



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

Evoluční a genové inženýrství bakteriálních producentů polyhydroxyalkanoátů

Evolutionary and genetic engineering of bacterial producers of polyhydroxyalkanoates

DISERTAČNÍ PRÁCE

Doctoral thesis

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Ivana Nováčková

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

prof. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

ŠKOLITEL SPECIALISTA

Consultant

prof. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání dizertační práce

Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií Akademický rok: 2022/23
Studentka: **Ing. Ivana Nováčková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie
Vedoucí práce: **prof. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**

Název dizertační práce:

Evoluční a genové inženýrství bakteriálních producentů polyhydroxyalkanoátů

Zadání dizertační práce:

1. Evoluční inženýrství PHA produkujících bakterií – adaptace bakterií na vybrané stresory, studium získaných kmenů
2. Genové inženýrství PHA produkujících bakterií – zavedení a optimalizace metod
3. Využití získaných kmenů pro biotechnologickou produkci PHA
4. Vývoj alternativního způsobu izolace PHA z mikrobiálních buněk

Termín odevzdání dizertační práce: 7.3.2023:

Ing. Ivana Nováčková
studentka

prof. Ing. Stanislav Obruča,
Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.3.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Předložená disertační práce se zabývá tematikou evolučního a genového inženýrství bakteriálních producentů polyhydroxyalkanoátů (PHA). Vyjma tato témata přímo související s názvem práce je rozvinuta o problematiku biotechnologické produkce PHA na modelových hydrolyzátech lignocelulosové biomasy s využitím extrémofilních mikroorganismů a dále o vývoj alternativního způsobu izolace PHA. Rozvíjející témata přitom volně navazovala na předchozí experimenty a reflektovala aktuálně řešené projekty na pracovišti. Disertační práce je vypracovaná formou komentované diskuse publikovaných prací, které jsou její součástí ve formě příloh. Evoluční inženýrství bylo aplikováno především na modelový PHA produkující bakteriální kmen *Cupriavidus necator* H16. Adaptací na kyselinu levulovou byly získány izoláty produkující kopolymer P(3HB-co-3HV) s vyšším zastoupením frakce 3HV, což vede ke zlepšení vlastností polymeru pro další zpracování. Stejně tak i růst kultur a množství celkových PHA v biomase bylo vyšší. Dlouhodobou adaptací téhož kmene na osmotický stres a přítomnost měďnatých iontů byly získány izoláty charakterizované v rámci druhé publikace. Ze získaných dat bylo možné pozorovat rozdíly v adaptačním procesu, kdy adaptace na osmotický stres byla postupná, zatímco u mědi byl pozorován výrazný skok nárůstu biomasy a PHA signalizující rychlou adaptaci. Na základě analýz byla diskutována významná úloha PHA při adaptaci kmene *C. necator* H16 na testované stresory, která nespočívala pouze v nárůstu množství polymeru v biomase, nicméně v posílení celého cyklu, což vede také ke zvýšení poolu monomerních jednotek vykazujících protektivní účinky. Adaptací na ϵ -kaptolakton, unikátní prekurzor 4HB, byl získán kopolymer P(3HB-co-4HB). Jeho vlastnosti jsou opět výhodnější než u homopolymeru P(3HB), a to už při nízkém zastoupení 4HB, kterého jsme dosáhli také v laboratorním bioreaktoru. Dalšího navýšení frakce 4HB by mohlo být dosaženo s využitím delečních mutantů s absencí relevantních genů, jež byly více diskutovány. Produkce PHA na modelech hydrolyzátů lignocelulosové biomasy pocházející například z potravinářství byla testována v kombinaci s využitím extrémofilních producentů, kdy byla diskutována preference obsažených monosacharidů (hexos, pentos) pro jednotlivé producenty. Pro přiblížení se reálným hydrolyzátům byla testována také odolnost kmenů vůči relevantním potenciálním mikrobiálním inhibitorům. Náchylnosti halofilních a termofilních producentů PHA k osmotickému namáhání bylo využito při vývoji alternativního izolačního přístupu, který by snížil ekonomickou i ekologickou zátěž celého procesu oproti standardní extrakci využívající chlorovanou rozpouštědla. Aplikací detergentu SDS v nízkých koncentracích při současném temperaci při vyšších teplotách vedla k zisku polymeru vysoké čistoty současně bez ztráty výtěžku. Dále se nabízí možnost recyklace využitého SDS.

KLÍČOVÁ SLOVA

Evoluční inženýrství; genové inženýrství; polyhydroxyalkanoáty (PHA); extrémofilní mikroorganismy; izolace PHA; SDS

ABSTRACT

This doctoral thesis deals with the topic of evolutionary and genetic engineering of polyhydroxyalkanoates (PHA) producing bacteria. Apart from these topics, the issue of biotechnological production of PHA on model hydrolysates of lignocellulosic biomass with the use of extremophilic microorganisms is also studied, as well as the development of an alternative method of PHA isolation. The themes were freely linked to previous experiments and reflected the currently solved projects in a working group. Doctoral thesis is prepared in the form of a commented discussion of published works, which are part of it in the form of appendices. Evolutionary engineering was mainly applied to the model PHA producing bacterial strain *Cupriavidus necator* H16. By adaptation to levulinic acid, isolates producing copolymer P(3HB-*co*-3HV) with a higher content of the 3HV fraction were obtained, which leads to improved properties of the polymer for further processing. As well as culture growth also the amount of total PHA in the biomass was higher. By long-term adaptation of the same strain to osmotic stress and the presence of copper ions, the isolates which are characterized in the second publication, were obtained. Based on obtained data, it was possible to observe differences in the adaptation process, where the adaptation to osmotic stress was gradual, while a significant step in the increase of biomass and PHA signaling faster adaptation was observed for copper. Based on the analyses, the significant role of PHA in the adaptation of the *C. necator* H16 strain to the tested stressors was discussed, it did not consist only in the increase in the amount of polymer in the biomass, but also in enhancement of whole PHA cycle, which also leads to an increase of the pool of monomeric units showing protective functions. By adaptation to ϵ -caprolactone, a unique precursor of 4HB, the copolymer P(3HB-*co*-4HB) was obtained. The properties of this copolymer are again more favorable than of the homopolymer P(3HB), even with a low content of 4HB, which we also achieved in a laboratory bioreactor. A further increase in the 4HB fraction could be achieved using deletion mutants with the absence of relevant genes, which is discussed more in the text. The production of PHA on models of lignocellulosic biomass hydrolysates originating from, for example, the food industry was tested in combination with the use of extremophile producers, when the preference of the contained monosaccharides (hexoses, pentoses) for individual producers was discussed. For the purpose to get closer to real hydrolysates, the resistance of the strains to relevant potential microbial inhibitors was also tested. The susceptibility of halophilic and thermophilic PHA producers to osmotic stress was used in the development of an alternative isolation approach that would reduce the economic and ecological burden of the process compared to standard extraction using chlorinated solvents. Application of SDS detergent at low concentrations while simultaneously exposing the cells to higher temperatures led to the gain of high purity polymer without loss of yield. The recycling process of used SDS is also a possibility.

KEY WORDS

Evolutionary engineering; genetic engineering; polyhydroxyalkanoates (PHA); extremophilic microorganisms; isolation of PHA; SDS

NOVÁČKOVÁ, Ivana. Evoluční a genové inženýrství bakteriálních producentů polyhydroxyalkanoátů. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/152653>. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Stanislav Obruča.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především panu prof. Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D. za odborné vedení disertační práce, a také za jeho ochotu, pomoc, odborné konzultace a podporu při vypracování práce i po celou dobu studia. Děkuji také svému školiteli specialistovi paní prof. Ing. Adriáně Kovalčíkové, Ph.D.. Velký dík patří rovněž všem kolegyním a kolegům z pracovního týmu za spolupráci v laboratoři a vždy pohodovou a přátelskou atmosféru. V neposlední řadě bych pak za podporu a důvěru také ráda poděkovala své rodině, příteli a blízkým.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Postavení mikrobiální buňky v biotechnologiích	9
2.1.1	Stresová odpověď mikroorganismů	9
2.1.2	Mechanismy stresové odpovědi mikroorganismů.....	10
2.1.3	Zlepšení charakteristik mikrobiálních producentů	11
2.2	Evoluční inženýrství.....	12
2.2.1	Vývoj metodiky evolučního inženýrství	12
2.2.2	Princip metodiky evolučního inženýrství.....	13
2.2.3	Metody analýzy adaptovaných kmenů	18
2.2.4	Aplikace evolučního inženýrství	19
2.3	Genové inženýrství.....	20
2.3.1	Vývoj technik genového inženýrství.....	20
2.3.2	Princip a provedení experimentů genového inženýrství	21
2.3.3	Aplikovatelnost technik genového inženýrství	24
2.4	Polyhydroxyalkanoáty	25
2.4.1	Výskyt, vlastnosti a složení PHA	25
2.4.2	Možnosti analýzy PHA	27
2.4.3	Biosyntéza PHA	29
2.4.4	Degradace PHA.....	31
2.4.5	Scale-up biotechnologické produkce PHA	31
2.4.6	Využití GMO pro produkci PHA	33
3	CÍLE PRÁCE	36
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	37
4.1	Evoluční inženýrství producentů PHA	38
4.1.1	Adaptace <i>C. necator</i> H16 na kyselinu levulovou.....	38
4.1.2	Dlouhodobá adaptace kmene <i>C. necator</i> H16 na biotechnologicky relevantní stresory	47
4.1.3	Produkce kopolymeru P(3HB-co-4HB) pomocí <i>C. necator</i> H16	63
4.2	Využití extrémofilů pro biotechnologickou produkci PHA	74
4.3	Ekologická izolace PHA z extrémofilních producentů	82
5	ZÁVĚR.....	92

6	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	95
7	LITERATURA.....	97
8	ŽIVOTOPIS	117
9	PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORKY.....	118
10	SEZNAM PŘÍLOH A PODÍL AUTORKY NA PUBLIKACÍCH	124
11	PŘÍLOHY.....	126
	11.1 Příloha I.....	126
	11.2 Příloha II.....	137
	11.3 Příloha III	151
	11.4 Příloha IV	157
	11.5 Příloha V.....	163
	11.6 Příloha VI.....	189

1 ÚVOD

Mikroorganismy jsou neustále vystaveny působení stresu, a to jak při biotechnologických procesech, tak i v jejich přirozeném prostředí. Stres, de facto představující posun jakéhokoliv relevantního parametru mimo optimum, slouží jako hnací krok evoluce. Bez působení vnějšího tlaku by totiž organismy neměly potřebu se v rámci adaptačního procesu vyvíjet. U mikroorganismů je stres doprovázený adaptací téměř neustávající záležitostí, což vede ke zvýšení jejich variability oproti složitějším organismům, které adaptují podstatně pomaleji. V případě, že je organismus neschopný se na často se měnící podmínky adaptovat, dochází po nějakém čase k jeho úhynu. Pro biotechnologické procesy jsou zapotřebí dostatečně odolné mikrobiální kmeny s dobrými produkčními vlastnostmi, které je možné získat pomocí řady technik.

Jeden z možných přístupů, evoluční inženýrství, je založen na řízené aplikaci stresu v laboratorním či průmyslovém měřítku. Pro přípravu kmenů se nevyužívá všech přirozeně se vyskytujících stresů, nýbrž pouze stresových podmínek, které mohou reálně v biotechnologických procesech nastat. Při kultivacích by měly být kontaminující mikroorganismy aplikací stresu eliminovány, zatímco adaptované kmeny by měly být odolné. Aplikací stresů různých intenzit mohou být připravovány kmeny s vyšší robustností nebo mohou být vyvíjeny kmeny se zcela novými charakteristikami na úrovni fenotypu, a to např. navýšením schopnosti utilizace zdroje uhlíku. Přestože je ale efektivita evolučního inženýrství poměrně vysoká, provedení experimentů je časově náročné.

Další možností konstrukce kmenů s novými vlastnostmi představuje aplikace technik genového inženýrství. Oproti evolučnímu inženýrství je provedení časově méně náročné, ale změny v genotypu se ne vždy projeví na úrovni fenotypu. Aplikací různých technik lze připravit kmeny s vylepšenými charakteristikami podobně jako u evolučního inženýrství.

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) představují jednu z možností, jak se mikroorganismy mohou dočasně chránit vlivům stresu. PHA slouží řadě bakterií jako rezervní zdroj uhlíku a energie pro případ, že se nachází ve stavu nedostatku živin nebo jsou vystaveny stresu prostředím. Jedná se o obnovitelné biomateriály, které disponují biokompatibilitou a biodegradabilitou. Svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi se podobají syntetickým polymerům vyráběným z ropy, což je při jejich současné biologické odbouratelnosti činí vhodnými materiály pro využití nejen v průmyslu, ale také například v oblasti péče o zdraví nebo kosmetice. Vlastnosti polymerů závisí na zastoupení monomerů v molekulách polyesterů, čehož lze využít při designu materiálů pro nejrůznější cílové aplikace.

Cílem práce je pojednat o obou zmíněných technikách, tedy o evolučním i o genovém inženýrství. Dále budou diskutovány možnosti aplikace obou přístupů na PHA produkující bakterie sloužící ke zvýšení výtěžku produkce a také k cílené produkci materiálů s požadovanými vlastnostmi.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Postavení mikrobiální buňky v biotechnologiích

Mikrobiální biotechnologie obecně zahrnují komplexní procesy, při nichž jsou prostřednictvím mikroorganismů produkovány látky a materiály pro různé účely, jedná se přitom o metabolity izolované v různých fázích růstu producentů. Aplikační potenciál takto vyprodukovaných látek je velmi široký, zahrnuje biopaliva, látky pro chemický či spotřební průmysl, enzymové preparáty pro průmysl, ale například i vysoce čisté proteiny pro farmaceutické účely. Mezi využívané mikroorganismy patří především bakterie a kvasinky, tedy zástupci prokaryotické i eukaryotické říše. Vzhledem ke komplexní povaze průmyslových fermentačních procesů je zapotřebí využívat mikroorganismy, které jsou dostatečně robustní, kdy robustnost spočívá v odolnosti kmenů vůči vlivům prostředí, ve kterém se nachází. Mezi nejčastěji se vyskytující stresové faktory patří výkyvy teploty mimo optimum daného producenta, kolísání hodnot pH, osmotický stres či přítomnost toxických látek, a to jednak v kultivačním mediu, jednak se může jednat o některý z hlavních či vedlejších produktů metabolismu. Expozice stresu vede ke změnám růstové kinetiky producentů, což se může negativně projevit při samotné fermentaci s ohledem na množství produktu, komplikaci při down-streamových procesech apod. Za účelem zvyšování robustnosti mikrobiálních producentů vzhledem k odolnosti vůči stresovým faktorům se proto využívá řada metodických postupů, kterými lze původní kmeny modifikovat s ohledem na zachování či zvýšení jejich charakteristických produkčních schopností [1–4].

2.1.1 Stresová odpověď mikroorganismů

Mikrobiální stres může být obecně brán jako posun libovolného pro buňku relevantního parametru mimo její optimum. Mikroorganismy jakožto nejčastěji jednobuněčné organismy mají v přítomnosti stresu dvě možnosti, a to buď se na stres adaptovat, nebo na následky poškození vlivem expozice zahynout, a to ihned nebo postupně, kdy následkem stresu nejsou schopny dělení. Adaptace spočívá ve změnách v buňce (změny ve složení) nebo buňky jako takové (změny ve fyziologii), a to kvůli limitaci fyzického pohybu. Lze ji tedy vysvětlit jako (evoluční) proces, při kterém se organismus přizpůsobí vnějším podmínkám, v nichž se vyskytuje [1–5].

Vlivem přirozeného výběru mutace jednak vznikají a jednak jsou účelně fixovány v populacích, přičemž z náhodných mutací se přirozeně fixují pouze ty prospěšné, čímž organismus získá tzv. adaptivní vlastnosti. Schopnost mutace neboli adaptabilita může být buď pasivní, jež je získávána na základě evoluční výhodnosti; aktivní, která spočívá v záměrném přizpůsobení se například za účelem využití nového zdroje živin; a kreativní, ta se projevuje záměrným přetvářením prostředí ve prospěch organismu. Z časového hlediska může být rozlišena adaptace okamžitá (krátkodobá) nebo dlouhodobá, která je typická pro extrémofilní nebo extrémotolerantní organismy. Stresová odpověď buňky může tedy spočívat v samovolné modifikaci na úrovni genomu za vzniku mutací nebo na úrovni adaptace fenotypu, a to buď fyziologická, genetická nebo epigenetická, všechny tyto vedou především ke změně v genové expresi. Fyziologická adaptace, zpravidla reverzibilní a nepřenášející se

na další generace, je spojená pouze s přechodným zvýšením odolnosti vůči letálním stresům, a to více než vůči stresům středně silným. Může být přitom zajištěna homologním nebo heterologním (zprostředkovaná ochrana v rámci druhů) způsobem. Zato genetická adaptace, ireverzibilní a dědičná, vzniká v důsledku náhodné mutace, ale může vzniknout i jako následek rekombinace molekul DNA, které nesou dědičné informace. Jelikož u bakterií není definována sexualita, tak podmínka sexuální mezidruhové bariéry jako takové postrádá smysl, proto zde hraje hlavní roli soudržnost druhu limitována tlakem prostředí, v němž se daný organismus nachází. Poslední z uvedených, epigenetická adaptace, jenž je reverzibilní a přenášející se na další generace, spočívá v modifikaci fenotypu, který je ve změněné podobě přenášen na další generace i bez přítomnosti stresoru, tedy za jiných podmínek, než které jí daly za vznik. Důsledkem genetické adaptace na stres dochází ke zvyšování genetické diverzity druhů díky změně exprese široké škály genů zapojených do stresové odpovědi a také aktivaci alternativních metabolických drah. Stres tedy rovněž slouží jako hnací krok evoluce, v jeho nepřítomnosti by nebylo zapotřebí se dále vyvíjet a vlivem četnosti stresových událostí se u mikroorganismů projevuje podstatně vyšší variabilita než u vyšších organismů [1–6].

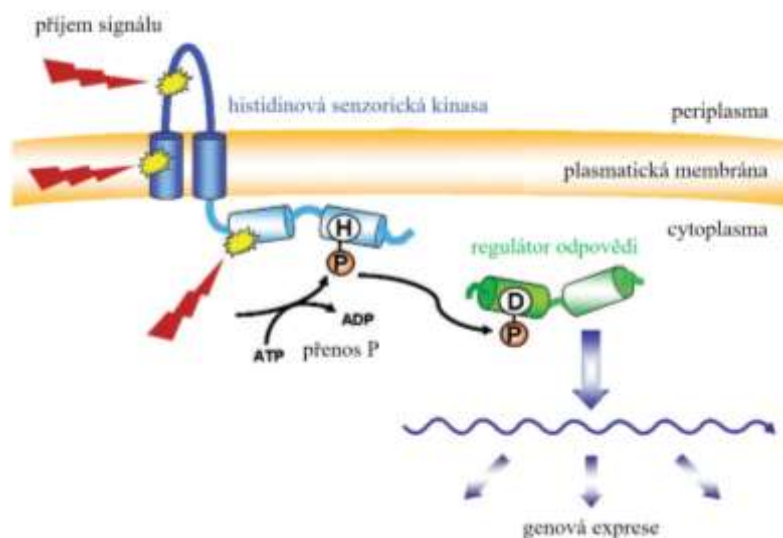
Samotnými projevy adaptace mohou být morfologické změny, inhibice syntézy DNA, RNA a neesenciálních proteinů, zvýšená rychlost obratu proteinů (proteolýzy), indukce exprese proteinů nezbytných pro adaptaci na daný stres a také indukci exprese proteinů zapojených do všeobecných regulačních sítí, čímž si buňka zajistí ochranu i vůči jiným stresovým podmínkám [1, 2, 5, 6].

2.1.2 Mechanismy stresové odpovědi mikroorganismů

Prokaryotické buňky disponují dvěma mechanismy regulace odpovědi na stres. Převládajícím mechanismem je pro ně regulace operonových transkripčních jednotek prostřednictvím sigma (σ) faktorů. Tyto podjednotky RNA polymerasy, jejichž hlavní funkce spočívá v zahájení transkripce nasednutím na sekvenci promotoru, reflektují signály z prostředí a následně zahajují transkripci příslušných množin genů či operonů v rámci nadřazené regulační oblasti (tzv. regulonu). σ faktory mohou mít rovněž vazebné partnery v podobě anti- σ faktorů, které při navázání zabraňují aktivaci transkripce. Teprve po deaktivaci anti- σ faktorů fosforylací nebo cílenou proteolýzou může σ -faktor plnit svoji funkci. Počet a typy σ -faktorů se odvíjí od jednotlivých druhů mikroorganismů, např. u bakterie *Escherichia coli* jich byla popsána řada s různými funkcemi označené podle molekulové hmotností, a to σ^{70} (RpoD) sloužící jako hlavní faktor při růstu buňky, σ^{19} (FecI) regulující transport železa ve formě citrátu, σ^{24} (RpoE) reagující na expozici extrémním teplotám, σ^{28} (RpoF) reflektující mechanický stres (indukuje expresi bičíku), σ^{32} (RpoH) sloužící jako hlavní σ -faktor při teplotním stresu, kdy zajišťuje expresi proteinů teplotního šoku HSP, proteas a enzymů opravujících DNA, dále např. σ^{38} (RpoS) reagující na hladovění a přechod do stacionární fáze a σ^{54} (RpoN) reflektující limitace dusíkem [1, 2, 7, 8].

Druhý mechanismus je založen na dvousložkových regulačních systémech využívajících fosforylačně závislé kinyzy nacházející se v buněčné stěně (membráně) (Obr. 1). Po přijetí signálu z vnějšího prostředí dochází k remodelaci proteinů, přenosu signálu fosforylační

kaskádou, a tím k tvorbě signálu pro vnitřní prostředí. Jako regulátory odpovědi slouží nejčastěji alternativní transkripční aktivátory spouštějící po předchozí aktivaci proces transkripce vazbou na příslušné promotory [1, 2, 9].



Obr. 1: Schéma transdukce signálu prostřednictvím dvousložkových regulátorových systémů [10]

2.1.3 Zlepšení charakteristik mikrobiálních producentů

Jak již bylo zmíněno, u mikrobiálních producentů je při biotechnologických procesech nezbytná dostatečná odolnost vůči prostředí, v němž se nachází, a rovněž schopnost produkce dostatečného množství požadovaných metabolitů. Ve spojitosti se stresovou odpovědí se řada výzkumných skupin věnovala sigma faktorům (Tab. 1), které s odpovědí organismu souvisí. Nejen za tímto účelem může být ke zlepšení charakteristik mikrobiálních producentů využita řada přístupů, mezi které patří především evoluční a genové inženýrství, které mohou být aplikovány jednak separátně, jednak kombinovaně [11]. O těchto strategiích pojednají další kapitoly této disertační práce.

Tab. 1: Inženýrské postupy aplikované na úrovni sigma faktorů [11]

sigma faktor	přístup	fenotyp	organismus	zdroj	
housekeeping faktor	σ^{70}	globální inženýrství na úrovni transkriptomu (gTME)	<i>E. coli</i> <i>L. plantarum</i> <i>R. ruber</i> TH	[12-14]	
		náhodná mutace, posun genomu, bodová mutace	produkce kyseliny hyaluronové	<i>E. coli</i>	[15]
			produkce teikoplaninu	<i>A. teichomyceticus</i> L-27	[16]
σ^S faktor navozující stacionární fázi	knockout genu	produkce 1-propanolu a putrescinu	<i>E. coli</i>	[17, 18]	
		produkce isobotanolu	<i>E. coli</i>	[19]	
	nadexprese sRNA	aktivace σ^S a zvýšená tolerance vůči kyselinám	<i>E. coli</i>	[20-22]	
	nadexprese 5' konce mRNA pro <i>rpoS</i> nepodléhajícího translaci	produkce PHB	<i>E. coli</i>	[23]	
SigE	nadexprese genu	produkce vodíku a PHB	<i>Synechocystis</i> sp.	[24, 25]	

alternativní σ faktory	Sig6	knockout genu	produkce avermektinu	<i>S. avermitilis</i>	[26]
	σ^{22}	mutace anti-sigma faktoru	produkce alginátu	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i>	[27, 28]
	Orf21	nadexprese genu	produkce klavulanové kyseliny	<i>S. clavuligerus</i> NRRL3585	[29]
	σ^E	adaptivní evoluce, nadexprese genu	produkce a zvýšená tolerance ethanolu	<i>Thermoanaerobacter</i> sp. X514	[30, 31]
	σ^N	nadexprese genu	produkce oxytetracyklinu	<i>E. coli</i>	[32]
syntetické σ faktory	σ^S	konstrukce sRNA ribonukleových přepínačů	pozměněná translace <i>rpoS</i>	<i>E. coli</i>	[33, 34]
	ECF σ faktory	chimerické σ faktory		<i>E. coli</i>	[35]
	Orthogonální σ faktory	rozdělená T7 polymerasa		T7 fág	[36]

2.2 Evoluční inženýrství

Evoluční inženýrství nebo také adaptivní laboratorní evoluce, buněčná řízená evoluce či *in vitro* evoluce představuje možnost přípravy látek, produktů metabolismu, s požadovanou funkcí nebo vlastnostmi pro cílovou aplikaci, a to s využitím principů přirozeného evolučního procesu. Může se jednat o různé biopolymery, nukleové kyseliny či proteiny se specifickými funkcemi, které nejsme schopni synteticky cíleně racionálně připravit s využitím klasických inženýrských postupů. Jedna z výhod evolučního inženýrství spočívá v tom, že není zapotřebí znát genetické determinanty podmiňující charakteristiky na úrovni fenotypu, jelikož mnohé z nich nejsou doposud popsány. Tento inverzní přístup umožňuje pouze fenotypové změny, které lze pozorovat ve spojitosti s růstem. Vesměs náhodnými postupy získané fenotypy mohou být následně prostřednictvím metod genetiky, transkriptomiky, metabolomiky, případně i jejich kombinací, charakterizovány a analyzovány za účelem identifikace vzniklých mutací a jejich příčiny [37–40].

Při přirozeném vývoji je zajištěn výběr nejlepšího z potomků v dané generaci. Evoluční inženýrství staví na stejném principu napodobováním přirozeného selekčního procesu. Můžeme jej rozdělit na dva samostatné kroky, které na sebe navazují, a to zavedení náhodných mutací do cílového genu pro vytvoření variace a výběr mutovaných genů, které exprimují produkty s požadovanou vlastností za působení selekčního tlaku. Můžeme tak získat mikrobiální kmeny s požadovanými vlastnostmi [37–43].

2.2.1 Vývoj metodiky evolučního inženýrství

Evoluční inženýrství má svoje kořeny již v pracích vědců jako byly Antoine van Leeuwenhoek, Louis Pasteur, Robert Koch a především Charles Darwin. Zasloužili se o řadu objevů, jako je především objev mikroorganismů, definování a přijetí teorie přirozeného výběru v evoluční biologii a dalších nezbytných základů. Počátek prvních experimentů započal prací Williama Dallingera přibližně před sto lety. Od té doby lze na základě publikací sledovat rozmach v horizontu posledního čtvrtstoletí. Mezi nejčteněji využívané mikroorganismy v rámci zveřejněných studií patří bakterie *Escherichia coli*, zástupce

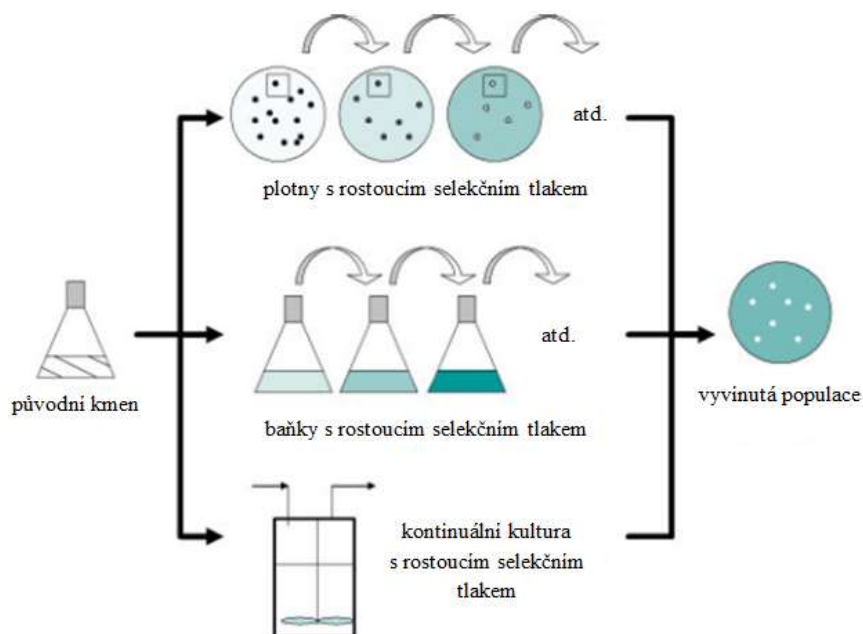
prokaryotické říše, a kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, zástupce eukaryot, které slouží jako modelové organismy [37, 44, 45].

Před zavedením evolučního inženýrství se pro charakterizaci evolučního vývoje využívala srovnávací genomika, která je založena na porovnávání sekvencí genů různých genomů téhož kmene i různých organismů. Pro evoluční vývoj je ale důležitá vazba na prostředí, v němž se mikroorganismus vyskytuje, jelikož to z velké části rozhoduje o podobě fenotypu. Až jeho pomocí byly proto experimentálně ověřeny principy evoluční biologie Charlese Darwina [37, 45].

Už od nástupu metodiky se díky jednoduchosti evolučního inženýrství využívalo zejména ke zlepšení charakteristik průmyslových kmenů, a to především ve vztahu k využívanému uhlíkatému zdroji, zvýšení robustnosti vůči nepříznivým podmínkám a odolnosti vůči mikrobiálním inhibitorům. Kromě jednoduchosti hrála hlavní roli i účinnost. V současné době dochází při téměř beze změn zachovaném postupu pro laboratorní evoluci k rozvoji a zjednodušení metod analyzujících adaptované kmeny, vývoji nových metod pro zvýšení genetické rozmanitosti a také k urychlení tempa evolučních procesů [38, 40].

2.2.2 Princip metodiky evolučního inženýrství

Provedení evolučních experimentů spočívá ve množení mikrobiálních populací při současném působení selekčního tlaku (Obr. 2). Selekcční tlak, představující limitaci růstu, jsou přitom různé stresové faktory jako teplota, pH, osmolarita, přítomnost toxických látek apod. Výhodami jsou především jednoduchost a účinnost, které činí evoluční inženýrství přední technikou pro zlepšování vlastností průmyslových producentů. Oproti přirozenému procesu evoluce, který metodika evolučního inženýrství napodobuje, probíhá adaptační proces racionálně, efektivně a podstatně rychleji. Při kultivaci v kontrolovaných podmínkách lze sledovat změny na úrovni fenotypu a zpětně i genotypu s volitelným časovým odstupem s ohledem na počet generací, kterým můžou být desítky, stovky až tisíce [38, 39, 42, 46].



Obr. 2: Princip evolučních experimentů [47]

Zlepšení vlastností na úrovni fenotypu, provázející proces adaptace, souvisí s aktivací dříve latentních metabolických drah a adaptované kmeny s evoluční výhodou následně rozšiřují populaci. Na úrovni genomu se během evolučního procesu účastní řada základních procesů, jako jsou různé typy mutací, rekombinace, genetický drift a také přirozený výběr. Popisu změn a jejich monitorování v čase se prostřednictvím matematických modelů zabývá evoluční genetika. Využívané modely slouží pouze k obecné informaci režimů evoluce a dynamiky změn na úrovni genotypu, jelikož průběh u jednotlivých systémů se odvíjí na jejich genomu a na povaze konkrétních genů, tedy jestli se jedná o enzymy s danou funkcí v rámci metabolismu nebo o proteiny s jinou než katalytickou funkcí (např. strukturní nebo transportní). Evoluční genetika vyhodnocuje míru evoluce, relativní význam procesů adaptivních a neadaptivních a také převládající tempo, s jakým mutace vznikají [38, 39, 46, 48].

Jednou z nejčastějších aplikací evolučního inženýrství je především využití širší škály substrátů, zvýšení tolerance mikrobiálních producentů vůči stresorům spojených s průmyslovými fermentacemi nebo zvyšování rychlosti růstu [38–40].

2.2.2.1 Možnosti režimů evolučních experimentů

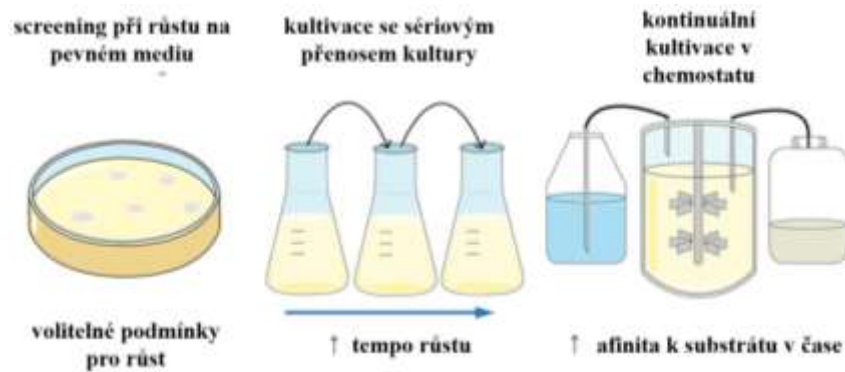
Pro většinu evolučních experimentů slouží jako výchozí materiál charakterizovaný sbírkový geneticky homogenní kmen a přestože se metodika dá aplikovat obecně, jsou postupy zaměřené primárně na jednobuněčné mikroorganismy, které mají mj. mnohem četnější populace. Kultivační část evolučních experimentů je poměrně jednoduchá a při rozvoji metodiky se příliš nemění. V principu existují tři hlavní postupy, kterými lze experimenty provádět (Obr. 3). Jedná se o kultivaci na pevných médiích (agarových plotnách), kultivaci v baňkách se sériovým přenosem a kontinuální kultivaci v bioreaktorech, přičemž klíčové jsou poslední dva z nich, kde dochází ke konkurenci adaptovaných buněk v rámci populací,

a tedy k uplatňování přirozeného výběru. Kromě samotného provedení se liší také genetická dynamika uplatňující se při šíření populací [37, 40, 46, 49].

Kultivace na agarových plotnách je jedinou z variant evolučních experimentů založených na akumulaci vzniklých mutací. Kvůli bariéře, kterou růst na tuhém mediu pro kolonie představuje, nedochází ke vzájemnému ovlivňování jednotlivých kolonií. Dochází tak k fixaci všech mutací bez ohledu na jejich sílu, čímž se odstraňuje rozmanitost na úrovni genomů. Tím, že se do dalších pasáží často přenáší jen vybrané kolonie z původní kultury, může dojít ke ztrátě výhodnějších mutací na úkor méně výhodných. Fyzická bariéra především zabraňuje uplatnění přírodního výběru, což může být v řadě experimentů záměr. Model lze využít například ke stanovování míry mutací, a to porovnáváním celogenomových sekvenací u dlouhodobých experimentů. Mimoto se metodika využívá pro stanovování vlivu chemických mutagenů na růst a na četnost mutací [46].

Sériový přenos je na rozdíl od předchozí varianty experimentů proces založený na adaptivním vývoji. Jedná se o submerzní kultivaci v baňkách, při níž dochází v pravidelných intervalech k přeočkování alikvotních podílů do čerstvých medií. Jako první nastává regenerace v novém prostředí, následně buňky rostou a dělí se, a to buď až do vyčerpání živin, nebo do dalšího přeočkování, v tom případě se zajistí trvalejší růst populace. Na rozdíl od kultivace na miskách je zde udržována genetická diverzita při každém přenosu, dochází tedy k adaptivní evoluci. Výhoda provedení spočívá v jednoduchosti, kdy je možné kultivovat paralelně velké množství kultur, a to za nízkých provozních nákladů. Kultivace v baňkách je částečně limitována, jelikož není možné ovlivnit všechny parametry kultivačního procesu jako pH a okysličení kultur. Zajistit lze ale konstantní kultivační teplotu a také homogenitu systému pomocí míchání, i když ne vždy je stejná hustota populací buněk a nestejněměrné zásobování buněk živinami. Přesto pro řadu systémů jsou tyto faktory zanedbatelné a metoda sériového přenosu je široce využívaná [37, 40, 46, 50].

Stejně jako u sériového přenosu nastává i při kontinuální kultivaci v bioreaktorech adaptivní vývoj populací v kultuře. Rozdíl spočívá v nastavení kultivačního procesu, je zajištěn přívod živin tak, aby bylo jejich množství konstantní, a je také udržována konstantní velikost populace. Spolu s přítokem živin tak dochází i k odvodu odpadu a náhodných jedinců z populací do chemostatu. Stálý přívod živin se projevuje i konstantní rychlostí růstu buněk a jejich kontakt vede ke genetické diverzitě. Oproti kultivaci v baňkách nabízí kultivace v bioreaktoru uchování konstantních podmínek při kultivaci včetně pH a okysličení, naopak cenová a technická náročnost procesu je vyšší [37, 40, 46, 50].



Obr. 3: Možnosti uspořádání evolučních experimentů [49, upraveno]

2.2.2.2 Adaptivní laboratorní evoluce (ALE)

Adaptivní laboratorní evoluce (ALE) zahrnuje metody sériového přenosu a kontinuální kultivaci, které spojuje vznik adaptivních událostí, zachování genetické diverzity a preferenční akumulace výhodných mutací v populaci. Rozdíl mezi kulturami lze pozorovat např. při porovnání růstových rychlostí, kdy při sériovém přenosu dochází k přeočkování kultur v exponenciální fázi s vysokou rychlostí růstu před vyčerpáním živin, v kontinuálních kulturách s omezeným množstvím živin je růst pod maximem a při dostatku je naopak maximální [37, 46].

Při vývoji nových fenotypů mohou nastat tři situace, buď může docházet k postupné optimalizaci, diskontinuální inovaci nebo ke kombinaci obou možností. Inovaci lze také definovat jako měnící se schopnosti populací, z nichž některé mohou být podmíněny pouze jednou výhodnou mutací. Mutace manifestuje do podoby spuštění exprese dříve nevyužívaných proteinů nebo ke změně substrátové specifity stávajících. Jako příklad diskontinuální inovace může být například osvojení schopnosti využít nový uhlíkatý zdroj, postupnou optimalizaci může představovat zdokonalování schopnosti utilizace uhlíkatého zdroje, obě tyto změny mohou pak dohromady tvořit i kombinovanou formu adaptace [40, 46].

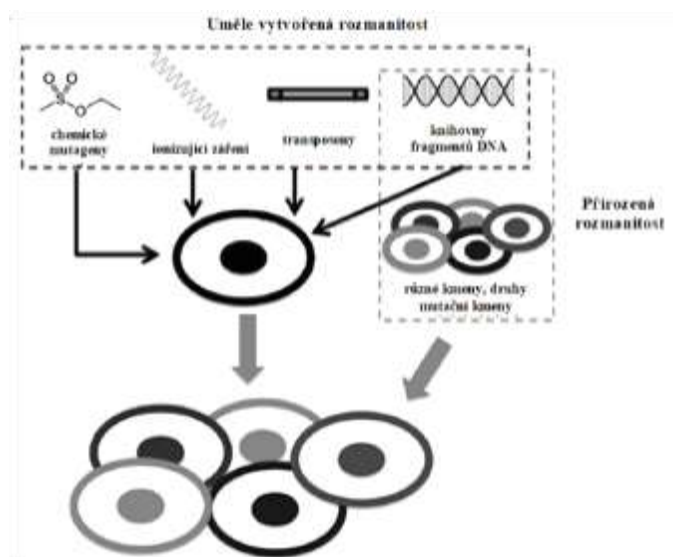
Mikroorganismy vyznačující se asexuálním typem rozmnožování a z principu vylučující konkurenční linie jsou charakteristické přítomností vždy pouze jedné pozitivní mutace, což je důsledek nízké četnosti nově vznikajících mutací a velikostí populace. I prospěšné mutace mohou být vyloučeny genetickým driftem. Jestli se v populaci udrží, uplatní se přirozený výběr (selekce), zvyšuje se četnost mutace, která se takto zafixuje, a v populaci nahradí předka. Uplatňuje se i vliv klonální interference, kdy si mezi sebou konkurují alternativní prospěšné mutace. Konkurenční boj zpomaluje míru šíření prospěšných mutací, jelikož se může uplatnit vždy jen jedna, a navíc se může objevit i komplikace v podobě neutrálních a škodlivých mutací, které se rovněž přirozeně objevují. Výsledná genetická dynamika a celkový projev mutací na úrovni fenotypu je pak dán souhrou všech faktorů, na nichž se projeví i velikost populace [465].

2.2.2.3 *Optimalizace míry stresu a zvýšení genetické diverzity*

Kromě režimu evolučního experimentu může experimentátor za účelem zlepšení fenotypových charakteristik upravovat sílu selekčního tlaku představující vliv prostředí pro růst. Intenzita stresu se projeví na genetické diverzitě populace; stres o vysoké intenzitě povede ke značné selekci a ve výsledku bude adaptováno velmi malé množství buněk vykazujících toleranci charakteristickou pro extrémofilní mikroorganismy. Nižší intenzita povede k vyšší rozmanitosti v populaci a k optimalizaci populace prostřednictvím více možných alternativních mutací, které lze charakterizovat. Pro vývoj fenotypů s vysokou schopností tolerance a zároveň s požadavkem na možnost analyzovat změny na úrovni genotypu je nejvhodnější alternativou aplikace gradientu stresu. Prostřednictvím postupně vznikajících prospěšných mutací se optimalizují změny na úrovni genomu, metabolické změny a také změny růstových charakteristik, což vede dohromady ke zvyšování zdatnosti daného kmene. Nastane-li více prospěšných mutací zároveň, vlivem epistasy nedochází k jejich plnému manifestu na úrovni fenotypu, vzájemně se utlumí a výsledný efekt je nižší, než kdyby dílčí mutace nastaly postupně. Z hlediska významnosti změn fenotypu můžeme změny v genotypu rozdělit na mutace největšího účinku a tzv. mikroevoluční změny, které jsou specificky vázány na prostředí, ve kterém vznikly [37, 38, 46].

Kromě samovolně vznikajících mutací se využívá za účelem zvýšení genetické diverzity řada technik, které navyšují četnost mutací (Obr. 4). Využívají se proto fyzikální mutageny (UV, RTG a γ záření), chemické mutageny (nejčastěji nitrosoguanidin, methyl methansulfonát či ethyl methansulfonát) a především metody genových manipulací jako PCR s náchylností k chybám, užití transposonů nebo metodu posunu genomu (genome shuffling), která umožňuje vývoj za pomoci rekursivní rekombinace na úrovni genomu vybraného mikroorganismu [39, 51]. Jednu z novějších metod fyzikální mutace představuje technika ARTP (atmospheric and room temperature plasma), která je založená na aplikaci vysokofrekvenčního plazma o atmosférické a pokojové teplotě. Paprsek plazmatu, generovaný tryskou, je schopen významných změn v sekvenci DNA, a to efektivněji než předchozí metody [52].

Genetická rozmanitost může být aplikována na různých úrovních od jednotlivých genů přes úroveň jednotlivých drah až po celý genom. Přestože na úrovni celého genomu je vznik mutace pravděpodobnější, značně narůstá složitost její detekce a identifikace všech různých mutantů na úrovni genomu je tedy téměř nemožná. I to je důvod k zavádění mutací semi-racionálním způsobem, jež kombinuje racionální design mutace a metody řízené evoluce. Takto získané mutanty je již možné začlenit do knihoven a charakterizovat. K přípravě definovaných knihoven se využívá řada dalších metod [39, 51].



Obr. 4: Vybrané způsoby zvyšující mutagenezi [51]

2.2.3 Metody analýzy adaptovaných kmenů

Doposud byla věnována pozornost kultivační části evolučních experimentů, která jednoduše a účinně generuje řadu adaptovaných kmenů s různě pozměněnými fenotypovými charakteristikami. Nezbytnou a také nejnáročnější část metodiky však tvoří screening nově získaných kmenů a následující selekce nejslibnějších fenotypů. Kmeny získané z jednotlivých kroků kultivací mohou být porovnávány vzájemně mezi sebou nebo s původním kmenem za účelem charakterizace rozdílů. K tomuto účelu se využívají různé metody genomiky, transkriptomiky, metabolomiky a jejich kombinace, které srovnávají kmeny na příslušných úrovních, tedy na úrovni DNA, RNA, proteinů a celé škály metabolitů [38, 39, 53–55].

Nejjednodušší techniky jsou založeny na využití charakteristik fenotypů, které jsou značně rozdílné, a to např. rychlý růst či barva. K analýze a separaci takových fenotypů mohou být použity spektrofotometrické a kolorimetrické metody, mikrofluidní techniky nebo průtoková cytometrie se sortací na základě fluorescenčního signálu (FACS). Kromě rozdílné růstové kinetiky a barvy lze jednoznačně rozlišit fenotypy na základě tolerance vůči vybraným látkám. Další možnost screeningu představují využití biosenzorů, které mohou být aplikovány za účelem vyvolání exprese proteinů anebo produkce jiných metabolitů odlišujících cílový fenotyp od okolí, vyvolání rezistence vůči antibiotiku nebo provádění screeningu metabolitů [39, 54].

Nejobecnějším přístupem k analýze korelací mezi genotypem a fenotypem pomocí metod molekulární biologie představuje zpětná analýza vzniklých mutací. U každé objevené mutace se provádí její rekonstrukce u původního kmene za účelem posouzení vlivu na celkový proces adaptace. Zatímco kultivační část evolučních experimentů je již po dlouhou dobu identická, metody molekulární biologie zaznamenávají v posledních letech dramatický vývoj vedoucí ke zjednodušení a zefektivnění analýzy a objasnění mechanismů na molekulární úrovni. Za tímto účelem se často využívá sekvenování nové generace (NGS), celogenomové sekvenování (WGS) nebo transkripční profilování, které jsou sice efektivní, ale k rekonstrukci genomu

mutantního kmene a porovnání s divokým kmenem vyžaduje značné množství času a dalších zdrojů. Pro zjednodušení analýz mutací byla proto vyvinuta řada alternativních technik jako např. využití definovaných delečních kmenů ze sbírek, které je ale omezeno pouze pro modelové mikroorganismy, či metoda rekurzivní genomové rekombinace a sekvenování (REGRES), jenž je použitelná obecně [37, 38, 56, 57].

Informace o struktuře vyvíjející se populace může poskytnout metoda založená na vizualizaci evolučního vývoje v reálném čase (VERT), která byla vyvinuta primárně pro eukaryotické mikroorganismy s komplikovanější evoluční dynamikou. Technika využívá fluorescenční markery v podobě fluorescenčních proteinů, které vizuálně odlišují klony v průběhu dlouhodobé nejčastěji kontinuální kultivace při aplikaci selekčního tlaku. Adaptace části původní směsné kultury se projeví na zvýšeném zastoupení barevné subpopulace, což lze využít jednak při monitorování evoluční dynamiky, a při kombinaci s průtokovou cytometrií i k sortování buněk [40, 53, 58–60].

2.2.4 Aplikace evolučního inženýrství

Evoluční inženýrství se aplikuje především na mikroorganismy, které se oproti jiným organismům vyznačují řadou výhodných charakteristik, jako jsou: i) nenáročné podmínky na živiny; ii) snadná kultivace v laboratoři a iii) vysoká rychlost rozmnožování a možnost stabilní kultivace v horizontu několika set až tisíc generací během dlouhodobých experimentů. Dlouhodobý časový horizont (volitelně dny, týdny až roky) umožňuje v průběhu procesu vyselektovat adaptované kmeny s nejlepšími charakteristikami na úrovni fenotypu [37].

Jak již bylo uvedeno výše, v biotechnologických procesech se evoluční inženýrství využívá primárně za účelem zvyšování robustnosti ve smyslu vyšší odolnosti vůči stresu způsobenému jednak fyzikálními faktory (např. teplota, pH, osmolarita), jednak vůči složkám kultivačního media nebo produktům metabolismu působících toxickým efektem a také ke zvyšování výtěžku vybraných metabolitů. Komplikace mohou nastat ve spojitosti se scale-up procesem z laboratorního do průmyslového měřítko, a to při produkci metabolitů spojených s růstem. Během převodu do většího objemu jsou mikrobiální producenti vystaveni stresu vlivem změny kultivačního media, kdy se v laboratořích a poloprovozech začíná zpravidla komplexními medii bohatými na živiny, následně jsou při velkoobjemové produkci kultury převedeny do nutričně chudších medií a během toho jsou i jinak namáhány, což se negativně podepíše na růstu a také na výtěžku požadovaných produktů. Při výběru kmenů a jejich vývoji pro velkoobjemové průmyslové fermentace je tedy zapotřebí zohlednit i odolnost vůči změnám podmínek spojených s výrobou a taktéž volit vhodné počáteční podmínky zamezující zpomalení růstu [37, 46].

Na úrovni výzkumu v oblasti medicíny našlo evoluční inženýrství taky uplatnění, a to skrze porovnání evolučních procesů s ohledem na jejich dynamiku při růstu *in vitro* v laboratoři nebo pro ně přirozeném prostředí a v lidském organismu. Porovnání genomů má svůj význam při identifikaci a stanovování změn genů zodpovědných za resistenci mikroorganismů vůči antibiotikům, genů kódujících proteiny způsobující imunitní reakci hostitele a rovněž také genů doposud neznámých [37, 46].

2.3 Genové inženýrství

Genové (genomové) inženýrství představuje techniku založenou na změně genetického kódu organismu, která vznikla jako odnož molekulární biologie. Genom všech organismů sestává z nukleotidů kódujících proteiny, pro jejichž správnou funkci musí být nukleotidy ve správném pořadí, kdy změny v sekvencích mohou mít pozitivní i negativní dopad na organismus. V posledních letech byla vyvinuta celá řada metod a nástrojů pro cílenou editaci genomu organismů, a to včetně průmyslově významných mikroorganismů. Genové inženýrství zahrnuje celou řadu úprav, a to delece nukleotidů vedoucí k vyřazení genů, inkorporace nukleotidů vedoucí k inserci nových genů a úpravy sekvencí nukleotidů vedoucí ke vzniku mutací, čímž se mění stávající nebo konstruuji nové genotypy. Vyjma toho se zabývá umělou syntézou či izolací vybraných genů z genotypů organismů se specifickými charakteristikami na úrovni fenotypu, následným řízeným přenosem do genomu nepříbuzných organismů a zajištěním exprese vložených genů. Úpravy genu mohou být implementovány na úrovni DNA, RNA nebo na úrovni epigenetické [61–63]. Z hlediska pozice integrované DNA v genomu hostitele se více uplatňuje náhodná integrace do genomu, nežli začlenění na základě homologní rekombinace, což má i přes poměrně vysokou efektivitu řadu nevýhod [64].

2.3.1 Vývoj technik genového inženýrství

Vývoj v oblasti genových technologií zaznamenal během posledních přibližně 60 let velký pokrok, a to od objevu struktury DNA v roce 1953 přes objev techniky polymerázové řetězové reakce (PCR) v roce 1983 až po zavedení vysoce sofistikované technologie CRISPR v posledních letech. Jednotlivé techniky pro editaci genomu organismu, které se během desetiletí vyvíjí, vesměs kompenzují úskalí technik předchozích tak, aby byla aplikace genového inženýrství co nejpřesnější a jednoduše proveditelné. Prvním milníkem při vývoji technik molekulární biologie byl objev restričních enzymů umožňujících cílené intervence do genomu, dále bylo objeveno sekvenování DNA následované jejím klonováním, kombinací jednotlivých úkonů spolu s dalšími mohou být vneseny změny do chromosomální DNA. Jak bylo uvedeno, nad homologní rekombinací převažuje převážně náhodné začlenění cizorodé DNA, nicméně pomocí vybraných přístupů lze cílit na konkrétní místa v genomu hostitele. K tomu lze s výhodou využít místně specifické nukleasy, které se postupně vyvíjely, což dalo vzniknout nukleasám založeným na motivu zinkových prstů (ZFN), meganukleasám, efektorovým nukleasám podobným transkripčním aktivátorům (TALEN) a CRISPR/Cas9 [64].

Genové manipulace mohou mít kromě teoretického přínosu spojeného se základními otázkami života na úrovni molekul především přínos pro studium léčby dědičných onemocnění, úpravě zemědělských plodin s ohledem na jejich rezistenci vůči nepříznivým vlivům prostředí a ke zlepšování jejich charakteristik, cílené produkci látek využívaných jako farmaceutik, k zavedení nových technik do výroby apod. [61–63]. Od roku 2006 probíhá celosvětový projekt zaměřený na knock-out jednotlivých genů v genomu myši, a to za účelem tvorby knihovny embryonálních kmenových buněk pro jednotlivé mutace a také fenotypů myši. Získané informace poskytují klíčové nástroje pro pochopení funkce jednotlivých genů

a také genetických příčin lidských onemocnění. Do roku 2016 bylo takto získáno celkem 5 000 knock-out myši a jejich genomů v knihovnách [65–67].

2.3.2 Princip a provedení experimentů genového inženýrství

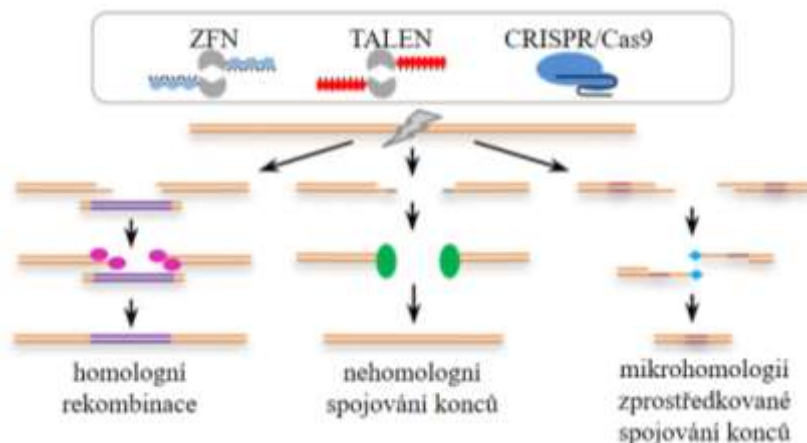
Manipulace s nukleovými kyselinami, která byla dříve téměř nemyslitelná, je v současné době běžnou technikou. Přenos nukleových kyselin je standardní pro každé v rámci jednoho organismu představující klasickou dědičnost vertikálním přenosem na potomky. Oproti tomu genové inženýrství pracuje s horizontálním přenosem DNA, a to nejen v rámci jedné generace, ale i mezi jednotlivými kmeny, čímž se odklání od většiny přirozených procesů [60, 63]. Jak již bylo zmíněno, v podstatě existují tři hlavní úpravy genomu vybraného organismu, a to delece (knock-out), inserce (knock-in) či výměny existujících DNA sekvencí za exogenní [64]. Delece krátkých úseků mohou být využity k odstranění regulačních prvků vypínajících expresi daných genů, aktivaci exprese genů delecí represorů, či změny struktury nebo funkce proteinů změnou kódující sekvence [64, 68]. Inserce mohou přinést do genomu řadu elementů, fungují jako výkonný nástroj pro modifikaci genů, změny jejich funkce, ale mohou i geny blokovat stejně jako delece, v tomto případě se často využívá inserce fluorescenčních reportérových genů (např. zelený fluorescenční protein – GFP). Inserce těchto genů bývá často prováděna i bez vypnutí genů jiných [64, 69]. Poslední z úprav, výměna sekvencí DNA, může být využita ke dvěma úkonům zároveň, a to k zablokování jednoho genu a současně aktivaci nového. Malé výměny jednotlivých nukleotidů slouží jako nástroj ke studiu bodových mutací, např. těch způsobujících lidská onemocnění [64, 70].

2.3.2.1 Enzymy využívané pro genové manipulace

K manipulaci s DNA od její izolace, přes umělou syntézu, inkorporaci do vektorů a další úpravy se nejčastěji využívají speciální enzymy, jejichž objev a charakterizace umožnila rozvoj řady technik [61, 62, 71].

Prvním z nejdůležitějších enzymů jsou restriční endonukleasy, neboli restriktasy, které štěpí fosfodiesterové vazby dvouvláknové DNA v určitých místech na základě specifických sekvencí. Většinou se jedná o palindromní sekvence, které se vyznačují stejným pořadím nukleotidů ve směru od 5' konce na obou DNA vláknech, a to v rozsahu 4–7 párů nukleotidů. V genovém inženýrství se využívají restriční endonukleasy II. třídy, které ke své funkci vyžadují pouze hořčnaté ionty. Restriktasy byly objeveny u bakterií, kterým slouží jako ochrana vůči cizorodé DNA především bakteriofágů, a současně bakterie, které tyto specifické enzymy produkují, si chrání úseky s cílovými sekvencemi ve svojí DNA různými modifikacemi, např. methylací. Při štěpení mohou nastat dvě situace vzhledem k místům rozdělení jednotlivých vláken, a to vznik kohezních nebo tupých konců. Při vzniku kohezních konců probíhá štěpení na jednotlivých vláknech na místech, která nejsou přímo naproti sobě, kdy rozštěpené konce následně nejsou stejně dlouhé, naproti tomu u tupých konců dochází ke štěpení na stejném místě na obou vláknech. Pro jednotlivé bakterie jsou charakteristické restriční endonukleasy s rozdílnými specifickými sekvencemi pro štěpení, což je velmi významný fakt s ohledem na jejich *in vitro* aplikaci. Velké množství restriktas izolovaných z různých bakterií umožňuje tvorbu restričních map, které zohledňují sekvence štěpení pro jednotlivé enzymy a tím umožňují výběr vhodných kandidátů pro izolaci úseků DNA či za

účelem štěpení vektorů sloužících k transportu insertu do buněk hostitele. Pro vyšťepování je rovněž důležité zohlednit vznikající typ konců, který bude mít vliv na začlenění insertu do vektorové molekuly DNA [61, 62, 71]. Schéma znázorňující vybrané možnosti interakcí konců jsou znázorněny na následujícím obrázku (Obr. 5).



Obr. 5: Schéma znázorňující vybrané možnosti narušení řetězců DNA a následné integrace do genomu [72]

Dalším z důležitých enzymů s uplatněním v molekulární biologii pro genové inženýrství je DNA ligasa, jež byla objevena v roce 1976. Katalyzuje spojování fragmentů DNA po jejich syntéze nebo štěpení restrikasami, čímž dává za vznik delším úsekům DNA nebo kruhovým molekulám např. v podobě vektorů s inserty pro transformaci hostitelských buněk. Na rozdíl od DNA polymerasy syntetizující vždy jen jedno vlákno na základě matrice je DNA ligasa schopná pouze polymerace součástí dvouvláknové molekuly DNA bez rozpletení dvoušroubovice [61, 62].

Kromě restrikas pro štěpení DNA a DNA ligasy pro spojování úseků jsou pro experimenty v rámci genových manipulací potřebné i další enzymy, a to především DNA i RNA polymerasa, exonukleasy, alkalická fosfatasa, Klenowův fragment a další. Pro práci s eukaryotickými geny je navíc zapotřebí reverzní transkriptáza izolovaná z retrovirů, která převádí mRNA na tzv. komplementární cDNA. Na rozdíl od prokaryot totiž obsahuje genom eukaryot oblasti nekódující strukturu proteinů, tzv. introny, které jsou po transkripci společně s kódujícími exony přítomny v pre-mRNA lokalizované v buněčném jádře. Po sestřihu do podoby mRNA s pouze kódujícími oblastmi může být RNA matrice vyizolována z cytosolu, následně převedena do podoby cDNA a posléze využita pro genové manipulace [61, 62].

2.3.2.2 Vektory a metody přenosu insertu do buněk hostitele

Po izolaci vybraného genu/vybraných genů a namnožení pomocí PCR je zapotřebí upravit DNA do podoby vhodné pro přenos do hostitelských buněk, zajištění inkorporace do jejich genetického kódu a zajištění případné následné exprese, delece aj. Výběr vhodného vektoru pro přenos insertu souvisí s jeho velikostí a dalších podmínkách experimentů. Přenos do hostitele se na základě cílového organismu nazývá transformace pro bakteriální buňky, transfekce pro eukaryota a transdukce pro viry [61, 62].

Nejjednodušším a nejčastěji využívaným vektorem je plasmid, kruhová doplňková molekula DNA o molekulové hmotnosti 10^6 – 10^8 Da, která se přirozeně vyskytuje u řady mikroorganismů a nese sekundární znaky mikroorganismu jako např. selekční markery v podobě rezistence k antibiotikům (ATB). Velikost insertu, pro niž lze plasmid využít, nabývá 10 000–15 000 párů bází. Přirozeně mohou být předávány mezi buňkami a mají schopnost replikace nezávisle na chromozomální DNA. Mohou být rozděleny na základě účelu na klonovací, jenž slouží k vložení genu do buněk, expresní se silnými promotory zajišťující transkripci a produkci proteinů a podvojně, které jsou využitelné pro prokaryotické i eukaryotické buňky. Pro využívané klonovací plasmidy existují restriční mapy, které limitují využitelnost restriktas. Pro transformaci lze využít elektroporaci nebo přenos do chemokompetentních buněk po expozici chladu v přítomnosti vápenatých iontů (CaCl_2). Aplikační potenciál plasmidů je široký a způsob je poměrně efektivní, přičemž největší limitace spočívá ve stabilním udržení plasmidu v buňce a přenosu do dalších generací [61, 62, 73, 74].

Zatímco přenos plasmidu do hostitele je zapotřebí provést aplikací zmíněných technik, při použití virů tento krok odpadá, jelikož např. bakteriofág infikuje bakterie svojí DNA přirozeně. Do genomu fága je možné zanezt větší inserty, a to o délce 40–50 kbp, kdy stejně jako u plasmidu existuje omezené množství restriktas, které lze využít. Většina DNA fága zůstává zachována kromě genů kódujících proteiny způsobující zánik buňky hostitele. V průběhu životního cyklu fága dochází v buňce při lytické fázi k namnožení DNA fága, a to včetně insertu. Nejznámějším využívaným fágem pro bakterie je modifikovaný bakteriofág λ s lineární dvouvláknovou molekulou DNA obsahující přibližně 50 genů. Kromě bakterií se viry jako vektory s výhodou využívají i u eukaryotních buněk, které plasmidy nedisponují [61, 62, 73].

Benefity plasmidu a fága kombinují kosmidy. Kosmid vzniká zacyklením původně lineární DNA bakteriofága λ , která je pro účely generace kosmidu upravena, a to po vpravení cestou charakteristickou pro fágy. Kromě podobnosti s kruhovou formou je společným znakem s plasmidy přítomnost genů kódujících selektivních markerů (např. rezistence k antibiotikům) a schopnost množení vektoru společně s insertem. Kapacita kosmidů je vyšší jako u fágů, a to až 45 kbp [61, 62, 73].

Inserty větší než přibližně 47 kbp mohou být klonovány prostřednictvím uměle připravených bakteriálních či kvasinkových chromozomů [73].

2.3.2.3 *Selekce klonů nesoucích vektor*

Klonovací vektory často nesou selekční markery, na jejichž základě je možné odlišit buňky s plasmidem, u nichž byl přenos úspěšný, od buněk bez plasmidu. Při výběru plasmidu s daným selekčním markerem musí být respektován cílový organismus tak, aby byl selekční marker efektivní. Rezistence k antibiotikům se projevuje nárůstem kolonií rekombinantů na agarových plotnách s obsahem příslušné látky, a to v důsledku exprese genů na plasmidu kódujících proteiny, které látku degradují. K selekci transformantů lze využít i specifitější techniky vyžadující enzymové aparáty speciálních hostitelských buněk, klonovací vektory a také tuhá media [61, 73].

Porovnání efektivity transformace může být provedeno přímo na úrovni genomu, což je zároveň nejpresnějším důkazem pro ověření nositelů insertu. V praxi lze využít tři způsobů: polymerázové řetězové reakce, restriční štěpení a sekvenace. Často se přitom používají všechny tři, a to postupně po sobě [73, 74].

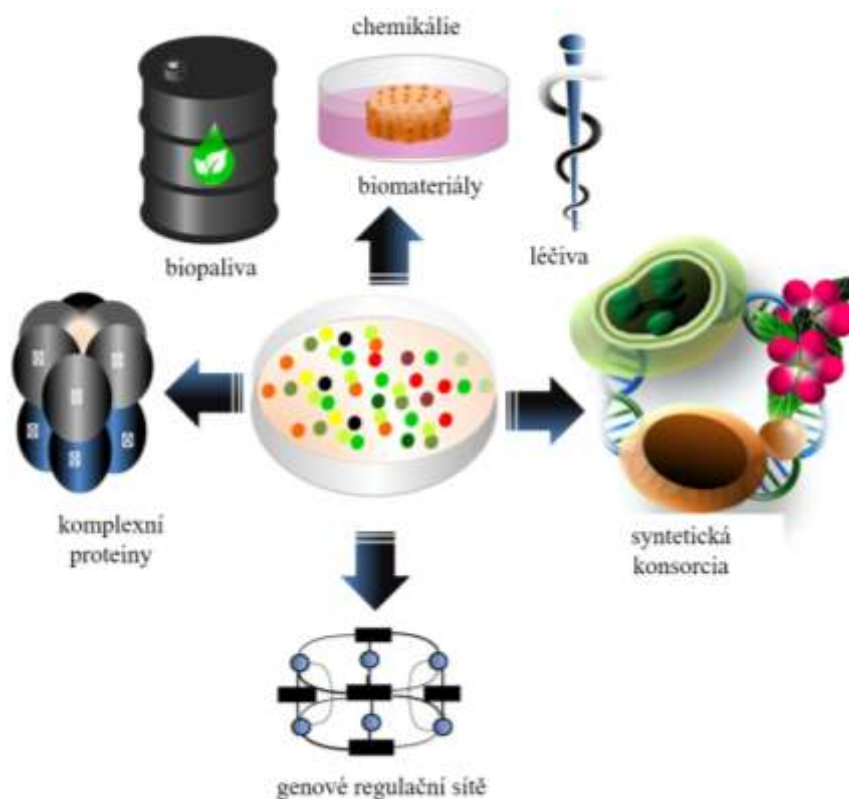
Sekvenace genomu je založena na stanovení pořadí nukleotidů v řetězci DNA, popř. i RNA u transkriptomové analýzy. Kromě tradičních metod zahrnujících Sangerovo či případně Maxam-Gilbertovo sekvenování, se využívají především techniky tzv. sekvenování nové generace (next generation sequencing) vyvíjené od 90. let 20. století, které oproti tradičním disponují vyšší rychlostí a nižší cenou při současné generaci velkého množství dat [75]. Sekvenační metody se dělí na sekvenování druhé a třetí generace. Druhá generace je založena na stanovení nukleotidové sekvence ve fragmentech genomu o délce několika stovek bází, které je nutné pro celogenomové sekvenace v genomu lokalizovat porovnáním s referenčními genomy v databázích nebo pro tento účel využít bioinformatické metody. Kromě fragmentace je zapotřebí provést PCR pro namnožení analyzovaných úseků DNA, což vede ke generování velkého množství dat, jež musí být následně zkomprimována a dále zpracována [75–77]. Z jednotlivých technik se nejčastěji využívá technologie Illumina a Iont Torrent. Sekvenování třetí generace, jenž se v současnosti vyvíjí, nevyžaduje amplifikaci DNA, naopak se zaměřuje na sekvenaci i jediné molekuly ideálně v reálném čase, a to pro výrazně delší úseky DNA. Pomocí vybraných technik lze stanovovat sekvenace např. celých chromozomů, pro dlouhé úseky se jedná primárně o technologii nanopore [61, 75].

2.3.3 Aplikovatelnost technik genového inženýrství

Pro biotechnologické aplikace jsou zapotřebí robustní mikroorganismy s dobrými produkčními vlastnostmi, které lze získat mj. právě technikami genového inženýrství. Po zásahu do genomu zpravidla následuje testování mutanta z hlediska manifestace změn na úrovni fenotypu, přístup je tedy reverzní oproti evolučnímu inženýrství [37].

Dlouhou dobu byly za účelem indukce mutací využívány různé chemické látky nebo záření, jak již bylo uvedeno výše. Přestože takto vznikla řada mutantních kmenů umožňující zkoumat funkce genů a podstatu mutací, byla tato mutagenese nespecifická, což limitovalo změny konkrétních genů nebo jejich sekvencí. Nejpokročilejší specifickou technikou pro úpravu genomu představuje již zmíněná CRISPR/Cas9, s jejímž využitím lze provádět mutace či delece genů a také je lze editovat, tzn. nahrazovat nebo upravovat genom, a to pro jednotlivé buňky nebo celé organismy. Technika využívá systému zajišťujícího přirozenou schopnost bakterií chránit se vůči infekci způsobené bakteriofágy. Cas9 je endonuleasou schopnou štěpit genomovou DNA řady buněk různých organismů tím, že je zacílena na specifickou sekvenci DNA pomocí RNA, která je k ní komplementární. CRISPR je zkratkou pro clustered regularly interspaced short palindromic repeats, tedy segmenty nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetit, které po transkripci do podoby RNA cílí endonuleasu do příslušných komplementárních oblastí DNA. Provedení modifikací genomu aplikací systému CRISPR/Cas9 je poměrně časově nenáročné, efektivní a finančně dostupné. Využívá se v medicíně při designování léčiv, při terapii, pro *in vitro* či *in vivo* modely nemocí a diagnostice, v zemědělství a biotechnologiích generováním geneticky modifikovaných

organismů s výhodnými vlastnostmi a dalších odvětvích, stejně jako pro účely výzkumu [61, 63].



Obr. 6: Možné aplikace genového inženýrství [78]

2.4 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) patří do skupiny biopolymerů především mikrobiálního původu. Z chemického hlediska se jedná o lineární polyestery nejčastěji 3-, ale i 4-, 5- nebo 6-hydroxyalkanových kyselin (Obr. 7) [79], které jsou ukládány v buňkách mikroorganismů ve formě intracelulárních granulí. Vlastnosti PHA mohou být v závislosti na složení značně variabilní, a proto mají potenciál nahradit klasické syntetické plasty vyráběné z ropy, kterým jsou ze všech bioplastů nejpodobnější. Oproti syntetickým plastům disponují řadou výhodných vlastností, a to především možností produkce z obnovitelných zdrojů, biokompatibilitou a biodegradabilitou, která eliminuje problém s akumulací použitých materiálů v životním prostředí [80–83].

2.4.1 Výskyt, vlastnosti a složení PHA

Více než 300 druhů bakterií syntetizuje PHA ve formě intracelulárních granulí, které byly objeveny a popsány už v roce 1926 francouzským vědcem Mauricem Lemoignem [84–86]. Slouží jim jako zásobní látky pro případ nepříznivých podmínek, kdy představují zdroj uhlíku, energie a také redukční síly, což jim ve stresových situacích umožní přežití, dokud nedojde k jejich vyčerpání. Obsah PHA v biomase se odvíjí od konkrétních producentů, ale závisí i na řadě dalších faktorů, které lze při biotechnologické výrobě zohlednit, což může vést až k 90 % výtěžku. Zatímco některé kmeny produkují PHA bez ohledu na prostředí,

Tab. 2: Vlastnosti homopolymeru 3HB a jeho vybraných kopolymerů, porovnání s PP [110]

Polymer	Teplota tání [°C]	Youngův modul [GPa]	Pevnost v tahu [MPa]	Prodloužení při přetržení [%]
P(3HB)	175–180	3,5–4	40	3–8
P(3HB-co-3HV)				
3 mol. % 3HV	170	2,9	38	–
20 mol. % 3HV	145	1,2	32	50–100
P(3HB-co-4HV)				
3 mol. % 4HV	166	–	28	45
10 mol. % 4HV	159	–	24	242
PP (polypropylen)	170–176	1,0–1,7	29,3–38,6	500–900

2.4.2 Možnosti analýzy PHA

Pro posouzení efektivity kultivačních procesů a vlastností polymeru je zapotřebí jejich identifikace zahrnující kvalitativní a kvantitativní analýzu a materiálová charakterizace. Vzhledem k různému obsahu PHA v buňkách a jejich různorodosti jsou kladeny požadavky na spolehlivé a dostatečně citlivé metody, které by měly být zároveň rychlé a jednoduché. Kromě analýze samotného materiálu jsou využívány i techniky provádějící screening PHA produkujících bakterií již při růstu. Jednotlivé metody zahrnují využití specifických barviv, spektrofotometrické stanovení, infračervenou spektroskopii s Fourierovou transformací (FT-IR), fluorimetrii, průtokovou cytometrii, vysokotlakou kapalinovou chromatografii (HPLC), plynovou chromatografii (GC), nukleární magnetickou rezonanci (NMR), techniky pro stanovení molekulové hmotnosti a techniky termické analýzy [111, 112].

2.4.2.1 Metody založené na vizualizaci PHA

Již od jejich objevení byly PHA popisovány jako sudanofilní inkluze, a to díky lipidické povaze. Pro specifické barvení granulí se tedy využívají lipofilní barviva, která se v nich kumulují a umožňují tím jednoduchou vizualizaci při kombinaci s dalšími technikami. I přes to, že se při aplikaci barviv mohou kromě polymeru obarvit i jiné komponenty buňky, jedná se o poměrně jednoduchou a využívanou techniku pro screening PHA produkujících mikroorganismů [84, 85, 112].

Označení sudanofilní je odvozeno od sudanové černi B, která byla pro barvení PHA granulí využívána již od jejich objevu, a částečně se využívá dodnes např. pro detekci pozitivních kolonií. Další možností je využití nilské modři A, která po fixaci ve vzorku vykazuje po excitaci v přítomnosti PHB granulí jasně oranžovou fluorescenci, a na rozdíl od předchozí je více selektivní, nedochází k obarvení dalších tělísek jako glykogenu či polyfosfátu. Upravením podmínek lze analýzu provést i nedestruktivně, a tím zajistit následnou selekci pozitivních kolonií. Pro screening kolonií a následnou nedestruktivní selekci lze využít např. i nilskou červeň. Při využití mikroskopie s fázovým kontrastem lze pozorovat granule díky jejich vysokému refrakčnímu indexu i bez nutnosti barvení [84, 85, 88, 98, 112–116].

2.4.2.2 Metody kvalitativní a kvantitativní analýzy

Spektrofotometrické metody slouží oproti předchozímu barvení především ke kvantifikaci, a to i malého množství polymeru. Byla vyvinuta metoda specifická pro stanovení

homopolymeru PHB založená na převedení monomeru na kyselinu krotonovou zahříváním v koncentrované kyselině sírové, a to po digesci buněk pomocí chlornanu sodného. Množství polyesteru se stanovuje na základě absorpce v UV oblasti při 235 nm [112, 117, 118].

Pro stanovení prostřednictvím vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), konkrétně iontové, je zapotřebí stejně opět provést převedení PHB na kyselinu krotonovou, která je po chromatografické separaci kvantifikována opět spektrofotometricky. Separační krok zabraňuje případným interferencím při absorpci a zvyšuje tak i celkovou citlivost [119].

Plynová chromatografie není schopna analyzovat polymer jako celek, nýbrž vyžaduje předchozí úpravy do podoby těkavých složek reprezentujících zastoupení jednotlivých monomerních jednotek. Příprava vzorku spočívá v izolaci polymeru z biomasy buď digesčními, nebo extrakčními metodami, následné či současné hydrolýze polymeru na jednotlivé monomerní jednotky a posléze k esterifikaci za vzniku nejčastěji methylesterů hydroxyalkanových kyselin. Při optimalizacích byly využívány různé kyseliny pro hydrolýzu a současně pro katalýzu esterifikace, konkrétně kyselina sírová či chlorovodíková, ale i rozdílné alkoholy účastníci se esterifikace, což může dát za vznik methyl-, ethyl, ale i propylesterů hydroxyalkanových kyselin. Druhou možností přípravy vzorku představuje využití pyrolyzních technik a následné přímé analýzy těkavých produktů. Po chromatografické separaci následuje detekce jednotlivých analytů, kdy nejčastěji využívané jsou sestavy s plamenově ionizačním detektorem nebo tandemové spojení s hmotnostní spektrometrií, která zvyšuje celkovou citlivost analýzy [112, 120–123].

Výhoda NMR při analýze PHA spočívá především v možnosti analýzy vyizolovaného polymeru bez nutnosti hydrolýzy a další derivatizace. Jako rozpouštědlo při ^1H NMR se nejčastěji využívá deuteriovaný chloroform [112].

2.4.2.3 Metody charakterizující fyzikálně-chemické vlastnosti PHA

Metodu infračervené spektroskopie lze využít pro kvalitativní i semikvantitativní stanovení PHA jednak přímo v buňkách jednak pro posouzení např. krystalinity u vyizolovaných folií či prášků, a to nejčastěji metodou KBr tablet nebo ATR krystalu. Ke zpracování dat z analýzy se používá metoda Fourierovy transformace za vzniku FT-IR spekter. Pro PHA je ve spektru nejvíce charakteristický pík při 1728 cm^{-1} odpovídající karbonylu a další píky, které mohou být specifické pro různé délky postranního řetězce, čímž se od sebe dají odlišit scl- a mcl-PHA a také lze posuzovat krystalinitu analyzovaného polymeru [112, 124, 125].

Pro stanovení molekulové hmotnosti PHA se využívají nejčastěji metody statického rozptylu světla nebo osmometrie. Mimoto byly za tímto účelem prováděny i experimenty založené na gelové permeační chromatografii nebo viskozimetrické stanovení [112].

Prostřednictvím metod termické analýzy, především pomocí diferenční skenovací kalorimetrie (DSC), lze stanovit základné charakteristiky polymeru reflektující mechanické a tepelné vlastnosti, a to teplotu skelného přechodu nebo teplotu tání. Tepelná stabilita může být studována pomocí termogravimetrické analýzy [112, 126].

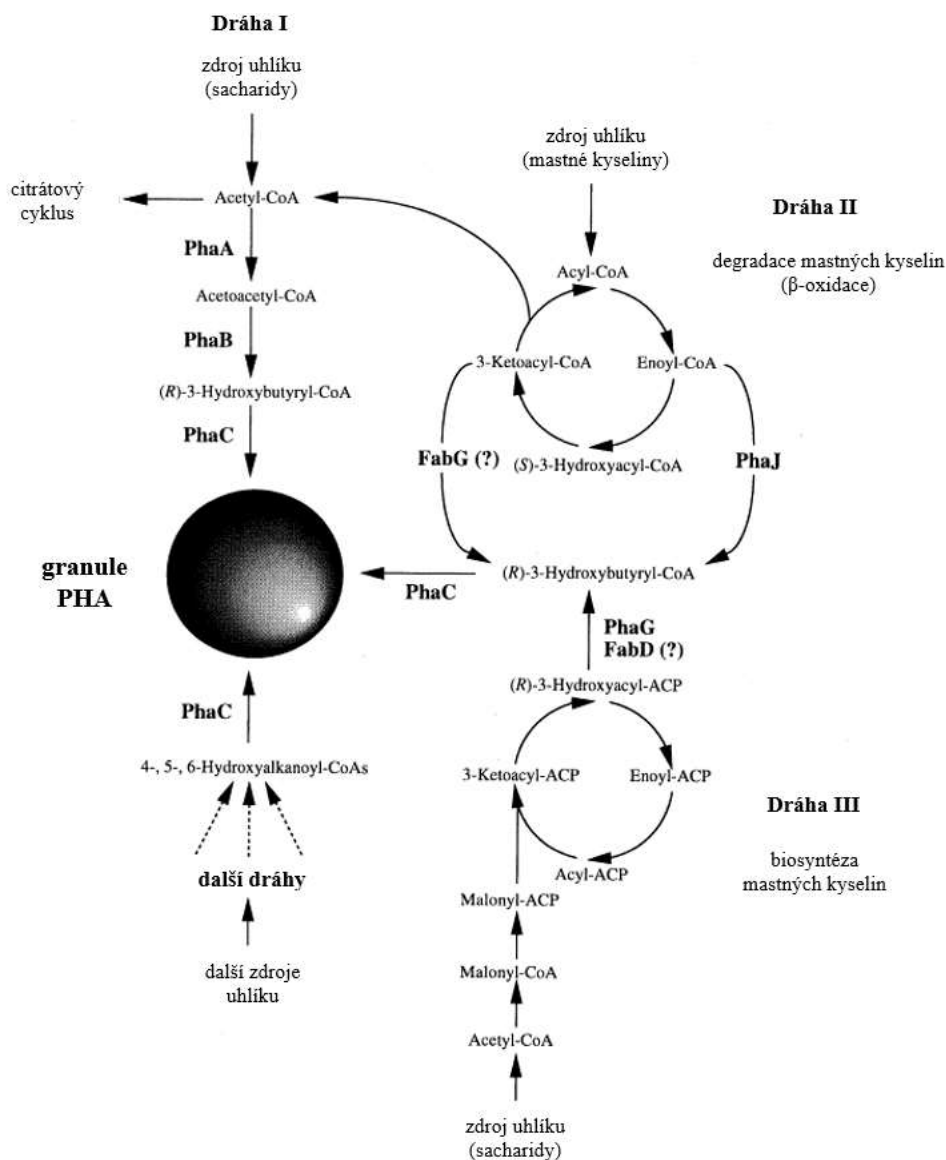
2.4.3 Biosyntéza PHA

Biosyntetické dráhy vedoucí k produkci PHA se odvíjí od uhlíkatého zdroje. Byly popsány tři hlavní dráhy napříč metabolismy známých produkujících kmenů, kdy rozdíl v nich se spočívá v úpravě zdroje uhlíku do podoby substrátu pro PHA syntasu (Obr. 8). Všechny tři dráhy jsou popsány pro biosyntézu PHA z 3-hydroxyalkanových kyselin, pro 4-, 5- a 6-hydroxyalkanové kyseliny je navržena dráha čtvrtá, která není na rozdíl od předchozích v tomto textu popsána detailně [103, 127].

První dráha je specifická pro produkci scl-PHA, popsána byla pro produkci PHB u kmene *Cupriavidus necator*. Vychází z cukerných substrátů převedených na acetyl-CoA, substrát β -ketoacylthiolasy (PhaA), která katalyzuje Claisenovu kondenzaci dvou molekul acetyl-CoA za vzniku acetoacetyl-CoA a odstoupení volného koenzymu A. Pomocí NADPH-dependentní acetoacetyl-CoA reduktasy (PhaB) je substrát přeměněn na (*R*)-3-hydroxybutyryl-CoA, který může být následně polymerizován stereospecifickou PHB syntasou (PhaC) na poly(3-hydroxybutyrát) za odstoupení volného koenzymu A. Geny *phaA*, *phaB* a *phaC* tvoří operon *phaCAB* pouze u kmenů *C. necator*, *Pseudomonas acidophila* a *Alcaligenes latus*, u řady dalších producentů jsou lokalizovány na jiných místech genomu. Stejně tak u některých producentů může být reduktasa namísto NADPH NADH-dependentní [80, 103, 105, 128, 129].

Dráha vycházející z meziproductů degradace mastných kyselin může vést k produkci scl-PHA z odstupujícího acetyl-CoA nebo mcl-PHA z různých acyl-CoA. Při β -oxidaci vznikají (*S*)-3-hydroxyacyl-CoA, které nemohou být využity jako substrát pro PHA syntasu, proto musí polymeraci předcházet izomerace katalyzovaná (*R*)-specifickou enoyl-CoA hydratase (PhaJ). Vzniklé (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA mohou být inkorporovány do struktury polymerů prostřednictvím PHA syntas s příslušnou substrátovou specifitou. Z této dráhy může vznikat kromě mcl-PHA i kopolymer P(3HB-*co*-3HV) patřící mezi scl-PHA. Nejtypičtější je dráha pro rod *Pseudomonas*, a to při využití řady alkanů a mastných kyselin jakožto zdrojů uhlíku [80, 103, 127–129].

Poslední popsaná dráha vedoucí k biosyntéze mcl-PHA může stejně jako první dráha vycházet ze sacharidů, ale i z dalších jednoduchých zdrojů uhlíku. Vznikající acetyl-CoA ale na rozdíl od dráhy první pokračuje do biosyntetické dráhy mastných kyselin, kde se generují různé (*R*)-3-hydroxyacyl-ACP. Prostřednictvím reakce katalyzované 3-hydroxyacyl-ACP-CoA transferasou (PhaG) jsou převedeny na jejich (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA formy, které jsou využitelné jako substrát pro PHA syntasy [80, 103, 127–129].



Obr. 8: Biosyntetické dráhy PHA [98]

2.4.3.1 Využití odpadních substrátů

Na základě možností biosyntézy lze říci, že pro produkci PHA lze využít sacharidické substráty, stejně jako substráty s obsahem mastných kyselin. Při identifikaci nových obnovitelných zdrojů uhlíku za účelem produkce PHA je tedy zapotřebí povahu substrátu zohlednit. Využití odpadních substrátů vede ke snížení nákladů na produkci PHA, a tím je činí konkurenceschopné při porovnání s tradičními petrochemickými plasty. Jako zdroje uhlíku a živin se často využívají odpadní produkty z různých segmentů průmyslu nebo zemědělství, a to především lignocelulosová biomasa, odpadní oleje, syrovátka, melasa anebo odpadní glycerol [130].

Přestože je lignocelulosová biomasa nejrozšířenějším, a tedy i nejlevnějším odpadním produktem řady výrob, musí být pro využití jako substrát nejvíce upraven. Po hydrolýze vedoucí až ke vzniku fermentovatelných sacharidů, především glukosy, jsou v hydrolyzátech přítomny vlivem rozkladu ligninu i látky působící jako mikrobiální inhibitory, proto je

vhodné hydrolyzáty detoxifikovat. Přítomnost organických kyselin, například kyseliny octové a levulové, může působit jednak jako inhibitor, ale s využitím adaptovaných kmenů mohou být tyto kyseliny naopak využity pro syntézu společně se sacharidy, čímž se zvyšuje účinnost celého procesu [131].

Přestože efektivita kultivace na odpadních substrátech může být vlivem složitosti těchto matric nižší, tak v kombinaci s výběrem vhodných producentů, které mohou být navíc vhodnými technikami upraveny, činí procesy konkurenceschopnými s ohledem na výslednou cenu vyprodukovaného polymeru [132].

2.4.4 Degradace PHA

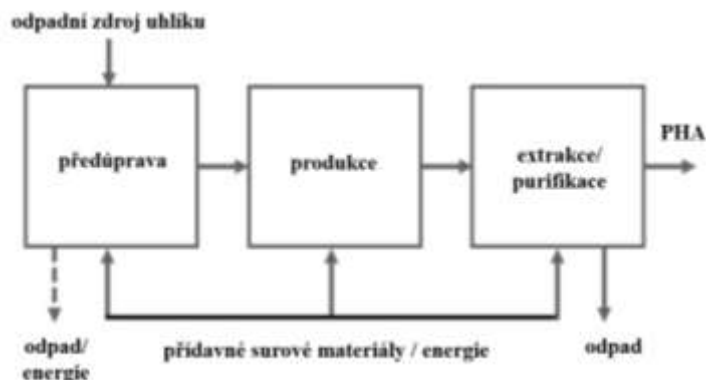
Degradaci PHA může být rozdělena na intracelulární a extracelulární, a to na základě povahy polymeru. Rozklad je katalyzován depolymerasami, které hydrolyticky štěpí esterovou vazbu v polymeru za uvolňování oligomerních a monomerních jednotek. Při intracelulární degradaci dochází k utilizaci amorfního PHA naakumulovaného v granulích při vyčerpání původních zdrojů uhlíku a energie a extracelulární degradace přímo souvisí s biodegradabilitou materiálu [98].

Intracelulární PHA depolymerasa, která obklopuje polyesterové jádro, štěpí amorfní polymer rychlostí závislou na aktuálním stavu buňky. Hydrolyza nastává i v případě dostatečného přísunu zdroje uhlíku a energie, ale oproti biosyntéze je asi desetkrát pomalejší, což poté neplatí v případě, kdy buňka např. hladoví. Obecně platí, že ve vodě nerozpustný polymer je při degradaci převeden na ve vodě rozpustné oligomery a monomery, které mohou být dále metabolizovány, čehož je využíváno i při extracelulární degradaci [98, 133, 134]. Extracelulární PHA depolymerasa, která je buňkou uvolňována do prostředí, částečně štěpí často vysokomolekulární polymer s různým stupněm krystalinity na monomery či oligomery, které mohou procházet do buňky a tam být dále metabolizovány za účelem zisku uhlíku a energie. Rychlost degradace nezáleží na fyziologickém stavu buňky, ale spíše na charakteristikách polymeru s ohledem na jeho složení, molekulovou hmotnost, dostupný povrch, krystalinitu, přítomnost aditiv, apod. a také na podmínkách prostředí jako teplota, vlhkost, pH a přítomnosti dalších nutrientů pro mikroorganismy. Doba degradace materiálu může mj. v závislosti na prostředí představovat horizont týdnů až let, kdy při aerobní degradaci PHA vzniká až oxid uhličitý a voda, anaerobně vzniká methan [98, 135–139].

2.4.5 Scale-up biotechnologické produkce PHA

Pro úspěšnou velkoobjemovou biotechnologickou produkci polyhydroxyalkanoátů jsou klíčové především tři faktory, a to co nejnižší náklady na substrát, na vývoj procesu a také na down-streamový izolační proces. Biokonverze odpadních substrátů na PHA ve většině případů všechny tři nároky splňuje, přičemž výtěžek se může pro různé substráty lišit, stejně jako produktivita s využitím různých producentů. Volbou vhodných substrátů či jejich kombinací lze cíleně produkovat relativně velká množství homopolymerů a kopolymerů PHA s volitelnou molekulovou hmotností, kdy kombinace různých substrátů může kompenzovat jejich nedostatky s ohledem na zastoupení živin [140, 141].

V průmyslovém měřítku bývá po optimalizaci procesu výroba PHA zapojena do konceptu biorafinerie. Proces implementace odpadních surovin do biotechnologické produkce sestává ze tří hlavních kroků (Obr. 9); a to úpravy původní suroviny do podoby vhodné pro fermentaci, samotném procesu produkce a následné izolaci a purifikaci polymeru [141].



Obr. 9: Zjednodušené schéma velkoobjemové produkce PHA s využitím odpadních substrátů [141]

Kromě produkce může být rozdělen na jednotlivé fáze, konkrétně na předúpravu, růst kultury a poslední fází je zvýšená biosyntéza a akumulace PHA v biomase. Vlivem povahy odpadních substrátů je velmi důležitá i druhá část produkčního procesu zaměřená na nárůst kultury tak, aby byl dostatečný, jelikož substráty po úpravě mohou obsahovat řadu látek, které mohou působit inhibičně. Pro kultivaci je žádoucí vysoká efektivita procesu, což lze kromě případné detoxifikace substrátu ovlivnit i volbou vhodného produkčního kmene. Kromě čistých kultur mohou být využívány i směsné kultury, přičemž čisté kmeny bývají nejrozšířenější při laboratorních experimentech, kdy u nich během let výzkumů docházelo především k optimalizaci produkce PHA volbou různých substrátů. Nejvíce pozornosti zaznamenaly rod *Bacillus*, kmen *Cupriavidus necator* a halofilní rody *Halomonas* a *Haloferax* díky snížení nároků na sterilitu procesu. Pro genové manipulace se využívá primárně kmen *E. coli*. Výhoda směsných kultur spočívá ve snížení nákladů na celkový proces oproti využití čistých kultur, a to vzhledem k nižším nárokům na sterilitu a celkové provedení. U směsných kultur zaznamenává nejširší využití aktivovaný kal z čistíren odpadních vod, který se ve své původní podobě pro produkci PHA příliš nehodí, proto se musí různými postupy obohacovat o kmeny schopné produkce významného množství PHA v biomase. Za tímto účelem se často využívá princip založený na střídavém přívodu živin a fázi hladovění, kdy si při nadbytku uhlíkatého zdroje ve vhodném mediu PHA produkující mikroorganismy tvoří polymer, který při fázi hladovění využívají jako rezervní zdroj uhlíku a energie, zatímco PHA neprodukující mikroorganismy při fázi hladovění postupně odumírají. Mikrobiální kultura se tak během jednotlivých cyklů obohacuje o PHA produkující mikroorganismy, což se příznivě projeví na výtěžku produktu při kultivaci [141].

Při převedení kultivace z laboratorního měřítko do velkých objemů zpravidla dochází ke snížení výtěžku PHA v biomase, proto i zde probíhá optimalizace přísady různých lehce utilizovatelných zdrojů uhlíku jako např. glycerol. Oproti laboratorním experimentům se totiž pro produkci zpravidla nevyužívají syntetické zdroje uhlíku, které jsou jednoduše přístupné. Z

hlediska kultivačních módů byla provedena řada experimentů s využitím vsádkových, příkrmových i kontinuálních kultivací v bioreaktorech, a to jedno- či vícestupňových, z nichž má každý své charakteristiky. Volba módu poté závisí na konkrétní situaci s ohledem na využívaný mikroorganismus, substrát, potřebu nárůstu kultury, požadavků na monitorování procesu apod. Po kultivaci následuje sklizení biomasy, izolace polymeru a v závislosti na požadavkům na čistotu také jeho purifikace [140, 141].

2.4.6 Využití GMO pro produkci PHA

Techniky molekulární biologie lze ve spojitosti s produkcí PHA využít primárně ve dvou případech, a to při analýze markerů podmiňujících produkci na úrovni genomu, a pro konstrukci rekombinantních kmenů produkujících PHA s případnými vylepšeními na úrovni fenotypu. Pro konstrukci nových producentů se do genomu často implementuje operon *phaCAB* kódující enzymy zajišťující produkci PHB, ale i další geny, které mohou mít za následek zlepšení produkčních vlastností. Stejně tak mohou být modifikace založeny na deleci genů. Metoda integrace operonu byla v minulosti využita pro přípravu PHB produkujícího rekombinantního kmene *E. coli*, kdy kmen jako takový disponuje kratší generační dobou, vyšší růstovou teplotou, vhodnými vlastnostmi pro extrakci a především není schopen degradace PHB. Vyjma mikroorganismů jsou prováděny experimenty zaměřené na produkci PHA v zemědělských plodinách, které oproti mikroorganismům rostou výrazně pomaleji a množství PHA je mnohem nižší, ale mají podstatně vyšší výtěžky biomasy a navíc mají i další potenciál pro využití. Kromě implementace operonu *phaCAB* mohou být rostliny upraveny i jinak, a to např. zvýšením odolnosti vůči nepříznivým podmínkám prostředí, vůči škůdcům apod. Jako nejvhodnější producent pro produkci se jeví např. proso prutnaté (*Panicum vigatum*), které bývá nejčastěji geneticky modifikováno prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens* [142–144].

Jedním z hlavních cílů úpravy genomu je zavedení produkce nebo její navýšení u slibných mikrobiálních producentů. Genová manipulace byla provedena i u mořských cyanobakterií, kdy Miyasaka a kolektiv (1998) implementovali operon pro biosyntézu PHA z *Cupriavidus necator* do genomu cyanobakterie. Na rozdíl od heterotrofních mikroorganismů jsou sinice schopny využívat jako zdroj uhlíku oxid uhličitý, který konvertují na organickou hmotu. Expresí cizorodých genů prostřednictvím vektorového promotorového systému v cyanobakteriích docházelo k produkci a akumulaci PHB až do 17 % hmotnosti biomasy [145].

Důležitým aspektem pro genové úpravy je schopnost kmenů využívat netradiční zdroje uhlíku, které vedou ke snížení produkčních nákladů, a to i s ohledem na produkci kopolymerů. Li a kolektiv (2010) se zaměřili na přípravu rekombinantní *E. coli* schopné produkce kopolymeru P(3HB-co-4HB), a to vnesením operonu *phaCAB* z modelového producenta PHA *Cupriavidus necator* zajišťující produkci PHB a genu *orfZ* z dráhy degradace sukcinátu u *Clostridium klyuveri*, který zajišťuje biosyntézu 4HB-CoA. Kromě koexprese vložených genů byla u *E. coli* provedena delece genů *sad* a *gabD* kódujících sukcinát semialdehyd dehydrogenasu, která odklání meziprodukt skrze sukcinát do Krebsova cyklu, kde je degradován namísto inkorporace do kopolymeru. Optimalizací procesu při růstu

na glukose byl získán výtěžek biomasy 9,4 g/L obsahující 65,5 % kopolymeru P(3HB-co-4HB) s 11,1 mol. % obsahem 4HB. Kromě glukosy byly testovány i další uhlíkaté zdroje, s nimiž bylo získáno vyšší množství biomasy se zachováním množství polymeru [146].

Pomocí metod genových manipulací mohou být upravovány i kmeny, které PHA produkují přirozeně, kdy jsou cíleně upravovány jejich charakteristiky za účelem produkce kopolymerů. Chen a kolektiv (2017) se ve své práci věnovali přípravě rekombinantního halofilního kmene *Halomonas bluephagenesis* TD01 a dalším formám za účelem produkce kopolymeru P(3HB-co-4HB). Bez úprav je kmen schopný produkce významného množství homopolymeru PHB a kopolymeru P(3HB-co-3HV). Pro přípravu transformantů využili znalosti z metabolismu prekurzorů 4-hydroxybutyrátu, konkrétně γ -butyrolaktonu, kmenů schopných jeho produkce a na tomto základě provedli úpravy kmene. Konkrétně provedli inserci genu *orfZ* kódujícího 4HB-CoA transferasu pocházející z *Clostridium kluyveri*, která převádí 4HB na 4HB-CoA, jež může být následně využit pro inkorporaci do kopolymeru. Navíc byl za účelem navýšení podílu 4HB v kopolymeru zaveden efektivní a stabilní expresní systém s využitím *tac* promotoru. Rekombinantní kmen byl připraven konjugací s kmenem *E. coli* S17-1, do něhož byl elektroporací vpraven plasmid pro následnou homologní rekombinaci do genomu halofila, a to jednak do chromozomu, jednak do plasmidu, čímž byli získáni příslušní transformanti. Při optimalizaci procesu byla kromě množství prekurzoru optimalizována i míra exprese heterologního genu prostřednictvím induktoru IPTG [147].

Ye a kolektiv (2018) také pracovali s kmenem *Halomonas bluephagenesis* TD01, ze kterého připravili rekombinantní kmeny pomocí kombinace úprav. Provedli také inserci genu *orfZ*, ale kromě ní provedli navíc delecí genu *gabD* kódujícího sukcinát semialdehyd dehydrogenasu, aby nebyly meziprodukty produkce 4HB-CoA odváděny do Krebsova cyklu a degradovány. Jako prekurzor byl využit γ -butyrolakton, jehož množství a dávkování byla optimalizována 60–70% konverze substrátu na 4HB při fed-batch kultivaci. Jako substráty byly využity glukosa a odpadní glukonát. Kombinací substrátu a prekurzoru dosáhli výtěžku biomasy 90 g/L při 74% obsahu kopolymeru s 13–15 mol. % frakcí 4HB [148].

Höfer a kolektiv (2010) využili methylotrofní kmen *Methylobacterium extorquens* schopný produkce PHA z biomethanolu, který není na rozdíl od klasických kultivací využívajících sacharidy konkurenční k potravinářské výrobě či krmivářství. Kromě methanolu byl kmen ATCC 55366 kultivován i na nenasycených vyšších mastných kyselinách, které rovněž patří mezi odpadní produkty, a díky schopnosti utilizace široké škály substrátů bylo možné připravovat polyestery PHA s požadovanými vlastnostmi pro cílové aplikace. Funkcionalizované PHA není schopen produkovat původní sbírkový kmen, nýbrž až rekombinantní kmeny po inkorporaci genů *phaC1* nebo *phaC2* ze *Pseudomonas fluorescens* GK13, a to s využitím indukovatelného redukovatelného expresního systému. Přestože rekombinantní kmeny s odlišnými geny preferenčně produkovaly vybrané typy monomerů na základě utilizace rozdílných mastných kyselin, produkovány byly především polymerní blendy vzniklé následky kombinací kmeni přirozených a získaných PHA syntas. Jako nejslibnější kandidát pro syntézu PHA s požadovanými vlastnostmi se jevil kmen *M. extorquens-phaC2* [149].

Gao a kolektiv (2012) se věnovali přípravě rekombinantního kmene *E. coli* schopného produkce scl- i mcl-PHA. Do kmene byl naklonován gen kódující PHA syntasu PhaC2Ps z kmene *Pseudomonas stutzeri* 1317, což vedlo k expresi obou typů PHA, ale s malým výtěžkem produktu vlivem nízké a nestabilní exprese implementovaného genu. Za účelem zvýšení výtěžku byly provedeny optimalizace zajišťující efektivnější expresi genu, což mělo za následek až 16násobné navýšení produkce PHB či 4násobné navýšení produkce polymerních blendů PHB s mcl-PHA v závislosti na použitelném substrátu. V rámci úprav byla provedena optimalizace kodonu a zavedena vlásenková struktura do mRNA, což obojí manifestovalo vyšší efektivitou exprese a tím vyšší výtěžností [150].

Xiong a kolektiv (2018) aplikovali CRISPR/Cas9 techniku na PHA produkující bakteriální kmen *Cupriavidus necator*. Efektivita transformace je u kmene velmi nízká při využití elektroporace a prakticky neproveditelný je tepelný šok, nejvhodnějším přístupem k přenosu plasmidu je proto využití procesu konjugace. Za tímto účelem byl použit kmen *Escherichia coli* S17-1. Po transformaci pomocí konjugace provedli v genomu *C. necator* delecii dvou genů kódujících restriční endonukleasy, které zabraňují efektivní elektroporaci, což bylo následně experimentálně prokázáno. Mimoto bylo zjištěno, že exprese proteinu Cas9 lokalizovaného v plasmidu byla negativně ovlivňována množstvím přítomné fruktosy, která ovlivňovala inducibilní pBAD promotor standardně reagující na přítomnost arabinosy. U mutantních kmenů se podařilo zvýšit efektivitu transformace pomocí elektroporace, což může být dále využito k úpravě kmene s ohledem na produkci PHA a navýšení utilizace oxidu uhličitého u použitého fakultativně chemolithoautotrofního mikroorganismu [151].

3 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem disertační práce je aplikace technik evolučního a genového inženýrství na bakteriální kmeny schopné produkovat polyhydroxyalkanoáty s ohledem na kvantitativní i kvalitativní charakteristiky produkovaného polymeru. Mimoto byla práce zaměřena na biotechnologickou produkci PHA s využitím odpadů z potravinářského průmyslu a taktéž vývoj alternativního způsobu izolace těchto biopolymerů.

Dílčí cíle práce:

1. **evoluční inženýrství** vybraných PHA producentů ve smyslu jejich adaptace na vybrané mikrobiální stresory, metabolická charakterizace získaných adaptovaných kmenů a ověření biotechnologického potenciálu pro produkci PHA u nejslibnějších z nich;
2. **genové inženýrství** vybraných producentů PHA ve smyslu zavedení a optimalizace postupů umožňujících stanovit genovou expresi vybraných genů, výběr vhodných cílů pro genové manipulace, zavedení technik pro vybrané kmeny;
3. **využití získaných kmenů** při biotechnologických produkcích, kultivace adaptovaných kmenů získaných během evolučního inženýrství v laboratorním bioreaktoru, využití odpadních substrátů z potravinářského průmyslu (odpadní olej, hydrolyzáty lignocelulosové biomasy) jako substrátů pro kultivace, podrobná materiálová charakterizace připravených materiálů;
4. **vývoj alternativního způsobu izolace PHA** se zaměřením na snížení ekologických a ekonomických aspektů standardního extrakčního přístupu, využití výhodných vlastností extrémofilních mikroorganismů.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

V rámci kapitoly věnované výsledkům a diskuzi jsou obsažena data publikovaná v rámci článků v impaktovaných časopisech, a to s popisem výsledků. Publikované články tvoří součást této disertační práce, jejich seznam je uveden včetně informací o podílu na autorství v kapitole 10, v rámci další kapitoly (kapitola 11) jsou jednotlivé výstupy přiloženy. Používané metody a postupy jsou podrobně popsány v rámci jednotlivých výstupů v přílohách.

Disertační práce je zaměřena především na evoluční inženýrství bakteriálních producentů polyhydroxyalkanoátů. Aplikací technik v rámci jednotlivých metodik představuje hlavní úsilí úprava produkčních charakteristik mikroorganismů s ohledem na kvantitu vyprodukovaných PHA, ale i kvalitativní zastoupení různých monomerů v kopolymerech, a to P(3HB-co-3HV) a P(3HB-co-4HB) při růstu na chemicky čistých substrátech, ale i odpadních materiálech, pocházejících často z potravinářského průmyslu, majících potenciál i pro velkokapacitní výrobu. Produkci kopolymeru 3HB s 3HV byla věnována především část práce zaměřená na adaptaci kmene *Cupriavidus necator* H16 CCM 3726 na kyselinu levulovou (podkapitola 11.1), která se přirozeně nachází v hydrolyzátech lignocelulosových materiálů a vystupuje jako inhibitor mikrobiálního růstu. Zisk kmenů schopných růst při vyšší koncentraci kyseliny levulové je žádoucí nejen s ohledem na celkovou výtěžnost procesu, ale také pro zisk kopolymeru s vyšší podílem 3HV, jelikož bakterie je schopna kyselinu využít za vzniku propionyl-CoA a ten následně využít jako prekurzor pro pětiuhlíkatý monomer 3-hydroxyvalerát, který následně začlení do kopolymeru.

Dlouhodobému adaptačnímu procesu byly v dalších experimentech vystaveny kmeny *Halomonas halophila* a opět i *Cupriavidus necator* H16, kdy byly využity stresové podmínky relevantní pro reálné biotechnologické procesy, a to přítomnosti organických kyselin (octová a levulová) pro *H. halophila* CCM 3662^T a vyššímu osmotickému stresu respektive přítomnosti vyšší koncentrace měďnatých iontů představujících antropogenní polutant pro *C. necator* H16 (podkapitola 11.2). Přestože se opět jednalo o experiment v rámci evolučního inženýrství, strategie experimentu a časový horizont byly odlišné. Z hlediska produkce PHA byla v průběhu evolučních experimentů sledována kvantitativní charakteristika polymeru, jelikož kmen *H. halophila* není schopen utilizace kyseliny levulové, což bylo potvrzeno mj. i stanovením její residuální koncentrace v supernatantech po kultivaci.

Další část práce (podkapitola 11.4) pojednává o využití extrémofilů k produkci PHA na modelových hydrolyzátech lignocelulosové biomasy. Jako mikroorganismy byly využity středně halofilní kmen *H. halophila* již využívaná pro evoluční experimenty, která disponuje schopností využívat širokou škálu uhlíkatých substrátů, termofilní kmen *Schlegelella thermodepolymerans* disponující unikátní schopností utilizace xylosy, která bývá v hydrolyzátech hojně zastoupena, a mesofilní *Burkholderia sacchari*, která podobně jako *H. halophila* dokáže metabolizovat širokou škálu uhlíkatých substrátů. Právě vysoká katabolická flexibilita je výhodná vzhledem k využití odpadních substrátů, které často obsahují pestrou paletu různých sacharidů. Obecně platí, že extrémofilní producenti PHA jsou z biotechnologického hlediska velice atraktivní a plně zapadají do moderního konceptu

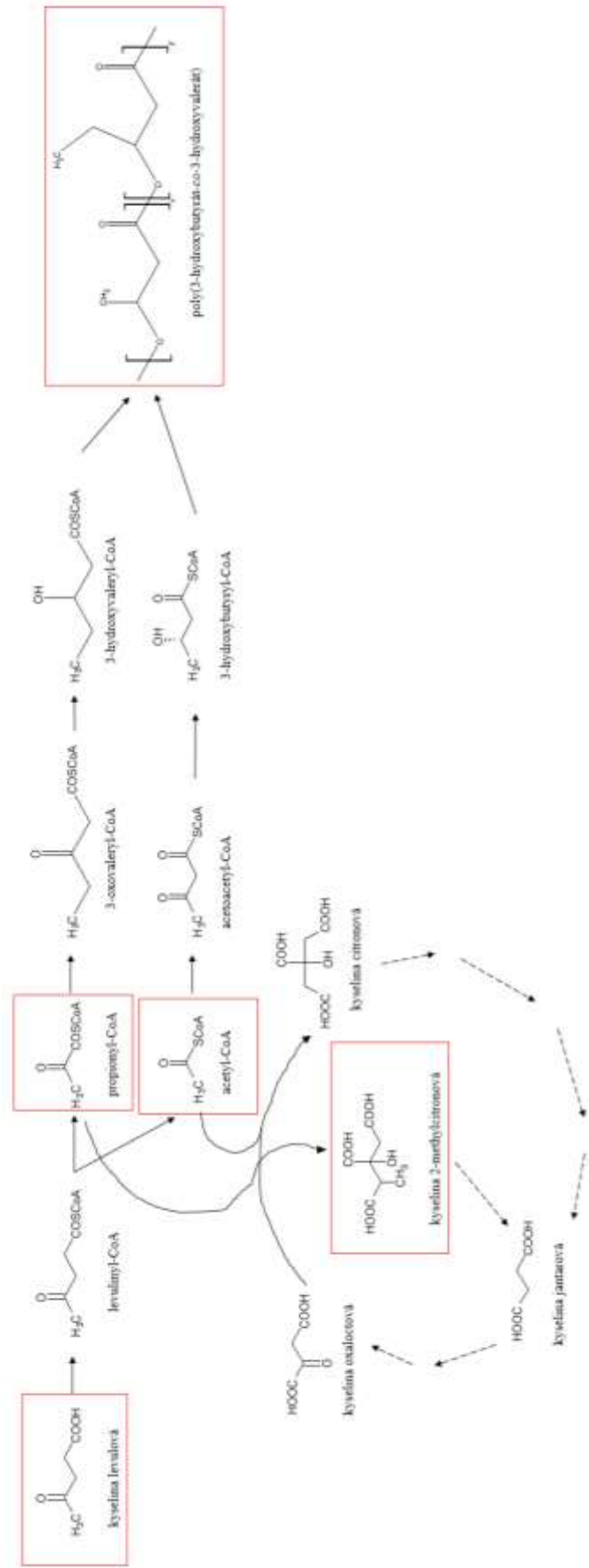
průmyslových biotechnologií nové generace (NGIB). Extrémní podmínky (např. vysoká salinita nebo kultivační teplota), při kterých extrémofily přirozeně rostou, zamezují kontaminaci, čímž se snižují nároky na sterilitu procesu a zařízení. To ve svém důsledku vede ke snížení energetických, ekonomických a také technologických nároků a nákladů. Kromě samotné produkce PHA pomocí extrémofilů byla vyvinuta a optimalizována ekologicky šetrná metoda izolace polymeru z mokré biomasy, kde bylo opět využito unikátních charakteristik vybraných extrémofilních mikroorganismů (podkapitoly 11.5 a 11.6).

4.1 Evoluční inženýrství producentů PHA

Obecně lze vylepšení růstových či produkčních charakteristik mikrobiálních producentů nebo i biotechnologických procesů dosáhnout více přístupy. Jeden z nich představují cílené metody genového inženýrství, alternativní přístup spočívá v aplikaci evolučního inženýrství, kdy vznikají adaptované fenotypy bez předchozí typizace na úrovni genomu. V rámci předložené disertační práce byly experimenty zaměřené na evoluční inženýrství aplikovány na mikroorganismy produkující PHA, a to jednak za účelem celkového navýšení produkce polymeru v přítomnosti stresorů, ale i za účelem produkce kopolymerů s vyšším zastoupením 3-hydroxyvalerátu (3HV) v prvním evolučním experimentu, případně 4-hydroxybutyrátu (4HB) v případě dlouhodobého adaptačního experimentu. V neposlední řadě bylo smyslem adaptačních experimentů také posoudit význam PHA v kontextu adaptace konkrétního bakteriálního kmene na vybraný stresor.

4.1.1 Adaptace *C. necator* H16 na kyselinu levulovou

Myšlenka vedoucí k adaptaci na kyselinu levulovou pramenila ze dvou hlavních idejí. První z nich spočívala ve skutečnosti, že se jedná o látku přirozeně se vyskytující v hydrolyzátech lignocelulosových materiálů, které představují značnou část odpadních substrátů využitelných po hydrolytickém štěpení pro biotechnologické produkce mj. právě PHA. Při hydrolýze však z hemicelulosity vznikají kromě užitelných sacharidů také jejich degradační produkty, látky působící jako inhibitory mikrobiálního růstu, a to 5-hydroxymethyl furfural, furfural a dále organické kyseliny jako kyselina octová, mravenčí nebo právě kyselina levulová. Namísto nutnosti následné detoxifikace je proto vhodné mít mikrobiální producenty, které buď dokáží tyto látky přímo využít, nebo jsou vůči nim alespoň částečně rezistentní. Druhá idea vycházela ze skutečnosti, že pro biosyntézu kopolymeru P(3HB-co-3HV) je možné využít kyselinu levulovou jako prekurzor pro 3-hydroxyvalerát v kombinaci s vhodným mikrobiálním producentem, který je schopen jejího využití a konverze na 3-hydroxyvaleryl-CoA. Jelikož ji lze produkovat cíleně z lignocelulosové biomasy, představuje poměrně levnou alternativu k dalším možným prekurzorům (např. kyselina valerová) [152]. Jako mikroorganismus pro adaptaci na kyselinu levulovou byl vybrán modelový kmen pro produkci PHA *C. necator* H16 CCM 3726, který disponuje schopností ji využít. Cílem práce tedy bylo prostřednictvím metody evolučního inženýrství získat kmen adaptovaný na kyselinu levulovou, což by vedlo ke snížení inhibičního vlivu vlivem tohoto stresoru, tedy lepšímu růstu v jeho přítomnosti, a zároveň ke zvýšení zastoupení 3HV v kopolymeru P(3HB-co-3HV). Zjednodušený metabolismus kyseliny levulové u kmene *C. necator* H16 je znázorněn na následujícím schématu (Obr. 10).



Obr. 10: Zjednodušené schéma metabolismu kyseliny levulové u *C. necator* HI16

Homopolymer poly(3-hydroxybutyrát) je nejvíce charakterizovaným materiálem patřícím mezi PHA, byl nejdříve identifikován a taktéž představuje nejčastěji produkováný mikrobiální biopolyester. Přestože vykazuje výhodné vlastnosti vlastní celé skupině PHA, tedy biodegradabilitu a biokompatibilitu, z hlediska materiálových charakteristik se nejedná o příliš vhodný materiál pro některé aplikace. Úskalí představuje především vysoká krystalinita spojená s křehkostí, vysoká tuhost a teplota tání blízká teplotě rozkladu, což vlivem problémů se zpracováním také limituje následné využití materiálu. S ohledem na aplikační potenciál PHA se prokázala jako podstatná charakteristika polymeru zastoupení monomerů v molekule, kdy inkorporace dalších monomerních jednotek k 3HB nebo kombinace jiných monomerů vede k podstatnému zlepšení mechanických vlastností. Jelikož byla popsána široká škála monomerních jednotek, které mohou mikroorganismy syntetizovat a následně do kopolymerů či terpolymerů zainkorporovat, mohou být de facto připraveny materiály s vlastnostmi pro cílené aplikace. Povaha monomerních jednotek se odvíjí nejen od produkujícího mikroorganismu, kdy například některé tvoří pouze scl-PHA, jiné pouze mcl-PHA, ale také od dostupných substrátů, které více či méně představují prekurzory pro vybrané monomery [79, 97, 109].

V biotechnologických produkcích se pro účely produkce kopolymerů často využívá kombinace více substrátů. Nejvíce charakterizovaný kopolymer, který patří do skupiny scl-PHA, představuje P(3HB-co-3HV). Z hlediska materiálových charakteristik byly popsány materiály s různým zastoupením frakce 3HV [153], kdy narůstající množství vedlo ke snížení negativních aspektů homopolymeru P(3HB) jako je snížení teploty tání, snížení krystalinity vlivem menší rigidity řetězců, zvýšení elasticity aj., nicméně po překročení zastoupení přibližně 50 mol. % se vlastnosti opět zhoršují [154, 155]. Jak již bylo zmíněno, mikroorganismy produkují polymer využitím metabolických aparátů, kterými disponují. Jako prekurzor 3-(*R*)-hydroxyvaleryl-CoA, substrátu pro PHA syntasu, se v biotechnologických procesech využívá propionát, *n*-propanol nebo valerát [156], které zvyšují cenu celé produkce. Pouze některé mikroorganismy především z domény Archaea jsou schopny syntetizovat kopolymer bez prekurzoru [157]. Levnější alternativu uvedených chemikálií sloužících jako prekurzory představuje kyselina levulová, která byla již v řadě studií jako prekurzor 3HV využita v kombinaci s hlavními zdroji uhlíku, a to s glycerolem [158, 159], xylosou [160] nebo syrovátkou [161]. Další možností je pak využití rekombinantních mikroorganismů, kdy pro produkci kopolymerů u *Pseudomonas putida*, schopné produkce i mcl-PHA, byla využita kombinace kyseliny oktanové a levulové [162].

Kyselina levulová (4-oxopentanová) představuje jeden z možných produktů kyselé hydrolyzy lignocelulosové biomasy. Jelikož se jedná o strategickou chemikálii s širokým spektrem využití zahrnující odvětví paliv, aditiv do paliv, barviv, rozpouštědel, monomerů, plastifikátorů, agrochemikálií a farmaceutik [163], bylo výzkumu její produkce věnováno značné úsilí, aby byla co nejefektivnější. Výrobní náklady na kilogram čisté kyseliny leží v rozmezí 0,09–0,20 \$ [152, 164, 165]. Mimo cílenou produkci ale vzniká v menším měřítku během úpravy lignocelulosových odpadů s účelem produkce utilizovatelných monosacharidů pro biotechnologické produkce, poté působí jako mikrobiální inhibitor. Podobně jako ostatní slabé organické kyseliny inhibuje syntézu tetrapyrrolů, mezi které patří hem, vitamin B12 či

cytochrom a také může snižovat pH v cytoplazmě buněk a tím částečně inhibovat či brzdit celkový buněčný metabolismus [160, 166, 167]. Negativní vliv na buněčný metabolismus manifestuje poté snížením efektivity biotechnologických procesů.

Ve vztahu k evolučnímu inženýrství nám poskytla kyselina levulová výzvu s cílem získat adaptovaný kmen, který je schopen ji nejen tolerovat, ale i ve zvýšené míře využít směrem k požadovanému produktu. V kombinaci s funkčním metabolickým aparátem pro produkci PHA ji totiž lze, jak již bylo zmíněno, využít jako prekurzor při biosyntéze kopolymeru P(3HB-co-3HV). Kmen *Cupriavidus necator* H16 je kyselinu levulovou schopen metabolizovat a využít k tvorbě kopolymeru v kombinaci s dalším zdrojem uhlíku (např. fruktosa), ale v poměrně malém množství a zároveň na něj stále působí inhibičně. Kromě fruktosy, která byla využita v rámci naší práce, byla prokázána tvorba kopolymeru při kombinaci propionátu s kyselinou levulovou, kdy frakce 3HV dosahovala až 80 mol. %, celkový výtěžek biomasy a polymeru však nedosahoval moc vysokých hodnot [168, 169]. Při kombinaci glukosy (20 g/L) s kyselinou levulovou (5 g/L) byl získán kopolymer s 21 mol. % 3HV, množství biomasy činilo pouze 4 g/L, projevil se tedy inhibiční efekt kyseliny [170]. Nicméně je kmen nejvíce prozkoumaným producentem PHA s vysokým potenciálem pro průmyslovou produkci polymeru. Sérií evolučních experimentů založených na adaptaci na postupně se navyšujícího množství inhibitoru a také experimentů s využitím mutagenního činidla byly připraveny kmeny, které byly následně porovnávány skrze růstové charakteristiky, kvalitativní a kvantitativní analýzu PHA, metabolickou charakterizaci a také detailnější analýzu vyizolovaných polymerů. Výsledky provedených experimentů byly publikovány v časopise *Biochemical Engineering Journal* v článku v rámci **Přílohy I** této práce.

Nejdříve jsme se zaměřili na získání adaptovaných kmenů, a to dvěma technikami kultivace, jednak submerzní kultivací a jednak kultivací na pevném médiu. Vybrané koncentrace kyseliny levulové byly nejdříve testovány s ohledem na nárůst kultury při expozici stresoru, na základě čehož byly vybrány optimální dávky pro adaptaci. Experimenty byly prováděny separátně při růstu na pevném médiu a při submerzní kultivaci, jelikož bylo zjištěno, že efekt stresoru se odvíjí od způsobu kultivace pravděpodobně vzhledem k aeraci, dostupnosti živin aj. Nejvyšší koncentrace, při které byl prokázán dostatečný růst při submerzní kultivaci, byla 5 g/L, při růstu na pevném médiu se jednalo o 7,5 g/L kyseliny levulové, a to při zisku jak první, tak i druhé generace adaptovaných kmenů. Kromě standardního kultivačního procesu byl využit chemický mutagen methyl methansulfonát v koncentracích 0,1 a 0,5 g/L, u kterého se předpokládá zvýšení genetické diverzity buněk, které jsou mutagenu vystaveny. Ani v tomto případě ale nebyly při růstu na pevných médiích tolerovány vyšší koncentrace kyseliny levulové, nejvyšší koncentrace vedoucí k zisku adaptovaných kolonií byla 5 g/L. V rámci první generace byly získány izoláty tří adaptovaných kmenů, dva z druhé generace a tři kmeny po aplikaci MMS. Následnou selekcí izolátů při submerzní kultivaci v médiu s 3,5 g/L kyseliny levulové, kdy byly posuzovány růstové a PHA produkční charakteristiky, bylo vybráno pět kmenů, a to tři z první generace, jeden z generace druhé a jeden kmen získaný po aplikaci mutagenu. U izolátu ALA04 z druhé generace bylo detekováno $20,6 \pm 0,9$ mol. % 3HV v kopolymeru P(3HB-co-3HV), což byl nejvyšší pozorovaný obsah 3HV

frakce v kopolymeru mezi všemi testovanými kmeny, divoký kmen dosahoval zastoupení 3HV v množství $15,6 \pm 0,9$ mol. %.

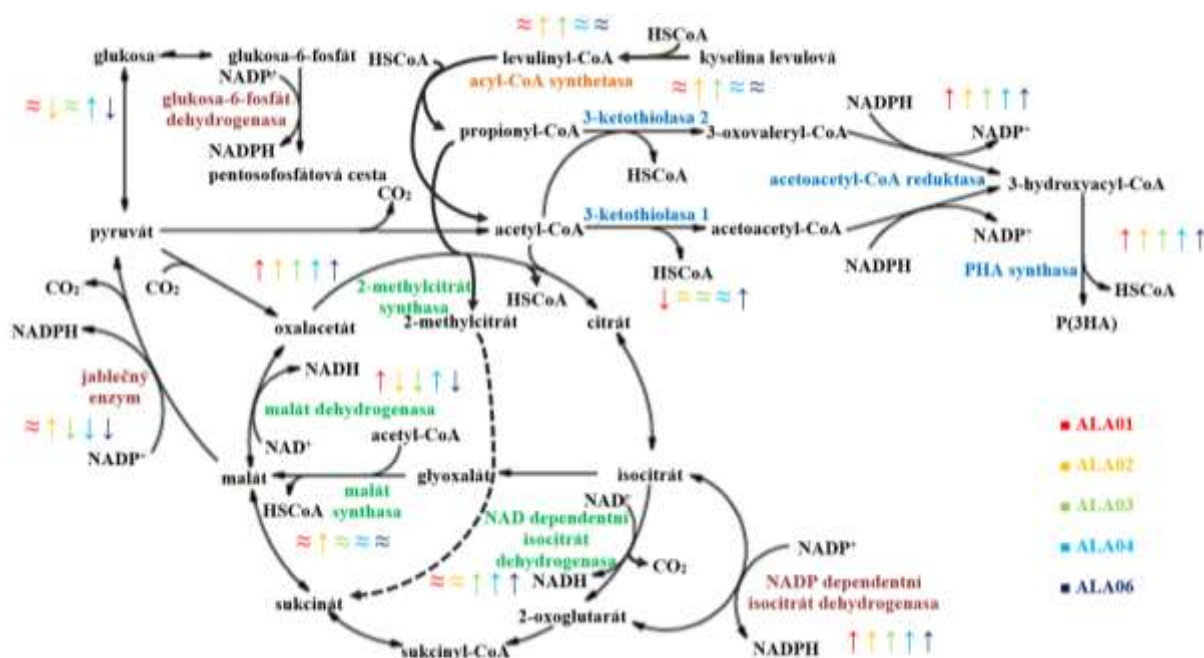
Podstatnou částí práce byla metabolická charakterizace získaných adaptovaných kmenů a současné porovnání s divokým kmenem skrze stanovení specifických enzymových aktivit, a to za účelem objasnění adaptační strategie při expozici kyselině levulové. Jak už bylo uvedeno výše, jedná se o slabou organickou kyselinu, reakci na ni, jakožto na stresor, se může projevat obecnou stresovou odpovědí [166]. Pro tento účel byly stanovovány aktivity enzymů zapojené do centrálních metabolických drah, aby bylo možné zhodnotit celkový fyziologický stav buněk, drah generujících redukovaný kofaktor NADPH, představující hlavní donor elektronů všech organismů, a biosyntetické dráhy PHA. Mimoto ale vzhledem ke schopnosti utilizace kyseliny levulové vybraným bakteriálním kmenem byla pozorována metabolická cesta vedoucí k syntéze levulinyl-CoA [171]. Kromě prostého srovnání byly naměřené hodnoty podrobeny statistické analýze prostřednictvím stanovení Pearsonova korelačního koeficientu a analýze hlavních komponent (PCA) za účelem odhalení podobností a diferencí mezi jednotlivými izoláty vůči sobě a vůči divokému kmeni.

Na základě získaných dat a následné statistické analýzy byly objeveny některé společné prvky adaptace, a to především v rámci obecné odpovědi na oxidativní stres, což se projevilo navýšením aktivit enzymů generujících redukovaný kofaktor NADPH, který je podstatný pro regeneraci molekul glutathionu a thiooxidinu zapojených do ochrany buněk vůči škodlivým radikálům, jež jsou vlivem oxidativního stresu generovány [172, 173]. Může se jednat o alternativní dráhy v rámci Krebsova cyklu, a to u NADP-dependentní varianty enzymu isocitrát dehydrogenasy, alternativní dráhu zpracování malátu na pyruvát pomocí jablečného enzymu či dráhy pentosofosfátového cyklu vycházející z glukosa-6-fosfátu za katalýzy glukosa-6-fosfát dehydrogenasou. Do generace redukovaného kofaktoru jsou ovšem v rámci metabolismu zapojeny i další enzymy, které nebyly stanovovány [172]. Kromě regenerace molekul zapojených do antioxidačního procesu vytváří vyšší množství NADPH příznivé prostředí pro biosyntetické procesy, a to mj. biosyntézu PHA, kdy enzym acetoacetyl-CoA reduktasa je NADPH dependentním enzymem redukujícím keto- formu na hydroxyskupinu monomerní jednotky PHA. Přestože prostřednictvím korelační analýzy nebyla nalezena korelace mezi žádným stanovovaným enzymem generujícím NADPH a acetoacetyl-CoA reduktasou, pro sumu specifických aktivit všech těchto stanovovaných enzymů by pozitivní korelace mohla být potvrzena. Navýšení aktivity biosyntetické dráhy PHA by mělo v rámci metabolomu manifestovat jako vyšší výtěžek polymeru v biomase, což bylo vyjma izolátu ALA06 u ostatních izolátů v kombinaci s vyšším množstvím biomasy v důsledku adaptace prokázáno. Pozitivní následky mírného oxidačního stresu navyšující biosyntézu PHA byly potvrzeny řadou experimentů, a to při expozici peroxidu vodíku a ethanolu v rámci výzkumu na našem pracovišti [174–176], ale také dalšími výzkumnými skupinami, které k indukci stresu využívali rovněž peroxid vodíku [177, 178].

Vyjma obecného vlivu kyseliny levulové jakožto stresoru byl pozorován výrazný vliv adaptace na posílení jejího metabolismu, což se projevilo skrze posílení aktivity klíčového enzymu 2-methylcitrátového cyklu a také 3-ketothiolasy 2, která generuje 3-oxovaleryl-CoA.

Nedošlo primárně k navýšení aktivity acyl-CoA syntetasy podílející se na prvním kroku metabolisme kyseliny levulové [171], vzhledem ke schopnosti bakteriálního kmene *C. necator* H16 využít mastné kyseliny z tuků lze předpokládat enzymovou aktivitu dostatečně vysokou i bez adaptace. U divokého kmene *C. necator* H16 bylo detekováno celkem 31 genů kódujících různé acyl-CoA syntetasy [179]. Navýšení se podstatně více (dvojnásobně až pětinásobně) projevilo u 2-methylcitrát syntasy, která vystupuje v cyklu představujícím součást centrálního metabolismu. Převádí propionyl-CoA generovaný z levulinyl-CoA přes pyruvát až na acetyl-CoA [180, 181], který může navýšovat celkový energetický metabolismus vedoucí rovněž k navýšení množství biomasy. Zároveň jej ale odčerpává, čímž snižuje podíl 3HV v kopolymeru [182], jenž pak u vybraných adaptovaných izolátů byl nižší než u kmene divokého bez předchozí adaptace. Metabolismus je komplexní proces a posílení drah využívajících propionyl-CoA se v rámci adaptovaných kmenů projevilo především navýšením výtěžku biomasy a celkové produkce PHA, u většiny současně snížením 3HV frakce v kopolymeru. U některých kmenů ale i přes navýšení enzymové aktivity 2-methylcitrát syntasy došlo k navýšení 3HV v P(3HB-co-3HV) kopolymeru, což pouze potvrzuje komplexnost celého metabolismu a i adaptačního procesu. Kromě propionyl-CoA vzniká po štěpení levulinyl-CoA i acetyl-CoA, který představuje v rámci metabolismu výchozí produkt či meziprodukt řady reakcí, a to jednak katabolických vedoucích k zisku energie prostřednictvím navýšení aktivity Krebsova cyklu, tak i anabolických, z nichž v rámci této práce stojí za zmínku především biosyntéza PHA.

Vyjma uvedených společných znaků adaptovaných kmenů jsme již na základě stanovených hodnot specifických enzymových aktivit navrhli více adaptačních strategií v rámci jednotlivých kmenů. Jako nejodlišnější se nám v rámci pozorovaných metabolických drah jevil kmen ALA02. Vykazoval stejně jako ostatní adaptované kmeny vysokou aktivitu 2-methylcitrát syntasy, ale mimoto také vysokou aktivitu malát syntasy spadajícího do glyoxalátového cyklu. Vznikající malát není spotřebováván primárně v Krebsově cyklu, ten byl v kroku katalyzovaném malát dehydrogenasou oproti ostatním adaptovaným kmenům utlumen, ale je převáděn na pyruvát za katalýzy jablečným enzymem, jehož aktivita byla dvakrát až třikrát vyšší oproti ostatním izolátům. Naopak podobné strategie adaptace byly pozorovány u kmenů ALA03, ALA04 a ALA06, kdy při porovnání s divokým kmenem byla značně navýšena aktivita Krebsova cyklu prostřednictvím NAD⁺ dependentní isocitrát dehydrogenasy bez navýšení malát syntasy a tedy ani glyoxalátového cyklu a ani jablečného enzymu, který malát z citrátového cyklu odčerpává. Znázornění analyzovaných enzymů, jejich zapojení do metabolismu a trendy specifických enzymových aktivit jsou obsahem následujícího schématu (Obr. 11).



Obr. 11: Přehled stanovovaných enzymů a trendy hodnot aktivit adaptovaných kmenů vůči divokému kmeni

Abychom získali nad experimentálními daty větší nadhled než pouhé srovnání naměřených hodnot, aplikovali jsme metody statistické analýzy. Na základě korelační analýzy využívající Pearsonův korelační koeficient jako hodnotící parametr bylo odhaleno 6 pozitivních a jedna negativní korelace, kdy jako relevantní byla brána absolutní hodnota koeficientu vyšší nebo rovna 0,85. Nejvyšší korelace byla stanovena mezi acyl-CoA syntetasou štěpící levulinyl-CoA na acetyl-CoA a propionyl-CoA [171], a malát syntasou generující malát z glyoxalátu a acetyl-CoA v rámci glyoxalátového cyklu. Přímá návaznost skrze metabolismus byla potvrzena korelací mezi aktivitou malát syntasy a jablečného enzymu, kdy první reakce představuje anaplerotickou reakci pro Krebsův cyklus, jelikož jablečný enzym generovaný malát odčerpává během alternativní konverze na pyruvát za současného vzniku NADPH. Tím může být také využit k zisku energie v Krebsově cyklu po přeměně na acetyl-CoA nebo oxalacetát, případně k zisku energie z propionyl-CoA za využití metabolického aparátu 2-methylcitrátového cyklu. Méně zřejmá korelace mezi enzymovými aktivitami malát dehydrogenasy a PHA syntasy může být připisována celkově dobrému fyziologickému stavu buněčné kultury, kdy během exponenciální fáze růstu dochází k intenzivní respiraci a nárůstu biomasy, a následně pak během stacionární fáze ke zvýšené produkci PHA. Pozitivní korelace mezi aktivitou acyl-CoA syntetasy a NADP⁺ dependentní isocitrát dehydrogenasy může být vysvětlena metabolickými protipóly, kdy katabolická reakce kyseliny levulové představující první krok utilizace mastných kyselin je opakem alternativní reakce v rámci Krebsova cyklu, kdy dochází ke generování

redukovaného kofaktoru NADPH vytvářejícího vhodné prostředí pro biosyntézy. Byla-li tedy posílená metabolizace kyseliny levulové, transformace isocitrátu na 2-oxoglutarát probíhala za katalýzy NAD⁺ dependentní alternativy enzymu.

Jako další z metod statistické analýzy aplikované na získaná data byla využita analýza hlavních komponent (PCA). Na základě lokalizace jednotlivých adaptovaných kmenů a izolátu v odpovídající 2D projekci lze diskutovat metabolické podobnosti mezi nimi. Nejvýraznější oddělení zón na základě rozdílů v enzymových aktivitách jsme pozorovali mezi divokým kmenem a kmeny adaptovanými, což vede k potvrzení myšlenky změn v metabolismu jako důsledku adaptace. V rámci adaptovaných kmenů se nejvíce odlišuje izolát ALA02, který už byl vzhledem ke své odlišnosti diskutován výše vzhledem k pravděpodobné odlišné adaptační strategii. Nejbližší vztah mezi sebou mají kmeny ALA01, ALA03 a ALA06. Z hlediska podobnosti s divokým kmenem je nejbližší vztah k ALA01, který kromě obecné adaptační strategie (zvýšená aktivita respirace, posílené dráhy utilizace propionyl-CoA, zvýšené generace NADPH a také biosyntetické dráhy PHA) vykazuje nejvyšší metabolickou podobnost.

Vyjma metabolické charakterizace jsme zaměřili pozornost taktéž na charakteristiku vyizolovaného kopolymeru P(3HB-*co*-3HV) prostřednictvím pokročilejších instrumentálních technik za účelem stanovení molekulové hmotnosti, zastoupení monomerů, krystalinity a také termických charakteristik. Technikou SEC-MALS prováděnou za účelem stanovení molekulové hmotnosti a polydisperzity polymeru bylo zjištěno, že u kmenů získaných z první generace došlo k poklesu molekulové hmotnosti o třetinu. Polymer vyizolovaný z ALA04 patřící do druhé generace adaptovaných kmenů vykazoval molekulovou hmotnost srovnatelnou s divokým kmenem, zároveň však byl opakovaně detekován nejvyšší obsah 3HV, a to 20,6 mol. %. Vyšší molekulovou hmotností polymeru disponoval kmen ALA06 získaný aplikací chemického mutagenu MMS, který ale opakovaně vykazoval nejnižší zastoupení 3HV v kopolymeru i vzhledem k divokému kmeni, a to 11,1 mol. %. Stupeň polydisperzity systému zůstal zachován v rámci všech analyzovaných kopolymerů, kdy byla navíc pro mikrobiálně vyprodukovaný polymer úzká distribuce, což je vhodné z hlediska zpracování. To, že má zastoupení 3HV významný dopad na materiálové charakteristiky polymeru skrze teploty tání, krystalinitu a mechanické vlastnosti obecně bylo detailně studováno a charakterizováno více výzkumnými týmy [183, 184]. Z hlediska krystalinity byly popsány rozdílné struktury P(3HB) a P(3HV) prostřednictvím krystalové mřížky. S ohledem na změny na úrovni mechanických vlastností bylo odhaleno, že při relativním obsahu 3HV 40 mol. % dochází k přechodu řetězce polymeru z krystalické podoby P(3HB) do podoby typické pro P(3HV). Rovněž snížení celkové krystalinity a teploty tání kopolymeru s ohledem na nárůst frakce 3HV se projevuje do obsahu 37 mol. % v kopolymeru, při dalším navýšení frakce 3HV dochází k opětovnému nárůstu krystalinity i teploty tání, přestože nárůst není tak markantní [154, 183, 185].

Za účelem stanovení krystalinity a teploty tání vyizolovaných polymerů divokého kmene a adaptovaných kmenů jsme využili techniku DSC. Kopolymer z adaptovaných kmenů získaných v rámci první generace adaptačních experimentů měl na základě analýzy

srovnatelnou teplotu tání s divokým kmenem, a to kolem 167,5 °C, což je méně než teplota tání homopolymeru P(3HB) uváděná v rozmezí 175–180 °C [110]. Polymery vyprodukované kmenem z druhé generace ALA04 a také ALA06 z kmene získaného aplikací mutagenu vykazovaly výrazné snížení, a to v průměru na 164,8 °C. Zatímco polymer vyizolovaný z kmene ALA04 obsahoval nejvyšší množství 3HV v kopolymeru, což potvrzuje trend snížení teploty tání v závislosti na relativním zastoupení 3HV, kmen ALA06 produkoval polymer s nejnižším zastoupení 3HV, a to i vzhledem k divokému kmeni. I proto byly materiály dále charakterizovány. Z termogramů byla vyhodnocena entalpie fúze, kde byly u všech kopolymerů patrné dvoupíky tání, které dokládají přítomnost dvou typů krystalické struktury. Dekonvolucí byly získány dva jednotlivé píky, první s nižší tepelnou stabilitou a druhý s vyšší, přičemž vzhledem k teplotě jejich maxim je zřejmé, že obě frakce obsahovaly kromě 3HB i 3HV.

Krystalinitu kopolymerů jsme kromě provázanosti s tepelnými vlastnostmi sledovali prostřednictvím FT-IR. Samotné spektrum jednotlivých materiálů bylo značně podobné, a to i vzhledem ke spektru homopolymeru P(3HB), nejvyšší signály poskytovaly charakteristické píky [186]. Proto byla využita schopnost této spektroskopické techniky podávat informace o fyzikální struktuře PHA, pro posouzení krystalinity byly využity charakteristické vibrační pásy specifické pro amorfni a krystalickou formu, tedy 1 228 cm^{-1} a 1 180 cm^{-1} [187]. Vzhledem k posouzení vlivu frakce 3HV na celkovou krystalinitu byl využit poměr intenzit jednotlivých vlnočtů, kdy při porovnání materiálů s divokým kmenem byly výrazně nižší hodnoty opět stanoveny pro kmene ALA04 a ALA06.

Na základě obou provedených materiálových charakteristik lze potvrdit trend popsany v literatuře, kdy s narůstajícím množstvím 3HV v P(3HB-co-3HV) kopolymeru dochází ke snižování teploty tání, což je výhodné pro zpracování, a také krystalinity, což je výhodné s ohledem na aplikační potenciál. Jedinou výjimku představuje polymer vyizolovaný z kmene ALA06 připraveného s využitím mutagenu MMS. Vzhledem k předpokladu souvislosti těchto charakteristik s rozdílným umístěním jednotlivých monomerů v rámci kopolymeru a skutečnosti, že bakterie standardně produkují náhodné kopolymery, předpokládáme, že kmen ALA06 je schopen produkovat částečně organizovaný kopolymer s částmi bohatšími na frakci 3HV, tedy celkově má poté polymer zčásti blokový charakter, což následně ovlivní vlastnosti materiálu [188].

Aplikací evolučního inženýrství při adaptaci na kyselinu levulovou jsme celkově získali 5 adaptovaných kmenů schopných úspěšně růst a reprodukovatelně produkovat kopolymer, 3 kmene pocházely z první generace, jeden z druhé generace a jeden byl získán aplikací chemického mutagenu MMS. Na základě metabolické charakterizace jsme navrhli adaptační strategie jednotlivých kmenů a provedli jsme porovnání s divokým kmenem bez adaptace, kdy se obecně projevil vliv kyseliny levulové projevující se jako oxidační stres, ale přesto byly objeveny i některé kmene s unikátními změnami na úrovni metabolomu. Po charakterizaci vyizolovaných kopolymerů byla potvrzena souvislost s obsahem 3HV a zlepšením vlastností polymeru oproti homopolymeru P(3HB), u kmene ALA06 je předpokládána schopnost tvořit částečně blokové kopolymery, což se projevilo zlepšením

vlastností materiálu i přes nejnižší obsah 3HV frakce. Na základě PCA analýzy porovnávající materiálové charakteristiky s enzymovými aktivitami nebyla identifikována obecná metabolická strategie vedoucí k zisku kopolymeru s výhodnějšími vlastnostmi.

4.1.2 Dlouhodobá adaptace kmene *C. necator* H16 na biotechnologicky relevantní stresory

V rámci předchozí práce byly publikovány výsledky relativně krátkého adaptačního procesu, kde byly jednak kombinovány kultivační techniky, jednak byly testovány různé intenzity selekčního tlaku. Následující práce byla zaměřena na dlouhodobý adaptační experiment při zachování konstantního selekčního tlaku. Jako mikroorganismy byly využity bakteriální kmeny *C. necator* H16 stejně jako v předchozím experimentu a středně halofilní kmen *H. halophila* s 66 g/L chloridu sodného v médiu jako optimem. Modelový kmen metabolismu PHA *C. necator* H16 byl exponován působení zvýšeného osmotického tlaku a zvýšené koncentraci měďnatých iontů, halofilní kmen byl exponován dvěma slabým organickým kyselinám, octové a levulové, které se obě přirozeně nachází v hydrolyzátech lignocelulosové biomasy. Všechny aplikované stresy představují biotechnologicky relevantní situace, kterým mohou být mikroorganismy během reálných procesů vystaveny.

Evolučnímu experimentu předcházelo nalezení optimální dávky stresoru, která jsme volili tak, aby byly kultury stále schopny růstu a množení, zároveň aby se projevil inhibiční efekt. Screening růstu byl proveden na základě měření optické hustoty během 72 hodin růstu a jako optimální koncentrace byla zvolena ta, kdy byla optická hustota kultur zredukována přibližně na polovinu. Optimální dávky stresorů pro *C. necator* H16 byly nastaveny na 30 mg/L měďnatých iontů Cu^{2+} v podobě modré skalice a 20 g/L NaCl, pro *H. halophila* byly jako nejvhodnější koncentrace stresorů zvoleny 3 g/L kyseliny octové respektive 1 g/L kyseliny levulové. Jelikož i v zamýšlených reálných biotechnologických procesech při kultivaci na hydrolyzátech dochází k úpravě hodnot pH na přibližně 7, bylo i v médiích pro *H. halophila* pH vždy upravováno, čímž se neprojevil primárně vliv kyselého prostředí, ale samotných kyselin, jejichž inhibiční efekt byl diskutován výše.

Dlouhodobý adaptační experiment jsme prováděli v baňkách, kdy po 48 hodinách kultivace jsme 10 obj. % kultury přenesli do čerstvého média se stresorem. Každá pasáž byla charakterizována s ohledem na nárůst biomasy skrze měření optické hustoty a gravimetrické stanovení a také na kvalitativní a kvantitativní stanovení PHA v biomase pomocí plynové chromatografie s plamenově-ionizačním detektorem. V supernatantech po kultivaci *H. halophila* byla pomocí iontové chromatografie stanovováno residuální množství kyselin. Z výsledků pro *H. halophila* bylo zjištěno, že na rozdíl od kmene *C. necator* využívaného v rámci předchozí práce, není kmen schopen využít kyselinu levulovou, jelikož residuální množství této kyseliny v supernatantu po kultivaci bylo téměř totožné vzhledem k dávkovanému množství. Tento kmen tedy rovněž není schopen kyselinu levulovou využít k produkci kopolymeru P(3HB-co-3HV), jelikož veškerý polymer v biomase byl povahy homopolymeru P(3HB). Stejně tak množství polymeru nebylo vyšší v přítomnosti kyseliny octové, která řadě mikroorganismů slouží jako přímý prekurzor acetyl-CoA využitelný v metabolismu mj. pro tvorbu PHA [189], pomocí iontové chromatografie bylo stanoveno, že

residuální množství kyseliny octové bylo zhruba poloviční oproti dávkovanému množství. Jelikož bylo zajímavějších výsledků v rámci adaptace docíleno pro kmen *C. necator* a zároveň za účelem redukce velkého množství dat, byly v článku do časopisu *International Journal of Biological Macromolecules* přiloženo jako **Přílohu II** této práce interpretována data z experimentů pouze pro tento kmen.

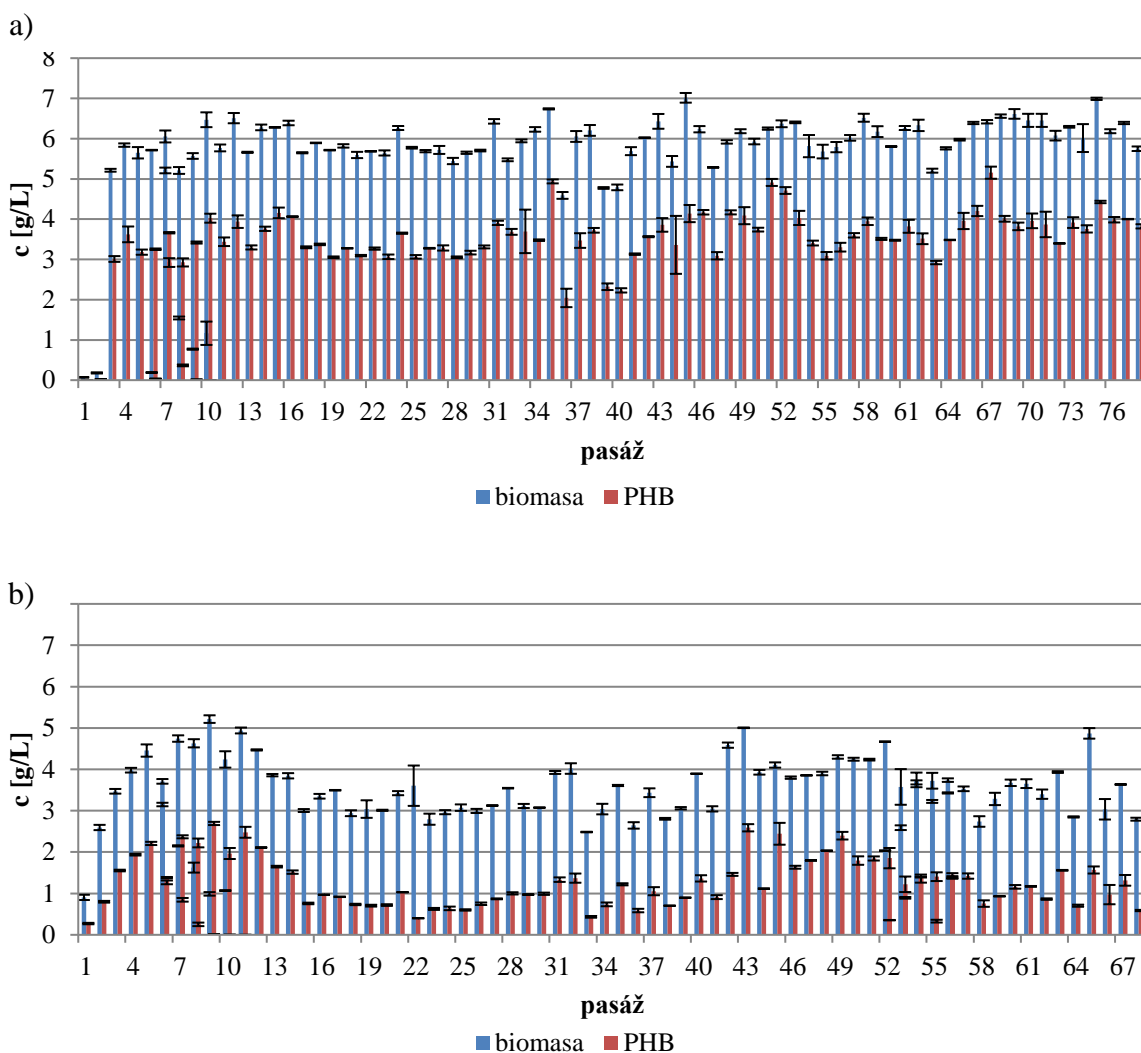
4.1.2.1 Komentovaná publikace

Jak již bylo uvedeno, zkoumaný modelový mikroorganismus byl exponován osmotickému stresu a stresu vyvolanému působením těžkých kovů. Osmotický stres představuje jeden z nejčastějších stresových faktorů, kterému mohou být mikroorganismy žijící především ve vodě nebo v půdě vystaveny, proto si vyvinuly účinné ochranné mechanismy, jak se s následky stresu vyrovnávat [190]. Jedním z těchto mechanismů může být akumulace PHA v biomase, kdy dochází ke kompenzaci následků fluktuací vlivem osmotického stresu [191]. Schopnost produkce PHA byla popsána rovněž u extrémně halofilních *Archaea* vyskytujících se v prostředích s vysokými koncentracemi solí, proto je akumulace těchto polymerů obecně brána jako jedna ze strategií prokaryot, jak se vyrovnat s prostředími o vysoké salinitě [157, 192]. Mimoto existují práce, které potvrzují, že aplikace mírného osmotického stresu na PHA produkující bakterie vedla k navýšení akumulace polymeru v biomase, a to např. právě u modelového kmene *C. necator* [176, 193], grampozitivního kmene *Bacillus megaterium* uyuni S29 [194], u cyanobakterie *Spirulina subsalsa* [195] nebo může sloužit k obohacení smíšeného mikrobiálního konsorcia o PHA produkující kmeny [196].

Druhý aplikovaný stres, expozice těžkým kovům, také představuje často přirozeně se vyskytující nepříznivou podmínku pro mikrobiální růst, a to téměř ve všech prostředích jejich existence [197, 198]. Příčinou výskytu těžkých kovů v životním prostředí je především antropogenní činnost, a to např. zpracování kovů, doprava a další odvětví [199]. Toxicita těžkých kovů je komplexní fenomén, který se projevuje v různých úrovních mikrobiálního metabolismu, kdy může docházet k nahrazení esenciálních iontů jinými za tvorby biologicky neaktivních komplexů. Hlavní charakteristikou podmiňující výhodnou, ale i toxickou funkci jsou nezaplňené d-orbitaly, které umožňují vhodné prostředí pro elektron-transportní reakce, kdy při přeměnách substrátů dochází k přenosu elektronů a protonů napříč metabolismem. Typicky proto vystupují jako kofaktory oxidoreduktas, kdy volba příslušného kovu závisí na vhodné hodnotě elektrochemického potenciálu [200]. Měď jako jeden z těžkých kovů hraje jednak esenciální roli v řadě metabolických reakcí, ale zároveň může škodit, a to například tvorbou peroxidových radikálů a jejich následné reakci s buněčnou membránou [201, 202]. Ionty mědi vystupují především při metabolických přeměnách, v němž vystupuje superoxid dismutasa společně se zinkem, v cytochrom c oxidase a příbuzných enzymech, kdy stojí na konci respiračního řetězce řady organismů skrze reakce oxidas při aerobním metabolismu [200, 203]. Kmen *C. necator* patří, jak napovídá název, ke kmenům rezistentním vůči mědi, řada prací vedla k závěru, že expozice mědi, ale i dalším těžkým kovům, vedla k navýšení produkce PHA [204]. To může indikovat, že produkce PHA hraje roli při adaptaci bakterií na stres vyvolaný těžkými kovy [176, 204].

Pozorováním hodnot množství biomasy u obou stresorů v rámci dlouhodobého experimentu jsme odhalili dva odlišné adaptační mechanismy, jež byly popsány již dříve. U adaptace na

měď došlo k adaptačnímu kroku v průběhu třetí pasáže, kdy byl pozorován výrazný nárůst bakteriálních buněk v kultuře více než desetinásobek oproti druhé pasáži, u adaptace na vyšší koncentraci soli v médiu docházelo k postupnému nárůstu biomasy, kdy k dosažení maxima došlo při páté pasáži. Prvních 5–6 pasáží bylo tedy na základě naměřených dat nejvýznamnějších z hlediska adaptace na stresové podmínky, poté docházelo v rámci dlouhodobého časového horizontu pouze k méně významným nárůstům, ale i k menším poklesům či k oscilaci kolem maximálních dosažených hodnot koncentrace biomasy. Průběh jednotlivých adaptačních experimentů je znázorněn na následujícím obrázku (Obr. 12).



Obr. 12: Základní screening během evolučních procesů – a) expozice iontům Cu^{2+} , b) expozice NaCl

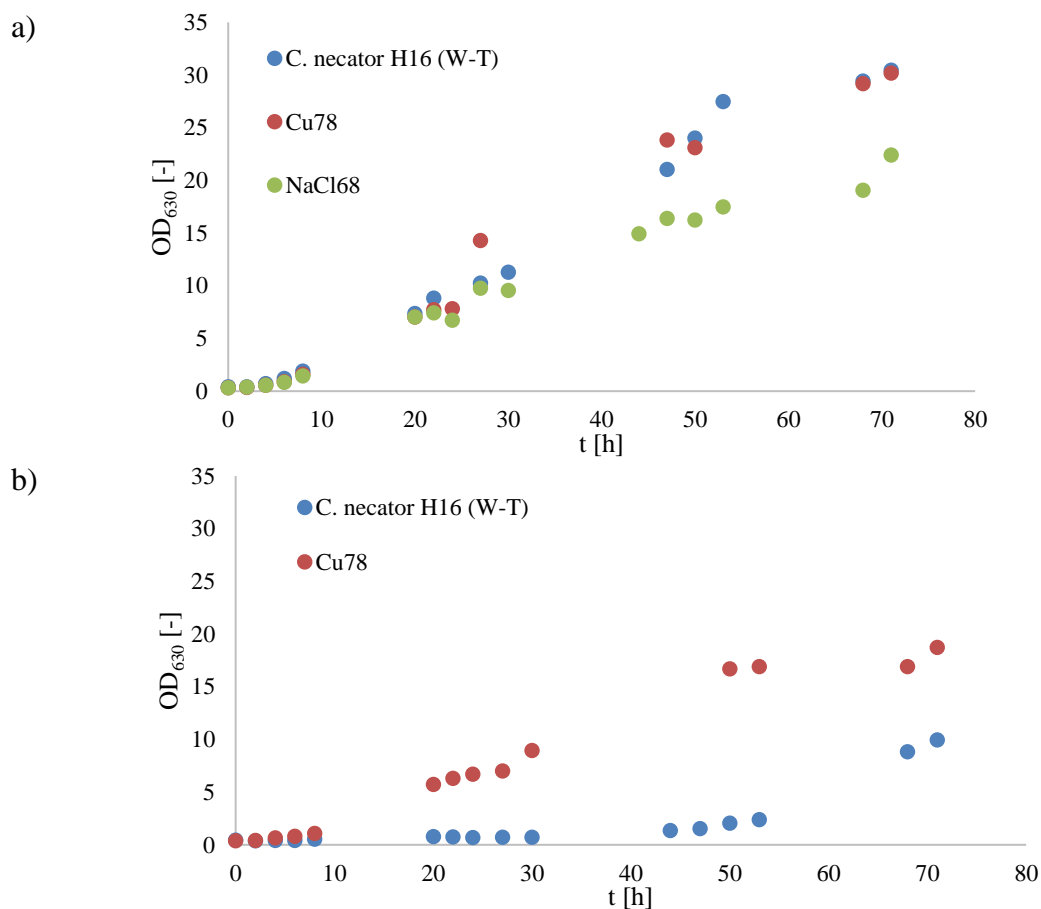
Na základě teoretických poznatků se obecně rozlišuje více přístupů, jak získat adaptované mikrobiální kmeny, a to na základě intenzity aplikovaného stresu. Nižší koncentrace v tomto případě vede k postupné optimalizaci fenotypu, zatímco vysoká koncentrace vede k podstatné změně prakticky téměř okamžitě po expozici stresu, jelikož buňky mají při vystavení stresu v podstatě dvě možnosti, a to adaptovat se na nové podmínky nebo zahynout [46]. V našem případě jsme aplikovali dávky stresoru, které vedly ke snížení nárůstu kultur přibližně na polovinu oproti kultuře bez stresoru, přesto jsme pozorovali lehce odlišná chování v rámci prvních pasáží. Množství homopolymery P(3HB) přibližně korelovalo s trendem biomasy pro

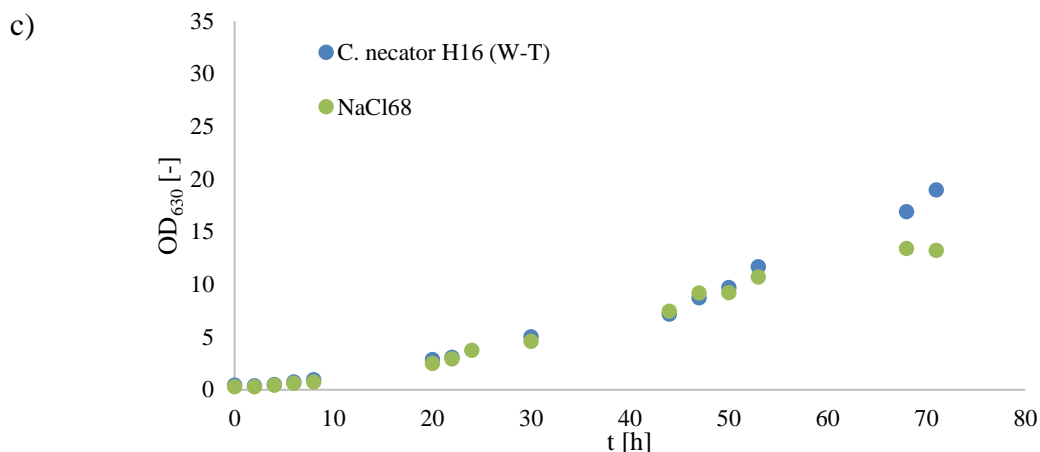
jednotlivé stresy, zpočátku bylo téměř nedetekovatelné u kultury exponované mědi, u kultury exponované osmotickému stresu bylo zastoupení v biomase patrné i u prvních pasáží. Objasnění nárůstu biomasy při expozici mědi lze pravděpodobně připisovat skutečnosti, že taxonomický název rodu *Cupriavidus* můžeme volně přeložit jako „mající rád měď“, což se v našem experimentu neprojevalo hned, ale pravděpodobně až po aktivaci protektivních mechanismů, kterými mikroorganismus disponuje. Bylo také popsáno, že přídavek nejen mědi, ale i dalších podobných kovů [176, 204], vede u kmene *C. necator* k navýšení produkce PHA v biomase. Akumulace PHA může tedy sloužit jako protektivní strategie při expozici buněk „těžkým“ kovům, které bakteriím způsobují oxidační stres. U kmene *Azospirillum brasilense* bylo pozorováno, že přítomnost některých těžkých kovů včetně mědi (jako v našem případě ve formě iontů Cu^{2+}) vedla k navýšení produkce PHA v biomase, a to i za podmínek, kdy kmen standardně polymer ve větší míře neprodukuje (nadbytek uhlíkatého zdroje, limitace esenciálními prvky jako dusík apod.). Z toho důvodu bylo usuzováno, že produkce PHA může být spojena s ochranou vůči vlivu těžkých kovů [205]. Co se týče vlivu obsahu soli na množství polymeru, v rámci práce autorského týmu Passanha a kol. (2014) bylo zjištěno, že má pozitivní vliv na produkci, nejvyšší obsah PHA u kmene *C. necator* byl pozorován při přidávku 9 g/L NaCl do média, a to 5,33 g/L PHA. Rovněž bylo zjištěno, že produkce PHA v buňkách začíná vlivem stresu dříve než za standardní kultivace bez expozice stresoru. Jako inhibiční se v jejich případě projevila již koncentrace 12 g/L NaCl [206], v našem případě docházelo k inhibičnímu efektu na poloviční množství buněk oproti kontrole při koncentraci 20 g/L, zároveň ale nebylo pozorováno významné navýšení PHB v buňkách. Vzhledem k uvedenému je tedy možné, že kultura v rámci našeho evolučního experimentu začala produkovat PHA taktéž již v brzké fázi růstu, což jí mj. umožnilo růst a dělit se i při expozici relativně vysoké síle osmotického stresu.

U dlouhodobých experimentů tohoto charakteru lze očekávat, že se při adaptaci na stres s ohledem na evoluci uplatní přirozený výběr a v populaci budou následně převládat klony buněk, které projevily evoluční výhodu oproti mateřské buňce. Rovněž není jisté, že k pozitivní mutaci dojde, vesměs se jedná o souhru více náhod, jak bylo popsáno ve výzkumu Lenski a kol. (1994), kdy pouze jedna kultura *E. coli* z 12 paralelních provedení byla po pasážování trvajícím 25 let (celkem přes 2 000 pasáží) schopna využít citrát jako zdroj uhlíku, zatímco ostatní ne. Jednalo se o kultury limitované glukosou, kde byly uvažovány čtyři možné strategie v rámci evolučního vývoje, které se více či méně projeví, což manifestovalo především zvětšením bakteriálních buněk a rovněž jejich rychlejším růstem. Nicméně porovnáním jednotlivých kultur bylo zjištěno, že adaptace u nich probíhala různou rychlostí. U zmíněné kultury jako jediné došlo ještě k výrazně vyššímu nárůstu množství buněk s evoluční výhodou související s utilizací nového substrátu, což bylo v následku mutací ve dvou genech ve vzájemně nezávislých drahách [56].

Jak bylo zmíněno, základní charakterizace jsme prováděli pro každou pasáž, ale jako jedna z hlavních součástí práce byla i komparace původního divokého kmene a posledních pasáží mikrobiálních buněk adaptovaných na dané stresy, tedy 78. pasáže z adaptace na měď a 68. pasáže adaptované na osmotický stres. Jako první charakteristiku jsme vyzkoušeli stanovit růstovou kinetiku divokého kmene a adaptovaných kmenů, a to vždy bez přítomnosti

selekčního tlaku a také v přítomnosti relevantních stresorů, průběh růstu znázorňuje následující obrázek (Obr. 13). Očekávali jsme přitom, že adaptované kmeny by měly vykazovat vyšší robustnost minimálně v přítomnosti stresu, ale i ve standardním médiu. Při kultivaci bez působení stresorů bylo nicméně stanoveno, že lepší růst vykazoval divoký kmen s růstovou kinetikou podobnou kmeni adaptovanému na měď, kmen adaptovaný na vyšší osmotický stres vykazoval podobnou kinetiku během počátečních hodin růstu, ale při exponenciální a stacionární fázi byly hodnoty optické hustoty kultury přibližně třetinové. Předpokládaný trend se projevil při porovnání divokého a adaptovaného kmene při kultivaci v přítomnosti mědi, kdy adaptovaný kmen již zpočátku vykazoval výrazně vyšší hodnoty intenzity zákalu, ke konci kultivace byly stanovené hodnoty pro adaptovaný kmen přibližně dvakrát větší. To nám koreluje s daty ze screeningu jednotlivých pasáží, kdy zpočátku byl růst v přítomnosti stresoru velmi nízký a obsah polymeru nemohl být ani stanoven. I přes to však hodnoty optické hustoty odpovídaly dvěma třetinám hodnoty růstu bez selekčního tlaku, adaptace na stres tedy stále, i když v nižší míře, růst kultury limituje. Podobného maxima intenzity zákalu jako u mědi dosáhla kultura divokého kmene při aplikaci osmotického stresu. Průběh růstu divokého i adaptovaného kmene za těchto podmínek byl srovnatelný, ke konci stacionární fáze ale u adaptovaného kmene začalo docházet k odumírání kultury. Celkově tedy lze říci, že obecně vyšší robustnost u adaptovaných kmenů prokázána nebyla, evoluční výhoda se ale projevila u kmene adaptovaného na měď oproti divokému kmeni v přítomnosti stresoru, kultura adaptovaná na osmotický stres byla oproti tomu pravděpodobně ve špatné kondici.





Obr. 13: Růst divokého kmene a posledních pasáží adaptovaných kmenů během 72 h za různých kultivačních podmínek – a) média bez stresorů, b) stres mědi (30 mg/L Cu^{2+}), c) osmotický stres (20 g/L NaCl)

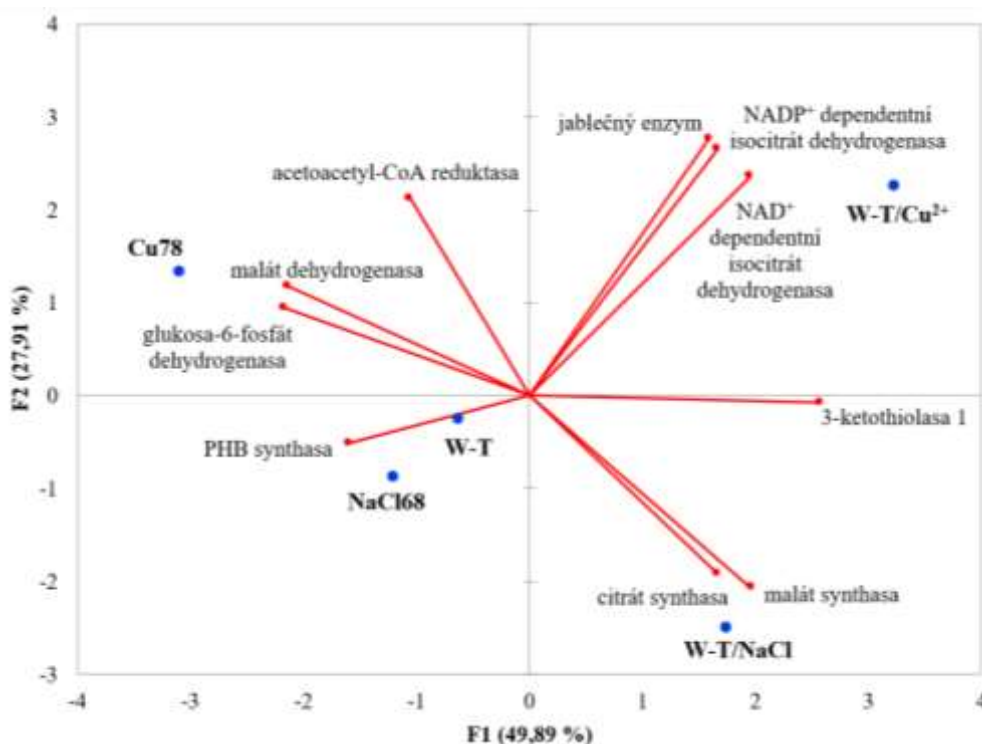
I v případě dlouhodobé adaptace jsme se zaměřili na metabolickou charakterizaci prostřednictvím stanovení specifických enzymových aktivit vybraných drah centrálního metabolismu a dalších relevantních enzymů za účelem odhalení adaptačních strategií v závislosti na jednotlivých stresorech. Z centrálního metabolismu byly vyselektovány klíčové enzymy Krebsova cyklu, glyoxalátového cyklu, jímž kmen *C. necator* disponuje, dále pak vybrané enzymy generující NADPH a enzymy zapojené do biosyntetické dráhy PHA. Pro tyto účely byly porovnány divoký kmen kultivovaný v médiu bez stresu a za stresových podmínek, adaptované kmeny byly kultivovány v médiu se stresorem, aby nedošlo k potlačení adaptivních metabolických charakteristik. Nejvýznamnějším rysem adaptace na měď je na základě naměřených dat navýšení aktivity NADPH generujících enzymů, konkrétně především NADP-dependentní isocitrát dehydrogenasy a jablečného enzymu. Navýšení produkce NADPH souvisí s obecnou stresovou odpovědí na oxidativní stres, který měďnaté ionty způsobují [207]. Stejně jako další těžké kovy a další činidla jako např. peroxid vodíku přispívá měď k tvorbě reaktivních forem kyslíku [208], vůči kterým se buňky chrání produkcí redukováných kofaktorů především v podobě NADPH, které následně tvoří vhodné prostředí pro regeneraci molekul zapojených do detoxifikačních procesů (např. glutathion), a to jako jejich redukční ekvivalenty [173]. Navýšení aktivit NADPH produkujících enzymů bylo sledováno při expozici mědi u divokého i adaptovaného kmene. Mimoto nadbytek NADPH v buňce představuje vhodné prostředí pro anabolické reakce jako je právě například biosyntéza PHA. Navýšení produkce redukováného kofaktoru může být také spojeno se zvýšenou intenzitou respirace buněk, která byla pozorována prostřednictvím vybraných enzymů Krebsova cyklu v přítomnosti mědi u obou kmenů. Přestože byly oba hlavní rysy při expozici měďnatým iontům popsány u divokého i adaptovaného kmene, strategie okamžité a dlouhodobé adaptace byly odlišné, u adaptovaného kmene byla ke generaci NADPH využita dráha centrálního metabolismu, a to cesta do pentosafosfátového cyklu katalyzovaná glukosa-6-fosfát dehydrogenasou. Expozice hypertonickému prostředí vedla u divokého i adaptovaného kmene pravděpodobně k navýšení intenzity respirace, což usuzujeme na základě aktivit enzymů s respirací přímo spjatých. U divokého kmene byla navýšena aktivita citrát syntasy využívající acetyl-CoA, což nás vedlo k myšlence snížení aktivity 3-ketothiolasy 1, která využívá stejný substrát, což ale nebylo pozorováno. U adaptovaného kmene byla

významně navýšena aktivita malát dehydrogenasy, tento jev nebyl u divokého kmene pozorován, a to i přes skutečnost, že u něj byla navýšena aktivita malát syntasy v rámci glyoxalátového cyklu více než čtyřikrát. Stejně jako při expozici mědi, i zde se vlivem zvýšení intenzity respirace projevilo navýšení produkce redukováného kofaktoru NADPH, ale pouze u adaptovaného kmene.

Z hlediska biosyntézy PHA spojuje oba adaptované kmeny trend posílení biosyntetické dráhy, a to především navýšením aktivity PHB syntasy, což nasvědčuje tomu, že role PHA má při adaptaci na aplikované stresové podmínky význam. Nicméně u adaptovaných kmenů nebyl detekován vyšší obsah polymeru v biomase a rovněž molekulová hmotnost PHA byla menší než pro polymer izolovaný z divokého kmene. Tento poznatek nás vedl k hypotéze, že adaptace je spojena nejen se zvýšenou biosyntézou, ale také současně posílenou intracelulární degradací PHA. Z hlediska adaptace mohl být tedy podstatný ne samotný obsah polymeru, ale celkově navýšený cyklus PHA zahrnující současnou syntézu a degradaci polymerních řetězců vedoucí mj. k navýšení poolu monomerní jednotky 3-hydroxybutyrátu [209]. Jelikož bylo popsáno, že monomer slouží jako potenciální chemický chaperon chránící biomolekuly před denaturací vlivem oxidačního stresu, má navýšení cyklu přeměny velký vliv v rámci adaptace na měď [210]. Z hlediska ochrany vůči vlivu osmotického stresu pak může 3HB sloužit jako osmoticky aktivní látka [211]. Na základě našich výsledků jsme tedy došli k závěru, že ne pouze vyšší obsah PHA v biomase má pozitivní vliv na odolnost vůči stresu, jako adaptační strategie může být využíván právě celkově posílený cyklus PHA.

Kromě posouzení adaptačních strategií na základě jednotlivých hodnot specifických enzymových aktivit, jsme se stejně jako v předchozí práci zaměřili na aplikaci metod statistické analýzy, a to opět korelační analýze s využitím Pearsonova korelačního koeficientu a PCA. Celkem bylo detekováno pět pozitivních korelací, negativní korelace s dostatečnou signifikancí objevena nebyla. Nejsilnější korelace byla objevena mezi oběma variantami isocitrát dehydrogenasy a jablečným enzymem, to může být přímo způsobeno zapojením do sledu reakcí v rámci katabolismu a anabolismu malátu. Dva z enzymů generujících NADPH jsou také zahrnuty do adaptace na oxidativní stres a zároveň vytváří vhodné prostředí pro biosyntézu. Korelace mezi citrát syntasou a malát syntasou využívající acetyl-CoA nasvědčuje převážně katabolickým reakcím převádějící malát na oxalacetát namísto přeměny na pyruvát za uvolnění NADPH. Pozitivní korelace mezi malát dehydrogenasou a glukosa-6-fosfát dehydrogenasou nemá z hlediska základních metabolických konsekvencí přímou spojitost, může se jednat o vliv celkově lepší fyziologický stav kultury vynikající zvýšenou aktivitou metabolismu a zároveň vyšší intenzitou dělení buněk s ohledem na dráhu vedoucí k produkci pentos. Poslední zmíněný trend byl pozorován především u kmene adaptovaného na měď při porovnání s divokým kmenem exponovaným mědi, lze to tedy brát jako vliv adaptace. Tato skutečnost byla dobře pozorovatelná i prostřednictvím PCA, kdy se ve dvourozměrné projekci oddělily kmeny podrobené akutnímu a dlouhodobému vlivu mědi. Vlivem adaptace tedy muselo dojít ke změnám v metabolismu, což manifestuje odlišným chováním minimálně na úrovni regulace aktivit relevantních enzymů. Nicméně došlo k oddělení téměř všech kmenů, které jsou tak zastoupeny ve všech kvadrantech, skrze specifické aktivity sledovaných enzymů jsou si nejbližší divoký kmen kultivovaný v médiu

bez expozice stresu a kmen adaptovaný na osmotický stres. Jak bylo uvedeno výše, vzhledem k předpokládanému navýšení cyklu PHA by se rozdíly mezi těmito dvěma kmeny mohly projevit u jiných enzymů, a to např. u intracelulární PHA depolymerasy. Naopak na základě vzdálenosti jsou si metabolicky nejvíce vzdálené divoký kmen bez expozice stresu a tentýž kmen exponovaný oxidativnímu stresu vyvolanému přítomností mědi. Kromě celkového rozdělení kmenů odvíjejícího se od korelací s hlavními komponentami F1 a F2 můžeme pozorovat i korelaci s jednotlivými enzymovými aktivitami, kdy lze vidět, v čem spočívá převážně hlavní rys adaptace (Obr. 14).



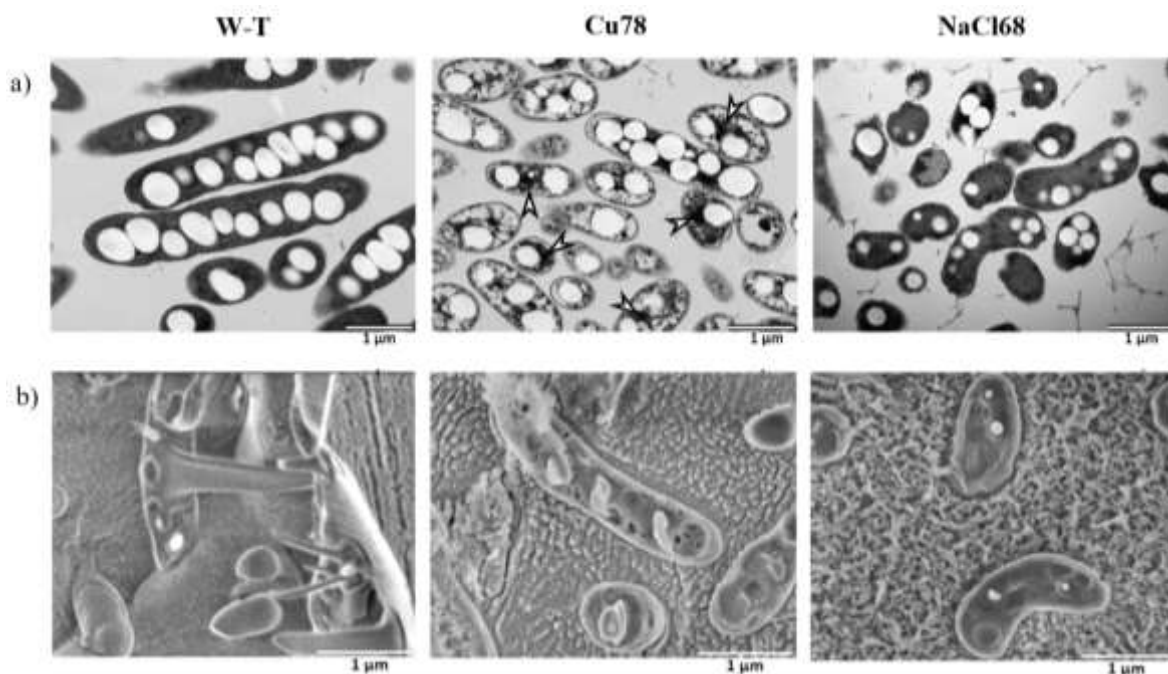
Obr. 14: Projekce testovaných kmenů a stanovovaných enzymů na základě PCA

Další úhel pohledu na hledání rozdílů mezi divokým kmenem a adaptovanými kmeny spočíval v porovnání jejich spekter biomasy získaných pomocí Ramanovy spektroskopie a infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací. V rámci spekter se projeví molekulární složení bakteriálních buněk skrze charakteristické skupiny reprezentující proteiny, nukleové kyseliny, glykosidové vazby sacharidů či esterové vazby mj. v molekulách PHA. Detekce PHA v bakteriální biomase byla popsána již dříve v řadě publikací [196, 212]. Prostřednictvím těchto technik nás tedy zajímalo, jak adaptační proces či expozice akutnímu stresu změní chemické složení buněk. Pro tento účel jsme využili opět metody statistické analýzy, konkrétně PCA, a to zvláště pro Ramanovu a infračervenou spektroskopii, kdy jako vstupní hodnoty byla využita naměřená spektra. Na rozdíl od enzymových aktivit, kde byly vůči sobě korelovány všechny hodnoty, byla zde srovnávána spektra separátně pro jednotlivé stesy, a to vždy divoký kmen bez stresu, divoký kmen exponovaný konkrétnímu stresoru a adaptovaný kmen. Ohraničenou zónu zcela oddělenou od ostatních dvou porovnávaných kmenů vykazoval na základě obou spekter kmen adaptovaný na osmotický stres. Na základě výše zmíněných výpovědních charakteristik obou spektroskopických technik by získaná data

mohla vypovídat o rozdílném chemickém složení biomasy kmene adaptovaného na vyšší salinitu. Tato myšlenka byla nicméně vyvrácena na základě konkrétních rozdílů pozorovatelných již ze spekter samotných, nejvýznamnější rozdíl intenzit píků byl v pásech odpovídajících PHB, což korelovalo se zastoupením polymeru v biomase. Z hlediska detekce PHB jsou uvažovány píky odpovídající karbonylové skupině, esterovým vazbám C–O a C–O–C a vazbě C–H charakteristické pro boční methylovou skupinu PHB. Množství polymeru bylo u kmene adaptovaného na osmotický stres nižší než u ostatních, což bylo stanovováno již v rámci základního screeningu pro jednotlivé pasáže pomocí plynové chromatografie, proto nebylo pozorování překvapující a tento fakt byl brán v potaz. Vzhledem k vysokým signálům PHA ve spektrech nebylo de facto možné detekovat rozdíly mezi kmeny z intenzit píků proteinů, nukleových kyselin apod. Kvantitativní charakteristika PHA již byla komentována, korelace mezi intenzitou relevantních píků a informací získanou z porovnávací metody GC-FID se ve spektrech projevila [187, 196, 212]. Mimoto nám ale spektrum s ohledem na polyester v biomase dokáže určit fyzikální strukturu, konkrétně stupeň krystalinity/amorficity polymeru, a to na základě intenzity a tvaru vibračních pásů detekovatelných ve FT-IR spektrech i spektrech Ramanovy spektroskopie. V souvislosti se stresovou odpovědí mikroorganismů akumulujících PHA bylo popsáno, že schopnost udržet polymer v amorfní formě přispívá k vyšší odolnosti těchto mikroorganismů vůči stresu [187, 213]. Dále jsme se tedy zaměřili na krystalinitu polymeru v bakteriální biomase divokého kmene bez a po expozici stresorům a adaptovaných kmenů, přičemž jsme brali v úvahu částečnou krystalizaci způsobenou přípravou vzorku sušením při 70 °C, expozice vysoké teplotě totiž krystalizaci indukují. Jako marker krystalinity byl uvažován pás odpovídající karbonylové vazbě C=O s ohledem na intenzitu a tvar píku, kdy symetrický pás s maximem při 1 735 cm⁻¹ odpovídá amorfnímu PHB, naopak krystalický polyester ve spektru manifestuje vysoce asymetrickým píkem s červeným posunem maxima intenzity. Výrazně nejméně krystalickou a tedy nejvíce amorfni povahu vykazoval polymer akumulovaný v buňkách kmene adaptovaného na osmotický stres, což bylo potvrzeno oběma spektroskopickými technikami. Může to tedy částečně indikovat vyšší odolnost tohoto kmene vůči stresu, jež byla diskutována výše. Ani v tomto případě však není souvislost stoprocentní, jelikož musíme brát v potaz další parametry, které mají vliv na krystalizaci granulí PHA v buňkách. Kmen adaptovaný na osmotický stres totiž vykazoval oproti ostatním nižší množství PHA, což je v tomto případě nezanedbatelné. Jedním z parametrů, které přispívají ke krystalizaci PHA v buňkách, je těsná blízkost granulí, která podporuje jejich agregaci předcházející krystalizaci [213]. Středně významná korelace mezi krystalinitou a množstvím polymeru v biomase byly pozorovatelné na základě celého datasetu, ne pouze u kmene adaptovaného na osmotický stres. I proto je zapotřebí větší odolnost PHA vůči krystalizaci u adaptovaného kmene dále prověřit.

K posouzení tvarů a vnitřní struktury buněk divokého kmene bez aplikace stresu v průběhu kultivace a adaptovaných kmenů exponovaných stresorům jsme využili techniky elektronové mikroskopie. Aplikovány byly konkrétně techniky kryo-skenovací elektronová mikroskopie a transmisní elektronová mikroskopie (Obr. 15). Oběma technikami byly v buňkách kultury adaptované na měď patrné precipitáty uvnitř v cytoplazmě. Z toho usuzujeme, že bakteriální buňky v rámci adaptace vytvořily útvary s měďnatými ionty, které chrání důležité části buňky

před škodlivým efektem těžkého kovu, jenž je navázáním do precipitátů odstíněn. Tvorba precipitátů již byla popsána při expozici uranu, a to u bakterie *Cupriavidus metallidurans* NA4, která z toxického kovu formovala dusičnan uranylu. Studie rovněž prokázala tvorbu komplexů s granulemi PHA, což přímo podporuje myšlenku protektivního účinku PHA vůči působení těžkých kovů [214]. Na základě našich mikroskopických snímků nicméně nemůžeme potvrdit stejný fenomén, jelikož rozmístění precipitátů u adaptovaného kmene *C. necator* při expozici mědi bylo vesměs nahodilé a jejich povaha nebyla doposud dále charakterizována. Pomocí kryo-SEM byly v buňkách pozorovány díry, které nasvědčují houbovitému charakteru bakteriální cytoplazmy, oproti tomu divoký kmen vykazoval převážně homogenní cytoplazmu s obsahem PHA granulí, ale bez depozit způsobených expozicí měďnatým iontům. Pro posouzení vlivu dlouhodobé adaptace by bylo ještě zajímavé skenovat strukturu cytoplazmy po akutní expozici tomuto stresoru. Nicméně můžeme na základě výše popsaných a komentovaných dat tvrdit, že námi využívaný bakteriální kmen je schopen přežít i prospívat v přítomnosti vyšších koncentrací mědi, která je jednak esenciálním prvkem, ale při vyšších koncentracích také prvkem s významným inhibičním efektem pro většinu bakterií [215]. Buňky kultury adaptované na osmotický stres vykazují podobné charakteristiky jako buňky divokého kmene, jen byly oproti nim menší a namísto tyčinkovitého tvaru byly srpkovité. I na základě těchto technik bylo skrze množství granulí PHA pozorovatelné, že zastoupení polymeru je nižší než u ostatních kmenů. Cytoplazma buněk adaptovaných na osmotický stres se jeví lehce koncentrovanější oproti ostatním, to může být spojeno s menším množstvím intracelulární vody v důsledku vystavení osmotickému stresu.



Obr. 15: Snímky divokého kmene a adaptovaných kmenů získané pomocí elektronové mikroskopie – a) TEM (šipky znázorňují výše diskutované precipitáty), b) kryo-SEM

Na základě získaných výsledků z jednotlivých základních i pokročilejších analýz v rámci diskutované publikace lze shrnout, že v rámci adaptace bakteriálního kmene *Cupriavidus*

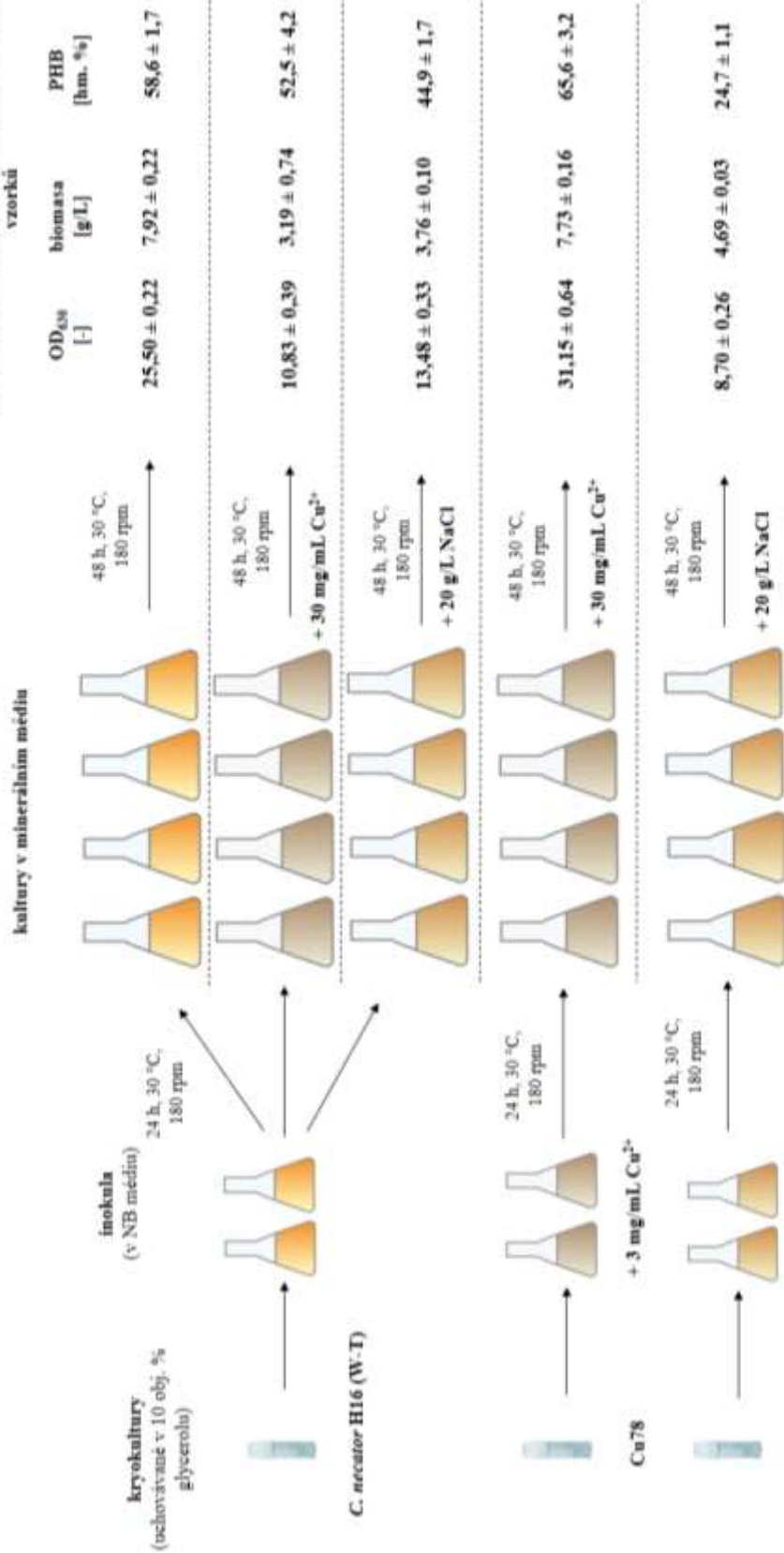
necator H16 na vybrané stresové faktory, tedy přítomnost měďnatých iontů a zvýšený osmotický stres, hrály PHA důležitou roli. Ne však pouze prostřednictvím vyššího množství polymeru v biomase, ale především pravděpodobně skrze navýšený cyklus přeměny PHA v buňkách, což vedlo k navýšení poolu monomerních jednotek, které vykazují funkci jednak chaperonů, jednak osmoprotektantů.

4.1.2.2 Nepublikovaná data vztahující se ke komentované publikaci

V rámci publikace nebyla vzhledem ke kapacitě článku publikována všechna získaná data. Především nebyly publikovány výsledky týkající se bakteriálního kmene *H. halophila*, který byl, jak bylo uvedeno výše, adaptován na přítomnost 1 g/L kyseliny levulové a 3 g/L kyseliny octové v médiu při současné regulaci pH. U tohoto kmene byl při porovnání růstových charakteristik prokázán pozitivní vliv adaptace při kultivaci v minerálním médiu. Kmen adaptovaný na přítomnost kyseliny levulové, stejně jako kyseliny octové, vykazoval v porovnání s divokým kmenem reprodukovatelně 1,5krát vyšší nárůst buněk v kulturách v přítomnosti kyselin, ale i větší nárůst v médiu bez těchto stresorů. Nicméně v rámci adaptace nedocházelo k výraznějšímu navýšení produkce PHA v biomase a na rozdíl od *C. necator* H16 není kmen *H. halophila* přirozeně schopen využít kyselinu levulovou, což bylo prokázáno analýzou residuálního množství kyseliny v supernatantu po kultivaci. Ani po poměrně dlouhé adaptaci na tento potenciální prekurzor 3-hydroxyvalerátu nebyla v biomase detekována přítomnost kopolymeru P(3HB-co-3HV), kyselina levulová na kmen *H. halophila* tedy působila pouze inhibičně.

Další nepublikovanou součástí, která se vztahuje k výše zmíněné publikaci, představuje proteomická analýza, jež byla provedena pro tetraplikáty kultur divokého kmene *C. necator* H16 v minerálním médiu bez stresu, dále tohoto divokého kmene v médiu se stresi, na něž byl původní kmen adaptován, tedy 30 mg/L měďnatých iontů respektive 20 g/L NaCl, a dále adaptovaných kmenů v médiu s odpovídajícími stresory. Pro účely analýzy byly využity vzorky bakteriální biomasy po 48 h kultivace. Samotná proteomická analýza byla realizována ve spolupráci s Proteomic Core Facility CEITEC Brno. Schéma experimentu je znázorněna na následujícím schématu (Obr. 16).

Průměrné hodnoty charakteristik pro tetraplíkát vzorků



Odběr triplikátů z každé baňky pro jednotlivé analýzy – proteomická, gravimetrická, stanovení PHB, stanovení optické hustoty

Obr. 16: Schéma experimentu předcházejícího proteomické analýze

Analýzou jednotlivých proteinů obsažených v analyzovaných buňkách byla detekována přítomnost celkem 4 604 proteinových skupin v rámci celého datasetu na základě anotace s UniProt databází. Nicméně se nejednalo výhradně o různé proteiny, jelikož řada shodných proteinů byla pravděpodobně vzhledem k drobným odlišnostem rozdělena. Ze zmíněného počtu bylo 489 proteinů na základě komparace s databází definovaných jako blíže necharakterizovaných.

Pro účely detekce up-regulovaných a down-regulovaných proteinů jednotlivých testovaných kmenů vůči sobě byly nastaveny threshold hodnoty na 5 pro parametr míry velikosti účinku (FC – fold change); 0,01 pro parametr signifikance P a 0,05 pro upravený P parametr podle Benjaminiho a Hochberga. Hodnoty P parametru a upraveného P parametru byly získány na základě LIMMA testu (Linear models for microarray data analysis). Jednotlivá vyhodnocení byla získána na základě porovnání hodnot s definovanými threshold hodnotami. Bylo možné získat informace, zda-li jsou poměry dat vyšší než specifikované hodnoty threshold (U), nižší než reciproká hodnota threshold (D) případně leží mezi těmito dvěma hodnotami (N). V případě, že podíl hodnoty P a upravené hodnoty P byl nižší než specifikované threshold hodnota, byly obě P hodnoty kategorizovány jako Y, v případě, že byl poměr rovný nebo vyšší, byly označeny jako N. Aby bylo možné uvažovat up-regulaci nebo down-regulaci jednotlivých proteinů mezi kmeny, byly filtrovány pro jednotlivé porovnávané kmeny detekované proteiny na základě překročení hodnot parametru FC.

Vůči sobě byl zprvu porovnán divoký kmen *C. necator* H16 exponovaný danému stresu s divokým kmenem (W-T) bez expozice stresorům, počty up-regulovaných a down-regulovaných proteinů jsou uvedeny v Tab. 3.

Tab. 3: Vliv akutní expozice iontům Cu^{2+} a osmotickému stresu na *C. necator* H16 (W-T)

porovnávané kmeny	down-regulace	up-regulace
W-T exponovaný Cu^{2+} / W-T	188	202
W-T exponovaný NaCl / W-T	521	153

Bylo zjištěno, že při expozici stresu indukovaného přítomností měďnatých iontů bylo oproti divokému kmeni down-regulováno a up-regulováno podobné množství proteinů, a to 188 respektive 202. Při důkladnějším screeningu těchto proteinů byla detekována up-regulace sedmi proteinů souvisejících s odpovědí na měď (copper resistance protein A, multi-copper oxidase; copper resistance protein B, copper extruder; copper resistance protein C; copper chaperone, heavy metal ion binding; putative copper uptake P-type ATPase; copper efflux P-type ATPase a copper resistance protein D, transmembrane component), kdy navíc poslední z uvedených byl detekován pouze u kmene exponovaného mědi. Přítomnost tohoto stresoru v médiu tedy i při okamžité krátkodobé expozici vedla k navýšení exprese zmíněných proteinů, což poukazuje na signifikantní vliv měďnatých iontů jakožto stresoru.

Při porovnání divokého kmene exponovaného osmotickému stresu a divokého kmene bez expozice stresu byla pozorována down-regulace 521 proteinů, přičemž up-regulováno bylo 153 proteinů, což je třetinové množství. Vzhledem k povaze stresoru není jednoduché přímo vyhledat proteiny zapojené do stresové odpovědi, nicméně byly detekovány proteiny zapojené

do syntézy trehalosy, která slouží jako osmoprotektant, přičemž množství nebyla navýšena ani snížena u žádných srovnávaných kmenů. S ohledem na obecnou stresovou odpověď buňky byla detekována přítomnost více typů proteinů zapojených do odpovědi (např. universal stress protein; universal stress protein, UspA family a metalloregulation DNA-binding stress protein), nicméně nebyla objevena žádná up-regulace pro stresované kmeny při krátkodobé expozici ani po adaptaci, naopak byly u obou krátkodobě stresovaných kmenů down-regulovány rozdílné dva univerzální stresové proteiny. I při akutní expozici lze předpokládat expresi proteinů, které jsou indukovány konkrétními stresory a jsou tím pro dané stresy specifitější, jak tomu bylo u kmene exponovaného mědi.

Další porovnávané dvojice kmenů byly kmeny adaptované na dané stresory, tedy kmen *C. necator* H16/Cu78 adaptovaný na přítomnost měďnatých iontů (30 mg/L Cu^{2+}) a kmen *C. necator* H16/NaCl68 adaptovaný na osmotický stres (20 g/L NaCl) s divokým kmenem bez expozice stresu. Počty down-regulovaných a up-regulovaných proteinů adaptovaných kmenů (Cu78, NaCl68) oproti kmeni divokému jsou shrnuty v Tab. 4.

Tab. 4: Vliv dlouhodobé adaptace na ionty Cu^{2+} a osmotický stres při porovnání s *C. necator* H16 (W-T)

porovnávané kmeny	down-regulace	up-regulace
Cu78 / W-T	256	156
NaCl68 / W-T	674	134

Vlivem dlouhodobé adaptace na přítomnost měďnatých iontů bylo u kmene oproti divokému kmeni down-regulováno 256 proteinů, což je více než v případě aplikace stresu na akutní stres. Up-regulováno bylo celkem 156 proteinů, což je v tomto případě méně než v předchozím porovnání. Rozdílný byl i trend, kdy vlivem adaptace bylo při této komparaci větší množství down-regulovaných proteinů a celkově i opačná množství více a méně exprimovaných proteinů. Kmen adaptovaný na měď vykazoval up-regulaci osmi proteinů zapojených do odpovědi na stres způsobený přítomností mědi v médiu. Oproti akutní expozici divokého kmene vlivu mědi byl u adaptovaného kmene up-regulován navíc jeden protein (response regulator of copper response, OmpR-family), což může celkově vést k více specifické stresové odpovědi. Stejně jako v předchozím porovnání vlivu expozice mědi byla detekována transmembránová komponenta proteinu odpovědného za resistenci vůči mědi D pouze u adaptovaného kmene, nikoli u divokého. Nebylo nalezeno žádné navýšení či snížení exprese proteinů odpovědných za obecnou stresovou odpověď. Porovnáme-li kmen adaptovaný na osmotický stres s divokým kmenem, bylo nalezeno celkem 674 down-regulovaných proteinů, což je největší detekovaná hodnota ze všech porovnávaných kmenů. Zároveň ale lze konstatovat, že v přítomnosti chloridu sodného byla u divokého i adaptovaného kmene vždy vyšší down- i up-regulace ve srovnání s divokým kmenem, ale i s alternativou v přítomnosti mědi. Dále byla detekována down-regulace čtyř z nalezených proteinů zapojených do obecné stresové odpovědi, produkce trehalosy regulující následky osmotického stresu nebyla u adaptovaného kmene navýšena ani snížena stejně jako v případě krátkodobé jednorázové expozice. V rámci výše komentované publikace zabývající se komparací adaptovaných kmenů s divokými byl předpokládán zvýšený obrat PHA v buňce za účelem navýšení intracelulárního poolu jednotky 3HB, která byla potvrzena jako

osmoprotektant. Nicméně byly nalezeny čtyři formy intracelulární P(3HB) depolymerasy, z nichž jedna byla u kmene adaptovaného na osmotický stres down-regulována stejně jako u divokého kmene exponovaného tomuto stresu, u mědi trend up- či down-regulace depolymeras pozorován nebyl.

Jako doplňkové porovnání se nabízí vliv adaptace na konkrétní stresor s akutní odpovědí divokého kmene na jejich přítomnost v médiu. Pro tento účel byly srovnány kmen *C. necator* H16/Cu78 s W-T kmenem exponovaným 30 mg/L Cu²⁺ a kmen *C. necator* H16/NaCl68 s W-T exponovaným 20 g/L NaCl, počty up- a down-regulovaných proteinů jsou uvedeny v Tab. 5.

Tab. 5: Porovnání vlivu dlouhodobé adaptace a akutní expozice Cu²⁺ iontům a osmotickému stresu

porovnávané kmeny	down-regulace	up-regulace
Cu78/W-T exponovaný Cu ²⁺	295	151
NaCl68/W-T exponovaný NaCl	411	309

Dlouhodobá adaptace na měď oproti krátkodobé expozici vedla k down-regulaci 295 proteinů a up-regulaci 151 proteinů. Počet down-regulací byl v tomto případě vyšší než při porovnání s divokým kmenem po expozici mědi vůči divokému kmeni, up-regulace byla v tomto případě nižší. Při porovnání adaptovaného kmene s divokým byla množství regulací téměř identická. Down-regulováno bylo celkem 43 proteinů s blíže necharakterizovanou funkcí, což bylo nejvyšší množství v rámci jednotlivých komparací, 26 těchto proteinů bylo up-regulováno. Navýšena byla exprese jednoho z proteinů odpovědného za univerzální stresovou odpověď, navíc byla pozorována nadprodukce P(3HB) depolymerasy. Počet down-regulací u kmene adaptovaného na osmotický stres byl detekován na 411 proteinů, up-regulovaných proteinů bylo méně, a to 309. Opět se ukázalo, že vliv osmotického stresu je z hlediska počtu změn v expresi výraznější, než tomu bylo u stresu způsobenému mědí. V rámci down-regulací byl detekován phasin protein pokrývající povrch PHA granulí, což při dlouhodobé adaptaci mohlo souviset se snížením počtu granulí PHA a zároveň i s celkovým obsahem polymeru v biomase, což bylo u adaptovaného kmene pozorováno při porovnání s divokým kmenem. Mimoto byla snížena exprese jednoho z proteinů odpovědného za obecnou stresovou odpověď. Při tomto srovnání byla oproti předchozí s mědí jako stresorem detekována up-regulace 43 blíže necharakterizovaných proteinů a jeden protein odpovědný za obecnou stresovou odpověď.

Kromě porovnání kmenů vůči sobě byly blíže pozorovány enzymy, u nichž byla stanovována specifická enzymová aktivita v rámci publikace. Zde se projevil trend spojený s detekcí více proteinů se stejným zařazením na základě označení a zároveň funkce. Citrát syntasa byla detekována pětkrát, up-regulována byla pro jednu variantu pouze u kmene adaptovaného na měď, a to vůči divokému kmeni bez stresu i po expozici stresu. NAD⁺ dependentní isocitrát dehydrogenasa byla detekována pouze v jedné formě, nicméně bez regulace na úrovni porovnání exprese. Stejně tak nebyla nalezena up- ani down-regulace pro malát dehydrogenasu. Malát syntasa, která vystupuje v rámci glyoxalátového cyklu, také nebyla pozměněna z hlediska míry exprese mezi srovnávanými kmeny. Následně byly zkoumány enzymy generující redukovaný kofaktor NADPH. Glukosa-6-fosfát dehydrogenasa byla

detekována celkem pětkrát, jedna z forem byla down-regulována u divokého kmene exponovaného osmotickému stresu oproti divokému kmeni bez stresu a up-regulována u kmene adaptovaného na osmotický stres vůči divokému kmeni v přítomnosti stresoru. To tedy poukazovalo na výrazné snížení exprese jedné z forem proteinu u divokého kmene při expozici osmotickému stresu, nicméně u dalších detekovaných forem jev pozorován nebyl. NADP⁺ dependentní isocitrát dehydrogenasa byla detekována dvakrát, taktéž beze změn v regulaci exprese v rámci srovnání. Jablečný enzym generující NADPH, byl nalezen pouze jedenkrát, a to beze změn mezi srovnávanými kmeny. Mimoto byla objevena i NAD⁺ dependentní varianta se stejnou funkcí, která ale nebyla z hlediska enzymových aktivit řešena. Jako poslední byly analyzovány výsledky pro enzymy zapojené do biosyntézy PHA. První z enzymů, 3-ketothiolasa, byla detekována pouze v jedné formě, nebyla však nalezena žádná up- ani down-regulace. Acetoacetyl-CoA reduktasa byla detekována celkem ve čtyřech formách, z nichž jedna byla ve dvou případech down-regulována, a to u kmene adaptovaného ne měď v porovnání s divokým kmenem i s divokým kmenem exponovaným mědi. Nicméně jako už výše to nebylo potvrzeno u více detekovaných forem. Ani v jedné z detekovaných forem PHA syntasy (PHA polymerasy) nebyla pozorována down- či up-regulace. Kromě syntézy byla reflektována i intracelulární degradace, u níž byly rozděleny proteiny do dvou skupin, základní enzym byla intracelulární PHA depolymerasa ve čtyřech formách a dále hydrolasa 3HB oligomerů ve dvou formách. Byla detekována jedna up-regulace PHA depolymerasy u kmene adaptovaného na měď oproti divokému kmeni po expozici mědi a down-regulace byla detekována při expozici osmotickému stresu u divokého kmene i u kmene adaptovaného, opět ale pouze u jedné z forem. Jedna z analyzovaných hydrolas byla down-regulována u kmene adaptovaného na osmotický stres v porovnání s divokým kmenem a také v porovnání s kmenem adaptovaným na přítomnost měďnatých iontů. V souvislosti s PHA ve formě intracelulárních granulí byla uvažována i regulace produkce phasin proteinů, které se nachází na povrchu granulí. Nebylo pozorováno žádné navýšení produkce phasinů, nicméně pro kmen adaptovaný na osmotický stres byla při porovnání s divokým kmenem jednak bez expozice soli a jednak po expozici osmotickému stresu nalezena down-regulace u dvou ze čtyř detekovaných forem. Pozatek koreluje s daty jednak z plynové chromatografie, jednak z elektronové mikroskopie, kdy vlivem nižšího granulí i množství celkového polymeru v buňkách lze očekávat menší množství proteinů obklopujících polyesterová jádra. Musíme však brát v úvahu, že kvantifikace proteinů navázaných na granule může být zatížena chybou.

Prostřednictvím stanovení specifických enzymových aktivit bylo nalezeno více rozdílů mezi jednotlivými adaptovanými kmeny a divokým kmenem bez stresorů i v jejich přítomnosti než na základě down- či up-regulací stanovených proteomickou analýzou. Up-regulace byla detekována pro glukosa-6-fosfát dehydrogenasu pro kmen adaptovaný na osmotický stres při porovnání s divokým kmenem exponovaným osmotickému stresu, pro tuto dvojici bylo pozorováno téměř devítinásobné navýšení specifické enzymové aktivity. Pro acetoacetyl-CoA reduktasu byla na základě proteomiky pozorována down-regulace u kmene adaptovaného na měď v porovnání s divokým kmenem bez expozice stresu a také exponovaného měďnatým iontům, nicméně na základě specifických enzymových aktivit byla pozorována pro stejné dvojice spíše navýšení specifických aktivit enzymu. Na základě zmíněného tedy lze

vydedukovat, že množství enzymu přítomného v buňce nemusí mít přímý dopad na hodnotu specifické enzymové aktivity. Vliv stresu se mohl projevit buď navýšením aktivit relevantních enzymů nebo nevyšším jejich exprese, a to bez nutnosti vzájemné souvislosti. Zároveň ale musíme brát v úvahu, že v rámci metabolismu nedochází k regulaci enzymové aktivity pouze na úrovni exprese, zásadní jsou také posttranslační modifikace a také regulace skrze další strategie jako allostérie, zpětná vazba, inhibice produktem atd. Tyto skutečnosti by také mohly vést k získaným výsledkům. S pomocí odhalit větší provázanost naměřených dat v rámci metabolismu by nám mohly pomoci bioinformatické nástroje využívané kolegy z FEKT VUT, se kterými plánujeme spolupráci.

4.1.3 Produkce kopolymeru P(3HB-co-4HB) pomocí *C. necator* H16

Kopolymer P(3HB-co-4HB) je z důvodů jeho mechanických, termických, ale také biologických vlastností velice zajímavým polymerem, který je některými odborníky považován za PHA polymer třetí generace. Pro účel inkorporace 4-hydroxybutyrátu (4HB) do struktury kopolymeru P(3HB-co-4HB) byly využity prekurzory aplikované, nejen v rámci našeho pracoviště, na jiné bakteriální kmeny, a to 1,4-butandiol (1,4-BD), γ -butyrolakton (γ -BL), 1,6-hexandiol (1,6-HD) a ϵ -kaprolakton (ϵ -KL), které vykazovaly v závislosti na kmenech různou úspěšnost konverze na 4-hydroxybutyryl-CoA, substrát PHA syntasy [216–219]. Zatímco první zmíněný substrát představuje strukturní analog 4-hydroxybutyrové kyseliny, druhá a čtvrtá molekula představují laktonické formy dvou hydroxykyselin s hydroxyskupinou na terminálním uhlíku, tedy kyseliny γ -hydroxymásečné a ϵ -hydroxykapronové, a 1,6-HD je šestiuhlíkatá molekula příbuzné kyselině ϵ -hydroxykapronové, kdy namísto karboxylové skupiny na prvním uhlíku obsahuje druhou hydroxylovou skupinu. U kmene *Cupriavidus necator* H16 schopného využít mimo cukerných substrátů také odpadní olej očekáváme mj. efektivní dráhu metabolizující mastné kyseliny (β -oxidace). Z molekuly γ -hydroxymásečné kyseliny může dojít k odštěpení produktu katabolismu mastných kyselin, acetyl-CoA, který může být dále metabolizován, nebo může dojít k aktivaci za vzniku 4-hydroxybutyryl-CoA, jenž je využitelný pro biosyntézu kopolymeru P(3HB-co-4HB). Kyselina ϵ -hydroxykapronová je de facto analogem předchozí kyseliny delší o dva uhlíky, proto vzniku 4-hydroxybutyryl-CoA předchází zkrácení řetězce kyseliny o dva uhlíky, což odpovídá jedné otočce Lynenovy spirály. Konverze 1,4-BD na 4-hydroxybutyryl-CoA pravděpodobně nastává při dvojnásobné oxidaci jedné z hydroxyskupin a aktivaci karboxylové skupiny. Poslední testovaný prekurzor 1,6-HD je pravděpodobně stejně jako 1,4-BD na jedné z hydroxyskupin karboxylován, a poté zpracován stejně jako kyselina ϵ -hydroxykapronová. Strategie jednotlivých experimentů vedoucích k získání kmene *C. necator* schopného produkce kopolymeru P(3HB-co-4HB) s vysokým podílem frakce 4HB je uvedeno níže v rámci **Přílohy III**.

4.1.3.1 Výběr nejvhodnějšího substrátu pro produkci kopolymeru

První experiment byl zaměřený na výběr nejvhodnějšího prekurzoru 4HB pro bakteriální kmen *C. necator* H16. Byly testovány jak samotné prekurzory 1,4-BD, γ -BL, 1,6-HD, respektive ϵ -KL v množství 4 g/L, tak i jejich kombinace s fruktosou a odpadním olejem v koncentraci 10 g/L. Výsledky analýzy biomasy a akumulovaných PHA jsou shrnuty v Tab. 6.

Tab. 6: Stanovení biomasy a PHA při produkci na potenciálních prekurzorech 4HB

substráty	biomasa [g/L]	PHA [hm. %]	PHA [g/L]	*4HB [mol. %]	*3HV [mol. %]
1,4-BD	0,65 ± 0,10	19,9 ± 6,9	0,13 ± 0,06	10,91 ± 1,17	1,89 ± 0,41
fruktosa + 1,4-BD	4,70 ± 0,04	81,0 ± 18,7	3,81 ± 0,92	0,63 ± 0,06	0
olej + 1,4-BD	6,84 ± 0,26	86,1 ± 17,9	5,86 ± 1,00	0	0,54 ± 0,01
γ-BL	0,68 ± 0,12	6,8 ± 0,1	0,05 ± 0,01	22,19 ± 1,43	0
fruktosa + γ-BL	5,07 ± 0,04	68,0 ± 0,4	3,45 ± 0,01	6,05 ± 0,06	0
olej + γ-BL	2,63 ± 0,06	41,7 ± 0,8	1,10 ± 0,04	6,37 ± 0,21	0,90 ± 0,20
1,6-HD	-	-	-	-	-
fruktosa + 1,6-HD	-	-	-	-	-
olej + 1,6-HD	1,08 ± 0,03	32,6 ± 0,5	0,35 ± 0,00	0	1,02 ± 0,01
ε-KL	1,38 ± 0,08	60,0 ± 16,9	0,83 ± 0,28	40,83 ± 1,03	0
fruktosa + ε-KL	1,36 ± 0,01	¹ 46,2	¹ 0,62	¹ 30,29	0
olej + ε-KL	1,16 ± 0,04	38,9 ± 1,3	0,45 ± 0,03	53,25 ± 0,60	1,10 ± 0,26

*Zbývající množství polymeru (kopolymeru, terpolymeru) bylo tvořeno jednotkami 3HB.

¹z technických důvodů nebylo možné měření opakovat v dostatečném počtu, proto chybí smodch

První dva testované prekurzory 1,4-BD a γ-BL ve své struktuře obsahují čtyři atomy uhlíku, zatímco druhé dva prekurzory 1,6-HD a ε-KL obsahují v molekule uhlíků šest. Na základě stanovených množství biomasy kultura lépe využívá čtyřuhlíkaté sloučeniny, většího výtěžku biomasy bylo dosaženo pouze, když byl ε-KL využit jako jediný zdroj uhlíku. Jako nejméně vhodný prekurzor vyšel na základě dat 1,6-HD, přičemž na samotném prekurzoru stejně jako na kombinaci s fruktosou nebyla stanovena žádná biomasa, lze tedy předpokládat, že na vybraný mikrobiální kmen působí spíše inhibičně. Namísto produkce kopolymeru s 4HB byla detekována přítomnost kopolymeru P(3HB-co-3HV), i když množství 3HV i celý obsah PHA byly nízké. Oba čtyřuhlíkaté prekurzory vedly v kombinaci s oběma zdroji uhlíku k vyššímu výtěžku biomasy i celkových PHA, ale frakce 4HB byla pro oba prekurzory nižší než pro druhý šestiuhlíkatý prekurzor ε-KL. Nejvyšší zastoupení 4HB bylo pro 1,4-BD a γ-BL detekováno, když kultura rostla pouze na samotných prekurzorech. V těchto případech bylo ale oproti růstu v kombinaci s olejem nebo fruktosou více než třikrát nižší. Na základě výzkumu týmu Steinbüchel a kol. (1994) nebyl kmen *C. necator* H16 schopen využít 1,4-BD [220]. Ve dvoustupňové kultivaci a při nastavení podmínek limitace dusíkem docházelo stejně jako v našem experimentu k produkci kopolymeru P(3HB-co-4HB) [221].

Dle našich výsledků se jako nejvhodnější prekurzor pro kmen *C. necator* H16 se jeví ε-KL, u nějž byl výtěžek biomasy ve všech třech případech srovnatelný a o něco nižší než u jiných prekurzorů, což poukazuje na pravděpodobný mírný inhibiční efekt. Nicméně množství PHA představovalo přibližně 50 hm. %, z čehož frakce 4HB se v závislosti na substrátu pohybovala v průměru okolo 40 mol. %, největší byla při kombinaci oleje a ε-KL, a to až 53,25 mol. %, proto byla tato kombinace využita i v rámci dalšího experimentu. Z dostupných zdrojů je patrné, že preference substrátů a prekurzorů jsou specifitou jednotlivých bakteriálních kmenů, pro bakteriální kmen *Cupriavidus* sp. DSM 19379 byly pro jednotlivé substráty stanoveny jednak odlišná zastoupení 4HB frakce, přestože rovněž ε-KL vedl v tomto parametru k nejvyššímu výtěžku, nicméně i inhibiční efekt byl rozdílný [218]. Na základě rešerše jsme

zjistili, že využití ϵ -KL jakožto prekurzoru 4HB je poměrně unikátní, jako hlavní prekurzory pro produkci kopolymeru P(3HB-co-4HB) se využívají především kyselina 4-hydroxybutanová či γ -BL.

Vzhledem ke stanovenému inhibičnímu efektu ϵ -KL byl další experiment zaměřený na jeho částečnou eliminaci tohoto negativního fenoménu, a to jednak vzhledem k množství přidávaného prekurzoru, jednak také v rámci času jeho přidavku. Po 24 h kultivace se kultura nachází již v exponenciální fázi růstu, po 48 h poté na rozmezí fáze exponenciální a stacionární. V Tab. 7 jsou shrnuty výsledky ze stanovení biomasy a analýzy PHA.

Tab. 7: Stanovení biomasy a analýza PHA při produkci na odpadním oleji (10 g/L) a ϵ -KL v závislosti na koncentraci a čase přidavku

čas přidavku [h]	koncentrace ϵ -KL [g/L]	biomasa [g/L]	PHA [g/L]	*4HB [mol. %]	Mw [kDa]	PDI [-]
-	0	9,29 ± 0,18	8,19 ± 0,02	-	409,75 ± 11,68	1,23 ± 0,03
0	2	9,03 ± 0,06	7,36 ± 0,00	1,53 ± 0,22	320,66 ± 11,71	1,30 ± 0,07
	4	3,61 ± 0,08	2,09 ± 0,02	3,53 ± 0,09	482,56 ± 11,52	1,31 ± 0,08
	6	2,08 ± 0,18	¹ 1,09	¹ 6,45	368,77 ± 18,05	1,28 ± 0,04
	8	1,67 ± 0,05	0,61 ± 0,11	19,99 ± 0,20	520,80 ± 19,71	1,41 ± 0,11
24	2	8,06 ± 0,19	6,30 ± 0,38	2,42 ± 0,11	363,49 ± 15,07	1,36 ± 0,01
	4	4,83 ± 0,03	3,40 ± 0,14	1,05 ± 0,10	294,08 ± 10,06	1,43 ± 0,04
	6	4,78 ± 0,10	3,15 ± 0,08	0,93 ± 0,06	262,06 ± 4,01	1,41 ± 0,04
	8	4,37 ± 0,06	2,49 ± 0,04	0,92 ± 0,02	244,45 ± 5,39	1,45 ± 0,06
48	2	10,10 ± 0,21	8,41 ± 0,22	¹ 0,36	253,11 ± 4,02	1,39 ± 0,01
	4	9,58 ± 0,07	7,80 ± 0,21	0,48 ± 0,08	241,46 ± 5,50	1,44 ± 0,03
	6	9,47 ± 0,09	7,60 ± 0,27	0,44 ± 0,01	217,22 ± 8,33	1,47 ± 0,05
	8	9,75 ± 0,17	¹ 7,55	¹ 0,46	205,04 ± 10,11	1,49 ± 0,01

*Zbývající množství kopolymeru bylo tvořeno jednotkami 3HB.

¹z technických důvodů nebylo možné měření opakovat v dostatečném počtu, proto chybí smodch

Po přeočkování inokula do minerálního média (v čase 0 h) se kultura zpočátku nachází v lag-fázi, buňky jsou v adaptační fázi na nové prostředí a přidavek většího množství inhibitoru se může projevit kromě celkově nižšího počtu buněk na konci kultivace také prodloužením této fáze. Při porovnání kontrolní kultury bez prekurzoru a s přidavkem hned při inokulaci můžeme pozorovat míru inhibice, kdy u 2 g/L ϵ -KL bylo množství biomasy na konci téměř srovnatelné s kontrolou, pro 4 g/L už byl výtěžek přibližně třetinový a s nárůstem koncentrace ϵ -KL výtěžek biomasy dále klesal. Stejně tak klesal i výtěžek celkových PHA v biomase, nicméně zastoupení frakce 4HB v kopolymeru se se vzrůstajícím množstvím ϵ -KL zvyšovalo od 1,53 mol. % pro 2 g/L až po téměř 20 mol. % pro 8 g/L. Přidavek ve 24 h kultivace, tedy v exponenciálním stavu kultury, vedl k navýšení celkové biomasy vyjma kultury s přidavkem 2 g/L, u které byl celkově nižší i výtěžek PHA, přestože zastoupení 4HB v kopolymeru bylo vyšší než při přidavku hned na počátku kultivace. Biomasa pro zbývající koncentrace ϵ -KL byla vesměs srovnatelná, pouze s mírně sestupným trendem s nárůstem množství prekurzoru. Trend byl pozorován i pro obsah celkových PHA a zastoupení 4HB, v tomto případě se oproti přidavku v čase 0 h nezvyšovalo procento 4HB frakce se zvyšujícím

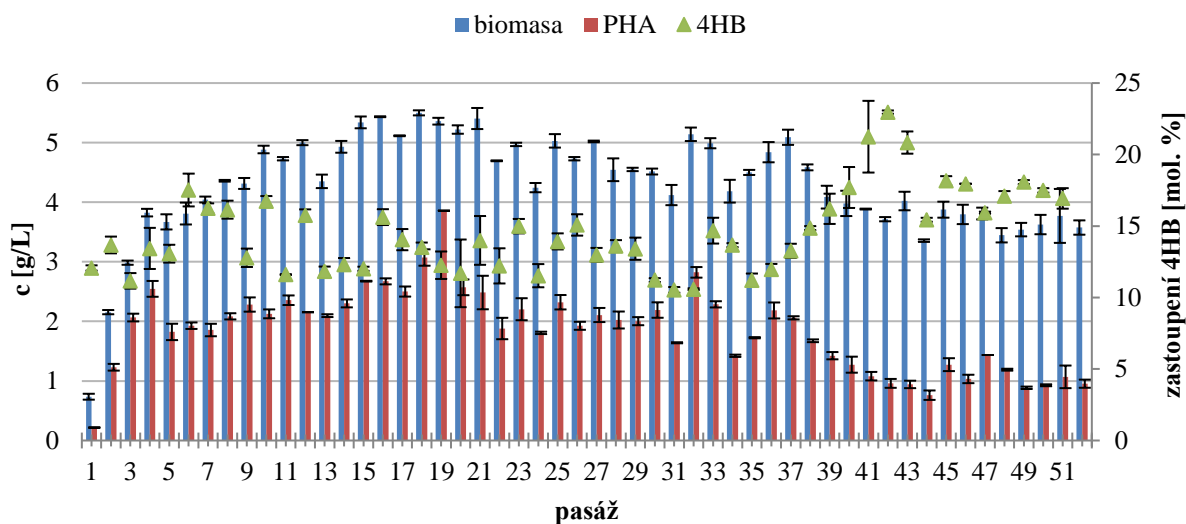
se množstvím ϵ -KL. Posledním testovaným časem bylo 48 h, kdy kultura začíná přecházet z exponenciální fáze do stacionární, nedochází již k výraznému nárůstu počtu buněk, u buněk ve zvýšené míře nastává syntéza sekundárních metabolitů. Inhibiční efekt ϵ -KL přidaném v tomto čase již nebyl tak významný, rozdíl je možné zaznamenat pouze mezi nejnižším přidavkem 2 g/L, u vyšších koncentrací byly výtěžky srovnatelné. Stejný trend se projevil i u množství celkových PHA, podíl 4HB v kopolymeru byl pro všechny koncentrace téměř totožný, navíc nejnižší ze všech testovaných časů. Zároveň ale množství biomasy bylo ve všech kulturách s přidavkem prekurzoru po 48 h vyšší než v kontrolní kultuře. Tento jev lze patrně přičítat vyčerpání primárního zdroje uhlíku, v tomto případě oleje, v médiu, což po uplynutí tohoto času pravděpodobně nastává, jelikož standardní kultivace, které v rámci pracoviště s *C. necator* H16 provádíme, požadují příslušný zdroj uhlíku v množství 20 g/L pro 72hodinovou kultivaci. Proto se při přidavku ϵ -KL může objevit vyšší nárůst biomasy, jelikož prekurzor je využit jako další zdroj uhlíku pro růst. Na základě získaných dat lze konstatovat, že pro produkci kopolymeru P(3HB-co-4HB) s vysokým podílem frakce 4HB je nejvhodnější prekurzor přidávat již na začátku kultivace, a to v koncentraci 8 g/L, kdy byla po 72 h kultivace získáno stále dostatečné množství buněk a zároveň obsah 4HB v kopolymeru činil téměř 20 mol. %. Zároveň ale vzhledem k výraznému inhibičnímu efektu se jeví jako vhodné připravit kmen s vyšší odolností vůči inhibičnímu vlivu ϵ -KL, a to právě např. metodou evolučního inženýrství.

Molekulová hmotnost PHA byla stanovena z polymeru vyizolovaného po 72 h kultivace. Zatímco kontrolní kultura v buňkách akumulovala homopolymer P(3HB), všechny ostatní kultury s přidavkem prekurzoru ϵ -KL akumulovaly kopolymer P(3HB-co-4HB) s různým zastoupením frakce 4HB. Porovnáním všech molekulových hmotností můžeme pozorovat trend vyšších hodnot pro kultury, kdy byl prekurzor přidán na počátku kultivace. Nejvyšší molekulovou hmotnost vykazoval kopolymer s největším množstvím 4HB (20 mol. %), a to přibližně 520 kDa, následovaný kopolymerem s třetí nejvyšší frakcí 4HB, ale zároveň s druhým nejvyšším zastoupením PHA v biomase z kultur obsahujících ϵ -KL již od počátku kultivace. Třetí nejvyšší molekulovou hmotnost vykazoval homopolymer P(3HB), který měl rovněž nejvyšší množství PHA v biomase. Pro zpracování jsou obecně vhodnější polymery s vyšší molekulovou hmotností a co nejužší distribucí délek řetězců definovaných indexem polydisperzity (PDI), od nějž se odvíjí něj mechanické vlastnosti polymeru. Polydisperzita systému rovna 1 značí monodisperzní systém se stejně dlouhými řetězci polymeru, což nebývá pro mikrobiálně produkované polymery běžné, navíc není v naprosté většině případů možné ji při tomto způsobu produkce ovlivnit [222]. Nejvíce uniformní z našich vzorků byl vyizolovaný homopolymer s PDI 1,23, nejvyšší stanovená hodnota byla 1,49, což značí stále poměrně uniformní systém.

4.1.3.2 Adaptace *C. necator* H16 na ϵ -KL za účelem zlepšení růstových a produkčních charakteristik kmene

Na základě výsledků plynoucích z předchozích experimentů by jako ideální kombinace substrátů byla kombinace odpadního oleje v koncentraci 10 g/L s prekurzorem ϵ -KL vystupujícím jako stresový faktor vzhledem ke svému inhibičnímu efektu na kulturu *C. necator* H16. Nicméně kvůli vyššímu výtěžku biomasy, který byl stanoven při kombinaci

s fruktosou, byla jako hlavní zdroj uhlíku vybrána právě fruktosa. Zvolena byla v koncentraci 8 g/L, aby byla během růstu dříve vyčerpána a kmen byl minimálně z části závislý i na druhém zdroji uhlíku, tedy ϵ -KL, jelikož doba kultivace jednotlivých pasáží byla jako v předchozím adaptačním experimentu 48 h. Přestože jsme očekávali významný inhibiční vliv ϵ -KL, jevila se nám tato kombinace jako vhodná pro postupnou adaptaci kultury. Výsledky gravimetrické analýzy a analýza PHA kumulovaných v biomase jsou uvedeny na Obr. 17.



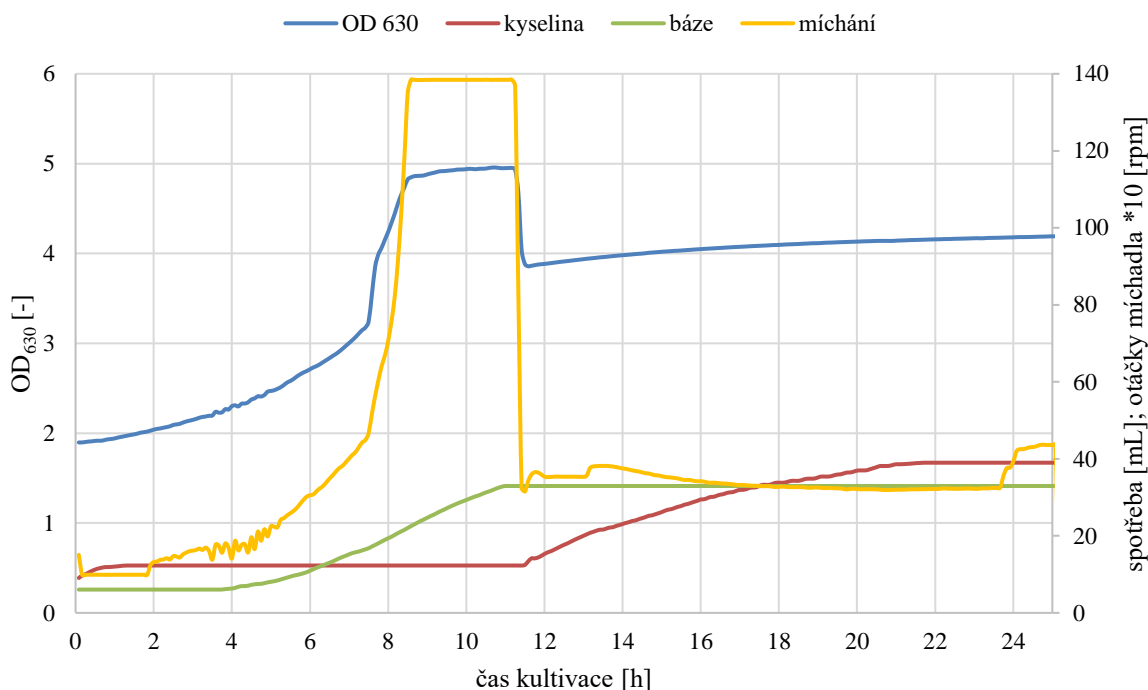
Obr. 17: Gravimetrické stanovení biomasy a stanovení PHA při adaptaci kultury *C. necator* H16 na ϵ -KL v rámci evolučního inženýrství

Z výsledků stanovení biomasy můžeme usuzovat, že adaptace na přítomnost ϵ -KL má postupný charakter podobně jako při adaptaci na osmotický stres v publikovaném článku. Maximální množství biomasy bylo stanoveno kolem 15. pasáže, poté už nedocházelo k signifikantnímu zlepšení růstových charakteristik v rámci sledovaného časového horizontu 50 pasáží. Množství celkových PHA bylo oproti tomu vyšší v iniciálních pasážích, nejvyšší v rámci 3. a 4. pasáže, poté byl pozorován pokles a případně náhodný nárůst, zastoupení v biomase však tvořilo v průměru přibližně 50 hm. %.

V rámci pilotních experimentů při růstu na kombinaci fruktosy a ϵ -KL (10 g/L + 4 g/L) bylo zastoupení frakce 4HB v kopolymeru 30 mol. % po 72 h kultivace, při analýze po 48 h v rámci charakterizace pasáží činilo zastoupení 4HB maximálně téměř 23 mol. %, a to pro 43. pasáž. Přestože množství prekursoru bylo stejné, koncentrace primárního zdroje uhlíku byla nižší, což bylo diskutováno dříve. Hlavním rozdílem je proto právě délka kultivace, jelikož biosyntéza PHA probíhá masivněji během stacionární fáze, proto lze očekávat, že po delším čase kultivace by mohl nejen celkový polymer, ale i právě množství 4HB v něm obsaženém být vyšší. Z hlediska adaptace je patrné, že byla úspěšná, jelikož docházelo k nárůstu množství celkové biomasy, a to nad hodnoty, které byly získány v rámci pilotních experimentů pro 72hodinové kultury, stejně tak i množství PHA bylo zvýšené.

4.1.3.3 Produkce kopolymeru v laboratorním bioreaktoru

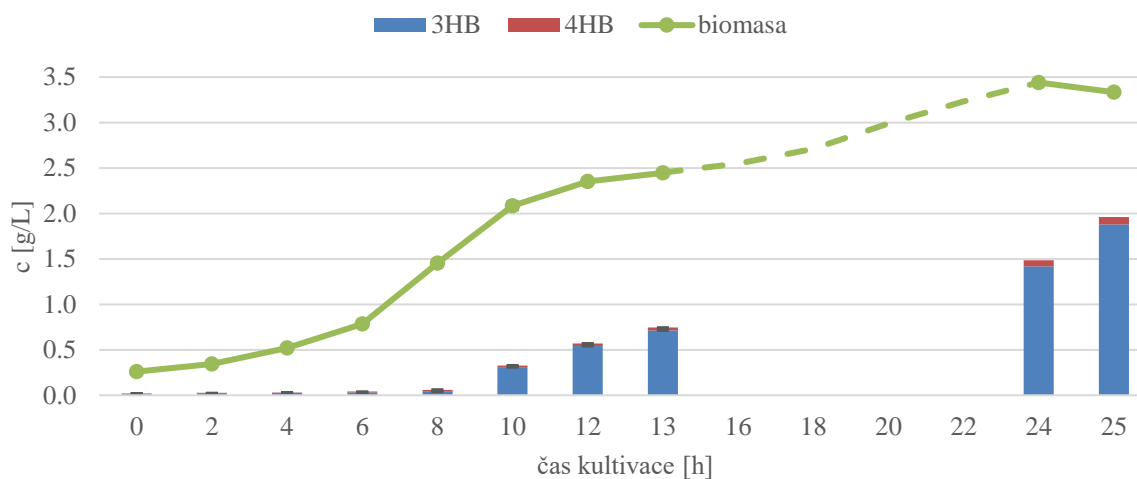
Scale-up produkce kopolymeru P(3HB-co-4HB) byl proveden v laboratorním bioreaktoru s nádobou o objemu 5 L (Sartorius BIostat, B plus) plněnou na pracovní objem 3,5 L. Jako mikrobiální producent byla vybrána 30. pasáž kmene *C. necator* adaptovaná na ϵ -KL, která již po 48 h růstu v minerálním médiu vykazovala prokazatelně vyšší nárůst biomasy a zastoupení 4HB v kopolymeru oproti iniciálním pasážím. Kombinace substrátů byla zvolena stejně jako pro baňkové experimenty, tedy 8 g/L fruktózy s 4 g/L ϵ -KL. Inokulum a následný seed byly připraveny v Nutrient Broth médiu s přídatkem 1 g/L ϵ -KL, aby byl po adaptaci zachován selekční tlak. V prvních experimentech byl zvolen vsádkový režim (batch), během něhož byl pozorován růst kultury prostřednictvím stanovení optické hustoty. Produkce PHA byla v literatuře popsána při všech možných režimech kultivace v bioreaktorech, mezi něž patří právě batch, dále fed-batch, repeated-batch i kontinuální kultivace, a to i na odpadních substrátech [223]. Mezi jedny z hlavních parametrů, které jsme pozorovali, patří hodnota pH kultury v průběhu kultivačního procesu, která nám zhruba signalizuje stav kultury, jelikož různé fáze růstu jsou spojené s produkcí látek, které parametr pH ovlivňují. Vývoj pH v průběhu kultivace společně s daty z turbidimetrické sondy a mícháním jsou znázorněny na Obr. 18.



Obr. 18: Hodnoty optické hustoty, vývoje pH kultury a míchání při batch kultivaci

Z obrázku je patrné, že již po hodině růstu se začalo snižovat pH, které ale bylo regulováno pomocí 30% NaOH respektive 1M H₂SO₄, proto výkyvy nejsou tak patrné (rozdíl minima a maxima činil rozmezí pH odlišné o přibližně 0,1) a kromě hlavních zlomů zcela nereflektují růst kultury. Nicméně ve 4. h můžeme očekávat počátek exponenciální fáze růstu a následně po 10. h její konec a přechod do fáze stacionární. Odumírání kultury na základě pH můžeme datovat do přibližně 22. h kultivace. Změna pH směrem k nižším hodnotám může být

vzhledem k fázi kultury spojena se zvýšenou produkcí kyselých metabolitů či vyšší spotřebou amonných iontů (zdroj N), naopak posun k vyšším hodnotám může být spojen s vyčerpáním hlavního zdroje uhlíku a případnou metabolizací proteinů a s tím spojenou produkcí zásaditých metabolitů.

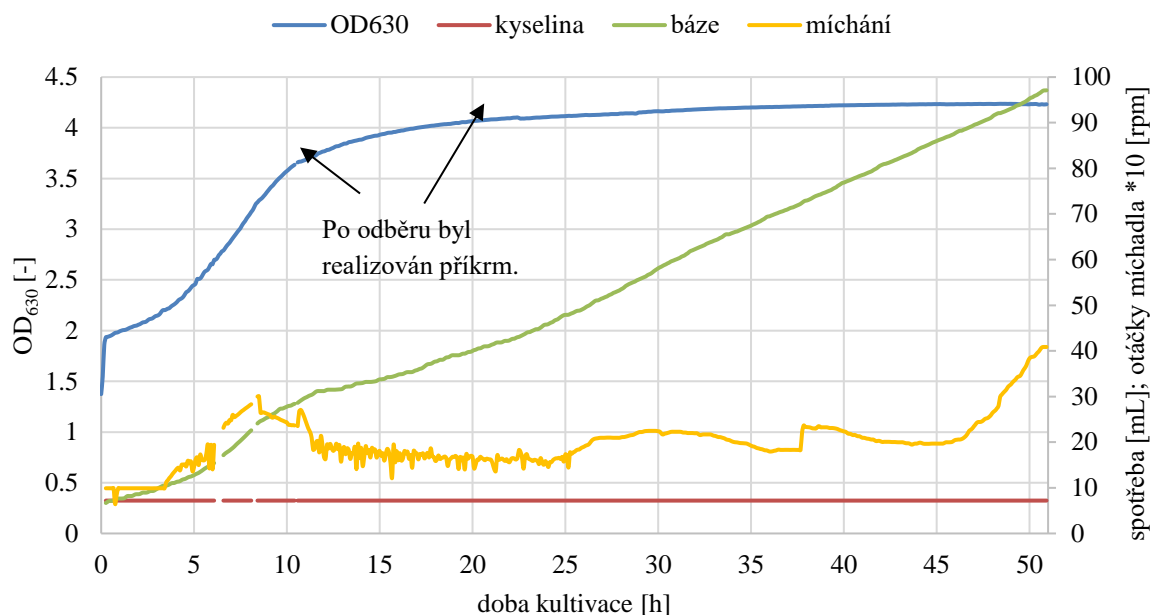


Obr. 19: Stanovení biomasy a PHA při batch kultivaci

Z obrázku (Obr. 19) lze vyčíst hodnoty z gravimetrického stanovení biomasy a taktéž z kvantitativní a kvalitativní analýzy PHA v biomase. Trend množství biomasy přitom přibližně koreluje s trendem optické hustoty kultury stanovené turbidimetrickou sondou bioreaktoru v průběhu kultivace až na pokles hodnoty OD_{630} před 12. h kultivace. Z dat optické hustoty je také patrnější přechod kultury do stacionární fáze v 11,5. h, jelikož nemáme data z tohoto časového okna stanovená na základě gravimetrické analýzy. Hodnota optické hustoty v maximu odpovídá hodnotě přibližně 5, což koreluje s 3,5 g/L biomasy. Přestože bylo množství PHA stanovované již z prvních odběrů, byla množství celkového polymeru zpočátku nízká, a to přibližně 30 mg/L do 6. h kultivace, nejvyšší množství PHA bylo detekováno na konci kultivace, a to 1,96 g/L. Zároveň ale na začátku kultivace bylo podstatně vyšší zastoupení frakce 4HB v kopolymeru, a to až 27 mol. % v 6. h kultivace, od 10. h docházelo ke snižování obsahu 4HB v kopolymeru až na 4,2 mol. % při ukončení kultivace. Na základě výsledků se tedy můžeme domnívat, že kultura využívá prekursor brzy po zahájení kultivace, v čase 0 h se jednalo pouze o homopolymer P(3HB), nicméně následně se zastoupení 4HB zvyšovalo při tvorbě kopolymeru P(3HB-co-4HB). Přibližně od 10. h je možné pozorovat značný pokles, jelikož se začala výrazně více kumulovat frakce 3HB, a to až do podílu 95 mol. %. Na základě dat z gravimetrie (ale i optické hustoty) je možné konstatovat, že přibližně od 24. h kultivace docházelo k postupnému odumírání kultury, proto lze předpokládat i vyčerpání substrátů.

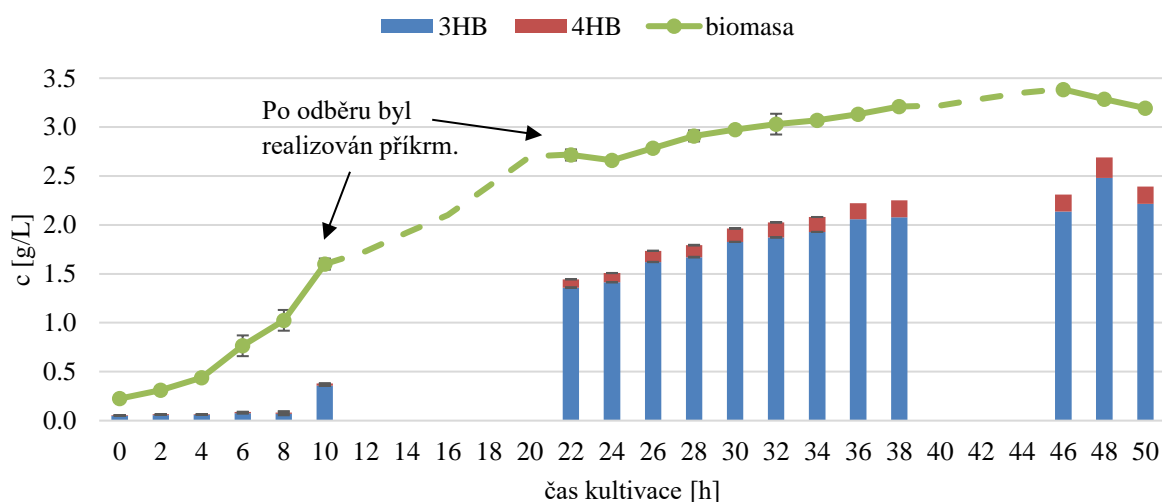
Jako další varianta kultivace v bioreaktoru vedoucí k navýšení produkce výtěžku slouží mód fed-batch, který mj. snižuje i náklady na výrobu právě PHA, kdy nedochází k limitaci zdrojem uhlíku, přičemž v tomto ohledu je důležité načasování přidavku substrátu [224]. Tento mód byl použit taktéž pro produkci kopolymeru P(3HB-co-4HB) u kmene *Cupriavidus* sp. USMAA1020 při růstu na γ -BL, a to s vysokým obsahem 4HB frakce až do 67 mol. %

[225]. V našem případě jsme pro 30. pasáž adaptovanou na ϵ -KL stejně jako u předchozí kultivace využili fruktosu v kombinaci s prekurzorem v množství 8 + 4 g/L, a to jednak na počátku kultivace, jednak při obou příkrmech, a to v 10,5. h a 22,3. h. Množství jednotlivých substrátů přepočtených na objem bioreaktoru byla i při příkrmech zachována.



Obr. 20: Hodnoty optické hustoty, vývoje pH kultury a míchání při fed-batch kultivaci

Na základě obrázku (Obr. 20) lze vyčíst, že kultura se velmi záhy dostala do exponenciální fáze růstu, která trvala přibližně do 11. h kultivace, a poté následoval přechod do fáze stacionární, v níž se nacházela téměř do konce monitorovaného časového úseku. Vlivem změny kultivačních podmínek spočívajících v přidavku uhlíkatých substrátů nesledujeme výraznější změny u hodnot pH, v rámci exponenciální fáze vidíme pouze mírný pokles a s nástupem stacionární fáze mírný nárůst pH, které se posléze udržovala vzhledem k regulaci vesměs konstantní.



Obr. 21: Stanovení biomasy a PHA při fed-batch kultivaci

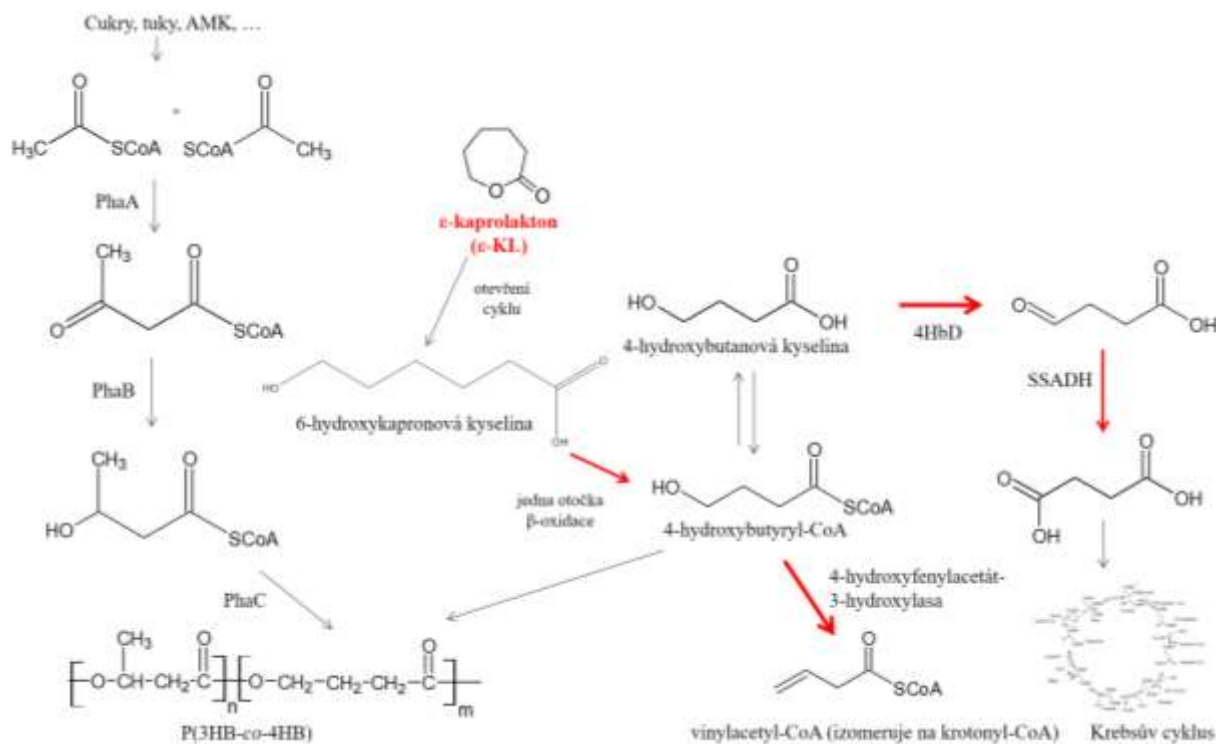
Úprava biotechnologického procesu spočívající ve využití módu fed-batch oproti předchozí kultivaci v batch módu vedla k řadě změn. Primárně bylo dosaženo prodloužení doby kultivačního procesu, jelikož na základě pilotní scale-up kultivace byl první přídavek substrátu uskutečněn již v 10. h kultivace, což vedlo k prodloužení exponenciální fáze růstu (Obr. 21). Následně byl dávkován druhý přídavek zdrojů uhlíku v 22,33. h, čímž došlo ještě k dalšímu nárůstu biomasy, přestože při dávkování se kultura nacházela již na počátku stacionární fáze. Maxima biomasy bylo dosaženo v 48,15. h kultivace, poté došlo k postupnému odumírání kultury, kultivační proces byl ukončen krátce před 51. h. Přestože maximální hodnota biomasy dosahovala hodnoty přibližně stejné jako u vsádkové kultivace, lze pozorovat navýšení obsahu celkových PHA v biomase, jelikož doplňováním substrátu nedocházelo k limitaci uhlíkem a tím k utilizaci intracelulárně akumulovaných granulí polymeru [226]. Navýšení množství biomasy by se dalo pravděpodobně dosáhnout navýšením množství dusíku (3 g/L namísto 1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Odlišnosti v kultivačním módu se projeví také na složení kopolymeru s ohledem na podíl 4HB. Už od počátku byl obsah 4HB detekován, a to jako 11,4 mol. %, následně docházelo k nárůstu podílu v celkovém polymeru s maximem v 8. h až 16,2 mol. %, což bylo stále nižší než u vsádkové kultivace. V 10. h se ale projevil stejný trend vedoucí k poklesu podílu, a to na přibližně 6 mol. %, což bylo pro oba módy srovnatelné, lze tedy předpokládat navýšenou inkorporaci jednotek 3HB do kopolymeru. Nicméně vlivem přidání obou substrátů při fed-batch módu, a to především po druhém příkrmu, došlo ještě k navýšení obsahu 4HB taktéž s maximem v 48,15. h, a to na 7,7 mol. %. Ve svém maximu přitom činil podíl PHA v biomase 82 hm. %.

Porovnáme-li výtěžky biomasy, celkových PHA v biomase a zastoupení 4HB v kopolymeru, lze říci, že fed-batch kultivace v laboratorním bioreaktoru s využitím kmene adaptovaného na ϵ -KL byla při uvážení všech kritérií úspěšná. Vzhledem k adaptaci bylo získáno vyšší množství biomasy než při pilotním experimentu navíc s vyšším množstvím fruktosy. Oproti experimentu optimalizujícímu množství a čas přídavku ϵ -KL bylo při experimentu v laboratorním bioreaktoru získáno vyšší množství celkových PHA a zastoupení 4HB bylo více než dvojnásobné. Vysokých podílů 4HB v kopolymeru, a to nad 20 mol. %, bylo zpravidla dosahováno zpočátku fermentace, kdy byl zároveň nízký výtěžek biomasy, což korelovalo s prvním experimentem testujícím různé prekurzory a kombinace se substráty. I přes nižší frakci 4HB v kopolymeru vyprodukovaného ve fermentoru oproti kopolymeru získaného z baňkových testů uvažujeme, že už zastoupení kolem 5 mol. % 4HB výrazně zlepšuje mechanické vlastnosti polymeru, proto i tyto experimenty lze považovat za úspěšné.

4.1.3.4 Alternativní přístup ke zlepšení charakteristik kmene *C. necator* H16 vzhledem k produkci kopolymeru P(3HB-co-4HB)

Aplikace evolučního inženýrství nás tedy přivedla ke zlepšení růstových a produkčních charakteristik kmene *C. necator* za optimalizovaných podmínek vzhledem k produkci kopolymeru P(3HB-co-4HB) s co nejvyšším zastoupením 4HB. Nicméně, jak bylo popisováno již v teoretické části práce, existují i jiné přístupy, jak charakteristiky kmenů vylepšit. Jeden z nich reprezentuje genové inženýrství, které je založené na cílených intervencích do genomu mikroorganismů, což poté vede ke změnám na úrovni fenotypu. Mezi tyto úpravy obecně patří delece či inserce genů, případně jejich výměna.

Abychom byli schopni efektivně podpořit biosyntézu P(3HB-*co*-4HB), je zapotřebí mít zmapovaný metabolismus vybraného bakteriálního kmene v souvislosti s relevantními substráty. Pro naši práci se jako nejoptimálnější kombinace substrátů jevila fruktosa s prekurzorem ϵ -KL, zapojení do metabolismu shrnuje následující schéma (Obr. 22).



Obr. 22: Předpokládaný metabolismus ϵ -kaprolaktonu u *C. necator* H16 (částečně převzato z [227])

Po otevření laktonového kruhu ϵ -KL a odbourání jedné molekuly acetyl-CoA skrze β -oxidaci vzniká 4-hydroxybutyryl-CoA, který může přímo sloužit jako substrát PHA syntasy, čímž může být bez dalších přeměn přímo zainkorporován do řetězce polymeru. Nicméně vyjma této cesty bakterie disponuje metabolickým aparátem pro další cesty metabolizace ϵ -KL. Jedna z konkurenčních metabolických cest spočívá v převodu 4-hydroxybutanové kyseliny na sukcinát-semialdehyd za katalýzy 4-hydroxybutyrát dehydrogenasou (4HbD) za spoluúčasti oxidovaného kofaktoru NAD^+ . V dalším kroku může být pomocí NAD(P)^+ dependentní sukcinát-semialdehyd dehydrogenasy (SSADH) konvertován na sukcinát, jež může být následně začleněn do Krebsova cyklu. Třetí cesta utilizace 4-hydroxybutyryl-CoA pravděpodobně spočívá v jeho dehydrataci za vzniku molekuly vinylacetyl-CoA katalýzou enzymem 4-hydroxyfenylacetát-3-hydroxylasou, za spoluúčasti kofaktoru FAD. Vinylacetyl-CoA následně izomeruje na krotonyl-CoA, jež může být metabolizován dále, mj. převeden na 3-hydroxybutyryl-CoA [227]. Inkorporaci 4HB do kopolymeru tedy potenciálně konkurují dvě reakce odvádějící 4-hydroxybutyryl-CoA jinými směry. Bylo popsáno, že kmen *C. necator* H16 není schopen využít 4-hydroxybutyrát jako jediný zdroj uhlíku pro růst, nebylo však objasněno proč. Nicméně kmen *C. necator* SK4040 vykazoval v přítomnosti tohoto substrátu výrazně vyšší aktivitu 4HbD, což poukazuje na schopnost utilizace substrátu. Zároveň bylo potvrzeno, že aktivace 4-hydroxybutyrátu na 4-hydroxybutyryl-CoA není iniciálním krokem degradace, k ní dochází primárně skrze postupný převod na sukcinát

zapojující se do citrátového cyklu. Při testování enzymové aktivity 4HbD v přítomnosti 4-hydroxybutyryl-CoA nebylo pozorováno její navýšení, což poukazuje na fakt, že aktivovaná forma 4-hydroxybutanové kyseliny neslouží jako substrát tohoto enzymu a nelze ani očekávat posunutí rovnováhy při vzájemné přeměně obou forem. Nicméně bylo pozorováno, že při využití 4-hydroxybutanové kyseliny jako substrátu docházelo k produkci kopolymeru, nikoli pouze homopolymeru P(4HB), k čemuž mohlo dojít pouze skrze aktivaci substrátu do formy 4HB-CoA a dále převedením přes vinylacetyl-CoA až na 3HB-CoA. Pomocí ¹³C-NMR bylo totiž prokázáno, že k tvorbě kopolymeru dochází skrze popsanou dráhu, nikoli skrze intermediáty citrátového cyklu, k nimž vede cesta zpočátku katalyzovaná 4HbD [221].

Na základě dostupných diskutovaných informací jsme v rámci optimalizačních experimentů zkoušeli přidat sukcinát v koncentracích 0,5; 1 a 2 g/L do kultivačního média za účelem potlačení konkurenční dráhy vlivem nadbytkem produktu při růstu na hlavním zdroji uhlíku v kombinaci s ϵ -KL. Pozorovali jsme navýšení množství biomasy oproti kontrole bez přídavku sukcinátu, a to až o 20 % pro koncentraci 2 g/L. Společně s množstvím biomasy byl pozorován nárůst množství celkových PHA v biomase o 5 hm. % oproti kontrole se 70 hm. % PHA. Nicméně se neprojevil pozitivní vliv na navýšení obsahu 4HB v kopolymeru, zde byl trend opačný, s narůstajícím množstvím přidaného sukcinátu klesalo zastoupení z 3,4 mol. % u kontroly na 2,5 mol. % při koncentraci sukcinátu 2 g/L. K požadovanému navýšení frakce 4HB v kopolymeru P(3HB-co-4HB) nedošlo, přestože na cestu produkce 4-hydroxybutyrátu ze sukcinátu je zaměřena řada prací využívajících přístupů genového inženýrství insercí a kmen *C. necator* H16 enzymy přirozeně disponuje, přestože tato cesta je poměrně unikátní. Takto byl připraven například rekombinantní kmen *E. coli* JM109, který po inserci genů kódujícího sukcinát semialdehyd dehydrogenasu (*sucD*), *4hbD* a koenzym A transferasu (*orfZ*) z *Clostridium kluyveri* DSM555, který je následně schopen konvertovat na 4HB-CoA glukosu [228].

Výzkumný tým Saito a kol. (1996) využil za účelem navýšení frakce 4HB v kopolymeru pro kmen *C. necator* H16 kombinaci 4-hydroxybutanové kyseliny s přídavkem citrátu draselného a síranu amonného. Ve třech z testovaných poměrů koncentrací jednotlivých substrátů byl získán polymer se zastoupením 4HB 100 mol. %, nicméně nejvyšší množství celkové biomasy a celkových PHA nejvyšší nebylo, to bylo získáno při růstu na 4-hydroxybutanové kyselině bez přídavku obou zmíněných sloučenin (5,8 g/L biomasy s 16 hm. % PHA po 48 h kultivace). Při kombinaci 25 g/L kyseliny 4-hydroxybutanové, 15 g/L citrátu a 2 g/L síranu amonného bylo získáno 5,2 g/L biomasy s obsahem čistého P(4HB), nicméně obsah polymeru činil pouze 2 hm. % [229].

Abychom vycházeli z co nejvíce autentických dat pro námi využívaný kmen, byla v rámci bakalářské práce Bc. Radmily Centnerové pomocí RT-qPCR stanovována exprese genů kódujících oba konkurenční proteiny, tedy 4HbD a 4-hydroxyfenylacetát-3-hydroxylasu u kmene *C. necator* H16. Pro tento účel byla bakterie kultivována na dvou uhlíkatých substrátech, které na základě předchozích experimentů využívá, a to na fruktose a γ -BL, již dříve diskutovanému prekurzoru 4-hydroxybutyrátu. Zatímco při kultivaci na fruktose, kdy

nebyla detekována přítomnost kopolymeru P(3HB-co-4HB), byl více exprimován druhý zmíněný enzym, 4-hydroxyfenylacetát-3-hydroxylasa, při kultivaci na γ -BL byly pozorovány změny v expresi 4HbD [230]. Na základě dat vycházejících z bakalářské práce by tedy k navýšení frakce 4HB v kopolymeru P(3HB-co-4HB) by tedy mohlo dojít v případě delece genu *gbd* kódujícího enzym 4HbD. Nicméně bylo zároveň na základě jiného výzkumu prováděného s totožným bakteriálním kmenem zjištěno, že 4HB-CoA, který vzniká z ϵ -KL nebo i γ -BL jako mezikrok jejich metabolismu [227], nenavýšuje aktivitu enzymu 4HbD, jehož substrátem je 4-hydroxybutanová kyselina [221]. Z tohoto důvodu by bylo zapotřebí kromě toho ještě dále prozkoumat, jak v bakteriálních buňkách *C. necator* H16 konkrétně v tomto případě funguje vzájemný převod mezi formou s navázaným koenzymem A a bez něj.

Naším experimentálním záměrem v rámci genového inženýrství bylo vyzkoušet postupně delece genů kódujících oba výše diskutované konkurenční proteiny odčerpávající 4-hydroxybutyryl-CoA, tedy 4HbD i 4-hydroxyfenylacetát-3-hydroxylasu, a to za účelem porovnání vlivu jejich absence na zastoupení frakce 4-hydroxybutyrátu v kopolymeru P(3HB-co-4HB). Navýšení zastoupení 4HB v kopolymeru by vedlo ke zlepšení vlastností produkovaného polymeru. Práce byla prováděna na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v týmu Mgr. Pavla Dvořáka, Ph.D., který má s oblastí genových manipulací dlouholeté zkušenosti. Přestože nebyl cílený záměr v rámci disertace dotažen k deleci genů, byly již úspěšně provedeny transformační experimenty s kmenem *C. necator* H16 na základě protokolu publikovaného týmem Tee a kol. (2017) [231], a to s plasmidy pSEVA238 nesoucí resistenci na kanamycin a pSW1 nesoucí resistenci k amplicinu.

Přestože kmen *C. necator* H16 představuje poměrně slibného kandidáta pro produkci P(3HB-co-4HB), v literatuře můžeme objevit řadu jiných mikroorganismů s přirozenou schopností produkce tohoto kopolymeru bez dodatečných úprav. Bakteriální kmen *Alcaligenes latus* je schopen při růstu na sacharose v kombinaci s γ -BL až 60% konverze prekurzoru na 4HB, kdy nejvyšší dosažené zastoupení jednotky v kopolymeru bylo 45 mol. % [232], *C. necator* H16 na kombinaci fruktosa a γ -BL na 4HB konvertoval za stejných podmínek pouze 3 % [233]. V rámci našeho týmu byl charakterizován termofilní izolát *Aneurinibacillus* sp. H, který je při růstu na 1,4-BD schopen produkovat kopolymer s více než 80 mol. % 4HB [216].

4.2 Využití extrémofilů pro biotechnologickou produkci PHA

Druhou oddělenou částí disertační práce, na niž byla naměřena a opublikována data, se zaměřuje na biotechnologickou produkci PHA s využitím extrémofilních mikroorganismů při kultivaci na odpadních substrátech. Produkce petrochemických plastů se odhaduje na přibližně 400 megatun ročně navíc se stále rostoucím využitím, a to převážně v rozvojových zemích, které se příliš nezaměřují na ekologickou stránku produkce [234]. I proto je zapotřebí, aby v tomto případě byla alespoň část nahrazena ekologičtější alternativou, jako jsou již vícekrát zmíněné PHA. Produkce těchto materiálů se odhaduje na 25 kilotun ročně, což je oproti ropným alternativám zanedbatelné množství. Nicméně se odhaduje navýšení celosvětové produkce na třinásovek v následujících pěti letech [235]. Navýšení produkce však

vyžaduje snížení nákladů na celý biotechnologický proces výroby a také izolace. Z hlediska výrobního procesu je důležité, aby byl založen na široce rozšířených zdrojích, které umožňují udržitelnou produkci PHA za snížení celkových nákladů. Výchozích surovin splňujících tyto požadavky je více, nicméně jako jeden z nejvhodnějších kandidátů jsou odpadní materiály na bázi lignocelulosity, které představují širokou skupinu odpadu pocházejícího z odvětví zemědělství, potravinářského a dřevozpracujícího průmyslu. Lignocelulosové materiály zároveň představují nejzastoupenější skupinu biomasy na světě. Stejně jako pro všechny zdroje je i v tomto případě nezbytné brát v úvahu charakteristiky materiálu, ať už se jedná o dostupnost, skladovatelnost a cenu, což se mj. odvíjí od řady parametrů, jako jsou mj. konkurenční možnosti využití. Řada lignocelulosových materiálů se dále využívá jako krmivo či stelivo pro zvířata, výplňové či tepelně izolační materiály, případně i jako nosiče energie [236]. Zde potom hraje roli vysoký roční výnos v řádech stovek megatun, který umožňuje část materiálu uvolnit ve prospěch bílých biotechnologií, mezi něž patří právě i produkce PHA.

Většina mikroorganismů není schopna přímé utilizace lignocelulosové biomasy, nicméně tyto suroviny je nutné předem hydrolyzovat za vzniku oligo- či monosacharidů hexos a pentos. Komplexní směsi sacharidů jsou zcela pouze zřídka využitelné mikroorganismy nejen pro produkci PHA, mnohem častější je pro mikroorganismy preference pouze frakce zastoupených sacharidů, což ale nepředstavuje nejefektivnější způsob využití hydrolyzátů. Současně se sacharidy se během hydrolyzy lignocelulosity kapalným podíl obohacuje o látky, které vystupují jako mikrobiální inhibitory, a to především fenolické látky, furfuraly či organické kyseliny. Z hlediska výběru vhodných mikroorganismů pro produkci PHA na hydrolyzátech lignocelulosity je tedy zapotřebí se věnovat oběma kritériím, jednak schopnosti vybraných mikroorganismů utilizovat různé sacharidy, jednak odolnosti mikroorganismů vůči přítomným inhibitorům, a to obojí navíc v kombinaci s vysokou schopností produkce polymeru.

Na základě literárních zdrojů se jako jeden z nejúspěšnějších kandidátů utilizace lignocelulosových hydrolyzátů se současnou schopností produkce PHA mezi mesofilními mikroorganismy jeví kmen *Burkholderia sacchari* [237]. Další možností je využití extrémofilních PHA producentů jakožto slibných alternativ obvykle používaných mesofilů. Celkově se jejich využití v biotechnologiích zavádí v rámci konceptu průmyslových biotechnologií nové generace (NGIB), jelikož využití extrémofilních mikroorganismů často zvyšuje robustnost celého procesu vzhledem ke snížení rizika kontaminace běžnými kmeny. Biotechnologická produkce nejen PHA tak může být prováděna za semi-sterilních či nesterilních podmínek, a to v semi-kontinuálním či kontinuálním režimu [238]. S ohledem na využití konkrétních extrémofilů se jeví jako zajímavá skupina halofilní mikroorganismy, u nichž se široce vyskytuje schopnost produkce PHA, což u nich pravděpodobně představuje jeden z možných adaptačních mechanismů vůči vysokému osmotickému tlaku vyskytujícímu se v jejich přirozeném prostředí [213]. Druhou skupinou extrémofilů, u nichž byla ve vyšší míře popsána produkce PHA, jsou termofilní mikroorganismy [239]. Na základě zmíněných skutečností byly pro experimentální práci v rámci publikace vybrány tři bakteriální kmeny. První zvolený kmen, mesofilní *Burkholderia sacchari* DSM 17165, byl využit vzhledem k potenciálu diskutovanému výše. Druhým kmenem byl středně halofilní kmen *Halomonas*

halophila s vysokou metabolickou flexibilitou s ohledem na zdroje uhlíku, tím pádem s vysokým potenciálem pro využití ligkocelulosových hydrolyzátů [240], který byl mj. využit i dříve v rámci evolučních experimentů. Jako poslední kmen byl využit termofil *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344, jež na základě literatury preferuje xylosu oproti ostatním sacharidům [241], přestože je také částečně metabolicky flexibilní. Vybrané mikroorganismy byly kultivovány na modelových hydrolyzátech lignocelulosové biomasy za účelem posouzení růstových a produkčních charakteristik. Vzhledem k přítomnosti mikrobiálních inhibitorů byla rovněž posouzena odolnost mikroorganismů vůči vybraným relevantním látkám inhibujícím růst. Na základě získaných dat bylo posléze provedeno porovnání extrémofilních PHA producentů s kmenem *B. sacchari*. Výsledky provedených experimentů byly publikovány v časopise *Bioresource Technology* v článku v rámci **Přílohy IV** této práce.

V rámci pilotního experimentu jsme posuzovali potenciál kmenů při růstu na modelových hydrolyzátech, a to jednak vzhledem k nárůstu biomasy, jednak s ohledem na produkci PHA v biomase. Jako doplňková analýza reflektující schopnost utilizace dávkovaných sacharidů bylo využito stanovení zbytkových sacharidů v supernatantu po kultivaci. Pro celkové porovnání byly kmeny kultivovány rovněž na preferovaných zdrojích uhlíku, tedy glukose pro *B. sacchari* a *H. halophila*, respektive xylose pro *S. thermodepolymerans*. Jako modelové hydrolyzáty odpadních lignocelulosových produktů byly vybrány následující; hydrolyzát měkkého dřeva, tvrdého dřeva, rýžové slámy, bagasy z cukrové třtiny, pšeničné slámy a pšeničných otrub, které se liší zastoupením jednotlivých monosacharidů. Na základě literatury byly připraveny modelové hydrolyzáty obsahující v různém zastoupení směs hexos a pentos, konkrétně glukosu, xylosu, arabinosu, mannosu a galaktosu, kdy ne všechny monosacharidy byly zastoupeny u všech směsí (Tab. 8).

Tab. 8: Složení jednotlivých modelových hydrolyzátů

sacharid (g/L)						
materiál	glukosa	xylosa	arabinosa	mannosa	galaktosa	reference
měkké dřevo	16,6	1	0,1	2	0,3	[242]
tvrdé dřevo	3,2	12,4	1	1,8	1,6	[243]
rýžová sláma	4,2	13,4	2,4	-	-	[244]
bagasa z cukrové třtiny	2,8	15	2,2	-	-	[244]
pšeničná sláma	11,2	7,2	0,9	-	0,7	[245]
pšeničné otruby	0,8	12,4	6,8	-	-	[246]

Celková koncentrace sacharidů v připravených médiích byla 20 g/L, a to jak v případě modelových hydrolyzátů, tak i u kontrolních kultivací s preferovaným substrátem. Jedním z cílů experimentů bylo tedy najít nevhodnější hydrolyzát pro jednotlivé bakterie. Kromě schopnosti růstu na hydrolyzátech byla klíčová i schopnost tvorby PHA v biomase (výsledky jsou uvedeny níže v Tab. 9). Experimenty zaměřené na výtěžek byly prováděny na ideálních

modelových hydrolyzátech sestávajících z monosacharidů, reálné vzorky lignocelulosových hydrolyzátů by obsahovaly i řadu dříve diskutovaných chemických látek vystupujících jako mikrobiální inhibitory, a to kyselinu ferulovou, gallovou, furfural, 5-hydroxymethylfurfural a již zmiňované kyseliny octovou a levulovou.

Tab. 9: Porovnání růstu a produkce PHA u vybraných bakteriálních kmenů na modelových hydrolyzátech

mikroorganismus	modelový hydrolyzát	biomasa [g/L]	PHB [hm. %]	residuální sacharidy [g/L]	*Y _{P/S} [-]	**Y _{X/S} [-]
<i>B. sacchari</i>	kontrola (glukosa)	3,45 ± 0,10	53,86 ± 1,30	4,89 ± 0,31	0,14	0,25
	měkké dřevo	3,16 ± 0,03	49,75 ± 1,40	8,41 ± 0,29	0,11	0,29
	tvrdé dřevo	3,11 ± 0,05	53,50 ± 1,73	10,59 ± 0,33	0,20	0,35
	rýžová sláma	2,71 ± 0,06	49,79 ± 1,02	14,14 ± 0,13	0,14	0,25
	bagasa z cukrové třtiny	3,02 ± 0,10	49,64 ± 1,56	14,83 ± 0,74	0,13	0,25
	pšeničná sláma	3,22 ± 0,04	49,30 ± 0,81	7,01 ± 0,14	0,23	0,43
	pšeničné otruby	3,31 ± 0,03	54,18 ± 0,14	10,81 ± 0,14	0,15	0,28
<i>H. halophila</i>	kontrola (glukosa)	6,35 ± 0,05	72,35 ± 0,96	3,16 ± 0,02	0,27	0,38
	měkké dřevo	6,47 ± 0,08	73,48 ± 1,15	2,98 ± 0,32	0,28	0,38
	tvrdé dřevo	3,81 ± 0,09	51,30 ± 1,14	9,68 ± 0,23	0,19	0,37
	rýžová sláma	3,52 ± 0,08	51,43 ± 1,23	9,70 ± 0,52	0,18	0,34
	bagasa z cukrové třtiny	3,14 ± 0,13	56,14 ± 0,89	8,52 ± 0,78	0,15	0,27
	pšeničná sláma	5,32 ± 0,01	74,74 ± 1,73	5,77 ± 0,44	0,28	0,37
	pšeničné otruby	2,56 ± 0,13	44,47 ± 1,30	10,69 ± 0,78	0,12	0,28
<i>S. thermodepolymerans</i>	kontrola (xylosa)	5,92 ± 0,08	72,03 ± 0,41	2,77 ± 0,21	0,25	0,34
	měkké dřevo	0,86 ± 0,16	14,74 ± 7,42	18,29 ± 0,31	0,08	0,50
	tvrdé dřevo	4,91 ± 0,48	65,71 ± 2,41	4,96 ± 0,08	0,21	0,33
	rýžová sláma	5,24 ± 0,13	75,32 ± 2,00	4,33 ± 0,29	0,25	0,33
	bagasa z cukrové třtiny	4,62 ± 0,06	70,45 ± 0,23	6,12 ± 0,00	0,23	0,33
	pšeničná sláma	4,41 ± 0,69	70,92 ± 1,37	5,79 ± 0,47	0,22	0,31
	pšeničné otruby	3,64 ± 0,39	64,48 ± 4,02	6,93 ± 0,31	0,18	0,28

*výtěžnostní koeficient Y_{P/S} – poměr výtěžku produktu k množství utilizovaných sacharidů

**výtěžnostní koeficient Y_{X/S} – poměr množství biomasy k množství utilizovaných sacharidů

Mesofilní bakterie *B. sacchari* vykazovala nejvyšší nárůst biomasy v kontrolní kultuře, tedy při růstu na čisté glukose. Bylo zjištěno, že se jedná o robustní bakterii, která byla schopna růstu na všech připravených směsích sacharidů, a to za vydatné biosyntézy PHA. Množství biomasy na jednotlivých substrátech nebylo výrazně odlišné, pouze při růstu na hydrolyzátu rýžové slámy byl zisk biomasy signifikantně nižší, a to 2,71 g/L, což je ale pouze přibližně 28 % pokles oproti kontrole. Na základě množství zbytkových sacharidů v médiu po kultivaci lze konstatovat, že bakterie preferuje hexosy před pentosami, jelikož nejnižší hodnoty byly stanoveny pro kontrolu následovanou hydrolyzátem měkkého dřeva a pšeničné slámy. Přestože nejvyšší zastoupení bylo opět v biomase při kontrolní kultivaci (53,86 hm. %, tj. 1,86 g/L), u žádné kultury nebyl obsah PHA v biomase nižší než 49,3 hm. %. Nejvyšší zastoupení polymeru v biomase bylo detekováno při kultivaci na hydrolyzátu pšeničných otrub, a to 54,18 hm. %, což představovalo celkový výtěžek 1,8 g/L PHA. Vzhledem k získaným datům lze potvrdit publikované studie, že bakteriální kmen *B. sacchari* je

vhodným kandidátem pro produkci PHA při kultivaci na různých hydrolyzátech s ohledem na flexibilitu vůči preferovaným sacharidům [237, 247].

Na první pohled je patrné, že hodnoty získané biomasy stejně jako v ní obsažených PHA byla u halofilní *H. halophila* vyšší než u testovaného mesofilního kmene. Jako nejvhodnější se jevila imitace hydrolyzátu měkkého dřeva, a to z hlediska nejvyššího obsahu biomasy (6,47 g/L) i obsažených PHA s výtěžkem 4,75 g/L. Hodnota biomasy byla oproti *B. sacchari* dvojnásobná, množství akumulovaného PHA bylo trojnásobné. Nicméně kmeny mají společný rys, a to preferenci hexos, jelikož i kmen *H. halophila* vykazoval lepší růst a produkci na hydrolyzátech měkkého dřeva, kdy byly stanoveny nejvyšší výtěžky současně s nejnižším množstvím residuálních sacharidů, a také pšeničné slámy, na níž bylo naakumulováno nejvyšší zastoupení PHA v biomase, a to 74,74 hm. %. Naopak jako nejhorší substrát se jevil hydrolyzát pšeničných otrub bohatý na pentosy, a to ve všech zkoumaných parametrech. Porovnáme-li ještě jednou *B. sacchari* a *H. halophila*, tak kromě výrazně vyšších výtěžků biomasy a PHA pro druhý zmíněný kmen, je podstatné taky rozdíl v kultivačních podmínkách. Halofilní kmen vyžaduje pro svůj růst středně vysokou koncentraci soli v médiu (optimálně 66 g/L NaCl), což ve výsledku při kultivaci nabízí výhodu oproti mesofilnímu nehalofilnímu kmenu, a to snížení nároků na sterilitu celého procesu, jelikož poměrně vysoká koncentrace soli v médiu brání kontaminaci [238]. Mimoto je tento rys *H. halophila* výhodný i pro kultivaci na reálných hydrolyzátech lignocelulosové biomasy, jelikož se po často využívané hydrolyze silnými anorganickými kyselinami nebo zásadami a následné neutralizaci v hydrolyzátech vyskytuje poměrně vysoké množství soli [131], která tím pádem nemusí být ani v podobě čistého NaCl přidávána. Využití halofilů se proto jeví jako vhodná strategie produkce PHA na lignocelulosových hydrolyzátech [248]. V případě nutnosti přidavku dalšího množství soli se také nabízí využití mořské vody, což vede k dalšímu snížení nákladů na produkci PHA [249]. Kromě polymeru produkují halofilní kmeny za účelem vyrovnání se s vysokým osmotickým tlakem kompatibilní soluty, jako jsou ektoiny či trehalosa, které mohou představovat další zajímavé produkty vhodné k izolaci [250]. Nicméně těmto látkám jsme se v rámci této práce nevěnovali, pozornost byla upřena na biotechnologický potenciál *H. halophila* s ohledem na produkci PHA.

Poslední testovaný bakteriální kmen *S. thermodepolymerans* se lišil od dvou předchozích s ohledem na využívání substrátů, jelikož upřednostňoval pentosy před hexosami. Nejvyšších výtěžků biomasy tedy bylo dosaženo na modelových hydrolyzátech s vyšším zastoupením xylosy a arabinosy, což se projevilo následně i na produkci PHA v biomase. Nejvyšší výtěžek polymeru byl získán při kultivaci na hydrolyzátu rýžové slámy (3,94 g/L) následovaném bagasou z cukrové třtiny (3,25 g/L) a hydrolyzátem tvrdého dřeva (3,22 g/L). Na těchto substrátech byly výtěžky podstatně vyšší než u kmenů *B. sacchari* a *H. halophila* preferujících modelové hydrolyzáty bohaté na hexosy glukosu a mannosu (případně galaktosu), tedy hydrolyzátu měkkého dřeva a pšeničné slámy. Při kultivaci na modelovém hydrolyzátu pšeničné slámy byl pozorován jednak celkově nejnižší nárůst biomasy (0,86 g/L) a nejnižší zastoupení PHA v biomase (14,74 hm. %), jednak současně nejvyšší množství residuálních sacharidů z původních 20 g/L, a to 18,29 g/L. Extrémofilní mikroorganismy můžou být tedy s výhodou využity pro účely produkce PHA na modelových hydrolyzátech

lignocelulosity, a to *H. halophila* pro substráty bohaté na hexosy a *S. thermodepolymerans* pro substráty bohaté na pentosy, v obou případech budou zajištěny vyšší výtěžky než při využití mesofilního kmene *B. sacchari* s vysokou flexibilitou vůči substrátu.

Přestože se v obou případech extrémofilů dostáváme k vyšším výtěžkům biomasy i PHA, je z hlediska reálného biotechnologického procesu nutné reflektovat charakteristiky jednotlivých skupin těchto bakterií. Společný rys spočívá v eliminaci kontaminace běžnou mikrobiální mikroflórou, a to buď zvýšenou koncentrací soli v médiu či vyšší kultivační teplotou. Dlouhodobý experiment týmu Ibrahim a Steinbüchel (2010) zaměřený na produkci PHA prováděný s kmenem *Chelatococcus* sp. v semisterilním prostředí při 50 °C potvrdil hypotézu NGIB konceptu, jelikož během celého procesu nedošlo ke kontaminaci kultury [251]. Jako možná limitace potenciálu termofilů pro produkci na reálných hydrolyzátech se může zdát přítomnost většího množství soli, nicméně bylo dokázáno, že řada termofilních mikroorganismů patří rovněž mezi halotolerantní, jelikož podobně jako halofilové produkují kompatibilní soluty, které je primárně chrání vůči zvýšené teplotě, ale mohou právě zastat i funkci osmoprotektantů v případě expozice hyperosmotickému prostředí [252]. Porovnáme-li kultivační nároky halofilních a termofilních PHA producentů, první zmíněná skupina vyžaduje vysokou koncentraci solí, což může způsobovat vážný problém spojený s korodováním používaného zařízení [238]. Termofilní producenti naproti tomu vyžadují pouze zvýšenou teplotu, často v rozmezí 50–55 °C, což pro kultivační zařízení nepředstavuje nebezpečí z hlediska poškození v porovnání s vysokými koncentracemi soli. Přestože se může zdát, že nároky na vyšší teplotu představují komplikace s ohledem na vyšší energetickou náročnost celého procesu, ve skutečnosti rychle rostoucí kultury produkují metabolické teplo, které současně s teplem vznikajícím při míchání může představovat značnou část energie, která pokryje nároky kultury. Tím patří termofilní kultury k de facto částečně samozahříváním systémům [251]. Je na místě poznamenat, že velkou část energetických nákladů při kultivaci mesofilů představuje chlazení rychle rostoucí a metabolizující mikrobiální kultury. Tento náklad u termofilů prakticky odpadá.

Abychom se přiblížili reálným hydrolyzátům a posoudili i druhý aspekt vhodnosti vybraných mikroorganismů pro účely využití pro produkci PHA, byly kmeny vystaveny inhibitorům, které se mohou v reálných hydrolyzátech vyskytovat. Vliv mikrobiálních inhibitorů je nezanedbatelný, výrazně ovlivňuje růst i celkový metabolismus, a to právě i vzhledem k produkci PHA. Pro co nejvyšší výtěžky PHA je tak nutné, aby byly použity kmeny co nejvíce robustní vůči negativním vlivům těchto látek. Mezi nejčteněji se vyskytující potenciální inhibitory po hydrolýze lignocelulosity biomasy byly pro tento účel vybrány organické kyseliny ferulová, gallová, octová a levulová a dále furfural či jeho derivát 5-hydroxymethylfurfural (5HMF). První dvě kyseliny patří mezi fenolické látky pocházející z degradace ligninu, obě vykazují výrazný antimikrobiální účinek prostřednictvím poškození buněčných membrán bakterií a taktéž indukují precipitaci či denaturaci proteinů [253]. Furfural a 5HMF vznikají při hydrolýze lignocelulosity chemickým rozkladem sacharidů, jejich inhibiční účinek spočívá ve vážném narušení toků metabolitů napříč mikrobiálním metabolismem a s tím souvisejícím nedostatečným energetickým metabolismem [254]. Rozkladem sacharidů vznikají hojně také poslední testované kyseliny, octová i levulová, které

v disociované formě zůstávají v extracelulárním prostředí, nicméně nedisociované formy mohou procházet do buněk prostřednictvím pasivní difúze. V buňce následně může docházet k disociaci, což vyústí ve změnu intracelulárního pH, jež musí být buňkou regulováno v rámci odpovědi na osmotický stres, a to na úkor energetického metabolismu [166]. Koncentrace inhibitorů byly vybrány na základě předchozích zkušeností s inhibičními efekty působící na kmeny, a to 1 g/L pro kyselinu ferulovou, gallovou a levulovou, 3 g/L pro kyselinu octovou a nejnižší koncentraci 0,25 g/L pro furfural a 5HMF. Pro účel porovnání inhibičního účinku byly kmeny *B. sacchari*, *H. halophila* a *S. thermodepolymerans* kultivovány na preferovaných sacharidech jednak v kombinaci s testovanými inhibitory, jednak i bez jejich přítomnosti. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce (Tab. 10).

Tab. 10: Vliv inhibitorů na růst a produkci PHA u vybraných bakteriálních kmenů

mikroorganismus	mikrobiální inhibitor	biomasa [g/L]	*PHA [hm. %]	residuální sacharidy [g/L]	*** inhibice [%]
<i>B. sacchari</i>	kontrola (glukosa)	2,82 ± 0,01	55,49 ± 1,95	8,59 ± 0,47	0
	kyselina ferulová	1,92 ± 0,05	37,26 ± 1,12	13,50 ± 0,27	54
	kyselina gallová	3,03 ± 0,09	55,85 ± 2,05	11,45 ± 0,08	-8
	furfural	2,75 ± 0,02	53,44 ± 1,98	9,20 ± 0,03	6
	5-HMF	2,57 ± 0,02	51,73 ± 2,14	9,74 ± 0,04	15
	kyselina octová	2,91 ± 0,00	54,86 ± 0,18	13,16 ± 0,13	-2
	kyselina levulová	2,68 ± 0,00	*48,17 ± 2,28	10,45 ± 0,03	8
<i>H. halophila</i>	kontrola (glukosa)	5,99 ± 0,07	85,12 ± 2,38	2,37 ± 0,01	0
	kyselina ferulová	0,10 ± 0,02	26,26 ± 1,21	18,79 ± 0,04	100
	kyselina gallová	3,99 ± 0,01	73,89 ± 3,48	7,42 ± 0,12	42
	furfural	3,97 ± 0,12	71,61 ± 2,16	7,48 ± 0,03	44
	5-HMF	5,44 ± 0,15	79,45 ± 2,65	4,22 ± 0,10	15
	kyselina octová	5,11 ± 0,16	75,68 ± 2,23	6,97 ± 0,13	24
	kyselina levulová	1,99 ± 0,04	59,05 ± 1,49	11,69 ± 0,26	77
<i>S. thermodepolymerans</i>	kontrola (xylosa)	6,31 ± 0,12	73,00 ± 1,90	4,89 ± 0,01	0
	kyselina ferulová	1,68 ± 0,01	52,20 ± 1,80	13,00 ± 0,00	81
	kyselina gallová	3,68 ± 0,57	56,90 ± 1,60	14,35 ± 0,01	55
	furfural	4,57 ± 0,10	63,00 ± 1,00	6,78 ± 0,05	24
	5-HMF	6,19 ± 0,21	68,30 ± 1,70	3,74 ± 0,03	20
	kyselina octová	5,22 ± 0,10	69,80 ± 2,50	7,32 ± 0,18	14
	kyselina levulová	6,89 ± 0,45	**73,30 ± 4,10	3,93 ± 0,08	-7

* PHA obsahovalo 5,6 mol. % 3HV, **PHA obsahovalo 6,5 mol. % 3HV

***zhodnocení vlivu potenciálního inhibitoru na růst; vypočteno jako poměr biomasy v přítomnosti daného stresoru a bez něj, záporné hodnoty značí pozitivní vliv na růst buněk

Na základě výsledků experimentu zaměřeného na posouzení nárůstu biomasy a produkce PHA na modelových hydrolyzátech lignocelulosových substrátů byl mesofilní kmen *B. sacchari* vyhodnocen jako nejméně vhodný. Naopak na základě testování robustnosti kmenů byl shledán jako nejvhodnější producent, jelikož negativní efekt testovaných inhibitorů při porovnání s kontrolou byl nejnižší. Největší inhibiční efekt byl pozorován v přítomnosti kyseliny ferulové, kdy pokles výtěžku PHA oproti kontrolní kultuře bez inhibitorů činil přibližně 54 %. Zároveň byl v její přítomnosti detekován nejvyšší obsah residuálních

sacharidů po kultivaci (13,50 g/L), což nasvědčuje i celkově špatnému nárůstu kultury. Extrémofilní kmeny *H. halophila* a *S. thermodepolymerans* v přítomnosti kyseliny ferulové taktéž vykazovaly pro ně nejvyšší inhibiční efekt, kdy pro halofilní kmen představoval výtěžek téměř 100% účinek, pro termofilní kmen byl výtěžek PHA zredukován oproti kontrole o 81 %, tedy pokles ze 4,60 g/L na pouhých 0,87 g/L, což korelovalo rovněž s trendem poklesu množství biomasy a nejvyššími množstvími residuálních sacharidů. Podobný efekt se projevil i u kyseliny gallové, která kmen *B. sacchari* neinhibovala, naopak byl pozorován mírný nárůst biomasy i PHA oproti kontrole. U extrémofilů byl opět pozorován výrazný pokles výtěžku PHA oproti kontrolám, nicméně nižší než u kyseliny ferulové. Naopak nejméně robustním kmenem se na základě výsledků jeví být halofilní kmen *H. halophila*, jenž vykazoval vysokou senzitivitu vůči vlivům všech testovaných inhibitorů. Nejmenší vliv na růst a produkci PHA pro kmen představoval 5HMF s 15% inhibičním efektem, který byl ale u všech kmenů přibližně srovnatelný. Zajímavý poznatek byl získán na základě dat inhibičního vlivu kyseliny levulové. Výrazná inhibice růstu a produkce PHA byla pozorována pouze u kmene *H. halophila*, a to 77 %, nejvíce po kyselině ferulové. U zbývajících dvou kmenů k inhibici vesměs nedošlo, naopak byly schopné kyselinu levulovou využít, což se projevilo akumulací kopolymeru P(3HB-co-3HV), což bylo pro kmen *B. sacchari* již dříve popsáno [160]. Metabolizace kyseliny levulové spočívá v převodu na levulinyl-CoA a následném štěpení na propionyl-CoA a acetyl-CoA, které mohou být následně využity v rámci metabolismu buď za účelem zisku energie nebo pro účely biosyntézy PHA, mj. právě i kopolymeru P(3HB-co-3HV) za předpokladu, že kmeny disponují potřebným metabolickým aparátem [171, 255]. Produkce kopolymeru v přítomnosti kyseliny levulové byla popsána i pro kmen *C. necator* H16, a to v rámci přílohy I této práce. Materiálové charakteristiky kopolymeru jsou pro zpracování a využití lepší než pro homopolymer P(3HB), proto je utilizace kyseliny levulové, jakožto prekurzoru 3HV, výhodným rysem mikrobiálních producentů PHA. Navíc kyselina levulová vzhledem ke svému původu patří mezi poměrně levné chemikálie pocházející z obnovitelných zdrojů, kdy naopak řada jiných prekurzorů bývá na finančně náročná, což následně zvyšuje výrobní náklady na kopolymery.

Právě výsledky získané pro kmen *H. halophila* nás vedly k experimentu zaměřenému na adaptaci kmene na kyseliny octovou a levulovou v rámci metodiky evolučního inženýrství, a to za účelem snížení inhibičního vlivu kyselin se zachováním vysoké produkce PHA. Na základě získaných výsledků došlo vlivem adaptace k postupnému nárůstu výtěžku biomasy a v ní obsaženém PHA až na 3,98 g/L biomasy a přibližně 2,5 g/L PHA, nicméně ani po 84 pasážích nedošlo ani k částečné utilizaci kyseliny levulové jakožto prekurzoru 3HV. Kyselina octová byla využita přibližně z poloviny, což bylo detekováno pomocí residuálního množství jednotlivých kyselin v supernatantech po kultivaci.

Porovnáním charakteristik růstu a produkce v přítomnosti inhibitorů jsme zjistili, že oba extrémofilní kmeny vykazují větší náchylnost jejich negativnímu vlivu oproti mesofilnímu kmeni *B. sacchari*. Nejvýrazněji se projevil inhibiční efekt kyseliny ferulové, což je pro účely produkce PHA na hydrolyzátech lignocelulosity v rámci konceptu NGIB vhodné reflektovat. Vesměs tak může být provedeno více způsoby, kdy první spočívá v úpravě hydrolyzátní při

procesu detoxifikace [253]. Bez úpravy substrátů druhý přístup spočívá v úpravě odolnosti produkujících mikroorganismů vůči vlivu inhibitorů. Pro tento účel se nabízí přístup evolučního inženýrství, jak je diskutováno v příloze I v rámci této práce, přístupy metabolického inženýrství [256], genového inženýrství apod. I přes zmíněný vyšší inhibiční vliv testovaných látek stále testovaní extrémofilové *H. halophila* a *S. thermodepolymerans* představují velmi úspěšné kandidáty pro produkci PHA na hydrolyzáttech lignocelulosové biomasy pocházející např. z potravinářství. Pomineme-li vysoký inhibiční vliv kyseliny ferulové na oba kmeny a kyseliny levulové na *H. halophila*, výtěžky PHA získané z biomasy extrémofilních kmenů byly podstatně vyšší než pro mesofilní kmen *B. sacchari* kultivovaný za stejných podmínek, a to dvakrát až třikrát vyšší. V případě modelových hydrolyzátů byly získány pro nevhodnější hydrolyzáty výtěžky PHA ještě vyšší. Při výběru nevhodnějších reálných hydrolyzátů je důležité reflektovat zastoupení sacharidů po hydrolyze, jelikož jednotliví producenti mohou různé nároky na povahu uhlíkatých zdrojů (pentosy, hexosy), a taktéž přítomnost mikrobiálních inhibitorů. Na základě našich dat je možné dále rozvinout robustní a efektivní výrobní proces produkce PHA na hydrolyzáttech lignocelulosových odpadů v rámci NGIB, a to za snížení celkových nákladů na produkci. Kromě homopolymery P(3HB) může být produkován také kopolymer P(3HB-co-3HV) s výhodnějšími mechanickými a technologickými vlastnostmi.

4.3 Ekologická izolace PHA z extrémofilních producentů

Vysoké náklady na celý proces velkoobjemové produkce PHA limitují její výraznější zavedení do průmyslu. Pro účely snížení celkové ceny existuje řada strategií, které byly již diskutovány dříve v rámci práce. Jedná se především o využití odpadních substrátů pro kultivaci či využití extrémofilních mikroorganismů. Předchozí část práce se zabírala využitím extrémofilních mikroorganismů při biotechnologické produkci PHA. Bylo zjištěno, že tato skupina producentů kromě vysokého potenciálu tvorby polymeru nabízí v rámci konceptu NGIB možnost snížení cen biotechnologického procesu díky snížení nákladů na sterilizaci médií a kultivačního zařízení, což následně sníží náklady ještě více než samotné využití odpadních substrátů. Nicméně vybraných vlastností extrémofilních producentů PHA může být s výhodou využito i při procesu izolace polymeru z buněk. Při návrhu izolačního procesu je přitom nutné zohlednit charakteristiky vybraných extrémofilů, jelikož přestože některé rysy mohou být společné, jiné se naopak mohou odlišovat vzhledem k prostředí, ve kterém se dané skupiny těchto mikroorganismů přirozeně vyskytují.

V rámci práce jsme se zaměřili na zástupce halofilů *H. halophila* a zástupce termofilů *S. thermodepolymerans*, které byly již testovány jakožto potenciální producenti PHA na modelových hydrolyzáttech lignocelulosové biomasy. Jednak při růstu na preferovaných sacharidech, jednak i na modelových hydrolyzáttech prokázaly velký potenciál pro produkci PHA se současnou možností snížení nákladů na výrobu. Množství polymeru v biomase halofilního kmene při růstu na glukose dosahovalo v průměru přes 80 hm. %, obsah PHA u termofila při růstu na xylose byl v průměru 70 hm. %. Výtěžky biomasy i polymeru jsou tedy značně vysoké, což je činí vhodnými kandidáty pro velkoobjemovou produkci. Nicméně ve vybraných skupinách extrémofilních mikroorganismů se nachází více slibných kandidátů pro velkoobjemovou produkci PHA, jež byli popsáni, u rodu *Halomonas* se kromě *H.*

halophila [240] jedná o řadu dalších kmenů jako *H. boliviensis* [257], *H. hydrothermalis* a *H. neptunia* [222] či *H. bluephagenesis* [258]. Mimoto slibným PHA producentem patří i extrémně halofilní archaea *Haloferax mediterranei* [259], která vyžaduje pro růst více než 200 g/L NaCl v médiu. Produkce PHA u halofilů může být uvažována při přirozené adaptaci zástupců na expozici prostředí o vysoké osmotické síle, kdy především monomerní jednotky slouží jako kompatibilní soluty (osmolyty) napomáhající kompenzovat osmotickou sílu vnějšího prostředí. Nicméně tato strategie bývá uvažována především pro středně halofilní PHA producenty, u extrémních halofilů, mezi něž patří především zástupci haloarchaea pro tento účel intracelulárně akumulují další organické látky (osmolyty) nebo anorganické látky jako draselné ionty [260].

Druhý testovaný kmen patří do skupiny termofilních mikroorganismů. Jak již bylo uvedeno, tato skupina se přirozeně vyskytuje v prostředích o vyšších teplotách, na něž jsou tím pádem adaptovány [261]. Na rozdíl od halofilů bylo u termofilů testováno podstatně méně rodů, které jsou schopné vyšší produkce PHA a jsou tedy vhodnými kandidáty pro využití v biotechnologiích. Jednotlivé slibné kmeny patří do rodů *Caldimonas* [262], *Tepidimonas* [263], z konkrétních zástupců pak kmeny *Aneurinibacillus* sp. H1 [216] či již zmíněný kmen *S. thermodepolymerans* [241]. U termofilů nicméně není role PHA v rámci adaptace tak přímočará, byla popsána pouze souvislost mezi odolností mesofilních kmenů akumulujících PHA vůči teplotnímu šoku [264]. Adaptace termofilů na vyšší teploty spočívá primárně ve změnách struktury proteinů, navýšení aktivit chaperonů chránících proteiny před denaturací, produkci proteinů teplotního šoku (heat-shock proteinů), akumulaci organických kompatibilních molekul podobně jako u halofilů či ve změnách struktury buněčné stěny u extrémních termofilů a archaea [265].

Uvedené kmeny lze kromě kultivace na odpadních substrátech využít v rámci NGIB, což vede ke snížení nároků na sterilitu zařízení, a tím tedy ke snížení nákladů na celkový proces a taktéž i cenu výsledného produktu. Jako další, poslední, strategie snižující náklady na celý proces se nabízí využití ekonomicky méně náročné izolace než je standardní izolace extrakcí pomocí organických rozpouštědel. Volbu extrakčního činidla limituje omezená rozpustnost PHA ve standardních rozpouštědlech používaných pro analogické aplikace, prakticky se tak jako nejvhodnější využívají chlorovaná rozpouštědla, jako jsou například chloroform či dichlormethan, která kromě vysoké pořizovací ceny a celkové technologické náročnosti představují ekologickou zátěž izolačního procesu [266]. Za upravených podmínek zahrnujících zvýšenou teplotu a tlak (120 °C, 7 bar) se pro účely extrakce mohou využít tzv. PHA anti-solventy, mezi něž patří především aceton [267]. Alternativně lze namísto klasických rozpouštědel jakožto extrakčních činidel využít extrakční vlastnosti superkritického CO₂, který nabízí ekologičtější variantu oproti chlorovaným rozpouštědlům. Nicméně rozpustnost PHA samotným superkritickým CO₂ není příliš vysoká, pro zefektivnění procesů je zapotřebí přidávat aditiva zvyšující rozpustnost PHA, např. methanol, což následně snižuje efektivitu celého procesu [268, 269].

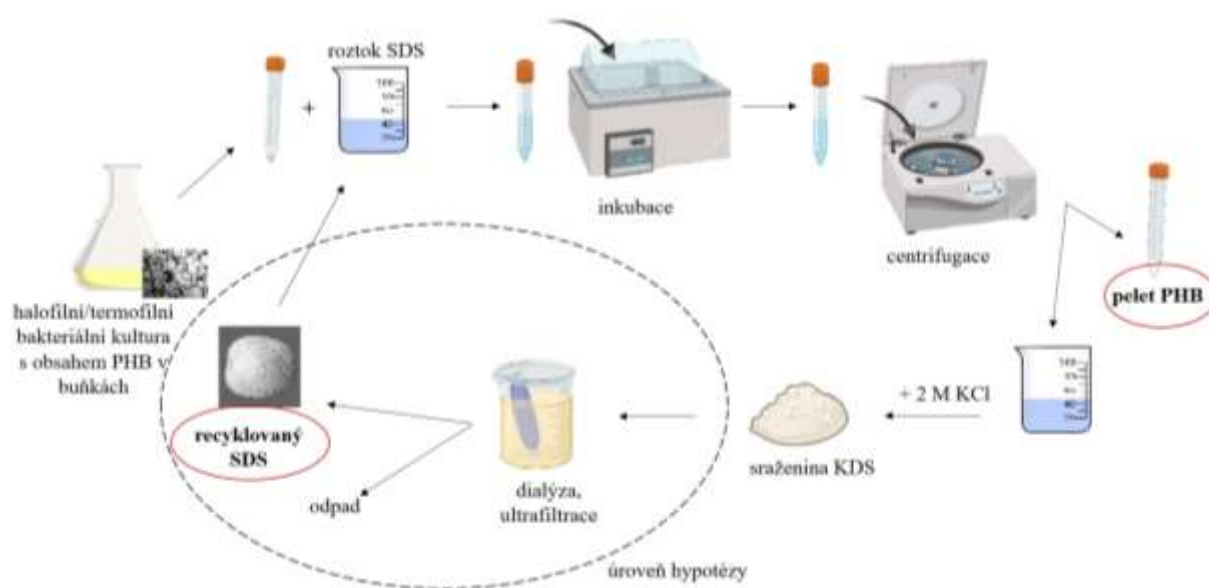
I přes rozdíly v provedení se zmíněné přístupy shodovaly ve strategii procesů spočívajících v rozpuštění polymeru v daném rozpouštědle a oddělení nerozpuštěné frakce. Opačný přístup

spočívá v rozpuštění ostatních komponent buněk a oddělení nerozpustné frakce PHA pomocí filtrace či centrifugace. Vzhledem k faktu, že polymer může z hlediska obsahu překročit 90 hm. % biomasy, jeví se jako logičtější přístup oddělit zbývající frakci nepolymerního charakteru, což platí i v případě námi využitých kmenů se 70–80 hm. % PHA v biomase. Pro tyto účely byla vyvinuta řada strategií využívajících odlišných chemických látek zaměřené na oddělení zbytků buněk nepředstavujících PHA. Jako slibný přístup se jeví využití hydrolytických enzymů narušujících buněčnou strukturu, která jsou tím solubilizovatelné ve vodných roztocích. Nejčastěji popsané postupy využívají komerčně dostupné proteasy jako Proteasa L330, Esparasa, Alkalasa, Neutrasa, Allproteasa a další [270], nicméně i přes poměrně vysokou účinnost je využití limitováno vysokou pořizovací cenou enzymů. Podobnou funkci mohou zastat i rozličné chemické látky s různou chemickou podstatou, z nejčastěji využívaných se jedná o hydroxid sodný [271], chlornan sodný [272, 273], EDTA a dále skupina detergentů, z nichž byly testovány např. dodecylsírán sodný (SDS) [273] nebo laurát amonný [274]. Kromě separátního využití můžou být vybrané přístupy kombinovány tak, aby byl výtěžek PHA co nejvyšší i s ohledem na čistotu vyizolovaného materiálu, jako výhodný se jeví přístup kombinující využití enzymů společně s SDS a EDTA, kdy získaný polymer měl čistotu srovnatelnou s PHA izolovaným pomocí extrakční metodou [275].

Jako další přístup, který vede k narušení celistvosti mikrobiálních buněk bez nutnosti přidavku dalších chemických látek, se nabízí využití hypotonické lyze. Provedení je poměrně jednoduché, tkví v expozici buněk prostředí o výrazně nižší osmotické síle než prostředí, v němž byly buňky kultivovány. Při náhlé expozici buněk takovému prostředí dochází vlivem rozdílů osmotických tlaků k penetraci vody do buněk, což vede k narušení jejich integrity, praskání buněk a následnému uvolnění intracelulárního obsahu. Přestože lze přístup teoreticky aplikovat na téměř všechny mikroorganismy, zejména halofily, byl popsán především pro extrémně halofilní archaea *Hfx. mediterranei* uvedený již dříve, který je vzhledem k požadavku na vysoké množství soli (přes 200 g/L) na expozici hypotonickému prostředí extrémně senzitivní. Reakce při expozici destilované vodě se projeví téměř okamžitě, buňky ztratí svoji integritu a dochází k uvolnění granulí PHA do roztoku. Nicméně lyze v pouhé destilované vody nevede v tomto případě k zisku polymeru o vysoké čistotě, pelet získaný po centrifugaci je směsí vrstvy buněčné debris, granulí PHA a vrstvy proteinů [276]. Na celkový pelet je tedy nutné aplikovat purifikační kroky vedoucí k odstranění residuí buněčných komponent [277], a to např. chlornanem sodným, peroxidem vodíku či dalšími látkami uvedenými výše.

V rámci problematiky shrnuté v článku jsme se věnovali vývoji metodiky nejen ekonomicky, ale i ekologicky méně náročné izolace PHA z buněk extrémofilních mikroorganismů *H. halophila* a *S. thermodepolymerans* schopných produkce polymeru vyšší než 70 hm. % se současným potenciálem pro aplikovatelnost přístupu NGIB. Na zvolené kmeny jsme aplikovali podmínky vedoucí k nastolení hypotonické lyze buněk, jelikož jsme vzhledem k potvrzenému obsahu kompatibilních solutů v buňkách sloužících k adaptaci v jejich přirozených podmínkách očekávali jejich vyšší náchylnost k osmotickému namáhání. Abychom získali dostatečně čistý produkt, když vezmeme do úvahy výsledky práce s *Hfx. mediterranei*, a zároveň abychom napomohli účinnější disrupci buněk, využili jsme detergent

SDS v koncentračním rozmezí 1–10 g/L, aby byly i přes jeho přítomnost nadále nastoleny hypoosmotické podmínky vedoucí k lyzi. Residuální SDS po extrakci bylo odstraněno převedením na nerozpustný produkt vysrážením s KCl, což eliminovalo potenciální negativní ekologický dopad sloučeniny v případě, že by zůstala v původní formě v odpadní vodě. Nerozpustný produkt dodecylsírany draselný (KDS) byl z odpadní vody jednoduše odstraněn a v rámci dalšího procesu může být potenciálně převeden zpět na SDS pro další využití. Shrnutí celého experimentu je znázorněno na následujícím schématu (Obr. 23). Jelikož námi vyvinutý postup je poměrně unikátní, podali jsme na základě získaných dat patentovou žádost, která je k práci přiložena jako **Příloha V**. Následně byly výsledky provedených experimentů publikovány v časopise *Polymers* v článku v rámci **Přílohy VI** této práce.



Obr. 23: Schéma izolačního procesu PHB s využitím SDS z halofilních či termofilních bakteriálních buněk

Na základě literární rešerše jsme se zpočátku věnovali optimalizaci parametrů izolace. Vycházeli jsme z předpokladu nastavení hypoosmotického prostředí pro izolaci, a to aplikací roztoku SDS do maximální koncentrace 10 g/L. Kromě přítomnosti detergentu byl izolační proces doplněn tepelným ošetřením za účelem zvýšení účinnosti. Jako optimalizační parametry byly tedy testovány různé koncentrace detergentu SDS, teplota a doba inkubace v hypoosmotickém prostředí, a dále také robustnost procesu testováním vyššího množství biomasy v roztoku SDS optimální koncentrace při optimální inkubaci. Během experimentů jsme vždy charakterizovali vyizolovaný materiál a jeho množství, aby bylo možné kvantitativně porovnat efektivitu jednotlivých přístupů. Materiál získaný optimalizovaným izolačním procesem byl dále podrobněji charakterizován prostřednictvím pokročilejších instrumentálních technik.

Tab. 11: Vliv koncentrace SDS na izolaci polymeru

mikroorganismus	SDS [g/L]	čistota PHB [hm. %]	výtěžek [-]
<i>H. halophila</i>	1	88,0 ± 0,4	0,99
	2,5	91,4 ± 2,7	0,99
	5	97,1 ± 3,7	1,11
	10	89,6 ± 1,4	1,09
<i>S. thermodepolymerans</i>	1	65,7 ± 0,8	0,95
	2,5	87,7 ± 3,6	0,97
	5	86,4 ± 1,4	1,00
	10	85,5 ± 0,4	0,92

Prvním optimalizovaným parametrem bylo množství SDS v roztoku, testovali jsme čtyři koncentrace, a to 1; 2,5; 5 a 10 g/L pro oba bakteriální kmeny (Tab. 11). Efekt jednotlivých roztoků byl vyhodnocen pro každý kmen zvlášť, jelikož vzhledem k rozdílným povahám obou extrémofilů jsme očekávali možný rozdílný vliv zvolené izolace. U obou kmenů jsme exponovali nakultivované bakteriální buňky po 72 h kultivace daným prostředím po dobu 2 h, lišily se přitom teploty inkubace, které byly v rámci tohoto experimentu na základě kultivačních teplot nastaveny na 70 °C pro *H. halophila* a 90 °C pro *S. thermodepolymerans*. Pro halofilní kmen s optimální koncentrací soli v médiu 66 g/L jsme očekávali mírně vyšší náchylnost k působení hypoosmotického prostředí, jako nejuspěšnější se jevílo množství 5 g/L, kdy byla čistota vyšší než 97 hm. %, zároveň byl i nejvyšší výtěžek PHA ze všech testovaných koncentrací. Lze tedy pozorovat výrazný efekt hypotonické lyze buněk současně se značným purifikačním vlivem. Odlišných výsledků bylo dosaženo pro termofilní kmen *S. thermodepolymerans*, kde se vzhledem k čistotě materiálu téměř 88 hm. % jevíla jako nejefektivnější koncentrace SDS 2,5 g/L, tedy poloviční oproti *H. halophila*. Rozdíl mezi kmeny může být mj. způsoben nižším zastoupením kompatibilních solutů v buňkách termofilního kmene, což vede k očekávání o menší náchylnosti buněk k hypotonické lyzi v porovnání s halofily. Čistoty vyizolovaných PHA z termofila jsou také podstatně nižší, přestože oproti surové biomase se 64 hm. % polymeru v biomase došlo o navýšení o více než 20 hm. %, zatímco u halofila byl nárůst čistoty PHA vyšší přibližně o 13 hm. %. Jelikož jsme z výsledků uvažovali kromě konečné čistoty polymeru i celkovou výtěžnost aplikovaného izolačního postupu, jako nejvhodnější koncentrace SDS bylo zvoleno stejně jako u *H. halophila* 5 g/L, a to mj. i vzhledem k odchylce u 2,5 g/L. Pro porovnání aplikovaného množství SDS pro izolaci byl zajímavý výzkum týmu Arikawa a kol. (2017), kteří izolovali polymer z biomasy mesofilního kmene *C. necator* s optimálním množstvím detergentu 33 g/L a současného použití sonikace namísto inkubace při zvýšené teplotě, čímž dosáhli čistoty minimálně 96 hm. % [278]. V porovnání s těmito výsledky je zřejmý pozitivní vliv náchylnosti extrémofilů k hypotonické lyzi u námi vybraných producentů akumulujících intracelulárně kompatibilní soluty, jelikož optimální množství SDS pro *H. halofila* bylo více než šestkrát nižší při čistotě polymeru vyšší než 97 hm. %, což vede ke snížení nákladů a ekologické zátěže spojené s produkcí biopolymerů. Při převedení procesu do většího měřítko se také jeví jako jednodušší námi navrhovaný postup založený na inkubaci při zvýšené teplotě než sonikace, která je ve větším objemech technologicky náročnější než temperace.

Tab. 12: Vliv inkubačního procesu na izolaci polymeru

mikroorganismus	inkubace	čistota PHB [hm. %]	výtěžek [-]
<i>H. halophila</i>	50 °C (120 min)	97,5 ± 1,2	0,92
	70 °C (120 min)	96,7 ± 0,3	0,97
	90 °C (120 min)	99,7 ± 0,1	0,90
	4 °C (120 min) + 70 °C (120 min)	94,3 ± 1,5	0,92
<i>S. thermodepolymerans</i>	30 °C (120 min)	67,6 ± 0,8	0,73
	50 °C (120 min)	81,4 ± 4,3	0,78
	70 °C (120 min)	96,7 ± 2,4	0,79
	90 °C (120 min)	99,8 ± 2,8	0,91
	4 °C (120 min) + 90 °C (120 min)	86,2 ± 2,1	0,87

Nastavení nejvhodnější inkubační teploty pro oba kmeny jsme provedli v rámci druhého kroku optimalizace, a to již s využitím nejefektivnější koncentrace SDS v roztoku (Tab. 12). Pro kmen *H. halophila* byly testovány vyšší teploty než je teplota kultivační, a to 50 °C, 70 °C a 90 °C, mimoto byla ještě testována metoda ochlazení při 4 °C následovaná již dříve testovanou teplotou 70 °C. Doba inkubace při vybraných teplotách byla ve všech případech pro oba kmeny totožná, a to 2 h. Jelikož kultivační teplota *S. thermodepolymerans* je podstatně vyšší, testovali jsme také vliv nižší teploty 30 °C, dále 50 °C, ale také 70 °C a 90 °C jako u halofila. Jelikož kultivační teplota termofilního PHA producenta byla 50 °C, očekávali jsme, že nižší teplota by mohla vést k poškození buněčné stěny a membrány termofila stejně jako je tomu při navýšení teploty. Stejně tak byl testován vliv chlazení při 4 °C následovaný temperací na již dříve testovanou teplotu 90 °C. Přestože výtěžky izolace a čistoty polymeru byly poměrně vysoké už při testování optima množství SDS, testování dalších teplot by mohlo vést buď k ještě většímu množství PHA vyšší kvality při vyšší/nižší teplotě nebo případně ke snížení nákladů na temperaci při nižší teplotě. Pro kmen *H. halophila* se jako nejvhodnější inkubační teplota na základě čistoty PHA jevila expozice 90 °C, kdy byla čistota PHA vyšší než 99,5 hm. %. Nicméně výtěžek PHA byl ve všech případech včetně kombinace chlazení a následného ohřevu nižší než při expozici 70 °C po dobu 2h, navíc pokles čistoty oproti 90 °C nebyl příliš vysoký, proto byla jako optimální teplota inkubace zvolena hodnota 70 °C. Naše domněnka náchylnosti membrány termofilního kmene ke snížené teplotě nebyla potvrzena, což se projevilo u teploty 30 °C, při kultivační teplotě 50 °C i při kombinaci chlazení a následné expozice teplotě 90 °C. Při teplotě 30 °C byl získán nejnižší výtěžek polymeru (0,73) o nejnižší čistotě (přibližně 67,6 hm. %), naopak jako nejefektivnější na základě výtěžku i čistoty se jevila inkubace při teplotě 90 °C. Expozice termofilů nízké teplotě vedla ke zcela opačnému efektu, než jsme primárně očekávali, jelikož bylo již dříve popsáno, že tyto podmínky naopak namísto narušení kompaktnosti buňky vedou k oslabení vlivu následného tepelného namáhání. Bylo popsáno, že zvýšená odolnost vůči vyšší teplotě souvisela se změnami ve složení mastných kyselin v membráně buněk [279]. Přestože byl jev popsán u mesofilních kmenů *E. coli* [280] a *C. necator* [281] po expozici nízkým teplotám (0–5 °C), nikoli konkrétně u termofilů, lze předpokládat, že princip při expozici nízké teplotě se u termofilů projeví taktéž a možná ještě výrazněji. Taktéž lze očekávat změny v membránových lipidech, což celkově posílí celistvost buňky a ta je následně méně náchylná vůči vlivům hypotonické lyzi a dalšímu teplotnímu namáhání. Tuto domněnku nám potvrdila data získaná pro kombinaci chlazení při 4 °C a následné expozice 90 °C, kdy čistota polymeru

vykazovala podstatně nižší hodnotu než při samotné expozici teplotě 90 °C, jež byla nejméně úspěšnější.

Tab. 13: Vliv počáteční koncentrace biomasy na izolaci polymeru

mikroorganismus	počáteční koncentrace biomasy [g/L]	čistota PHB [hm. %]	výtěžek [-]
<i>H. halophila</i>	1,83	96,2 ± 1,9	0,86
	4,21 (kontrola)	96,6 ± 0,3	0,99
	8,40	95,9 ± 7,1	1,04
	11,86	¹ 91,5	0,96
	17,72	¹ 94,9	1,03
	22,65	95,9 ± 1,0	1,06
<i>S. thermodepolymerans</i>	1,91	96,3 ± 1,3	0,89
	3,76 (kontrola)	101,1 ± 4,7	0,92
	8,88	93,4 ± 0,5	0,77
	11,72	¹ 84,1	0,80
	16,01	93,3 ± 2,4	1,01
	20,99	¹ 94,1	0,94

¹z technických důvodů nebylo možné měření opakovat v dostatečném počtu, proto chybí smodch

Oba optimalizované parametry pro jednotlivé kmeny jsme následně testovali s ohledem na robustnost izolačního procesu vzhledem k množství biomasy rozsuspendované v konstantním množství roztoku SDS, a to s ohledem na výtěžek polymeru a jeho čistotu (Tab. 13). Na základě našich zkušeností jsme usoudili, že se jedná o důležitý parametr izolačního postupu, jelikož produkce PHA často probíhá ve vysoce denzních bakteriálních kulturách [282]. Menší množství potřebného SDS na vyšší množství biomasy také snižuje cenu izolačního procesu a taktéž je výrazně snížena ekologická zátěž způsobená přítomností detergentu v odpadní vodě. Porovnáním dat pro jednotlivé poměry biomasy a roztoku SDS jsme zjistili, že s ohledem na množství biomasy se jedná o velmi robustní proces, jelikož čistota vyizolovaného PHA se s nárůstem množství biomasy ve většině případů lišila pouze málo. Lze tedy říci, že námi optimalizovaný izolační proces může být aplikován na biomasu z vysoce denzních kultur získaných např. z fed-batch kultivací v laboratorních bioreaktorech.

Pro další zpracování polymeru je vhodné znát vyjma čistoty i další charakteristiky, které ovlivňují fyzikálně-chemické vlastnosti. Z tohoto pohledu jsou důležité parametry molekulová hmotnost a polydisperzita systému. Vzhledem k aplikovaným podmínkám bylo naším dalším cílem stanovit, jaký vliv má aplikovaný izolační postup na tyto parametry. Za účelem komparace jsme provedli extrakci PHA z vysušené biomasy v chloroformu při 70 °C během 12 h, kterou považujeme za standardní, stejný postup jsme aplikovali také na již vyizolovaný materiál, abychom eliminovali případný vliv extrakčního postupu. Pro jednotlivé kmeny byly pozorovány rozdílné trendy v molekulové hmotnosti vzhledem ke kontrole vyextrahované z vysušené biomasy. U kmene *S. thermodepolymerans* jsme pozorovali mírný pokles hodnot vzhledem ke kontrole, což může být způsobeno zvýšenou teplotou 90 °C aplikovanou po dobu 2 h při izolaci s působením SDS, kdy mohlo docházet k částečné degradaci polymeru. Jiný trend byl pozorován u kmene *H. halophila*, která standardně produkuje polymer vyšší molekulové hmotnosti v porovnání s ostatními PHA producenty včetně *S. thermodepolymerans* [240]. Porovnáním molekulové hmotnosti polymeru získaného

z vysušené biomasy a polymeru izolovaného z buněk po kultivaci aplikací optimalizovaného postupu s použitím SDS bylo zjištěno, že aplikací námi navrženého postupu byl získán polymer až 1,5krát vyšší molekulovou hmotností. Nárůst molekulové hmotnosti řetězců polymeru po ošetření detergentem SDS přičítáme zvýšené rozpustnosti dlouhých řetězců PHA v chloroformu po odstranění ostatních buněčných komponent. Standardní proces izolace z vysušených buněk při 70 °C po dobu 2 h pravděpodobně efektivnější pro řetězce s nižší molekulovou hmotností. Polydisperzity jednotlivých testovaných PHA byly na mikrobiálně produkovaný polymer poměrně nízké, jednalo se tedy o poměrně uniformní materiály, které jsou obecně jako takové vhodnější pro další zpracování. Výsledky jsou shrnuty v rámci Tab. 14.

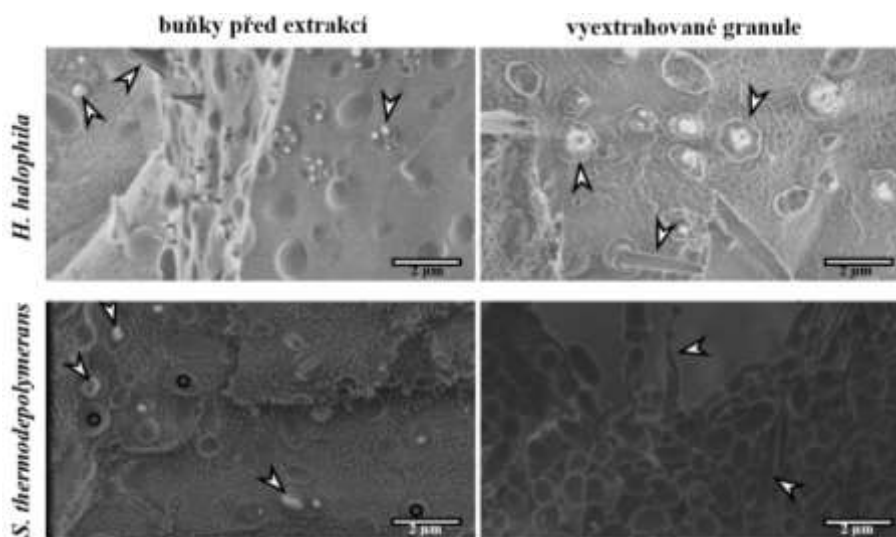
Tab. 14: Vlastnosti vyizolovaných polymerů

mikroorganismus	inkubace	M_w [kDa]	PDI [-]
<i>H. halophila</i>	PHB ze suché biomasy	1 050,4 ± 1,8	1,20 ± 0,04
	70°C (120 min)	1 581,9 ± 5,3	1,46 ± 0,19
<i>S. thermodepolymerans</i>	PHB ze suché biomasy	711,5 ± 1,6	1,17 ± 0,01
	90°C (120 min)	686,4 ± 16,1	1,23 ± 0,03

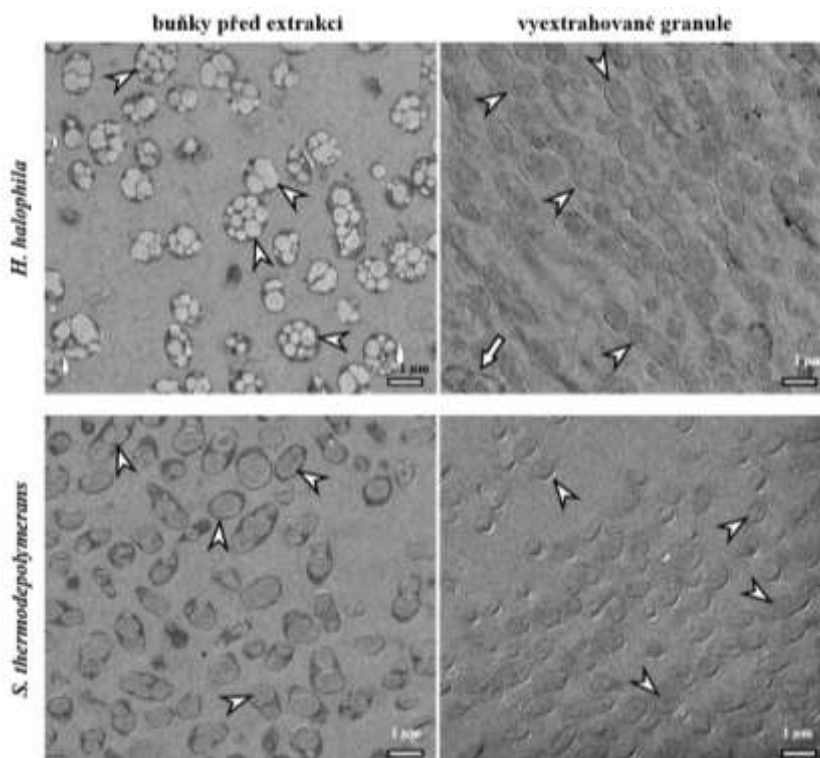
Kromě základní charakteristiky pomocí GC-FID lze čistotu vyizolovaných materiálů porovnat prostřednictvím infračervené spektroskopie. Pro účely srovnání jsme analyzovali vzorky vysušené biomasy před extrakcí, materiál získaný optimalizovaným protokolem s využitím SDS a také komerčně dostupný homopolymer P(3HB) od firmy Biomer. Jako hlavní polutant detekující přítomnost biomasy byla uvažována přítomnost proteinů, jež je charakterizována přítomností amidových pásů ve spektru, my jsme se konkrétně zaměřili na vlnočty kolem 3 300 cm⁻¹, 1 640 cm⁻¹ a 1 540 cm⁻¹. Z jednotlivých spekter lze vyčíst, že v komerčním P(3HB) nebyla detekována žádná residua proteinů, zatímco v biomase byla detekována vysoká intenzita píků ve zmíněných pásech vlnočtů. Ve vzorcích PHA izolovaných z jednotlivých mikrobiálních producentů byl detekován výrazný pokles signálu indikujících přítomnost proteinů, z čehož lze usuzovat vysokou efektivitu purifikace eliminující tyto kontaminanty. Data ve spektrech nám navíc korelovala s daty získanými pomocí plynové chromatografie, kdy pro čistější polymer izolovaný z *H. halophila* (přes 91 hm. %) byly intenzity píků nižší než pro polymer izolovaný ze *S. thermodepolymerans* s nižší čistotou (přes 86 hm. %).

Jako poslední metodiku na charakterizaci vyizolovaných materiálů jsme aplikovali zobrazení pomocí elektronové mikroskopie, a to jednak kryo-SEM (Obr. 24), jednak TEM (Obr. 25). Pro porovnání úspěšnosti izolace jsme využili vzorky biomasy před izolací a následně vyizolovaného materiálu. Na základě snímků z kryo-SEM získané zlomením zamrazených vzorků bylo možné pozorovat jehlovité útvary dosvědčující elastické skupenství granulí v buňkách obou kmenů i při teplotě tekutého dusíku [187]. V druhých částech zlomu se poté nacházely konkávní deformace způsobené absencí granulí. Nicméně jsme pozorovali rozdíly mezi morfologií granulí u kmenů, kdy zatímco u *H. halophila* bylo pozorováno větší množství menších granulí, v buňkách kmene *S. thermodepolymerans* bylo menší množství výrazně větších granulí, konkrétně 1–3 na základě našeho pozorování. Vlivem izolace u kmene *H. halophila* došlo ke sloučení granulí do nepravidelných útvarů se současným

zachováním elasticity, větší oválné granule *S. thermodepolymerans* zůstaly rozdělené i po izolaci. Obecně je pro izolaci vzhledem k separaci lepší menší množství větších granulí [283], což poukazuje na slibný potenciál termofilního kmene pro velkoobjemovou produkci PHA v průmyslu. Prostřednictvím TEM bylo možné pozorovat polutanty polymeru sestávající převážně ze zbytků porušených buněčných komponent a také malé množství neporušených buněk, což potvrzuje naše data získaná jednak z GC-FID, jednak pomocí FT-IR.



Obr. 24: Snímky buněk a vyzolovaného materiálu z kryo-SEM; šipky označují jehlovité deformace, kroužky označují deformace na plasmatické membráně



Obr. 25: Snímky buněk a vyzolovaného materiálu z TEM; šipky označují granule polymeru, u vyextrahovaných granulí znázorňuje intaktní buňku

Kromě optimalizace izolačního postupu vedoucího k získání čistého polymeru a podrobnější charakterizaci materiálu jsme se zaměřili také na možnost recyklace využitého SDS v rámci procesu, jelikož v odpadní vodě by vykazoval škodlivý efekt a komplikoval by proces čištění odpadních vod. Po izolaci a následné centrifugaci vedoucí k získání peletu reprezentujícího především PHA jsme tak dále zpracovávali i supernatant obsahující SDS. Jako nejefektivnější cesta se nám jevílo kvantitativní vysrážení ve vodě rozpustného SDS v prostředí 2 M KCl do podoby nerozpustného KDS, který může být poté jednoduše odstraněn dekantací nebo opět centrifugací. Jedná se o vysoce efektivní, rychlý a zároveň levný způsob eliminace SDS z odpadní vody, po vysrážení nebyla v roztocích detekována žádná residua detergentu. Dále uvažujeme možnou recyklaci SDS ultradialýzou KDS ve vhodném rozpouštědle v přítomnosti nadbytku sodných iontů, což by vedlo k regeneraci SDS a možnosti opětovného využití v dalším izolačním experimentu, jež by ještě více prohloubilo ekonomickou výhodnost námi navrhovaného izolačního procesu. Nicméně proces regenerace nebyl v rámci předložené disertační práce experimentálně ověřen.

Vyvinutý izolační postup pro PHA je určený pro extrémofilní producenty, kteří jsou náchylní k hypotonické lyzi vzhledem k produkci a akumulaci kompatibilních solutů, jež jim slouží jako součást adaptační strategie na prostředí, v němž se přirozeně vyskytují. Hypotonická lyze byla nastolena expozicí buněk prostřední o nižší osmotické síle. Jako neoptimálnější se pro tyto účely jevílo roztok SDS v koncentraci 5g/L se současným navýšením teploty. Zjistili jsme, že expozice těmto podmínkám vedla u obou testovaných kmenů k disrupci buněk a současnému uvolnění nerozpustných granúl PHA. Mimoto detergent SDS pomáhá rozpouštět hydrofobní komponenty buněk, které taktéž představují potenciální kontaminanty granúl polymeru. Námi navržený izolační proces je poměrně jednoduchý, robustní, opakovatelný a aplikovatelný i za velkoobjemových podmínek v průmyslových procesech. Pro tyto účely byla provedena standardní kultivace *H. halophila* v laboratorním bioreaktoru následovaná stejně jako u baňkových experimentů oddělením biomasy od kultivačního média a resuspendací v roztoku SDS o koncentraci 5 g/L. Během 2 h teploty při 70 °C byla suspenze současně míchána při otáčkách 100 rpm. Analýzou vyizolovaného materiálu bylo zjištěno, že se podařilo získat polymer s čistotou více než 95 hm. % a celkovým výtěžkem kolem 0,95. Za účelem dalšího navýšení čistoty je možné po izolaci provést promytí vhodnými organickými rozpouštědly či jinými reagenty. Abychom eliminovali nežádoucí efekt SDS v odpadní vodě a tím udrželi i pozitivní ekologický aspekt postupu, zaměřili jsme se na odstranění detergentu z odpadní vody. Jednoduchým vysrážením v prostředí KCl byla získána odpadní voda prostá residuí SDS. Ve vodě nerozpustný produkt KDS, jež může být jednoduše odstraněn dekantací nebo centrifugací, je uvažován pro regeneraci SDS použitelného při další izolaci. Uvedený postup tedy výrazně navyšuje ekologickou i ekonomickou přívětivost oproti nejčastěji využívané extrakci chlorovanými rozpouštědly. Vyvinutá strategie izolace PHA je plně kompatibilní s konceptem průmyslových biotechnologií nové generace, je levná, jednoduchá, robustní a současně vede k získání biopolymeru PHA o vysoké čistotě při zachování vysokých výtěžků a taktéž přívětivosti k životnímu prostředí.

5 ZÁVĚR

Předložená disertační práce se tematicky zaměřuje na aplikaci technik především evolučního, ale v menší míře i genového inženýrství na bakteriální kmeny schopné produkce polyhydroxyalkanoátů. Hlavním cílem bylo získat ze sbírkových bakteriálních kmenů kmeny se zlepšenými produkčními schopnostmi, a to jednak z kvantitativního hlediska tvorby PHA, jednak z hlediska kvalitativního, kdy byla zaměřena snaha na zlepšení syntézy kopolymerů P(3HB-co-3HV) a P(3HB-co-4HB). Pro vybrané kopolyмеры je charakteristické, že se zvyšujícím se obsahem druhé monomerní frakce vůči frakci 3HB se do určité míry zlepšují celkové vlastnosti polymeru. Naším cílem bylo mj. pro tvorbu těchto kopolymerů využít levnější či doposud nevyužívané alternativy prekurzorů 3HV či 4HB. Stejná myšlenka, spočívající ve snížení nákladů na produkci PHA, byla náplní další části práce, kdy byly využity jako substráty modelové hydrolyzáty lignocelulosové biomasy pocházející například z potravinářského průmyslu. Pro tyto účely byl vybrán jednak mesofilní bakteriální kmen, jednak vybrané kmeny extrémofilní, konkrétně zahrnující zástupce halofilů a termofilů, které mají specifické požadavky na kultivaci, které mohou v konečném důsledku snížit také nároky na proces produkce polymeru. Specifik termofilních a halofilních mikroorganismů bylo využito posléze v poslední tematické části disertační práci, při níž byla upřena pozornost na vývoj alternativního způsobu izolace PHA z bakteriální biomasy.

Z experimentu zaměřeného na krátkodobou adaptaci kmene *C. necator* H16 na mikrobiální inhibitor kyselinu levulovou bylo získáno pět kmenů s potenciálem pro lepší růst a produkci kopolymeru P(3HB-co-3HV) v přítomnosti kyseliny levulové oproti divokému kmeni. Jeden z kmenů byl získán po aplikaci chemického mutagenu methyl methansulfonátu. Reprodukovatelně získaný kopolymer s nejvyšším zastoupením 3HV obsahoval přibližně 21 mol. % této frakce v kopolymeru. Kmeny byly podrobeny metabolické charakterizaci a porovnány s divokým kmenem za účelem objasnění adaptační strategie na kyselinu levulovou. Statistickou analýzou získaných dat specifických enzymových aktivit byly objasněny některé společné prvky adaptace spočívající především v obecné odpovědi na oxidativní stres vedoucí především k navýšení produkce NADPH. Vyjma izolátu ALA06 získaného aplikací MMS bylo v rámci adaptace pozorováno navýšení výtěžku biomasy stejně jako v ní obsaženého polymeru. Na základě PCA byla pozorována rozdílnost divokého kmene od adaptovaných kultur. Charakterizovaný polymer vykazoval trend klesající krystalinity a teploty tání společně s narůstajícím zastoupením frakce 3HV. Trendu se vymykal kopolymer vyizolovaný z kmene ALA06, u něhož předpokládáme schopnost syntetizovat částečně blokové kopolyмеры, což se projeví zlepšením vlastností materiálu i přes nejnižší obsah 3HV frakce.

Dlouhodobý adaptační experiment byl aplikován opět na kmen *C. necator* H16, jako stresové faktory byly vybrány osmotický tlak a přítomnost iontů těžkých kovů, konkrétně měďnaté ionty. Z trendů růstu biomasy u obou stresorů jsme odhalili dva odlišné adaptační mechanismy, skokový nárůst při adaptaci na měď a postupný nárůst při adaptaci na osmotický stres, u obou paralelních experimentů došlo po čase k ustálení a žádné další trendy v růstu při dalším pasážování nebyly pozorovány. Jako robustnější byl na základě experimentů shledán

kmen adaptovaný na měď, který vykazoval lepší charakteristiky růstu i produkce oproti divokému kmeni. Stejně jako u předchozí práce zaměřené na adaptaci, byly kmeny metabolicky charakterizovány a data byla následně podrobena statistické analýze. Oba adaptované kmeny spojovala navýšená dráha biosyntézy PHA, proto lze na základě získaných výsledků z jednotlivých základních a následně i pokročilejších analýz (FT-IR, Ramanova spektroskopie) v rámci diskutované publikace usuzovat, že při adaptace *C. necator* H16 na přítomnost měďnatých iontů a zvýšený osmotický stres hrály PHA důležitou roli. Ne však pouze prostřednictvím vyššího množství polymeru v biomase, ten nebyl pokaždé přímo prokázán, ale především pravděpodobně skrze navýšený cyklus přeměny PHA v buňkách, což vedlo k navýšení poolu monomerních jednotek, které vykazují funkci jednak chaperonů, jednak osmoprotektantů.

Data z proteomické analýzy aplikované na adaptované kmeny a divoký kmen bez a za přítomnosti stresorů nám pomocí jednoduchého srovnání ukázala řadu up-regulovaných či down-regulovaných proteinů při porovnání jednotlivých dvojic kmenů. Vliv aplikovaného stresu se mohl projevit navýšením aktivit enzymů, navýšením jejich exprese, ale také na dalších úrovních metabolismu, což by se mohlo dále projevit ve výsledcích při podrobnějším porovnání kmenů. Za účelem odhalit větší provázanost naměřených dat v rámci metabolismu uvažujeme aplikaci bioinformatických nástrojů v rámci další spolupráce.

Jako nevhodnější prekurzor jednotky 4HB pro produkci kopolymeru P(3HB-co-4HB) pomocí kmene *C. necator* H16 se na základě experimentů jevil ϵ -KL, jehož využití pro tento účel je poměrně unikátní, nicméně zároveň vystupoval jako mikrobiální inhibitor. Dlouhodobým adaptačním experimentem bakteriálního kmene na ϵ -KL jsme získali izolát vykazující výrazně lepší růst v přítomnosti prekurzoru zároveň s jeho efektivnějším využitím pro tvorbu kopolymeru v kombinaci s dalším zdrojem uhlíku. Další zlepšení kmene za účelem navýšení frakce 4HB v kopolymeru nabízí delece genů zapojených do utilizace meziprojektu 4-hydroxybutyryl-CoA pomocí metod genového inženýrství. Dva možné zapojené proteiny, respektive je kódující geny, byly popsány a také byly provedeny transformační experimenty, jež jsou součástí delečního protokolu, nicméně deleční mutanty v rámci této práce připraveny nebyly. I přes to však adaptovaný izolát získaný na základě metodiky evolučního inženýrství byl schopen i při kultivaci v laboratorním bioreaktoru produkovat značné množství polymeru s nezanedbatelnou frakcí 4HB, která má pozitivní vliv na výsledné vlastnosti materiálu.

Dále jsme se věnovali biotechnologické produkci PHA pomocí mesofilního kmene *B. sacchari* a dále dvou extrémofilních kmenů, halofilního kmene *H. halophila* a termofilního kmene *S. thermodepolymerans*, a to na modelových hydrolyzátech lignocelulosové biomasy, jež pochází často z odvětví potravinářství. Jednotlivé modelové směsi sestávaly z rozdílného zastoupení hexos a pentos. Využití extrémofilních producentů PHA může společně s využitím odpadních substrátů vést k dalšímu zredukování nákladů na produkci snížením nároků na sterilitu procesu v rámci konceptu NGIB. Z výsledků bylo zjištěno, že extrémofilní kmeny mají velký potenciál pro využití při kultivaci na směsích sacharidů. Zatímco kmen *H. halophila* preferoval směsi bohaté na hexosy, kmen *S. thermodepolymerans* preferoval směsi bohaté na pentosy, což je podstatná informace pro případné další experimenty např. na

reálných hydrolyzátech. Dále jsme testovali robustnost vůči potenciálním inhibitorům často přítomným v reálných lignocelulosových hydrolyzátech, kdy vliv na jednotlivé producenty byl proměnný. Výhodná byla nicméně schopnost mesofilního a termofilního kmene využít kyseliny levulovou za současné produkce kopolymeru P(3HB-co-3HV).

V návaznosti na předchozí problematiku produkce PHA pomocí halofilního a termofilního producenta, kteří jsou schopni produkovat vysoké množství polymeru v biomase, jsme se dále zaměřili na vývoj alternativního způsobu izolace z těchto bakteriálních buněk. Hlavní myšlenkou přitom bylo snížit ekonomickou i ekologickou zátěž procesu a využít skutečnosti, že oba zvolené typy extrémofilů spojuje zvýšená náchylnost k osmotickému namáhání. Pro účely izolace jsme využili detergent SDS, jehož optimální koncentrace pro izolaci byla experimentálně stanovena na 5 g/L. Jednotlivé kmeny byly namáhány také při inkubaci při zvýšené teplotě, kdy termofilní kmen vyžadoval teplotu 90 °C, pro halofilní kmen byla dostatečná teplota 70 °C. Získané polymery vykazovaly čistoty vyšší než 99 hm. %, výtěžky se blížily hodnotě 1,0. Porovnáním molekulových hmotností takto izolovaných polymerů oproti standardní extrakci chloroformem bylo zjištěno, že na polymer izolovaný z *H. halophila* byl efekt pozitivní, jelikož molekulová hmotnost byla v tomto případě vyšší, izolace při vyšší teplotě pro *S. thermodepolymerans* má na tento parametr polymeru negativní dopad. Zatímco SDS může při 70 °C zvyšovat rozpustnost dlouhých řetězců, při 90 °C může již docházet k částečné degradaci. Vyvinutý postup byl na základě experimentů vyhodnocen jako robustní. Další možností, která by ještě více snížila ekologickou a ekonomickou zátěž celého procesu, spočívá v potenciální recyklaci SDS po izolaci, která byla v patentové žádosti i publikaci nastíněna a vyžaduje další experimenty.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

1,4-BD	1,4-butandiol
1,6-HD	1,6-hexandiol
3HB	3-hydroxybutyrát
3HV	3-hydroxyvalerát
4HB	4-hydroxybutyrát
4HbD	4-hydroxybutyrát dehydrogenasa
5-HMF	5-hydroxymethylfurfural
ALE	adaptivní laboratorní evoluce
ARTP	plazma o atmosférické a pokojové teplotě
ATB	antibiotika
ATR	technika zeslabené totální reflektance
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CRISPR	nahromaděné pravidelně rozmístěné krátké palindromické repetice
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DSC	diferenční skenovací kalorimetrie
FACS	metoda průtokové cytometrie umožňující sortaci buněk na základě fluorescenčního signálu
FID	plamenově-ionizační detektor
FT-IR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GC	plynová chromatografie
GFP	zelený fluorescenční protein
GMO	geneticky modifikovaný organismus
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HSP	protein teplotního šoku
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid
kbp	kilopár bazí
KDS	dodecylsíran draselný
kryo-SEM	kryogenní skenovací (rastrovací) elektronová mikroskopie
lcl-PHA	polyhydroxyalkanoáty s dlouhým bočním řetězcem
mcl-PHA	polyhydroxyalkanoáty se středně dlouhým bočním řetězcem
MMS	methyl methansulfonát
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NAD ⁺ /NADH	nikotinamidadeninukleotid (oxidovaná/redukovaná forma)
NADP ⁺ /NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát (oxidovaná/ redukovaná forma)
NGIB	průmyslové biotechnologie nové generace
NGS	sekvenování nové generace
NMR	nukleární magnetická rezonance
P(3HB-co-3HV)	kopolymer 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu
P(3HB-co-4HB)	kopolymer 3-hydroxybutyrátu a 4-hydroxybutyrátu
PCA	analýza hlavních komponent
PCR	polymerázová řetězová reakce
PHA	polyhydroxyalkanoáty
PHB	poly(3-hydroxybutyrát)

RNA	ribonukleová kyselina
RTG	rentgenové záření
scl-PHA	polyhydroxyalkanoáty s krátkým bočním řetězcem
SDS	dodecylsírán sodný
SSADH	sukcinát-semialdehyd dehydrogenasa
TALEN	efektorové nukleasy podobné transkripčním aktivátorům
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
UV	ultrafialové záření
WGS	celogenomové sekvenování
ZFN	nukleasa založená na motivu zinkových prstů
γ -BL	γ -butyrolakton
ϵ -KL	ϵ -kaprolakton

7 LITERATURA

- [1] MARLES-WRIGHT, J., R. J. LEWIS. 2007. Stress responses of bacteria. *Current Opinion in Structural Biology*. **17**(6), 755–760.
- [2] FOSTER, P. L. 2005. Stress responses and genetic variation in bacteria. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. **569**(1–2), 3–11.
- [3] HRSTKA, M. Obecná biologie. 1. vyd. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2005, 112 s. ISBN 80-214-3057-5.
- [4] XIAO, H., Z. BAO, H. ZHAO a B. TEUSINK, 2015. High Throughput Screening and Selection Methods for Directed Enzyme Evolution: Past, present, and future. *AIChE Journal*. **54**(16), 4011-4020.
- [5] FULDA, S., A. GORMAN, O. HORI a A. SAMALI. 2010. Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death. *International Journal of Cell Biology*. **1**, 1–23.
- [6] ŠIMONOVÍČOVÁ, A.. Environmentálna mikrobiológia. 1. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislavě 2013.
- [7] TRIPATHI, L., Y. ZHANG a Z. LIN. 2014. Bacterial Sigma Factors as Targets for Engineered or Synthetic Transcriptional Control. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. **2**.
- [8] GRUBER, T. M. a C. A. GROSS. 2003. Multiple Sigma Subunits and the Partitioning of Bacterial Transcription Space. *Annual Review of Microbiology*. **57**(1), 441–466.
- [9] GALPERIN, M., A. NIKOLSKAYA a E. KOONIN. 2001. Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiology Letters*. **203**(1), 11–21.
- [10] KRÄMER, R. 2010. Bacterial stimulus perception and signal transduction: Response to osmotic stress. *The Chemical Record*. **10**(4), 217–229.
- [11] TRIPATHI, L., Y. ZHANG a Z. LIN. 2014. Bacterial Sigma Factors as Targets for Engineered or Synthetic Transcriptional Control. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. **2**.
- [12] ALPER, H., a G. STEPHANOPOULOS. 2007. Global transcription machinery engineering: a new approach for improving cellular phenotype. *Metabolic Engineering*. **9**, 258–267.
- [13] KLEIN-MARCUSCHAMER, D., a G. STEPHANOPOULOS. 2008. Assessing the potential of mutational strategies to elicit new phenotypes in industrial strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **105**, 2319–2324.
- [14] MA, Y., a H. YU. 2012. Engineering of *Rhodococcus* cell catalysts for tolerance improvement by sigma factor mutation and active plasmid partition. *Journal of Ind Microbiology and Biotechnology*. **39**, 1421–1430.
- [15] YU, H., K. TYO, H. ALPER, D. KLEIN-MARCUSCHAMER, a G. STEPHANOPOULOS. 2008. A high-throughput screen for hyaluronic acid accumulation in recombinant *Escherichia coli* transformed by libraries of engineered sigma factors. *Biotechnology and Bioengineering*. **101**, 788–796.
- [16] WANG, H., L. YANG, K. WU a G. LI. 2014. Rational selection and engineering of exogenous principal sigma factor (sigma(HrdB)) to increase teicoplanin production in an industrial strain of *Actinoplanes teichomyceticus*. *Microbial Cell Factories*. **13**(10).

- [17] CHOI, Y. J., J. H. PARK, T. Y. KIM a S. Y. LEE. 2012. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 1-propanol. *Metabolic Engineering*. 14, 477–486.
- [18] QIAN, Z. G., X. X. XIA a S. Y. LEE. 2009. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of putrescine: a four carbon diamine. *Biotechnology and Bioengineernig*. 104, 651–662.
- [19] SMITH, K. M., a J. C. LIAO. 2011. An evolutionary strategy for isobutanol production strain development in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*. 13, 674–681.
- [20] GAIDA, S. M., M. A. AL-HINAI, D. C. INDURTHI, S. A. NICOLAOU a E. T. PAPOUTSAKIS. 2013. Synthetic tolerance: three noncoding small RNAs, DsrA, ArcZ and RprA, acting supra-additively against acid stress. *Nucleic Acids Resources*. 41, 8726–8737.
- [21] BAK, G., K. HAN, D. KIM a Y. LEE. 2014. Roles of rpoS-activating small RNAs in pathways leading to acid resistance of *Escherichia coli*. *Microbiology Open*. 3, 15–28.
- [22] JIN, Y., R. M. WATT, A. DANCHIN a J. D. HUANG. Small noncoding RNA GcvB is a novel regulator of acid resistance in *Escherichia coli*. *BMC Genomics*. 2009; 10(165).
- [23] KANG, Z., WANG, Q., ZHANG, H. a Q. QI. 2008. Construction of a stress-induced system in *Escherichia coli* for efficient polyhydroxyalkanoates production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 79, 203–208.
- [24] OSANAI, T., A. KUWAHARA, H. IJIMA, K. TOYOOKA, M. SATO, K. TANAKA, et al. 2013a. Pleiotropic effect of sigE over-expression on cell morphology, photosynthesis and hydrogen production in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Journal*. 76, 456–465.
- [25] OSANAI, T., K. NUMATA, A. OIKAWA, A. KUWAHARA, H. IJIMA, Y. DOI, et al. 2013b. Increased bioplastic production with an RNA polymerase sigma factor SigE during nitrogen starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Resources*. 20, 525–535.
- [26] JIANG, L., Y. LIU, P. WANG, Y. WEN, Y. SONG, Z. CHEN, et al.. 2011. Inactivation of the extracytoplasmic function sigma factor Sig6 stimulates avermectin production in *Streptomyces avermitilis*. *Biotechnology Letters*. 33, 1955–1961.
- [27] MARTIN, D. W., M. J. SCHURR, M. H. MUDD, J. R. GOVAN, B. W. HOLLOWAY a V. DERETIC. 1993. Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. *Proceedings of the National Academy. of. Sciences U.S.A.* 90, 8377–8381.
- [28] BORGOS, S., S. BORDEL, H. SLETTA, H. ERTESVÅG, Ø. JAKOBSEN, P. BRUHEIM, et al. 2013. Mapping global effects of the anti-sigma factor MucA in *Pseudomonas fluorescens* SBW25 through genome-scale metabolic modeling. *BMC Systeme Biology*. 7(19).
- [29] JNAWALI, H. N., K. LIOU a J. K. SOHNG. 2011. Role of sigma-factor (orf21) in clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* NRRL3585. *Microbiology Resources*. 166, 369–379.

- [30] LIN, L., Y. JI, Q. TU, R. HUANG, L. TENG, X. ZENG, et al. 2013a. Microevolution from shock to adaptation revealed strategies improving ethanol tolerance and production in *Thermoanaerobacter*. *Biotechnology for Biofuels*. 6, 103.
- [31] LIN, Z., Y. ZHANG, a J. WANG. 2013b. Engineering of transcriptional regulators enhances microbial stress tolerance. *Biotechnology Advances*. 31, 986–991.
- [32] STEVENS, D. C., K. R. CONWAY, N. PEARCE, L. R. VILLEGAS-PENARANDA, A. G. GARZA a C. N. BODDY. 2013. Alternative sigma factor over-expression enables heterologous expression of a type II polyketide biosynthetic pathway in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*. 8:e64858.
- [33] JIN, Y., J. WU, Y. LI, Z. CAI, a J. D. HUANG. 2013. Modification of the RpoS network with a synthetic small RNA. *Nucleic Acids Resources*. 41, 8332–8340.
- [34] JIN, Y. a J. D. HUANG. 2011. Engineering a portable riboswitch-LacP hybrid device for two-way gene regulation. *Nucleic Acids Resources*. 39.
- [35] RHODIUS, V. A., SEGALL-SHAPIRO, T. H., SHARON, B. D., GHODASARA, A., ORLOVA, E., TABAKH, H., et al. 2013. Design of orthogonal genetic switches based on a crosstalk map of sigmas, anti-sigmas, and promoters. *Molecular Systems of Biology*. 9(702).
- [36] Segall-Shapiro, T. H. a C. Voigt. (2013). Artificial sigma factors based on bisected t7 RNA polymerase. United States patent application PCT/US2013/034147.
- [37] DRAGOSITS, M. a D. MATTANOVICH. 2013. Adaptive laboratory evolution – principles and applications for biotechnology. *Microbial Cell Factories*. 12(64).
- [38] WINKLER, J. D. a K. C. KAO. 2014. Recent advances in the evolutionary engineering of industrial biocatalysts. *Genomics*. 104(6), 406–411.
- [39] CHAE, T. U., S. Y. CHOI, J. W. KIM, Y.-S. KO a S. Y. LEE. 2017. Recent advances in systems metabolic engineering tools and strategies. *Current Opinion in Biotechnology*. 47, 67–82.
- [40] ZHU, Z., J. ZHANG, X. JI, Z. FANG, Z. WU, J. CHEN a G. DU. 2018. Evolutionary engineering of industrial microorganisms-strategies and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 102(11), 4615–4627.
- [41] SHEPELIN, D., A. HANSEN, R. LENNEN, H. LUO, M. HERRGÅRD, J. CHEN a G. DU. 2018. Selecting the Best: Evolutionary Engineering of Chemical Production in Microbes. *Genes*. 9(5), 4615–4627.
- [42] SAUER, U., A. HANSEN, R. LENNEN, H. LUO, M. HERRGÅRD, J. CHEN a G. DU. 2001. Evolutionary Engineering of Industrially Important Microbial Phenotypes: Evolutionary Engineering of Chemical Production in Microbes. *Metabolic Engineering*. 9(5), 129–169.
- [43] ALKIM, C., B. TURANLI-YILDIZ, Z. P. ÇAKAR, Z. FANG, Z. WU, J. CHEN a G. DU. Evolutionary Engineering of Yeast. *Yeast Metabolic Engineering*. New York, NY: Springer New York, 2014-3-26, 102(11), 169-183. *Methods in Molecular Biology*. ISBN 978-1-4939-0562-1.
- [44] VODRÁŽKA, Z.. Biochemie. 2. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 978-80-200-0600-4.
- [45] RUBIN, G. M., YANDELL, et al. 2000. Comparative Genomics of the Eukaryotes. *Science*. 287(5461), 2204–2215.
- [46] BARRICK, J. E. a R. E. LENSKI. 2013. Genome dynamics during experimental evolution. *Nature Reviews. Genetics*. 14, 827–839.

- [47] HAHN-HÄGERDAL, B., K. KARHUMAA, Ch. U LARSSON, M. GORWA-GRAUSLUND, J. GÖRGENS a W. H. VAN ZYL. 2005. Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use. *Microbial Cell Factories*. **4**(31).
- [48] HUANG, D., R. WANG, W. DU, G. WANG a M. XIA. 2015. Activation of glycerol metabolic pathway by evolutionary engineering of *Rhizopus oryzae* to strengthen the fumaric acid biosynthesis from crude glycerol. *Bioresource Technology*. 196, 263-272.
- [49] FERNÁNDEZ-CABEZÓN, L., A. CROS a P. I. NIKEL. 2019. Evolutionary Approaches for Engineering Industrially Relevant Phenotypes in Bacterial Cell Factories. *Biotechnology Journal*. **14**(9).
- [50] BACHMANN, H., J. T. PRONK, M. KLEEREBEZEM a B. TEUSINK. 2015. Evolutionary engineering to enhance starter culture performance in food fermentations. *Current Opinion in Biotechnology*. 32, 1–7.
- [51] BIOT-PELLETIER, D. a V. J. J. MARTIN. 2014. Evolutionary engineering by genome shuffling. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98, 3877–3887.
- [52] ZHANG, X., X.-F. ZHANG, H.-P. LI, L.-Y. WANG, Ch. ZHANG, X.-H. XING a Ch.-Y. BAO. 2014. Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **98**(12), 5387–5396.
- [53] ALMARIO, M. P., L. H. REYES a K. C. KAO. 2013. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced tolerance to hydrolysates of lignocellulosic biomass. *Biotechnology and Bioengineering*. **110**(10), 2616–2623.
- [54] XIAO, H., Z. BAO, H. ZHAO a B. TEUSINK, 2015. High Throughput Screening and Selection Methods for Directed Enzyme Evolution. *Current Opinion in Biotechnology*. **54**(16), 4011–4020.
- [55] COBB, R. E., R. CHAO, H. ZHAO a B. TEUSINK, 2013. Directed evolution: Past, present, and future. *AIChE Journal*. **59**(5), 1432–1440.
- [56] LENSKI, R., F. VASI a M. TRAVISANO. 1994. Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. II. Changes in life-history traits during adaptation to a seasonal environment. *The American Naturalist*. **144**(3), 432–456.
- [57] MAYER, G. Exchange of genetic information. Microbiology and Immunology On-line [online]. [cit. 2020-04-27]. Dostupné z: <http://www.microbiologybook.org/mayer/genetic%20ex.htm>.
- [58] REYES, L. H., M. P. ALMARIO, J. WINKLER, M. M. OROZCO, K. C. KAO a J. FRUNZKE. 2012. Visualizing evolution in real time to determine the molecular mechanisms of n-butanol tolerance in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*. **14**(5), 579–590.
- [59] BONNER, W. A., H. R. HULETT, R. G. SWEET a L. A. HERZENBERG. 1972. Fluorescence Activated Cell Sorting: Library screening strategies. *Review of Scientific Instruments*. **43**(3), 404–409.
- [60] KAO, K. C. a G. SHERLOCK. 2008. Molecular characterization of clonal interference during adaptive evolution in asexual populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Genetics*. **40**(12), 1499–1504.
- [61] SNUSTAD, D. Peter a Michael J. SIMMONS. Genetika. Druhé aktualizované. Brno: Masarykova univerzita, 2017. ISBN 978-80-210-8613-5.

- [62] VODRÁŽKA, Z.. Biochemie. 2. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 978-80-200-0600-4.
- [63] The Essential Guide To Genome Engineering: Techniques & Applications. SYNTHEGO [online]. [cit. 2020-04-27]. Dostupné z: <https://www.synthego.com/learn/genome-editing-engineering>.
- [64] LANIGAN, T. M., H. C. KOPERA a T. L. SAUNDERS. 2020. Principles of Genetic Engineering. *Genes*. **11**(3).
- [65] SKARNES, W. C., B. ROSEN, A. P. WEST, M. KOUTSOURAKIS, W. BUSHELL, V. IYER, A. O. MUJICA, M. THOMAS, J. HARROW, T. COX, T et al. 2011. A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature*. 474, 337–342.
- [66] THOMAS, K. R. a M. R. CAPECCHI. 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*. 51, 503–512.
- [67] Knockout Mouse Project (KOMP). The Jackson Laboratory [online]. [cit. 2023-01-19]. Dostupné z: <https://www.jax.org/research-and-faculty/resources/knockout-mouse-project>
- [68] XIONG, J., K. CAWLEY, M. PIEMONTESE, Y. FUJIWARA, H. ZHAO, J. J. GOELLNER a C. A. O'BRIEN. 2018. Soluble RANKL contributes to osteoclast formation in adult mice but not ovariectomy-induced bone loss. *Nature Communication*. **9**(2909).
- [69] GU, B., E. POSFAI a J. ROSSANT. 2018. Efficient generation of targeted large insertions by microinjection into two-cell-stage mouse embryos. *Nature Biotechnology*. 36, 632–637.
- [70] DE LIGT, J., J. A. VELTMAN a L. E. VISSERS. 2013. Point mutations as a source of de novo genetic disease. *Current Opinion in Genetics and Development*. 23, 257–263.
- [71] SIPEK, Antonín. Genetické inženýrství. Genetika - Biologie [online]. [cit. 2020-04-27]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/geneticke-inzenyrstvi>.
- [72] LIU, Z., Y. LIANG, E. L. ANG a H. ZHAO. 2017. A New Era of Genome Integration—Simply Cut and Paste!. *ACS Synthetic Biology*. **6**(4), 601–609.
- [73] GREEN M., SAMBOOK J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Laboratory Press. 2012, 4 vydání. ISBN-10: 1936113422.
- [74] VONDREJS, V. a Z. STORCHOVÁ. Genové inženýrství, I. Praha: Karolinum, 1997.
- [75] ANSORGE, W. J. 2009. Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnology*. **25**(4), 195–203.
- [76] KING, C. R. a T. SCOTT-HORTON. Pyrosequencing®: A Simple Method for Accurate Genotyping. New Jersey: Humana Press. ISBN 1597453773. 39–56.
- [77] TUCKER, T., M. MARRA a J. M. FRIEDMAN. 2009. Massively Parallel Sequencing: The Next Big Thing in Genetic Medicine. *The American Journal of Human Genetics*. **85**(2), 142–154.
- [78] NASERI, G. A M. A. G. KOFFAS. 2020. Application of combinatorial optimization strategies in synthetic biology. *Nature Communication*. 11, 2446.
- [79] PHILIP, S., T. KESHAVARZ a I. ROY. 2007. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 82, 233–247.

- [80] ANJUM, A., M. ZUBER, K. M. ZIA, A. NOREEN, M. N. ANJUM a S. TABASUM. 2016. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*. 89, 161–174.
- [81] CASTILHO, L. R., D. A. MITCHELL a D. M. G. FREIRE. 2009. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. *Bioresource Technology*. 100, 5996–6009.
- [82] SURIYAMONGKOL, P., R. WESELAKE, S. NARINE, M. MOLONEY a S. SHAH. 2007. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants. *Biotechnology Advances*. 25(2), 148–175.
- [83] GILL, M. 2014. Bioplastic: A better alternative to plastics. *IMPACT: International Journal of Research in Applied. Natural and Social Sciences*. 2(8), 115–120.
- [84] LEMOIGNE, M. 1926. Produit de déshydratation et de polymérisation de l'acide b-oxy butyrique. *Bulletin De La Societe De Chimie Biologique*. 8, 770–782.
- [85] LEMOIGNE, M. 1927. Etudes sur l'autolyse microbieënne origine de l'acide b-oxybutyrique formeâ par autolyse. *Annales de l'Institut Pasteur*. 41, 148–165.
- [86] STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoic acids. In: Byrom, D. (eds) *Biomaterials*. Palgrave MacMillan. London. 1991, 125-213. ISBN 978-1-349-11167-1.
- [87] ANDERSON A. J., E. A. DAWES. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic rate, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*. 54(4), 450–472.
- [88] KESSLER, B. a B. WITHOLT. Poly(3-hydroxyalkanoates). In: Flickinger MC, Drew S. W. (eds) *Encyclopedia of bioprocess technology - fermentation, biocatalysis and bioseparation*. Wiley, New York. 1999, 2024-2040. ISBN 0471138223.
- [89] KOLLER, M., A. ATLIĆ, M. DIAS, A. REITERER a G. BRAUNEGG. 2010a. Microbial PHA Production from Waste Raw Materials. In: Steinbüchel, A. a G. Guo-Qiang Chen (eds.) *Plastics from bacteria: natural functions and applications*. Microbiology Monographs. Springer Berlin Heidelberg, 2012. 14, 85–119. ISBN 978-3-642-02796-3.
- [90] STEINBÜCHEL, A., B. FÜCHTENBUSCH. 1998. Bacterial and other biological systems for polyester production. *Trends in Biotechnology*. 16, 419–427.
- [91] BRAUNEGG, G., G. LEFEBVRE a K. F. GENSER. 1998. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*. 65, 127–161.
- [92] YU, J., Z. SI a W. K. R. WONG. 2002. Kinetics modeling of inhibition and utilization of mixed volatile fatty acids in the formation of polyhydroxyalkanoates by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry*. 37, 731–738.
- [93] LUENGO, J.M., B. GARCÍA, A. SANDOVAL, G. NAHARRO a E. R. OLIVERA. 2003. Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*. 6, 251–260.
- [94] REHM, B. H. A. 2006. Genetics and Biochemistry of Polyhydroxyalkanoate Granule Self-assembly: The Key Role of Polyester Synthases. *Biotechnology Letters*. 28(4), 207–213.
- [95] GRAGE, K., A. C. JAHNS, N. PARLANE, R. PALANISAMY, I. A. RASIAH, J. A. ATWOOD a B. H. A. REHM. 2009. Bacterial Polyhydroxyalkanoate Granules:

- Biogenesis, Structure, and Potential Use as Nano-/Micro-Beads in Biotechnological and Biomedical Applications. *Biomacromolecules*. **10**(4), 660-669.
- [96] ZINN, M., B. WITHOLT a T. EGLI. 2001. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **53**(1), 5–21.
- [97] ZINN M. 2003. Tailor-made synthesis of polyhydroxyalkanoates. *European Cells & Materials*. **5**, 38–39.
- [98] SUDESH, K., H. ABE a Y. DOI. 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*. **25**, 1503–1555.
- [99] CIESIELSKI, S., J. MOŹEJKO a N. PISUTPAISAL. 2015. Plant oils as promising substrates for polyhydroxyalkanoates production. *Journal of Cleaner Production*. **106**, 408–421.
- [100] VERLINDEN, R. A. J., D. J. HILL, M. A. KENWARD, C. D. WILLIAMS a I. RADECKA. 2007. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*. **102**, 1437–1449.
- [101] KOLLER, M., A. SALERNO, M. DIAS, A. REITERER a G. BRAUNEGG. 2010b. Modern Biotechnological Polymer Synthesis: A Review. *Food Technology and Biotechnology*. **48**(3), 255–269.
- [102] KESHAVARZ T. a I. ROY. 2010. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*. **13**, 321–326.
- [103] KHANNA, S. a A. K. SRIVASTAVA. 2005. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*. **40**(2), 606–619.
- [104] WU, H.-A., D.-S. SHEU a Ch.-Y. LEE. 2003. Rapid differentiation between short-chain-length and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria with spectrofluorometry. *Journal of Microbiological Methods*. **53**, 131–135.
- [105] ANDERSON A. J., E. A. DAWES. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic rate, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*. **54**(4), 450–472.
- [106] HA, C. S., W. J. CHO. 2002. Miscibility, properties, and biodegradability of microbial polyester containing blends. *Progress in Polymer Science*. **27**, 759–809.
- [107] LU, X. Y., J. ZHANG, Q. WU, G. Q. CHEN. 2003. Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) via manipulating the fatty acid β -oxidation pathway in *E. coli*. *FEMS Microbiology Letters*. **221**, 97–101.
- [108] AKIYAMA, M., Y. TAIMA a Y. DOI. 1992. Production of poly(3-hydroxyalkanoates) by a bacterium of the genus *Alcaligenes* utilizing long-chain fatty acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **37**(6), 698–701.
- [109] FUKUI, T., T. KICHISE, Y. YOSHIDA a Y. DOI. 1997. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate- co-3-hydroxy-heptanoate) terpolymers by recombinant *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnology Letters*. **19**(11), 1093–1097.
- [110] VAN DER WALLE, G. A. M., G. J. M. DE KONING, R. A. WEUSTHUIS a G. EGGINK. 2001. Properties, modifications and applications of biopolyesters. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*. **71**, 263–291.
- [111] DE RIJK, T. C., P. VAN DE MEER, G. EGGINK a R. A. WEUSTHUIS. Methods for Analysis of Poly(3-hydroxyalkanoate) Composition. In: Doi, Y. a A. Steinbüchel

- (eds.) Biopolymers: Polyesters II: Properties and Chemical Synthesis. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. ISBN 978-3527302192.
- [112] SUCHITRA G. 2016. Methods for identification, quantification and characterization of polyhydroxyalkanoates- a review. *International Journal of Bioassays*. **5**(4), 4977–4983.
- [113] BURDON, K. L. J. 1946. Bacterial Fatty materials in bacterial and fungi revealed by staining dried fixed slide preparations. *Journal of Bacteriology*. 665–678.
- [114] SMIBERT, R.M. a KRIEG, N.R. P. In GERHARDT, P. MURRAY, G.E. COSTILLOWS R.N. NESTER, E.W. WOOD, W.A. KERIEG, N.R. a PHILLIPS, G.P. (ed). General characterization Manual of methods for general bacteriology, 1979, American society for microbiology, Washington D.C. 409–443.
- [115] BOURQUE B., OUELLETTE, G. ANDRE, D. GROLEAU. 1992. Production of poly-B-hydroxybutyrate from Methanol: Characterization of a new isolate. *Methylobacterium extorquens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **37**, 7–12.
- [116] OSTLE A. G. a J.G. HOLT. 1982. Nile blue A as a fluorescent stain for poly-B-hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology*. **44**, 238–241.
- [117] LAW J. H. a R. A. SLEPECKY. 1961. Assay of Poly-B-Hydroxybutyric acid. *Journal of Bacteriology*. **82**, 33–36.
- [118] WARD A.C. a DAWES E. 1973. A disc assay for poly-B-hydroxybutyrate. *Anually Biochemistry*. **52**, 607–613.
- [119] KARR D.B., J. K. WATERS a D. W. EMERICH. 1983. Analysis of Poly-B-Hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* bacterioids by ion-exclusion high pressure liquid chromatography and UV detection. *Applied Environmental Microbiology*. **46**(6), 1339–1344.
- [120] BRAUNEGG G., B. SONNLEITNER a R. M. LAFFERTY. 1978. A rapid gas chromatographic method for the determination of Poly-B-hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. **6**, 29–37.
- [121] RIIS V. a W. J. MAI. 1988. Chromatographic determination of Poly-B-hydroxybutyric acid from microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. *Chromatography*. **445**, 285–289.
- [122] BRANDL H.E. J., KNEE, JR., FULLER R.C., GROSS R.A. a LENZ R.W. 1988. Ability of Phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum* to produce various B-hydroxyalkanoates potential source for biodegradable polyesters. *Applied Environmental Microbiology*. **54**, 1977–1982.
- [123] HEULLER, R. J. 1988. Pyrolysis gas chromatography for the rapid characterization bacterial poly-(B-hydroxybutyrate-co-B-hydroxy valerate). *Polymer Preprints*. **29**, 609–610.
- [124] JUTTNER R.R., LAFFERTY R.M. a KNACHNUSS H.J. 1975. A simple method for the determination of poly-B-hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European Journal of Applied Microbiology*. **1**, 233–237.
- [125] HONG K., SUN S., TIAN W., CHEN G.Q., HUDRG W. 1999. A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by fourier transform infrared spectroscopy. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **51**, 523–526.

- [126] SCANDOLA, M., CECCORULLI G. a DOI Y. 1990. Viscoelastic relaxations and thermal properties of bacterial poly-(B-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) *International Journal of Biological Macromolecules*. 12, 112–117.
- [127] KAZUNORI, T., T. TAKEHARU, K. MATSUMOTO, S. NAKAE, S. TAGUCHI a Y. DOI. 2001. Investigation of metabolic pathways for biopolyester production. *Ecomolecular Science Research*. 42, 71–74.
- [128] MADISON, L. L. a G. W. HUISMAN. Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1999, **63**(1), 21–53.
- [129] MERRICK, J. M. Microbial Water-insoluble Aliphatic Polyesters (PHAs). In: DOI, Y. a A. STEINBÜCHEL (eds). *Biopolymers Online*. 3a. [online]. 2005, [cit. 2018-02-19]. ISBN 9783527600038.
- [130] DU, CH., J. SABIROVA, W. SOETAERT a S. KI CAROL LIN. 2012. Polyhydroxyalkanoates Production From Low-cost Sustainable Raw Materials. *Current Chemical Biology*. **6**(1), 14–25.
- [131] OBRUCA, S., P. BENESOVA, L. MARSALEK a I. MAROVA. 2015. Use of Lignocellulosic Materials for PHA Production. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. **29**(2), 135–144.
- [132] M. NARODOSLAWSKY, H.S.K. SHAZAD a R. KOLLMANN. 2005. LCA of PHA production - identifying the ecological potential of bioplastic. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. **29**(2), 299–305.
- [133] DOI, Y., Y. KAWAGUCHI, N. KOYAMA, S. NAKAMURA, M. HIRAMITSU a H. KIMURA. Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiology Letters*. 1992, 103, 103–108.
- [134] STEINBÜCHEL, A. et al.. Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions. *Canadian Journal of Microbiology* (Supplement). 1995, **41**(1), 94–105.
- [135] DOI, Y. et al. 1996. Evaluation of biodegradabilities of biosynthetic and chemosynthetic polyesters in river water. *Polymer Degradation and Stability*. 51, 281–286.
- [136] DOI, Y. a H. ABE. 1997. Structural effects on biodegradation of aliphatic of aliphatic polyesters. *Macromolecular Symposia*. 118, 725–731.
- [137] KASUYA, K., K. TAKAGI, S. ISHIWATARI, Y. YOSHIDA a Y. DOI. 1998. Biodegradabilities of various aliphatic polyesters in natural waters. *Polymer Degradation and Stability*. 59, 327–332.
- [138] OHURA, T., Y. AOYAGI, K. TAKAGI, Y. YOSHIDA, K. KASUYA a Y. DOI. 1999. Biodegradation of poly(3-hydroxyalkanoic acids) fibers and isolation of poly(3-hydroxybutyric acid) degrading microorganisms under aquatic environments. *Polymer Degradation and Stability*. 63, 23–29.
- [139] RYDZ, J., W. SIKORSKA, M. KYULAVSKA a D. CHRISTOVA. 2014. Polyester-Based (Bio)degradable Polymers as Environmentally Friendly Materials for Sustainable Development. *International Journal of Molecular Sciences*. 16, 564–596.
- [140] KAUR, G. 2015. Strategies for Large-scale Production of Polyhydroxyalkanoates. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. **29**(2), 157–172.

- [141] RODRIGUEZ-PEREZ, S., A. SERRANO, A. A. PANTIÓN a B. ALONSO-FARIÑAS. 2018. Challenges of scaling-up PHA production from waste streams. A review. *Journal of Environmental Management*. 205, 215–230.
- [142] REDDY, C.S., R. GHAI, A. RASHMI a V. C. KALIA. 2003. Polyhydroxyalkanoates: An overview. *Bioresource Technology*. **87**(2), 137–146.
- [143] MCLAUGHLIN, S.B. a L. A. KSZOS. 2005. Development of switchgrass (*Panicum virgatum*) as a bioenergy feedstock in the United States. *Biomass and Bioenergy*. **28**(6), 515–535.
- [144] BERNARD, M. 2014. Industrial Potential of Polyhydroxyalkanoate Bioplastic: A Brief Review. *USURJ: University of Saskatchewan Undergraduate Research Journal*. **1**(1).
- [145] MIYASAKA, H., H. NAKANO, H. AKIYAMA, S. KANAI a M. HIRANO. Production of PHA (polyhydroxyalkanoate) by genetically engineered marine cyanobacterium. *Advances in Chemical Conversions for Mitigating Carbon Dioxide, Proceedings of the Fourth International Conference on Carbon Dioxide Utilization*. Elsevier, 1998; 237-242. ISBN 9780444825742.
- [146] LI, Z.-J., Z.-Y. SHI, J. J., Y.-Y. GUO, Q. WU a G.-Q. CHEN. 2010. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from unrelated carbon sources by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*. **12**(4), 352–359.
- [147] CHEN, X., J. YIN, J. YE, et al. 2017. Engineering *Halomonas bluephagenesis* TD01 for non-sterile production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Bioresource Technology*. 244, 534–541.
- [148] YE, J., W. HUANG, D. WANG, F. CHEN, J. YIN, T. LI, H. ZHANG a G.-Q. CHEN. 2018. Pilot Scale-up of Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) Production by *Halomonas bluephagenesis* via Cell Growth Adapted Optimization Process. *Biotechnology Journal*. **13**(5).
- [149] HÖFER, P., Y. J. CHOI, M. J. OSBORNE, C. B. MIGUEZ, P. VERMETTE a D. GROLEAU. 2010. Production of functionalized polyhydroxyalkanoates by genetically modified *Methylobacterium extorquens* strains. *Microbial Cell Factories*. **9**(1).
- [150] GAO, X., X.-X. YUAN, Z.-Y. SHI, Y.-Y. GUO, X.-W. SHEN, J.-Ch. CHEN, Q. WU a G.-Q. CHEN. 2012. Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates by *E. coli* containing an optimized PHA synthase gene. *Microbial Cell Factories*. **11**(1).
- [151] XIONG, B., Z. LI, L. LIU, D. ZHAO, X. ZHANG a CH. BI. 2018. Genome editing of *Ralstonia eutropha* using an electroporation-based CRISPR-Cas9 technique. *Biotechnology for Biofuels*. **11**(1).
- [152] BOZELL, J. J., L. MOENS, D. C. ELLIOTT, Y. WANG, G. G. NEUENSWANDER, S. W. FITZPATRICK, R. J. BILSKI a J. L. JARNEFELD. 2000. Production of levulinic acid and use as a platform chemical for derived products. *Resources, Conservation and Recycling*. **28**(3–4), 227–239.
- [153] VIGNESWARI, S., J. M. CHAI, K. SHANTINI, K. BHUBALAN a A. A. AMIRUL. 2019. Designing Novel Interfaces via Surface Functionalization of Short-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates. *Advances in Polymer Technology*. 1–15.

- [154] KUNIOKA, M., A. TAMAKI a Y. DOI. 1989. Crystalline and thermal properties of bacterial copolyesters: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Macromolecules*. **22**(2), 694–697.
- [155] SCANDOLA, M., G. CECCORULLI, M. PIZZOLI a M. GAZZANO. 1992. Study of the crystal phase and crystallization rate of bacterial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Macromolecules*. **25**(5), 1405–1410.
- [156] DOI, Y., A. TAMAKI, M. KUNIOKA a K. SOGA. 1988. Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes eutrophus* from butyric and pentanoic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **28**(4-5), 330–334.
- [157] KOLLER, M. 2019. Polyhydroxyalkanoate biosynthesis at the edge of water activity – Haloarchaea as biopolyester factories. *Bioengineering*. **6**(2), 34.
- [158] ASHBY, R. D., D. K. Y. SOLAIMAN, G. D. STRAHAN, C. ZHU, R. C. TAPPEL a C. T. NOMURA. 2012. Glycerine and levulinic acid: Renewable co-substrates for the fermentative synthesis of short-chain poly(hydroxyalkanoate) biopolymers. *Bioresource Technology*. **118**, 272–280.
- [159] KACHRIMANIDOU, V., N. KOPSAHELIS, S. PAPANIKOLAOU, I. K. KOOKOS, M. DE BRUYN, J. H. CLARK a A. A. KOUTINAS. 2014. Sunflower-based biorefinery: poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production from crude glycerol, sunflower meal and levulinic acid. *Bioresource Technology*. **172**, 121–130.
- [160] KEENAN, T. M., S. W. TANENBAUM, A. J. STIPANOVIC a J.P. NAKAS. 2004. Production and Characterization of Poly- β -hydroxyalkanoate Copolymers from *Burkholderia cepacia* Utilizing Xylose and Levulinic Acid. *Biotechnology Progress*. **20**(6), 1697–1704.
- [161] KOLLER, M., P. HESSE, H. FASL, F. STELZER a G. BRAUNEGG. 2017. Study on the effect of levulinic acid on whey-based biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Hydrogenophaga pseudoflava*. *Applied Food Biotechnology*. **4**(2), 65–78.
- [162] SCHMACK, G., V. GORENFLO a A. STEINBÜCHEL. 1998. Biotechnological production and characterization of polyesters containing 4-hydroxyvaleric acid and medium-chainlength hydroxyalkanoic acids. *Macromolecules*. **31**(3), 644–649.
- [163] DUTTA, S. a N. S. BHAT. 2021. Recent Advances in the Value Addition of Biomass-Derived Levulinic Acid: A Review Focusing on its Chemical Reactivity Patterns. *ChemCatChem*. **13**(14), 3202–3222.
- [164] Biofine Technology [online]. 2001 [cit. 2022-08-08]. Dostupné z: <http://biofinetechnology.com/>
- [165] Technology. GF Biochemicals [online]. 2010 [cit. 2022-08-08]. Dostupné z: <http://www.gfbiochemicals.com/technology/>
- [166] JONSSON, L. J., B. ALRIKSSON a N.-O. NILVEBRANT. 2013. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*. **6**, e16.
- [167] SASAKI, K., S. IKEDA, Y. NISHIZAWA a M. HAYASHI. 1987. Production of 5-aminolevulinic acid by photosynthetic bacteria. *Journal of Fermentation Technology*. **65**, 511–515.
- [168] BEREZINA, N. A B. YADA. 2016. Improvement of the poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) production by dual feeding with levulinic acid and sodium propionate in *Cupriavidus necator*. *New Biotechnology*. **33**, 231–236.

- [169] CHUNG, S. H., G. G. CHOI, H. W. KIM a Y. H. RHEE. 2001. Effect of levulinic acid on the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* KHB-8862. *Journal of Microbiology*. 39, 79–82.
- [170] WANG, Y., R. CHEN, J. CAI, Z. LIU, Y. ZHENG, H. WANG, Q. LI a N. HE. 2013. Biosynthesis and thermal properties of PHBV produced from levulinic acid by *Ralstonia eutropha*. *PLoS One*. **8**(4), e60318.
- [171] JAREMKO, M. a J. YU. 2011. The initial metabolic conversion of levulinic acid in *Cupriavidus necator*. *Journal of Biotechnology*. 155, 293–298.
- [172] SPAANS, S. K., R. A. WEUSTHUIS, J. VAN DER OOST a S. W. M. KENGEN. 2015. NADPH-generating systems in bacteria and archaea. *Frontiers in Microbiology*. 6.
- [173] MURAKAMI, K., R. TSUBOUCHI, M. FUKAYAMA, T. OGAWA a M. YOSHINO. 2006. Oxidative inactivation of reduced NADP-generating enzymes in *E. coli*: iron-dependent inactivation with affinity cleavage of NADP-isocitrate dehydrogenase. *Archives of Microbiology*. 186, 385–392.
- [174] OBRUCA, S., I. MAROVA, M. STANKOVA, L. MRAVCOVA a Z. SVOBODA. 2010. Effect of ethanol and hydrogen peroxide on poly(3-hydroxybutyrate) biosynthetic pathway in *Cupriavidus necator* H16. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **26**(7), 1261–1267.
- [175] OBRUCA, S., O. SNAJDAR, Z. SVOBODA a I. MAROVA. 2013. Application of random mutagenesis to enhance the production of polyhydroxyalkanoates by *Cupriavidus necator* H16 on waste frying oil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **29**(12), 2417–2428.
- [176] OBRUCA, S., I. MAROVA, Z. SVOBODA a R. MIKULIKOVA. 2010. Use of controlled exogenous stress for improvement of poly(3-hydroxybutyrate) production in *Cupriavidus necator*. *Folia Microbiologica*. 55, 17–22.
- [177] JUNG, Y. M. a Y. H. LEE. 2000. Utilization of oxidative pressure for enhanced production of poly- β -hydroxybutyrate and poly(3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) in *Ralstonia eutropha*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 90, 266–270.
- [178] BLUNT, W., R. SPARLING, D. J. GAPES, D. B. LEVIN a N. CICEK. 2018. The role of dissolved oxygen content as a modulator of microbial polyhydroxyalkanoate synthesis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **34**(8), 106.
- [179] STRITTMATTER, C. S., J. EGGERS, V. BIESGEN, et al. 2022. Insights into the Degradation of Medium-Chain-Length Dicarboxylic Acids in *Cupriavidus necator* H16 Reveal β -Oxidation Differences between Dicarboxylic Acids and Fatty Acids. *Applied and Environmental Microbiology*. **88**(2), e01873-21.
- [180] BRAMER, C. O. a A. STEINBÜCHEL. 2001. The methylcitric acid pathway in *Ralstonia eutropha*: new genes identified and involved in propionate metabolism. *Microbiology*. 147, 2203–2214.
- [181] EWERING, C., C. O. BRAMER, N. BRULAND, A. BETHKE a A. STEINBÜCHEL. 2006. Occurrence and expression of tricarboxylate synthases in *Ralstonia eutropha*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71, 80–89.
- [182] YU, J. a Y. T. SI. 2006. Metabolic carbon fluxes and biosynthesis of polyhydroxyalkanoates in *Ralstonia eutropha* on short fatty acids. *Biotechnology Progress*. 20, 1015–1024.

- [183] KUNIOKA, M. a Y. DOI. 1990. Thermal degradation of microbial copolyesters: Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Macromolecules*. **23**(7), 1933–1936.
- [184] KOVALCIK, A., K. MEIXNER, M. MIHALIC, W. ZEILINGER, I. FRITZ, W. FUCHS a B. DROSG. 2017. Characterization of polyhydroxyalkanoates produced by *Synechocystis salina* from digestate supernatant. *International Journal of Biological Macromolecules*. 102, 497–504.
- [185] KUNIOKA, M., Y. KAWAGUCHI a Y. DOI. 1989. Production of biodegradable copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *A. eutrophus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 30, 569–573.
- [186] KANSIZ, M, H. BILLMAN-JACOBÉ a D. MCNAUGHTON. 2000. Quantitative Determination of the Biodegradable Polymer Poly(β -hydroxybutyrate) in a Recombinant *Escherichia coli* Strain by Use of Mid-Infrared Spectroscopy and Multivariate Statistics. *Applied Environmental Microbiology*. **66**(8), 3415–3420.
- [187] SEDLACEK, P., E. SLANINOVA, V. ENEV, M. KOLLER, J. NEBESAROVA, I. MAROVA, K. HRUBANOVA, V. KRZYZANEK, O. SAMEK a S. OBRUCA. 2019. What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **103**(4), 1905–1917.
- [188] KOLLER, M. 2019. Chemical and Biochemical Engineering Approaches in Manufacturing Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters of Tailored Structure with Focus on the Diversity of Building Blocks. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. **32**(4), 413–438.
- [189] NARANCIC, T., E. SCOLLICA, S. T. KENNY, H. GIBBONS et al. 2016. Understanding the physiological roles of polyhydroxybutyrate (PHB) in *Rhodospirillum rubrum* S1 under aerobic chemoheterotrophic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **100**(20), 8901–8912.
- [190] OBRUCA, S., P. SEDLACEK, I. PERNICOVA, A. KOVALCIK, I. NOVACKOVA, E. SLANINOVA a I. MAROVA I. Interconnection between PHA and stress robustness of bacteria, In: M. Koller (Ed.), *The Handbook of Polyhydroxyalkanoates*, Vol. 2: Kinetics, Bioengineering, and Industrial Aspects, CRC Press, Boca Raton, 2020, 107–132.
- [191] OBRUCA, S., P. SEDLACEK, M. KOLLER, D. KUCERA a I. PERNICOVA. 2018. Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: biotechnological consequences and applications. *Biotechnology Advances*. **36**(3), 856–870.
- [192] SEDLACEK, P., E. SLANINOVA, M. KOLLER, J. NEBESAROVA, I. MAROVA, V. KRZYZANEK a S. OBRUCA. 2019. PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances. *New Biotechnology*. **49**(3), 129–136.
- [193] PASSANTHA, P., G. KEDIA, R. M. DINSDALE, A. J. GUWY a S. R. ESTEVES. 2014. The use of NaCl addition for the improvement of polyhydroxyalkanoate production by *Cupriavidus necator*. *Bioresource Technology*. 163, 287–294.
- [194] RODRÍGUEZ-CONTRERAS, A., M. KOLLER, G. BRAUNEGG a M. S. MARQU'ES-CALVO. 2016. Poly [(R)-3- hydroxybutyrate] production under

- different salinity conditions by a novel *Bacillus megaterium* strain. *New Biotechnology*. **33**(1), 73–77.
- [195] SHRIVASTAV, A., S. K. MISHRA a S. MISHRA. 2010. Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis by *Spirulina subsalsa* from Gujarat coast of India. *International Journal of Biological Macromolecules*. **46**(2), 255–260.
- [196] PERNICOVA, I., I. NOVACKOVA, P. SEDLACEK, X. KOURILOVA, M. KOLLER a S. OBRUCA. 2020. Application of osmotic challenge for enrichment of microbial consortia in polyhydroxyalkanoates producing thermophilic and thermotolerant bacteria and their subsequent isolation. *International Journal of Biological Macromolecules*. **144**(2), 698–704.
- [197] WEAST, R. C. In: CRC Handbook of Chemistry and Physics, 64th Edition, CRC Press, Boca Raton, 1984.
- [198] GADD, G. M. a A. J. GRIFFITHS. 1978. Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microbial Ecology*. **4**(4), 303–317.
- [199] MARZAN, L. W., M. HOSSAIN, S. A. MINA, Y. AKTER a A. M. M. A. CHOWDHURY. 2017. Isolation and biochemical characterization of heavy-metal resistant bacteria from tannery effluent in Chittagong city, Bangladesh: bioremediation viewpoint. *Egyptian Journal of Aquatic Research*. **43**(1), 65–74.
- [200] NIES, D. H. 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **51**(6), 730–750.
- [201] RODRIGUEZ-MONTELONGO, L., L. C. DE LA CRUZ-RODRIGUEZ, R. N. FARIAS a E. M. MASSA. 1993. Membrane-associated redox cycling of copper mediates hydroperoxide toxicity in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1144**, 77–84.
- [202] SUWALSKY, M., B. UNGERER, L. QUEVEDO, F. AGUILAR a C. P. SOTOMAYOR. 1998. Cu²⁺ ions interact with cell membranes. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **70**, 233–238.
- [203] IWATA, S., C. OSTERMEIER, B. LUDWIG a H. MICHEL. 1995. Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature*. **376**, 660–669.
- [204] PASSANTHA, P., S. R. ESTEVES, G. KEDIA, R. M. DINSDALE a A. L. GUWY. 2013. Increasing polyhydroxyalkanoate (PHA) yields from *Cupriavidus necator* by using filtered digestate liquors. *Bioresource Technology*. **147**, 345–352.
- [205] KAMNEV, A. A., A. V. TUGAROVA, P. A. TARANTILIS, P. H. E. GARDINER a M. G. POLISSIOU. 2012. Comparing poly-3-hydroxybutyrate accumulation in *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245: the effects of copper(II). *Applied Soil Ecology*. **61**, 213–216.
- [206] PASSANTHA, P., G. KEDIA, R. M. DINSDALE, A. J. GUWY a S. R. ESTEVES. 2014. The use of NaCl addition for the improvement of polyhydroxyalkanoate production by *Cupriavidus necator*. *Bioresource Technology*. **163**, 287–294.
- [207] SINGH, R., R. J. MAILLOUX, S. PUISEUX-DAO a V. D. APPANNA. 2007., Oxidative stress evokes a metabolic adaptation that favors increased NADPH synthesis and decreased NADH production in *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Bacteriology*. **189**(18), 6665–6675.

- [208] LIU, J., J. WANG, S. LEE a R. WEN. 2018. Copper-caused oxidative stress triggers the activation of antioxidant enzymes via ZmMPK3 in maize leaves. *PLoS One*. **13**(9), e0203612.
- [209] KADOURI, D., E. JURKEVITCH, Y. OKON a S. CASTRO-SOWINSKI. 2018. Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Critical Reviews in Microbiology*. **31**(2), 55–67.
- [210] OBRUCA, S., P. SEDLACEK, F. MRAVEC, O. SAMEK a I. MAROVA. 2016. 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*. **100**(3), 1365–1376.
- [211] ROBERTS, M. F. 2005. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems*. **1**(5).
- [212] SAMEK, O., S. OBRUCA, M. SILER, P. SEDLACEK, P. BENESOVA, D. KUCERA, I. MAROVA, J. JEZEK, S. BERNATOVA a P. ZEMANEK. 2016. Quantitative raman spectroscopy analysis of polyhydroxyalkanoates produced by *Cupriavidus necator* H16. *Sensors*. **16**(11), 1–7.
- [213] OBRUCA, S., P. SEDLACEK, E. SLANINOVA, I. FRITZ, C. DAFFERT, K. MEIXNER, Z. SEDRLOVA a M. KOLLER. 2020. Novel unexpected functions of PHA granules. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 104, 4795–4810.
- [214] ROGIERS, T., M. L. MERROUN, A. WILLIAMSON, N. LEYS, R. V. HOUDT, N. BOON a K. MIJNENDONCKX. 2022. *Cupriavidus metallidurans* NA4 actively forms polyhydroxybutyrate-associated uranium-phosphate precipitates. *Journal of Hazardous Materials*. 421, e126737.
- [215] TREVORS, J. T. 1987. Copper resistance in bacteria. *Microbiology Science*. **4**(1), 29–31.
- [216] PERNICOVA, I., I. NOVACKOVA, P. SEDLACEK, X. KOURILOVA, M. KALINA et al. 2020. 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*. **12**(6), 1235.
- [217] NORHAFINI, H., L. THINAGARAN, K. SHANTINI et al. 2017. Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) with high 4HB composition and PHA content using 1,4-butanediol and 1,6-hexanediol for medical application. *Journal of Polymer Research*. **24**(189).
- [218] KUCERA, D., I. NOVACKOVA, I. PERNICOVA, P. SEDLACEK a S. OBRUCA. 2019. Biotechnological Production of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-4-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) Terpolymer by *Cupriavidus* sp. DSM 19379. *Bioengineering*. **6**(3), 74.
- [219] VIGNESWARI, S., S. VIJAYA, M. I. A. MAJID, K. SUDESH, C. S. SIPAUT, M. N. M. AZIZAN a A. A. AMIRUL. 2009. Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer with manipulated variables and its properties. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **36**(4), 547–556.
- [220] STEINBÜCHEL, A., H. E. VALENTIN a A. SCHONEBAUM. 1994. Application of recombinant gene technology for production of polyhydroxyalkanoic acids:

- Biosynthesis of poly(4-hydroxybutyric acid) homopolyester. *Journal of Environmental Polymer Degradation*. 2, 67–76.
- [221] VALENTIN, H. E., G. ZWINGMANN, A. SCHONEBAUM a A. STEINBUHEL. 1995. Metabolic Pathway for Biosynthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-4-Hydroxybutyrate) from 4-Hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*. *European Journal of Biochemistry*. **227**(1–2), 43–60.
- [222] PERNICOVA, I., D. KUCERA, J. NEBESAROVA, M. KALINA, I. NOVACKOVA, M. KOLLER a S. OBRUCA. 2019. Production of polyhydroxyalkanoates on waste frying oil employing selected *Halomonas* strains. *Bioresource Technology*. 292, e122028.
- [223] COLOMBO, B., F. FAVINI, B. SCAGLIA et al. 2017. Enhanced polyhydroxyalkanoate (PHA) production from the organic fraction of municipal solid waste by using mixed microbial culture. *Biotechnology for Biofuels*. 2017, **10**(1).
- [224] GAHLAWAT, G. 2018. Enhancing the Production of Polyhydroxyalkanoate Biopolymer by *Azohydromonas australica* Using a Simple Empty and Fill Bioreactor Cultivation Strategy. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. **31**(4), 479–485.
- [225] FAEZAH, A. N., A. RAHAYU, S. VIGNESWARI et al. 2011. Regulating the molar fraction of 4-hydroxybutyrate in Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by biological fermentation and enzymatic degradation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 27, 2455–2459.
- [226] KANJANACHUMPOL, P., S. KULPREECHA, V. TOLIENG a N. THONGCHUL. 2013. Enhancing polyhydroxybutyrate production from high cell density fed-batch fermentation of *Bacillus megaterium* BA-019. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. **36**(10), 1463–1474.
- [227] DOI, Y., A. SEGAWA a M. KUNIOKA. 1990b. Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in *Alcaligenes eutrophus*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 12, 101–106.
- [228] LU, J., Z. LI, Q. YE a H. WU. 2019. Effect of reducing the activity of respiratory chain on biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-lactate) in *Escherichia coli*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. **35**(1), 59–69.
- [229] NAKAMURA, S. a Y. DOI. 1992. Microbial Synthesis and Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Macromolecules*. **25**(17), 4237–4241.
- [230] CENTNEROVÁ, R. Studium exprese genů u bakterie *Cupriavidus necator* a dalších vybraných producentů polyhydroxyalkanoátů. Brno, 2022. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Iva Pernicová.
- [231] TEE, K. L., J. GRINHAM, A. M. OTHUSITSE, M. GONZÁLEZ-VILLANUEVA, A. O. JOHNSON a T. S. WONG. 2017. An Efficient Transformation Method for the Bioplastic-Producing “Knallgas” Bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Biotechnology Journal*. **12**(11).
- [232] HIRAMITSU, M., N. KOYAMA a Y. DOI. 1993. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Alcaligenes latus*. *Biotechnology Letters*. 15, 461–464.

- [233] DOI, Y., A. SEGAWA a M. KUNIOKA. 1990. Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in *Alcaligenes eutrophus*. *International Journal of Biological Macromolecules*. **12**(2), 106–111.
- [234] NIELSEN, T. D., J. HASSELBALCH, K. HOLMBERG a J. STRIPPLE. 2020. Politics and the plastic crisis: a review throughout the plastic life cycle. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Energy and Environment*. **9**, e360.
- [235] European Bioplastics, Bioplastic Market Data 2019 available at: https://docs.european-bioplastics.org/publications/market_data/Report_Bioplastics_Market_Data_2019.pdf
- [236] YOUSUF, A., D. PIROZZI a F. SANNINO. Chapter 1 - Fundamentals of lignocellulosic biomass, In: *Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels*. Editor(s): A. YOUSUF, D. PIROZZI a F. SANNINO, Academic Press, 2020, 1–15, ISBN 9780128159361.
- [237] RAPOSO, R. S., M. C. DE ALMEIDA, M. D. C. DE OLIVEIRA, M. M. DA FONSECA a M. T. CESARIO. 2017. A *Burkholderia sacchari* cell factory: production of poly-3-hydroxybutyrate, xylitol and xylonic acid from xylose-rich sugar mixtures. *New Biotechnology*. **34**, 12–22.
- [238] CHEN, G. Q. a X. R. JIANG. 2018. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. **50**, 94–100.
- [239] XIAO, Z., Y. ZHANG, L. XI, F. HUO, J. Y. ZHAO, J. LI. 2015. Thermophilic production of polyhydroxyalkanoates by a novel *Aneurinibacillus* strain isolated from Gudao oilfield, China. *Journal of Basic Microbiology*. **55**(9), 1125–1133.
- [240] KUCERA, D., I. PERNICOVÁ, A. KOVALCIK, M. KOLLER, L. MULLEROVA, P. SEDLACEK et al. 2018. Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*. *Bioresource Technology*. **256**, 552–556.
- [241] KOURILOVA, X., I. PERNICOVA, K. SEDLAR, J. MUSILOVA, P. SEDLACEK, M. KALINA, M. KOLLER a S. OBRUCA. 2020. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a thermophilic strain of *Schlegelella thermodepolymerans* from xylose rich substrates. *Bioresource Technology*. **315**, e123885.
- [242] BOWERS, T., A. VAIDYA, D. A. SMITH a G. LLOYD-JONES. 2014. Softwood hydrolysate as a carbon source for polyhydroxyalkanoate production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **89**, 1030–1037.
- [243] JEFFRIES, T. W. a H. K. SREENATH. 1988. Fermentation of hemicellulosic sugars and sugar mixtures by *Candida shehatae*. *Biotechnology and Bioengineering*. **31**, 502–506.
- [244] ROBERTO, I. C., M. G. A. FELIPE, I. M. DE MANCILHA, M. VITOLO, S. SATO a S. S. DA SILVA. 1995. Xylitol production by *Candida guilliermondii* as an approach for the utilization of agroindustrial residues. *Bioresource Technology*. **51**, 255–257.
- [245] SAHA, B., L. ITENA, M. COTTAA a Y. WU. 2005. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry*. **40**, 3693–3700.

- [246] CHOTEBORSKA, P., B. PALMAROLA-ADRADOS, M. GALBE, B. ZACCHI, K. MELZUCH a M. RYCHTERA. 2004. Processing of wheat bran to sugar solution. *Journal of Food Engineering*. 61, 561–565.
- [247] CESARIO, M. T., R. S. RAPOSO, M. C. M. D. DE ALMEIDA, F. VAN KEULEN, B. S. FERREIRA a M. M. R. DA FONSECA. 2014. Enhanced bioproduction of poly-3-hydroxybutyrate from wheat straw lignocellulosic hydrolysates. *New Biotechnology*. 31, 104–113.
- [248] CHAO-BING, L., L. I. HAI-CHAO, L. DE-QIANG, N. HAQ, Y. TING-TING a X. FENG. 2022. Efficiently unsterile polyhydroxyalkanoate production from lignocellulose by using alkali-halophilic *Halomonas alkalicola* M2, *Bioresource Technology*. 351, e126919.
- [249] YUE, H., C. LING, T. YANG, X. CHEN, Y. CHEN, H. DENG, Q. WU, J. CHEN a G.-Q. CHEN. 2014. A seawater-based open and continuous process for polyhydroxyalkanoates production by recombinant *Halomonas campaniensis* LS21 grown in mixed substrates. *Biotechnology for Biofuels*. 7, e108.
- [250] KUMAR, P. a B. S. KIM. 2018. Valorization of polyhydroxyalkanoates production process by co-synthesis of value-added products. *Bioresource Technology*. 269, 544–556.
- [251] IBRAHIM, M. H. a A. STEINBÜCHEL. 2010. High-cell-density cyclic fed-batch fermentation of poly(3-hydroxybutyrate)-accumulating thermophile, *Chelatococcus* sp. strain MW10. *Applied Environmental Microbiology*. 76, 7890–7895.
- [252] ESTEVES, A. M., S. K. CHANDRAYAN, P. M. MCTERNAN, N. BORGES, M. W. W. ADAMS a H. SANTOS. 2014. Mannosylglycerate and di-myo-inositol phosphate have interchangeable roles during adaptation of *Pyrococcus furiosus* to heat stress. *Applied Environmental Microbiology*. 80, 4226–4233.
- [253] BHATIA, S. K., S. S. JAGTAP, A. A. BEDEKAR, R. K. BHATIA, A. K. PATEL, D. PANT et al. 2020. Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: effect of key parameters, technological improvements, and challenges. *Bioresource Technology*. 300, e122724.
- [254] HORVATH, I. S., C. J. FRANZEN, M. J. TAHERZADEH, C. NIKLASSON a G. LIDEN. 2003. Effects of furfural on the respiratory metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in glucose-limited chemostats. *Applied Environmental Microbiology*. 69, 4076–4086.
- [255] RAND, J. M., T. PISITHKUL, R. L. CLARK, J. M. THIEDE et al. 2017. A metabolic pathway for catabolizing levulinic acid in bacteria. *Nature Microbiology*. 2, 1624–1634.
- [256] SONG, H.-S., J.-M. JEON, H.-J. KIM, S. K. BHATIA, G. SATHIYANARAYANAN et al. 2017. Increase in furfural tolerance by combinatorial overexpression of NAD salvage pathway enzymes in engineered isobutanol-producing *E. coli*. *Bioresource Technology*. 245, 1430–1435.
- [257] QUILLAGUAMÁN, J., S. HASHIM, F. BENTO, B. MATTIASSON a R. HATTIKAUL. 2005. Poly(3-hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1 using starch hydrolysate as substrate. *Journal of Applied Microbiology*. 99, 151–157.

- [258] REN, Y., C. LING, I. HAJNAL, Q. WU a G.-Q. CHEN. 2018. Construction of *Halomonas bluephagenesis* capable of high cell density growth for efficient PHA production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 102, 4499–4510.
- [259] ALSAFADI, D. a O. AL-MASHAQBEH. 2017. A one-stage cultivation process for the production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) from olive mill wastewater by *Haloferax mediterranei*. *New Biotechnology*. 34, 47–53.
- [260] SHIVANAND, P. a G. MUGERAYA. 2011. Halophilic Bacteria and Their Compatible Solutes—Osmoregulation and Potential Applications. *Current Science*. 100, 1516–1521.
- [261] OBRUCA, S.; P. DVORAK, P. SEDLACEK, M. KOLLER, K. SEDLAR, I. PERNICOVA a D. SAFRANEK. 2022. Polyhydroxyalkanoates synthesis by halophiles and thermophiles: Towards sustainable production of microbial bioplastics. *Biotechnology Advances*. 59, e107906.
- [262] HSIAO, L.-J., M.-C. LEE, P.-J. CHUANG, Y.-Y. KUO, J.-H. LIN, T.-M. WU a S.-Y. LI. 2018. The production of poly(3-hydroxybutyrate) by thermophilic *Caldimonas manganoxidans* from glycerol. *Journal of Polymer Research*. 25, 85.
- [263] KOURILOVA, X., I. PERNICOVA, M. VIDLAKOVA, R. KREJCIRIK, K. MRAZOVA, K. HRUBANOVA, V. KRZYZANEK, J. NEBESAROVA a S. OBRUCA. 2021. Biotechnological conversion of grape pomace to poly(3-hydroxybutyrate) by moderately thermophilic bacterium *Tepidimonas taiwanensis*. *Bioengineering*. 8(141).
- [264] WANG, Q., H. YU, Y. XIA et al. 2009. Complete PHB mobilization in *Escherichia coli* enhances the stress tolerance: a potential biotechnological application. *Microbial Cell Factories*. 8(47).
- [265] URBIETA, M. S., E. R. DONATI, K.-G. CHAN, S. SHAHAR, L. L. SIN a M. M. GOH. 2015. Thermophiles in the genomic era: Biodiversity, science, and applications. *Biotechnology Advances*. 33, 633–647.
- [266] RAMSAY, J. A., E. BERGER, R. VOYER, C. CHAVARIE a B. A. RAMSAY. 1994. Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents. *Biotechnology Techniques*. 8, 589–594.
- [267] KOLLER, M., R. BONA, E. CHIELLINI a G. BRAUNEGG. 2013. Extraction of short-chain-length poly-[(R)-hydroxyalkanoates] (scl-PHA) by the “anti-solvent” acetone under elevated temperature and pressure. *Biotechnology Letters*. 35, 1023–1028.
- [268] KHOSRAVI-DARANI, K., E. VASHEGHANI-FARAHANI, S. A. SHOJAOSADATI a Y. YAMINI. 2004. Effect of process variables on supercritical fluid disruption of *Ralstonia eutropha* cells for poly(R-hydroxybutyrate) recovery. *Biotechnology Progress*. 20, 1757–1765.
- [269] HEJAZI, P., E. VASHEGHANI-FARAHANI a Y. YAMINI. 2003. Supercritical fluid disruption of *Ralstonia eutropha* for poly(3-hydroxybutyrate) recovery. *Biotechnology Progress*. 19, 1519–1523.
- [270] HOLMES, P. A. a G. B. LIM. Separation Process. U.S. Patent 4910145, 20 March 1990.
- [271] CHOI, J. I. A S. Y. LEE. 2000. Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals. *Biotechnology and Bioengineering*. 62, 546–553.

- [272] BERGER, E., B. A. RAMSAY, J. A. RAMSAY, C. CHAVARIE a G. BRAUNEGG. 1989. PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass. *Biotechnology Techniques*. 3, 227–232.
- [273] MARUDKLA, J., A. PATJAWIT, C. CHUENSANGJUN a S. SIRISANSANEEYAKUL. 2018. Optimization of poly(3-hydroxybutyrate) extraction from *Cupriavidus necator* DSM 545 using sodium dodecyl sulfate and sodium hypochlorite. *Agriculture and Natural Resources*. 52, 266–273.
- [274] MANNINA, G., D. PRESTI, G. MONTIEL-JARILLO a M. E. SUÁREZ-OJEDA. 2019. Bioplastic recovery from wastewater: A new protocol for polyhydroxyalkanoates (PHA) extraction from mixed microbial cultures. *Bioresource Technology*. 282, 361–369.
- [275] KATHIRASER, Y., M. K. AROUA, K. B. RAMACHANDRAN a I. K. P. TAN. 2007. Chemical characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) recovered by enzymatic treatment and ultrafiltration. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 82, 847–855.
- [276] RODRIGUEZ-VALERA, F. 1992. Halobacteria as producers of polyhydroxyalkanoates. *FEMS Microbiology Letters*. 103, 181–186.
- [277] BHATTACHARYYA, A., A. PRAMANIK, S. K. MAJI, S. HALDAR, U. K. MUKHOPADHYAY a J. MUKHERJEE. 2012. Utilization of vinasse for production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. *AMB Express*. 2(34).
- [278] ARIKAWA, H., S. SATO, T. FUJIKI a K. MATSUMOTO. 2017. Simple and rapid method for isolation and quantitation of polyhydroxyalkanoate by SDS-sonication treatment. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 124, 250–254.
- [279] MIDDELBERG, A. P. J. 1995. Process-scale disruption of microorganisms. *Biotechnology Advances*. 13, 491–551.
- [280] KATSUI, N., T. TSUCHIDO, M. TAKANO a I. SHIBASAKI. 1981. Effect of preincubation temperature on the heat resistance of *Escherichia coli* having different fatty acid compositions. *Journal of Genetic Microbiology*. 122, 357–361.
- [281] REES, P., R. H. CUMMING a J. S. WATSON. Rheology of heated bacterial DNA. In: Proceedings of the 1994 ICheme Research Event, London, UK, 1994; Volume 1, 183–185.
- [282] KOLLER, M., L. MARSALEK, M. MIRANDA DE SOUSA DIAS a G. BRAUNEGG. 2017. Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. *New Biotechnology*. 37, 24–38.
- [283] SHEN, R., Z. Y. NING, Y. X. LAN, J. C. CHEM a C. G. CHEN. 2019. Manipulation of polyhydroxyalkanoate granular sizes in *Halomonas bluephagenesis*. *Metabolic Engineering*. 54, 117–126.

8 ŽIVOTOPIS

Osobní údaje:

Jméno a příjmení: Ivana Nováčková
Adresa bydliště: Horákov 169, Mokrá 664 04
Telefon: +420 602 835 511
Datum narození: 6. 2. 1993
E-mail: xcnovackova@fch.vut.cz
Dosažený titul: Ing.

Vzdělání:

2018 – současnost Doktorské studium – obor Potravinářská chemie
Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně
2016–2018 Magisterské studium – obor Chemie pro medicínské aplikace
Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně
2013–2016 Bakalářské studium – obor Chemie pro medicínské aplikace
Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně
2009–2013 Gymnázium Brno Křenová

Pracovní zkušenosti:

2021 – 2022 Kvalitní Interní Granty VUT, vedoucí týmu
2018 – 2021 projekt Brno Ph.D. Talent 2018
2016 – současnost Centrum materiálového výzkumu, Fakulta chemická, VUT v Brně
pozice vědecký pracovník
srpen–září 2016 Enantis, s.r.o., pozice laboratorní asistent
srpen–září 2015 Enantis, s.r.o., pozice laboratorní asistent

Člen řešitelského týmu na následujících projektech:

Řízená evoluce bakterií produkujících polyhydroxyalkanoáty (2019–2021, standardní projekt GAČR, GA 19-20697S)

Ekologická role polyhydroxybutyrátu u cyanobakterií (2019–2021, mezinárodní projekt GAČR, GA 19-29651L)

9 PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORKY

Publikace v recenzovaných časopisech s impakt faktorem:

NOVÁČKOVÁ, I.; KUČERA, D.; POŘÍZKA, J.; PERNICOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; KOLLER, M.; KOVALČÍK, A.; OBRUČA, S. Adaptation of *Cupriavidus necator* to levulinic acid for enhanced production of P(3HB-co-3HV) copolyesters. *BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL*, 2019, roč. 151, č. 11, s. 1-10. ISSN: 1369-703X.

KUČERA, D.; NOVÁČKOVÁ, I.; PERNICOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. Biotechnological Production of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-4-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) Terpolymer by *Cupriavidus sp.* DSM 19379. *Bioengineering*, 2019, roč. 6, č. 3, s. 74-84. ISSN: 2306-5354.

PERNICOVÁ, I.; KUČERA, D.; NEBESÁŘOVÁ, J.; KALINA, M.; NOVÁČKOVÁ, I.; KOLLER, M.; OBRUČA, S. Production of polyhydroxyalkanoates on waste frying oil employing selected *Halomonas* strains. *BIORESOURCE TECHNOLOGY*, 2019, roč. 292, č. 11, s. 1-4. ISSN: 0960-8524.

PERNICOVÁ, I.; NOVÁČKOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; KOUŘILOVÁ, X.; KOLLER, M.; OBRUČA, S. Application of osmotic challenge for enrichment of microbial consortia in polyhydroxyalkanoates producing thermophilic and thermotolerant bacteria and their subsequent isolation. *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*, 2020, roč. 144, č. 2, s. 698-704. ISSN: 0141-8130.

PERNICOVÁ, I.; NOVÁČKOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; KOUŘILOVÁ, X.; KALINA, M.; KOVALČÍK, A.; KOLLER, M.; NEBESAROVA, J.; KRZYZANEK, V.; HRUBANOVA, K.; MÁSILKO, J.; SLANINOVÁ, E.; OBRUČA, S. 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, roč. 12, č. 6, s. 1-13. ISSN: 2073-4360.

SEDLÁČEK, P.; PERNICOVÁ, I.; NOVÁČKOVÁ, I.; KOUŘILOVÁ, X.; KALINA, M.; KOVALČÍK, A.; KOLLER, M.; NEBESAROVA, J.; KRZYZANEK, V.; HRUBANOVA, K.; MÁSILKO, J.; SLANINOVÁ, E.; TRUDIČOVÁ, M.; OBRUČA, S. Introducing the Newly Isolated Bacterium *Aneurinibacillus sp.* H1 as an Auspicious Thermophilic Producer of Various Polyhydroxyalkanoates (PHA) Copolymers-2. Material Study on the Produced Copolymers. *Polymers*, 2020, roč. 12, č. 6, s. 1-18. ISSN: 2073-4360.

KOUŘILOVÁ, X.; NOVÁČKOVÁ, I.; KOLLER, M.; OBRUČA, S. Evaluation of mesophilic *Burkholderia sacchari*, thermophilic *Schlegelella thermodepolymerans* and halophilic *Halomonas halophila* for polyhydroxyalkanoates production on model media mimicking lignocellulose hydrolysates. *BIORESOURCE TECHNOLOGY*, 2021, roč. 325, č. 4, s. 1-5. ISSN: 0960-8524.

POSPÍŠILOVÁ, A.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; PŘIKRYL, R. Isolation of poly(3-hydroxybutyrate) from bacterial biomass using soap made of waste cooking oil. *BIORESOURCES TECHNOLOGY*, 2021, roč. 326, č. 1, s. 1-5. ISSN: 0960-8524.

NOVÁČKOVÁ, I.; HRABALOVÁ, V.; SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; SAMEK, O.; KOLLER, M.; KRZYZANEK, V.; HRUBANOVÁ, K.; NEBESÁŘOVÁ, J.; OBRUČA, S. The role of polyhydroxyalkanoates in adaptation of *Cupriavidus necator* to osmotic pressure and high concentration of copper ions. *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*, 2022, roč. 206, č. 5, s. 977-189. ISSN: 0141-8130.

NOVÁČKOVÁ, I.; KOUŘILOVÁ, X.; MRÁZOVÁ, K.; SEDLÁČEK, P.; KALINA, M.; KRZYZANEK, V.; KOLLER, M.; OBRUČA, S. Combination of Hypotonic Lysis and Application of Detergent for Isolation of Polyhydroxyalkanoates from Extremophiles. *Polymers*, 2022, roč. 14, č. 9, s. 1-16. ISSN: 2073-4360.

Kapitola v knize:

OBRUČA, S.; SEDLÁČEK, P.; PERNICOVÁ, I.; KOVALČÍK, A.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; SLANINOVÁ, E.; MÁROVÁ, I. Interconnection between PHA and Stress Robustness of Bacteria. In *The Handbook of Polyhydroxyalkanoates*. 1. Boca Raton: CRC Press, 2020. s. 107-132. ISBN: 9780367275594.

Patenty:

OBRUČA, S.; PERNICOVÁ, I.; KUČERA, D.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; SEDLÁČEK, P.; Vysoké učení technické v Brně, Brno, CZ: *Způsob výroby polyhydroxyalkanoátů pomocí izolátu termofilního bakteriálního kmene Aneurinibacillus sp. H1*. 308626, patent. (2021)

Podaná patentová přihláška:

NOVÁČKOVÁ, I.; KOUŘILOVÁ, X.; OBRUČA, S.; *Způsob izolace PHA biopolymerů z halofilních a termofilních bakterií*. Patentová přihláška, číslo deníku 2022/747.

Konferenční příspěvky – přednášky:

NOVÁČKOVÁ, I.; KUČERA, D.; POŘÍZKA, J.; SEDLÁČEK, P.; PERNICOVÁ, I.; OBRUČA, S. *Evolutionary engineering approach for enhancement of growth characteristics and producing capacity of selected PHA producing microorganisms*. Studentská odborná konference Chemie je život 2019 - Sborník abstraktů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019. s. 58-58. ISBN: 978-80-214-5807-9.

Konferenční příspěvky – postery:

NOVÁČKOVÁ, I.; KUČERA, D.; POŘÍZKA, J.; PERNICOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. *Adaptation of Cupriavidus necator H16 to levulinic acid for enhancement of 3-hydroxyvalerate content in copolymer P(3HB-co-3HV)*. XIX. setkání biochemiků a molekulárních biologů Wimmerová, Michaela, Holková, Jitka, eds. Brno: 2018. s. 76-76. ISBN: 978-80-210-9069-9.

NOVÁČKOVÁ, I.; KUČERA, D.; POŘÍZKA, J.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S.; PERNICOVÁ, I. *Adaptation of selected PHA producing bacteria to biotechnologically relevant stressors*. XXVIII: konference mladých mikrobiologů Tomáškovy dny 2019. Brno: Masarykova univerzita, 2019. s. 52-52. ISBN: 978-80-210-9296-9.

NOVÁČKOVÁ, I.; KUČERA, D.; OBRUČA, S.; SEDLÁČEK, P.; POŘÍZKA, J.; PERNICOVÁ, I. *Adaptation of PHA producing bacteria Cupriavidus necator H16 and Halomonas halophila to biotechnologically relevant stressors*. 10th European Symposium on Biopolymers - Program. 2019. s. 70-70.

NOVÁČKOVÁ, I.; KUČERA, D.; POŘÍZKA, J.; PERNICOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. *Application of evolutionary engineering for enhancement of robustness and producing capacity of selected microbial PHA producers*. The Biomania student scientific meeting and Eusynbios symposium 2019 - Book of Abstracts. 1. 2019. s. 120-120. ISBN: 978-80-210-9373-7.

NOVÁČKOVÁ, I.; CHATRNÁ, V.; SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; SAMEK, O.; OBRUČA, S. *Approaches of evolutionary engineering for adaptation of Cupriavidus necator H16 to biotechnologically relevant stressors*. XXIX. konference mladých mikrobiologů TOMÁŠKOVY DNY 2020. 1. Brno: Masarykova univerzita, 2020. s. 45-45. ISBN: 978-80-210-9611-0.

NOVÁČKOVÁ, I.; CHATRNÁ, V.; SLANINOVÁ, E.; POŘÍZKA, J.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. *Evolutionary engineering approach for adaptation of PHA producing strain Halomonas halophila to levulinic and acetic acid*. Biotechnology and Biotechnological Equipment. 2021. s. 25-25. ISSN: 1314-3530.

NOVÁČKOVÁ, I.; KOUŘILOVÁ, X.; MRÁZOVÁ, K.; OBRUČA, S. *Environmentally-friendly Isolation of Polyhydroxyalkanoates from Extremophilic Bacteria*. The EuroBiotech Journal. 2021. s. 99-99. ISSN: 2564-615X.

NOVÁČKOVÁ, I.; HRABALOVÁ, V.; SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; POŘÍZKA, J.; KALINA, M.; SAMEK, O.; OBRUČA, S. *Evolutionary Engineering of Selected Polyhydroxyalkanoate Producing Strains to Biotechnologically Relevant Stressors*. World Academy of Science, Engineering and Technology. 2021. s. 76-76. ISSN: 1307-6892.

NOVÁČKOVÁ, I.; HRABALOVÁ, V.; SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. *The role of polyhydroxyalkanoates in adaptation process of Cupriavidus necator under*

stress conditions. The Biomania Student Scientific Meeting 2022 - Book of Abstracts. 1. Brno: MUNI PRESS, 2022. s. 133-133. ISBN: 9788028000400.

NOVÁČKOVÁ, I.; HRABALOVÁ, V.; SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. *Involvement of polyhydroxyalkanoates in the adaptation process of bacterial strain Cupriavidus necator*. ICCT 2022 - Book of abstracts. 2022. s. 1 (1 s.). ISBN 978-80-88307-11-2.

NOVÁČKOVÁ, I.; HRABALOVÁ, V.; SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. *The role of polyhydroxyalkanoates in adaptation process of Cupriavidus necator under stress conditions*. The Biomania Student Scientific Meeting 2022 - Book of Abstracts. 1. Brno: MUNI PRESS, 2022. s. 133-133. ISBN: 9788028000400.

NOVÁČKOVÁ, I.; KOUŘILOVÁ, X.; MRÁZOVÁ, K.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. *Ekologická izolace polyhydroxyalkanoátů z extrémofilních bakterií*. 29. kongres Československé společnosti mikrobiologické s mezinárodní účastí. Brno: Československá společnost mikrobiologická z.s., 2022. s. 17-17. ISBN: 978-80-88379-18-8.

Další konferenční příspěvky – směs obou forem prezentace:

KUČERA, D.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; PERNICOVÁ, I.; OBRUČA, S. *Adaptation of PHA Producing Bacteria to Levulinic Acid*. 6th International Conference on Chemical Technology. 2018. ISBN: 978-80-86238-83-8.

KUČERA, D.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; PERNICOVÁ, I.; OBRUČA, S. *Adaptation of PHA producing bacteria to levulinic acid*. In *Proceedings of the 6th International Conference on Chemical Technology. International Conference on Chemical Technology*. 1st edition. Prague: Czech Society of Industrial Chemistry, 2018. s. 74-77. ISBN: 978-80-86238-77-7. ISSN: 2336-8128.

KUČERA, D.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; PERNICOVÁ, I.; OBRUČA, S. *Evolutionary engineering of Cupriavidus necator for improved utilization levulinic acid*. Abstracts of the 18th European Congress on Biotechnology. New Biotechnology. 2018. s. 93-93. ISSN: 1871-6784.

PERNICOVÁ, I.; KOUŘILOVÁ, X.; KUČERA, D.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; OBRUČA, S. *Screening of biotechnological potential in extremophilic bacteria*. XIX. setkání biochemiků a molekulárních biologů Wimmerová, Michaela, Holková, Jitka, eds. Brno: 2018. s. 78-78. ISBN: 978-80-210-9069-9.

VANĚK, M.; TOMALA, L.; SZOTKOWSKI, M.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; OBRUČA, S. *On Mixing and Separation During Polyhydroxyalkanoates Extraction – Yield and Purity Optimization*. 7th Meeting on Chemistry and Life 2018. Book of abstracts. 2018. ISBN: 978-80-214-5488-0.

PERNICOVÁ, I.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; KOUŘILOVÁ, X.; KUČERA, D.; OBRUČA, S. *Isolation extremophilic bacteria producing polyhydroxyalkanoate from natural sample*. The

biomania student scientific meeting and eusynbios symposium 2019 Book of abstracts. Brno, Czech Republic: Masaryk University Press, 2019. s. 114-114. ISBN: 978-80-210-9373-7.

PERNICOVÁ, I.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; KOUŘILOVÁ, X.; OBRUČA, S. *Isolace extremofilních bakterií produkující polyhydroxyalkanoáty z přírodních vzorků. XXVIII. konference mladých mikrobiologů Tomáškovy dny 2019.* Brno: Masarykova universita, 2019. s. 24-24. ISBN: 978-80-210-9296-9.

PERNICOVÁ, I.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; KOUŘILOVÁ, X.; HERNÁNDEZ, N.; PRIETO, M.A.; OBRUČA, S. *Thermophilic bacteria isolated from compost as producers of polyhydroxyalkanoates.* 10th European Symposium on Biopolymers. Straubing, Germany: C.A.R.M.E.N.e.V., 2019. s. 72-72.

KOUŘILOVÁ, X.; PERNICOVÁ, I.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; OBRUČA, S. *Thermophilic Bacteria of the Genus Caldimonas as Polyhydroxyalkanoate Producers.* The Biomania Student Scientific Meeting & Eusynbios Symposium 2019 Book of Abstracts. Brno: Masaryk University Press, 2019. s. 112-112. ISBN: 978-80-210-9379-7.

PERNICOVÁ, I.; KUČERA, D.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; VODIČKA, J.; KOVALČÍK, A.; OBRUČA, S. *Extremophiles – Platform strains for sustainable production of polyhydroxyalkanoates.* In *Materials Science Forum.* Trans Tech Publications Ltd, 2019. s. 74-79. ISBN: 9783035714449.

POSPÍŠILOVÁ, A.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; PŘIKRYL, R. *Novel method for isolation of PHB from bacterial biomass.* Studentská odborná konference CHEMIE JE ŽIVOT 2020, Sborník abstraktů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, 2020. s. 120-121. ISBN: 978-80-214-5920-0.

PERNICOVÁ, I.; KOUŘILOVÁ, X.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. *Isolace termofilních bakterií schopných produkce polyhydroxyalkanoátů. XXIX. konference mladých mikrobiologů Tomáškovy dny 2020. 1.* Brno: Masarykova universita, 2020. s. 46-46. ISBN: 978-80-210-9611-0.

KOUŘILOVÁ, X.; PERNICOVÁ, I.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; OBRUČA, S. *Bakterie rodu Caldimonas jako termofilní producenti polyhydroxyalkanoátů. XXIX. konference mladých mikrobiologů Tomáškovy dny 2020. 1.* Brno: Masarykova univerzita, 2020. s. 44-44. ISBN: 978-80-210-9611-0.

CHATRNÁ, V.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; OBRUČA, S. *Characterization of Bacterial Strains Obtained in Evolutionary Engineering.* Studentská odborná konference CHEMIE JE ŽIVOT 2020 Sborník abstraktů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2020. s. 75-76. ISBN: 978-80-214-5920-0.

CHATRNÁ, V.; KOUŘILOVÁ, X.; PERNICOVÁ, I.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; POŘÍZKA, J.; OBRUČA, S. *Využití lignocelulózových materiálů k produkci polyhydroxyalkanoátů. XXX.*

konference mladých mikrobiologů Tomáškovy dny 2021. 1. Brno: Masarykova univerzita, 2021. s. 41-41. ISBN: 978-80-210-9882-4.

MRÁZOVÁ, K.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; KOUŘILOVÁ, X.; OBRUČA, S.; KRZYŽÁNEK, V. *The first insight on changes in PHA granules after extraction from extremophilic microorganisms.* Microscopy 2021: Conference. 1. 2021. s. 81-81.

KOUŘILOVÁ, X.; VIDLÁKOVÁ, M.; PERNICOVÁ, I.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; OBRUČA, S. *Polyhydroxyalkanoate's production by thermophilic genus *Caldimonas* and *Tepidimonas*.* Biotechnology and Biotechnological Equipment. 2021. ISSN: 1314-3530.

PERNICOVÁ, I.; KOUŘILOVÁ, X.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. *Production of P(3HB-co-4HB) copolymer by new thermophilic isolate *Aneurinibacillus* sp. H1 in batch, repeated-batch and fed-batch cultivation modes of cultivation.* Biotechnology and Biotechnological Equipment. 2021. s. 1 (1 s.). ISSN: 1314-3530.

HRABALOVÁ, V.; KOUŘILOVÁ, X.; PERNICOVÁ, I.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; POŘÍZKA, J.; OBRUČA, S. *Production of Polyhydroxyalkanoates Using Hydrolyzates of Lignocellulosic Materials.* The Biomania Student Scientific Meeting 2022. 1. Brno: Masarykova univerzita, 2022. s. 114-114. ISBN: 978-80-280-0040-0.

SLANINOVÁ, E.; RUBANOVÁ, B.; ČERNAYOVÁ, D.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; HAVLÍKOVÁ, M.; MRÁZOVÁ, K.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. *Study of aeration and light/dark conditions on production of polyhydroxyalkanoates in bacteria *Rhodospirillum rubrum*.* ICCT 2022 - Book of abstracts. 2022. s. 1 (1 s.). ISBN 978-80-88307-11-2.

HRABALOVÁ, V.; KOUŘILOVÁ, X.; PERNICOVÁ, I.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; POŘÍZKA, J.; OBRUČA, S. *Valorizace odpadních produktů na bázi lignocelulózy.* ICCT 2022 - Book of abstracts. 2022. s. 1 (1 s.). ISBN 978-80-88307-11-2.

SLANINOVÁ, E.; RUBANOVÁ, B.; ČERNAYOVÁ, D.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; HAVLÍKOVÁ, M.; MRÁZOVÁ, K.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. *Study of aeration and light/dark conditions on production of polyhydroxyalkanoates in bacteria *Rhodospirillum rubrum*.* ICCT 2022 - Book of abstracts. 2022. s. 1 (1 s.). ISBN 978-80-88307-11-2.

HRABALOVÁ, V.; KOUŘILOVÁ, X.; PERNICOVÁ, I.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; POŘÍZKA, J.; OBRUČA, S. *Production of Polyhydroxyalkanoates Using Hydrolyzates of Lignocellulosic Materials.* The Biomania Student Scientific Meeting 2022. 1. Brno: Masarykova univerzita, 2022. s. 114-114. ISBN: 978-80-280-0040-0.

PERNICOVÁ, I.; KOUŘILOVÁ, X.; ŘEHÁKOVÁ, V.; **NOVÁČKOVÁ, I.**; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. *A new generation of biotechnological PHA production using thermophilic bacteria.* 13th International congress on extremophiles – Abstract Book. 2022. s. 173-173.

10 SEZNAM PŘÍLOH A PODÍL AUTORKY NA PUBLIKACÍCH

Příloha I

NOVÁČKOVÁ, I.; KUČERA, D.; POŘÍZKA, J.; PERNICOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; KOLLER, M.; KOVALČÍK, A.; OBRUČA, S. Adaptation of *Cupriavidus necator* to levulinic acid for enhanced production of P(3HB-co-3HV) copolyesters. *BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL*, 2019, roč. 151, č. 11, s. 1-10. ISSN: 1369-703X.

Ivana Nováčková prováděla převážnou část experimentální práce – evoluční experimenty a následnou charakterizaci získaných adaptovaných kmenů včetně studie enzymových aktivit. Byla zodpovědná za vyhodnocení a zpracování dat, následně se podílela na tvorbě prvního draftu manuskriptu. Podle systému Apollo jí v autorském kolektivu přísluší autorský podíl 25 %.

Příloha II

NOVÁČKOVÁ, I.; HRABALOVÁ, V.; SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; SAMEK, O.; KOLLER, M.; KRZYZANEK, V.; HRUBANOVÁ, K.; NEBESÁŘOVÁ, J.; OBRUČA, S. The role of polyhydroxyalkanoates in adaptation of *Cupriavidus necator* to osmotic pressure and high concentration of copper ions. *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*, 2022, roč. 206, č. 5, s. 977-189. ISSN: 0141-8130.

Ivana Nováčková byla společně s Vendulou Hrabalovou zodpovědná za zásadní část experimentální práce a vyhodnocení dat. Autorka byla následně zodpovědná za tvorbu prvního draftu manuskriptu. Podle systému Apollo jí v autorském kolektivu přísluší autorský podíl 25 %.

Příloha III

Protokoly experimentů, které nebyly publikovány, a to především v souvislosti s produkcí kopolymeru P(3HB-co-4HB) se současným využitím přístupu evolučního inženýrství. Přiložen byl i protokol experimentu předcházejícího proteomické analýze adaptovaných kmenů charakterizovaných v rámci Přílohy II.

Příloha IV

KOUŘILOVÁ, X.; NOVÁČKOVÁ, I.; KOLLER, M.; OBRUČA, S. Evaluation of mesophilic *Burkholderia sacchari*, thermophilic *Schlegelella thermodepolymerans* and halophilic *Halomonas halophila* for polyhydroxyalkanoates production on model media mimicking lignocellulose hydrolysates. *BIORESOURCE TECHNOLOGY*, 2021, roč. 325, č. 4, s. 1-5. ISSN: 0960-8524.

*Experimentální práce byla rozdělena mezi dvě první autorky, kdy Ivana Nováčková byla zodpovědná za experimenty s bakteriálními kmeny *B. sacchari* a *H. halophila*, a následně také za vyhodnocení a zpracování dat relevantních pro dané kmeny. Podílela se posléze i na*

tvorbě manuskriptu. Podle systému Apollo jí v autorském kolektivu přísluší autorský podíl 30 %, rovnocenný s autorkou Xeníí Kouřilovou.

Příloha V

NOVÁČKOVÁ, I.; KOUŘILOVÁ, X.; OBRUČA, S.; *Způsob izolace PHA biopolymerů z halofilních a termofilních bakterií. Patentová přihláška, číslo deníku 2022/747.*

*Patentová přihláška nebyla prozatím přijata, nicméně Ivana Nováčková byla zodpovědná za veškeré kultivační a izolační experimenty prováděné s bakteriálním kmenem *H. halophila*. Stejně tak i za vyhodnocení získaných dat pro tento kmen. Podílela se také na přípravě patentové přihlášky. Podle systému Apollo jí v autorském kolektivu přísluší autorský podíl 34 %.*

Příloha VI

NOVÁČKOVÁ, I.; KOUŘILOVÁ, X.; MRÁZOVÁ, K.; SEDLÁČEK, P.; KALINA, M.; **KRZYZANEK, V.; KOLLER, M.; OBRUČA, S.** *Combination of Hypotonic Lysis and Application of Detergent for Isolation of Polyhydroxyalkanoates from Extremophiles. *Polymers*, 2022, roč. 14, č. 9, s. 1-16. ISSN: 2073-4360.*

*Jak bylo uvedeno již u patentové přihlášky, Ivana Nováčková byla zodpovědná za veškeré kultivační a izolační experimenty prováděné s bakteriálním kmenem *H. halophila*. Stejně tak i za vyhodnocení získaných dat pro tento kmen. Aktivně se podílela na kompletaci manuskriptu. Podle systému Apollo jí v autorském kolektivu přísluší autorský podíl 25 %.*

11 PŘÍLOHY

11.1 Příloha I

NOVÁČKOVÁ, I.; KUČERA, D.; POŘÍZKA, J.; PERNICOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; KOLLER, M.; KOVALČÍK, A.; OBRUČA, S. Adaptation of *Cupriavidus necator* to levulinic acid for enhanced production of P(3HB-co-3HV) copolyesters. *BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL*, 2019, roč. 151, č. 11, s. 1–10. ISSN: 1369-703X.



Regular article

Adaptation of *Cupriavidus necator* to levulinic acid for enhanced production of P(3HB-co-3HV) copolyesters

Ivana Novackova^a, Dan Kucera^{a,b}, Jaromir Porizka^{a,b}, Iva Pernicova^{a,b}, Petr Sedlacek^b, Martin Koller^{c,d}, Adriana Kovalcik^a, Stanislav Obruca^{a,b,*}

^a Department of Food Chemistry and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Parkyova 118, 612 00 Brno, Czech Republic

^b Material Research Centre, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Parkyova 118, 612 00 Brno, Czech Republic

^c Institute of Chemistry, NAWI Graz, University of Graz, Heinrichstrasse 28/III, 8010 Graz, Austria

^d ARENA Arbeitsgemeinschaft für Ressourcenschonende & Nachhaltige Technologien, Inffeldgasse 21b, 8010 Graz, Austria

HIGHLIGHTS

- Evolved strains demonstrated better growth in the presence of LA.
- Adaptation of *C. necator* H16 to LA led to higher content of 3HV in P(3HB-co-3HV).
- Higher 3HV content was connected with lower crystallinity and lower T_m .
- Slightly different adaptation strategies of evolved strains were observed.
- PCA has been used for multiparametric analysis of data.

ARTICLE INFO

Keywords:

polyhydroxyalkanoates
levulinic acid
adaptation
Cupriavidus necator
metabolic characterization

ABSTRACT

Evolutionary engineering is an approach, which allows preparing microorganisms with desired phenotype without the need for knowledge of genetic characteristics connected with changes at phenotype level. This approach is based on cell multiplication under stress conditions and it can be performed in various designs. In connection with PHA-producing bacteria, evolutionary engineering can be used to gain microorganisms producing PHAs with required material properties. Using levulinic acid (LA) as a stress factor and *Cupriavidus necator* H16 as a model PHA producing bacterial strain, five evolved strains have been obtained in the present study. Compared with the parental strain, all of these showed better growth in the presence of LA, strains ALA01 and ALA04 showed higher PHA content in biomass and strains ALA03 and ALA04 showed higher 3-hydroxyvalerate (3HV) content in copolymer P(3HB-co-3HV). By DSC and FTIR analysis of polymers, connections between 3HV content, crystallinity and melting temperature have been studied. Metabolic characterization provided information about possible adaptation strategies of evolved strains, while based on methods of statistical analysis similarities and differences between individual strains were discussed. Considering obtained information, evolutionary engineering displays a useful tool for modification of microorganisms together with fine-tuning the properties of produced metabolites (PHA copolyesters).

1. Introduction

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polyesters of hydroxyalkanoic acids, which are accumulated by numerous prokaryotic microorganisms in form of intracellular granules. The primary biological function of PHA is intracellular storage of carbon, energy and reducing power; however, apart from their role for survival of cells under starvation conditions, presence of PHA granules in bacterial cells also enhances

their robustness against various other stress factors [1] such as UV irradiation [2], repeated freezing-thawing cycles [3], oxidative stress [4,5] or osmotic imbalance [6].

Furthermore, due to their biodegradable and biocompatible nature and renewable origin, PHAs have been attracting considerable attention as promising "green" alternatives to petrochemical polymers [7]. Nevertheless, commercial production of PHA is scarce as a consequence of the high production cost and also due to their non-optimal

* Corresponding author.

E-mail address: Stana.O@seznam.cz (S. Obruca).

<https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107350>

Received 6 May 2019; Received in revised form 17 July 2019; Accepted 15 August 2019

Available online 16 August 2019

1369-703X/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Nomenclature	
D	polydispersity index
Mw	weight-average molecular weight
Mn	number-average molecular weight
T _m	melting temperature
ΔH _m	enthalpy of fusion
ΔH _{tot}	total melting enthalpy
A	absorbance
Abbreviation	
2MCS	2-methylcitrate synthase
3HB	3-hydroxybutyrate
3HV	3-hydroxyvalerate
3-KT1	3-ketothiolase 1
3-KT2	3-ketothiolase 2
AACoAR	acetoacetyl-CoA reductase
ACoAS	acyl-CoA synthetase
CoA	coenzyme A
G6PD	glucose-6-phosphate dehydrogenase
LA	levulinic acid
MDH	malate dehydrogenase
MMS	methyl methanesulphonate
MS	malate synthase
NAD-IDH	NAD-dependent isocitrate dehydrogenase
NADP-IDH	NADP-dependent isocitrate dehydrogenase
PCA	principal component analysis
PHA	polyhydroxyalkanoate

mechanical and technological properties. The most common PHA, poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), the homopolymer of 3-hydroxybutyrate (3HB), is a highly crystalline and brittle material with melting temperature (T_m) close to its degradation temperature. However, processing of PHB is challenging, and applications are considerably limited because of its disadvantageous material characteristics [8]. Nevertheless, mechanical properties of PHA can be substantially improved when other monomer units are incorporated into polymeric chains. For instance, the most widely studied PHA copolymer consisting of 3HB and 3-hydroxyvalerate (3HV), namely poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (P(3HB-co-3HV)), demonstrates reduced crystallinity, higher flexibility and considerably lower melting temperature than PHB homopolymer [9,10].

Most bacterial PHAs producers require supplementation by suitable propionyl-CoA generating precursors such as propionate, n-propanol or valerate to induce biosynthesis of P(3HB-co-3HV) copolymer [11], while only a limited number of microbes, mainly from the Archaea domain, are able to synthesize P(3HB-co-3HV) copolyesters without the need for 3HV precursors (reviewed by [12]). However, these precursors are expensive; thus, their application further reduces economic competitiveness of PHAs production. Therefore, an alternative inexpensive 3HV-precursor, levulinic acid (4-oxopentanoic acid, LA) was utilized in previous studies for P(3HB-co-3HV) production from glycerol [13,14], xylose [15], or whey [16] as main substrates. Moreover, a process for production of PHA containing 3HB, 3HV, 4-hydroxyvaleric acid (4HV) and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids by a recombinant *Pseudomonas putida* strain was developed using a medium with octanoic and LA as carbon sources [17]. LA can be efficiently produced in high yields by the dehydrative treatment of biomass or carbohydrates with acid and, therefore, it is considered being a crucial bio-based platform chemical. Cost of LA in large scale production is estimated at US-\$ 0.09 – US-\$ 0.20 kg⁻¹ [18]. Nevertheless, LA reveals substantial microbial inhibitory activity since it inhibits biosynthesis of tetrapyrroles such as heme or vitamin B12 and, similarly to other weak organic acids, LA can acidify the cytoplasm of bacterial and yeast cells and, hereby, inhibit or completely hamper the entire metabolism [19]. Due to its toxicity, use of LA as a precursor of 3HV can be problematic since it can substantially decrease productivity of the biotechnological process. It should be mentioned that levulinic acid is also formed as an undesired side product when the carbohydrate fraction of lignocellulose materials is thermally hydrolyzed in assistance of mineral acids. Therefore, LA along with acetic acid, phenolics and furfurals is considered being one of the undesired microbial inhibitors, which are present in lignocellulose-based cultivation media [20].

Taking into account all the possible relationships of LA to biotechnological production of PHA, we have decided to utilize approaches of evolutionary engineering and subsequent metabolic characterization of evolved strains to investigate mechanisms of adaptation of

Capriavidus necator to LA. We also intended to test whether selected approach can be used to gain strains adapted to LA, which would be of great importance for PHA production both by using LA as 3HV precursor and for PHA production from lignocellulose based substrates used as the main carbon source. *C. necator* was selected since it is considered being the model bacterial strain in the context of PHA metabolism, and it is also a promising candidate strain for industrial production of PHAs [21].

2. Material and methods

2.1. Microorganism, its cultivation and adaptation to LA

Capriavidus necator H16 OCM 3726 was purchased from the Czech Collection of Microorganisms. The nutrient broth (NB) medium (10 g L⁻¹ peptone, 10 g L⁻¹ beef extract, 5 g L⁻¹ NaCl) was used for the inoculum preparation and the culture preservation (agar plates). The mineral salt (MS) medium was used in all the experiments: 3 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 1.02 g L⁻¹ KH₂PO₄, 11.01 g L⁻¹ Na₂HPO₄ · 12 H₂O, 0.2 g L⁻¹ MgSO₄ · 7 H₂O, 1 mL microelement solution and 1 L distilled water. The microelement solution was composed of 9.7 g L⁻¹ FeCl₃, 7.8 g L⁻¹ CoCl₂ · 2 H₂O, 0.156 g L⁻¹ CuSO₄ · 5 H₂O, 0.119 g L⁻¹ CoCl₂, 0.118 g L⁻¹ NiCl₂, 0.062 g L⁻¹ CrCl₂ and 0.1 mol L⁻¹ HCl. Fructose at a concentration of 20 g L⁻¹ was used as a carbon source in all the cultivations. Fructose stock solution, salt solutions, stock solution of LA (Sigma Aldrich) and microelement solutions were autoclaved separately (121°C, 25 min) and then aseptically reconstituted at room temperature prior to the inoculation. The pH-value was adjusted to 7.0 using 1 mol L⁻¹ NaOH. The cultivations were performed in Erlenmeyer flasks (volume 250 mL) containing 100 mL of MS medium. The temperature was set to 30°C, the flasks were agitated at 180 rpm.

The adaptation of the bacterial culture to LA was performed by a series of cultivations with gradual increase of concentration of LA in cultivation media, followed by selection and identification of the best adapted cells as fastest-growing colonies on agar dishes containing MS medium with high concentration of LA. In the first step, overnight inoculum grown in NB medium was transferred into MS media with 0.5 and 5 g L⁻¹ of LA, respectively, and also into MS media without LA; these cultures were cultivated for 48 hours. After that, 100 μL of each bacterial culture was transferred onto agar plates containing agar solidified MS media with 1, 3, 5 and 10 g L⁻¹ of LA. It should be noted that no growth occurred in presence of 10 g L⁻¹ of LA in this step. Subsequently, the colonies capable of growth at the highest concentration of LA (5 g L⁻¹) were transferred by streaking patterns onto new agar plates containing agar solidified MS medium with 5 and 7.5 g L⁻¹ of LA, respectively. Finally, the colonies capable of growth at the highest concentration of LA were selected as adapted cultures for further characterization.

In parallel, the model organism *C. necator* H16 was subjected to adaptation to LA (1 g L^{-1}) in the presence 0.1 and 0.5 g L^{-1} of the chemical mutagen methyl methanesulphonate (MMS) for 48 hours (cultivated at 30°C , 180 rpm). After that, 100 μL of each bacterial culture was transferred onto agar plates containing agar-solidified MS media with 5, 7.5, 10 and 12.5 g L^{-1} of LA, respectively. Similarly to the cultures described above, the colonies capable of growth at the highest concentration of LA were selected as adapted cultures for further characterization. All the evolved strains were transferred into NB medium with 1 g L^{-1} of LA, cultivated for 24 h (30°C , 180 rpm) and stored in presence of 10 vol.% glycerol at -80°C .

An illustration summarizing the adaptation process with and without the mutagen can be seen in Supplementary materials.

2.2. Testing of PHA production capabilities of evolved strains

PHA production capability of evolved strains was compared to the wild-type strain in an experiment performed in Erlenmeyer flasks. The inocula were prepared in NB medium and cultivated for 24 h (30°C , 180 rpm). After that, microbial cultures were transferred into flasks (volume 250 mL) containing 100 mL of MS medium with 3.5 g L^{-1} of LA. The cultivations were performed for 72 h; after that, the microbial cells were harvested by centrifugation ($8000 \times g$, 5 min) and analyzed for PHA content as described in section 2.3. Furthermore, after 48 h of cultivation, samples were taken for determination of intracellular activities (described in 2.4) of selected enzymes. All the cultivations were performed in triplicate.

2.3. Analysis of PHA

To determine biomass concentration expressed as cell dry mass (CDM) and PHA content in cells, samples (10 mL) were centrifuged and the cells were re-suspended and washed with 5% (v/v) Triton X (10 mL), centrifuged again, and finally re-suspended and washed with distilled water. The biomass concentration was analyzed gravimetrically and PHA content in cells and monomer composition of PHA were analyzed as methyl esters of individual 3-hydroxyacids (3HB and 3HV) by gas chromatography as reported previously [22]. Copolymer P (3HB-co-3HV) with a 3HV content of 12% (Sigma Aldrich, Germany) was used as a standard, benzoic acid (LachNer, Czech Republic) was used as an internal standard.

To determine the molecular weight of PHA samples, the polyesters were extracted from the dried cells by chloroform (approx. 20 mg biomass, 5 mL chloroform, 70°C , 24 h under continuous stirring), residual bacterial biomass was separated by filtration, and, finally, the solvent was removed by evaporation at 70°C for 24 h. After that, 5 mg of the polymer was solubilized in 1 mL of HPLC-grade chloroform. Obtained samples were passed through syringe filters (nylon membrane, pore size 0.45 μm) and analyzed by gel Size Exclusion Chromatography (Agilent, Infinity 1260 system containing PLgel MIXED-C column) coupled with Multiangle Light Scattering (Wyatt Technology, Dawn Heleos II) (SEC-MALS) and Differential Refractive Index (Wyatt Technology, Optilab T-rEX) detection. For the analysis, 100 μL of individual samples were injected into the chromatographic system containing HPLC-grade chloroform (pre-filtered through 0.02 μm membrane filter) as mobile phase. The used flow rate was 0.6 mL min^{-1} . The weight-average molecular weight (Mw) and polydispersity index (D, ratio of weight-average and number-average molecular weight Mw/Mn) were determined using the ASTRA software (Wyatt Technology, version 6.1) based on Zimm's equations [23]. The used value of refractive index increment (dn/dc) for PHB was 0.0336 mL g^{-1} , as determined from the differential refractometer response assuming a 100% sample mass recovery from the column.

Melting behavior of the isolated PHA polymers was analyzed by means of a differential scanning calorimeter (DSC) Q2000 (TA Instruments) equipped with an RCS90 Cooling accessory and evaluated

by TA Universal Analysis 2000 software. Phase transitions of mercury and indium were used for the calibration in the applied temperature range. Samples of a certain mass (ca. 5 mg) were placed in hermetically sealed Tzero aluminum pans, and the measurement was carried out under a dynamic nitrogen atmosphere. To ensure the same thermal history of all samples prior to the evaluation of their melting behavior, each sample was first heated at $10^\circ\text{C min}^{-1}$ to 190°C and subsequently cooled down to -30°C at the same cooling rate. Then the sample was heated again ($10^\circ\text{C min}^{-1}$ to 200°C) and the thermogram, recorded in this second heating step, was further evaluated. From each of the measured thermograms, T_m was determined as the peak temperature value in the melting endotherm. Further, total melting enthalpy (ΔH_{tot}) was determined by integration of the melting endotherm as its total area.

The infrared spectra of isolated polymers were recorded with a Nicolet iSSO FTIR spectrometer (Thermo Scientific). All measurements were taken at ambient temperature (25°C) on the built-in single-reflection diamond attenuated total reflectance (ATR) crystal. Each spectrum was collected as an average of 128 scans with resolution 1 cm^{-1} . Recorded spectra are provided without further corrections.

2.4. Determination of enzyme activities

The cells for determination of activities of selected enzymes were sampled after 48 h of cultivation as described in section 2.2, harvested by centrifugation ($8000 \times g$, 5 min, 4°C), suspended in 50 mmol L^{-1} phosphate buffer (pH 7.4) and disrupted by sonication (Sonopuls HD 3200, Bandelin, Germany) at 4°C . The cytosol was separated from the cell debris by centrifugation ($10,000 \times g$, 10 min, 4°C), aliquoted and stored at -80°C .

Spectrophotometric determination of enzyme activities was described in details previously by Obruca et al. [24]. Activity of NAD-dependent isocitrate dehydrogenase (NAD-IDH) and NADPH-dependent isocitrate dehydrogenase (NADP-IDH) were determined spectrophotometrically (340 nm) in reaction mixture consisting of 50 mmol L^{-1} phosphate buffer (pH 7.4), 1 mmol L^{-1} NAD⁺ or NADP⁺, 50 mmol L^{-1} isocitrate, 10 mmol L^{-1} MgSO₄ and 100 mmol L^{-1} KCl. Similarly, activities of malate dehydrogenase (MDH) and malic enzyme (ME) were determined in phosphate buffer (pH 7.4), 1 mmol L^{-1} NAD⁺ in case of MDH or 1 mmol L^{-1} NADP⁺ in case of ME, 50 mmol L^{-1} malate, 10 mmol L^{-1} MgSO₄ and 100 mmol L^{-1} KCl. The activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) was measured in following reaction mixture: phosphate buffer pH 7.4, 1 mmol L^{-1} NADP⁺, 5 mmol L^{-1} glucose-6-phosphate and 30 mmol L^{-1} MgCl₂. Activity of malate synthase (MS) was determined by monitoring the release of free CoA during the enzymatic reaction (at 30°C) using 1 mmol L^{-1} 5,5'-di-thiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) at 405 nm in 50 mmol L^{-1} phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.2 mmol L^{-1} acetyl-CoA and 5 mmol L^{-1} glyoxylic acid.

Similarly, activity of 3-ketothiolases (3-KT) was assayed by following release of free CoA using DTNB. The reaction mixture for determination of activity of 3-KT1 (catalyzing the condensation of two acetyl-CoA molecules) contained phosphate buffer (50 mmol L^{-1} , pH 7.4), 0.2 mmol L^{-1} acetyl-CoA and 1 mmol L^{-1} DTNB. In order to estimate activity of 3-KT2 capable of incorporation of propionyl-CoA into 3-hydroxyvaleryl-CoA (condensation of acetyl-CoA and propionyl-CoA), the reaction mixture contained 0.2 mmol L^{-1} acetyl-CoA, 0.2 mmol L^{-1} propionyl-CoA and 1 mmol L^{-1} DTNB, and the activity of 3-KT1 was subtracted from the results of this assay. Acetoacetyl-CoA reductase (AACoR) activity was determined in a mixture containing 1 mmol L^{-1} acetoacetyl-CoA, 0.4 mmol L^{-1} NADPH and phosphate buffer (50 mmol L^{-1} , pH 7.4), NADP⁺ formation was measured spectrophotometrically as a decrease of absorbance at 340 nm. PHA synthase activity was determined spectrophotometrically (405 nm) in a mixture containing phosphate buffer (50 mmol L^{-1} , pH 7.4), 0.2 mmol L^{-1} 3-hydroxybutyryl-CoA and 1 mmol L^{-1} DTNB. Activity of 2-

methylcitrate synthase (2MCS) was determined in mixture consisting of 50 mmol L⁻¹ phosphate buffer pH 7.4, 2 mmol L⁻¹ oxaloacetate, 1 mmol L⁻¹ propionyl-CoA and 2 mmol L⁻¹ DTNB by measuring the absorbance at 405 nm. Activity of levulinic acid specific acyl-CoA synthetase (ACoAS) was determined in mixture containing 50 mmol L⁻¹ phosphate buffer (pH 7.4), 2 mmol L⁻¹ DTNB, 0.07 mmol L⁻¹ CoA and 0.15 mmol L⁻¹ ATP. Separately, the activities of intracellular enzymes from cell extracts and membrane-binding enzymes from cell debris were measured. Activity of ACoAS was measured as a decrease of absorbance at 405 nm caused by loss of substrate, namely free CoA.

All the samples were analyzed in triplicate. In all these cases, final volume of reaction mixture was 250 µL, the reactions were initiated by addition of cell extracts (25 µL) and the changes of absorbance were recorded at 340 or 405 nm with regards to the enzyme analyzed, temperature was set to 30°C (ELx800, Biotek, Germany). One unit of enzyme activity was defined as the conversion of one nmol of substrate per minute. The amount of soluble protein in cell extracts was determined by Hartree-Lowry method [25] using bovine serum albumin as a standard (NanoPhotometer, Impien, Germany).

2.5. Statistical analysis

Results were sorted and processed by various statistical approaches. Analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test were used to evaluate the differences between the tested bacterial strains in terms of production and metabolic parameters. Principal component analysis (PCA), based on Pearson correlation, was used for multivariate characterization of bacterial strains. The main goal of PCA was to find similarities and dissimilarities between the strains and to obtain potential clustering of the observations. Results of PCA were visualized by the two dimensional projection of the observations onto biplot of principal components and original variables. Data analysis was performed by Microsoft excel (Microsoft, USA) and XL-stat (Addinsoft, France).

3. Results and discussion

3.1. PHA production by LA-adapted strains

By application of evolutionary engineering approaches to gain *C. necator* strains adapted to LA, we obtained in total 8 evolved strains designated as ALA01 – ALA08. All these strains were further tested for their PHA production capabilities via submerged cultivation in mineral medium in presence of 3.5 g L⁻¹ of LA. The wild-type strain was cultivated in the same medium as a control culture. The results of this comparative production experiment are demonstrated in Table 1. Out of the eight evolved strains, three strains (ALA05, ALA07 and ALA08) revealed very poor growth and no PHA accumulation. Therefore, these bacterial cultures were eliminated from further experiments and metabolic characterization. On the contrary, as expected, adaptation of the

strains to LA substantially improved growth properties in presence of LA for most of remaining cultures. In particular, especially strains ALA01 and ALA02 reached about 25% higher cell concentration than the wild-type control culture. The fact that application of evolutionary engineering for adaptation of *C. necator* to LA may eliminate its growth inhibitory effect can be considered being positive for the overall volumetric productivity. PHAs are intracellular products, thus reaching high cell density is crucial to obtain high product titers [26]. This fact is well demonstrated by our data since PHA titers reached with ALA01 and ALA02 (4.7 and 5.0 g L⁻¹, respectively) are substantially higher than those obtained by wild-type strain (3.5 g L⁻¹) and, at the same time, intracellular contents of the polymer are comparable. Further, with exception of ALA04 and ALA06, evolved strains accumulated polymer with considerably lower M_w than the wild-type strain. Despite lower M_w of polymer is not desired considering its properties, all determined values were still high enough for processing of the materials. Moreover, the strain ALA04 as well as strain ALA03 are interesting due to the fact that they were capable of incorporating higher amounts of 3HV into the copolymer than observed for the wild type, while the 3HV content in the copolymers produced by other evolved strains were even lower than in the wild-type strain. The material properties of polymers produced by particular strains are in details discussed in part 3.3.

3.2. Metabolic profiling of evolved strains

Evolved strains and the wild-type strain were characterized by determination of enzyme activities of selected enzymes involved in the central metabolism, PHA metabolism and metabolism of LA. The scheme of metabolic pathways and particular enzymes, which activities were examined within this study, is shown in Fig. 1. Activities of selected enzymes of all the evolved strains and of the control strain were compared to assess possible similarities and dissimilarities, and to identify potential adaptation strategies of *C. necator* to LA. The results are provided in Table 2.

Generally, when exposed to LA during cultivation, the evolved strains adapted to LA show metabolic disparities in comparison to the wild-type strain. The most significant disparity between evolved strains and the wild-type strain was observed in propionyl-CoA catabolism through the 2-methylcitrate cycle in which propionyl-CoA is turned into pyruvate, which may be further decarboxylated to acetyl-CoA [27,28]. Metabolization of propionyl-CoA via the 2-methylcitrate cycle provides energy and/or important constituents for biomass synthesis. Activity of 2-methylcitrate synthase (2MCS) was considerably enhanced in all the evolved strains as compared to wild-type strain (1.9 – 5.2 fold). It seems reasonable that adaptation of the bacterium to LA, which is metabolically cleaved into acetyl-CoA and propionyl-CoA, is associated with increasing activity of the 2-methylcitrate pathway. On the other side, it was reported that due to the activity of the propionyl-CoA-consuming 2-methylcitrate cycle, only a small portion of propionyl-CoA is

Table 1

Biomass and PHA titers obtained with various strains adapted to LA. 72 h cultivations with 3.5 g L⁻¹ LA.

	CDM	PHA	PHA	3HV content in PHA	M _w
	[g L ⁻¹]	[wt. %]	[g L ⁻¹]	[mol. %]	[kDa]
<i>C. necator</i> Wild-type	7.3 ± 0.2	47.8 ± 2.1	3.5 ± 0.1	15.8 ± 0.9	668.0 ± 25.6
<i>C. necator</i> ALA01	9.3 ± 0.3	49.9 ± 0.9	4.7 ± 0.2	13.9 ± 0.3	422.0 ± 64.2
<i>C. necator</i> ALA02	9.0 ± 0.1	47.7 ± 0.7	5.0 ± 0.1	13.50.2	455.2 ± 64.6
<i>C. necator</i> ALA03	8.1 ± 0.1	47.8 ± 2.8	4.1 ± 0.1	17.0 ± 0.1	427.8 ± 22.4
<i>C. necator</i> ALA04	7.8 ± 0.1	55.4 ± 1.5	3.9 ± 0.1	20.6 0.9	615.5 ± 66.0
<i>C. necator</i> ALA05	0.4 ± 0.1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>C. necator</i> ALA06	7.4 ± 0.8	41.80.5	3.1 ± 0.3	11.4 ± 0.3	725.9 ± 27.1
<i>C. necator</i> ALA07	0.9 ± 0.2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>C. necator</i> ALA08	0.6 ± 0.1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

CDM stands for cell dry mass, n.d. – not detected. Results are in form: mean ± standard deviation. Highest results for CDM, PHA, PHA content, 3HV content in PHA, and M_w are highlighted in grey.

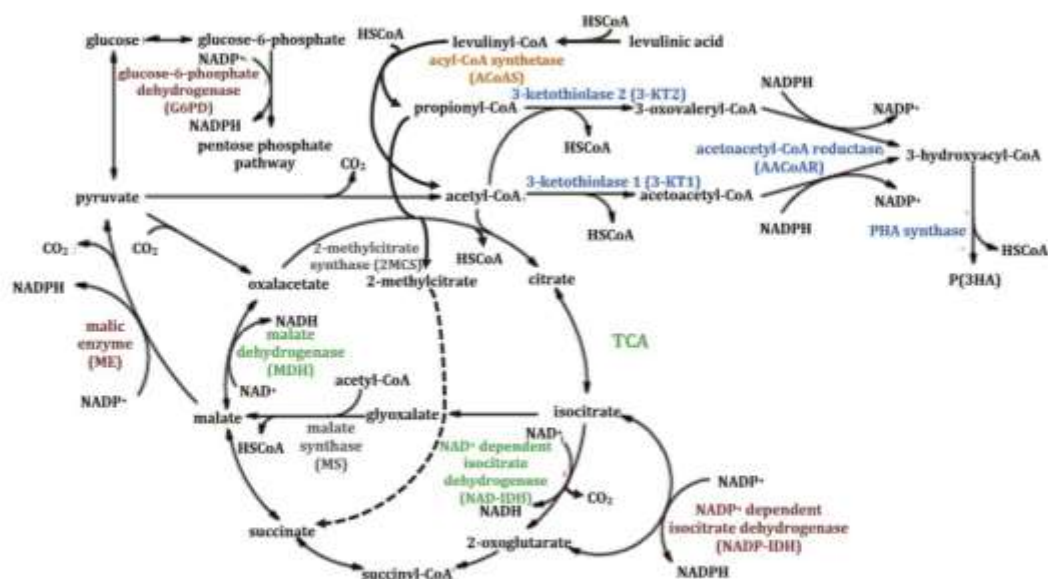


Fig. 1. Scheme of central metabolism of *C. necator* with selected enzymes, which were analyzed in terms of their specific activities.

incorporated into P(3HB-co-3HV) in *C. necator* [29]. This fact explains why the 3HV content in most of evolved strains was lower than in the wild-type strain, which demonstrated lower activity of 2MCS. Therefore, adaptation of the culture to LA has positive consequences from the point of view of growth and overall productivity, but it has a slightly negative impact on efficiency of 3HV incorporation by lower LA-to-3HV yields. Metabolism is generally a complex process and it is likely that the reason why, despite high activity of 2MCS, some evolved strains produced copolyester with higher 3HV content. Except enhanced metabolic activity via the 2-methylcitrate cycle, also the pathway leading to copolyester biosynthesis could be enhanced, which could lead to higher 3HV content in PHA.

Other similarities between evolved strains dealt with increased activity of the TCA cycle, enhanced production of the reduced cofactor NADPH through different metabolic pathways, and also increased activity of the PHA biosynthetic pathway. It is likely that higher amount of available acetyl-CoA, as a product of LA catabolism, increased activity of TCA cycle, which is closely related to cell respiration. This could be the reason why the activities of the enzymes responsible for

NADPH generation, primarily of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase (observed in all the evolved strains), much less of malic enzyme (observed in ALA02) or glucose-6-phosphate dehydrogenase (observed in ALA04) were enhanced. Reduced NADPH generated by these enzymes is necessary for regeneration of glutathione and thioredoxin involved in detoxification of reactive oxygen species [30]; therefore, the evolved strains revealed indication of adaptation to oxidative stress conditions, which could be a consequence of the expected increased respiratory activity of the evolved cultures. Consequently, increased levels of NADPH directs flux of acetyl-CoA towards PHA biosynthesis, where it reduces the hydrogen-acceptors acetoacetyl-CoA and 3-oxovaleryl-CoA to the respective alcohols (3-hydroxyacyl-CoAs; so called "pseudofermentation" reaction), thus supporting activity of enzymes involved in PHA accumulation. A positive effect of mild oxidative pressure on PHA biosynthesis was observed repeatedly in our previous studies [4,24,31] and also confirmed by other authors [32,33].

Furthermore, despite some general similarities among evolved strains were observed, the closer look at the metabolic profiles of evolved strains indicates slightly different adaptation strategies. In

Table 2

Specific enzyme activities of selected enzymes obtained with various strains adapted to LA.

Metabolic pathway	Enzyme	Specific enzyme activity [U mg ⁻¹]					
		Wild-type	ALA01	ALA02	ALA03	ALA04	ALA06
TCA cycle	NAD-IDH	53.55 ± 1.86	124.47 ± 9.85	196.87 ± 3.53	926.22 ± 70.64	847.94 ± 38.10	669.81 ± 46.94
	MDH	409.68 ± 11.36	629.03 ± 25.42	220.33 ± 12.24	301.13 ± 32.63	1,034.43 ± 45.33	130.60 ± 5.28
2-methylcitrate cycle	2MCS	473.71 ± 10.57	2,503.70 ± 318.39	1,440.09 ± 111.17	1,440.22 ± 81.68	1,719.68 ± 103.71	910.28 ± 30.93
Glyoxylate cycle	MS	163.55 ± 4.36	195.62 ± 0.62	498.54 ± 85.43	214.23 ± 9.99	218.97 ± 4.34	152.40 ± 3.27
NADP ⁺ dependent enzymes	G6PD	524.81 ± 75.92	510.16 ± 46.43	128.41 ± 16.63	491.45 ± 16.51	779.69 ± 24.99	331.69 ± 32.62
	NADP-IDH	53.55 ± 10.71	1,605.52 ± 55.23	1,143.47 ± 70.87	1,505.64 ± 45.70	1,937.27 ± 65.98	1,337.75 ± 78.96
	ME	303.46 ± 29.95	314.51 ± 19.06	589.08 ± 10.82	236.84 ± 18.25	170.17 ± 8.08	203.99 ± 7.04
Levulinic acid metabolism	ACoAS - ICE	166.64 ± 17.58	83.16 ± 2.22	72.77 ± 11.56	39.10 ± 10.14	43.22 ± 8.87	90.59 ± 18.06
	ACoAS - MBE	79.39 ± 2.88	75.82 ± 0.65	177.92 ± 2.54	111.31 ± 1.65	86.79 ± 7.83	95.16 ± 9.94
	IACoAS	246.03 ± 25.95	158.98 ± 4.24	250.69 ± 39.83	150.40 ± 39.02	130.01 ± 26.67	185.75 ± 37.03
PHA metabolism	3-KT1	145.55 ± 14.00	91.15 ± 13.67	168,507.40	167.21 ± 11.55	147.83 ± 8.52	222.19 ± 32.85
	3-KT2	63.32 ± 3.38	95.32 ± 7.77	138.24 ± 10.04	108.48 ± 10.37	81.52 ± 12.79	80.99 ± 9.37
	AACoAR	617.99 ± 27.37	1,732.52 ± 50.32	1,856.48 ± 97.71	2,178.95 ± 92.10	1,950.36 ± 75.84	2,454.27 ± 39.09
	PHA synthase	18.00 ± 2.36	214.03 ± 6.22	72.57 ± 6.92	121.63 ± 2.38	370.29 ± 17.11	80.53 ± 2.63

Results are presented in the form: mean ± standard deviation

particular, the results of enzymatic assays indicate that the strain ALA02 evolved most differently in comparison to the other strains. This strain revealed high activity of 2MCS (similarly as ALA01, ALA03 and ALA04) and, moreover, in ALA02, utilization of acetyl-CoA through the glyoxylate cycle was more pronounced on the expense of activity of Krebs cycle, which was slowed down due to reduced MDH activity. Malate generated in TCA or in glyoxylate cycle was predominantly converted to pyruvate, a reaction catalyzed by ME producing NADPH for biosynthesis. On the contrary, similar adaptation strategies were identified in strains ALA03, ALA04 and ALA06. At the simultaneous activation of Krebs cycle through NAD-IDH and unchanged MS (glyoxylate cycle) activity, ME activity was reduced in ALA03, ALA04 and ALA06 compared to the wild-type strain.

The connection between enzyme activities through correlation analysis using determination of Pearson correlation coefficient was assessed. We considered correlation when the absolute value of coefficient was higher than 0.85. We have spotted six positive and one negative correlation between activities of selected enzymes (see Table 3). The highest correlation was observed between enzyme activities of MS and ACoAS. According to Jaremko and Yu [34], propionyl-CoA and also acetyl-CoA are formed during metabolization of LA, while the produced acetyl-CoA can be used for malate synthesis by reacting with glyoxylate. The correlation between MDH (reaction produces reduction equivalents) and PHA synthase (polymerizes products of reactions consuming reduction equivalents) could be related with good overall cell physiology, thus leading to intensive respiration during exponential phase and PHA formation during the stationary phase. The connection between MS and ME could result in metabolic continuity, because the product of MS, malate, is the substrate for ME. The excess of malate in cells could be used to gain energy through transformation into pyruvate, which enters the Krebs cycle after transformation into oxaloacetate, or the cells could gain energy from propionyl-CoA through 2MCS. This pathway is not required for P(3HB-co-3HV) production. The other correlation confirmed our results about LA metabolism: we identified correlation between ACoAS and 3-KT2, when we assumed creation of acetyl-CoA and propionyl-CoA from levulinyl-CoA catalyzed by ACoAS, whereas 3-KT2 catalyzes condensation of these two molecules to form 3-hydroxyvaleryl-CoA. Based on previous correlation between MS and 3-KT2, this is a further evidence for the close connection of PHA biosynthesis with LA metabolism. Effective metabolism of LA resulted in increased activity of 3-KT2-catalyzed condensation of acetyl-CoA and propionyl-CoA to 3-oxovaleryl-CoA, and also to higher production of malate via the glyoxylate cycle. Subsequently, the reaction metabolizing excess of malate to pyruvate generates high quantities of NADPH, which in turn fuels the PHA biosynthetic pathway. The threshold value for positive correlation was identified also for MDH and G6PD. The connection between higher

respiration activity and NADPH producing enzymes was described above; the other context could be identified in higher metabolic activity and subsequent requirement for pentoses because of higher intensity of cell division. Negative correlation between enzyme activities of NADP-IDH and ACoAS could indicate metabolic pathways oriented in opposite directions, whereas NADP-IDH produced the reduced cofactor NADPH involved in biosynthetic pathways, while ACoAS catalyzed initial step of degradation of fatty acids, LA in our case. If activity of ACoAS was higher, transformation of isocitrate into 2-oxoglutarate was primarily catalyzed by NAD-IDH.

The results of metabolic profiling were also subjected to statistical analysis using the PCA method. Dimension of the 13 input variables was reduced to three principal components with eigenvalue > 1. Selected principal components F1 (39.89%), F2 (32.47%) and F3 (19.01%) composed 90.37% of the variability of the original data set. Best possible visual representation of the bacterial strains was obtained by the dispersion of the observations onto a two dimensional factor plane of principal components F1 and F2 (Fig. 2). Clear clustering of individual bacterial strains can be observed and it is based on differences in bacterial metabolism as represented by enzymatic activities. Most significant separation can be observed between the wild-type strain and remaining strains. In the wild-type strain, the observations are projected in the area with negative scores for F2 component, which is strongly positively connected with activity of ACoAS - ICE and negatively with NADP-IDH, NAD-IDH, AACoAR and 2MCS. Therefore, adaptation to LA manifested through enzyme activities led probably to different adaptation strategies of evolved strains, which indicates that performed evolutionary experiments substantially changed metabolism of evolved strains. Similarly, a separated cluster was formed by the ALA02 observations, because its enzyme activities differed significantly from the other analyzed strains. It could be assumed that adaptive evolution of ALA02 to LA led to a different adaptation strategy than in other evolved strains. The closest relationship could be observed between strains ALA01, ALA03 and ALA06. The strain ALA02 represented the most separate and remote zone in Fig. 2. As was in-depth described and discussed above, the strain ALA02 demonstrated increased activity of the glyoxylate cycle and decreased activity of TCA cycle than other evolved strains. The strain ALA01 was most similar to the wild-type strain, without features common to all evolved strains (increased respiration activity, enhanced propionyl-CoA utilization pathway, increased activity of NADPH generating enzymes and enhanced PHA biosynthesis pathway); hence, enzymatically, ALA01 did not differ much from wild-type strain.

Table 3
Correlation analysis of enzyme activities.

variable	NAD-IDH	MDH	MS	2MCS	G6PD	NADP-IDH	ME	ACoAS - ICE	ACoAS - MBE	Σ ACoAS	3-KT1	3-KT2	AACoAR	PHB synthase
NAD-IDH	1													
MDH	0.165	1												
MS	-0.241	-0.208	1											
2MCS	0.026	0.487	0.150	1										
G6PD	0.368	0.846	-0.635	0.196	1									
NADP-IDH	0.631	0.437	0.046	0.744	0.272	1								
ME	-0.621	-0.398	0.889	0.052	-0.769	-0.293	1							
ACoAS - ICE	-0.730	-0.262	-0.260	-0.597	-0.125	-0.911	0.133	1						
ACoAS - MBE	-0.069	-0.463	0.940	-0.047	-0.763	0.006	0.816	-0.286	1					
Σ ACoAS	-0.715	-0.586	0.471	-0.578	-0.686	-0.823	0.721	0.694	0.492	1				
3-KT1	0.466	-0.590	0.036	-0.650	-0.408	-0.065	-0.106	-0.069	0.326	0.182	1			
3-KT2	-0.009	-0.322	0.872	0.379	-0.648	0.310	0.741	-0.538	0.884	0.175	0.034	1		
AACoAR	0.699	-0.147	0.092	0.348	-0.179	0.799	-0.199	-0.802	0.245	-0.545	0.474	0.408	1	
PHB synthase	0.444	0.894	-0.128	0.660	0.712	0.788	-0.436	-0.620	-0.314	-0.799	-0.384	-0.092	0.308	1

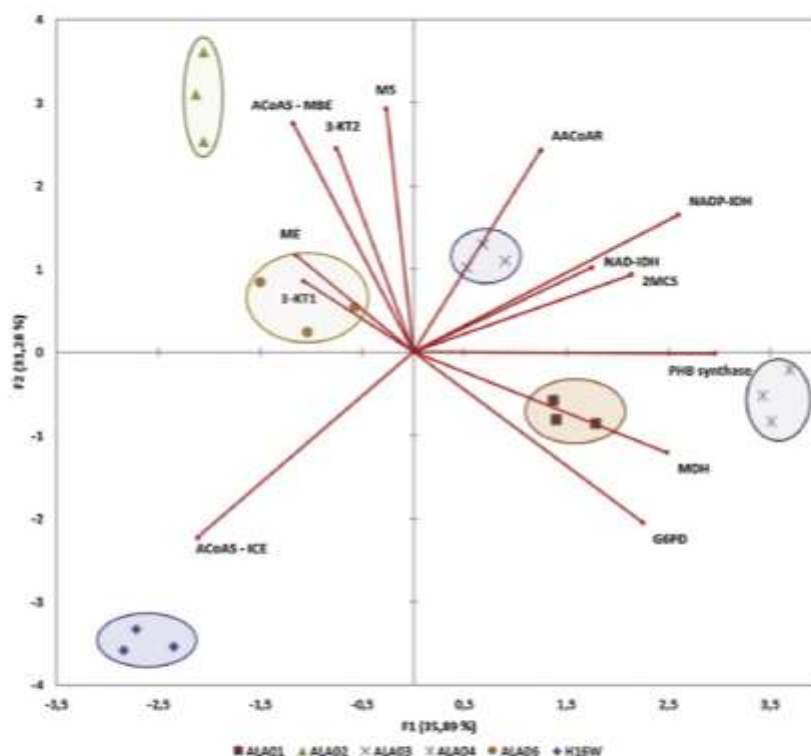


Fig. 2. Projection of characterized evolved strains and wild-type using PCA.

3.3. Characterization of material properties of P(3HB-co-3HV) produced by LA adapted strains

In the next part of the work, basic material properties of the PHA polymers produced by the wild-type strain and the evolved strains were investigated and compared. In particular, molecular weight, monomer composition and crystallinity of the produced copolyesters were analyzed. Results of this material assay are summarized in Table 4. First of all, it can be seen that the produced polyesters differed significantly in their molecular weight. In comparison with the wild type strain, the first generation of strains evolved in absence of chemical mutagen (i.e., strain ALA01 – ALA03) produced copolyesters with significantly lower molecular weight. Contrarily, the strain representing the second generation evolved without chemical mutagen (ALA04) provided polymer of similar molecular weight as the wild type strain, while an involvement of the chemical mutagen resulted in strain ALA06, which produced a polymer with even higher molecular weight than the wild type strain. For all tested strains, very low values of polydispersity index \bar{D}

(provided by the molecular weight assay as ratio of weight average value to number average value of molecular weight) represent a narrow distribution of the polymer chain lengths in all produced polymer samples.

Similarly to the differences in M_w of the polymer, the two evolved strains ALA04 and ALA06 stood out among the other strains also with respect to the monomer composition of the copolyester. It can be seen in Table 4 that the strain evolved in the second generation of LA adaptation (ALA04) was capable of incorporating the highest amount of 3HV. On the other hand, the chemical mutagen-assisted adaptation to LA resulted in the strain that incorporated the lowest amount of 3HV among all studied strains. The relative content of 3HV in the polymer chain represents a crucial parameter as far as polymer processing and forming is concerned. It has already been thoroughly described how the incorporation of 3HV in the copolymer influences its physical properties such as crystallization behavior, melting behavior as well as mechanical properties [35–37]. In this context, Kunioka et al. have revealed that depending on the 3HV content, P(3HB-co-3HV) copolyesters

Table 4

Basic material parameters of PHA polymers produced by the wild type strain and the evolved strains of *C. necator* H16.

	3HV content[mol.%]	M_w [kDa]	\bar{D}	T_m [°C]	ΔR_{1228} [g^{-1}]	$\Delta R_1/\Delta R_{tot}$	$\Delta R_2/\Delta R_{tot}$	A_{1228}/A_{1180}
WT	15.8 ± 0.9	668.0 ± 5.6	1.05	167.2	62.7	0.88	0.12	0.91
ALA01	13.9 ± 0.3	422.0 ± 64.2	1.05	167.5	74.7	0.94	0.06	0.95
ALA02	13.5 ± 0.2	455.2 ± 64.6	1.06	168.2	81.4	0.48	0.52	1.09
ALA03	17.0 ± 0.1	427.8 ± 22.4	1.07	167.2	81.8	0.70	0.30	0.94
ALA04	20.6 ± 0.9	615.5 ± 66.0	1.05	164.7	73.1	0.91	0.09	0.82
ALA06	11.4 ± 0.3	725.9 ± 27.1	1.06	164.9	63.4	0.73	0.27	0.87

^apolydispersity Index \bar{D} (M_w/M_n).

^brelative area of the two deconvolution components.

^cIR absorbance ratio at frequencies 1228 cm^{-1} and 1180 cm^{-1} , respectively.

crystallize in two crystalline forms, in the P(3HB) crystal lattice or the P(3HV) crystal lattice [35]. A relative content of 40 mol % 3HV was described as the threshold value for the transition from one crystal form to the other. Furthermore, Kunioka and Doi also proved that the degree of crystallinity as well as melting temperature decrease with the increasing concentration of 3HV up to 37 mol.% [36]. Any decrease of the melting point is of great technological interest, because the homopolymer P(3HB) is in general thermally unstable due to the random chain scission at ester groups at temperatures close above its melting point [36]. An unintentional thermal degradation thus may take place during the melting processing, leading to a significant reduction of an average molecular weight and undesired changes in rheological and mechanical properties [37]. Therefore, any shift of T_m to lower temperatures contributes to higher thermal stability during the melt processing of copolyester and constitutes a significant material improvement of the PHA polymer in terms of facilitated technological processing. For that reason, we complemented our material analysis of produced PHA copolymers also by a characterization of their crystallization and melting behavior.

DSC analysis of the isolated copolymers was used primarily in order to determine their melting temperatures (T_m) and enthalpies of fusion (ΔH_m). Raw thermograms, determined during the second heating scan of previously molten and cooled materials (see Materials and Methods for details), are shown in Fig. S3. Resulting values of the two parameters are shown in Table 4. From the comparison of T_m , it can be seen that the polymers produced by the first generation of the strains, which evolved in absence of chemical mutagen (ALA01, ALA02 and ALA03), were characterized by T_m close to that of the wild type strain. On the other hand, strains ALA04 (second generation of LA adaptation) and ALA06 (adaptation with presence of chemical mutagen) provided again polymers with different material properties – in this case with significantly lower T_m . Total melting enthalpy values vary by far more among the individual producing strains. It is worth remembering that T_m represents a qualitative characteristic of the crystallites, while ΔH_m is influenced rather by their quantitative content in the polymer. Further, it can be seen in the thermograms presented in Fig. S3 that all copolyesters exhibit double melting peaks, which indicates presence of two major types of crystallites in the structure of molten-and-cooled polymers. It is also evident from the different shapes of the melting peaks that the relative content of the two crystallite types differs among the tested polymers. Therefore, we have performed deconvolution of the melting endotherm peak by fitting the experimental envelope band by the summation of two calculated Gaussian components using non-linear fitting tools of the Origin 8.1 software (see Fig. S3b for an example of the graphical representation of the deconvolution results). Table 4 shows calculated relative areas of the first and the second melting component, respectively. Apparently, the first melting component represents melting of crystals with lower thermal stability, while the second melting peak represents melting of crystals with higher thermal stability. As can be seen from Table 4, significant relative areas of the second melting peak were found for ALA02, ALA03 and ALA06. Overall, the relative areas of the second melting peak vary from 6% (ALA01) to 52% (ALA02) of the total area of the melting endotherm.

FTIR analysis was applied as a supplementary structural assay of the produced polymers; spectra of the analyzed materials are shown in Fig. S4. Evidently, all copolymers show similar spectra that involve all the spectral features characteristic for PHA [38]. This is expectable as far as the differences in chemical composition (relative 3HV content ranging from 11.4% to 20.6%) are not large enough to cause any significant spectral signatures in FTIR. Nevertheless, FTIR spectra can provide information not only about chemical, but also about physical structure of PHA. In our previous work, we have summarized the way how the FTIR spectra can be utilized in evaluation of crystallinity of PHA [39]. It has been described that FTIR spectra of PHA involve vibration bands characteristic for crystalline and for amorphous PHA, respectively. Therefore, in this work we provide the ratio of IR absorbance at the

frequency characteristic for crystalline PHA (1228 cm^{-1}) to an absorbance at frequency attributed to amorphous PHA (1180 cm^{-1}) as a supplementary spectral indicator of inherent sample crystallinity (see detail of the spectral region with the two characteristic vibration bands in Fig. S4b). Results of this spectral assay are provided in Table 4. Once again, lower value of A_{1228}/A_{1180} as compared to the wild-type strain distinguish the copolymers produced by strains ALA04 and ALA06 from those isolated from the other adapted strains.

As was already discussed, there is strong evidence from literature that the relative content of 3HV in P(3HB-co-3HV) copolymers influences their overall crystallinity and melting behavior. Therefore, we have performed correlation analysis to seek for correlations between particular material parameters that were determined for the individual copolymers (see Table S1 in supplementary material). This analysis has revealed a strong negative correlation between molecular weight of the copolyesters and both basic parameters determined by DSC, i.e., melting temperature T_m (Pearson coefficient -0.722) and total heat of fusion (Pearson coefficient -0.892). It indicates that the chain length is the primary parameter that affects crystallinity of the isolated copolymers. Furthermore, strong positive correlation was found between melting temperature and the spectral parameter A_{1228}/A_{1180} , which confirms that the quality of crystallites in the polymer structure manifests in its FTIR spectrum. However, no strong or even moderate positive/negative correlation was confirmed for 3HV content and any of the other material parameters contrarily to the original expectations. Nevertheless, from the closer look at the relation between 3HV and other properties of the polymer, it can be seen that the low correlation coefficients are influenced by a specific position of ALA06, which is strongly distinguished from other materials. After elimination of the ALA06 parameters from the correlation analysis, originally expected correlation was indeed confirmed between the 3HV content and melting temperature T_m (strong negative correlation Pearson coefficient -0.952), and also between the 3HV content and spectral parameter A_{1228}/A_{1180} (strong negative correlation Pearson coefficient -0.859). Both correlations are presented graphically in Fig. S5, and the correlation table is provided in supplementary material as well (see Table S2). It is difficult to discuss this unique position of polymer produced by strain ALA06 solely on the basis of material parameters presented in this work. Nevertheless, it is likely that the distinguished material properties of the polymer come from a different orientation of the monomer units in the structure of copolymer chain. Usually, bacteria produce random copolymers, nevertheless, we hypothesize that strain ALA06 is capable, up to some level, to produce partially organized copolymer with parts of the chains rich in 3HV, hence, a partially blocky structure, which subsequently changes the properties of the produced material [8]. However, this hypothesis needs to be tested by detail crystallography assay of the polymer (including X-ray diffraction) and polymer sequence distribution and fragmentation studies of the individual copolyesters as a viable tool to study their microstructure [40].

Finally, the distinctive position of the evolved strains ALA04 (second generation of LA adaptation) and ALA06 (adaptation in presence of chemical mutagen) was further supported by results of multivariate characterization based on PCA evaluation of material properties. It can be seen in Fig. S6 that these two materials were projected in the opposite dimensions than the observation, which corresponds to samples produced by first generation in the biplot of selected principal components F1 and F2 (eigenvalue > 1), which in sum comprise 87.3% of the variability of the original data set.

4. Conclusions

By methods of evolutionary engineering, five strains adapted to LA originating from *C. necator* HI16 (wild-type) have been obtained. Strains *C. necator* ALA01, ALA02 and ALA03 have been classified as the first generation of evolved strains, strain *C. necator* ALA04 has represented

the second generation of evolved strains and *C. necator* ALA06 has been gained by the contribution of the chemical mutagen MMS. All evolved strains showed better growth in the presence of the inhibitor LA than observed for the wild-type strain, which was one of main parameters confirming a successful adaptation process. The analysis of PHAs in biomass moreover showed higher content of PHA in the biomass and, for some strains, also higher content of 3HV in P(3HB-co-3HV). The strain *C. necator* ALA04 repeatedly reported the highest value of PHA and also 3HV content with more than 20 mol.%. After GC-FID analysis, copolymers were further characterized by DSC, SEC-MALS and FTIR. On the basis of results, a connection between higher 3 HV content, lower melting temperature and lower crystallinity has been observed for copolymers isolated from strains *C. necator* ALA01, ALA02, ALA03 and ALA04. Polymer isolated from *C. necator* ALA06 has not confirmed that trend, therefore a different structural motif could be considered. Biochemical characterization of evolved strains through determination of specific activities of selected enzymes has provided information about possible adaptation strategies of strains considering similarities and differences between evolved strains and the wild-type strain. Similarities among evolved strains with the wild-type strain have been observed in enhanced metabolism of propionyl-CoA, enhanced PHA biosynthetic pathways, respiratory activity and also in enhanced activities of NADPH producing enzymes. It could be assumed that higher respiratory activity could be associated with adaptation to LA metabolized via aerobic β -oxidation. Higher intensity of respiration could cause oxidation stress, which was eliminated by higher production of NADPH. The excess of NADPH could promote biosynthetic pathways such as production of PHAs. Moreover, metabolic differences between evolved strains have been evaluated by PCA, and some adaptation strategies have been suggested. The most striking one among the adapted strains was strain *C. necator* ALA02 with enhanced intensity of LA catabolism, higher activity of glyoxylate cycle and reduced MDH activity. Strains *C. necator* ALA01, ALA03 and ALA06 were similar to each other. Strain ALA01 was the most similar to the wild-type strain, and the adaptation strategy of strain ALA04 was probably a little different from others. Different results have been observed when material properties have been used for PCA. From this prospective, no obvious link between general metabolic strategies of the strains and the shifts in quality of the produced polymer was identified.

Acknowledgements

This study was funded by the project GA 19-20697S of the Czech Science Foundation (GACR). Further, Ivana Novácková is Brno Ph.D. Talent Scholarship Holder – Funded by the Brno City Municipality. This work was also funded through the project SoMoPro (project No. 6SA18032). This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme under the Marie Skłodowska-Curie, and it is co-financed by the South Moravian Region under grant agreement No. 665,860. Note: Authors confirm that the content of this work reflects only the author's view and that the EU is not responsible for any use that may be made of the information it contains.

Appendix A. Supplementary Data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107350>.

References

- [1] S. Obruca, P. Sedláček, M. Köller, D. Kucera, I. Pernicová, Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications, *Biotechnol. Adv.* 36 (3) (2018) 856–870, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.006>.
- [2] E. Slaninová, P. Sedláček, F. Mravec, L. Mullersová, O. Samek, M. Köller, O. Hesko, D. Kucera, I. Marova, S. Obruca, Light scattering on PHA granules protects bacterial cells against the harmful effects of UV radiation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102 (4) (2018) 1923–1931, <https://doi.org/10.1007/s00253-018-0760-8>.
- [3] S. Obruca, P. Sedláček, V. Krzyzanek, F. Mravec, K. Hrubáková, O. Samek, D. Kucera, P. Benesová, I. Marova, Accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) helps bacterial cells to survive freezing, *PLoS One.* 11 (6) (2016), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157778> e0157778.
- [4] S. Obruca, I. Marova, M. Stanková, L. Mravcová, Z. Svoboda, Effect of ethanol and hydrogen peroxide on poly(3-hydroxybutyrate) biosynthetic pathway in *Capriavidia necator* H16, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26 (7) (2010) 1261–1267, <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0296-8>.
- [5] I.S.A. Rowaishi, A. Pailier, S. Rasul, B. Karan, S.W. Grötzing, K. Takarabe, J. Eppinger, Poly(3-hydroxybutyrate) production in an integrated electromicrobial setup: Investigation under stress-inducing conditions, *PLoS One.* 13 (4) (2018), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196079> e0196079.
- [6] P. Sedláček, E. Slaninová, M. Köller, J. Nebešová, I. Marova, V. Krzyzanek, S. Obruca, PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances, *New Biotechnol.* 49 (2019) 129–136, <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.10.005>.
- [7] M. Köller, Switching from petro-plastics to microbial polyhydroxyalkanoates (PHA): the biotechnological escape route of choice out of the plastic predicament? *EnvironBiotech. J.* 3 (1) (2019) 32–44, <https://doi.org/10.2478/ebj.2019-0004>.
- [8] M. Köller, Chemical and Biochemical Engineering Approaches in Manufacturing Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolymers of Tailored Structure with Focus on the Diversity of Building Blocks, *Chem. Biochem. Eng. Q* 32 (4) (2019) 413–438, <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2018.1385> (2019).
- [9] M. Kunioka, A. Tamaki, Y. Doi, Crystalline and thermal properties of bacterial copolymers: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate), *Macromolecules.* 22 (2) (1989) 694–697, <https://doi.org/10.1021/ma00192a031>.
- [10] M. Scandola, G. Geccorulli, M. Pizzoli, M. Gazzano, Study of the crystal phase and crystallization rate of bacterial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), *Macromolecules.* 25 (5) (1992) 1405–1410, <https://doi.org/10.1021/ma00031a008>.
- [11] Y. Doi, A. Tamaki, M. Kunioka, K. Soga, Production of copolymers of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes eutrophus* from butyric and pentanoic acids, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28 (4–5) (1988) 330–334, <https://doi.org/10.1007/BF00268190>.
- [12] M. Köller, Polyhydroxyalkanoate biosynthesis at the edge of water activity: Halochloa as biopolymer factories, *Bioengineering* 6 (2) (2019), <https://doi.org/10.3390/bioengineering6020054>.
- [13] R.D. Ashby, D.K.Y. Solaiman, G.D. Strahan, C. Zhu, R.C. Tappel, C.T. Nomura, Glycerine and levulinic acid: Renewable co-substrates for the fermentative synthesis of short-chain poly(hydroxyalkanoate) biopolymers, *Bioresour. Technol.* 118 (2012) 272–280, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.092>.
- [14] V. Kachrimaniidou, N. Kopsabelis, S. Papanikolaou, I.K. Kookos, M. De Bruyn, J.H. Clark, A.A. Kostin, Sunflower-based bio refinery: poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production from crude glycerol, sunflower meal and levulinic acid, *Bioresour. Technol.* 172 (2014) 121–130, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.044>.
- [15] T.M. Keenan, S.W. Tanenbaum, A.J. Stipanovic, J.P. Naska, Production and characterization of poly-beta-hydroxyalkanoate copolymers from *Burkholderia cepacia* utilizing xylose and levulinic acid, *Biotechnol. Prog.* 20 (2004) 1697–1704, <https://doi.org/10.1002/btpr.498734>.
- [16] M. Köller, P. Hesse, H. Fast, F. Steiner, G. Brauneegg, Study on the effect of levulinic acid on whey-based biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Hydrogenophaga pseudoflava*, *Appl. Food Biotechnol.* 4 (2) (2017) 65–78, <https://doi.org/10.22037/af.v4i2.16337>.
- [17] G. Schmack, V. Gorenflü, A. Steinbüchel, Biotechnological production and characterization of polyesters containing 4-hydroxyvaleric acid and medium-chain-length hydroxyalkanoic acid, *Macromolecules* 31 (3) (1998) 644–649, <https://doi.org/10.1021/ma970864d>.
- [18] J.J. Bozell, L. Moens, D.C. Elliott, Y. Wang, G.G. Neunswander, S.W. Fitzpatrick, R.J. Bilski, J.L. Jarnfeld, Production of levulinic acid and use as a platform chemical for derived products, *Resour. Conserv. Recycl.* 28 (3–4) (2000) 227–239, [https://doi.org/10.1016/S0921-3449\(99\)00047-6](https://doi.org/10.1016/S0921-3449(99)00047-6).
- [19] L.J. Jönsson, B. Alriksson, N.O. Nilvebrant, Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification, *Biotechnol. Biofuels.* 6 (1) (2013), <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-16> 16.
- [20] E. Palmqvist, B. Hahn-Hägerdal, Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II. Inhibitors and mechanisms of inhibition, *Bioresour. Technol.* 74 (1) (2000) 25–33, [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00161-3).
- [21] C.J. Brighton, A. Abdulrahman, J. Kebabian, D. Palmer, *Ralstonia eutropha* and the Production of Value Added Products: Metabolic Background of the Wild-Type Strain and Its Role as a Diverse, Genetically-Engineered Biscatalyst Organism, *Ralstonia eutropha* and the Production of Value Added Products: Metabolic Background of the Wild-Type Strain and Its Role as a Diverse, Genetically-Engineered Biscatalyst Organism, in: M. Köller (Ed.), *Recent Advances in Biotechnology Volume 1. Microbial Biopolymer Production, Performance and Processing Microbiology, Foodstocks, and Metabolism*, Bentham Science Publishers, Sharjah, 2016, pp. 265–347.
- [22] G. Brauneegg, B.Y. Sonnleitner, R.M. Lafferty, A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 6 (1) (1978) 29–37, <https://doi.org/10.1007/BF00509854>.
- [23] K.A. Osaki, Revised version of the integro-differential equation in the Zimm theory for polymer solution dynamics, *Macromol.* 5 (2) (1972) 141–144.

- [24] S. Obruca, O. Snajdar, Z. Svoboda, I. Marova, Application of random mutagenesis to enhance the production of polyhydroxyalkanoates by *Cupriavidus necator* H16 on waste frying oil, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29 (12) (2013) 2417–2428, <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1410-5>.
- [25] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, *Serum-protein assay by modified Lowry protein assay*, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [26] M. Köller, L. Marszałek, M.M. de Sousa Dias, G. Braunegg, Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner, *New Biotechnol.* 37 (2017) 24–38, <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.05.001>.
- [27] C.O. Bramer, A. Steinbüchel, The methylcitric acid pathway in *Ralstonia eutropha*: new genes identified and involved in propionate metabolism, *Microbiology*. 147 (2001) 2203–2214, <https://doi.org/10.1099/00221287-147-8-2203>.
- [28] C. Ewering, C.O. Bramer, N. Bruland, A. Bethke, A. Steinbüchel, Occurrence and expression of tricarboxylate synthases in *Ralstonia eutropha*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71 (2006) 80–89, <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0099-2>.
- [29] J. Yu, Y.T. Si, Metabolic carbon fluxes and biosynthesis of polyhydroxyalkanoates in *Ralstonia eutropha* on short fatty acids, *Biotechnol. Prog.* 20 (2006) 1015–1024, <https://doi.org/10.1021/bp034380c>.
- [30] K. Murakami, R. Tsubouchi, M. Fukuyama, T. Ogawa, M. Yoshino, Oxidative inactivation of reduced NADP-generating enzymes in *E. coli*: iron-dependent inactivation with affinity cleavage of NADP-isocitrate dehydrogenase, *Arch. Microbiol.* 186 (2006) 385–392, <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0133-1>.
- [31] S. Obruca, I. Marova, Z. Svoboda, R. Mikalíková, Use of controlled exogenous stress for improvement of poly(3-hydroxybutyrate) production in *Cupriavidus necator*, *Folia Microbiol.* 55 (2010) 17–22, <https://doi.org/10.1007/s12223-010-0003-z>.
- [32] Y.M. Jung, Y.H. Lee, Utilization of oxidative pressure for enhanced production of poly- β -hydroxybutyrate and poly(3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) in *Ralstonia eutropha*, *J. Biosci. Bioeng.* 90 (2000) 266–270, [https://doi.org/10.1016/S1389-1729\(00\)80080-8](https://doi.org/10.1016/S1389-1729(00)80080-8).
- [33] W. Blunt, R. Sparling, D.J. Gapes, D.B. Levin, N. Cicek, The role of dissolved oxygen content as a modulator of microbial polyhydroxyalkanoate synthesis, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 34 (8) (2018) 106, <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2485-6>.
- [34] M. Jaremko, J. Yu, The initial metabolic conversion of levulinic acid in *Cupriavidus necator*, *J. Biotechnol.* 155 (2011) 293–298, <https://doi.org/10.1016/j.biotech.2011.07.027>.
- [35] M. Kamioka, Y. Kawaguchi, Y. Doi, Production of biodegradable copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *A. eutrophus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30 (1989) 569–573, <https://doi.org/10.1007/BF00250361>.
- [36] M. Kamioka, Y. Doi, Thermal degradation of microbial copolyesters: Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate), *Macromolecules*. 23 (7) (1990) 1933–1936, <https://doi.org/10.1021/ma00209a009>.
- [37] A. Kowalczyk, K. Meisner, M. Mihalic, W. Zellinger, I. Frits, W. Fuchs, B. Drog, Characterization of polyhydroxyalkanoates produced by *Synechocystis salina* from digestate supernatant, *Int. J. Biol. Macromol.* 102 (2017) 497–504, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.054>.
- [38] M. Kamiz, H. Billman-Jacobe, D. McNaughton, Quantitative Determination of the Biodegradable Polymer Poly(β -hydroxybutyrate) in a Recombinant *Escherichia coli* Strain by Use of Mid-Infrared Spectroscopy and Multivariate Statistics, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (8) (2000) 3415–3420, <https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3415-3420.2000>.
- [39] P. Sedláček, E. Šlaminová, V. Enev, M. Köller, J. Nebesarova, I. Marova, K. Hrubanova, V. Krzyzaniak, O. Samek, S. Obruca, What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103 (4) (2019) 1905–1917, <https://doi.org/10.1007/s00253-018-09584-z>.
- [40] G. Adamus, W. Sikorska, M. Kowalczyk, M. Montano, M. Scandola, Sequence distribution and fragmentation studies of bacterial copolyester macromolecules: Characterization of PHBV macroinitiator by electrospray ion-trap multistage mass spectrometry, *Macromol.* 33 (16) (2000) 5797–5802, <https://doi.org/10.1021/ma000055g>.

11.2 Příloha II

NOVÁČKOVÁ, I.; HRABALOVÁ, V.; SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; SAMEK, O.; KOLLER, M.; KRZYZANEK, V.; HRUBANOVÁ, K.; NEBESÁŘOVÁ, J.; OBRUČA, S. The role of polyhydroxyalkanoates in adaptation of *Cupriavidus necator* to osmotic pressure and high concentration of copper ions. *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*, 2022, roč. 206, č. 5, s. 977–189. ISSN: 0141-8130.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomac

The role of polyhydroxyalkanoates in adaptation of *Cupriavidus necator* to osmotic pressure and high concentration of copper ions

Ivana Novackova^a, Vendula Hrabalova^a, Eva Slaninova^a, Petr Sedlacek^a, Ota Samek^b,
Martin Koller^{c,d}, Vladislav Krzyzanek^b, Kamila Hrubanova^b, Katerina Mrazova^b,
Jana Nebesarova^{e,f}, Stanislav Obruca^{g,h}

^a Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Parkyova 118, 612 00 Brno, Czech Republic

^b Institute of Scientific Instruments of the Czech Academy of Sciences, v.v.i., Kralovopolska 147, 612 64 Brno, Czech Republic

^c Research Management and Service, c/o Institute of Chemistry, NAWI Graz, University of Graz, Heinrichstrasse 28/IV, 8010 Graz, Austria

^d ARENA Arbeitsgemeinschaft für Ressourcenschonende & Nachhaltige Technologien, Inffeldgasse 21b, 8010 Graz, Austria

^e Biology Centre, The Czech Academy of Sciences, v.v.i., Branisovska 31, 370 05 Ceské Budejovice, Czech Republic

^f Faculty of Science, Charles University, Vitavska 7, 128 43 Prague 2, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:

Adaptation
Cupriavidus necator
Heavy metals
Osmotic stress
Polyhydroxyalkanoates
Stress condition

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are abundant microbial polyesters accumulated in the form of intracellular granules by numerous prokaryotes primarily as storage of carbon and energy. Apart from their storage function, the presence of PHA also enhances the robustness of the microbial cells against various stressors. In this work, we investigated the role of PHA in *Cupriavidus necator*, a model organism concerning PHA metabolism, for adaptation to osmotic pressure and copper ions. In long-term laboratory evolution experiments, the bacterial culture was cultivated in presence of elevated doses of sodium chloride or copper ions (incubations lasted 78 passages for Cu²⁺ and 68 passages for NaCl) and the evolved strains were compared with the wild-type strain in terms of growth and PHA production capacity, cell morphology (investigated by various electron microscopy techniques), activities of selected enzymes involved in PHA metabolism and other crucial metabolic pathways, the chemical composition of bacterial biomass (determined by infrared and Raman spectroscopy) and also considering robustness against various stressors. The results confirmed the important role of PHA metabolism for adaptation to both tested stressors.

1. Introduction

Under unbalanced conditions, numerous bacteria and Archaea are able to synthesize and accumulate polyhydroxyalkanoates (PHAs), linear polyesters of hydroxyalkanoic acids, in the form of intracellular granules [1]. PHAs serve them as a source of carbon, energy and reducing power [2,3]. It has been reported that PHA producing bacterial strains are often much more robust and resistant against various stress factors such as temperature out of optimum [4–6], freezing [7,8], radiation [9], changes in pH value [10], osmolarity [9,11], ethanol, H₂O₂ [12,13], presence of xenobiotics [14] or selected heavy metals [15], nutrient availability [16] and others.

Despite numerous favorable material properties of PHAs (renewable origin, biodegradability, biocompatibility, etc.), their application potential is limited by a high production price [17]. Generally, there are

several possibilities to reduce the production cost, one of them is represented by using inexpensive carbon sources originating from waste substrates [18], employing overproducing bacterial strains [19,20], extremophiles [21] or using improved “traditional” PHA production strain [22,23]. Improvement in production and biotechnological approaches can be achieved by targeted methods of genetic engineering. Alternatively, also the non-targeted approach of evolutionary engineering relying on the selection of the desirable phenotypes during long-term laboratory evolutions can be adopted. Actually, since PHA plays an important role in the stress response of bacteria to various stressors, utilization of stress-directed evolutionary engineering experiments to obtain PHA overproducing strains seems to be a reasonable strategy. It was recently reported that PHA overproducing strains of the Gram-negative soil bacterium *Cupriavidus necator* (formerly *Ralstonia eutropha*, *Wautersia eutropha*, *Alcaligenes eutrophus*, or *Hydrogenomonas*

* Corresponding author.

E-mail address: obruca@fch.vut.cz (S. Obruca).

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.102>

Received 16 December 2021; Received in revised form 24 February 2022; Accepted 16 March 2022

Available online 19 March 2022

0141-8130/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

eutropha), the most studied PHA accumulating strain, adapted to levulinic acid, can be obtained employing principles of evolutionary engineering [24].

Changes in osmolarity belong among the most common stress factors of numerous environments. This is the reason why almost all prokaryotes, especially those located in soil or in water, had to develop mechanisms to deal with the consequences of osmotic stress [25]. It has been recently reported that accumulation of PHAs shields bacteria from adverse effects of osmotic fluctuations [16]. Moreover, since PHA synthesis is a very common feature among halophiles including extremely halophilic Archaea ('haloarchaea'), it was suggested that PHA accumulation serves as a potential strategy associated with adaptation of prokaryotes to high salinity environments [11,26]. Further, it was also observed that the exposition of various microbial cultures to mild osmotic pressure supports PHA accumulation. For instance, it has been reported that supplementation of cultivation medium by appropriately dosed osmotic pressure substantially enhances PHA accumulation in *C. necator* [12,27], in cyanobacterium *Spirulina subsalsa* [28], or in the Gram-positive PHA producer *Bacillus megaterium* uyuni S29 [29]. Furthermore, the application of osmotic challenge can also be utilized to enrich mixed microbial consortia in PHA producers [30].

Exposition to heavy metals represents another important stress condition commonly faced by bacteria [31,32]. Their presence is connected predominantly with anthropogenic activities such as factories processing metals, pollutants from traffic and others [33]. Toxic effects of metals are complex and involve numerous modes of action, e.g., displacement of essential minerals, due to the formation of biologically multifunctional complexes. The toxicity of heavy metals is also connected with their unfilled d-orbitals, which, on the other hand, makes them successful candidates for electron-transporting reactions such as modifications of substrates connected with the transport of electrons and protons across the whole metabolism. That is the reason why selected metals with proper electrochemical potential serve as cofactors of oxidoreductases [34]. One of these heavy metals is copper which, on the one hand, plays essential metabolic roles but, on the other hand, may cause harm by the formation of hydroperoxide radicals [35] and their reaction with the cell membrane [36]. The most significant role of copper in metabolism lies in copper/zinc superoxide bismutase, cytochrome c oxidase and related enzymes – participating as the terminal step of the respiratory chain of many organisms via reaction of oxygen-dependent oxidases [34,37]. For selected microorganisms, copper resistance is quite often encoded on the plasmid level [34]. *Cupriavidus necator* H16 belongs to a group of copper-resistant bacteria which is even reflected in its genus name, since *Cupriavidus* stands for "copper-loving", and a couple of studies dealing with enhanced PHA production in presence of copper ions have been published. In *C. necator* exposition to heavy metal ions including copper ions substantially enhanced PHA synthesis [12,38], which might indicate an important role of PHA for adaptation to heavy-metals-induced stress. In the genome of *Cupriavidus necator* H16, all the genes relevant for copper resistance are localized on chromosomes, which differs from some microbial strains with resistance encoded on plasmid DNA [39]. Copper chaperone PCu(A) C is localized on chromosome 1, while almost all other involved genes are localized on chromosome 2. Seven enzyme-encoding genes were classified within chromosome 2, when more types were classified, for instance, copper-binding protein, copper oxidase transforming Cu(I) to Cu(II) ions, copper resistance proteins with unspecified function, copper homeostasis membrane protein, proteins with the regulatory mechanism of transcription and others [40].

In this work, we performed long-term evolutionary experiments in which the microbial culture of *C. necator* was exposed to hypertonic pressure induced by NaCl and Cu^{2+} ions. To explore the importance of PHA for adaptations of the bacterial culture to the selected stressors and also to evaluate the biotechnological potential of evolved strains, the obtained cultures were characterized in terms of PHA accumulation capacity. Furthermore, the morphology of the bacterial cells was

investigated by various techniques of electron microscopy, activities of selected key enzymes of crucial metabolic pathways were assayed and last but not least, the structural variation among the strains was also assessed by Infrared and Raman spectroscopy.

2. Material and methods

2.1. Microorganisms and cultivations

A freeze-dried bacterial culture of *Cupriavidus necator* H16 CCM 3726 was obtained from the Czech Collection of Microorganisms, Brno, Czech Republic.

Cultivations for inoculum preparation were performed in 100 mL Erlenmeyer flasks in the Nutrient Broth medium (peptone 10.0 g/L, beef extract 10.0 g/L, NaCl 5.0 g/L) during 24 h at 30 °C with constant shaking at 180 rpm. Mineral medium was used for evolutionary experiments and also for other cultivations; the composition of this medium was $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3 g/L), KH_2PO_4 (1.05 g/L), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (11.1 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2 g/L) and 1 mL/L of microelement solution (MES) which consists of $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (9.7 g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (7.8 g/L), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.156 g/L), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.119 g/L) and NiCl_2 (0.118 g/L) in 0.1 M HCl. The cultivations were performed in 250 mL Erlenmeyer flasks with 100 mL medium under permanent shaking at 180 rpm at 30 °C for the required time (48 or 72 h); after the cultivations were stopped, cells were harvested and analyzed.

2.1.1. Determination of optimal dose of tested stressors

At first, selected stressors were tested considering the strength and impact of stress conditions. Cultivations were performed in 250 mL Erlenmeyer flasks with 100 mL of culture, four concentrations have been tested for both stressors; 10, 15, 20 and 25 g/L of NaCl and 5, 10, 30 and 50 mg of copper ions Cu^{2+} /L supplied in the form of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. During the 72 h lasting experiment, the optical density (OD) of the culture was measured spectrophotometrically (Nanophotometer Implen P300) at wavelength $\lambda = 630$ nm against distilled water as zero reference.

2.1.2. Evolutionary engineering experiment

Based on the results of the previous experiment, optimal doses of stressors have been chosen for the adaptation experiment during the evolutionary engineering process, specifically 20 g/L of NaCl representing osmotic stress and 30 mg of Cu^{2+} /L (in the form of 118 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) representing heavy metal challenge. During the long-term evolutionary engineering cultivations, the bacterial culture was cultivated in the presence of the particular stress factor (20 g/L NaCl or 30 mg/L Cu^{2+}), the aliquot of culture was transferred into the fresh medium after each 48 h of the cultivation at an inoculation ratio of 1:10; 78 passages were performed for copper stress and 68 passages in case of NaCl-induced stress.

For further analysis of the evolved strains, cultures were inoculated from preserved cryocultures into Nutrient Broth medium with ten times lower dose of stressor (addition of 2 g/L NaCl or 3 mg/L of Cu^{2+}) against doses applied for cultivation in mineral salts medium (20 g/L NaCl or 30 mg/L of Cu^{2+}). After 24 h of cultivation at 30 °C and 180 rpm, mineral media with stressors were inoculated in the same way as in the case of the evolutionary experiment by 10 (v/v) % of individual inoculum. While for evolutionary experiments and biochemical characterization cells were harvested and analyzed after 48 h of cultivation, for other techniques including electron microscopy, Raman spectroscopy, FT-IR and SEC-MALS cultivations were analyzed after 72 h.

2.2. Analytical methods

2.2.1. Basic screening of each passage

Basic screening of every passage involved the determination of biomass both spectrophotometrically (Implen, P 300) at $\lambda = 630$ nm and

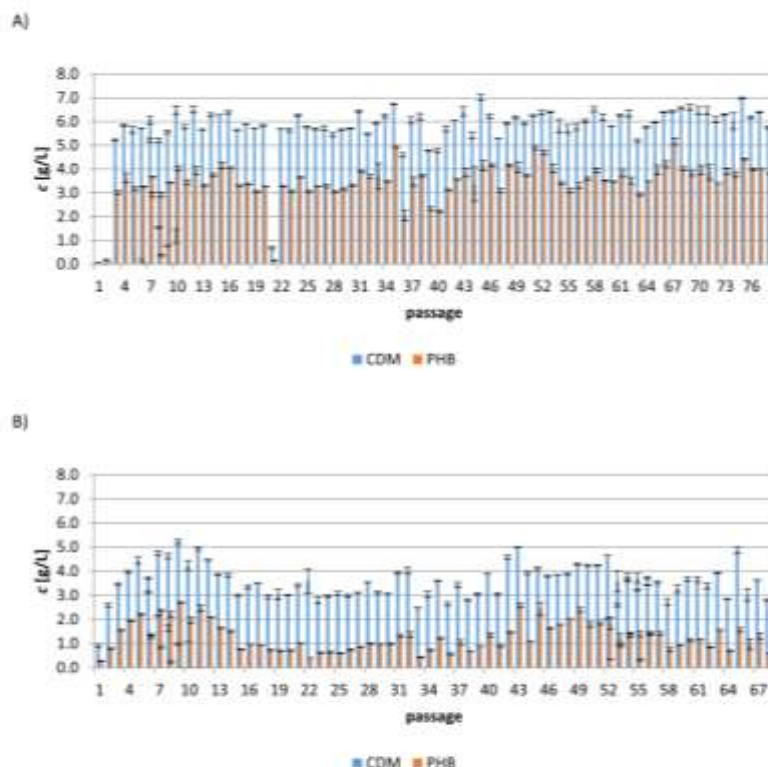


Fig. 1. Basic screening of cultures during evolutionary engineering process – A) copper ions (Cu^{2+}), B) NaCl.

gravimetrically. Microbial culture (10 mL) was centrifuged (6000 rpm, 5 min, Hettich EBA 200), washed with distilled water, and centrifuged once more; this determination was done in duplicate for each sample. Then pellets were dried to constant mass and concentration of biomass was expressed in g/L as cell dry mass (CDM). PHA content and composition in dry biomass was determined using gas chromatography (Trace 1300, Thermo Scientific, column: DB-WAX 30 m by 0.25 mm) with flame-ionization detector (GC-FID) as reported previously in Brandtl et al. [41].

2.2.2. Characterization of evolved strains

Aside from the basic screening, selected passages were subjected to in-depth analysis using advanced techniques such as Raman spectroscopy, size-exclusion chromatography with multi angle light scattering detection (SEC-MALS), FTIR spectroscopy and also various approaches of electron microscopy (e.g., cryo-scanning electron microscopy - cryo-SEM, and transmission electron microscopy - TEM). At first, biochemical characterization of evolved strains, as well as the original wild-type strain exposed to the same conditions as evolved strains, was performed by measuring specific enzyme activities of selected key enzymes involved in the crucial metabolic pathways like citric acid cycle (TCA), glyoxalate shunt, and poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) biosynthesis (citrate synthase - CS; NAD-dependent isocitrate dehydrogenase - NAD-IDH; malate dehydrogenase - MDH; malate synthase - MS; glucose-6-phosphate dehydrogenase - G6PD; NADP-dependent isocitrate dehydrogenase - NADP-IDH; malic enzyme - ME; 3-ketothiolase - 3-KTI; acetoacetyl-CoA reductase - AACoAR; PHB synthase) using spectrophotometric methods in multiplates ELISA reader (BioTek, ELx808). Assays, which were used for the determination of activities of selected enzymes, were in detail described previously [24].

2.2.3. SEC-MALS

For SEC-MALS analysis at first polymer were extracted using chloroform (approx. 30 mg/mL) as solvent at 70 °C in vials overnight. After filtration of cooled down mixture, a solvent-cast film of the polymer was obtained by free evaporation of solvent. Then, approximately 4.5 mg of this PHB foil was dissolved in 1.5 mL of chloroform at 70 °C (final concentration 3 mg/mL). After dissolving of the whole foil, the sample was filtered using nylon syringe filters with 0.45 μm porosity into new vials. Prepared samples were analyzed using size-exclusion chromatography (SEC; column PLgel 5 μm , 300 by 7.5 mm, Agilent Technologies) with MALS detection (DAWN HELEOS II) and different refractometer (OPTILAB T-REX, Wyatt Technology).

2.2.4. Raman spectroscopy

Raman spectroscopy was used for visualization of the “fingerprint” of whole cells considering the contents of PHB, proteins, lipids, nucleic acids, etc. For this purpose, cultures were centrifuged (6000 rpm, 5 min, Hettich EBA 200) and cells were deposited onto sapphire glass in three parallel spots. After drying at 70 °C, samples were analyzed by Renishaw InVia system (Renishaw inVia Raman Spectrometer, Renishaw plc., Wotton under Edge, UK), using a 785 nm single-mode diode laser as the excitation source. Foculation of the laser beam was provided by microscope objective (50 \times , NA 0.5, Leica, Wetzlar, Germany), where the spot of laser has a diameter of approx. 2 \times 10 μm . Spectra were acquired in the range of 700–1800 cm^{-1} . Every spot has been measured for 15 s, and spectra were generated [42].

2.2.5. Infrared spectroscopy

Aside from the Raman spectroscopy, Infrared spectroscopy with Fourier transformation (FTIR) (Nicolet, Nicolet iS50) was used for

screening of potential changes in the molecular structure of the cells induced by the adaptation experiments. FTIR spectra of the dried biomass (drying to constant mass at 70 °C) were collected with iSSO FTIR spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). All measurements were taken at ambient temperature with the built-in single-reflection diamond attenuated total reflectance (ATR) crystal. An individual absorption spectrum was collected as an average of 16 scans with a resolution of 4 cm⁻¹ (data spacing 0.5 cm⁻¹). Each culture was analyzed at 5 (FTIR) or 15 (Raman) spots randomly distributed on a sample of dried biomass. For individual cultures, biomass samples were always prepared in triplicate. In order to reveal spectral differences among the individual samples (wild type, wild type under stress condition and the adapted ones), the whole-spectra Principal component analysis (PCA) was performed using a standard multivariate principle component program written in-house using MATLAB software (MathWorks, Natick, MA, USA) at the Institute of Scientific Instruments, Czech Academy of Sciences [43]. Prior to PCA, spectra were processed by the same program using Rolling circle algorithm of background correction (radius: 300 cm⁻¹, number of passes: 5) and normalized (normalization frequencies: 1640 cm⁻¹ for FTIR, 1350 cm⁻¹ for Raman).

2.2.6. Electron microscopy

Bacterial cultures were centrifuged for 3 min at 3000 rpm. For cryo-SEM, concentrated pellet of cells was pipetted onto 6 mm aluminium carries of 4 µL volume without any cryo-protectant. For TEM, samples were pipetted on 3 mm Cu/Au of 0.6 µL volume carriers pre-treated with 1% solution of lecithin in chloroform. Samples were then fixed using a high-pressure freezer (EM ICE, Leica Microsystems).

6 mm carriers were transferred under liquid nitrogen into cryo-vacuum preparation chamber (ACE600, Leica Microsystems) and freeze-fracturing and sublimation (7 min, -95 °C) was performed. Samples were then transferred under vacuum using a shuttle (EM VCT100, Leica Microsystems) into a scanning electron microscope (SEM) equipped with cryo-stage (Magellan 400/L, FEI) for observation at -120 °C using 1–2 keV electron beam without any coating.

3 mm carriers were transferred under liquid nitrogen into a freeze substitution unit (EM AFS2, Leica Microsystems). The used protocol for freeze substitution was previously described in [44]. After freeze substitution, samples were heated to room temperature, washed 3 times in acetone (15 min each) and infiltrated in medium-hardness epoxy resin (Epoxy embedding medium kit, Sigma-Aldrich). Mixtures of acetone and resin in ratios 1:2; 1:1; 2:1; 1:0 were changed after 1 h and then left under vacuum overnight in fresh pure resin. After the final exchange of pure resin, samples were cured at 62 °C for 48 h. Embedded samples were cut to ultrathin sections using a diamond knife with a cutting angle of 45° (Diatome) and ultramicrotome UTC Ultracut (Leica Microsystems), sections on microscopic grids were stained using solutions of uranyl acetate and lead citrate and observed in the transmission electron microscope JEOL 1010 (JEOL) using accelerating voltage 80 kV.

2.3. Statistical analysis

All cultivations were performed in triplicates. Results of the growth and biomass analyses provided in Table 2 and Fig. 1 represent the average value ± standard deviation of the triplicates. Results of the biochemical assays were analyzed by Pearson correlation analysis and PCA in Microsoft excel (Microsoft, USA) and XL-stat (Addinsoft, France). Results of these analyses are shown in Table 3 and Fig. 4. PCA was used as an unsupervised method for revealing similarities and dissimilarities between the analyzed strains.

The whole-spectra PCA analysis of FTIR and Raman spectra was performed using a standard multivariate principle component program written in-house using MATLAB software (MathWorks, Natick, MA, USA) at Institute of Scientific Instruments, Czech Academy of Sciences Brno [43]. Origin 2019b (OriginLab, Northampton, MA, USA) was used to visualize the resulting PCA bi-plot and component loading plots

(Figs. 5 and 6).

3. Results and discussion

3.1. Laboratory evolution of *C. necator*

To investigate the importance of PHA for adaptation to Cu²⁺ ions and osmotic pressure, we performed long-term laboratory adaptation to the selected stressors. Actually, evolutionary engineering employs several approaches to obtain evolved strains; experiments can exploit different intensity of stress when lower concentration often leads to gradual optimization of the phenotype of evolved strain whereas high concentration can lead to substantial innovation in the phenotype of the strain [45], since exposition to high-stress dose results only in two possibilities for the cells – adapt or perish. Considering the intended long-lasting adaptation experiments, we decided to use concentrations of stressors, which partially inhibit but do not thwart the growth of the microbial culture. Therefore, we exposed the microbial cultures to various doses of Cu²⁺ ions (5, 10, 30 and 50 mg/L) and NaCl (10, 15, 20 and 25 g/L) and we have monitored the growth of the culture within 72 h of cultivation by regular inspection of the optical density of the cultures. Based on obtained growth curves, we selected optimal stressor doses of 30 mg/L of Cu²⁺ and 20 g/L of NaCl, which reduced the growth of the culture by about 50% when compared to the control setup (see Fig.S1).

Microbial culture of *C. necator* HI6 was repeatedly re-passaged (after 48 h) and cultivated in presence of optimized concentrations of the stressors. In the course of laboratory adaptation, we analyzed CDM and PHA content in bacterial biomass in each passage right before it was inoculated to the subsequent passage. Data are shown in Fig. 1; here, it can be observed that at the beginning of the adaptation process, cultures demonstrated low growth and also poor PHA accumulation, which is most likely caused by the inhibitory effect of stressors. Nevertheless, after several passages, the biomass as well as PHA concentrations substantially increased and remained comparable throughout the experiment. The process of adaptation was connected with significantly enhanced biomass growth since a higher content of bacterial biomass suddenly appears in the third passage for the copper stress (Fig. 1A); afterward the third passage, no more significant shifts appeared during the whole adaptation process. Along with biomass, also the amount of PHA in biomass increased, representing up to 70 wt% of CDM. For selected strains of *Azospirillum brasilense* it was proved that some heavy metals including copper (in the form of Cu²⁺) enhance PHA biosynthesis despite the fact that the cultivation was performed in a nutritionally balanced medium that does not meet the requirements for enhanced PHA biosynthesis, namely the presence of an excess of carbon source and limitation by other essential elements such as nitrogen. Therefore, the authors hypothesized that the accumulation of PHA is in this case associated to the protection against heavy metals [46].

The adaptation to osmotic stress (Fig. 1B) manifested a much slower trend than in the case of copper-induced stress (Fig. 1A). Moreover, the culture adapted to copper ions showed quite stable amounts of biomass (around 5.7 g/L) and PHB (around 3.5 g/L) during the entire process after the initial adaptation phase; in the case of the culture adapted to high salinity, the deviations in further stages of the experiment were much more significant. The culture adapted to NaCl demonstrated the best growth and the highest PHA production capability immediately after the initial adaptation phase; later on, both monitored parameters slightly decreased and fluctuated.

3.2. Comparison of growth characteristics of evolved strains and wild-type strain with and without exposure to stress

For comparison of evolved strains from last passages with the wild-type strain, the strains were cultivated during 72 h in media in the presence or absence of stress factors, and the growth of the microbial cultures was screened by the OD of the cultures. All cultures were

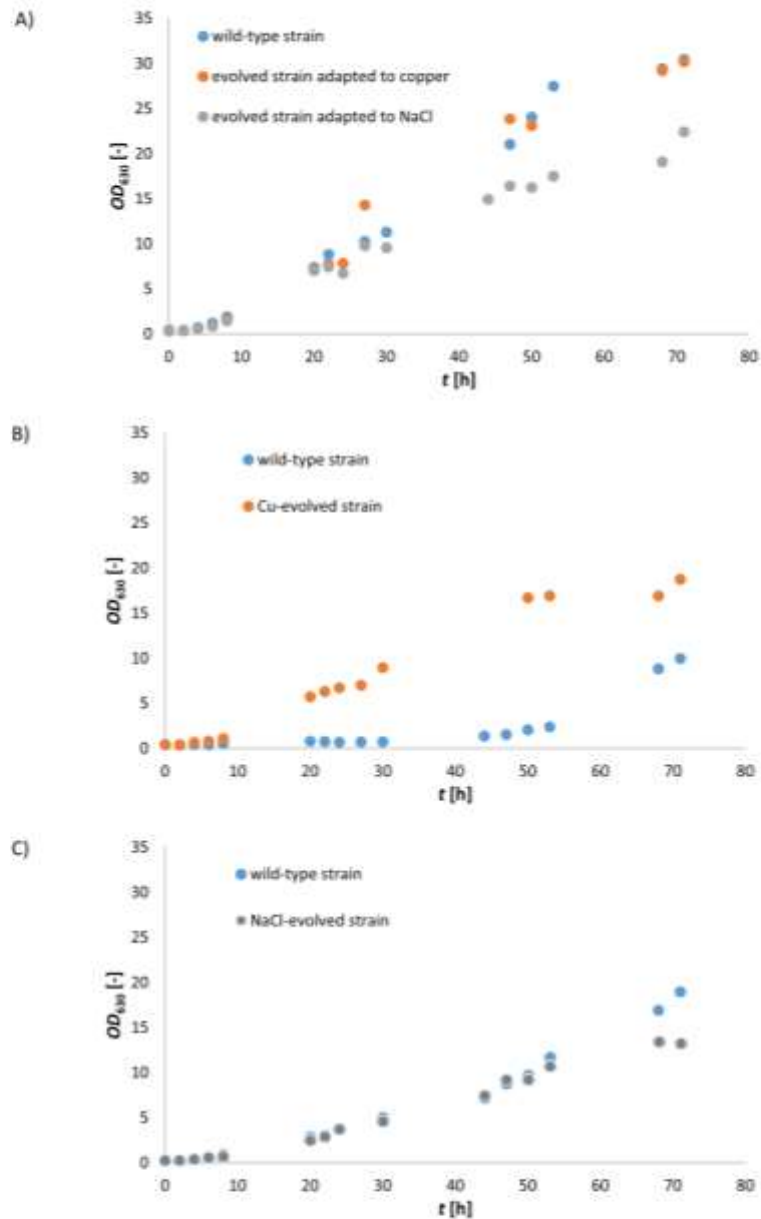


Fig. 2. Growth of wild-type and evolved strain cultures during 72 h under different conditions – A) media without stress, B) copper stress (30 mg/L Cu²⁺), C) osmotic stress (20 g/L NaCl).

cultivated in triplicate to obtain relevant data; in Fig. 2 average values were considered. At the start of this experiment, it was assumed that adapted strains would show more significant growth than the wild-type strain, at least in stressor-containing media; moreover, we also expected generally enhanced robustness and growth capacity of evolved cultures [47].

Based on data shown in Fig. 2A it is demonstrated that the assumption of enhanced general robustness of adapted strains in cultivation media without the stress factors was not correct, especially for the strain

adapted to NaCl, which showed the worst growth performance from 48th hour of the cultivation till the end of the experiment. The culture adapted to copper showed similar growth characteristics as the wild-type strain.

The most significant influence of the adaptation process was recorded in the case of cultivation in the presence of copper (Cu²⁺ 30 mg/L) (Fig. 2B). Whereas the wild-type strain showed a very long lag-phase (about 44 h) and generally poor growth, the evolved strain was characterized by fast growth and two-times higher value of optical density,

Table 1
Comparison of specific growth rates of the wild-type strain and evolved strains during cultivation without stress and under copper and osmotic stress.

Conditions	Capriavidus necator strain H16	Specific growth rate [h ⁻¹]
Medium without stress	Wild-type	0.524
	Cu-evolved strain	0.469
	NaCl-evolved strain	0.310
Copper stress (30 mg/L Cu ²⁺)	Wild-type	0.343
	Cu-evolved strain	0.368
Osmotic stress (20 g/L NaCl)	Wild-type strain	0.280
	NaCl-evolved strain	0.222

which indicates substantially faster growth. Despite the positive effect of the adaptation, copper still caused partial inhibition of the growth even of adapted culture; the maximal value of OD in medium without stress was around 30 for both the copper adapted and the wild-type strain, whereas in the presence of copper the maximal value for the adapted strain was around 20, which represents a reduction of final cell density by about 30%.

Growth of the wild-type strain together with NaCl-evolved strains was also compared in the presence of sodium chloride (20 g/L) in media (Fig. 2C). Generally, the strain adapted to osmotic stress exerted by 20 g/L of NaCl did not manifest any differences in growth characteristics compared with the wild-type strain in presence of the NaCl. Considering the comparison of growth in media without stressors, the strain adapted to NaCl seems to be overall less robust than the wild-type strain. There is a possibility of adaptation on a different level, not only in growth, which will be discussed further in the text.

Moreover, we can compare also specific growth rates based on obtained curves, which describe increase of the number of cells during the exponential phase (Table 1). From the data, we observed that the best performances were shown by the wild-type strain in medium without stress (0.524 h⁻¹), whereas the poorest growth was observable for the strain adapted to osmotic stress in the presence of stressor NaCl (0.222 h⁻¹). The strain adapted to osmotic stress showed worse growth in medium without stress than both cultures exposed to copper stress that was connected with the bad condition of the culture.

3.3. Biochemical characterization of evolved strains and their comparison with the wild-type strain

The strains were biochemically characterized via measurement of activities of selected key enzymes from different branches of the metabolism. Considering possible adaptation strategies, we focused predominantly on enzymes involved in central energetic metabolism including the Krebs cycle (tricarboxylic acid cycle - TCA) and the glyoxylate shunt, but we also selected NADPH-generating enzymes and enzymes active in the pathway catalyzing PHB biosynthesis (Fig. 3). Apart from the determination of the activities of selected enzymes, we have also determined biomass yields, PHA titers and PHA content in biomass as well as the molecular mass of the produced polymers; all the results are provided in Table 2.

Based on data for specific enzyme activities it can be assumed that exposition to copper stress leads to enhanced activity of NADPH generating enzymes, especially NADP-IDH and ME, which is typical for response to oxidative stress [48]; it was observed before that heavy metals such as Cu²⁺ can contribute to the generation of oxidatively reactive species, thus causing oxidative pressure [49]. Cofactors in the reduced forms (especially NADPH) are involved in securing cells against oxidative stress because they create a suitable environment for the regeneration of molecules (such as glutathione), thus fueling detoxification processes with reduction equivalents [50]. Together with protection against oxidative stress, NADPH represents a promising reductive surrounding suitable for numerous anabolic biosynthetic processes, such as the PHA biosynthetic pathway, where NADPH gets converted to NADP⁺ during the “pseudofermentative reaction” step (reduction of acetoacetyl-CoA to (R)-3-hydroxybutyryl-CoA). Considering values of specific enzyme activities of individual strains, both the wild-type as well as the adapted culture exposed to Cu²⁺ manifested higher activities of NADPH producing enzymes as compared to control (wild-type strain not exposed to the stressor). As has been already mentioned, since Cu²⁺ ions are known to induce oxidative pressure, enhanced activities of NADPH producing enzymes are not surprising. Moreover, this effect can also be connected with enhanced respiratory activity, which is indicated by increased activity of some enzymes of the Krebs cycle, namely NAD-IDH (9910 ± 78 U/mg) in case of the wild-type strain under copper stress or MDH in case of the evolved strain exposed to the same stress conditions (1794 ± 25 U/mg). Generally, we

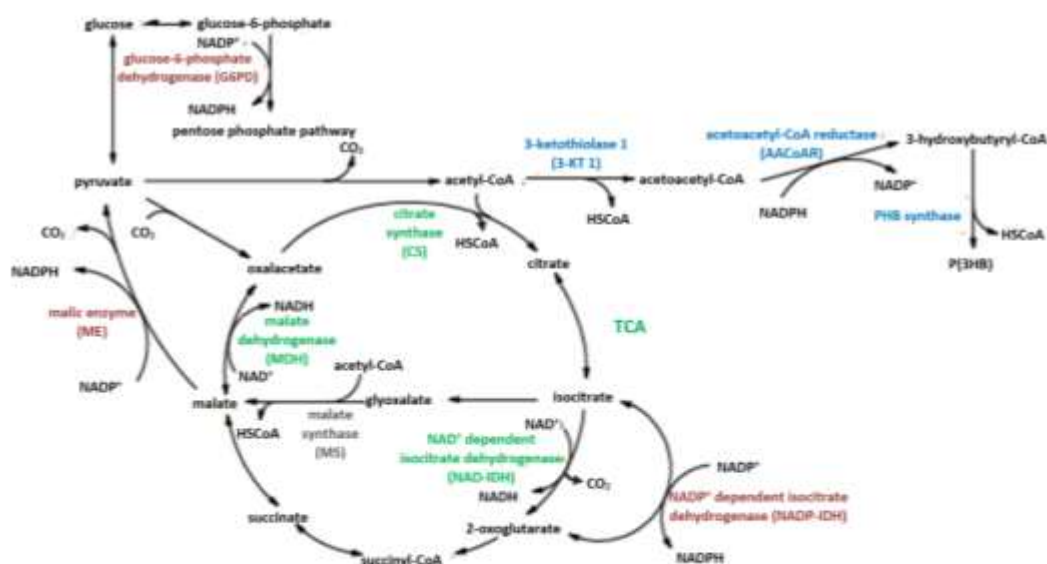


Fig. 3. The scheme of metabolic pathways investigated in biochemical characterization.

Table 2
Comparison of wild-type strain with evolved strains adapted to copper or osmotic stress.

Strain	Wild-type	Wild-type/ copper stress	Evolved strain/ copper stress	Wild-type/ osmotic stress	Evolved strain/ osmotic stress	
Determination of metabolic activity for selected pathways and enzymes						
Metabolic pathway	Enzyme	Specific enzyme activity [U/mg]				
Krebs cycle	CS	86 ± 2	221 ± 13	112 ± 8	457 ± 25	121 ± 9
	NAD-IDH	213 ± 4	9,310 ± 79	181 ± 5	403 ± 13	214 ± 15
	MDH	180 ± 6	206 ± 9	1,794 ± 15	189 ± 12	734 ± 14
Glyoxalate cycle	MS	149 ± 12	359 ± 21	61 ± 3	664 ± 21	252 ± 18
	G6PD	130 ± 11	206 ± 9	2,040 ± 40	190 ± 20	1,181 ± 34
NADP ⁺ dependent enzymes	NADP-IDH	790 ± 50	8,200 ± 100	1,921 ± 13	850 ± 40	1,440 ± 30
	ME	499 ± 9	3,430 ± 60	1,453 ± 13	490 ± 20	840 ± 20
	3-KT1	131 ± 6	255 ± 8	89 ± 9	210 ± 20	162 ± 13
PHA metabolism	AACoAR	370 ± 30	275 ± 12	490 ± 20	149 ± 12	61 ± 6
	PHB synthase	180 ± 40	170 ± 30	347 ± 8	208 ± 14	530 ± 30
Basic characteristics of strains after 72 hours of cultivation						
CDM [g/L]	8.30 ± 0.02	4.55 ± 0.02	6.03 ± 0.08	5.08 ± 0.02	4.57 ± 0.08	
PHB [wt. %]	58.32 ± 1.69	42.03 ± 0.11	55.55 ± 1.06	49.96 ± 0.45	28.34 ± 0.06	
Characterization of polymer (SEC-MALS)						
M _w [kDa]	435.16 ± 5.65	-	272.03 ± 0.61	-	349.51 ± 2.44	
PDI [-]	1.34 ± 0.03	-	1.35 ± 0.00	-	1.34 ± 0.02	

Acronyms of enzymes: CS – citrate synthase; NAD-IDH – NAD-dependent isocitrate dehydrogenase; MDH – malate dehydrogenase; MS – malate synthase; G6PD – glucose 6-phosphate dehydrogenase; NADP-IDH – NADP-dependent isocitrate dehydrogenase; ME – malic enzyme; 3-KT1 – 3-ketothiolase 1; AACoAR – acetoacetyl-CoA reductase.

Results are presented in the form: mean ± standard deviation.

Green highlighted numbers represent the most significantly increased specific enzyme activities, whereas red highlighted numbers represent more than two times lower activities.

CDM: cell dry mass; M_w: weight average molecular mass; PDI: polydispersity index

Acronyms of enzymes: CS – citrate synthase; NAD-IDH – NAD-dependent isocitrate dehydrogenase; MDH – malate dehydrogenase; MS – malate synthase; G6PD – glucose 6-phosphate dehydrogenase; NADP-IDH – NADP-dependent isocitrate dehydrogenase; ME – malic enzyme; 3-KT1 – 3-ketothiolase 1; AACoAR – acetoacetyl-CoA reductase.

Results are presented in the form: mean ± standard deviation.

Green highlighted numbers represent the most significantly increased specific enzyme activities, whereas red highlighted numbers represent more than two times lower activities.

CDM: cell dry mass; M_w: weight average molecular mass; PDI: polydispersity index.

observed different metabolic strategies of the wild-type strain and evolved strain in a medium containing Cu²⁺. In the wild-type strain, NADPH generation is implemented mainly by activation of NADPH-dependent enzymes of the Krebs cycle, while the adapted strain satisfied its needs for NADPH also via the enhanced activity of G6PD (2040 ± 40 U/mg against 130 ± 11 U/mg for wild-type strain).

Also, sudden exposition and/or adaptation to osmotic pressure results in the modulation of intracellular activities of selected enzymes. We observed enhanced activity of Krebs cycle enzymes, which is connected with cell respiration, in particular, the activity of CS was increased in wild-type strain exposed to the osmotic shock (457 ± 25 U/mg). Since CS and 3-KT1 compete for acetyl-CoA as a substrate, this could lead to the decrease of enzyme activity of 3-KT1; however, this fact was not observed. For the evolved strain, enzyme activity of MDH was substantially enhanced (734 ± 14 U/mg), whereas for the wild-type strain exposed to osmotic stress conditions (specific activity 189 ± 12 U/mg), the activity of MDH was comparable with control (180 ± 6 U/mg), despite the glyoxalate cycle leading to the formation of malate via MS, which was increased by more than four times. Enhanced activity of respiration leading to increased oxidative stress was manifested in enhancement of enzyme activity of an NADPH producing enzyme, namely G6PD (1181 ± 14 U/mg against 130 ± 6 U/mg for wild-type strain), which was observed only for the evolved strain. Differences in production of NADPH between wild-type strains in the presence or absence of hypertonic pressure were negligible.

Interestingly, the activities of all enzymes involved in PHB synthesis

(in particular PHB synthase) were enhanced in adapted cultures when the cultures were exposed to selected stressors (two-times for the culture adapted to copper and more than three-times for strain adapted to osmotic stress). This indicates the importance of PHB concerning adaptation to particular stressors. Nevertheless, despite enhanced activities of the enzymes involved in PHB synthesis, both adapted strains accumulated a lower amount of PHB than the control culture, and the polymer produced by the cultures also revealed substantially lower molecular mass as compared to control. These indications lead us to the hypothesis that not only PHB synthesis but also in PHA degradation is enhanced in evolved cultures. It is known that PHB metabolism reveals a cyclic nature – in cells, the polymer is simultaneously synthesized and also degraded, which results in presence of 3-hydroxybutyrate (3HB) (monomer of PHB) in cells [2]. Our results indicate that adaptation to both osmotic pressure and Cu²⁺ might be associated with enhanced turnover of the PHB cycle. This is not very surprising since it was described that 3HB acts as a potent chemical chaperone protecting biomolecules from denaturation by numerous factors including oxidative pressure induced by Cu²⁺ [51]. Moreover, 3HB is also considered to act as a compatible solute capable of compensating for high extracellular salt concentration [52]. Therefore, it seems that enhanced turnover of the PHB cycle may be a reasonable and robust strategy for adaptation to various stress conditions.

To better understand and interpret the metabolic consequences of adaptation of *C. necator* to NaCl and Cu²⁺, we utilized tools of statistical analysis. Data of enzyme activities were subjected to correlation analysis

Table 3
Results of correlation analysis based on specific enzyme activities.

Variable	CS	NAD-IDH	MS	MDH	G6PD	NADP-IDH	ME	3-KT1	AACoAR	PHB synthase
CS	1									
NAD-IDH	0.099	1								
MS	0.958	0.168	1							
MDH	-0.426	-0.344	-0.616	1						
G6PD	-0.451	-0.372	-0.599	0.980	1					
NADP-IDH	0.014	0.987	0.063	-0.194	-0.219	1				
ME	-0.006	0.980	0.031	-0.150	-0.182	0.999	1			
3-KT1	0.629	0.733	0.759	-0.725	-0.697	0.646	0.611	1		
AACoAR	-0.428	0.011	-0.630	0.496	0.332	0.071	0.119	-0.550	1	
PHB synthase	-0.366	-0.425	0.539	-0.313	0.695	-0.325	-0.327	-0.391	-0.384	1

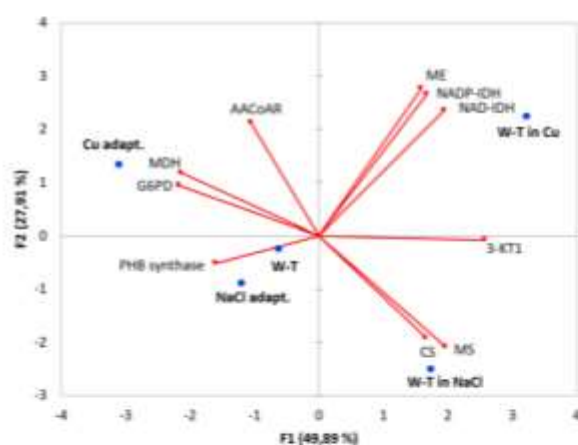


Fig. 4. Projection of specific enzyme activities and wild-type strain together with adapted strains based on PCA.

and principal component analysis (PCA).

Statistical analysis of specific enzyme activities based on the determination of Pearson correlation coefficient revealed five positive correlations (Table 3) (note: correlation was accepted if the value of coefficient was higher than 0.85). The highest correlation close to 1 has been observed between IDH (both NAD- as well as NADP-dependant) and ME, which can be connected with their involvement in subsequent enzymatic reactions within the TCA cycle and side reactions via anabolism and catabolism of malate. Moreover, NADP-IDH and ME produce NADPH, which, as mentioned above, is necessary also for PHB biosynthesis and to cope with oxidative pressure. The second strong correlation observed was between CS and MS that both require acetyl-CoA as the substrate. A positive correlation can indicate a predominance of catabolic metabolism, while in the case of the anabolism it can be assumed that malate originating from the glyoxylate cycle would be transformed to pyruvate instead of oxaloacetate continuing in TCA cycle together with the formation of reduced cofactor NADPH necessary for biosynthetic pathways. Statistic analysis identified positive correlation between MDH and G6PD but we are not aware of any metabolic explanation for this phenomenon. The connection between them could be through a total disposition of metabolism when the enhanced activity of TCA cycle and subsequently also cell respiration represented by high activity of MDH can be connected with total high metabolic activity and ratio of cell divisions. This suggested trend was observed for evolved strain adapted to copper stress, which showed higher biomass content than wild-type strain in copper stress considering the enhanced activity of G6PD. Last but not least, we also identified a strong positive correlation between NAD-IDH and NADP-IDH, which might be caused either by the fact that it is the same enzyme with low specificity to cofactor or there are different enzymes with different cofactor specificity but with a

very similar regulation mechanism.

The data of specific enzyme activities for all the tested strains were also subjected to PCA, which reduces the number of variables into individual factors, mutually independent variables. As input data, values of ten specific enzyme activities were used and then were reduced to three main components with eigenvalue >1. Selected principal components F1 (49.89%), F2 (27.91%) and F3 (13.82%) composed 91.61% of the variability of the original data set. For clarity, the best visualization based on the dispersion of variables and observations has been inferred in two-dimensional factor projection of principal components F1 and F2. Fig. 4 shows the factor score values of all analyzed strains (data groups) based on positive or negative correlations of the default variables (specific enzyme activities) with the main components F1 and F2. Based on visualized data connected with different and/or similar metabolic characteristics, we can observe the distribution of strains into all four quadrants, when an individual quadrant represents different metabolic strategies dependent on short-term or long-lasting adaptation process as can be also derived from correlations with individual enzymes. Whereas almost all strains separate into a different part of the graph, the wild-type strain seems to be metabolically closest to the strain adapted to osmotic stress. Of course, it is likely that different stress conditions lead to different metabolic strategies to cope with stress. The greatest distance can be observed between the wild-type strain not exposed to stress conditions and the wild-type strain exposed to copper. Whereas the wild-type strain positively connects with specific enzyme activity of PHB synthase and negatively with ME, NADP-IDH and NAD-IDH, quite the opposite was observed for the strain exposed to copper. As the result of acute stress, the wild-type strain in the presence of copper behaves differently than the adapted strain under the same conditions, indicating that the adaptation to particular stress conditions is associated with shift of the metabolism from acute stress response to “normal-like” metabolism.

3.4. Molecular spectroscopy characterization of the bacterial cultures

Aside from the altered metabolism of the adapted cultures, it was also considered whether and how the adaptation processes affect the molecular composition of the bacterial cells. For this purpose, the combination of FTIR and Raman analysis of the dried biomass samples was applied. Raw spectra were collected on different spots of culture triplicates, average spectra for all cultures are provided in Supplementary material (Fig. S2). These spectra show the spectral features typical for PHA-producing bacteria as described in detail in previous works [30,42,53]. To reveal potential spectral differences brought about via the respective stress exposure and/or the adaptation process, the processed (i.e., background corrected and normalized) spectra were subjected to PCA in the spectral range 1800–800 cm^{-1} . Results of this analysis are provided in Fig. 5 (FTIR) and Fig. 6 (Raman).

It can be seen that only the evolved culture adapted to high osmolarity shows independent clustering outside the region that corresponds to the wild-type culture both in FTIR and Raman PCA diagram. The independent clustering in PCA can be considered an evidence of

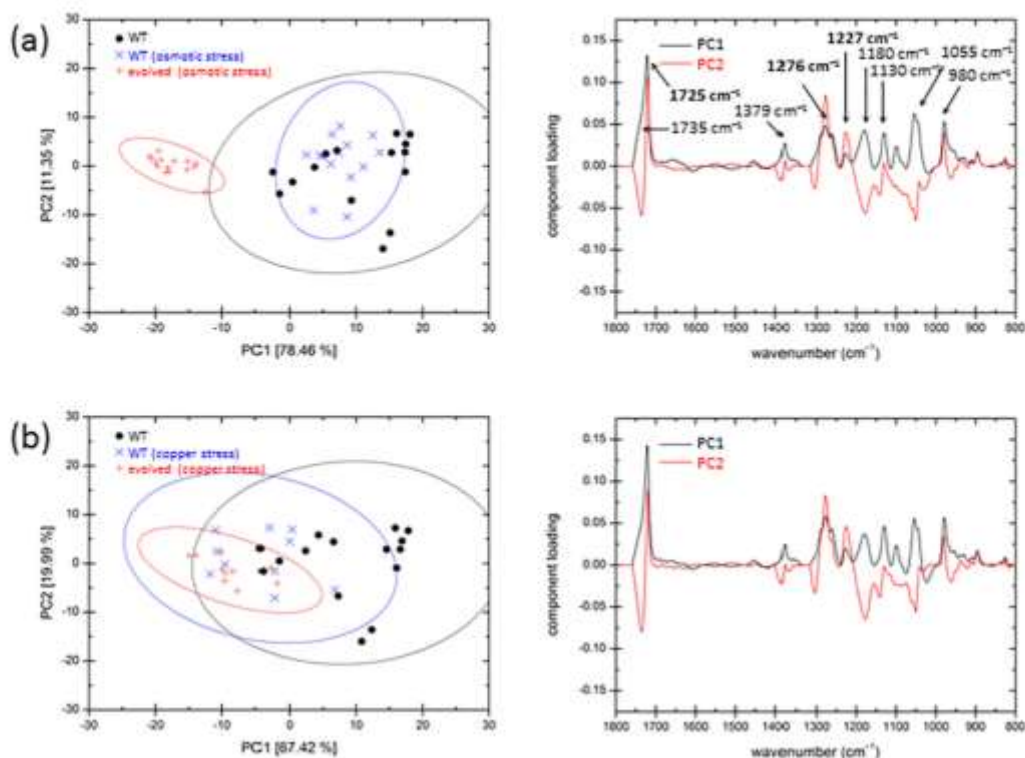


Fig. 5. Results of Principal Component Analyses of the sets of FTIR spectra of bacterial cultures: (a) wild type and cultures exposed/adapted to osmotic stress, and (b) wild type and cultures exposed/adapted to copper. The PCA was performed with all measured spectra. The value in the square bracket represents the relative variance that is composed in the respective principal component. Ellipses represent the 95% interval of confidence.

significant structural difference between the biomasses of the wild-type and evolved strains, respectively. Nevertheless, from the closer look into the loading of principal components that provides this separation, it can be seen that the variance between the cultures is contributed almost exclusively from the spectral signature of the PHB content. This can be illustrated by the contributions of the vibration bands corresponding to ester bonds such as C=O stretching (around 1730 cm^{-1} both in FTIR and Raman, 1180 cm^{-1} in FTIR) or C–O and C–O–C stretching (1276 , 1227 , and 1055 cm^{-1} in FTIR, 1261 , 1220 , 1101 and 1058 cm^{-1} in Raman) and also of C–H bending in side methyl groups of PHB (980 cm^{-1} both in FTIR and Raman, 1379 and 1130 cm^{-1} in FTIR, 1457 and 1401 cm^{-1} in Raman). Because no significant contribution of the other molecular components of the cell such as proteins, nucleic acids etc. can be found in the principal components' loadings, the independent clustering of the NaCl-evolved culture can be ascribed to its lower overall PHB content confirmed also by GC-FID analysis (see Table 2). No specific alteration in content or molecular structure of other cellular components resulting from the adaptation process was revealed by the spectroscopic assay.

Nevertheless, aside from the quantitative information about the content of PHB in the cells, it has been demonstrated in previous works [30,42,53] that vibration spectroscopy can also provide valuable information concerning its physical structure because intensity and shape of some of the vibration bands of PHB change with the level of its crystallinity. These bands are marked in bold in Figs. 5 and 6. It has also been suggested that the ability to maintain intracellular PHA in native amorphous form represents an important contribution to the stress-resistance of bacteria [53,54]. Therefore, the interpretation of data collected in the spectral assay further focused on comparing the

crystallinity of PHB in dry biomass of the individual cell cultures. It should be emphasized that the crystallization of originally amorphous intracellular PHB in the biomass was induced by the high-temperature ($70\text{ }^{\circ}\text{C}$) drying of the cultures. As the specific crystallinity marker, ester C=O stretching band at about 1730 cm^{-1} was selected, which is both FTIR and Raman active and is known to change the symmetrical shape centered at about 1735 cm^{-1} that corresponds to amorphous polyester to highly asymmetric redshift- deformed band with maximum intensity at about $1725\text{--}1720\text{ cm}^{-1}$. Results of the spectroscopic evaluation of biomass crystallinity is shown in Fig. S3. It can be seen that the NaCl-evolved culture shows significantly lower crystallinity of PHB in dried biomass as compared to the wild-type culture as proved by both FTIR and Raman analysis (confirmed by *t*-test at confidence level 0.95). This may represent an interesting confirmation of the increased stress robustness of the NaCl-evolved culture. Nevertheless, the lower content of PHB in the NaCl-evolved culture should also be taken into account, because the susceptibility to crystallization is higher for the intracellular PHB granules occurring in close proximity to each other as this enables their effective aggregation during the crystallization process [54]. It can be seen in supplementary material that there is a moderate correlation between spectral signal proportional to intracellular content of PHB and the crystallinity marker in the overall set of measured spectra (see Fig. S3). Therefore, the enhanced resistance of the NaCl-evolved culture against stress-induced PHB crystallization needs further experimental verification.

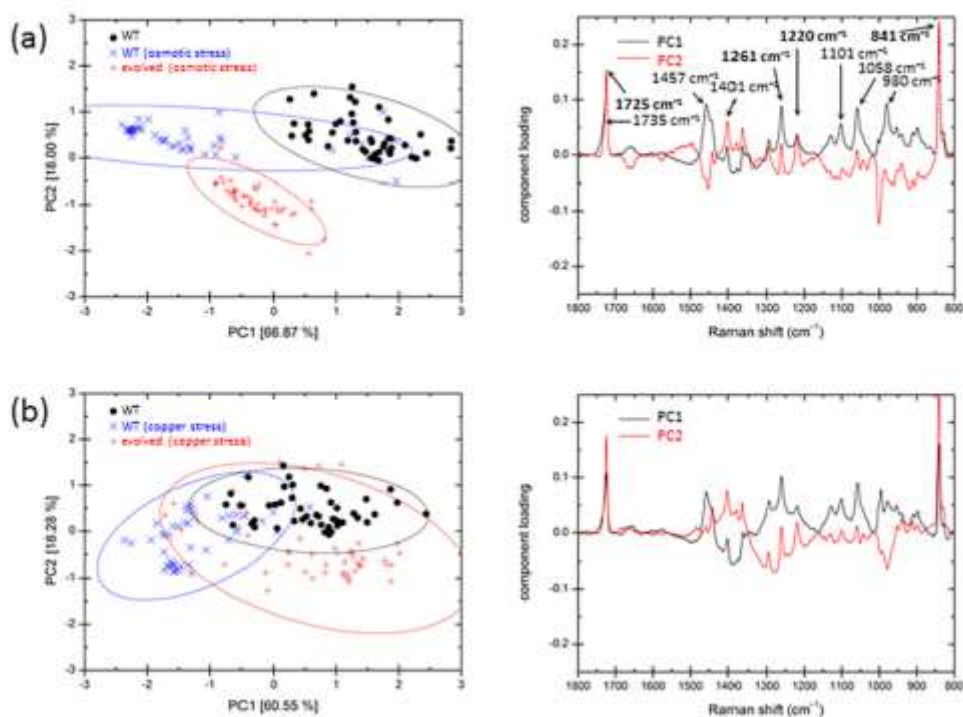


Fig. 6. Results of Principal Component Analyses (PCA) of the sets of Raman spectra of bacterial cultures: (a) wild type and cultures exposed/adapted to osmotic stress, and (b) wild type and cultures exposed/adapted to copper. The PCA was performed with all measured spectra. The value in the square bracket represents the relative variance that is composed in the respective principal component. Ellipses represent the 95% interval of confidence.

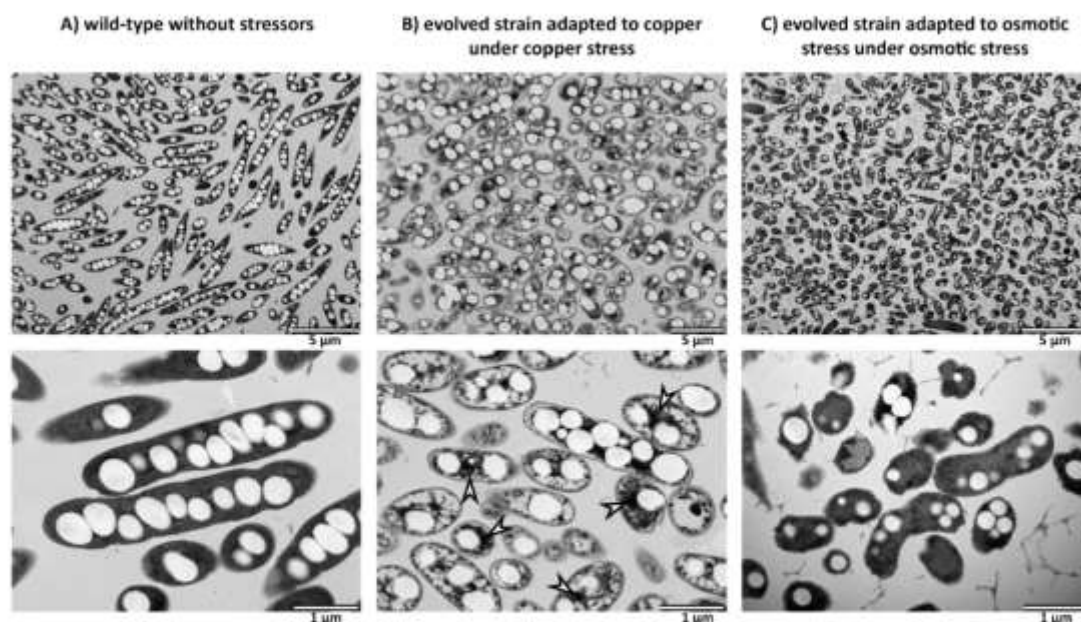


Fig. 7. TEM images of cells; A) wild-type strain, B) evolved strain adapted to copper, C) evolved strain adapted to osmotic stress. Note: Arrows in Fig. B (lower illustration) point to the precipitates described in the text.

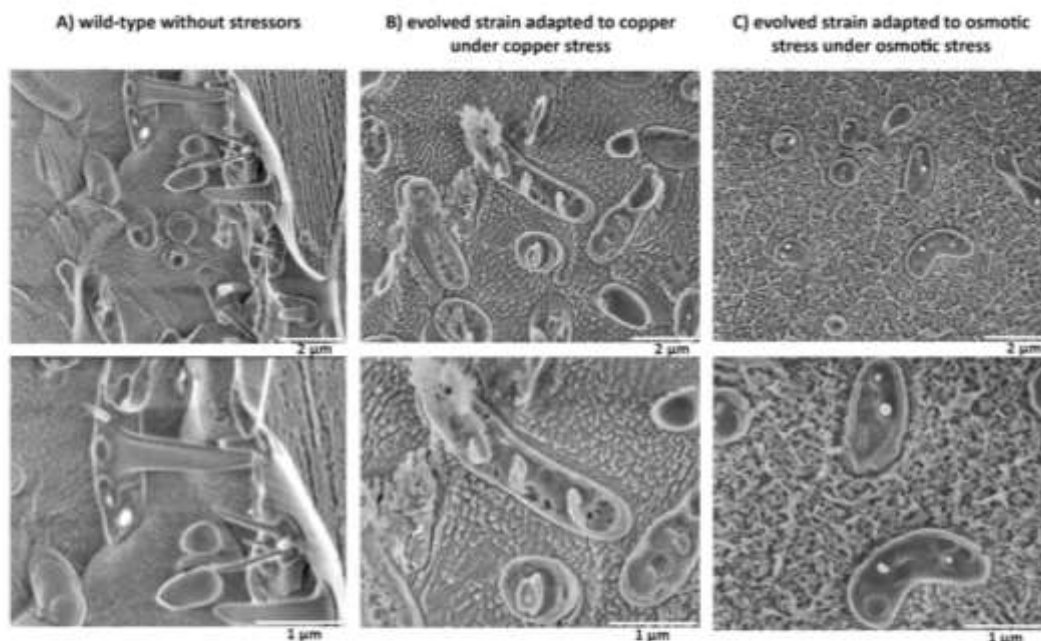


Fig. 8. Cryo-SEM images of cells; A) wild-type strain, B) evolved strain adapted to copper, C) evolved strain adapted to osmotic stress.

3.5. Electron microscopy of cells – features originating from the adaptation process

Electron microscopy analysis provided us with information about cell morphology considering the shape and inner structure of cells. Data obtained by Transmission Electron Microscopy (TEM) are shown in Fig. 7, while Fig. 8 demonstrates the shapes as observed by cryo-SEM. For cells adapted to copper ions, there are compliant cryo-SEM and TEM images; in both cases, areas of precipitates are visible. It can be suggested that cells can protect important parts of their interior by the formation of precipitates with copper ions, which eliminate harmful effects exerted by them. The presence of precipitates in cytoplasm connected with exposure to the stress caused by heavy metals was described in Rogiers et al. [39] for *Cupriavidus metallidurans* NA4 in the presence of uranium in the form of uranyl nitrate ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$). This study proved the formation of complexes of precipitates with PHA granules which could be connected with the protective function of PHA against stress caused by the presence of heavy metals [39]. In our case, the localization of precipitates was predominantly irregular, and their character has not been clarified. Dark regions visible in the cryo-SEM images represent “holes”, which mirror the spongy character of the structure (cytoplasm). Wild-type strain cells without stress displayed quite a homogenous cytoplasm with PHB granules without deposits of heavy metals. Cells of evolved strain adapted to osmotic stress (see Fig. 8C) show slight similarities with wild-type strain without stress, but they are smaller, have crescent shape instead of rod-shaped wild-type cells; moreover, also a lower number of PHB granules is visible, which corresponds with quantitative data from gas chromatography. Moreover, their cytoplasm looks more concentrated and compact than for remaining cells (wild-type and adapted to copper), which could be connected to lower water content of water in the cytoplasm (due to the exposure to osmotic stress); this could have an influence on the sublimation during cryo-SEM sample preparation procedure.

On the one hand, copper belongs to a group of trace elements required by many microorganisms; on the other hand, it also acts as an

inhibitor of the growth of most bacteria. Selected strains are able to resist much higher concentrations of copper representing heavy metals and get well with it via different mechanisms mentioned above [40].

To sum up, present study demonstrates that PHA play an important function in the adaptation of *C. necator* to high osmolarity and copper ions. Most importantly, accelerated turnover of the PHA cycle provides increased levels of PHA monomers with chaperoning and osmoprotective functions.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This study was funded by the project GA19-20697S of the Czech Science Foundation (GACR). TEM analysis was supported by the MEYS CR (LM2015062 Czech-Biolmaging).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.102>.

References

- [1] G.-Y.A. Tan, Ch.-L. Chen, L. Li, L. Ge, L. Wang, I.M.N. Rzazad, Y. Li, L. Zhao, Y. Mo, J.-Y. Wang, Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): a review, *Polymers* 6 (3) (2014) 706–754, <https://doi.org/10.3390/polym6030706>.
- [2] D. Kadouri, E. Jurkevitch, Y. Okon, S. Castro-Sowinski, Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates, *Crit. Rev. Microbiol.* 31 (2) (2008) 55–67, <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/104098410290894228>.
- [3] S. Obruca, L. Dinkočíl, V. Krzyzanek, K. Hrubanová, P. Sedláček, F. Mravec, O. Samek, D. Kucera, P. Benesová, I. Marova, Polyhydroxyalkanoates in bacterial

- cells - more than just storage materials. *Mater. Sci. Forum* 851 (2016) 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.msf.2016.05.020>.
- [4] T.H. Pham, The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in thannolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. *Microbiology* 150 (10) (2004) 3405–3413. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27357-0>.
- [5] D. Wu, J. He, Y. Gong, D. Chen, X. Zhu, N. Qiu, M. Sun, M. Li, Z. Yu, Proteomic analysis reveals the strategies of *Bacillus thuringiensis* YBT-1520 for survival under long-term heat stress. *Proteomics* 11 (13) (2011) 2580–2591. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000392>.
- [6] P.M. Tribelli, N.I. López, Poly(3-hydroxybutyrate) influences biofilm formation and motility in the novel Antarctic species *Pseudomonas extremaustralis* under cold conditions. *Extremophiles* 15 (5) (2011) 541–547. <https://doi.org/10.1007/s12241-011-9184-1>.
- [7] S. Obruca, P. Sedláček, V. Krzyžanek, F. Mrázek, K. Hranáčová, O. Samek, D. Kucera, P. Benesova, I. Marova, Accumulation of Poly(3-hydroxybutyrate) helps bacterial cells to survive freezing. *PLoS One* 11 (6) (2016) 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157778>.
- [8] P. Pavez, J.L. Castillo, C. González, M. Martínez, Poly-β-hydroxyalkanoate exert a protective effect against carbon starvation and frozen conditions in *Sphingopyxis chilensis*. *Curr. Microbiol.* 59 (6) (2009) 636–640. <https://doi.org/10.1007/s12241-009-9485-9>.
- [9] S. Tai, Y. Okon, Production of the reserve material poly-β-hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* cd. *Can. J. Microbiol.* 31 (7) (1985) 608–613. <https://doi.org/10.1139/m51-115>.
- [10] Q. Wang, H. Yu, Y. Xia, Z. Kang, Q. Qi, Complete PHB mobilization in *Escherichia coli* enhances the stress tolerance: a potential biotechnological application. *Microb. Cell Factories* 8 (2009) 47. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-47>.
- [11] P. Sedláček, E. Šlaninová, M. Koller, J. Nebesárova, I. Marova, V. Krzyžanek, S. Obruca, PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances. *New Biotechnol.* 49 (3) (2019) 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.02.005>.
- [12] S. Obruca, I. Marova, Z. Švoboda, R. Mikulíková, Use of controlled exogenous stress for improvement of poly(3-hydroxybutyrate) production in *Cupriavidus necator*. *Folia Microbiol.* 55 (1) (2010) 17–22. <https://doi.org/10.1007/s12241-010-0454-2>.
- [13] S. Obruca, I. Marova, M. Stankova, L. Mravenca, Z. Švoboda, Effect of ethanol and hydrogen peroxide on poly(3-hydroxybutyrate) biosynthetic pathway in *Cupriavidus necator* H16. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 26 (7) (2010) 1261–1267. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0296-8>.
- [14] L.C. Nair, S. Pradeep, M.S. Ajayan, K. Jayachandran, S. Shashidhar, Accumulation of intracellular Polyhydroxybutyrate in *Alcaligenes* sp. d2 under phenol stress. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 159 (2) (2009) 545–552. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8454-2>.
- [15] P. Passanthe, S.R. Esteves, G. Kedia, R.M. Dinadale, A.J. Guwy, Increasing polyhydroxyalkanoate (PHA) yields from *Cupriavidus necator* by using filtered digestate liquors. *Bioresour. Technol.* 147 (2013) 345–352. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.048>.
- [16] S. Obruca, P. Sedláček, M. Koller, D. Kucera, I. Pernicová, Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: biotechnological consequences and applications. *Biotechnol. Adv.* 36 (3) (2018) 856–870. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.006>.
- [17] R.J. Van Wegen, Y. Ling, A.P.J. Middelberg, Industrial production of polyhydroxyalkanoates using *Escherichia coli*: an economic analysis. *Chem. Eng. Res. Des.* 76 (3) (1998) 417–426. [https://doi.org/10.1205/0263-9715\(1998\)76:3:1-0](https://doi.org/10.1205/0263-9715(1998)76:3:1-0).
- [18] C. Du, J. Sabirova, W. Soetaert, S.K.C. Lin, Polyhydroxyalkanoates production from low-cost sustainable raw materials. *Curr. Chem. Biol.* 6 (1) (2012) 14–25. <https://doi.org/10.1002/cchb.1007>.
- [19] R.A. Rehman, A.Q. Rao, Z. Ahmed, A. Gul, Selection of potent bacterial strain for over-production of PHB by using low cost carbon source for eco-friendly bioplastics. *Adv. Life Sci.* 3 (1) (2015) 29–35. <https://doi.org/10.1155/2015/2935>.
- [20] A. Hossain, I. Rasooli, M. Taran, Isolation and identification of poly-β-hydroxybutyrate over-producing bacteria and optimization of production medium. *Jundishapur J. Microbiol.* 8 (7) (2015). e16965. <https://doi.org/10.58977/jjmic.2015.080707>.
- [21] P.K. Obulinsky, S. Meharaya, Polyhydroxyalkanoates from extremophiles: a review. *Bioresour. Technol.* 325 (2021). e124653. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124653>.
- [22] I. Fasano, M. Bassaglia, S. Casella, Improving polyhydroxyalkanoate production from inexpensive carbon sources by genetic approaches: a review. *Biofuel. Bioprod. Biorefin.* 13 (1) (2019) 208–227. <https://doi.org/10.1002/bbb.1944>.
- [23] R. Vijay, K. Tarika, Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) using synthetic biology and metabolic engineering approaches. *Res. J. Biotechnol.* 13 (1) (2018) 99–109. https://doi.org/10.2478/24747676/Production_of_Polyhydroxyalkanoates_PHA_using_Synthetic_Biology_and_Metabolic_Engineering_Approaches.
- [24] I. Nováková, D. Kucera, J. Poráková, I. Pernicová, P. Sedláček, M. Koller, A. Kovalčík, S. Obruca, Adaptation of *Cupriavidus necator* to levulinic acid for enhanced production of P(3HB-co-3HV) copolyesters. *Biochem. Eng. J.* 151 (2019). e107350. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107350>.
- [25] S. Obruca, P. Sedláček, I. Pernicová, A. Kovalčík, I. Nováková, E. Šlaninová, I. Marova, Interconnection between PHA and stress robustness of bacteria. In: M. Koller (Ed.), *The Handbook of Polyhydroxyalkanoates*, Vol. 2: Kinetics, Bioengineering, and Industrial Aspects, CRC Press, Boca Raton, 2020, pp. 107–132.
- [26] M. Koller, Polyhydroxyalkanoate biosynthesis at the edge of water activity - Haloarchaea as biopolyester factories. *Bioengineering*. 6(2) (2019) 34. <https://doi.org/10.3390/bioengineering6020034>.
- [27] P. Passanthe, G. Kedia, R.M. Dinadale, A.J. Guwy, S.R. Esteves, The use of NaCl addition for the improvement of polyhydroxyalkanoate production by *Cupriavidus necator*. *Bioresour. Technol.* 163 (2014) 287–294. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.068>.
- [28] A. Shrivastav, S.K. Mishra, S. Mishra, Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis by *Spirulina subsals* from Gujarat coast of India. *Int. J. Biol. Macromol.* 46 (2) (2010) 255–260. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.01.001>.
- [29] A. Rodríguez-Contreras, M. Koller, G. Braunegg, M.S. Marqués-Calvo, Poly [(R)-3-hydroxybutyrate] production under different salinity conditions by a novel *Bacillus megaterium* strain. *New Biotechnol.* 33 (1) (2016) 73–77. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.12.005>.
- [30] I. Pernicová, I. Nováková, P. Sedláček, X. Kourilová, M. Koller, S. Obruca, Application of osmotic challenge for enrichment of microbial consortia in polyhydroxyalkanoates producing thermophilic and thermotolerant bacteria and their subsequent isolation. *Int. J. Biol. Macromol.* 144 (2) (2020) 698–704. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.001>.
- [31] R.C. Weast, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 64th Edition, CRC Press, Boca Raton, 1984.
- [32] G.M. Gadd, A.J. Griffiths, Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microb. Ecol.* 4 (4) (1978) 303–317. <https://doi.org/10.1007/BF02322222>.
- [33] L.W. Marzan, M. Hossain, S.A. Mina, Y. Akter, A.M.M.A. Chowdhury, Isolation and biochemical characterization of heavy-metal resistant bacteria from tannery effluent in Chittagong city, Bangladesh: bioremediation viewpoint. *Egypt. J. Aquat. Res.* 43 (1) (2017) 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2016.11.002>.
- [34] D.H. Nies, Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51 (6) (1999) 730–750. <https://doi.org/10.1007/s002530015157>.
- [35] L. Rodríguez-Montelongo, L.C. De La Cruz-Rodríguez, R.N. Farias, E.M. Massa, Membrane-associated redox cycling of copper mediates hydroperoxide toxicity in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1144 (1993) 77–84. [https://doi.org/10.1016/0167-4836\(93\)90063-3](https://doi.org/10.1016/0167-4836(93)90063-3).
- [36] M. Szwalsky, B. Ungerer, I. Quevedo, F. Aguilar, C.F. Sotomayor, Cu²⁺ ions interact with cell membranes. *J. Inorg. Biochem.* 70 (1998) 233–238. [https://doi.org/10.1016/S0162-0909\(97\)00090-1](https://doi.org/10.1016/S0162-0909(97)00090-1).
- [37] S. Iwata, C. Ostermeier, B. Ludwig, H. Michel, Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from paracoccus denitrificans. *Nature* 376 (1995) 660–669. <https://doi.org/10.1038/376660a>.
- [38] P. Passanthe, S.R. Esteves, G. Kedia, R.M. Dinadale, A.L. Guwy, Increasing polyhydroxyalkanoate (PHA) yields from *Cupriavidus necator* by using filtered digestate liquors. *Bioresour. Technol.* 147 (2013) 345–352. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.048>.
- [39] T. Rogiers, M.L. Merroun, A. Williamson, N. Leys, R.V. Houdt, N. Boon, K. Mijnenboom, *Cupriavidus metallidurans* NA4 actively forms polyhydroxybutyrate-associated uranium phosphate precipitates. *J. Hazard. Mater.* 421 (2022). e126737. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126737>.
- [40] J.T. Trevors, Copper resistance in bacteria. *Microbiol. Sci.* 4 (1) (1987) 29–31. [https://doi.org/10.1016/0168-1616\(87\)90009-0](https://doi.org/10.1016/0168-1616(87)90009-0).
- [41] H. Brandl, R.A. Gross, R.W. Lenz, A. Clinton Fuller, *Pseudomonas oleovorans* as a source of Poly(β-Hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (8) (1988) 1977–1982.
- [42] O. Samek, S. Obruca, M. Šiler, P. Sedláček, P. Benesova, D. Kucera, I. Marova, J. Jizek, S. Bernatova, P. Zemanek, Quantitative raman spectroscopy analysis of polyhydroxyalkanoates produced by *Cupriavidus necator* H16. *Sensors* 16 (11) (2016) 1–7. <https://doi.org/10.3390/s16111808>.
- [43] K. Mlymarikova, O. Samek, S. Bernatova, F. Ruzicka, J. Jizek, A. Hranáčová, M. Šiler, P. Zemanek, V. Hala, Influence of culture media on microbial fingerprints using raman spectroscopy. *Sensors* 15 (2015) 29635–29647. <https://doi.org/10.3390/s151129635>.
- [44] X. Kourilová, J. Schwarzenova, I. Pernicová, E. Sedlar, K. Mrázová, V. Krzyžanek, J. Nebesárova, S. Obruca, The first insight in multi-extremophilic *rubrobacter xylanophilus* and *rubrobacter spartanus*. *Microorganisms* 9 (5) (2021) 909. <https://doi.org/10.3390/micro9050909>.
- [45] J.E. Barrick, R.E. Lenski, Genome dynamics during experimental evolution. *Nat. Rev. Genet.* 14 (2013) 827–839. <https://doi.org/10.1038/nrg3564>.
- [46] A.A. Kammev, A.V. Tugarova, F.A. Tarantilo, P.H.E. Gardiner, M.G. Polissiou, Comparing poly-3-hydroxybutyrate accumulation in *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245: the effects of copper(II). *Appl. Soil Ecol.* 61 (2012) 213–216. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.10.020>.
- [47] Y. Lu, Y.-F. Cheng, X.-P. He, X.-N. Guo, B.-R. Zhang, Improvement of robustness and ethanol production of ethanologenic *Saccharomyces cerevisiae* under co-stress of heat and inhibitors. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39 (1) (2012) 73–80. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9485-9>.
- [48] R. Singh, R.J. Mailloux, S. Puisseu-Dao, V.D. Appanna, Oxidative stress evokes a metabolic adaptation that favors increased NADPH synthesis and decreased NADH production in *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 189 (18) (2007) 6665–6675. <https://doi.org/10.1128/JB.00555-07>.
- [49] J. Liu, J. Wang, S. Liu, R. Wen, Copper-caused oxidative stress triggers the activation of antioxidant enzymes via ZmMPK3 in maize leaves. *PLoS One* 13 (9) (2018). e0203612. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203612>.
- [50] K. Murakami, R. Tsubouchi, M. Fukuyama, T. Ogawa, M. Yoshino, Oxidative inactivation of reduced NAD⁺-generating enzymes in *E. coli*: iron-dependent inactivation with affinity cleavage of NADP-isocitrate dehydrogenase. *Arch. Microbiol.* 186 (2006) 385–392. <https://doi.org/10.1007/s00203-005-0033-3>.

- [51] S. Obruca, P. Sedláček, F. Mrázek, O. Samek, I. Marova, Evaluation of 3-hydroxybutyrate as an enzyme-protective agent against heating and oxidative damage and its potential role in stress response of poly(3-hydroxybutyrate) accumulating cells, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100 (3) (2016) 1365–1376. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-015-7162-4>.
- [52] M.F. Roberts, Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms, *Saline Syst.* 1 (5) (2005). <https://aquaticbiology.com/medcentral.com/articles/10.1186-1746-1448-1-5>.
- [53] P. Sedláček, E. Šlaninová, V. Feneš, M. Koller, J. Nebesárová, V. Krzyžanek, O. Samek, I. Marova, S. Obruca, What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiment, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103 (4) (2019) 1905–1917. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-018-09584-z>.
- [54] S. Obruca, P. Sedláček, E. Šlaninová, I. Fritz, C. Daffert, K. Meixner, Z. Sedlářová, M. Koller, Novel unsuspected functions of PHA granules, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104 (11) (2020) 4795–4810. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-020-10568-1>.

11.3 Příloha III

Použité chemikálie a přístroje

Použité chemikálie

- 1,4-butandiol (Sigma-Aldrich, Německo)
- 1,6-hexandiol (Sigma-Aldrich, Německo)
- D-fruktosa (LachNer, Česká republika)
- dihydrogenfosforečnan draselný (LachNer, Česká republika)
- glycerol bezvodý (LachNer, Česká republika)
- hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (LachNer, Česká republika)
- hydroxid sodný (LachNer, Česká republika)
- chlorid vápenatý dihydrát (Lachema, Česká republika)
- chlorid kobaltnatý (Penta, Česká republika)
- chlorid nikelnatý (Penta, Česká republika)
- chlorid sodný (LachNer, Česká republika)
- chlorid železitý hexahydrát (Penta, Česká republika)
- chloroform (LachNer, Česká republika)
- isopropanol (LachNer, Česká republika)
- kyselina benzoová (Penta, Česká republika)
- kyselina chlorovodíková 35% (LachNer, Česká republika)
- kyselina sírová $\geq 96\%$ (LachNer, Česká republika)
- methanol (LachNer, Česká republika)
- Nutrient Broth (HiMedia, Indie)
- odpadní olej šarže 6 (Nafigate)
- síran amonný (LachNer, Česká republika)
- síran hořečnatý heptahydrát (LachNer, Česká republika)
- síran měďnatý pentahydrát (Lachema, Česká republika)
- γ -butyrolakton (Sigma-Aldrich, Německo)
- ϵ -kaprolakton (Sigma-Aldrich, Německo)

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

Použité přístroje

- analytické váhy Ohaus, Pioneer PA224C (Švýcarsko)
- bioreaktor BIOSTAT BPlus/ B plus, Sartorius Stedim, pracovní objem 3,5 L (Francie)
- centrifuga, Hettich EBA 200 (Německo)
- laminární box Aura mini, BioAir – Euroclone (Itálie)
- nanofotometr, Implen, P 300 (Německo)
- plynový chromatograf s FID, Thermo Scientific, Trace 1300; kolona: DB-WAX 30 m by 0,25 mm (USA)

- SEC chromatograf s kolonou PLgel mixed-C 5 μm , 300 by 7,5 mm, Agilent Technologies (USA); detektory: MALS – DAWN HELEOS II, diferenční refraktometr OPTILAB T-REX, Wyatt Technology (USA)
- temperovaná třepačka (inkubátor), Biosan ES-20 (Lotyšsko)
- temperovaná třepačka, Heidolph, Incubator 1000 (Německo)
- termoblok, Stuart, SBH130D (Velká Británie)
- váhy, Kern EW 620-3NM (Německo)
- běžné laboratorní sklo a vybavení

Proteomická analýza adaptovaných kmenů a porovnání s divokým kmenem bez a za expozice stresovým podmínkám

Kultivace posledních pasáží adaptovaných kmenů a divokého kmene

Kryokultura *C. necator* H16 uchovávaná v 10% glycerolu byla zaočkována do Nutrient Broth média (25 g/L), a to do 100 mL Erlenmeyerových baněk s 50 mL média. Stejně tak byla připravena inokula posledních pasáží *C. necator* adaptovaných na stres měďnatými ionty, *C. necator*/Cu78, a na osmotický stres, *C. necator*/NaCl168, které byly rovněž uchovávány v podobě kryokultur. Za účelem zachování selekčního tlaku byly do média pro *C. necator*/Cu78 přidány 3 mg/L Cu^{2+} v podobě modré skalice (tj. 11,8 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$), což představuje desetinu aplikovaného stresu při evolučním experimentu, pro kulturu adaptovanou na osmotický stres tak byly přidány do komplexního média 2 g/L NaCl. Po 24 h kultivace při 30 °C a 180 rpm byla inokula přeočkována do minerálních médií složených z $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3 g/L), KH_2PO_4 (1,05 g/L), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (11,1 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/L) a 1 mL/L roztoku stopových prvků (MES) sestávající z $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (9,7 g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (7,8 g/L), $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (0,156 g/L), CoCl_2 (0,119 g/L) a NiCl_2 (0,118 g/L) v 0,1 M HCl. Média byla připravena v tetraplikátech do Erlenmeyerových baněk o objemu 250 mL se 100 mL média, jako zdroj uhlíku byla využita fruktosa v koncentraci 20 g/L. Kultivace probíhala při 30 °C a 180 rpm po dobu 48 h.

Příprava vzorků na proteomickou analýzu

Pro účely proteomické analýzy byly z každé kultury odebrány do plastových zkumavek tři paralelní vzorky po 10 mL, které byly stočeny při 6 000 rpm po dobu 5 min, následně byly supernatanty odlity a pelet buněk byl promyt 10 mL fyziologického roztoku. Po opětovném stočení (6 000 rpm, 5 min) byl supernatant opět odlit a promyté buněčné pelety byly uchovány při –80 °C. Pro samotnou analýzu byl vybrán vždy jeden vzorek ze tří paralelních odebraných, pro každou situaci tedy čtyři biologicky odlišné vzorky, každý z jedné baňky. Následná proteomická analýza byla realizována ve spolupráci s Proteomic Core Facility CEITEC Brno.

Základní analýza kultur – stanovení růstu, PHA a morfologie buněk

Souběžně s přípravou vzorků pro proteomickou analýzu byla provedena základní charakterizace kultur. Oproti destilované vodě jako blanku byla proměřena optická hustota

kultur, a to jako absorbance při 630 nm. Gravimetrické stanovení biomasy bylo provedeno v duplikátech pro každou baňku. Pro tento účel bylo odebráno 10 mL kultury, vzorek byl stočen v centrifuze při 6 000 rpm po dobu 5 min, supernatant byl odlit a nahrazen destilovanou vodou, v níž byl pelet rozsuspendován za účelem promytí. Poté byla suspenze opět stočena (6 000 rpm, 5 min), supernatant byl odlit a promyté buňky byly sušeny při 70 °C do konstantní hmotnosti. Posléze bylo zvážením vysušeného peletu stanoveno množství biomasy v buněčné kultuře v g/L. Analýza obsahu PHA byla provedena pomocí plynové chromatografie s plamenově-ionizační detekcí (GC-FID). Pro tento účel bylo na analytických vahách do krimpovacích vialek naváženo 9–11 mg vysušené biomasy. K biomase byl přidán 1 mL chloroformu a 0,8 mL transesterifikační směsi sestávající z 5 mg/mL kyseliny benzoové sloužící jako interní standard v 15% kyselině sírové v methanolu. Po zakrimpování vialek a promíchání směsí byly vzorky po dobu 3 h inkubovány v termobloku při 94 °C. Po esterifikaci a následném ochlazení byly směsi extrahovány 0,5 mL 50 mM hydroxidu sodného ve 4 mL vialkách. Po odseparování jednotlivých fází bylo do nových vialek s 0,9 mL isopropanolu odebráno 50 µL spodní organické fáze obsahující methylestery hydroxyalkanových kyselin a kyseliny benzoové. Uzavřené vialky byly analyzovány na plynovém chromatografu.

Kromě základní charakteristiky byly vzorky podrobeny elektronové mikroskopii, jednak kryo-SEM, a jednak TEM, a to za účelem porovnání případných změn v morfologii buněk. Elektronová mikroskopie byla provedena na externím pracovišti na Ústavu přístrojové techniky Akademie věd v Brně.

Adaptace na ϵ -kaprolakton za účelem produkce kopolymeru P(3HB-co-4HB) – protokol

1) Výběr nejvhodnějšího prekurzoru pro produkci P(3HB-co-4HB)

Kultivace kmene *Cupriavidus necator* H16 s přidavkem prekurzorů

Vybraný kmen *C. necator* H16 (CCM 3726) byl z kryokultury zaočkován do komplexního média Nutrient Broth (pepton 10 g/L, hovězí extrakt 10 g/L, NaCl 5 g/L), a to do 50 mL vysterilovaného média ve 100 mL Erlenmeyerově baňce. Zaočkována kultura byla kultivována při 30 °C po dobu 24 h za konstantního třepání při 180 rpm. Za účelem posouzení nejvhodnější kombinace substrátů pro produkci kopolymeru P(3HB-co-4HB) bohatého na frakci 4HB byla provedena kultivace kmene v minerálním médiu s odlišnými zdroji uhlíku, a to odpadního fritovacího oleje (10 g/L) v kombinaci s 4 g/L prekurzoru (1,4-butandiolu, γ -butyrolaktonu, 1,6-hexandiolu nebo ϵ -kaprolaktonu), fruktosy (10 g/L) opět v kombinaci se 4 g/L prekurzoru a pro porovnání také samotných prekurzorů v množství 4 g/L. Vyjma rozdílu ve zdroji uhlíku bylo využito standardní minerální média sestávající z $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3 g/L), KH_2PO_4 (1,05 g/L), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (11,1 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/L) a 1 mL/L roztoku stopových prvků (MES) složeného z $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (9,7 g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (7,8 g/L), $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (0,156 g/L), $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (0,119 g/L) a NiCl_2 (0,118 g/L) v 0,1 M HCl. Média byla připravena do 250 mL Erlenmeyerových baněk se 100 mL média, a to vždy ve dvou paralelních provedeních pro každý substrát či kombinaci substrátů.

Do vysterilovaných médií bylo zaočkováno narostlé inokulum v poměru 1:10, následně byly zaočkované kultury kultivovány při 30 °C po dobu 72 h za konstantního třepání při 180 rpm.

Stanovení biomasy a PHA

Po kultivaci byly odebrány vzorky pro gravimetrické stanovení biomasy, a to z každé baňky jeden vzorek, abychom získali dva nezávislé výsledky se statistickou signifikancí. Z baňky bylo vždy odebráno 10 mL kultury, suspenze byly následně stočeny při 6 000 rpm po dobu 5 min, supernatanty byly odlity a vzniklý pelet byl resuspendován v 10 mL destilované vody, čímž byly buňky promyty od zbytků kultivačního média. Suspenze byla opětovně stočena v centrifuze (6 000 rpm, 5 min), supernatant byl odlit a pelet byl při 70 °C sušen do konstantní hmotnosti. Zvážením vysušeného peletu bylo stanoveno množství biomasy v buněčné kultuře v g/L.

Kvalitativní i kvantitativní analýza PHA byla provedena pomocí plynové chromatografie s plamenově-ionizační detekcí (GC-FID). Postup byl analogický jako při přípravě vzorků z experimentu zaměřeného na proteomickou analýzu vybraných bakteriálních kultur.

2) Stanovení optimálního množství a času přidavku ϵ -kaprolaktonu

Kultivace kmene *Cupriavidus necator* H16 s přidavkem ϵ -kaprolaktonu

Inokulum kmene *C. necator* H16 (CCM 3726) bylo z kryokultury zaočkováno do komplexního média Nutrient Broth stejně jako v předchozím experimentu. Za účelem posouzení nejvhodnější koncentrace ϵ -kaprolaktonu (ϵ -KL) a času jeho přidavku byly vybrány následující podmínky; přidavky 2; 4; 6 a 8 g/L v časech kultivace 0 h, 24 h a 48 h. Jako hlavní substrát byl vybrán odpadní olej v množství 10 g/L, který byl přítomen již od začátku. Pro kultivaci bylo následně využito minerální médium sestávající z $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 g/L), KH_2PO_4 (1,05 g/L), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (11,1 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/L) a 1 mL/L roztoku stopových prvků (MES) složeného z $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (9,7 g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (7,8 g/L), $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (0,156 g/L), $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (0,119 g/L) a NiCl_2 (0,118 g/L) v 0,1 M HCl, oproti předchozímu experimentu bylo sníženo množství síranu amonného za účelem dosažení limitace dusíkem (zvýšení C:N poměru). Podmínky zaočkování a kultivace byly totožné s předchozím experimentem, rozdíl byl v přidavku prekurzoru v uvedených koncentracích na začátku kultivace, po 24 h kultivace či po 48 h kultivace. Za účelem komparace byla připravena i kontrolní kultura, kde byl jako substrát pouze odpadní olej v množství 10 g/L.

Stanovení biomasy a PHA, stanovení molekulové hmotnosti PHA

Biomasa byla stanovena gravimetricky stejně jako v předchozím experimentu. Rovněž kvalitativní a kvantitativní analýza PHA byla stanovena analogicky s předchozím experimentem.

Za účelem stanovení molekulové hmotnosti byl nejdříve intracelulárně naprodukovaný polymer extrahován chloroformem z vysušené promyté biomasy, a to při 70 °C v termobloku po dobu 12 h. Po extrakci a ochlazení byla směs přefiltrována přes hladký filtr na Petriho

misku, která byla ponechána v digestoři za účelem odpaření rozpouštědla. Do 4 mL vialek bylo naváženo přibližně 1,5 mg získané folie PHA, ke které byl přidán 1 mL chloroformu. Uzavřené vialky byly temperovány na 50 °C až do úplného rozpuštění polymeru. Následně byly ochlazené vzorky přefiltrovány přes nylonový filtr s porozitou 0,45 μm do vialek pro analýzu. Vzorky byly následně analyzovány pomocí vylučovací chromatografie s detekcí rozptylu světla ve více úhlech (SEC-MALS) a refraktometrickým detektorem za účelem stanovení molekulové hmotnosti.

3) Adaptace na ε-KL za účelem vyššího výtěžku frakce 4HB v kopolymeru P(3HB-co-4HB)

Jako nejlepší z prekurzorů byl vybrán na základě výsledků ε-KL, a to v kombinaci s fruktózou, která podpoří nárůst biomasy a zajistí dostatečnou frakci i 3HB. Jako původní hodnoty byly nastaveny koncentrace 8 g/L fruktosy a 8 g/L ε-KL, obojí v 0. h kultivace, na základě hodnot optické hustoty a dalších parametrů kultur bylo množství prekurzoru sníženo na polovinu, tedy na 4 g/L, jelikož oproti předchozí práci nebyl proveden experiment na stanovení „safe window“. Jako hlavní zdroj uhlíku byla zvolena fruktosa namísto oleje, aby bylo zajištěno stále stejné složení kultivačního média vzhledem k nedostatku použitého oleje. Složení minerálního média bylo standardní, a to (NH₄)₂SO₄ (3 g/L), KH₂PO₄ (1,05 g/L), Na₂HPO₄ · 12 H₂O (11,1 g/L), MgSO₄ · 7H₂O (0,2 g/L) a 1 mL/L roztoku stopových prvků (MES) složeného z FeCl₃ · 6 H₂O (9,7 g/L), CaCl₂ · 2 H₂O (7,8 g/L), CuSO₄ · 5 H₂O (0,156 g/L), CoCl₂ · 6 H₂O (0,119 g/L) a NiCl₂ (0,118 g/L) v 0,1 M HCl. Oproti standardním kultivacím nebyly kultury připravovány ve dvou paralelních provedeních, každá pasáž vycházela pouze z jedné baňky a průměrné hodnoty byly stanoveny ze dvou analýz jedné kultury. Rovněž jako v publikovaném článku byla doba kultivace jedné pasáže 48 h, kdy se kultura nachází na konci exponenciální fáze růstu, namísto standardní kultivace ukončené po 72 h ve stacionární fázi.

Každá získaná pasáž byla charakterizována z hlediska optické hustoty stanovené při 630 nm oproti destilované vodě jako blanku, což slouží jako první znak, zdali kultura roste a prosperuje. Současně bylo provedeno gravimetrické stanovení biomasy nesoucí relevantnější informaci o množství buněk a následně také analýza PHA v biomase poskytující kvalitativní i kvantitativní informace o PHA. Průběžně byly vybrané pasáže uchovány v kryozkumavkách v 10% glycerolu při -80 °C pro další práci. Sériovým přenosem vždy po 48 h bylo celkem získáno 50 pasáží.

4) Kultivace kultury adaptované na ε-KL v laboratorním bioreaktoru

Pro scale-up kultivace kultury adaptované na ε-KL byla vybrána 30. pasáž z evolučního experimentu, který v čase kultivace stále probíhal. Kultura byla zaočkována z kryozkumavky do 100 mL Erlenmeyerových baněk s 50 mL Nutrient Broth média s 1 g/L ε-KL, aby byl zachován selekční tlak. Po 24 h kultivace při 30 °C a 180 rpm bylo narostlé inokulum přeočkováno v poměru 1:10 do 250 mL baněk se 100 mL Nutrient Broth média opět s 1 g/L ε-KL, následně byly takto připravené kultury kultivovány za stejných podmínek jako v předchozím kroku. Minerální médium bylo připraveno tak, aby byla nastolena limitace

dusíkem, složení bylo tedy následující: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 g/L), KH_2PO_4 (1,05 g/L), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (11,1 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/L) a 1 mL/L roztoku stopových prvků (MES) složeného z $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (9,7 g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (7,8 g/L), $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (0,156 g/L), $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (0,119 g/L) a NiCl_2 (0,118 g/L) v 0,1 M HCl. Pro kultivaci byl využit laboratorní bioreaktor Sartorius o pracovním objemu 3,5 L. Po sterilaci byly přidány substráty fruktosa v množství 8 g/L a ϵ -KL v množství 4 g/L, připravený bioreaktor byl poté zaočkován inokulem opět v poměru 1:10. Kultivace byla provedena jednak v režimu batch, jednak v režimu fed-batch při 30 °C. Při fed-batch režimu byly přidávány příkrmy ve stejných koncentracích jako v počátku, a to na základě aktuálních dat o růstu kultury. Během dne byly odebrány vzorky přibližně po 2 h, a to pro účely charakterizace množství biomasy a analýzy PHA.

11.4 Příloha IV

KOUŘILOVÁ, X.; NOVÁČKOVÁ, I.; KOLLER, M.; OBRUČA, S. Evaluation of mesophilic *Burkholderia sacchari*, thermophilic *Schlegelella thermodepolymerans* and halophilic *Halomonas halophila* for polyhydroxyalkanoates production on model media mimicking lignocellulose hydrolysates. *BIORESOURCE TECHNOLOGY*, 2021, roč. 325, č. 4, s. 1–5. ISSN: 0960-8524.



Evaluation of mesophilic *Burkholderia sacchari*, thermophilic *Schlegelella thermodepolymerans* and halophilic *Halomonas halophila* for polyhydroxyalkanoates production on model media mimicking lignocellulose hydrolysates

Xenie Kourilova^{a,1}, Ivana Novackova^{a,1}, Martin Koller^{b,c}, Stanislav Obruca^{a,*}

^a Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkynova 118, 612 00 Brno, Czech Republic

^b Institute of Chemistry, NAWI Graz, University of Graz, Heinrichstrasse 28/VI, 8010 Graz, Austria

^c ARENA Arbeitsgemeinschaft für Ressourcenschonende & Nachhaltige Technologien, Inffeldgasse 21b, 11 8010 Graz, Austria

HIGHLIGHTS

- Tested extremophiles overperformed *B. sacchari* in PHA production from lignocelluloses.
- *H. halophila* reached high PHA titers on hexoses-rich hydrolysates.
- *S. thermodepolymerans* preferred hydrolysates rich in pentoses.
- Both tested extremophiles were sensitive to microbial inhibitors.
- The utilization of extremophiles bring numerous advantages to the biotech process.

ARTICLE INFO

Keywords:

Burkholderia sacchari
Extremophiles
Halomonas halophila
Lignocellulose materials
Microbial inhibitors
Polyhydroxyalkanoates
Schlegelella thermodepolymerans

ABSTRACT

In this work, the mesophilic bacterium *Burkholderia sacchari*, the halophilic bacterium *Halomonas halophila*, and the thermophilic bacterium *Schlegelella thermodepolymerans* were evaluated with regards to their suitability for polyhydroxyalkanoates (PHA) production from model media mimicking lignocellulose hydrolysates. *B. sacchari* was capable of utilizing all the tested "model hydrolysates", yielding comparable PHA titers and turning out as very robust against lignocellulose-derived microbial inhibitors. On the contrary, *H. halophila* reached substantially higher PHA titers on hexoses-rich media, while *S. thermodepolymerans* preferred media rich in pentoses. Both extremophiles were more sensitive to microbial inhibitors than *B. sacchari*. Nevertheless, considering substantially higher PHA productivity of both extremophiles even in the presence of microbial inhibitors and also other positive factors associated with utilization of extremophiles, such as the reduced risk of microbial contamination, both *H. halophila* and *S. thermodepolymerans* are auspicious candidates for sustainable PHA production from abundantly available, inexpensive lignocelluloses.

1. Introduction

On the one hand, synthetic polymers produced from petrochemical resources are widely used and easy-to-make anthropogenic, xenobiotic materials, which possess numerous excellent material properties. Therefore, they provide an extraordinary number of applications in the everyday life of modern society. On the other hand, the production of

such well-established petro-plastics currently increases exponentially, amounting to about 400 megatons (Mt) per year, with a clear upward trend of their use especially in emerging and developing countries (Nielsen et al., 2020). These facts make it clear that maintaining the current petrochemical plastics production strategies, their unlimited use and challenging elimination from the ecosphere, the future of our planet is at stake. This underlines the urgent need for alternative materials with

* Corresponding author.

E-mail address: obruca@fch.vut.cz (S. Obruca).

¹ The first two authors contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124704>

Received 23 November 2020; Received in revised form 7 January 2021; Accepted 8 January 2021

Available online 15 January 2021

0960-8524/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Table 1

Composition of model lignocellulose hydrolysates – synthetic solutions mimicking hydrolysates of various lignocellulose materials described in the literature. These model hydrolysates were used for the evaluation of the PHA production capacity of the tested bacterial cultures.

Material	Glucose		Xylose		Arabinose		Mannose		Galactose		Reference
	[%]	[g/L]	[%]	[g/L]	[%]	[g/L]	[%]	[g/L]	[%]	[g/L]	
Soft-wood	83	16.6	5	1	0.5	0.1	10	2.0	1.5	0.3	Bowers et al. 2014
Hard-wood	16	3.2	62	12.4	5	1.0	9	1.8	8.0	1.6	Jeffries and Strenth 1988
Rice straw	21	4.2	67	13.4	12	2.4	–	–	–	–	Roberts et al. 1995
Sugar cane bagasse	14	2.8	75	15	11	2.2	–	–	–	–	Roberts et al. 1995
Wheat straw	56	11.2	36	7.2	4.5	0.9	–	–	3.5	0.7	Sehe et al. 2005
Wheat bran	4	0.8	62	12.4	34	6.8	–	–	–	–	Chotiborska et al. 2004

plastic-like properties, based on renewable resources and of biodegradable, compostable and biocompatible nature. In this context, polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters come into play (Koller and Mukherjee, 2020). PHA are microbial storage compounds; they are accumulated in the cytoplasm of numerous prokaryotes (Obruca et al., 2020). Due to their technological and mechanical properties, these materials are considered to be “green”, renewable and biodegradable alternatives to petrochemical polymers (Sabapathy et al., 2020).

Currently, the annual production of PHA is estimated at around 25 kilotons (kt), which is almost negligible as compared to the annual production of synthetic polymers. Nevertheless, it is expected that the production capacities of PHA will at least triple in the next five years (European Bioplastics, 2019). Therefore, it is necessary to find inexpensive, abundantly available resources enabling the sustainable and cost-efficient production of PHA. In this context, lignocellulose-based waste products of agriculture, food, and wood processing industry represent a very promising family of raw materials. Lignocelluloses are the most abundant organic materials produced by nature. Of course, local availability, shelf life, and price of these resources are depended upon numerous parameters, and many of them find also numerous applications such as animal feeding and bedding, energy carriers, or as a filler and thermal insulation materials. Nevertheless, the fact that these materials are generated in amounts of hundreds of Mt per year indicates that part of the annual production of these lignocellulose materials can easily be dedicated as sustainable resources for “White Biotechnology” processes, such as for PHA production.

Conversion of lignocellulose-based materials into PHA is a challenging task since the hydrolysis of lignocelluloses yields a mixture of sugars, encompassing both hexoses and pentoses. Only a very limited number of PHA-producing microorganisms is capable of efficient utilization of these sugar mixtures. In addition, utilization of lignocellulose-based media is complicated by the presence of various microbial inhibitors such as phenolic compounds, furfurals, or organic acids, which are released from lignocellulose material during treatment and hydrolysis. Therefore, great demands such as resistance to microbial inhibitors, the capability of various sugars utilization, and high PHA productivity are put on microbial producers of PHA when lignocellulose materials are used as substrates. To date, the Gram-negative mesophilic bacterium *Burkholderia sacchari* is considered to be the most promising PHA producer from lignocellulose hydrolysates (Raposo et al., 2017).

Extremophilic bacteria are considered to be auspicious candidates for the industrial production of PHA representing a promising alternative to well-established mesophilic bacteria. The concept of Next-Generation Industrial Biotechnology (NGIB) formulated by Chen and Jiang (2018) relies on extremophiles as cellular factories for various desired bioproducts. In particular, numerous halophiles are prominent PHA producers, which is most likely associated with the fact that accumulation of PHA seems to be one of the strategies of adaptation to high salinity environments (Obruca et al., 2020). PHA production capacity was also detected in several thermophiles such as *Chelatococcus therrmostellatus* (Ibrahim and Steinbüchel, 2010) or *Aneurinibacillus* sp. HI (Pernicová et al., 2020). The most important advantage of PHA production by extremophiles is the robustness of the process against

contamination by common microflora. Therefore, PHA production can be operated in a continuous or semi-continuous mode of operation under reduced or even completely missing sterility precautions (Chen and Jiang, 2018).

Halomonas halophila is a moderately halophilic bacterium with extraordinary substrate-utilization flexibility; therefore, it was identified as a promising strain for PHA production from lignocellulose materials (Kucera et al., 2018). Also, *Schlegelella thermodepolymerans*, a moderately thermophilic bacterium, is capable of PHA production from a wide variety of sugars. Surprisingly, it prefers xylose over other sugars. Therefore, also *S. thermodepolymerans* can be efficiently employed for PHA production from lignocellulose materials (Kourilova et al., 2020).

The present work aimed at evaluating the suitability of these promising extremophiles for PHA production on model media mimicking lignocellulose substrates and at comparing their potential in terms of sugar utilization and inhibitor sensitivity to the performance of *B. sacchari*.

2. Material and methods

2.1. Microorganisms and cultivations

Burkholderia sacchari DSM 17165 and *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344 were purchased from Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany. *Halomonas halophila* CCM 3662 was obtained from the Czech Collection of Microorganisms (CCM), Masaryk University, Brno, Czech Republic.

Cultivations were performed in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of cultivation media. In all the bacterial cultures, the nutrient broth (peptone 10.0 g/L, beef extract 10.0 g/L, sodium chloride 5.0 g/L) as a nutrient-rich medium was used for inoculum development. The inoculum medium (50 mL) was inoculated by 1 mL of cryo-cultures (stored in 15% glycerol at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) cultured for 24 h at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*H. halophila* and *B. sacchari*) or $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*S. thermodepolymerans*) with constant shaking at 180 rpm. For PHA production experiments, defined mineral media were used. Mineral media for *B. sacchari* was described previously by Obruca et al. (2014). *H. halophila* was cultivated in saline mineral media (Kucera et al., 2018). For the cultivation of *S. thermodepolymerans*, the mineral medium described in Kourilova et al. (2020) was used. In the first experiments, model media mimicking lignocellulose hydrolysates were used as carbon sources; the sugar composition of individual model hydrolysates, synthetic solutions mimicking hydrolysates of various lignocellulose materials described in the literature, is summarized in Table 1. In the second experiment, the cultures were cultivated in an appropriate mineral medium with 20 g/L of glucose (*B. sacchari* and *H. halophila*) or xylose (*S. thermodepolymerans*) in the presence of microbial inhibitors; following concentrations of individual inhibitors were aseptically added to the cultivation media after heat sterilization (115', 15 min) before inoculation: gallic acid, ferulic acid and levulinic acids were applied at a concentration of 1 g/L, initial concentration of acetic acid was 3 g/L, furfural and 5-hydroxymethylfurfural were added at a concentration of

Table 2
Growth and PHA production on model lignocellulose hydrolysates; sugar composition of the model hydrolysates is shown in Table 1.

Microorganism	Model hydrolysate	CDM [g/L]	PHB [g/L]	PHB [% of CDM]	Residual sugars [g/L]	Y_{PHB} [g/g]
<i>B. sacchari</i>	Control (glucose)	3.45 ± 0.10	1.86 ± 0.09	53.86 ± 1.30	4.89 ± 0.31	0.12
	Soft-wood	3.16 ± 0.03	1.57 ± 0.04	49.75 ± 1.40	8.41 ± 0.29	0.14
	Hardwood	3.11 ± 0.05	1.66 ± 0.07	53.50 ± 1.73	10.59 ± 0.33	0.18
	Rice straw	2.71 ± 0.06	1.35 ± 0.04	49.79 ± 1.02	14.14 ± 0.13	0.23
	Sugar cane bagasse	3.02 ± 0.10	1.52 ± 0.02	49.64 ± 1.56	14.83 ± 0.74	0.29
	Wheat straw	3.22 ± 0.04	1.59 ± 0.03	49.30 ± 0.81	7.01 ± 0.14	0.12
	Wheat bran	3.31 ± 0.03	1.80 ± 0.01	54.18 ± 0.14	10.81 ± 0.14	0.20
	Control (glucose)	6.35 ± 0.05	4.59 ± 0.06	72.35 ± 0.96	3.16 ± 0.02	0.27
<i>H. halophila</i>	Soft-wood	6.47 ± 0.08	4.75 ± 0.13	73.48 ± 1.15	2.98 ± 0.32	0.28
	Hardwood	3.81 ± 0.09	1.96 ± 0.06	51.30 ± 1.14	9.68 ± 0.23	0.19
	Rice straw	3.52 ± 0.08	1.81 ± 0.08	51.43 ± 1.23	9.70 ± 0.52	0.18
	Sugar cane bagasse	3.14 ± 0.13	1.74 ± 0.07	56.14 ± 0.89	8.52 ± 0.78	0.15
	Wheat straw	5.32 ± 0.01	3.98 ± 0.10	74.74 ± 1.73	5.77 ± 0.44	0.28
	Wheat bran	2.56 ± 0.13	1.14 ± 0.09	44.47 ± 1.30	10.69 ± 0.78	0.12
	Control (xylose)	5.92 ± 0.08	4.26 ± 0.03	72.03 ± 0.41	2.77 ± 0.21	0.25
	Soft-wood	0.86 ± 0.16	0.13 ± 0.09	14.74 ± 7.42	18.29 ± 0.31	0.08
<i>S. thermodepolymerans</i>	Hardwood	4.91 ± 0.48	3.22 ± 0.20	65.71 ± 2.41	4.96 ± 0.08	0.21
	Rice straw	5.24 ± 0.13	3.94 ± 0.21	75.32 ± 2.00	4.33 ± 0.29	0.25
	Sugar cane bagasse	4.62 ± 0.06	3.25 ± 0.05	70.45 ± 0.23	6.12 ± 0.00	0.23
	Wheat straw	4.41 ± 0.69	3.13 ± 0.55	70.92 ± 1.37	5.79 ± 0.47	0.22
	Wheat bran	3.64 ± 0.39	2.35 ± 0.40	64.48 ± 4.02	6.93 ± 0.31	0.18

0.25 g/L each. The inoculum ratio was 10%, the cultivations were performed under permanent shaking (180 rpm) at 30 °C (*B. sacchari* and *H. halophila*) or 55 °C (*S. thermodepolymerans*). After 72 h, the cultivations were stopped, and cells were harvested and analyzed.

2.2. Analytical methods

The biomass was determined gravimetrically. Duplicate samples of cultured biomass (10 mL) were centrifuged (6 000 × g, 5 min) and washed with distilled water. The biomass concentration was expressed as cell dry mass (CDM) in g/L. The PHA content was determined in the dry biomass thus obtained. The analysis was performed by gas chromatography (GC) as reported by Brandl et al. (1988). The determination of residual sugars was performed by the DNS method (Kourilova et al., 2020).

3. Results and discussion

3.1. PHA production on model lignocellulose hydrolysates

At first, PHA production performance of all the three tested bacteria, mesophilic *B. sacchari*, halophilic *H. halophila* and thermophilic *S. thermodepolymerans* was accessed using model lignocellulose hydrolysates. These artificial substrate cocktails, emulating lignocellulose hydrolysates, differ in the composition of fermentable sugars as shown in Table 1. Apart from the model hydrolysates, the bacterial cultures were also cultivated in media containing solely the most-preferred sugar. The results of these experiments are presented in Table 2.

The results substantiated that *B. sacchari* is a robust bacterium capable of the utilization of various sugar mixtures. As expected, the highest CDM (3.45 g/L) and PHB titers (1.86 g/L) were gained in control cultivation on pure glucose; nevertheless, the values obtained on model hydrolysates were similar to the control. Actually, the lowest product titer was observed for model medium mimicking rice straw hydrolysate (1.35 g/L); nevertheless, even in this case, it still represents about 72% of the value obtained in the control culture. The highest sugar consumption was observed in the control culture and when using model hydrolysates of soft-wood and wheat straw, which indicates the strain's preference for hexoses. Nevertheless, data related to PHA production suggest that *B. sacchari* is a suitable bacterium for the conversion of various lignocellulose materials into PHA, as reported previously by numerous authors (Cesário et al., 2014; Raposo et al., 2017).

CDM values as well as PHA titers obtained by *H. halophila* are

generally higher than those gained employing *B. sacchari*. The best PHA production by *H. halophila* was recorded for the soft-wood hydrolysate, amounting to 4.75 g/L, which more than tripled the PHA titer obtained by *B. sacchari* on this model hydrolysate. Evidently, *H. halophila* also prefers hexoses over pentoses since the highest PHA titers, as well as the highest contents of PHA in biomass, were obtained in hexoses-rich model hydrolysates of soft-wood and rice straw. When comparing the halophilic bacterium *H. halophila* to the mesophilic non-halophilic bacterium *B. sacchari*, it should be mentioned that, aside from better productivity, halophiles possess numerous additional advantages, which should be taken into account. *H. halophila* was cultivated at a NaCl concentration of 66 g/L, which is a value high enough to prevent contamination of the process by common microflora (Chen and Jiang, 2018). Moreover, the high salt concentration is a very typical feature of most of the lignocellulose hydrolysates, since the process of lignocellulose hydrolysis usually involves chemical treatment of the material by mineral acid or base and subsequent neutralization, which generates high salt content (Obruci et al., 2015). Therefore, high salt tolerance or even halophilicity can be considered being a highly desirable property of a given PHA production strain when lignocellulose materials are used as substrates. Moreover, inexpensive seawater can be used for PHA production (Yue et al., 2014), and compatible solutes such as ectoines or trehalose accumulated by halophiles to cope with the high osmolarity of cultivation media can be considered being very interesting marketable by-products of PHA production (Kumar and Kim, 2018).

Oppositely to *B. sacchari* and *H. halophila*, *S. thermodepolymerans* prefers pentoses over hexoses, which is a rather scarce feature in microbiology. Therefore, when employing this bacterium, the highest PHA titers were obtained on hydrolysates rich in pentoses, especially in model hydrolysates of rice straw (3.94 g/L), sugar cane bagasse (3.25 g/L), and hard-wood (3.22 g/L). In these cases, the PHA titers gained by *S. thermodepolymerans* are higher than those obtained by *H. halophila* or *B. sacchari*. Oppositely, *S. thermodepolymerans* failed in readily utilizing the hexoses-rich model hydrolysate of soft-wood; in this case, CDM values (0.86 g/L), as well as PHA titer (0.13 g/L), are very low, thus indicating that this bacterium is not capable of efficient utilization of a mixture of glucose and mannose. Hence, *S. thermodepolymerans* seems to be the extremophilic bacterium of choice when pentoses-rich substrates shall be converted to PHA, while *H. halophila* can be very efficiently employed for the conversion of hexoses-rich mixtures. However, apart from substrates preference, there are additional facts that need to be taken into account when comparing halophilic and thermophilic bacteria from the PHA production point of view. Similar to high salt

Table 3
Evaluation of the effect of selected lignocellulose-derived microbial inhibitors on PHA production by the tested bacterial cultures.

		CDM [g/L]	PHA [g/L]	PHA (% of CDM)	Residual sugars [g/L]	V_{max} [g/g]	Inhibitory effect [% of PHA titers less compared to control]
<i>B. sacchari</i>	Control (glucose)	2.82 ± 0.01	1.56 ± 0.06	55.49 ± 1.95	8.59 ± 0.47	0.14	0
	Ferulic acid	1.92 ± 0.05	0.71 ± 0.04	37.26 ± 1.12	13.50 ± 0.27	0.11	54
	Gallic acid	3.03 ± 0.09	1.69 ± 0.01	55.85 ± 2.05	11.45 ± 0.08	0.20	-8
	Furfural	2.75 ± 0.02	1.47 ± 0.04	53.44 ± 1.98	9.20 ± 0.03	0.14	6
	5HMF	2.57 ± 0.02	1.33 ± 0.07	51.73 ± 2.14	9.74 ± 0.04	0.13	15
	Acetic acid	2.91 ± 0.00	1.60 ± 0.01	54.86 ± 0.18	13.16 ± 0.13	0.23	-2
<i>H. halophila</i>	Control (glucose)	2.68 ± 0.00	1.44 ± 0.07	48.17 ± 2.28	10.45 ± 0.03	0.15	8
	Control (xylose)	5.99 ± 0.07	5.10 ± 0.08	85.12 ± 2.38	2.37 ± 0.01	0.29	0
	Ferulic acid	0.10 ± 0.02	0.02 ± 0.00	26.26 ± 1.21	18.79 ± 0.04	0.02	100
	Gallic acid	3.99 ± 0.01	2.95 ± 0.13	73.89 ± 3.48	7.42 ± 0.12	0.23	42
	Furfural	3.97 ± 0.12	2.84 ± 0.01	71.61 ± 2.16	7.48 ± 0.03	0.23	44
	5HMF	5.44 ± 0.15	4.32 ± 0.03	79.45 ± 2.65	4.22 ± 0.10	0.27	15
<i>S. thermodepolymerans</i>	Control (xylose)	5.11 ± 0.16	3.87 ± 0.01	75.68 ± 2.23	6.97 ± 0.13	0.30	24
	Ferulic acid	1.99 ± 0.04	1.17 ± 0.01	59.05 ± 1.49	11.69 ± 0.26	0.14	77
	Gallic acid	6.31 ± 0.12	4.60 ± 0.13	73.00 ± 1.90	4.89 ± 0.01	0.30	0
	Ferulic acid	1.68 ± 0.01	0.87 ± 0.03	52.20 ± 1.80	13.00 ± 0.00	0.12	81
	Gallic acid	3.68 ± 0.57	2.09 ± 0.33	56.90 ± 1.60	14.35 ± 0.01	0.37	55
	Furfural	4.57 ± 0.10	3.49 ± 0.67	63.00 ± 1.00	6.78 ± 0.05	0.26	24
	5HMF	6.19 ± 0.21	3.67 ± 0.64	68.30 ± 1.70	3.74 ± 0.03	0.23	20
	Acetic acid	5.22 ± 0.10	3.95 ± 0.34	69.80 ± 2.50	7.32 ± 0.18	0.31	14
	Levulinic acid	6.89 ± 0.45	4.94 ± 1.54	**73.30 ± 4.10	3.93 ± 0.08	0.31	-7

* PHA contained 5.6 mol % of 3HV, **PHA contained 6.5 mol. % of 3HV.

concentration, also high temperature prevents the process from massive contamination by common microflora. In this context, Ibrahim and Steinbüchel (2010) operated a process of thermophilic (50 °C) production of PHA employing *Chelatococcus* sp. for long periods in a semi-aseptic mode of cultivation without noticeable contamination. Furthermore, considering the high salt content of lignocellulose hydrolysates, thermophiles are surprisingly not seriously disadvantaged as compared to halophiles, since the accumulation of compatible solutes is part of their adaptation strategy towards high temperatures, which helps them to withstand at the same time also hyperosmotic stress (Esteves et al., 2014). Therefore, thermophiles are usually also osmotolerant. Oppositely, the high salt-requirements of halophiles can represent a serious problem from the perspective of cultivation equipment corrosion (Chen and Jiang, 2018). From this point of view, a cultivation temperature of about 50–55 °C represents no danger for standard cultivation equipment, in contrast to excessive salt loads. Moreover, high cultivation temperatures might seem to be energetically demanding; however, metabolic heat generated by an active, quickly growing microbial culture and the energy generated by the stirrer system can dissipate a substantial amount of energy, thus making thermophilic cultivations "self-heating systems" (Ibrahim and Steinbüchel, 2010).

3.2. Influence of microbial inhibitors on PHA production

Microbial inhibitors present in lignocellulose hydrolysates seriously affect microbial growth and metabolism. Therefore, the robustness of a particular microorganism against microbial inhibitors is a decisive factor when considering its utilization for PHA production on lignocellulose hydrolysates. Hence, the sensitivity of all the three tested bacteria to selected lignocellulose-associated inhibitors was evaluated as well (Table 3). Bacterial cultures were exposed to selected phenolics, namely ferulic and gallic acid. These compounds are abundant in lignocellulose materials, substantially differ in chemical structure (ferulic acid is derivative of the unsaturated compound cinnamic acid, while gallic acid, a derivate both of pyrogallol and benzoic acid, is a member of the group of phenols) and reveal strong antimicrobial activity. They damage the bacterial cell membrane and also harm microbial metabolism by inducing protein denaturation and precipitation (Bhatia et al., 2020). Further, furfural and 5-hydroxymethyl furfural (5HMF) are products of

chemical decomposition of sugars during lignocellulose materials hydrolysis. These compounds seriously affect metabolic fluxes and the efficiency of energy metabolism (Horváth et al., 2003). Organic acids such as levulinic acid or acetic acid are also commonly present in hydrolysates. They can, in undissociated form, enter the cells via passive diffusion and then dissociate in the cells, which results in a substantial drop in the intracellular pH, thus harming the microbial cells by energy expenditure needed to cope with this pH-stress (Jönsson et al., 2013).

Among all the bacteria tested, *B. sacchari* seems to be the most resistant to the negative effect of microbial inhibitors. In this bacterium, ferulic acid was identified as the most potent inhibitor; its presence reduced PHA yields by about 54% as compared to the control culture (not exposed to any inhibitor). However, *H. halophila* was virtually completely inhibited by ferulic acid, and in *S. thermodepolymerans*, ferulic acid decreased PHA titers from 4.6 g/L (control cultivation) to 0.87 g/L (81% reduction). Further, unlike both investigated extremophiles, *B. sacchari* was not inhibited by gallic acid. On the contrary, the most inhibitor-sensitive strain was *H. halophila*. In this bacterium, apart from 5HMF, which revealed only minor inhibition, all the other inhibitors severely decreased PHA production as compared to the control culture. Further, among the tested microorganisms, only *H. halophila* was substantially inhibited by levulinic acid, which evidences that this bacterium lacks a metabolic pathway enabling its utilization. Oppositely, *B. sacchari* and *S. thermodepolymerans* were not seriously inhibited by levulinic acid, and both cultures were capable of its incorporation into the structure of PHA: in the presence of levulinic acid, both cultures produced a copolymer consisting of 3-hydroxybutyrate (3HB) and 3-hydroxyvalerate (3HV) – poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (P(3HB-co-3HV)). It is likely that in both bacteria levulinic acid was metabolized as described by Rand et al. (2017), resulting in the formation of acetyl-CoA and propionyl-CoA, the latter can be coupled with acetyl-CoA yielding 3-hydroxyvaleryl-CoA, which is subsequently incorporated into the PHA chain. P(3HB-co-3HV) possesses better material properties than poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), the homopolymer of 3HB. Therefore, the capability of the utilization of levulinic acid as a structural precursor of 3HV can be considered a very positive feature of the bacterium.

The fact that both extremophilic bacteria are more prone to microbial inhibitors than *B. sacchari* is indeed surprising. What is of particular

interest is the very high sensitivity of both cultures to ferulic acid. This knowledge should be taken into account when developing an NGIB process for PHA production from lignocellulose hydrolysates. Some strategies might reduce the negative effect of inhibitors. At first, microbial inhibitors can be removed from the hydrolysate in a process which is termed detoxification (Bhatia et al., 2020)). Further, microbial cultures can be adapted to inhibitor compounds by evolutionary engineering (Novackova et al., 2019), or approaches of metabolic engineering (Song et al., 2017). Nevertheless, even though the tested extremophiles were more susceptible to microbial inhibitors, both *S. thermodepolymerans* and *H. halophila* are auspicious PHA producers, performing superior to *B. sacchari*. With exception of heavily inhibiting ferulic acid and levulinic acid (inhibiting only *H. halophila*), PHA titers obtained by extremophiles are substantially (even 2–3 fold) higher than those gained by *B. sacchari* in the presence of the same microbial inhibitor.

4. Conclusion

The potential of different microbial strains for PHA production on model lignocellulose hydrolysates was studied. It was shown that both extremophiles are auspicious PHA producers, superior to commonly employed mesophilic bacterium *B. sacchari*. Selection of most appropriate production strain heavily depends on sugar composition of a given lignocellulose hydrolysate and presence of microbial inhibitors. As the main take-away message, presented data constitute another step forwards when it comes to development of robust, inexpensive, and efficient PHA production processes according to the concept of NGIB.

Funding

This study was funded by the project GA19-20697S of the Czech Science Foundation (GAČR), and supported by Brno University of Technology intra-university junior project FCH/FEKT-J-20-6399. Ivana Novackova is Brno Ph.D. Talent Scholarship Holder (Funded by the Brno City Municipality).

CRediT authorship contribution statement

Xenie Kourilova: Investigation, Writing - review & editing. **Ivana Novackova:** Investigation, Writing - review & editing. **Martin Koller:** Writing - original draft, Writing - review & editing. **Stanislav Obruca:** Writing - original draft, Conceptualization, Visualization, Supervision.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- Bhatia, S.K., Jagtap, S.S., Bedekar, A.A., Bhatia, R.K., Patel, A.K., Pant, D., Rajesh Bans, J., Rao, C.V., Kim, Y.-G., Yang, Y.-H., 2020. Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: effect of key parameters, technological improvements, and challenges. *Bioresour. Technol.* 300, art. no. 122724.
- Brandl, H., Gross, B.A., Lenz, B.W., Fuller, R.C., 1988. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Appl. Environ. Microb.* 54, 1977–1982.
- Bowers, T., Vaidya, A., Smith, D.A., Lloyd-Jones, G., 2014. Softwood hydrolysate as a carbon source for polyhydroxyalkanoate production. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 89, 1030–1037.
- Osório, M.T., Raposo, R.S., de Almeida, M.C.M.D., van Kreulen, F., Ferreira, B.S., da Fonseca, M.M.R., 2014. Enhanced bioproduction of poly-3-hydroxybutyrate from wheat straw lignocellulosic hydrolysates. *N. Biotechnol.* 31, 104–113.
- Chen, G.Q., Jiang, X.R., 2018. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Curr. Opin. Biotech.* 50, 94–100.
- Chotiborská, P., Palmarská-Adámská, B., Galbe, M., Zacchi, B., Melnich, K., Hychtara, M., 2004. Processing of wheat bran to sugar solution. *J. Food Eng.* 61, 561–565.
- European Bioplastics, *Bioplastic Market Data 2019* available at: https://docs.european-bioplastics.org/publications/market_data/Report_Bioplastics_Market_Data_2019.pdf.
- Esteves, A.M., Chandruvan, S.K., McTernan, P.M., Borges, N., Adams, M.W.W., Samis, H., 2014. Mammorylglycerate and di-myo-inositol phosphate have interchangeable roles during adaptation of *Pyrococcus furiosus* to heat stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 4226–4232.
- Horváth, I.S., Franzén, C.J., Taherzadeh, M.J., Niklasson, C., Lidén, G., 2003. Effects of furfural on the respiratory metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in glucose-limited chemostats. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4076–4080.
- Reahin, M.H., Steinbüchel, A., 2010. High-cell-density cyclic fed-batch fermentation of poly(3-hydroxybutyrate)-accumulating thermophile, *Chelatococcus* sp. strain MW10. *Appl. Environ. Microb.* 76, 7890–7895.
- Jeffries, T.W., Sreenath, H.K., 1988. Fermentation of hemicellulosic sugars and sugar mixtures by *Candida shehatae*. *Biotechnol. Bioeng.* 31, 503–506.
- Jónsson, L.J., Alriksson, B., Nilvebrant, N.-O., 2013. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnol. Biofuels*, 6, art. no. 16.
- Koller, M., Mukherjee, A., 2020. Polyhydroxyalkanoates-linking properties, applications, and end-of-life options. *Chem. Biochem. Eng. Q* 34, 115–129.
- Kourilova, X., Pernicova, I., Sedlar, K., Musilova, J., Sedlacek, P., Kalina, M., Koller, M., Obruca, S., 2020. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a thermophilic strain of *Schlegella thermodepolymerans* from xylose rich substrates. *Bioresour. Technol.* 315, art. no. 123885.
- Kucera, D., Pernicova, I., Kovalčík, A., Koller, M., Mullerova, L., Sedlacek, P., Mravec, F., Nebesárova, J., Kalina, M., Marova, I., Krzyzaneck, V., Obruca, S., 2018. Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*. *Bioresour. Technol.* 256, 552–556.
- Kumar, P., Kim, R.S., 2018. Valorization of polyhydroxyalkanoates production process by co-synthesis of value-added products. *Bioresour. Technol.* 269, 544–556.
- Nielsen, T. D., Hasselbalch, J., Holmberg, K., Strippel, J., 2020. Politics and the plastic crisis: a review throughout the plastic life cycle. *Wiley Interdiscip. Rev. Energy Environ.* 9, art. no. e360.
- Novackova, I., Kucera, D., Porizka, J., Pernicova, I., Sedlacek, P., Koller, M., Kovalčík, A., Obruca, S., 2019. Adaptation of *Cupriavidus necator* to levulinic acid for enhanced production of P(3HB-co-3HV) copolyesters. *Biochem. Eng. J.* 151, art. no. 107350.
- Obruca, S., Benesova, P., Petrik, S., Oborna, J., Peikryl, B., Marova, I., 2014. Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolysate of spent coffee grounds. *Process Biochem.* 49, 1409–1414. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.05.033>.
- Obruca, S., Benesova, P., Marzalek, L., Marova, I., 2015. Use of lignocellulosic materials for PHA production. *Chem. Biochem. Eng. Q* 29, 135–144.
- Obruca, S., Sedlacek, P., Slaninova, E., Fritz, J., Duffort, C., Meixner, K., Sedřilova, Z., Koller, M., 2020. Novel unexpected functions of PHA granules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 4795–4810.
- Pernicova, I., Novackova, I., Sedlacek, P., Kourilova, X., Kalina, M., Kovalčík, A., Koller, M., Nebesárova, J., Krzyzaneck, V., Hruhanova, K., Masilko, J., Slaninova, E., Obruca, S., 2020. Introducing the newly isolated bacterium *Aneurinibacillus* sp. HI as an auspicious thermophilic producer of various polyhydroxyalkanoates (PHA) copolymers-1. Isolation and characterization of the bacterium. *Polymers* 12, art. no. 1235.
- Rand, J.M., Pistikoul, T., Clark, R.L., Thiede, J.M., Mehner, C.R., Agnew, D.E., Campbell, C.E., Markley, A.L., Price, M.N., Ray, J., Wetmore, K.M., Suh, Y., Arkin, A.P., Deuschhaus, A.M., Amador-Noguer, D., Pfeleger, B.F., 2017. A metabolic pathway for catabolizing levulinic acid in bacteria. *Nat. Microbiol.* 2, 1624–1634.
- Raposo, R.S., de Almeida, M.C., de Oliveira, M.D.C., da Fonseca, M.M., Osório, M.T., 2017. A *Burkholderia sacchari* cell factory: production of poly-3-hydroxybutyrate, xylitol and xylonic acid from xylose-rich sugar mixtures. *N. Biotechnol.* 34, 12–22.
- Robert, I.C., Felipe, M.G.A., de Mascilha, I.M., Vrinou, M., Sato, S., da Silva, S.S., 1995. Xylitol production by *Candida guilliermondii* as an approach for the utilization of agroindustrial residues. *Bioresour. Technol.* 51, 255–257.
- Sabapathy, P.C., Devaraj, P., Meixner, K., Anburajan, P., Kathirvel, P., Ravikumar, Y., Zabeđ, H.M., Qi, X., 2020. Recent developments in polyhydroxyalkanoates (PHAs) production – a review. *Bioresour. Technol.* 306, art. no. 123132.
- Saha, B., Irena, L., Cotian, M., Wu, Y., 2005. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochem.* 40, 3693–3700.
- Song, H.-S., Jinn, J.-M., Kim, H.-J., Bhatia, S.K., Sathiyasaranayyan, G., Kim, J., Won Hong, J., Gi Hong, Y., Young Choi, K., Kim, Y.-G., Kim, W., Yang, Y.-H., 2017. Increase in furfural tolerance by combinatorial overexpression of NAD salvage pathway enzymes in engineered *Isobutanol*-producing *E. coli*. *Bioresour. Technol.* 245, 1430–1435.
- Yoo, H., Ling, C., Yang, T., Chen, X., Chen, Y., Deng, H., Wu, Q., Chen, J., Chen, G.-Q., 2014. A seawater-based open and continuous process for polyhydroxyalkanoates production by recombinant *Halomonas campanensis* LS21 grown in mixed substrates. *Biotechnol. Biofuels* 7, art. no. 108.

11.5 Příloha V

NOVÁČKOVÁ, I.; KOUŘILOVÁ, X.; OBRUČA, S.; *Způsob izolace PHA biopolymerů z halofilních a termofilních bakterií.* Patentová přihláška, číslo deníku 2022/747

Způsob izolace biopolymerů polyhydroxyalkanoátů z halofilních a termofilních bakterií

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu efektivní izolace polyhydroxyalkanoátů z mikrobiální biomasy halofilních nebo termofilních bakterií.

Dosavadní stav techniky

Extremofilní mikroorganismy v poslední době přitahují pozornost odborné společnosti z řady důvodů. V oblasti biotechnologií je hlavní motivací nezměrný biosyntetický potenciál extremofilních mikroorganismů a také schopnost růstu a produkce vybraných metabolitů při podmínkách (vysoká nebo nízká teplota, vysoká salinita, extrémní hodnoty pH), které do velké míry eliminují riziko kontaminace procesu běžnou mesofilní mikroflórou. Díky své robustnosti vůči nežádoucí mikrobiální kontaminaci je možné procesy využívající extremofilní mikroorganismy realizovat za snížených nároků na sterilitu případně zcela bez sterilizace kultivačního média nebo zařízení. To má ve svém důsledku výrazně pozitivní dopady na energetickou a ekonomickou bilanci takovýchto procesů. Navíc vysoká odolnost procesu vůči kontaminaci umožňuje využít vysoce produktivní kontinuální nebo semi-kontinuální kultivační scénáře. Celkově je tedy využití extremofilních mikroorganismů v biotechnologiích moderním trendem, který je v současné době označován jako koncept průmyslových biotechnologií nové generace (Next-Generation Industrial Biotechnology) [1].

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou mikrobiální zásobní polyestery, které akumulují celá řada prokaryotických mikroorganismů. Kromě své primární zásobní funkce také významně navyšují stresovou robustnost mikroorganismů a jejich akumulace je pravděpodobně součástí adaptace na některé extrémní podmínky, jako je například vysoká salinita prostředí [2]. PHA jsou tedy široce rozšířené také mezi extremofilními prokaryoty. PHA představují velice zajímavou ekologickou alternativu k petrochemickým polymerům – PHA jsou kompletně biodegradabilní a kompostovatelné materiály, které jsou vyráběny ze zcela obnovitelných případně dokonce odpadních surovin, přičemž jejich vlastnosti a využití je velice podobné jako mají tradiční petrochemické polymery jako je například polypropylen [3].

Nicméně hlavní překážkou, která brání masovému využití PHA, je vysoká cena jejich produkce. Právě v tomto kontextu je velice slibné využití konceptu průmyslových biotechnologií nové generace a extremofilních mikroorganismů, což by ve svém důsledku

mohlo významně snížit cenu PHA. V tomto kontextu je možné využít té skutečnosti, že řada extremofilů je schopna přirozené produkce PHA. Především představitelé halofilních mikroorganismů (mikroorganismy adaptované na vysokou salinitu prostředí) patří mezi velice slibné producenty PHA – schopnost produkce PHA byla popsána u řady zástupců rodu *Halomonas* jako jsou třeba *Halomonas boliviensis* [4], *Halomonas neptunia* a *Halomonas hydrothermalis* [5], *Halomonas bluephagenesis* [6] nebo *Halomonas halophila* [7], případně u extrémně halofilních zástupců skupiny Archaea jako je například *Haloferax mediterranei* [8]. Jak již bylo uvedeno výše, akumulace PHA je součástí adaptační strategie halofilů vůči hyperosmotickému prostředí, nicméně hlavní adaptační strategií je obvykle akumulace organických látek (tzv. osmolytů), které kompenzují osmotický tlak prostředí. U extrémních halofilů plní tuto funkci K^+ iony, u středně a mírně halofilních mikroorganismů jsou to organické molekuly, jako jsou například betain, ektoiny nebo trehalóza [9].

Kromě halofilů byla produkce PHA pozorována také u řady termofilních bakterií (adaptovaných na vysokou teplotu prostředí). Mezi PHA produkující termofily patří například zástupci rodu *Caldimonas* [10], *Tepidimonas* [11] nebo velice slibný PHA producent *Schlegelella thermodepolymerans*, který má velký potenciál při produkci PHA s využitím substrátů na bázi lignocelulózy s vysokým obsahem xylózy [12, 13]. U termofilů se PHA pravděpodobně přímo nepodílejí na adaptaci vůči vysoké teplotě, ta je obvykle spojená se změnou struktury proteinů, navýšení aktivity chaperonů a dalších heat-shock proteinů, a také akumulací organických kompatibilních látek podobně jako je tomu u halofilních prokaryot [14].

Kromě samotné biotechnologické produkce PHA se na vysoké ceně PHA podílí také náročnost izolačního procesu. Extrakce polymeru z mikrobiálních buněk je často realizovaná pomocí organických rozpouštědel, nicméně vzhledem k omezené rozpustnosti polymeru, která je navíc limitována jen na některá rozpouštědla (především chlorovaná rozpouštědla jako je chloroform nebo dichlormethan), je tento postup technologicky náročný a využití toxických rozpouštědel do velké míry eliminuje pozitivní ekologický dopad materiálů [15]. Řada dalších prací popisuje extrakci PHA z bakteriální biomasy s využitím jiných méně toxických rozpouštědel, jako jsou alkoholy [16], aceton [17] nebo estery [18], nicméně vzhledem k nízké rozpustnosti PHA v těchto rozpouštědlech vyžaduje extrakční proces extrémní podmínky – především vysokou teplotu a tlak, ale i přes to vykazuje jen omezenou účinnost. Další možností je využití extrakce superkritickým CO_2 . Tento proces má velice pozitivní ekologickou konotaci, nicméně vzhledem k omezené rozpustnosti PHA v superkritickém CO_2 je proces málo účinný [19, 20]. Kromě extrakčních metod je možné při izolaci PHA z mikrobiální biomasy využít i

alternativní způsob, který je založen na odstranění ostatních složek biomasy, přičemž PHA granule zůstávají v pevném stavu a jsou následně separovány pomocí centrifugace anebo filtrace. K odstranění jiných buněčných komponent než PHA může být využito celé řady činidel a strategií. V literatuře je například popsáno využití hydrolytických enzymů (obvykle proteáz) [21], prakticky jsou však tyto postupy do velké míry limitovány vysokou cenou enzymů. Alternativním způsobem je digesce biomasy pomocí chemických činidel jako je NaOH [22], chonan sodný [23], EDTA a další chelatační činidla případně detergenty jako je například dodecylsírán sodný (SDS) [24] nebo lauryl amonný [25]. Samozřejmě mohou být jednotlivé přístupy kombinovány, jak ve své práci popisuje Kathiraser a kol., kteří k izolaci PHA využili enzymy v kombinaci s detergenty a EDTA [26].

Jako nástroj umožňující snadnou disrupci buněk byla využita i hypotonická lyze mikrobiálních buněk. Tento postup je založen na expozici buněk prostředí o výrazně nižší osmotické síle, než je ta, kterou disponuje kultivační médium. Při náhlé expozici hypotonickému prostředí začne voda vnikat do buněk a následně dojde k narušení jejich integrity, prasknutí a uvolnění intracelulárního obsahu buněk. Tento postup byl precizně popsán především u extrémně halofilních prokaryot jako je například *Haloferax mediterranei*, které jsou standardně kultivovány při koncentracích soli vyšších než 200 g/l. Při expozici destilované vodě dochází okamžitě k disrupci buněk a uvolnění PHA granulí do roztoku, po centrifugaci pak v precipitátu vznikají dvě fáze – spodní frakci představují zbytky buněčné hmoty a svrchní fázi pak PHA granule [27], nicméně čistota takto připravených PHA materiálů není příliš vysoká a obvykle je třeba je dále purifikovat například pomocí chlomanu případně dalších činidel [8, 28].

Literatura

- [1] CHEN, G.-Q., X.-R. JIANG. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2018; **50**: 94–100. doi: 10.1016/j.copbio.2017.11.016.
- [2] OBRUCA, S., P. SEDLACEK, M. KOLLER, D. KUCERA, I. PERNICOVA. Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. *Biotechnol. Adv.* 2018; **36**(3): 856-870. doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.12.006.
- [3] KOURMENTZA, C., J. PLÁCIDO, N. VENETSANEAS, A. BURNIOL-FIGOLS, C. VARRONE, H. N. GAVALA, M. A. M. REIS. Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. *Bioeng.* 2017; **4**(4). doi: 10.3390/bioengineering4020055.

- [4] QUILLAGUAMÁN, J., S. HASHIM, F. BENTO, B. MATTIASSON, R. HATTI-KAUL. Poly(β -hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1 using starch hydrolysate as substrate. *J. Appl. Microbiol.* 2005; **99**(1): 151-157. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02589.x.
- [5] PERNICOVA, I., D. KUCERA, J. NEBESAROVA, M. KALINA, I. NOVACKOVA, M. KOLLER, S. OBRUCA. Production of polyhydroxyalkanoates on waste frying oil employing selected *Halomonas* strains. *Bioresour. Technol.* 2019; **292**. doi: 10.1016/j.biortech.2019.122028.
- [6] REN, Y., Ch. LING, I. HAJNAL, Q. WU, G.-Q. CHEN. Construction of *Halomonas bluephagenesis* capable of high cell density growth for efficient PHA production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018; **102**(10): 4499-4510. doi: 10.1007/s00253-018-8931-7.
- [7] KUCERA, D., I. PERNICOVÁ, A. KOVALCIK, et al. Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*. *Bioresour. Technol.* 2018; **256**: 552-556. doi: 10.1016/j.biortech.2018.02.062.
- [8] ALSAFADI, D., O. AL-MASHAQBEH. A one-stage cultivation process for the production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) from olive mill wastewater by *Haloferax mediterranei*. *New Biotechnol.* 2017; **34**: 47-53. doi: 10.1016/j.nbt.2016.05.003.
- [9] SHIVANAND, P., G. MUGERAYA. Halophilic Bacteria and Their Compatible Solutes – Osmoregulation and Potential Applications. *Curr. Sci.* 2011; **100**(10): 1516–1521.
- [10] HSIAO, L.-J., M.-Ch. LEE, P.-J. CHUANG, Y.-Y. KUO, J.-H. LIN, T.-M. WU, S.-Y. LI. The production of poly(3-hydroxybutyrate) by thermophilic *Caldimonas manganoxidans* from glycerol. *J. Polym. Res.* 2018; **25**(4). doi: 10.1007/s10965-018-1486-6.
- [11] KOURILOVA, X., I. PERNICOVA, M. VIDLAKOVA, et al. Biotechnological Conversion of Grape Pomace to Poly(3-hydroxybutyrate) by Moderately Thermophilic Bacterium *Tepidimonas taiwanensis*. *Bioeng.* 2021; **8**(10). doi: 10.3390/bioengineering8100141.
- [12] KOURILOVA, X., I. NOVACKOVA, M. KOLLER, S. OBRUCA. Evaluation of mesophilic *Burkholderia sacchari*, thermophilic *Schlegelella thermodepolymerans* and halophilic *Halomonas halophila* for polyhydroxyalkanoates production on model media mimicking lignocellulose hydrolysates. *Bioresour. Technol.* 2021; **325**. doi: 10.1016/j.biortech.2021.124704.
- [13] KOURILOVA, X., I. PERNICOVA, K. SEDLAR, J. MUSILOVA, P. SEDLACEK, M. KALINA, M. KOLLER, S. OBRUCA. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a thermophilic strain of *Schlegelella thermodepolymerans* from xylose rich substrates. *Bioresour. Technol.* 2020; **315**. doi: 10.1016/j.biortech.2020.123885.
- [14] URBIETA, M. S., E. R. DONATI, K.-G. CHAN, S. SHAHAR, L. L. SIN, K. M. GOH. Thermophiles in the genomic era: Biodiversity, science, and applications. *Biotechnol. Adv.* 2015; **33**(6): 633-647. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.04.007.
- [15] RAMSAY, J. A., E. BERGER, R. VOYER, C. CHAVARIE, B. A. RAMSAY. Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents. *Biotechnol. Techniq.* 1994; **8**(8): 589-594. doi: 10.1007/BF00152152.
- [16] ARAMVASH, A., F. MOAZZENI ZAVAREH, N. GHOLAMI BANADKUKI. Comparison of different solvents for extraction of polyhydroxybutyrate from *Cupriavidus necator*. *Eng. Life Sci.* 2018; **18**(1): 20-28. doi: 10.1002/elsc.201700102.
- [17] KOLLER, M., R. BONA, E. CHIellini, G. BRAUNEGG. Extraction of short-chain-length poly-[(R)-hydroxyalkanoates] (scl-PHA) by the “anti-solvent” acetone under

- elevated temperature and pressure. *Biotechnol. Lett.* 2013; **35**(7): 1023-1028. doi: 10.1007/s10529-013-1185-7.
- [18] JIANG, G., B. JOHNSTON, D. TOWNROW, I. RADECKA, M. KOLLER, P. CHABER, G. ADAMUS, M. KOWALCZUK. Biomass Extraction Using Non-Chlorinated Solvents for Biocompatibility Improvement of Polyhydroxyalkanoates. *Polymers*. 2018; **10**(7). doi: 10.3390/polym10070731.
- [19] KHOSRAVI-DARANI, K., E. VASHEGHANI-FARAHANI, S.A. SHOJAOSADATI, Y. YAMINI. Effect of Process Variables on Supercritical Fluid Disruption of *Ralstonia eutropha* Cells for Poly(R-hydroxybutyrate) Recovery. *Biotechnol. Prog.* 2004; **20**(6): 1757-1765. doi: 10.1021/bp0498037.
- [20] HEJAZI, P., E. VASHEGHANI-FARAHANI, Y. YAMINI. Supercritical Fluid Disruption of *Ralstonia eutropha* for Poly(β -hydroxybutyrate) Recovery. *Biotechnol. Prog.* 2003; **19**(5): 1519-1523. doi: 10.1021/bp034010q.
- [21] HOLMES P. A., G. B. LIM. Separation process. US Patent 4910145, 199
- [22] CHOI J. I., S. Y. LEE. Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals. *Biotechnol. Bioeng.* 2000; **62**: 546-553.
- [23] BERGER, E., B. A. RAMSAY, J. A. RAMSAY, C. CHAVARIE, G. BRAUNEGG. PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass. *Biotechnol. Techniq.* 1989; **3**(4): 227-232. doi: 10.1007/BF01876053.
- [24] MARUDKLA, J., A. PATJAWIT, Ch. CHUENSANGJUN, S. SIRISANSANEYAKUL. Optimization of poly(3-hydroxybutyrate) extraction from *Cupriavidus necator* DSM 545 using sodium dodecyl sulfate and sodium hypochlorite. *Agricultur. Natur. Resour.* 2018; **52**(3): 266-273. doi: 10.1016/j.anres.2018.09.009.
- [25] MANNINA, G., D. PRESTI, G. MONTIEL-JARILLO, M. E. SUÁREZ-OJEDA. Bioplastic recovery from wastewater: A new protocol for polyhydroxyalkanoates (PHA) extraction from mixed microbial cultures. *Bioresour. Technol.* 2019; **282**: 361-369. doi: 10.1016/j.biortech.2019.03.037.
- [26] KATHIRASER, Y., M. K. AROUA, K. B. RAMACHANDRAN, I. K. P. TAN. Chemical characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) recovered by enzymatic treatment and ultrafiltration. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2007; **82**(9): 847-855. doi: 10.1002/jctb.1751.
- [27] RODRIGUEZ-VALERA, F. Halobacteria as producers of polyhydroxyalkanoates. *FEMS Microbiol. Lett.* 1992; **103**(2-4): 181-186. doi: 10.1016/0378-1097(92)90308-B.
- [28] BHATTACHARYYA, A., A. PRAMANIK, S. K. MAJI, S. HALDAR, U. K. MUKHOPADHYAY, J. MUKHERJEE. Utilization of vinasse for production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. *AMB Express.* 2012; **2**(1). doi: 10.1186/2191-0855-2-34.

Přehled vyobrazení

Obrázek 1: Schématické znázornění způsobu izolace biopolymerů polyhydroxyalkanoátů z halofilních a termofilních bakterií:

A – kultivace halofilní nebo termofilní (bez nutnosti přidavku NaCl) kultury s vysokým obsahem PHA a organických osmolytů; B – separace buněk pomocí centrifugace (alternativně filtrace); C – odstranění kultivačního média; D – expozice buněk hypotonickému roztoku obsahujícímu SDS (1–5 g/l) při vysoké teplotě (60–90°C) – lyze buněk; E – separace PHA granulí z roztoku pomocí centrifugace; F – sběr PHA a následné zpracování; G – supernatant po separaci PHA granulí; H – precipitace SDS pomocí KCl; I – recyklace SDS.

Obrázek 2: FTIR spektrum původní biomasy *H. halophila* (1) a polymeru izolovaného optimalizovaným izolačním postupem (2) a také komerčního vzorku PHB (Biomer) (3). Šipky ukazují na absorpční pásy odpovídající složkám biomasy (3300, 1640 a 1540 cm^{-1} – proteiny).

Obrázek 3: Cryo-SEM snímky biomasy *H. halophila* před izolací (A) a PHA granulí po izolaci (B).

Obrázek 4: Charakterizace růstu a produkce P(3HB) kultury *H. halophila* v laboratorním reaktoru.

Obrázek 5: FTIR spektrum původní biomasy *S. thermodepolymerans* (1) a polymeru izolovaného optimalizovaným izolačním postupem (2) a také komerčního vzorku PHB (Biomer) (3). Šipky ukazují na absorpční pásy odpovídající dominantním složkám biomasy (3300, 1640 a 1540 cm^{-1} – proteiny).

Obrázek 6: Princip recyklace SDS z precipitátu KDS pomocí ultradialýzy s membránou o hodnotě cut-off 1 kDa

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je využití unikátních vlastností extremofilních buněk, konkrétně vysoké koncentrace intracelulárních solutů, která je typická pro halofilní i termofilní mikroorganismy, ke snadné izolaci polyhydroxyalkanoátů o vysoké čistotě. Dle způsobu podle vynálezu je extremofilní kultura exponována hypotonickému roztoku o vysoké teplotě (60–90°C) a nízké koncentraci (1–5 g/l) anionaktivního detergentu – dodecylsiranu sodného (SDS). Současné využití všech tří faktorů (hypotonického prostředí, vysoké teploty a SDS) vede

k velice efektivní buněčné lyzi a solubilizaci buněčných komponent jako jsou proteiny, lipidy, komponenty buněčné stěny atd., takže PHA materiál o vysoké čistotě je následně možné separovat jako pevnou frakci pomocí centrifugace nebo filtrace.

Pro zlepšení ekologické i ekonomické stránky procesu se provede precipitace SDS v supernatantu (po separaci PHA) pomocí KCl, což výrazně sníží zátěž, kterou by supernatant představoval z pohledu čištění odpadní vody a zároveň je možné SDS s využitím membránových procesů recyklovat a využít opakovaně ve způsobu izolace podle vynálezu, což má výrazně pozitivní dopad na ekonomiku procesu. Princip celého procesu je obsahem obrázku č. 1.

Způsob izolace polyhydroxyalkanoátů z halofilních a termofilních kultur bakterií podle vynálezu zahrnuje kroky kultivace produkční kultury v kultivačním médiu, separace buněk produkční kultury z kultivačního média, vystavení separovaných buněk produkční kultury hypotonickému roztoku obsahujícímu dodecylsírany sodný o koncentraci 1–5 g/l při teplotě 60 až 90 °C, oddělení získaných granulí polyhydroxyalkanoátů z buněk kultury od supernatantu hypotonického roztoku, precipitaci supernatantu přidávkem 4 M KCl v objemovém poměru supernatant : KCl 1:1, separaci vysráženého dodecylsírany draselného ze supernatantu, regeneraci získaného dodecylsírany sodného ze supernatantu a jeho opětovné použití v hypotonickém roztoku při izolaci polyhydroxyalkanoátů z kultur bakterií v další šarži.

Při způsobu izolace polyhydroxyalkanoátů z halofilních kultur bakterií je celková koncentrace solí v kultivačním médiu produkční kultury výhodně více než 50 g/l. Halofilní kulturou může být například bakterie *Halomonas halophila*.

Při způsobu izolace polyhydroxyalkanoátů z termofilních kultur bakterií je teplota kultivačního média výhodně nejméně 50°C. Termofilní kulturou může být například bakterie *Schlegelella thermodepolymerans*.

Získané polyhydroxyalkanoáty se podle výhodného provedení přečistí promytím ethanolem nebo acetonem.

Podstata vynálezu je dále vysvětlena podle příkladů provedení, které však žádným způsobem neomezují další možná provedení v rozsahu patentových nároků.

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1

Izolace PHA z biomasy halofilní bakterie *Halomonas halophila*

Halofilní bakterie *Halomonas halophila* CCM 3662 byla kultivována v Erlenmeyerových baňkách aerobně za stálého míchání (180 rpm) na termostátované třepačce (30 °C) po dobu 24 h v komplexním médiu s následujícím složením:

Složení komplexního média:

Yeast Extract	3 g
Pepton	15 g
Glukóza	1 g
NaCl	66 g
Destilovaná voda	1 000 ml

Kultura narostlá v komplexním médiu byla následně využita jako inokulum pro zaočkování produkčních kultur, které byly kultivovány po dobu 72 h za totožných podmínek v minerálním médiu s následujícím složením:

Složení minerálního média:

(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0 g
KH ₂ PO ₄	1,02 g
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	11,1 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2 g
NaCl	66 g
Glukóza	20 g
Roztok stopových prvků MES*	0,1 ml
Destilovaná voda	1 000 ml

*Složení roztoku stopových prvků MES:

FeCl ₃	9,7 g
CaCl ₂	7,8 g
CuSO ₄	0,156 g
CoCl ₂	0,119 g

NiCl ₂	0,118 g
CrCl ₂	0,062 g
0,1 M HCl	1 000 ml

Po ukončení kultivace byly testovány různé způsoby izolace PHA z biomasy založené na kombinovaném namáhání bakteriálních buněk hypotonickým prostředím, detergentem o nízké koncentraci a vysokou teplotou. Byla otestována celá řada ekologicky šetrných a biodegradabilních detergentů jako jsou například cocamidopropyl betaine, coco glukosid, lauryl glukosid, rhamnolipidy nebo sophorolipidy, nicméně jejich využití nevedlo k dostatečné čistotě izolovaného materiálu. Proto byl jako detergent využit dodecylsírán sodný (SDS). Jeho použití k izolaci PHA již bylo popsáno, nicméně dle dosavadního stavu techniky nebyl SDS nikdy využit k izolaci způsobem podle vynálezu – tedy v nízké koncentraci za vysoké teploty k izolaci PHA pomocí hypotonického šoku ze středně halofilních mikrobiálních buněk vyžadujících 3–20 hm. % NaCl v růstovém médiu.

V prvním kroku byla testována optimální koncentrace SDS, experiment byl proveden následovně – v centrifugační zkumavce bylo zcentrifugováno (6 000 rpm, 10 min) 10 ml buněčné kultury s obsahem PHA 75,45 hm. %, supernatant byl slit a nahrazen vodným roztokem SDS o různé koncentraci (1; 2,5; 5 a 10 g/l). Sediment byl rozsuspendován a následně byl vzorek inkubován při teplotě 70°C po dobu 120 min. Po skončení inkubace byla opět provedena centrifugace (6 000 rpm, 5 min), supernatant byl slit a sediment obsahující převážně izolované PHA granule byl vysušen do konstantní hmotnosti při 70°C, čistota takto získaného materiálu bylo ověřena pomocí plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1, nejvyšší čistoty bylo dosaženo při koncentraci SDS 5 g/l.

Tabulka 1

Vliv koncentrace SDS na čistotu PHA získaného z buněk kultury *H. halophila*

SDS (g/l)	Čistota PHA (hm. %)
1	88,0 ± 0,4
2,5	91,4 ± 2,7
5	97,1 ± 3,7
10	89,6 ± 1,4

V dalším kroku byla optimalizována teplota inkubace směsi, koncentrace použitého SDS byla 5 g/l, výsledky jsou uvedeny v tabulce 2. Nejvyšší čistoty bylo dosaženo při teplotě 90°C, ale

na základě výtěžků polymeru a také vzhledem ke snížení energetických nároků byla jako optimální zvolena pro izolaci teplota 70°C.

Tabulka 2

Vliv teploty inkubace na čistotu a výtěžek PHA získaného z buněk kultury *H. halophila*

Teplota inkubace	Čistota PHA (hm. %)	Výtěžek (%)
50°C (120 min)	97,5 ± 1,2	91,9
70°C (120 min)	96,7 ± 0,3	97,2
90°C (120 min)	99,7 ± 0,1	89,6
4°C (120 min) + 70°C (120 min)	94,3 ± 1,5	91,7

V následujícím kroku byl ověřen vliv počáteční koncentrace biomasy na čistotu získaného materiálu a výtěžek procesu. Smyslem tohoto experimentu bylo ověřit robustnost izolačního procesu s ohledem právě na různou počáteční koncentraci biomasy – při využití většího poměru biomasy k roztoku SDS je možné výrazně snížit náklady na izolační proces (množství SDS na biomasu) a zároveň je možné výrazně snížit ekologickou zátěž, kterou způsobuje SDS v odpadní vodě. Různé navážky biomasy byly získány centrifugací různého objemu původní kultury, ve všech případech byla izolace provedena pomocí 10 ml roztoku SDS o koncentraci 5 g/l při teplotě 70°C. Výsledky jsou prezentovány v tabulce 3, celkově je možné konstatovat, že proces je velice robustní z pohledu množství počáteční biomasy a (výtěžnosti procesu i čistoty získaného polymeru byly pro všechny vzorky velice podobné) a pomocí námi vyvinutého izolačního postupu je možné izolovat PHA i z biomasy získané pomocí high-cell-density cultivation (například pomocí fed-batch kultivace).

Tabulka 3

Vliv počáteční koncentrace biomasy na čistotu PHA a výtěžek polymeru získaného z buněk kultury *H. halophila*

Objem vzorku	Počáteční koncentrace biomasy (g/l)	Čistota PHA (hm. %)	Výtěžek (%)
Původní biomasa	5,44	75,48	-
5 ml	2,72	96,19	85,8
10 ml (standardní)	5,44	96,63	99,2
20 ml	10,88	95,91	104,4
30 ml	16,32	91,53	96,0
40 ml	21,76	94,87	102,7
50 ml	27,20	95,87	105,9

Čistota získaného materiálu byla kromě GC-FID ověřena také pomocí ATR-FTIR, na obrázku 2 jsou presentována spektra původní biomasy před izolací (obsah PHA 75,48 hm. %) a také PHA polymeru získaného pomocí optimalizovaného izolačního postupu (čistota 99,7 hm. %), ve spektrech je jasně patrný významný pokles absorpčních pásů odpovídajících ostatním komponentám buněčné biomasy (především proteinů) a FTIR spektrum získaného materiálu se silně podobá spektru čistého komerčního preparátu PHA.

Další technikou, která nám umožnila posoudit efektivitu izolačního postupu, byla elektronová mikroskopie (cryo-SEM), kdy byly opět pozorovány buňky před izolací a následně materiál získaný pomocí optimalizovaného izolačního postupu. Výsledky jsou presentovány na obrázku 3, buňky po izolaci mají oválný tvar a u buněk, u kterých je patrné poškození buněčných obalů, je patrné, že PHA granule zaujímají významnou část jejich intracelulárního prostoru. V místech, kde byly mechanicky namáhány i samotné PHA granule, došlo k typické plastické deformaci PHA granulí (protáhlé tyčinkovité útvary). Po izolaci došlo ke ztrátě buněčných obalů a hmota je tvořena agregáty PHA granulí, opět je možné pozorovat plastické deformace PHA materiálů způsobené mechanickým namáháním materiálu při přípravě vzorku na cryo-SEM analýzu. Tyto záběry z elektronové mikroskopie potvrzují, že izolační postup zásadním způsobem narušil integritu bakteriálních buněk a získaný materiál je tvořen agregáty PHA granulí o velikosti řádově odpovídající 1 μm .

V rámci optimalizace izolačního procesu byly otestovány také další šetrné kroky, které by mohly navýšit čistotu získaného materiálu. Konkrétně bylo testováno promytí PHA granulí vybranými organickými rozpouštědly (ethanol, aceton, hexan), kdy cílem bylo především odstranit nepolární látky (proteiny, lipidy), které se ze své podstaty mohou vázat na PHA granule a představovat tak majoritní frakci nečistot. Kromě organických rozpouštědel byla také testována možnost izolace PHA granulí optimalizovaným roztokem SDS (5 g/l) v kombinaci s proteolytickým enzymem (alkalázou – 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$, > 2 U/g), který měl podle pracovní hypotézy také solubilizovat proteiny adsorbované na PHA granule. Výsledky experimentu jsou presentovány v tabulce 4, jako nejlepší strategie dodatečné purifikace PHA granulí se jeví jejich promytí ethanolem. Vzhledem k ekologicky šetrné povaze ethanolu a jeho relativně nízké ceně a snadné možnosti recyklace (přečištění ethanolu je možné realizovat destilací) se jistě jedná o

velice zajímavou a jednoduchou možností, jak dosáhnout velmi vysoké čistoty PHA materiálu ekologicky šetrným způsobem.

Tabulka 4

Ověření možnosti dodatečné purifikace materiálu promytím vybranými organickými rozpouštědly a ošetření komerčním proteolytickým enzymem alkalázou působící společně s SDS v průběhu izolačního procesu

Promývací činidlo	Čistota PHA (hm. %)	Výtěžek (%)
Původní biomasa	68,9 ± 1,0	-
Standardní procedura	91,3 ± 1,5	92,4
SDS (5 g/l) + proteáza	90,9 ± 0,2	94,1
Aceton	89,2 ± 0,5	102,4
Ethanol	97,1 ± 0,4	105,6
Hexan	93,0 ± 0,2	106,3

Dále jsme ověřili vliv izolačního postupu na molekulovou hmotnost polymeru získaného pomocí izolačního postupu, molekulová hmotnost polymeru byla stanovena pomocí vylučovací chromatografie (SEC-MALS), výsledky jsou obsahem tabulky 5 a potvrdily naši hypotézu, že izolační postup je z pohledu PHA polymeru velice šetrný a jeho využití nevede k degradaci polymeru.

Tabulka 5

Molekulová hmotnost PHA izolovaného za různých teplot pomocí optimalizovaného postupu.

	Mw (kDa)	PDI (-)
Izolace PHA z promyté biomasy	1 050,40 ± 1,84	1,20 ± 0,04
4°C	1 580,25 ± 14,78	1,14 ± 0,02
50°C	1 349,55 ± 11,67	1,20 ± 0,01
70°C	1 581,85 ± 5,30	1,46 ± 0,19
90°C	1 628,50 ± 8,91	1,12 ± 0,02
Promytí etOH	1 375,45 ± 34,58	1,28 ± 0,07
Alkaláza	1 565,35 ± 24,96	1,10 ± 0,04

V dalším experimentu byl koncept izolace PHA ověřen ve větším objemu (4,5 l) v laboratorním reaktoru, kdy bylo v prvním kroku stejně jako pro submerzní kultivaci v baňkách připraveno inokulum v komplexním médiu (složení viz výše). Pro pre-seed kulturu sloužící k zaočkování bioreaktoru bylo použito hybridní médium, kombinace komplexního a minerálního média, s glukózou jakožto zdrojem uhlíku v koncentraci 10 g/l. Po 24 h kultivace byl zaočkován fermentor, který obsahoval minerální médium. V rámci konceptu NGIB bylo vysterilováno pouze médium, fermentor včetně nezbytných komponent sterilován nebyl. Kultivace probíhala v průběhu 46 h, během 24. hodiny byl přidán uhlíkatý zdroj znovu v koncentraci 20 g/l. Po ukončení kultivace byla veškerá kultura odčerpána a stočena v centrifuze (6 000 rpm, 5 min), rozsuspendována v destilované vodě předehřáté na 60 °C, do níž byl přidán SDS v koncentraci 5 g/l. Směs byla převedena zpět do reaktoru, kde byla po dobu 2 h udržována při teplotě 60 °C za současného míchání (200 rpm). Po ukončení izolace byla opět veškerá suspenze odčerpána a stočena v centrifuze za stejných podmínek. Pelet představující převážně granule PHA byl ještě promyt destilovanou vodou a po zcentrifugování a odlití supernatantu byl sušen do konstantní hmotnosti při 70 °C.

Na základě výsledků uvedených v obrázku 4 je patrné, že obsah PHA (v podobě poly(3-hydroxybutyrátu)) byl při kultivaci v bioreaktoru nižší než při kultivaci v baňkách, a to v průměru o 20 hm. % při vztahování na hmotnost usušené biomasy. Přesto byl proveden scale-up izolace, výsledky čistoty jsou uvedeny v tabulce 6. Na základě výsledků lze říci, že i při nižší teplotě izolace než byla standardně využívána po kultivaci v baňkách (70 °C) po stejný časový úsek byla izolace úspěšná, což přisuzujeme zejména kontinuálnímu míchání v průběhu izolace, které při izolaci ve zkumavkách není zajištěno.

Tabulka 6

Čistota PHA izolovaného v rámci scale-up celého procesu

vzorek	Čistota PHA (hm. %)
Kontrola – (PHA v biomase)	51,2 ± 0,8
60 °C (120 min)	97,4 ± 0,1

Příklad 2:

Izolace PHA z biomasy termofilní bakterie *Schlegelella thermodepolymerans*

Kromě halofilní bakterie *Halomonas halophila* byl koncept izolace PHA s využitím kombinace vysoké teploty, hypotonického prostředí a nízké koncentrace SDS aplikován také na modelového termofilního producenta PHA – *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344. Také u termofilních bakterií je adaptace na extrémní podmínky spojena s akumulací organických solutů a je tedy předpoklad, že námi navržená strategie by mohla být využita i v tomto případě. Nicméně podle našich znalostí nebyl podobný postup izolace PHA doposud u žádné termofilní bakterie popsán.

Termofilní kultura *Schlegelella thermodepolymerans* byla kultivována v Erlenmeyerových baňkách aerobně za stálého míchání (180 rpm) na termostatované třepačce při kultivační teplotě 50 °C po dobu 24 h v komplexním médiu s následujícím složení:

Složení komplexního média:

Pepton	10 g
Hovězí extrakt	10 g
Chlorid sodný	5 g
Destilovaná voda	1000 ml

Kultura narostlá v komplexním médiu byla následně využita jako inokulum pro zaočkování produkčních kultur, které byly kultivovány po dobu 72 h za totožných podmínek v minerálním médiu o následujícím složení:

Složení minerálního média:

NH ₄ Cl	1,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	9,0 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,02 g
Fe ^(III) NH ₄ citrát	0,0012 g
Xylóza	20 g
Yeast extract	0,5 g
Roztok stopových prvků TES*	0,1 ml
Destilovaná voda	1 000 ml

*Složení roztoku stopových prvků TES:

EDTA	50,0 g
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	13,8 g
ZnCl ₂	0,84 g
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	0,13 g
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,1 g
MnCl ₂ · 6 H ₂ O	0,016 g
H ₃ BO ₃	0,1 g
Destilovaná voda	1 000 ml

Izolační experimenty byly prováděny stejným způsobem, jako tomu bylo u bakterie *Halomonas halophila*, tedy v centrifugační zkumavce bylo centrifugováno 10 ml buněčné kultury, následně byl odstraněn supernatant a biomasa byla rozsuspendována v roztoku SDS, ve kterém byla inkubována standardně po dobu 2 h při zvýšené teplotě. Následně byla suspenze opět centrifugována, supernatant byl slit a sediment byl šetrně vysušen při teplotě 70 °C do konstantní hmotnosti. Poté byla v sedimentu stanovena čistota a výtěžek PHA pomocí GC-FID. V prvním kroku optimalizačního postupu byly testovány různé inkubační teploty a to 50, 70, 90°C po dobu 120 min. Kromě ohřevu byl u termofilních buněk testován také vliv chlazení na izolaci, a to jednak při teplotě 30°C po dobu 120 min, jednak kombinace teploty na 4 °C po dobu 120 min s následným ohřevem na 70 °C po dobu 120 min. Výsledky experimentu jsou prezentovány v tabulce 7. Výsledky jednoznačně dokazují, že izolační postup je kromě halofilních buněk možné aplikovat také na termofilní buňky a také v tomto případě je možné získat PHA o vysoké čistotě. Nejvyšší čistoty PHA materiálu bylo dosaženo při inkubační teplotě 90 °C. V tomto případě se podařilo získat velice čistý materiál, a proto byla v následujících experimentech použita teplota inkubace právě 90 °C.

Tabulka 7

Vliv teploty inkubace na čistotu a výtěžek PHA polymeru z buněčné hmoty *S. thermodepolymerans* (obsah PHA v biomase před izolací byl 68,5 hm. %) při použití roztoku SDS o koncentraci 5 g/l.

Inkubace	Čistota PHA (hm. %)	Výtěžek (%)
30 °C (120 min)	67,6 ± 0,8	72,9
50 °C (120 min)	81,4 ± 4,3	78,2
70 °C (120 min)	96,7 ± 2,4	79,1
90 °C (120 min)	99,8 ± 2,8	90,6
4 °C (120 min) + 70 °C (120 min)	86,2 ± 2,1	87,0

Další parametr, který byl optimalizován, je koncentrace použitého SDS. Výsledky optimalizačního experimentu jsou prezentovány v tabulce 8. Nejvyšší čistoty bylo dosaženo při použití roztoku SDS o koncentraci 2,5 g/l. V porovnání s halofilní kulturou je hodnota optimální koncentrace SDS výrazně nižší, což je patrně dáno nižší intracelulární koncentrací solutů v termofilní kultuře. K navýšení lytického účinku hypotonického šoku je tedy u termofilní kultury zapotřebí výrazně snížit koncentraci detergentu. I přes zmíněné byla pro další práci využívána koncentrace SDS 5 g/l, pro kterou byla čistota PHA jen mírně nižší, ale výtěžek materiálu byl větší.

Tabulka 8

Vliv počáteční koncentrace SDS na čistotu a výtěžek PHA polymeru při izolaci z buněčné hmoty *S. thermodepolymerans* (obsah PHA v biomase před izolací byl 68,5 hm. %), teplota inkubace byla 90 °C.

SDS (g/l)	Čistota PHA (hm. %)	Výtěžek (%)
1	65,7 ± 0,8	95,2
2,5	87,7 ± 3,6	97,1
5	86,4 ± 1,4	100,0
10	85,5 ± 0,4	91,8

Dalším studovaným parametrem byl vliv poměru množství biomasy na objem použitého roztoku SDS o koncentraci 5 g/l, tato studie byla provedena stejným postupem jako tomu bylo u kultury *H. halophila*. Výsledky testu jsou prezentovány v tabulce 9. Také u termofilní kultury je izolační postup robustní vůči počáteční navážce biomasy a je možné jej využít při izolaci PHA z high-cell-density kultivací, přičemž vysoká počáteční navážka biomasy má pozitivní dopad na ekologickou i ekonomickou bilanci procesu.

Tabulka 9

Vliv počáteční koncentrace biomasy na čistotu PHA a výtěžek polymeru získaného z buněk kultury *S. thermodepolymerans*.

Objem vzorku	Počáteční koncentrace biomasy (g/l)	Čistota PHA (hm. %)	Výtěžek (%)
Původní biomasa	6,08	68,47	-
5 ml	3,04	96,31	89,0
10 ml (standardní)	12,16	101,14	92,0
20 ml	18,24	67,93	76,6
30 ml	24,32	84,09	79,6
40 ml	30,40	102,95	100,7
50 ml	36,48	94,07	93,8

Kromě GC-FID jsme k ověření čistoty PHA materiálů získaných pomocí unikátního izolačního postupu využili také ATR-FTIR, kdy byla srovnána absorpční spektra původní biomasy *S. thermodepolymerans* (obsah PHA 68,5 %), PHA materiálu po izolaci (čistota 90,46 %) a také komerčního vzorku PHA (Biomer), výsledky jsou předmětem obrázku 5. Ze spekter je patrné, že aplikace izolačního postupu vede k významnému navýšení čistoty PHA materiálu (pokles piků odpovídající proteinům), nicméně v materiálu i po izolaci zůstávají jasně patrné zbytky proteinů případně dalších zbytků biomasy. Celkově není u PHA izolované z termofilní bakterie dosaženo tak vysoké čistoty materiálu jako tomu bylo u halofilní bakterie, což je pravděpodobně způsobeno nižší intracelulární koncentrací osmolytů (a tedy i nižší citlivostí vůči hypotonickému šoku) a také vyšší rezistencí k ohřevu.

V rámci dalších experimentů jsme se pokusili optimalizovat a tím navýšit čistotu materiálu izolovaného z termofilní kultury promytím organickými rozpouštědly a kombinací roztoku SDS s proteázou. Výsledky těchto experimentů jsou prezentovány v tabulce 10. Z výsledků je patrné, že promytí PHA materiálu získaného po izolaci má pozitivní vliv na čistotu materiálu a je tedy možné dalšími operacemi PHA získané z biomasy *S. thermodepolymerans* dále purifikovat.

Tabulka 10

Ověření možnosti dodatečné purifikace materiálu promytím vybranými organickými rozpouštědly a kombinací roztoku SDS (5 g/l) a proteolytického enzymu.

	Čistota PHA (hm. %)	Výtěžek (%)
Původní biomasa	63,43	-
Standardní procedura	86,44	90,0
SDS (5 g/l) + proteáza	89,77	81,5
Aceton	86,62	94,6
Ethanol	90,46	93,5
Hexan	90,37	107,2

Dále byl ověřen vliv izolace na molekulovou hmotnost získaného materiálu pomocí SEC-MALS. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 11 a je z nich jasně patrné, že izolační postup je vůči PHA polymeru velice šetrný a nedochází k žádné významné redukci molekulové hmotnosti PHA.

Tabulka 11

Molekulová hmotnost PHA izolovaného z biomasy termofilní bakterie *S. thermodepolymerans*.

	Mw (kDa)	PDI (-)
PHA v původní biomase	711,50 ± 1,56	1,17 ± 0,01
Inkubace při 70 °C	753,10 ± 32,10	1,20 ± 0,04
Inkubace při 90 °C	686,40 ± 16,12	1,23 ± 0,03
Promytí etOH	951,65 ± 6,72	1,17 ± 0,07
Promytí hexanem	838,85 ± 25,95	1,23 ± 0,00
SDS (5 g/l) + proteáza	938,60 ± 5,37	1,23 ± 0,03

Příklad 3

Precipitace a recyklace SDS

Izolační postup využívající kombinované působení hypotonického šoku, vysoké teploty a SDS aplikovaného v nízké koncentraci je možné využít na izolaci PHA z halofilních i termofilních kultur. Námi navržený postup vede k izolaci čistých až vysoce čistých materiálů, PHA je následně možné purifikovat promytím vhodným organickým rozpouštědlem, které může odstranit středně polární případně i nepolární nečistoty nesorbované na PHA granule (proteiny a lipidy). Izolační postup je navíc z pohledu materiálu velice šetrný a nedochází při jeho aplikaci k žádné významné redukci molekulové hmotnosti polymeru. Nicméně hlavní slabinou námi navrženého postupu je použití SDS – jedná se o aniontový detergent, který při realizaci izolačního postupu v průmyslovém měřítku může představovat velice závažný problém především z pohledu managementu a čištění odpadních vod, a to i přes to, že SDS je

v navrženém izolačním protokolu úmyslně využito v nízkých koncentracích. Proto jsme se věnovali možným způsobům odstranění SDS ze supernatantu po separaci PHA materiálu a vyvinuli jsme postup, který je založen na precipitaci SDS pomocí KCl. Pokud je k supernatantu přidán 4 M KCl (objemový poměr supernatant : KCl 1:1), vysráží se SDS ve formě nerozpustného dodecylsírany draselného (KDS), který je následně možné separovat centrifugací případně samovolnou dekantací viz obrázek 6. V tabulce 12 jsou prezentovány koncentrace SDS v supernatantu po aplikaci precipitace detergentu pomocí KCl (stanovení zbytkového SDS bylo realizováno spektrofotometricky pomocí kolorimetrického reagentu Stains-All). Z výsledků je patrné, že se obsah SDS ve vodné fázi snížil o více než dva řády. Námí navržený způsob precipitace je tedy velice efektivním, technologicky i ekonomicky nenáročným a snadno realizovatelným postupem, který umožňuje minimalizovat negativní konsekvence použití SDS při izolaci PHA z bakteriální biomasy.

Tabulka 12

Vliv precipitace SDS pomocí KCl na residuální koncentraci SDS v supernatantu po izolaci

Počáteční koncentrace SDS (g/l)	1	2,5	5	10
Koncentrace SDS (g/l) po precipitaci pomocí KCl	0,002	0	0	0

Krok precipitace SDS ve formě KDS má ještě výrazně vyšší potenciál než jen eliminovat SDS z odpadních vod. Precipitát KDS je možné využít k regeneraci a recyklaci SDS, což má výrazně pozitivní dopady na ekologickou i ekonomickou stránku procesu. Proces regenerace SDS je založen na kontinuálním promývání precipitátu KDS pomocí NaOH (0,1–1 M) v ultradializačním zařízení s využitím ultrafiltrační membrány o hodnotě cut-off 1 kDa. Během této procedury jsou K^+ v KDS postupně vytlačovány Na^+ za vzniku SDS, které ve vodném prostředí vytváří micely, které však nemohou membránou projít a jsou tedy v systému efektivně zadržovány. Proces je možné realizovat tak dlouho, dokud není veškerý KDS převeden zpět na SDS, případně je možné KDS precipitát od vzniklého SDS oddělit pomocí sedimentace nebo centrifugace. Princip regenerace SDS z KDS precipitátu je obsahem obrázku 6.

Průmyslová využitelnost

Vynález se týká způsobu efektivní izolace polyhydroxyalkanoátů z mikrobiální biomasy halofilních nebo termofilních bakterií, která je provozně i ekonomicky nenáročná s pozitivním vlivem na životní prostředí, realizovatelná v průmyslovém měřítku.

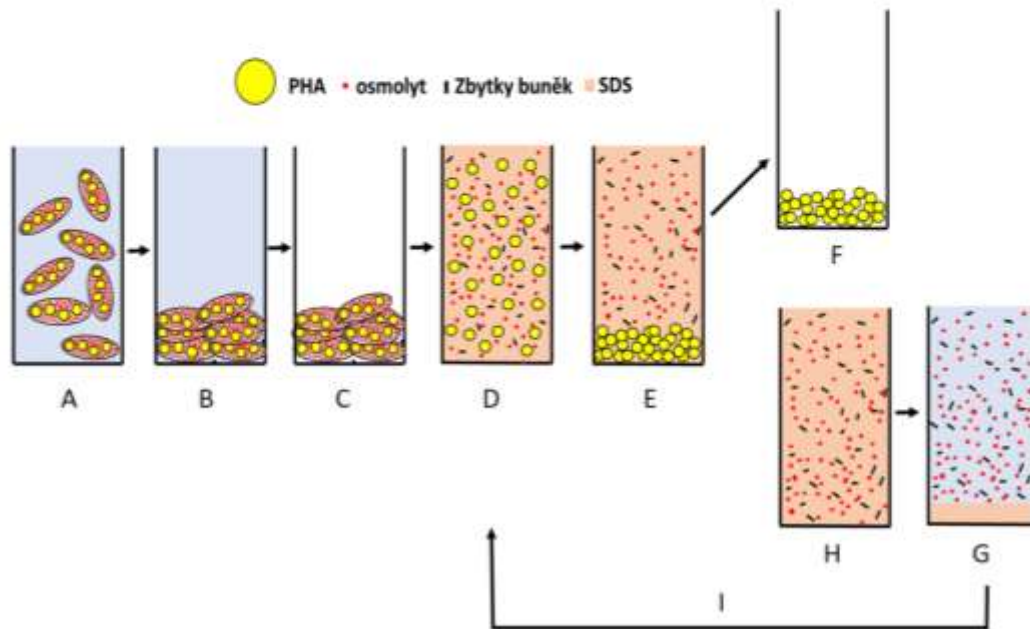
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob izolace polyhydroxyalkanoátů z halofilních a termofilních kultur bakterií, **vyznačující se tím, že** zahrnuje kroky kultivace produkční kultury v kultivačním médiu, separace buněk produkční kultury z kultivačního média, vystavení separovaných buněk produkční kultury hypotonickému roztoku obsahujícímu dodecylsírany sodný o koncentraci 1–5 g/l při teplotě 60 až 90 °C, oddělení získaných granulí polyhydroxyalkanoátů z buněk kultury od supernatantu hypotonického roztoku, precipitaci supernatantu přidávkem 4 M KCl v objemovém poměru supernatant : KCl 1:1, separaci vysráženého dodecylsírany draselného ze supernatantu, regeneraci získaného dodecylsírany sodného ze supernatantu a jeho opětovné použití v hypotonickém roztoku při izolaci polyhydroxyalkanoátů z kultur bakterií v další šarži.
2. Způsob izolace polyhydroxyalkanoátů z halofilních kultur bakterií podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** celková koncentrace solí v kultivačním médiu produkční kultury je více než 50 g/l.
3. Způsob izolace polyhydroxyalkanoátů z termofilních kultur bakterií podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** teplota kultivačního média je nejméně 50°C.
4. Způsob izolace polyhydroxyalkanoátů podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** halofilní kulturou bakterie je *Halomonas halophila*.
5. Způsob izolace polyhydroxyalkanoátů podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** termofilní kulturou bakterie je *Schlegelella thermodepolymerans*.
6. Způsob izolace polyhydroxyalkanoátů podle nároků 1 až 5, **vyznačující se tím, že** získané polyhydroxyalkanoáty se přečistí promytím ethanolem nebo acetonem.

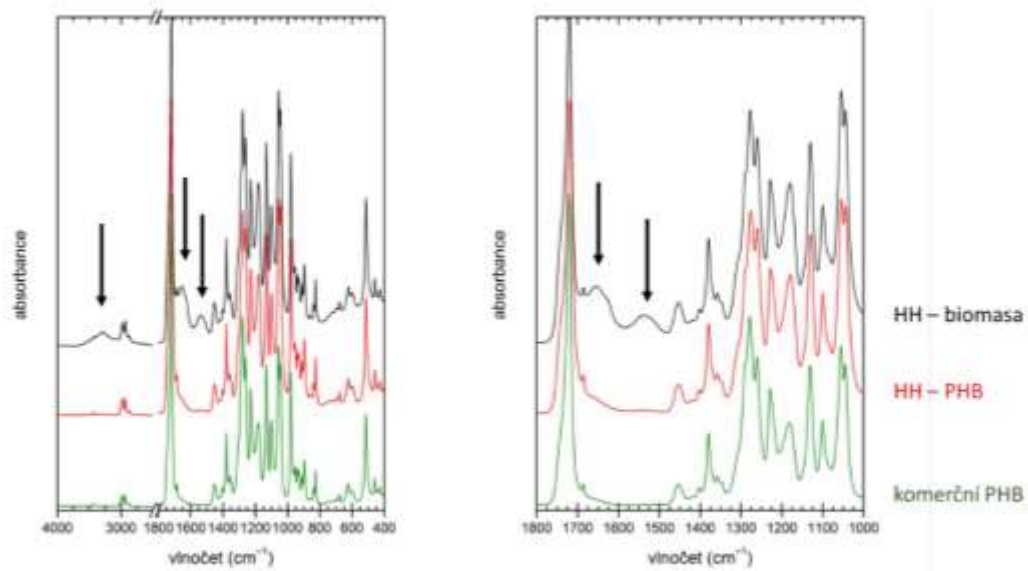
Anotace

Název vynálezu: Způsob izolace biopolymerů polyhydroxyalkanoátů z halofilních a termofilních bakterií

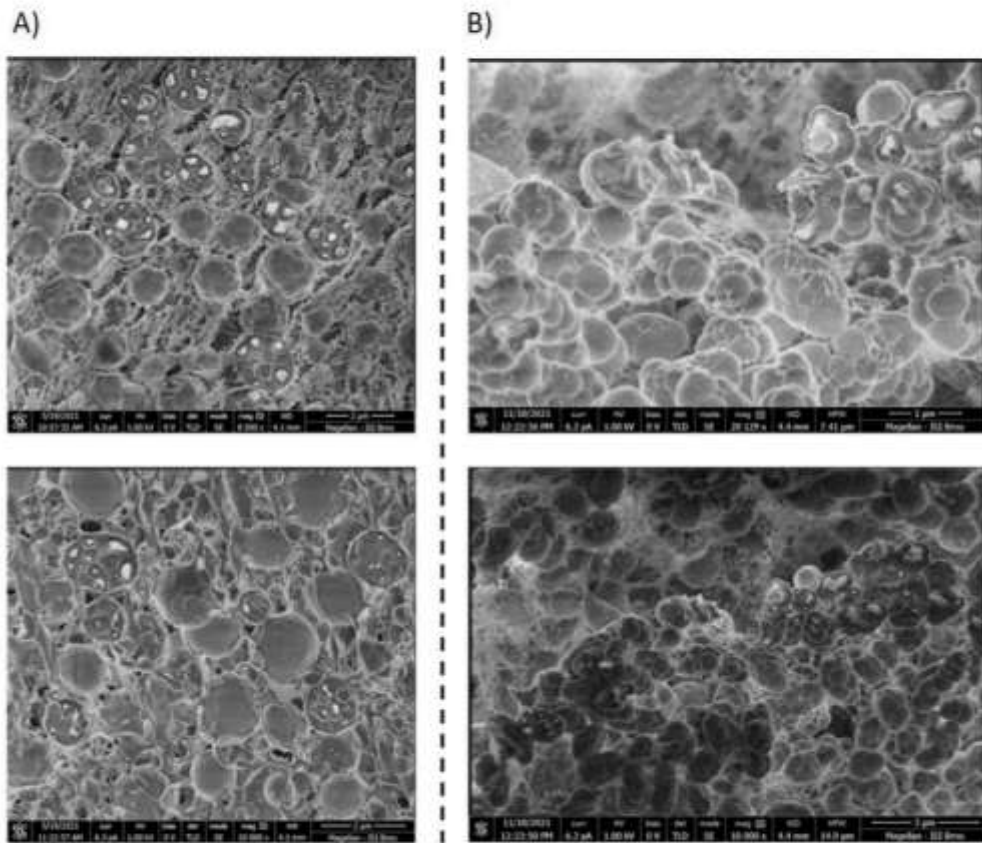
Vynález se týká způsobu efektivní izolace polyhydroxyalkanoátů z mikrobiální biomasy halofilních nebo termofilních bakterií zahrnujícího kroky kultivace produkční kultury v kultivačním médiu, separace buněk produkční kultury z kultivačního média, vystavení separovaných buněk produkční kultury hypotonickému roztoku obsahujícímu dodecylsírany sodný o koncentraci 1–5 g/l při teplotě 60 až 90 °C, oddělení získaných granulí polyhydroxyalkanoátů z buněk kultury od supernatantu hypotonického roztoku, precipitací supernatantu, regenerací získaného dodecylsírany sodného ze supernatantu a jeho opětovné použití v hypotonickém roztoku při izolaci polyhydroxyalkanoátů z kultur bakterií v další šarži.



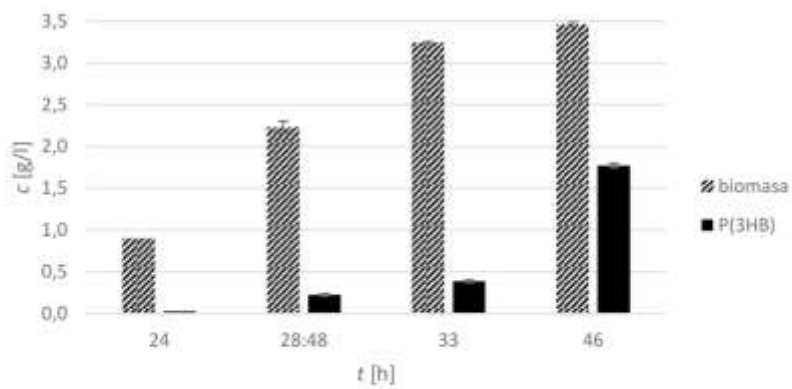
Obr.1



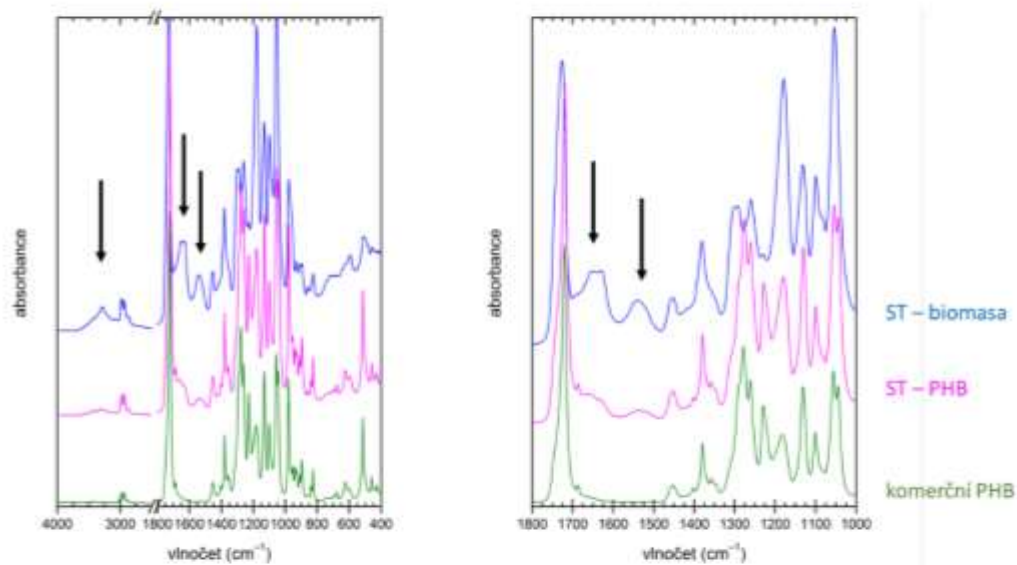
Obr.2



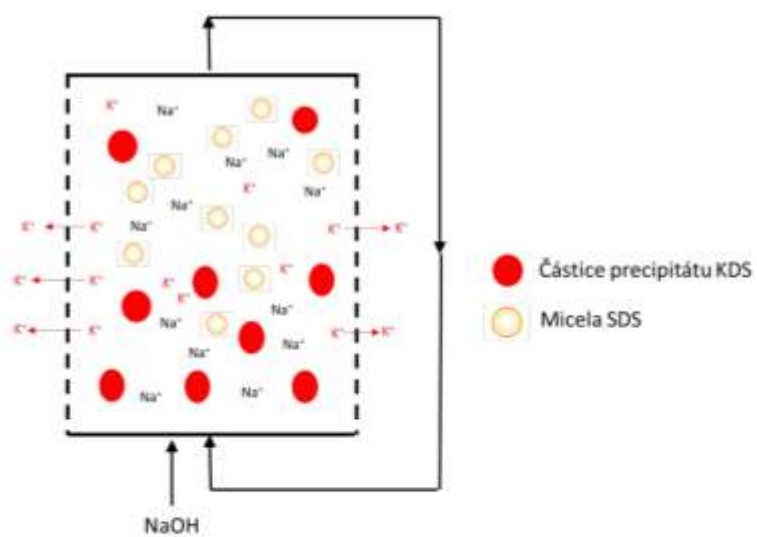
Obr.3



Obr.4



Obr.5



Obr. 6

11.6 Příloha VI

NOVÁČKOVÁ, I.; KOUŘILOVÁ, X.; MRÁZOVÁ, K.; SEDLÁČEK, P.; KALINA, M.; KRZYZANEK, V.; KOLLER, M.; OBRUČA, S. Combination of Hypotonic Lysis and Application of Detergent for Isolation of Polyhydroxyalkanoates from Extremophiles. *POLYMERS*, 2022, roč. 14, č. 9, s. 1–16. ISSN: 2073-4360.

Article

Combination of Hypotonic Lysis and Application of Detergent for Isolation of Polyhydroxyalkanoates from Extremophiles

Ivana Novackova¹, Xenie Kourilova¹, Katerina Mrazova², Petr Sedlacek¹, Michal Kalina¹, Vladislav Krzyzaneck², Martin Koller^{3,4} and Stanislav Obruca^{1,*}

¹ Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Parkynova 118, 612 00 Brno, Czech Republic; xcnovackova@fch.vut.cz (I.N.); xckourilova@fch.vut.cz (X.K.); sedlacek-p@fch.vut.cz (P.S.); kalina-m@fch.vut.cz (M.K.)

² Institute of Scientific Instruments of the Czech Academy of Sciences, v.v.i., Kralovopolska 147, 612 64 Brno, Czech Republic; mrazova@isibrno.cz (K.M.); krzyzaneck@isibrno.cz (V.K.)

³ Research Management and Service, c/o Institute of Chemistry, NAWI Graz, University of Graz, Heinrichstrasse 28/IV, 8010 Graz, Austria; martin.koller@uni-graz.at

⁴ ARENA—Arbeitsgemeinschaft für Ressourcenschonende & Nachhaltige Technologien, Inffeldgasse 21b, 8010 Graz, Austria

* Correspondence: obruca@fch.vut.cz; Tel: +420-541-149-354

Abstract: Production of polyhydroxyalkanoates (PHA), microbial biopolyesters, employing extremophilic microorganisms is a very promising concept relying on robustness of such organisms against microbial contamination, which provides numerous economic and technological benefits. In this work, we took advantage of the natural susceptibility of halophilic and thermophilic PHA producers to hypotonic lysis and we developed a simple and robust approach enabling effective isolation of PHA materials from microbial cells. The method is based on the exposition of microbial cells to hypotonic conditions induced by the diluted solution of sodium dodecyl sulfate (SDS) at elevated temperatures. Such conditions lead to disruption of the cells and release of PHA granules. Moreover, SDS, apart from its cell-disruptive function, also solubilizes hydrophobic components, which would otherwise contaminate PHA materials. The purity of obtained materials, as well as the yields of recovery, reach high values (values of purity higher than 99 wt.%, yields close to 1). Furthermore, we also focused on the removal of SDS from wastewater. The simple, inexpensive, and safe technique is based on the precipitation of SDS in the presence of KCl. The precipitate can be simply removed by decantation or centrifugation. Moreover, there is also the possibility to regenerate the SDS, which would substantially improve the economic feasibility of the process.

Keywords: polyhydroxyalkanoate (PHA); sodium dodecyl sulfate (SDS); PHA isolation; extremophiles; halophiles; thermophiles; *Halomonas halophila*; *Schlegelella thermodepolymerans*



Citation: Novackova, I.; Kourilova, X.; Mrazova, K.; Sedlacek, P.; Kalina, M.; Krzyzaneck, V.; Koller, M.; Obruca, S. Combination of Hypotonic Lysis and Application of Detergent for Isolation of Polyhydroxyalkanoates from Extremophiles. *Polymers* **2022**, *14*, 1761. <https://doi.org/10.3390/polym14091761>

Academic Editor: Shashi Kant Bhatia

Received: 21 March 2022

Accepted: 23 April 2022

Published: 26 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are microbial storage polyesters, which are accumulated by various prokaryotic microorganisms. Apart from their primary storage function for carbon, energy, and reduction equivalents, PHAs also significantly enhance the stress robustness of microorganisms and accumulation of them is probably a part of adaptation to some extreme conditions such as high salinity [1]. PHAs are, therefore, widespread metabolites among extremophilic prokaryotes [2]. Moreover, they represent a very promising ecologically friendly alternative to traditional petrochemical polymers—PHAs are completely biodegradable and compostable materials, which can be produced from totally renewable resources including also waste products stemming from food production and other industries. Their properties and application fields are very similar to petrochemical plastics such as polypropylene [3].

Nevertheless, the main problem prohibitive for large-scale production of PHAs is their high production cost. There are several strategies how to overcome this limitation. One of them is the employment of extremophiles as PHA-producing chassis. The main advantage of extremophiles is their capability of growth and production of various metabolites including but not limited to PHA under conditions, which reduce or even eliminate the risk of contamination of the process by common mesophilic microflora, e.g., high or low temperature, high salinity, extreme pH-values, etc. Due to their robustness against unfavorable microbial contamination, which can destroy whole fermentation batches, biotechnological processes using extremophilic microorganisms can be operated under reduced requirements for sterility, or eventually even completely without sterilization of the cultivation media or equipment. Consequently, it has a significantly positive impact on the energy and economic balance of these processes. Moreover, high tolerance of the process against contamination allows running the cultivation process in highly productive continuous or semi-continuous mode. Therefore, employing extremophilic microorganisms in biotechnology is nowadays a modern trend, which is called the concept of industrial biotechnology of the next-generation (“Next-Generation Industrial Biotechnology”, NGIB) [4].

In this context, the employment of extremophilic microorganisms can significantly reduce the price of PHA. It can take advantage of the ability of numerous extremophiles to produce PHA natively. Predominantly many halophilic microorganisms (microorganisms adapted to the high salinity of environments) belong among promising PHA producers—PHA production ability was described for several representatives of genus *Halomonas* such as *Halomonas boliviensis* [5], *Halomonas neptunia* and *Halomonas hydrothermalis* [6], *Halomonas bluephagenesis* [7], *Halomonas halophila* [8], or extremely halophilic representatives of the Archaea domain, such as *Haloferax mediterranei* [9]. As mentioned above, the accumulation of PHA is a part of the adaptation strategy of halophiles to hyperosmotic environment; however, the main adaptation strategy is usually the accumulation of either organic (osmolytes) or inorganic (K^+ ions) substances, which compensate for the osmotic pressure of the surrounding, as observed especially for extreme haloarchaea [10].

Instead of halophiles, the production of PHAs was also observed in a restricted number of thermophilic bacteria, which are adapted to high temperature conditions [2]. The most studied strains belong to the genera *Caldimonas* [11], *Tepidimonas* [12], in addition to the very promising PHA producer *Schlegelella thermodepolymerans*, which showed expedient potential for PHA production using lignocellulose-based substrates with high xylose content [13]. For thermophiles, PHA most likely does not directly take the role in the adaptation to high temperature, since the adaptation is usually connected with changes of protein structure, enhancement of the activity of chaperones and other heat-shock proteins, and also accumulation of organic compatible molecules similarly to halophilic prokaryotes [14].

Apart from the microbial biosynthesis of PHA, also the expenses associated with the isolation of PHA, an intracellular product, from microbial biomass contribute to the high cost of PHA. Extraction of the polymer from the microbial cells is often performed by organic solvents; however, considering limited polymer solubility, the extraction is limited to selected, predominantly chlorinated, solvents such as chloroform or dichloromethane. Alternatively, compounds typically described as “PHA anti-solvents”, such as acetone, can be employed for PHA extraction under conditions of highly elevated temperature (120 °C) and pressure (7 bar) [15]. Nevertheless, the approaches based on organic solvents are technologically difficult, and the use of toxic and hazardous solvents eliminates the positive ecological impact of final materials [16]. The other possibility is the utilization of supercritical CO_2 for PHA extraction. Despite a very positive ecological connotation, due to the low solubility of PHA in supercritical CO_2 and the need for additional compounds acting as solubility mediators (“modifiers”), such as methanol, the process shows low efficiency [17,18]. Also, an alternative PHA isolation approach based on the removal of other components of biomass can be used, when PHA granules remain in the intact, solid state and can be further separated by centrifugation or filtration. From an economical viewpoint, this approach makes definitely sense: Considering the fact that the PHA fraction

in biomass can exceed 90 wt.%, it appears cumbersome to recover these 90 wt.% instead of simply removing the minor (10%) fraction of biomass. Indeed, many reagents and strategies can be used to remove other cell components instead of PHA. For instance, in literature the use of hydrolytic enzymes (predominantly commercially available proteases—Protease L330, Esparase, Alcalase, Neutrase, Allprotease, etc.) is described [19], but in practice, these approaches are limited by the high cost of enzymes. An alternative way is the digestion of biomass using various chemical reagents such as sodium hydroxide [20], sodium hypochlorite [21], EDTA, and detergents such as SDS [22] or ammonium laurate [23]. Individual approaches can be combined as was mentioned in Kathiraser et al., who used enzymes together with detergents and EDTA for PHA isolation [24].

Hypotonic lysis is an additional tool that can be used for the simple disruption of microbial cells. This approach is based on the exposition of cells to surrounding with significantly lower osmotic strength than osmolarity of cultivation medium. During sudden exposition to a hypotonic environment, water begins to penetrate into cells, which leads to disruption of their integrity, rupture of cells, and release of the intracellular cell content. This hypoosmotic cell lysis approach was described predominantly for extreme halophilic prokaryotes such as *Hfx. mediterranei*, which are cultivated in media with salt contents of more than 200 g/L and are, therefore, extremely sensitive to hypotonic treatment. During exposure to distilled water, cells disruption and release of PHA granules into the solution occur immediately. After centrifugation, there are two phases generated—the bottom pinkish phase represents cell mass residues (colorized by carotenoid pigments), while the upper white phase consists of PHA granules [25]. However, the purity of PHA isolated in the described way is not too high due to the PHA granules being covered by a proteinaceous membrane; therefore, the following purification using for instance hypochlorite, H_2O_2 , or other reagents is usually necessary [8,26].

In this work, we decided to investigate the possibility of utilization of hypotonic lysis to isolate PHA from moderately extremophilic microorganisms—halophilic *Halomonas halophila* and also thermophilic *Schlegelella thermodepolymerans*. We hypothesized that both microorganisms could be partially sensitive to hypotonic lysis due to the accumulation of compatible solutes as a strategy of their adaptation to extreme conditions. To further support the process of cell disruption and increase the purity of the isolated materials, we have also introduced a low concentration of 10 g/L of sodium dodecyl sulfate (SDS). Since SDS might reduce the positive environmental impact of the process by serious contamination of wastewater, we introduced a step in which SDS leftovers after PHA isolation are precipitated with KCl and can be easily removed from wastewater and potentially even regenerated for repeated use.

2. Materials and Methods

2.1. Cultivation of Microorganisms

For experimental work, two extremophilic strains were used, the moderately halophilic strain *Halomonas halophila* (CCM 3662) obtained from Czech Collection of Microorganisms, Brno, Czech Republic, and the moderately thermophilic strain *Schlegelella thermodepolymerans* (DSM 15344) purchased from Leibniz Institute DSMZ—German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany.

The first cultivation step, preparation of inoculum, was performed in 100 mL Erlenmeyer flasks with 50 mL of media. Inoculum culture of *H. halophila* was prepared in a medium consisting of yeast extract (3 g/L), peptone (15 g/L), glucose (1 g/L), and sodium chloride (66 g/L) during 24 h in 30 °C, permanent shaking 180 rpm. Inoculum of *S. thermodepolymerans* was prepared in 25 g/L Nutrient Broth medium (10 g/L peptone, 10 g/L beef extract and 5 g/L NaCl) during 24 h in 50 °C, permanent shaking 180 rpm.

After 24 h lasting cultivation, mineral salts media were inoculated by 10% (v/v) of inoculum, cultivations were performed in 250 mL Erlenmeyer flasks with 100 mL of medium. The basic mineral salt medium for *H. halophila* cultivation consisted of $(NH_4)_2SO_4$ (3.0 g/L), KH_2PO_4 (1.02 g/L), $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (11.1 g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.2 g/L), NaCl

(66 g/L), glucose (20 g/L) and 1 mL/L of microelements solution (FeCl₃ (9.7 g/L), CaCl₂ (7.8 g/L), CuSO₄ (0.156 g/L), CoCl₂ (0.119 g/L), NiCl₂ (0.118 g/L) and CrCl₂ (0.062 g/L) dissolved in 0.1 M HCl) and 20 g/L of glucose. The mineral salt medium for cultivations of *S. thermodepolymerans* consisted of Na₂HPO₄·12 H₂O (9.0 g/L), KH₂PO₄ (1.5 g/L), NH₄Cl (1.0 g/L), MgSO₄·7 H₂O (0.2 g/L), CaCl₂·2 H₂O (0.02 g/L), Fe(III)NH₄citrate (0.0012 g/L), yeast extract (0.5 g/L), 20 g/L xylose and 1 mL/L of microelements solution (EDTA (50.0 g/L), FeCl₃·6 H₂O (13.8 g/L), ZnCl₂ (0.84 g/L), CuCl₂·2 H₂O (0.13 g/L), CoCl₂·6 H₂O (0.1 g/L), MnCl₂·6 H₂O (0.016 g/L), H₃BO₃ (0.1 g/L), dissolved in distilled water) (all used chemicals including hydrochloric acid, salts, glucose and xylose were purchased from LachNer, Neratovice, CZE; yeast extract, peptone and Nutrient Broth were purchased from HiMedia, Brno, CZE). Inoculated media were cultivated during 72 h under permanent shaking at 180 rpm at the optimal growth temperature, 30 °C for *H. halophila* and 50 °C for *S. thermodepolymerans*, respectively.

2.2. Basic Characterization of Cultures

After 72 h, cultivations were finished. For determination of growth of culture, optical density of cultures was measured using a spectrophotometer (P300, Implen, Munich, Germany) at 630 nm against distilled water as a blank. Gravimetric determination of cell dry matter (CDM) was performed by centrifugation of 10 mL of culture at 3460 × g, 5 min (EBA 200, Hettich, Spenge, Germany). The generated supernatant was discarded and the pellet was washed with distilled water and centrifuged again. The pellet was dried to constant weight at 70 °C in drying chamber (IP60, LTE Scientific, Oldham, UK) and then the amount of biomass (g/L) was obtained by weighing on an analytical scale (Pioneer PA224C, Ohaus, Parsippany, NJ, USA). Moreover, the content of PHA in dried biomass was measured by gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID; gas chromatograph Trace 1300, Thermo Scientific, column: DB-WAX 30 m by 0.25 mm, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) as reported previously in Brandtl et al. (1988) [27]. All determinations were performed in duplicate.

2.3. Isolation of PHA from Bacterial Biomass

Right after cultivation, the isolation of PHA from wet bacterial biomass is performed. Predominantly for halophilic strain *H. halophila*, but also for *S. thermodepolymerans*, a very important strategy is the hypotonic environment, which induces disruption of cells leading to release of the intracellular cell content including PHA granules. The main idea of isolation is based on the use of hypotonic conditions together with SDS (TCl, Zwijndrecht, Belgium) applied in low but still sufficient concentration along with the elevated temperature. These factors should lead to cell disruption and the release of water-insoluble PHA granules. For both microorganisms, we focused at the beginning on the optimization of SDS concentration (in range 1 to 10 g/L), temperature treatment (higher and lower than cultivation temperature), and the ratio of microbial biomass vs. volume of SDS solution.

The first optimized parameter was the most efficient concentration of SDS. The experiment was performed in this way: 10 mL of the culture after cultivation was centrifuged in a plastic test tube with a screw cap (3460 × g, 10 min), the supernatant was discarded and replaced by prepared aqueous solution of SDS (1; 2.5; 5 and 10 g/L), in replicates for each SDS concentration. Pellets were resuspended and suspensions were incubated in a water bath at 70 °C for 120 min. After incubation, test tubes with suspensions were centrifuged again (3460 × g, 5 min), supernatants were discarded and preserved for further use, the pellets containing predominantly isolated PHA granules were washed with distilled water and then dried to constant weight at 70 °C. The amount of the product was determined gravimetrically and the purity of obtained PHA was determined by GC-FID as the same as described above.

The second, optimized parameter was the temperature of isolation or combination of different temperatures, i.e., temperature treatment. For both strains, the same treatments were tested: 50 °C (120 min), 70 °C (120 min), 90 °C (120 min) and a combination of cooling-

down and heating-up; 4 °C (120 min) followed by 70 °C (120 min). SDS was applied at a concentration of 5 g/L, otherwise, the experiment was performed in the same way as described above for optimization of SDS concentration.

To reduce the amount of detergent (SDS) using a higher biomass amount, the third series of optimization experiments was based on a comparison of the effectivity of isolation with different ratios of initial biomass concentration and 10 mL of aqueous SDS (5 g/L) solution in the most to verify the purity of obtained material and compare product yield. Also, the purpose of this experiment was to verify the robustness of the isolation process concerning different initial biomass concentrations—using a higher ratio of biomass to SDS solution can significantly reduce the cost of the isolation process (amount of SDS per biomass) and also significantly reduce environmental burden caused by SDS in wastewater. In practice, different amounts of biomass were obtained by centrifugation of a larger volume of cell culture when the volume of SDS solution was still 10 mL. However, the approach was the same as previous ones, using optimal SDS solution concentration of 5 g/L for both strains and optimal “heat treatment”: 70 °C for 2 h for *H. halophila* and keeping at temperature 90 °C for 2 h for *S. thermodepolymerans*. All isolation experiments based on long-term exposition to elevated temperatures were performed in a water bath (BL 4/150, WSL, Czestochowa, Poland).

2.4. Characterization of Isolated PHA Polymer

In this work, we produced a homopolymer of 3-hydroxybutyrate-poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), the most common representative of PHA. Quantification of the polymer in bacterial biomass and determination of purity of the isolated samples were performed by GC-FID as described above.

Further, we used Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR, Nicolet iS50, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) with the built-in single-reflection diamond attenuated total reflectance (ATR) crystal to collect infrared spectra of the original biomass, polymer isolates, and the reference material, commercially available P(3HB) (Biomer, Schwalbach am Taunus, Germany). Each spectrum was collected in the range of 4000–400 cm^{-1} as an average of 16 scans with a resolution of 4 cm^{-1} (data spacing 0.5 cm^{-1}).

For determination of molecular weight and its distribution (polydispersity index PDI) of the polymer, we used size-exclusion chromatography with multi-angle light scattering detector (SEC-MALS) (SEC chromatography, column PLgel mixed-C 5 μm , 300 × 7.5 mm, Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA; detectors: MALS–DAWN HELEOS II, differential refractometer OPTILAB T-REX, Wyatt Technology, Dernbach, Germany). Using this method, we compared polymers isolated by different approaches, which were the most promising based on results from GC connected with the highest material purity. Approximately 200 mg of sample (biomass, isolated material) was weighed into glass pyrex test tubes, 10 mL of chloroform was added, then test tubes were tightly screwed with caps and during 12 h incubated at 70 °C in a thermoblock. After 12 h, the mixture was filtered through a paper filter on Petri dishes, and chloroform was freely evaporated. Then 1.5 mg of foil was weighed to the vial (volume 4 mL) and 1.5 mL of chloroform (LachNer, Neratovice, CZE) was added. The mixture was incubated at 50 °C in the thermoblock till all foil was dissolved, then the solution was filtered using nylon filters with 0.45 μm pore size into small vials, and the samples were analyzed.

Selected samples were also analyzed by electron microscopy. Bacterial cultures and isolated PHA samples were fixed using the high-pressure freezing method (EM ICE, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Samples were centrifuged for 3 min at 4000 rpm and the generated pellet was pipetted on the 0.2 mm side of the 6 mm Al carrier type A and closed with the flat side of carrier type B (without using any cryo-protectant) for further processing for observation in the cryogenic scanning electron microscope (cryo-SEM). For freeze-substitution procedure followed by observation in the transmission electron microscope (TEM), samples were frozen in 0.2 mm side of the 3 mm Au carrier type A and closed with the flat side of carrier B. Both of the carriers were pre-treated with 1%

aqueous solution of lecithin (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) in chloroform. For cryo-SEM, high-pressure-frozen samples were transferred into a cryo vacuum preparation chamber (ACE 600, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), where they underwent freeze-fracture followed by sublimation for 7 min at $-95\text{ }^{\circ}\text{C}$. Samples were then transferred into a scanning electron microscope equipped with a cryo stage (Magellan 400/L, FEI, Hillsboro, OR, USA) and observed using 1 keV electron beam at $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$. For TEM, high-pressure-frozen samples were transferred into a freeze substitution unit (AFS2, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) containing a freeze-substitution solution of 1.5% OsO_4 in acetone. The freeze-substitution protocol was set as previously described in Kourilova et al. [28]. Thus prepared freeze-substitution samples were washed in pure acetone (3×15 min) and gradually infiltrated with epoxy resin (Epoxy Embedding Medium, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany), mixtures with acetone 1:2, 1:1, 2:1 and pure resin for 1 h each. After the final exchange of pure resin, samples were left overnight under vacuum, then embedded in fresh resin and cured at $62\text{ }^{\circ}\text{C}$ heat for 48 h. Cured blocks of samples were cut to ultrathin sections using a diamond knife with cutting angle 45° (Diatome, Nidau, Switzerland) and ultramicrotome (UTC 7, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), and stained using solutions of uranyl acetate and lead citrate. Contrast ultrathin sections were imaged using a transmission electron microscope (Talos F200C, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) using a 200 keV beam.

2.5. Precipitation of Potassium Dodecyl Sulfate (KDS) and Determination of Residual SDS Concentration

SDS is a water-soluble molecule, whereas the salt potassium dodecyl sulfate (KDS) is water-insoluble. This is the main idea of how to get rid of SDS from wastewater after isolation of PHA from bacterial biomass. A simple addition of KCl to supernatant containing SDS results in the formation of an insoluble precipitate of KDS, which can conveniently be separated by sedimentation or centrifugation. For this purpose, we prepared 4 M aqueous KCl solution and after isolation and following centrifugation, we added it in a 1:1 ratio to the supernatant to obtain a precipitate.

Residual concentration of SDS after PHA isolation procedure and also the efficiency of KDS precipitation from SDS solutions with different initial amounts of the detergent were determined employing a spectroscopic assay based on the use of Stains-All dye (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) as described by Rupprecht et al. [29]. The analysis was performed using a microplate reader (ELISA reader, ELx808, BioTek, Winooski, VT, USA).

3. Results and Discussion

Every isolation experiment was preceded by the cultivation of microorganisms *H. halophila* and *S. thermodepolymerans* in mineral media with the most suitable carbon sources (glucose for *H. halophila* and xylose for *S. thermodepolymerans*) to obtain biomass with high PHA content. Within individual cultivations, we tried to keep the cultures under the same conditions for gaining results of biomass and PHA content as similar as possible, despite we measured both characteristics (biomass content gravimetrically and PHA content by GD-FID) within each experiment for independent comparison among results of cultivations. For each experiment, amounts of PHA in biomass are stated under almost all tables for the comparison with the purity of isolated polymer using different treatments, because for individual experiments all the yields were related to individual cultivation results. Based on the data from experiments, for *H. halophila* average concentration of biomass was (5.5 ± 0.3) g/L with a PHA fraction in biomass of about (78 ± 7) wt.%. For *S. thermodepolymerans* average biomass concentration was (6.1 ± 0.1) g/L with (70 ± 4) wt.% PHA.

3.1. Optimization of SDS Concentration

Within the whole PHA isolation development process, the first step was focused on the optimal concentration of detergent SDS. The idea was to expose the extremophilic bacterial cells naturally containing compatible solutes as a part of their adaptation strategy

to hypotonic conditions with low amounts of SDS to improve cell disruption and enable solubilization of hydrophobic cell components which would otherwise get attached to PHA granules reducing the purity of the materials. For both used strains, tested SDS concentrations were 1; 2.5; 5 and 10 g/L; results for individual strains are listed in Table 1. For *H. halophila* the process was carried out in a water bath during a 2 h lasting process at 70 °C; for *S. thermodepolymerans*, the process lasting the same time was carried out at 90 °C.

Table 1. Effect of different SDS concentrations on PHA purity and yield during 2 h lasting isolation at 70 °C for *H. halophila* and 90 °C for *S. thermodepolymerans*.

Strain	SDS (g/L)	PHA Purity (wt.%)	Yield (-) ¹
<i>H. halophila</i>	1	88.0 ± 0.4	0.99
	2.5	91.4 ± 2.7	0.99
	5	97.1 ± 3.7	1.11
	10	89.6 ± 1.4	1.09
<i>S. thermodepolymerans</i>	1	65.7 ± 0.8	0.95
	2.5	87.7 ± 3.6	0.97
	5	86.4 ± 1.4	1.00
	10	85.5 ± 0.4	0.92

¹ Yield is defined as PHA (g/L) for individual isolation way divided by PHA (g/L) obtained from biomass without previous isolation step. PHA content in the biomass: *H. halophila* (84.02 ± 0.61) wt.%, *S. thermodepolymerans* (64.43 ± 5.96) wt.%.

In the case of *H. halophila*, the most effective SDS concentration for isolation of PHA was 5 g/L, when the purity of the polymer was more than 97 wt.% together with the highest product yield considering purity and also amount of the isolated material. For this moderately halophilic strain with optimal salt concentration for growth 66 g/L, utilization of 5 g/L of SDS induces effective hypotonic cell lysis and results in high purity of the isolated material. Therefore, the most suitable concentration of SDS was used for all the following experiments employing the halophilic strain.

For *S. thermodepolymerans*, the highest purity was determined for a SDS concentration of 2.5 g/L. In comparison with the halophilic culture, the concentration is 2 times less, which might be caused by the lower content of the compatible solutes in the cells of thermophilic culture. It can be expected that thermophilic bacteria are less prone to hypotonic lysis as compared to halophiles. This expectation is also supported by the fact that purities of PHA materials obtained for thermophilic *S. thermodepolymerans* are substantially lower than those obtained in its halophilic counterpart *H. halophila*. Further, aside from the purity of the material, we have also considered the yield of the isolation process which was highest for 5 g/L of SDS leading to the establishment of the most suitable concentration of SDS of 5 g/L—the same as for *H. halophila*.

The team of Arikawa et al. (2017) focused on using SDS in combination with sonication for the isolation of PHA from biomass of the mesophilic bacterium *Cupriavidus necator*, when the optimal concentration of detergent was set on 33 g/L [30]. In our case, we used a more than 6-times lower amount of detergent due to the advantageous effect of hypotonic shock, which is applicable on strains producing compatible solutes (for instance halophiles and thermophiles). Further, our approach relying on hypotonic shock does not require any special equipment, on the contrary, sonification of the bacterial cells can be challenging especially in scales of industrial production of PHA.

3.2. Optimization of "Heat Treatment"

Subsequently, the second step in the isolation process development was to optimize temperature and time of isolation; together, this process can be called "heat treatment". Within the first experiment focused on SDS concentration, "heat treatment" was represented by the application of a temperature of 70 °C for 2 h, but despite quite high yields, using different temperature can be more effective, or lowering the temperature could be more economically suitable, eventually. Based on previous results, time of exposition was set at

2 h, strain *H. halophila* was exposed to temperature 50 °C, 70 °C (as control—for comparison see Table 1), 90 °C and combination of cooling-down at 4 °C and following heating-up at 70 °C. The optimization process for *S. thermodepolymerans* included a little different strategy, when, in contrast to the halophilic strain, a lower temperature of 30 °C was also tested (we hypothesized that even low temperature could damage cell envelope of thermophilic bacterium). Other tested temperatures were 50 °C, 70 °C, 90 °C (as control—for comparison see Table 1) and also a combination of cooling-down at 4 °C and following heating-up at 70 °C as same as for *H. halophila*. The results of the experiments are listed in Table 2.

Table 2. Effect of different “heat treatments” on PHA purity and yield during isolation in 5 g/L SDS solution.

Strain	“Heat Treatment”	PHA Purity (wt.%)	Yield (–)
<i>H. halophila</i>	50 °C (120 min)	97.5 ± 1.2	0.92
	70 °C (120 min)	96.7 ± 0.3	0.97
	90 °C (120 min)	99.7 ± 0.1	0.90
	4 °C (120 min) + 70 °C (120 min)	94.3 ± 1.5	0.92
<i>S. thermodepolymerans</i>	30 °C (120 min)	67.6 ± 0.8	0.73
	50 °C (120 min)	81.4 ± 4.3	0.78
	70 °C (120 min)	96.7 ± 2.4	0.79
	90 °C (120 min)	99.8 ± 2.8	0.91
	4 °C (120 min) + 90 °C (120 min)	86.2 ± 2.1	0.87

PHA content in the biomass: *H. halophila* (82.27 ± 0.09) wt.%, *S. thermodepolymerans* (69.57 ± 0.79) wt.%.

Based on the results presented in Table 2, the most successful “heat treatment” for isolation of PHA from the halophilic strain considering the purity of isolated material was a temperature of 90 °C for 2 h, when the purity was higher than 99 wt.%. Despite a little lower purity after isolation at 70 °C, the yield of the material was higher than for the highest tested temperature 90 °C and also higher than for the combination of cooling-down and following heating-up. For subsequent isolation experiments, a treatment representing 2 h of heating at 70 °C was applied for strain *Halomonas halophila*.

The optimization process for *S. thermodepolymerans* included a little different strategy; in contrast to the halophilic strain, we tested a lower temperature (30 °C), but the effectivity of isolation was not too high (the purity was around 67 wt.% and the yield was 0.73). Based on these data, the most successful “heat treatment” was keeping the sample at 90 °C for 2 h; here, the purity exceeded 99 wt.%, hence, it was very similar to using a temperature of 70 °C for *H. halophila*. The combination of cooling followed by heating was not too successful for the thermophilic strain, whereas exposition to low temperature presumably led to the development of enhanced resistance to thermal treatment as was already reported in the literature [31]. This effect was described for mesophilic bacterial strains *E. coli* [32] and *C. necator* [33] after treatment at low temperature (0–5 °C). It was proved that enhanced resistance against elevated temperature was caused by the changes in the fatty acids composition in cell membranes [31]. Despite the fact that the effect was not described for thermophilic strains in detail, it is very likely that also in this case the low-temperature treatment resulted in active modulation of cell membrane lipids, which negatively impacted the susceptibility of the bacterial cells to hypotonic lysis. For our experiment, lower efficiency of combined “heat treatment” can be observed compared with keeping the cells at 90 °C for 2 h. To conclude, the most suitable “heat treatment” procedure for the thermophilic strain *S. thermodepolymerans* was keeping the isolation mixture at 90 °C for 2 h.

3.3. Testing of Different Ratios SDS Solution: Biomass

After optimization of SDS concentration and “heat treatment”, the following step was focused on the influence of initial biomass amount on the purity of isolated material and the yield of the process. This is very important since PHA production is usually performed as a high cell density cultivation [34], therefore the robustness of the isolation process with

respect to the amount of biomass employed per isolation batch is a very important factor determining the viability and feasibility of the process. Therefore, we tested different initial concentrations of biomass, while keeping the volume of SDS solution constant (5 g/L). Moreover, an increasing portion of biomass per isolation batch can also reduce the cost of the isolation process (lower SDS amount) and significantly decrease the environmental burden caused by the presence of SDS in wastewater.

Based on the results listed in Table 3, it is possible to state that the process is very robust regarding the initial biomass concentration; purities of material isolated from different biomass amounts were greatly similar. The same goes for almost all yields for both strains. Therefore, the developed isolation procedure can be advantageously applied on biomass obtained from high-cell-density cultivation (e.g., fed-batch cultivation).

Table 3. Effect of different biomass content on PHA purity and yield applied during 2 h lasting isolation in 5 g/L SDS solution at 70 °C for *H. halophila* and 90 °C for *S. thermodepolymerans*.

Strain	Biomass Amount in SDS Solution (g/L)	PHA Purity (wt.%)	Yield (–)
<i>H. halophila</i>	1.83	96.2 ± 1.9	0.86
	4.21 (standard process)	96.6 ± 0.3	0.99
	8.40	95.9 ± 7.1	1.04
	11.86	91.5	0.96
	17.72	94.9	1.03
	22.65	95.9 ± 1.0	1.06
<i>S. thermodepolymerans</i>	1.91	96.3 ± 1.3	0.89
	3.76 (standard process)	101.1 ± 4.7	0.92
	8.88	93.4 ± 0.5	0.77
	11.72	84.1	0.80
	16.01	93.3 ± 2.4	1.01
	20.99	94.1	0.94

PHA content in the biomass: *H. halophila* (75.5 ± 0.1) wt.%, *S. thermodepolymerans* (68.5 ± 0.0) wt.%.

3.4. Effect of Different Isolation Approaches on the Molecular Weight of the Polymer

The following experiment was focused on the determination of the molecular weight of obtained PHA materials; the main goal was to evaluate the influence of the isolation procedure on the molecular weight of the polymer.

Isolation of polymer using SDS solution (5 g/L) did not manifest in the decrease of molecular weight of PHA as can be seen in Table 4. For comparison, PHA was isolated from dried biomass using a procedure involving 12 h lasting incubation in chloroform at 70 °C in a thermoblock. To eliminate differences from sample preparation, all analyzed PHA samples were subjected to the same treatment. Despite the slight differences, values of molecular weight were in principle very similar at least for polymers isolated from *S. thermodepolymerans*. Only a little decrease can be observed which could be caused by enhanced temperature 90 °C used for isolation with SDS. In the case of *H. halophila*, isolation with SDS led to enhancement of molecular weight up to 1.5-times. It should be pointed out that the M_w of the polymer produced by *H. halophila* is very high as compared to other PHA producers [8] including *S. thermodepolymerans*. It can be assumed that the higher molecular weight of polymer after SDS isolation treatment might be caused by enhanced solubility of longer chains in chloroform after elimination of other cells components. 12 h lasting isolation at 70 °C in chloroform is possibly more efficient for shorter polymer chains with lower molecular weight. PDI values were very low for all studied isolation setups, indicating the high uniformity of generated biopolyesters in terms of molecular mass distribution, which is a beneficial feature for further polymer processing.

Table 4. The molecular weight of isolated PHA polymer.

Strain	"Treatment"	M_w (kDa)	PDI ² (-)
<i>H. halophila</i>	PHA isolated from dried biomass	1050.4 ± 1.8	1.20 ± 0.04
	70 °C (120 min)—standard process	1581.9 ± 5.3	1.46 ± 0.19
<i>S. thermodepolymerans</i>	PHA isolated from dried biomass	711.5 ± 1.6	1.17 ± 0.01
	90 °C (120 min)—standard process	686.4 ± 16.1	1.23 ± 0.03

² PDI (polydispersity index) is defined as M_w/M_n . M_w : weight average molecular mass; M_n : number average molecular mass.

3.5. Determination of Material Purity by Infrared Spectroscopy

FTIR technique was applied on samples of dried biomass, PHA polymer isolated by optimized process for each strain (2 h lasting treatment at 70 °C for *H. halophila* (HH) or 90 °C for *S. thermodepolymerans* (ST) in solution with 5 g/L SDS), and also for commercial P(3HB) (Biomer) as a reference material. Result are shown in Figures 1 and 2.

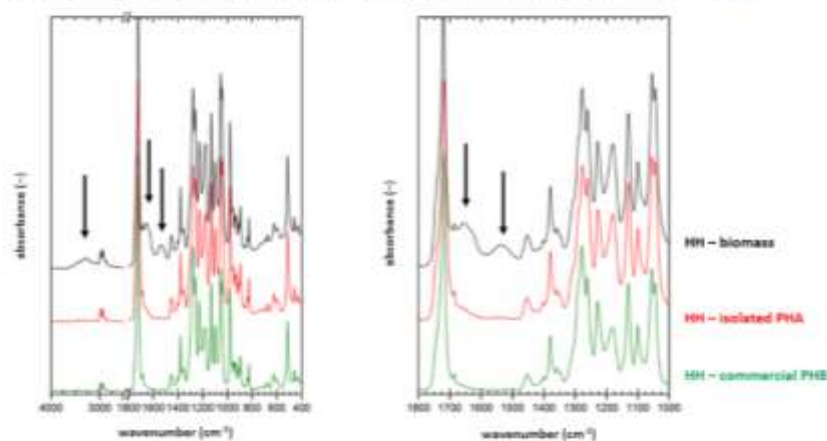


Figure 1. FTIR spectra of original biomass of *H. halophila* (black), polymer isolated via optimized approach (red) and commercial P(3HB) sample (Biomer) (green); arrows show absorption bands for components of biomass (3300 ; 1640 and 1540 cm^{-1} —proteins).

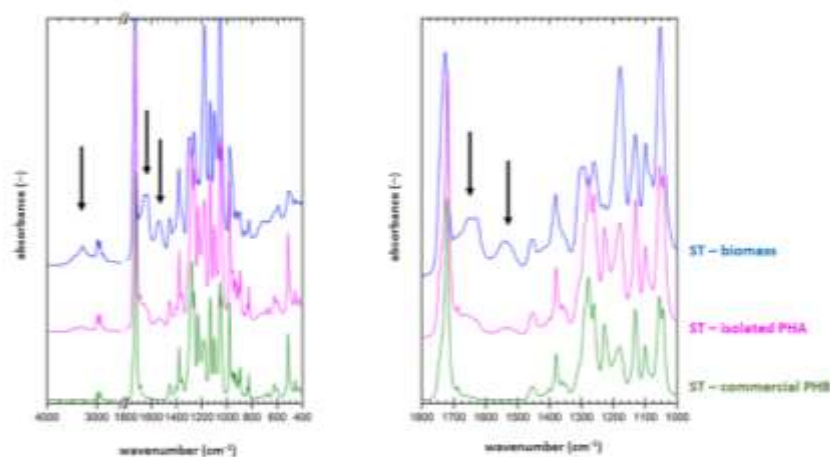


Figure 2. FTIR spectra of original biomass of *S. thermodepolymerans* (blue), polymer isolated via optimized approach (magenta) and commercial P(3HB) sample (Biomer) (green); arrows show absorption bands for components of biomass (3300 ; 1640 and 1540 cm^{-1} —proteins).

To evaluate the purity of the polymer isolates from FTIR spectra, characteristic spectral signatures of proteins can be used. These can be found at about 3300 cm^{-1} (referred to as amide A band), 1640 cm^{-1} (referred to as amide I band) and 1540 cm^{-1} (referred to as amide II band). All these characteristic bands are marked with arrows in the biomass spectra in Figures 1 and 2. As expected, the protein signal is completely absent in spectrum of the reference P(3HB) material. In the FTIR spectra of polymer isolates obtained from both tested strains, significant decrease of the protein signal, compared to the original biomass, indicates high effectivity of the polymer purification during the extraction process. As can be seen from the comparison of Figures 1 and 2, lower content of the residual biomass was found for the polymer isolated from *H. halophila*. This is in good agreement with the results of GC-FID. Based on the gravimetric yield of the chromatographic analysis, we determined polymer purity (86.4 ± 1.4) wt.% for *S. thermodepolymerans* and (91.3 ± 1.5) wt.% for *H. halophila*.

3.6. Electron Microscopy Imaging

Selected samples were analyzed using electron microscopy techniques, specifically, samples of microbial cells of *H. halophila* and *S. thermodepolymerans* and isolates of PHA from both strains.

Cryo-SEM image of *H. halophila* (Figure 3A) shows rod-shaped cells containing several granules of PHA. Most of the cells were fractured during the freeze-fracturing procedure and revealed the intracellular content of PHA. As previously described [35], PHA remain elastic even at temperatures of liquid nitrogen and can be observed being pulled out of the cells, showing “needle type” deformation (arrowhead in Figure 3) or as holes in cells (concave deformation) when the granule was pulled out of the cell completely. Cells of *S. thermodepolymerans* (Figure 3C), containing 1 or 2 granules of PHA also deformed by freeze-fracturing. In the image, it is possible to observe also fracture of the cell wall revealing the surface of the plasma membrane, marked with O. The image of isolated granules from *H. halophila* (Figure 3B) shows that the granules merged, but still remained elastic. PHA isolated from *S. thermodepolymerans* (Figure 3D), however, stayed separate after the extraction as individual oval granules, which were also affected by freeze-fracturing and show needle deformation.

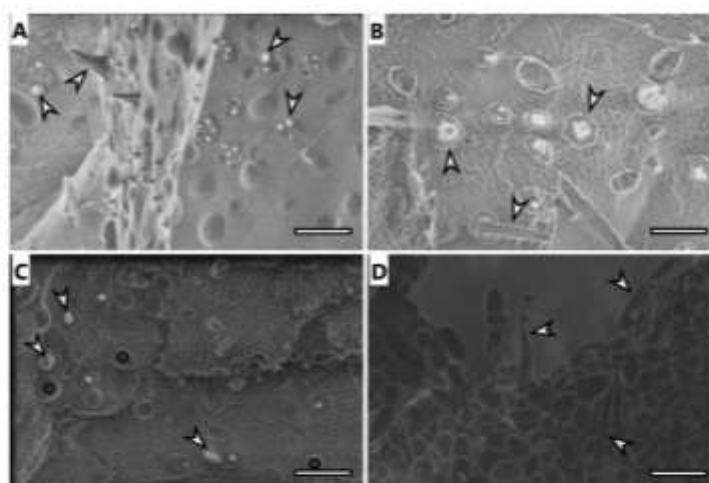


Figure 3. Cryo-SEM image of: (A) *H. halophila* biomass before extraction of PHA granules, (B) PHA granules isolated from *H. halophila*, (C) *S. thermodepolymerans* biomass before extraction of PHA granules, (D) PHA granules isolated from *S. thermodepolymerans*, needle deformation of PHA granules marked with arrowhead, cells with fractured cell wall revealing the surface of plasma membrane marked with O, scale bar $2\ \mu\text{m}$.

TEM observation confirmed previous findings of cryo-SEM. *H. halophila* contained several smaller granules in their cells (Figure 4A), while *S. thermodepolymerans* contained 1–3 larger granules. Generally, it is described that larger PHA granules are beneficial for the recovery process [36], which makes *S. thermodepolymerans* of even higher interest for an eventual industrial-scale application. Images of isolated granules also confirm the shape observed in cryo-SEM: isolates from *H. halophila* merged into irregularly shaped granules, while granules from *S. thermodepolymerans* of regular oval shape stayed separate. In Figure 4B,D, it is possible to see shades surrounding the granules. Based on the results of purification, the shades could be caused by contamination originating from disrupted cellular fragments, or by PHA granule membrane remnants. It is also possible to observe a few intact cells (Figure 4B marked with arrow), thus confirming the results of the determination of purity of the isolates—for instance (91.3 ± 1.5) wt.% of PHA for *H. halophila* using standard optimized process.

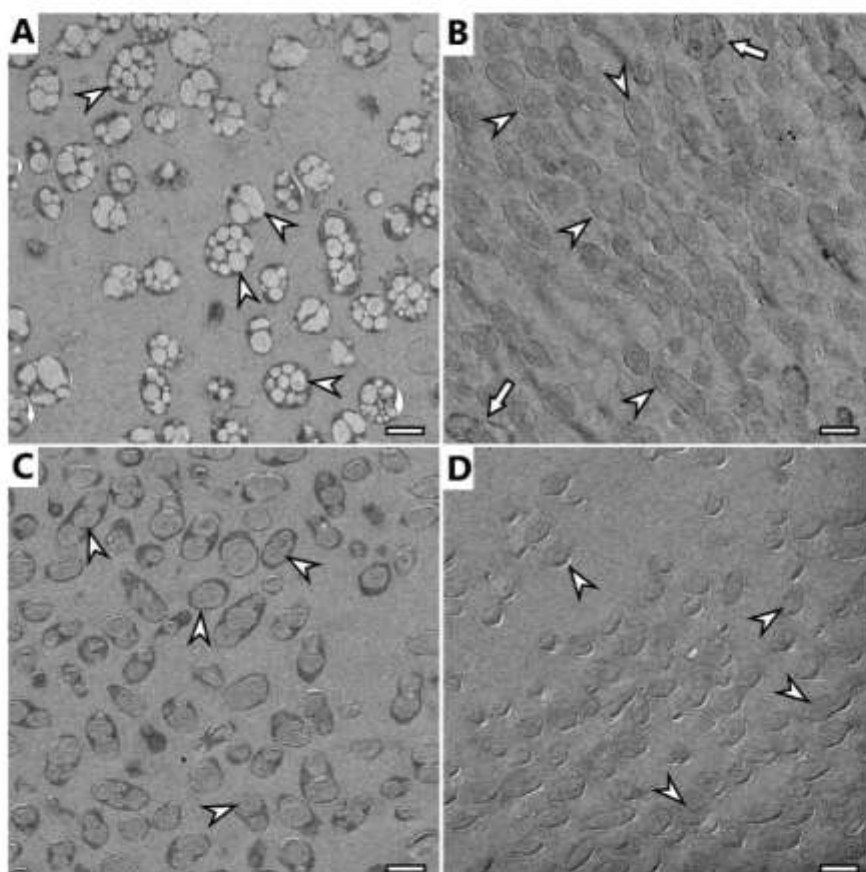


Figure 4. TEM image of (A) *H. halophila* biomass before extraction of PHA granules, (B) PHA granules isolated from *H. halophila*, (C) *S. thermodepolymerans* biomass before extraction of PHA granules, (D) PHA granules isolated from *S. thermodepolymerans*, PHA granules marked with arrowhead, intact cells after extraction marked with arrow, scale bar 1 μm .

3.7. Wastewater Management—Precipitation of KDS from SDS after Isolation

As same as other detergents, also SDS serves as a contaminant of wastewater with possible harmful effects on wastewater management. Therefore, we focused on the removal

of the irritant compound SDS from the supernatant after the isolation process. We have tested several approaches (data not shown), and the most successful procedure was simple and feasible precipitation of SDS in the form of poorly water-soluble potassium dodecyl-sulfate (KDS) in the presence of 2 M KCl. The efficiency of the SDS removal process was determined via measurement of SDS concentration using the protocol of Rupprecht et al. (2015) [29]. Data are demonstrated in Table 5.

Table 5. Results of SDS determination before and after KDS precipitation.

Parameter	SDS (g/L)			
	1	2.5	5	10
Concentration used for isolation	0.6	1.8	4.9	10.7
In supernatant after isolation	0.02	n.d. ³	n.d.	n.d.
Residual SDS concentration after KDS precipitation	26.8	64.9	169.9	316.0
KDS yield (mg)				

³ n.d.—no detectable.

Based on presented data, it seems that removal of SDS from a wastewater stream by simple addition of non-toxic and cheap KCl is a very effective process since after this treatment the residual concentration of SDS in the supernatant after isolation was not detectable for almost all the samples. The formation of KDS precipitate is a very quick and straightforward method to remove SDS used for isolation of PHA granules, since the formation of the precipitate can be observed immediately after the addition of KCl into supernatants after isolation as shown in Figure 5.

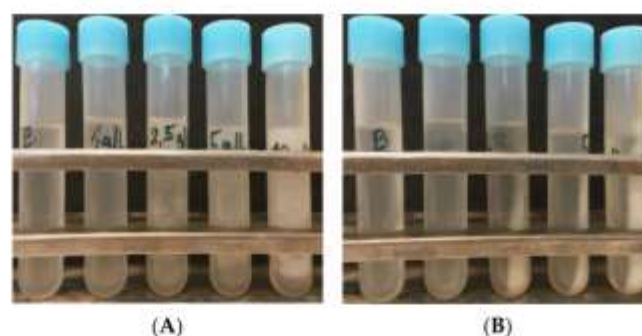


Figure 5. KDS precipitate using 2 M KCl after isolation with different SDS concentrations—from the left: blank, 1 g/L, 2.5 g/L, 5 g/L, 10 g/L: (A) before centrifugation; (B) after centrifugation.

A different strategy to get rid of the detergent after isolation was used by the team of Samori et al. (2015), who isolated PHA polymer from bacterial biomass. For this purpose, they used ammonium laurate (most efficient at a concentration of 200 wt.%), which acts similarly to SDS in terms of microbial cell disruption and solubilization of hydrophobic contaminants. After separation of the polymer by centrifugation, the addition of CO₂ into supernatant leads to a decrease of the pH-value, and switches the detergent into poorly water soluble neutral (protonated) lauric acid with the possibility of separation by centrifugation; resulting water phase containing ammonium hydrogen carbonate can serve as a nitrogen source for microorganisms [37]. Our approach relies on the application of the lower amount of inexpensive and abundant detergent SDS, which can be simply removed from wastewater by precipitation. It should be pointed out that unlike for ammonium laurate, the removal of the SDS from the supernatant in form of KCl occurs in a non-destructive way, and it is very likely that SDS could be regenerated for instance by ultradialysis in excess of Na⁺ ions. Hence, our concept enables not only removal of detergent from wastewater, but also holds a promise of SDS recovery, which would be very beneficial with respect to economic aspects of the PHA isolation process. Nevertheless, the

possibility of SDS recovery from KDS precipitate deserves further investigation, which is out of the scope of this preliminary work.

4. Conclusions

In this work, we developed a procedure for the isolation of PHA materials from extremophilic microbial cells. The method is based on the exposition of the bacterial cells naturally containing high intracellular concentrations of compatible solutes as part of their adaptation strategy to extreme hypotonic conditions induced by the diluted solution of SDS (optimal concentration is about 5 g/L of SDS) at elevated temperature. Our results indicate that such conditions lead to disruption of the cells and release of PHA granules. Moreover, SDS apart from its cell-disruptive function also solubilizes hydrophobic cell components which would otherwise get attached as contaminants to PHA materials. The procedure seems to be simple, robust, and feasible in industrial conditions. The purity of obtained materials (usually above 95%), as well as yields of the procedure (usually about 0.9), reach high values. If even higher purity of the material is needed, additional steps such as the washing of the materials with proper organic solvents or other agents can be involved. Furthermore, since leftovers of the detergent SDS in process wastewater might dramatically decrease the positive ecological features of the process, we also focused on the removal of SDS. We have developed a simple, cheap, and safe technique that is based on the precipitation of SDS in the presence of KCl. The resulting precipitate can be simply removed by decantation or centrifugation, hence, SDS does not contaminate the wastewater of the process. Moreover, there is also the possibility to regenerate SDS which would substantially improve the economic feasibility and overall sustainability of the process. To sum up, the developed strategy for PHA isolation is compatible with Next-Generation Industrial Biotechnology concepts, it is simple, cheap, robust, provides PHA materials in high purity and at high yields and is also ecologically friendly.

Author Contributions: Conceptualization, S.O.; investigation, I.N., X.K., K.M., P.S., M.K. (Michal Kalina) and V.K.; writing—original draft preparation, S.O., I.N. and M.K. (Martin Koller); writing—review and editing, X.K., P.S. and M.K. (Martin Koller); visualization, S.O., I.N. and K.M.; supervision, S.O.; project administration, I.N.; funding acquisition, I.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by Grant FCH-K-21-6952 implemented within the project Quality Internal Grants of BUT (KInG BUT), Reg. No. CZ.02.2.69/0.0/0.0/19_073/0016948, which is financed from the OP RDE. Also CIISB research infrastructure project LM2018127 funded by MEYS CR is gratefully acknowledged for the financial support of the measurements at the CF CryoEM.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Obruca, S.; Sedlacek, P.; Koller, M.; Kucera, D.; Pernicova, I. Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. *Biotechnol. Adv.* **2018**, *36*, 856–870. [[CrossRef](#)]
2. Obruca, S.; Dvorak, P.; Sedlacek, P.; Koller, M.; Sedlar, K.; Pernicova, I.; Safranek, D. Polyhydroxyalkanoates synthesis by halophiles and thermophiles: Towards sustainable production of microbial bioplastics. *Biotechnol. Adv.* **2022**, *59*, 107906. [[CrossRef](#)]
3. Kourmentza, C.; Plácido, J.; Venetsaneas, N.; Burniol-Figols, A.; Varrone, C.; Gavala, H.N.; Reis, M.A.M. Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. *Bioengineering* **2017**, *4*, 55. [[CrossRef](#)]
4. Chen, G.-Q.; Jiang, X.-R. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2018**, *50*, 94–100. [[CrossRef](#)]
5. Quillaguamán, J.; Hashim, S.; Bento, F.; Mattiasson, B.; Hatti-Kaul, R. Poly(β -hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LCI using starch hydrolysate as substrate. *J. Appl. Microbiol.* **2005**, *99*, 151–157. [[CrossRef](#)]
6. Pernicova, I.; Kucera, D.; Nebesarova, J.; Kalina, M.; Novackova, I.; Koller, M.; Obruca, S. Production of polyhydroxyalkanoates on waste frying oil employing selected *Halomonas* strains. *Bioresour. Technol.* **2019**, *292*, 122028. [[CrossRef](#)]

7. Ren, Y.; Ling, C.; Hajnal, I.; Wu, Q.; Chen, G.-Q. Construction of *Halomonas bluephagenesis* capable of high cell density growth for efficient PHA production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 4499–4510. [\[CrossRef\]](#)
8. Kucera, D.; Pernicová, I.; Kovalčík, A.; Koller, M.; Müllerová, L.; Sedláček, P.; Mravec, F.; Nebesarová, J.; Kalina, M.; Marová, I.; et al. Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*. *Bioresour. Technol.* **2018**, *256*, 552–556. [\[CrossRef\]](#)
9. Alsafadi, D.; Al-Mashaqbeh, O. A one-stage cultivation process for the production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) from olive mill wastewater by *Haloferax mediterranei*. *New Biotechnol.* **2017**, *34*, 47–53. [\[CrossRef\]](#)
10. Shivanand, P.; Mugeraya, G. Halophilic Bacteria and Their Compatible Solutes—Osmoregulation and Potential Applications. *Curr. Sci.* **2011**, *100*, 1516–1521.
11. Hsiao, L.-J.; Lee, M.-C.; Chuang, P.-J.; Kuo, Y.-Y.; Lin, J.-H.; Wu, T.-M.; Li, S.-Y. The production of poly(3-hydroxybutyrate) by thermophilic *Caldimonomas manganoxidans* from glycerol. *J. Polym. Res.* **2018**, *25*, 85. [\[CrossRef\]](#)
12. Kourilova, X.; Pernicova, I.; Vidlakova, M.; Krejcirik, R.; Mrazova, K.; Hrubanova, K.; Krzyzaneck, V.; Nebesarova, J.; Obruca, S. Biotechnological conversion of grape pomace to poly(3-hydroxybutyrate) by moderately thermophilic bacterium *Tepidimonas taiwanensis*. *Bioengineering* **2021**, *8*, 141. [\[CrossRef\]](#)
13. Kourilova, X.; Pernicova, I.; Sedlar, K.; Musilova, J.; Sedlacek, P.; Kalina, M.; Koller, M.; Obruca, S. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a thermophilic strain of *Schlegella thermodepolymerans* from xylose rich substrates. *Bioresour. Technol.* **2020**, *315*, 123885. [\[CrossRef\]](#)
14. Urbietta, M.S.; Donati, E.R.; Chan, K.-G.; Shahar, S.; Sin, L.L.; Goh, M.M. Thermophiles in the genomic era: Biodiversity, science, and applications. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 633–647. [\[CrossRef\]](#)
15. Koller, M.; Bona, R.; Chiellini, E.; Braunegg, G. Extraction of short-chain-length poly-[(R)-hydroxyalkanoates] (scl-PHA) by the “anti-solvent” acetone under elevated temperature and pressure. *Biotechnol. Lett.* **2013**, *35*, 1023–1028. [\[CrossRef\]](#)
16. Ramsay, J.A.; Berger, E.; Voyer, R.; Chavarie, C.; Ramsay, B.A. Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents. *Biotechnol. Tech.* **1994**, *8*, 589–594. [\[CrossRef\]](#)
17. Khosravi-Darani, K.; Vasheghani-Farahani, E.; Shojaosadati, S.A.; Yamini, Y. Effect of process variables on supercritical fluid disruption of *Ralstonia eutropha* cells for poly(R-hydroxybutyrate) recovery. *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20*, 1757–1765. [\[CrossRef\]](#)
18. Hejazi, P.; Vasheghani-Farahani, E.; Yamini, Y. Supercritical fluid disruption of *Ralstonia eutropha* for poly(β -hydroxybutyrate) recovery. *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19*, 1519–1523. [\[CrossRef\]](#)
19. Holmes, P.A.; Lim, G.B. Separation Process. U.S. Patent 4910145, 20 March 1990.
20. Choi, J.L.; Lee, S.Y. Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *62*, 546–553. [\[CrossRef\]](#)
21. Berger, E.; Ramsay, B.A.; Ramsay, J.A.; Chavarie, C.; Braunegg, G. PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass. *Biotechnol. Tech.* **1989**, *3*, 227–232. [\[CrossRef\]](#)
22. Marudkla, J.; Patjawit, A.; Chuensangjun, C.; Sirisansaneeyakul, S. Optimization of poly(3-hydroxybutyrate) extraction from *Cupriavidus necator* DSM 545 using sodium dodecyl sulfate and sodium hypochlorite. *Agric. Nat. Resour.* **2018**, *52*, 266–273. [\[CrossRef\]](#)
23. Mannina, G.; Presti, D.; Montiel-Jarillo, G.; Suárez-Ojeda, M.E. Bioplastic recovery from wastewater: A new protocol for polyhydroxyalkanoates (PHA) extraction from mixed microbial cultures. *Bioresour. Technol.* **2019**, *282*, 361–369. [\[CrossRef\]](#)
24. Kathiraser, Y.; Aroua, M.K.; Ramachandran, K.B.; Tan, I.K.P. Chemical characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) recovered by enzymatic treatment and ultrafiltration. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2007**, *82*, 847–855. [\[CrossRef\]](#)
25. Rodriguez-Valera, F. Halobacteria as producers of polyhydroxyalkanoates. *FEMS Microbiol. Lett.* **1992**, *103*, 181–186. [\[CrossRef\]](#)
26. Bhattacharyya, A.; Pramanik, A.; Maji, S.K.; Haldar, S.; Mukhopadhyay, U.K.; Mukherjee, J. Utilization of vinasse for production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. *AMB Express* **2012**, *2*, 34. [\[CrossRef\]](#)
27. Brandl, H.; Gross, R.A.; Lenz, R.W.; Clinton Fuller, A. *Pseudomonas oleovorans* as a Source of Poly(β -Hydroxyalkanoates) for Potential Applications as Biodegradable Polyesters. *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, *54*, 1977–1982. [\[CrossRef\]](#)
28. Kourilova, X.; Schwarzerova, J.; Pernicova, I.; Sedlar, K.; Mrazova, K.; Krzyzaneck, V.; Nebesarova, J.; Obruca, S. The first insight into polyhydroxyalkanoates accumulation in multi-extremophilic *Rubrobacter xylanophilus* and *Rubrobacter spartanus*. *Microorganisms* **2021**, *9*, 909. [\[CrossRef\]](#)
29. Rupprecht, K.R.; Lang, E.Z.; Gregory, S.D.; Bergsma, J.M.; Rae, T.D.; Fishpaugh, J.R. A precise spectrophotometric method for measuring sodium dodecyl sulfate concentration. *Anal. Biochem.* **2015**, *486*, 78–80. [\[CrossRef\]](#)
30. Arikawa, H.; Sato, S.; Fujiki, T.; Matsumoto, K. Simple and rapid method for isolation and quantitation of polyhydroxyalkanoate by SDS-sonication treatment. *J. Biosci. Bioeng.* **2017**, *124*, 250–254. [\[CrossRef\]](#)
31. Middelberg, A.P.J. Process-scale disruption of microorganisms. *Biotechnol. Adv.* **1995**, *13*, 491–551. [\[CrossRef\]](#)
32. Katsui, N.; Tsuchido, T.; Takano, M.; Shibasaki, I. Effect of preincubation temperature on the heat resistance of *Escherichia coli* having different fatty acid compositions. *J. Gen. Microbiol.* **1981**, *122*, 357–361. [\[CrossRef\]](#)
33. Rees, P.; Cumming, R.H.; Watson, J.S. Rheology of heated bacterial DNA. In Proceedings of the 1994 IChemE Research Event, London, UK, 5–6 January 1994; Volume 1, pp. 183–185.
34. Koller, M.; Marsalek, L.; Miranda de Sousa Dias, M.; Braunegg, G. Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. *New Biotechnol.* **2017**, *37*, 24–38. [\[CrossRef\]](#)

35. Sedlacek, P.; Slaninova, E.; Enev, V.; Koller, M.; Nebesarova, J.; Marova, I.; Hrubanova, K.; Krzyzanek, V.; Samek, O.; Obruca, S. What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 1905–1917. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Shen, R.; Ning, Z.Y.; Lan, Y.X.; Chen, J.C.; Chen, C.G. Manipulation of polyhydroxyalkanoate granular sizes in *Halomonas bluephagenesis*. *Metab. Eng.* **2019**, *54*, 117–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Samori, C.; Basaglia, M.; Casella, S.; Favaro, L.; Galletti, P.; Giorgini, L.; Marchi, D.; Mazzocchetti, L.; Torri, C.; Tagliavini, E. Dimethyl carbonate and switchable anionic surfactants: Two effective tools for the extraction of polyhydroxyalkanoates from microbial biomass. *Green Chem.* **2015**, *17*, 1047–1056. [[CrossRef](#)]