrácie väzieb skupín O-H. Šírka pásu by mohla nasvedčovať tomu, že sa jedná ako o viazané (tvorba vodíkových mostíkov), tak i o neviazané skupiny O-H.

Nasleduje o niečo väčší pík pri vlnových číslach 2 900–2 700 cm^{-1} . Absorbujú tu najmä metylové skupiny $-\text{CH}_3$, ale tiež skupiny $-\text{CH}_2$. Ide teda o vibráciu alifatickej väzby C-H v nenasýtených a nasýtených uhlíkovodíkoch. Pík v danom referenčnom spektre je mierny, rôzne PHA však

obsahujú tieto typy väzieb v rôznej kvantite a jeho intenzita (a aj tvar) sa v závislosti na tom môže meniť.

Najvýraznejším, a z hľadiska analýzy PHA tiež jedným z najdôležitejších pík, je pík o hodnote vlnočetu $1\,720\text{ cm}^{-1}$. Absorbancia v tejto oblasti ($1\,720\text{--}1\,740\text{ cm}^{-1}$) všeobecne prislúcha valenčným vibráciám väzby C=O rôznych karboxylových skupín. V prípade PHA sa jedná o valenčné vibrácie väzby C=O v esteroch.

Keďže boli polyhydroxyalkanoáty analyzované in-situ (bez extrakcie z biomasy), v spektrách sú viditeľné aj dva charakteristické píky pre zvyšky biomasy. V oblastiach tzv. amidu I ($1\,650\text{ cm}^{-1}$) a amidu II ($1\,540\text{ cm}^{-1}$) dochádza k vibráciám väzby N-H typických pre tieto zlúčeniny.

Od hodnôt $1\,500\text{ cm}^{-1}$ a nižšie je už pozorované typické spektrum pre polyhydroxyalkanoáty (oblasť odtlačku prsta). Dôležitý pík môžeme vidieť pri hodnote vlnočetu $1\,359\text{ cm}^{-1}$. Ten je podľa štúdie [36] charakteristický pre 4HB, takže je dobre pozorovateľný v našom spektre kopolyméru s väčším obsahom monoméru 4HB.

Celá oblasť od $1\,320\text{ cm}^{-1}$ až po $1\,100\text{ cm}^{-1}$ predstavuje naťahovanie väzieb C-O-C a C-C-O. Okrem iného sa v tejto časti spektra v našom meraní môžu vyskytovať aj vibrácie jednoduchých väzieb C-O, prislúchajúce zlúčeninám z biomasy ako sú napríklad polysacharidy či lipidy. Vzniknutý pík v oblasti $1\,270\text{ cm}^{-1}$ v prípade PHA spektra býva charakteristický pre kryštalickú formu polyméru.

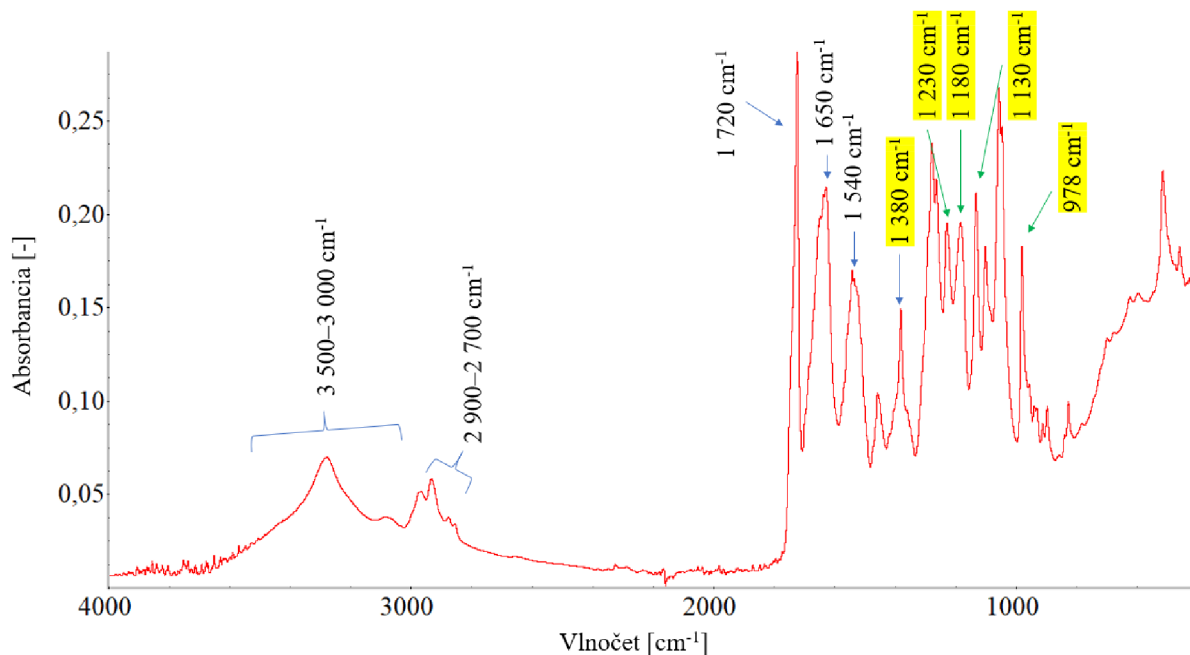
Amorfnú formu vo vzorke kopolyméru môžeme sledovať píkom o hodnote $1\,160\text{ cm}^{-1}$.

Pík 755 cm^{-1} , posledný vyznačený pík v referenčnom spektre, bol odpozorovaný v nameraných spektrách. Jeho intenzita sa vizuálne menila s typom analyzovanej vzorky a súvisí s monomérnym zložením kopolyméru P(3HB-co-4HB), a teda obsahom 3HB a 4HB.

Spektrum na obrázku č. 19 bolo popísané z hľadiska rozličných skupín a pásov charakteristických ako pre kopolymér, tak i pre biomasu, avšak je vhodné porovnať ho so spektrom homopolyméru a popísať základné rozdiely. Na obrázku č. 20 je preto príklad nameraného IČ spektra pre takýto typ vzorky. Ide o vzorku s najvyššou koncentráciou glycerolu ako substrátu (20 g/l). Podľa výsledkov z chromatografickej analýzy (Tabuľka 10: Výsledky plynovej chromatografie pre obe sady kultivácie baktérie *A. thermoaerophilus*) sa v kopolyméri tejto vzorky nachádza len veľmi malé, zanedbateľné množstvo 4HB monoméru. Vo vzorke sa teda nachádza takmer čistý homopolymér P(3HB). Na obrázku sú žltým podfarbením vyznačené píky, ktoré v predchádzajúcom spektre prislúchajúcemu kopolyméru pozorovateľné neboli.

V porovnaní so spektrom na obrázku č. 19 môžeme už na prvý pohľad vidieť rozdielne intenzity absorpcie v určitých oblastiach. Rozdielom je napríklad podstatne vyšší absorpčný pás v oblasti vibrácií väzby O-H ($3\,500\text{--}3\,000\text{ cm}^{-1}$). Nastali aj posuny pík v oblasti $2\,900\text{--}2\,700\text{ cm}^{-1}$ (viď príloha obrázok č. 32).

O prevahe 3HB monomérov vo vzorke nasvedčuje najmä vysoká intenzita píku o vlnočete $1\,380\text{ cm}^{-1}$. Ten môže poslúžiť k detekcii množstva 3HB vo vzorke a to preto, lebo ide o kývavú vibráciu (z angl. rocking) metylu, kde sa pohybujú tri atómy vodíku v $-\text{CH}_3$ smerom nahor a nadol (označované aj ako dáždnikový pohyb, z angl. umbrella effect).



Obrázok č.20: ATR-FTIR spektrum vybranej vzorky o koncentrácii glycerolu 20 g/l z 2. kultivačnej sady H1

Okrem iného sa v spektre nachádza pík $1\,230\text{ cm}^{-1}$. Ten je podobne ako pík $1\,270\text{ cm}^{-1}$ charakteristický pre kryštalickú formu. Oproti píku pre kryštalickú formu kopolyméru P(3HB-co-4HB) teda nastal posun o približne 40 cm^{-1} .

Rovnako môžeme pozorovať rozdiel medzi píkom amorfnej formy pre homopolymér a pre kopolymér. Zatiaľ čo v prípade kopolyméru sa tento pík objavil na vlnočete $1\,160\text{ cm}^{-1}$, v prípade homopolyméru na obrázku č. 20 je posunutý na hodnotu $1\,180\text{ cm}^{-1}$. Táto zmena bola taktiež pozorovaná v už spomínanej štúdií [36] a môžeme ju tiež vidieť na obrázku č. 9. Na rovnakom obrázku je možné pozorovať aj vysokú intenzitu píku o hodnote $1\,130\text{ cm}^{-1}$, ktorý bol dobre viditeľný vo vzorkách s vysokým množstvom 3HB monoméru a samozrejme sa teda nachádza aj v spektre vzorky obsahujúcej homopolymér P(3HB).

V spektre sa objavil aj pík v oblasti 978 cm^{-1} . Ten podľa jednej zo štúdií preberaných v kapitole 2.3 klesal so zvyšujúcou sa koncentráciou 4HB. V našom spektre, ktoré predstavuje homopolymér je teda veľmi intenzívny.

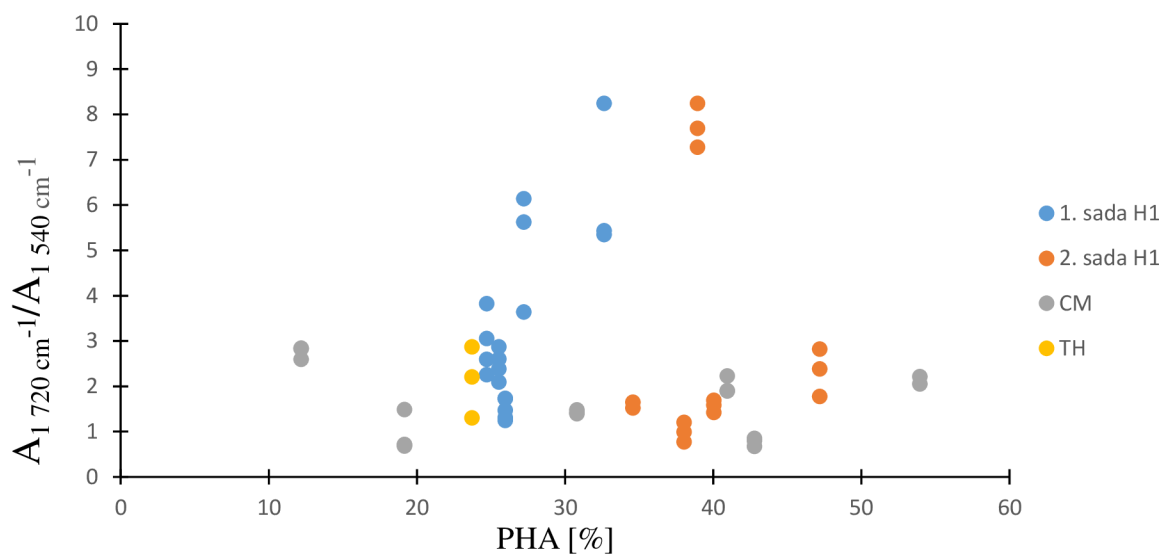
4.5.2 Využitelnosť metódy ATR-FTIR pre kvantitatívnu analýzu PHA v biomase

V rámci kvantitatívnej analýzy bola testovaná korelácia dát získaných metódou vibračnej spektroskopie ATR-FTIR s dátami získanými plynovou chromatografiou. Sledovala sa závislosť intenzity absorpcie píkov charakteristických pre prítomnosť PHA v biomase na percentuálnom obsahu PHA v biomase stanovenom metódou GC-FID. Dáta zo spektier v tomto vyhodnotení neboli priemerované, takže logicky neboli počítané ani odchýlky.

Zvolený pík o hodnote $1\,720\text{ cm}^{-1}$ prislúcha valenčnej vibrácii väzby C=O v esteroch. Druhý analyzovaný pík o vlnočete $1\,170\text{ cm}^{-1}$ podáva informáciu o prítomnosti PHA v amorfnej forme. Pomocou týchto významných pásov sa už v prechádzajúcich štúdiách sledovala daná metóda pre stanovenie kvantity polymérov, prevažne homopolyméru P(3HB) (viď kapitola 2.3)

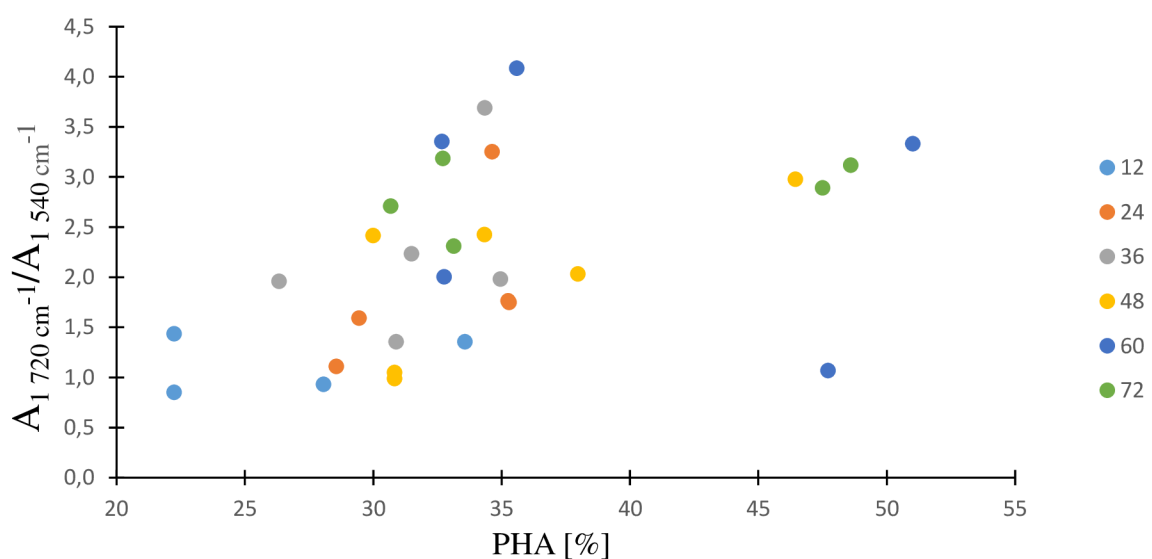
a na základe výsledkov bola potvrdená jej využiteľnosť pri stanovovaní obsahu homopolymérov akumulovaných v určitých mikroorganizmoch.

Spektra pre jednotlivé vzorky museli byť v prvom kroku korigované v dôsledku rozdielov nameranej intenzity absorpcie, ktoré môžu byť spôsobené napríklad nerovným pokrytím kryštálu vzorkou biomasy pri jednotlivých meraniach. Pre tento účel sa použila metóda normalizácie na vnútorný štandard, ktorým je pík amidu II ($1\ 540\ \text{cm}^{-1}$). Oblasť amidu II sa používa k normalizácii v prípade analýz PHA v biomase, pretože PHA v danej oblasti neabsorbujú žiarenie. Normalizované dáta boli vynesené do grafu v závislosti na percentuálnom obsahu kopolyméru P(3HB-co-4HB) v biomase.

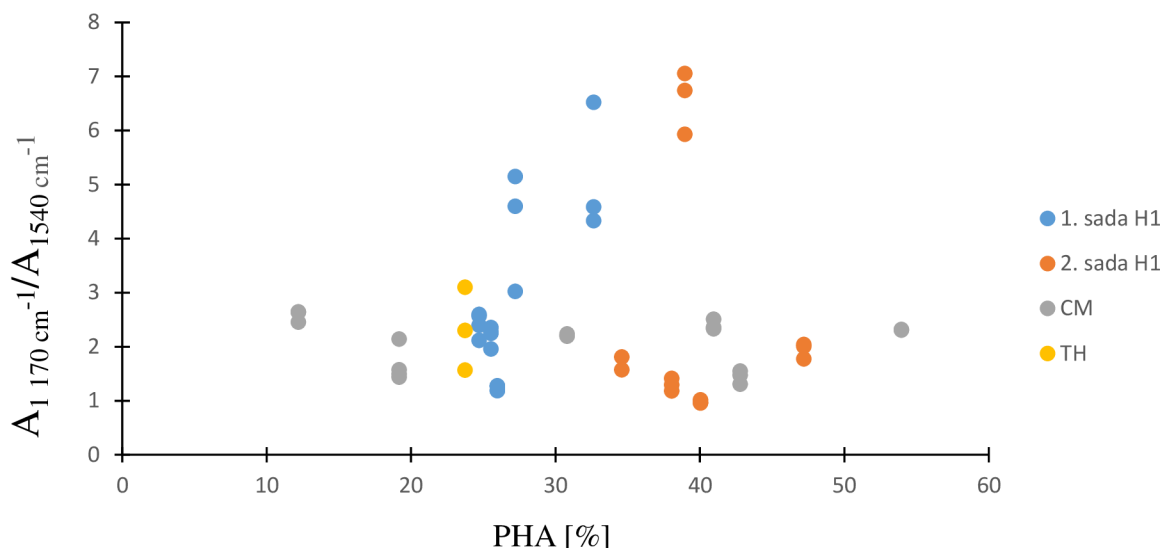


Obrázok č. 21: Závislosť normalizovaného píku $1\ 720\ \text{cm}^{-1}$ na percentuálnom obsahu polyméru v biomase pozorovaná pre všetky kultivované mikroorganizmy

Bol zostrojený aj graf rovnakej závislosti pre nameranú sadu spektier rastovej krivky.



Obrázok č. 22: Závislosť normalizovaného píku $1\ 720\ \text{cm}^{-1}$ na percentuálnom obsahu polyméru v biomase pozorovaná pre vzorky rastovej krivky baktérie H1



Obrázok č. 23: Závislosť normalizovaného píku 1 170 cm^{-1} na percentuálnom obsahu polyméru v biomase pozorovaná pre všetky kultivované mikroorganizmy

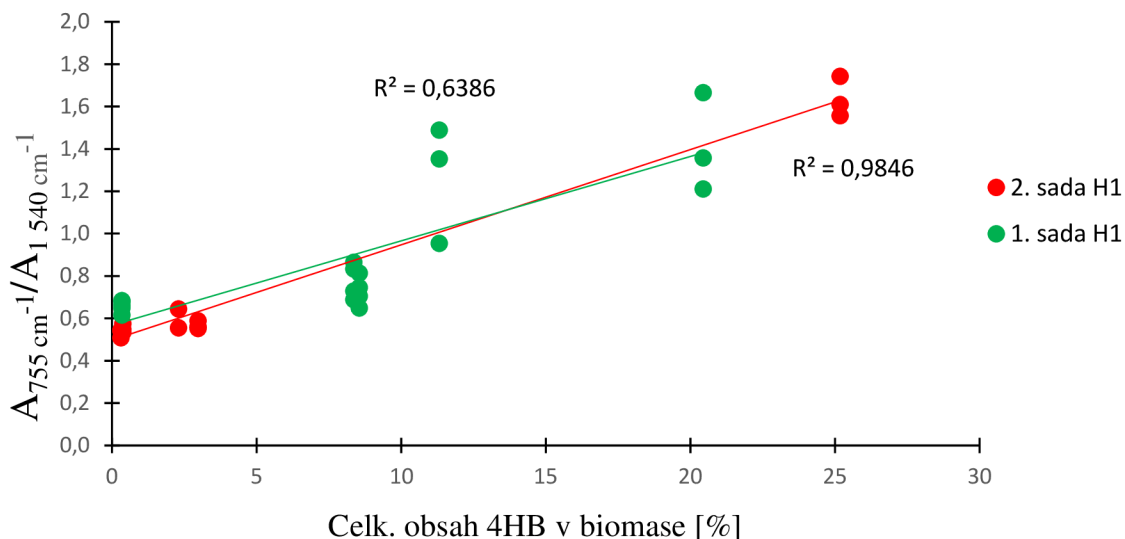
Na grafoch (obrázky č. 21 až 23) môžeme vidieť, že ani v prípade jedného mikroorganizmu obsahujúceho P(3HB-co-4HB) dáta nevykazujú lineárnu závislosť aká by bola predpokladaná na základe predchádzajúcich zistení pri štúdiu homopolymérov (2.3). Snahou bolo nájsť čiastkovú linearitu aspoň pri niektorej z baktérií. Avšak ani pri rozdelení dát na jednotlivé druhy mikroorganizmov a ich preložení lineárnou priamkou nebolo možné pozorovať koreláciu dát s dostatočne vysokým koeficientom spoľahlivosti. V tejto práci bol mikroorganizmami akumulovaný kopolymér, pri ktorom podľa našich výsledkov nemusí platiť linearita, ktorá je pozorovaná pri produkcii homopolymérov danými baktériami.

Z výsledkov tejto časti experimentu tak môžeme usúdiť, že pík 1 720 cm^{-1} nie je možné v prípade nášho merania použiť ako kvantitatívny marker pre stanovenie obsahu kopolyméru v biomase. Logicky sa teda nepreukazuje ani univerzálnosť použitia tejto analýzy pre rôzne druhy baktérií produkujúce P(3HB-co-4HB). Neosvedčil sa ani pík amorfnej formy PHA (1 170 cm^{-1}).

4.5.3 Využitelnosť metódy ATR-FTIR pre kvalitatívnu analýzu PHA v biomase

Ďalej boli pre účely kvalitatívnej analýzy sledované charakteristické pásy v IČ spektrách pre jednotlivé monoméry 3HB a 4HB. Píky pre túto časť analýzy boli zvolené na základe literatúry (viď 2.3) a tiež vizuálnych zmien naprieč nameranými spektrami vzoriek. Dáta zo spektier v tomto vyhodnotení opäť neboli priemerované.

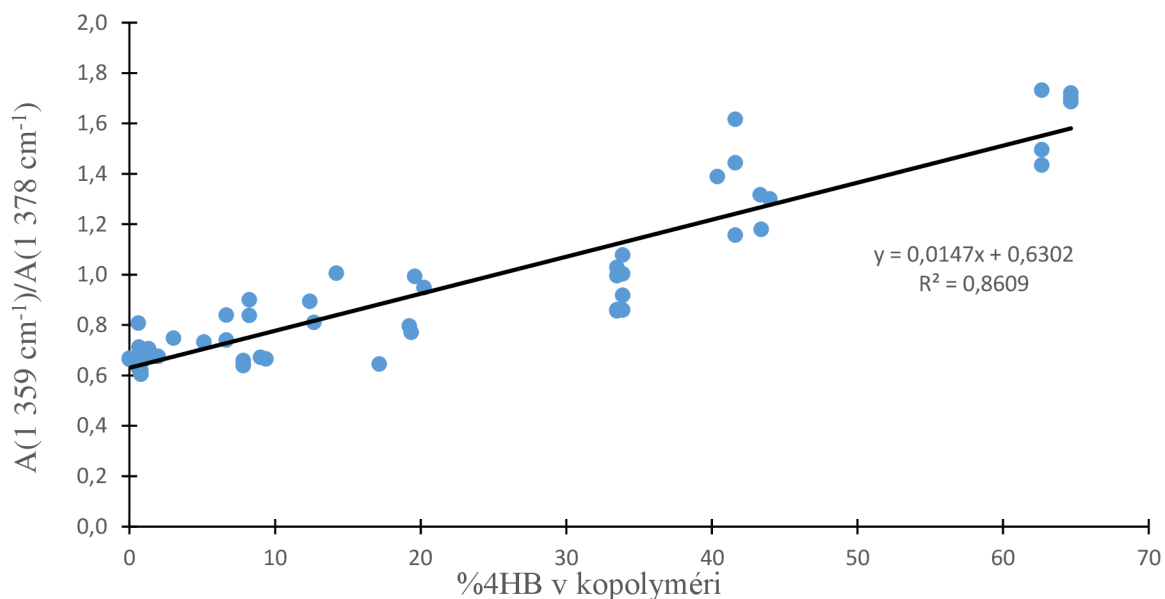
Ako prvý bol pozorovaný pík s hodnotou vlnočety 755 cm^{-1} . Ten bol zvolený na základe vizuálnej zmeny intenzity absorpcie v danej oblasti naprieč meranými spektrami (poloha píku viď obrázok č. 19). Pík bol opäť normalizovaný na amid II a závislosti pre dané mikroorganizmy vyneseny do grafu. Závislosť bola vztiahnutá na percentuálny obsah 4HB monoméru v celkovom množstve biomasy. Linearita bola nakoniec pozorovaná iba pri kopolyméri akumulovanom v baktérii H1.



Obrázok č. 24: Lineárna závislosť normalizovaného píku 755 cm^{-1} na celkovom obsahu monoméru 4HB v biomase pre kultivačné sady 1 a 2 baktérie H1

Podľa koeficientu spoľahlivosti R môžeme usúdiť, že FTIR dáta sa v tomto prípade pomerne dobre zhodujú s výsledkami GC analýzy aspoň pri kultivačnej sade č. 2 pre baktériu *Aneurinibacillus thermoaerophilus* sp. H1.

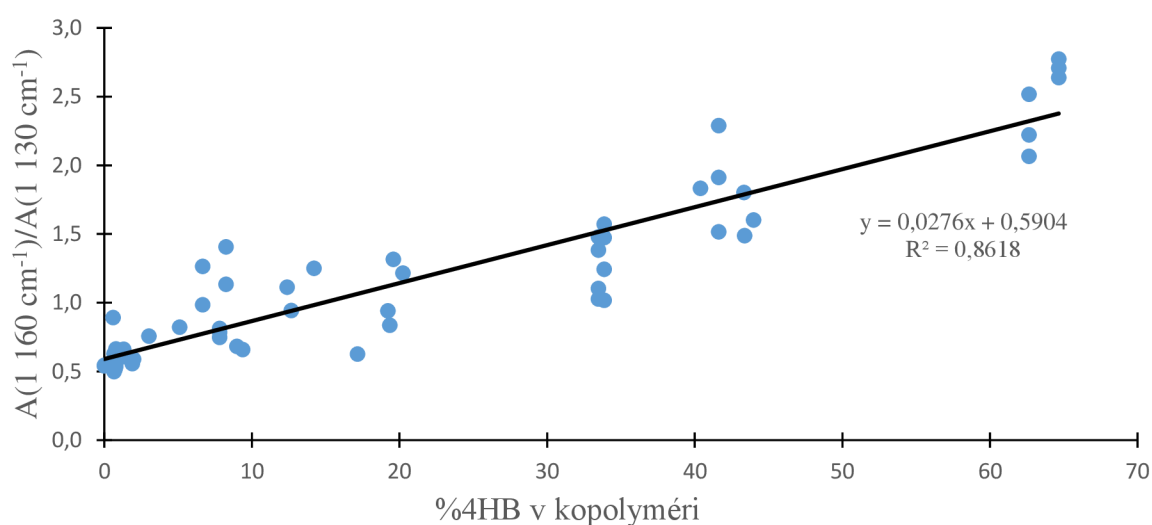
Pre podrobnejšiu analýzu boli podľa predchádzajúcej štúdie extrahovaných kopolymérov vybrané ďalšie významné píky (viď obrázky č. 9 a 10). Vybrané hodnoty sú charakteristické pre monoméry 3HB a 4HB, a tentokrát vynášané vo vzájomnom pomere v závislosti na percentuálnom zastúpení monoméru 4HB v kopolyméri. Vzhľadom k veľkému množstvu dát pre vzorky baktérie H1 oproti ostatným kultiváciám, boli nasledujúce korelácie pozorované najskôr v tomto mikroorganizme.



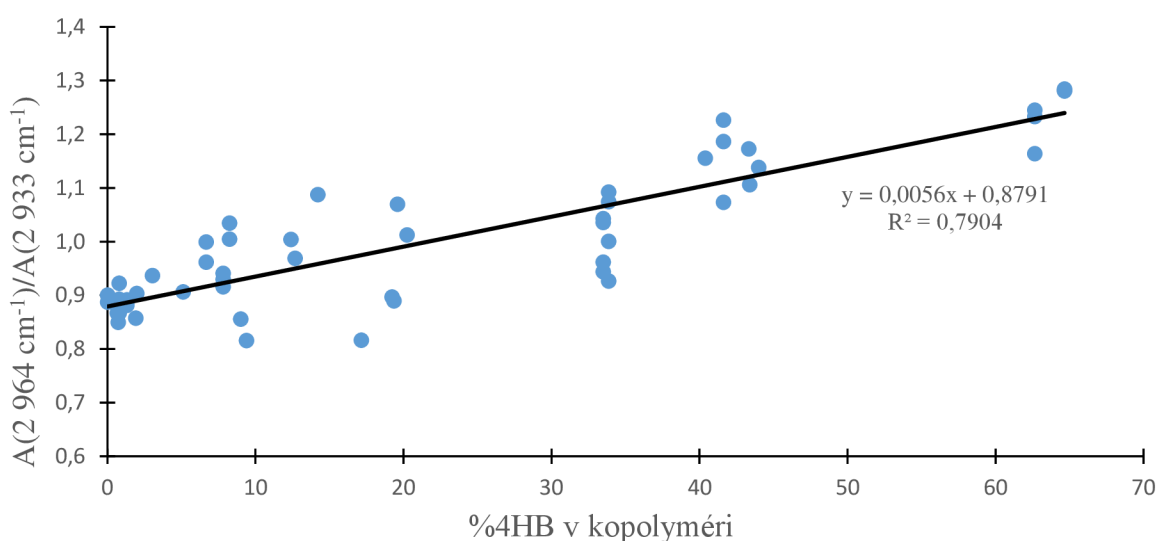
Obrázok č. 25: Graf lineárnej závislosti pomeru píkov 1359 cm^{-1} a 1378 cm^{-1} na percentuálnom zastúpení 4HB monomérovej frakcie v kopolyméri (pre baktériu H1)

Prvým sledovaným pomerom je vlnčet $1\,359\text{ cm}^{-1}$ (odpovedajúci meniacemu sa 4HB monoméru v kopolyméri) vzťahnutý ku hodnote píku $1\,378\text{ cm}^{-1}$ (pík charakteristický pre metylovú skupinu v monomére 3HB – $1\,380\text{ cm}^{-1}$), ktorých závislosť na množstve 4HB frakcie v kopolyméri môžeme vidieť na obrázku č. 25. Do grafu boli pre potreby obširnejšej analýzy okrem dvoch kultivačných sád H1 zahrnuté aj dáta z rastovej krivky pre tento mikroorganizmus. Z rovnice spoľahlivosti plynie, že korelácia dát je v celku dobrá. Pomer týchto píkov by teda mohol slúžiť ku kvalitatívnej analýze P(3HB-co-4HB) v biomase špecificky pre vybranú baktériu H1.

Rovnako boli spracované aj ďalšie zvolené pomery vlnčetov charakteristických pre 4HB či 3HB monoméru. Závislosť na obrázku č. 26 predstavuje pomer píkov, ktoré sú charakteristické pre amorfné formy PHA ($1\,160\text{ cm}^{-1}$ pre 4HB a $1\,130\text{ cm}^{-1}$ pre 3HB, viď podkapitola 4.5.1).



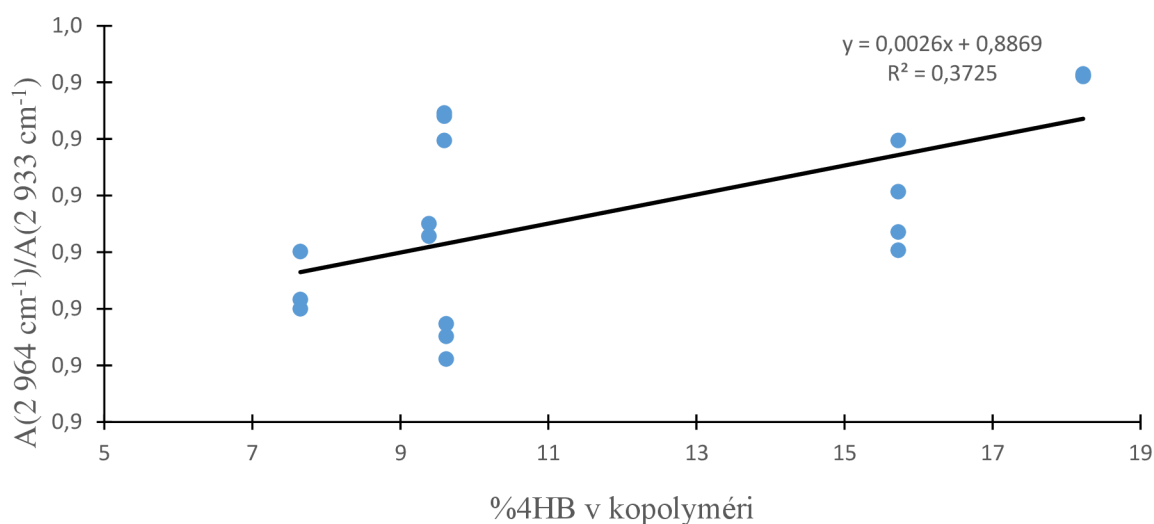
Obrázok č. 12: Graf lineárnej závislosti pomeru píkov $1\,160\text{ cm}^{-1}$ a $1\,130\text{ cm}^{-1}$ na percentuálnom zastúpení 4HB monoméru v kopolyméri (pre baktériu H1)



Obrázok č.27: Graf lineárnej závislosti pomeru píkov $2\,964\text{ cm}^{-1}$ a $2\,933\text{ cm}^{-1}$ na percentuálnom zastúpení 4HB monoméru v kopolyméri (pre baktériu H1)

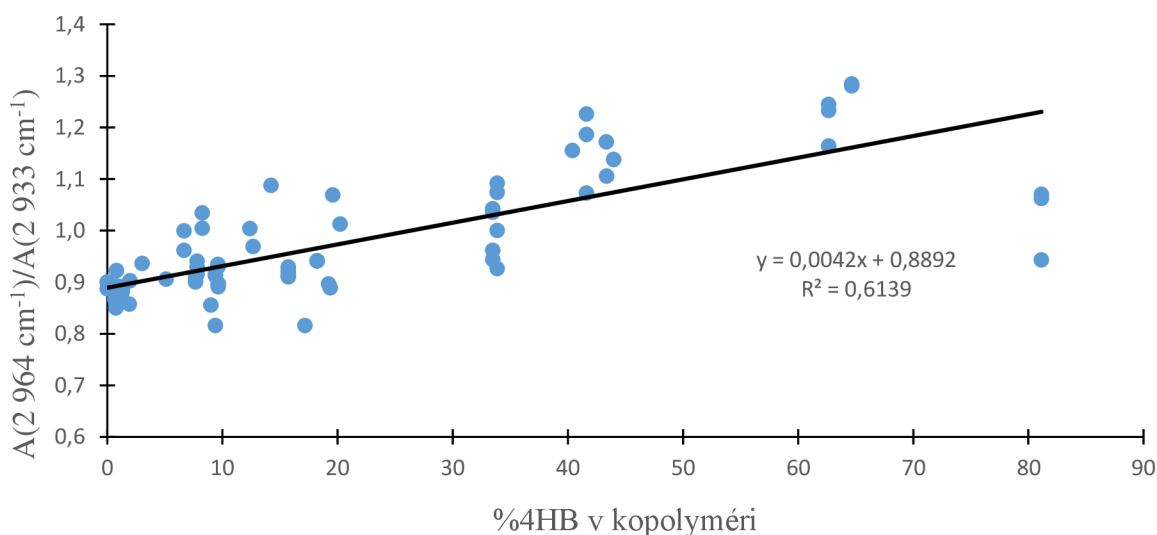
Na obrázku č. 27 je pre zmenu sledovaný pomer píkov $2\,964\text{ cm}^{-1}$ a $2\,933\text{ cm}^{-1}$ zvolených na základe štúdie (36) z obrázku č. 9, v ktorej boli preukázané zmeny intenzity absorpcie v týchto oblastiach so zmenou monoméneho zloženia kopolyméru.

Z vynesných závislostí vyplýva, že sa dáta pre baktériu H1 namerané metódou ATR-FTIR zhodujú s výsledkami z plynovej chromatografie. Koeficient spoľahlivosti naznačuje pomerne dobrú koreláciu a môžeme teda do určitej miery využiť vibračnú spektroskopiu pri kvalitatívnej analýze kopolyméru v tejto baktérii.



Obrázok č. 28: Graf lineárnej závislosti pomeru píkov $2\,964\text{ cm}^{-1}$ a $2\,933\text{ cm}^{-1}$ na percentuálnom zastúpení 4HB monoméneho frakcie v kopolyméri (pre baktériu *Cupriavidus malaysiensis*)

Snaha o aplikáciu tejto metódy bola aj pri vzorkách mikroorganizmu *Cupriavidus malaysiensis*. V tomto prípade sa však linearita nepreukázala takmer vôbec, čo môžeme vidieť aj na obrázku č. 28.

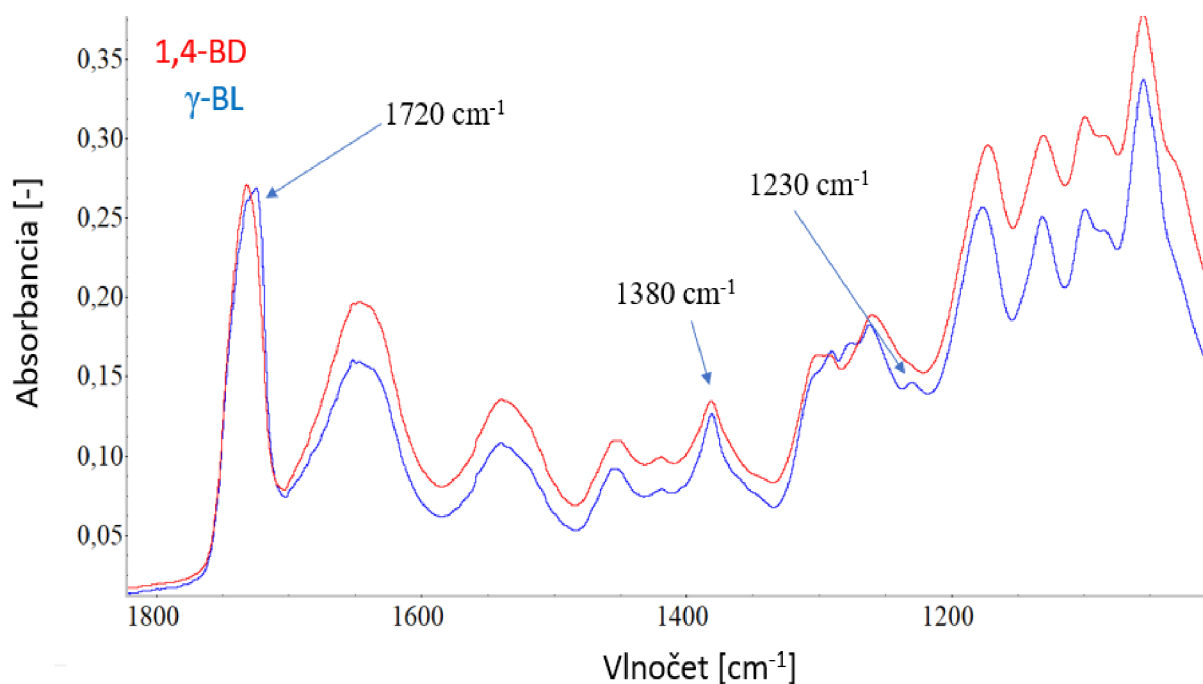


Obrázok č. 29: Graf lineárnej závislosti pomeru píkov $2\,964\text{ cm}^{-1}$ a $2\,933\text{ cm}^{-1}$ na percentuálnom zastúpení 4HB monoméneho frakcie v kopolyméri pre všetky skúmané mikroorganizmy

Ďalej bola ešte preskúmaná prípadná použiteľnosť tejto metódy naprieč viacerými druhmi mikroorganizmov. Do grafu na obrázku č. 27, boli pridané príslušné dáta pre baktérie *Cupriavidus malaysiensis* a *Thermomonas hydrothermalis*. Na obrázku č. 29 môžeme vidieť výraznejšiu odchýlku od pôvodnej linearity, ktorá platila pri baktérii H1. Zlú koreláciu potvrdzuje aj koeficient spoľahlivosti, ktorý klesol. Použitie tejto metódy pre kvalitatívnu analýzu PHA v biomase teda nie je univerzálne pre rozličných producentov kopolyméru.

Okrem porovnávania dát s výsledkami plynovej chromatografie pod kvalitatívnu analýzu PHA v biomase spadá aj vizuálne vyhodnotenie nameraných spektier IČ. Typicky sa jedná o sledovanie kryštalických a amorfných foriem PHA.

V nami nameranej sade vzoriek boli tieto dve formy pozorované na vzorkách *Cupriavidus malaysiensis* kmeňa 19379. Vzorky obsahovali pri kultivácii dva typy substrátu (vid'. kapitola 3.2.2) a ich namerané IČ spektrá sú na obrázku č. 30.



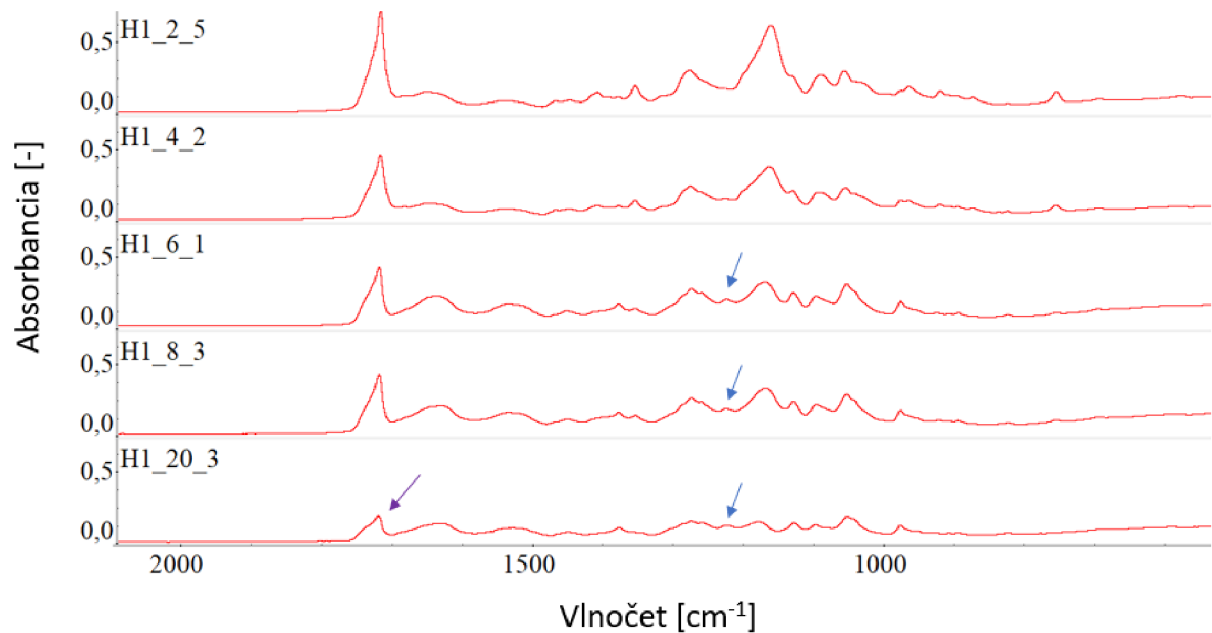
Obrázok č. 30: Spektrá dvoch rôzne kultivovaných baktérií kmeňa 19379

Základným charakteristickým znakom kryštalickej formy PHA je ohyb píku väzby C=O pre estery (1720 cm^{-1}) v FTIR spektre smerom vpravo. Vzorka baktérie narastenej na γ -butyrolaktone má oproti druhej vzorke, v ktorej bol ako substrát použitý 1,4-butandiol, tento pík v spektre mierne ohnutý na pravú stranu.

Vo vzorke sa podľa výsledkov plynovej chromatografie nachádza prevažne 3HB monomér. Jeho prítomnosť potvrdzuje aj príslušné infračervené spektrum – pík 1380 cm^{-1} charakteristický pre methyl monoméru 3HB. Keďže sme vo vzorke pozorovali prvý znak kryštalizácie vďaka esterovému píku a vidíme, že sa v nej nachádza monomér 3HB, môžeme hľadať oblasť prislúchajúcu kryštalinite 3HB monomérov. Tú predstavuje pík o hodnote 1230 cm^{-1} . Jeho intenzita je síce veľmi nízka, avšak v porovnaní s druhou vzorkou je stále viditeľný rozdiel absorbancie v danej oblasti. Vzorka biomasy s PHA pripravená kultiváciou baktérie

Cupriavidus malaysiensis za použitia substrátu γ -butyrolaktonu je teda o niečo kryštalickejšia ako vzorka s 1,4-butandiolom.

Pozorovaním spektier naprieč všetkými kultiváciami bolo týmto spôsobom zistené, že prevažná väčšina meraných biomás bola v kryštalickej forme. Na obrázku č. 31 môžeme vidieť vybrané spektrá biomasy H1 o rôznych koncentráciách glycerolu pri kultivácií. Modré šípky ukazujú na pík charakteristický pre kryštalicke P(3HB) a fialová šípka poukazuje na intenzívny ohyb píku esterovej väzby (1720 cm^{-1}) v prípade biomasy kultivovanej s najvyšším obsahom glycerolu (20 g/l).



Obrázok č. 31: IČ spektrá biomasy baktérie H1 z prvej sady o rôznych koncentráciách glycerolu ako substrátu

5 ZÁVER

Cieľom bakalárskej práce bolo vypracovanie literárnej rešerše na tému dostupných možností pre analýzu polyhydroxyalkanoátov v bakteriálnej biomase. Z metód vibračnej spektroskopie bola pre in-situ analýzu v tejto bakalárskej práci zvolená technika ATR-FTIR.

V práci boli k biosyntéze PHA využité tri rôzne druhy mikroorganizmu syntetizujúce kopolymér poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát). Vo výsledku sa tieto baktérie kultivačne líšili najmä zložením akumulovaného kopolyméru, ale aj jeho celkovým obsahom. Producenti s najväčším obsahom PHA boli tri kmene *Cupriavidus malaysiensis* využívajúce substrát γ -butyrolakton.

Kmeň *Thermomonas hydrothermalis* úspešne syntetizoval PHA iba za použitia jedného substrátu a vo výsledku z neho teda bola pripravená iba jedna vzorka, a iba o jednej koncentrácii. Nebolo preto možné sledovať koreláciu dát podobným spôsobom ako pri ďalších dvoch mikroorganizmoch. Percentuálne obsahovala vzorka *Thermomonas hydrothermalis* malé množstvo PHA v biomase (len okolo 20 %), avšak v rámci monoméreného zloženia bol P(3HB-co-4HB) v tejto biomase až z 80 % zložený z monoméru 4HB.

Pri raste koncentrácie glycerolu ako substrátu pre baktériu *Aneurinibacillus thermoaerophilus* sp. H1 klesal monomér 4HB obsiahnutý v PHA kopolyméri. To je dané faktom, že glycerol podporuje syntézu monomérnych jednotiek 3HB a prekursor pre syntézu 4HB monomérov bol v týchto vzorkách vždy v rovnakej koncentrácii. Celkovo sa však obsah polyesteru v tejto baktérii nemenil lineárne, čo bude pravdepodobne zapríčinené špecifickým mechanizmom biosyntézy P(3HB-co-4HB).

V práci sme otestovali využitie analytickej metódy ATR-FTIR pre stanovenie obsahu PHA v biomase. Vzorky pripravenej biomasy boli analyzované touto metódou, pričom jej výsledky boli porovnávané s výsledkami plynovej chromatografie. Predpokladaná korelácia dát v prípade kvantitatívnej analýzy však nebola naplnená ani u jedného druhu mikroorganizmu. Linearita závislostí dát z týchto dvoch metód bola doteraz vo väčšine mikroorganizmov pozorovaná, avšak pre vzorky obsahujúce homopolymer (prevažne P(3HB)). Po zrovnaní intenzít charakteristických píkov pre PHA ($1\ 720\ \text{cm}^{-1}$ a $1\ 170\ \text{cm}^{-1}$) s príslušnými dátami chromatografickej analýzy je predpokladané, že tieto dva píky sú ovplyvňované monoméreným zložením kopolyméru v biomase. Pík $1\ 720\ \text{cm}^{-1}$ je pravdepodobne citlivý na zložku 4HB, keďže v tejto oblasti nastáva zvýšená absorpcia vo vzorkách s vyšším obsahom tohto monoméru.

V spektrách bola v rámci kvalitatívnej analýzy pozorovaná forma v akej sa kopolymér nachádzal. V baktérii *Cupriavidus malaysiensis* bolo možné pozorovať charakteristické znaky pre kryštalické a amorfné podoby polyhydroxyalkanoátov pomocou špecifických píkov. V tejto baktérii kryštalinita závisela od typu substrátu, pričom vzorky kultivované za prítomnosti γ -butyrolaktonu boli kryštalickejšie než tie za prítomnosti 1,4-butandiolu. V prípade vzoriek biomasy z baktérie *Aneurinibacillus thermoaerophilus* sp. H1 bola väčšia pripravených vzoriek kryštalická, čo bolo taktiež vizuálne pozorované v sadách nameraných spektier.

Ďalej bola metóda využitá ku kvalitatívnej analýze vysušenej biomasy, pričom bola snaha o zistenie monoméreného zloženia P(3HB-co-4HB) priamo z biomasy a hľadaná korelácia s výsledkami GC. Píky zvolené pre túto časť analýzy boli prevažne inšpirované predchádzajúcim štúdiom extrahovaných kopolymérov danou metódou. V tejto

časti bola pozorovaná korelácia dát pri porovnávaní rozličných píkov špecifických pre monoméry 4HB a 3HB tvoriace P(3HB-co-4HB). Vo výsledku však bola preukázaná úspešná korelácia dát len vo vzorkách baktérie *Aneurinibacillus thermoaerophilus* sp. H1. Experimentom bolo potvrdené, že obsah monoméru 4HB alebo 3HB v kopolyméri je možné úspešne stanoviť využitím ATR-FTIR in-situ v biomase tejto konkrétnej baktérie. Do istej miery by z týchto dát bolo možné zistiť aj celkový obsah kopolyméru v biomase, v prípade že by bol stanovený presný obsah monoméru 3HB, a aj 4HB vo vzorke touto metódou. Vzhľadom k nepreukázanej linearite dát pre rovnako prevedenú kvalitatívnu analýzu pri baktérii *Cupriavidus malaysiensis* je potreba poznamenať, že metóda nie je univerzálna pre všetky typy sledovaných mikroorganizmov.

Na základe výsledkov tejto práce môžeme konštatovať, že je potrebné ďalej skúmať možnosti využitia ATR-FTIR pri analýze polyhydroxyalkanoátov v biomase. Je dôležité sa zamerať na efekt 4HB monoméru v danom kopolyméri pri kvantitatívnej analýze pomocou vibračnej spektroskopie. Baktéria *Aneurinibacillus thermoaerophilus* H1 je vhodným producentom tohto kopolyméru a úpravou kultivačných podmienok by bolo možné dosiahnuť vyšších obsahov PHA s rôznym monomérnym zložením. Nastavením vhodných podmienok by bolo možné využiť aj producenta *Thermomonas hydrothermalis* k tvorbe kopolyméru s vysokými obsahmi 4HB monoméru.

Ďalej by bolo vhodné použiť metódu Ramanovej spektroskopie pre získanie detailnejšej analýzy kopolymérov v biomase. Okrem toho, sa do budúcnosti metódami vibračnej spektroskopie môžu sledovať aj iné kopolyméry, obsahujúce napríklad 4-hydroxyvalerát či 3-hydroxyhexanoát.

6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] HORI, Katsutoshi, Kazuo SOGA a Yoshiharu DOI. Effects of culture conditions on molecular weights of poly(3-hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas putida* from octanoate. *Biotechnology Letters*. 1994, 16(7), 709-714. ISSN 0141-5492. Dostupné z: doi:10.1007/BF00136476
- [2] SAMEK, Ota, Stanislav OBRUČA, Martin ŠILER et al. Quantitative Raman Spectroscopy Analysis of Polyhydroxyalkanoates Produced by *Cupriavidus necator* H16. *Sensors*. 2016, 16(11). ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s16111808
- [3] ČERNAYOVÁ, D. Metody stanovení obsahu polyhydroxyalkanoátů v bakteriálních buňkách. Brno, 2018, 55 s. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
- [4] SEDLACEK, Petr, Eva SLANINOVA, Vojtech ENEV et al. What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019, 103(4), 1905-1917. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-018-09584-z
- [5] Vibrační spektroskopie. Ústav makromolekulární chemie: Akademie věd České republiky [online]. Praha [cit. 2020-04-28].
- [6] LICZKA, Jan. *Krystalizace mikrobiálních polyesterů – metody studia, biologické konsekvence*. Brno, 2019. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
- [7] PETIT, S. a J. MADEJOVA. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. Handbook of Clay Science. Elsevier, 2013, , 213-231. Developments in Clay Science. ISBN 9780080993645. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-098259-5.00009-3
- [8] MEZZINA, Mariela, Diana WETZLER, Alejandra DE ALMEIDA, Nina DINJASKI, M. PRIETO a Maria PETTINARI. A phasin with extra talents: a polyhydroxyalkanoate granule-associated protein has chaperone activity. *Environmental Microbiology*. 2015, 17(5), 1765-1776. ISSN 14622912. Dostupné z: doi:10.1111/1462-2920.12636
- [9] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Filip MRAVEC, Ota SAMEK a Ivana 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. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, 100(3), 1365-1376. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-015-7162-4
- [10] CZERNIECKA-KUBICKA, A., I. ZARZYKA a M. PYDA. Advanced analysis of poly(3-hydroxybutyrate) phases based on vibrational heat capacity. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2017, 127(1), 905-914. ISSN 1388-6150. Dostupné z: doi:10.1007/s10973-016-5903-y

- [11] SUDESH, K, H ABE a Y DOI. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*. 2000, 25(10), 1503-1555. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/S0079-6700(00)00035-6
- [12] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Vladislav KRZYZANEK et al. Accumulation of Poly(3-hydroxybutyrate) Helps Bacterial Cells to Survive Freezing. *PLOS ONE*. 2016, 11(6). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0157778
- [13] ALBUQUERQUE, Priscilla a Carolina MALAFAIA. Perspectives on the production, structural characteristics and potential applications of bioplastics derived from polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, 107, 615-625. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.09.026
- [14] SHARMA, Vibhuti, Rutika SEHGAL a Reena GUPTA. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Properties and Modifications. *Polymer*. 2021, 212. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2020.123161
- [15] KESHAVARZ, Tajalli a Ipsita ROY. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*. 2010, 13(3), 321-326. ISSN 13695274. Dostupné z: doi:10.1016/j.mib.2010.02.006
- [16] MUDENUR, Chethana, Kona MONDAL, Urvashi SINGH a Vimal KATIYAR. Production of Polyhydroxyalkanoates and Its Potential Applications. *Advances in Sustainable Polymers*. Singapore: Springer Singapore, 2019, , 131-164. *Materials Horizons: From Nature to Nanomaterials*. ISBN 978-981-32-9803-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-32-9804-0_7
- [17] VODIČKA, Juraj. Polyhydroxyalkanoáty jako metabolity prokaryot adaptovaných na extrémní prostředí. Brno, 2018. Bakalářská. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
- [18] PHILIP, S., T. KESHAVARZ a I. ROY. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. 2007, 82(3), 233-247. ISSN 02682575. Dostupné z: doi:10.1002/jctb.1667
- [19] RAZA, Zulfiqar, Shahina RIAZ a Ibrahim BANAT. Polyhydroxyalkanoates: Properties and chemical modification approaches for their functionalization. *Biotechnology Progress*. 2018, 34(1), 29-41. ISSN 87567938. Dostupné z: doi:10.1002/btpr.2565
- [20] KRUPÍČKOVÁ, Kristýna. ISOLACE, CHARAKTERIZACE A APLIKACE BIOMEDICÍNSKY VÝZNAMNÉHO POLYMERU P(3HB-co-4HB). Brno, 2020. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
- [21] DRÁBKOVÁ, Kateřina. BIOTECHNOLOGICKÁ PRODUKCE PHA POMOCÍ CUPRIAVIDUS MALAYSIENSIS. Brno, 2019. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

- [22] KIM, Jin, Bong LEE a Beom KIM. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Ralstonia eutropha*. *Biochemical Engineering Journal*. 2005, 23(2), 169-174. ISSN 1369703X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2005.01.016
- [23] ALVES, Marta, Fred RAINEY, M. NOBRE a Milton DA COSTA. *Thermomonas hydrothermalis* sp. nov., A New Slightly Thermophilic γ -Proteobacterium Isolated from a Hot Spring in Central Portugal. *Systematic and Applied Microbiology*. 2003, 26(1), 70-75. ISSN 07232020. Dostupné z: doi:10.1078/072320203322337335
- [24] AL-DAGHISTANI, Hala, Balsam MOHAMMAD, Tonni KURNIAWAN et al. Characterization and applications of *Thermomonas hydrothermalis* isolated from Jordan's hot springs for biotechnological and medical purposes. *Process Biochemistry*. 2021, 104, 171-181. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2021.03.010
- [25] PERNICOVA, Iva, Ivana NOVACKOVA, Petr SEDLACEK et al. Introducing the Newly Isolated Bacterium *Aneurinibacillus* sp. H1 as an Auspicious Thermophilic Producer of Various Polyhydroxyalkanoates (PHA) Copolymers–1. Isolation and Characterization of the Bacterium. *Polymers*. 2020, 12(6). ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym12061235
- [26] RAMACHANDRAN, Hema, Nur SHAFIE, Kumar SUDESH, Mohamad AZIZAN, Mohamad MAJID a Al-Ashraf AMIRUL. Correction to: *Cupriavidus malaysiensis* sp. nov., a novel poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) accumulating bacterium isolated from the Malaysian environment. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2018, 111(4), 637-637. ISSN 0003-6072. Dostupné z: doi:10.1007/s10482-017-0998-0
- [27] VŠCHT - Reflekační techniky [online]. [cit. 2021-06-20]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/lms/Zverze/IR/Atr.htm>
- [28] GRDADOLNIK, Jože. ATR-FTIR SPECTROSCOPY: ITS ADVANTAGES AND LIMITATIONS. *Acta Chim. Slov.* 2002, (49), 631642.
- [29] KUSAKA, S., H. ABE, S. LEE a Y. DOI. Molecular mass of poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] produced in a recombinant *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1997, 47(2), 140-143. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s002530050902
- [30] CHAI, Jun, Tan AMELIA, Govindan MOURIYA, Kesaven BHUBALAN, Al-Ashraf AMIRUL, Sevakumaran VIGNESWARI a Seeram RAMAKRISHNA. Surface-Modified Highly Biocompatible Bacterial-poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate): A Review on the Promising Next-Generation Biomaterial. *Polymers*. 2021, 13(1). ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym13010051
- [31] WILLIAMS, Simon, Said RIZK a David MARTIN. Poly-4-hydroxybutyrate (P4HB): a new generation of resorbable medical devices for tissue repair and regeneration. *Biomedizinische Technik/Biomedical Engineering*. 2013, 58(5). ISSN 1862-278X. Dostupné z: doi:10.1515/bmt-2013-0009

- [32] DE GELDER, Joke, Diana WILLEMSE-ERIX, Maarten SCHOLTES et al. Monitoring Poly(3-hydroxybutyrate) Production in *Cupriavidus necator* DSM 428 (H16) with Raman Spectroscopy. *Analytical Chemistry*. 2008, 80(6), 2155-2160. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac702185d
- [33] CIOBOTĂ, Valerian, Eva-Maria BURKHARDT, Wilm SCHUMACHER, Petra RÖSCH, Kirsten KÜSEL a Jürgen POPP. The influence of intracellular storage material on bacterial identification by means of Raman spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010, 397(7), 2929-2937. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-010-3895-1
- [34] PORTER, Michael a Jian YU. Monitoring the in situ crystallization of native biopolyester granules in *Ralstonia eutropha* via infrared spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods*. 2011, 87(1), 49-55. ISSN 01677012. Dostupné z: doi:10.1016/j.mimet.2011.07.009
- [35] VERLINDEN, R.A.J., D.J. HILL, M.A. KENWARD, C.D. WILLIAMS a I. RADECKA. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*. 2007, 102(6), 1437-1449. ISSN 1364-5072. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x
- [36] TSUGE, Takeharu. Metabolic improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2002, 94(6), 579-584. ISSN 13891723. Dostupné z: doi:10.1016/S1389-1723(02)80198-0
- [37] LEE, Wing-Hin, Mohd AZIZAN a Kumar SUDESH. Effects of culture conditions on the composition of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Comamonas acidovorans*. *Polymer Degradation and Stability*. 2004, 84(1), 129-134. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2003.10.003
- [38] ELBANNA, Khaled, Tina LTKE-EVERSLOH, Dieter JENDROSSEK, Heinrich LUFTMANN a Alexander STEINBCHEL. Studies on the biodegradability of polythioester copolymers and homopolymers by polyhydroxyalkanoate (PHA)-degrading bacteria and PHA depolymerases. *Archives of Microbiology*. 2004, 182(2-3). ISSN 0302-8933. Dostupné z: doi:10.1007/s00203-004-0715-z
- [39] REDDY, C.S.K, R GHAI, RASHMI a V.C KALIA. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*. 2003, 87(2), 137-146. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/S0960-8524(02)00212-2
- [40] LEE, Sang a Jong-il CHOI. Production and degradation of polyhydroxyalkanoates in waste environment. *Waste Management*. 1999, 19(2), 133-139. ISSN 0956053X. Dostupné z: doi:10.1016/S0956-053X(99)00005-7
- [41] PERNICOVÁ, Iva. Identifikace a izolace PHA produkujících bakterií. Brno, 2021. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

- [42] BEDNÁROVÁ, Kristína. PRODUKCE POLYESTERŮ POMOCÍ EXTREMOFILNÍCH BAKTERIÍ. Brno, 2020. Bakalářská. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
- [43] CHING YEE, Loo a Sudesh KUMAR. Polyhydroxyalkanoates: Bio-based microbial plastics and their properties. *Malaysian Polymer Journal (MPJ)*. 2007, (2), 31-57.
- [44] TIAN, Jiamin, Anthony SINSKEY a JoAnne STUBBE. Kinetic Studies of Polyhydroxybutyrate Granule Formation in *Wautersia eutropha* H16 by Transmission Electron Microscopy. *Journal of Bacteriology*. 2005, 187(11), 3814-3824. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.187.11.3814-3824.2005
- [45] Infračervená spektroskopie. VŠCHT [online]. Praha [cit. 2021-07-27]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/lms/Zverze/Infrared.htm>
- [46] Identifying functional groups. Oregon State University [online]. 2019 [cit. 2021-07-27]. Dostupné z: <http://sites.science.oregonstate.edu/~gablek/CH335/Chapter10/IR.htm>
- [47] MACHOVIČ, Vladimír a František NOVÁK. DIFUZNĚ-REFLEXNÍ INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE PŮDNÍCH BITUMENŮ Z OBLASTI ŠUMAVY. *Chemické listy*. 1998, 1998(92), 151-156.
- [48] FTIR sample techniques - diffuse reflectance (DRIFT). ThermoFisher [online]. [cit. 2021-07-27]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-sample-handling-techniques/ftir-sample-handling-techniques-diffuse-reflectance-drifts.html>
- [49] KBr (Potassium Bromide). Tydex [online]. [cit. 2021-07-27]. Dostupné z: http://www.tydexoptics.com/materials1/for_transmission_optics/kbr/
- [50] MORAVEC, Zdeněk a Veronika KOŠAŘOVÁ. Molekulová spektroskopie. In: Science MUNI [online]. [cit. 2021-07-27]. Dostupné z: <https://www.sci.muni.cz/chemsekce/frvs2011/pdf/mol-spec.pdf>
- [51] RAMACHANDRAN, Hema, Nur SHAFIE, Kumar SUDESH, Mohamad AZIZAN, Mohamad MAJID a Al-Ashraf AMIRUL. *Cupriavidus malaysiensis* sp. nov., a novel poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) accumulating bacterium isolated from the Malaysian environment. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2018, 111(3), 361-372. ISSN 0003-6072. Dostupné z: doi:10.1007/s10482-017-0958-8

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

1,4-BD – 1,4-butandiol

3HB – 3-hydroxybutyrát

4HB – 4-hydroxybutyrát

ATR-FTIR – Infračervená spektroskopia s využitím Fourierovej transformácie a metódy úplného zoslabeného odrazu (Attenuated total reflectance)

baktéria H1 – *Aneurinibacillus thermoaerophilus* H1

CM – *Cupriavidus malaysiensis*

GC-FID – Plynová chromatografia s plameňovým ionizačným detektorom

gly – glycerol

P(3HB) – poly(3-hydroxybutyrát)

P(3HB-co-4HB) – poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát)

P(4HB) – poly(4-hydroxybutyrát)

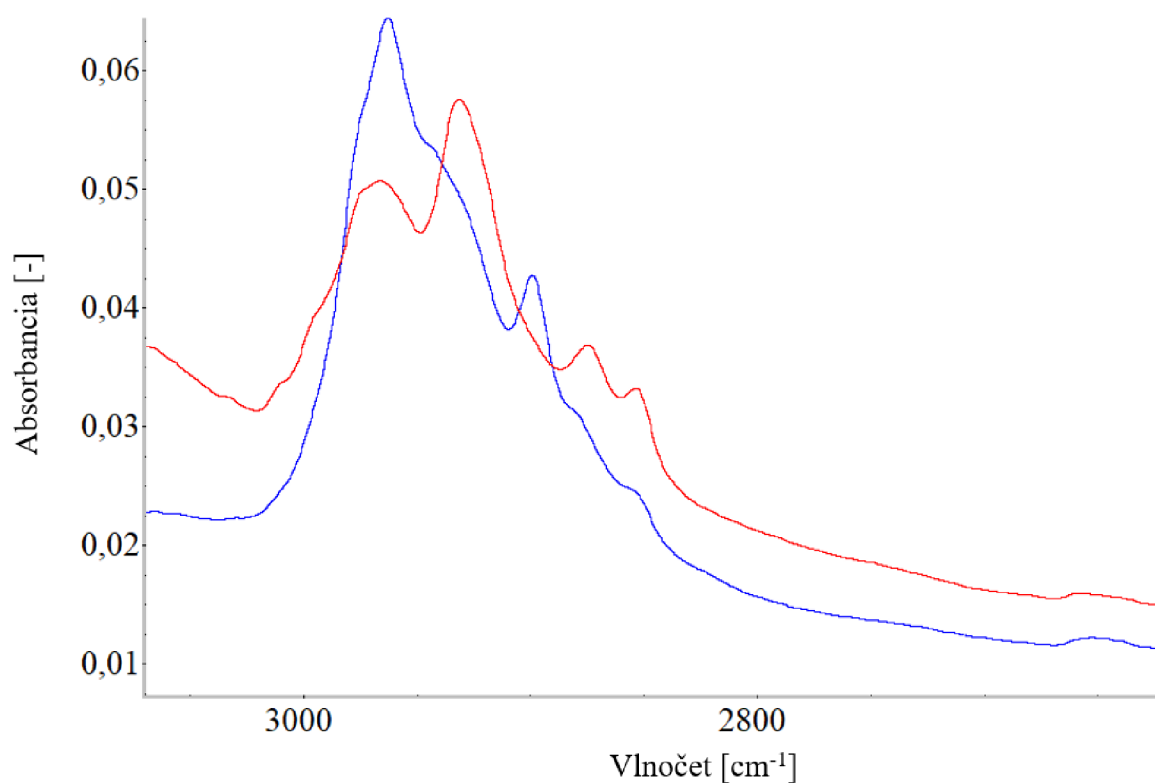
PGA – polyglykolid

PHA – polyhydroxyalkanoát/y

TH – *Thermomonas hydrothermalis*

γ -BL/g-BL – γ -butyrolakton

8 PRÍLOHY



Obrázok č. 32: Posuny píkov v oblasti 2 900–2 700 cm^{-1} , predstavuje zmenu v pomere skupín $-\text{CH}_3$ a $-\text{CH}_2$ pri rozdielnych podmienkach kultivácie a teda rozdielnych pomeroch 3HB a 4HB