



**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

**IDENTIFIKACE A IZOLACE PHA PRODUKUJÍCÍCH  
BAKTERIÍ**

IDENTIFICATION AND ISOLATION OF PHA PRODUCING BACTERIA

**DIZERTAČNÍ PRÁCE**

DOCTORAL THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Ing. Iva Pernicová**

**ŠKOLITEL**

SUPERVISOR

**doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**

**BRNO 2021**

## Zadání dizertační práce

Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií Akademický rok: 2020/21  
Studentka: **Ing. Iva Pernicová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie  
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**

### Název dizertační práce:

Identifikace a izolace PHA produkujících bakterií

### Zadání dizertační práce:

1. Studium produkce PHA u extremofilních sbírkových bakteriálních kultur
2. Izolace extremofilních PHA producentů z přirozených mikrobiálních konsorcií
3. Taxonomická klasifikace izolátů a jejich studium pomocí nástrojů molekulární biologie
4. Studium biotechnologického potenciálu izolátů v kontextu produkce PHA
5. Optimalizace biotechnologického procesu produkce PHA u vybraných mikrobiálních kultur

### Termín odevzdání dizertační práce: 31.1.2021:

-----  
Ing. Iva Pernicová  
student(ka)

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

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

V Brně dne 20.1.2021

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

## Abstrakt

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou mikrobiální zásobní polyestery, které mohou představovat obnovitelnou a ekologicky šetrnou alternativu k petrochemickým plastům. Jejich výroba a využití jsou do velké míry znevýhodněny vysokou produkční cenou. Jednou z možností, jak snížit cenu produkce PHA, je využití extrémofilních PHA producentů, které s sebou přináší především výhody vyplývající z vysoké robustnosti procesu vůči mikrobiální kontaminaci. V předložené práci byla pozornost zaměřena na studium produkce PHA pomocí vybraných halofilních a termofilních mikroorganismů. Z halofilních mikroorganismů byly testovány především vybraní sbírkoví zástupci rodu *Halomonas*, a to vzhledem k jejich možnému využití k produkci PHA z levného odpadního fritovacího oleje. Byli identifikováni dva slibní PHA producenti, a to konkrétně *Halomonas hydrothermalis* a *Halomonas neptunia*. Oba kmeny dosahovaly v rámci baňkových experimentů solidních výtěžků PHA a při přidavku vhodných strukturních prekurzorů byly také schopny produkce kopolymerů se zajímavými materiálovými vlastnostmi. Hlavní důraz byl však v práci kladen na studium produkce PHA pomocí termofilních mikroorganismů. V rámci práce byla provedena izolace termofilních PHA producentů z různých termofilních konsorcií (aktivní kal, kompost atd.). V průběhu izolačních experimentů byl navržen originální izolační postup využívající změny osmotického tlaku tzv. osmoselekce. Touto originální cestou bylo získáno několik desítek slibných termofilních producentů PHA, kteří byli taxonomicky zařazeni pomocí sekvenace genu *16S rRNA* a byl u nich testován PHA produkční potenciál. Nejslibnějším PHA producentem byl izolát klasifikovaný jako *Aneurinibacillus* sp. H1. K produkci PHA pomocí *Aneurinibacillus* sp. H1 lze využít řadu substrátů včetně odpadního glycerolu. Ještě významnější je schopnost syntetizovat kopolymery s vysokým obsahem 4-hydroxybutyrátu. Monomerní složení PHA kopolymeru, a tím i materiálové vlastnosti připraveného kopolymeru, je možné kontrolovat vhodným nastavením kultivačních podmínek. Připravený kopolymer P(3HB-co-4HB) má unikátní vlastnosti a velký aplikační potenciál v řadě high-end aplikací například v oblasti péče o zdraví, potravinářství nebo kosmetice.

## Klíčová slova

Polyhydroxyalkanoáty, extrémofilní mikroorganismy, termofilní bakterie, izolace bakterií

## **Abstract**

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are microbial storage polyesters that represent a renewable and environmentally friendly alternative to petrochemical plastics. However, their production and use are severely disadvantaged by the high production cost. The use of extremophilic PHA producers is one of the ways to reduce the cost of PHA production. Extremophiles bring numerous advantages resulting from the high robustness of the process against microbial contamination. In this doctoral thesis, attention was focused on the study of PHA production using selected halophilic and thermophilic microorganisms. Representatives of the genus *Halomonas* were mainly from public collections of microorganisms. Two promising PHA producers on waste frying oil were identified, namely *Halomonas hydrothermalis* and *Halomonas neptunia*. Both strains achieved good PHA yields in flask experiments. With the addition of suitable structural precursors, they were also able to produce copolymers with interesting material properties. However, in the proposed thesis, the main emphasis was placed on the study of PHA production using thermophilic microorganisms. As a part of the work, the isolation of thermophilic PHA producers from various thermophilic consortia (active sludge, compost, etc.) was performed. During isolations experiments, an original isolation procedure was designed using changes in osmotic pressure, the so-called osmoselection. Dozens of promising thermophilic PHA producers were obtained thanks to this original approach. They were taxonomically classified using *16S rRNA* and tested for production potential. The most promising PHA producer was the isolate which was classified as *Aneurinibacillus* sp. H1. This bacterium is able to utilize a variety of substrates, including waste glycerol, to produce PHA. Even more important is the capability of synthesizing copolymers with a high content of 4-hydroxybutyrate. The monomer composition of the PHA copolymer and thus the material properties of the prepared copolymer can be controlled by suitable adjustment of the cultivation conditions. The prepared copolymer P(3HB-co-4HB) has unique properties and the great application potential in numerous high-end applications, for example in the field of health care, food industry or cosmetics.

## **Keywords**

Polyhydroxyalkanoates, extremophilic microorganism, thermophilic bacteria, isolation of bacteria



PERNICOVÁ, Iva. Identifikace a izolace PHA produkujících bakterií. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/133858>. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Stanislav Obruča.

## **Prohlášení**

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

.....  
podpis

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala panu docentu Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D. za odborné vedení dizertační práce, za ochotu a pomoc při vypracování práce a za odborné konzultace. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Xenii Kouřilové, Ing. Ivaně Nováčkové a Ing. Danu Kučerovi, Ph.D. a celému týmu PHA za případnou pomoc v laboratoři, při odběrech vzorků a za úžasné zážitky. Také bych chtěla poděkovat své rodině a příteli za podporu během celého studia. V neposlední řadě děkuji čistírnám odpadních vod Brno-Modřice a Bystřice pod Hostýnem, kompostárnám Brno a Blansko a společnosti Dekonta, a.s. za poskytnutí vzorků.

## OBSAH

<b>1.</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>9</b>
<b>2.</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>11</b>
2.1.	POLYHYDROXYALKANOÁTY.....	11
2.1.1.	Syntéza PHA .....	13
2.1.2.	Přehled enzymů a genů vztahujících se k metabolismu PHA .....	15
2.2.	ZPŮSOBY IDENTIFIKACE PHA U BAKTERIÍ.....	17
2.2.1.	Lipofilní barviva.....	18
2.2.2.	Infračervená spektrometrie.....	19
2.2.3.	Ramanova spektrometrie.....	20
2.2.4.	Molekulární techniky .....	21
2.2.5.	Další techniky pro stanovení PHA .....	28
2.2.6.	Porovnání metod pro identifikaci akumulace PHA.....	28
2.3.	EXTRÉMOFILNÍ MIKROORGANISMY.....	29
2.3.1.	Halofilní producenti PHA .....	32
2.3.2.	Termofilní producenti PHA .....	33
2.4.	OBOHACENÍ SMĚSNÝCH BAKTERIÁLNÍCH KULTUR O BAKTERIE PRODUKUJÍCÍ PHA .....	34
2.4.1.	Anaerobní/aerobní obohacení .....	35
2.4.2.	Aerobní dynamické krmení.....	35
2.5.	VYUŽITÍ ODPADNÍCH SUBSTRÁTŮ K PRODUKCI PHA.....	36
<b>3.</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>39</b>
3.1.	POUŽITÉ PŘÍSTROJE .....	39
3.2.	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	39
3.3.	POUŽITÉ MIKROORGANISMY .....	42
3.4.	SEZNAM KULTIVAČNÍCH MÉDIÍ.....	42
3.5.	OŽIVENÍ A ÚCHOVA MIKROBIÁLNÍCH KMENŮ .....	45
3.6.	FENOTYPOVÁ IDENTIFIKACE VYBRANÝCH IZOLÁTŮ .....	45
3.7.	IZOLACE PHA TERMOFILNÍCH PRODUCENTŮ ZE VZORKŮ AKTIVOVANÉHO KALU NEBO KOMPOSTU.....	46
3.7.1.	Aerobní dynamické krmení.....	46
3.7.2.	Izolace náhodným výběrem kolonií .....	47

3.7.3. Izolace pomocí Nílské červeně .....	47
3.7.4. Izolační protokol využívající osmotický stres.....	47
3.7.5. Izolace PHA produkujících bakterií pomocí osmoselekce .....	47
3.7.6. Selektce PHA produkujících bakterií při různých teplotách .....	48
3.8. KULTIVACE MIKROORGANISMŮ V BAŇKÁCH ZA ÚČELEM STUDIA PRODUKCE PHA .....	48
3.8.1. Produkce mcl-PHA .....	49
3.8.2. Produkce PHA pomocí halofilních mikroorganismů .....	49
3.8.3. Testování produkce PHA u vybraných izolátů získaných pomocí osmoselekce .....	51
3.8.4. Testování produkce a optimalizace produkce PHA u izolátů H1, H2 a K2 .....	56
3.9. KVANTIFIKACE A CHARAKTERIZACE PHA .....	59
3.9.1. Gravimetrické stanovení sušiny .....	59
3.9.2. Stanovení PHA pomocí plynové chromatografie.....	59
3.9.3. Extrakce PHA ze suché biomasy a charakterizace materiálu .....	59
3.10. DALŠÍ POUŽITÉ ANALYTICKÉ METODY .....	60
3.10.1. Spektrofotometrické stanovení zbytkového glycerolu.....	60
3.10.2. Stanovení zbytkového glycerolu a 1,4-butandiolu pomocí HPLC ..	61
3.11. MOLEKULÁRNÍ METODY.....	61
3.11.1. Izolace DNA .....	61
3.11.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	61
3.11.3. Sekvenace.....	64
<b>4. VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>65</b>
4.1. PRODUKCE MCL-PHA POMOCÍ BAKTERIÍ RODU <i>PSEUDOMONAS</i> .....	65
4.2. PRODUKCE PHA NA ODPADNÍM FRITOVACÍM OLEJI POMOCÍ VYBRANÝCH ZÁSTUPCŮ RODU <i>HALOMONAS</i> .....	69
4.3. IZOLACE TERMOFILNÍCH PRODUCENTŮ POLYHYDROXYALKANOÁTŮ Z PŘÍRODNÍCH VZORKŮ.....	81
4.3.1. Aerobní dynamické krmení .....	81
4.3.2. Izolace pomocí změn osmotického tlaku .....	88
4.3.3. Detekce PHA syntázy termofilních izolátů .....	102
4.3.4. Testování produkce PHA u vybraných izolátů .....	108

4.4. CHARAKTERISTIKA A SCREENING PRODUKCE PHA IZOLÁTŮ S OZNAČENÍM H1, H2 A K2.....	117
4.4.1. Optimalizace produkce PHA u izolátu K2, H1 a H2 .....	119
4.4.2. Produkce kopolymerů PHA pomocí izolátů K2, H1 a H2 .....	123
4.4.3. Optimalizace produkce a produkční potenciál izolátu H1 .....	126
4.4.4. Batch, fed-batch a repeated-batch izolátu H1 .....	134
<b>5. ZÁVĚR .....</b>	<b>150</b>
<b>6. POUŽITÉ ZKRATKY .....</b>	<b>154</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>155</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>179</b>
<b>9. SEZNAM PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI .....</b>	<b>180</b>
<b>10. PŘÍLOHY.....</b>	<b>186</b>
10.1. INTERCONNECTION OF WASTE CHICKEN FEATHER BIODEGRADATION AND KERATINASE AND MCL-PHA PRODUCTION EMPLOYING <i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i> KT2240.....	186
10.2. PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATES ON WASTE FRYING OIL EMPLOYUNG SELECTED <i>HALOMONAS</i> STRAINS .....	193
10.3. APPLICATION OF OSMOTIC CHALLENGE FOR ENRICHMENT OF MICROBIAL CONSORTIA IN POLYHYDROXYALKANOATES PRODUCING THERMOPHILIC AND THERMOTOLERANT BACTERIA AND THEIR SUBSEQUENT ISOLATION .....	197
10.4. PATENTOVÁ LISTINA .....	204
10.5. INTRODUCING THE NEWLY ISOLATED BACTERIUM <i>ANEURINIBACILLUS</i> SP. H1 AS AN AUSPICIOUS THERMOPHILIC PRODUCER OF VARIOUS POLYHYDROXYALKANOATES (PHA) COPOLYMERS–1. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE BACTERIUM.....	228

# 1. ÚVOD

Znečištění životního prostředí plasty je jedním z nejnaléhavějších problémů této doby. Nejenže, celosvětově stoupá výroba plastů, ale stoupá také procento odpadu, které končí právě v životním prostředí, kde dochází k jeho akumulaci. Ročně se do moře z pevniny uvolní okolo 8 milionů tun plastového odpadu. Tento odpad poté putuje napříč celým světem a hromadí se jednak v moři samotném, ale i na přilehlých pobřežích. Vlivem podmínek prostředí také dochází k rozpadu odpadu na tzv. mikroplasty, které se akumulují v živočišných, pitné vodě a začínají se pomalu akumulovat i v lidském těle.

Značnou část tohoto odpadu tvoří plasty a výrobky na jedno použití. Jejich aktivní použití trvá většinou několik minut, nicméně v životním prostředí setrvávají až stovky let. Přitom lze toto znehodnocování přírody omezit, ne-li zastavit úplně, pomocí snížení výroby a použití rezistentních syntetických plastů a/nebo nahrazením těchto materiálů ekologicky šetrnějšími alternativami. Vhodných materiálů je hned několik. Například klasická plastová brčka lze nahradit brčky z nerezové oceli, bambusové, rýžové či obilné slámy. Také plastové vatové tyčinky, kterých se ročně vyrobí v řádu stovek miliard kousků a které často končí v oceánech, lze nahradit ekologičtější variantou bambusových či papírových tyčinek nebo tyčinkami na více použití vyrobených ze silikonu. Téměř každý plastový výrobek na jedno použití má svoji ekologičtější variantu.

Ovšem plasty lze nahradit i jinými polymery, které mají podobné mechanické či fyzikální vlastnosti, ale jsou v přírodě rozložitelné a kompostovatelné. Jedná se o přírodní polymery. Mezi tyto alternativy k petrochemicky vyráběným polymerům patří také polyhydroxyalkanoáty (PHA). Jedná se o mikrobiální polyestery, které jsou plně biodegradabilní. Jsou produkovány širokým spektrem bakterií, kterým PHA slouží jako zásobní zdroj uhlíku a energie. Nicméně díky svým vlastnostem mohou být biotechnologicky vyrobené PHA slibnou alternativu k syntetickým polymerům, která má široké uplatnění v řadě odvětví. Své uplatnění nachází jednak jako obalový materiál, který je vhodný i pro potravinářské účely, ale především v medicíně, farmacii či kosmetickém průmyslu.

Nicméně produkce PHA je omezena konkurenceschopností výrobního procesu. Cenu produktu ovlivňuje mnoho parametrů. Mezi hlavní z nich patří náročnost na sterilitu biotechnologického procesu, cena zdroje uhlíku či produktivita daného použitého bakteriálního kmene. Jednou ze strategií, jak snížit cenu procesu, je použití levných uhlíkatých substrátů. Většinou se jedná o odpadní substráty z některého z agropotravinářského komplexu. Možností je opravdu mnoho a stačí jen nalézt vhodnou variantu pro daný proces. Jako substráty lze například využít odpadní rostlinné oleje, odpadní glycerol, syrovátku, melasu, ale i odpadní slámu či stébla kukuřice, otruby nebo kávovou sedlinu. Dalším důležitým parametrem je také použitý mikroorganismus, jeho produktivita, kultivační podmínky a metabolické nároky.

Mikroorganismy se k produkci používají již celá tisíciletí, ať už se jedná o výrobu ethanolu, chleba či o produkci důležitých enzymů a dalších metabolických látek. Avšak kromě běžně „dostupných“ kultur, které se často používají pro biotechnologické procesy, se v poslední době dostaly do středu zájmu také extrémofilní mikroorganismy. Díky svým unikátním schopnostem jsou schopny nejen přežít, ale také růst a prosperovat v extrémních podmínkách. Díky tomu

mikroskopický život najdeme po celé planetě, v mořských termálních průduších, ve slaných jezerech, permafrostu, na poušti či v kyselých sopečných jezírkách. Jejich unikátní strategie přežití v těchto podmínkách lze biotechnologicky využít. Jejich enzymy snášejí vyšší teploty, eventuelně nízké či vysoké hodnoty pH, což umožňuje jejich širší aplikační využití. Také poskytují mnoho nových a neprozkoumaných možností.

Z hlediska biotechnologického procesu ovšem přinášejí ještě jednu nespornou výhodu, a tím je snížení nákladů na sterilitu procesu. Díky tomu, že prosperují v extrémních podmínkách, nejsou procesy založené na extrémofilech ohroženy běžnou kontaminací, která v těchto podmínkách nemá šanci přežít. Proto je možné vést biotechnologické procesy v semi-sterilních nebo dokonce v nesterilních podmínkách.

Přesto však nejsou extrémofily, především v kontextu produkce PHA, dostatečně prozkoumány. Proto se tato práce zaměřuje na studium produkce PHA pomocí vybraných sbírkových halofilních mikroorganismů, ale také na izolaci termofilních producentů PHA z přírodních konsorcií.

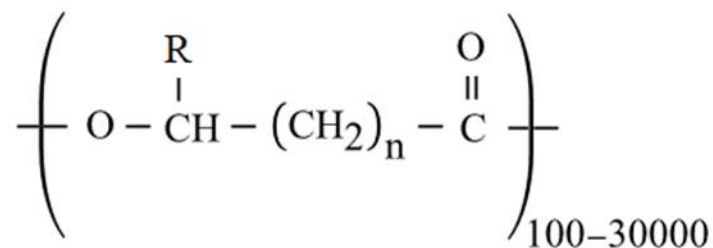
Spojení extrémofilních mikroorganismů a PHA přináší řadu výhod, které by mohly časem vést k nižšímu znečištění naší planety.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou biodegradabilní a biokompatibilní polymery, které jsou syntetizovány ve formě intracelulárních granulí širokým spektrem bakterií a některými zástupci archea [1; 2]. Mikroorganismům granule PHA slouží jako zásobní zdroj uhlíku a energie a také navyšují robustnost bakteriálních buněk vůči řadě stresových faktorů [3]. PHA nezatěžují životní prostředí, navíc je lze považovat za alternativu k některým plastům vyráběných z ropy, protože mají vhodné chemické i fyzikální vlastnosti. Další výhodou PHA je výroba z obnovitelných, případně i odpadních surovin nebo vedlejších produktů. PHA lze využít na výrobu nádob, lahví a jiných obalů [4]. Díky jejich biologické rozložitelnosti je lze použít také v medicíně jako vstřebatelné chirurgické nitě či ve farmaceutickém průmyslu jako nosiče aktivních látek nebo hormonů v léčivech [5]. Právě biodegradabilita je jejich největší výhodou, která by mohla snížit znečištění a akumulaci odpadů vyrobených z nerozložitelných plastů [6].

Dnes známe asi 150 různých typů monomerů, které mohou být inkorporovány do struktury PHA [7]. Z chemického hlediska se jedná o lineární polyestery hydroxykyselin (Obrázek 1). PHA můžeme rozdělit podle počtu uhlíku v monomerní jednotce. První skupinou jsou takzvané scl-PHA (short chain length) neboli PHA s krátkým řetězcem, které mají v monomeru 3 až 5 uhlíků a jedním ze zástupců je například poly(3-hydroxybutyrát), který je nejvíce rozšířeným a nejznámějším zástupcem z PHA polymerů. Druhá skupina PHA obsahuje v monomerní jednotce 6 až 14 uhlíků v monomeru a nazývá se mcl-PHA (medium chain length) neboli PHA se středně dlouhým řetězcem, mezi zástupce této skupiny patří například homopolymery poly(3-hydroxyhexanoát), poly(3-hydroxyoktanoát) a heteropolymer poly(3-hydroxyhexanoát-co-3-hydroxyoktanoát) [8]. Obě skupiny se liší svými vlastnostmi. Scl-PHA mají obecně vysoký stupeň krystalinity, a tudíž jsou tuhé a křehké, zatímco mcl-PHA mají nízký stupeň krystalinity a jedná se o elastické materiály. Liší se také teplotou tání, která je obecně u mcl-PHA výrazně nižší než u scl-PHA. Obecně je vysoká teplota tání většiny scl-PHA považována za technologickou nevýhodu, protože teplotní okno pro tavení materiálu bez jeho degradace je velice úzké. Například homopolymer 3-hydroxybutyrátu má teplotu tání okolo 170 °C a jeho degradace začíná okolo 200 °C [9; 10]. Další skupinou jsou takzvané lcl-PHA, tedy polyhydroxyalkanoáty s dlouhým řetězcem. Monomer má více než 14 uhlíků, avšak tento typ je neobvyklý a málo prostudovaný [11].



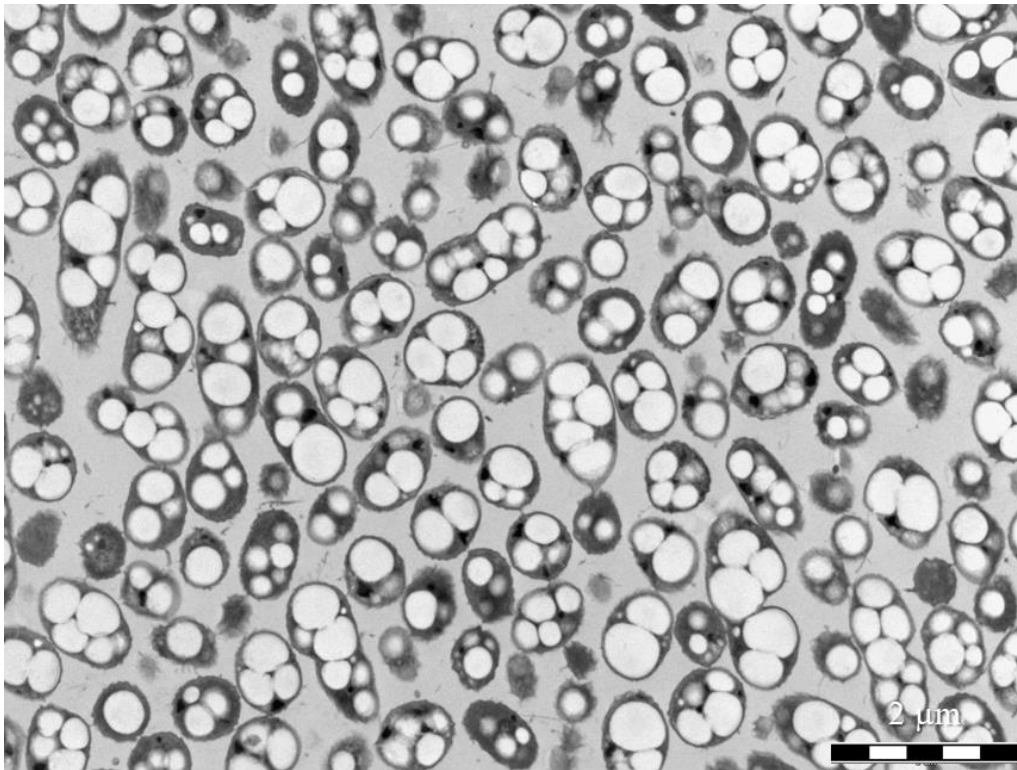
n=1	R= vodík	poly(3-hydroxypropionát)
	methyl	poly(3-hydroxybutyrát)
	ethyl	poly(3-hydroxyvalerát)
	propyl	poly(3-hydroxyhexanoát)
	pentyl	poly(3-hydroxyoktanoát)
	nonyl	poly(3-hydroxydodekanoát)
n=2	R= vodík	poly(4-hydroxybutyrát)
n=3	R= vodík	poly(5-hydroxyvalerát)

**Obrázek 1: Chemická struktura základních polyhydroxyalkanoátů, upraveno z [10]**

Polyhydroxyalkanoáty jsou opticky aktivní polyestery a všechny 3-hydroxyalkanové kyseliny jsou v konformaci *R* v důsledku stereospecifity polymeračního enzymu (PHA syntázy). Molekulová hmotnost polymeru se pohybuje v rozmezí 200 000 až 3 000 000 Da v závislosti na mikroorganismu, který PHA akumuluje a také na podmínkách jeho růstu [12].

PHA se vyskytují v bakteriích ve formě intracelulárních granulí (Obrázek 2), které mají obvykle 0,2 až 0,5 μm v průměru a nacházejí se v cytoplazmě [11]. Nativní granule PHA mají lipidovou povahu, a proto je lze barvit lipofilními barvivy jako je Súdánská čern B či Nílská červen [10; 13]. Je zajímavé, že nativní PHA granule v bakteriálních buňkách obsahují polymer v amorfní formě, která vykazuje vysokou flexibilitu, a svými vlastnostmi připomíná podchlazenou kapalinu. Poté co je ochranná vrstva nativních granulí poškozena (například při izolaci polymeru z bakteriálních buněk) dochází k rychlé krystalizaci polymeru [14].



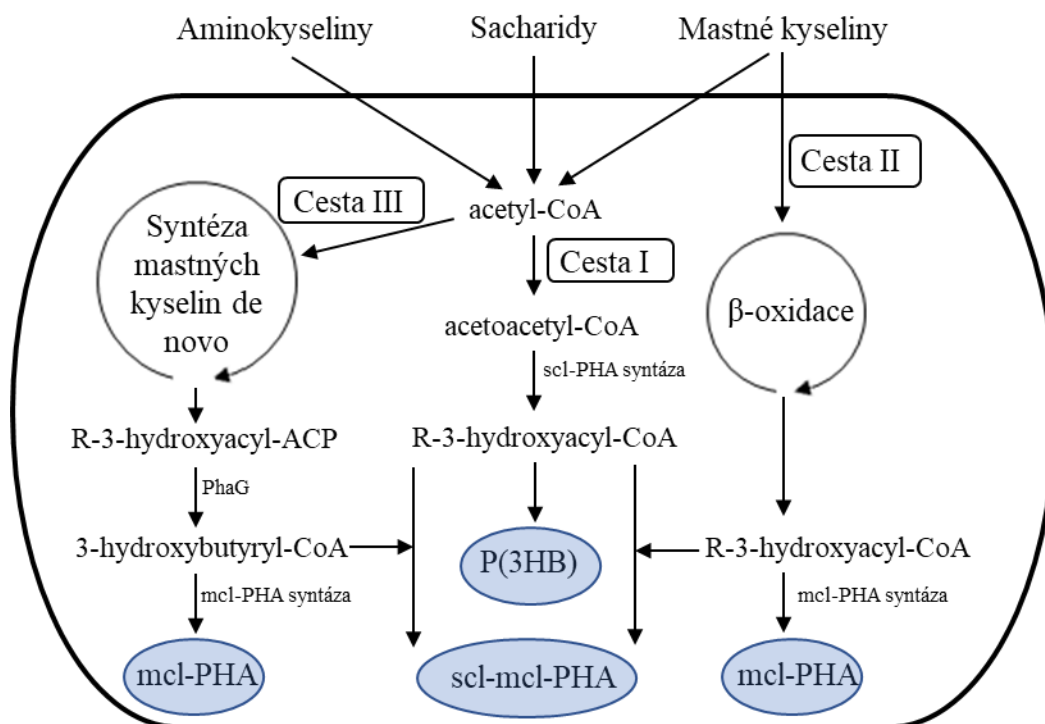


**Obrázek 2: Snímek bakterie *Cupriavidus necator* H16 CCM 3726 obsahující granule PHA z transmisního elektronového mikroskopu**

### **2.1.1. Syntéza PHA**

Bakterie, které syntetizují PHA, lze rozdělit do dvou skupin na základě podmínek pro syntézu. První skupina vyžaduje omezení živin, například fosforu, dusíku, hořčíku nebo kyslíku a nadbytek uhlíku. Bakterie patřící do této skupiny PHA hromadí až ve stacionární fázi růstu. Druhou skupinu bakterií tvoří druhy, které jsou schopny produkce PHA i během růstové fáze a nevyžadují žádnou limitaci živinami [2].

Struktura PHA, které se hromadí v bakteriálních buňkách, závisí také na zdrojích uhlíků, které daná bakterie využívá. Zdroje uhlíku mohou být různé. Například mastné kyseliny jsou strukturně podobné hydroxyalkanovým kyselinám a jsou nazývány příbuznými substráty. Je možné využít i substráty, které nemají podobnou strukturu jako PHA. Jedním z nich je například hojně využívaná glukóza. Pro syntézu PHA byly popsány tři hlavní mechanismy (Obrázek 3). Existuje však až 12 různých metabolických cest pro jejich syntézu [15; 16].



**Obrázek 3: Tři hlavní mechanismy biosyntézy PHA, upraveno z [16]**

První cesta vede od acetyl-CoA k poly(3-hydroxybutyrátu), zkráceně P(3HB), a jedná se o klasický případ syntézy scl-PHA. Dva acetyl-CoA generované ze sacharidů, mastných kyselin či aminokyselin jsou pomocí beta-ketothiolázy (PhaA) kondenzovány za vzniku acetoacetyl-CoA. Enzym acetoacetyl-CoA reduktáza (PhaB) redukuje acetoacetyl-CoA na (*R*)3-hydroxybutyryl-CoA. Nakonec dochází k polymeraci PHA syntázou (PhaC) za vzniku P(3HB) [16]. Tato cesta je charakteristická pro bakterie druhu *Cupriavidus necator* [13; 16; 17]. Tyto bakterie mohou hromadit P(3HB) až do 80 % hmotnosti vztažené na suchou hmotnost buněk, při nadbytku C zdroje a limitaci dusíku či fosforu [13; 18].

Přidáním vhodného prekurzoru do kultivačního média může vést syntéza PHA ke tvorbě kopolymerů. Při použití kyseliny propionové nebo valerové jako prekurzoru může docházet k produkci kopolymeru složeného z 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu (3HV). Přidání 4-hydroxybutyrátu nebo  $\gamma$ -butyrolaktonu do kultivačního média vede k syntéze odpovídajících thioesterů-CoA a jejich začlenění do PHA pomocí PHA syntázy [13].

Druhá cesta biosyntézy PHA využívá meziprodukty  $\beta$ -oxidačního cyklu a vede k syntéze mcl-PHA. Jako zdroj uhlíku jsou využívány mastné kyseliny. V  $\beta$ -oxidačním cyklu jsou mastné kyseliny převedeny na enoyl-CoA. Poté se enoyl-CoA transformuje pomocí enoyl-CoA hydratázou (PhaJ) na (*R*)3-hydroxyacyl-CoA, ten je dále polymerizován mcl-PHA syntázou na mcl-PHA. Tato biosyntetická dráha je charakteristická pro bakterie rodu *Pseudomonas* (*P. putida*, *P. oleovorans*, *P. aeruginosa*) nebo při tvorbě scl-PHA při růstu bakterií na lipidovém zdroji uhlíku [16; 17; 19].

Třetí cesta zahrnuje cyklus syntézy mastných kyselin *in situ*. Klíčovým enzymem je zde 3-hydroxyacyl-ACP-CoA transferáza (PhaG), která přeměňuje 3-hydroxyacyl-ACP na 3-hydroxyacyl-CoA, který je základem pro polymeraci pomocí mcl-PHA syntázy. Syntéza

mastných kyselin *in situ* a  $\beta$ -oxidační cyklus mohou být nezávisle regulovány a obě poskytují prekurzory pro syntézu PHA [16; 20; 21].

### 2.1.2. Přehled enzymů a genů vztahujících se k metabolismu PHA

Do metabolismu PHA se zapojuje velké množství enzymů. Enzymy podílející se v metabolismu PHA jsou označovány zkratkou PHA. Geny kódující enzymy zapojené do syntézy jsou pojmenovány v abecedním pořadí (*phaA*, *phaB*, ...). Zato enzymy podílející se na degradaci PHA jsou pojmenovávány od konce abecedy (*phaZ*) [22]. Přehled základních enzymů a přírodních genů účastnících se biosyntézy nebo degradace PHA je zobrazen v tabulce 1.

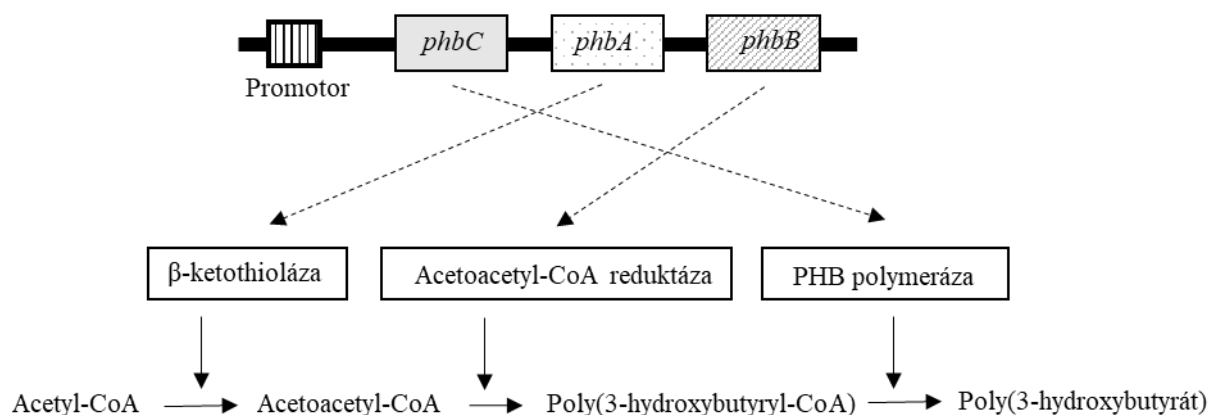
**Tabulka 1: Přehled některých vybraných genů [23; 24]**

Název genu	Kódovaný enzym	Funkce enzymu
<i>phaA</i>	$\beta$ -ketothioláza	kondenzace acetyl-CoA za vzniku acetoacetyl-CoA
<i>phaB</i>	acetoacetyl-CoA reduktáza	redukce acetoacetyl-CoA na ( <i>R</i> )-3-hydroxybutyryl-CoA
<i>phaC</i>	PHA syntáza	polymerizace hydroxykyselin za vzniku PHA
<i>phaG</i>	( <i>R</i> )-3-hydroxyacyl-ACP-CoA transferáza	transformace 3-hydroxyacyl-ACP na 3-hydroxyacyl-CoA
<i>phaJ</i>	enoyl-CoA hydratáza	transformace enoyl-CoA na ( <i>R</i> )-3-hydroxyacyl-CoA
<i>phaM</i>	aktivátor a urychlovač katalytické aktivity	aktivátor a urychlovač katalytické aktivity
<i>phaP</i>	phasiny, proteiny sestavující granule	proteiny sestavující granule
<i>phaZ</i>	PHA depolymeráza	depolymerační enzym

Kromě základních enzymů podílejících se na biosyntéze PHA (*PhaA*, *PhaB*, *PhaC*) jsou dalšími důležitými proteiny phasiny *PhaP*, které se zapojují do morfologie intercelulárních granulí PHA v cytosolu, díky svým amfifilním vlastnostem se sorbují na povrch PHA granulí a představují mezifázi mezi hydrofobním polymerem a vodou obsaženou v cytoplazmě [25; 26]. Protein *PhaF* se nejspíše podílí na regulaci exprese genů související s tvorbou mcl-PHA [27]. Jako přírodní aktivátor P(3HB) syntázy funguje také protein *PhaM* například v bakterii *Cupriavidus necator* [28]. Protein *PhaD* není ještě plně prozkoumáný, ale účastní se produkce mcl-PHA v bakteriích [29].

V bakterii *Cupriavidus necator* jsou geny pro syntézu PHA organizovány v *phbCAB* operonu (Obrázek 4). Syntézy scl-PHA se účastní tři enzymy kódované geny *phaA*, *phaB*

a *phaC* [22; 30; 31]. Toto uspořádání se však nachází i u jiných bakterií se stejnou strategií akumulace PHA [17]. Druhá třída PHA syntázy obsahuje dva geny *phaC* (*phaC1* a *phaC2*), které jsou odděleny *phaZ* genem kódující PHA depolymerázu. Také se zde nacházejí geny kódující proteiny zodpovědné za regulaci PHA metabolismu (např. *phaD*) [32].



Obrázek 4: Schéma CAB operonu a biosynetické dráhy scl-PHA, upraveno z [31]

### 2.1.2.1 PHA syntázy

PHA syntázy (PhaC) jsou klíčové enzymy při syntéze polyhydroxyalkanoátů. Zprostředkovávají polykondenzaci hydroxyalkanových monomerů do polymeru. PHA syntázy se mohou dělit na základě jejich podjednotkové kompozice, substrátové specifity, primární struktury a na základě kinetiky a mechanismu katalýzy do čtyř tříd [24].

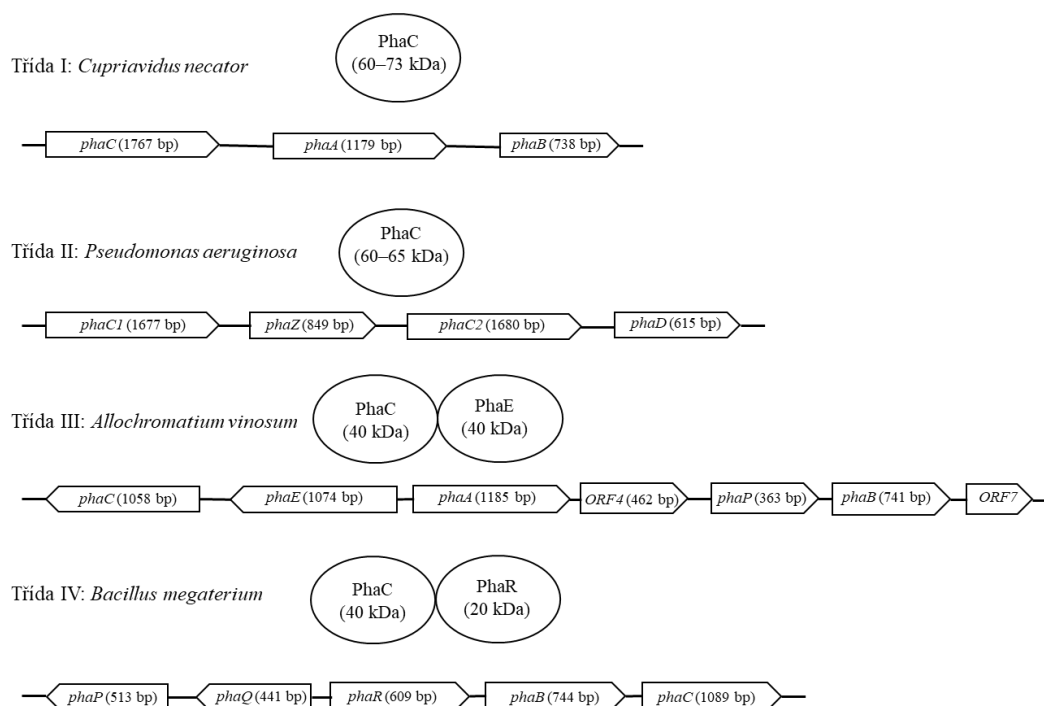
PHA syntázy první třídy jsou reprezentovány charakteristickou PHA syntázou modelové bakterie *Cupriavidus necator* (dříve známá také jako *Ralstonia eutropha*, *Wautersia eutropha* a *Alcaligenes eutrophus*). Tato třída enzymů má pouze jednu podjednotku, avšak je katalyticky aktivnější ve formě dimeru. Jedna podjednotka má molekulovou hmotnost od 60 do 73 kDa a je specifická pro biosyntézu scl-PHA. Z toho důvodu jsou jeho cílovým monomerem 3–5 uhlíku dlouhé 3-, 4- nebo 5-hydroxyalkanoáty. Nicméně i některé PHA syntázy třídy I mohou katalyzovat inkorporaci 3-hydroxyhexanoátu do struktury polymeru (např. *Rhodospirillum rubrum* či *Aeromonas caviae*) [13; 32].

PHA syntázy třídy II také obsahují jednu podjednotku o velikosti 60–65 kDa (kódovaná geny *phaC1*, *phaC2*), která polymeruje monomery za vzniku mcl-PHA. Tento typ PHA syntázy je charakteristický pro bakterie rodu *Pseudomonas* (např. *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas oleovorans*) [13; 22; 30; 33].

Enzymy třídy III jsou tvořeny dvěma podjednotkami (podjednotka C = PhaC a podjednotka E = PhaE) o molekulové hmotnosti přibližně 40 kDa. Podjednotka PhaC má podobné aminokyselinové složení jako PHA syntázy třídy I a II. PhaE nevykazuje žádnou sekvenční podobnost s ostatními PHA syntázami. Touto třídou enzymů jsou tvořeny polyhydroxyalkanoáty o velikosti 3 až 5 uhlíků (scl-PHA). Třetí třída byla objevena u halofilní bakterie *Allochromatium vinosum*, vyskytuje se však také u sinic či halofilních archeí jako jsou například archea rodu *Haloferax* či *Haloarcula* [23; 30; 32].

PHA syntázy třídy IV jsou charakteristické pro kmeny *Bacillus* sp. a tvoří je dvě různé podjednotky PhaC a PhaR. Liší se i molekulárními hmotnostmi, kdy PhaC podjednotka má 40 kDa, zatím co PhaR je poloviční (20 kDa). PHA syntázy čtvrté třídy jsou velmi rozmanité a lze je rozdělit do několika podskupin. Nejčastěji dochází k syntéze PHA s krátkým řetězcem [16; 23; 32; 34].

Všechny PHA syntázy mají konzervovaný cystein, který slouží jako katalyticky aktivní místo, kde je kovalentně připojen rostoucí řetězec PHA. Katalytickou triádu kromě cysteinu tvoří také histidin a kyselina asparagová. Tato triáda je podobná triádám esteráz. Aminokyselinové sekvence PHA syntázy v porovnání se sekvencemi esteráz ukazují, že PHA syntázy mají podobné složení jako  $\alpha/\beta$  hydrolázy [26]. Klastř PHA syntáz pro jednotlivé třídy je zobrazen na obrázku 5 pomocí známých představitelů dané třídy.



**Obrázek 5: Organizace genů zapojených do přímé syntézy PHA a rozdělení PHA syntázy napříč jednotlivými třídami, upraveno z [32]**

## 2.2. Způsoby identifikace PHA u bakterií

Při hledání nových producentů PHA, což byla jedna z klíčových aktivit této disertační práce, je důležitá identifikace PHA pozitivních buněk nebo kolonií, převážně pak ve směsných bakteriálních kulturách a konsorciích. Důležitým faktorem je potom rychlá a snadná identifikace dané kolonie, která produkuje PHA. Existuje několik způsobů identifikace PHA přímo v buňce bakterie bez nutnosti extrakce polymeru z bakteriální biomasy [24].

### 2.2.1. Lipofilní barviva

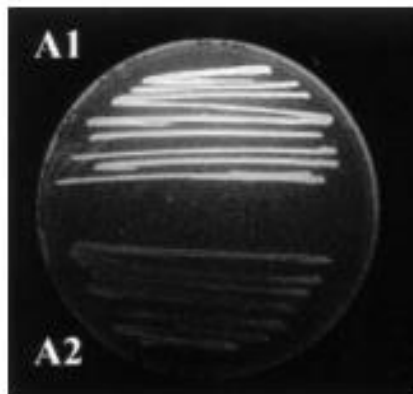
Polyhydroxyalkanoáty mají lipofilní charakter, proto jsou vhodné pro barvení lipofilními barvivy. Mezi nejpoužívanější barviva pro selektivní barvení PHA granulí patří Nilská červeň, Nilská modř A a Súdánská čern B [35].

Nilská modř A je bazické oxazinové barvivo rozpustné ve vodě a ethanolu. Jeho oxazonová forma (Nilská růžová – Nile pink) se tvoří spontánní oxidací ve vodném prostředí nebo refluxováním ve zředěné kyselině sírové. Vzniklá Nilská růžová je rozpustná v tekutých neutrálních tucích při teplotě barvení [36]. Pro barvení buněk se používá 1% roztok Nilské modři A a tepelně fixovaný preparát. K excitaci poté dochází při vlnové délce 460 nm [35; 36].

Súdánská čern B je lipofilní barvivo, které je rozpustné v organických rozpouštědlech, jako je například ethanol [8]. Pro barvení PHA inkluzí se používá tepelně fixovaný preparát, který je následně obarven a pozorován pod mikroskopem [35; 37; 38].

U směsných bakteriálních kultur lze za pomoci barvení intracelulárních lipidických inkluzí pomocí Nilské modři A či Súdánské černi B sledovat distribuci PHA ve vzorcích. Pomocí kvantitativní analýzy obrazů speciálně vyvinuté pro identifikaci a izolaci bakterií produkujících PHA pomocí světelné či fluorescenční mikroskopie lze rychle a snadno rozlišit PHA produkující bakterie od neprodukcujících [35].

Velmi často využívaným lipofilním barvivem je také Nilská červeň (Nile red). Je rozpustná v organických rozpouštědlech, nejčastěji se používá ethanol nebo dimetylsulfoxid (DMSO). Jedná se o oxazonovou formu se silnou oranžovou fluorescencí při buzení max. 543 nm při vazbě na PHA v buňkách [37]. Při barvení Nilskou červení lze barvu přidávat rovnou do agarem ztuženého kultivačního média (Obrázek 6) a to v koncentraci 0,5 µg barviva na ml média. Tento způsob identifikace PHA produkujících bakterií je snadný a rychlý. Miska s narostlou kulturou se osvíjí UV lampou a lze vybrat kolonie, které jsou pozitivní na PHA a tím je oddělit od neprodukcujících bakterií ve směsných kulturách [37; 38].



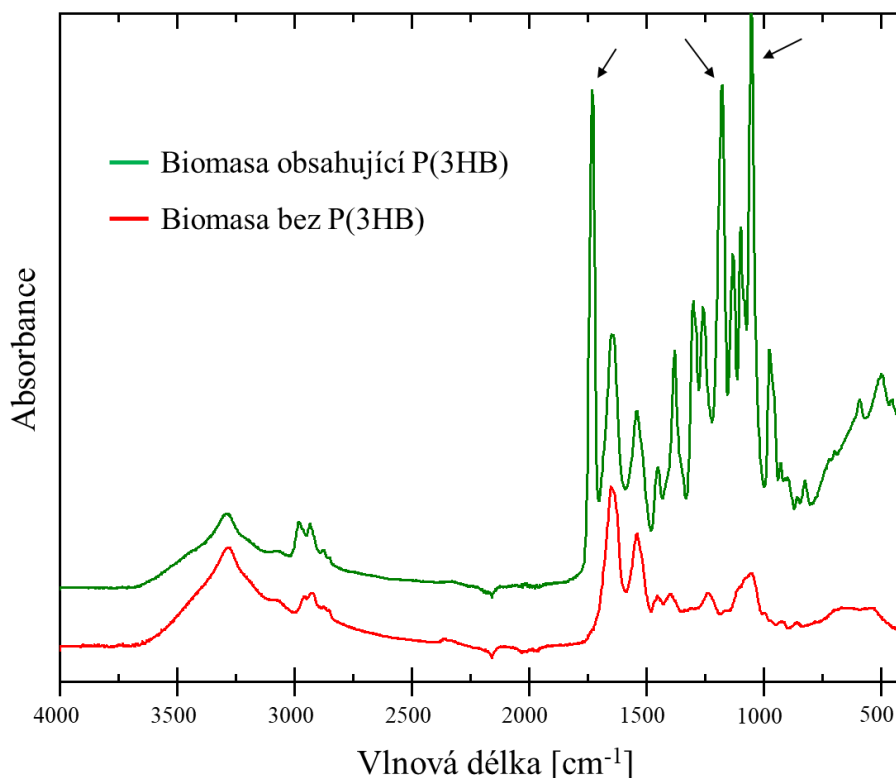
**Obrázek 6: Černobílý snímek kultury obarvené nilskou červení, na kterém je pozorovatelné srovnání identifikace kultury obsahující PHA. A1 – *Cupriavidus necator* H16 produkující PHA; A2 – *Cupriavidus necator* PHB<sup>4</sup> neprodukující PHA [37]**

### 2.2.2. Infračervená spektrometrie

Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR) je rychlá metoda sloužící k identifikaci a případně také kvantifikaci PHA nejen ve směsných kulturách. Oproti klasickému stanovení PHA pomocí plynové chromatografie se jedná o rychlou metodu. Mezi její další výhody patří malé množství vzorku či absence jakýchkoli rozpouštědel [39]. Avšak její nevýhodou je citlivost metody k vodě, která vykazuje široký absorpční pás. Proto ve spektrech interferuje s řadou látek včetně PHA. Z toho důvodu je nutné vzorek před analýzou vysušit a tím dojde i k usmrcení bakterií.

FTIR se zabývá studiem molekulární struktury a jedná se o měření infračerveného (IR) záření absorbované vzorkem. Pokud je IR záření absorbováno vzorkem, dojde k přechodu mezi vibračními energetickými stavy chemických vazeb v molekule. Tyto vibrační energie jsou specifické pro chemické vazby, výsledná spektra poskytují informace o funkčních skupinách a chemické struktuře sloučenin ve vzorku [40].

Při analýze PHA dochází k intenzivnímu vstřebávání v pásech okolo  $1724\text{ cm}^{-1}$ , kde dochází k absorpci C=O skupinami, které jsou pro PHA charakteristické. Doprovodné pásy jsou umístěny v blízkosti  $1280$  a  $1165\text{ cm}^{-1}$ , kde se jedná o esterové vazby [41]. Porovnání spekter bakteriální biomasy, ve které je nebo není přítomen polyester P(3HB), je zobrazeno na obrázku 7. Černé šipky ukazují na charakteristické pásy pro identifikaci PHA v bakteriální biomase.



**Obrázek 7: Porovnání spekter bakteriální biomasy naměřené pomocí FTIR.** Zelená linka ukazuje spektrum bakteriální biomasy obsahující P(3HB), červená pak spektrum pro bakteriální biomasu bez P(3HB). Černé šipky ukazují na charakteristické pásy pro stanovení PHA v bakteriální biomase.

### 2.2.3. Ramanova spektrometrie

Také Ramanova spektrometrie slouží ke studii molekulárních struktur a poskytuje informace o funkčních skupinách v molekule vzorku. Tato technika je založena na nepružném rozptylu dopadajícího záření prostřednictvím interakce s vibračními molekulami. Vzorek je osvětlen monochromatickým laserovým paprskem, ten interaguje s molekulami vzorku. Ramanovské spektrum je potom vyjádřeno jako změna intenzity v závislosti na vlnové délce, nejčastěji v rozmezí 4000–10 cm<sup>-1</sup> [42].

Stejně jako FTIR je tato metoda rychlá, neinvazivní a lze ji použít ke sledování v bioreaktorech online. Ramanova spektrometrie nevyžaduje dlouhou přípravu a na rozdíl od FTIR není potřeba zbavovat se vody, protože nedochází k její interferenci. Proto lze PHA stanovit přímo v koloniích na Petriho miskách, kdy charakteristický pás pro P(3HB) je okolo 1736 cm<sup>-1</sup>. Z Ramanova spektra lze také vyčíst informace o krystalinitě daného polymeru a je možné ji také využít jako rychlý nástroj pro stanovení obsahu PHA v bakteriální biomase [43]. S využitím Ramanovské pinzety je možné provést analýzu na úrovni jedné buňky, a dokonce s jednotlivými buňkami manipulovat a dále je sortovat. Principiálně se tak jedná o velice zajímavý přístup k současné identifikaci a izolaci PHA produkujících buněk ze směsných mikrobiálních kultur [44].



## 2.2.4. Molekulární techniky

Pomocí molekulárních technik lze zjistit na úrovni genotypu, zda daný mikroorganismus má potenciál produkovat PHA. Neberou však v potaz, zda je daný gen aktivní či nikoli nebo v jakém množství a za jakých kultivačních podmínek bude PHA syntetizováno. Pomocí molekulárních technik se nejčastěji stanovují či hledají geny kódující klíčové enzymy biosyntézy PHA, především pak PHA syntázy. Kvantifikace exprese genů zapojených do biosyntézy PHA lze realizovat pomocí polymerázové řetězové reakce s reverzní transkripcí (RT-qPCR) [45].

### 2.2.4.1 Southernův přenos

Southernův přenos je jedna z prvních molekulárních technik, která byla použita pro identifikaci PHA genů, kdy její princip spočívá v detekci specifických molekul DNA ze směsi DNA [46]. Celý experimentální protokol zahrnuje použití restričních enzymů, následné gelové elektroforézy, přenos fragmentů na blotovací membránu (Southernův přenos – anglicky blotting) a následnou hybridizaci pomocí sond, díky kterým dochází k detekci hledaných fragmentů DNA [47].

Timm a kolektiv už v roce 1994 navrhli specifickou obecnou sondu *pha* genů na základě bakterií *Cupriavidus necator* a *Pseudomonas oleovorans* a metodu Southernova přenosu využili pro hledání stejných sekvencí u různých mikroorganismů. Avšak prokázali, že je vhodná pouze pro producenty s PHA syntázou třídy I a II, ale není schopna detekce *pha* genů syntáz tříd III a IV [48].

### 2.2.4.2 FISH

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je molekulární technika používaná pro detekci genového uspořádání, oblastí delece a amplifikace chromozomů či numerických chromozomálních abnormalit. Tato metoda využívá fluorescenčně značené DNA sondy a následnou fluorescenční mikroskopii [49].

Kromě toho, že touto metodou lze identifikovat taxonomické skupiny ve smíšených kulturách, lze ji také použít pro identifikaci *pha* genů. Jedná se o metodu využívající kombinaci metody FISH a dvojitého barvení PHA a polyfosfátu pomocí methylenové modři či barvivem DAPI-polyfosfát. Ke dvojitému barvení lze navíc použít ještě sekvenční barvení PHA granulí Súdánskou černí [45].

### 2.2.4.3 PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je jednoduchá metoda, která umožňuje amplifikaci a následnou detekci specifického fragmentu DNA [50]. Proto je tato metoda hojně využívána při identifikaci PHA produkujících bakterií. Používá se k prvotnímu screeningu a také je vhodná v případech, kdy je detekce jinými technikami obtížná, například kvůli akumulaci PHA v malém množství či daný mikroorganismus nemá vhodné podmínky pro produkci PHA [51].

Pro PCR analýzu jsou klíčové použité primery, krátké specifické oligonukleotidy. V literatuře je možné nalézt celou řadu sad primerů vhodných k identifikaci *phaC* genů,

nicméně celou skutečnost komplikuje heterogenita *phaC* genů. V tabulce 2 je uveden přehled primerů umožňujících detekci genů kódujících PHA syntázy u různých mikroorganismů. Je však nutno poznamenat, že použití PCR může vést k falešně negativním výsledkům (bakterie disponuje genetickým potenciálem pro syntézu PHA, ale použitá sada primerů jej není schopna identifikovat), ale také k falešně pozitivním výsledkům (je detekován příslušný gen, avšak daný mikroorganismus není schopen produkce PHA) [45].

**Tabulka 2: Přehled vybraných primerů pro detekci PHA syntáz**

<b>Třída</b>	<b>Gen</b>	<b>Název primeru</b>	<b>Sekvence primeru</b>	<b>Velikost amplikonu</b>	<b>Příklad použití</b>	<b>Zdroj</b>
<b>I+II</b>	<i>phaC</i>	G1-R	5'GTGCCGCC(GC)(CT)(AG)(GC) ATCAACAAGT3'	551 bp	potvrzení schopnosti produkovat PHA na úrovni genotypu po předchozím fenotypovém (barvením Súdánskou černí) stanovení u řady bakterií (např. <i>Azospirillum brasilense</i> ATCC 29710, <i>Azotobacter chroococcum</i> IBUN 88, <i>Pseudomonas fluorescens</i> IBUN 91...)	[52]
		G-D	5'GTTCCAG(AT)ACAG(GC)A(G T)(AG)TCGAA3'			
	<i>phaC</i>	CF1	5'ATCAACAA(AG)T(AT)CTAC( AG)TC(CT)T(CG)GACCT3'	500 bp	identifikace PHA syntáz z metagenomu mořských bakterií izolovaných z mořské houby <i>Aaptos aaptos</i>	[53]
		CR4	5'AGGTAGTTGT(CT)GAC(CG)( AC)(AC)(AG)TAG(GT)TCCA3'			
<b>II</b>	<i>phaC</i>	phaCF2	5'GT(CCC/GG)TTC(GGG/AA)T( GGG/CC)(AAA/GG)T(CC/G)(TT/ A)(CCC/GG)CTGGCGCAACCC3 ,	496 bp	pro screening PHA producentů izolovaných z přírodních vzorků, u potvrzených producentů na základě genotypu byla jejich produkce také podrobena fenotypovým testům	[54]
phaCR4		5'AGGTAGTTGT(TT/C)GAC(CC C/GG)(AAA/CC)(AAA/CC)(GGG/ A)TAG (TTT/G)TCCA3'				

Třída	Gen	Název primeru	Sekvence primeru	Velikost amplikonu	Příklad použití	Zdroj
II	phaC1	E1-D	5'GGAGCGTCGTAGATGAGTA ACAAGAA3'	1965 bp	potvrzení schopnosti produkovat PHA na úrovni genotypu po předchozím fenotypovém (barvením Súdánskou černí) stanovení u řady bakterií (např. <i>Azospirillum brasilense</i> ATCC 29710, <i>Azotobacter chroococcum</i> IBUN 88, <i>Pseudomonas fluorescens</i> IBUN 91...)	[52]
		E1R	5'AGGTTGGCGCCGATGCCGTT GAA3'			
	phaC1 + C2	I-179L	5'ACAGATCAACAAGTTCTAC ATCTTCGAC3'	540 bp	pro rychlou genetickou charakterizaci PHA syntáz, pro obecný screening mikroorganismů, pro identifikaci mcl-PHA producentů, například <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> HBQ06, <i>Pseudomonas nitroreducens</i> 0802	[51]
		I-179R	5'GGTGTTGTCGTTGTTCCAGT A GAGGATGTC3'			
III	phaC	Haphapcr1	5'GTTTTAATCGATTACGCNYT NGTNAAYMGNCNTAYATG3'	500–600 bp	pro rychlou genetickou charakterizaci PHA syntáz, pro obecný screening mikroorganismů, pro identifikaci PHA producentů třídy III, kam patří například sinice či síran redukující bakterie, <i>Allochromatium vinosum</i> , <i>Thiocystis violacea</i> a <i>Synechocystis</i> sp.	[51]
		Haphapcr2	5'CGGGACTATRAADATCCAY TTYTCCATNCKTAGAAAGTT3'			

Třída	Gen	Název primeru	Sekvence primeru	Velikost amplikonu	Příklad použití	Zdroj		
III	<i>phaC</i>	codehopCF	5'ACCGACGTCGTCTACAAGG ARAAYAARYT3'	280 bp	pro studium halofilních archeí schopných produkovat PHA, porovnání genů PHA syntáz v <i>Halobacteriaceae</i> , potvrzení genů <i>phaC</i> a <i>phaE</i> ve vybraných archeí například <i>Haloarcula amylolytica</i> 26-3, <i>Halorubrum xinjiangense</i> 25-13, <i>Halostagnicola larsenii</i> 24-25 a <i>Halorubrum litoreum</i> 12-2	[55]		
		codehopCR	5'GGTCGCGGACGACGTCNAC RCARTT3'					
	<i>phaE</i>	codehopEF	5'CGACCGAGTTCCGCGAYAT HTGGYT3'	230 bp				
		codehopER	5'GCGTGCTGGCGGCKYTCNA VYTC3'					
	<i>phaE</i>	PhaE3A-F	5'GAGTTCCGYGATATCTGG YT3'	224 bp			rychlá a efektivní metoda screenigu PHA produkujících haloarcheí, kultivačně nezávislá detekce <i>phaE</i> genu, například u archae <i>Haloquadratum walsbyi</i> DSM 16854 s pozitivním výsledkem, u bakterií <i>Bacillus megaterium</i> DSM 319 a <i>Cupriavidus necator</i> DSM 428 s negativním výsledkem	[56]
		PhaE3A-R	5'TGCTGACGACGCTCGASYTC 3'					

Třída	Gen	Název primeru	Sekvence primeru	Velikost amplikonu	Příklad použití	Zdroj
III	<i>phaC</i>	phaC (3.1) - F	5'GGGATGTCTATTTGATTGAY TGG3'	360 bp	detekce <i>phaC</i> genu u cyanobakterií, porovnání PCR analýzy s určením producentů na základě fenotypových testů, například <i>Plectonema</i> sp. UTEX 1541, <i>Spirulina platensis</i> UTEX LB2340, <i>Synechococcus leopoliensis</i> UTEX 2434, <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	[57]
		phaC (3.1) - R	5'GGTCGGGACTATCAAAAAT CCA3'			
IV	<i>phaC</i>	B1F	5'AACTCCTGGGCTTGAAGAC A3'	590 bp	pro rychlou genetickou charakterizaci PHA syntáz, pro obecný screening mikroorganismů, pro identifikaci PHA producentů třídy IV, detekce genů bakterií rodu <i>Bacillus</i> , např. <i>Bacillus megaterium</i>	[51]
		B1R	5'TCGCAATATGATCACGGCTA 3'			
		B2R	5'ACGGTCCACCAACGTTACAT 3'	380 bp		
	<i>phaC</i>	BmpaC01 5F	5'CGTGCAAGAGTGGGAAAAA T3'	900 bp		
BmpaC93 1R		5'TCGCAATATGATCACGGCTA 3'				

Třída	Gen	Název primeru	Sekvence primeru	Velikost ampikonu	Příklad použití	Zdroj
IV	<i>phaC</i>	PhaC-F	5'CTTGGTTAYTGCATGGGNGG AAC3'	500 bp	molekulární potvrzení PHA syntáz ve vybraných izolátech z termitů střevní mikroflóry, po identifikaci úseku 16S rRNA se jednalo například o bakterie <i>Bacillus aryabhatai</i> (KX951938), <i>Bacillus anthracis</i> (KX951940), <i>Bacillus cereus</i> (KX951943)	[58]
		PhaC-R	5'ACTTGRYRKGGCANDGCRA TRTGAT3'			
	<i>phaC</i>	phaCF	5'CACCATGACTACATTCGCAA CAGAATG3'	1000 bp	analýza genů podílejících se na produkci PHA a na celulolytické aktivitě u bakterie <i>Bacillus cereus</i> tsu1	[59]
		phaCR	5'ATTAGAACGCTCTTCAAGCC AA3'			

### 2.2.5. Další techniky pro stanovení PHA

Existuje mnoho dalších technik, kterými lze PHA detekovat případně i kvantifikovat. Jednou z nejvíce používaných technik pro kvantifikaci PHA je plynová chromatografie. Avšak tato metoda vyžaduje dlouhou přípravu vzorku a také není vhodná k identifikaci PHA produkujících bakterií ve směsných kulturách. Kromě plynové chromatografie lze na stanovení PHA použít také kapalinovou chromatografii [60].

Dalšími technikami jsou mikroskopické metody, například fluorescenční mikroskopie s fluorescenčními sondami jako jsou například Nilská červeň či boron-dipyromethen (BODIPY) 493/503, které spíše slouží ke kvalitativnímu vyhodnocení. PHA v buňkách lze také pozorovat pomocí elektronové mikroskopie, a to především pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) [45]. Komplementární technikou k fluorescenční mikroskopii je pak průtoková cytometrie, která často využívá stejné fluorescenční sondy jako mikroskopie, nicméně umožňuje současnou analýzu rozsáhlých buněčných populací při zachování single-cell úrovně analýzy. Také průtokovou cytometrii je možné využít jako zajímavý nástroj pro sledování biotechnologického procesu. Například García-Torreiro a kol. nedávno popsali využití průtokové cytometrie a barviva BODIPY 493/503 k monitoringu produkce PHA pomocí halofilní bakterie *Halomonas boliviensis*, přičemž průtoková cytometrie byla označena za vhodnější a přímočařejší analytickou techniku pro stanovení intracelulárního obsahu PHA než rutinní plynová chromatografie [61]. K obdobnému závěru došli Alves a kol., kteří vyvinuly průtokově cytometrickou techniku umožňující kvantifikaci intracelulárního obsahu PHA v buňkách do 5 minut od odběru vzorku [62].

### 2.2.6. Porovnání metod pro identifikaci akumulace PHA

Časová náročnost jednotlivých metod pro stanovení PHA (Obrázek 8) se liší. Ramanova spektrometrie patří mezi nejrychlejší metody stanovení, protože nevyžaduje žádnou složitou přípravu vzorku, stačí pouze narostlá kultura na misce [43]. FTIR je také velmi rychlá metoda, avšak je nutné vzorek vysušit, což jednak zvyšuje časovou náročnost metody, ale také dochází k inaktivaci buněk [41]. Lipofilní barvení patří mezi rychlé a snadné metody, ale může docházet k falešně pozitivním výsledkům například obarvením jiných intracelulárních lipofilních částí [35]. PCR jako jediná z metod uvedených na obrázku 8 stanovuje schopnost akumulovat na úrovni genotypu. Nicméně tato metoda je náchylná k chybám. Může docházet k nespecifickým amplifikacím nebo může docházet k falešně negativním výsledkům použitím nevhodných primerů. Také může nastat falešně pozitivní výsledek, kdy je detekován gen, ale daná bakterie přesto nedokáže PHA syntetizovat, například mutantní kmen *Cupriavidus necator* PHB<sup>-4</sup> není v důsledku bodové mutace schopen akumulovat PHA, nicméně dává pozitivní výsledek na přítomnost *phaC* genu. Proto by byla vhodná kombinace několika metod, ideálně metody stanovující akumulaci PHA na úrovni fenotypu a genotypu [45; 51]. Plynová chromatografie se nejčastěji používá ke kvantifikaci PHA a analýze monomerního složení polymeru. Tato metoda však vyžaduje delší přípravu vzorku [60], proto není vhodná pro prvotní detekci při hledání nového producenta PHA.





**Obrázek 8: Časová náročnost určitých metod pro detekci PHA**, RS – Ramanova spektrometrie, FTIR – Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací, barvení – barvení PHA pomocí lipofilních barviv, PCR – polymerázová řetězová reakce, GC – plynová chromatografie

### 2.3. Extrémofilní mikroorganismy

Extrémofilní mikroorganismy jsou organismy, které žijí v extrémních podmínkách prostředí. Jedná se o horké prameny, sopečné povrchy, podmořské průduchy, zasolená jezera či půdy a podobně. Některé mikroorganismy jsou dokonce schopny snášet více těchto extrémů, potom o nich hovoříme jako o polyextrémofilních mikroorganismech. Extrémní podmínky mohou mít různý charakter, může jednat o fyzikální, chemické či například biologické extrémy. Mezi fyzikální extrémy řadíme vysokou či nízkou teplotu, tlak, který je jiný než atmosférický (průměr atmosférického tlaku 101,3 kPa), nebo přítomnost záření. Nízké či vysoké pH, různá škála salinity či malá aktivita vody se řadí mezi chemické extrémy. Jako biologické extrémy jsou označovány výživové extrémní podmínky. Podle jednotlivého extrému, ve kterém daný mikroorganismus žije, můžeme extrémofilní mikroorganismy rozdělit do skupin [63–65]. Rozdělení extrémofilních mikroorganismů zobrazuje tabulka 3.

**Tabulka 3: Rozdělení extrémofilních mikroorganismů [63–65]**

Extrémní podmínky	Označení	Optimum	Příklad
Teplota	hypertermofilní	> 80 °C	<i>Pyrolobus fumarii</i> (113 °C)
	termofilní	45/55/60 až 80 °C	<i>Synechococcus lividis</i>
	psychrofilní	<15 °C	rod <i>Micrococcus</i>
Salinita	halofilní	2–5 M NaCl	rod <i>Halomonas</i>
pH	alkalifilní	> 9	rod <i>Spirulina</i>
	acidofilní	<2–3	<i>Cyanidium caldarium</i>

<b>Extrémní podmínky</b>	<b>Označení</b>	<b>Optimum</b>	<b>Příklad</b>
<b>Tlak</b>	piezofilní/ barofilní	> 0,1 MPa	<i>Shewanella benthica</i>
<b>Vysušení</b>	xerofilní	bezvodé	<i>Artemia salina</i>
<b>Chemické extrémny</b>	kapnofilní	čistý CO <sub>2</sub>	<i>Cyanidium caldarium</i>
	metalofilní	(Zn, Co, Cd, Hg, Pb)	rody <i>Ralstonia</i> , <i>Cupriavidus</i>
<b>Radiace</b>	radiorezistentní		<i>Deinococcus radiodurans</i>

Extrémofilní mikroorganismy mají široké využití. Nejčastěji se používají k produkci enzymů – extrémozymů, které mají požadované vlastnosti a stabilitu i při vysoké teplotě či velmi nízkém pH apod. Například použití termostabilní DNA polymerázy z bakterie *Thermus aquaticus* umožnilo rozvoj polymerázové řetězové reakce a molekulárních technologií [63]. Další biotechnologické využití extrémofilů znázorňuje tabulka 4.

Použití extrémofilů má také výhody s ohledem na samotný biotechnologický proces. Díky extrémním podmínkám kultivace se snižuje riziko kontaminace mezofilními kmeny a nároky na sterilizaci systémů, což má pozitivní dopad na snížení nákladů výroby. Vzhledem ke sníženému riziku kontaminace je možné využít výhodné kontinuální nebo semi-kontinuální kultivační strategie [63–65]. Při biotechnologickém využití termofilů se navíc snižují náklady na chlazení a jejich vyšší teplota kultivace pozitivně ovlivňuje rozpustnost produktů a substrátu. Při použití termofilů například k výrobě ethanolu, se snižují náklady na získávání produktu, protože již při kultivaci okolo 70 °C dochází k těkání produktu, který je následně možné kontinuálně jímat v kondenzátorech. Výrazně se tak snižuje toxický efekt produktu během fermentace [66; 67]. Mezi extrémofilními organismy se také objevují producenti PHA. Největší potenciál produkce PHA extrémofilními mikroorganismy mají halofilní bakterie či archea nebo termofilní bakterie [68; 69].

Průmyslová biotechnologie příští generace (NGIB z anglického Next Generation Industrial Biotechnology) je založena na bioprodukcí s nižšími náklady a tím i vyšší konkurenceschopností. Snížení nákladů umožňuje právě použití extrémofilů, protože mimo jiné lze produkce provádět v otevřených nesterilních podmínkách. NGIB také zahrnuje snížení spotřeby pitné vody či energie, upřednostňuje kontinuální výrobní procesy a využívá levné odpadní zdroje uhlíku [15; 70].

**Tabulka 4: Přehled biotechnologických produktů extrémofilů [67; 68]**

<b>Extrémofilní mikroorganismy</b>	<b>Enzymy</b>	<b>Použití</b>	<b>Příklady komerčního použití</b>
<b>Termofilní</b>	<p>amylázy                      proteázy                      celulózy                      hemicelulózy                      chitinázy                      glykolytické enzymy                      DNA enzymy</p>	<p>v cukrovarnictví                      pro zpracování                      lignocelulóзовých                      materiálů                      v pracích a čistících                      detergentech                      v potravinářství                      v klinické diagnostice                      v molekulární biologii</p>	<p>Lipolasa 110 L –  <i>Thermomyces                      lanuginosus</i>                      Protex 14 L – <i>Bacillus                      thermoproteolyticus</i>,                      Novamyl – <i>Geobacillus                      stearothermophilus</i></p>
<b>Psychrofilní</b>	<p>proteázy                      lipázy                      dehydrogenázy                      mastných kyselin                      celulózy                      hemicelulózy</p>	<p>v sýrařství a mléčném                      průmyslu                      pro prací a čistící                      prostředky                      degradace                      lignocelulóзовých                      materiálů</p>	<p>Lipáza – <i>Candida                      antarctica</i>                      Novozym Kannase –  <i>Bacillus clausii</i>                      Celluzyme – <i>Humicola                      insolens</i></p>
<b>Halofilní</b>	<p><math>\beta</math>-karoten                      kompatibilní látky                      (ectoiny)</p>	<p>v potravinářství                      ve farmacii</p>	<p>ectoiny produkované  <i>Halomonas elongatou</i>                      a <i>Marinococcem</i> M52                      v kosmetologii –                      RonaCareEctoine™,                      MedaEctoineSyxyl™  <math>\beta</math>-karoten – <i>Dunaliella                      salina</i></p>
<b>Alkalofilní</b>	<p>proteázy                      lipázy                      celulózy</p>	<p>pro detergentní aditiva                      pro produkci                      cyklodextrinu</p>	<p>enzymy na výrobu                      cyklodextrinů –  <i>Bacillus</i> strain 38-2                      Puradax HA – <i>Bacillus</i>                      spp.                      INFIAGE™ Neutra –  <i>Streptomyces</i> spp.</p>

Extrémofilní mikroorganismy	Enzymy	Použití	Příklady komerčního použití
<b>Acidofilní</b>	oxidázy síry	pro bioloužení k odsíření uhlí v těžebním průmyslu	SPEZYME, Phytase 5000, Fructozym P 6-L – <i>Aspergillus kawachi</i> enzymy pro hydrolyzu škrobu – <i>Thermoplasma acidophilum</i> bioloužení – <i>Leptospirillum ferriphilum</i> , <i>Sulfobacillus thermosulfidoxidans</i>
<b>Piezofilní</b>	lipázy	možné použití pro snížení viskozity ropy při vysokém tlaku	RNA polymerase $\sigma^{54}$ – <i>Shewanella violacea</i> geny <i>ORF1,2, cydD</i> – <i>Shewanella benthica</i>

### 2.3.1. Halofilní producenti PHA

Halofilní mikroorganismy potřebují pro svůj růst hypersalinní prostředí. Typickým představitelem extrémně halofilních archeí je rod *Haloferax* především *Haloferax mediterranei* [71]. Tato archea využívají řadu odpadních substrátů (syrovátka, hydrolyzovaná sláma) [69] a má PHA syntázu třídy III. *H. mediterranei* tvoří kopolymer poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) i bez prekurzorových sloučenin strukturně podobných hydroxyvalerátu. Avšak i jiné haloarchea akumulují PHA (např. *Halogeometricum*) [69; 72]. Při biotechnologickém využití extrémních halofilů se kromě výše uvedených výhod jako je především rezistence vůči mikrobiální kontaminaci procesu často uvádí další výhodný aspekt, a to je využití jednoduché a cenově nenáročné hypotonické lyze buněk k izolaci polymeru z bakteriální biomasy [73].

Halofilní bakterie jsou také schopny akumulace PHA. Mezi takové bakterie patří například zástupci rodu *Halomonas*. Například *Halomonas halophila* akumuluje P(3HB) až do 82 % hmotnosti suché biomasy. Tato bakterie má PHA syntázu první třídy a syntéza P(3HB) probíhá stejnou metabolickou drahou jako u bakterie *Cupriavidus necator*. *H. halophila* využívá řadu odpadních substrátů (melasa, syrovátka, lignocelulózní materiály), jejichž využití tedy může významně vylepšit ekonomickou stránku PHA [74]. Adaptace řady halofilních bakterií na prostředí s vysokou osmotickou silou je většinou spojena s akumulací kompatibilních solutů v bakteriálních buňkách, které kompenzují rozdíl v osmotické aktivitě extra a intracelulárním prostředím. Mezi kompatibilní soluty patří například ectoin nebo hydroxyectoin, které vykazují zajímavou biologickou aktivitu a nachází uplatnění například v oblasti kosmetiky nebo péče

o zdraví. Guzmán a kolektiv proto studovali koprodukcí PHA a ectoinů pomocí bakterie *Halomonas boliviensis*, přičemž koprodukce obou metabolitů v rámci jednoho procesu by měla samozřejmě výrazně pozitivní vliv na ekonomiku procesu [75].

Přehled dalších halofilních producentů PHA znázorňuje tabulka 5 i s jejich výtěžkem PHA, zdrojem uhlíku či použitým množstvím soli [69].

**Tabulka 5: Přehled některých halofilních producentů PHA**

<b>Mikroorganismus</b>	<b>Zdroj uhlíku</b>	<b>Koncentrace soli</b>	<b>Množství PHA</b>	<b>Zdroj</b>
<i>Halomonas boliviensis</i>	glukóza + glutamát	4,5 až 15 % NaCl	P(3HB) – 68,5 %, koprodukce ectoinů	[75]
<i>Halomonas TD01</i>	glukóza + kvasniční extrakt	6 % NaCl	P(3HB-co-3HV) – 82 %	[76]
<i>Bacillus megaterium H16</i>	glukóza	5 % NaCl	P(3HB) – 39 %	[77]
<i>Yangia sp. ND 199</i>	fruktóza + prekurzory	3 % NaCl	P(3HB) – 2,6 g/l; P(3HB-co-4HB) – 1,36 g/l; P(3HB-co-3HV) – 1,44 g/l	[78]
<i>Natrinema pallidum</i>	škrob	25 % NaCl	P(3HB-co-3HV) – 75,5 %	[79]
<i>Haloferax mediterranei</i>	hydrolyzovaný syrovátkový permeát + $\gamma$ -butyrolakton	20 % NaCl	P(3HB-co-3HV-co-4HB) – 14,7 g/l	[80]

### 2.3.2. Termofilní producenti PHA

Obecně jsou termofilní mikroorganismy definovány tak, že vykazují nejvyšší metabolickou aktivitu při teplotách vyšších než 45 °C. Využití termofilních bakterií v biotechnologických procesech je energeticky výhodné, protože jsou výrazně potlačeny náklady na energeticky náročné chlazení kompenzující uvolněné metabolické teplo. Dále využití termofilů výrazně snižuje nároky na sterilitu procesu, který je tak možno vést v energeticky úsporném semi-

sterilním nebo dokonce zcela nesterilním procesu. Díky vysoké robustnosti vůči mikrobiální kontaminaci je navíc při využití termofilů možné uvažovat o dlouhodobém kontinuálním biotechnologickém procesu. I mezi termofily existuje řada producentů PHA (Tabulka 6). Schopnost akumulace PHA, podobně jako u halofilů, může poskytovat výhodu při adaptaci na extrémní prostředí. Je známo, že se monomery PHA podílejí na ochraně enzymů proti vysoké teplotě jako chemické chaperony [66; 69].

Mezi termofilní producenty PHA patří například termofilní cyanobakterie *Synechococcus* sp. Jedná se o autotrofního producenta P(3HB) [81]. Také u zástupců rodu *Thermus*, respektive *Thermus thermophilus* byla popsána schopnost produkce PHA. Tyto bakterie jsou schopny produkce až při 75 °C až do 40 % hmotnosti suché biomasy. Pokud je do kultivačního média přidáván oktanoát sodný dochází k akumulaci kopolyesteru, který obsahuje scl- a mcl-PHA. Mezi další termofilní producenty patří například *Chelatococcus daeguensis* či termofilní druhy rodu *Bacillus* [69].

**Tabulka 6: Přehled vybraných termofilních producentů PHA**

<b>Mikroorganismus</b>	<b>Zdroj uhlíku</b>	<b>Teplota</b>	<b>Množství PHA</b>	<b>Zdroj</b>
<i>Thermus thermophilus</i>	glukonát + oktanoát	75 °C	scl-co-mcl PHA – 40 %	[82]
<i>Chelatococcus daeguensis</i> TAD1	glukóza + glycerol	50 °C	P(3HB) – 80 %	[83]
<i>Chelatococcus</i> sp. strain MW10	glukóza	55 °C	P(3HB) – 16,8 g/l	[84]
<i>Bacillus shackletonii</i> K5	glukóza	45 °C	P(3HB) – 72,6 %	[85]
<i>Cupriavidus</i> sp. S-6	glukonát	50 °C	P(3HB) – 49 %	[86]
<i>Pseudomonas</i> sp. SG4502	acetát + oktanoát + dodekanoát	55 °C	mcl-PHA – 40,6 %	[87]

#### 2.4. Obohacení směsných bakteriálních kultur o bakterie produkující PHA

Existuje mnoho rodů bakterií, které jsou schopny syntetizovat PHA a které jsou uchovány jako čisté izoláty. Tyto čisté kultury se používají pro průmyslovou výrobu PHA. Kromě čistých kultur se pro výrobu také používají rekombinantní bakterie, které poskytují určité výhody jako je vysoká hustota buněk, rychlý růst či nadprodukce PHA. Jako rekombinantní bakterie pro výrobu PHA se používají například *Escherichia coli* nebo *Cupriavidus necator* [88–90]. Avšak i genetické vylepšení bakteriálního kmene, nese s sebou jisté nevýhody. Výhodnější

potřeby na krmení či snížení ekonomických nákladů snížením sterilizace zařízení poskytuje použití smíšené bakteriální kultury [89].

V posledních letech roste zájem o použití směsných kultur pro výrobu PHA. Jako vhodné směsné kultury jsou označovány směsná mikrobiální konsorcia, která jsou schopna významné akumulace PHA, přičemž se využívají speciální kultivační postupy, které favorizují růst PHA produkujících bakterií a akumulaci PHA. Pro využití směsných kultur pro výrobu PHA se nejdříve provádí jejich obohacení o bakterie produkující PHA [90].

#### **2.4.1. Anaerobní/aerobní obohacení**

První produkce PHA pomocí směsných bakteriálních kultur byla pozorována při biologickém odstraňování fosfátů aktivovaným kalem v čistírnách odpadních vod, kde dochází ke střídání anaerobní a aerobní fáze. Proto první pokusy o obohacení směsných kultur využívaly střídání těchto dvou fází. Avšak při tomto obohacování převládají bakterie akumulující polyfosfáty a glykogen, u kterých se PHA hromadí během anaerobní fáze, kde dochází k limitaci akceptorů elektronů. V aerobní fázi pak bakterie využívá uložené PHA s dostupným kyslíkem, což vede k vyšší výtěžnosti adenosintrifosfátů (ATP) ve srovnání se ziskem energie získané z anaerobního metabolismu substrátu [90; 91].

#### **2.4.2. Aerobní dynamické krmení**

Další ze strategií obohacení směsné kultury PHA produkujícími bakteriemi je aerobní dynamické krmení (ADK) neboli "feast and famine" (čili „blahobyt a hlad“). Jedná se o cyklické střídání přebytku a limitace vnějším substrátem, které vede k nárůstu bakterií se silnými schopnostmi skladování uhlíku [92; 93].

##### **2.4.2.1 Základní princip**

Existuje mnoho variací aerobního dynamického krmení, ale princip všech je stejný. V přítomnosti externího zdroje uhlíku dochází k tvorbě PHA, v období limitace („hladu/famine“), kdy chybí externí zdroj uhlíku, je PHA metabolizováno [92; 93]. V praxi se jedná o opakující se cyklus vedoucí k zakoncentrování bakterií schopných akumulace PHA. Jeden cyklus většinou trvá 12 hodin a zahrnuje fáze „blahobyt“ (feast), „hlad“ (famine), limitaci kyslíkem a výměnu média. V první části cyklu mají mikroorganismy dostatek externího zdroje uhlíku, který je využit k pokrytí energetických nároků kultury a k růstu (fáze blahobytu). Po vyčerpání zdrojů uhlíku postupně cyklus přechází ve fázi „hladu“, která trvá 3 až 5 hodin, tudíž dochází k limitaci externím substrátem a případným zdrojem uhlíku a energie se stává PHA. Po celou dobu dochází k aeraci, proto je tato část cyklu také označována jako aerobióza. Ke konci cyklu dochází ke krátkodobé limitaci kyslíkem. Poté se vymění médium za čerstvé, které obsahuje nový zdroj uhlíku a cyklus se znovu opakuje [94].

Pro celkový výnos obecně platí, že substráty jako je acetát, butyrát či valerát jsou téměř kvantitativně využity pro buněčný růst a syntézu PHA granulí. Některé literární zdroje uvádějí, že součet množství PHA v buňce, respirace a výtěžky růstu neodpovídají množství

spotřebovaného uhlíkatého substrátu [92]. Proto se předpokládá, že část substrátu, je nahromaděn uvnitř buněk jako nízkomolekulární produkty nebo je transformován do exopolymerních látek [92; 95].

#### **2.4.2.2 Příklady použití aerobního dynamického krmení**

Použitím aerobního dynamického krmení se zabývá řada výzkumných týmů. L. Huang a kol. se zabývali zvýšením produkce PHA pomocí smíšené mikrobiální kultury pomocí ADK. Zdlouhavý proces s využitím smíšených kultur byl urychlen prodloužením kultivační části pro nárůst biomasy a zároveň zachováním akumulací kapacity PHA. Což vedlo k navýšení výtěžku PHA. Vypouštění kalu mělo též pozitivní vliv na akumulaci polymeru. Tento kultivační proces lze zpracovat do konvenčního třístupňového procesu [96].

Tým F. Valentina se zabýval využitím uhlíku z odpadních vod přes biokonverzi na biologicky odbouratelné polymery. Pomocí smíšených mikrobiálních kultur z odpadních vod a odpadních vod z průmyslových procesů za pomoci "feast and famine" docházelo k obohacení kultur a k propojení výroby PHA s biologickým čištěním odpadních vod s přínosem obnovitelných zdrojů a také mineralizaci kalu [97].

Směsné kultury obohacené pomocí "feast and famine" byly také využity pro akumulaci PHA z odpadních vod palmového oleje jako jediného zdroje uhlíku. Docházelo až ke 100% odstranění kyseliny propionové a máselné za tvorby kopolymeru PHA. Bylo dosaženo výtěžku 0,6833 mg PHA na g biomasy. Vzniklé PHA bylo identifikováno jako poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) zkráceně P(3HB-co-3HV) [98].

### **2.5. Využití odpadních substrátů k produkci PHA**

Polyhydroxyalkanoáty jsou vhodnou alternativou k petrochemicky vyráběným plastům. Mezi jejich hlavní nevýhodu patří vyšší ceny biotechnologického procesu. Cenu lze však snížit využitím například extrémofilních mikroorganismů, které jsou považovány za novou generaci průmyslové technologie [70], ale také využitím odpadních surovin jako vstupní zdroj uhlíku, protože cena substrátu může představovat až 40 % ceny produktu [99]. Jako nejslibnější zdroje uhlíku, které jsou zároveň i levné, se nabízejí odpadní produkty z potravinářského průmyslu, jako jsou například odpadní rostlinné oleje, melasa z cukrovarského průmyslu, lisovaná ovocná vláknina (matoliny) a lignocelulózní materiály, odpady z výroby bionafty (odpadní glycerol) či odpadní živočišné oleje ze zpracování masa [100; 101].

Jednou ze slibných surovin se jeví odpadní olej [102], ať už se jedná o palmový [103], řepkový [104], slunečnicový [105] nebo sójový [106] či použitý kuchyňský olej [107]. Nejčastěji se k produkci PHA na oleji využívá bakterie *Cupriavidus necator*, která jednak disponuje vysokou schopností akumulovat PHA, tak i vysokou lipázovou aktivitou a efektivitou utilizace lipidů. Při využití odpadního řepkového oleje v bioreaktoru dosahovala produkce přes 100 g/l P(3HB) [108]. Také k produkci mcl-PHA je možné využít odpadní olej. Dva kmeny *Pseudomonas* G101 a G106 byly použity pro produkci mcl-PHA na odpadním oleji [109]. Kromě rostlinných olejů lze použít pro výrobu PHA také odpadní živočišné tuky a oleje [105; 110; 111]. Jedním z odpadních živočišných tuků je odpadní rybí olej, který je ve směsi



s glycerolem využíván pomocí mírně halofilní bakterie *Salinivibrio* sp. produkující P(3HB). Tako bakterie je schopna nárůstu do koncentrací okolo 69 g/l s 51% obsahem P(3HB) na suchou biomasu [110]. Bakterie *Cupriavidus necator* H16 lze použít na produkci PHA z živočišných tuků. Například za použití živočišného loje bylo dosaženo až 24 g/l P(3HB) [111]. Nicméně problematika produkce PHA na živočišných tucích a olejích není tak prozkoumána jako na rostlinných olejích [105].

Kuřecí maso je jednou z nejvýznamnějších surovin v oblasti masného průmyslu, při jeho zpracování však vznikají stamiliony tun odpadního peří ročně. Toto odpadní peří nemá mnohé další využití. Část se používá na zkrmení, avšak valná většina končí na skládkách či ve spalovnách a dochází k zatěžování životního prostředí [112; 113]. Peří je bohaté na keratinový protein, proto je tento materiál vhodným a potenciálním zdrojem pro získávání keratinu, který může mít využití například v kosmetickém nebo textilním průmyslu nebo také v medicíně [112]. Přímé mikrobiální zpracování surového peří je náročné a musí být využit kmen s keratinolytickou schopností [113] nebo musí docházet k hydrolýze keratinu chemickou cestou. Peří podrobené alkalické hydrolýze bylo využito jako zdroj dusíku pro produkci PHA na odpadním fritovacím oleji s využitím bakterie *C. necator*, použití hydrolyzátu peří výrazně navýšilo výtěžek procesu a při produkci kopolymeru 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu měl hydrolyzátní peří i výrazně pozitivní vliv na výsledné monomerní složení polymeru [114].

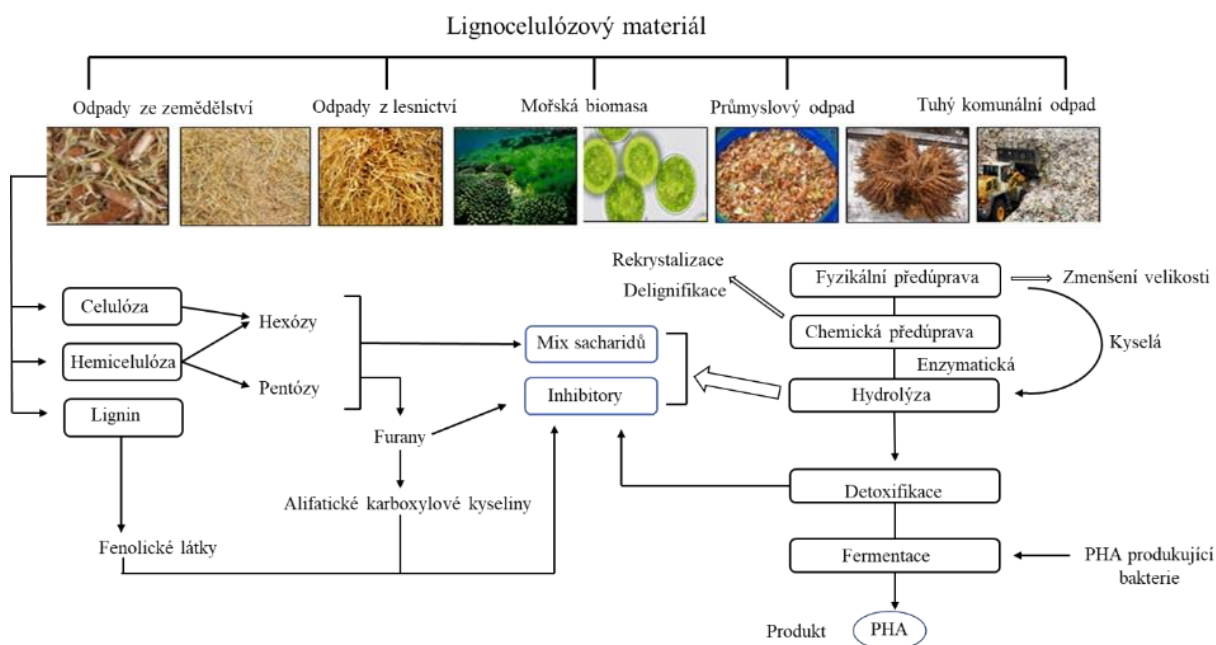
PHA lze také vyrábět z odpadní syrovátky, která vzniká jako vedlejší odpadní produkt při výrobě sýra [115]. Každý rok se vyprodukuje přibližně 120 milionů tun syrovátky. Pouze zhruba polovina tohoto „odpadu“ má další využití v potravinářském nebo krmivářském průmyslu [116; 117]. Syrovátka je bohatým zdrojem sacharidů (laktózy), vitaminů, bílkovin či tuků [118]. Mikroorganismy, které jsou schopné růst na syrovátce, byly schopné ve fermentoru produkce PHA až 5,5 g/l [119]. Existuje mnoho producentů, kteří jsou schopni růst a produkovat buď přímo na surové nebo upravené syrovátce. Mezi ně patří například halofilní archea *Haloferax mediterranei* DSM 1411 [115], rekombinantní *Escherichia coli* [120], *Thermus thermophilus* HB8 [121] nebo rekombinantní *Cupriavidus necator* mRePT [122]. Kromě čistých kultur lze syrovátku využít také pro produkci PHA pomocí směsných mikrobiálních kultur [123].

Řada odpadních surovin obsahuje také významné množství škrobu. Avšak ne všechny bakterie jsou schopny využít škrob bez předchozí hydrolýzy, která opět zvyšuje cenu biotechnologické produkce. Nicméně bakterie *Azotobacter croococcum* je schopna využít škrob přímo bez předchozí úpravy a zároveň je schopna produkce okolo 50 % P(3HB), kdy produkce činila okolo 23 g/l [124]. Termofilní bakterie *Caldimonas taiwanensis* disponuje enzymy, které jsou schopny degradovat škrob. Při využití škrobu jako jediného zdroje uhlíku docházelo k produkci P(3HB), zato při využití směsi škrobu a kyseliny valerové byl produkován kopolymer P(3HB-co-3HV) [125].

Dalším zajímavým odpadním zdrojem je kávová sedlina. Káva je hojně konzumována po celém světě. Celosvětová spotřeba kávy se pohybuje okolo 10 milionů tun za rok. Avšak při zpracování kávy na nápoj a také při výrobě instantní kávy vznikají miliony tun pevného odpadu, který se nazývá kávová sedlina. Tu je také možné biotechnologicky využít. Lze z ní vyrábět bioethanol či bionaftu [126]. Kávová sedlina je však bohatá i na kávový olej, který lze

využít jako vstupní surovinu pro výrobu polyhydroxyalkanoátů. Extrahovaný olej u kávové sedliny byl použit jako jediný zdroj uhlíku pro bakterii *Cupriavidus necator* H16. Produkce PHA dosahovala okolo 90 % hmotnosti suché biomasy, což vedlo k výtěžku okolo 27 g/l P(3HB) [127]. Také polysacharidovou frakci kávové sedliny je možné po chemicko-enzymatické hydrolýze využít jako surovinu pro produkci PHA [128].

Hlavní frakce odpadních substrátů pocházejících ze zemědělství a potravinářství jsou lignocelulózy. Tyto odpady můžeme rozdělit do tří skupin na základě jejich původu. Jedná se o zbytky lesního hospodářství, zbytky zemědělských výrob či komunální tuhý odpad. Ze zemědělství jsou nejvíce zastoupeny odpady ze zpracování rýže, kukuřice, pšenice a cukrové třtiny. Z lesního hospodářství se pak jedná o odpady, jako jsou piliny a dřevní štěpky. Složení lignocelulózy závisí na druhu rostliny, ze které pochází. Obecně se skládá především z celulózy, hemicelulózy a ligninu (Obrázek 9). Lignocelulózy mohou být využity jako velice zajímavá surovina při výrobě PHA za účelem snížení ceny produkce. Avšak vždy musí podstoupit předúpravě a hydrolýze polysacharidů na fermentovatelné cukry [129]. K produkci PHA na upravených lignocelulózy byla například použita bakterie *Bacillus firmus* NII 0830, kdy jako vstupní lignocelulózy byl použit rýžová sláma [130]. Hydrolyzované pšeničné otruby byly použity pro produkci P(3HB) pomocí halofilní bakterie *Halomonas boliviensis* LC1 [131]. Také pšeničnou slámu lze využít pro produkci PHA. Například pomocí bakterie *Bulkholderia sacchari* DSM 17165 bylo dosaženo produkce PHA až 72 % hmotnosti suché biomasy [132].



**Obrázek 9: Schéma zpracování a úpravy lignocelulózy odpadních materiálů pro výrobu PHA, upraveno z [129]**

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1. Použité přístroje

Pro experimentální část byly použity přístroje uvedené v tabulce 7 a základní laboratorní vybavení.

**Tabulka 7: Seznam nejdůležitějších přístrojů**

Použité přístroje	
analytické váhy, Ohaus Pioneer PA224C	soustava HPLC s RID, SHIMADZU 10A
ATR-FTIR, Thermo Scientific, Waltham iS50	SEC-MALS-dRI, Wyatt Technology
centrifuga, Boeco U-32R	temperovaná třepačka, Heidolph Incubator 100
centrifuga, Hermle Z36HK	temperovaná třepačka, IKA KS4000i control
centrifuga, Hettich EBA 200	temperovaná třepačka, LABWIT ZWYR-D2401
centrifuga, Sartorius Sigma 1-15	termoblok, Bibby Scientific Stuart SBH 130
duální vizualizační systém, Ultra Lum Ultra Viewer	termoblok, Bibby Scientific Stuart SBH 200D
ELISA reader, BioTek, ELx808	termostat, LTE IP100U
hlubokomrazicí box, Artico	termostat, LTE IP60
laminární box, Euroclone BioAir Auro mini	termocycler, BIO-RAD My Cycler™
magnetická míchačka, Biosan MMS-3000	transluminátor, Spektroline TVR 3121
magnetická míchačka, TKO Kartell	váhy, Kern EW 620-3NM
nanofotometr, Implen P300	vizualizační systém, Azure Biosystem c200
pH metr, Thermo Scientific pHTestr 30	vortex, Benchmark BenchMixer
plynový chromatograf s FID, Thermo Scientific Trace 1300	zdroj pro ELFO, Labnet Enduro Power Supplies 300V

#### 3.2. Použité chemikálie

Seznam použitých chemikálií zobrazuje tabulka 8. Chemikálie, které byly použité pro molekulární technologie zobrazuje tabulka 9.

**Tabulka 8: Seznam použitých chemikálií**

Název chemikálie (Společnost, zkratka státu)	
1,4-butandiol (Sigma-Aldrich, DEU)	hydrogenuhlíčan sodný (Lach-Ner, CZE)
1,6-hexandiol (Sigma-Aldrich, DEU)	hydroxid sodný (Lach-Ner, CZE)
acetát amonný (Sigma-Aldrich, DEU)	hydroxyectoin (Sigma-Aldrich, DEU)
acetylaceton (Sigma-Aldrich, DEU)	chlorid amonný (Lach-Ner, CZE)
agar (HiMedia, IND)	chlorid kobaltnatý hexahydrát (Lach-Ner, CZE)
betain (Sigma-Aldrich, DEU)	chlorid draselný (Lach-Ner, CZE)
bromid sodný (Lach-Ner, CZE)	chlorid hořečnatý hexahydrát (Lach-Ner, CZE)
citronan amonno-železitý (Fluka, CHE)	chlorid manganatý tetrahydrát (Lach-Ner, CZE)
D-fruktóza (Lach-Ner, CZE)	chlorid nikelnatý hexahydrát (Lach-Ner, CZE)
D-glukóza (Lach-Ner, CZE)	chlorid sodný (Lach-Ner, CZE)
D-manóza (Sigma-Aldrich, DEU)	chlorid vápenatý dihydrát (Lachema, CZE)
dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, CZE)	chlorid železitý hexahydrát (Lach-Ner, CZE)
dusičnan amonný (Lach-Ner, CZE)	chloroform p.a. (Lach-Ner, CZE)
dusičnan sodný (Lach-Ner, CZE)	isopropanol p.a. (Lach-Ner, CZE)
ection (Sigma-Aldrich, DEU)	jodid draselný (Lach-Ner, CZE)
ethanol 99,8% (Lach-ner, ČR)	jodistan sodný (Lach-Ner, CZE)
galaktóza (Lach-Ner, CZE)	kvasniční extrakt (HiMedia, IND)
glycerol (Lach-Ner, CZE)	kyselina benzoová (Lach-Ner, CZE)
hovězí extrakt (HiMedia, IND)	kyselina boritá (Lachema, CZE)
hydrogenfosforečnan amonno-sodný tetrahydrát (Lach-Ner, CZE)	kyselina chlorovodíková 35%, p.a. (Lach-Ner, CZE)
hydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, CZE)	kyselina levulová (Sigma-Aldrich, DEU)
hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (Lach-Ner, CZE)	kyselina octová 99% p.a. (Lach-Ner, CZE)

Název chemikálie (Společnost, zkratka státu)	
kyselina oktanová (VWR Chemicals, USA)	síran amonný (Lach-Ner, CZE)
kyselina sírová (Lach-Ner, CZE)	síran hořečnatý heptahydrát (Lach-Ner, CZE)
kyselina valerová (Sigma-Aldrich, DEU)	síran manganatý monohydrát (Lach-Ner, CZE)
laktóza monohydrát (Lach-Ner, CZE)	síran měďnatý pentahydrát (Lach-Ner, CZE)
methanol (Lach-Ner, CZE)	síran zinečnatý heptahydrát (Lach-Ner, CZE)
močovina (Sigma-Aldrich, DEU)	sojový pepton (HiMedia, IND)
molybdenan sodný dihydrát (Lach-Ner, CZE)	Spirit blue agar (HiMedia, IND)
nutrient broth (HiMedia, IND)	thiomčovina (Sigma-Aldrich, DEU)
pepton (HiMedia, IND)	trehalóza (Sigma-Aldrich, DEU)
propan-1-ol (Sigma-Aldrich, DEU)	tris(hydroxymethyl)aminomethan (Lach-Ner, CZE)
propionát sodný (Sigma-Aldrich, DEU)	trypton (HiMedia, IND)
sacharóza (Lach-Ner, CZE)	$\gamma$ -butyrolakton (Sigma-Aldrich, DEU)

**Tabulka 9: Seznam chemikálií pro molekulární technologie**

Název chemikálie (Společnost, zkratka státu)	
agaróza (Sigma-Aldrich, DEU)	Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe, DEU)
DNA ladder 1 kb Plus (Nippon Genetics Europe, DEU)	NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, DEU)
DNA ladder 100 bp (Nippon Genetics Europe, DEU)	PCR vkládací pufr Yellow load (Top-Bio, CZE)
ethylendiamintetraacetát sodný (Lach-Ner, CZE)	primery (Generi Biotech, CZE)
chlorid hořečnatý 25mM (Thermo Scientific, USA)	sterilní voda Aqua pro injectione (B. Braun Medical, DEU)
Master mix OneTaq Hot Start (2x koncentrovaný) se standardním pufrům (New England BioLabs, GBR)	

### 3.3. Použité mikroorganismy

V práci byly použity mikroorganismy ze sbírek mikroorganismů (Česká sbírka mikroorganismů – CCM; Německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur – DSM), seznam těchto mikroorganismů zobrazuje tabulka 10. Kromě sbírkových mikroorganismů byly také v práci použity izolované bakterie z přírodních vzorků, a to ze vzorků kompostu (Centrální kompostárna Brno, Kompostárna Blansko) a z čistíren odpadních vod (ČOV Brno-Modřice, ČOV Bystřice pod Hostýnem).

**Tabulka 10: Seznam sbírkových mikroorganismů**

<b>Mikroorganismus</b>	<b>Sbírkové číslo</b>
<i>Cupriavidus necator</i> H16	CCM 3726
<i>Bacillus cereus</i>	CCM 2010 <sup>T</sup>
<i>Bacillus coagulans</i>	CCM 2658
<i>Bacillus megaterium</i>	CCM 2037
<i>Pseudomonas putida</i> KT 2440	DSM 6125
<i>Halomonas halophila</i>	CCM3662
<i>Halomonas organivorans</i>	CCM7142 <sup>T</sup>
<i>Halomonas salina</i>	CCM 4361
<i>Halomonas elongata</i>	CCM 3756
<i>Halomonas ilicicola</i>	CCM 7522
<i>Halomonas neptunia</i>	CCM 7107
<i>Halomonas halmophila</i>	CCM 2833
<i>Halomonas hydrothermalis</i>	CCM 7104
<i>Halomonas meridiana</i>	CCM 7105
<i>Halomonas axialensis</i>	CCM 7103

### 3.4. Seznam kultivačních médií

Mikroorganismy byly kultivovány na komplexních médiích. Seznam použitých komplexních médií je zobrazen v tabulce 11. Produkce polyhydroxyalkanoátů pak probíhala v minerálních médiích, která jsou zobrazena v tabulce 12.

**Tabulka 11: Seznam komplexních médií**

Označení média	Složení média [g/l]		Označení média	Složení média [g/l]	
NB	hovězí extrakt	10	K2	pepton	15
	pepton	10		kvasniční extrakt	3
	NaCl	5		NaCl	66
K3 (B82)	kvasniční extrakt	10		glukóza	1
	pepton	5	K4 (B54)	nutrient broth (NB)	1000 ml
	glukóza	1		NaCl	30
	NaCl	81		MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	5
	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	9,6		pH 7,2	
	MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	7	K5 (B142)	kvasniční extrakt	3
	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,36		pepton	5
	KCl	2		NaCl	150
	NaHCO <sub>3</sub>	0,06		pH 7,0	
	NaBr	0,026	K6 (B10)	pepton	5
	pH 7,2			hovězí extrakt	3
		MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O		0,01	
			pH 7,0		

**Tabulka 12: Seznam minerálních médií**

Označení média	Složení média [g/l]		Označení roztoku stop. prvků	Složení roztoku stop. prvků [g/l]	
CN	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	MES	FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	9,7
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O	11,1		CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	7,8
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,05		CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,156
	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,2		CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,119
	po sterilizaci			NiCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,118
	uhlíkatý zdroj			ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,1
	MES	1ml/l		0,1 M HCl	1000 ml

Označení média	Složení média [g/l]		Označení roztoku stop. prvků	Složení roztoku stop. prvků [g/l]	
<b>ADK-M</b>	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,6	<b>TES I</b>	FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1,5
	NH <sub>4</sub> Cl	0,16		H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,15
	EDTA	0,1		CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,15
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,092		MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	0,12
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,045		ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,12
	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,07		Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,06
	thiomočovina	0,01		CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,03
	po sterilizaci			KI	0,03
	množství uhlíku	0,7			
	TES I	2 ml/l			
<b>Chelatococ. (M1)</b>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O	9	<b>TES II</b>	EDTA	50
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5		FeCl <sub>3</sub>	8,3
	NH <sub>4</sub> Cl	1		ZnCl <sub>2</sub>	0,84
	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,2		CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,13
	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,02		CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,1
	NH <sub>4</sub> Fe <sup>III</sup> citrát	0,0012		MnCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,016
	kvasniční extrakt	0,5		H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,1
	po sterilizaci				
	uhlíkatý zdroj				
	TES II	1ml/l			



Označení média	Složení média [g/l]		Označení roztoku stop. prvků	Složení roztoku stop. prvků [g/l]		
<b>Chelatococ. (M2)</b>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O	9	<b>TES II</b>	EDTA	50	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5		FeCl <sub>3</sub>	8,3	
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1		ZnCl <sub>2</sub>	0,84	
	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,2		CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,13	
	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,02		CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,1	
	NH <sub>4</sub> Fe <sup>III</sup> citrát	0,0012		MnCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,016	
	trypton	0,5		H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,1	
	po sterilizaci					
	uhlíkatý zdroj					
	TES II	1ml/l				

### 3.5. Oživení a úchova mikrobiálních kmenů

Sbírkové kmeny mikroorganismů byly oživeny z lyofilizovaného stavu podle návodu poskytnutého příslušnou sbírkou, rozetřeny křížovým roztěrem na agarové plotny a také zaočkovány do 50 ml tekutého média, vždy s příslušným médiem pro daný mikroorganismus definovaným sbírkou. Kultivace byla provedena za optimálních podmínek pro daný mikroorganismus 24 až 48 hodin. Poté byly připraveny kryozkumavky, ve kterých byly kultury uchovávány v 10% glycerolu při teplotě -80°C. Původní izoláty byly uchovávány stejným způsobem. Všechna média, kryozkumavky i laboratorní vybavení pro práci s mikroorganismy byly sterilní a práce probíhala v laminárním boxu.

### 3.6. Fenotypová identifikace vybraných izolátů

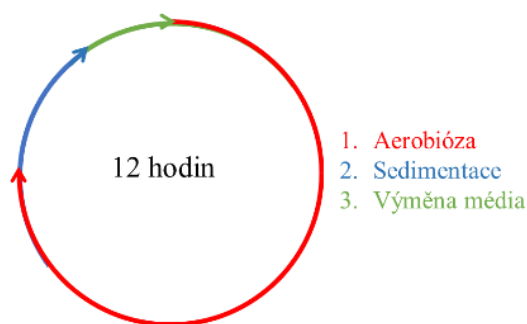
Vybrané izoláty byly poslány na agarových plotnách s komplexím médiem do České sbírky mikroorganismů v Brně, kde proběhla fenotypová identifikace. V rámci komerční identifikace byl proveden morfologický popis kolonií a identifikační testy. Také byla v rámci identifikace použita metoda Biolog, díky níž byl mikroorganismu na základě podmínek růstu zařazen do taxonomického rodu či druhu.

### 3.7. Izolace PHA termofilních producentů ze vzorků aktivovaného kalu nebo kompostu

Izolace termofilních producentů PHA probíhala ze vzorků aktivovaného kalu z čistíren odpadních vod, a to z čistírny odpadních vod Brno-Modřice a čistírny odpadních vod Bystřice pod Hostýnem, nebo z kompostárny Brno a z kompostárny Blansko. Odběry byly realizovány na podzim v roce 2017 (pouze kal z ČOV Bystřice pod Hostýnem), na podzim roku 2018 byl odběr proveden z kompostárny Brno a Blansko a z ČOV Brno-Modřice. V roce 2019 (podzim) byly odběry dělány ze všech čtyř odběrových míst. Odběr probíhal do sterilních připravených nádob. Po převozu do laboratoře byl vzorek ihned použit k zaočkování média. Aktivovaný kal byl uchován v 10% glycerolu při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , vzorek kompostu byl uchován při  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.7.1. Aerobní dynamické krmení

Pro aerobní dynamické krmení I (ADK) bylo použito 100 ml média s označením ADK-M uvedené v tabulce 12 ve 250 ml Erlenmayerově baňce. Jako zdroj uhlíku byl použit acetát sodný, xylóza, laktóza a kyselina palmitová o koncentraci 0,7 g/l propočítané na množství uhlíku ve sloučenině. Připravené médium bylo zaočkováno 2 ml aktivovaného kalu. Samotný proces se skládal ze třech kroků, které byly cyklicky opakovány (Obrázek 10). Prvním krokem byla fáze aerobiózy, která trvala 10,5 hodiny při  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  a 210 rpm. Poté následovala 1 hodina sedimentace, tato fáze probíhala při  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ . V následujících 30 minutách byl obsah baňky stočen při 4 000 rpm, 5 minut; slit supernatant a sediment byl rozsuspendován v čerstvém médiu se zdrojem uhlíku a TES I. Poté opět následoval nový 12hodinový cyklus. Během cyklu byly odebírány vzorky na gravimetrické stanovení biomasy a stanovení PHA. Biomasa byla také uchovávána ve formě kryozkumavek při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



Obrázek 10: Schéma aerobního dynamického krmení

Aerobní dynamické krmení II probíhalo za stejných podmínek jako první aerobní dynamické krmení, avšak jako zdroj uhlíku byl použit pouze acetát sodný. Inokulace byla provedena 2 ml aktivovaného kalu uchovaného v 10% glycerolu – označení ADK-KAL. Jako inokulum také sloužila kultura ze 7. cyklu z ADK I na acetátu sodném, uchovaná ve formě kryozkumavky. Tato linie byla označena jako ADK-ADK.

### **3.7.2. Izolace náhodným výběrem kolonií**

Izolace náhodným výběrem probíhala na pevných agarových plotnách. Vždy z příslušného média byly připraveny pevné agarové plotny. Desítkovým ředěním byla kultura vyseta na misky, a to v koncentracích  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ . Misky byly vysety v paralelním či triplexním opakování. Kultivace probíhala po dobu 24 až 48 h při 60 °C. Výběr producenta PHA probíhal náhodným výběrem kolonie, která byla přesazena na novou agarovou plotnu křížovým roztěrem.

### **3.7.3. Izolace pomocí Nilské červeně**

Izolace PHA producentů pomocí Nilské červeně probíhala na pevných agarových plotnách s přídavkem lipofilního barviva Nilská červeň. Jako médium bylo použito M1 médium nebo ADK-M (Tabulka 12) s příslušným zdrojem uhlíku. Před nalitím misek byla do média přidána Nilská červeň, a to v koncentraci 0,5 mg na 1 ml DMSO, do média byla přidána koncentrace 1  $\mu$ l na 1ml média. Po ztuhnutí byly misky zaočkovány plošným nátěrem pomocí desítkového ředění jako u izolace náhodným výběrem. Kultivace probíhala při 50 °C nebo 60 °C, 24 až 48 h v temnu. Poté byly plotny ozářeny UV zářením a detekovány oranžově fluoreskující kolonie, které byly následně přesazeny na nové plotny, avšak již bez přidané Nilské červeně.

### **3.7.4. Izolační protokol využívající osmotický stres**

Do sterilní zkumavky bylo odebráno 10 ml kultury a stočeno při 6 000 rpm po dobu 5 minut. Následně byl supernatant odlit a sediment byl rozsuspendován ve sterilním roztoku 100 g/l NaCl a inkubován 10 minut při 50 °C. Poté byl obsah opět stočen při 6 000 rpm, 5 minut. Po odlití supernatantu byl sediment rozsuspendován v 10 ml sterilní destilované vody a znovu inkubován 10 min při 50 °C. Po inkubaci byl obsah zředěn desítkovým ředěním a vyset na misky s minerálním médiem M1 s příslušným zdrojem uhlíku. Kultivace agarových ploten probíhala 48 hodin při dané kultivační teplotě (50, 60 nebo 70 °C). Narostlé kolonie byly testovány na přítomnost PHA pomocí ATR-FTIR. Část vybrané kolonie byla nanášena na povrch krystalu ATR. Po odpaření vody (cca 2 minuty) bylo zaznamenáno spektrum jako průměr 32 skenů ve frekvenčním rozsahu 4 000–400  $\text{cm}^{-1}$  se spektrálním rozlišením 1  $\text{cm}^{-1}$ . Pokud byla kolonie pozitivní na PHA, byl zbytek kolonie přesazen na novou plotnu a poté také do submerzního média. Daný izolát byl uchováván ve formě kryozkumavek v 10% glycerolu při -80 °C.

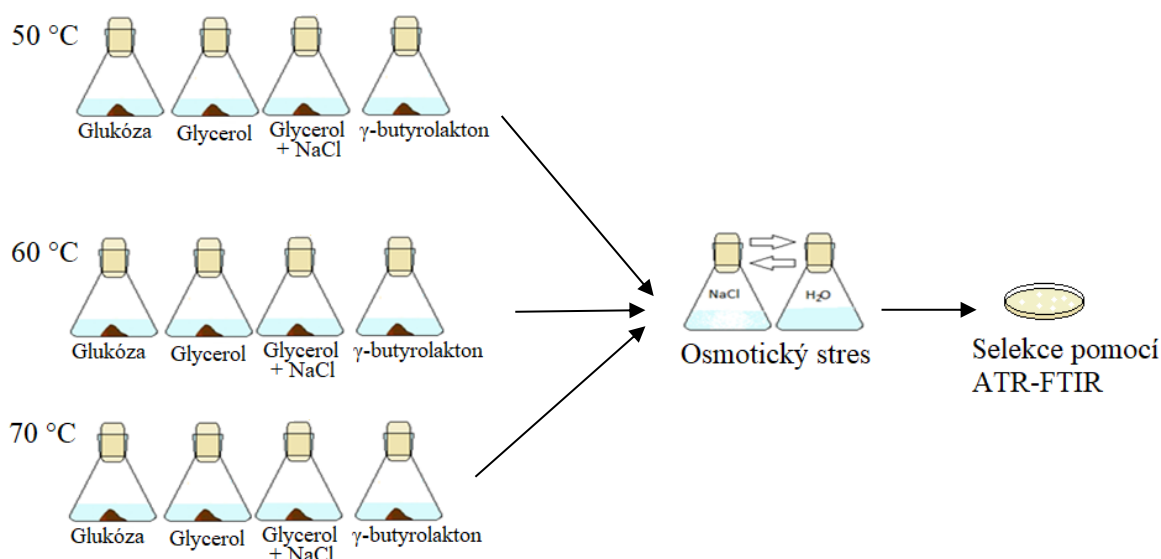
### **3.7.5. Izolace PHA produkujících bakterií pomocí osmoselektce**

Izolace PHA produkujících bakterií vycházející z kultivace na médiu M1. Do minerálního média byly přidány 2 g kompostu nebo 2 ml aktivovaného kalu (odběr z roku 2018). Jako zdroj uhlíku byly použity: glukóza 20 g/l, glycerol 20 g/l,  $\gamma$ -butyrolakton 8 g/l nebo kyselina levulová 5 g/l. Kultivace probíhala 48 hodin při 50 °C a 190 rpm. Poté byla kultura přesazena do nového média a kultivace probíhala dalších 48 hodin za stejných podmínek. Poté probíhala selekce

PHA produkujících bakterií pomocí osmotického stresu. PHA pozitivní kolonie byly přesazeny do tekutého média a kultivovány 24 hodin při dané teplotě a 190 rpm. Poté byly kultury uchovány v podobě kryozkumavek v 10% glycerolu při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.7.6. Selektce PHA produkujících bakterií při různých teplotách

Vzorky kompostu z kompostárny z Blanska a z Brna o hmotnosti 1 g byly smíchány se 100 ml minerálního média M1. Aktivovaný kal (2 ml) z čističek odpadních vod Brno-Modřice a Bystřice pod Hostýnem byl přidán do 100 ml média M1. Jako zdroj uhlíku byla použita glukóza 20 g/l, glycerol 20 g/l,  $\gamma$ -butyrolakton 8 g/l a 20 g/l glycerolu s 40 g/l NaCl. Kultivace probíhala 48 h při teplotách 50, 60 a 70  $^{\circ}\text{C}$  při 190 rpm. Selektce PHA produkujících bakterií probíhala pomocí aplikace osmotického stresu. Schéma je zobrazeno na obrázku 11.



Obrázek 11: Schéma selektce PHA produkujících bakterií při různých teplotách kultivace

### 3.8. Kultivace mikroorganismů v baňkách za účelem studia produkce PHA

Typická kultivace v baňkách za účelem studia produkce PHA pomocí studovaných mikroorganismů probíhala obdobným způsobem během celé experimentální práce. Nejdříve bylo připraveno inokulum (50 ml komplexního média charakteristického pro daný mikroorganismus), které bylo zaočkováno kulturou z kryozkumavek. Inokulum bylo kultivováno 24 h, 180 rpm při dané optimální teplotě. Samotná produkce PHA probíhala v Erlenmayerových baňkách o objemu 250 ml, použito bylo minerálním médiu charakteristické pro daný mikroorganismus (Tabulka 12) s přidavkem roztoku stopových prvků a konkrétního uhlíkatého substrátu obvykle o koncentraci 20 g/l (není-li v textu uvedeno jinak) o objemu 100 ml minerálního média. Sterilní roztok stopových prvků a zdroj uhlíku byly přidány až po sterilizaci. Samotná kultivace byla zahájena inokulací, zvolený inokulační objem byl 10 % (v/v), standardní kultivace probíhala po dobu 72 h, během nebo až po skončení kultivace byly odebírány vzorky na stanovení PHA v biomase a případně další analýzy.

### 3.8.1. Produkce mcl-PHA

Kultivace bakterií rodu *Pseudomonas* probíhala podle postupů popsaných výše (kapitola 3.8). Pro určení schopnosti využít olej byl použit komerční Spirit Blue Agar. Agar byl připraven podle návodu poskytnutého výrobcem, po sterilizaci byl přidán sterilní olej a směs byla vylita na Petriho misky. Po ztuhnutí byla miska zaočkována danou kulturou a kultivována 24 h při 30 °C. V submerzní kultivaci na oleji byl jako zdroj uhlíku použit olej a po 24 hodinách kultivace bylo přidáno určité množství kyseliny oktanové (výsledná koncentrace 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 a 5 g/l).

Surové peří použité na degradaci bylo nejprve promyto vodou a poté sušeno do konstantní hmotnosti. Do minerálního média byla přidána koncentrace 20 g/l a médium bylo vysterilizováno. Pro stanovení hmotnostního úbytku peří byl celý obsah baňky přefiltrován pod tlakem. Následně byl filtrační koláč sušen do konstantní hmotnosti.

Dvojstupňová produkce probíhala následujícím postupem. Nejprve bylo zaočkováno komplexní médium kulturou z kryozkumavky. Po 24 hodinách kultivace při 30 °C bylo zaočkováno produkční médium s 20 g/l peří. Kultivace probíhala 7 dní, avšak čtvrtý den byla narostlá kultura použita jako inokulum do produkce druhého stupně. Minerální médium obsahovalo 20 g/l oleje. Po 24hodinové kultivaci byly přidány 2 g/l kyseliny oktanové.

Analýza stanovení naakumulovaného PHA byla provedena podle postupů uvedených v kapitole 3.9.

### 3.8.2. Produkce PHA pomocí halofilních mikroorganismů

Kultivace halofilních mikroorganismů probíhala podle všeobecného postupu popsaného v kapitole 3.8. Komplexní médium a obsah NaCl pro každou testovanou halofilní bakterii je uveden v následující tabulce 13. Jako zdroj uhlíku byl při kultivaci na oleji použit odpadní fritovací olej o koncentraci 20 g/l. Při úpravě produkčních podmínek byly změněny pouze uvedené parametry.

**Tabulka 13: Přehled halofilních bakterií rodu *Halomonas* a jejich použitých koncentrací soli a komplexních médií**

Koncentrace soli v minerálním médiu	Halofilní bakterie	Komplexní médium
30 g/l	<i>H. elongata</i> CCM 3756	B54
60 g/l	<i>H. halophila</i> CCM 3662	K2
	<i>H. halmophila</i> CCM 2833	B54
81 g/l	<i>H. salina</i> CCM 4361	B82
	<i>H. organivorans</i> CCM 7142	B82
	<i>H. neptunia</i> CCM 7107	B82
	<i>H. hydrothermalis</i> CCM 7104	B82
	<i>H. meridiana</i> CCM 7105	B82
	<i>H. axialensis</i> CCM 7103	B82

Pro optimalizaci salinity byly použity koncentrace 40, 60, 80 a 100 g/l NaCl.

Optimalizace teploty zahrnovala kultivaci v rozmezí teplot 30, 35, 40 a 45 °C. Podmínky kultivace byly stejné jako ve všeobecné kultivaci halofilních bakterií (produkce 72 h, 20 g/l oleje, *H. hydrothermalis* 40 g/l NaCl, *H. neptunia* 60 g/l). Optimalizace koncentrace dusíkatého zdroje zahrnovala koncentrace síranu amonného 1 a 3 g/l. Pro optimalizaci pH byly použity standardní podmínky, kde v minerálním médiu bylo upraveno pH koncentrovaným hydroxidem sodným, a to v rozmezí pH 7, 8, 9 a 10.

Optimalizace zdroje dusíku probíhala podle všeobecného postupu. Koncentrace zdroje uhlíku byla přepočítána na počet atomů dusíku ve zdroji, kdy jako základní koncentrace byl brán síran amonný o koncentraci celé látky 1 g/l. Jako zdroje dusíku byly použity síran amonný (1 g/l), chlorid amonný (0,81 g/l), močovina (0,46 g/l), dusičnan amonný (0,61 g/l), hydrogenfosforečnan amonno-sodný tetrahydrát (3,16 g/l) a dusičnan sodný (1,28 g/l). Podmínky kultivace pro *H. hydrothermalis* byly 40 g/l NaCl, pH 8 a 37 °C; pro bakterii *H. neptunia* byly podmínky 60 g/l NaCl, pH 10 a 30 °C. Obě bakterie využívaly jako zdroj uhlíku 20 g/l oleje.

Při produkční kultivaci s prekurzory byl obsah NaCl pro *H. hydrothermalis* 40 g/l a pro *H. neptunia* 60 g/l. Po 24 hodinách kultivace v minerálním médiu byly do média přidány 2 g/l příslušného prekurzoru. Kultivační teplota byla 30 °C.

Kultivace s recyklací supernatantu zahrnovala dvě následné kultivace. První kultivace probíhala podle standardních podmínek kultivace halofilních bakterií (inokulum: 24 h, 30 °C, 180 rpm; produkce: 72 h, 20 g/l oleje, *H. hydrothermalis* 40 g/l NaCl, *H. neptunia* 60 g/l, 1 g/l síranu amonného). Na konci první kultivace byla odebrána biomasa na stanovení obsahu PHA.

Zbylá biomasa byla centrifugována (5 000 rpm, 5 min), supernatant byl sterilně odebrán a ke zbylé biomase bylo přidáno 50 ml sterilní destilované vody, buňky byly rozsuspendovány a ponechány 15 minut při 30 °C. Poté byly znovu centrifugovány a supernatant byl smíchán s 50 ml dvakrát koncentrovaného sterilního minerálního média. Poté bylo přidáno 20 g/l oleje. Takto připravené minerální médium bylo zaočkováno 10 % (v/v) kultury z nového inokula a probíhala druhá kultivace za klasických podmínek (72 h, 30 °C, 180 rpm).

Produkce s osmolyty probíhala pouze v 50 ml produkčního média za standardních podmínek, kdy do každé Erlenmayerovy baňky s produkcí bylo po sterilizaci přidán 1 mg/ml příslušné látky (ectoin, hydroxyectoin, trehalóza, betain). Také byla provedena kontrola, která neobsahovala žádnou z předchozích přidaných látek.

### **3.8.3. Testování produkce PHA u vybraných izolátů získaných pomocí osmoselekce**

Testování produkce PHA u vybraných izolátů bylo provedeno v několika experimentech, kdy produkce probíhala dle popisu v kapitole 3.8. Jako komplexní médium byl použit Nutrient Broth. Teplota závisela na prováděném experimentu. Jako minerální médium bylo použito médium označené jako M1 (Tabulka 12). Podmínky kultivace a zdroj uhlíku zobrazuje tabulka 14. Jako zdroje uhlíku byly zvoleny původní zdroje použité při izolaci, mezi které patřily glukóza 20 g/l, glycerol 20 g/l a  $\gamma$ -butyrolakton 8 g/l. Seznam izolátů a jejich původní zdroj při izolaci zobrazuje tabulka 15. Kultivace na původních zdrojích při 50 a 60 °C byla provedena u všech izolátů uvedených v tabulce 15. Další experimenty byly provedeny pouze s izoláty z roku 2019. Pro kultivaci na oleji byl použit rostlinný olej o koncentraci 20 g/l. Glycerol byl použit o koncentraci 20 g/l a pro kultivace na 1,4-butandiolu byly použity 4 g/l 1,4-butandiolu.

**Tabulka 14: Přehled podmínek kultivace pro testování produkce PHA u vybraných izolátů**

	Název experimentu	Zdroj uhlíku	Kultivační teplota [°C]		Délka kultivace [h]
			inokula	produkce	
<b>Izoláty izolované při teplotě 50 a 60 °C</b>	kultivace na původním zdroji izolace	uhlíkový zdroj použitý při izolaci dané bakterie	50	50	48/72*
	kultivace na původním zdroji izolace při 60 °C	uhlíkový zdroj použitý při izolaci dané bakterie	50	60	72
	kultivace na oleji	olej	50	50	72
	kultivace na glycerolu	glycerol	50	50	72
	kultivace na 1,4-butandiolu	1,4-butandiol	50	50	48
<b>Izoláty izolované při teplotě 70 °C</b>	kultivace na původním zdroji izolace	uhlíkový zdroj použitý při izolaci dané bakterie	70	70	72
	kultivace na původním zdroji izolace při 60 °C	uhlíkový zdroj použitý při izolaci dané bakterie	70	60	72
	kultivace na glycerolu	glycerol	70	70	72
	kultivace na 1,4-butandiolu	1,4-butandiol	70	70	72

\* Izoláty izolované z roku 2018 byly kultivovány 72 h, izoláty z roku 2019 byly kultivovány 48 h



**Tabulka 15: Seznam vybraných izolátů a jejich původní uhlík izolace či teplota**

<b>Rok izolace</b>	<b>Původ vzorku</b>	<b>Název izolátu</b>	<b>Použitý substrát</b>	<b>Teplota izolace</b>	<b>Název izolátu</b>	<b>Substrát izolace</b>	<b>Teplota izolace</b>
<b>2018</b>	<b>aktivovaný kal, Brno-Modřice</b>	4	glukóza	50	31	glycerol	50
		25	glukóza	50	32	glycerol	50
		28	glukóza	50	34	glycerol	50
		29	glycerol	50	35	glycerol	50
		30	glycerol	50			
<b>2019</b>	<b>kompost, Blansko</b>	Bz	glycerol	50			
	<b>aktivovaný kal, Bystřice pod Hostýnem</b>	A1	glycerol	50	A21	glukóza	60
		A2	glycerol	50	A22	glukóza	60
		A3	$\gamma$ -butyrolakton	50	A23	glukóza	60
		A3a	$\gamma$ -butyrolakton	50	A25	glukóza	60
		A4	glukóza	50	A26	glukóza	60
		A4a	glukóza	50	A27	glukóza	60

<b>Rok izolace</b>	<b>Původ vzorku</b>	<b>Název izolátu</b>	<b>Substrát izolace</b>	<b>Teplota izolace</b>	<b>Název izolátu</b>	<b>Substrát izolace</b>	<b>Teplota izolace</b>
<b>2019</b>	<b>aktivovaný kal, Bystřice pod Hostýnem</b>	A5	glukóza	50	A28	glukóza	60
		A5a	glukóza	50	AFn1	glukóza	60
		A6	glukóza	50	AFn2	glukóza	60
		A7	glukóza	50	AH10	glycerol	70
		A8	glukóza	50	AH11	glycerol	70
		A9	glukóza	50	AH24	glukóza	60
		A12	glukóza	70	AH30	glukóza	60
	<b>kompost, Brno</b>	F101	glukóza	70	F106	glukóza	50
		F102	glukóza	70	F107	glukóza	50
		F103	glukóza	50	F108	glukóza	50
		F104	glukóza	50	F109	glukóza	50
		F105	glukóza	50	F110	glukóza	50

<b>Rok izolace</b>	<b>Původ vzorku</b>	<b>Název izolátu</b>	<b>Substrát izolace</b>	<b>Teplota izolace</b>	<b>Název izolátu</b>	<b>Substrát izolace</b>	<b>Teplota izolace</b>
<b>2019</b>	<b>aktivovaný kal, Brno-Modřice</b>	M1	glukóza	50	M5	glycerol	50
		M2	glukóza	50	M6	$\gamma$ -butyrolakton	50
		M3	glukóza	50	M7	$\gamma$ -butyrolakton	50
		M4	glycerol	50			

### 3.8.4. Testování produkce a optimalizace produkce PHA u izolátů H1, H2 a K2

Screening produkce PHA u vybraných izolátů byl proveden za standardních podmínek uvedených v kapitole 3.8. Prvotní testy probíhaly při 50 °C za využití 20 g/l glycerolu jako zdroje uhlíku. Pro optimalizaci produkce PHA byly upravovány podmínky kultivace a také složení minerálního média. Kultivace, pokud není uvedeno jinak, probíhala standardně podle postupu popsaného v kapitole 3.8. Po kultivaci byla stanovena biomasa gravimetricky (kapitola 3.9.1) a následně byla v biomase stanovena přítomnost PHA pomocí GC-FID (kapitola 3.9.2).

Jedním z testovaných parametrů bylo množství komplexního a dusíkatého zdroje. Bylo použito minerální médium M1 uvedené v tabulce 12, s různými poměry kvasničného extraktu a chloridu amonného zobrazené v tabulce 16.

**Tabulka 16: Poměr kvasničného extraktu a chloridu amonného v minerálním médiu**

Kvasniční extrakt [g/l]	Chlorid amonný [g/l]
0	3
3	1
3	0
0,5	3

Optimalizace zdroje dusíku probíhala v minerálním médiu s označením M1, s 20 g/l glycerolu jako zdrojem uhlíku. Chlorid amonný (1 g/l) byl nahrazen 1 g/l síranu amonného, dusičnanu amonného a močoviny. Kontrola obsahovala 1 g/l chloridu amonného.

Výběr vhodného zdroje komplexní výživy byl proveden v minerálním médiu M1 s 1 g/l chloridu amonného. Mezi testované komplexní zdroje byl použit kvasniční extrakt, bakteriologický pepton, sojový pepton, trypton a hovězí extrakt v koncentraci 0,5 g/l.

Optimální kultivační teplota byla testována na minerálním médiu M1 s 20 g/l glycerolu. U izolátů H1, H2 a K2 byla testována kultivační teplota 45, 50, 55, 60 a 65 °C. U izolátů H1 byly testovány také teploty 40 a 35 °C.

Schopnost produkovat kopolymery P(3HB-*co*-3HV) byla testována za přídavku prekurzorů. K minerálnímu médiu s označením M1 s 20 g/l glycerolu byly přidány 2 g/l příslušného prekurzoru. Jako prekurzor byla použita kyselina levulová, propionát sodný, propan-1-ol a kyselina valerová. Také byla provedena kontrola, která obsahovala pouze 20 g/l glycerolu. Kultivace poté probíhala 72 hodin při 50 °C a 180 rpm.

Všechny tři izoláty byly testovány na produkci kopolymeru P(3HB-*co*-4HB) za využití 8 g/l prekurzoru jako jediného zdroje uhlíku. Testované prekurzory tvořily 1,6-hexandiol,  $\gamma$ -butyrolakton a 1,4-butandiol.

### 3.8.4.1 Optimalizace produkce PHA u izolátu s označením H1

U izolátu H1 byla provedena podrobnější optimalizace produkce. Kultivace probíhala za standardních podmínek popsanych v kapitole 3.8. Jako minerální médium bylo použito médium s označením M1 nebo M2 a kultivace probíhala 72 h při 50 °C. Prvním testovaným parametrem optimalizace produkce byl zdroj uhlíku. Testovanými zdroji uhlíku o koncentraci 20 g/l byly glycerol, sacharóza, manóza, galaktóza, glukóza, fruktóza a laktóza. Optimalizace koncentrace nejvhodnějšího zdroje uhlíku (glycerol) byla provedena v minerálním médiu s označením M2 při 45 °C. Testován byl čistý glycerol a odpadní glycerol v koncentracích 10, 20 a 30 g/l.

V rámci optimalizace tvorby kopolymeru P(3HB-co-4HB) byly testovány dvě minerální média a to M1 (1 g/l chloridu amonného a 0,5 g/l kvasničného extraktu) a M2 (1 g/l dusičnanu amonného a 0,5 g/l tryptonu), kdy byl jako zdroj uhlíku použit 1,4-butandiol o koncentraci 8 g/l. Zároveň byly testovány kultivační teploty 45, 50 a 55 °C. Následně byla testována vhodná koncentrace 1,4-butandiolu nejprve na dvou médiích, M1 a M2 (Tabulka 12), kdy koncentrace 1,4-butandiolu byla 4, 8, 12 a 16 g/l. Kultivace probíhala po dobu 72 hodin při teplotě 50 °C. Po zúžení rozsahu koncentrace 1,4-butandiolu byly testovány ještě koncentrace 3, 4, 5, 6, 7 a 8 g/l 1,4-butandiolu. Při kultivaci bylo použito médium M2 a kultivační teplota byla 45 °C. Za účelem zvýšení množství biomasy byla také testována směs glycerolu a 1,4-butandiolu. Výběr vhodné koncentrace glycerolu probíhal v minerálním médiu M2 a kultivační teplotě 45 °C. Jako zdroj uhlíku byly použity 4 g/l 1,4-butandiolu a 2, 4, 6, 8 a 20 g/l glycerolu.

Dalším testovaným parametrem bylo zvýšení osmotického tlaku, kdy do minerálního média M2 byl přidán chlorid sodný o koncentracích 10, 20 a 30 g/l a zároveň byla provedena kultivace bez chloridu sodného. Jako zdroj uhlíku byla použita směs 1,4-butandiolu s glycerolem o koncentraci 4+4 g/l.

Tvorba terpolymeru probíhala v minerálním médiu M2 při 45 °C. Jako zdroj uhlíku byl použit 1,4-butandiol o koncentraci 4 g/l a směs 1,4-butandiolu s glycerolem o koncentraci 4+4 g/l. Prekurzor ve formě kyseliny valerové o koncentraci 2 g/l byl přidán před kultivací a po 24 hodinách kultivace, jak znázorňuje tabulka 17.

**Tabulka 17: Tvorba terpolymeru za využití 1,4-butandiolu, glycerolu a kyseliny valerové**

	Přídavek 2 g/l kyseliny valerové v čase kultivace	
	0 h	24 h
1,4-butandiol 4 g/l	0 h	24 h
1,4-butandiol 4 g/l + glycerol 4 g/l	0 h	24 h

### 3.8.4.2 Batch, fed-batch a repeated batch u izolátu H1

U izolátu *Aneurinibacillus* sp. H1 byla provedena kultivace ve vsádkovém módu (batch), kde probíhalo měření biomasy, PHA, optického zákalu a pH po 4 hodinách. Optický zákal byl měřen jako absorbance při vlnové délce 630 nm. Kultivace probíhala při 50 °C na minerálním

médiu M2 (Tabulka 12) a jako zdroj uhlíku byla použita směs 4 g/l 1,4-butandiolu a 2 g/l glycerolu.

Kromě batch kultivace byla také provedena fed-batch kultivace, které probíhala při 50 °C v minerálním médiu M2. Bylo provedeno pět různých variant původního zdroje uhlíku a příkrmu, přehled zobrazuje tabulka 18. Každých 24 hodin byl odebrán vzorek na stanovení biomasy, optické hustoty, PHA a souběžně bylo měřeno pH. Kultivace trvala 96 hodin a každých 24 hodin byl realizován přídavek příkrmu.

**Tabulka 18: Přehled počátečních zdrojů uhlíku a příkrmů ve fed-batch kultivaci bakterie *Aneurinibacillus* sp. H1**

	Počáteční zdroj uhlíku	Příkrm
<b>Kontrola</b>	4 g/l 1,4-butandiol + 2 g/l glycerol	bez příkrmu
<b>1. kultivační strategie</b>	4 g/l 1,4-butandiol + 2 g/l glycerolu	4 g/l 1,4-butandiol + 2 g/l glycerol
<b>2. kultivační strategie</b>	4 g/l 1,4-butandiol + 2 g/l glycerol	4 g/l 1,4-butandiol + 2 g/l glycerol + 0,5 g/l trypton
<b>3. kultivační strategie</b>	4 g/l 1,4-butandiol + 2 g/l glycerol	4 g/l 1,4-butandiol
<b>4. kultivační strategie</b>	10 g/l glycerol	4 g/l 1,4-butandiol

Repeated-batch kultivace byla provedena v minerálním médiu M2 (Tabulka 12) s 4 g/l 1,4-butandiolu a 2 g/l glycerolu jako zdrojem uhlíku. Kultivace trvala 44 hodin. Při testování množství inokula bylo při první vsádce zaočkováno 10 % (v/v) inokula. Při přechodu na další vsádku bylo z baňky odčerpáno určené množství profermentovaného média a následně přidáno stejné množství čerstvého média. Druhý batch byl zaočkován množstvím 10, 20 a 30 % (v/v) inokula. Kultivace druhé vsádky probíhala opět 44 hodin a v průběhu byly odebírány vzorky na měření optické hustoty, koncentrace biomasy a PHA a také bylo měřeno pH.

Následný repeated-batch byl proveden za stejných podmínek jako při výběru vhodného inokulačního poměru. První batch byl zaočkován 10 % (v/v) inokula, všechny následující vsádky byly zaočkovány 30 % (v/v) inokula. Kultivace jedné vsádky trvala 44 hodin a v průběhu kultivace byla měřena optická hustota, pH a koncentrace biomasy a PHA.

### **3.9. Kvantifikace a charakterizace PHA**

#### **3.9.1. Gravimetrické stanovení sušiny**

Vždy bylo odebráno dvakrát 10 ml kultury do centrifugačních zkumavek. Kultura byla centrifugována při 6000 rpm po dobu 5 minut. Poté byl odlit supernatant (při některých kultivacích uchován pro další stanovení), biomasa byla rozsuspendována v destilované vodě a kultura byla opět centrifugována. Po odlití promývací vody byla biomasa sušena do konstantní hmotnosti.

#### **3.9.2. Stanovení PHA pomocí plynové chromatografie**

Suchá biomasa byla zvážena na analytických vahách a bylo odváženo 8 až 11 mg biomasy do krimpovacích vialek pro stanovení PHA. Do vialek byl přidán 1 ml chloroformu a 0,8 ml esterifikační směsi s vnitřním standardem (15% kyselina sírová v methanolu s 5 mg/ml kyseliny benzoové). Vialky byly hermeticky uzavřeny, následná esterifikace probíhala při 94 °C tři hodiny. Poté byl obsah vialek smíchán s 0,5 ml 0,05 M NaOH, kde došlo k neutralizaci kyseliny a oddělení fází. Ze spodní chloroformové fáze bylo odpipetováno 50 µl do 900 µl chloroformu v čisté vialce. Takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem. Byla použita kolona TG-WAXMS (Thermo Scientific, délka 30 m, I.D. 0,32 mm, šířka filmu 0,5 µm), jako nosný plyn byl použit dusík s konstantním průtokem 2 ml/min. Stejným postupem byla také připravena kalibrační křivka z čistého polymeru, která byla nově připravována pro každé měření.

#### **3.9.3. Extrakce PHA ze suché biomasy a charakterizace materiálu**

Pro extrakci PHA ze suché biomasy byla celková biomasa z produkce usušena do konstantní hmotnosti. Poté bylo přibližně 0,2 g biomasy převedeno do zkumavek, do kterých bylo přidáno 10 ml chloroformu. Zkumavky byly hermeticky uzavřeny a inkubovány v termobloku při teplotě 70 °C 8 hodin. Po ochlazení byla suspenze přefiltrována, aby došlo k odstranění přebytečné biomasy. Filtrát byl převeden na Petriho misku, kde došlo k odpaření rozpouštědla a k tvorbě PHA fólie. Takto připravené fólie byly uchovávány v temnu a suchu.

##### **3.9.3.1 Stanovení molekulové hmotnosti pomocí SEC-MALS**

Čisté fólie PHA byly rozpuštěny v chloroformu při 70 °C, koncentrace se pohybovala okolo 5 mg polymeru na 1 ml rozpouštědla. Po rozpuštění fólie byl roztok přefiltrován a uzavřen do vialky. Analýza molekulové hmotnosti probíhala na přístroji SEC-MALS-dRI s průtokem 0,6 ml/min chloroformu na PL gel mixed-C koloně.

##### **3.9.3.2 FTIR analýza čistých polymerů**

Analýza spekter PHA fólií probíhala pomocí ATR-FTIR, technikou zeslabeného úplného odrazu infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací. Spektra byla pořizena

spektrometrem iS50 FTIR z povrchu vzorku při laboratorní teplotě na zabudovaném krystalu. Absorpční spektra byla získána jako průměr šestnácti skenů s rozlišením  $1 \text{ cm}^{-1}$ .

### 3.9.3.3 Termická analýza

Termická analýza PHA fólií byla provedena pomocí diferenční skenovací kalorimetrie (DSC Q2000). Měření probíhalo pod dynamickou dusíkovou atmosférou v hermeticky uzavřených hliníkových celách. Vzorky o hmotnosti přibližně  $5 \mu\text{g}$  byly nejprve stabilizovány při teplotě  $200 \text{ }^\circ\text{C}$ . Následně byly vzorky ochlazovány s rychlostí  $2 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ . Při  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  došlo opět ke stabilizaci přibližně 10 minut a poté byl stejnou rychlostí vzorek zahříván. Pro stanovení úbytku hmotnosti byl použit termogravimetrický analyzátor TGA Q5000 v teplotním intervalu  $25$  až  $600 \text{ }^\circ\text{C}$  s rychlostí zahřívání  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  za minutu v dynamické atmosféře suchého vzduchu.

### 3.9.3.4 Mikroskopické stanovení PHA

Pro detekci PHA pod fluorescenčním mikroskopem byl 1 ml kultury stočen při 4 000 rpm po dobu 5 minut a poté byl sediment rozsuspendován ve vytemperovaném PBS pufru. Po opětovném stočení byl znovu přidán 1 ml vytemperovaného PBS pufru a bylo přidáno  $0,5 \mu\text{l}/\text{ml}$  fluorescenční sondy BODIPY o koncentraci  $1 \text{ mg}/\text{ml}$  DMSO. Po inkubaci byl vzorek pozorován na fluorescenčním mikroskopu MicroTime 200 (Picoquant GmbH, DE).

V některých případech byly vzorky zaslány externím spolupracujícím pracovištím k analýze pomocí cryo-rastrovací elektronové mikroskopie (Ústav přístrojové techniky AV ČR, v.v.i.) případně transmisní elektronové mikroskopie (Biologické centrum AV ČR, v.v.i.).

## 3.10. Další použité analytické metody

### 3.10.1. Spektrofotometrické stanovení zbytkového glycerolu

Zbytkový glycerol byl stanoven ze supernatantu. Stanovení probíhalo kombinací reakcí Malaprade a Hantzsch [133]. Pro stanovení bylo nutné připravit roztok činidla I, který obsahoval  $18 \text{ mg}/\text{ml}$  jodistanu sodného a  $77 \text{ mg}/\text{ml}$  acetátu amonného v 10% kyselině octové. Roztok činidla II se skládal z 1% acetylacetonu v isopropylalkoholu. Na mikrotitrační desku bylo napipetováno  $40 \mu\text{l}$  vzorku supernatantu. Poté bylo přidáno  $40 \mu\text{l}$  roztoku činidla I. Po 10 minutách inkubace bylo přidáno  $125 \mu\text{l}$  roztoku činidla II. Deska byla promíchána. Absorbance byla měřena při  $410 \text{ nm}$  po 25 minutách. Zbytkový glycerol byl vypočítán podle následující rovnice (1):

$$\text{Zbytkový glycerol} \left[ \frac{\text{mg}}{\text{l}} \right] = \frac{\Delta A_{\text{vzorek}(25 \text{ minut}-15 \text{ minut})} - \Delta A_{\text{blank}(25 \text{ minut}-15 \text{ minut})}}{\text{přímka lineární regrese} \left[ \frac{\text{l}}{\text{mg}} \right]}. \quad (1)$$

Vzorky byly vždy vhodně naředěny a byly měřeny ve dvou opakováních. Místo vzorku byla do blanku použita voda. Kalibrační řada byla připravena pomocí čistého glycerolu, stejným způsobem jako vzorky.



### 3.10.2. Stanovení zbytkového glycerolu a 1,4-butandiolu pomocí HPLC

Zbytkový glycerol a 1,4-butandiol byl stanoven pomocí HPLC s refraktometrickou detekcí (soustava SHIMADZU). Pro kalibrační řadu byla připravena směs o koncentraci 5 g/l glycerolu a 5 g/l 1,4-butandiolu. Po vhodném naředění byly vzorky či kalibrační roztok nastříknuty na kolonu (Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid). Mobilní fázi tvořil roztok kyseliny sírové o koncentraci 0,005 M. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml/min. Teplota na koloně byla 50 °C a teplota na detektoru 40 °C.

### 3.11. Molekulární metody

#### 3.11.1. Izolace DNA

Izolace DNA byla prováděna buď z tekutých kultur, nebo z kultur na agarových plotnách. Pro izolaci DNA z kultur narostlých na agarových plotnách byla odebrána jedna kolonie kultury, která byla rozsuspendována ve 100 µl sterilního lyzačního pufru (5 mM TrisHCl pufr, pH 8,5). Následně byla mikrozkuhavka inkubována po dobu 10 minut. Pro mezofilní mikroorganismy byla inkubační teplota pro izolaci DNA 90 °C. Pro termofilní mikroorganismy musela být teplota lyze nejprve optimalizována. Jako nejvhodnější teplota byla vybrána teplota 98 °C, která poskytovala nejvyšší výtěžky a čistotu DNA. Po inkubaci byl obsah mikrozkuhovek centrifugován při 7 378 × g po dobu 10 minut. Poté byl supernatant obsahující DNA přepipetován do čisté sterilní mikrozkuhavky a uchován při –30 °C pro další použití. Koncentrace a čistota DNA byla stanovena spektrometricky.

Pro izolaci DNA z tekutého média byl postup obdobný. Do sterilní mikrozkuhavky byla odebrána kultura z tekutého média. Množství odebrané kultury záviselo na koncentraci biomasy. Mikrozkuhavka s kulturou byla centrifugována 6 000 rpm, 5 minut. Supernatant byl sterilně odebrán a kultura byla promyta v PBS pufru. Po centrifugaci a odebrání supernatantu bylo přidáno 100 µl sterilního lyzačního pufru a sediment byl rozsuspendován. Následný postup byl stejný jako u izolace DNA z kultur na agarových plotnách.

#### 3.11.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) byly amplifikovány vybrané úseky DNA. Multiplex PCR sloužila k detekci genů *16S rRNA*, sloužící k potvrzení bakteriální DNA a po sekvenaci k taxonomickému zařazení izolátů, a genu *phaC*, který kóduje PHA syntázu první třídy. K bližší charakterizaci PHA syntázy bylo používáno také několik dalších párů primerů, Tyto reakce již ale probíhaly samostatně. Pro detekci PHA syntáz bylo nejprve nutné navržení primerů (primery pro čtvrtou třídu poddruh *Aneurinibacillus*) či jejich dohledání v literatuře. Poté byla vypočítána annealingová teplota a provedena gradientová PCR pro optimalizaci nejvhodnějších podmínek PCR.

Směs pro multiplex PCR obsahovala 12,5 µl master mixu (One Taq™ Hot Start 2x Master Mix with Standard Buffer); 2,6 µl roztoku 25mM MgCl<sub>2</sub>; 1 µl 20x zředěného primeru (16S-F,

16S-R, G-D, G<sub>1</sub>R); 2 µl DNA; 3,9 µl PCR vody; celkový objem reakční směsi činil 25 µl. Kromě testovaných vzorků byla také připravena negativní kontrola, kde místo DNA byla přidána PCR voda, a pozitivní kontrola, kde jako matrice DNA byla použita DNA bakterie *Cupriavidus necator* H16 CCM 3726. Teplotní program znázorňuje tabulka 19. Detekce PCR produktů byla prováděna pomocí gelové elektroforézy za využití 2% agarózového gelu a TBE pufu.

**Tabulka 19: Teplotní program multiplex PCR**

	T [°C]	t [s]	počet cyklů
<b>1.</b>	94	30	1
<b>2.</b>	94	30	30
	55*	30	
	68	90	
<b>3.</b>	68	300	1
	4	60	

\*Annealingová teplota

PCR směs pro ostatní páry primerů obsahovala 12,5 µl master mixu (One Taq™ Hot Start 2x Master Mix with Standard Buffer); 2 x 1 µl 20x zředěného příslušného primeru; 2 µl DNA; 8,5 µl PCR vody; celkový objem reakční směsi činil 25 µl. Také byla provedena negativní kontrola, které neobsahovala DNA matrici, a pozitivní kontrola, která obsahovala DNA matrici příslušné bakterie. Teplotní program PCR byl stejný jako v případě multiplex PCR (Tabulka 19), lišil se pouze v annealingových teplotách. Přehled annealingových teplot příslušných primerů a pozitivních kontrol znázorňuje tabulka 20.

**Tabulka 20: Přehled použitých primerů**

<b>Cílový gen</b>	<b>Označení primeru</b>	<b>Sekvence primeru</b>	<b>Velikost amplikonu [bp]</b>	<b>Annealingová teplota[°C]</b>	<b>Pozitivní kontrola</b>
<b>16S rRNA [134]</b>	16S-F	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1500	55	<i>Cupriavidus necator</i> H16 CCM 3726
	16S-R	GGTTACCTTGTTACGACTT			
<b>PHA syntáza třídy I [52]</b>	G-D	GTGCCGCCSYRSATCAACAAG T	551	55	<i>Cupriavidus necator</i> H16 CCM 3726
	G1R	GTTCCAGWACAGSAKRTCAGAA			
<b>PHA syntáza třídy II [52]</b>	E1D	GGAGCGTCGTAGATGAGTAACAAGAA	1965	62	<i>Pseudomonas putida</i> KT 2440 DSM 6125
	E1R	AGGTTGGCGCCGATGCCGTTGAA			
<b>PHA syntáza třídy IV [34]</b>	PhaBm-F	CGTGCAAGAGTGGGAAAAAT	1000	55	<i>Bacillus megaterium</i> CCM 2037
	PhaBm-R	TCGCAATATGATCACGGCTA			
<b>PHA syntáza třídy IV [58]</b>	PhaBc-F	CTTGGTTAYTGCATGGGNGGAAC	500	55	<i>Bacillus cereus</i> CCM 2010
	PhaBc-R	ACTTGRYRKGGCANDGCRATRTGAT			
<b>PHA syntáza třídy IV</b>	phaC_F	ACACTGGGTATCATTCCACCGG	299	65	<i>Aneurinibacillus</i> sp. H1 CCM 8960
	phaC_R	GCGGCAATGTTTAGCACGTTTG			

### 3.11.3. Sekvence

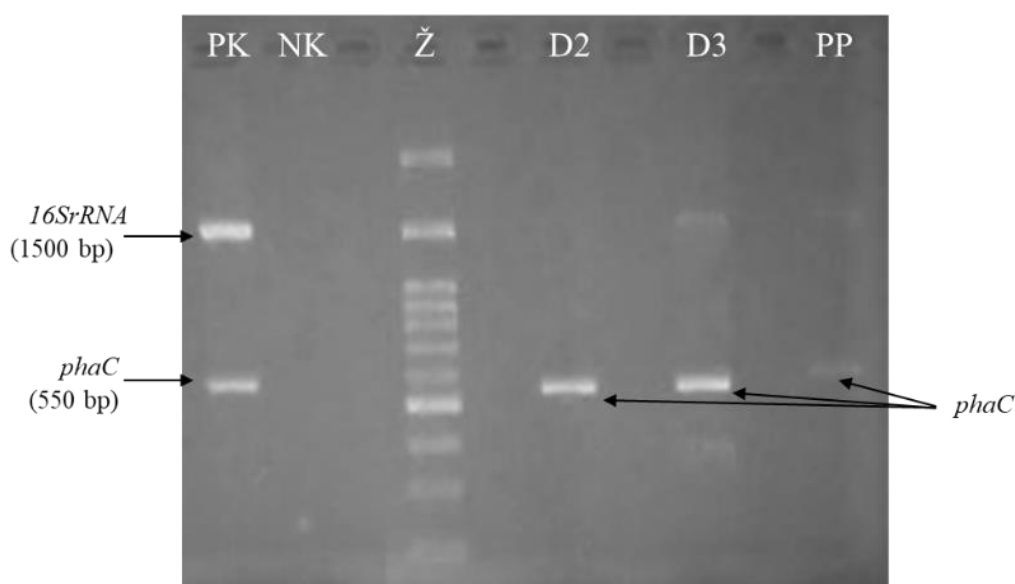
Pro sekvenaci výsledného amplikonu (nejčastěji amplikon *16S rRNA*) byla použita PCR směs ve dvojnásobném množství vždy s příslušným primerem a daným teplotním programem. Po amplifikaci byl výsledný amplikon detekován pomocí agarózové elektroforézy a následně přečištěn pomocí komerčního kitu NucleoSpin Gel a PCR Clean-up kitu a zaslán na sekvenaci firmě SEQme s.r.o. Po sekvenaci a úpravě byla data vyhodnocena pomocí programu BLAST NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## 4. VÝSLEDKY A DISKUSE

### 4.1. Produkce mcl-PHA pomocí bakterií rodu *Pseudomonas*

Schopnost produkovat PHA byla studována u třech bakterií rodu *Pseudomonas*. Jednalo se o sbírkový kmen *Pseudomonas putida* KT2440 DSM 6125 a dva izoláty z půdy zamořené ropou, které byly dodány firmou Dekonta, a.s., a po sekvenaci malé ribozomální podjednotky klasifikovány jako *Pseudomonas gessardii* (D2 – označení izolátu) a *Pseudomonas fulva* (D3 – označení izolátu). Pro bakterie rodu *Pseudomonas* je typická produkce polyhydroxyalkanoátů se středně dlouhým řetězcem monomeru neboli mcl-PHA. Také pro mcl-PHA platí, že je lze vyrobit z obnovitelných zdrojů, jsou biokompatibilní a jsou plně rozložitelné. Avšak oproti PHA s krátkým řetězcem mají nižší krystalinitu, nižší teplotu skelného přechodu a vyšší tažnost, což z nich dělá elastomerní polymery. Jejich aplikační potenciál je široký a tkví ve využití jejich elastomerních vlastností v medicíně či farmaceutickém průmyslu [135; 136].

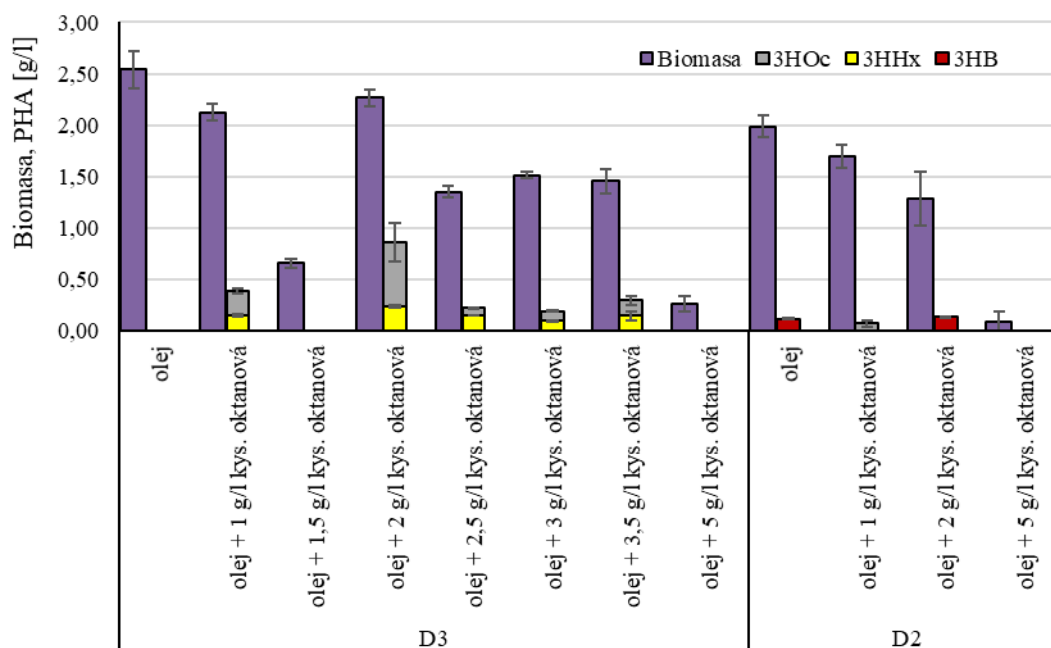
Nejprve byla schopnost akumulace PHA detekována na úrovni genotypu, kde byla prokázána přítomnost PHA syntázy u všech testovaných kmenů (Obrázek 12). V následném testu byla identifikována jako PHA syntáza druhé třídy, které je typická právě pro bakterie rodu *Pseudomonas*.



**Obrázek 12: Detekce PCR produktů multiplex PCR. Stanovení genů *16S rRNA* a PHA syntázy první a druhé třídy. PK – pozitivní kontrola (*Cupriavidus necator* H16), NK – negativní kontrola, Ž – žebříček, D2 – izolát (*Pseudomonas gessardii*), D3 – izolát (*Pseudomonas fulva*), PP – *Pseudomonas putida* KT 2440**

Po důkazu schopnosti produkovat PHA na úrovni genotypu, byla tato schopnost ověřena i na úrovni fenotypu. Původní myšlenka produkce mcl-PHA byla založena na produkci polyhydroxyalkanoátů na odpadním oleji s přidavkem kyseliny oktanové jako prekurzoru mcl-PHA. Proto byla nejprve otestována schopnost izolátů D2 a D3 růst na oleji, jako jediném zdroji uhlíku pomocí testu na agarových plotnách se Spirit Blue agarem. Při schopnosti

utilizace oleje vzniká okolo narostlé kolonie odbarvená zóna. Oba izoláty byly schopny olej využít.

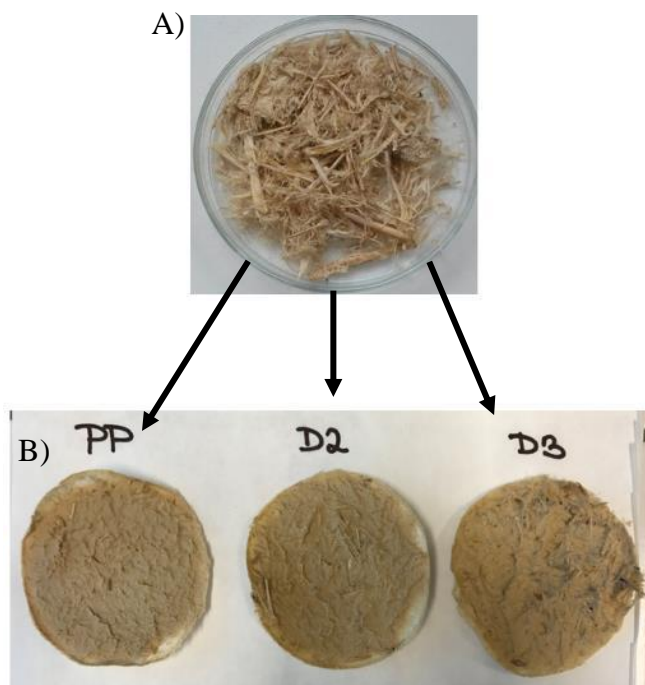


**Obrázek 13: Testování produkce mcl-PHA na oleji s kyselinou oktanovou.** Graf závislosti biomasy a PHA v g/l na jednotlivých koncentracích kyseliny oktanové. Koncentrace oleje byla 20 g/l. Kyselina oktanová byla do média přidána po 24 h kultivace v dané koncentraci. Data měřena po 72 h kultivace. D2 – *Pseudomonas gessardii*; D3 – *Pseudomonas fulva*; 3HB – 3-hydroxybutyrát; 3HOc – 3-hydroxyoktanoát; 3HHx – 3-hydroxyhexanoát. Výsledná data jsou uvedena jako průměr naměřených hodnot, chybová úsečka zobrazuje směrodatnou odchylku.

První testy ukázaly, že izolát D3 je schopen účinnější akumulace mcl-PHA, proto výběr vhodné koncentrace přídavku kyseliny oktanové byl v širší míře testován právě u izolátu D3 (Obrázek 13). Na samotném oleji byl nárůst bakteriální biomasy nejvyšší. Přídavek kyseliny oktanové působil při vyšších koncentracích inhibičně. Izolát D2 produkoval mcl-PHA při přídavku 1 g/l kyseliny oktanové, a to pouze v malé míře, pouze necelých 5 % hmotnosti suché biomasy. Na samotném oleji a s přídavkem 2 g/l kyseliny oktanové produkovala D2 pouze P(3HB), a to pouze do 10 % suché biomasy. Izolát D3 byl schopen vyšší produkce mcl-PHA. Nejvyšších výtěžků mcl-PHA bylo dosaženo s přídavkem 2 g/l kyseliny oktanové. PHA tvořily téměř 40 % hmotnosti v suché biomase, se zastoupením okolo 70 mol % 3HOc (3-hydroxyoktanoát) a 30 mol % 3HHx (3-hydroxyhexanoát). Pro další experimenty byla vybrána koncentrace přídavku kyseliny oktanové 2 g/l k 20 g/l odpadního oleje po 24 hodinách kultivace.

Pro produkci PHA, lze využít také další odpad, který nemá již další uplatnění, a tím snížit výrobní cenu polymeru. Jednou z takových surovin je například odpadní kuřecí peří. Celosvětově se vyprodukuje několik milionů tun kuřecího peří z drůbežářského průmyslu, které nemá již další využití. Neošetřené kuřecí peří není příliš vhodné do krmiv nebo na kompostování a většinou končí ve spalovnách, což je neekonomické a také neekologické. Přitom peří je bohaté na bílkoviny a obsahuje až 91 %  $\beta$ -keratinu [137]. Neošetřené kuřecí peří bylo použito jako jediný zdroj uhlíku v minerálním médiu pro kultivace bakterií *Pseudomonas*

*putida* KT 2440 (PP), *Pseudomonas gessardii* (D2) a *Pseudomonas fulva* (D3). Kultivace probíhala sedm dní. Všechny tři testované bakterie byly schopny utilizace surového peří. Peří před kultivací a po kultivaci je zobrazeno na obrázku 14.



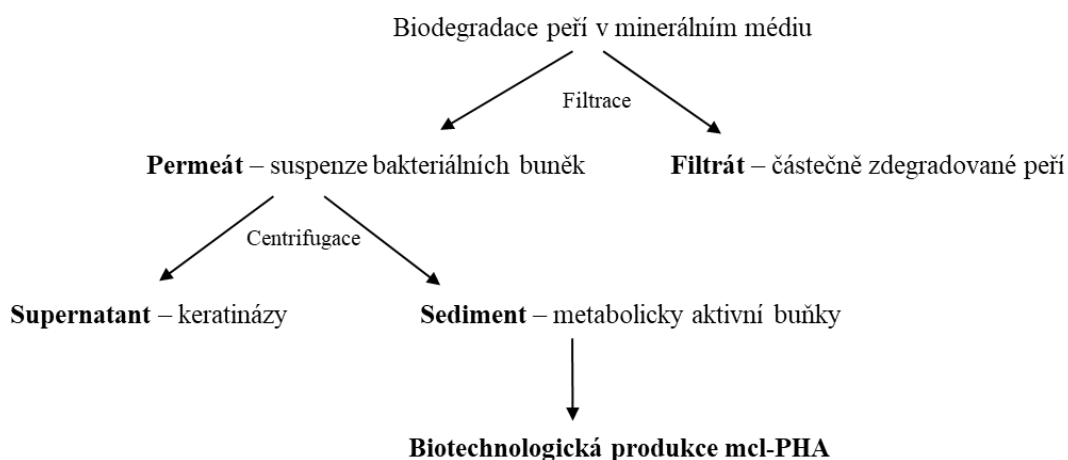
**Obrázek 14: Biodegradace neošetřeného odpadního kuřecího peří.** A) Neošetřené peří před degradací; B) Peří po degradaci v minerálním médiu po 7 dnech pomocí mikroorganismů (PP – *Pseudomonas putida* KT 2440; D2 – *Pseudomonas gessardii*; D3 – *Pseudomonas fulva*).

Během kultivace došlo ke značnému snížení objemu peří a vznikla kašovitá hmota, která by již mohla být lépe kompostovatelná. Během kultivace také došlo k hmotnostnímu úbytku peří, který je zaznamenán v tabulce 21. Peří je z velké části tvořeno proteiny, především alfa-keratinem, jedná se tedy o surovinu bohatou na dusík. Obecně platí, že akumulace PHA je indukována limitací dusíkem, proto během degradace peří nedošlo k žádné detekovatelné produkci PHA u žádné z testovaných bakterií.

**Tabulka 21: Test nárůstu biomasy v minerálním médiu s 20 g/l peřím jako jediným zdrojem uhlíku.** Celkový úbytek peří je vyjádřený v hmotnostních procentech. D2 – *Pseudomonas gessardii*, D3 – *Pseudomonas fulva*, PP – *Pseudomonas putida* KT 2440.

	Den kultivace	D2	D3	PP
<b>Biomasa [g/l]</b>	4. den	0,88 ± 0,03	0,41 ± 0,02	0,73 ± 0,02
	7. den	0,97 ± 0,01	0,50 ± 0,01	0,67 ± 0,01
<b>Celkový úbytek peří [hm. %]</b>	4. den	15,18	10,19	19,78
	7. den	21,94	15,13	28,03

Nárůst bakteriální biomasy na peří byl inspirací k zavedení dvoustupňové produkce mcl-PHA, kdy v prvním stupni (degradační) je bakteriální růst zprostředkován na neošetřeném kuřecím peří. Tato kultivace vede k degradaci peří, nakultivování bakteriální biomasy a k produkci keratináz a dalších proteináz, které lze eventuelně využít k dalšímu zpracování. Druhý stupeň kultivace je poté produkčním krokem vedoucím k syntéze mcl-PHA. Tuto myšlenku dvoustupňového procesu zobrazuje obrázek 15. Bakteriální kultura z degradačního kroku slouží k zaočkování minerální produkce s olejem. Ten slouží jako zdroj uhlíku a jde opět o využití odpadní suroviny. Po 24 hodinách kultivace je přidán prekurzor (2 g/l kyseliny oktanové) pro tvorbu mcl-PHA. Na základě předchozích dat, byla produkční fáze očkovaná kulturou po čtyřech dnech v degradační fázi. Celková degradační fáze trvala 7 dní, produkční fáze 72 hodin.

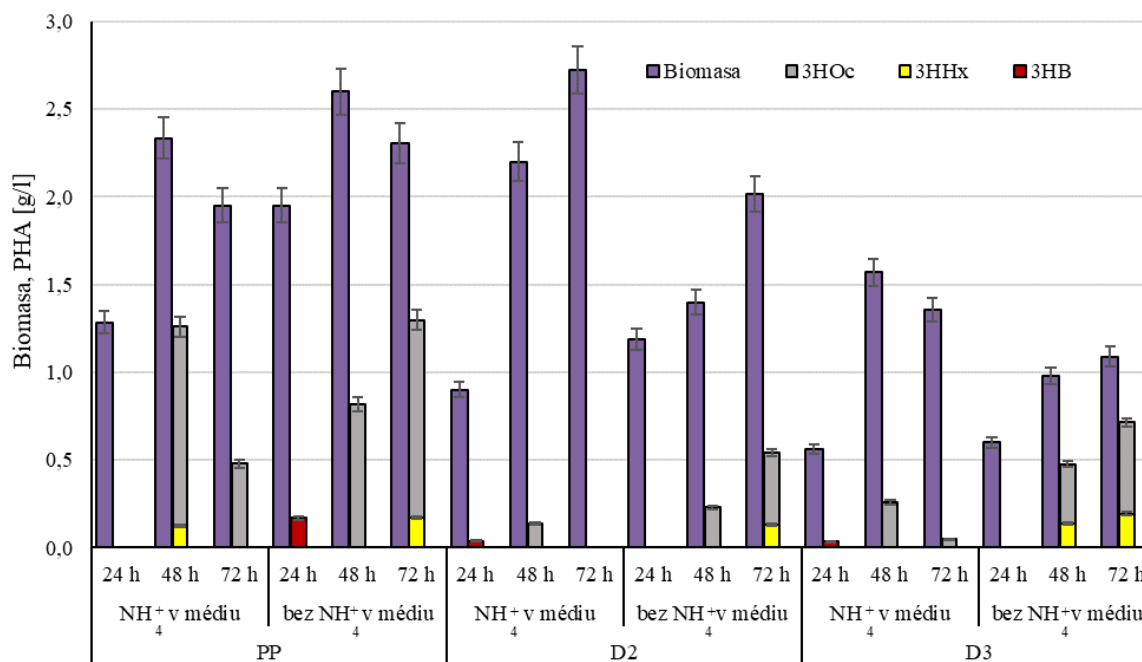


**Obrázek 15: Schéma produkce mcl-PHA za současného rozkladu peří a využití odpadního oleje**

Množství dusíku v produkčním médiu je důležitým faktorem pro produkci PHA. Proto byla následná produkce otestována v médiu jak s přidaným, tak bez přidaného dusíku. Využití kultivace bez přidaného dusíku bylo možné, protože většina bakteriální biomasy byla nakultivována při degradaci peří a v produkční fázi procesu nebyl významný růst bakterií nutný. Po 24 hodinách kultivace byla přidána kyselina oktanová. Během prvních 24 hodin došlo pouze k produkci PHA obsahujících 3HB (Obrázek 16), a to v malém množství u sbírkového kmene *Pseudomonas putida* v médiu bez přidaného dusíku a u izolátů D2 a D3 v médiu s přidaným dusíkem. Po 48 hodinách kultivace v produkčním médiu již byly akumulovány mcl-PHA. V případě bakterie *Pseudomonas putida* byla produkce mcl-PHA srovnatelná jak v míře naprodukovaného PHA, tak i ve složení kopolymeru, a to ve 48. h kultivace v médiu s přidaným dusíkem a po 72 hodinách v médiu bez dusíku. Produkce PHA se v obou případech pohybovala okolo 1,2 g/l, kde obsah 3HOc v polymeru se pohyboval okolo 90 mol. %. Produkce mcl-PHA u izolátů jednoznačně dosahovala vyšších výtěžků v médiu bez přídavku dusíku. U bakterie *Pseudomonas gessardii* (D2) byla nejvyšší produkce mcl-PHA po 72 h kultivace v médiu bez přidaného dusíku. Množství kopolymeru P(3-hydroxyhexanoát-co-3-hydroxyoktanoát) dosahovalo téměř 0,7 g/l se zastoupením 80 mol. % 3HOc. Produkce PHA u D3 (*Pseudomonas fulva*) dosahovala již v 48. hodině kultivace necelých 0,5 g/l, kde 3HHx byl obsažen přibližně v 30 mol. %. Při ukončení produkce činilo množství kopolymeru P(3-hydroxyhexanoát-co-3-



hydroxyoktanoát) 65 % hmotnosti suché biomasy. Zastoupení jednotlivých monomerů bylo necelých 30 mol. % 3HHx a 70 mol. % 3HOc.



**Obrázek 16: Produkce mcl-PHA pomocí dvojestupňové produkce.** Graf závislosti biomasy a PHA v g/l pro jednotlivé bakterie v průběhu času produkční fáze na rozdílném médiu. Médium s NH<sub>4</sub><sup>+</sup> obsahovalo 1 g/l síranu amonného, médium bez NH<sub>4</sub><sup>+</sup> neobsahovalo síran amonný. PP – *Pseudomonas putida* KT 2440; D2 – *Pseudomonas gessardii*; D3 – *Pseudomonas fulva*; 3HB – 3-hydroxybutyrát; 3HOc – 3-hydroxyoktanoát; 3HHx – 3-hydroxyhexanoát. Data jsou dána průměrem naměřených hodnot, chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku.

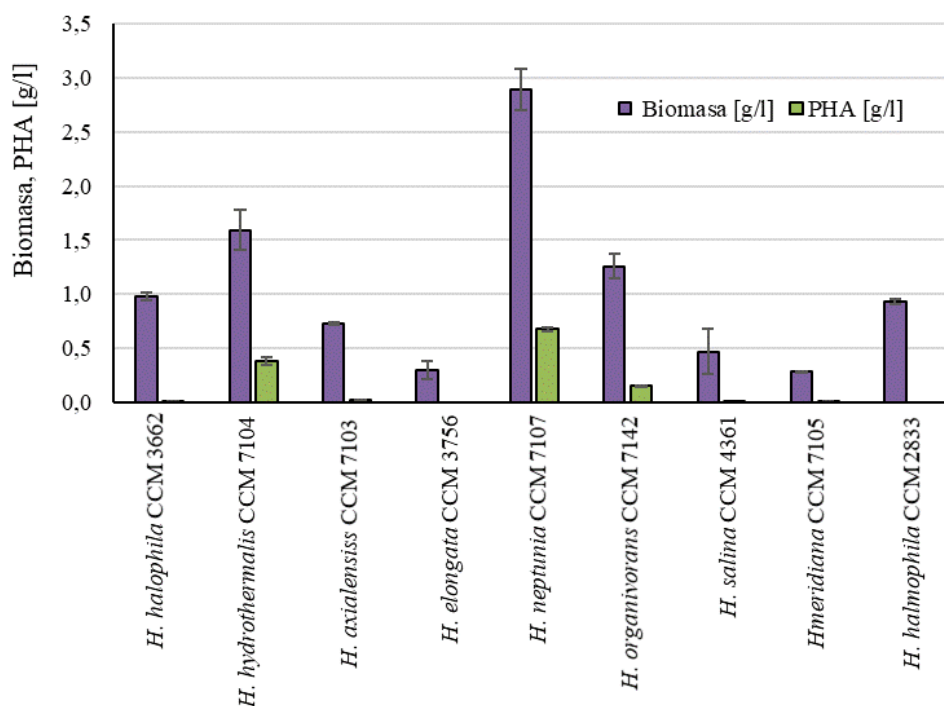
Spojení degradace peří a následné produkce PHA se ukázalo jako účinné. Tento postup spojuje využití dvou odpadních substrátů, které nemají již další využití, a navíc dochází k produkci polymeru, který je vhodnou alternativou k plastům vyrobených z ropy a je plně rozložitelný v přírodě. Přídavek kyseliny oktanové v koncentraci 2 g/l, se ukázal jako dostatečný pro podporu tvorby mcl-PHA, tak aby nedocházelo k inhibici růstu bakterií, jako tomu bylo u vyšších dávek tohoto prekursoru. Na produkci mcl-PHA po degradaci peří má také vliv přídavek dusíku do média. Vyšších výtěžků po 72 h kultivace bylo dosaženo v médiích bez přidaného dusíku. Článek věnovaný propojení degradace peří a výroby PHA pomocí bakterie *P. putida* je obsahem přílohy 10.1.

#### 4.2. Produkce PHA na odpadním fritovacím oleji pomocí vybraných zástupců rodu *Halomonas*

Prvními extrémofilními mikroorganismy, u nichž byla v rámci této disertační práce studována produkce PHA byly halofilní mikroorganismy. Jedná se o mikroorganismy, které se adaptovaly na vyšší osmotický tlak prostředí. Celkové využití halofilních bakterií v biotechnologickém průmyslu nese řadu výhod, mezi které patří především snížení nákladů biotechnologického procesu díky možnosti využití mořské vody, snížení rizika kontaminace či koprodukcce další využitelných metabolitů. Některé halofilní prokaryotní mikroorganismy jsou schopny produkce

polyhydroxyalkanoátů [138]. Podle některých studií se zdá, že schopnost produkce PHA je dokonce jednou ze strategií buněk, jak se vyrovnat s osmotickým tlakem prostředí a je tedy součástí adaptační strategie některých halofilů [69; 139]. Využití halofilních bakterií k produkci intracelulárního produktu, jako jsou právě PHA, nese i řadu výhod spojených například s izolací finálních produktů – bakteriální buňky je možné snadno dezintegrovat s využitím hypotonické lyze. Mezi halofilními mikroorganismy existuje celá řada producentů PHA, jako je například *Haloferax mediterranei* [140–142], *Halogeometricum borinquense* [143], *Yangia* sp. ND199 [78] nebo také halofilní *Bacillus megaterium* H16 [77]. Mezi další halofilní producenty PHA patří také bakterie rodu *Halomonas* [75; 76; 144]. Produkce PHA byla například popsána pro *Halomonas halophila* [74], *Halomonas bluephagenesis* [145; 146], *Halomonas boliviensis* [75; 147], *Halomonas campisalis* [148] či *Halomonas nitroreducens* [149]. Ve většině případů byl jako zdroj uhlíku pro produkci využit cukernatý substrát. Žádná práce se systematicky nevěnovala využití halofilních mikroorganismů k produkci PHA z odpadních olejů případně jiných lipidických substrátů. Přitom právě odpadní fritovací oleje a další levné/odpadní lipidické substráty jsou obecně považovány za velice slibné suroviny pro výrobu PHA [150]. Odpadní fritovací olej je vhodnou surovinou k produkci PHA například pomocí mezofilní bakterie *Cupriavidus necator* H16 [151].

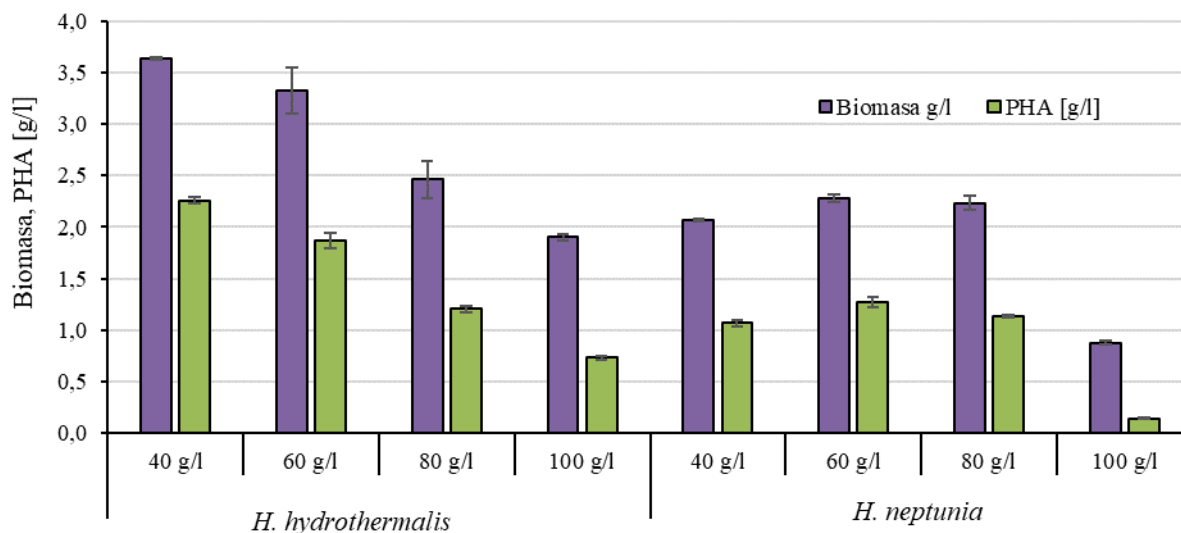
Z české sbírky mikroorganismů bylo vybráno 9 druhů rodu *Halomonas* a to *H. halophila* CCM 3662, *H. hydrothermalis* CCM 7104, *H. axialensis* CCM 7103, *H. elongata* CCM 3756, *H. neptunia* CCM 7107, *H. organivorans* CCM 7142, *H. salina* CCM 4361, *H. meridiana* CCM 7105 a *H. halmophila* CCM 2833. U bakterie *H. halophila* CCM 3662 byla již produkce PHA popsána [74], avšak její produkce PHA na oleji nebyla dosud studována. Vybrané druhy rodu *Halomonas* byly nejprve v rámci standardní baňkové kultivace testovány, zda jsou schopny využít olej a současně produkovat PHA (Obrázek 17).



**Obrázek 17: Screening vybraných druhů rodu *Halomonas* při kultivaci na oleji.** Koncentrace biomasy a PHA uvedena v g/l v závislosti na jednotlivém rodu bakterie. Výsledky kultivace jsou brány po 72 hodinách kultivace v produkčním médiu s 20 g/l oleje, chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku paralelních měření.

Z testovaných druhů byly schopny utilizace oleje a nárůstu biomasy na oleji jako jediném zdroji uhlíku všechny testované druhy. Avšak významnější produkce PHA na tomto zdroji uhlíku vykazovaly pouze tři, a to *H. hydrothermalis*, *H. neptunia* a *H. organivorans*. Obsahu PHA nad 20 % hmotnosti suché biomasy dosáhly pouze *H. hydrothermalis* (23,8 % PHA) a *H. neptunia* (23,4 % PHA). Tyto bakterie se na základě prvního screeningového experimentu jeví jako vhodné kandidáty na produkci PHA na oleji, proto u nich byla produkce PHA na odpadním fritovacím oleji dále studována a optimalizována.

Nejdříve vzhledem k jejich halofilnímu charakteru byla optimalizována koncentrace soli v minerálním médiu. Množství soli ovlivňuje nejen růst biomasy, ale také množství PHA. Testované koncentrace chloridu sodného byly 40, 60, 80 a 100 g/l, výsledky experimentu jsou prezentovány na obrázku 18.



**Obrázek 18: Vliv koncentrace soli na růst a produkci *H. hydrothermalis* a *H. neptunia*.** Graf závislosti biomasy a PHA uvedené v g/l na jednotlivých koncentracích chloridu sodného pro testované bakterie. Výsledky kultivace jsou brány po 72 hodinách kultivace v produkčním médiu s 20 g/l oleje, chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku paralelních měření.

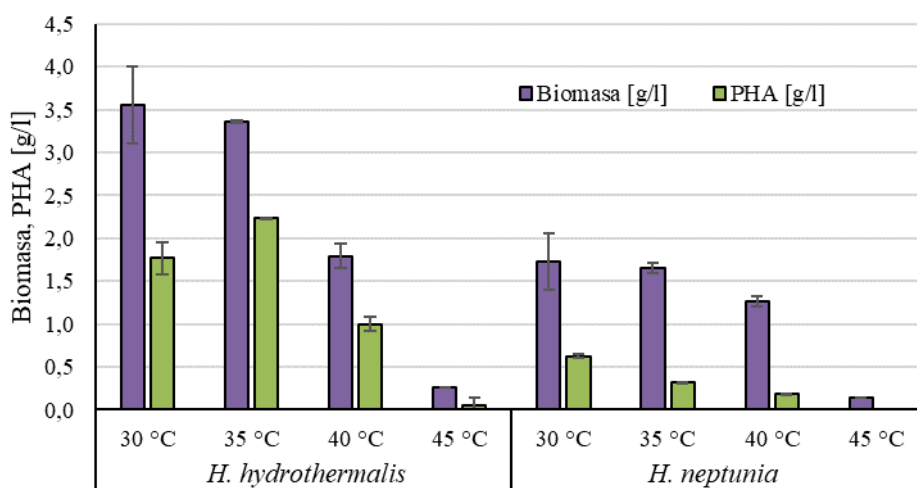
Při počátečním screeningu produkčního potenciálu halofilních bakterií, byla koncentrace chloridu sodného pro oba vybrané producenty shodná a to 81 g/l. Tuto koncentraci soli uváděla jako optimální Česká sbírka mikroorganismů (CCM), ze které byly bakterie pořízeny. Vliv koncentrace soli na nárůst biomasy a PHA je zřejmý u obou producentů. *H. hydrothermalis* dosahuje nejvyššího výtěžku biomasy i PHA u koncentrace soli 40 g/l (Obrázek 18), kdy PHA dosahovaly téměř 62 % hmotnosti suché biomasy. Bakterie *H. neptunia* dosahovala podobných nárůstů biomasy a výtěžků PHA při koncentracích 40, 60 a 80 g/l. Nejvyššího zastoupení PHA v biomase dosáhla při koncentraci chloridu sodného 60 g/l v minerálním médiu a to 55 % PHA hmotnosti suché biomasy. Pro další experimenty byly používány již koncentrace chloridu sodného 40 g/l pro *H. hydrothermalis* a 60 g/l pro *H. neptunii*.

Koncentrace soli v médiu neovlivňuje pouze množství PHA, ale také jejich molekulovou hmotnost [152]. Se snížením salinity u bakterie *H. hydrothermalis* roste nejen míra akumulace PHA, ale také molekulová hmotnost polymeru. Při koncentraci 40 g/l chloridu sodného byla molekulová hmotnost přibližně 381 kDa. Vyšší molekulová hmotnost je žádoucí při zpracování polymeru. Zato *H. neptunia* vykazovala výkyvy a nebylo možno zde najít korelaci mezi salinitou média a molekulovou hmotností polymeru. Nejvyšší molekulové hmotnosti dosáhla *H. neptunia* při koncentraci 100 g/l chloridu sodného a to 345,5 kDa. Přehled molekulových hmotností polymerů v průběhu změn koncentrace chloridu sodného znázorňuje tabulka 22. Vliv salinity na produkci a molekulovou hmotnost PHA je rozdílný pro každý daný druh bakterie a je pro ni charakteristický. Bakterie *Halomonas halophila* například vykazovala se zvyšující se salinitou rostoucí molekulovou hmotnost polymeru. Nejvyšší míry akumulace PHA bylo u *H. halophila* dosaženo při použití 60 g/l NaCl, kde se molární hmotnost polymeru pohybovala okolo 793 kDa. Nejnížší produkce PHA byla zaznamenána při koncentraci 100 g/l, kde molekulová hmotnost polymeru byla nejvyšší, a to 810 kDa [74].

**Tabulka 22: Molekulová hmotnost polymeru v závislosti na salinitě.**  $M_w$  – molekulová hmotnost polymeru,  $\bar{D}$  – polydispersita.

	NaCl [g/l]	$M_w$ [kDa]	$\bar{D}$
<i>H. hydrothermalis</i>	40	381,77	1,17
	60	381,29	1,22
	80	262,39	1,19
	100	245,15	1,28
<i>H. neptunia</i>	40	284,93	1,18
	60	293,10	1,26
	80	230,78	1,21
	100	345,47	1,16

Dalším optimalizovaným parametrem, který má vliv na růst biomasy a akumulaci PHA, je teplota. Testované teploty byly 30 °C, což byla i teplota doporučená sbírkou mikroorganismů, dále teploty 35, 40 a 45 °C, jelikož se jedná o bakterie původně izolované z hydrotermálních mořských prúdů [153], a je proto možné předpokládat, že jsou schopné tolerovat i vyšší teploty. Výsledky jsou uvedeny na obrázku 19.

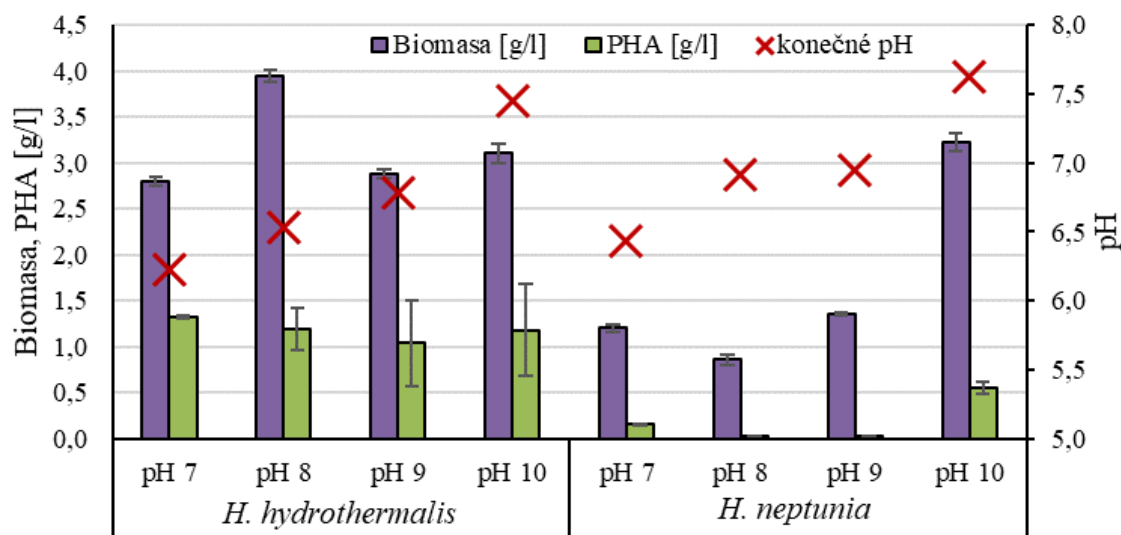


**Obrázek 19: Vliv teploty na růst biomasy a produkci PHA bakterií *H. hydrothermalis* a *H. neptunia*.** Kultivace za daných podmínek probíhala 72 h na 20 g/l oleje jako jediného zdroje uhlíku. Výsledná data jsou dána průměrem hodnot, chybová úsečka zobrazuje směrodatnou odchylku jednotlivých měření.

Bakterie *H. hydrothermalis* byla schopna růstu při všech testovaných teplotách, avšak nejvyššího buněčného nárůstu dosahovala při teplotách 30 a 35 °C. Produkce PHA při 30 °C byla téměř 50 % hmotnosti suché biomasy, tedy přibližně 1,7 g/l. Při 35 °C byl buněčný nárůst

nepatrně menší, avšak PHA dosahovalo téměř 67 % hmotnosti suché biomasy, tedy 2,23 g/l PHA. Při vyšších teplotách docházelo k menšímu nárůstu biomasy i PHA, při 45 °C byl nárůst buněk výrazně menší a nepřekročil hranici 0,3 g/l biomasy, avšak stále docházelo k produkci PHA, byť zanedbatelnému. Na druhou stranu bakterie *H. neptunia* při této teplotě nedokázala PHA vůbec akumulovat, ale také narostla ve všech testovaných teplotách. Nejvyšší buněčný nárůst byl při teplotě 30 °C, kdy množství PHA činilo přibližně 36 % suché hmotnosti buněk, které odpovídalo 0,62 g/l PHA.

Kromě teploty a salinity je dalším důležitým fyziologickým parametrem růstu také pH. Pro zvýšení buněčného nárůstu bylo optimalizováno také počáteční pH minerálního média. Samotné minerální médium se všemi komponenty a olejem jako zdrojem uhlíku má na počátku pH přibližně 7. Počáteční testované hodnoty pH byly 7, 8, 9 a 10. Úprava pH byla provedena před sterilizací média koncentrovaným hydroxidem sodným a pH bylo také změřeno na konci vsádkové kultivace. Výsledná data znázorňuje obrázek 20.

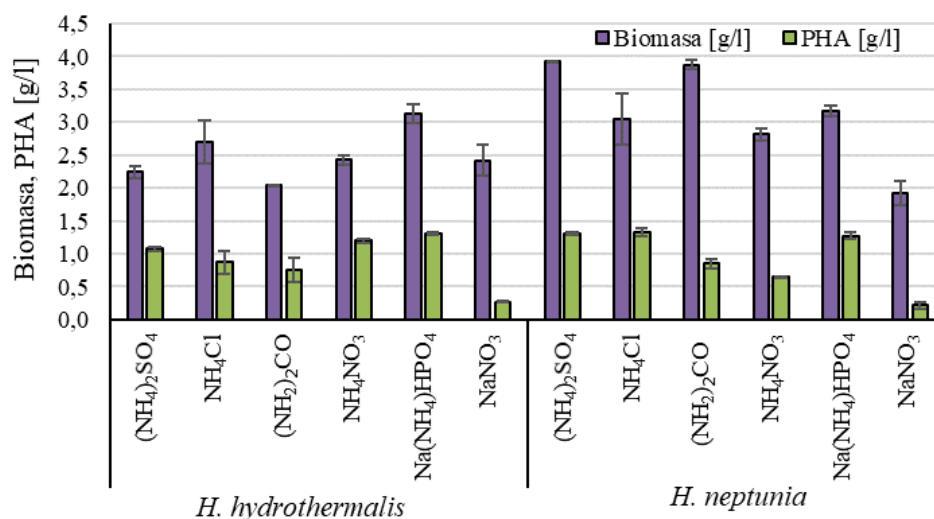


**Obrázek 20: Optimalizace pH na růst buněk a schopnosti akumulace PHA u vybraných druhů rodu *Halomonas*.** Kultivace probíhala 72 h při 30 °C. Na konci kultivace bylo změřeno konečné pH. Výsledná data jsou vyjádřena průměrem naměřených hodnot, chyba zobrazuje směrodatnou odchylku.

Bakterie *H. hydrothermalis* byla schopna růstu v celé škále testovaného počátečního pH, což naznačuje její mírně alkalofilní charakter, který je pro některé zástupce tohoto rodu typický [76]. Nejvyšší nárůst biomasy byl při počátečním pH 8, avšak vyšší schopnost akumulace PHA byla při pH 7. Konečné pH se pohybuje okolo neutrálního pH. Pro bakterii *H. neptunia* mělo zásadité pH pozitivní účinek. Paradoxně při počátečním pH 8 a 9, bylo zaznamenáno zanedbatelné množství PHA. Při nejvyšším testovaném pH byla akumulace PHA nejvyšší a dosahovala okolo 20 % suché hmotnosti buněk, tedy přibližně 0,5 g/l PHA.

Dalším důležitým faktorem nejen při růstu buněk, ale hlavně při produkci PHA je množství dusíkatého zdroje. Ovšem množství PHA také závisí na typu použitého dusíkatého zdroje. Nejdříve bylo testováno množství dusíku v minerálním médiu. Původní minerální médium obsahovalo 1 g/l síranu amonného. Byla porovnána produkce PHA při použití 1 g/l a 3 g/l síranu amonného. U obou bakterií měla zvýšená koncentrace dusíkatého zdroje neblahý vliv na růst

biomasy i množství naakumulovaného PHA. U bakterie *H. hydrothermalis* klesla výsledná biomasa téměř o 1 g/l, u *H. neptunii* dokonce při vyšším obsahu dusíku přesahoval rozdíl v nárůstu biomasy 1 g/l. Následné testování zdrojů dusíku, proto probíhalo v koncentraci 1 g/l (Obrázek 21). Testovány byly následující anorganické soli – síran amonný, chlorid amonný, dusičnan amonný, hydrogenfosforečnan amonno-sodný či dusičnan sodný; a z organických látek močovina.

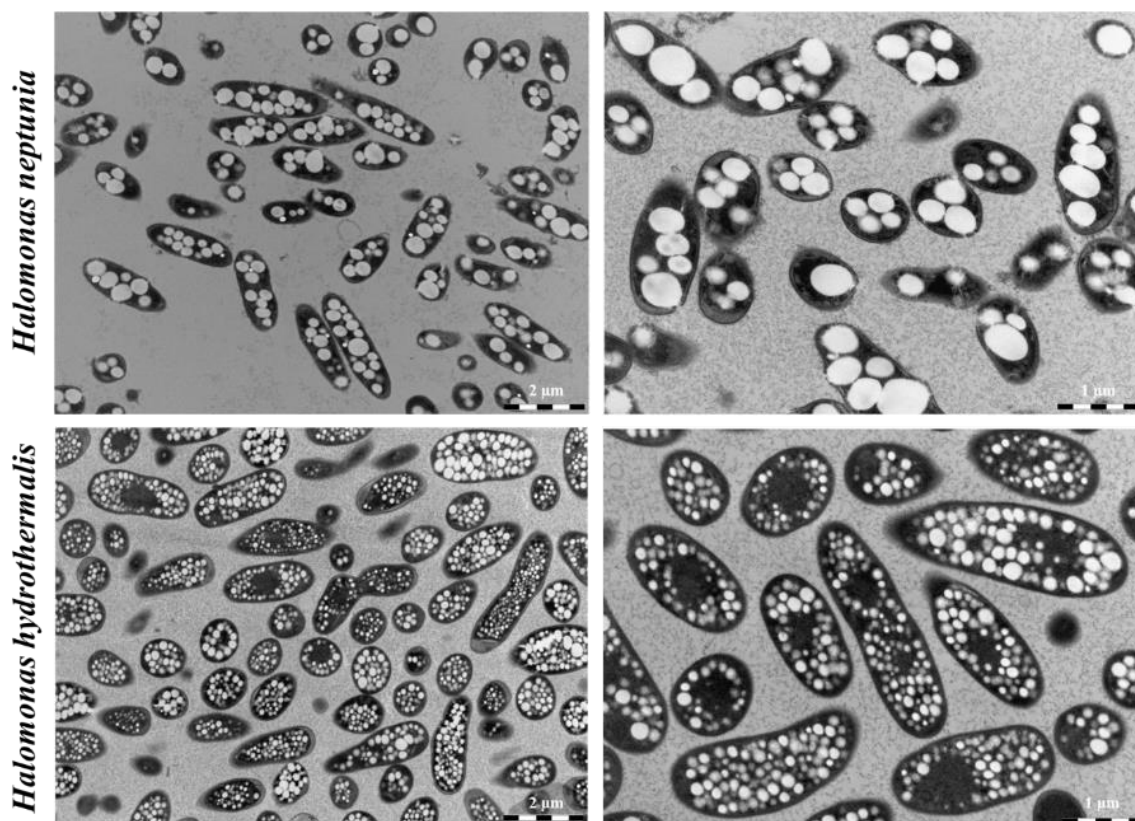


**Obrázek 21: Vliv zdroje dusíku na buněčný nárůst a produkci PHA.** Kultivační podmínky byly 72 h, 20 g/l oleje; *H. hydrothermalis*: 40 g/l NaCl, 37 °C, počáteční pH 8; *H. neptunia*: 60 g/l NaCl, 30 °C, počáteční pH 10. Výsledná data zobrazují průměrnou hodnotu, chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku.

Vliv dusíkatého zdroje byl testován při optimalizovaných parametrech kultivace pro obě bakterie. Použitý zdroj dusíku měl vliv na nárůst bakterie *H. hydrothermalis*. Vyšších hodnot biomasy a PHA bylo dosaženo při použití dusičnanu amonného a hydrogenfosforečnanu amonno-sodného. Biomasa při použití hydrogenfosforečnanu činila 3,13 g/l s 42 % PHA v suché hmotnosti buněk, tedy 1,31 g/l PHA. Zatím co při použití dusičnanu amonného byla celková biomasa 2,43 g/l s 50 % PHA, což činilo 1,2 g/l PHA. Pro bakterii *H. neptunia* bylo při použití třech zdrojů dusíku dosaženo podobných hodnot akumulace PHA, a to u síranu amonného (1,20 g/l PHA), chloridu amonného (1,31 g/l PHA) a hydrogenfosforečnan amonno-sodného (1,27 g/l).

Morfologie buněk s naakumulovaným PHA byla následně analyzována pomocí transmisního elektronového mikroskopu (TEM). Obě kultury obsahují intracelulární granule PHA (Obrázek 22). Vzhled uspořádání granulí v buňce *H. neptunia* je typický pro PHA produkující bakterie a je srovnatelný s dalšími producenty [139]. Buňky obsahují menší množství, přibližně 5 až 10, větších granulí PHA. Zato morfologie buněk *H. hydrothermalis* je zcela odlišná. Buňky obsahují vysoký počet menších granulí.

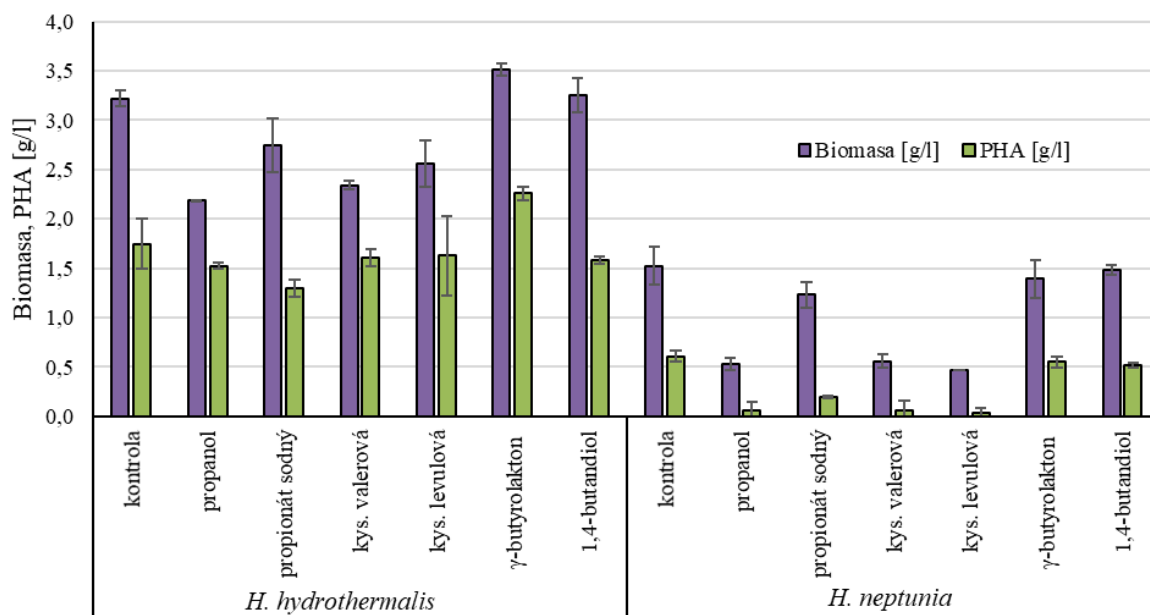




**Obrázek 22: TEM analýza morfologie buněk a PHA granulí pro bakterie *H. hydrothermalis* a *H. neptunia*. Kultivace 72 h na oleji jako jediném zdroji uhlíku.**

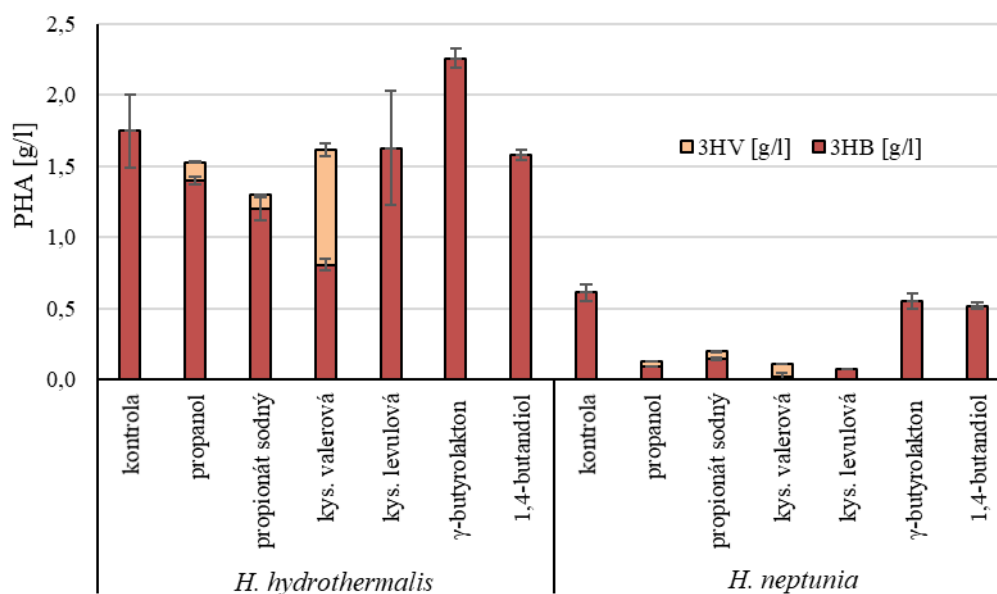
Kromě optimalizace produkčních podmínek, byla také testována schopnost produkce kopolymerů obsahujících kromě 3HB také další monomerní jednotky. Přidání vhodných strukturních prekurzorů do minerálního média může vést k zabudování alternativních monomerů do polymerního řetězce. Takto připravené materiály mohou poskytovat lepší technologické či mechanické vlastnosti než samotný homopolymer. Zařazení 3-hydroxyvalerátu (3HV) do struktury polymeru snižuje tuhost, teplotu tání či krystalinitu samotného P(3HB) [154]. Dalším zajímavým monomerem, který významně mění vlastnosti polymeru, je 4-hydroxybutyrát (4HB). Pro indukci syntézy kopolymeru poly(3-hydroxybutyrát-*co*-4-hydroxybutyrát) byly jako prekurzory 4HB testovány  $\gamma$ -butyrolakton a 1,4-butandiol. Výsledky experimentu jsou předmětem obrázku 23.





**Obrázek 23: Posouzení schopnosti tvorby kopolymeru.** Závislost biomasy a PHA uvedené v g/l na přidaných prekurzorech. Kontrola neobsahovala žádný prekurzor. Všechny testované vzorky obsahovaly 20 g/l oleje, kultivace probíhala při počátečním pH 7, 30 °C, 72 h. Výsledky jsou dány průměrem hodnot, chybová úsečka zobrazuje směrodatnou odchylku.

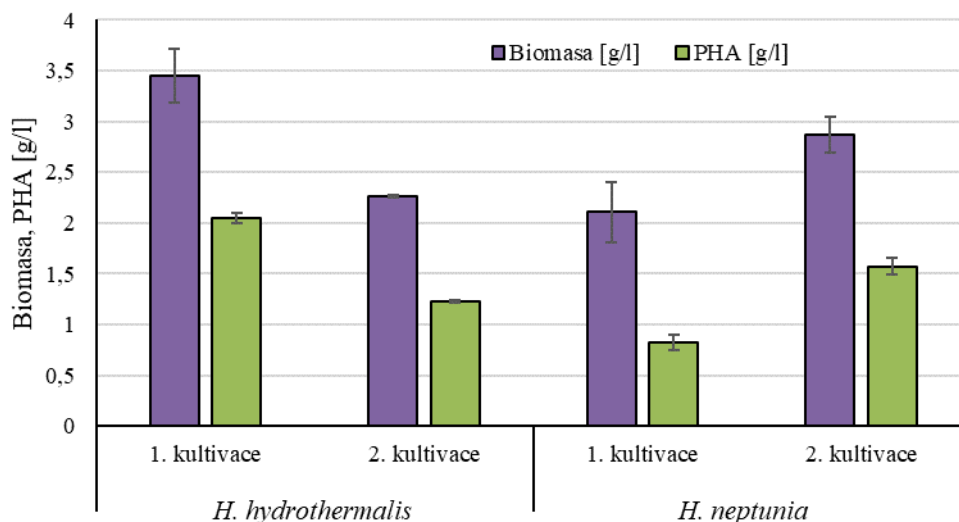
Žádný z použitých prekurzorů neměl příliš negativní efekt na růst bakterií. Biomasa bakterie *H. hydrothermalis* za využití  $\gamma$ -butyrolaktonu a 1,4-butandiolu byla dokonce vyšší než v kontrolní kultivaci. Při použití  $\gamma$ -butyrolaktonu byla zaznamenána i vyšší produkce PHA. U bakterie *H. neptunia* mělo použití  $\gamma$ -butyrolaktonu a 1,4-butandiolu podobný výsledek na růst biomasy i produkci PHA jako v kontrolním vzorku. Bohužel při použití  $\gamma$ -butyrolaktonu ani při aplikaci 1,4-butandiolu nedošlo k začlenění 4-hydroxybutyrátu do struktury polymeru. Ani jedna z bakterií tedy nebyla schopna tvořit kopolymer poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát).



**Obrázek 24: Jednotlivé složení homopolymeru či kopolymeru.** Graf závislosti PHA v g/l na použitém prekurzoru udává poměr zastoupených jednotek monomeru v g/l. Výsledky jsou dány průměrem hodnot, chybová úsečka zobrazuje směrodatnou odchylku.

Avšak obě bakterie byly schopny tvořit kopolymer poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát), což zobrazuje obrázek 24. *H. neptunia* byla schopna pouze omezené tvorby kopolymeru s přidávanými prekurzory (propanol, kyselina valerová a propionát sodný). Nicméně celková produkce PHA je velmi malá a nepřesahuje 0,2 g/l PHA, přičemž monomer 3HV nepřesahoval 10 % hmotnosti suché biomasy. Zato *H. hydrothermalis* byla schopna produkce kopolymeru na kyselině valerové v koncentraci 1,6 g/l PHA. Jednotlivé zastoupení monomerů bylo téměř ekvimolární. Díky inkorporaci 3-hydroxyvalerátu do polymeru je materiál flexibilnější, má například širší použití v medicínských aplikacích, ale také jako jednorázové předměty a obalový materiál v potravinářství [155]. Díky schopnosti produkce kopolymeru obsahující významnou frakci 3HV je *H. hydrothermalis* možné považovat za velice slibného halofilního producenta PHA s využitím odpadního fritovacího oleje jako základní vstupní suroviny.

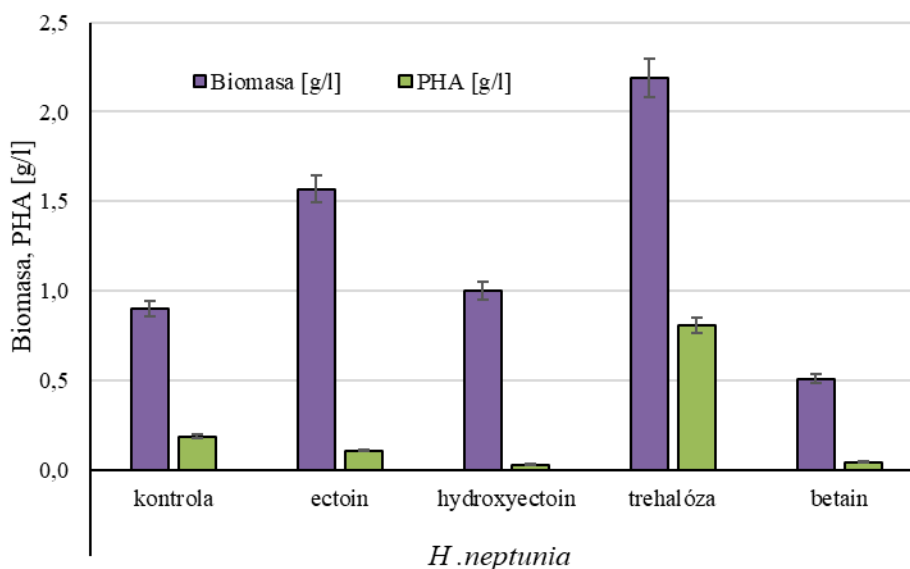
Základní strategií adaptace na hypertonické prostředí u středně halofilních mikroorganismů, mezi které patří i zástupci rodu *Halomonas*, je akumulace osmolytů. Jedná se o organické sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností rozpustné ve vodě [156]. Typické osmolyty jsou trehalóza, betain, nebo ectoiny. Bakterie obvykle akumulují směs těchto látek, přičemž jejich intracelulární koncentrace se může řádově pohybovat až v jednotkách molů na litr. Akumulace takto velkého množství osmolytů je však energeticky náročná, proto jsou buňky schopny přijmout a využít i osmolyty nacházející se v extracelulárním prostředí. V rámci dalšího experimentu jsme se tedy pokusili využít hypotonické lyze buněk k uvolnění osmolytů z buněčné biomasy a použít takto připravené osmolyty při přípravě média v následné kultivaci. Takovéto inovativní kultivační schéma by bylo možné využít jak k izolaci osmolytů pro navýšení produktivity následné kultivace, tak k izolaci PHA. Výsledky pilotního experimentu ověřující naši hypotézu jsou prezentovány na obrázku 25.



**Obrázek 25: Produkce PHA za využití recyklace supernatantu.** První generace produkce probíhala standardním způsobem. Médium pro druhou generaci (kultivaci) bylo připraveno ze supernatantu po lyzi buněk z první kultivace. Výsledná data jsou dána průměrnou hodnotou, chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku.

Osmolyty z první kultivace by měly usnadnit produkci PHA a celkové biomasy v druhé, následné kultivaci. Tento předpoklad se bohužel nepotvrdil u bakterie *H. hydrothermalis*, kde produkce biomasy i PHA v druhé kultivaci klesla. Celková koncentrace biomasy byla ve druhé kultivaci menší o více než 1 g/l, produkce PHA klesla z původních 2 g/l na 1,2 g/l. Supernatant použitý pro přípravu média pro druhou generaci nejspíše obsahoval nahromaděné metabolity, které negativně ovlivnily růst kultury během druhé kultivace. Avšak u bakterie *H. neptunia* se produkce PHA při použití recyklace supernatantu zvýšila oproti první kultivaci, i celkový nárůst biomasy byl vyšší. U druhé kultivace produkce PHA stoupla z původních 0,8 g/l na necelých 1,6 g/l, tedy skoro dvojnásobně. Recyklace supernatantu a tím využití již nasyntetizovaných osmolytů se ukázala jako vhodná strategie vedoucí ke zvýšení produkce PHA.

Mezi nejčastější osmolyty produkované halofilními bakteriemi patří ectoin nebo hydroxyectoin. Ectoiny patří mezi další metabolity bakterií rodu *Halomonas*, které mají využití v biotechnologiích například jako ochranné látky pro proteiny, DNA či jako celková ochrana savčích buněk [157]. Mezi další látky, které mají osmoprotekční vlastnosti, patří například některé cukry (sacharóza, trehalóza), polyoly (glycerol, arbitol), některé aminokyseliny (prolin, alanin) či kvartérní aminy (betain, cholin) [158]. Přidání těchto látek do minerálního média by mohlo opět vést ke zvýšení produkce PHA ve spojení s nižšími energetickými náklady na syntézu osmoprotektantů.



**Obrázek 26: Využití osmoprotektantů ke zvýšení produkce PHA.** Kontrola neobsahuje žádný přidaný osmolyt, ostatní osmolyty jsou v koncentraci 1 g/l. Kultivace probíhala 72 h, 30 °C, pH 7. Data jsou uváděna jako průměrná hodnota měření, chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku.

Bakterie *H. neptunia* vykazovala vyšší produkci PHA při použití recyklace supernatantu, proto byla u této bakterie také vyzkoušena produkce PHA po přidání již komerčně dostupných osmolytů, konkrétně ectoinu, hydroxyectoinu, trehalózy a betainu (Obrázek 26). Při přidavku ectoinu, hydroxyectoinu a betainu byla produkce PHA nižší než v kontrolním vzorku, který neobsahoval žádný přidaný osmolyt. Nicméně přídavek trehalózy měl pozitivní vliv jak na celkovou produkci biomasy, tak i na produkci PHA. Biomasa stoupla téměř 2,5krát. Produkce PHA vzrostla z původních 0,2 na 0,8 g/l.

Nicméně celkově se koncepce využití osmolytů ve formě supernatantu po hypotonické lyzi buněk z předchozí kultivace nezdá být vhodnou strategií. Navýšení produkce PHA není dostatečně vysoké na to, aby ospravedlnilo náročnost celé operace, která především představuje navýšení rizika kontaminace. Přidání čistých komerčně dostupných osmolytů má sice pravděpodobně lepší potenciál pro navýšení produkce PHA, nicméně z praktického hlediska tato možnost (díky vysoké ceně trehalózy a dalších osmolytů) proces spíše ekonomicky zatěžuje, než aby jej zlepšovala. Proto nebyla koncepce přidavku osmolytů v práci dále rozvíjena.

Bakterie *H. hydrothermalis* i *H. neptunia* se jeví jako zajímaví producenti s dobrým potenciálem pro produkci PHA za využití odpadního fritovacího oleje jako zdroje uhlíku. Díky vysoké salinitě kultivačního média může jejich využití vést ke snížení nákladů biotechnologické produkce (především u nákladů na sterilitu procesu), a tím ke zvýšení konkurenceschopnosti PHA. Přídavkem vhodného prekurzoru lze také dosáhnout tvorby kopolymeru P(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát), který má lepší mechanické a fyzikální vlastnosti než samotný P(3HB) (příloha 10.2). Případná produkce osmolytů a jejich využití by mohlo vést k dalšímu snížení ceny produkce. Zajímavá by byla také studie chování těchto bakterií ve větším kultivačním objemu v bioreaktorech, která však nebyla předmětem této

práce. Také neobvyklá morfologie buněk *H. hydrothermalis* může být předmětem dalšího výzkumu.

### 4.3. Izolace termofilních producentů polyhydroxyalkanoátů z přírodních vzorků

Další slibnou skupinou extrémofilů jsou termofilní mikroorganismy. Jedná se o organismy, které přežívají, žijí a prosperují ve vyšších teplotách. Přirozených míst, kde se termofily vyskytují, je mnoho. Jedná se především o různé geotermální průduchy, horké prameny a podobně [63]. Tyto organismy skrývají velký biotechnologický potenciál. Díky životu v extrémních podmínkách jsou například jejich proteiny a enzymy adaptovány k vysokým teplotám, proto mají široké uplatnění jako termostabilní látky [159]. Průmyslovou biotechnologií založenou na extrémofilních mikroorganismech, která je schopna konkurovat běžné výrobě, označil profesor Chen a jeho tým za průmyslové biotechnologie nové generace. Tyto biotechnologické procesy nové generace využívají například termofilní bakterie. Díky extrémním podmínkám dochází ke snížení rizika kontaminace, a tím může být snížena cena biotechnologického procesu a zvýšena konkurenceschopnost produktu [70].

Polyhydroxyalkanoáty jsou nadějným polymerem, který je biokompatibilní a v přírodě rozložitelný. Jejich výroba je navíc založena na obnovitelných zdrojích [160]. Avšak jejich produkce u termofilních mikroorganismů není příliš popsána. Produkce PHA u termofilů je velmi málo prozkoumána a byla potvrzena jen v několika případech, například u bakterie *Chelatococcus* sp. MW10 [161], *Caldimonas taiwanensis* [162], *Thermus thermophilus* [82] či *Bacillus shackletonii* K5 [85]. Proto jsme se zaměřili na izolaci nových termofilních producentů PHA z přírodních vzorků pomocí několika izolačních technik.

#### 4.3.1. Aerobní dynamické krmení

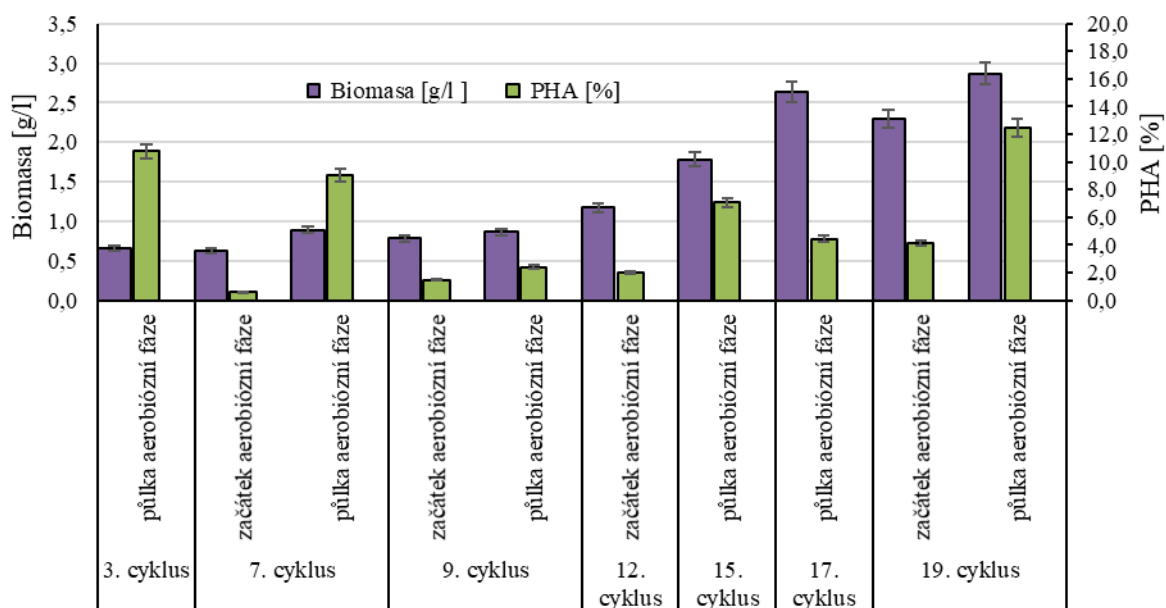
Aerobní dynamické krmení (ADK) je bioinženýrská strategie řízení směsných mikrobiálních konsorcií, jehož cílem je obohacení konsorcia o producenty PHA. Aerobní dynamické krmení je cyklicky se opakující kultivace, kde dochází ke střídání fáze bohaté na živiny (feast) a fáze limitace živinami (famine). ADK nachází především uplatnění při nesterilní produkci PHA z různých odpadních surovin pomocí směsných bakteriálních kultur PHA [94; 97]. Nicméně lze principiálně tento postup využít také k izolaci PHA producentů.

Z tohoto důvodu bylo ADK v práci použito pro izolaci PHA produkujících termofilních bakterií ze vzorků aktivovaného kalu. Aktivovaný kal byl poskytnut ČOV v Bystřici pod Hostýnem, která je v rámci ČR unikátním provozem využívajícím termofilní biologické čištění odpadních vod. Kal je zde aktivován při teplotách 50 až 60 °C, a proto lze předpokládat, že obsahuje vysoký podíl termofilních a termotolerantních mikroorganismů. Jako zdroj uhlíku byl v našem experimentu použit acetát sodný, jedná se o relativně snadno utilizovatelný zdroj uhlíku, který vedl při použití v rámci ADK ve směsných mezofilních kulturách až k produkci 65 % P(3HB) [90]. Dále byly vyzkoušeny i náročnější zdroje uhlíku jako xylóza, laktóza či kyselina palmitová. Motivací zařazení těchto substrátů bylo vyizolovat PHA produkující termofilní bakterie schopné konverze těchto substrátů na PHA. Avšak již v 9. cyklu se ukázalo,

že tyto složitější zdroje uhlíku nejsou vhodným zdrojem uhlíku pro ADK. Biomasa se ve třetím cyklu pro laktózu a kyselinu palmitovou pohybovala okolo 0,35 g/l, pro xylózu jen okolo 0,14 g/l. Při použití laktózy byly ve třetím cyklu naměřeny necelé 3 % P(3HB). U xylózy a kyseliny palmitové nebylo detekováno žádné množství P(3HB). Při využití složitějšího zdroje uhlíku nebyla již po 9. cyklu detekována biomasa, a proto byl pokus ukončen.

Selekce PHA produkujících bakterií za využití acetátu sodného však byla úspěšnější (Obrázek 27). Biomasa již ve třetím cyklu stoupla na 0,5 g/l a naměřené množství PHA bylo okolo 10 % ze suché hmoty biomasy. Množství biomasy víceméně rostlo až do ukončení pokusu. Množství PHA bylo proměnlivé a bylo ovlivněno především časem odběru v cyklu aerobního dynamického krmení. PHA slouží jako zdroj uhlíku a energie a jsou produkovány při nadbytku uhlíku [163] a limitaci například fosforu či dusíku. Proto například v 7. a 19. cyklu, kdy byl odběr udělán dvakrát během jednoho cyklu, a to na začátku a v půlce první fáze v době dostatku živin, je množství PHA odlišné. Při prvním odběru, který byl proveden po fázi sedimentace a 12 hodin od přidání zdroje uhlíku, bylo detekováno pouze nízké množství PHA. Ve druhém odběru, který již byl po přidání zdroje uhlíku, což v aerobní fázi cyklu vede k navýšení množství PHA v buňce, bylo opravdu zaznamenáno vyšší množství PHA. PHA poté slouží jako zdroj uhlíku a energie v době chudé na živiny, popřípadě v sedimentační fázi chudé i na kyslík. Pokus byl ukončen po 19. cyklu aerobního dynamického krmení, kdy biomasa dosahovala téměř 3 g/l a množství PHA bylo okolo 12 %. Veškeré detekované PHA byly tvořeny pouze polymerem složeným z 3HB.

V literatuře je popsáno, že při práci v sekvenčním vsádkovém reaktoru s mezofilními směsnými kulturami lze dosáhnout stabilní produkce až 53 % P(3HB) za využití acetátu sodného jako zdroje uhlíku při aerobním dynamickém krmení po dobu 30 dní. Při prodloužení celkové doby na dva měsíce produkce stoupla až na 79 % P(3HB), což vede k zefektivnění pro komerční procesy [164]. Použití ADK v sekvenčních reaktorech po dobu jednoho roku vedlo také k navýšení množství P(3HB) u směsných kultur téměř na 74 %. Takto vysoké množství polymeru je srovnatelné s produkcí pomocí čistých bakteriálních kultur [94].



**Obrázek 27: Aerobní dynamické krmení termofilní směsné kultury – zdroj uhlíku acetát sodný.**

Graf závislosti biomasy v g/l a množství PHA v % na fázi a počtu cyklu aerobního dynamického krmení, teplota kultivace 60 °C. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku.

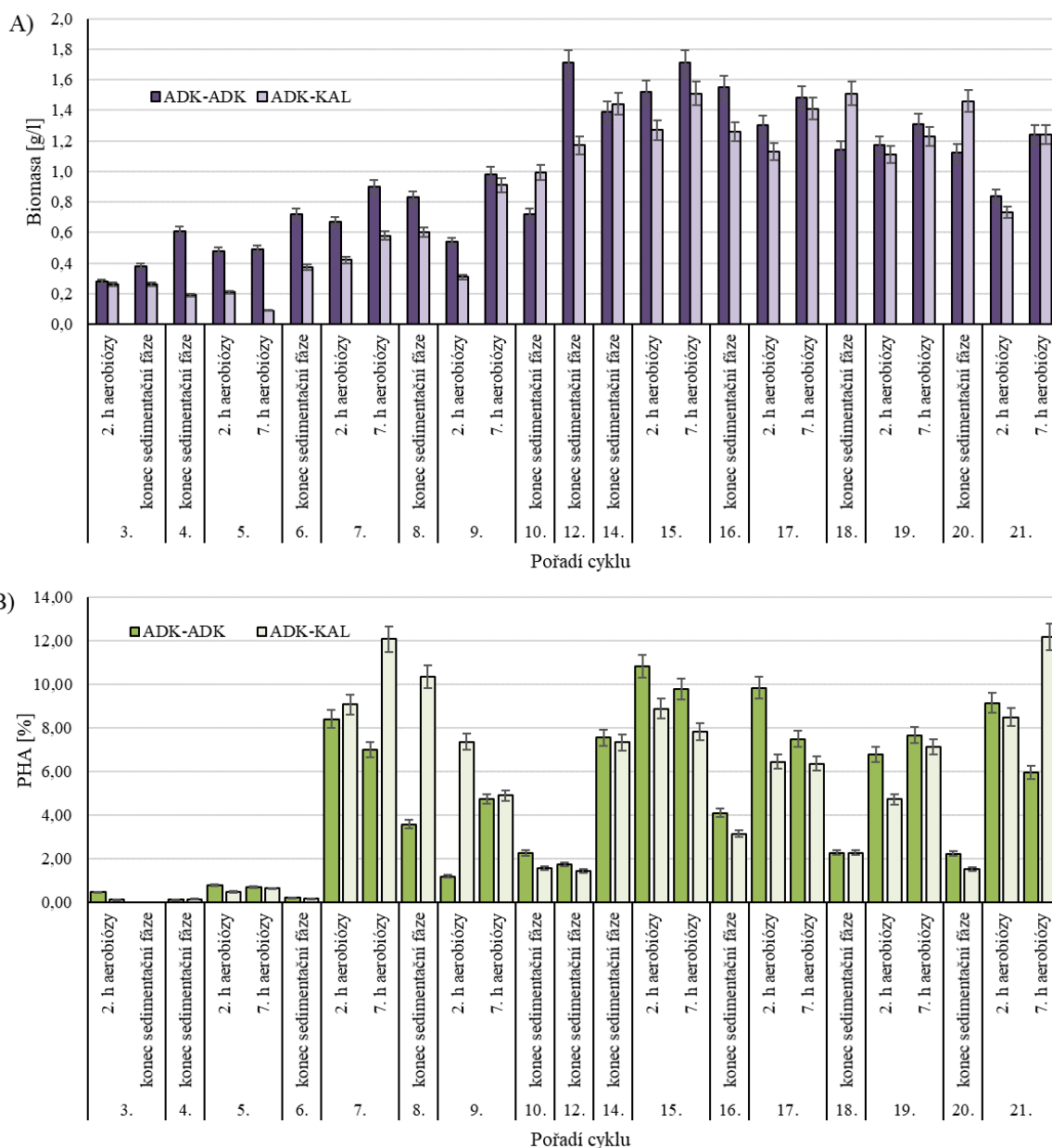
ADK je tedy velice efektivním nástrojem umožňujícím obohacení směsného mezofilního bakteriálního konsorcia o PHA producenty, nicméně u termofilního konsorcia je podle našich výsledků a zkušeností situace výrazně složitější. Bakteriální kultura po ukončení 19. cyklu (kdy obsah PHA v biomase dosáhl svého maxima) byla rozetřena na agarovou plotnu a vybrané kolonie byly pomocí sekvenace *16S rRNA* přibližně taxonomicky zařazeny. Většina kolonií byla určena jako polymikrobiální, i když na agarové plotně se jevíly jako čisté kolonie. Izolát ADK 3 byl určen jako *Tepidiphilus* sp. s podobností 81,80 %. Tato bakterie se řadí do kmene *Proteobacteria* a třídy *Hydrogenophilalia*. Johnson a kolektiv při sekvenaci izolátu z ADK v sekvenačním reaktoru zařadily izoláty do stejného kmene, avšak třídy *Gammaroteobacteria* [164].

Rod *Tepidiphilus* je gram negativní nesporeující bakterie. Jedná se o termofilní rod s optimální teplotou růstu okolo 50 °C. Je aerobní, avšak je schopen anaerobního růstu v přítomnosti dusičnanů [165; 166]. Produkce PHA u tohoto rodu nebyla doposud příliš popsána. Bohužel viabilitu izolátu ADK 3 se nepodařilo udržet, a proto nebylo možné podrobně prostudovat jeho PHA produkční potenciál. Na základě bioinformačních údajů bylo zjištěno, že zástupce tohoto rodu bakterie *Tepidiphilus thermophilus* DSM 27220 obsahuje PHA syntázu [167]. Proto byla schopnost produkovat PHA u rodu *Tepidiphilus* zkoumána právě pomocí bakterie *Tepidiphilus thermophilus* DSM 27220. Celkově je možné konstatovat, že schopnost produkovat PHA byla potvrzena jak na úrovni genotypu, tak fenotypu. Avšak produkce PHA se nezdá být z biotechnologického hlediska příliš atraktivní. Celkově bakterie vykazovala velice malé výtěžky biomasy i PHA (obsah PHA do cca 10 % hmotnosti suché biomasy) a další slabinou této bakterie je velice omezené spektrum substrátů, které dokáže využít. Jedná se především o krátké organické kyseliny (acetát, propionát atd.), naopak sacharidy ani lipidy nedokáže tato bakterie prakticky vůbec využít ke svému růstu. Proto nebyla této bakterii věnována další pozornost.

V prvním experimentu s aerobním dynamickým krmením bylo dosaženo pozitivních výsledků. Byl vybrán vhodný zdroj uhlíku a také zmapován průběh akumulace PHA. Pro druhý test s ADK byl použit jako zdroj uhlíku pouze acetát sodný. Avšak byly porovnány dvě linie. Jedna byla zaočkována opět aktivovaným kalem (ADK-KAL), druhá byla zaočkována kulturou z aerobního dynamického krmení I ze 7. cyklu (ADK-ADK). Tyto dvě linie poté byly porovnány v nárůstu biomasy i v množství naakumulovaného PHA. Výsledný průběh biomasy znázorňuje obrázek 28 A) a množství PHA obrázek 28 B).

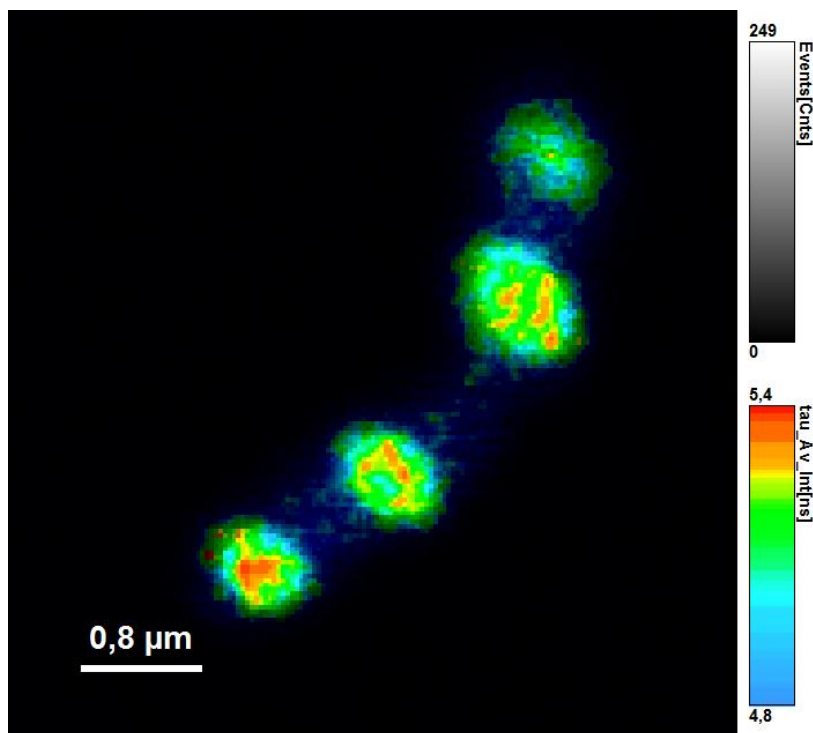
Průběh koncentrace biomasy byl velmi podobný. V prvních cyklech byla biomasa vyšší u linie ADK-ADK, která byla zaočkována kulturou již z předchozího aerobního dynamického krmení, ale již od 10. cyklu byla biomasa porovnatelná. Odběry probíhaly po 2 či 7 hodinách aerobiózy nebo na konci sedimentační fáze. V rámci aerobiózní fáze většinou docházelo k navýšení biomasy v průměru o 0,22 g/l biomasy pro ADK-ADK a pro ADK-KAL bylo navýšení během aerobiózy v průměru o 0,29 g/l biomasy. Nejvyššího nárůstu linie ADK-ADK dosáhla již ve 12. cyklu, kdy bylo měření provedeno na konci sedimentační fáze, kdy se biomasa pohybovala okolo 1,7 g/l. Podobného výsledku bylo dosaženo ještě po 7. hodině aerobiózy 15. cyklu. Linie zaočkováná přímo z kalu takových hodnot nedosáhla, avšak její maximum bylo také dosaženo po 7. hodině aerobiózy v 15. cyklu, a to 1,51 g/l biomasy. Při ukončení experimentu byly hodnoty koncentrace biomasy obou linií téměř totožné. Jiný průběh však mělo množství PHA. Do šestého cyklu bylo pro obě linie zaznamenáno pouze zanedbatelné množství PHA do 2 % hmotnosti suché biomasy. Množství PHA do 2 % suché hmoty biomasy bylo také zaznamenáno při odběrech na konci sedimentační fáze s výjimkou 16. cyklu, kdy se PHA pohybovaly mezi 2 až 4 %.





**Obrázek 28: Porovnání biomasy a množství PHA v průběhu ADK II.** Linie ADK-KAL byla zaočkována z kalu, linie ADK-ADK byla zaočkována kulturou z ADK I ze 7. cyklu. A) Graf závislosti biomasy uvedené v g/l na fázi cyklu a pořadí cyklu aerobního dynamického krmení. B) Graf závislosti PHA v % na fázi cyklu a pořadí cyklu během aerobního dynamického krmení, kultivační teplota 60 °C. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku.

Během 17. cyklu ADK II byla provedena také analýza buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu. PHA granule byly potvrzeny u obou linií. Obrázek 29 znázorňuje PHA granule v buňce obarvené fluorescenční sondou BODIPY. Na obrázku je patrné, že buňka obsahuje intracelulární granule PHA. Obě linie pod mikroskopem vykazovaly obdobné výsledky i velikost PHA pozitivních bakterií. Mezi pozorovanými bakteriemi se vyskytovaly i buňky, které obsahovaly pouze minimum PHA nebo jej neobsahovaly vůbec. Tyto bakterie byly schopny přežít podmínky ADK i bez schopnosti produkovat PHA.

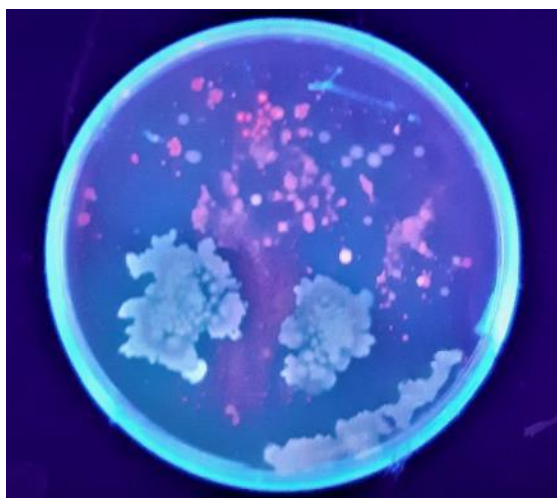


**Obrázek 29: Zobrazení PHA granulí v buňce pod fluorescenčním mikroskopem pro kulturu z aerobního dynamického krmení II pro linii ADK-KAL**

Aerobní dynamické krmení II také vedlo k obohacení směšného konsorcia o PHA producenty. Ve snaze získat čistý kmen termofilního producenta PHA, byly kultury z konce cyklu ADK II rozetřeny na agarové plotny obsahující Nilskou červeň. Nilská červeň je lipofilní barvivo, které umožňuje rychlou detekci PHA produkujících bakterií [37]. Po nárůstu kultury byly misky osvětleny UV zářením a byly detekovány PHA pozitivní kolonie (Obrázek 30), které vykazují oranžově-červenou fluorescenci. Tyto kolonie byly poté přesazeny na čisté plotny pomocí křížového roztěru. Z osmi izolátů označených NC1 až NC8 byly pomocí sekvenace *16S rRNA* taxonomicky zařazeny pouze tři, ostatní vzorky byly buď polymikrobiální nebo se nepodařilo daný úsek DNA vůbec amplifikovat. Izoláty z ADK-AKD byly určeny jako *Anoxybacillus geothermalis* s podobností 99,69 % (NC1) a *Anoxybacillus* sp. se shodou 94,27 % (NC3). Pro linii ADK-KAL byla taxonomicky zařazena pouze jedna kolonie a to NC4, která byla vyhodnocena také jako *Anoxybacillus geothermalis* 99,70 %.

Rod *Anoxybacillus* je kvalifikován jako skupina gram pozitivních, mírně až středně termofilních bakterií, které se nachází převážně v geotermálních pramenech, kompostu nebo v zařízeních na zpracování mléka [168]. Zástupci rodu *Anoxybacillus* jsou obvykle také tolerantní vůči alkalickému prostředí, proto jsou zajímaví pro různé průmyslové aplikace [169–171]. Také jsou zajímaví skrz produkci termostabilních enzymů, které jsou schopny snášet alkalické pH [172]. Produkce PHA však u žádného zástupce rodu *Anoxybacillus* dosud nebyla popsána. Je nutné poznamenat, že ani v našich experimentech jsme neprokázali schopnost produkce PHA na úrovni genotypu ani fenotypu. V submerzní kultivaci nebylo detekováno PHA ani pomocí plynové chromatografie ani pomocí fluorescenční mikroskopie. Při roztěru na agarové plotny s Nilskou červení vykazovaly všechny izoláty přibližně klasifikované jako zástupci rodu *Anoxybacillus* pozitivní barvení. Podle některých studií je rod *Anoxybacillus*

schopen produkce polárních intracelulárních lipidů [173], je tedy možné že tyto lipidické látky poskytovaly falešně pozitivní výsledek při barvení pomocí Nilské červeně.



**Obrázek 30: Snímek agarové plotny obsahující Nilskou červeně s nárůstem bakteriální kultury z ADK II**

Aerobní dynamické krmení má vliv nejen na akumulaci PHA, ale také na samotné buňky bakterií. Bylo zjištěno, že ve fázi s limitací živin jsou bakterie více „hydrofobní“, což umožňuje lepší agregaci a adhezi. Agregace buněk je jednou ze strategií přežití mikroorganismů v této limitující fázi. V cyklickém opakování limitující fáze se tento jev posiluje a mikrobiální kultura se stává kompaktnější a vzniká lépe flokulující kal [174].

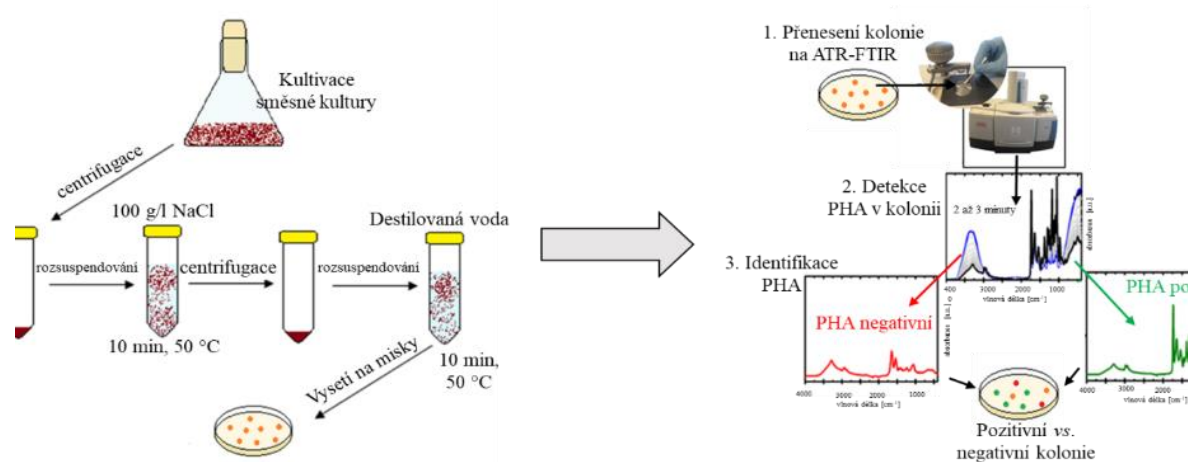
Celkově je možné konstatovat, že v průběhu vedení termofilních ADK experimentů se ve smíšeném bakteriálním konsorciu nacházeli producenti PHA, což dokazuje přítomnost PHA v bakteriální biomase. Obsah PHA byl v některých případech relativně vysoký (až 15 % hmotnosti suché biomasy), což dává naději, že PHA producenti představují významnou složku mikrobiálního konsorcia. Nicméně následná izolace čistých PHA produkujících kultur byla do velké míry neúspěšná. Na základě experimentu ADK se podařilo identifikovat potenciální termofilní produkční organismus *Tepidiphilus thermophilus*, u kterého byla následně schopnost produkce PHA prokázána u zakoupeného typového sbírkového kmene, ale samotný izolát nebyl dlouhodobě viabilní v axenické kultuře. V rámci ostatních experimentů nebyl vyizolován žádný PHA produkující kmen, a to ani v případě, že jako preselekční metoda byla využita vizualizace PHA pozitivních kolonií pomocí Nilské červeně. Polyhydroxyalkanoáty mají lipofilní charakter, tudíž jsou dobře barvitelné lipofilními barvivy jako je právě Nilská červeně. Aplikací Nilské červeně přímo do média lze rychle na pevných plotnách detekovat PHA produkující kolonie ve smíšených kulturách. Spiekermann a kolektiv použili Nilskou červeně do agarových ploten k rychlé detekci PHA kolonií, což vedlo k detekci PHA pozitivních bakterií bez jejich usmrcení. Výborné výsledky byly pozorovány především u gram negativních bakterií, avšak méně vhodný byl na použití gram pozitivních bakterií [37]. Zdá se, že barvení Nilskou červení není vhodné nejen pro gram pozitivní bakterie, ale není optimální ani při analýze termofilních kultur. Použití Nilské červeně vedlo k falešně pozitivním výsledkům. Mnohé kultury vykazovaly pozitivní odezvu na barvení, avšak při další charakterizaci se již nepotvrdila schopnost produkce PHA. Zdá se tedy, že ADK není vhodnou metodou pro izolaci čistě

termofilní bakteriální kultury schopné akumulace PHA. Je také možné, že PHA producenti, kteří byli ve směsné kultuře získané pomocí ADK přítomni, nejsou schopni růstu jako axenické kultury.

#### 4.3.2. Izolace pomocí změn osmotického tlaku

Lze tedy předpokládat, že aerobní dynamické krmení není vhodné jako izolační metoda vedoucí k získání termofilních producentů schopných produkce PHA. Proto byla zvolena alternativní originální strategie pro izolaci termofilních producentů PHA.

Je známo, že přítomnost PHA granulí v buňkách pomáhá zvyšovat míru přežití bakterií při vystavení osmotickému stresu, ať už navýšení osmotického tlaku v hypertonickém prostředí [175] či nižšímu tlaku v hypotonickém prostředí [139]. Na základě této osmoprotektivní funkce PHA byla navržena nová izolační metoda. Přírodní vzorek (kompost, kal) byl smíchán s minerálním médiem a daným zdrojem uhlíku a byla provedena kultivace tak, aby došlo k maximální možné akumulaci PHA u přítomných producentů. Poté následoval selekční krok využívající osmotickou změnu tlaku znázorněnou na obrázku 31. Kultura byla nejprve vystavena hypertonickému prostředí, které představoval roztok chloridu sodného o koncentraci 100 g/l. Následným promytím v destilované vodě byly buňky vystaveny hypotonickému prostředí. Na závěr byly vysety na agarové plotny. Pro eliminaci náhodného výběru pozitivních kolonií byl zařazen další krok, a to detekce PHA pomocí ATR-FTIR, kdy část narostlé kolonie byla nanášena na krystal ATR-FTIR a bylo detekováno PHA.



**Obrázek 31: Schéma selekce PHA produkujících bakterií pomocí změn osmotického tlaku**

Po vysušení a změření vzorku, které trvalo 2 až 3 minuty, bylo možné detekovat charakteristické absorpční pásy polyesterů při  $1734\text{ cm}^{-1}$  (C=O vazby) a  $1180\text{ cm}^{-1}$  (C-O-C vazby) a zvýšené absorpce v oblasti  $1050\text{ cm}^{-1}$  (C-C-O) [176]. Při pozitivní odezvě byla kolonie nanášena na novou agarovou plotnu a po nárůstu byla převedena do submerzního média a poté uchována ve formě kryozkumavky v 10% glycerolu při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Při testování této metody byl počet životaschopných kolonií před osmoselekcí u vzorku aktivovaného kalu z čistírny odpadních vod Brno-Modřice za využití glycerolu jako zdroje

uhlíku  $1,29 \cdot 10^{10}$  na ml. Po osmoselekcí klesl počet životaschopných kolonií na  $6,6 \cdot 10^8$  na ml. Zato se však zvýšil poměr PHA pozitivních kolonií ku negativním, a to z 1:14 na 8:7. Takže pravděpodobnost výběru PHA pozitivní kolonie se znásobila téměř 8krát. Tzv. osmoselekcce tedy sloužila k selekci a obohacení konsorcia o producenty PHA, pomocí rychlé a snadné detekce díky ATR-FTIR bylo možné určit PHA pozitivní kolonie (příloha 10.3). Přehled účinnosti osmoselekční metody znázorňuje tabulka 23.

**Tabulka 23: Porovnání účinnosti osmoselekční metody k izolaci PHA produkujících termofilních bakterií**

	<b>Před osmoselekcí</b>	<b>Po osmoselekcí</b>
<b>CFU na ml</b>	$1,29 \cdot 10^{10}$	$6,6 \cdot 10^8$
<b>PHA pozitivní kolonie : PHA negativní kolonie</b>	1:14	8:7
<b>% pozitivních kolonií ze všech testovaných kolonií</b>	7	53

Navržený izolační protokol byl použit na selekci PHA pozitivních kolonií ze vzorku aktivovaného kalu z čistírny odpadních vod Brno-Modřice a kompostu z centrální kompostárny Brno. První selekce bakterií byla provedena na různých zdrojích uhlíku. Jednalo se o glukózu, glycerol, kyselinu levulovou a  $\gamma$ -butyrolakton. Teplota kultivace i izolace byla 50 °C. Avšak v případě kyseliny levulové a  $\gamma$ -butyrolakton nebyly nalezeny žádné PHA pozitivní kolonie ani u jednoho ze vzorků kompostu nebo kalu. Celkový nárůst biomasy byl před „osmoselekcí“ malý a obsah PHA se pohyboval do 2 % hmotnosti suché biomasy. Zato glukóza a glycerol v případě aktivovaného kalu se ukázaly jako vhodné zdroje uhlíku pro selekci PHA produkujících bakterií. Před osmoselekcí bylo ve vzorku s glukózou naměřeno kolem 8 % PHA a ve vzorku s glycerolem dokonce 16 % PHA na suchou hmotu biomasy. Jednalo se výhradně o P(3HB). Ze vzorku aktivovaného kalu bylo celkově vyizolováno přibližně 40 PHA pozitivních kolonií, které byly číselně označeny. Izoláty s označením 1 až 28 byly vyizolovány za využití glukózy a izoláty získané za použití glycerolu byly označeny 29 až 40. V případě vzorků z kompostu byly celkové PHA před osmoselekcí, za využití glukózy jako zdroje uhlíku, velmi nízké, nedosahovaly ani 2 %, zato u vzorků kompostu na glycerolu jako zdroje uhlíku byl obsah PHA před osmoselekcí 17 % hmotnosti suché biomasy. I přesto bylo ze vzorku kompostu na glycerolu vyizolováno pouze 5 pozitivních kolonií. Izoláty nesly označení H1, H2, H3 a K1 a K2. Všechny izoláty byly přesazeny na nové misky. Některé z izolátů ani po 48 hodinách kultivace při 50 °C na minerálním médiu a daným zdrojem uhlíku, na kterém byly izolovány, nenarostly. Kolonie, které narostly, byly přeočkovány do submerzního média a byly uchovány ve formě kryozkumavek. Seznam uchovaných izolátů je zobrazen v tabulce 24.

**Tabulka 24: Seznam uchovaných izolátů ze vzorku aktivovaného kalu a kompostu pomocí osmoselekce (rok 2018)**

<b>Vzorek</b>	<b>Označení izolátu</b>	<b>Zdroj uhlíku při izolaci</b>
<b>Aktivovaný kal, Brno-Modřice</b>	4	glukóza
	5	
	8	
	9	
	10	
	25	
	28	
	29	glycerol
	30	
	31	
	32	
	34	
	35	
	<b>Kompost, Brno</b>	H1
H2		
K2		

Selekce PHA produkujících bakterií pomocí osmoselekce byla využita i při izolaci bakterií z dalších vzorků kompostu z kompostárny Brno a kompostárny Blansko, a také z aktivovaného kalu z čistíren odpadních vod Brno-Modřice a Bystřice pod Hostýnem odebíraných na podzim roku 2019. Jako zdroje uhlíku pro selekci byla vybrána glukóza o koncentraci 20 g/l, glycerol 20 g/l a  $\gamma$ -butyrolakton 8 g/l. Na základě předchozích výsledků byl glycerol vyhodnocen jako vhodný zdroj uhlíku pro selekci PHA produkujících bakterií. Proto ve snaze najít polyextrémního producenta PHA, který by byl halofilní termofil, bylo také použito jako zdroj uhlíku 20 g/l glycerolu s 40 g/l NaCl. Současně byly testovány i tři různé teploty kultivace a to 50, 60 a 70 °C (Obrázek 11). Těchto 48 kombinací bylo podrobena osmoselekci a následně

detekci PHA produkujících bakterií pomocí ATR-FTIR. Po následné kultivaci izolátů bylo celkem získáno a uchováno 44 izolátů jejichž přehled je uveden v tabulce 25.

**Tabulka 25: Seznam izolátů při využití osmoselektce za různých teplot kultivace (rok 2019)**

<b>Vzorek</b>	<b>Označení izolátu</b>	<b>Zdroj uhlíku při izolaci</b>	<b>Teplota izolace [°C]</b>
<b>Kompost, Blansko</b>	Bz	glycerol	50
<b>Aktivovaný kal, Bystřice pod Hostýnem</b>	A1	glycerol	50
	A2	glycerol	50
	A3	$\gamma$ -butyrolakton	50
	A3a	$\gamma$ -butyrolakton	50
	A4	glukóza	50
	A4a	glukóza	50
	A5	glukóza	50
	A5a	glukóza	50
	A6	glukóza	50
	A7	glukóza	50
	A8	glukóza	50
	A9	glukóza	50
	A12	glukóza	70
	A21	glukóza	60
	A22	glukóza	60
	A23	glukóza	60
	A25	glukóza	60
A26	glukóza	60	

<b>Vzorek</b>	<b>Označení izolátu</b>	<b>Zdroj uhlíku při izolaci</b>	<b>Teplota izolace [°C]</b>
<b>Aktivovaný kal, Bystřice pod Hostýnem</b>	A27	glukóza	60
	A28	glukóza	60
	AFn1	glukóza	60
	AFn2	glukóza	60
	AH10	glycerol	70
	AH11	glycerol	70
	AH24	glukóza	60
	AH30	glukóza	60
<b>Kompost, Brno</b>	F101	glukóza	70
	F102	glukóza	70
	F103	glukóza	50
	F104	glukóza	50
	F105	glukóza	50
	F106	glukóza	50
	F107	glukóza	50
	F108	glukóza	50
	F109	glukóza	50
	F110	glukóza	50
<b>Aktivovaný kal, Brno-Modřice</b>	M1	glukóza	50
	M2	glukóza	50
	M3	glukóza	50

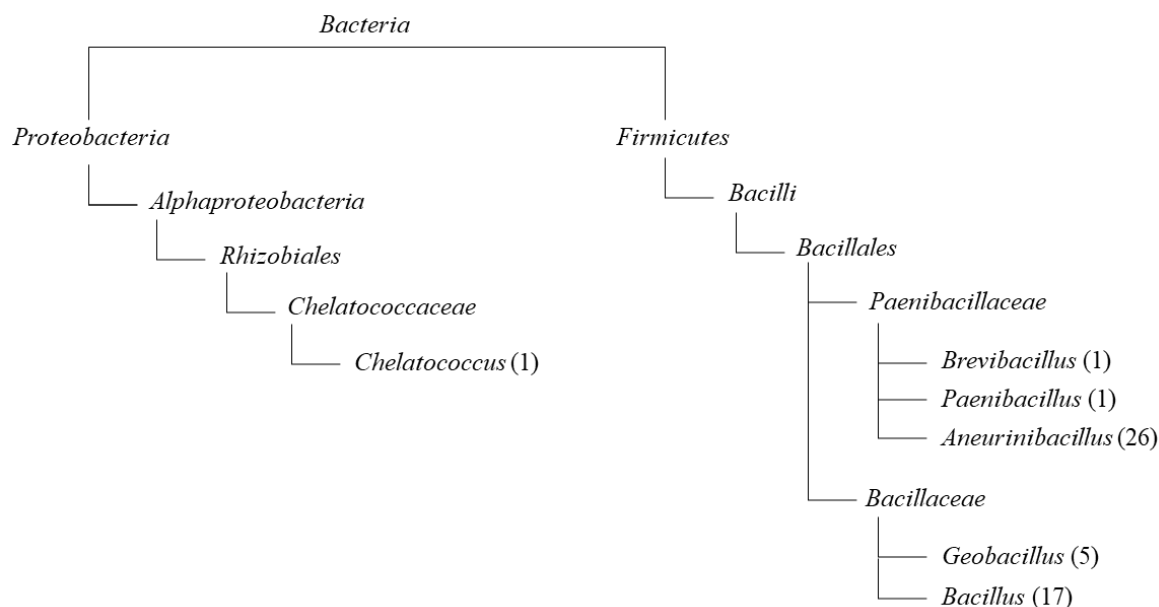


Vzorek	Označení izolátu	Zdroj uhlíku při izolaci	Teplota izolace [°C]
Aktivovaný kal, Brno-Modřice	M4	glycerol	50
	M5	glycerol	50
	M6	$\gamma$ -butyrolakton	50
	M7	$\gamma$ -butyrolakton	50

#### 4.3.2.1 Taxonomická charakterizace izolátů

Jednotlivé izoláty byly taxonomicky zařazeny na základě sekvence genu *16S rRNA*. Díky znalosti sekvence malé ribozomální podjednotky (pro prokaryota *16S rRNA*) lze daný organismus přibližně identifikovat a klasifikovat [177]. Sekvence genu se následně porovnají s databází mikroorganismů (například blast.ncbi.nlm.nih.gov) a daný izolát se taxonomicky zařadí. Se shodou nad 97 % lze daný organismus zařadit na rodové i druhové úrovni [178], v rozmezí pod 95 % do 80 % na úrovni rodu, pokud je shoda nižší, lze daný organismu zařadit pouze na úrovni čeledi či pouze řádu [179; 180]. K úplnému korektnímu taxonomickému zařazení je však potřeba využití více metod a kombinace genotypických a fenotypických přístupů [181; 182].

Mezi izolovanými bakteriemi se vyskytovaly jak gram negativní, tak gram pozitivní bakterie. Z taxonomického hlediska lze dané izoláty rozdělit do dvou kmenů či oddělení, a to kmen *Proteobacteria*, který je zastoupen pouze minimálně, a *Firmicutes*, kde všechny ostatní izoláty patří do třídy *Bacilli*. Schéma taxonomického zařazení izolátů zobrazuje obrázek 32. *Proteobacteria* jsou gram negativní bakterie, které zahrnují jak fototrofy, heterotrofy i chemolitotrofy. Tento kmen také zahrnuje mnoho známých lidských, živočišných i rostlinných patogenů [183]. Izolát s označením 34 byl klasifikován jako *Chelatococcus composti*. Produkce polyhydroxyalkanoátů pomocí bakterií *Chelatococcus* již byla popsána u příbuzných termofilních bakterií *Chelatococcus daeguensis* [184] či *Chelatococcus* sp. MW10 [84].



**Obrázek 32: Schéma taxonomického zařazení izolátů získaných pomocí osmoselektce, v závorce je uveden počet izolátů spadající do konkrétního rodu.**

Zbylých 50 izolátů patří do kmene *Firmicutes*. *Firmicutes* zahrnuje třídy *Bacilli*, *Clostridia* či *Erysipelotrichia* [185] a jedná se o gram pozitivní bakterie, které zahrnují více jak 250 bakteriálních rodů [186]. Naše izoláty patří do třídy *Bacilli* a řádu *Bacillales*, kde jsou zastoupeny dvě čeledě, a to *Bacillaceae* a *Paenibacillaceae* [187]. Do čeledi *Bacillaceae* patří rod *Bacillus* a jemu příbuzné rody jako například *Geobacillus*. Do rodu *Geobacillus* patří především izoláty získané při kultivaci při 70 °C. U rodu *Bacillus* je produkce PHA relativně dobře prostudována a popsána [188]. PHA byly dokonce poprvé pozorovány právě v bakterii *Bacillus megaterium*, kdy v roce 1926 M. Lemoigne pozoroval intracelulární granule PHA [189]. Nicméně taxonomie jednotlivých rodů v rámci čeledě se relativně často mění díky hlubšímu pochopení fylogenetické a evoluční příbuznosti jednotlivých rodů [190].

Rod *Geobacillus* zahrnuje gram pozitivní tyčinkovité bakterie, které tvoří spóry a mají optimální teplotu růstu mezi 55 až 65 °C [191]. Dříve byly zařazovány do rodu *Bacillus*. Bakterie rodu *Geobacillus* jsou izolovány z mírného i horkého prostředí, typický je výskyt v okolí horkých pramenů, hlubinných mořských sedimentů či ropných polí, cukrovarů, konzerváren potravin nebo mlékáren. Rod *Geobacillus* má značný význam v oblasti biotechnologií, například pro výrobu termostabilních enzymů, nebo při bioremediaci [192]. Všechny izoláty izolované pomocí osmoselektce při 70 °C byly právě zařazeny do rodu *Geobacillus*. Jako *Geobacillus stearothermophilus* byl klasifikován izolát nesoucí označení A12. Izoláty AH10, F101 a F102 byly klasifikovány jako *Geobacillus thermodenitrificans* a izolát AH11 byl vyhodnocen jako *Geobacillus* sp. Bakterie *Geobacillus thermodenitrificans* T12 izolovaná z kompostu je schopna utilizace xylózy a produkce kyseliny mléčné na xylanu, což ji činí biotechnologicky zajímavou [193]. Izoláty patřící do rodu *Geobacillus* mohou skrývat velký biotechnologický potenciál s nižšími nároky na sterilitu procesu díky jejich vyšší kultivační teplotě.

Další velmi početně zastoupeným rodem izolovaných bakterií je rod *Bacillus*. Tento rod zahrnuje převážně gram pozitivní sporulující bakterie, které patří do více než 260 druhů. Zástupci rodu *Bacillus* mohou být pohybliví či nepohybliví, aerobní či fakultativně anaerobní, ve výjimečných případech i striktně anaerobní. Hojně se vyskytují v přírodě a zahrnují i řadu druhů, které by bylo možné označit jako extrémofily např. halofily, alkalofily, psychrofilny i termofily. Rod *Bacillus* obsahuje nejen mnoho známých patogenů, ale také biotechnologicky významné druhy, které se používají například pro produkci vitamínu B2 či B12, produkci antibiotik nebo k produkci enzymů pro detergenty [194; 195]. Mezi izolovanými bakteriemi byly po taxonomickém zařazení zástupci *Bacillus subtilis*, jimiž byly izoláty M1 a M2. Izolát označený jako 25 byl určen jako *Bacillus amyloliquefaciens*, který úzce souvisí s *B. subtilis* a dříve byl dokonce řazen jako jeho kmen či poddruh [196].

Izoláty 31, A2, F103 a F106 byly klasifikovány jako *B. licheniformis* a izolát 4 jako *B. paralicheniformis*. Na základě fylogenetické analýzy byla zjištěna blízká příbuznost mezi *B. licheniformis* a *B. paralicheniformis*, ale existují i genetické rozdíly v genomu, díky kterým lze tyto druhy od sebe rozlišit. Oba druhy mají biotechnologický význam. Používají se například k výrobě enzymů či antibiotik [197]. Dalším druhem blíže příbuzným s *B. licheniformis* je *B. hyanesii*, tento druh vykazuje vysokou podobnost s druhem *B. licheniformis*, ale na základě fenotypových odlišností a fylogenetických analýz se ukázalo, že se jedná o nový druh [198]. Podle sekvenací genu *16S rRNA* byly proto izoláty A4, F104 a F105 určeny jako *B. hyanesii*, *B. licheniformis* a *B. paralicheniformis* se stejnou podobností. Další podobnost s druhem *B. licheniformis* vykazuje také druh *B. piscis*, ale na základě fylogenetických a fenotypových údajů byl *Bacillus piscis* klasifikován jako nový druh, který je schopen růstu v rozmezí 0 až 10 % přídavku NaCl či v rozmezí pH 6 až 10 [199]. Právě jako *B. piscis* byly klasifikovány izoláty F107 a M4.

Izolát M5 byl určen jako *Bacillus cytotoxicus*, tento druh vykazuje podobnost se skupinou bacilů podobných druhu *B. cereus*, ale na základě odlišností byl klasifikován jako nový samostatný druh. Jedná se o aerobní až fakultativně anaerobní sporetvorné bakterie, které se často vyskytují na potravinách a které jsou potenciálními původci potravinové otravy [200]. Izolát s označením M7 byl identifikován jako *Bacillus shackletonii*. Tento druh dokáže růst v širokém rozsahu pH a to od 5 až do 9, jedná se o aerobní bakterie schopné růst při teplotách od 15 do 55 °C [201]. K rodu *Bacillus* přísluší také izoláty s označením A3 a A3a, které byly klasifikovány jako *Bacillus coagulans*. Tento druh bakterie vykazuje vlastnosti patřící jak k *Bacillaceae* tak k *Lactobacillaceae*, a tím komplikuje své jednoznačné taxonomické zařazení. Je schopen produkce kyseliny mléčné, ale také tvoří endospory [202]. Jedná se ovšem o probiotický druh, který má široký potenciál využití, protože právě díky sporám je schopen přežít vysoké teploty, ale zachovat si svou probiotickou funkci [203].

Další čeledí je *Paenibacillaceae*, která je rozdělena do dvou fylogenetických klastrů, kdy první skupinu tvoří *Paenibacillus*, *Bravibacillus*, *Cohnella* a *Thermobacillus* a druhou skupinu tvoří rody *Aneurinibacillus*, *Ammoniphilus* a *Oxalophagus*. Izolát označený jako Bz byl určen jako *Paenibacillus* sp. Tento rod bakterií je charakterizován jako aerobní nebo fakultativně anaerobní sporulující bakterie vyskytující se na různých zdrojích od půd, přes slané a sladké vody, kompostů či potravin, až po klinické vzorky. Některé druhy tohoto rodu vykazují

patogenitu [204]. Dalším izolátem patřícím do stejné skupiny je izolát s označením A1, který byl klasifikován jako *Brevibacillus* sp. Některé druhy tohoto rodu jako je například *B. laterosporus* jsou spojovány s lidskými infekcemi, ale celkově má tento rod značný biotechnologický potenciál díky produkci enzymů, které jsou schopny biodegradovat polyethylen, a také jsou vhodné jako laboratorní modely, díky vysoké účinnosti elektroporace [205]. Největší zastoupení zařazených izolátů má rod *Aneurinibacillus* patřící do druhého klastru čeledi *Paenibacillaceae*. Dvacet čtyři izolátů bylo klasifikováno jako *Aneurinibacillus thermoaerophilus* a dva jako *Aneurinibacillus* sp. Jedná se o gram pozitivní tyčinkovité bakterie, které tvoří elipsoidní spory. Většina z nich je striktně aerobní, ale některé druhy mohou být i mikroaerofilní. Optimální růstové teploty se u tohoto rodu pohybují v rozmezí 20 až 65 °C [206]. Přehled taxonomického zařazení všech izolátů získaných ze vzorků kompostu a aktivovaného kalu pomocí změn osmotického tlaku zobrazuje tabulka 26. Sekvence genu *16S rRNA* izolátů byla uložena v GeneBank pod evidenčními čísly, které jsou rovněž zobrazeny v tabulce 26.

Tabulka 26: Přehled taxonomického zařazení všech izolátů

Rok izolace	Původ vzorku	Název izolátu	Substrát izolace	Teplota izolace	Taxonomické zařazení	GeneBank číslo
2018	aktivovaný kal, Brno-Modřice	4	glukóza	50	<i>Bacillus paralicheniformis</i> 100 %	MT636944
		25	glukóza	50	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 99,79 %	MN595610
		28	glukóza	50	polymikrobiální	
		29	glycerol	50	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> 99,75 %	MN595898
		30	glycerol	50	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> 99,48 %	MN595683
		31	glycerol	50	<i>Bacillus licheniformis</i> 99,93 %	MN595618
		32	glycerol	50	<i>Aneurinibacillus</i> sp. 99,84 %	MN595897
		34	glycerol	50	<i>Chelatococcus composti</i> 100 %	MN596015
		35	glycerol	50	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> 100 %	MN596016
	kompost, Brno	H1	glycerol	50	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> 99,91 %	MT112889
		H2	glycerol	50	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> 99,83 %	MT636552
		K2	glycerol	50	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> 99,91 %	MT636552
2019	kompost, Blansko	Bz	glycerol	50	<i>Paenibacillus</i> sp. 82,87 %	*

Rok izolace	Původ vzorku	Název izolátu	Substrát izolace	Teplota izolace	Taxonomické zařazení	GeneBank číslo
2019	aktivovaný kal, Bystřice pod Hostýnem	A1	glycerol	50	<i>Brevibacillus</i> sp. 94,73 %	MT636463
		A2	glycerol	50	<i>Bacillus licheniformis</i> 99,63 %	MT634704
		A3	$\gamma$ -butyrolakton	50	<i>Bacillus coagulans</i> 99,11 %	MT634705
		A3a	$\gamma$ -butyrolakton	50	<i>Bacillus coagulans</i> 99,72 %	MT634707
		A4	glukóza	50	<i>Bacillus haynesii</i> 99,91 %	MT634706
		A4a	glukóza	50	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> 99,46 %	MT634709
		A5	glukóza	50	polymikrobiální	
		A5a	glukóza	50	polymikrobiální	
		A6	glukóza	50	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> 99,78 %	MT634710
		A7	glukóza	50	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> 99,77 %	MT634711
		A8	glukóza	50	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> 99,55 %	MT634713
		A9	glukóza	50	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> 99,78 %	MT634712
A12	glukóza	70	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> 99,89 %	MT634714		

Rok izolace	Původ vzorku	Název izolátu	Substrát izolace	Teplota izolace	Taxonomické zařazení	GeneBank číslo
2019	aktivovaný kal, Bystřice pod Hostýnem	A21	glukóza	60	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> 99,78 %	MT634715
		A22	glukóza	60	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> 99,70 %	MT636923
		A23	glukóza	60	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> 99,78 %	MT634718
		A25	glukóza	60	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> 99,78 %	MT634716
		A26	glukóza	60	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> 99,70 %	MT636926
		A27	glukóza	60	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> 99,78 %	MT634719
		A28	glukóza	60	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> 99,78 %	MT636925
		AFn1	glukóza	60	polymikrobiální	
		AFn2	glukóza	60	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> 99,78 %	MT636942
		AH10	glycerol	70	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> 99,75 %	MT634721
		AH11	glycerol	70	<i>Geobacillus</i> sp. 100 %	MT634722
		AH24	glukóza	60	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> 99,55 %	MT634737
AH30	glukóza	60	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> 99,70 %	MT636943		

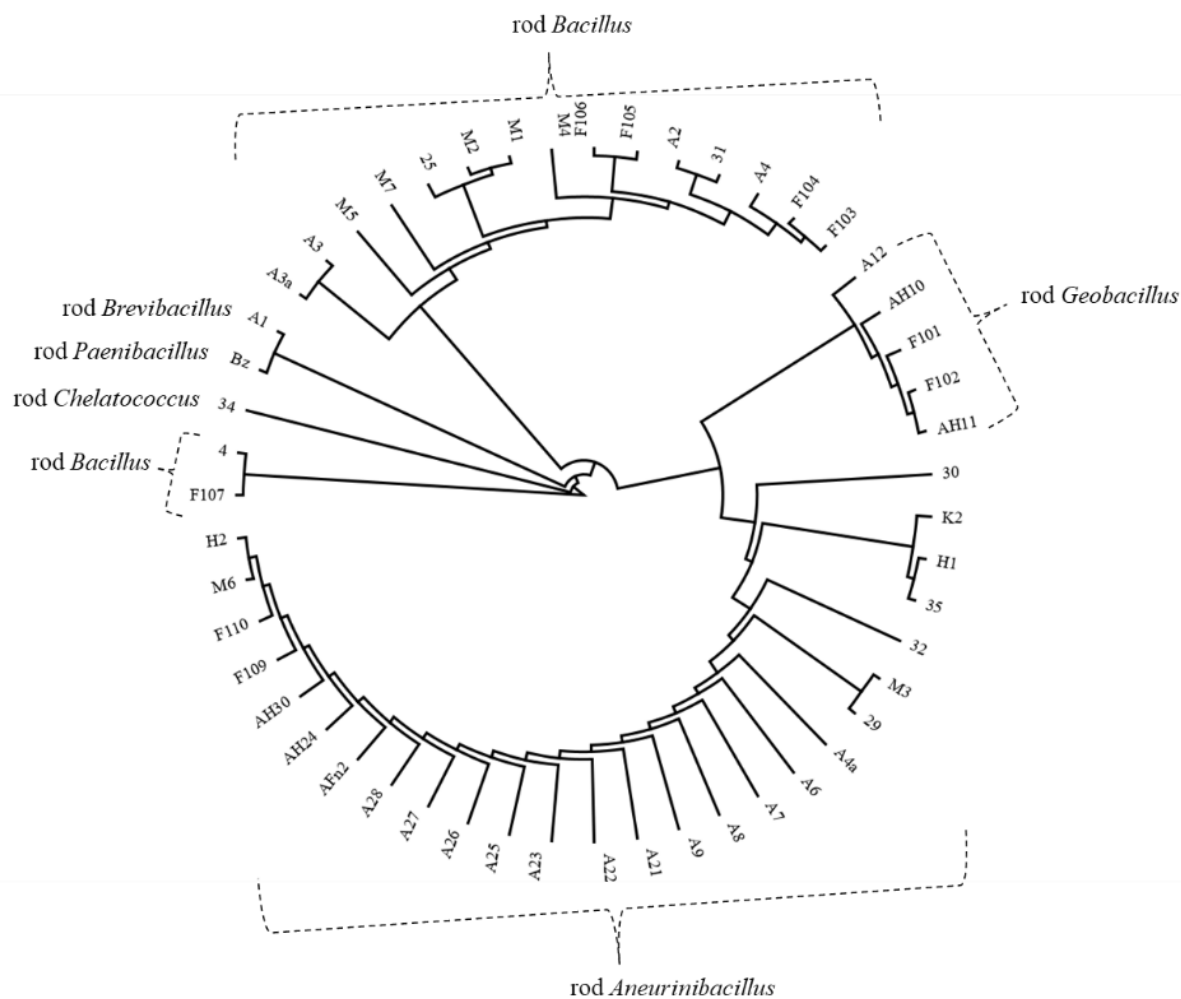
Rok izolace	Původ vzorku	Název izolátu	Substrát izolace	Teplota izolace	Taxonomické zařazení	GeneBank číslo
2019	kompost, Brno	F101	glukóza	70	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> 99,85 %	MT634739
		F102	glukóza	70	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> 100 %	MT634740
		F103	glukóza	50	<i>Bacillus licheniformis</i> 99,70 %	MT634742
		F104	glukóza	50	<i>Bacillus haynesii</i> 99,99 %	MT634741
		F105	glukóza	50	<i>Bacillus haynesii</i> 99,99 %	MT634743
		F106	glukóza	50	<i>Bacillus licheniformis</i> 99,63 %	MT634744
		F107	glukóza	50	<i>Bacillus piscis</i> 100 %	MT634745
		F108	glukóza	50	<i>polymikrobiální</i>	
		F109	glukóza	50	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> 99,78 %	MT634746
		F110	glukóza	50	<i>Aeurinibacillus</i> sp. 100 %	MT634747
	aktivovaný kal, Brno-Modřice	M1	glukóza	50	<i>Bacillus subtilis</i> 99,93 %	MT636249
		M2	glukóza	50	<i>Bacillus subtilis</i> 99,93 %	MT636934
		M3	glukóza	50	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> 99,78 %	MT636367



Rok izolace	Původ vzorku	Název izolátu	Substrát izolace	Teplota izolace	Taxonomické zařazení	GeneBank číslo
2019	aktivovaný kal, Brno-Modřice	M4	glycerol	50	<i>Bacillus piscis</i> 99,74 %	MT636370
		M5	glycerol	50	<i>Bacillus cytotoxicus</i> 99,89 %	MT636369
		M6	$\gamma$ -butyrolakton	50	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> 99,63 %	MT636459
		M7	$\gamma$ -butyrolakton	50	<i>Bacillus shackletonii</i> 99,12 %	MT636458

\* Sekvence genu *16S rRNA* izolátu Bz nebylo možné vložit do systému GenBank a tím získat GenBank číslo, protože i přes opakované izolace a sekvenace nebylo dosaženo kvalitních výsledků

Pomocí sekvencí genu *16S rRNA*, které sloužily i k taxonomickému zařazení jednotlivých izolátů do bakteriálních rodů, byl vytvořen fylogenetický strom pomocí programu Geneious Prime, metodou UPGMA a genetickým distančním modelem Tamura-Nei. Na obrázku 33 lze pozorovat fylogenetický strom jednotlivých izolátů získaných pomocí osmoselektce z aktivovaného kalu a kompostu. Jednotlivé rody jsou odděleny, akorát rod *Bacillus* je rozdělen na dvě nesouvisející větve. Rody *Brevibacillus* a *Paenibacillus* tvoří společnou větev, protože tvoří jeden klastr čeledi *Paenibacillaceae*.



**Obrázek 33: Fylogenetický strom pomocí sekvencí genu *16S rRNA* izolátů.** Fylogenetický strom byl vytvořen ze sekvencí genu *16S rRNA* pomocí programu Geneious Prime, metodou UPGMA a genetickým distančním modelem Tamura-Nei.

#### 4.3.3. Detekce PHA syntázy termofilních izolátů

Klíčovým enzymem při produkci polyhydroxyalkanoátů je PHA syntáza. Substrátem pro tento enzym jsou (*R*)-hydroxyalkanové kyseliny koenzymu A. Hydroxyalkanové kyseliny mohou mít rozdílnou délku uhlíkatého řetězce a také různé substituenty [207]. Na základě primární struktury, složení podjednotek a substrátové specifity se PHA syntázy dělí do čtyř tříd [208]. První třída je tvořena jednou podjednotkou PhaC se substrátovou specifitou k řetězcům dlouhým pouze 3 až 5 uhlíků, tvoří tedy scl-PHA. Mezi typické zástupce patří *Cupriavidus*

*necator*. Druhá třída je také tvořena podjednotkou PhaC, ale dochází k tvorbě mcl-PHA a je typická pro bakterie rodu *Pseudomonas*. Syntáza třetí a čtvrté třídy je tvořena dvěma podjednotkami. Třetí třída s podjednotkami PhaC a PhaE tvoří scl-PHA, ale dokáže syntetizovat i mcl-PHA. Čtvrtá třída PHA syntáz je typická pro rod *Bacillus* a jemu příbuzné rody se substrátovou specifitou k tvorbě scl-PHA [209].

U vybraných izolátů byla snaha detekovat gen PHA syntázy pro vybrané třídy pomocí PCR a příslušných primerů. Pro třídu I byly vybrány primery se širokou specifitou a jako pozitivní kontrola byla použita bakterie *Cupriavidus necator* H16 CCM 3726. Pokud byla u izolátu potvrzena přítomnost první třídy, byl daný izolát otestován příslušnými primery i na druhou třídu, kde jako pozitivní kontrola byla použita DNA z bakterie *Pseudomonas putida* KT2440 DSM 6125. Po taxonomickém zařazení izolátů bylo zjištěno, že převážná část izolátů patří do třídy *Bacilli*, proto byla PHA syntáza izolátů detekována pomocí tří různých sad primerů pro čtvrtou třídu. První pár primerů byl pro skupinu *phaC* spadající do skupiny *Bacillus cereus*. Druhou skupinu tvořily primery pro detekci *phaC* genu pro bakterii *Bacillus megaterium* [210]. Bohužel se ukázalo, že gen rodu *Aneurinibacillus* není možné amplifikovat s využitím výše popsaných primerů. Proto byly navrženy nové primery přímo pro rod *Aneurinibacillus* a tyto primery byly zařazeny jako třetí stanovená skupina u čtvrté třídy.

Vybrané izoláty z roku 2019 byly podrobeny detekci PHA syntázy (Tabulka 27). První třída byla potvrzena u izolátů Bz, A1, A2, A3, A4, AH10, F101, F106, M1, M2 a M4. Což bylo překvapivé, protože se jedná o bakterie rodu *Bacillus* nebo jemu příbuzné rody a pro ně je charakteristická PHA syntáza třídy IV [210]. Tyto izoláty byly také otestovány na PHA syntázu druhé třídy, která byla potvrzena u izolátů Bz, A1 a A3. Druhá třída je typická pro rod *Pseudomonas* a ve třídě *Bacilli* se často nevyskytuje, avšak jsou známy případy, kdy bakterie rodu *Bacillus* byly schopny produkce mcl-PHA [211]. Izoláty, u kterých byla potvrzena PHA syntáza druhé třídy, by měly být také schopny produkce mcl-PHA.

**Tabulka 27: Stanovení genů PHA syntázy u izolátů z roku 2019**

		<b>Třída I</b>	<b>Třída II</b>	<b>Třída IV</b>	
	pozitivní kontrola	<i>Cupriavidus necator</i> H16	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Aneurinibacillus</i> sp. H1	<i>Bacillus cereus</i>
	použité primery	G-D/G1-R	E1-D/R	phaCAb-F/R	phaCBc-F/R
<b>Označení izolátu</b>	taxonomické zařazení izolátu	přítomnost genu pro PHA syntázu			
<b>Bz</b>	<i>Paenibacillus</i> sp.	+	+		
<b>A1</b>	<i>Brevibacillus</i> sp.	+	+		
<b>A2</b>	<i>Bacillus licheniformis</i>	+			
<b>A3</b>	<i>B. coagulans</i>	+	+		
<b>A3a</b>	<i>B. coagulans</i>				
<b>A4</b>	<i>B. haynesii</i>	+			
<b>A4a</b>	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>			+	
<b>A5</b>	polymikrobiální			+	
<b>A5a</b>	polymikrobiální			+	

Označení izolátu	Taxonomické zařzení izolátu	Třída I	Třída II	Třída IV ( <i>Aneurinibacillus</i> )	Třída IV ( <i>Bacillus cereus</i> )
A6	<i>A. thermoaerophilus</i>			+	
A7	<i>A. thermoaerophilus</i>			+	
A8	<i>A. thermoaerophilus</i>			+	
A9	<i>A. thermoaerophilus</i>			+	
A12	<i>G. stearothermophilus</i>				
A21	<i>A. thermoaerophilus</i>			+	
A22	<i>A. thermoaerophilus</i>			+	
A23	<i>A. thermoaerophilus</i>			+	
A25	<i>A. thermoaerophilus</i>			+	
A26	<i>A. thermoaerophilus</i>			+	
A27	<i>A. thermoaerophilus</i>			+	
A28	<i>A. thermoaerophilus</i>			+	
AFn1	polymikrobiální			+	

Označení izolátu	Taxonomické zařezání izolátu	Třída I	Třída II	Třída IV ( <i>Aneurinibacillus</i> )	Třída IV ( <i>Bacillus cereus</i> )
<b>AFn2</b>	<i>A. thermoaerophilus</i>			+	
<b>AH10</b>	<i>G. thermodenitrificans</i>	+			
<b>AH11</b>	<i>Geobacillus</i> sp.				
<b>AH24</b>	<i>A. thermoaerophilus</i>			+	
<b>AH30</b>	<i>A. thermoaerophilus</i>			+	
<b>F101</b>	<i>G. thermodenitrificans</i>	+		+	
<b>F102</b>	<i>G. thermodenitrificans</i>				
<b>F103</b>	<i>B. licheniformis</i>				
<b>F104</b>	<i>B. haynesii</i>				
<b>F105</b>	<i>B. haynesii</i>				
<b>F106</b>	<i>B. licheniformis</i>	+			
<b>F107</b>	<i>B. piscis</i>				
<b>F108</b>	polymikrobiální			+	

Označení izolátu	Taxonomické zařazení izolátu	Třída I	Třída II	Třída IV ( <i>Aneurinibacillus</i> )	Třída IV ( <i>Bacillus cereus</i> )
<b>F109</b>	<i>A. thermoaerophilus</i>			+	
<b>F110</b>	<i>Aneurinibacillus</i> sp.			+	+
<b>M1</b>	<i>B. subtilis</i>	+			
<b>M2</b>	<i>B. subtilis</i>	+			
<b>M3</b>	<i>A. thermoaerophilus</i>			+	
<b>M4</b>	<i>B. piscis</i>	+			
<b>M5</b>	<i>B. cytotoxicus</i>				
<b>M6</b>	<i>A. thermoaerophilus</i>			+	
<b>M7</b>	<i>B. shackletonii</i>			+	

PHA syntáza třídy IV pro skupinu *B. megaterium* nebyla prokázána u žádného z izolátů. Skupina PHA syntáz na základě *B. cereus* byla prokázána pouze u jednoho izolátu, a to u F110, který byl taxonomicky zařazen jako *Aneurinibacillus* sp. U tohoto izolátu byla také potvrzena PHA syntáza specifická pro rod *Aneurinibacillus*. Syntáza třídy IV, kde byly primery navrženy právě podle bakterie *Aneurinibacillus* sp. XH2, jejíž genom je veřejně dostupný [212], byla potvrzena u všech izolátů taxonomicky zařazených jako rod *Aneurinibacillus*. Dokonce i u izolátů, které se nepodařilo taxonomicky zařadit, protože jejich sekvence byly polymikrobiální, byla potvrzena PHA syntáza třídy IV spadající pod rod *Aneurinibacillus*. Avšak tato PHA syntáza byla potvrzena i u dalších bakteriálních rodů, jako byl například izolát F101, který byl klasifikován jako *Geobacillus thermodenitrificans* a byla u něho potvrzena i první třída PHA syntázy. Je zajímavé, že u izolátu F102, který byl taxonomicky zařazen ke stejnému rodu i druhu, nebyla potvrzena žádná testovaná PHA syntáza. Také u izolátu M7 byla potvrzena PHA syntáza třídy IV charakteristická pro rod *Aneurinibacillus*. Avšak tento izolát byl taxonomicky zařazen jako *Bacillus shackletonii*.

U některých izolátů nebyla detekována pomocí námi dostupných primerů žádná PHA syntáza. To ovšem neznamená, že izoláty nemohou být schopny akumulace PHA. Pro PHA syntázy spadající do třídy IV neexistuje univerzální sada primerů a navíc se ukazuje, že tato třída PHA syntáz bude velice rozmanitá a bude obsahovat více podskupin.

#### 4.3.4. Testování produkce PHA u vybraných izolátů

Potenciál produkce PHA byl testován u všech izolátů získaných pomocí osmoselektce. Testování probíhalo ve více experimentech. Nejprve byla schopnost produkovat PHA ověřena na substrátech použitých pro izolaci jednotlivých kmenů za standardních podmínek, jak je popsáno v kapitole 3.8.3. Teplota kultivace byla 50 a 60 °C, pouze izoláty, které byly izolovány při 70 °C, byly kultivovány při 60 a 70 °C. Izoláty izolované z odběrů v roce 2019 byly testovány i na více zdrojích uhlíku, jako byl například glycerol, olej či také byla testována schopnost produkce kopolymeru na 1,4-butandiolu.

Výsledky screeningu produkce PHA pomocí termofilních izolátů zobrazuje tabulka 28. Izoláty, které byly izolovány v roce 2018, měly obecně vyšší výtěžky biomasy, což mohlo být způsobeno tím, že produkce probíhala 72 h, zatímco izoláty z roku 2019 byly kultivovány pouze 48 h. Avšak pro prvotní screening schopnosti akumulace PHA vliv o něco delší kultivační doby zanedbatelný. Produkce PHA byla potvrzena u všech izolátů z roku 2018 při kultivační teplotě 50 °C, kromě izolátu označeného jako 28. Izolát 28 byl pomocí sekvenace genu *16S rRNA* klasifikován jako polymikrobiální, takže PHA producenta mohla „přerůst“ mikrobiální kultura, která není schopna produkce PHA. Izoláty 4, 25 a 31 patří do rodu *Bacillus*, pro které je produkce PHA charakteristická a hojně popsána [213–215], avšak nebyly schopny produkce PHA při vyšší kultivační teplotě. I nárůst biomasy byl znatelně nižší. Jejich optimální teplota růstu se bude nejspíše pohybovat okolo nebo pod 50 °C, a bude se spíše jednat o termotolerantní bakterie nežli o pravé termofily. Izolát 34 byl schopen produkce PHA na glycerolu u obou kultivačních teplot. Jedná se o izolát určený jako *Chelatococcus composti*. U jeho příbuzných kmenů byla produkce PHA již dříve popsána. Například bakterie *Chelatococcus dauguensis* TAD1 byla schopna produkovat okolo 2 g/l P(3HB) na glycerolu při 50 °C [184]. Také



*Chelatococcus* sp. MW10 byl schopen produkovat P(3HB) [84]. Izoláty 29, 30, 32, 34 a 35 byly schopny produkce PHA také v obou testovaných teplotách. Ve všech případech se jedná o izoláty zařazené pod rod *Aneurinibacillus*, u kterého byla popsána produkce PHA pouze v rámci publikace Z. Y. Xiao a kolektivu [216].

**Tabulka 28: Produkce polyhydroxyalkanoátů pomocí termofilních izolátů na uhlíkatém zdroji izolace při kultivační teplotě 50 a 60 °C**

Rok izolace	Zdroj uhlíku	Označení izolátu	Kultivační teplota 50 °C		Kultivační teplota 60 °C	
			biomasa [g/l]	PHA [g/l]	biomasa [g/l]	PHA [g/l]
2018	glukóza	4	0,62 ± 0,13	0,08 ± 0,01	0,23 ± 0,03	n.d.
		25	2,79 ± 0,18	1,53 ± 0,15	0,17 ± 0,02	n.d.
		28	1,21 ± 0,05	n.d.	0,29 ± 0,08	n.d.
	glycerol	29	1,44 ± 0,16	0,65 ± 0,01	0,96 ± 0,07	0,24 ± 0,01
		30	1,51 ± 0,04	0,70 ± 0,01	0,90 ± 0,01	0,32 ± 0,01
		31	3,37 ± 0,21	2,09 ± 0,15	0,19 ± 0,01	n.d.
		32	1,34 ± 0,09	0,64 ± 0,01	0,94 ± 0,01	0,21 ± 0,01
		34	3,37 ± 0,01	1,25 ± 0,05	1,47 ± 0,24	0,50 ± 0,01
		35	1,77 ± 0,16	0,91 ± 0,01	1,01 ± 0,04	0,25 ± 0,02
2019	glycerol	Bz	1,00 ± 0,05	0,01 ± 0,00	n.d.	n.d.
	glycerol	A1	1,41 ± 0,08	0,04 ± 0,00	n.d.	n.d.
		A2	0,42 ± 0,06	0,01 ± 0,00	n.d.	n.d.
	γ-butyrolakton	A3	n.d.	n.d.	0,07 ± 0,01	n.d.
		A3a	0,34 ± 0,02	n.d.	n.d.	n.d.
	glukóza	A4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		A4a	1,47 ± 0,08	0,28 ± 0,01	0,41 ± 0,02	n.d.
		A5	1,79 ± 0,01	0,49 ± 0,03	0,25 ± 0,02	0,03 ± 0,01
A5a		0,84 ± 0,17	0,06 ± 0,01	0,20 ± 0,06	n.d.	

Rok izolace	Zdroj uhlíku	Označení izolátu	Kultivační teplota 50 °C		Kultivační teplota 60 °C	
			biomasa [g/l]	PHA [g/l]	biomasa [g/l]	PHA [g/l]
2019	glukóza	A6	1,57 ± 0,10	0,35 ± 0,02	0,15 ± 0,01	n.d.
		A7	1,70 ± 0,21	0,39 ± 0,02	0,13 ± 0,01	n.d.
		A8	1,43 ± 0,02	0,29 ± 0,01	0,14 ± 0,04	n.d.
		A9	1,71 ± 0,12	0,48 ± 0,02	0,15 ± 0,01	n.d.
		A21	1,28 ± 0,08	0,31 ± 0,01	0,10 ± 0,01	n.d.
		A22	1,61 ± 0,14	0,34 ± 0,02	0,34 ± 0,05	0,02 ± 0,01
		A23	1,43 ± 0,30	0,36 ± 0,02	0,13 ± 0,01	n.d.
		A25	1,69 ± 0,02	0,45 ± 0,02	0,73 ± 0,01	0,04 ± 0,01
		A26	1,63 ± 0,18	0,33 ± 0,02	0,25 ± 0,06	0,03 ± 0,01
		A27	2,39 ± 0,10	0,78 ± 0,04	0,57 ± 0,03	0,01 ± 0,00
		A28	1,09 ± 0,32	0,25 ± 0,01	0,17 ± 0,03	n.d.
		AFn1	0,83 ± 0,16	0,14 ± 0,01	0,34 ± 0,03	n.d.
		AFn2	2,27 ± 0,09	1,09 ± 0,05	0,15 ± 0,01	n.d.
		AH24	1,37 ± 0,01	0,31 ± 0,02	0,34 ± 0,01	n.d.
	AH30	2,29 ± 0,04	0,71 ± 0,03	0,77 ± 0,06	0,02 ± 0,00	
	glukóza	F103	0,24 ± 0,11	n.d.	n.d.	n.d.
		F104	0,37 ± 0,02	0,01 ± 0,00	n.d.	n.d.
		F105	0,42 ± 0,02	n.d.	n.d.	n.d.
		F106	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		F107	0,67 ± 0,01	n.d.	0,73 ± 0,01	0,01 ± 0,00
F108		1,29 ± 0,02	0,42 ± 0,02	0,15 ± 0,01	n.d.	

Rok izolace	Zdroj uhlíku	Označení izolátu	Kultivační teplota 50 °C		Kultivační teplota 60 °C	
			biomasa [g/l]	PHA [g/l]	biomasa [g/l]	PHA [g/l]
2019	glukóza	F109	0,90 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,11 ± 0,01	n.d.
		F110	0,77 ± 0,06	0,06 ± 0,01	0,10 ± 0,01	n.d.
	glukóza	M1	0,78 ± 0,18	n.d.	0,60 ± 0,04	n.d.
		M2	0,82 ± 0,17	n.d.	0,75 ± 0,04	n.d.
		M3	2,33 ± 0,01	0,81 ± 0,04	0,04 ± 0,01	n.d.
	glycerol	M4	0,61 ± 0,04	n.d.	0,25 ± 0,01	0,02 ± 0,00
		M5	1,22 ± 0,05	0,01 ± 0,00	0,27 ± 0,02	0,04 ± 0,01
	γ-butyrolakton	M6	0,12 ± 0,03	0,01 ± 0,00	n.d.	n.d.
		M7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. – nedetekováno

Všechny izoláty z roku 2019, které patří do rodu *Aneurinibacillus* (A4a, A6, A7, A8, A9, A21, A22, A23, A25, A26, A27, A28, AFn2, AH24, AH30, F109, F110, M3 a M6), byly schopny produkce PHA při 50 °C. Nejvyšších hodnot produkce dosahovaly izoláty A27 s produkcí 0,78 g/l P(3HB), M3 s produkcí P(3HB) 0,81 g/l a izolát AFn2 s produkcí 1,09 g/l P(3HB). Jednalo se o produkci na glukóze jako jediném zdroji uhlíku. Izolát *Aneurinibacillus* sp. XH1 izolovaný z ropného pole byl schopen produkce P(3HB) pouze okolo 0,1 g/l [216]. Oproti izolátům zařazených do rodu *Aneurinibacillus* z roku 2018, byly schopny produkce PHA při 60 °C pouze některé izoláty, a to izoláty s označením A22, A25, A27 a AH30, kdy však jejich produkce PHA rapidně klesla.

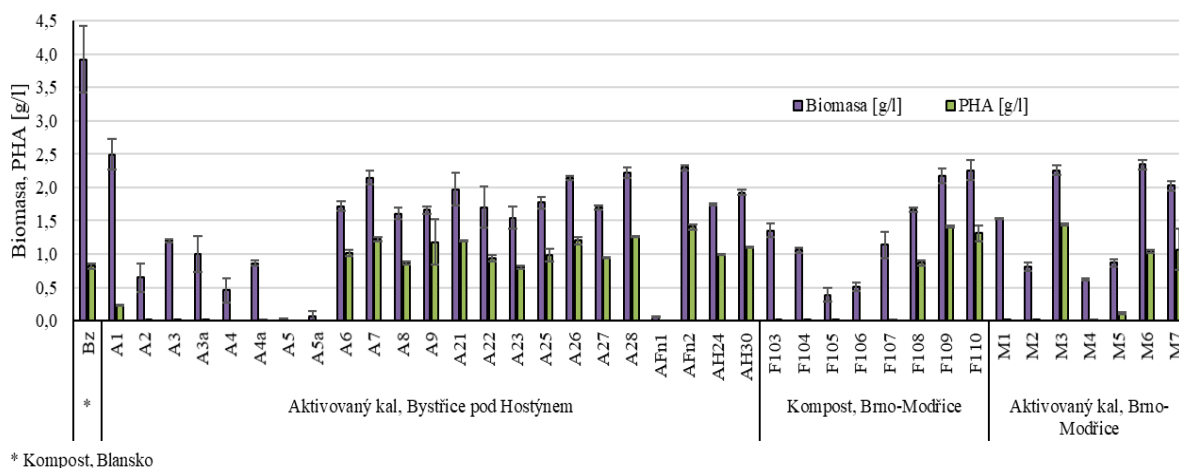
Produkce PHA při 60 °C byla také zaznamenána u izolátů označených jako A5, tento vzorek byl vyhodnocen jako polymikrobiální, ale produkoval P(3HB) v malé míře právě i za zvýšené teploty. Izoláty F107 a M4 byly taxonomicky zařazeny jako *Bacillus piscis*, tyto izoláty byly také schopny produkce P(3HB) při obou teplotách. U tohoto druhu ještě nebyla popsána produkce PHA.

Izoláty označené jako M1 a M2, které jsou taxonomicky zařazeny jako *Bacillus subtilis*, nebyly schopny téměř žádné produkce PHA, přitom právě produkce biopolymeru PHA je u tohoto druhu hojně popsána a zkoumána [217].

Izoláty z roku 2019 byly podrobeny detailnějšímu screeningu biotechnologického potenciálu produkce PHA. Dalším testovaným zdrojem uhlíku byl glycerol, který byl použit jako jediný

zdroj uhlíku v koncentraci 20 g/l u všech izolátů bez ohledu na to z jakého uhlíkatého zdroje byly získány. Glycerol je hlavním vedlejším produktem při výrobě bionafty. Tím, jak roste spotřeba bionafty, tím víc vzniká odpadního glycerolu. Čištění odpadního glycerolu je však velmi drahé, proto se hledají alternativní způsoby využití. Jednou z nich je například získávání mono, di či triacylglycerolů [218]. Dále je možné využít odpadní glycerol do dřevěných pelet [219] nebo může sloužit jako vstupní surovina pro produkci polyhydroxyalkanoátů [220; 221].

Vzhledem k předchozím výsledkům screeningu produkce při různých teplotách bylo rozhodnuto, že následující experiment bude probíhat pouze při 50 °C. Jako jediný zdroj uhlíku byl použit glycerol. Naměřená data jsou uvedena na obrázku 34. U většiny izolátů lze pozorovat vyšší nárůst biomasy na glycerolu než na glukóze či na  $\gamma$ -butyrolaktonu, které byly využity jako substrát při izolaci. Je zajímavé, že množství biomasy bakterie Bz (*Paenibacillus* sp.) se navýšilo téměř čtyřnásobně, i když zdroj uhlíku i podmínky kultivace zůstaly stejné. I množství P(3HB) se zvýšilo, téměř na 1 g/l. Také u izolátů, které byly původně izolovány z  $\gamma$ -butyrolaktonu (A3, A3a, M6 a M7), se zvýšilo množství biomasy. Přesto však izoláty A3 a A3a neprodukovaly téměř žádný P(3HB). Avšak u izolátů M6 a M7 byla zaznamenána produkce P(3HB) okolo 1 g/l. Izoláty, které byly taxonomicky zařazeny do rodu *Bacillus* (A2, A4, F103 až F107), produkovaly téměř zanedbatelné množství P(3HB) nebo nebyly schopny produkce vůbec. Aby došlo ke zvýšení produkce PHA pomocí rodu *Bacillus*, bylo by nejspíše nutné optimalizovat složky v minerálním médiu. U skupiny izolátů taxonomicky patřících k rodu *Aneurinibacillus* se produkce PHA na glycerolu oproti glukóze ve většině případů spíše navýšila. Proto lze říci, že izoláty rodu *Aneurinibacillus* by mohly být vhodné pro produkci PHA na odpadním glycerolu. Spojení termofilních bakterií a odpadního zdroje jako vstupní suroviny by mohlo vést ke snížení nákladů na biotechnologickou produkci PHA, a tím i zvýšení konkurenceschopnosti tohoto biodegradabilního polymeru.

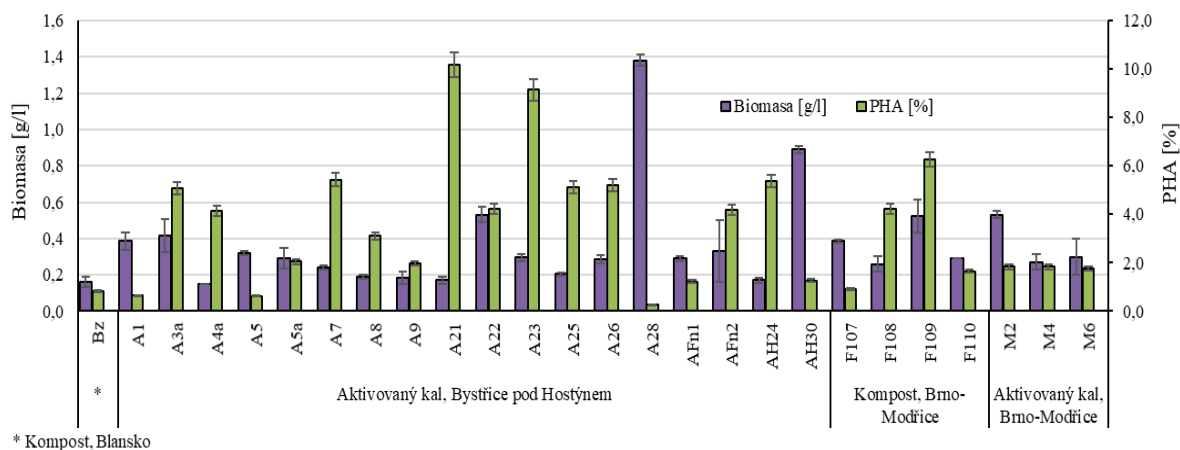


**Obrázek 34: Produkce PHA na 20 g/l glycerolu jako jediném zdroji uhlíku u vybraných izolátů.**

Kultivace probíhala 72 h při 50 °C. Výsledné hodnoty jsou dány průměrem paralelního měření, chybová úsečka zobrazuje směrodatnou odchylku.

Dalším testovaným uhlíkatým substrátem pro produkci PHA byl olej. Výsledky produkce PHA na oleji pomocí termofilních izolátů zobrazuje obrázek 35. Některé izoláty (A3, A4, A6, A27, F103, F106, M1, M3 a M7) nebyly schopny olej využít. Izoláty s označením A2, F104, F105 a M5 byly schopny využít olej, avšak nebyly schopné produkce PHA. Ostatní izoláty

byly schopny jak využít olej, tak i produkovat PHA. Produkce PHA byla všeobecně nižší než na ostatních zdrojích uhlíku. V nejlepším případě dosáhlo množství PHA pouze okolo 10 % hmotnosti suché biomasy, a to u izolátu A21. Produkce PHA byla spíše zaznamenána u izolátů zařazených do rodu *Aneurinibacillus*. V rámci těchto izolátů byl však pozorovatelný značný rozdíl v nárůstu biomasy i v produkci PHA. I když některé izoláty byly shodně zařazeny pod stejný rod i druh, vyskytují se na základě fenotypových znaků značné rozdíly mezi jednotlivými izoláty.



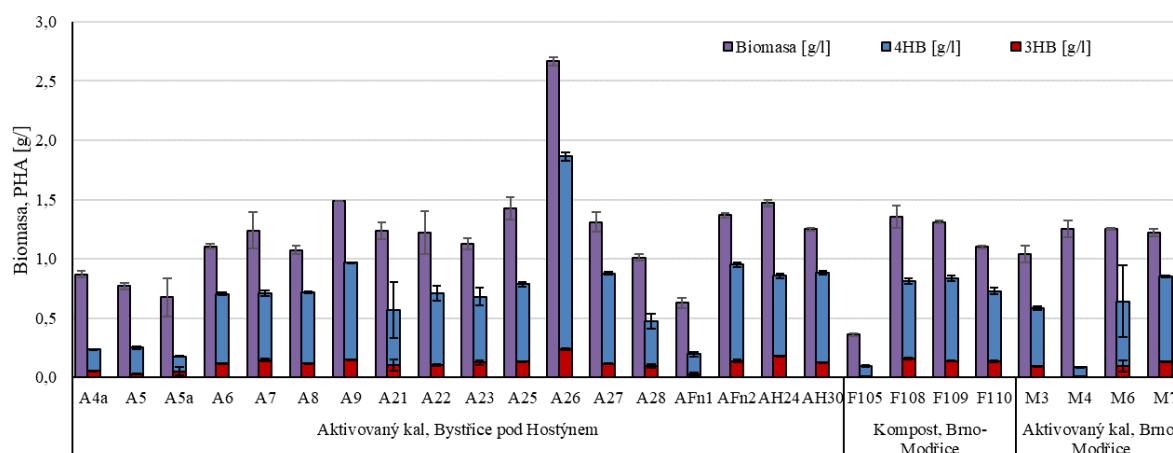
**Obrázek 35: Testování potenciálu využít olej a produkovat PHA u vybraných izolátů.**

Produkce probíhala při 50 °C za využití 20 g/l rostlinného oleje jako jediného zdroje uhlíku. Výsledné hodnoty jsou dány průměrem paralelního měření, chybová úsečka zobrazuje směrodatnou odchylku.

Využití oleje k produkci PHA pomocí termofilních izolátů se neukázalo příliš vhodné kvůli malé produkci biomasy i PHA. Některé izoláty byly sice schopny využít olej a produkce PHA, ale celková rentabilita procesu je pravděpodobně nulová.

V rámci screeningu produkce PHA u termofilních izolátů byla také ověřena schopnost produkovat kopolymer P(3HB-co-4HB) nebo dokonce samotný P(4HB). Jako zdroj uhlíku a zároveň strukturální prekurzor 4HB byl použit 1,4-butandiol v koncentraci 4 g/l. Inkorporace 4HB do polymeru vede ke změnám fyzikálních i mechanických vlastností kopolymeru. Kopolymery se 4HB jsou výrazně méně krystalické, mají nižší teplotu tání a jsou značně flexibilnější než ostatní zástupci scl-PHA. Proto mají vysoký aplikační potenciál v řadě oblastí. Za zmínku stojí například využití v oblasti biomedicínských aplikací [8; 222]. Izoláty označené jako A2, F103 a F104 nebyly schopny využít 1,4-butandiolu. Zato izoláty A1, A3, A3a, F106, F107, M1, M2 a M5 byly schopny tento substrát využít. Jejich bakteriální nárůst se pohyboval do 0,5 g/l, avšak nebyly schopny produkovat žádné PHA. Izolát označený jako Bz byl schopen vyššího bakteriálního nárůstu okolo 1,3 g/l, ale také nebyl schopen produkce PHA. Tyto izoláty pro přehlednost nejsou uvedeny na obrázku 36, který znázorňuje výsledky screeningu schopnosti produkovat kopolymer na 1,4-butandiolu jako jediném zdroji uhlíku. Na základě naměřených dat lze konstatovat, že rod *Aneurinibacillus* je dobrým producentem kopolymeru P(3HB-co-4HB). Průměrně je kopolymer složený z více jak 80 mol.% z monomeru 4HB. Nejlepších výsledků dosáhl izolát označený jako A26, kdy jeho produkce kopolymeru bez jakékoliv optimalizace dosahovala téměř 2 g/l s 87 mol. % 4HB. Tento izolát byl klasifikován jako *Aneurinibacillus thermoaerophilus*. Izolát F105, klasifikován jako

*Bacillus haynesii*, a izolát M4 (*Bacillus piscis*) byly schopny produkce kopolymeru se zastoupením 4HB vyšších než 90 mol. %. Dalším slibným producentem, u kterého dosahovalo množství PHA až 70 % hmotnosti suché biomasy, byl izolát M7 taxonomicky zařazen jako *Bacillus shackletonii*. Kopolymer zahrnoval více než 80 mol. % monomeru 4HB.



**Obrázek 36: Testování potenciálu tvořit kopolymer P(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát).**

Kultivace probíhala 48 h při 50 °C na 4 g/l 1,4-butandiolu jako jediném zdroji uhlíku u vybraných izolátů. Chybová úsečka zobrazuje směrodatnou odchylku.

Screening potenciálu produkce PHA proběhl také u izolátů kultivovaných při teplotě 70 °C. Mezi tyto izoláty patřily izoláty s označením AH10, AH11, A12, F101 a F102. Jejich schopnost produkovat PHA byla testována při dvou kultivačních teplotách a to při 70 a 60 °C. Jako uhlíkatý substrát byl použit původní zdroj izolace, tedy glukóza nebo glycerol v koncentraci 20 g/l. Pro studium syntézy kopolymeru P(3HB-co-4HB) byl jako jediný zdroj uhlíku použit 1,4-butandiol, a to v koncentraci 4 g/l. Všechny izoláty byly taxonomicky zařazeny pod rod *Geobacillus*. Dříve spadaly bakterie rodu *Geobacillus* taxonomicky pod rod *Bacillus* [223; 224], proto lze předpokládat, že by mohly být bakterie rodu *Geobacillus* schopné produkce PHA. Avšak produkce tímto rodem je popsána jen v několika separátech, přičemž kmeny popisované v těchto publikacích nejsou dostupné ve veřejných sbírkách mikroorganismů. Proto produkci PHA ani správnou taxonomickou klasifikaci tedy není možné ověřit [225–227].

Výsledky testování produkce PHA za využití izolátů patřících k rodu *Geobacillus* zobrazuje tabulka 29. Všechny izoláty byly schopny alespoň malého růstu na všech zdrojích uhlíku při 70 °C, avšak s nižším množstvím biomasy než při 60 °C. Výjimku představuje izolát s označením AH11, který vykazoval vyšší výtěžky biomasy při 70 °C na glycerolu než při 60 °C. Nicméně produkce PHA při 70 °C byla spíše zanedbatelná. Jako vhodnější kultivační teplota pro produkci PHA se jevila teplota 60 °C. Při této teplotě byly izoláty s označením F101 a F102 schopny produkce PHA jak na glukóze, tak na glycerolu, avšak na glukóze byla produkce až třikrát vyšší. Tyto izoláty byly také schopny produkovat kopolymer P(3HB-co-4HB). Produkce PHA u izolátu F101 dosahovala 0,22 g/l se zastoupením téměř 80 mol. % 4HB. Izolát s označením F102, i když byl taxonomicky zařazen ke stejnému rodu i druhu jako F101, měl produkci nižší a to 0,14 g/l se zastoupením 4HB 59 mol. %. Produkce kopolymeru P(3HB-co-4HB) u rodu *Geobacillus* nebyla dosud popsána.

**Tabulka 29: Screening produkce PHA u izolátů získaných při 70 °C.** Produkce probíhala po dobu 72 h při 60 a 70 °C za využití různých zdrojů uhlíku.

Teplota	Uhlíkatý zdroj		Označení izolátu	Biomasa [g/l]	PHA [g/l]	3HB [mol. %]	4HB [mol. %]	
60 °C	původní zdroj	glycerol	AH10	0,43 ± 0,03	n.d.	n.d.	n.d.	
		glycerol	AH11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		glukóza	A12	0,33 ± 0,01	n.d.	n.d.	n.d.	
		glukóza	F101	2,57 ± 0,01	1,01 ± 0,02	100	n.d.	
		glukóza	F102	2,30 ± 0,01	0,73 ± 0,06	100	n.d.	
	Glycerol		AH10	0,43 ± 0,03	n.d.	n.d.	n.d.	
			AH11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
			A12	0,45 ± 0,04	n.d.	n.d.	n.d.	
			F101	0,88 ± 0,12	0,31 ± 0,01	100	n.d.	
			F102	0,89 ± 0,01	0,31 ± 0,00	100	n.d.	
	1,4-butandiol		AH10	0,20 ± 0,03	n.d.	100	n.d.	
			AH11	0,21 ± 0,02	n.d.	n.d.	n.d.	
			A12	0,39 ± 0,01	0,13 ± 0,01	11,6	88,4	
			F101	0,57 ± 0,17	0,22 ± 0,01	21,3	78,7	
			F102	0,51 ± 0,01	0,14 ± 0,01	41,0	59,0	
	70 °C	původní zdroj	glycerol	AH10	0,26 ± 0,02	n.d.	100	n.d.
			glycerol	AH11	0,33 ± 0,04	0,01 ± 0,00	100	n.d.
			glukóza	A12	0,09 ± 0,01	0,01 ± 0,00	100	n.d.
glukóza			F101	0,23 ± 0,01	n.d.	100	n.d.	
glukóza			F102	0,44 ± 0,04	n.d.	100	n.d.	

Teplota	Uhlíkatý zdroj	Označení izolátu	Biomasa [g/l]	PHA [g/l]	3HB [mol %]	4HB [mol %]
70 °C	glycerol	AH10	0,26 ± 0,02	n.d.	100	n.d.
		AH11	0,33 ± 0,04	0,01 ± 0,00	100	n.d.
		A12	0,36 ± 0,08	n.d.	100	n.d.
		F101	0,01 ± 0,00	n.d.	100	n.d.
		F102	0,31 ± 0,07	n.d.	100	n.d.
	1,4-butandiol	AH10	0,24 ± 0,04	n.d.	100	n.d.
		AH11	0,27 ± 0,02	n.d.	100	n.d.
		A12	0,05 ± 0,01	n.d.	100	n.d.
		F101	0,19 ± 0,04	n.d.	100	n.d.
		F102	0,61 ± 0,05	0,01 ± 0,00	100	n.d.

n.d. – nedetekováno

U vybraných termofilních izolátů byla testována produkce PHA při více kultivačních teplotách a na různých zdrojích uhlíku, jako byla například glukóza, glycerol, olej či 1,4-butandiol. Obecně byla produkce PHA vyšší při 50 °C, nejvyšší produkce dosáhl izolát s označením 31 na glycerolu a to přes 2 g/l P(3HB). Také byla testována produkce PHA na oleji, ukázalo se však, že kvůli nízkým výtěžkům nejsou testované termofilní izoláty příliš vhodné k produkci PHA na oleji. Dále byla testována schopnost produkce kopolymeru se 4HB, který výrazně ovlivňuje mechanické i fyzikální vlastnosti daného polymeru. Jako zdroj uhlíku a zároveň prekurzor kopolymeru P(3HB-co-4HB) byl použit 1,4-butandiol v koncentraci 4 g/l. Izoláty patřící do rodu *Aneurinibacillus* se ukázaly jako výborní producenti tohoto kopolymeru, kdy například produkce PHA izolátu s označením A26 dosahovala 2 g/l se zastoupením 87 mol. % 4HB. Produkce kopolymeru P(3HB-co-4HB) byla také zaznamenána u izolátu F101 taxonomicky zařazeného pod rod *Geobacillus*, u kterého produkce činila 0,2 g/l s 80 mol. % 4HB. Produkce kopolymeru byla také zaznamenána u některých izolátů patřících do rodu *Bacillus*. Některé izoláty se proto jeví jako zajímaví producenti PHA, navíc je možné, že mají další biotechnologický potenciál, například produkci dalších metabolitů jako jsou termostabilní enzymy či jiné metabolity, kterým nebyla v práci věnována pozornost. Také je nutno poznamenat, že všechny screeningové produkce byly prováděny bez jakékoli optimalizace produkčních i kultivačních podmínek. Proto je pravděpodobné, že optimalizací produkčních podmínek by bylo možné výtěžky výrazně navýšit.



#### 4.4. Charakteristika a screening produkce PHA izolátů s označením H1, H2 a K2

Izoláty s označením H1, H2 a K2, které byly vyizolované z kompostu z kompostárny Brno (2018) pomocí osmoselekce, byly taxonomicky zařazeny pod rod *Aneurinibacillus*. Jelikož se jednalo o rod, u kterého byla pouze minimálně popsána produkce PHA [216], byly tyto izoláty detailněji podrobeny studiu produkce PHA.

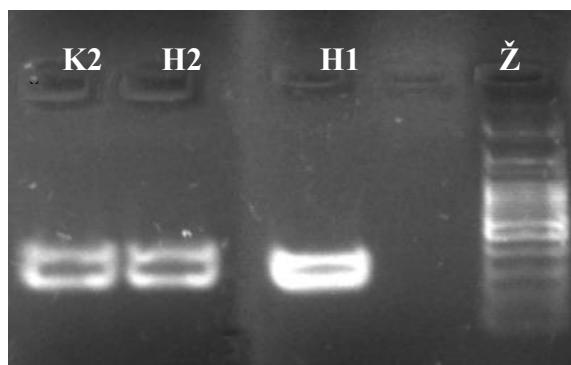
Kvůli komplexnějšímu taxonomickému zařazení byly izoláty identifikovány také fenotypově Českou sbírkou mikroorganismů v Brně. Izoláty byly taxonomicky zařazeny nejen díky sekvenci genu *16S rRNA* (kapitola 4.3.2.1), ale také na základě fenotypové identifikace. Všechny tři izoláty byly stanoveny jako sporulující gram pozitivní tyčinky patřící do rodu *Aneurinibacillus*. Izoláty se původně barvily negativně, ale KOH test potvrdil gram pozitivní buněčnou stěnu. Pomocí fenotypické identifikaci (Tabulka 30) a komerční analýzy metodou Biolog byly izoláty vyhodnoceny následovně: izolát H1 nebylo možné určit na úrovni druhu a byl zařazen pouze jako *Aneurinibacillus* sp., izoláty H2 a K2 byly zařazeny jako *Aneurinibacillus migulans*.

**Tabulka 30: Fenotypická identifikace izolátů H1, H2 a K2**

<b>H1</b>	morfologie	matné, ploché, béžové, okraj nepravidelný
	pozitivní test	anaerobní růst, kataláza, ureáza, hemolýza, hydrolyza želatiny, kaseinu, ONPG a lecitinu, kyselina z glukózy, xylózy a laktózy, růst v přítomnosti 7 % NaCl, růst při 60 °C
	negativní test	hydrolyza škrobu, Tweenu 80, eskulinu, tyrosinu a DNA, acetoin, redukce nitrátů, kyselina z manitolu, celobiózy, fruktózy a inositolu, růst v přítomnosti 10 % NaCl, růst při 30 a 65 °C, Simmons citrát, arginin dihydrolyza
<b>H2</b>	morfologie	matné, ploché, béžové, okraj nepravidelný
	pozitivní test	kataláza, ureáza, hemolýza, hydrolyza želatiny, kaseinu, ONPG, DNA a lecitinu, kyselina z glukózy, fruktózy a celobiózy, růst v přítomnosti 7 % NaCl, růst při 60 °C

<b>H2</b>	negativní test	anaerobní růst, hydrolýza škrobu, Tweenu 80, eskulinu a tyrosinu, acetoin, redukce nitrátů, kyselina z xylózy, manitolu, laktózy a inositolu, růst v přítomnosti 10 % NaCl, růst při 30 a 65 °C, Simmons citrát, arginin dihydroláza
	morfologie	matně lesklé, ploché, béžové, okraj nepravidelný
<b>K2</b>	pozitivní test	anaerobní růst, kataláza, ureáza, hemolýza, hydrolýza želatiny, kaseinu, tyrosinu, ONPG a lecitinu, kyselina z glukózy, růst v přítomnosti 7 % NaCl, růst při 60 °C, arginin dihydroláza
	negativní test	hydrolýza škrobu, Tweenu 80, eskulinu a DNA, acetoin, redukce nitrátů, kyselina z xylózy, manitolu, laktózy, fruktózy a inositolu, růst v přítomnosti 10 % NaCl, růst při 30 a 65 °C, Simmons citrát

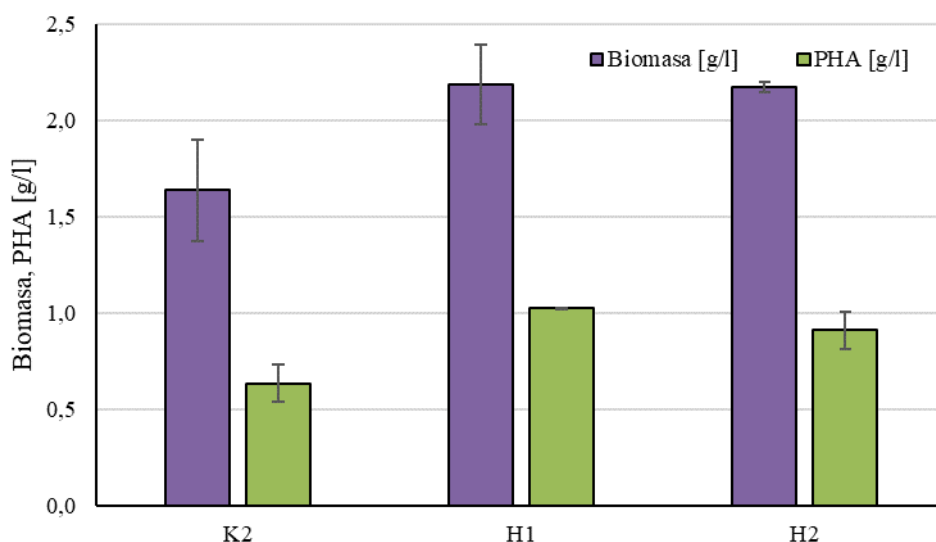
Izoláty byly také testovány na přítomnost PHA syntázy. Protože se jedná o rod *Aneurinibacillus*, byly použity speciálně navržené primery právě pro tento rod. Obrázek 37 ukazuje, že všechny tři izoláty mají PHA syntázu třídy IV typickou pro rod *Aneurinibacillus*. Byla také provedena PCR reakce pro ostatní skupiny třídy IV a pro PHA syntázu první třídy. V těchto případech však byly výsledky negativní.



**Obrázek 37: Stanovení PHA syntázy třídy IV za použití primerů navržených pro rod *Aneurinibacillus*.** K2 – izolát *Aneurinibacillus migulans* K2; H2 – izolát *Aneurinibacillus migulans* H2; H1 – izolát *Aneurinibacillus* sp. H1; Ž – žebříček.

#### 4.4.1. Optimalizace produkce PHA u izolátu K2, H1 a H2

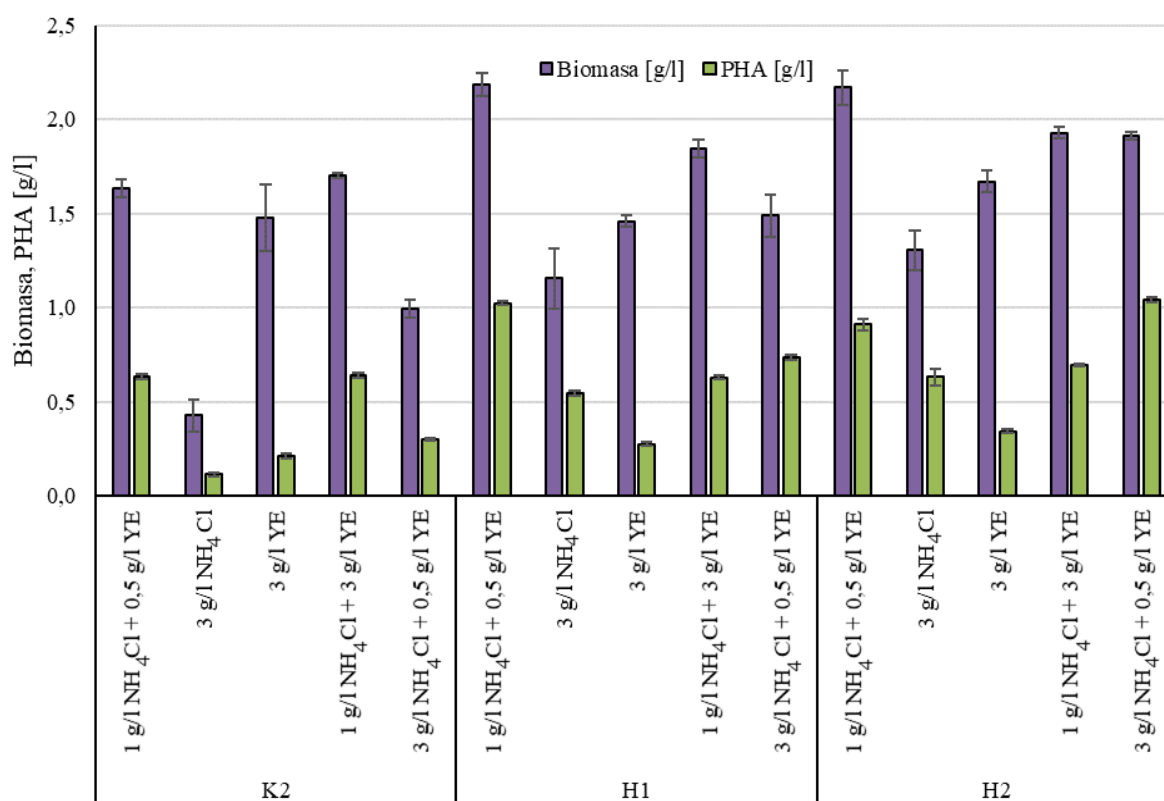
Prvotní test schopnosti produkovat PHA byl proveden na substrátu, který byl využit při izolaci, tedy na glycerolu. Výsledky znázorňuje obrázek 38. Izoláty označené H1 a H2 vykazovaly podobný bakteriální nárůst, okolo 2,2 g/l, i když se podle taxonomické charakterizaci jedná o dva rozdílné druhy. Zato K2, přestože by se mělo jednat o stejný druh jako H2, měla nižší bakteriální nárůst. Izolát K2 byl také schopen menší produkce PHA oproti zbylým dvěma izolátům. Všechny tři izoláty produkovaly P(3HB). Produkce izolátu H1 dosahovala okolo 1 g/l, zatím jediná publikovaná produkce PHA u rodu *Aneurinibacillus* dosahovala pouze okolo 0,1 g/l [216].



**Obrázek 38: Prvotní test produkce PHA na glycerolu při 50 °C.** Hodnoty jsou dány průměrem z paralelního měření a chybová úsečka představuje směrodatnou odchylku měření.

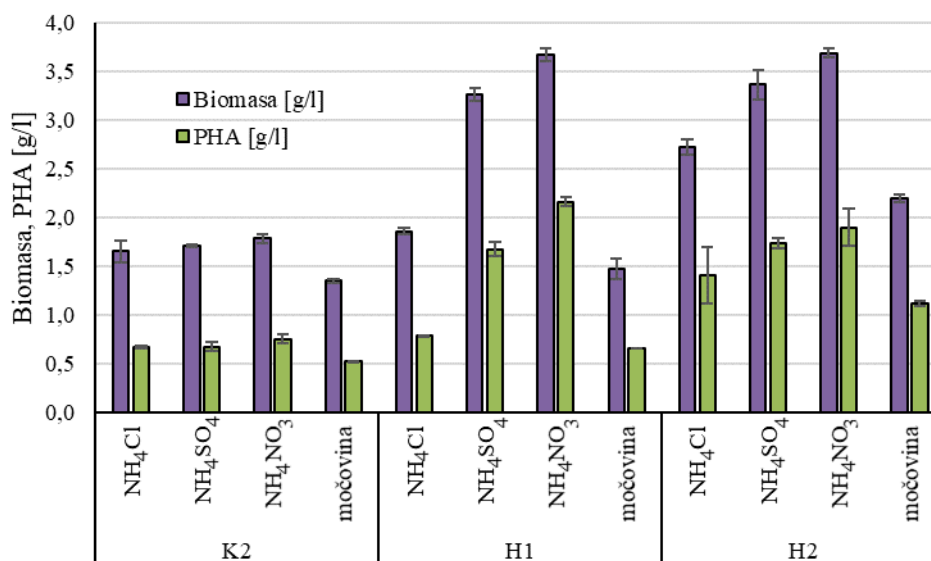
Izoláty se tedy jeví jako schopní termofilní producenti PHA, proto bylo jejich minerální médium upraveno ve snaze získat vyšší produkci PHA a bakteriální nárůst. Jedním z prvních upravovaných parametřů byl poměr dusíkatého zdroje, kterým byl chlorid amonný, a komplexního zdroje, který představoval kvasniční extrakt. Byla také provedena kontrola,

kteřá obsahovala původní množství testovaných látek a to 1 g/l chloridu amonného a 0,5 g/l kvasničného extraktu (YE). Výsledky první optimalizace média zobrazuje obrázek 39. Jedním z testovaných poměrů bylo zvýšení koncentrace chloridu amonného na 3 g/l a absence komplexního zdroje. Tato možnost se ukázala jako nevýhodná. Všechny tři izoláty měly na tomto složení média nejnížší výtěžek biomasy, nárůst byl menší téměř o 1 g/l a také se snížila produkce PHA. Z toho lze usuzovat, že izoláty potřebují ke svému růstu komplexní zdroj dusíku a dalších prvků. V médiu, kde byla zvýšená dávka komplexního zdroje dusíku na 3 g/l, ale chyběl anorganický zdroj uhlíku v podobně chloridu amonného, byl sice výtěžek biomasy vyšší, ale produkce PHA byla velmi nízká. I tato kombinace se ukázala jako nevhodná. Kombinace poměrů chloridu amonného a komplexního zdroje 1:3 g/l a 3:0,5 g/l sice vedly ke zvýšení produkce PHA i biomasy, ale všeobecně lze říci, že nejvýhodnější variantou je původní poměr a to 1 g/l chloridu amonného a 0,5 g/l kvasničného extraktu.



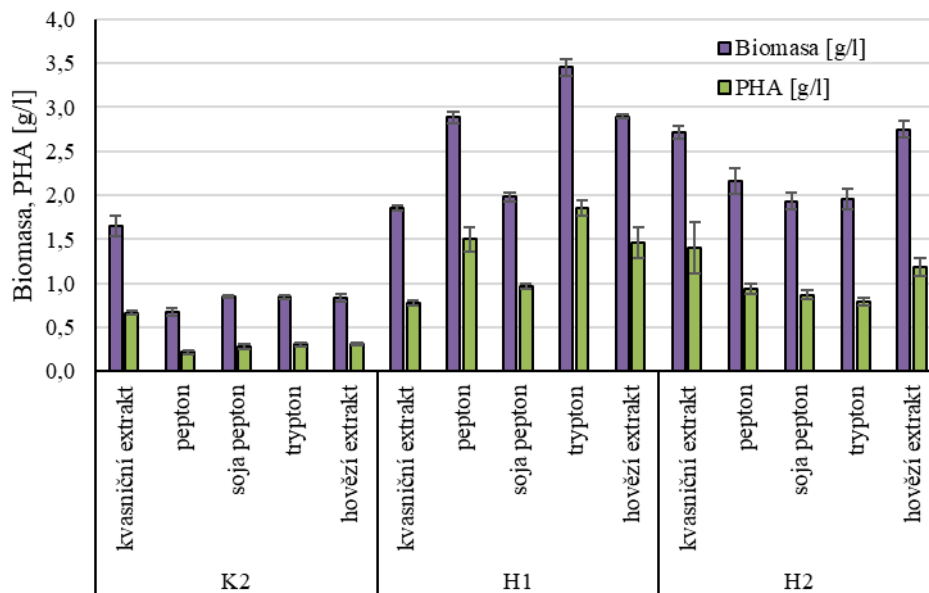
**Obrázek 39: Optimalizace poměru dusíku a komplexního zdroje.** Kultivace probíhala po dobu 72 h při 50 °C. YE – kvasniční extrakt. Hodnota je dána průměrem paralelního měření. Chybová úsečka zobrazuje směrodatnou odchylku.

Po testování poměru anorganického dusíku a komplexního zdroje, bylo zjištěno, že pro vyšší nárůst biomasy i produkci PHA je nutné, aby v minerálním médiu byly zastoupeny oba zdroje. Proto dalším testovaným parametrem byl výběr vhodného dusíkatého zdroje o koncentraci 1 g/l. Mezi testované zdroje patřily chlorid amonný jako kontrola, síran amonný, dusičnan amonný a močovina. Z obrázku 40 je patrné, že rozdíly mezi izoláty H1 a H2 v porovnání s K2 jsou značné a že H1 a H2 budou slibnějšími producenti PHA. Jak u izolátu H1, tak u H2 měl pozitivní vliv na růst buněčné biomasy i produkci PHA síran amonný a dusičnan amonný.



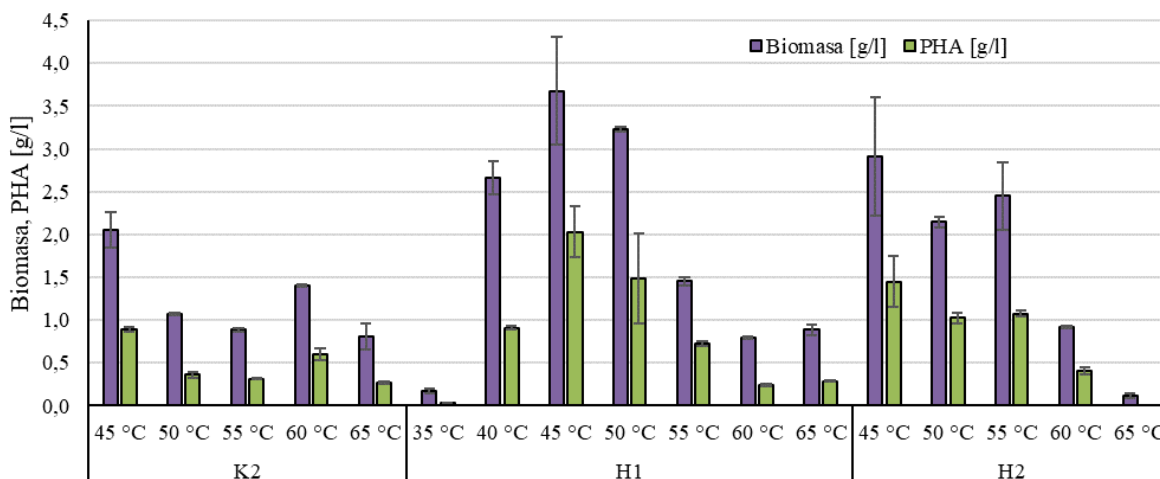
**Obrázek 40: Výběr vhodného zdroje dusíku. Kultivace probíhala 72 hodin při 50 °C na minerálním médiu M1. Výsledná hodnota je dána průměrem paralelního měření. Chybová úsečka zobrazuje směrodatnou odchylku.**

Po zvýšení produkce PHA výběrem vhodného zdroje dusíku, byl také optimalizován vhodný komplexní zdroj. Mezi testovanými komplexními zdroji o koncentraci 0,5 g/l byl původní kvasničný extrakt a dále pepton, sojový pepton, trypton a hovězí extrakt (Obrázek 41). I u této změny parametru lze pozorovat, že se výtěžek biomasy i produkce PHA u izolátu K2 znatelně liší od zbylých dvou izolátů. Změna komplexního zdroje u izolátu K2 nevedla ani ke zvýšení koncentrace biomasy ani ke zvýšení produkce PHA a všechny ostatní testované zdroje kromě původního kvasničného extraktu mají podobné výtěžky biomasy i PHA. Ani izolát H2 nereagoval na změnu komplexního zdroje zvýšením nárůstu biomasy či produkce PHA. Změna ovlivnila růst převážně negativně, kdy u peptonu, sojového peptonu a tryptonu je dokonce nižší než s kvasničným extraktem. Při použití hovězího extraktu byly výsledky srovnatelné s kvasničným extraktem. Proto je pro izoláty K2 a H2 vhodným komplexním zdrojem kvasniční extrakt. Zato izolát H1 reagoval pozitivně na změnu komplexního zdroje. Nejvyšší koncentrace biomasy dosáhl izolát H1 na tryptonu jako komplexním zdroji. Produkce P(3HB) dosahovala téměř 2 g/l.



**Obrázek 41: Výběr vhodného komplexního zdroje.** Kultivace probíhala 72 hodin při 50 °C na minerálním médiu M1. Výsledná hodnota je dána průměrem paralelního měření. Chybová úsečka zobrazuje směrodatnou odchylku.

Dalším důležitým kultivačním parametrem je teplota. Izoláty byly izolované při teplotě 50 °C, ale nemusí se jednat o jejich optimální teplotu růstu. U izolátu K2 a H2 byla testována teplota 45, 50, 55, 60 a 65 °C. U izolátu H1, který se v přechozích testech jevil jako nejlepší producent PHA, byla kromě již zmíněných teplot testována také teplota 40 a 35 °C. Podle fenotypové charakterizace provedené v České sbírce mikroorganismů, by izoláty K2, H1 a H2 neměly být schopny růstu při 30 °C. Testování optimální teploty růstu zobrazuje obrázek 42.



**Obrázek 42: Optimalizace kultivační teploty pro izoláty K2, H1 a H2.** Kultivace probíhala po dobu 72 h při různých teplotách na minerálním médiu M1 za využití glycerolu jako jediného zdroje uhlíku. Výsledky jsou dány průměrem hodnot paralelního měření. Chybová úsečka potom představuje směrodatnou odchylku.

Jako nejvhodnější kultivační teplota u všech třech izolátů byla teplota 45 °C. Při této teplotě izoláty dosahovaly nejvyšší koncentrace biomasy i nejvyšší produkce PHA. Je zajímavé, že

také všechny tři izoláty byly schopny růst při teplotě 65 °C, a izoláty H1 a K2 byly také schopny při této teplotě produkovat PHA, přestože při fenotypové charakterizaci Českou sbírkou mikroorganismů v Brně, byla teplota 65 °C určena jako nevhodná k růstu mikroorganismů. Izolát H1 však potvrdil, že teplota 35 °C bude představovat spodní mez pro růst bakterií, a teplota 30 °C určená při fenotypové charakterizaci jako nevhodná pro růst bude správná. Lze tedy všeobecně konstatovat, že všechny tři izoláty patřící k rodu *Aneurinibacillus* jsou schopny růstu od 35 °C do 65 °C s optimální teplotou růstu okolo 45 °C. Bude se jednat nejspíše o termotolerantní organismy nebo o mírné termofily.

#### 4.4.2. Produkce kopolymerů PHA pomocí izolátů K2, H1 a H2

Po optimalizaci kultivačních podmínek byla testována také schopnost produkovat kopolymery PHA, a to jak kopolymer P(3HB-*co*-3HV) tak P(3HB-*co*-4HB). Pro produkci kopolymerů bylo nejprve nutné určit vhodné prekurzory, ale také to, jestli je daný izolát vůbec schopen produkce kopolymeru. Pro testování schopnosti produkovat kopolymer s 3-hydroxyvalerátem, byly použity prekurzory kyselina levulová, propionát sodný, propan-1-ol a kyselina valerová. Prekurzory byly přidány do média na začátku kultivace o koncentraci 2 g/l. Kromě prekurzoru byl v médiu také obsažen uhlíkatý zdroj a to 20 g/l glycerolu. Byla také provedena kontrola, která neobsahovala žádný prekurzor. Výsledky testování schopnosti produkovat kopolymer P(3HB-*co*-3HV) zobrazuje tabulka 31.

**Tabulka 31: Testování produkce kopolymeru P(3HB-*co*-3HV) pomocí izolátů K2, H1 a H2.**

Kultivace probíhala v minerálním médiu M1 s 20 g/l glycerolu a 2 g/l příslušného prekurzoru, který byl přidán hned na počátku kultivace. Výsledné hodnoty jsou dány průměrem paralelního měření a chyba vyjadřuje směrodatnou odchylku měření.

Izolát	Prekurzor	Biomasa [g/l]	PHA [g/l]	3HB [mol. %]	3HV [mol. %]
<b>K2</b>	Kontrola	0,71 ± 0,05	0,23 ± 0,01	100	n.d.
	kyselina levulová	1,51 ± 0,01	0,31 ± 0,01	100	n.d.
	propionát sodný	0,98 ± 0,11	0,08 ± 0,01	100	n.d.
	propan-1-ol	0,86 ± 0,06	0,33 ± 0,01	100	n.d.
	kyselina valerová	1,04 ± 0,01	0,21 ± 0,01	52,9	47,1
<b>H1</b>	Kontrola	1,09 ± 0,06	0,53 ± 0,02	100	n.d.
	kyselina levulová	1,08 ± 0,06	0,39 ± 0,01	100	n.d.

Izolát	Prekurzor	Biomasa [g/l]	PHA [g/l]	3HB [mol. %]	3HV [mol. %]
<b>H1</b>	propionát sodný	1,11 ± 0,04	0,31 ± 0,01	67,9	32,1
	propan-1-ol	1,47 ± 0,04	0,66 ± 0,01	96,3	3,7
	kyselina valerová	1,90 ± 0,02	0,71 ± 0,02	33,4	66,6
<b>H2</b>	kontrola	1,31 ± 0,03	0,67 ± 0,03	100	n.d.
	kyselina levulová	0,83 ± 0,07	0,31 ± 0,01	100	n.d.
	propionát sodný	1,21 ± 0,11	0,38 ± 0,05	68,0	32,0
	propan-1-ol	2,10 ± 0,10	0,95 ± 0,06	100	n.d.
	kyselina valerová	2,12 ± 0,07	0,74 ± 0,15	34,2	65,8

n.d. - nedetekováno

I když byl izolát H2 a K2 určen jako stejný druh, již předchozí výsledky ukázaly, že se tyto dva izoláty od sebe velmi liší. Stejně je to i v případě schopnosti produkovat kopolymer s 3-hydroxyvalerátem (3HV). Izolát K2 nebyl schopen s žádným testovaným prekurzorem tvořit kopolymer. Se všemi testovanými prekurzory došlo pouze ke zvýšení množství biomasy, ale pouze s kyselinou levulovou a propan-1-olem byla jeho produkce P(3HB) vyšší oproti kontrole. Avšak izoláty H1 a H2 byly schopny s některými prekurzory tvořit kopolymer P(3HB-co-3HV). Izolát H2 byl schopen inkorporovat 3-hydroxyvalerát do polymeru v případě využití propionátu sodného a kyseliny valerové. V případě použití propionátu sodného klesla produkce PHA téměř na polovinu oproti kontrole, pouze na 0,38 g/l ale se zastoupením 32 mol. % 3HV. V případě kyseliny valerové stoupla biomasa na 2,12 g/l a produkce PHA byla 0,74 g/l se zastoupením okolo 66 mol. % 3HV. Je zajímavé, že nejvyšší produkce PHA dosáhl izolát H2 za použití propan-1-olu, kdy biomasa i PHA byla vyšší než v kontrolní kultivaci. Koncentrace PHA pak dosahovala téměř 1 g/l, ale zastoupen byl pouze 3HB.

Také izolát H1 byl schopen inkorporace 3HV, a to za použití prekurzorů propionátu sodného, propan-1-olu a kyseliny valerové. V případě použití propionátu sodného dosahovala produkce PHA pouze 0,3 g/l s 32 mol. % 3HV. Za přítomnosti propan-1-olu v médiu byla produkce PHA téměř dvojnásobná a to okolo 0,66 g/l, ale zastoupení 3HV kleslo na necelá 4 mol. %. Jako nejvhodnější zdroj pro akumulaci kopolymeru P(3HB-co-3HV) se ukázala kyselina valerová, kde se nárůst biomasy pohyboval okolo 1,9 g/l s 0,7 g/l PHA. Kopolymer obsahoval i nejvyšší množství 3HV a to téměř 67 mol. %. Izoláty H1 a H2 se ukázaly jako vhodné pro produkci polymeru s 3HV především za využití kyseliny valerové. Také je zajímavé



vysoké zastoupení 3-hydroxyvalerátu v kopolymeru. Většina bakterií produkuje P(3HB-*co*-3HV) spíše do 30 až 50 mol. % koncentrace 3HV [228–232]. Využití kopolymeru P(3HB-*co*-3HV) je široké. Díky začlenění 3HV do řetězce dochází ke zlepšení mechanických a technologických vlastností materiálu [233]. Díky jeho biokompatibilitě a biologické rozložitelnosti je tento materiál vhodný pro lékařské účely a jeho využití lze například najít v chirurgických nitích, při uvolňování léků, tkáňových náplastech a podobně [234–237]. Svoji roli také hraje míra zastoupení 3HV v polymeru, protože s rostoucím obsahem 3HV klesá krystalinita a také teplota tání [238].

Mezi dalšími testovanými schopnostmi izolátů byla schopnost tvořit kopolymer P(3HB-*co*-4HB) za přítomnosti vhodných strukturních prekurzorů. Použité prekurzory byly 1,6-hexandiol,  $\gamma$ -butyrolakton a 1,4-butandiol o koncentraci 8 g/l. Prekurzory byly přidány na počátku kultivace a sloužily zároveň jako jediný zdroj uhlíku. Z tabulky 32, která zobrazuje výsledky kultivace na prekurzorech 4HB, je viditelné, že všechny tři izoláty byly schopny produkce kopolymeru P(3HB-*co*-4HB) na dvou z testovaných prekurzorů, a to na  $\gamma$ -butyrolaktonu a 1,4-butandiolu. Produkce kopolymeru u izolátu K2 na  $\gamma$ -butyrolaktonu se pohybovala okolo 0,18 g/l s necelými 64 mol. % 4HB a na 1,4-butandiolu byla jeho produkce okolo 0,5 g/l s frakcí 4HB okolo 80 mol. %. Izoláty H1 a H2 produkovaly polymer s vyšším zastoupením 4HB, a to konkrétně produkce kopolymeru u H1 na  $\gamma$ -butyrolaktonu dosahovala 0,45 g/l s 84 mol. % 4HB a na 1,4-butandiolu byla produkce kopolymeru PHA 0,77 g/l s 88 mol.% 4HB. U izolátu H2 byla produkce velmi podobná.

Všechny tři izoláty jsou schopny produkce kopolymeru P(3HB-*co*-4HB). Nejslibnějším producentem se zdá být izolát H1. Je na místě poznamenat, že kopolymer P(3HB-*co*-4HB) má v rámci skupiny PHA materiálů unikátní mechanické vlastnosti (nízká krystalinita, vysoká elasticita, nízká teplota tání) [239] a má velice široký aplikační potenciál [240]. Izoláty K2, H1 a H2 jsou extrémně zajímavými producenty P(3HB-*co*-4HB), protože jsou schopny produkce kopolymerů s opravdu vysokými obsahy 4HB.

**Tabulka 32: Testování tvorby kopolymeru P(3HB-*co*-4HB).** Kultivace probíhala v minerálním médiu M1 na 8 g/l příslušného prekurzoru, který byl přidán hned na počátku kultivace. Výsledné hodnoty jsou dány průměrem paralelního měření a chyba vyjadřuje směrodatnou odchylku měření.

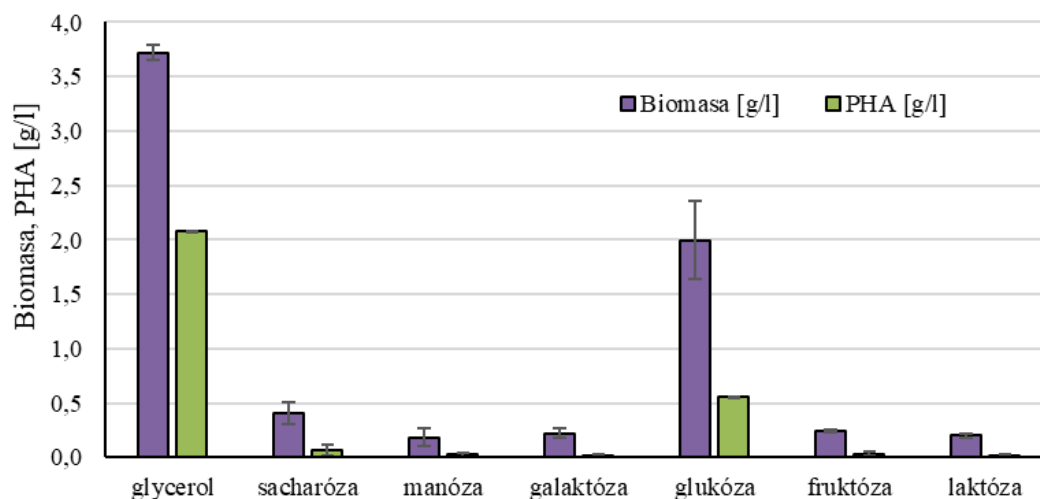
Izolát	Prekurzor	Biomasa [g/l]	PHA [g/l]	3HB [mol. %]	4HB [mol. %]
<b>K2</b>	1,6-hexandiol	0,13 ± 0,02	0,02 ± 0,01	100	n.d.
	$\gamma$ -butyrolakton	0,37 ± 0,02	0,18 ± 0,02	36,6	63,4
	1,4-butandiol	0,89 ± 0,03	0,50 ± 0,01	20,1	79,9
<b>H1</b>	1,6-hexandiol	0,37 ± 0,08	0,03 ± 0,01	100	n.d.
	$\gamma$ -butyrolakton	0,52 ± 0,03	0,45 ± 0,01	15,9	84,1

Izolát	Prekurzor	Biomasa [g/l]	PHA [g/l]	3HB [mol. %]	4HB [mol. %]
H1	1,4-butandiol	1,02 ± 0,04	0,77 ± 0,01	11,6	88,4
H2	1,6-hexandiol	0,32 ± 0,01	0,01 ± 0,01	100	n.d.
	γ-butyrolakton	0,36 ± 0,21	0,26 ± 0,01	17,3	82,7
	1,4-butandiol	1,05 ± 0,10	0,84 ± 0,01	12,2	87,8

n.d.- nedetekováno

#### 4.4.3. Optimalizace produkce a produkční potenciál izolátu H1

Na základě předchozích výsledků byl izolát s označením H1 vybrán jako nejslibnější z testovaných izolátů pro podrobnější studium produkce PHA. Prvním z testovaných parametrů byla schopnost utilizace různých zdrojů uhlíku. Mezi testovanými sacharidy byla sacharóza, manóza, galaktóza, glukóza, fruktóza a laktóza. Testovaný izolát byl schopen růstu na všech zmíněných uhlíkatých zdrojích (Obrázek 43). Nicméně významnějšího růstu dosáhl pouze na glukóze, kdy výtěžek biomasy byl okolo 2 g/l s 0,5 g/l P(3HB). Při kultivaci na glycerolu dosahovala kultura koncentrace biomasy přes 3,5 g/l a produkce P(3HB) mírně přesahovala 2 g/l. Glycerol se tedy ukázal jako nejlepší zdroj uhlíku pro kultivaci izolátu H1.

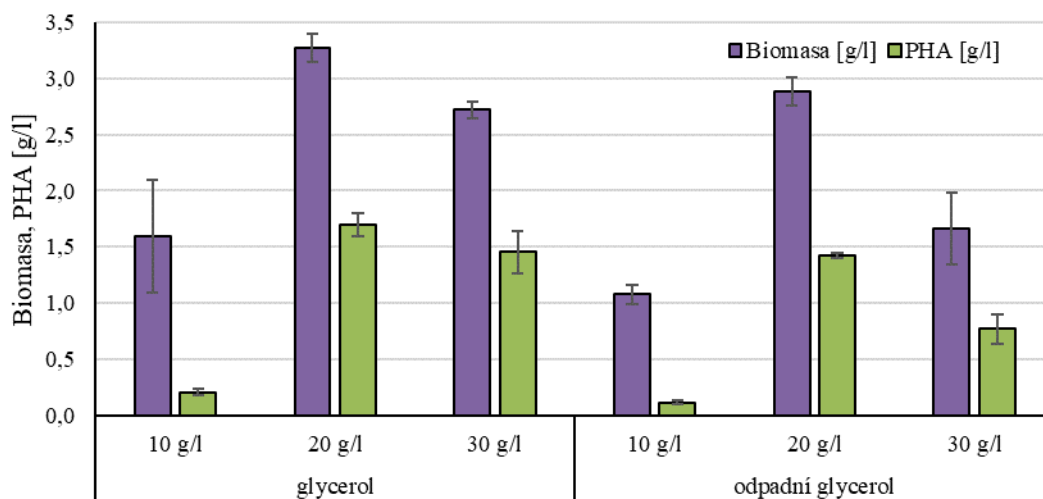


**Obrázek 43: Screening produkce PHA na různých zdrojích uhlíku o koncentraci 20 g/l pomocí izolátu H1.** Kultivace probíhala na minerálním médiu M1 při 50 °C po dobu 72 h. Výsledné hodnoty představují průměr naměřených hodnot a chybová úsečka udává směrodatnou odchylku měření.

Produkce PHA na glycerolu nese jistá pozitiva. Se zvýšenou spotřebou bionafty vzniká odpadní glycerol, pro který se hledá další využití, které nevyžaduje složitou rafinaci. Jedním z možných použití odpadního glycerolu je například výroba hluboce eutektických rozpouštědel [241]. Bohužel znečištění odpadního glycerolu, který obsahuje mimo jiné například i methanol, zbytkové katalyzátory, anorganické a organické soli a další kontaminanty [242], není vhodné

pro lékařské, farmaceutické či kosmetické použití. I přes kontaminanty, které mohou působit inhibičně, je možné využití odpadního glycerolu jako suroviny v biotechnologickém průmyslu. Jsou popsány procesy využívající odpadní glycerol jako surovinu pro produkci PHA, například pomocí bakterie *Cupriavidus eutrophus* [243] či termofilní bakterie *Caldimonas manganoxidans* [244].

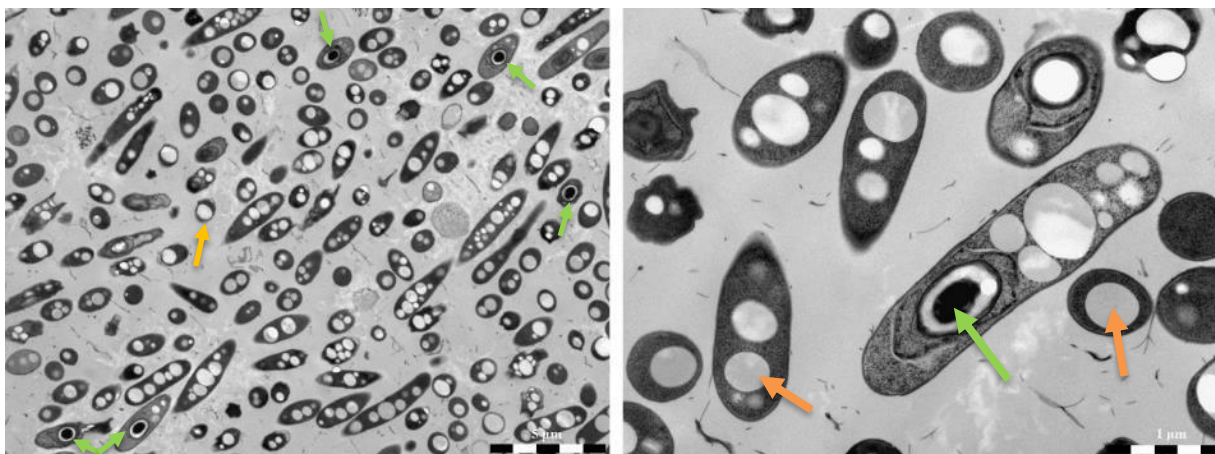
Srovnání produkce na čistém a odpadním glycerolu pomocí izolátu H1 zobrazuje obrázek 44. Byly testovány tři různé koncentrace glycerolu a to 10, 20 a 30 g/l. Izolát *Aneurinibacillus* sp. H1 byl schopen růstu na odpadním glycerolu bez jakékoli úpravy odpadního glycerolu. Jeho produkce na odpadním glycerolu je téměř srovnatelná s produkcí na čistém glycerolu. Jako nejméně vhodná koncentrace bylo 10 g/l glycerolu, kdy byla kultura očividně limitovaná zdrojem uhlíku. Použití 30 g/l glycerolu působilo spíše inhibičně. V odpadním glycerolu byla hodnota biomasy téměř poloviční ve srovnání s použitím pouze 20 g/l. Nejvhodnější koncentrace u obou typů glycerolu byla hodnota 20 g/l. Je tedy možné konstatovat, že izolát *Aneurinibacillus* sp. H1 je vhodný pro produkci P(3HB) z odpadního glycerolu.



**Obrázek 44: Testování produkce PHA na čistém a odpadním glycerolu pomocí izolátu H1.**

Kultivace probíhala na minerálním médiu M2, 72 hodin při teplotě 45 °C. Výsledné hodnoty představují průměr naměřených hodnot a chybová úsečka udává směrodatnou odchylku měření.

Morfologie PHA granulí v buňce rostoucí na glycerolu byla zkoumána pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM). Snímek morfologie buněk s vnitřními endospory a granulemi PHA zobrazuje obrázek 45. Jednotlivé buňky obsahují v průměru 3 až 15 granulí PHA, které jsou rozprostřeny po buňce. Mimo granulí PHA jsou v některých buňkách také obsaženy endospory, které většinou nejsou vítány během biotechnologického procesu nebo při akumulaci PHA. Studie u rodu *Bacillus* ukazují, že sporulace souvisí s metabolismem PHA, kdy vede ke snížení PHA v buňkách [245–247]. Avšak v případě izolátu H1 je i po 72 hodinách kultivace pouze malé množství bakterií ve sporulujícím stavu (pod 10 %). I v buňkách, kde se nachází endospora, se stále vyskytují granule PHA, takže ani sporulace by neměla být překážkou v zavedení izolátu *Aneurinibacillus* sp. H1 do průmyslové výroby.

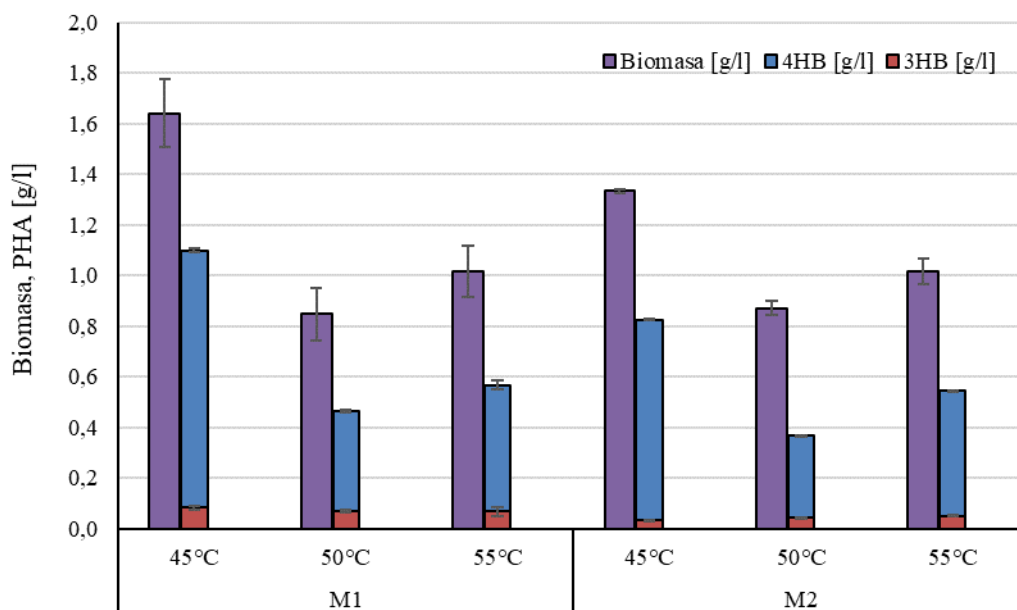


**Obrázek 45:** TEM snímek izolátu *Aneurinibacillus* sp. H1 po kultivaci na 20 g/l glycerolu, 72 hodin, 45 °C. Zelené šipky ukazují na endospory v bakteriální buňce, oranžové pak ukazují na příklad granule PHA v buňce.

#### 4.4.3.1 Studium produkce kopolymeru P(3HB-co-4HB)

Kopolymer P(3HB-co-4HB) má široké potenciální uplatnění v medicíně, farmacii či kosmetickém průmyslu, navíc zvýšené množstvím monomeru 4HB má lepší biokompatibilitu a mechanické vlastnosti [248; 249]. Proto bylo provedeno studium produkce kopolymeru P(3HB-co-4HB) pomocí izolátu *Aneurinibacillus* sp. H1. Jako zdroj uhlíku a zároveň jako prekurzor pro tvorbu 4HB byl použit 1,4-butandiol.

Prvním krokem optimalizace produkce kopolymeru bylo porovnání původního média M1 a upraveného média M2 za využití 8 g/l 1,4-butandiolu při různých kultivačních teplotách (Obrázek 46). Nejvyšších produkcí bylo dosaženo při teplotě 45 °C, jak již bylo stanoveno při optimalizaci P(3HB). Avšak vyšší produkce bylo dosaženo na minerálním médium M1, kdy množství kopolymeru bylo 1,10 g/l s 92 mol. % 4HB.



**Obrázek 46: Produkce P(3HB-co-4HB) na 1,4-butandiolu v závislosti na použitém médiu a kultivační teplotě.** Jako zdroj uhlíku bylo použito 8 g/l 1,4-butandiolu. Výsledky jsou dány průměrem naměřených hodnot a chybová úsečka zobrazuje směrodatnou odchylku.

Dalším testovaným parametrem byla koncentrace uhlíkatého zdroje a to konkrétně 1,4-butandiolu. Testovány byly koncentrace 4, 8, 12 a 16 g/l v obou minerálních médiích, výsledky zobrazuje tabulka 33. Vyšších hodnot koncentrace biomasy bylo dosaženo v minerálním médiu M2, tedy s dusičnanem amonným a tryptonem. Jako nejvhodnější koncentrace 1,4-butandiolu se ukázala hodnota 4 g/l. Obecně lze říci, že molekulová hmotnost kopolymeru se vzrůstající koncentrací 1,4-butandiolu klesala, a to u obou minerálních médií, nejvyšší molekulová hmotnost byla naměřena v případě 4 g/l 1,4-butandiolu v minerální médium M2 a to téměř 120 kDa a index polydisperzity byl 1,06.

Obecně nižší molekulová hmotnost polymeru v přítomnosti 1,4-butandiolu může být také dána unikátními vlastnostmi PHA syntázy třídy IV. Tyto syntázy nejenže katalyzují polymeraci PHA, ale dochází také k alkoholytickému štěpení řetězců PHA, pokud je v médiu přítomen alkohol. Tato vlastnost může být vhodná pro regulaci molekulové hmotnosti PHA, ale také může vést k modifikaci karboxylových konců PHA [210]. Tato alkoholytická aktivita může být příčinou, proč s rostoucí koncentrací 1,4-butandiolu v médiu tak dramaticky klesá molekulová hmotnost výsledného polymeru.

**Tabulka 33: Optimalizace koncentrace 1,4-butandiolu za použití dvou médií (M1 a M2) pro produkci P(3HB-*co*-4HB) bakterií označenou jako H1. Mw – molekulová hmotnost polymeru, Đ – polydisperzita.**

Médium	1,4-butandiol	Biomasa [g/l]	PHA [g/l]	3HB [mol. %]	4HB [mol. %]	Mw [kDa]	Đ
<b>M1</b>	4 g/l	0,93 ± 0,03	0,48 ± 0,04	14,6	85,4	99,10 ± 2,65	1,05
	8 g/l	0,85 ± 0,11	0,46 ± 0,02	16,1	83,9	88,50 ± 2,39	1,10
	12 g/l	0,72 ± 0,06	0,36 ± 0,05	18,4	81,6	41,28 ± 2,28	1,19
	16 g/l	0,56 ± 0,05	0,26 ± 0,01	17,6	82,4	37,86 ± 3,53	1,18
<b>M2</b>	4 g/l	1,41 ± 0,02	0,64 ± 0,37	15,4	84,6	119,83±3,55	1,06
	8 g/l	0,88 ± 0,01	0,38 ± 0,22	16,4	83,6	30,69 ± 0,46	1,56
	12 g/l	0,79 ± 0,09	0,35 ± 0,20	15,2	84,8	44,96 ± 1,58	1,21
	16 g/l	0,68 ± 0,01	0,29 ± 0,17	14,0	86,0	35,78 ± 1,50	1,28

I při opakování experimentu dosahovalo vyšších výtěžků minerální médium M2, proto bylo vybráno jako vhodnější produkční médium pro akumulaci P(3HB-*co*-4HB) i při dalších experimentech. Ještě jednou byla zopakována optimalizace koncentrace 1,4-butandiolu, kdy byly použité koncentrace nižší, a to 3, 4, 5, 6, 7 a 8 g/l, vzhledem k předchozím výsledkům. Nejvyšší produkce kopolymeru P(3HB-*co*-4HB) bylo dosaženo na koncentracích 4 a 6 g/l 1,4-butandiolu (Tabulka 34). Molekulová hmotnost polymeru byla také téměř stejná při těchto dvou koncentracích substrátu a to 128 kDa pro 4 g/l a 130 kDa pro 6 g/l. Molární frakce 4HB v kopolymeru je pro všechny testované koncentrace 1,4-butandiolu srovnatelná a obecně velice vysoká – 88 až 92 mol. %. V dalších experimentech byla počáteční koncentrace 1,4-butandiolu 4 g/l.

**Tabulka 34: Podrobnější optimalizace koncentrace 1,4-butandiolu v produkčním médiu pro tvorbu P(3HB-co-4HB) pouze v minerálním médiu M2. Mw – molekulová hmotnost polymeru, Đ – polydisperzita.**

<b>1,4-butandiol</b>	<b>Biomasa [g/l]</b>	<b>PHA [g/l]</b>	<b>3HB [mol. %]</b>	<b>4HB [mol. %]</b>	<b>Mw [kDa]</b>	<b>Đ</b>
<b>3 g/l</b>	1,22 ± 0,11	0,61 ± 0,05	9,4	90,6	115,61 ± 7,58	1,05
<b>4 g/l</b>	1,67 ± 0,02	0,91 ± 0,03	9,1	90,9	128,97 ± 3,85	1,12
<b>5 g/l</b>	1,24 ± 0,23	0,57 ± 0,01	11,7	88,3	101,13 ± 6,68	1,16
<b>6 g/l</b>	1,60 ± 0,15	0,89 ± 0,01	7,2	92,8	130,69 ± 2,32	1,13
<b>7 g/l</b>	1,13 ± 0,01	0,58 ± 0,01	12,0	88,0	120,81 ± 17,9	1,26
<b>8 g/l</b>	0,96 ± 0,01	0,42 ± 0,04	13,1	86,9	30,69 ± 0,46	1,56

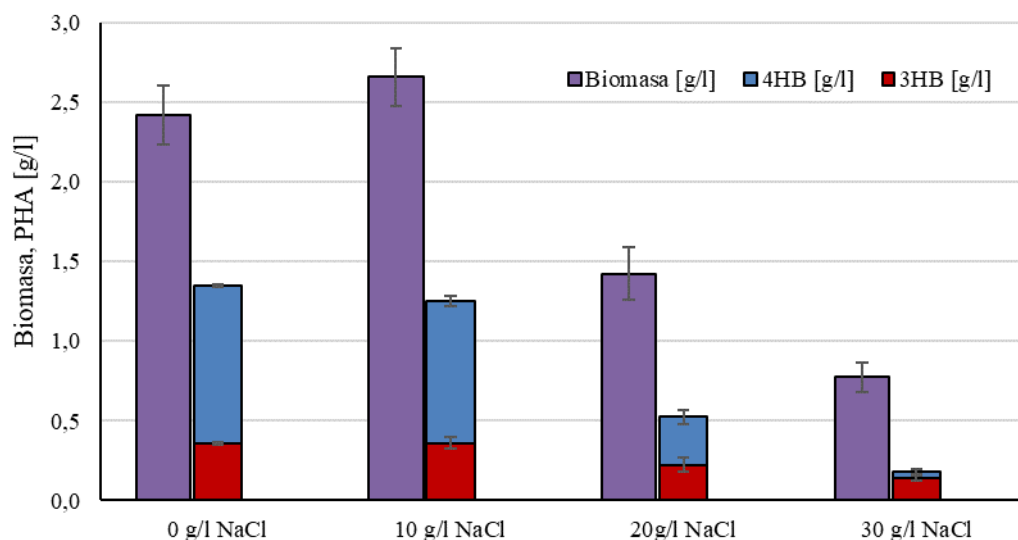
Izolát H1 tedy disponuje unikátní schopností produkce kopolymeru P(3HB-co-4HB) s velice vysokým podílem 4HB. Nicméně při použití 1,4-butandiolu jakožto jediného substrátu jsou výtěžky biomasy i polymeru obecně nízké. Proto bylo v rámci dalších experimentů testováno využití kombinace 1,4-butandiolu a glycerolu, přičemž by glycerol plnil především funkci substrátu podporujícího růst mikrobiální kultury a 1,4-butandiol představoval především strukturální prekurzor 4HB. Koncentrace 1,4-butandiolu byla vybrána na základě předchozích experimentů, a to 4 g/l. Koncentrace glycerolu byla testována v koncentracích 2, 4, 6, 8 a 20 g/l.

Při použití směsi 1,4-butandiolu a glycerolu došlo ke zvýšení koncentrace biomasy, a to ve všech případech přes 2 g/l. Také došlo ke zvýšení produkce kopolymeru P(3HB-co-4HB). Poměr složek ve směsi zdrojů uhlíku se odrazil ve složení kopolymeru (Tabulka 35). V případě použití pouze 2 g/l glycerolu bylo zastoupení 3HB pouze okolo 16 mol. % a se zvyšující se koncentrací glycerolu se zvyšuje i zastoupení 3HB, kdy v případě použití 20 g/l glycerolu bylo zastoupení 3HB 95 mol. %. Jak již bylo zmíněno, množství 4HB v kopolymeru ovlivňuje jeho mechanické i technologické vlastnosti, tudíž podle požadovaných vlastností lze jednoduše úpravou kultivačních podmínek řídit zastoupení 4HB v kopolymeru. Nejvyšší produkce pak bylo dosaženo při použití koncentrací glycerolu 2 a 4 g/l, kdy koncentrace PHA dosahovala v obou případech přes 1,8 g/l. Avšak při použití 2 g/l glycerolu bylo zastoupení 4HB vyšší a molekulová hmotnost polymeru dosáhla hodnoty 120 kDa. Pokud byla použita vyšší koncentrace glycerolu, molekulová hmotnost klesla na 86 kDa.

**Tabulka 35: Produkce P(3HB-co-4HB) v kombinaci 1,4-butandiolu s glycerolem jako zdrojem uhlíku v minerálním médiu M2. Mw – molekulová hmotnost polymeru, Đ – polydisperzita.**

1,4-butandiol + glycerol	Biomasa [g/l]	PHA [g/l]	3HB [mol. %]	4HB [mol. %]	Mw [kDa]	Đ
4 g/l + 2 g/l	2,69 ± 0,15	1,83 ± 0,02	16,4	83,6	120,03 ± 2,06	1,27
4 g/l + 4 g/l	2,79 ± 0,03	1,82 ± 0,10	25,6	74,4	86,01 ± 1,66	1,32
4 g/l + 6 g/l	2,28 ± 0,26	1,15 ± 0,03	57,5	42,5	76,05 ± 1,38	1,78
4 g/l + 8 g/l	2,43 ± 0,01	0,99 ± 0,12	63,6	36,4	66,28 ± 1,22	1,59
4 g/l + 20 g/l	2,56 ± 0,11	1,14 ± 0,05	95,4	4,6	9,61 ± 0,59	1,03

PHA pomáhají bakteriím přežít nepříznivé podmínky, mezi které se například řadí i osmotický stres [250]. Proto byl testován vliv navýšené osmotické síly kultivačního média (10, 20 a 30 g/l NaCl) na produkci kopolymeru P(3HB-co-4HB). Rovněž byla provedena kontrola, která neobsahovala přídavek chloridu sodného. Přídavek 10 g/l NaCl měl pozitivní vliv na růst biomasy, produkce PHA však byla mírně nižší. Vyšší koncentrace chloridu sodného vedly ke snížení biomasy i produkce PHA. Je zajímavé, že při použití 30 g/l se rapidně snížilo množství 4HB v kopolymeru, a to pouze na 24 mol.%.



**Obrázek 47: Vliv přídavku chloridu sodného na produkci P(3HB-co-4HB) pomocí izolátu označeného H1. Jako zdroj uhlíku byla použita směs 4 g/l 1,4-butandiolu a 4 g/l glycerolu. Výsledné hodnoty jsou dány průměrem měření a chybová úsečka zobrazuje směrodatnou odchylku.**

V rámci testování produkčního potenciálu bakterie *Aneurinibacillus* sp. H1 byla také zkoumána možnost produkce terpolymeru P(3HB-co-3HV-co-4HB). Jednotky 3HV a 4HB v terpolyesteru zlepšují mechanické a fyzikální vlastnosti materiálu, který má široké uplatnění, například v lékařských či farmaceutických aplikacích [251]. Schopnost produkce terpolymeru



P(3HB-co-3HV-co-4HB) byla již dříve u některých mikroorganismů popsána [252], ale jednalo se spíše o mezofilní druhy. Produkce terpolymeru je například zaznamenána u bakterie *Cupriavidus necator*, kdy byla schopna produkce P(3HB-co-3HV-co-4HB) na glukóze, kyselině propionové a za použití prekurzoru 4HB buď  $\gamma$ -butyrolaktonu nebo kyseliny 4-hydroxybutanové. Největší frakci ve výsledném terpolymeru ale stále zaujímal 3HB [253]. Vyššího obsahu 4HB v terpolymeru bylo dosaženo u bakterie *Alcaligenes* sp. A-04, avšak dvojestupňovým procesem [254]. Schopnost tvořit terpolymer byla také zaznamenána u archeae *Haloferax mediterranei* avšak opět s minimálním zastoupením 4HB [255].

Při produkci terpolymeru P(3HB-co-3HV-co-4HB) byly vyzkoušeny dvě varianty aplikace zdroje uhlíku. První variantou byla směs 1,4-butandiolu a glycerolu, oba o koncentraci 4 g/l, kdy glycerol sloužil především pro podpoření tvorby biomasy a 1,4-butandiol sloužil jako prekurzor tvorby 4HB. Druhá varianta obsahovala pouze 1,4-butandiol o koncentraci 4 g/l jako zdroj uhlíku a zároveň jako prekurzor 4HB jednotek. V obou případech byla přidána kyselina valerová o koncentraci 2 g/l jako prekurzor 3HV. Kyselina valerová byla přidána ve dvou časech kultivace, do první sady vzorků byla přidána hned na počátku kultivace, do druhé sady byla přidána po 24 hodinách kultivace. Výsledky experimentu zobrazuje tabulka 36.

**Tabulka 36: Tvorba terpolymeru P(3HB-co-3HV-co-4HB) za využití různých substrátů.** Jako zdroj uhlíku byl použit samotný 1,4-butandiol o koncentraci 4 g/l a směs 4 g/l 1,4-butandiolu (1,4-BD) a 4 g/l glycerolu, do obou variant zdroje uhlíku byly přidány 2 g/l kyseliny valerové, a to buď v čase kultivace 0 h nebo 24 h. Kultivace probíhala 72 hodin při 45 °C. Mw – molekulová hmotnost polymeru, Đ – polydisperzita.

Zdroj uhlíku	Přídavek kyseliny valerové	Biomasa [g/l]	PHA [g/l]	3HB [mol. %]	4HB [mol. %]	3HV [mol. %]	Mw [kDa]	Đ
1,4-BD + glycerol	0 h	0,71 ± 0,35	0,16 ± 0,01	52,0	0,0	48,0	117,91 ± 2,95	2,14
	24 h	1,41 ± 0,15	0,51 ± 0,05	94,6	3,5	1,8	77,86 ± 1,19	2,18
1,4-BD	0 h	1,44 ± 0,06	0,58 ± 0,03	12,7	54,2	33,1	117,84 ± 0,72	1,55
	24 h	0,84 ± 0,03	0,30 ± 0,01	29,3	69,8	0,9	192,00 ± 5,19	1,61

Z tabulky 36 je patrné, že izolát *Aneurinibacillus* sp. H1 je schopen produkce terpolymeru P(3HB-co-3HV-co-4HB). Zastoupení monomerních jednotek se liší v závislosti na použitém zdroji uhlíku a na čase přídavku kyseliny valerové. V případě směsi 1,4-butandiolu a glycerolu nebyl při přídavku kyseliny valerové v čase 0 tvořen terpolymer, ale pouze kopolymer P(3HB-co-3HV), kdy zastoupení monomeru 3HV bylo 48 mol. % a celková produkce PHA byla 0,16 g/l. Pokud se kyselina valerová přidala do směsi 1,4-butandiolu a glycerolu až po 24 hodinách kultivace biomasa vzrostla na 1,41 g/l s obsahem 0,51 g/l terpolymeru P(3HB-co-3HV-co-4HB), kdy byl převážně zastoupen monomer 3HB a to v 94,6 mol.%, 3,5 mol. % zaujímal monomer 4HB a necelé 2 mol. % tvořila jednotka 3HV. V případě použití pouze 1,4-butandiolu jako zdroje uhlíku bylo zastoupení 4HB vyšší. Při přídavku kyseliny valerové po 24 hodinách kultivace byla biomasa nižší a to 0,84 g/l. Terpolymer pak obsahoval nejvíce

4HB a to téměř 70 mol.%, dále byl tvořen přibližně z 29 mol. % 3HB a necelé 1 mol. % zaujímal 3HV. Molekulová hmotnost takto tvořeného terpolyesteru byla 192 kDa, což byla nejvyšší naměřená molekulová hmotnost PHA ve srovnání s ostatními hodnotami. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití samotného 1,4-butandiolu jako zdroje uhlíku s přidavkem kyseliny valerové hned na počátku kultivace. Biomasa byla 1,44 g/l s 40 % PHA na suchou biomasu. Všechny monomerní jednotky byly zastoupeny ve vyšších koncentracích. Nejvyšší podíl zastoupení měl 4HB a to 54,2 mol. %, poté byl nejvíce zastoupen 3HV 33,1 mol. % a nejmenší zastoupení měla jednotka 3HB s 12,7 mol. %. Molekulová hmotnost tohoto terpolymeru se pohybovala okolo 117 kDa s indexem polydisperzity 1,55. Na základě dostupné literatury neexistují zmínky o termofilním producentovi terpolymeru P(3HB-co-3HV-co-4HB) s vyšším zastoupením 4HB, proto se izolát *Aneurinibacillus* sp. H1 jeví jako vhodný kandidát pro průmyslovou tvorbu terpolymeru s vysokým zastoupením 4HB, protože právě monomer 4HB dává materiálu vhodné mechanické a technologické vlastnosti. Navíc je jeho výroba pouze jednostupňová a nevyžaduje drahé prekurzory jako je například kyselina 4-hydroxybutanová [222].

Izolát *Aneurinibacillus* sp. H1 prokázal velký biotechnologický potenciál, co se týká produkce PHA. Tato termofilní bakterie je schopna produkce PHA nejen na čistém glycerolu, ale také na odpadním glycerolu, a navíc bez jakékoliv další úpravy. Kromě polymeru P(3HB) je také schopna tvořit kopolymer P(3HB-co-3HV) se zastoupením až 66 mol. % 3HV. Kromě toho je také schopna za přidavku prekurzoru 1,4-butandiolu tvořit kopolymer P(3HB-co-4HB), který má široké uplatnění v medicíně či farmacii. Obsah monomeru 4HB závisí na použitém zdroji uhlíku, popřípadě poměru glycerolu a 1,4-butandiolu, kde se podíl zastoupení 4HB jednotky pohybuje od 4 do 95 mol. %. Tato skutečnost přispívá ke konkurenceschopnosti biotechnologického potenciálu daného izolátu, kdy v rámci úpravy vstupního zdroje lze upravit poměr jednotek v polymeru dle požadované aplikace. Mimo již zmíněných kopolymerů je také schopna produkce terpolymeru P(3HB-co-3HV-co-4HB). Na základě úpravy kultivačních podmínek lze opět připravit terpolymer o různém zastoupení monomerních jednotek. Díky těmto vlastnostem byla bakterie uložena v České sbírce mikroorganismů v Brně jako patentová kultura pod číslem CCM 8960 (příloha 10.4). Výsledky shrnující optimalizaci produkce a produkci kopolymeru P(3HB-co-4HB) pomocí izolátu *Aneurinibacillus* sp. H1 byly také publikovány formou článku v impaktovaném časopise (příloha 10.4). Materiálová charakterizace polymerů připravených pomocí bakterie *Aneurinibacillus* sp. H1 je shrnuta v článku Sedláček a kolektiv [256].

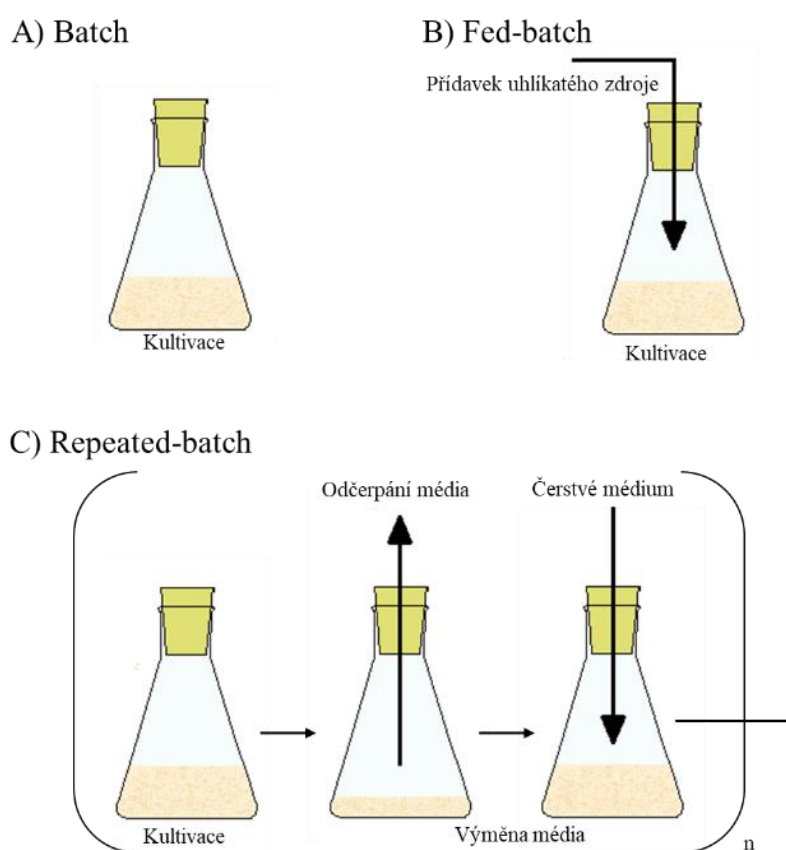
#### **4.4.4. Batch, fed-batch a repeated-batch izolátu H1**

Kultivaci mikroorganismů lze provádět ve více kultivačních módech a každá z nich nese určitá pozitiva i negativa. Vždy je to ovlivněno daným mikroorganismem, použitým substrátem či podmínkami kultivace. Snad nejstarším běžně používaným typem kultivace je klasická vsádka (batch) [257]. Přidáváním živin do klasické batch kultivace vznikla fed-batch kultivace tedy přítoková vsádka. Během procesu jsou dodávány do reaktoru živiny, ale buňky a produkty zůstávají v reaktoru. Pokročilou variantou vsádkové kultivace je repeated-batch kultivace, během které dochází k periodickému odebírání média (včetně buněk i produktu), které je

nahrazováno čerstvým médiem [258]. Dalším typem je kontinuální kultivace, kdy během kultivace dochází ke kontinuálnímu přítoku i odtoku kultivačního média z reaktoru [259].

Také produkci polyhydroxyalkanoátů lze provádět ve všech zmíněných módech. Dokonce správně zvolenou kultivační strategií lze zvýšit produkci PHA a s používáním levných zdrojů uhlíku snižovat cenu biotechnologického procesu a zvyšovat konkurenční schopnost polymeru [260].

V rámci testování produkce PHA pomocí termofilního izolátu *Aneurinibacillus* sp. H1 bylo také vyzkoušeno několik kultivačních strategií. Základní myšlenku těchto strategií kultivace zobrazuje obrázek 48. Vliv na tvorbu kopolymeru P(3HB-co-4HB) byl testován pomocí klasické batch kultivace či během fed-batch kultivace, při které byly testovány čtyři různé příkrmy. Rovněž byl testován vliv strategie repeated-batch na produkci PHA.

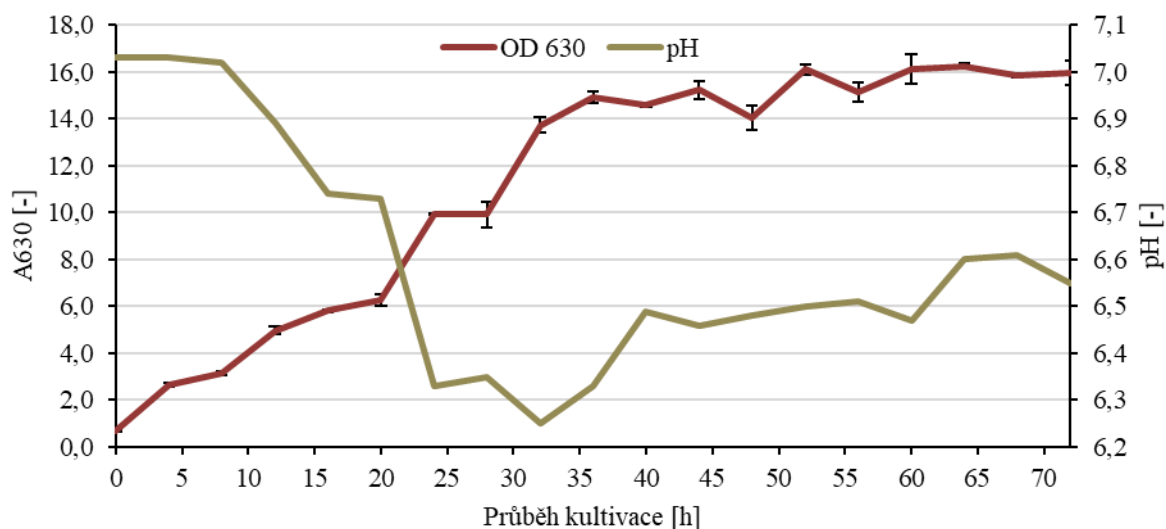


**Obrázek 48: Schéma kultivací batch, fed-batch a repeated-batch u bakterie *Aneurinibacillus* sp.**

**H1.** A) Schéma batch kultivace – klasická vsádka; B) schéma fed-batch – kultivace začíná jako vsádka, ale každých 24 hodin byl do baňky přidán příslušný zdroj uhlíku; C) schéma repeated-batch – kultivace probíhala jako klasická vsádka, ale každých 48 hodin byla část média odčerpána a bylo přidáno čerstvé médium, následně pokračovala kultivace.

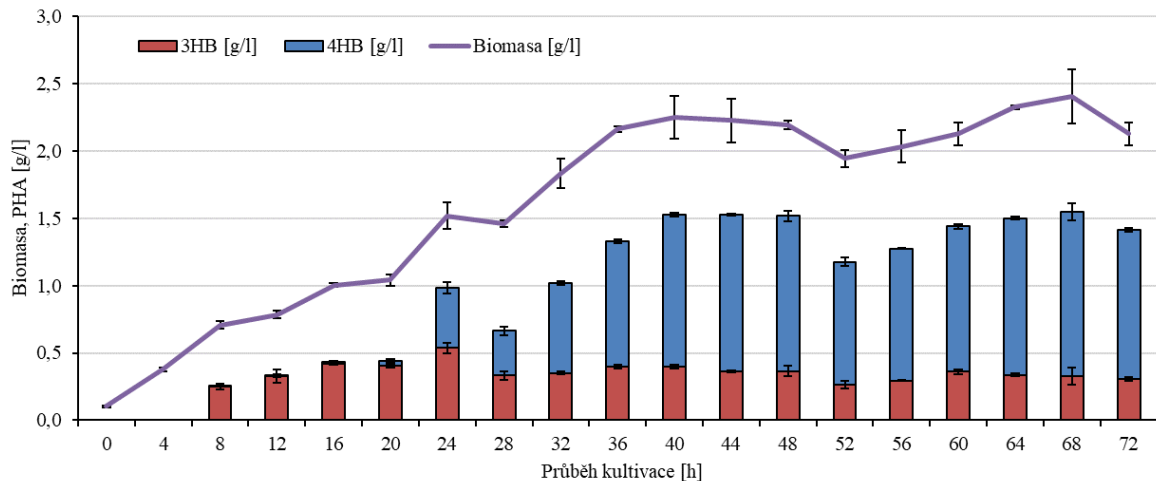
Kultivace bakterie *Aneurinibacillus* sp. H1 v režimu batch probíhala na směsi 4 g/l 1,4-butandiolu a 2 g/l glycerolu jako zdroje uhlíku. Průběh kultivace byl monitorován. Každé čtyři hodiny bylo měřeno pH, buněčná hustota, koncentrace biomasy, koncentrace PHA a jednotlivé zastoupení monomerů v polymeru. Na obrázku 49 je zaznamenán průběh změny buněčné hustoty, která je vyjádřena absorbcí měřenou při 630 nm, a změna pH. Hodnota pH

na počátku kultivace se pohybuje okolo 7 a v prvních třiceti hodinách kultivace klesla na hodnotu 6,2. Od 32. hodiny má spíše stoupající trend. Kultivace byla ukončena v 72. hodině, kdy byla hodnota pH 6,5. Změna trendu v hodnotě pH může být zapříčiněná vyčerpáním směsi zdrojů uhlíku. Průběh změny buněčné hustoty má rostoucí charakter do 35. hodiny, poté už spíše dochází k zastavení růstu a přechodu kultury do stacionární fáze.



**Obrázek 49: Křivka růstu bakterie *Aneurinibacillus* sp. H1 při kultivaci na směsi 4 g/l 1,4-butandiolu a 2 g/l glycerolu.** Graf zobrazuje závislost absorbance optického zákalu (OD 630) a změnu pH na čase kultivace.

Na obrázku 50 je zobrazena závislost koncentrace biomasy a množství PHA v průběhu kultivace. Křivka zobrazující koncentraci biomasy má podobný průběh jako průběh křivky zobrazující buněčnou hustotu, kdy od 36. hodiny začíná stacionární fáze a koncentrace biomasy se pohybuje okolo 2,5 g/l. Nejvyšší koncentrace bylo dosaženo v 68. hodině a to 2,81 g/l. Koncentrace PHA byla stanovována až od 8. hodiny kultivace. V prvních dvaceti hodinách dochází k akumulaci PHA do koncentrace 0,5 g/l a polymer je složen převážně z 3HB. V této fázi bakterie nejspíše využívá převážně glycerol, proto vzniká téměř čistý homopolymer P(3HB). Od 24. hodiny je již zaznamenáno vyšší zastoupení monomeru 4HB, což značí, že bakterie začíná využívat 1,4-butandiol jako prekurzor pro tvorbu 4HB. Nejvyšších hodnot koncentrace PHA bylo dosaženo po 40. hodině kultivace, když až na mírný pokles v 52. a 56. hodině, byla stabilní až do konce kultivace.



**Obrázek 50: Závislost koncentrace biomasy a PHA na čase kultivace pro bakterii**

*Aneurinibacillus sp. H1*. Jako zdroj uhlíku byla použita směs 4 g/l 1,4-butandiolu a 2 g/l glycerolu. Kultivace probíhala při 50 °C po dobu 72 hodin. Výsledné hodnoty jsou dány průměrem naměřených hodnot, chybové úsečky pak zobrazují směrodatnou odchylku.

Ve vybraných hodinách byla také stanovena molekulová hmotnost polymeru pomocí metody SEC-MALS, výsledky jsou zobrazeny v tabulce 37. V průběhu času kultivace dochází ke zvyšování molekulové hmotnosti polymeru. Od 56. hodiny kultivace se již příliš nemění složení kopolymeru, avšak molekulová hmotnost se ještě nepatrně zvýšila, kdy nejvyšších hodnot dosáhla až na konci kultivace a to 126 kDa. Index polydisperzity se v průběhu celého experimentu pohybuje okolo 1,5.

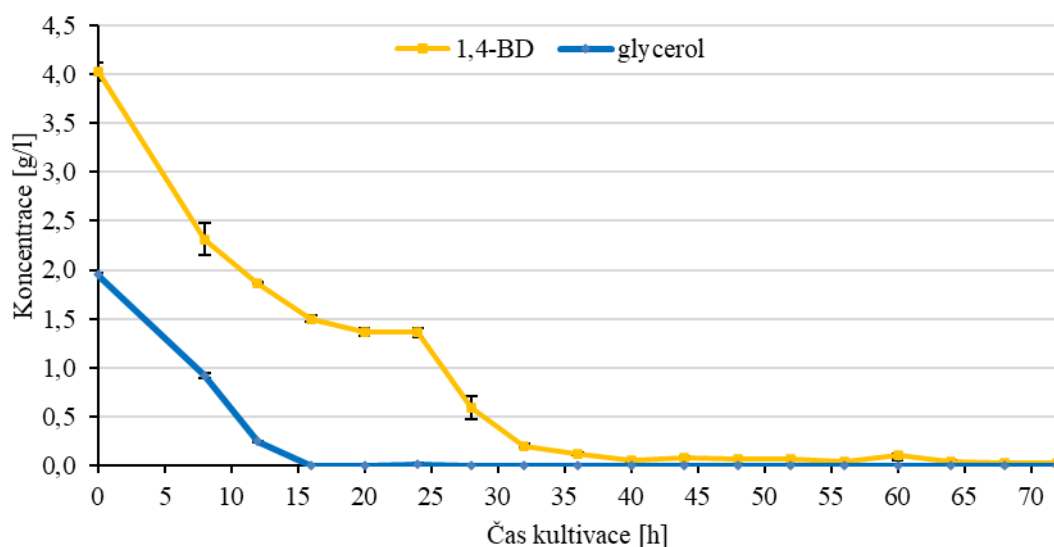
**Tabulka 37: Koncentrace PHA a jednotlivé zastoupení monomeru v polymeru, molekulová hmotnost a index polydisperzity během batch kultivace bakterie *Aneurinibacillus sp. H1*.**

Kultivace probíhala na směsi 4 g/l 1,4-butandiolu a 2 g/l glycerolu po dobu 72 hodin.

	PHA [g/l]	3HB [mol. %]	4HB [mol. %]	Mw [kDa]	Đ
<b>24 h</b>	0,98 ± 0,21	54,6	45,4	65,08 ± 1,42	1,56
<b>36 h</b>	1,33 ± 0,05	29,8	70,2	92,96 ± 1,14	1,66
<b>40 h</b>	1,53 ± 0,08	26,1	73,9	98,76 ± 0,41	1,57
<b>56 h</b>	1,27 ± 0,11	23,0	77,0	112,86 ± 1,86	1,59
<b>68 h</b>	1,54 ± 0,27	21,1	78,9	117,02 ± 0,91	1,50
<b>72 h</b>	1,41 ± 0,08	21,8	78,2	126,65 ± 0,07	1,63

Pomocí HPLC byly stanoveny zbytkové zdroje uhlíku v médiu. Průběh zbytkové koncentrace uhlíkatých zdrojů zobrazuje obrázek 51. Z naměřených dat vyplývá, že glycerol byl vyčerpán během prvních dvaceti hodin kultivace. Zároveň s glycerolem byl také využíván 1,4-butandiol. K vyčerpání veškerého zdroje uhlíku došlo až okolo čtyřicáté hodiny. Z průběhu zbytkové koncentrace uhlíkových zdrojů a z koncentrací PHA a jejich monomerního

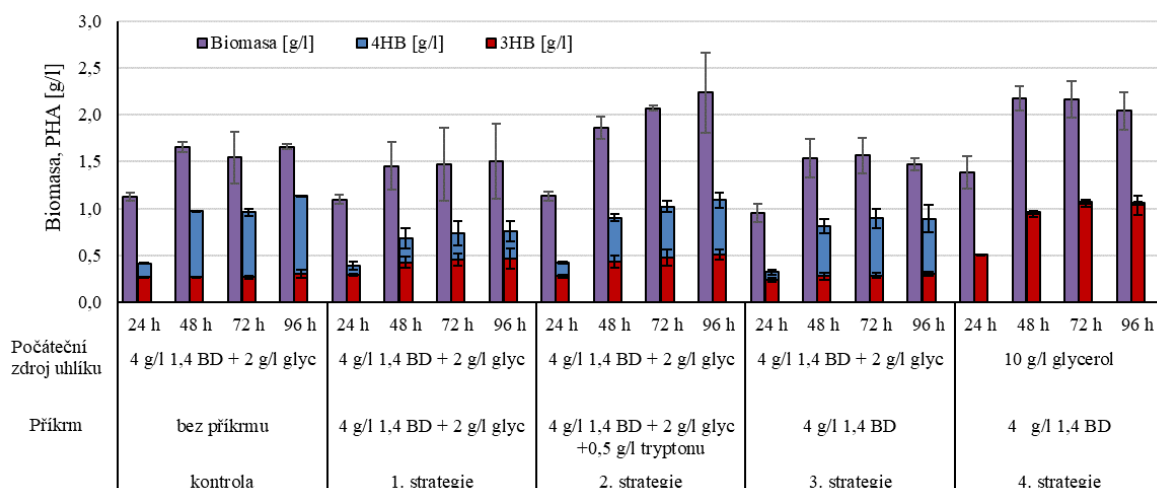
zastoupení v kopolymeru, je patrné, že k produkci 4HB dochází až po vyčerpání veškerého glycerolu v médiu, i když k utilizaci prekursoru 4HB, tedy 1,4-butandiolu, dochází od začátku kultivace.



**Obrázek 51: Zbytková koncentrace 1,4-butandiolu (1,4-BD) a glycerolu během batch kultivace.** Výsledné hodnoty jsou dány průměrem naměřených hodnot, chybová úsečka zobrazuje směrodatnou odchylku měření.

Z monitoringu produkce PHA v kultivačním batch módu je patrné, že lze kultivaci ukončit již dříve, protože již v 40. hodině kultivace dochází téměř k nejvyšším hodnotám produkce a také k vyčerpání zdrojů uhlíku. Zkrácením kultivační doby opět dochází ke snížení nákladů biotechnologického procesu. Rovněž lze jako výhodu považovat fakt, že i když vrcholu produkce PHA bylo dosaženo již okolo 40 hodiny a rovněž došlo k vyčerpání uhlíkatého zdroje, nedocházelo k intenzivnímu využití PHA granulí jako zdroj energie.

Dalším testovaným kultivačním módem byla fed-batch kultivace, kdy každých 24 hodin byly do média přidány živiny. Protože během batch kultivace se musí dbát na to, aby kultura nebyla limitovaná zdrojem uhlíku a nedocházelo k využívání produktu jako zdroje uhlíku [261], je fed-batch vhodnou alternativou. Právě fed-batch kultivace se řadí mezi metody kultivace, které vedou k dosažení vysoké koncentraci buněk a s tím spojeného intracelulárního produktu [262]. V rámci testování fed-batch kultivace u izolátu *Aneurinibacillus* sp. H1 byly testovány čtyři různé příkrmy a také byla provedena kontrola, do které nebyl přidán příkrm. Kontrola a další tři kultivační strategie vycházely z počátečního zdroje uhlíku, kterým byla směs 4 g/l 1,4-butandiolu a 2 g/l glycerolu. U čtvrtého experimentálního uspořádání bylo jako původní zdroj uhlíku použito 10 g/l glycerolu. Kontrola byla bez příkrmu. Přehled příkrmů pro jednotlivé kultivační strategie je popsán v tabulce 18. Výsledky fed-batch kultivace, tedy průběh koncentrace biomasy a PHA během jednotlivých příkrmových kultivací je zobrazen na obrázku 52.



**Obrázek 52: Průběh koncentrace biomasy a PHA v rámci fed-batch kultivace bakterie**

*Aneurinibacillus* sp. H1. Kultivace probíhala při 50 °C po dobu 96 hodin. Počáteční zdroj uhlíku je zobrazen v grafu, příkrm byl přidáván vždy po 24 hodinách a je také zobrazen v grafu. Byla provedena také kontrola, do které nebyl přidáván příkrm. 1,4-BD – 1,4-butandiol; glyc – glycerol. Výsledky jsou dány průměrem paralelního měření a chybová úsečka představuje směrodatnou odchylku měření.

Postupné přidávání živin do média nemělo bohužel příliš pozitivní efekt na produkci PHA. U prvního experimentálního uspořádání nedošlo oproti kontrole ke zvýšení biomasy a spíše došlo ke snížení produkce PHA, u kterého byl navíc monomer 4HB zastoupen pouze pod 50 mol. %. Produkce PHA se již od 48. hodiny kultivace až do konce příliš neměnila. U druhého kultivačního uspořádání, kde byl kromě zdroje uhlíku také přidáván komplexní zdroj bohatý na dusík, byla produkce biomasy vyšší oproti kontrole. Maxima bylo dosaženo na konci kultivace a to v 96. hodině, kdy se biomasa pohybovala okolo 2,5 g/l a množství PHA přesahovalo 1 g/l s 65 mol. % 4HB. Třetí strategie uspořádání příkrmu vedla opět k poklesu produkce biomasy i PHA oproti kontrole, kde nedocházelo k žádnému příkrmu. Čtvrtá kultivační strategie, která vycházela pouze z glycerolu a byl přidáván 1,4-butandiol, dosáhla vyšší produkce biomasy než v kontrolním vzorku. Již po 48 hodinách kultivace se koncentrace biomasy pohybovala nad 2 g/l a množství PHA se pohybovalo okolo 1 g/l. Nicméně výsledný polymer byl tvořen pouze monomerem 3HB a ani přidávání prekursoru nevedlo k tvorbě kopolymeru P(3HB-co-4HB). Je otázkou, zda by prodloužení kultivace vedlo k produkci kopolymeru, kdy by se po vyčerpání veškerého glycerolu začal utilizovat 1,4-butandiol.

Vhodná úprava biotechnologického procesu může vést ke zvýšení produkce PHA a tím ke snížení nákladů na výrobu. Fed-batch kultivace je hojně používaná za cílem co nejvíce zvýšit produkci PHA a zároveň zabránit limitaci zdrojem uhlíku. Důležité je však sledování vývoje kultivace a vhodné načasování přídatku živin [263]. Po monitoringu růstu a po nastavení vhodného dávkování glycerolu do kultivačního média vzrostla výtěžnost PHA u bakterie *Zobellela denitrificans* MW1 téměř šestinásobně, koncentrace P(3HB) na konci fed-batch kultivace dosahovala až 54,2 g/l [264]. Také správná koncentrace a načasování přídatku uhlíkatého zdroje obsahující prekuzory může vést k tvorbě kopolymerů, jak tomu bylo například za použití bakterie *Burkholderia sacchari* DSM 17165. U této bakterie bylo využito glukózy jako původního zdroje a přídatku  $\gamma$ -butyrolaktonu pro tvorbu P(3HB-co-4HB). Bylo dosaženo celkové produkce PHA 42 g/l se 7 mol. % 4HB [265]. Také vhodně zvoleným

přídavkem uhlíkatého substrátu a dusíku byla zvýšena produkce PHA u bakterie *Cupriavidus malaysiensis* USMAA1020, kdy díky přídavku směsi 1,4-butandiolu a 1,6-hexandiolu došlo také k akumulaci P(3HB-co-4HB) s vysokým zastoupením 4HB v monomeru pohybující se mezi 92 až 99 mol. % [266].

Na konci kultivace byla stanovena u každé strategie příkrmu a také u kontroly molekulová hmotnost výsledného kopolymeru (Tabulka 38). Molekulová hmotnost kontrolního vzorku byla 208 kDa, zato molekulová hmotnost polymeru u první a druhé kultivační strategie velice poklesla, a to až na hodnoty okolo 53 kDa. Avšak nejnižší hodnotu molekulové hmotnosti měl polymer P(3HB), tedy čtvrtý pár testovaných příkrmů, kdy molekulová hmotnost byla pouze 45,5 kDa. Přídavky zdroje uhlíku ovlivnily nejen složení polymeru, ale také molekulovou hmotnost.

**Tabulka 38: Přehled zastoupení monomerů v polymeru P(3HB-co-4HB) a molekulová hmotnost výsledných polymerů při produkci PHA pomocí bakterie *Aneurinibacillus* sp. H1 při fed-batch kultivaci.** 1,4-BD – 1,4-butandiol; glyc – glycerol; Mw – molekulová hmotnost; Đ – index polydisperzity.

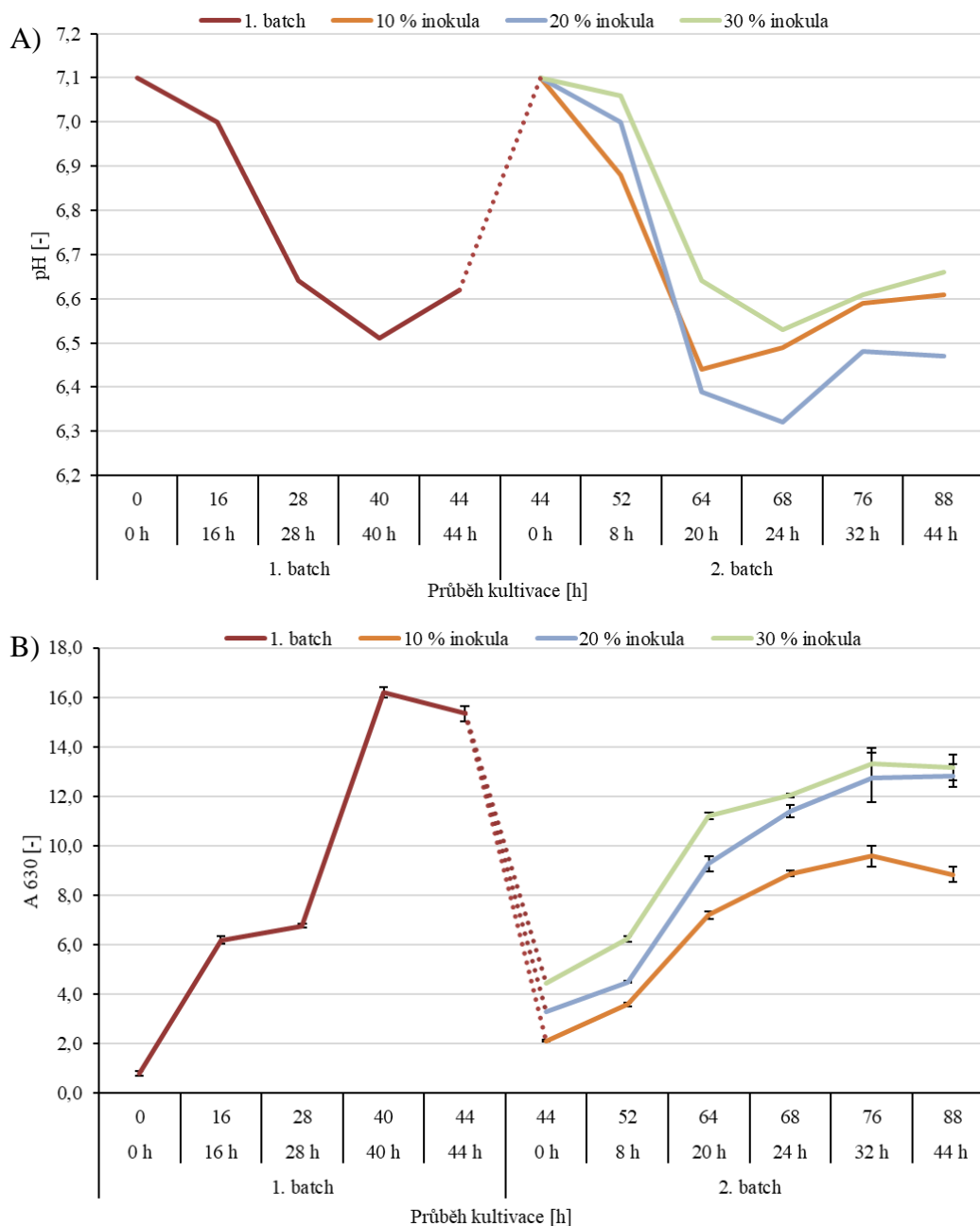
	Počáteční zdroj uhlíku	Typ příkrmu	PHA [g/l]	3HB [mol. %]	4HB [mol. %]	Mw [kDa]	Đ
<b>kontrola</b>	4 g/l 1,4 BD + 2 g/l glyc	bez příkrmu	1,14 ± 0,04	26,5	73,5	208,41 ± 1,72	1,35
<b>1. strategie</b>	4 g/l 1,4 BD + 2 g/l glyc	4 g/l 1,4 BD + 2 g/l glyc	0,75 ± 0,01	61,5	38,5	52,19 ± 1,51	1,56
<b>2. strategie</b>	4 g/l 1,4 BD + 2 g/l glyc	4 g/l 1,4 BD + 2 g/l glyc + 0,5 g/l tryptonu	1,09 ± 0,03	46,8	53,2	53,63 ± 0,92	1,44
<b>3. strategie</b>	4 g/l 1,4 BD + 2 g/l glyc	4 g/l 1,4 BD	0,89 ± 0,12	33,9	66,1	88,34 ± 1,51	1,34
<b>4. strategie</b>	10 g/l glycerol	5 g/l 1,4 BD	1,06 ± 0,12	97,8	2,2	45,51 ± 1,13	1,42

Dalším testovaným typem kultivace ve snaze zvýšit efektivitu produkce PHA byla repeated-batch, tedy opakovaná vsádka. Tento typ kultivačního módu nese řadu výhod. Při srovnání s klasickou vsádkou je čas na přípravu procesu menší, protože není potřeba mezi každou novou vsádkou promývání kultivační nádoby a sterilizace [267; 268]. Protože se používá kultura z předešlé vsádky jako inokulum, není potřeba vytvářet nová inokula. Tímto dochází k úsporám práce i času [269]. Mohou se však vyskytovat rozdíly v produkci mezi jednotlivými šaržemi, může kolísat například i produkce a kvalita polymeru či molekulová hmotnost [270].



Na základě předchozích měření byly vybrány podmínky pro repeated-batch kultivace izolátu *Aneruinibacillus* sp. H1. Pro podpoření tvorby kopolymeru P(3HB-co-4HB) byla jako zdroj uhlíku použita směs 4 g/l 1,4-butandiol se 2 g/l glycerolu. Délka kultivace byla dána monitoringem klasické batch kultivace, kdy už po 40 hodinách kultivace již nedocházelo ke změnám produkce PHA. Změna vsádky byla proto provedena ve 44. hodině kultivace. Poměr inokulačního objemu je velmi důležitý pro budoucí produkci PHA. Ovlivňuje nejen celkovou koncentraci biomasy ale také PHA [148]. Proto byl nejdříve stanoven správný „inokulační objem“ – objem ponechaný v kultivační nádobě z předchozího cyklu, kdy po první vsádce došlo k odčerpání média a pro další vsádku bylo ponecháno 10, 20 a 30 % média s buňkami jako inokulum pro další šarži.

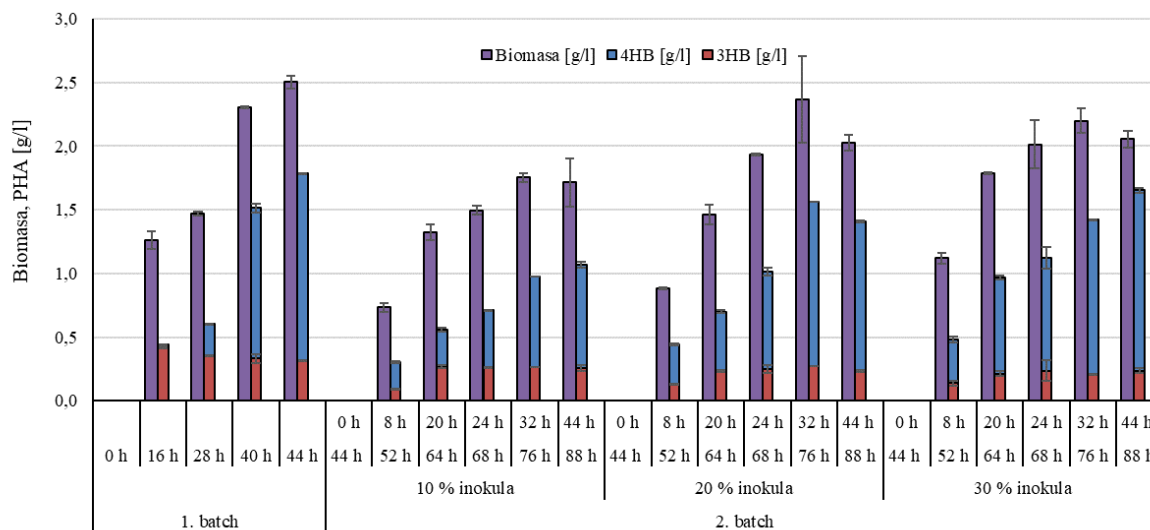
Během experimentu byla v průběhu první a druhé kultivace sledována změna pH a nárůst buněčné hustoty, která byla měřena spektrofotometricky. Výsledky jsou zobrazeny na obrázku 53. Během prvního cyklu vsádky došlo během 44 hodin kultivace ke snížení pH na hodnotu 6,5. Přibližně ve 40. hodině poté došlo k jejímu vzrůstu na hodnotu 6,6. Nová vsádka vycházela z pH minerálního média, tedy 7,1. Podobnou křivku změny pH vykazuje křivka pro inokulum 30 %, avšak svého minima dosáhla již po 24 hodinách kultivace. Nejnižšího pH bylo dosaženo při vsádce zaočkováné 20 %, kdy po 24 hodinách kleslo pH na hodnotu 6,3. Co se týká buněčné hustoty, tak během druhé kultivace nebylo dosaženo vyšší nebo stejné hodnoty absorbance jako u první vsádky. Průběh křivek během druhé vsádky je podobný a liší se až ke konci kultivace. Při použití pouze 10 % dochází ke slabému úbytku, zatím co při použití 20 % se na konci kultivace buněčná hustota vyrovnala kultivaci vycházející ze 30 % inokula.



**Obrázek 53: Průběh změny pH a optické hustoty během kultivace v režimu repeated-batch při testování vhodné koncentrace inokula. A) Závislost pH na čase v průběhu repeated-batch. B) Graf závislosti absorpance měření při vlnové délce 630 nm na průběhu kultivace repeated-batch. Výsledky optické hustoty jsou dány průměrem měření a chybová úsečka zobrazuje směrodatnou odchylku.**

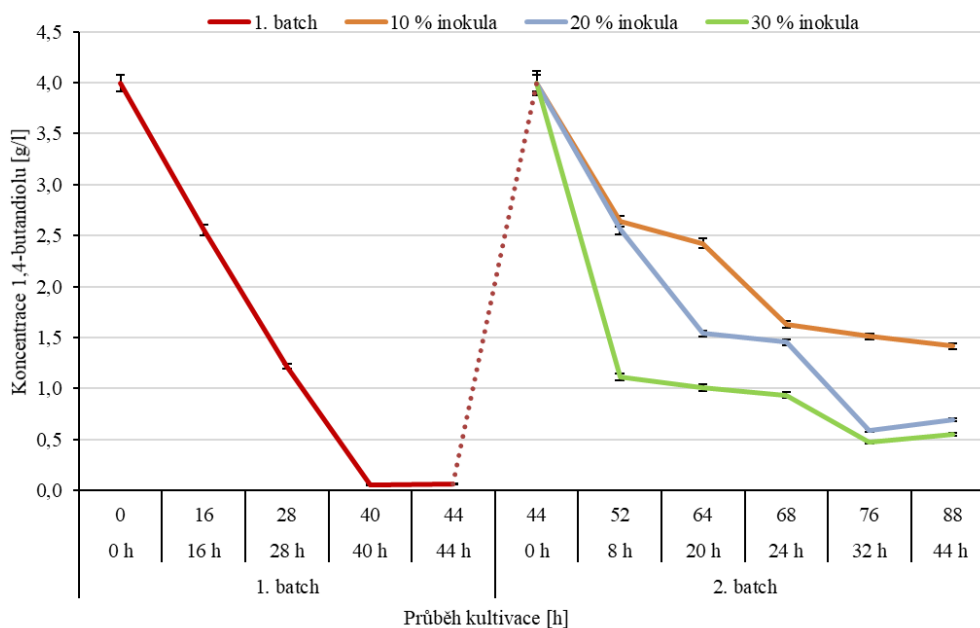
Kromě pH a buněčné hustoty byla monitorována také změna koncentrace biomasy a PHA. Taktéž bylo sledováno jednotlivé zastoupení monomerů v polymeru P(3HB-co-4HB), které je zobrazeno na obrázku 54. Během první batch kultivace bylo dosaženo nejvyšší koncentrace biomasy a to 2,5 g/l a také PHA, kdy koncentrace polymeru dosahovala téměř 1,8 g/l s 82 mol. % 4HB. Při použití 10 % inokula byla produkce biomasy i PHA nejnižší a celková biomasa dosahoval sotva koncentrací PHA v první vsádce. Koncentrace PHA při použití 30 % jako inokula má vzrůstající charakter a na konci druhé vsádky je koncentrace ze všech

testovaných inokulačních poměrů nejvyšší a to 1,6 g/l s téměř 86 mol. % 4HB. Pro další repeated-batch kultivace bylo jako nejvhodnější inokulační poměr vybráno právě 30 % inokula.



**Obrázek 54: Závislost koncentrace biomasy a PHA na průběhu kultivace repeated-batch pro různé množství inokulačního poměru pro druhý batch.** Jako zdroj uhlíku byla použita směs 4 g/l 1,4-butandiolu a 2 g/l glycerolu. Hodnoty jsou dány průměrem a chybová úsečka zobrazuje směrodatnou odchylku.

Během repeated-batch kultivace byla také měřena koncentrace zbytkových zdrojů uhlíku v médiu. Glycerol byl v průběhu první batch kultivace spotřebován do 16. hodiny kultivace a při druhé batch kultivaci byla změřena nulová koncentrace glycerolu u všech třech poměrů. Průběh zbytkového 1,4-butandiolu (Obrázek 55) je podobný v prvním batch jako v klasické vsádce a k vyčerpání dochází okolo 40. hodiny kultivace. V druhé vsádce již nedochází k úplnému vyčerpání 1,4-butandiolu a úbytek je dán poměrem inokula. Průběh křivek je pro všechny tři poměry inokula podobný. Na konci kultivace je nejvyšší zbytková koncentrace 1,4-butandiolu u 10 % inokula a to 1,42 g/l. Nejnižší je potom u 30 % inokula, kdy bylo naměřeno pouze 0,55 g/l. Což odpovídá i nárůstu biomasy a PHA, kdy při 30 % inokula bylo na konci kultivace dosaženo nejvyšší koncentrace PHA.



**Obrázek 55: Měření zbytkového 1,4-butandiolu v médiu během repeated-batch kultivace pro různé inokulační poměry.** Naměřené hodnoty jsou dány průměrem naměřených hodnot. Chybová úsečka zobrazuje směrodatnou odchylku.

Na konci první vsádky a na konci druhé vsádky pro každý inokulační poměr byla u polymeru rovněž stanovena molekulová hmotnost a index polydisperzity (Tabulka 39). Z naměřených hodnot je patrné, že inokulační poměr má vliv nejen na koncentraci PHA, ale také na kvalitu či molekulovou hmotnost polymeru [271]. Na konci druhé batch kultivace je rozdíl v molekulových hmotnostech polymeru, kdy nejnižší je u inokulačního poměru 10 % a nejvyšší u 30 %. Polymer s použitím 30 % inokula má srovnatelnou molekulovou hmotnost jako na konci první batch kultivace.

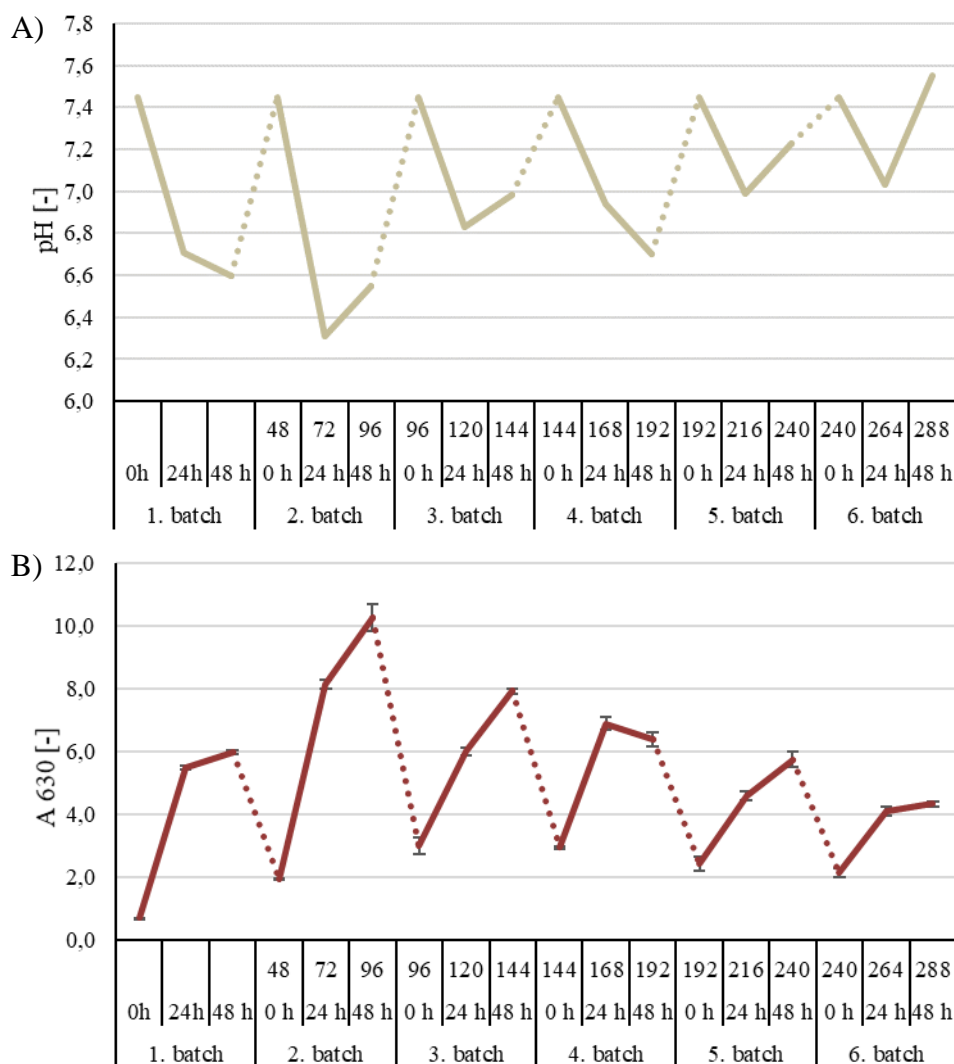
**Tabulka 39: Molekulová hmotnost polymeru a jednotlivé zastoupení monomerních jednotek v P(3HB-co-4HB) na konci jednotlivých kroků repeated-batch kultivace.** Mw – molekulová hmotnost; Đ – index polydisperzity.

	PHA [g/l]	3HB [mol. %]	4HB [mol. %]	Mw [kDa]	Đ
<b>1. batch</b>	1,79 ± 0,09	17,7	82,3	119,19 ± 1,47	1,35
<b>10 % – 2. batch</b>	1,07 ± 0,02	24,2	75,8	84,49 ± 0,99	1,39
<b>20 % – 2. batch</b>	1,41 ± 0,04	16,5	83,5	107,68 ± 0,43	1,36
<b>30 % – 2. batch</b>	1,65 ± 0,25	14,3	85,7	115,33 ± 1,03	1,46

Repeated-batch kultivaci lze považovat za cyklicky se opakující vsádku, která připomíná aerobní dynamické krmení, které se hojně používá k produkci PHA pomocí směsných mikrobiálních kultur či k zakoncentrování PHA produkujících bakterií [272]. Při repeated-batch lze víceméně opakovat cykly, dokud nedojde ke kontaminaci šarže [273]. Limitace

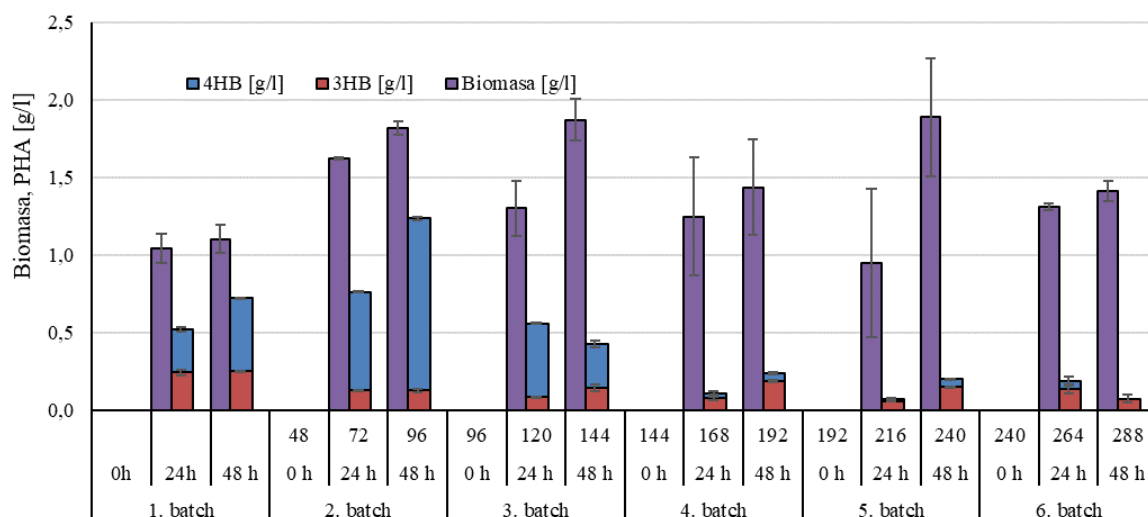
kontaminací je eliminována použitím extrémofilních mikroorganismů. Při provádění repeated-batch v bioreaktorech, kde dochází k plnému monitoringu biotechnologického procesu, je většinou následující batch kratší a rychlejší [274]. Nicméně pro experiment v baňkách, zůstal čas kultivace jednotlivých batch kultivací zachován. Každá jednotlivá kultivace trvala 48 hodin. Jako zdroj uhlíku byla opět použita směs 4 g/l 1,4-butandiolu se 2 g/l glycerolu a jako inokulum pro další vsádky bylo vždy použito 30 % kultivačního média z předchozí batch kultivace. Celkově byla vsádka zopakována šestkrát.

Během celého repeated-batch experimentu byly opět sledovány parametry jako je změna pH, buněčná hustota, koncentrace biomasy a PHA. Změnu pH a buněčné hustoty zobrazuje obrázek 56. Již na první pohled je patrné, že změna pH a buněčné hustoty jsou si svým zrcadlovým odrazem. Nejvyšší buněčné hustoty a tím spojeného nejnižšího pH bylo dosaženo již v druhé batch kultivaci, dokonce buněčná hustota při druhé kultivaci byla téměř dvojnásobná oproti první vsádce. S každou další vsádkou se buněčná hustota pomalu snižuje. To stejné lze říci o změně pH, kdy k nejnižšímu poklesu došlo právě v druhé vsádce, a poté se pH s každou další kultivací již příliš neměnilo od původní hodnoty média.



**Obrázek 56: Změna pH a optické hustoty v průběhu repeated-batch kultivace bakterie *Aneurinibacillus sp. H1*.** A) Graf závislosti pH na čase v průběhu repaeted-batch kultivace. B) Graf závislosti absorbance optické hustoty na průběhu kultivace během repeated-batch módu. Absorbance je dána průměrem naměřených hodnot, chybová úsečka udává směrodatnou odchylku.

Průběh koncentrace biomasy a PHA během repeated-batch kultivace je zobrazen na obrázku 57. Koncentrace biomasy je v každé následné batch kultivaci vyšší než při první vsádce, dokonce na konci druhé, třetí a páté batch kultivace je srovnatelná a pohybuje se okolo 1,8 g/l. Během čtvrté vsádky došlo k poklesu biomasy, avšak i tak je vyšší než při první vsádce. Také poslední (šestá) vsádka již dosahuje nižších hodnot koncentrace biomasy a to pod 1,5 g/l. I když hodnoty biomasy jsou dobré, a i v páté vsádce je koncentrace vysoká, produkce PHA rapidně klesla. Nejvyšší produkce polymeru P(3HB-co-4HB) je dosaženo v druhém cyklu batch kultivace, kdy na konci vsádky dosahuje produkce 1,2 g/l, což je téměř dvojnásobek oproti první vsádce. Zastoupení 4HB v polymeru se pohybuje okolo 89 mol. %. Od třetího cyklu batch kultivace však produkce PHA klesá, kdy například v pátém cyklu klesla pouze na 0,2 g/l a hlavním zastoupeným monomerem je 3HB se 75 mol. %. Na konci šestého cyklu je produkován již čistý P(3HB).

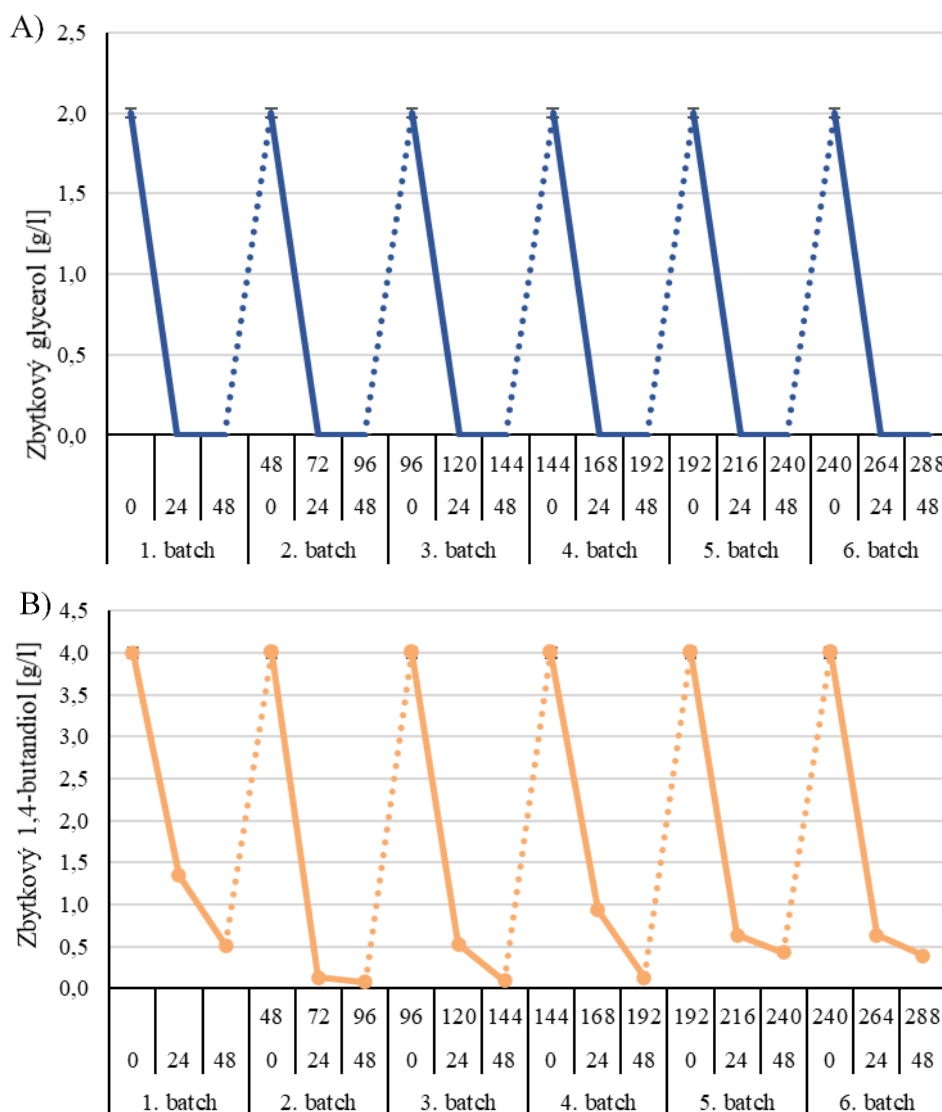


**Obrázek 57: Průběh koncentrace biomasy a PHA během repeated-batch kultivace.** Kultivace probíhala při 50 °C, kdy jako zdroj uhlíku byla použita směs 4 g/l 1,4-butandiolu a 2 g/l glycerolu. Výsledné hodnoty jsou dány průměrem paralelního měření a chybová usečka zobrazuje směrodatnou odchylku.

S každým následujícím cyklem se obvykle zrychluje produkce, což pravděpodobně zapříčinilo tak rapidní pokles produkce PHA. Nastavení opakování cyklů a včasné přidání čerstvého média je lepší při monitoringu v bioreaktoru, kde díky včasné detekci změn v produkci může docházet ke zvýšení produkce PHA než během obvyčejné vsádky. Například při použití bakterie *Cupriavidus necator* NRRL B14690 bylo již při druhém cyklu repeated-batch kultivace dosaženo téměř trojnásobnému zvýšení produktivity oproti obvyčejné vsádce. Produkce P(3HB) pomocí repeated-batch dosahovala 25 g/l [275]. Také použití repeated-batch kultivace pro produkci PHA pomocí *Azohydromonas australica* DSM 1124 vedlo ke zvýšení produkce, a to více než trojnásobnému na celkovou koncentraci 20,5 g/l P(3HB) na konci čtvrtého cyklu [263]. Zkrácení času kultivace a zvýšení produkce PHA bylo rovněž naměřeno u bakterie *Alcaligenes latus* TISTR 1403 při repeated-batch kultivaci. Čtvrtý cyklus byl kratší o 9 hodin a produktivita vzrostla více než dvakrát na 0,21 g/l·h oproti první vsádce. Konečná produkce pak činila 3,10 g/l PHA [273].

Dalším z měřených parametrů během repeated-batch kultivace byla koncentrace zbytkových zdrojů uhlíku. Průběh naměřených koncentrací zobrazuje obrázek 58, kdy část A) zobrazuje křivku pro glycerol a část B) 1,4-butandiol. Z křivky koncentrace zbytkového glycerolu je patrné, že došlo k úplnému vyčerpání glycerolu během prvních 24 hodin kultivace. Zato 1,4-butandiol byl naměřen i ve 48. hodině kultivace. Při druhé vsádce došlo k téměř úplnému vyčerpání 1,4-butandiolu již za 24 hodin, kdy byl nárůst biomasy i produkce PHA nejvyšší. V následujících dvou batch kultivacích bylo detekováno pouze minimální množství 1,4-butandiolu až při měření v 48. hodině. V pátém a šestém cyklu byl rozdíl zbytkové koncentrace 1,4-butandiolu mezi 24. a 48. hodinou téměř minimální a pohyboval se okolo 0,5 g/l. Během těchto cyklů docházelo také k malému nárůstu produkce PHA a kopolymer obsahoval převážně monomer 3HB. Na základě výsledků tohoto experimentu se zdá, že ani repeated-batch kultivace není zcela vhodný kultivační mód. Dochází k fyziologické změně

produkční kultury, kterou doprovází pokles schopnosti akumulace PHA. Bylo by určitě zajímavé v dalších experimentech objasnit podstatu fyziologické změny indukované repeated-batch kultivací, nicméně tento úkol již přesahuje tuto disertační práci.



**Obrázek 58: Koncentrace zbytkového zdroje uhlíku v g/l během repeated-batch kultivace.**

A) Koncentrace zbytkového glycerolu; B) Koncentrace zbytkového 1,4-butanediolu. Hodnoty jsou dány průměrem naměřených hodnot a chybová úsečka zobrazuje směrodatnou odchylku.

Na konci každé vsádky byla u polymeru také stanovena molekulová hmotnost (Tabulka 40). Molekulová hmotnost nebyla stanovena v šestém cyklu, kvůli nízké produkci PHA. Na konci prvního cyklu byla naměřena molekulová hmotnost 102 kDa. S každým dalším cyklem molekulová hmotnost rostla, kdy na konci pátého cyklu dosáhla téměř 180 kDa. Jedinou odchylkou bylo měření molekulové hmotnosti po třetím cyklu, molekulová hmotnost výrazně poklesla, a to dokonce pod hodnotu prvního cyklu na hodnotu 98 kDa.



**Tabulka 40: Přehled koncentrace PHA a jednotlivé zastopení monomerů v polymeru během jednotlivých vsádek repeated-batch.** Z konců jednotlivých vsádek byla u polymeru také stanovena molekulová hmotnost polymeru (Mw) a index polydisperzity (Đ).

Číslo vsádky	Čas	PHA [g/l]	3HB [mol. %]	4HB [mol. %]	Mw [kDa]	Đ
<b>1. batch</b>	48 h	0,72 ± 0,01	35,2	64,8	102,39 ± 1,83	1,31
<b>2. batch</b>	96 h	1,23 ± 0,18	10,4	89,6	159,23 ± 2,94	1,28
<b>3. batch</b>	144 h	0,44 ± 0,07	33,2	66,8	98,58 ± 2,73	1,53
<b>4. batch</b>	192 h	0,24 ± 0,01	80,7	19,3	161,89 ± 1,72	1,39
<b>5. batch</b>	240 h	0,20 ± 0,01	74,8	25,2	179,80 ± 4,56	1,43

Použitá strategie kultivace hraje důležitou roli při zefektivnění biotechnologického procesu. Fed-batch či repated-batch vykazují zvýšení produkce PHA oproti klasické vsádce, nicméně je nutná jejich optimalizace a vhodné dávkování. Během sledování batch kultivace izolátu *Aneurinibacillus* sp. H1 byl pozorován průběh tvorby kopolymeru P(3HB-co-4HB), který má hojně využití v medicínských aplikacích. Na směsi 1,4-butandiolu a glycerolu byl nejdříve tvořen čistý P(3HB) až po vyčerpání glycerolu byl tvořen kopolymer. Avšak při fed-batch kultivaci, kdy na začátku byl v médiu pouze glycerol a po 24 hodinách přidán 1,4-butandiol nedocházelo ani po 96 hodinách kultivace k tvorbě kopolymeru P(3HB-co-4HB). Fed-batch kultivace měla výrazný vliv na molekulovou hmotnost výsledného polymeru, kdy došlo k rapidnímu snížení tohoto parametru. Během repeated-batch kultivace byl nejprve testován vhodný poměr inokulace, který na základě průběhu křivek a molekulové hmotnosti výsledného polymeru byl zvolen na 30 %. Při samotné repeated-batch kultivaci, která se skládala z šesti na sebe navazujících vsádek, nedošlo k výraznému nárůstu produkce, spíše naopak. Při druhé vsádce sice stoupla produkce P(3HB-co-4HB) na 1,2 g/l, poté však s každou následující vsádkou produkce klesala až na hodnotu 0,2 g/l. Zdá se, že během cyklické repeated-batch kultivace došlo k fyziologické změně kultury, která byla spojena s nižší akumulací PHA, což je významně nežádoucí efekt. Během testování kultivačních strategií bylo zjištěno, že nejvhodnějším typem kultivace je nejspíše batch, nicméně by bylo vhodné všechny testované strategie vyzkoušet i ve větších objemech v bioreaktoru.

## 5. ZÁVĚR

Jedním z cílů předložené disertační práce bylo otestovat vybrané procesy a postupy, které by mohly výrazně snížit produkční cenu PHA. Jednou z možností je použití levného odpadního substrátu. Celosvětově se ročně vyprodukuje několik milionů tun odpadního peří pocházejícího z drůbežářského průmyslu. Tento odpad byl testován jako vstupní materiál k produkci PHA pomocí bakterií rodu *Pseudomonas*. V rámci práce byl vyvinut dvojestupňový proces valorizace odpadního peří, který je založena na využití bakterie *Pseudomonas putida* KT2440. V prvním stupni dochází k degradaci peří a nárůstu bakteriální biomasy. Poté je narostlá kultura využita k inokulaci produkčního média, které obsahuje odpadní olej. Supernatant z degradace peří je bohatý na proteínázy, především na keratinázy, a lze ho tedy považovat za zdroj těchto hodnotných enzymů. Pro produkci mcl-PHA je do produkčního média přidána kyselina oktanová o koncentraci 2 g/l po 24 hodinách kultivace. V tomto uspořádání dosahovala produkce PHA na konci dvojestupňového procesu okolo 1,2 g/l s obsahem okolo 90 mol. % 3HOc. Tento dvojestupňový proces se zdá být dobrou alternativou využití odpadního kuřecího peří.

Další možností, jak snížit cenu biotechnologického procesu, je využití extrémofilních producentů PHA. Mezi první testované extrémofily v této práci patřily halofilní bakterie. Produkce u halofilních bakterií je již částečně popsána, avšak žádná dosavadní literatura se přímo nevěnuje využití halofilních mikroorganismů k produkci PHA s využitím odpadního oleje jako substrátu. Za tímto účelem bylo otestováno devět sbírkových druhů halofilní bakterie rodu *Halomonas* (*H. halophila* CCM 3662, *H. hydrothermalis* CCM 7104, *H. axialensis* CCM 7103, *H. elongata* CCM 3756, *H. neptunia* CCM 7107, *H. organivorans* CCM 7142, *H. salina* CCM 4361, *H. meridiana* CCM 7105 a *H. halmophila* CCM 2833). Avšak významnější produkce PHA (nad 20 % hmotnosti suché biomasy) na oleji jako jediném zdroji uhlíku byly schopny pouze dvě a to *H. hydrothermalis* a *H. neptunia*. Protože tyto bakterie nejsou dostatečně prostudovány, byly optimalizovány jejich kultivační/produkční parametry.

Pro halofilní bakterie je jedním z nejdůležitějších parametrů přítomnost soli v médiu. Koncentrace chloridu sodného neovlivňuje pouze koncentraci bakteriální biomasy, ale také produkci PHA a jeho výslednou molekulovou hmotnost. Nejvhodnější koncentrace chloridu sodného pro *H. hydrothermalis* je 40 g/l, zato pro *H. neptunia* je optimální koncentrace 60 g/l. Molekulová hmotnost výsledného polymeru u bakterie *H. hydrothermalis* roste se snižující se koncentrací chloridu sodného, kdy při optimální koncentraci (40 g/l NaCl) byla molekulová hmotnost ( $M_w$ ) P(3HB) 381,7 kDa. U bakterie *H. neptunia* nebylo možné najít korelaci mezi množstvím soli a molekulovou hmotností polymeru.

Kromě optimalizace produkčních podmínek byla u halofilních bakterií také testována produkce PHA kopolymerů s využitím vhodných strukturních prekurzorů. Ani jeden kmen nebyl schopen zařadit do struktury polymeru 4HB, avšak bakterie *H. hydrothermalis* byla schopna produkce kopolymeru P(3HB-co-3HV), pokud byla jako strukturní prekurzor využita kyselina valerová. Produkce kopolymeru dosahovala koncentrace 1,6 g/l s téměř 50 mol. % zastoupení 3HV.

Významná část práce se zabývala studiem produkce PHA pomocí termofilních organismů. Produkce PHA u termofilních bakterií je jen zřídka popsána, proto jsme se zaměřili na izolaci nových termofilních producentů z přírodních vzorků jako je kompost či aktivovaný kal. Izolace termofilních producentů PHA probíhala několika způsoby. Prvním izolačním postupem bylo aerobní dynamické krmení. Jedná se o 12hodinový stále se opakující cyklus, který vede k zakoncentrování PHA produkcujících bakterií. V práci bylo vyzkoušeno více zdrojů uhlíku. Ukázalo se však, že jediným vhodným zdrojem uhlíku pro ADK vedeném v termofilním režimu (60 °C) je acetát sodný. Na konci 19. cyklu dosahoval obsah PHA v mikrobiálním konsorciu až 12 % hmotnosti suché biomasy. Z ADK byl získán izolát, který byl po sekvenaci malé ribozomální podjednotky 16S rRNA klasifikován jako *Tepidiphilus* sp. Bohužel se nepodařilo udržet jeho viabilitu pro otestování produkčního potenciálu. Proto byl pořízen sbírkový kmen *Tepidiphilus thermophilus* DSM 27220, u kterého byla testována produkce PHA. Schopnost produkovat PHA byla prokázána jak na úrovni genotypu, tak fenotypu. Avšak podle našich výsledků se nezdá, že by *Tepidiphilus thermophilus* byl biotechnologicky zajímavým producentem PHA.

V rámci práce pak byl vyvinut původní postup pro izolaci termofilních producentů PHA ze směsných mikrobiálních konsorcií. Je známo, že PHA granule pomáhají zvyšovat robustnost bakterií vůči osmotickému stresu. Tento fakt byl využit k návrhu izolační metody využívající právě změny v osmotickém tlaku. Vzorek kompostu či kalu byl smíchán s produkčním médiem. Po následné kultivaci byla kultura vystavena nejdříve hypertonickému prostředí představující roztok 100 g/l NaCl a následně byla promyta destilovanou vodou. Poté byla kultura vyseta na agarové misky PHA a pozitivní kolonie byly identifikovány pomocí ATR-FTIR. Pomocí tohoto izolačního postupu došlo k výraznému zvýšení úspěšnosti v izolaci termofilních producentů PHA. Pomocí této metody bylo z různých vhodných konsorcií získáno několik desítek izolátů, které byly následně studovány ve smyslu jejich taxonomické klasifikace i schopnosti produkce PHA s využitím různých substrátů.

Izoláty, které byly schopny opětovného růstu, byly taxonomicky zařazeny pomocí sekvenace genu *16S rRNA*. Mezi izoláty se vyskytovaly jak gram negativní, tak gram pozitivní bakterie. Také byly zastoupeny dva kmeny, a to *Proteobacteria* a ve větší míře kmen *Firmicutes*, především však třída *Bacili*. Mezi izoláty jsou v menší míře přítomni zástupci rodu *Chelatococcus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus* nebo *Geobacillus*. Ve větším zastoupení jsou poté izoláty patřící do rodu *Bacillus* a více než polovinu všech izolátů představují zástupci rodu *Aneurinibacillus*.

U izolátů byla provedena detekce přítomnosti PHA syntázy pomocí PCR. PHA syntáza je klíčový enzym v metabolismu PHA a dělí se do čtyř tříd. Čtvrtá třída PHA syntáz je charakteristická pro bakterie patřící do rodu *Bacillus*. Avšak tato třída syntáz se dělí do několika podskupin a jejich molekulární detekce s využitím PCR není díky jejich heterogenitě snadná. Proto byla navržena nová sada primerů pro detekci PHA syntázy přímo pro rod *Aneurinibacillus*. U většiny izolátů se podařilo detekovat alespoň jednu PHA syntázu. Je zajímavé, že u některých izolátů byla pozorována přítomnost PHA polymeráz spadajících do dvou tříd, nebo byla identifikována PHA polymeráza, která není charakteristická pro daný rod. Například u izolátu F106, který byl taxonomicky zařazen jako *Bacillus licheniformis* byla

detekována PHA syntáza třídy I. U izolátu A2 (*Bacillus coagulans*) byla stanovena PHA syntáza třídy II, tudíž by měl být schopen produkce mcl-PHA.

Některé z izolátů dosahovaly velmi slibné produkce PHA bez jakýchkoliv optimalizací produkčních podmínek. Například produkce PHA u izolátu 31 na glycerolu při 50 °C dosahovala 2 g/l. V rámci práce byla také testována produkce kopolymeru P(3HB-co-4HB) s využitím 1,4-butandiolu jako strukturního prekurzoru 4HB. Ukázalo se, že mnoho izolátů je schopno tvořit tento kopolymer, především pak zástupci rodu *Aneurinibacillus*. Nejlepších výsledků dosáhl izolát s označením A26, jehož biomasa dosahovala koncentrace okolo 2,6 g/l a produkce PHA se pohybovala těsně pod 2 g/l a kopolymer P(3HB-co-4HB) obsahoval 87 mol. % 4HB. Kopolymery s takto vysokým zastoupením 4HB v jednostupňové kultivaci jsou neobvyklé, ale velmi žádoucí.

Tři izoláty s označením H1, H2 a K2 byly studovány podrobněji. Taxonomicky byly zařazeny k rodu *Aneurinibacillus*. Kvůli komplexnějšímu zařazení byly izoláty zaslány do České sbírky mikroorganismů v Brně, kdy byly zařazeny i na základě fenotypových vlastností. Bylo zjištěno, že se jedná o sporulující gram pozitivní bakterie. Izolát H1 byl identifikován jako *Aneurinibacillus* sp., zbylé dva izoláty H2 a K2 byly zařazeny jako *Aneurinibacillus migulans*. U všech tří izolátů byla potvrzena PHA syntáza třídy IV, pomocí primerů navržených přímo pro rod *Aneurinibacillus*.

Pro zvýšení produkce PHA u těchto tří izolátů byly optimalizovány kultivační podmínky a produkční médium. Mezi optimalizované parametry patřily zdroje dusíku, komplexní zdroje, jejich koncentrace a kultivační teplota. Optimální teplota kultivace se pohybuje okolo 45 °C, proto se jedná spíše o mírné termofily až termotolerantní bakterie.

Také byla testována schopnost tvořit PHA kopolymery. Pro tvorbu kopolymeru s 3HV byly testovány následující prekurzory – kyselina levulová, propionát sodný, propan-1-ol a kyselina valerová. Izolát H1 byl schopen produkce kopolymeru P(3HB-co-3HV) s propionátem sodným a kyselinou valerovou. Výsledný kopolymer při použití propionátu sodného jako prekurzoru obsahoval 32 mol. % monomeru 3HV, zato při použití kyseliny valerové obsahoval téměř 67 mol. % 3HV. Schopnost tvořit kopolymer P(3HB-co-4HB) byla testována za využití 1,6-hexandiolu,  $\gamma$ -butyrolaktonu a 1,4-butandiolu jako prekurzoru, které také sloužily jako jediný zdroj uhlíku. Všechny tři izoláty byly schopny produkce žádaného kopolymeru. Nejvyšší produkce pak dosahoval izolát H1.

Na základě průběžných výsledků se izolát *Aneurinibacillus* sp. H1 jevil jako neslibnější producent PHA, proto byl u něj dále testován a rozvíjen potenciál produkce PHA. Byl proveden screening produkce PHA na různých zdrojích uhlíku, kde nejlepších výsledků dosahoval glycerol. Také byla testována vhodná koncentrace glycerolu a zároveň byl jako substrát testován i odpadní glycerol, který vzniká při výrobě bionafty a jedná se tak o levný odpadní zdroj uhlíku.

Dále také bylo u izolátu H1 rozvíjeno studium produkce materiálově zajímavého kopolymeru P(3HB-co-4HB). Jako nejvhodnější zdroj uhlíku pro produkci kopolymeru P(3HB-co-4HB) se ukázala směs glycerolu a 1,4-butandiolu. Jejich vzájemné koncentrační poměry ovlivňují složení výsledného kopolymeru, kdy v závislosti na obsahu 1,4-butandiolu v médiu

Ize kontrolovat obsah 4HB v rozmezí 4 až 95 mol. %. Tento fakt přispívá ke zvýšení konkurenceschopnosti výroby PHA pomocí izolátu H1, kdy pouhou úpravou kultivačních podmínek je možné připravovat kopolymery s různým složením monomerů, a tedy různými mechanickými vlastnostmi.

Za účelem zvýšení produkce a zlepšení biotechnologického procesu, byly také testovány různé kultivační módy. Pomocí baňkových testů byl vyzkoušen klasický mód batch kultivace, kultivace s různými typy příkrmů (fed-batch) a opakovaná vsádková kultivace (repeated-batch). Každá z těchto variant má své výhody i nevýhody. Během fed-batch kultivace bylo řešeno několik strategií příkrmu. Jednalo se převážně o varianty směsí glycerolu a 1,4-butandiolu. Je zajímavé, že pokud kultivace začínala pouze na glycerolu, nedošlo k inkorporaci 4HB do řetězce polymeru, i když byl později v médiu přítomen prekurzor 1,4-butandiol. Repeated-batch kultivace umožňuje další snížení ceny vstupních nákladů na výrobní proces. Proces byl vedený tím způsobem, že po skončení vsádky bylo odčerpáno 70 % média a bylo nahrazeno čerstvým. Tento postup byl několikrát opakován tak, že bylo uskutečněno celkem šest po sobě jdoucích batch kultivací. Bohužel opakování vsádek mělo neblahý vliv na produkci PHA, která postupně klesala a nejspíše došlo i k nežádoucím fyziologickým změnám v kultuře.

Předložená práce potvrzuje, že mezi extrémofilními mikroorganismy se vyskytuje celá řada zajímavých producentů PHA. Někteří zástupci jsou vhodnými kandidáty pro další studium případně i pro průmyslovou produkci PHA. Izolát *Aneurinibacillus* sp. H1 je podle našich výsledků slibný producent PHA kopolymerů, proto byl uložen v České sbírce mikroorganismů jako patentová kultura *Aneurinibacillus* sp. H1 CCM 8960 a produkce PHA pomocí tohoto izolátu byla patentově chráněna patentem číslo 308626.

## 6. POUŽITÉ ZKRATKY

1,4-BD	1,4-butandiol
3HB	3-hydroxybutyrát
3HHx	3-hydroxyhexanoát
3HOc	3-hydroxyoktanoát
3HV	3-hydroxyvalerát
4HB	4-hydroxybutyrát
ADK	aerobní dynamické krmení
ADK-Ac	aerobní dynamické krmení – acetát sodný
ADK-ADK	aerobní dynamické krmení – očkováno kulturou z předchozího ADK
ADK-KAL	aerobní dynamické krmení – očkováno kalem
ATR-FTIR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací s útlumem celkové odrazivosti (attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy)
CFU	počet životaschopných buněk (Colony forming units)
Đ	index polydisperzity
GBL	$\gamma$ -butyrolakton
glyc	glycerol
lcl-PHA	polyhydroxyalkanoáty s dlouhým řetězcem
M1	médium 1 (Tabulka 12)
M2	médium 2 (Tabulka 12)
mcl-PHA	polyhydroxyalkanoáty se středně dlouhým řetězcem
Mw	molekulová hmotnost
n.d.	nedetekováno
NCBI	průmyslová biotechnologie příští generace (Next Generation Industrial Biotechnology)
PHA	polyhydroxyalkanoáty
P(3HB)	poly(3-hydroxybutyrát)
P(3HB-co-4HB)	poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát)
scl-PHA	polyhydroxyalkanoáty s krátkým řetězcem
TEM	transmisní elektronový mikroskop
YE	kvasniční extrakt

## 7. LITERATURA

- [1] SUDESH, K. Bio-Based and Biodegradable Polymers. *Polyhydroxyalkanoates from Palm Oil: Biodegradable Plastics* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013, , 3-36. SpringerBriefs in Microbiology. ISBN 978-3-642-33538-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-33539-6\_2
- [2] MUHAMMADI, S., M. AFZAL a S. HAMEED. Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. *Green Chemistry Letters and Reviews* [online]. 2015, **8**(3-4), 56-77. ISSN 1751-8253. Dostupné z: doi:10.1080/17518253.2015.1109715
- [3] KUMAR, V., S. KUMAR a D. SINGH. Microbial polyhydroxyalkanoates from extreme niches: Bioprospection status, opportunities and challenges. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, **147**, 1255-1267. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.09.253
- [4] ADELEYE, A. T., Ch. K. ODOH, O. Ch. ENUDI, O. O. BANJOKO, O. O. OSIBOYE, E. TOLUWALOPE ODEDIRAN a H. LOUIS. Sustainable synthesis and applications of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from biomass. *Process Biochemistry* [online]. 2020, **96**, 174-193. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2020.05.032
- [5] ALI, I. a N. JAMIL. Polyhydroxyalkanoates: Current applications in the medical field. *Frontiers in Biology* [online]. 2016, **11**(1), 19-27. ISSN 1674-7984. Dostupné z: doi:10.1007/s11515-016-1389-z
- [6] KRUEGER, C. L., C. M. RADETSKI, A. G. BENDIA, I. M. OLIVEIRA, M. A. CASTRO-SILVA, C. R. RAMBO, R. V. ANTONIO a A. O.S. LIMA. Bioconversion of cassava starch by-product into Bacillus and related bacteria polyhydroxyalkanoates. *Electronic Journal of Biotechnology* [online]. 2012, **15**(3). ISSN 0717-3458. Dostupné z: doi:10.2225/vol15-issue3-fulltext-6
- [7] LI, Z., J. YANG a X. J. LOH. Polyhydroxyalkanoates: opening doors for a sustainable future. *NPG Asia Materials* [online]. 2016, **8**(4), 265-265. ISSN 1884-4049. Dostupné z: doi:10.1038/am.2016.48
- [8] LOO, Ch.Y. a K. SUDESH. Polyhydroxyalkanoates: Bio-based microbial plastics and their properties. *Malaysian Polymer Journal* [online]. 2007, **2**(2), 31-57.
- [9] OBRUCA, S., I. MAROVA, Z. SVOBODA a R. MIKULIKOVA. Use of controlled exogenous stress for improvement of poly(3-hydroxybutyrate) production in *Cupriavidus necator*. *Folia Microbiologica* [online]. 2010, **55**(1), 17-22. ISSN 0015-5632. Dostupné z: doi:10.1007/s12223-010-0003-z
- [10] OJUMU, T.V., J. YU a B.O. SOLOMON. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology* [online]. 2004, **3**(1), 18-24. ISSN 1684-5315. Dostupné také z: <https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/3487/1/jb04003.pdf>
- [11] KUNASUNDARI, B. a K. SUDESH. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Express Polymer Letters* [online]. 2011, **5**(7), 620-634. ISSN 1788618X. Dostupné z: doi:10.3144/expresspolymlett.2011.60
- [12] KIM, D. Y., H. W. KIM, M. G. CHUNG a Y. H. RHEE. Biosynthesis, Modification, and Biodegradation of Bacterial Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates. *The Journal of Microbiology* [online]. 2007, **45**(2), 87-97.
- [13] SUDESH, K, H ABE a Y DOI. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science* [online].

- 2000, **25**(10), 1503-1555 [cit. 2020-09-18]. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/S0079-6700(00)00035-6
- [14] BONTHRONE, K.M., J. CLAUSS, D.M. HOROWITZ, B.K. HUNTER a J.K.M. SANDERS. The biological and physical chemistry of polyhydroxyalkanoates as seen by NMR spectroscopy. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 1992, **103**(2-4), 269-277. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.1992.tb05848.x
- [15] CHEN, G.Q. a X.R. JIANG. Engineering bacteria for enhanced polyhydroxyalkanoates (PHA) biosynthesis. *Synthetic and Systems Biotechnology* [online]. 2017, **2**(3), 192-197. ISSN 2405805X. Dostupné z: doi:10.1016/j.synbio.2017.09.001
- [16] CHEN, G.Q., I. HAJNAL, H. WU, L. LV a J. YE. Engineering Biosynthesis Mechanisms for Diversifying Polyhydroxyalkanoates. *Trends in Biotechnology* [online]. 2015, **33**(10), 565-574. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2015.07.007
- [17] KESSLER, B. a B. WITHOLT. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *Journal of Biotechnology* [online]. 2001, **86**(2), 97-104. ISSN 01681656. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-1656(00)00404-1
- [18] DOI, Y., A. TAMAKI, M. KUNIOKA a K. SOGA. Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes eutrophus* from butyric and pentanoic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 1988, **28**(4-5), 330-334. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/BF00268190
- [19] WANG, Qin, Ryan C. TAPPEL, Chengjun ZHU a Christopher T. NOMURA. Development of a New Strategy for Production of Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates by Recombinant *Escherichia coli* via Inexpensive Non-Fatty Acid Feedstocks. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2011, **78**(2), 519-527 [cit. 2020-09-18]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.07020-11
- [20] WITHOLT, B. a B. KESSLER. Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 1999, **10**(3), 279-285. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/S0958-1669(99)80049-4
- [21] PRIETO, M. A., L. I. de EUGENIO, B. GALÀN, J. M. LUENGO a B. WITHOLT. Synthesis and Degradation of Polyhydroxyalkanoates. *Pseudomonas* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007, , 397-428. ISBN 978-1-4020-6096-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4020-6097-7\_14
- [22] REHM, B. H.A. a A. STEINBÜCHEL. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 1999, **25**(1-3), 3-19. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/S0141-8130(99)00010-0
- [23] ZOU, H., M. SHI, T. ZHANG, L. LI, L. LI a M. XIAN. Natural and engineered polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase: key enzyme in biopolyester production. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2017, **101**(20), 7417-7426. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-017-8485-0
- [24] MEZZOLLA, V., O. D'URSO a P. POLTRONIERI. Role of PhaC Type I and Type II Enzymes during PHA Biosynthesis. *Polymers* [online]. 2018, **10**(8). ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym10080910
- [25] WANG, L., Q. LIU, X. WU et al. Bioinformatics Analysis of Metabolism Pathways of Archaeal Energy Reserves. *Scientific Reports* [online]. 2019, **9**(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-37768-0



- [26] JENDROSSEK, D. Polyhydroxyalkanoate Granules Are Complex Subcellular Organelles (Carbonosomes). *Journal of Bacteriology* [online]. 2009, **191**(10), 3195-3202. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.01723-08
- [27] PRIETO, M. A., B. BÜHLER, K. JUNG, B. WITHOLT a B. KESSLER. PhaF, a Polyhydroxyalkanoate-Granule-Associated Protein of *Pseudomonas oleovorans* GPo1 Involved in the Regulatory Expression System for pha Genes. *Journal of Bacteriology* [online]. 1999, **181**(3), 858-868. ISSN 1098-5530. Dostupné z: doi:10.1128/JB.181.3.858-868.1999
- [28] PFEIFFER, D. a D. JENDROSSEK. PhaM Is the Physiological Activator of Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) Synthase (PhaC1) in *Ralstonia eutropha*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2014, **80**(2), 555-563. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.02935-13
- [29] KLINKE, S., G. DE ROO, B. WITHOLT a B. KESSLER. Role of phaD in Accumulation of Medium-Chain-Length Poly(3-Hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas oleovorans*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2000, **66**(9), 3705-3710. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.66.9.3705-3710.2000
- [30] CHEK, M. F., S.Y. KIM, T. MORI, H. ARSAD, M. R. SAMIAN, K. SUDESH a T. HAKOSHIMA. Structure of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase PhaC from *Chromobacterium* sp. USM2, producing biodegradable plastics. *Scientific Reports* [online]. 2017, **7**(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-05509-4
- [31] REDDY, C.S.K, R GHAI, RASHMI a V.C KALIA. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology* [online]. 2003, **87**(2), 137-146. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/S0960-8524(02)00212-2
- [32] HONG, S.H. a S.Y. LEE, S.J. PARK, ed. Polymerization of Building Blocks to Macromolecules: Polyhydroxyalkanoates as an Example. SMOLKE, Christina. *The Metabolic Pathway Engineering Handbook: Fundamentals*. 1st Edition. USA: CRC Press, 2009, 4.1-4.20. ISBN 9781439802960.
- [33] GUO, W., J. DUAN, W. GENG, J. FENG, S. WANG a C. SONG. Comparison of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates synthases from *Pseudomonas mendocina* NK-01 with the same substrate specificity. *Microbiological Research* [online]. 2013, **168**(4), 231-237. ISSN 09445013. Dostupné z: doi:10.1016/j.micres.2012.11.003
- [34] NAYAK, P. K., A. K. MOHANTY, T. GAONKAR, A. KUMAR, S. N. BHOSLE a S. GARG. Rapid Identification of Polyhydroxyalkanoate Accumulating Members of Bacillales Using Internal Primers for phaC Gene of *Bacillus megaterium*. *ISRN Bacteriology* [online]. 2013, **2013**, 1-12. ISSN 2314-6273. Dostupné z: doi:10.1155/2013/562014
- [35] MESQUITA, D. P., A. L. AMARAL, C. LEAL, A. OEHMEN, M. A.M. REIS a E. C. FERREIRA. Polyhydroxyalkanoate granules quantification in mixed microbial cultures using image analysis: Sudan Black B versus Nile Blue A staining. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2015, **865**, 8-15. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2015.01.018
- [36] OSTLE, A. G. a J. G. HOLT. Nile blue A as a fluorescent stain for poly-beta-hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1982, **44**(1), 238-241. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.44.1.238-241.1982
- [37] SPIEKERMANN, P., B.H. A. REHM, R. KALSCHUEUR, D. BAUMEISTER a A. STEINBÜCHEL. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage

- compounds. *Archives of Microbiology* [online]. 1999, **171**(2), 73-80. ISSN 0302-8933. Dostupné z: doi:10.1007/s002030050681
- [38] LEGAT, A., C. GRUBER, K. ZANGGER, G. WANNER a H. STAN-LOTTER. Identification of polyhydroxyalkanoates in *Halococcus* and other haloarchaeal species. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2010, **87**(3), 1119-1127. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-010-2611-6
- [39] ARCOS-HERNANDEZ, M. V., N. GURIEFF, S. PRATT, P. MAGNUSSON, A. WERKER, A. VARGAS a P. LANT. Rapid quantification of intracellular PHA using infrared spectroscopy: An application in mixed cultures. *Journal of Biotechnology* [online]. 2010, **150**(3), 372-379. ISSN 01681656. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiotec.2010.09.939
- [40] BOUYANFIF, A., S. LIYANAGE, E. HEQUET, Na. MOUSTAID-MOUSSA a N. ABIDI. Review of FTIR microspectroscopy applications to investigate biochemical changes in *C. elegans*. *Vibrational Spectroscopy* [online]. 2018, **96**, 74-82. ISSN 09242031. Dostupné z: doi:10.1016/j.vibspec.2018.03.001
- [41] SHAMALA, T. R., M. S. DIVYASHREE, R. DAVIS, K. S. L. KUMARI, S. V. N. VIJAYENDRA a B. RAJ. Production and characterization of bacterial polyhydroxyalkanoate copolymers and evaluation of their blends by fourier transform infrared spectroscopy and scanning electron microscopy. *Indian Journal of Microbiology* [online]. 2009, **49**(3), 251-258. ISSN 0046-8991. Dostupné z: doi:10.1007/s12088-009-0031-z
- [42] BUMBRAH, G. S. a R. M. SHARMA. Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. *Egyptian Journal of Forensic Sciences* [online]. 2016, **6**(3), 209-215. ISSN 2090536X. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejfs.2015.06.001
- [43] SAMEK, O., S. OBRUČA, M. ŠILER et al. Quantitative Raman Spectroscopy Analysis of Polyhydroxyalkanoates Produced by *Cupriavidus necator* H16. *Sensors* [online]. 2016, **16**(11). ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s16111808
- [44] TAO, Z., L. PENG, P. ZHANG, Y.Q. LI a G. WANG. Probing the Kinetic Anabolism of Poly-Beta-Hydroxybutyrate in *Cupriavidus necator* H16 Using Single-Cell Raman Spectroscopy. *Sensors* [online]. 2016, **16**(8). ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s16081257
- [45] KOLLER, M. a A. RODRÍGUEZ-CONTRERAS. Techniques for tracing PHA-producing organisms and for qualitative and quantitative analysis of intra- and extracellular PHA. *Engineering in Life Sciences* [online]. 2015, **15**(6), 558-581. ISSN 16180240. Dostupné z: doi:10.1002/elsc.201400228
- [46] CASELLA, S., L. FAVARO a M. BASAGLIA. Bacterial Genetic Modifications for Improving Polyhydroxyalkanoates Production from Inexpensive Carbon Sources. KOLLER, Martin, ed. *Recent Advances in Biotechnology* [online]. BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, 2016, s. 380-435. ISBN 9781681083254. Dostupné z: doi:10.2174/9781681083254116010010
- [47] BROWN, T. Southern Blotting. *Current Protocols in Immunology* [online]. 2001, **6**(1). ISSN 1934-3671. Dostupné z: doi:10.1002/0471142735.im1006as06
- [48] TIMM, A., S. WIESE a A. STEINBÜCHEL. A general method for identification of polyhydroxyalkanoic acid synthase genes from pseudomonads belonging to the rRNA homology group I. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 1994, **40**(5), 669-675. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/BF00173327

- [49] NIKIFOROVA, M. N. a E. NIKIFOROV. Molecular Anatomic Pathology. *Diagnostic Immunohistochemistry* [online]. Elsevier, 2011, , 42-57. ISBN 9781416057666. Dostupné z: doi:10.1016/B978-1-4160-5766-6.00006-6
- [50] SNUSTAD, D.P. a M.J. SIMMONS. Metody molekulární genetiky. *Genetika*. 2. Brno: Masarykova Universita, 2017, s. 352-375. ISBN 978-80-210-8613-5.
- [51] SOLAIMAN, D. K. Y. a R. D. ASHBY. Rapid Genetic Characterization of Poly(hydroxyalkanoate) Synthase and Its Applications †. *Biomacromolecules* [online]. 2005, **6**(2), 532-537. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm0493640
- [52] REVELO ROMO, D. M., M. V. GROSSO, N. C. MORENO SOLANO a D. MONTOYA CASTANO. A most effective method for selecting a broad range of short and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate producing microorganisms. *Electronic Journal of Biotechnology* [online]. 2007, **10**(3), 0-0. ISSN 07173458. Dostupné z: doi:10.2225/vol10-issue3-fulltext-13
- [53] AMELIA, T.S. M., A.A. A. AMIRUL a K. BHUBALAN. Data on partial polyhydroxyalkanoate synthase genes (phaC) mined from Aaptos aaptos marine sponge-associated bacteria metagenome. *Data in Brief* [online]. 2018, **16**, 75-80. ISSN 23523409. Dostupné z: doi:10.1016/j.dib.2017.11.011
- [54] SHEU, D.S., Y.T. WANG a Ch.Y. LEE. Rapid detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR. *Microbiology* [online]. 2000, **146**(8), 2019-2025. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi:10.1099/00221287-146-8-2019
- [55] HAN, J., J. HOU, H. LIU, S. CAI, B. FENG, J. ZHOU a H. XIANG. Wide Distribution among Halophilic Archaea of a Novel Polyhydroxyalkanoate Synthase Subtype with Homology to Bacterial Type III Synthases. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2010, **76**(23), 7811-7819. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.01117-10
- [56] MUANGSUWAN, W., P. RUANGSUJ, P. CHAICHANACHAICHARN a M. YASAWONG. A novel nucleic lateral flow assay for screening of PHA-producing haloarchaea. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2015, **116**, 8-14. ISSN 01677012. Dostupné z: doi:10.1016/j.mimet.2015.06.012
- [57] LANE, C. E. a M G. BENTON. Detection of the enzymatically-active polyhydroxyalkanoate synthase subunit gene, phaC, in cyanobacteria via colony PCR. *Molecular and Cellular Probes* [online]. 2015, **29**(6), 454-460. ISSN 08908508. Dostupné z: doi:10.1016/j.mcp.2015.07.001
- [58] CIBICHAKRAVARTHY, B., S. ABINAYA a S. R. PRABAGARAN. Syntrophic association of termite gut bacterial symbionts with bifunctional characteristics of cellulose degrading and polyhydroxyalkanoate producing bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2017, **103**, 613-620. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.05.100
- [59] LI, H., S. ZHOU, T. JOHNSON et al. Genome Structure of Bacillus cereus tsu1 and Genes Involved in Cellulose Degradation and Poly-3-Hydroxybutyrate Synthesis. *International Journal of Polymer Science* [online]. 2017, **2017**, 1-12. ISSN 1687-9422. Dostupné z: doi:10.1155/2017/6192924
- [60] DE RIJK, T. C., P. VAN DE MEER, G. EGGINK a R. A. WEUSTHUIS. Methods for Analysis of Poly(3-hydroxyalkanoate) (PHA) Composition. *Biopolymers: Polyesters. II Properties and Chemical Synthesis* [online]. 2005, **3**, 1-12.

- [61] GARCÍA-TORREIRO, M., M. LÓPEZ-ABELAIRAS, T. A. LU-CHAU a J.M. LEMA. Application of flow cytometry for monitoring the production of poly(3-hydroxybutyrate) by *Halomonas boliviensis*. *Biotechnology Progress* [online]. 2017, **33**(2), 276-284. ISSN 87567938. Dostupné z: doi:10.1002/btpr.2373
- [62] ALVES, L.P.S., A.T. ALMEIDA, L.M. CRUZ, F.O. PEDROSA, E.M. DE SOUZA, L.S. CHUBATSU, M. MÜLLER-SANTOS a G. VALDAMERI. A simple and efficient method for poly-3-hydroxybutyrate quantification in diazotrophic bacteria within 5 minutes using flow cytometry. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* [online]. 2017, **50**(1) [cit. 2020-10-19]. ISSN 1414-431X. Dostupné z: doi:10.1590/1414-431x20165492
- [63] ROTHSCCHILD, L. J. a R. L. MANCINELLI. Life in extreme environments. *Nature* [online]. 2001, **409**(6823), 1092-1101. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/35059215
- [64] PERSIDIS, Aris. Extremophiles. *Nature Biotechnology* [online]. 1998, **16**(6), 593-594 [cit. 2020-10-19]. ISSN 1087-0156. Dostupné z: doi:10.1038/nbt0698-593
- [65] NEE, S. Introducing the extremophiles. *Nature* [online]. 2007, **448**(7152), 413-414. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/448413a
- [66] BOSMA, E.F. Isolation and screening of thermophilic bacilli from compost for electrotransformation and fermentation: Characterization of *Bacillus smithii* ET 138 as a new biocatalyst. *Isolation, characterization and engineering of Bacillus smithii : a novel thermophilic platform organism for green chemical production*. 1st Edition. 2015: Wageningen University, 2015, s. 57-84. ISBN 9789462575073 - 220.
- [67] TAYLOR, M. P., L. VAN ZYL, M. TUFFIN a D. COWAN. Extremophiles and Biotechnology: How Far Have We Come?. *Extremophiles: Microbiology and Biotechnology*. 1. USA: Caister Academic Press, 2012, s. 1-24. ISBN 978-1-912530-54-0.
- [68] COKER, J. A. Extremophiles and biotechnology: current uses and prospects. *F1000Research* [online]. 2016, **5**. ISSN 2046-1402. Dostupné z: doi:10.12688/f1000research.7432.1
- [69] OBRUCA, S., P. SEDLACEK, M. KOLLER, D. KUCERA a I. PERNICOVA. Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. *Biotechnology Advances* [online]. 2018, **36**(3), 856-870. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2017.12.006
- [70] CHEN, G.Q. a X.R. JIANG. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2018, **50**, 94-100. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2017.11.016
- [71] MITRA, Ruchira, Tong XU, Hua XIANG a Jing HAN. Current developments on polyhydroxyalkanoates synthesis by using halophiles as a promising cell factory. *Microbial Cell Factories* [online]. 2020, **19**(1) [cit. 2020-10-20]. ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/s12934-020-01342-z
- [72] KOLLER, M., P. HESSE, R. BONA, Ch. KUTSCHERA, A. ATLIć a G. BRAUNEGG. Potential of Various Archae- and Eubacterial Strains as Industrial Polyhydroxyalkanoate Producers from Whey. *Macromolecular Bioscience* [online]. 2007, **7**(2), 218-226. ISSN 16165187. Dostupné z: doi:10.1002/mabi.200600211
- [73] KOLLER, M. Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters by Extremophiles?. *MOJ Polymer Science* [online]. 2017, **1**(2). ISSN 25749773. Dostupné z: doi:10.15406/mojps.2017.01.00011

- [74] KUCERA, D., I. PERNICOVÁ, A. KOVALCIK et al. Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*. *Bioresource Technology* [online]. 2018, **256**, 552-556. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2018.02.062
- [75] GUZMÁN, H., D. VAN-THUOC, J. MARTÍN, R. HATTI-KAUL a J. QUILLAGUAMÁN. A process for the production of ectoine and poly(3-hydroxybutyrate) by *Halomonas boliviensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2009, **84**(6), 1069-1077. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-009-2036-2
- [76] TAN, D., Q. WU, J.Ch. CHEN a G.Q. CHEN. Engineering *Halomonas* TD01 for the low-cost production of polyhydroxyalkanoates. *Metabolic Engineering* [online]. 2014, **26**, 34-47. ISSN 10967176. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymben.2014.09.001
- [77] SALGAONKAR, B.B., K. MANI a J.M. BRAGANCA. Characterization of polyhydroxyalkanoates accumulated by a moderately halophilic salt pan isolate *Bacillus megaterium* strain H16. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2013, **114**(5), 1347-1356. ISSN 13645072. Dostupné z: doi:10.1111/jam.12135
- [78] HUU PHONG, T., D. VAN THUOC a K. SUDESH. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymers by *Yangia* sp. ND199 from different carbon sources. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2016, **84**, 361-366 [cit. 2020-10-22]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.12.037
- [79] SALGAONKAR, B. B. a J. M. BRAGANÇA. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co -3-hydroxyvalerate) by *Haloferax borinquense* strain E3. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2015, **78**, 339-346. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.04.016
- [80] KOLLER, M. Recycling of Waste Streams of the Biotechnological Poly(hydroxyalkanoate) Production by *Haloferax mediterranei* on Whey. *International Journal of Polymer Science* [online]. 2015, **2015**, 1-8. ISSN 1687-9422. Dostupné z: doi:10.1155/2015/370164
- [81] MIYAKE, M., M. ERATA a Y. ASADA. A thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus* sp. MA19, capable of accumulating poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. *Journal of Fermentation and Bioengineering* [online]. 1996, **82**(5), 512-514. ISSN 0922338X. Dostupné z: doi:10.1016/S0922-338X(97)86995-4
- [82] PANTAZAKI, A. A., M. G. TAMBAKA, V. LANGLOIS, P. GUERIN a D. A. KYRIAKIDIS. Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis in *Thermus thermophilus*: Purification and biochemical properties of PHA synthase. *Molecular and Cellular Biochemistry* [online]. 2003, **254**(12), 173-183. ISSN 03008177. Dostupné z: doi:10.1023/A:1027373100955
- [83] XU, F., S. HUANG, Y. LIU, Y. ZHANG a S. CHEN. Comparative study on the production of poly(3-hydroxybutyrate) by thermophilic *Chelatococcus daeguensis* TAD1: a good candidate for large-scale production. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2014, **98**(9), 3965-3974. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-014-5524-y
- [84] IBRAHIM, M. H. A. a A. STEINBUCHER. High-Cell-Density Cyclic Fed-Batch Fermentation of a Poly(3-Hydroxybutyrate)-Accumulating Thermophile, *Chelatococcus* sp. Strain MW10. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2010, **76**(23), 7890-7895. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.01488-10
- [85] LIU, Y., S. HUANG, Y. ZHANG a F. XU. Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus shackletonii* K5 from a biotrickling filter for the production of

- polyhydroxybutyrate. *Journal of Environmental Sciences* [online]. 2014, **26**(7), 1453-1462. ISSN 10010742. Dostupné z: doi:10.1016/j.jes.2014.05.011
- [86] SHEU, D.-S., W.-M. CHEN, Y.-W. LAI a R.-C. CHANG. Mutations Derived from the Thermophilic Polyhydroxyalkanoate Synthase PhaC Enhance the Thermostability and Activity of PhaC from *Cupriavidus necator* H16. *Journal of Bacteriology* [online]. 2012, **194**(10), 2620-2629. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.06543-11
- [87] SATOH, Y., K. TAJIMA, S. NAKAMOTO et al. Isolation of a thermotolerant bacterium producing medium-chain-length polyhydroxyalkanoate. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2011, **111**(4), 811-817 [cit. 2020-10-19]. ISSN 13645072. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05093.x
- [88] SAMROT, A., M. BHAKYALAKSHMI, K. L. VENKATRAMAN, K. SAHITI, S.A. PHILIP, T. JAHNAVI a P. SENTHILKUMAR. Optimization and Characterization of Poly[R]hydroxyalkanoates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosciences, Biotechnology Research Asia* [online]. 2015, **12**(3), 2133-2138. ISSN 09731245. Dostupné z: doi:10.13005/bbra/1883
- [89] SATOH, H., Y. IWAMOTO, T. MINO a T. MATSUO. Activated sludge as a possible source of biodegradable plastic. *Water Science and Technology* [online]. 1998, **38**(2), 103-109. ISSN 0273-1223. Dostupné z: doi:10.1016/S0273-1223(98)00435-1
- [90] DIAS, J. M. L., P. C. LEMOS, L. S. SERAFIM et al. Recent Advances in Polyhydroxyalkanoate Production by Mixed Aerobic Cultures: From the Substrate to the Final Product. *Macromolecular Bioscience* [online]. 2006, **6**(11), 885-906. ISSN 16165187. Dostupné z: doi:10.1002/mabi.200600112
- [91] KOURMENTZA, C., J. PLÁCIDO, N. VENETSANEAS, A. BURNIOL-FIGOLS, C. VARRONE, H. N. GAVALA a M. A. M. REIS. Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. *Bioengineering* [online]. 2017, **4**(4). ISSN 2306-5354. Dostupné z: doi:10.3390/bioengineering4020055
- [92] HUANG, L., Z. CHEN, Q. WEN, L. ZHAO, D.J. LEE, L. YANG a Y. WANG. Insights into Feast-Famine polyhydroxyalkanoate (PHA)-producer selection: Microbial community succession, relationships with system function and underlying driving forces. *Water Research* [online]. 2018, **131**, 167-176. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2017.12.033
- [93] WIJEYEKOON, S., C. R. CARERE, M. WEST, S. NATH a D. GAPES. Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis from nutrient rich wet oxidation liquors. *Water Research* [online]. 2018, **140**, 1-11. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2018.04.017
- [94] SERAFIM, L. S., P. C. LEMOS, R. OLIVEIRA a M. A.M. REIS. Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 2004, **87**(2), 145-160. ISSN 0006-3592. Dostupné z: doi:10.1002/bit.20085
- [95] DIONISI, D., M. MAJONE, V. TANDOI a M. BECCARI. Sequencing batch reactor: influence of periodic operation on physiological state, microbial composition and performance of activated sludge in biological wastewater treatment. *Industrial & Engineering Chemistry Research* [online]. **40**, 5110-5119.
- [96] HUANG, L., Z. CHEN, Q. WEN a D.J. LEE. Enhanced polyhydroxyalkanoate production by mixed microbial culture with extended cultivation strategy. *Bioresource Technology* [online]. 2017, **241**, 802-811. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2017.05.192

- [97] VALENTINO, F., F. MORGAN-SAGASTUME, S. CAMPANARI, M. VILLANO, A. WERKER a M. MAJONE. Carbon recovery from wastewater through bioconversion into biodegradable polymers. *New Biotechnology* [online]. 2017, **37**, 9-23. ISSN 18716784. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbt.2016.05.007
- [98] GOBI, K. a V.M. VADIVELU. Aerobic dynamic feeding as a strategy for in situ accumulation of polyhydroxyalkanoate in aerobic granules. *Bioresource Technology* [online]. 2014, **161**, 441-445. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2014.03.104
- [99] CHANASIT, W., B. HODGSON, K. SUDESH a K. UMSAKUL. Efficient production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from *Pseudomonas mendocina* PSU using a biodiesel liquid waste (BLW) as the sole carbon source. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* [online]. 2016, **80**(7), 1440-1450. ISSN 0916-8451. Dostupné z: doi:10.1080/09168451.2016.1158628
- [100] YU, P.H.F., H. CHUA, A.L HUANG, W.H. LO a K.P. HO. Transformation of industrial food wastes into polyhydroxyalkanoates. *Water Science and Technology* [online]. 1999, **40**(1), 365-370. ISSN 0273-1223. Dostupné z: doi:10.1016/S0273-1223(99)00402-3
- [101] NIELSEN, Ch., A. RAHMAN, A.U. REHMAN, M. K. WALSH a Ch. D. MILLER. Food waste conversion to microbial polyhydroxyalkanoates. *Microbial Biotechnology* [online]. 2017, **10**(6), 1338-1352. ISSN 1751-7915. Dostupné z: doi:10.1111/1751-7915.12776
- [102] MOHD FADZIL, F. I. a T. TSUGE. Microbial Production of Polyhydroxyalkanoates From Plant Oils: Renewability and Biodegradability. *Encyclopedia of Renewable and Sustainable Materials* [online]. Elsevier, 2020, s. 148-159. ISBN 9780128131961. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-803581-8.11425-0
- [103] KAMILAH, H., A. AL-GHEETHI, T.A. YANG a K. SUDESH. The Use of Palm Oil-Based Waste Cooking Oil to Enhance the Production of Polyhydroxybutyrate [P(3HB)] by *Cupriavidus necator* H16 Strain. *Arabian Journal for Science and Engineering* [online]. 2018, **43**(7), 3453-3463. ISSN 2193-567X. Dostupné z: doi:10.1007/s13369-018-3118-1
- [104] VERLINDEN, R.A.J., D. J. HILL, M. A. KENWARD, C. D. WILLIAMS, Z. PIOTROWSKA-SEGET a I. K. RADECKA. Production of polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by *Cupriavidus necator*. *AMB Express* [online]. 2011, **1**(1). ISSN 2191-0855. Dostupné z: doi:10.1186/2191-0855-1-11
- [105] SURENDRAN, A., M. LAKSHMANAN, J. Y. CHEE, A. M. SULAIMAN, D. V. THUOC a K. SUDESH. Can Polyhydroxyalkanoates Be Produced Efficiently From Waste Plant and Animal Oils?. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. 2020, **8**. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2020.00169
- [106] LLIGADAS, G., J. C. RONDA, M. GALIà a V. CÁDIZ. Renewable polymeric materials from vegetable oils a perspective. *Materials Today* [online]. 2013, **16**(9), 337-343. ISSN 13697021. Dostupné z: doi:10.1016/j.mattod.2013.08.016
- [107] KOURMENTZA, C., J. COSTA, Z. AZEVEDO, C. SERVIN, C. GRANDFILS, V. DE FREITAS a M.A.M. REIS. *Burkholderia thailandensis* as a microbial cell factory for the bioconversion of used cooking oil to polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids. *Bioresource Technology* [online]. 2018, **247**, 829-837. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2017.09.138
- [108] OBRUCA, S., I. MAROVA, O. SNAJDAR, L. MRAVCOVA a Z. SVOBODA. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator*

- from waste rapeseed oil using propanol as a precursor of 3-hydroxyvalerate. *Biotechnology Letters* [online]. 2010, **32**(12), 1925-1932. ISSN 0141-5492. Dostupné z: doi:10.1007/s10529-010-0376-8
- [109] MOŻEJKO, J., G. PRZYBYŁEK a S. CIESIELSKI. Waste rapeseed oil as a substrate for medium-chain-length polyhydroxyalkanoates production. *European Journal of Lipid Science and Technology* [online]. 2011, **113**(12), 1550-1557. ISSN 14387697. Dostupné z: doi:10.1002/ejlt.201100148
- [110] VAN THUOC, D., D. N. MY, T. T. LOAN a K. SUDESH. Utilization of waste fish oil and glycerol as carbon sources for polyhydroxyalkanoate production by *Salinivibrio* sp. M318. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2019, **141**, 885-892. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.09.063
- [111] RIEDEL, S. L., S. JAHNS, S. KOENIG, M. C.E. BOCK, Ch. J. BRIGHAM, J. BADER a U. STAHL. Polyhydroxyalkanoates production with *Ralstonia eutropha* from low quality waste animal fats. *Journal of Biotechnology* [online]. 2015, **214**, 119-127. ISSN 01681656. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiotec.2015.09.002
- [112] FAGBEMI, O. D., B. SITHOLE a T. TESFAYE. Optimization of keratin protein extraction from waste chicken feathers using hybrid pre-treatment techniques. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* [online]. 2020, **17**. ISSN 23525541. Dostupné z: doi:10.1016/j.scp.2020.100267
- [113] ALAHYARIBEIK, S., S. D. SHARIFI, F. TABANDEH, S. HONARBAKHSH a S. GHAZANFARI. Bioconversion of chicken feather wastes by keratinolytic bacteria. *Process Safety and Environmental Protection* [online]. 2020, **135**, 171-178. ISSN 09575820. Dostupné z: doi:10.1016/j.psep.2020.01.014
- [114] BENESOVA, P., D. KUCERA, I. MAROVA a S. OBRUCA. Chicken feather hydrolysate as an inexpensive complex nitrogen source for PHA production by *Cupriavidus necator* on waste frying oils. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 2017, **65**(2), 182-188. ISSN 02668254. Dostupné z: doi:10.1111/lam.12762
- [115] KOLLER, M., D. SANDHOLZER, A. SALERNO, G. BRAUNEGG a M. NARODOSLAWSKY. Biopolymer from industrial residues: Life cycle assessment of poly(hydroxyalkanoates) from whey. *Resources, Conservation and Recycling* [online]. 2013, **73**, 64-71. ISSN 09213449. Dostupné z: doi:10.1016/j.resconrec.2013.01.017
- [116] AMARO, T. M. M. M., D. ROSA, G. COMI a L. IACUMIN. Prospects for the Use of Whey for Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2019, **10**. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2019.00992
- [117] NIKODINOVIC-RUNIC, J., M. GUZIK, S. T. KENNY, R. BABU, A. WERKER a K. E. O CONNOR. *Carbon-Rich Wastes as Feedstocks for Biodegradable Polymer (Polyhydroxyalkanoate) Production Using Bacteria* [online]. Elsevier, 2013, s. 139-200. *Advances in Applied Microbiology*. ISBN 9780124076730. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-407673-0.00004-7
- [118] GIROTTO, F., L. ALIBARDI a R. COSSU. Food waste generation and industrial uses: A review. *Waste Management* [online]. 2015, **45**, 32-41. ISSN 0956053X. Dostupné z: doi:10.1016/j.wasman.2015.06.008
- [119] KOLLER, M., R. BONA, G. BRAUNEGG et al. Production of Polyhydroxyalkanoates from Agricultural Waste and Surplus Materials †. *Biomacromolecules* [online]. 2005, **6**(2), 561-565. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm049478b
- [120] AHN, W. S., S. J. PARK a S. Y. LEE. Production of Poly(3-Hydroxybutyrate) by Fed-Batch Culture of Recombinant *Escherichia coli* with a Highly Concentrated Whey



- Solution. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2000, **66**(8), 3624-3627. ISSN 1098-5336. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.66.8.3624-3627.2000
- [121] PANTAZAKI, A. A., Chr. P. PAPANEOPHYTOU, A. G. PRITSA, M. LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES a D. A. KYRIAKIDIS. Production of polyhydroxyalkanoates from whey by *Thermus thermophilus* HB8. *Process Biochemistry* [online]. 2009, **44**(8), 847-853. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2009.04.002
- [122] POVOLO, S., P. TOFFANO, M. BASAGLIA a S. CASELLA. Polyhydroxyalkanoates production by engineered *Cupriavidus necator* from waste material containing lactose. *Bioresource Technology* [online]. 2010, **101**(20), 7902-7907. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2010.05.029
- [123] COLOMBO, B., T. PEPÈ SCIARRIA, M. REIS, B. SCAGLIA a F. ADANI. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from fermented cheese whey by using a mixed microbial culture. *Bioresource Technology* [online]. 2016, **218**, 692-699. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2016.07.024
- [124] KIM, B. S. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2000, **27**(10), 774-777. ISSN 01410229. Dostupné z: doi:10.1016/S0141-0229(00)00299-4
- [125] SHEU, D.S., W.M. CHEN, J.Y. YANG a R.C. CHANG. Thermophilic bacterium *Caldimonas taiwanensis* produces poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from starch and valerate as carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2009, **44**(5), 289-294. ISSN 01410229. Dostupné z: doi:10.1016/j.enzmictec.2009.01.004
- [126] CHOI, I. S., S. H. KO, H. M. KIM et al. Coffee residue as a valorization bio-agent for shelf-life extension of lactic acid bacteria under cryopreservation. *Waste Management* [online]. 2020, **118**, 585-590. ISSN 0956053X. Dostupné z: doi:10.1016/j.wasman.2020.09.025
- [127] OBRUCA, S., S. PETRIK, P. BENESOVA, Z. SVOBODA, L. EREMKA a I. MAROVA. Utilization of oil extracted from spent coffee grounds for sustainable production of polyhydroxyalkanoates. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2014, **98**(13), 5883-5890. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-014-5653-3
- [128] OBRUCA, S., P. BENESOVA, S. PETRIK, J. OBORNA, R. PRIKRYL a I. MAROVA. Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolysate of spent coffee grounds. *Process Biochemistry* [online]. 2014, **49**(9), 1409-1414. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2014.05.013
- [129] AL-BATTASHI, H. S., N. ANNAMALAI, N. SIVAKUMAR, S. AL-BAHRY, B.N. TRIPATHI, Q. D. NGUYEN a V. K. GUPTA. Lignocellulosic biomass (LCB): a potential alternative biorefinery feedstock for polyhydroxyalkanoates production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* [online]. 2019, **18**(1), 183-205. ISSN 1569-1705. Dostupné z: doi:10.1007/s11157-018-09488-4
- [130] SINDHU, R., N. SILVIYA, P. BINOD a A. PANDEY. Pentose-rich hydrolysate from acid pretreated rice straw as a carbon source for the production of poly-3-hydroxybutyrate. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2013, **78**, 67-72. ISSN 1369703X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2012.12.015
- [131] VAN-THUOC, D., J. QUILLAGUAMÁN, G. MAMO a B. MATTIASSON. Utilization of agricultural residues for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2007, **0**(0). ISSN 1364-5072. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03553.x

- [132] CESÁRIO, M. T., R. S. RAPOSO, M. C. M.D. DE ALMEIDA, F. VAN KEULEN, B. S. FERREIRA a M. M. R. DA FONSECA. Enhanced bioproduction of poly-3-hydroxybutyrate from wheat straw lignocellulosic hydrolysates. *New Biotechnology* [online]. 2014, **31**(1), 104-113. ISSN 18716784. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbt.2013.10.004
- [133] KUHN, J., H. MÜLLER, D. SALZIG a P. CZERMAK. A rapid method for an offline glycerol determination during microbial fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology* [online]. 2015, **18**(3), 252-255. ISSN 07173458. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejbt.2015.01.005
- [134] EDWARDS, K. J., M. E. KAUFMANN a N. A. SAUNDERS. Rapid and Accurate Identification of Coagulase-Negative Staphylococci by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2001, **39**(9), 3047-3051. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.39.9.3047-3051.2001
- [135] RAI, R., T. KESHAVARZ, J.A. ROETHER, A.R. BOCCACCINI a I. ROY. Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. *Materials Science and Engineering: R: Reports* [online]. 2011, **72**(3), 29-47. ISSN 0927796X. Dostupné z: doi:10.1016/j.mser.2010.11.002
- [136] ZHENG, Y., J.Ch. CHEN, Y.M. MA a G.Q. CHEN. Engineering biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) for diversity and cost reduction. *Metabolic Engineering* [online]. 2020, **58**, 82-93. ISSN 10967176. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymben.2019.07.004
- [137] SHEKHAR SK, J. G. *Biodegradation of Keratin from Chicken Feathers by Fungal Species as a Means of Sustainable Development* [online]. 2014, **05**(05). ISSN 21556199. Dostupné z: doi:10.4172/2155-6199.1000232
- [138] QUILLAGUAMÁN, J., H. GUZMÁN, D. VAN-THUOC a R. HATTI-KAUL. Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2010, **85**(6), 1687-1696. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-009-2397-6
- [139] SEDLACEK, P., E. SLANINOVA, M. KOLLER, J. NEBESAROVA, I. MAROVA, V. KRZYZANEK a S. OBRUCA. PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances. *New Biotechnology* [online]. 2019, **49**, 129-136. ISSN 18716784. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbt.2018.10.005
- [140] ALSAFADI, D. a 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 Biotechnology* [online]. 2017, **34**, 47-53. ISSN 18716784. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbt.2016.05.003
- [141] CHEN, C. W., T.M. DON a H.F. YEN. Enzymatic extruded starch as a carbon source for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. *Process Biochemistry* [online]. 2006, **41**(11), 2289-2296. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2006.05.026
- [142] HUANG, T.Y., K.J. DUAN, S.Y. HUANG a C. W. CHEN. Production of polyhydroxyalkanoates from inexpensive extruded rice bran and starch by *Haloferax mediterranei*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [online]. 2006, **33**(8), 701-706. ISSN 1367-5435. Dostupné z: doi:10.1007/s10295-006-0098-z
- [143] SALGAONKAR, B. B. a J. M. BRAGANÇA. Utilization of Sugarcane Bagasse by *Halogeometricum borinquense* Strain E3 for Biosynthesis of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Bioengineering* [online]. 2017, **4**(4), 1-18. ISSN 2306-5354. Dostupné z: doi:10.3390/bioengineering4020050

- [144] SIMON-COLIN, C., G. RAGUÉNÈS, J. COZIEN a J.G. GUEZENNEC. Halomonas profundus sp. nov., a new PHA-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent shrimp. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2008, **104**(5), 1425-1432. ISSN 1364-5072. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03667.x
- [145] REN, Y., Ch. LING, I. HAJNAL, Q. WU a G.Q. CHEN. Construction of Halomonas bluephagenesis capable of high cell density growth for efficient PHA production. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2018, **102**(10), 4499-4510. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-018-8931-7
- [146] SHEN, R., Z.Y. NING, Y.X. LAN, J.Ch. CHEN a G.Q. CHEN. Manipulation of polyhydroxyalkanoate granular sizes in Halomonas bluephagenesis. *Metabolic Engineering* [online]. 2019, **54**, 117-126. ISSN 10967176. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymben.2019.03.011
- [147] RIVERA-TERCEROS, P., E. TITO-CLAROS, S. TORRICO, S. CARBALLO, D. VAN-THUOC a J. QUILLAGUAMÁN. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by Halomonas boliviensis in an air-lift reactor. *Journal of Biological Research-Thessaloniki* [online]. 2015, **22**(1). ISSN 2241-5793. Dostupné z: doi:10.1186/s40709-015-0031-6
- [148] KULKARNI, S.O., P.P. KANEKAR, S.S. NILEGAONKAR, S.S. SARNAIK a J.P. JOG. Production and characterization of a biodegradable poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHB-co-PHV) copolymer by moderately haloalkalitolerant Halomonas campisalis MCM B-1027 isolated from Lonar Lake, India. *Bioresource Technology* [online]. 2010, **101**(24), 9765-9771. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2010.07.089
- [149] CERVANTES-UC, J.M., J. CATZIN, I. VARGAS, W. HERRERA-KAO, F. MOGUEL, E. RAMIREZ, S. RINCÓN-ARRIAGA a G. LIZAMA-UC. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates produced by an extreme halophilic bacterium, Halomonas nitroreducens, isolated from hypersaline ponds. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2014, **117**(4), 1056-1065. ISSN 13645072. Dostupné z: doi:10.1111/jam.12605
- [150] CIESIELSKI, S., J. MOŻEJKO a N. PISUTPAISAL. Plant oils as promising substrates for polyhydroxyalkanoates production. *Journal of Cleaner Production* [online]. 2015, **106**, 408-421. ISSN 09596526. Dostupné z: doi:10.1016/j.jclepro.2014.09.040
- [151] OBRUCA, S., O. SNAJDAR, Z. SVOBODA a I. MAROVA. Application of random mutagenesis to enhance the production of polyhydroxyalkanoates by Cupriavidus necator H16 on waste frying oil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2013, **29**(12), 2417-2428. ISSN 0959-3993. Dostupné z: doi:10.1007/s11274-013-1410-5
- [152] RODRÍGUEZ-CONTRERAS, Al., M. KOLLER, G. BRAUNEGG a M. S. MARQUÉS-CALVO. Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] production under different salinity conditions by a novel Bacillus megaterium strain. *New Biotechnology* [online]. 2016, **33**(1), 73-77. ISSN 18716784. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbt.2015.08.006
- [153] KAYE, J. Z., M. C. MÁRQUEZ, A. VENTOSA a J. A. BAROSS. Halomonas neptunia sp. nov., Halomonas sulfidaeris sp. nov., Halomonas axialensis sp. nov. and Halomonas hydrothermalis sp. nov: halophilic bacteria isolated from deep-sea hydrothermal-vent environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2004, **54**(2), 499-511. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.02799-0
- [154] ZHAO, H. a L.-S. TURNG. Mechanical performance of microcellular injection molded biocomposites from green plastics. *Biocomposites* [online]. Elsevier, 2015, , 141-160. ISBN 9781782423737. Dostupné z: doi:10.1016/B978-1-78242-373-7.00015-9

- [155] CHEN, G.Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society Reviews* [online]. 2009, **38**(8). ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/b812677c
- [156] OREN, A. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems* [online]. 2008, **4**(1). ISSN 1746-1448. Dostupné z: doi:10.1186/1746-1448-4-2
- [157] YIN, J., J.Ch. CHEN, Q. WU a G.Q. CHEN. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Biotechnology Advances* [online]. 2015, **33**(7), 1433-1442. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2014.10.008
- [158] VARGAS, C., M. ARGANDONA, M. REINA-BUENO, J. RODRIGUEZ-MOYA, C. FERNANDEZ-AUNION a J. J. NIETO. Unravelling the adaptation responses to osmotic and temperature stress in *Chromohalobacter salexigens*, a bacterium with broad salinity tolerance. *Saline Systems* [online]. 2008, **4**(1). ISSN 1746-1448. Dostupné z: doi:10.1186/1746-1448-4-14
- [159] ARORA, N. K. a H. PANOSYAN. Extremophiles: applications and roles in environmental sustainability. *Environmental Sustainability* [online]. 2019, **2**(3), 217-218. ISSN 2523-8922. Dostupné z: doi:10.1007/s42398-019-00082-0
- [160] PÉREZ-ARAUZ, A.O., A.E. AGUILAR-RABIELA, A. VARGAS-TORRES, A.-I. RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, N. CHAVARRÍA-HERNÁNDEZ, B. VERGARA-PORRAS a M.R. LÓPEZ-CUELLAR. Production and characterization of biodegradable films of a novel polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesized from peanut oil. *Food Packaging and Shelf Life* [online]. 2019, **20**. ISSN 22142894. Dostupné z: doi:10.1016/j.fpsl.2019.01.001
- [161] IBRAHIM, M.H.A., A. WILLEMS a A. STEINBÜCHEL. Isolation and characterization of new poly(3HB)-accumulating star-shaped cell-aggregates-forming thermophilic bacteria. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2010, **5**(109), 1579-1590. ISSN 13645072. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04786.x
- [162] SHEU, D.S., W.M. CHEN, J.Y. YANG a R.Ch. CHANG. Thermophilic bacterium *Caldimonas taiwanensis* produces poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from starch and valerate as carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2009, **44**(5), 289-294. ISSN 01410229. Dostupné z: doi:10.1016/j.enzmictec.2009.01.004
- [163] MADKOUR, M. H., D. HEINRICH, M.A. ALGHAMDI, I. I. SHABBAJ a A. STEINBÜCHEL. PHA Recovery from Biomass. *Biomacromolecules* [online]. 2013, **14**(9), 2963-2972. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm4010244
- [164] JOHNSON, K., Y. JIANG, R. KLEEREBEZEM, G. MUYZER a M. C. M. VAN LOOSDRECHT. Enrichment of a Mixed Bacterial Culture with a High Polyhydroxyalkanoate Storage Capacity. *Biomacromolecules* [online]. 2009, **10**(4), 670-676. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm8013796
- [165] MANAIA, C. M., B. NOGALES a O. C. NUNES. *Tepidiphilus margaritifera* gen. nov., sp. nov., isolated from a thermophilic aerobic digester. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2003, **53**(5), 1405-1410. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.02538-0
- [166] PODDAR, A., R. T. LEPCHA a S. K. DAS. Taxonomic study of the genus *Tepidiphilus*: transfer of *Petrobacter succinatimandens* to the genus *Tepidiphilus* as *Tepidiphilus succinatimandens* comb. nov., emended description of the genus *Tepidiphilus* and description of *Tepidiphilus thermophilus* sp. nov., isolated from a terrestrial hot spring.

- International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2014, **64**(1), 228-235. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.056424-0
- [167] UniProtKB - A0A0K6ITG6: (A0A0K6ITG6\_9PROT). *UniProtKB* [online]. 2015. Dostupné také z: <https://www.uniprot.org/uniprot/A0A0K6ITG6>
- [168] GOH, K.M., H.M. GAN, K.G. CHAN et al. Analysis of Anoxybacillus Genomes from the Aspects of Lifestyle Adaptations, Prophage Diversity, and Carbohydrate Metabolism. *PLoS ONE* [online]. 2014, **9**(3). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0090549
- [169] D'SOUZA, D.R., R. D. MORGAN, V. PARASHAR, N. CAPALASH a P. SHARMA. Characterization of BfII – A Thermostable, Co ++ -Requiring Isoschizomer of BsiYI from Anoxybacillus Flavithermus. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2004, **20**(6), 593-598. ISSN 0959-3993. Dostupné z: doi:10.1023/B:WIBI.0000043173.88074.14
- [170] KIKANI, B.A. a S.P. SINGH. The stability and thermodynamic parameters of a very thermostable and calcium-independent  $\alpha$ -amylase from a newly isolated bacterium, Anoxybacillus beppuensis TSSC-1. *Process Biochemistry* [online]. 2012, **47**(12), 1791-1798. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2012.06.005
- [171] KAMBOUROVA, M., R. MANDEVA, I. FIUME, L. MAURELLI, M. ROSSI a A. MORANA. Hydrolysis of xylan at high temperature by co-action of the xylanase from Anoxybacillus flavithermus BC and the beta-xylosidase/alpha-arabinosidase from Sulfolobus solfataricus O alpha. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2007, **102**(6), 1586-1593. ISSN 1364-5072. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03197.x
- [172] WANG, J., Y. BAI, P. YANG et al. A new xylanase from thermoalkaline Anoxybacillus sp. E2 with high activity and stability over a broad pH range. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2010, **26**(5), 917-924. ISSN 0959-3993. Dostupné z: doi:10.1007/s11274-009-0254-5
- [173] GOH, K.M., U.M. KAHAR, Y. Y. CHAI, Ch. S. CHONG, K. P. CHAI, V. RANJANI, R. Md. ILLIAS a K.G. CHAN. Recent discoveries and applications of Anoxybacillus. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2013, **97**(4), 1475-1488. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-012-4663-2
- [174] TAY, J.-H., Q.-S. LIU a Y. LIU. Microscopic observation of aerobic granulation in sequential aerobic sludge blanket reactor. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2001, **91**(1), 168-175. ISSN 1364-5072. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01374.x
- [175] OBRUCA, S., P. SEDLACEK, F. MRAVEC et al. The presence of PHB granules in cytoplasm protects non-halophilic bacterial cells against the harmful impact of hypertonic environments. *New Biotechnology* [online]. 2017, **39**, 68-80. ISSN 18716784. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbt.2017.07.008
- [176] SEDLACEK, P., E. SLANINOVA, V. ENEV et al. What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2019, **103**(4), 1905-1917. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-018-09584-z
- [177] KIM, M. a J. CHUN. 16S rRNA Gene-Based Identification of Bacteria and Archaea using the EzTaxon Server. *New Approaches to Prokaryotic Systematics* [online]. Elsevier, 2014, , 61-74. Methods in Microbiology. ISBN 9780128001769. Dostupné z: doi:10.1016/bs.mim.2014.08.001
- [178] JOHNSON, J. S., D. J. SPAKOWICZ, B.Y. HONG et al. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature*

- Communications* [online]. 2019, **10**(1). ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-019-13036-1
- [179] JANDA, J. M. a S. L. ABBOTT. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2007, **45**(9), 2761-2764. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.01228-07
- [180] KIM, M., H.S. OH, S.Ch. PARK a J. CHUN. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2014, **64**(2), 346-351. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.059774-0
- [181] MIZRAHI-MAN, O., E. R. DAVENPORT, Y. GILAD a B. A. WHITE. Taxonomic Classification of Bacterial 16S rRNA Genes Using Short Sequencing Reads: Evaluation of Effective Study Designs. *PLoS ONE* [online]. 2013, **8**(1). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0053608
- [182] WANG, X., I. K. JORDAN a L.W. MAYER. A Phylogenetic Perspective on Molecular Epidemiology. *Molecular Medical Microbiology* [online]. Elsevier, 2015, , 517-536. ISBN 9780123971692. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-397169-2.00029-9
- [183] GUPTA, R. The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. **24**(4), 367-402. ISSN 01686445. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-6445(00)00031-0
- [184] CUI, B., S. HUANG, F. XU, R. ZHANG a Y. ZHANG. Improved productivity of poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) in thermophilic *Chelatococcus daeguensis* TAD1 using glycerol as the growth substrate in a fed-batch culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2015, **99**(14), 6009-6019. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-015-6489-1
- [185] LUDWIG, W. Karl-Heinz Schleifer William B. Whitman, K.H. SCHLEIFER a W. B. WHITMAN. Revised Road Map to the Phylum Firmicutes. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* [online]. Wiley, 2015. ISSN 9781118960608. Dostupné z: doi:10.1002/9781118960608.bm00025
- [186] MARCIANO, F. a P. VAJRO. Oxidative Stress and Gut Microbiota: None. *Gastrointestinal Tissue* [online]. Elsevier, 2017, s. 113-123. ISBN 9780128053775. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-805377-5.00008-4
- [187] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 80-210-4207-9.
- [188] MOHAPATRA, S., S. MAITY, H. R. DASH, S. DAS, S. PATTNAIK, Ch. Ch. RATH a D. SAMANTARAY. Bacillus and biopolymer: Prospects and challenges. *Biochemistry and Biophysics Reports* [online]. 2017, **12**, 206-213. ISSN 24055808. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrep.2017.10.001
- [189] LEMOIGNE, M. Produits de Deshydratation et de Polymerisation de L'acide  $\beta$ -Oxybutyrique. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1926, **8**, 770-782.
- [190] WHITMAN, W.B, F. RAINEY, P. KÄMPFER, M. TRUJILLO, J. CHUN, P. DEVOS, B. HEDLUND a S. DEDYSH, ed. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* [online]. Wiley, 2015. ISBN 9781118960608. Dostupné z: doi:10.1002/9781118960608
- [191] NAZINA, T. N., T. P. TOUROVA, A. B. POLTARAUS et al. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov.

- and *Geobacillus uzensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. th.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2001, **51**(2), 433-446. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/00207713-51-2-433
- [192] BURGESS, S. A., S. H. FLINT, D. LINDSAY, M. P. COX a P. J. BIGGS. Insights into the *Geobacillus stearothermophilus* species based on phylogenomic principles. *BMC Microbiology* [online]. 2017, **17**(1). ISSN 1471-2180. Dostupné z: doi:10.1186/s12866-017-1047-x
- [193] DAAS, M.J. A., B. VRIESENDORP, A. H. P. VAN DE WEIJER, J. VAN DER OOST a R. VAN KRANENBURG. Complete Genome Sequence of *Geobacillus thermodenitrificans* T12, A Potential Host for Biotechnological Applications. *Current Microbiology* [online]. 2018, **75**(1), 49-56. ISSN 0343-8651. Dostupné z: doi:10.1007/s00284-017-1349-0
- [194] COTE, Ch. K., J. D. HEFFRON, J.A. BOZUE a S. L. WELKOS. *Bacillus anthracis* and Other *Bacillus* Species. *Molecular Medical Microbiology* [online]. Elsevier, 2015, , 1789-1844. ISBN 9780123971692. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-397169-2.00102-5
- [195] SLEPECKY, R. A. a H. E. HEMPHILL. The Genus *Bacillus*—Nonmedical. *The Prokaryotes* [online]. New York, NY: Springer US, 2006, , 530-562. ISBN 978-0-387-25494-4. Dostupné z: doi:10.1007/0-387-30744-3\_16
- [196] WELKER, N. E. a L. L. CAMPBELL. Unrelatedness of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* [online]. 1967, **94**(4), 1124-1130. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.94.4.1124-1130.1967
- [197] DU, Y., J. MA, Z. YIN et al. Comparative genomic analysis of *Bacillus paralicheniformis* MDJK30 with its closely related species reveals an evolutionary relationship between *B. paralicheniformis* and *B. licheniformis*. *BMC Genomics* [online]. 2019, **20**(1). ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/s12864-019-5646-9
- [198] DUNLAP, Ch. A., D. A. SCHISLER, E. B. PERRY, N. CONNOR, F. M. COHAN a A. P. ROONEY. *Bacillus swezeyi* sp. nov. and *Bacillus haynesii* sp. nov., isolated from desert soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2017, **67**(8), 2720-2725. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijsem.0.002007
- [199] LEE, J.B., S. H. JEON, S.G. CHOI, H.Y. JUNG, M.K. KIM a S. SRINIVASAN. *Bacillus piscis* sp. nov., a novel bacterium isolated from the muscle of the antarctic fish *Dissostichus mawsoni*. *Journal of Microbiology* [online]. 2016, **54**(12), 809-813. ISSN 1225-8873. Dostupné z: doi:10.1007/s12275-016-6473-1
- [200] GUINEBRETIERE, M.H., S. AUGER, N. GALLERON et al. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2013, **63**(1), 31-40. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijms.0.030627-0
- [201] LOGAN, N. A., L. LEBBE, A. VERHELST, J. GORIS, G. FORSYTH, M. RODRÍGUEZ-DÍAZ, M. HEYNDRICKX a P. DE VOS. *Bacillus shackletonii* sp. nov., from volcanic soil on Candlemas Island, South Sandwich archipelago. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2004, **54**(2), 373-376. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijms.0.02661-0

- [202] KHATRI, I., S. SHARMA, T. N. C. RAMYA, S. SUBRAMANIAN a N. AHMED. Complete Genomes of *Bacillus coagulans* S-lac and *Bacillus subtilis* TO-A JPC, Two Phylogenetically Distinct Probiotics. *PLOS ONE* [online]. 2016, **11**(6). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0156745
- [203] KONURAY, G. a Z. ERGINKAYA. Potential Use of *Bacillus coagulans* in the Food Industry. *Foods* [online]. 2018, **7**(6). ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods7060092
- [204] SÁEZ-NIETO, J.A., M.J. MEDINA-PASCUAL, G. CARRASCO, N. GARRIDO, M.A. FERNANDEZ-TORRES, P. VILLALÓN a S. VALDEZATE. *Paenibacillus* spp. isolated from human and environmental samples in Spain: detection of 11 new species. *New Microbes and New Infections* [online]. 2017, **19**, 19-27. ISSN 20522975. Dostupné z: doi:10.1016/j.nmni.2017.05.006
- [205] PANDA, A. K., S. S. BISHT, S. DEMONDAL, N. SENTHIL KUMAR, G. GURUSUBRAMANIAN a A. K. PANIGRAHI. *Brevibacillus* as a biological tool: a short review. *Antonie van Leeuwenhoek* [online]. 2014, **105**(4), 623-639. ISSN 0003-6072. Dostupné z: doi:10.1007/s10482-013-0099-7
- [206] LOGAN, N. A. a P. DE VOS. *Aneurinibacillus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* [online]. 2015. ISSN 9781118960608. Dostupné z: doi:10.1002/9781118960608.gbm00549
- [207] STEINBÜCHEL, A. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 1995, **128**(3), 219-228. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1016/0378-1097(95)00125-0
- [208] REHM, B.H. A. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochemical Journal* [online]. 2003, **376**(1), 15-33. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/bj20031254
- [209] PARK, S. J., T. W. KIM, M. K. KIM, S. Y. LEE a S.Ch. LIM. Advanced bacterial polyhydroxyalkanoates: Towards a versatile and sustainable platform for unnatural tailor-made polyesters. *Biotechnology Advances* [online]. 2012, **30**(6), 1196-1206. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2011.11.007
- [210] TSUGE, T., M. HYAKUTAKE a K. MIZUNO. Class IV polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases and PHA-producing *Bacillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2015, **99**(15), 6231-6240. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-015-6777-9
- [211] CHOONUT, A., P. PRASERTSAN, S. KLOMKLAO a K. SANGKHARAK. Study on mcl-PHA Production by Novel Thermotolerant Gram-Positive Isolate. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2020, **28**(9), 2410-2421. ISSN 1566-2543. Dostupné z: doi:10.1007/s10924-020-01779-8
- [212] XI, L., Z ZHANG, N. QIAO, Y. ZHANG, J. LI, J.Y. ZHAO a Z. XIAO. Complete genome sequence of the novel thermophilic polyhydroxyalkanoates producer *Aneurinibacillus* sp. XH2 isolated from Gudao oilfield in China. *Journal of Biotechnology* [online]. 2016, **227**, 54-55. ISSN 01681656. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiotec.2016.03.056
- [213] SINGH, G., A. KUMARI, A. MITTAL, A. YADAV a N. K. AGGARWAL. Poly  $\beta$  - Hydroxybutyrate Production by *Bacillus subtilis* NG220 Using Sugar Industry Waste Water. *BioMed Research International* [online]. 2013, **2013**, 1-10. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2013/952641
- [214] ANJALI, M., C. SUKUMAR, A. KANAKALAKSHMI a K. SHANTHI. Enhancement of growth and production of polyhydroxyalkanoates by *Bacillus subtilis* from agro-



- industrial waste as carbon substrates. *Composite Interfaces* [online]. 2013, **21**(2), 111-119. ISSN 0927-6440. Dostupné z: doi:10.1080/15685543.2013.834200
- [215] SANGKHARAK, K. a P. PRASERTSAN. Municipal Wastes Treatment and Production of Polyhydroxyalkanoate by Modified Two-Stage Batch Reactor. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2013, **21**(4), 1009-1015. ISSN 1566-2543. Dostupné z: doi:10.1007/s10924-013-0597-8
- [216] XIAO, Z., Y. ZHANG, L. XI, F. HUO, J. ZHAO a J. LI. Thermophilic production of polyhydroxyalkanoates by a novel *Aneurinibacillus* strain isolated from Gudao oilfield, China. *Journal of Basic Microbiology* [online]. 2015, **55**(9), 1125-1133. ISSN 0233111X. Dostupné z: doi:10.1002/jobm.201400843
- [217] SINGH, M., S. K.S. PATEL a V. C. KALIA. *Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates. *Microbial Cell Factories* [online]. 2009, **8**(1). ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/1475-2859-8-38
- [218] BINHAYEEDING, N., S. KLOMKLAO a K. SANGKHARAK. Utilization of Waste Glycerol from Biodiesel Process as a Substrate for Mono-, Di-, and Triacylglycerol Production. *Energy Procedia* [online]. 2017, **138**, 895-900. ISSN 18766102. Dostupné z: doi:10.1016/j.egypro.2017.10.130
- [219] BALA-LITWINIAK, A. a H. RADOMIAK. Possibility of the Utilization of Waste Glycerol as an Addition to Wood Pellets. *Waste and Biomass Valorization* [online]. 2019, **10**(8), 2193-2199. ISSN 1877-2641. Dostupné z: doi:10.1007/s12649-018-0260-7
- [220] DE PAULA, F. C., S. KAKAZU, C. B. Ch. DE PAULA, J. G. C. GOMEZ a J. CONTIERO. Polyhydroxyalkanoate production from crude glycerol by newly isolated *Pandoraea* sp. *Journal of King Saud University - Science* [online]. 2017, **29**(2), 166-173. ISSN 10183647. Dostupné z: doi:10.1016/j.jksus.2016.07.002
- [221] KOLLER, M. a L. MARSALEK. Principles of Glycerol-Based Polyhydroxyalkanoate Production. *Applied Food Biotechnology* [online]. 2015, **2**(4), 3-10. ISSN 2423-4214. Dostupné z: doi:10.22037/afb.v2i4.8270
- [222] MARTIN, D.P. a S. F. WILLIAMS. Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2003, **16**(2), 97-105. ISSN 1369703X. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-703X(03)00040-8
- [223] COOREVITS, A., A. E. DINSDALE, G. HALKET, L. LEBBE, P. DE VOS, A. VAN LANDSCHOOT a N. A. LOGAN. Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2012, **62**(7), 1470-1485. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.030346-0
- [224] ASH, C., J.A.E. FARROW, S. WALLBANKS a M.D. COLLINS. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 1991, **13**(4), 202-206. ISSN 02668254. Dostupné z: doi:10.1111/j.1472-765X.1991.tb00608.x
- [225] GIEDRAITYTÈ, G. a L. KALÈDIENÈ. Purification and characterization of polyhydroxybutyrate produced from thermophilic *Geobacillus* sp. AY 946034 strain. *Chemija* [online]. 2015, **26**(1), 38-45.
- [226] GEDIKLI, S., P.r A. ÇELİK, M. DEMIRBILEK, M. B. MUTLU, E. B. DENKBAŞ a A. ÇABUK. Experimental Exploration of Thermostable Poly ( $\beta$ -Hydroxybutyrate)s by *Geobacillus kaustophilus* Using Box-Behnken Design. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2019, **27**(2), 245-255. ISSN 1566-2543. Dostupné z: doi:10.1007/s10924-018-1335-z

- [227] VIJAY, R. a K. TARIKA. Microbial Production of Polyhydroxy alkanoates (PHAs) using Kitchen Waste as an Inexpensive Carbon Source. *Biosciences, Biotechnology Research Asia* [online]. 2019, **16**(1), 155-166. ISSN 09731245. Dostupné z: doi:10.13005/bbra/2733
- [228] BIERNACKI, M., M. MARZEC, T. ROICK, R. PÄTZ, K. BARONIAN, R. BODE a G. KUNZE. Enhancement of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) accumulation in *Arxula adenivorans* by stabilization of production. *Microbial Cell Factories* [online]. 2017, **16**(1). ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/s12934-017-0751-4
- [229] NOVACKOVA, I., D. KUCERA, J. PORIZKA, I. PERNICOVA, P. SEDLACEK, M. KOLLER, A. KOVALCIK a S. OBRUCA. Adaptation of *Cupriavidus necator* to levulinic acid for enhanced production of P(3HB-co-3HV) copolyesters. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2019, **151**. ISSN 1369703X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2019.107350
- [230] LIU, J., Y. ZHAO, M. DIAO et al. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Production by *Rhodospirillum rubrum* Using a Two-Step Culture Strategy. *Journal of Chemistry* [online]. 2019, **2019**, 1-8. ISSN 2090-9063. Dostupné z: doi:10.1155/2019/8369179
- [231] CHEN, Q., Q. WANG, G. WEI, Q. LIANG a Q. QI. Production in *Escherichia coli* of Poly(3-Hydroxybutyrate- co -3-Hydroxyvalerate) with Differing Monomer Compositions from Unrelated Carbon Sources. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2011, **77**(14), 4886-4893. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.00091-11
- [232] SRIRANGAN, K., X. LIU, T. T. TRAN, T.C. CHARLES, M. MOO-YOUNG a C. P. CHOU. Engineering of *Escherichia coli* for direct and modulated biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer using unrelated carbon sources. *Scientific Reports* [online]. 2016, **6**(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep36470
- [233] GÜNGÖRMEDI, G., M. DEMIRBILEK, M. B. MUTLU, E. B. DENKBAŞ a A. ÇABUK. Polyhydroxybutyrate and hydroxyvalerate production by *Bacillus megaterium* strain A1 isolated from hydrocarbon-contaminated soil. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2014, **131**(15), -. ISSN 00218995. Dostupné z: doi:10.1002/app.40530
- [234] SMITH, J. R. a D. A. LAMPROU. Polymer coatings for biomedical applications: a review. *Transactions of the IMF* [online]. 2014, **92**(1), 9-19. ISSN 0020-2967. Dostupné z: doi:10.1179/0020296713Z.000000000157
- [235] WU, J., K. XUE, H. LI, J. SUN, K. LIU a M. A. BARBOSA. Improvement of PHBV Scaffolds with Bioglass for Cartilage Tissue Engineering. *PLoS ONE* [online]. 2013, **8**(8). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0071563
- [236] RIEKES, M., L. R. JUNIOR, R. PEREIRA, P. BORBA, D. FERNANDES a H. STULZER. Development and Evaluation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and Polycaprolactone Microparticles of Nimodipine. *Current Pharmaceutical Design* [online]. 2013, **19**(41), 7264-7270. ISSN 13816128. Dostupné z: doi:10.2174/138161281941131219125657
- [237] CHEN, Y., Y.H. TSAI, I.N. CHOU, S.H. TSENG a H.S. WU. Application of Biodegradable Polyhydroxyalkanoates as Surgical Films for Ventral Hernia Repair in Mice. *International Journal of Polymer Science* [online]. 2014, **2014**, 1-11. ISSN 1687-9422. Dostupné z: doi:10.1155/2014/789681

- [238] RIVERA-BRISO, A. a Á. SERRANO-AROCA. Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate): Enhancement Strategies for Advanced Applications. *Polymers* [online]. 2018, **10**(7). ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym10070732
- [239] KIM, J. S., B.H. LEE a B.S. KIM. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Ralstonia eutropha*. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2005, **23**(2), 169-174. ISSN 1369703X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2005.01.016
- [240] BONARTSEV, A. P., G. A. BONARTSEVA, I. V. RESHETOV, K. V. SHAITAN a M. P. KIRPICHNIKOV. Application of Polyhydroxyalkanoates in Medicine and the Biological Activity of Natural Poly(3-Hydroxybutyrate). *Acta Naturae* [online]. 2019, **11**(2), 4-16. ISSN 2075-8251. Dostupné z: doi:10.32607/20758251-2019-11-2-4-16
- [241] BEWLEY, B. R., A. BERKALIEV, H. HENRIKSEN, D.B. BALL a L. S. OTT. Waste glycerol from biodiesel synthesis as a component in deep eutectic solvents. *Fuel Processing Technology* [online]. 2015, **138**, 419-423. ISSN 03783820. Dostupné z: doi:10.1016/j.fuproc.2015.05.025
- [242] HUNSOM, M. a Ch. AUTTHANIT. Adsorptive purification of crude glycerol by sewage sludge-derived activated carbon prepared by chemical activation with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and KOH. *Chemical Engineering Journal* [online]. 2013, **229**, 334-343. ISSN 13858947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2013.05.120
- [243] VOLOVA, T., A. DEMIDENKO, E. KISELEV, S. BARANOVSKIY, E. SHISHATSKAYA a N. ZHILA. Polyhydroxyalkanoate synthesis based on glycerol and implementation of the process under conditions of pilot production. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2019, **103**(1), 225-237. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-018-9460-0
- [244] HSIAO, L.J., M.Ch. LEE, P.J. CHUANG, Y.Y. KUO, J.H. LIN, T.M. WU a S.Y. LI. The production of poly(3-hydroxybutyrate) by thermophilic *Caldimonas manganoxidans* from glycerol. *Journal of Polymer Research* [online]. 2018, **25**(4). ISSN 1022-9760. Dostupné z: doi:10.1007/s10965-018-1486-6
- [245] SADYKOV, M. R., J.S. AHN, T.J. WIDHELM et al. Poly(3-hydroxybutyrate) fuels the tricarboxylic acid cycle and de novo lipid biosynthesis during *Bacillus anthracis* sporulation. *Molecular Microbiology* [online]. 2017, **104**(5), 793-803. ISSN 0950382X. Dostupné z: doi:10.1111/mmi.13665
- [246] CHEN, H.J., T.K. TSAI, S.Ch. PAN, J.S. LIN, Ch.L. TSENG a G.Ch. SHAW. The master transcription factor Spo0A is required for poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) accumulation and expression of genes involved in PHB biosynthesis in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2010, **304**(1), 74-81. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01888.x
- [247] WU, Q., H. HUANG, G. HU, J. CHEN, K.P. HO a G.Q. CHEN. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media. *Antonie van Leeuwenhoek* [online]. **80**(2), 111-118. ISSN 00036072. Dostupné z: doi:10.1023/A:1012222625201
- [248] NORHAFINI, H., L. THINAGARAN, K. SHANTINI, K.H. HUONG, I. M. SYAFIQ, K. BHUBALAN a A. A. AMIRUL. 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* [online]. 2017, **24**(11). ISSN 1022-9760. Dostupné z: doi:10.1007/s10965-017-1345-x
- [249] LI, Z.J., Z.Y. SHI, J. JIAN, Y.Y. GUO, Q. WU a G.Q. CHEN. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from unrelated carbon sources by metabolically

- engineered *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering* [online]. 2010, **12**(4), 352-359. ISSN 10967176. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymben.2010.03.003
- [250] ZHAO, Y. H., H. M. LI, L. F. QIN, H.H. WANG a G.Q. CHEN. Disruption of the polyhydroxyalkanoate synthase gene in *Aeromonas hydrophila* reduces its survival ability under stress conditions. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2007, **276**(1), 34-41. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00904.x
- [251] AZIZ, N. A., C. S. SIPAUT a A.A.A. ABDULLAH. *Improvement of the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) terpolyester by manipulating the culture condition* [online]. 2012, **87**(11), 1607-1614. ISSN 02682575. Dostupné z: doi:10.1002/jctb.3817
- [252] KUCERA, D., I. NOVACKOVA, I. PERNICOVA, P. SEDLACEK a S. OBRUCA. Biotechnological Production of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-4-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) Terpolymer by *Cupriavidus* sp. DSM 19379. *Bioengineering* [online]. 2019, **6**(3). ISSN 2306-5354. Dostupné z: doi:10.3390/bioengineering6030074
- [253] MADDEN, L.A., A.J. ANDERSON, J. ASRAR, P. BERGER a P. GARRETT. Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Ralstonia eutropha* in fed-batch cultures. *Polymer* [online]. 2000, **41**(10), 3499-3505. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/S0032-3861(99)00611-4
- [254] CHANPRATEEP, S. a S. KULPREECHA. Production and characterization of biodegradable terpolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) by *Alcaligenes* sp. A-04. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. 2006, **101**(1), 51-56. ISSN 13891723. Dostupné z: doi:10.1263/jbb.101.51
- [255] HERMANN-KRAUSS, C., M. KOLLER, A. MUHR, H. FASL, F. STELZER a G. BRAUNEGG. Archaeal Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Co- and Terpolyesters from Biodiesel Industry-Derived By-Products. *Archaea* [online]. 2013, **2013**, 1-10. ISSN 1472-3646. Dostupné z: doi:10.1155/2013/129268
- [256] SEDLACEK, P., I. PERNICOVA, I. NOVACKOVA et al. Introducing the Newly Isolated Bacterium *Aneurinibacillus* sp. H1 as an Auspicious Thermophilic Producer of Various Polyhydroxyalkanoates (PHA) Copolymers–2. Material Study on the Produced Copolymers. *Polymers* [online]. 2020, **12**(6). ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym12061298
- [257] BURKE, D.G., P.D. COTTER, R.P. ROSS a C. HILL. Microbial production of bacteriocins for use in foods. *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals* [online]. Elsevier, 2013, , 353-384. ISBN 9780857093431. Dostupné z: doi:10.1533/9780857093547.2.353
- [258] QU, L., L.J. REN, G.N. SUN, X.J. JI, Z.K. NIE a H. HUANG. Batch, fed-batch and repeated fed-batch fermentation processes of the marine thraustochytrid *Schizochytrium* sp. for producing docosahexaenoic acid. *Bioprocess and Biosystems Engineering* [online]. 2013, **36**(12), 1905-1912. ISSN 1615-7591. Dostupné z: doi:10.1007/s00449-013-0966-7
- [259] LINDSKOG, E. K. The Upstream Process: Principal Modes of Operation. *Biopharmaceutical Processing* [online]. Elsevier, 2018, s. 625-635 [cit. 2]. ISBN 9780081006238. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100623-8.00031-1
- [260] COLOMBO, B., F. FAVINI, B. SCAGLIA et al. Enhanced polyhydroxyalkanoate (PHA) production from the organic fraction of municipal solid waste by using mixed microbial culture. *Biotechnology for Biofuels* [online]. 2017, **10**(1). ISSN 1754-6834. Dostupné z: doi:10.1186/s13068-017-0888-8

- [261] BLABY, I.K., V. DE CRÉCY-LAGARD a T.J. LYONS. Modes of Culture/Microbial. *Comprehensive Biotechnology* [online]. Elsevier, 2011, , 303-314. ISBN 9780080885049. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-088504-9.00034-9
- [262] KANJANACHUMPOL, P., S. KULPREECHA, V. TOLIENG a N. THONGCHUL. Enhancing polyhydroxybutyrate production from high cell density fed-batch fermentation of *Bacillus megaterium* BA-019. *Bioprocess and Biosystems Engineering* [online]. 2013, **36**(10), 1463-1474. ISSN 1615-7591. Dostupné z: doi:10.1007/s00449-013-0885-7
- [263] GAHLAWAT, G. Enhancing the Production of Polyhydroxyalkanoate Biopolymer by *Azohydromonas Australica* Using a Simple Empty and Fill Bioreactor Cultivation Strategy. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* [online]. 2018, **31**(4), 479-485. ISSN 03529568. Dostupné z: doi:10.15255/CABEQ.2017.1148
- [264] IBRAHIM, M.H. A. a A. STEINBÜCHEL. Poly(3-Hydroxybutyrate) Production from Glycerol by *Zobellella denitrificans* MW1 via High-Cell-Density Fed-Batch Fermentation and Simplified Solvent Extraction. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2009, **75**(19), 6222-6231. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.01162-09
- [265] RAPOSO, R.S., M. C. M.D. DE ALMEIDA, M.M.R. DA FONSECA a M. T. CESÁRIO. Feeding strategies for tuning poly (3-hydroxybutyrate- co -4-hydroxybutyrate) monomeric composition and productivity using *Burkholderia sacchari*. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2017, **105**, 825-833. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.07.111
- [266] NORHAFINI, H., K.H. HUONG a A.A. AMIRUL. High PHA density fed-batch cultivation strategies for 4HB-rich P(3HB-co-4HB) copolymer production by transformant *Cupriavidus malaysiensis* USMAA1020. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2019, **125**, 1024-1032. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.12.121
- [267] LIU, L., F. WANG, G. PEI, J. CUI, J. DIAO, M. LV, L. CHEN a W. ZHANG. Repeated fed-batch strategy and metabolomic analysis to achieve high docosaheptaenoic acid productivity in *Cryptocodium cohnii*. *Microbial Cell Factories* [online]. 2020, **19**(1). ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/s12934-020-01349-6
- [268] ZHAO, B., L. WANG, F. LI, D. HUA, C. MA, Y. MA a P. XU. Kinetics of d-lactic acid production by *Sporolactobacillus* sp. strain CASD using repeated batch fermentation. *Bioresource Technology* [online]. 2010, **101**(16), 6499-6505. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2010.03.069
- [269] REDDY, L.V., Y.M. KIM, J.S. YUN, H.W. RYU a Y.J. WEE. L-Lactic acid production by combined utilization of agricultural bioresources as renewable and economical substrates through batch and repeated-batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. *Bioresource Technology* [online]. 2016, **209**, 187-194. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2016.02.115
- [270] KOLLER, M. a G. BRAUNEGG. Potential and Prospects of Continuous Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. *Bioengineering* [online]. 2015, **2**(2), 94-121. ISSN 2306-5354. Dostupné z: doi:10.3390/bioengineering2020094
- [271] MAHANSARIA, R., S. BHOWMIK, A. DHARA, A. SAHA, M. K. MANDAL, R. GHOSH a J. MUKHERJEE. Production enhancement of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in *Halogeometricum borinquense*, characterization of the bioplastic and desalination of the bioreactor effluent. *Process Biochemistry* [online]. 2020, **94**, 243-257. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2020.04.004

- [272] BLUNT, W., D. LEVIN a N. CICEK. Bioreactor Operating Strategies for Improved Polyhydroxyalkanoate (PHA) Productivity. *Polymers* [online]. 2018, **10**(11). ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym10111197
- [273] SINGHABOOT, P. a P. KAEWKANNETRA. A higher in value biopolymer product of polyhydroxyalkanoates (PHAs) synthesized by *Alcaligenes latus* in batch/repeated batch fermentation processes of sugar cane juice. *Annals of Microbiology* [online]. 2015, **65**(4), 2081-2089. ISSN 1590-4261. Dostupné z: doi:10.1007/s13213-015-1046-9
- [274] KOLLER, M. A Review on Established and Emerging Fermentation Schemes for Microbial Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters. *Fermentation* [online]. 2018, **4**(2). ISSN 2311-5637. Dostupné z: doi:10.3390/fermentation4020030
- [275] KHANNA, S. a A. K. SRIVASTAVA. Repeated Batch Cultivation of *Ralstonia eutropha* for Poly ( $\beta$ -hydroxybutyrate) Production. *Biotechnology Letters* [online]. 2005, **27**(18), 1401-1403. ISSN 0141-5492. Dostupné z: doi:10.1007/s10529-005-0689-1
- [276] BLUNT, W., R. SPARLING, D. J. GAPES, D. B. LEVIN a N. CICEK. The role of dissolved oxygen content as a modulator of microbial polyhydroxyalkanoate synthesis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2018, **34**(8). ISSN 0959-3993. Dostupné z: doi:10.1007/s11274-018-2488-6

## 8. ŽIVOTOPIS

Jméno a příjmení: Ing. Iva Pernicová

Datum narození: 27. září 1991

E-mail: xcpernicovai@fch.vut.cz

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9528-5445>

### Vzdělání

- **2016- současnost:** Doktorské studium – Potravinářská chemie, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně (VUT), Česká republika

Cena děkana za vynikající studijní výsledky, Cena rektora

- **2014-2016:** Magisterské studium – Potravinářská chemie a biotechnologie, Fakulta chemická, VUT v Brně,

Absolvování s vyznamenáním, Cena děkana za vynikající studijní úspěchy

- **2011-2014:** Bakalářské studium – Potravinářská chemie, Fakulta chemická, VUT v Brně

Absolvování s vyznamenáním

- **2007-2011:** Gymnázium, Třebíč; Maturitní zkouška s vyznamenáním

### Certifikovaná školení

- **2016:** Interní auditor systému managementu kvality dle ISO 9001

Interní auditor systému HACCP

Interní auditor normy IFS FOOD verze 6

### Absolvované stáže

- **2019 únor–květen:** Odborná zahraniční stáž ve národním výzkumném centru v Madridu, Španělsko (Biological Research Center (CIB-CSIC)) na téma stanovení genové exprese.
- **2015 říjen–2016 duben:** Odborná stáž – vypracování diplomové práce ve společnosti Biovendor, a.s., na téma Stanovení biologické aktivity rekombinantního proteinu adiponektin pomocí buněčné kultury
- **2016 červenec–srpen:** Odborná stáž na Chemickém ústavu SAV v Bratislavě, téma Biotypizace bazidomycetních kvasinek pomocí MALDI-TOF, skrining pro produkci polygalaktouronáz, testování vlivu kultivačních podmínek na produkci povrchové alfa-galaktosidázy *Cryptococcus flavescens*
- **2013 únor–duben:** Odborná stáž na Veterinární a farmaceutické univerzitě v Brně v rámci BiochemNetu na téma Ověřování stability přírodních látek pomocí HPLC

### Pracovní zkušenost

- **2016-současnost:** Technický pracovník pro vývoj biotechnologie, Centrum materiálového výzkumu, Fakulta chemická, VUT v Brně

## 9. SEZNAM PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI

### Články v časopisech s impakt faktorem ( $J_{imp}$ )

- **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.
- 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.
- **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.
- KOVALČÍK, A.; **PERNICOVÁ, I.**; OBRUČA, S.; SZOTKOWSKI, M.; ENEV, V.; KALINA, M.; MÁROVÁ, I. Grape winery waste as a promising feedstock for the production of polyhydroxyalkanoates and other value-added products. FOOD AND BIOPRODUCTS PROCESSING, 2020, roč. 124, č. 1, s. 1-10. ISSN: 0960-3085.
- KOUŘILOVÁ, X.; **PERNICOVÁ, I.**; SEDLÁŘ, K.; MUSILOVÁ, J.; SEDLÁČEK, P.; KALINA, M.; KOLLER, M.; OBRUČA, S. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a thermophilic strain of Schlegelella thermodepolymerans from xylose rich substrates. BIORESOURCE TECHNOLOGY, 2020, roč. 315, č. 8, s. 1-7. ISSN: 0960-8524.
- **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.
- 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.



- OBRUČA, S.; SEDLÁČEK, P.; KOLLER, M.; KUČERA, D.; **PERNICOVÁ, I.** Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. *BIOTECHNOLOGY ADVANCES*, 2018, roč. 36, č. 3, s. 856-870. ISSN: 0734-9750.
- KUČERA, D.; **PERNICOVÁ, I.**; KOVALČÍK, A.; KOLLER, M.; MÜLLEROVÁ, L.; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; NEBESAROVA, J.; KALINA, M.; MÁROVÁ, I.; KRZYŽÁNEK, V.; OBRUČA, S. Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*. *BIORESOURCETECHNOLOGY*, 2018, roč. 256, č. 1, s. 552-556. ISSN: 0960-8524.
- 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.

#### Články v časopisech zařazených v databázi Scopus

- **PERNICOVÁ, I.**; ENEV, V.; MÁROVÁ, I.; OBRUČA, S. Interconnection of Waste Chicken Feather Biodegradation and Keratinase and mcl-PHA Production Employing *Pseudomonas putida* KT2440. *APPLIED FOOD BIOTECHNOLOGY*, 2019, roč. 6, č. 2345-5357, s. 83-90. ISSN: 2345-5357.
- 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.
- KOVALČÍK, A.; KUČERA, D.; MATOUŠKOVÁ, P.; **PERNICOVÁ, I.**; OBRUČA, S.; KALINA, M.; ENEV, V.; MÁROVÁ, I. Influence of removal of microbial inhibitors on PHA production from spent coffee grounds employing *Halomonas halophila*. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2018, roč. 6, č. 2, s. 3495-3501. ISSN: 2213-3437.
- **PERNICOVA, I.**; KUCERA, D.; NOVACKOVA, I.; VODICKA, J.; KOVALCIK, A.; OBRUCA, S. Extremophiles - Platform Strains for Sustainable Production of Polyhydroxyalkanoates. *Materials Science Forum*. 2019, roč. 955, s. 74-79. ISSN 1662-9752.

#### Kapitoly v knihách

- KOLLER, M., S. OBRUČA, **I. PERNICOVÁ** a G. BRAUNEGG. Physiological, kinetic, and process engineering aspects of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by extremophiles. WILLIAMS, H. a P. KELLY, ed. *Polyhydroxyalkanoates:: Biosynthesis, Chemical Structures and Applications*. Nova Science Publishers, 2018, s. 1-70. ISBN 978-1-53613-439-1.
- OBRUCA, S.; SEDLACEK, P.; **PERNICOVA, I.**; KOVALCIK, A.; NOVACKOVA, I.; SLANINOVA, E.; MAROVA, I. Interconnection between PHA and Stress Robustness of

Bacteria. The Handbook of Polyhydroxyalkanoates. CRC Press, 2020, 2020-9-23, , 107-132. ISBN 9780429296635.

### 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)

### Konferenční příspěvky

- **PERNICOVÁ, I.**; KOUŘILOVÁ, X.; NOVÁČKOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. Izolace 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.; MUSILOVÁ, J.; SEDLÁŘ, K.; BEDNÁROVÁ, K.; **PERNICOVÁ, I.**; OBRUČA, S. Thermophilic Bacterium *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344 as a Producer of Polyhydroxyalkanoates. Studentská odborná konference CHEMIE JE ŽIVOT 2020. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2020. s. 90-91. ISBN: 978-80-214-5920-0.
- 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.
- 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.
- **PERNICOVÁ, I.**; NOVÁČKOVÁ, I.; KOUŘILOVÁ, X.; OBRUČA, S. Izolace 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
- 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.
- KOUŘILOVÁ, X.; **PERNICOVÁ, I.**; OBRUČA, S. Screening biotechnologického potenciálu vybraných zástupců rodu *Geobacillus*. XXVIII. konference mladých mikrobiologů Tomáškovy dny 2019. 2019. s. 48-48. ISBN: 978-80-210-9296-9.
- **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.

- 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.**; 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.
- 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.; 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.
- **PERNICOVÁ, I.**; KRATOCHVÍLOVÁ, O.; KUČERA, D.; OBRUČA, S. SCREENING OF PRODUCTION OF BIOSURFACTANTS IN SELECTED BACTERIA. In International Conference on Chemical Technology. International Conference on Chemical Technology. Praha: 2018. s. 70-73. ISSN: 2336-8128.
- **PERNICOVÁ, I.**; KRATOCHVÍLOVÁ, O.; KUČERA, D.; OBRUČA, S. Screening of biosurfactants excretion among selected bacteria. 7th Meeting on Chemistry and Life 2018. Book of abstracts. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, 2018. s. 142-142. ISBN: 978-80-214-5488-0
- 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.
- **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.
- 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.

- KOVALČÍK, A.; **PERNICOVÁ, I.**; KUČERA, D.; OBRUČA, S.; MATOUŠKOVÁ, P.; KUNDRÁT, V.; MÁROVÁ, I. Properties of biogenic PHA nanofibrous materials originated from strains *Burkholderia* species and *Pseudomonas* species using grape pomace medium. Program Agenda & Abstracts, 25th Annual Meeting of the BioEnvironmental Polymer Society, August 15-17, 2018, Rensselaer Polytechnic University, Troy, New York. Troy, New York, USA: Rensselaer Polytechnic University, 2018. s. 37-37.
- 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.
- **PERNICOVÁ, I.**; KRATOCHVÍLOVÁ, O.; KUČERA, D.; OBRUČA, S. Screening of Production of Biosurfactants in Selected Bacteria. 2018. ISBN: 978-80-86238-83-8.
- **PERNICOVÁ, I.**; KRATOCHVÍLOVÁ, O.; KUČERA, D.; OBRUČA, S. Screening produkce biosurfaktantů u vybraných bakterií produkující polyhydroxyalkanoáty. XXVII. konference mladých mikrobiologů Tomáškovy dny 2018. Brno: Masarykova univerzita, 2018. s. 75-75. ISBN: 978-80-210-8963-1.
- KRATOCHVÍLOVÁ, O.; **PERNICOVÁ, I.**; OBRUČA, S. Microbial production of biosurfactants by selected bacterial strains. XIX. setkání biochemiků a molekulárních biologů. Brno: Masarykova univerzita, 2018. s. 66-66. ISBN: 978-80-210-9069-9.
- **PERNICOVÁ, I.**; KRATOCHVÍLOVÁ, O.; KUČERA, D.; OBRUČA, S. Screening of production of biosurfactants in selected bacteria. In PROCEEDINGS OF THE 6TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON CHEMICAL TECHNOLOGY. CZECH SOC INDUSTRIAL CHEMISTRY, 2018. s. 70-73. ISBN: 978-80-86238-77-7
- **PERNICOVÁ, I.**; KUČERA, D.; VLASÁKOVÁ, T.; OBRUČA, S. Isolation and characterization of extremophiles for biotechnological production of polyhydroxyalkanoates. XVIII. Setkání biochemiků a molekulárních biochemiků. 1. Brno: Masarykova univerzita v Brně, 2017. s. 82-82. ISBN: 978-80-210-8765-1.
- OBRUČA, S.; KUČERA, D.; BENEŠOVÁ, P.; **PERNICOVÁ, I.**; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; SAMEK, O.; KRZYZANEK V.; MÁROVÁ, I. Integrating production of PHA into bio-refinery concept – shedding light also on specific consequences of non-optimal cultivation conditions. Biotech 2017 Book of Abstracts. 1. Praha: ICT Prague, 2017. s. 52-53. ISBN: 978-80-7080-989- 0.
- **PERNICOVÁ, I.**; ŠURÁŇOVÁ, Z.; INNEMANOVÁ, P.; OBRUČA, S. Interconnection of microbial degradation of chicken feather and polyhydroxyalkanoates production employing selected pseudomonas strains. EUROBIOTECH 6th Central European Congress of Life Sciences. Krakow: 2017. s. 164-164.

- KUČERA, D.; **PERNICOVÁ, I.**; KOVALČÍK, A.; OBRUČA, S. Accumulation of PHAs by halophilic strain *Halomonas halophila*. XVIII.setkání biochemiků a molekulárních biologů. Brno: Masarykova Univerzita, 2017. s. 75-75. ISBN: 978-80-210-8765-1.
- OBRUČA, S.; KUČERA, D.; **PERNICOVÁ, I.**; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; SAMEK, O.; KRZYZANEK, V.; NEBESAROVA, J.; MÜLLEROVÁ, L.; CHYTILOVÁ, A.; SLANINOVÁ, E.; MÁROVÁ, I. Capability of polyhydroxyalkanoates accumulation enhances stress resistance and cell robustness of bacteria. Eurobiotech: Programme and Abstract Book. 1. Krakow: Targi w Krakowie, 2017. s. 154-154.
- **PERNICOVÁ, I.**; ŠURÁŇOVÁ, Z.; OBRUČA, S.; Innemanova P. BIODEGRADATION OF CHICKEN FEATHER BY POLYHYDROXYALKANOATES ACCUMULATING BACTERIA. 2017. ISBN: 978-80-86238-62-3.
- OBRUČA, S.; KUČERA, D.; BENEŠOVÁ, P.; **PERNICOVÁ, I.**; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; SAMEK, O.; KRZYZANEK, V.; MÜLLEROVÁ, L.; CHYTILOVÁ, A.; SLANINOVÁ, E. Integrating production of PHA into bio-refinery concept: considering the impact of non- optimal cultivation conditions. 9th European Symposium on Biopolymers: Book of Abstracts. 1. Toulouse, Francie: 2017. s. 28-29.
- **PERNICOVÁ, I.**; ŠURÁŇOVÁ, Z.; INNEMANOVÁ, P.; OBRUČA, S. BIODEGRADATION OF CHICKEN FEATHER BY POLYHYDROXYALKANOATES ACCUMULATING BACTERIA. In Proceedings of the 5th International Conference on Chemical Technology. 1. Praha: Czech Society of Industrial Chemistry, 2017. s. 67-71. ISBN: 978-80-86238-62-3.
- STRATILOVÁ, B.; **PERNICOVÁ, I.**; PAVLATOVSKÁ, B.; MÁROVÁ, I.; VADKERTIOVÁ, R.; STRATILOVÁ E. Polygalacturonases of yeasts associated with natural environments. 2017.

## 10. PŘÍLOHY

### 10.1. Interconnection of waste chicken feather biodegradation and keratinase and *mcl*-PHA production employing *Pseudomonas putida* KT2240

<http://dx.doi.org/10.22037/afb.v6i1.21429>



APPLIED FOOD BIOTECHNOLOGY, 2019, 6 (1):83-90  
Journal homepage: [www.journals.sbm.u.ac.ir/afb](http://www.journals.sbm.u.ac.ir/afb)

Research Article

pISSN: 2345-5357  
eISSN: 2423-4214

## Interconnection of Waste Chicken Feather Biodegradation and Keratinase and *mcl*-PHA Production Employing *Pseudomonas putida* KT2440

Iva Pernicova, Vojtech Enev, Ivana Marova, Stanislav Obruca\*

Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkynova 118, 612 00 Brno, Czech republic.

### Abstract

**Background and objective:** Waste chicken feather is an important waste product of the poultry processing industry and is annually produced in substantial amounts. Hence, wise management of this waste is desirable. In this work we aimed at feathers biodegradation by a selected bacterial strain capable of utilizing chicken feathers as sole carbon source—*Pseudomonas putida* KT2440. To utilize feather, the bacterial culture excrete keratinase, which can be easily isolated after biodegradation process and which, therefore, represents an interesting side product of the intended technology. Moreover, bacterial culture of employed for feather degradation is also capable of *mcl*-PHA accumulation.

**Materials and methods:** Bacterial culture of *Pseudomonas putida* KT2440 was cultivated in presence of waste chicken feathers as the only carbon source; during the cultivation keratinase activity and biomass growth were monitored. Metabolically active biomass after feather degradation was used for *mcl*-PHA production.

**Results and conclusion:** During cultivation on waste feathers, bacteria did not accumulate detectable amounts of medium-chain length polyhydroxyalkanoate (*mcl*-PHA); nevertheless, when metabolically active bacterial cells after feather biodegradation were transferred into nitrogen limited mineral media, a high medium-chain length polyhydroxyalkanoate content of 61% of cell dry weight in microbial cells was reached. The polymer consisted of 3-hydroxyhexanoate (27.2% mol) and 3-hydroxyoctanoate (72.8% mol) monomer units. Therefore, this work demonstrates a possible interconnection of feather biodegradation with keratinase and medium-chain length polyhydroxyalkanoate production.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

### Article Information

#### Article history

Received 16 May 2018  
Revised 11 June 2018  
Accepted 26 Jul 2018

#### Keywords

- Waste feathers
- *Pseudomonas putida*
- keratinase
- *mcl*-PHA

#### \*Corresponding author: Stanislav Obruca,

Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkynova 118, 612 00 Brno, Czech republic.

Tel: +420 776 788 818  
Fax: +420 541 211 697  
E-mail: [obruca@fch.vut.cz](mailto:obruca@fch.vut.cz)

### 1. Introduction

Millions of tons of chicken feathers are generated as waste by the poultry processing industry every year, which represents serious problem for the food industry. According to Taskin et al. poultry processing manufacturers produce about  $7.7 \times 10^8$  kg of feathers annually [1]. Nevertheless, despite low prize and abundant availability of feathers, its further applications as well as valorization approaches are limited. Waste feathers is used in low-grade animal feed but more often is treated as a waste and ends up in landfills or incinerators. These ways of destroying feathers are not desirable from an economical as well as an ecological point of view and they have been restricted or even banned in some countries [2]. Therefore; there is an urgent need for

new processes enabling ecological and economical valorization of this resistant solid waste. There are some studies aimed at utilization of waste chicken feathers as a substrate for processes of microbial biotechnology. Taskin et al. [3] reported that chicken feathers protein hydrolysate can be used for biotechnological manufacturing of L-lactic acid by *Rhizopus oryzae*; waste chicken feathers can be also utilized for production of biogas, xylanase or extracellular polysaccharides [4-6]. Recently, we have reported that alkaline hydrolysate of chicken waste feathers can be applied as inexpensive complex nitrogen source to enhance *scl*-PHA production on waste frying oil employing *Cupravidus necator* [7].



Feathers consist predominantly (about 90% weight) of proteins, the most important fraction is represented by keratin. Feathers keratins are small fibrous proteins with a molecular weight around 10 kDa, which are of interest due to their high nutrition value caused by a desirable amino acids composition. On the other side, keratin is mechanically and chemically robust and also resistant to either chemical or enzymatic hydrolysis, which complicates its digestibility and applicability for feeding purposes [8]. Efficient enzymatic hydrolysis of keratin is possible only by action of specific proteolytic enzymes called keratinases. These enzymes are capable of complete hydrolysis of feathers and other keratin rich substrates. Therefore, these enzymes have numerous applications in food and feed industry, fertilizer production, cosmetics or pharmaceutical and textile industries [9].

Keratinases for industrial purposes are usually produced by microorganisms especially bacteria belonging to genus *Bacillus*. For instance Williams et al. isolated, identified and characterized feathers degrading bacteria *Bacillus (B.) licheniformis* [10]. Actually, all the currently commercially available preparations of keratinases are produced by *B. licheniformis* [9]. Furthermore; there are numerous recent reports that also members of the genus *Pseudomonas* are efficient producers of keratinases. Mohamad et al. isolated *Pseudomonas* sp. LM10 which was capable of providing high keratinase activities in feathers based media supplemented with fructose and peptone [11]. Similarly, Stiborova et al. isolated *Pseudomonas* sp. P5 demonstrating substantial feathers hydrolyzing capability [2]. Keratinase production was also recorded for *Pseudomonas (P.) aeruginosa* [12].

In addition, numerous *Pseudomonas* strains are also capable of accumulating polyhydroxyalkanoates (PHAs) as carbon and energy storage materials. These microbial polyesters of hydroxyacids are considered an ecological alternative to petrochemical plastics since they are fully biodegradable, biocompatible and moreover they are produced from renewable sources [13]. PHAs are usually accumulated by bacterial cells when a carbon source is present in excess but other elements such as nitrogen or phosphorous are exhausted. Depending on the monomer composition, PHA are classified as *scl*-PHA (monomers consist of 3-5 carbon atoms) and medium-chain length polyhydroxyalkanoate (*mcl*-PHA) (monomers contain 6-14 carbon atoms). Most *Pseudomonas* strains are producers of *mcl*-PHA [13]. Among all the *Pseudomonads*, *P. putida* KT2440 is the most studied in the context of PHA metabolism and is the most widely used for *mcl*-PHA production [14-16]. The strain (originally designated as *P. arvilla* strain mt-2 and subsequently reclassified as *P. putida* mt-2) is a plasmid-free derivative of a toluene-degrading bacterium. It is considered being probably the most-studied saprophytic laboratory *Pseudomonad* which is able to sur-

ive and prosper in the environment [17]. Therefore, apart from its PHA production capabilities, it is also candidate strain for industrially-oriented metabolic engineering aimed at various applications [18].

Aware of the interesting PHA production capacities of numerous *Pseudomonads* and their capability of utilization of waste feathers which is associated with keratinase excretion we tested numerous *Pseudomonas* strains for their feathers biodegrading capacities. Our intent was to interconnect highly interesting process of feathers degradation with *mcl*-PHA as well as keratinase production. Surprisingly, we observed that *P. putida* KT2440 revealed the highest degradation efficiency and keratinase activity in cultivation media when waste chicken feathers was used as a sole carbon source in cultivation media. Therefore, we employed this well-known *mcl*-PHA producing bacterial strain for development of our concept interconnecting keratinase and *mcl*-PHA production.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microorganism and cultivation method

*P. putida* KT2440 (DSM 6125) was purchased from Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures, Braunschweig, Germany.

Non-treated chicken feathers were used as sole carbon source for growth of the bacteria culture and keratinase production. The cultivation was carried out for 7 days at 30°C with shaking at 180 rpm in 100 ml mineral salt medium (MSM) containing (g l<sup>-1</sup>) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.02; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12; H<sub>2</sub>O, 11.1; MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0.2. The MSM included 1 ml l<sup>-1</sup> microelements solution (MES) which contains (g l<sup>-1</sup>) FeCl<sub>3</sub> 6H<sub>2</sub>O, 9.7; CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 7.8; CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O, 0.156; CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, 0.119; NiCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, 0.118; ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0.1; dissolve in 0.1 M HCl. First, the feathers were washed and dried and after being sterilized (121°C, 30 min.) they were used as a sole carbon source in an amount corresponding to 20 g per liter of MSM. The flasks were inoculated with an overnight culture of *P. putida* grown in Nutrient Broth medium which consist of (g l<sup>-1</sup>) bacteriological peptone, 10; beef extract, 10; and NaCl, 5. Total loss of feathers, biomass, pH and keratinase activity was determined during the cultivation, all the cultivations were performed in duplicate.

Bacterial biomass obtained after feathers degradation was separated from feather by filtration (Whatman filters), centrifuged (5000 ×g, 5 min) and re-suspended in production medium consisting of (g l<sup>-1</sup>) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 or 0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.02; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12H<sub>2</sub>O, 11.1; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2 and 1 ml l<sup>-1</sup> MES. Further, the cultivation medium was supplemented by waste frying oil (oil was obtained from university canteen at FCH BUT, it consisted predominantly of rapeseed oil) (20 g l<sup>-1</sup>) and octanoic acid (2 g l<sup>-1</sup>) which served as the carbon sources and *mcl*-PHA precursors, the cultivations were performed in duplicate.



## 2.2. Analytical methods

Keratinase activity of the supernatant was determined and expressed as reported by Letourneau et al. using Keratinazure (Sigma-Aldrich) as a substrate [19].

Biomass concentration was measured gravimetrically as cell dry mass (CDM). PHA content in bacterial cells was analyzed employing GC-FID as reported previously, particularly 3-hydroxyalkanoic acid (C6, C8, C10, C12 and C14) purchased from Larodan (Sweden) were used as a standards, benzoic acid was used as internal standard [20].

Elemental composition of the chicken feathers (obtained from poultry processing manufactory Vodnanska drubez a.s., Brno Modrice, Czech Republic) before and after degradation was determined using a CHNS/O analyzer Euro Vector EA 3000. Samples (~ 1-2 mg) were packed in tin capsules in the oven for combustion at 980°C using pure oxygen as combustion gas and pure helium as carrier gas. All elements were determined by thermal conductivity detector (TCD). The calibration curves for C, H, N, S were obtained using a reference standard sample sulphanil-amide.

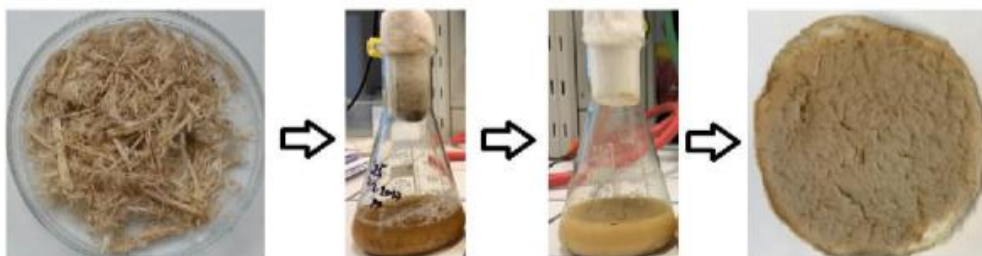
FTIR-ATR spectra of feather before and after degradation were obtained by means of an Attenuated Total Reflectance (ATR) technique using a Nicolet iS50 spectrometer. All spectra were recorded over the range 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  at a resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$  and were the average of 256 scans.

## 3. Results and discussion

We screened various *Pseudomonas* strains originating both from culture collections as well as our isolates for waste chicken feathers degradation capability which is associated with keratinase production. Surprisingly, among all the tested strains, *P. putida* KT2440 demonstrated the highest chicken feather degradation capacity. When the bacterial strain was inoculated into the mineral media containing waste chicken feathers as the sole carbon source and cultivated under optimal conditions, the process of feathers biodegradation was visible to the naked eye (see Fig. 1) solid particles of waste chicken feathers were transformed into pulp-like material, which was accom-

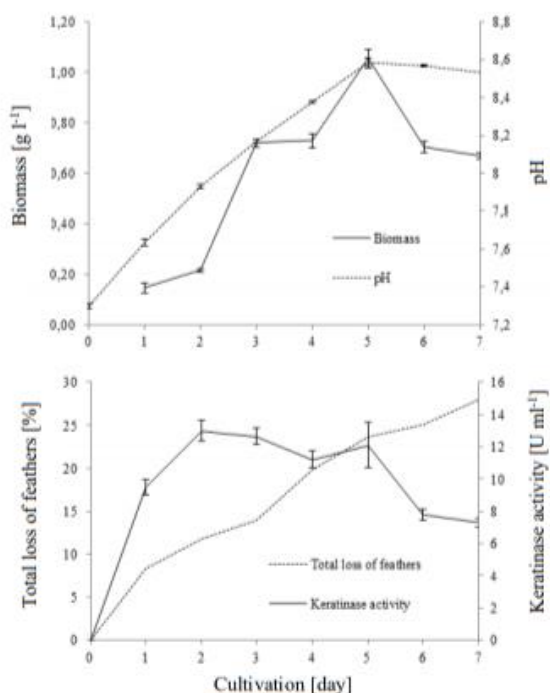
panied by decrease of weight of the feathers and also by substantial increase of turbidity of the cultivation media. When the cultivation was finished, it was possible to remove partially degraded chicken feathers by filtration using Whatman no. 5 filter paper. Not surprisingly, bacterial cells were not captured by the filter paper and passed to the filtrate. Therefore, it was possible to separate bacterial cells for further purposes and gravimetrically quantify both measure of feathers degradation and concentration of bacterial biomass.

Furthermore, we investigated the time course of feathers degradation, keratinase production and biomass growth during an experiment lasting for 7 days, the results are demonstrated in Fig. 2. As expected, the growth of the bacterial culture on feathers was accompanied by secretion of keratinase into the cultivation media. The highest biomass concentration was achieved on the 5<sup>th</sup> day of cultivation (1.06  $\text{g l}^{-1}$ ). The keratinase activity in cultivation media rapidly increased, reaching the maximal level (approx. 13  $\text{U ml}^{-1}$ ) on the 2<sup>nd</sup> day of cultivation and remained constant till the 5<sup>th</sup> day of cultivation. After that, keratinase activity in the cultivation media decreased to approximately 8  $\text{U ml}^{-1}$ . It is likely that the factor which inhibited growth of the bacterial culture and decreased keratinase excretion was the high pH value, since the pH value of the cultivation media increased during the time course of cultivation which is very typical feature when protein rich substrates are utilized as the carbon source by microbial culture which is accompanied by excretion of basic nitrogen-containing metabolites into cultivation media. pH value reached its maximal value 8.6 on the 5<sup>th</sup> day of cultivation. Nevertheless, despite the decrease in metabolic activity of the bacterial culture and keratinase activity in cultivation media after the 5<sup>th</sup> day of cultivation, chicken feather degradation progressed almost linearly during the whole assay. After 7 days of cultivation 28% of feathers' weight was completely degraded. It is likely that the measure of feather degradation could have been enhanced by prolongation of the biodegradation process or even by control of pH in the cultivation media.



**Figure 1.** Demonstration of feather degradation by *Pseudomonas putida* KT2440 during 7 days. Large solid particles of chicken feather were degraded by microbial culture resulting in formation of pulp-like material which can be removed by filtration using Whatman no.5 filter paper.





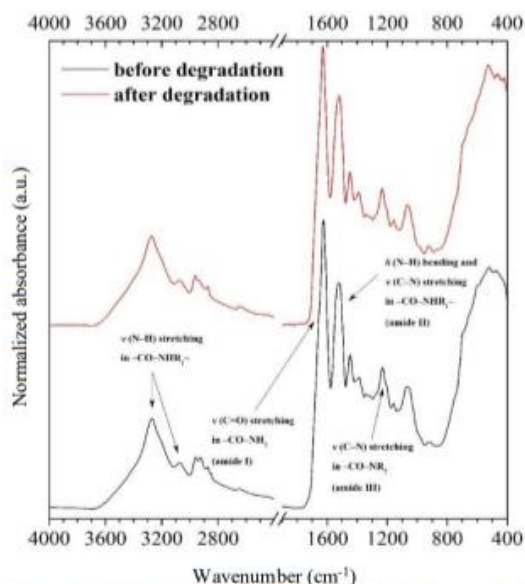
**Figure 2.** Time course of a) biomass growth and pH development b) keratinase activity and feather degradation expressed as percentage mass loss during 7 days lasting biodegradation experiment employing *Pseudomonas putida*.

It should be noted that the samples of bacterial biomass taken during feathers biodegradation assay were analyzed to determine the intracellular content of PHA. Nevertheless, since PHA accumulation is activated by nitrogen limitation and feathers are rich in protein and therefore also in nitrogen content, we did not detect any PHA in bacterial biomass [21,22].

Further, we decided to investigate chemical changes of feathers induced by the degradation process. The materials before and after degradation were analyzed in terms of chemical composition of macro-elements using a combusting elementary analyzer and also by FTIR. The FTIR-ATR spectra of feathers before and after degradation are presented in Fig. 3. All the spectra contain a sharp and intensive band at 1629 cm<sup>-1</sup> corresponding to carbonyl groups in amide I, an  $\alpha$ -helix conformation. Another band occurring at 1520 cm<sup>-1</sup> can be assigned to stretching C-N and N-H bending groups in amide II conformation, which are also indicated by the broad band centered at about 3272 cm<sup>-1</sup> resulting from the N-H stretching vibrations of the amide II groups. The absorbance bands of aliphatic groups is revealed in the range 2980-2840 cm<sup>-1</sup>, where the

asymmetric and symmetric C-H stretching of methyl groups at 2961 cm<sup>-1</sup> and 2875 cm<sup>-1</sup>, and the asymmetric C-H stretching of methylene groups at 2927 cm<sup>-1</sup>.

The deformation bending of methyl and methylene groups occur in the spectra at 1448 cm<sup>-1</sup> and 1384 cm<sup>-1</sup>. The less intensive absorption band at 1340 cm<sup>-1</sup> corresponds with amide III. The appearance of amide III is revealed by 1330-1200 cm<sup>-1</sup> frequency zones, where the N-H in-plane bending and C-N stretching vibrations in amide groups and corresponds to the  $\alpha$ -helix conformation. The absorption band at 1070 cm<sup>-1</sup> is characteristic a peak for skeletal C-C vibration. Finally, the appearance of the band at 1158 cm<sup>-1</sup> is most probably associated with the C-C stretching in amino acids. The appearance and absorption bands of FTIR-ATR spectra suggest that the chemical composition of chicken feathers during degradation process was not substantially changed. Further, the elemental compositions of feathers before and after degradation are presented in Table 1. The results show that the average elemental compositions of feathers before and after degradation are comparable. Therefore, based on results of FTIR elemental analysis, it can be stated that degradation of chicken feathers by *P. putida* KT2440 is not associated with chemical modification of the solid material, but the process of feathers degradation consists of keratinase catalyzed cleavage of peptide bounds in feathers keratin. Decrease of molecular weight of keratin is most likely responsible for change of appearance and structure of the material (see Fig. 1, feathers before and after degradation).



**Figure 3.** FTIR spectra of chicken feather before and after degradation

**Table 1.** Element composition of feather before and after degradation (7 days) by *Pseudomonas putida*

Feathers	Nitrogen (%wt)	Carbon (%wt)	Hydrogen (%wt)	Sulphur (%wt)
Before degradation	17.19 ± 0.30	53.15 ± 0.30	7.75 ± 0.13	0.59 ± 0.84
After degradation	16.37 ± 0.07	50.75 ± 0.04	7.63 ± 0.05	Not detected

Thus, it can be stated that several interesting side products are formed when *P. putida* is cultivated on waste chicken feathers. The first interesting product is the solid fraction remaining after fermentation- partially hydrolyzed feathers. This side product can be simply separated by filtration and it has potential use in animal feeding since partial hydrolysis of feathers keratin substantially improves its digestibility. For instance, Chayatip et al. used waste chicken feathers partially digested by *B. subtilis* to improve protein content of corn cob silage [23]. Nevertheless, it should be noted that a thorough evaluation may be necessary before a potential use of the partially hydrolyzed feathers as an animal feed, in order to meet legal requirements. This may include the nutritional value of this product as well as determining the safety issue. The positive aspect of intended process is GRAS (generally recognized as safe) status of *P. putida* KT2440 [24].

Filtrate after residual feathers removal by filtration can be further separated by centrifugation. The supernatant contains substantial amounts of active keratinase, which can be also considered being interesting product finding application at various industrial fields [4,25]. Hence, this is the first report suggesting *P. putida* KT2440 as promising candidate for keratinase production. Nevertheless, further experiments are needed to investigate basic characteristics of the keratinase and to evaluate its usability in various applications.

Last but not least, the sediment after filtrate centrifugation contains metabolically active cells of *P. putida*. As was mentioned above, the bacterial culture did not accumulate PHA during feathers degradation since nitrogen limitation was not induced. Nevertheless, metabolically active biomass after feathers degradation can be simply employed for *mcl*-PHA production. Therefore, we re-suspended bacterial cells after feathers degradation in two formulations of mineral media- with and without 1 g l<sup>-1</sup> of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sodium octanoate and waste frying oil were used as *mcl*-PHA precursor. PHA producing capacity of bacterial cells after feathers degradation was compared with control cultivation which was “traditionally” inoculated from overnight culture cultivated in NB medium, the results are demonstrated in Table 2.

During initial 24 h of cultivation, bacteria did not accumulate *mcl*-PHA regardless of presence or absence of nitrogen or bacterial cells origin. Nevertheless, when bacterial cells from feathers degradation were used, a higher initial amount of cells was introduced into the process (initial CDM was 0.15 and 0.7 g l<sup>-1</sup> for control and biomass stemming from feather biodegradation respectively-ly), which decreased consumption of carbon substrate for cell growth. After the first day of cultivation, bacterial cells started to accumulate *mcl*-PHA consisting exclusively of C6 and C8 monomers.

**Table 2.** Production of *mcl*-PHA by *Pseudomonas putida* cultures stemming from feather degradation process

		(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> in media	CDM (g l <sup>-1</sup> )	PHA (%wt)	PHA (g l <sup>-1</sup> )	C6 (%mol)	C8 (%mol)
24 h	Control	Yes	0.46 ± 0.08	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-
	Cells from feather degradation	Yes	1.29 ± 0.22	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-
	Cells from feather degradation	None	1.25 ± 0.15	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-	-
48 h	Control	Yes	1.45 ± 0.11	61.5 ± 4.31	0.89 ± 0.09	44.0	56.0
	Cells from feather degradation	Yes	2.34 ± 0.12	49.3 ± 6.58	1.15 ± 0.16	9.7	90.3
	Cells from feather degradation	None	2.60 ± 0.15	48.7 ± 4.31	1.26 ± 0.13	28.5	71.5
72 h	Control	Yes	1.37 ± 0.10	42.3 ± 3.10	0.58 ± 0.06	61.0	39.0
	Cells from feather degradation	Yes	1.95 ± 0.18	26.1 ± 2.57	0.51 ± 0.07	<i>n.d.</i>	100.0
	Cells from feather degradation	None	2.31 ± 0.30	61.4 ± 8.27	1.42 ± 0.27	27.2	72.8

CDM stands for cell dry mass, *n.d.*: not detected, results are in form: mean ± standard deviation

It should be noted that cells from feather degradation supplied with nitrogen produced almost exclusively poly(3-hydroxyoctanoate), while complete nitrogen limitation resulted in presence of about 30% mol of 3-hydroxyhexanoate in the copolymer structure. Actually, 3-

hydroxyoctoyl-CoA is preferred substrate for PHA synthase of *P. putida*; therefore, it is not surprising that the major constituent of *mcl*-PHA was 3-hydroxyoctanoate when the cells were cultivated in presence of octanoate [26]. The fact that strong nitrogen limitation increased the proportion of 3-



hydroxyhexanoate could be explained by the fact that nitrogen limitation stimulated action of enzymes which are responsible for conversion of S-3-hydroxacyl-CoA (stemming from  $\beta$ -oxidation of fatty acids) to R-3-hydroxacyl-CoA which can serve as a substrate for PHA synthase. Such an effect was recently reported by Mozejko-Ciesielska et al. [27] who observed that expression of all the enzymes involved in *mcl*-PHA biosynthesis in *P. putida* is up-regulated under nitrogen limitation. The highest PHA yields were observed in the bacterial culture originally used for feathers degradation which was cultivated in complete absence of nitrogen. In this case, bacterial biomass contained 61.4% wt of *mcl*-PHA per cell dry weight and *mcl*-PHA titers reached 1.42 g l<sup>-1</sup> which is about 2.4 fold more than yields in control cultivation. It is very likely that absence of nitrogen in the cultivation media strongly stimulated PHA accumulation. On the other side, this cultivation strategy cannot be applied in a traditional cultivation scenario in which presence of nitrogen for growth of biomass is a necessary condition to reach reasonable biomass and *mcl*-PHA yields.

#### 4. Conclusion

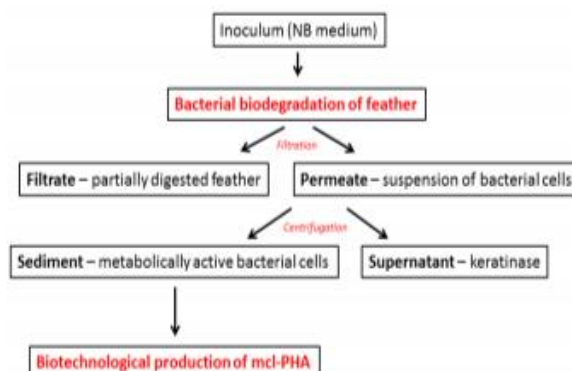
To sum up, the suggested process, which is schematically depicted in Fig. 4, advantageously interconnects waste feathers degradation enabling biomass growth and *mcl*-PHA accumulation, which can be performed in a separate step in complete absence of nitrogen directing the substrate very efficiently to the *mcl*-PHA biosynthetic pathway. The *mcl*-PHA content in bacterial cells can, therefore, reach very high values which is beneficial not only from the perspective of overall productivity, but high PHA content in biomass has also a positive impact on the cost of the isolation process [28]. Moreover, keratinase and partially digested chicken feathers are very interesting side products of the suggested process, which can be used for instance in the food and feed industry.

#### 5. Acknowledgements

This study was funded by the project "Materials Research Centre at FCH BUT- Sustainability and Development" No. LO1211 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic and by the project FCH-S-18-5334.

#### 6. Conflict of interest

All the authors declare that they have no conflict of interest.



**Figure 4.** Idea of interconnection of feather biodegradation and *mcl*-PHA production

#### References

- Taskin M, Ozkan B, Atici O, Aydogan MN. Utilization of chicken feather hydrolysate as a novel fermentation substrate for production of exopolysaccharide and mycelial biomass from edible mushroom *Morchella esculenta*. *Int J Food Sci Nutr*. 2011; 63(5):597-602. doi: 10.3109/09637486.2011.640309
- Stiborova H, Branska B, Vesela T, Lovecka P, Stranska M, Hajslova J, Jiru M, Patakova, Demnerovak K. Transformation of raw feather waste into digestible peptides and amino acids. *J Chem Technol Biotechnol*. 2016; 91(6):1629-1637. doi: 10.1002/jctb.4912
- Taskin M, Esim N, Ortucu S. Efficient production of l-lactic acid from chicken feather protein hydrolysate and sugar beet molasses by the newly isolated *Rhizopus oryzae* TS-61. *Food Bioprod Process*. 2012; 90(4):773-779. doi: 10.1016/j.fbp.2012.05.003
- Patinvoh RJ, Feuk-Lagerstedt E, Lundin M, Sarvari Horvath I, Taherzadeh MJ. Biological pretreatment of chicken feather and biogas production from total broth. *Appl Biochem Biotechnol*. 2016; 180(7):1401-1415. doi: 10.1007/s12010-016-2175-8
- Taskin M, Ozkan B, Atici O, Aydogan MN. Utilization of chicken feather hydrolysate as a novel fermentation substrate for production of exopolysaccharide and mycelial biomass from edible mushroom *Morchella esculenta*. *Int J Food Sci Nutr*. 2011; 63(5):597-602. doi: 10.3109/09637486.2011.640309
- Prakash S, Veeranagouda Y, Kyoung L, Sreeramulu K. Xylanase production using inexpensive agricultural wastes and its partial characterization from a halophilic *Chromohalobacter* sp. TPSV 101. *World J Microbiol Biotechnol*. 2009; 25(2):197-204. doi: 10.1007/s11274-008-9880-6
- Benesova P, Kucera D, Marova I, Obruca S. Chicken feather hydrolysate as an inexpensive complex nitrogen source for PHA production by *Cupriavidus necator* on waste frying oils. *Lett Appl Microbiol*. 2017; 65(2):182-188. doi: 10.1111/lam.12762
- Poole AJ, Church JS, Huson MG. Environmentally sustainable fibers from regenerated protein. *Biomacromolecules*. 2009; 10(1):1-8. doi: 10.1021/bm8010648

9. Kothari D, Rani A, Goyal A. Keratinases. In: Pandey A, Negi S, Soccol CR. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products. Amsterdam, Elsevier; 2017: 447-469.
10. Williams CM, Richter CS, Mackenzie, JR, JM, Shih JC. Isolation, identification, and characterization of a feather-degrading bacterium. *Appl Environ Microbiol.* 1990; 56 (6): 1509-1515.
11. Mohamad N, Phang L-ye, Abd-Aziz S. Optimization of metallo-keratinase production by *Pseudomonas* sp. LM19 as a potential enzyme for feather waste conversion. *Biocatal Biotransfor.* 2017; 35(1):41-50. doi: 10.1080/10242422.2017.1280031
12. Sharma R, Gupta R. Substrate specificity characterization of a thermostable keratinase from *Pseudomonas aeruginosa* KS-1. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2010; 37:785-792. doi: 10.1007/s10295-010-0723-8
13. Koller M, Marsalek L, de Sousa Dias MM, Braunegg G. Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. *New Biotechnol.* 2017; 37:24-38. doi: 10.1016/j.nbt.2016.05.001
14. Follonier S, Riesen R, Zinn M. Pilot-scale production of functionalized mcl-PHA from grape pomace supplemented with fatty acids. *Chem Biochem Eng Q.* 2015; 29(2): 113-121. doi: 10.15255/CABEQ.2014.2251
15. Borrero-de Acuna J, Bielecka A, Haussler S, Schobert M, Jahn M, Wittmann C, John D, Poblete-Castro I. Production of medium chain length polyhydroxyalkanoate in metabolic flux optimized *Pseudomonas putida*. *Microb Cell Fact.* 2014; 13(1): 88. doi: 10.1186/1475-2859-13-88
16. Escapa IF, del Cerro C, Garcia JL, Prieto MA. The role of GlpR repressor in *Pseudomonas putida* KT2440 growth and PHA production from glycerol. *Environ Microbiol.* 2013; 15(1): 93-110. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02790.x
17. Martins dos Santos VAP, Timmis KN, Tumbler B, Weinl C. Genomic Features of *Pseudomonas putida* Strain KT2440. In: Ramos JL. *Pseudomonas*. Boston, MA: Springer US; 2004: 77-112. doi: 10.1007/978-1-4419-9086-0\_3
18. Nikel PI, Chavarria M, Danchin A, de Lorenzo V. From dirt to industrial applications: *Pseudomonas putida* as a synthetic biology chassis for hosting harsh biochemical reactions. *Curr Opin Chem Biol.* 2016; 34:20-29. doi: 10.1016/j.cbpa.2016.05.011
19. Letourneau F, Soussotte V, Bressollier P, Branland P, Vemeuil B. Keratinolytic activity of *Streptomyces* sp. S.K1-02: A new isolated strain. *Lett Appl Microbiol.* 1998; 26(1): 77-80.
20. Obruca S, Snajdar O, Svoboda Z, Marova I. Application of random mutagenesis to enhance the production of polyhydroxyalkanoates by *Cupriavidus necator* H16 on waste frying oil. *World J Microbiol Biotechnol.* 2013; 29(12):2417-2428. doi: 10.1007/s11274-013-1410-5
21. Obruca S, Sedlacek P, Koller M, Kucera D, Pemicova I. Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. *Biotechnol Adv.* 2017; 36(3):856-870. doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.12.006
22. Swetlana N, Jain PC. Feather degradation by strains of *Bacillus* isolated from decomposing feathers. *Braz J Microbiol.* 2010; 41(1):196-200. doi: 10.1590/S1517-83822010000100028
23. Suttiniyom C, Yammuen-art S, Kanpiengjai A, Unban K, Khanongnuch C. Digestibility and protein content improvement of corncob silage using chicken feather partially digested by *Bacillus subtilis* G8. *Int J Agric Biol.* 2015; 17(06):1207-1212. doi: 10.17957/IJAB/14.0031
24. Loescheke A, Thies S. *Pseudomonas putida*-a versatile host for the production of natural products. *Appl Microbiol Biot.* 2015; 99(15):6197-6214. doi: 10.1007/s00253-015-6745-4
25. Gupta R, Ramnani P. Microbial keratinases and their prospective applications: An overview. *Appl Microbiol Biot.* 2006; 70(1):21-33. doi: 10.1007/s00253-005-0239-8
26. Sheu D-R, Lee C-Y. Altering the substrate specificity of polyhydroxyalkanoate synthase I derived from *Pseudomonas putida* GP01 by localized semirandom mutagenesis. *J Bacteriol.* 2004; 186(13):4177-4184. doi: 10.1128/JB.186.13.4177-4184.2004
27. Mozejko-Ciesielska J, Pokoj T, Ciesielski S. Transcriptome remodeling of *Pseudomonas putida* KT2440 during mcl-PHAs synthesis: Effect of different carbon sources and response to nitrogen stress. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2018; 45(6):433-446. doi: 10.1007/s10295-018-2042-4
28. Jacquelin N, Lo CW, Wei YH, Wu HS, Wang SS. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochem Eng J.* 2008; 39(1):15-27. doi: 10.1016/j.bej.2007.11.029



## 10.2. Production of polyhydroxyalkanoates on waste frying oil employing selected *Halomonas* strains

Bioresource Technology 292 (2019) 122028



Contents lists available at ScienceDirect

Bioresource Technology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biortech](http://www.elsevier.com/locate/biortech)



Short Communication

### Production of polyhydroxyalkanoates on waste frying oil employing selected *Halomonas* strains



Iva Pernicova<sup>a</sup>, Dan Kucera<sup>a</sup>, Jana Nebesarova<sup>b,c</sup>, Michal Kalina<sup>a</sup>, Ivana Novackova<sup>a</sup>,  
Martin Koller<sup>d,e</sup>, Stanislav Obruca<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Parkytnova 118, 612 00 Brno, Czech Republic

<sup>b</sup> Biology Centre, The Czech Academy of Sciences, v.v.i., Branišovska 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

<sup>c</sup> University of South Bohemia, Faculty of Science, Branišovska 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

<sup>d</sup> Institute of Chemistry, NAWI Graz, University of Graz, Heinrichstrasse 28/III, 8010 Graz, Austria

<sup>e</sup> ARENA Arbeitsgemeinschaft für Ressourcenschonende & Nachhaltige Technologien, Inffeldgasse 21b, 8010 Graz, Austria

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

*Halomonas* spp.  
Halophiles  
Lipids  
Polyhydroxyalkanoates  
Waste frying oil

#### ABSTRACT

The aim of this work was to study the potential of selected *Halomonas* species for conversion of waste frying oil into polyhydroxyalkanoates (PHA). In total nine *Halomonas* strains were experimentally screened for their capability of PHA production. Among them, *Halomonas neptunia* and *Halomonas hydrothermalis* were identified as potent PHA producers. Initial concentration of NaCl was identified as parameter influencing PHA yields as well as molecular weight of the polymer. In addition, *H. hydrothermalis* was capable of biosynthesis of a copolymer of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate P(3HB-co-3HV). When valerate was utilized as a precursor, the 3HV fraction in the copolymer reached high values of 50.15 mol.%. PHA production on lipid substrates by *Halomonas* has not been reported so far. Bearing in mind all the positive aspects of employing extremophiles in industrial biotechnology, *H. hydrothermalis* seems to be a very interesting halophilic strain for production of PHA using lipid substrates.

#### 1. Introduction

Microbial storage polyesters called polyhydroxyalkanoates (PHA) are attracting attention of the scientific community as ecologically acceptable alternatives to petrochemical polymers. Generally, PHA are accumulated intracellularly in form of granules by numerous prokaryotes. Despite their extraordinary properties such as biodegradability, biocompatibility and also the fact that PHA are produced from renewable resources ("biobased"), industrial production of PHA is still scarce; this is predominantly caused by their high production cost (Kumar et al., 2019). To reduce the price of PHA, there are many attempts to produce PHA from inexpensive waste substrates, especially food processing waste. In particular, lipid-based materials such as waste frying/cooking oil (Obruca et al., 2013), palm kernel oil (Loo et al., 2005) or lipids from animal processing industry (Riedel et al., 2015) are considered being promising substrates. *Cupriavidus necator* (formerly *Ralstonia eutropha*, *Wautersia eutropha* and *Alcaligenes eutrophus*) is usually employed for PHA production on lipids since it is capable of efficient utilization of triacylglycerols; further, implementing this strain for lipid-based PHA biosynthesis enables to reach very high product

titers and yields (Gieselski et al., 2015).

Another strategy which might help to reduce cost of biotechnological process was recently defined by Professor Chen as "Next Generation Industrial Biotechnology" (NGIB). This concept relies on extremophilic production strains which provide numerous benefits. In particular, processes based on extremophiles are resistant to microbial contamination, which might reduce sterility demands and also enables continuous mode of cultivation (Chen and Jiang, 2018). Especially halophiles are currently considered the "coming stars" for industrial biotechnology (Yin et al., 2015). Actually, PHA production was already described in numerous halophiles. This linkage of halophilicity and PHA accumulation might be attributed to the fact that PHA granules protect bacterial cells from adverse effect of osmolarity fluctuations; therefore, it can be expected that PHA biosynthesis is a positive feature during adaptation to hypertonic conditions and osmotic fluctuations (Sedlacek et al., 2019). Aside from robustness against microbial contamination, PHA production by halophiles provides additional advantages – crude materials can be isolated from bacterial cells by hypotonic lysis (Fernandez-Castillo et al., 1986), and compatible solutes (e.g., ectoines) helping halophiles to cope with hypertonic conditions

\* Corresponding author.

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

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122028>

Received 17 July 2019; Received in revised form 14 August 2019; Accepted 16 August 2019

Available online 18 August 2019

0960-8524/© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.



represent additional high value products (Kumar and Kim, 2018). Despite the fact that halophiles were reported to be capable of conversion of various inexpensive substrates into PHA, there is lack of reports describing capability of halophiles for valorization of lipid substrates; to our knowledge, only Kumar et al. reported that the halophile *Paracoccus* sp. strain LL1 can produce PHA on waste cooking oil (Kumar and Kim, 2019).

The genus *Halomonas* comprises gram-negative rod-shaped aerobic bacteria; some of them, such as *Halomonas halophila* (Kucera et al., 2018), *Halomonas boliviensis* (Guzmán et al., 2009) or *Halomonas bluephagensis* (Chen et al., 2017) are considered being very promising candidates for PHA production from sugar-based substrates; nevertheless, *Halomonas* species has not been studied for PHA production on lipids so far. Therefore, we decided to investigate whether selected members of the genus *Halomonas* can be employed for efficient biotechnological conversion of waste frying oil into polyhydroxyalkanoates.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microorganisms, cultivation and analysis of bacterial cells

*Halomonas elongata* CCM 3756, *H. halophila* CCM 3662, *H. halomphila* CCM 2833, *H. salina* CCM 4361, *H. organivorans* CCM 7142, *H. neptunia* CCM 7107, *H. hydrothermalis* CCM 7104, *H. meridiana* CCM 7105 and *H. axialensis* CCM 7103 were purchased from the Czech Collection of Microorganisms (CCM). The bacterial cultures were cultivated on Complex Nutrient Medium (CNM; peptone bacteriological 15 g/L, yeast extract 3 g/L, glucose 1 g/L, NaCl 66 g/L) and maintained as cryo-conserved cultures at  $-80^{\circ}\text{C}$  in the presence of 17 (w/v) % glycerol. For PHA production, a mineral medium (MM) reported elsewhere (Obruca et al., 2013) was applied, which was supplemented by 20 g/L waste frying oil (collected in University Canteen of Faculty of Chemistry, Brno University of Technology) and 60 g/L NaCl (unless stated otherwise). The waste frying oil consisted predominantly of rapeseed and sunflower oil. Basic parameters of the oil were determined as reported previously (Obruca et al., 2013): acid value 55.52; saponification value 187.14; iodine value 35.69, ester value 131.63; peroxide value 253.32. This medium was inoculated by 3 vol% of a 24 h old liquid culture grown on CNM. The production cultivations were performed in Erlenmeyer flasks (volume 250 mL) containing 100 mL of the cultivation media ( $30^{\circ}\text{C}$ , 200 rpm, 72 h). Influence of salinity on PHA production was assessed by application of various initial concentrations of NaCl (20, 40, 60, 80 and 100 g/L). Moreover, the strains' potential of production of PHA copolymers containing, apart from 3-hydroxybutyrate (3HB), also 3-hydroxyvalerate (3HV) or 4-hydroxybutyrate (4HB) building blocks was investigated by application of suitable structurally related precursors (n-propanol, sodium propionate, valeric acid, levulinic acid (3HV precursors),  $\gamma$ -butyrolactone and 1,4-butanediol (4HB precursors); final precursor concentration in medium amounted to 2 g/L) to the culture after 24 h of cultivation in MM medium with 20 g/L waste frying oil. All the cultivations were performed in parallel, and each cultivation setup was performed and analyzed in triplicate. Bacterial cells were analyzed by Transmission Electron Microscopy (TEM) according to a protocol described elsewhere (Sedlacek et al., 2019). The biomass concentration was determined gravimetrically and the PHA content in cells was analysed by Gas Chromatography as reported previously (Obruca et al., 2013). Cultivations were performed in duplicate and analyzed in triplicate. Molecular weight of isolated PHA samples was analyzed by Size Exclusion Chromatography coupled with Multi-Angle Light Scattering and Differential Refractometry as described previously (Kucera et al., 2018).

**Table 1**

Capabilities of various *Halomonas* strains to produce PHA on waste frying oil (shaking flask scale; 72 h, 180 rpm,  $30^{\circ}\text{C}$ ).

	CDM [g/L]	PHB [% per CDM]	PHB [g/L]
<i>H. halophila</i>	0.98 $\pm$ 0.03	0.38 $\pm$ 0.09	0.01
<i>H. hydrothermalis</i>	1.60 $\pm$ 0.14	23.76 $\pm$ 1.69	0.38
<i>H. axialensis</i>	0.73 $\pm$ 0.01	2.18 $\pm$ 0.22	0.02
<i>H. elongata</i>	0.30 $\pm$ 0.06	n.d.	n.d.
<i>H. neptunia</i>	2.90 $\pm$ 0.14	23.12 $\pm$ 0.48	0.67
<i>H. organivorans</i>	1.26 $\pm$ 0.08	11.88 $\pm$ 0.17	0.15
<i>H. salina</i>	0.47 $\pm$ 0.15	0.66 $\pm$ 0.33	0.01
<i>H. meridiana</i>	0.28 $\pm$ 0.00	2.96 $\pm$ 0.00	0.01
<i>H. halomphila</i>	0.93 $\pm$ 0.02	n.d.	n.d.

The concentration of NaCl in the medium was set to optimal salinity according to Czech Collection of Microorganisms as follow: 30 g/L *H. elongata*; 60 g/L *H. halophila* and *H. halomphila*, the rest of the cultures were cultivated at NaCl 81 g/L.

CDM stands for cell dry mass and n.d. stands for Not Detected.

The results are presented as mean  $\pm$  standard deviation.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Experimental screening of *Halomonas* species capable of producing PHA on waste frying oil

At first, the potential of selected *Halomonas* strains to grow and produce PHA in simple mineral medium with waste frying oil as the sole carbon source was evaluated; the results are provided in Table 1. Actually, most of the cultures were capable to utilize oil for growth; nevertheless, in most of the cultures, the growth was rather low, and the same can be stated about PHA accumulation, since the PHA content in most of the cultures did not exceed 2.5% of cell dry mass (CDM). Nevertheless, three bacterial cultures, namely *H. hydrothermalis*, *H. neptunia* and *H. organivorans* revealed rather good growth and also considerable PHA content in bacterial biomass. In *H. hydrothermalis* and *H. neptunia*, the PHA content in biomass exceeded 25% of CDM, which is a promising result. Both strains accumulated exclusively polymer consisting of 3HB monomer units, hence, the homopolymer poly(3-hydroxybutyrate) (PHB). Because these two organisms were identified as most auspicious potential halophilic PHA producers among the investigated candidates, they were investigated further. Both *H. hydrothermalis* and *H. neptunia* were originally isolated from deep-sea hydrothermal-vent environments (Kaye et al., 2004). *H. hydrothermalis* was also isolated from sea at West Coast of India based on its ability to utilize *Jatropha* biodiesel byproduct (predominantly crude glycerol phase) for PHA biosynthesis (Shrivastav et al., 2010); this strain was deposited as MTCC 5445 and its genome was completely sequenced (Vamsi Bharadwaj et al., 2015). To our best knowledge, there is no previous report on PHA production by *H. neptunia*.

TEM pictures showed the morphology of both cultures after 72 h cultivation in mineral medium with waste frying oil as a sole carbon source. It can be seen that both cultures contain substantial amounts of PHA granules. The appearance of *H. neptunia* cells is typical for PHA producing cells, and comparable for instance with *C. necator* (Sedlacek et al., 2019) or *H. halophila* (Kucera et al., 2018); each cell contains a few (5–15) relatively large granules. Contrarily, *H. hydrothermalis* reveals a unique morphology of PHA granules since each cell contains a remarkably high number (more than 25) of granules with substantially lower diameter than in *H. neptunia*. It is well known that the size and number of PHA granules in *C. necator* and other PHA producers is determined by expression of PhaP proteins, also called phasins. These small proteins cover the surface of PHA granules and represent the interface between the hydrophilic cytoplasm and the rather hydrophobic polymer core, which prevents granules from aggregation. It has been demonstrated that deletion of genes encoding for PhaP results in formation of one big granule (and PHA synthesis is generally inhibited),



while overexpression of PhaP led to synthesis of an increased number of very small PHB granules (Jendrossek, 2009). Hence, it seems that *H. hydrothermalis* reveals high a level of PhaP expression when cultivated on waste frying oil as substrate; nevertheless, this statement needs experimental approval in follow-up studies. Furthermore, there is one more detail which deserves attention. In cells containing a lower number of PHA granules, the granules are localized in close vicinity in the cytoplasm, leaving an “empty space” in the central part of the bacterial cells, while PHA granules are assembled in a way resembling a pearl necklace. This is in contrast to common PHA producers like *C. necator* (Sedlacek et al., 2019) or *H. halophila* (Kucera et al., 2018), which feature a rather homogenous distribution of PHA granules in the cytoplasmic space. Indeed, this intracellular organization of *H. hydrothermalis* deserves further investigation.

### 3.2. PHA production by *Halomonas hydrothermalis* and *Halomonas neptunia*

Further, we decided to investigate the effect of salinity of the cultivation medium on PHA production by *H. hydrothermalis* and *H. neptunia*, since in our previous work (Kucera et al., 2018) we observed that NaCl concentration strongly affects not only PHA yields, but, surprisingly, also molecular weight and molecular weight distribution of the polymer in *H. halophila*. The higher NaCl concentration was applied, the higher molecular weight of the polymer was acquired. Hence, both cultures were cultivated in NaCl concentration of 40, 60, 80 and 100 g/L with waste frying oil used as the sole carbon source; results are shown in Table 2. It should be noted that in the initial screening cultivation (results in Table 1) both cultures were cultivated at a NaCl concentration of 80 g/L. For *H. hydrothermalis* it can be seen that decreasing NaCl concentration to 40 g/L has a strongly positive effect on biomass growth as well as on PHB accumulation in cells. PHB content in biomass reached 62% of CDM, and the PHB titer achieved 2.26 g/L, which is more than the six-fold concentration obtained in the initial reference experiment with 80 g/L NaCl. *H. neptunia* seems to prefer higher salinity, since the highest productivity for this strain was achieved at 60 g/L NaCl, when PHB content in cells reached 56% of CDM, and the PHB concentration amounted to 1.27 g/L. Obviously, optimization of the salinity of the cultivation media considerably enhanced productivity of both cultures. It should be noted that the PHA concentrations gained in this work for both strains are substantially higher than the values achieved by Kumar and Kim, who employed the halophilic strain *Paracoccus* sp. strain LL1 for PHA production on waste frying oil; in these experiments, only 1 g/L of PHB were obtained (Kumar and Kim, 2019), which indicates extraordinary potential of *H. hydrothermalis*. Moreover, in *H. hydrothermalis*, a decrease in NaCl concentration, apart from improved productivity, also resulted in substantial increase in weight average molecular weight ( $M_w$ ) of the produced polymer (from 245 kDa at 100 g/L NaCl to 381 kDa at 40 g/L NaCl), which is also a very positive feature regarding future thermal processing of this material, where high molecular weight is desired. This trend is opposite to the correlation of salinity and  $M_w$  of the PHA observed in *H. halophila*,

where higher salinity by trend favored higher molecular weight (Kucera et al., 2018). For *H. neptunia*, we observed high fluctuations in  $M_w$  of the polymer at various salinities instead of being able to identify a reasonable trend correlation. Based on these results, *H. hydrothermalis* seems to be a superior PHA producer to *H. neptunia*, since it provides higher product titers, and molecular weight of the polymer can be tailored by controlling NaCl concentration.

The capacity of both species to produce PHA copolymers was investigated as well. PHB homopolymer is a highly crystalline material with very limited flexibility and high melting temperature, which is close to its temperature of degradation (Kamioka and Doi, 1990); this narrow temperature window, together with the high crystallinity and brittleness of PHB, complicates its processing and reduces its application potential. These material disadvantages can be overcome by incorporation of other monomers units such as 4HB or 3HV into the polymer's structure. Resulting copolymers reveal lower melting temperature, substantially reduced crystallinity and overall superior properties as compared to PHB homopolymer. Incorporation of 4HB or 3HV into PHA can be achieved by feeding the bacterial culture with suitable precursors such as 1,4-butanediol or  $\gamma$ -butyrolactone in case of 4HB, or precursors with odd carbon number such as n-propanol, propionic, valeric or levulinic acid for 3HV introduction (Koller et al., 2017). We have tested these precursors; the results are demonstrated in Table 3. Unfortunately, none of the cultures was capable of incorporating 4HB units. On the contrary, *H. hydrothermalis* was able to produce P(3HB-co-3HV) copolymer when n-propanol, propionate or valerate were added to the cultivation media. Especially when valerate was used as 3HV precursor, the 3HV fraction in the copolymer reached a very high value of 50 mol%. Precursors of 3HV usually demonstrate antimicrobial properties; therefore, application of 3HV precursors inhibits biomass growth and decreases PHA yields and frequently also molecular weight of the polymers. What can be considered as positive is the fact that application of the tested precursors decreased PHA titers only rather slightly in comparison to the control setup (culture without precursor added); the lowest inhibitory effect was observed for valerate. Moreover, if valerate was used as 3HV precursor, 3HV portion in the copolymer reached the highest value, and  $M_w$  was increased as compared to control. On the contrary, *H. hydrothermalis* was not capable of incorporation of levulinic acid into P(3HB-co-3HV) polyesters when cultivated on waste frying oil, which is in contrast to results of (Bera et al., 2015), who utilized crude levulinic acid as a 3HV precursor for P(3HB-co-3HV) biosynthesis employing their isolate designed as *H. hydrothermalis* MTCC 5445, or for the halotolerant strain *Hydrogenophaga pseudoflava*, which was reported to be an expedient P(3HB-co-3HV) producer when supplied with whey as main carbon source and levulinic acid as 3HV precursor (Koller et al., 2017). It is likely that the different strains (subspecies) of *H. hydrothermalis* vary in capability of levulinic acid metabolization. Growth and PHA biosynthesis of *H. neptunia* were severely inhibited by all the applied 3HV precursors; application of valerate even completely prevented PHA biosynthesis. When n-propanol or propionate were applied, *H. neptunia* was capable to produce P(3HB-co-3HV) copolymers with relatively high 3HV fractions (29.5 and

**Table 2**  
Influence of salinity on PHB production by *H. hydrothermalis* and *H. neptunia*.

	NaCl [g/L]	CDM [g/L]	PHB [% per CDM]	PHB [g/L]	$M_w$ [kDa]	$\bar{D}$
<i>H. hydrothermalis</i>	40	3.64 ± 0.01	61.98 ± 0.60	2.26	381.77	1.17
	60	3.33 ± 0.16	56.11 ± 1.61	1.87	381.29	1.22
	80	2.46 ± 0.13	48.84 ± 0.99	1.20	262.39	1.19
	100	1.90 ± 0.02	38.38 ± 0.52	0.73	245.15	1.28
<i>H. neptunia</i>	40	2.07 ± 0.01	51.63 ± 1.04	1.07	284.93	1.18
	60	2.28 ± 0.03	55.71 ± 1.60	1.27	293.10	1.26
	80	2.24 ± 0.05	50.71 ± 0.55	1.13	230.78	1.21
	100	0.88 ± 0.02	15.63 ± 0.53	0.14	345.47	1.16

The results are presented as mean ± standard deviation.



**Table 3**  
Production of PHA copolymers from selected precursors of 3HV and 4HB.

		CDM [g/L]	PHA [% of CDM]	3HV [mol.%]	PHA [g/L]	$M_w$ [kDa]	$D$
<i>H. hydrothermalis</i>	Control	3.22 ± 0.06	59.87	0.00	1.93	253.63	1.17
	n-Propanol	2.19 ± 0.00	69.86	8.44	1.53	93.91	2.08
	Propionate	2.75 ± 0.20	47.17	7.16	1.29	217.77	1.17
	Valerate	2.34 ± 0.03	68.83	50.15	1.61	410.93	1.19
	Levulinic acid	2.56 ± 0.17	63.55	0.00	1.63	348.99	1.12
	γ-Butyrolactone	3.52 ± 0.04	64.20	0.00	2.26	262.76	1.18
	1,4-Butanediol	3.25 ± 0.12	48.60	0.00	1.58	217.96	1.26
<i>H. neptunia</i>	Control	1.53 ± 0.14	39.97	0.00	0.61	n.a.	n.a.
	n-Propanol	0.54 ± 0.05	23.66	29.50	0.13	n.a.	n.a.
	Propionate	1.23 ± 0.09	15.85	26.07	0.19	n.a.	n.a.
	Valerate	0.56 ± 0.05	n.d.	n.d.	n.d.	n.a.	n.a.
	Levulinic acid	0.47 ± 0.00	14.62	0.00	0.07	n.a.	n.a.
	γ-Butyrolactone	1.40 ± 0.14	39.48	0.00	0.55	n.a.	n.a.
	1,4-Butanediol	1.49 ± 0.04	34.87	0.00	0.52	n.a.	n.a.

Control: No 3HV or 4HB precursor added.

n.a.: not analyzed.

$D$ : Polydispersity ( $M_w/M_n$ ).

The results are presented as mean ± standard deviation.

26.5 mol.% of 3HV for n-propanol and propionate, respectively); nevertheless, the polymer yields were very low. This indicates that *H. neptunia* is very sensitive to the inhibitory effect of 3HV precursors, which further substantiates our previous statement that *H. hydrothermalis* constitutes a more promising PHA producer than *H. neptunia*.

#### 4. Conclusions

*H. hydrothermalis* is an interesting strain for production of PHA on waste frying oil and other lipids. It provided high PHA titers, high PHA content in biomass, the molecular weight of the polymer can be controlled by adapting the NaCl concentration, the strain is robust against negative effects of 3HV precursors, and it is capable to efficiently incorporate 3HV building blocks into the polymer structure. Therefore, *H. hydrothermalis* can be considered being a definitely auspicious candidate for PHA production from waste frying oil and other inexpensive lipids, further experiments will be focused on optimization of cultivation parameters in laboratory bioreactors.

#### Funding

This study was funded by the project GA19-20697S of the Czech Science Foundation (GACR). Further, Ivana Novackova is Brno Ph.D. Talent Scholarship Holder – Funded by the Brno City Municipality, Czech Republic.

#### 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.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary materials provide TEM analysis of the PHA granules containing cells of *H. neptunia* and *H. hydrothermalis*. Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122028>.

#### References

Bera, A., Dubey, S., Bhayani, K., Mondal, D., Mishra, S., Ghosh, P.K., 2015. Microbial synthesis of polyhydroxyalkanoate using seaweed-derived crude levulinic acid as co-nutrient. *Int. J. Biol. Macromol.* 72, 487–494.

Chen, G.Q., Jiang, X.B., 2018. Next generation industrial biotechnology based on

extremophilic bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 50, 94–100.

Chen, X., Yin, J., Ye, J., Zhang, H., Che, X., Ma, Y., Li, M., Wu, L.-P., Chen, G.-Q., 2017. Engineering *Halomonas blattbergensis* T001 for non-sterile production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Bioresour. Technol.* 244, 534–541.

Ciesielski, S., Mozejko, J., Piotrowski, N., 2015. Plant oils as promising substrates for polyhydroxyalkanoates production. *J. Clean. Prod.* 106, 408–421.

Fernandez-Castillo, R., Rodriguez-Valera, F., Gonzalez-Ramos, J., Ruiz-Berruano, F., 1986. Accumulation of poly(β-hydroxybutyrate) by halobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 214–216.

Guzmán, H., Van-Thuc, D., Martín, J., Herrero-Kauf, R., Quillaguamán, J., 2009. A process for the production of ectoine and poly(3-hydroxybutyrate) by *Halomonas boliviensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84, 1069–1077.

Jendroszek, D., 2009. Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). *J. Bacteriol.* 191, 3195–3202.

Kaye, J.Z., Miquez, M.C., Ventosa, A., Barot, J.A., 2004. *Halomonas neptunia* sp. nov., *Halomonas sulfidaria* sp. nov., *Halomonas aridulensis* sp. nov. and *Halomonas hydrothermalis* sp. nov.: halophilic bacteria isolated from deep-sea hydrothermal-vent environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 499–511.

Koller, M., Hesse, P., Faul, H., Stuber, F., Brauneberg, G., 2017. Study on the effect of levulinic acid on whey-based biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Hydrogobacterium pseudoflavum*. *Appl. Food Biotechnol.* 4, 65–78.

Kucera, D., Pomicová, I., Kovalek, A., Koller, M., Mullerova, L., Sedláček, P., Mravec, F., Nebesarova, J., Kalina, M., Masrva, 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, B.S., 2018. Valorization of polyhydroxyalkanoates production process by co-synthesis of value-added products. *Bioresour. Technol.* 269, 544–556.

Kumar, P., Kim, B.S., 2019. *Purissius* sp. strain LL1 as a single cell factory for the conversion of waste cooking oil to polyhydroxyalkanoates and carotenoids. *Appl. Food Biotechnol.* 6, 33–60.

Kumar, G., Ponnusamy, V.K., Bhosale, R.B., Shekhani, S., Yoon, J.-J., Bhatia, S.K., Rajesh Bana, J., Kim, S.-H., 2019. A review on the conversion of volatile fatty acids to polyhydroxyalkanoates using dark fermentative effluents from hydrogen production. *Bioresour. Technol.* 287, 121427.

Kuziova, M., Doi, Y., 1990. Thermal degradation of microbial copolymers: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Macromolecules* 23, 1933–1936.

Lo, C.Y., Lee, W.H., Tunge, T., Doi, Y., Sudeh, K., 2005. Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxybenzoate) from palm oil products in a *Wastococcus oerophus* mutant. *Biotechnol. Lett.* 27, 1405–10.

Obruca, S., Snajdar, O., Svoboda, Z., Masrva, I., 2013. Application of random mutagenesis to enhance the production of polyhydroxyalkanoates by *Capsiella necator* H16 on waste frying oil. *World J. Microb. Biotechnol.* 29, 2417–2428.

Riedel, S.L., Jahn, S., Koenig, S., Sock, M.C.E., Brigham, C.J., Bader, J., Stahl, U., 2015. Polyhydroxyalkanoates production with *Rubonia oerophus* from low quality waste animal fats. *J. Biotechnol.* 214, 119–127.

Sedláček, P., Slaninova, E., Koller, M., Nebesarova, J., Masrva, I., Krzyzaneck, V., Obruca, S., 2019. PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances. *New Biotechnol.* 49, 129–136.

Shrivastava, A., Mishra, S.K., Shethia, B., Pancha, I., Jain, D., Mishra, S., 2010. Isolation of promising bacterial strains from soil and marine environment for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production utilizing *Latopha* biodiesel byproduct. *Int. J. Biol. Macromol.* 47, 283–287.

Vasni Bharadwaj, S.V., Shrivastava, A., Dubey, S., Ghosh, T., Palival, C., Maurya, R., Mishra, S., 2015. Draft genome sequence of *Halomonas hydrothermalis* MTCC 5445, isolated from the west coast of India. *Genome Announc.* 3, e01419–e1514.

Yin, J., Chen, J.C., Wu, Q., Chen, G.Q., 2015. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 33, 1433–1442.



## 10.3. Application of osmotic challenge for enrichment of microbial consortia in polyhydroxyalkanoates producing thermophilic and thermotolerant bacteria and their subsequent isolation

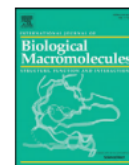
International Journal of Biological Macromolecules 144 (2020) 698–704



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>



### Application of osmotic challenge for enrichment of microbial consortia in polyhydroxyalkanoates producing thermophilic and thermotolerant bacteria and their subsequent isolation



Iva Pernicova<sup>a</sup>, Ivana Novackova<sup>a</sup>, Petr Sedlacek<sup>a</sup>, Xenie Kourilova<sup>a</sup>, Martin Koller<sup>b,c</sup>, Stanislav Obruca<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkynova 118, 612 00 Brno, Czech Republic

<sup>b</sup> Institute of Chemistry, NAWI Graz, University of Graz, Heinrichstrasse 28/VI, 8010 Graz, Austria

<sup>c</sup> ARENA Arbeitsgemeinschaft für Ressourcenschonende & Nachhaltige Technologien, Inffeldgasse 21b, 8010 Graz, Austria

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 30 October 2019

Received in revised form 4 December 2019

Accepted 15 December 2019

Available online 16 December 2019

##### Keywords:

Polyhydroxyalkanoates

Enrichment

Isolation of bacteria

Osmotic challenge

Thermophiles

#### ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates are microbial polyesters which are considered being biological alternatives to petrochemical polymers. Extremophiles, such as thermophilic PHA producers, hold promise to improve competitiveness of PHA production process. Therefore, this work aimed at isolation of new strains, which could produce PHA under elevated temperature. Since traditional Nile red staining of colonies provided false positive results in thermophiles, we developed a novel strategy of enriching microbial consortia by PHA producers. This so called “osmoselective strategy” is based on application of osmotic challenge by sudden exposition of the mixed microbial culture to hypertonic and subsequently to hypotonic conditions; moreover, this strategy relies on the fact that PHA protect bacteria from negative effects of rapid fluctuations in osmotic pressure. In combination with fast and reliable ATR-FTIR inspection of selected colonies for presence of PHA, we were able to isolate several promising thermophilic or thermotolerant PHA producing strains belonging to the genera *Bacillus*, *Aneurinibacillus* and *Chelatococcus*, which indeed deserves further investigation to evaluate their potential for industrial production of PHA.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are microbial polyesters which are accumulated by a wide range of prokaryotes primarily as carbon and energy storage materials; in addition to this primary function, it has been recently stressed out that capability of PHA accumulation enhances robustness of bacterial cells against numerous stress factors [1]. Due to their properties which resemble petrochemical plastics, PHA are considered being bio-based and also biodegradable competitors of petrochemical polymers. Nevertheless, PHA are disadvantaged by high cost of their biotechnological production, which is reflected in their final price [2,3]. Therefore, Chen and Jiang suggested the concept of “Next Generation Industrial Biotechnology (NGIB)” to overcome problems associated with weaknesses of traditional biotechnological strategies. Principally, NGIB processes employ extremophiles as producing microorganisms and take advantage of their unique capabilities to live and prosper under extreme conditions, which prevents the cultivation process from microbial contamination and provides also many additional benefits [4,5].

We have recently reported that PHA accumulation capability enhances the survival rate of bacteria when exposed to osmotic up-shock [6] and also subsequent down-shock [7]. Our observations suggest that PHA are involved in osmotic resistance of bacteria, and that PHA accumulation capacity of cells can be considered being a potential adaptation strategy to cope with highly saline environments. This is also substantiated by the fact that numerous halophiles including halotolerant and extremely halophilic Archaea are proficient PHA producers, capable of reaching high PHA contents in the cells [8]. In context of NGIB, it should be pointed out that numerous halophiles such as *Haloferax mediterranei* [9], *Halomonas halophila* [10] or *Halomonas bluephagenesis* [11] are considered being promising candidates for industrial production of PHA according to the NGIB concept. The main obstacle in using halophiles is that they require introduction of high amounts of NaCl in cultivation media, which represents an additional cost factor (cost for salt, and cost for post-cultivation disposal of the highly saline spent cultivation medium) and complicates wastewater management. Of course, salt can be recycled and reused [12], but this procedure substantially complicates the process. Moreover, the high salt concentration has a massive corrosive effect, which reduces the lifespan of the bioreactors and other equipment, which calls for development of more expensive bioreactor materials [13,14].

\* Corresponding author.

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

From a similar point of view, the main problem associated with thermophiles could be that the process must be operated at elevated temperatures, which, at a first glance, seems to be an energy-demanding approach. Nevertheless, thermophilic processes might be of expedient energy efficiency, since only minor energy efforts for cooling demands are needed. Moreover, such thermophilic cultivations, especially in large scale fermentations, can be operated as “self-heating systems” because of the heat energy generated by the microbial metabolism. In addition, also the stirring system of the bioreactor generates heat energy. Hence, these manifold effects allow reducing both heating and cooling expenses. However, PHA production capability was reported only for a limited number of thermophiles such as *Chelatococcus thermostellatus* [15], *Thermus thermophilus* [16], *Caldimonas taiwanensis* [17], or *Aneurimibacillus* sp. [18].

Therefore, we decided to focus on isolation of thermophilic PHA producers from mixed microbial consortia. Nevertheless, in our experimental attempts employing a conventional technique based on identification of PHA-positive colonies by Nile Red fluorescence staining [19], we have found out that this experimental approach is not reliable for thermophilic strains. Actually, most of isolates revealed very intensive positive Nile Red staining, but no PHA accumulation. Therefore, we developed a novel enrichment technique, which is based on our previous observation that PHA accumulation enhances survival rate of bacteria when exposed to sudden hypertonic and subsequent hypotonic environments. In combination with quick and reliable ATR-FTIR analysis to determine PHA presence in individual colonies, we developed a powerful methodology enabling us to isolate PHA thermophilic or thermotolerant PHA producers from mixed microbial consortia (Fig. 1).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Utilization of osmotic challenge for isolation of PHA producing thermophiles

Activated sludge from the Brno-Modřice wastewater treatment plant, Czech Republic, was washed by distilled water. After that, 2 mL of washed activated sludge has been added to 100 mL of mineral salt media (MSM) which consists of (g/L):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ , 9.0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.2;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1.0;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.02;  $\text{Fe}^{(III)}\text{NH}_4\text{citrate}$ , 0.0012; yeast extract, 0.5 with 20 g/L glycerol as sole carbon source. The MSM included 1 mL/L microelements solution (MES), which contains (g/L): EDTA, 50.0;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 13.8;  $\text{ZnCl}_2$ , 0.84;  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.13;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.1;  $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.016;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.1; dissolved in distilled water. The cultivation was carried out for 48 h at 50 °C with shaking at 190 rpm. After 48 h, 10% of the culture was used to inoculate fresh MSM medium. After another 48 h of incubation and shaking at 50 °C, a

selection of PHA production bacteria was carried out using osmotic stress according to the following protocol:

10 mL of culture has been transferred into a sterile centrifugation tube. This cultivation broth was centrifuged (6000  $\times$ g, 5 min.) and, subsequently, the generated cell pellet was re-suspended in a sterile solution of 100 g/L NaCl and incubated for 10 min at 50 °C and shaking at 190 rpm. After that, the saline cell suspension was centrifuged again, the supernatant was removed and the remaining cell pellet was re-suspended in 10 mL distilled water. The suspension thus generated was incubated at 50 °C for 10 min and shaken at 190 rpm. After that, 100  $\mu\text{L}$  of the culture was homogeneously spread on Petri dishes with mineral medium containing glycerol (20 g/L) solidified with agar-agar (1.7 wt%). Cultivation in an incubator was carried out for 48 h at 50 °C. Individual colonies were tested for the presence of PHA using ATR-FTIR. Colonies which were evaluated as PHA positive were transferred onto fresh MSM dishes and purified to generate axenic cultures. After that, the cultures were inoculated into liquid MSM, and cultivated for 24 h at 50 °C; stirring was set at 190 rpm and, finally, cultures were stored in cryo-tubes in 10 vol% glycerol as cryo-protectant at  $-80$  °C.

### 2.2. ATR-FTIR inspection of presence of PHA in colonies

For identification of PHA-positive colonies, the FTIR spectrum was taken for every single tested colony using Nicolet iS50 FTIR spectrometer (Thermo Scientific) equipped with a built-in module for attenuated total reflectance (ATR) measurement. Cotton swabs were used to take a sample of biomass from the tested bacterial colony grown on the Petri dish and to transfer it to the surface of the single-reflection diamond ATR crystal. The FTIR spectrum was previewed in the OMNIC 9 software (Collect preview function) for an on-line monitoring of a free evaporation of water from the biomass sample. After the evaporation was completed (2–3 min), presence/absence of PHA in the biomass was resolved either directly from the spectral preview, or the representative FTIR spectrum was recorded as an average of 32 scans in the frequency range 4000–400  $\text{cm}^{-1}$  with spectral resolution of 1  $\text{cm}^{-1}$ .

### 2.3. Molecular analysis of isolates

Heating lyses was used for DNA extraction. A small amount of culture from Petri dishes has been added to the lyses buffer (5 mM TrisHCl, pH 8.5) and heated to 95 °C for 10 min. After heating, lyses tubes were centrifuged, and the supernatant was used as DNA template.

PCR for detection of bacterial DNA and taxonomy (16S rRNA) was performed using the forward primer 16S-F (5'-AAGAGTTTGATCCTGG CTCAG-3') and the reverse primer 16S-R (5'-GGTACCTGTACCA CTT-3'). The PCR mixture consisted of 12.5  $\mu\text{L}$  One TaqTM Hot Start 2 $\times$  Master Mix with Standard Buffer, 2.6  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$ , 2  $\mu\text{L}$  DNA template,

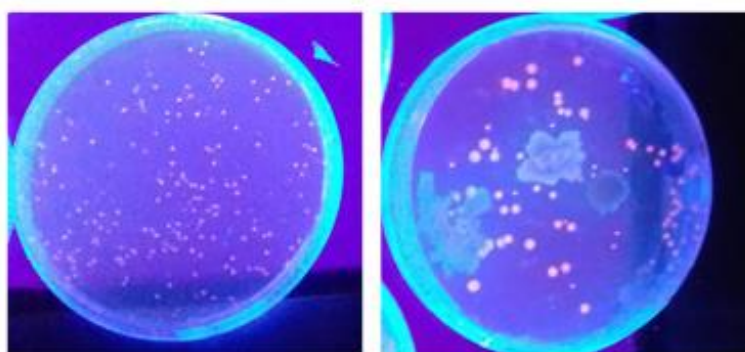


Fig. 1. Examples of Nile Red staining-positive colonies of thermophilic and/or thermotolerant bacteria isolated from active sludge at 50 °C which, in realities, were unable of PHA biosynthesis.



0.2  $\mu\text{M}$  of each primer and volume added to 25  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ . This PCR mixture was heated at 94  $^\circ\text{C}$  for 30 s. The PCR cycle consisted of three steps: denaturation 30 s at 94  $^\circ\text{C}$ , annealing 30 s at 55  $^\circ\text{C}$  and extension 90 s at 68  $^\circ\text{C}$ . This cycle was repeated 30 times, the last extension step was extended for 5 min at 68  $^\circ\text{C}$ . The PCR amplicon was detected by 2% agarose gel electrophoresis with 1 $\times$  TBE. PCR products of 16S rRNA gene were purified using the NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit and sent for commercial sequencing (SEQme, Czech Republic). The taxonomic classification was evaluated using the blast NCBI database (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

#### 2.4. Production of PHA by selected isolates

At first, the cultures were grown in Nutrient Broth (10 g/L beef extract, 10 g/L peptone, 5 g/L NaCl) at 50  $^\circ\text{C}$  under permanent shaking (190 rpm); overnight cultures were used as inoculum for PHA production experiments. Mineral Salt Medium (MSM) with 20 g/L glycerol and 1 mL/L of Microelement Solution (MES) was used as production medium. The volume of the inoculum culture was 10% (v/v) of the volume of the cultivation medium. The cultivations were performed at 50  $^\circ\text{C}$  and 60  $^\circ\text{C}$  under permanent shaking (190 rpm), the cultivations were finished after 72 h. All the cultivations were performed in duplicate. After cultivation, cells were harvested by centrifugation (8000  $\times$ g, 5 min). Biomass was determined gravimetrically as the cell dry mass (CDM), and the amount of PHA in dry cells was analyzed by Gas Chromatography as reported previously [20].

### 3. Results and discussion

Spiekermann et al. described that application of Nile red into agar-solidified medium can be used to distinguish PHA producing colonies from their PHA negative counterparts [19]. This approach has been subsequently used by many groups for isolation of PHA producers from various microbial consortia. Nevertheless, we experienced that this method is not really universal since it cannot be employed for isolation of PHA producing bacteria from any microbial consortia. We tried employing this conventional methodology for isolation of thermophilic or thermotolerant (capable of growing at 50  $^\circ\text{C}$ ) PHA producing strains from various sources such as activate sludge or compost. On Petri dishes we observed numerous colonies which revealed very bright fluorescence, which is usually considered being an undisputable marker of presence of PHA granules in cells. Nevertheless, when we tested these colonies for capability to PHA production and for presence of *phaC* genes encoding for PHA synthase (key enzyme required for PHA biosynthesis), we have neither detected any traceable amount of PHA in bacterial biomass nor *phaC* genes. After many trials, we have realized that positive Nile red staining in bacteria adapted to higher temperatures is not primarily associated with presence of PHA. In other words, Nile Red staining on Petri dishes gave false positive results with thermophiles and/or thermotolerant bacteria, which might be caused, for instance, by presence of unusual lipids like wax esters in thermophiles, which also provide positive Nile Red staining [21–23]. This is in accordance to previously published literature reporting that this method is hardly applicable to trace Gram-positive bacteria due to the significant adsorption of Nile red by the cell wall of such species [24].

Therefore, since we could not rely on Nile Red-based selection of PHA-positive colonies, we had to look for an alternative approach. Indeed, there are some methods, which can be used for enrichment of PHA producers in mixed microbial cultures; the most frequently used among them being dynamic feeding, also called the feast-and-famine cycling. In this methodological approach, a mixed microbial culture is repeatedly exposed to periods of ample availability of external carbon substrate (feast phase), followed by periods of starvation (famine phase). Since the strains capable of PHA production are able to survive starvation periods better than their PHA negative counterparts, the microbial culture gets enriched in PHA positive strains. This general

approach is usually used for production of PHA in non-sterile mode using mixed microbial cultures, as it was exhaustively described, e.g., by Oliveira et al. [25] or Valentino et al. [26]. Nevertheless, a dynamic feeding strategy is a very labor-intensive and time-consuming approach, and it is usually performed with volatile short chain fatty acids such as acetate, propionate or butyrate as substrates. Therefore, it provides only very limited possibility to select an appropriate cultivation substrate as additional selection criteria.

In our previous work we have observed that PHA-rich bacterial cells are considerably more resistant to osmotic challenge than PHA-free bacteria [6,7]. We have decided to take advantage of this phenomenon by profiting from osmoprotection provided by PHA granules for isolation of PHA producers from a mixed consortium of thermophilic bacteria. Specifically, we exposed mixed cultures cultivated at 50  $^\circ\text{C}$  to following osmotic challenge: a submerge bacterial culture grown on desired substrates and cultivation media was centrifuged and re-suspended in phosphate buffer containing 100 g/L NaCl. After 10 min of incubation, the cell suspension was centrifuged again and re-suspended in distilled water. Hence, the culture was exposed to dramatically changing osmotic conditions – at first, the cells were suddenly exposed to hypertonic conditions and subsequently to extremely hypotonic conditions. According to our previous observations, PHA containing cells demonstrate substantially higher resistance when exposed to such a sudden and dramatic osmotic imbalance [7]. Therefore, we expected that the culture gained after osmotic challenge will be enriched in PHA producers. Of course, (i), a mixed microbial consortium exposed to osmotic challenge enrichment must contain PHA producers prior to application of osmotic imbalances and (ii), the PHA content within a cell must reach a certain threshold value to provide desired protection effect. In addition, we are aware of the fact that bacteria possess also other strategies to cope with fluctuations of osmotic pressure than only accumulation of PHA; as examples, osmoprotection by biosynthesis of osmolytes [27], dormancy [28] or spores formation [29] are described in literature. Nevertheless, to minimize the protective effect of protective strategies others than PHA accumulation, the bacterial cells exposed to osmotic challenge were challenged at the very beginning of the stationary phase of their growth in order to minimize the portion of metabolically inactive cell forms (osmolytes, spores, etc.); moreover, the stress conditions were induced immediately, hence, the cells had no change to adapt to sudden increase and subsequent decrease in osmotic pressure.

Our hypothesis was tested in an experiment using activated sludge as a starting mixed culture and mineral medium with glycerol as the sole carbon source. For this purpose, glycerol was identified as a very suitable substrate since it is easily utilized by numerous bacteria including many of those which are not capable of utilization of sugars or lipids. Moreover, glycerol is currently considered being a very promising substrate for PHA production both by bacteria and Archaea, because it is produced in steadily increasing quantities as a side product of the emerging biodiesel manufacturing [30]. Nevertheless, the protocol is principally compatible with any other substrate, which is of importance considering the fact that, for some extremophilic PHA producing strains, it was shown that glycerol is used for biomass growth, but not for PHA biosynthesis [31]. The concept of the enrichment protocol is illustrated in Fig. 2.

After application of osmotic challenge, we need to distinguish between PHA positive and negative colonies. Since in case of thermophilic cultures we cannot rely on Nile Red staining, we utilized a different approach – selected colonies were analyzed by ATR-FTIR, which provides quick and reliable information about presence or absence of PHA in bacterial cells. The processes of ATR-FTIR analysis of a fresh bacterial biomass as well as the main spectral features that correspond to the presence of PHA in a sample are described in details in our previous work [32]. After transferring the biomass sample to the surface of the ATR crystal, the FTIR spectrum is affected by a high initial content of water. Therefore, the sample is first let to freely dehydrate directly on the ATR surface. During this step, relative intensity of wide absorption

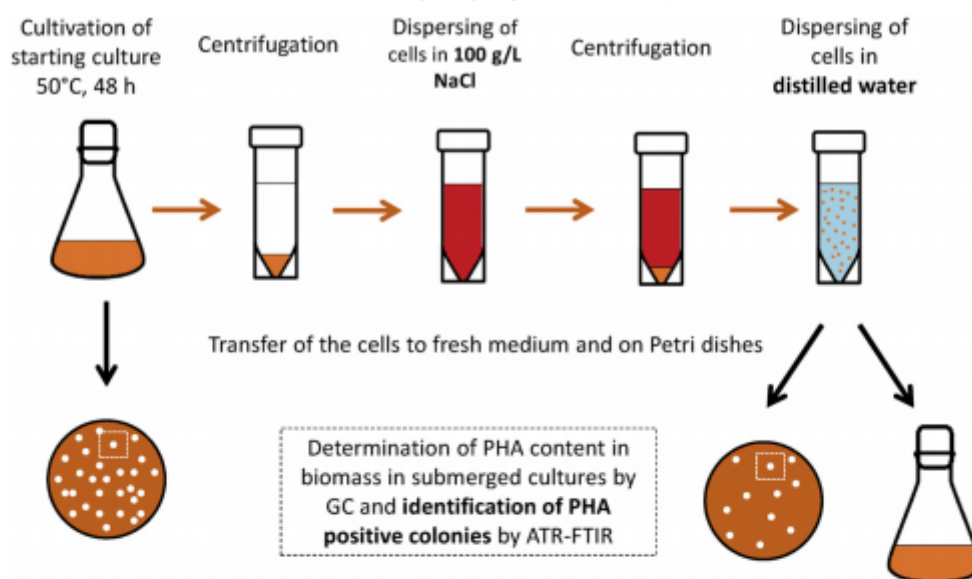


Fig. 2. Principle of enrichment of active sludge in PHA producing thermophilic bacteria by application of osmotic challenge.

bands of water (stretching band centered at  $3300\text{ cm}^{-1}$ , bending mode at  $1640\text{ cm}^{-1}$  and the spectral edge corresponding to rocking vibration at about  $1000\text{ cm}^{-1}$ ) decrease, while the spectral features attributed to residual biomass components increase continuously as a consequence of water evaporation. In a FTIR spectrum of dry biomass, PHA presence can then be easily confirmed on the basis of appearance of characteristic absorption bands of polyesters located at  $1734\text{ cm}^{-1}$  (C=O stretching) and  $1180\text{ cm}^{-1}$  (C–O–C stretching) and also of significant increase in absorption at  $1050\text{ cm}^{-1}$  (C–C–O stretching). In this way, PHA positive and PHA negative colonies, respectively, were identified and the PHA positive colonies were subjected to further treatment as described below. It should be pointed out that combination of Nile Red colony staining on solidified agars to select potential PHA producers followed by purposeful inspection by ATR-FTIR would be a very interesting high-throughput strategy for isolation of PHA producers. Nevertheless, in thermophiles, this strategy is not applicable due to false positive Nile Red staining of PHA non-containing cells (Fig. 3).

The principle of the experiment is illustrated in Fig. 2 and the results are provided in Table 1. The submerged mixed culture, before undergoing the enriching experiment, contained 7.3% PHB per cell dry mass (CDM), when this culture was directly used to inoculate solid medium on Petri dishes. A total of 15 randomly selected colonies were investigated for presence of PHA by ATR-FTIR; presence of PHA was confirmed only in 1 colony, which represents about 7% out of examined colonies. Nevertheless, when the submerged culture was exposed to osmotic challenge and spread on agar plates, we identified 8 PHA-positive colonies out of 15 investigated, hence, the portion of PHA positive colonies reached 53%. This result clearly indicates that osmotic challenge enriched the microbial consortium in PHA accumulators and, therefore, this approach can be used for isolation of pure PHA producing bacterial strains from mixed microbial consortia when the challenged culture is plated on suitable solidified medium. However, when the challenged culture was used as inoculum for subsequent submerged cultivation, the PHA content (1.96% per CDM) in biomass after 48 h cultivation was lower when compared to culture prior to osmotic challenge. It is likely that, despite their lower portion at the beginning of cultivation, quickly growing non-PHA accumulating bacteria, which survived

osmotic treatment, were able to overgrow PHA accumulators in fresh media. This emphasizes that application of osmotic challenge cannot serve as an alternative to dynamic feeding or similar approaches for purposes of PHA production by mixed cultures.

The PHA positive colonies isolated by osmotic challenge were inoculated on fresh Petri dishes and purified to achieve axenic cultures. Subsequently, isolates were identified by 16S rRNA sequencing; the results are presented in Table 2. According to the results, most of the isolates were Gram-positive strains closely related to the genus *Bacillus*. It should be pointed out that PHA accumulation capability is a common feature among *Bacillaceae* [33]; in this context, it should be noted that the very first organism described as PHA producer by Lemoigne in the 1920ies was a *Bacillus megaterium* spp. [34]. Isolate number 25 revealed highest similarity with *Bacillus amyloliquefaciens*, which is closely related to *Bacillus subtilis*; in fact, for a long time, *B. amyloliquefaciens* was considered being a sub-species of *B. subtilis* [35]. It can be noted that *B. subtilis* was identified as promising PHA producer by several authors [36–38]. Similarly, isolate 28 seems to be closely related to *Bacillus licheniformis*, which was also investigated for its PHA biosynthesis capability [39,40]. *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* as well as *B. licheniformis* are known for their tolerance to higher temperature; despite the fact that their optimal growth temperature is in the mesophilic range, they are capable to grow at temperatures slightly above  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , hence, they are considered being thermotolerant strains [41]. Further, isolates number 29, 30, 32, and 35 seem to belong to the genus *Aneurinibacillus*. Members of this genus are mostly thermophilic or thermotolerant, and they are taxonomically closely related to the genus *Bacillus*; actually, these genera were separated only rather recently [42]. Noteworthy, PHA production capacity was already described for thermophilic *Aneurinibacillus* sp. XH2, with an optimal growth and PHA production temperature of  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  [18], hence, it seems that PHA biosynthesis is also a ubiquitous feature among members of *Aneurinibacillus*. The only Gram-negative bacterium among the PHA positive isolates was isolate number 30, which was identified as *Chelatococcus composti*; actually, PHA production was described before for closely related thermophilic strains *Chelatococcus daeguensis* [43] and *Chelatococcus thermostellatus* [44].



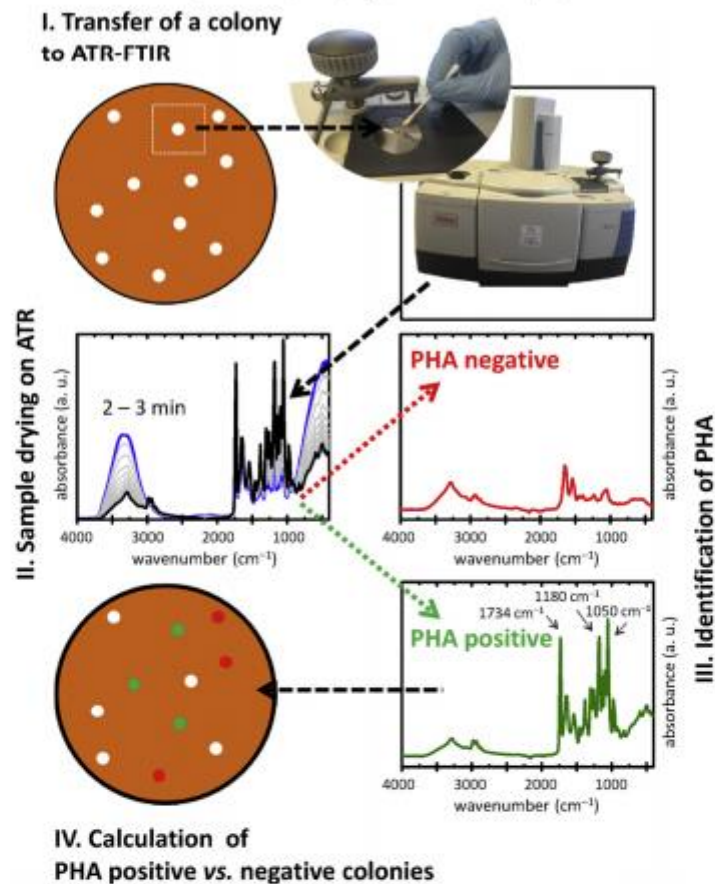


Fig. 3. Identification of PHA positive and PHA negative colonies by ATR-FTIR.

To evaluate PHA production capacity of the isolates, we performed a simple experiment in which all the PHA positive isolates from the osmotic challenge experiment were cultivated in flasks in simple mineral medium using glycerol as the sole carbon source. The final biomass as well as PHA concentrations were determined after 72 h of cultivation at 50 and 60 °C; the results are presented in Fig. 4. Apart from isolate 28, for which no PHA accumulation was detected, all the isolates demonstrated substantially higher PHA production capability at 50 °C; the best PHA producers were isolates 25 (identified as *Bacillus amyloliquefaciens*) with a PHA concentration of 1.5 g/L and a PHA

content in CDM of 54.8%, isolate 31 (identified as *Bacillus licheniformis*), which reached a PHA concentration of 2.1 g/L and PHA content in CDM of 62.0%, and finally isolate 34 (identified as *Chelatococcus compostri*), in which PHA concentration and the PHA content in CDM reached 1.25 g/L and 37.2%, respectively. It should be emphasized that these product fractions and concentrations were gained without any process optimization, and indeed are very promising. On the contrary, growth of bacterial cultures as well as PHA biosynthesis was severely lower when cultivations were carried out at 60 °C. For instance, in the cultures 25 and 28, which revealed expedient PHA production at 50 °C, no PHA was detected at all when cultivated at 60 °C. This indicates that, rather than in the case of obligate thermophiles, these cultures are thermotolerant strains, which thrive well at 50 °C, but not at 60 °C. The only culture which provided significant growth activity and PHA production capability at 60 °C was isolate 34; here, a PHA concentration of 0.5 g/L was recorded, and the PHA content in biomass reached 34.0%, which is comparable to the cultivation performed at 50 °C, where the intracellular PHA fraction represented about 37.32% of CDM.

**Table 1**  
Results of enrichment experiment.

		Before osmotic challenge	After osmotic challenge
Petri dishes	CFU per mL	$1.29 \cdot 10^{10}$	$6.6 \cdot 10^8$
	Ratio PHA positive: PHA negative colonies	1:14	8:7
	% of PHA positive colonies out of tested	7	53
Submerged culture	CDM [g/L]	$0.95 \pm 0.04$	$0.78 \pm 0.04$
	% of PHB per CDM	$7.30 \pm 1.49$	$1.96 \pm 0.54$
	PHB [g/L]	0.07	0.02

#### 4. Concluding remarks

To sum up, we suggest application of osmotic challenge consisting of sudden exertion of hypertonic and subsequent hypotonic shock to enrich a given microbial consortium in PHA producers; this enables their

**Table 2**  
Results of identification of PHA producing isolates by 16S rRNA sequencing.

Genus	Identification numbers	Approximate identification of the isolate based on 16S rRNA sequence	16S rRNA sequence GenBank accession number
<i>Bacillus</i>	25	<i>Bacillus amyloqueliciens</i>	MN595610
	31	<i>Bacillus licheniformis</i>	MN595618
	29	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	MN595898
<i>Aneurinibacillus</i>	30		MN595683
	32		MN595897
	35		MN596016
<i>Chelatococcus</i>	34	<i>Chelatococcus composti</i>	MN596015
	28	Multiseptic sample	

subsequent isolation, identification and characterization. We have utilized this method in combination with fast and reliable ATR-FTIR identification of PHA-positive colonies for isolation of thermophilic and thermotolerant PHA producing bacteria from activated sludge. We have isolated several bacterial strains, which seem to be very intriguing thermophilic/thermotolerant PHA producers, deserving further investigation to evaluate their biotechnological potential for energy-efficient industrial production of PHA following the concept of Next Generation Industrial Biotechnology.

#### CRediT authorship contribution statement

**Iva Pernicová:** Investigation. **Ivana Novacková:** Investigation. **Petr Sedláček:** Investigation, Visualization. **Xenie Kourilová:** Methodology, Writing - review & editing. **Martin Koller:** Writing - review & editing. **Stanislav Obruca:** Writing - original draft, Conceptualization, Supervision.

#### Declaration of competing interest

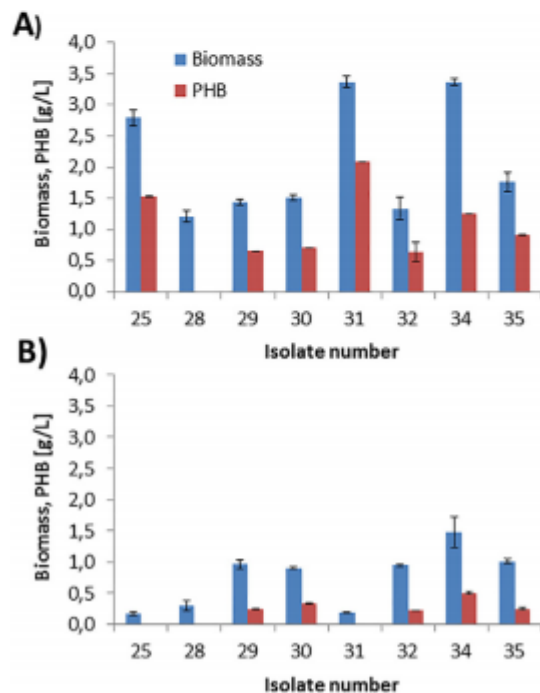
The authors declare no conflicts of interest.

#### Acknowledgement

This study was funded by the project GA19-20697S of the Czech Science Foundation (GACR). Further, Ivana Novacková is Brno Ph.D. Talent Scholarship Holder – Funded by the Brno City Municipality.

#### References

- [1] 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 (2018) 856–870, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.006>.
- [2] M. Koller, Chemical and biochemical engineering approaches in manufacturing polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters of tailored structure with focus on the diversity of building blocks, *Chem. Biochem. Eng. Q.* 32 (2019) 413–438, <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2018.1385>.
- [3] Koller, M., Maršálek, L., de Sousa Dias, M. M., Braunegg, G., Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner, *New Biotechnol.* 37 (2017) 24–38, [doi:https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.05.001](https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.05.001).
- [4] G.-Q. Chen, X.-R. Jiang, Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria, *Curr. Opin. Biotech.* 50 (2018) 94–100, <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.11.016>.
- [5] L.-P. Yu, F.-Q. Wu, G.-Q. Chen, Next-generation industrial biotechnology-transforming the current industrial biotechnology into competitive processes, *Biotechnol. J.* 14 (2019) e1800437, <https://doi.org/10.1002/biot.201800437>.
- [6] S. Obruca, P. Sedláček, F. Mravec, V. Krzyžanek, et al., The presence of PHB granules in cytoplasm protects non-halophilic bacterial cells against the harmful impact of hypertonic environments, *New Biotechnol.* 39 (2017) 68–80, <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.07.008>.
- [7] P. Sedláček, E. Slaninová, M. Koller, J. Nebesarová, et al., 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>.
- [8] M. Koller, Polyhydroxyalkanoate biosynthesis at the edge of water activity-haloarchaea as biopolyester factories, *Bioengineering* 6 (2019) <https://doi.org/10.3390/bioengineering6020034pii>: E34.
- [9] A. Bhattacharyya, J. Saha, S. Haldar, A. Bhowmic, et al., Production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterraneus* using rice-based ethanol stillage with simultaneous recovery and re-use of medium salts, *Extremophiles* 18 (2014) 463–470, <https://doi.org/10.1007/s00792-013-0622-8>.
- [10] D. Kucera, I. Pernicová, A. Kovalčík, M. Koller, et al., Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*, *Bioresour. Technol.* 256 (2018) 552–556, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.062>.
- [11] J. Ye, W. Huang, D. Wang, F. Chen, et al., Pilot scale-up of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) production by *Halomonas bluephagenesis* via cell growth adapted optimization process, *Biotechnol. J.* 13 (2018) e1800074, <https://doi.org/10.1002/biot.201800074>.
- [12] M. Koller, Recycling of waste streams of the biotechnological poly(hydroxyalkanoate) production by *Haloferax mediterraneus* on whey, *Int. J. Polym. Sci.* 2015 (2015), 370164, <https://doi.org/10.1155/2015/370164>.
- [13] B. Lorantfy, B. Seyer, C. Herwig, Stoichiometric and kinetic analysis of extreme halophilic Archaea on various substrates in a corrosion resistant bioreactor, *New Biotechnol.* 31 (2014) 80–89, <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.08.003>.
- [14] F.F. Hezayen, B.H.A. Rehm, R. Eberhardt, A. Steinbüchel, Polymer production by two newly isolated extremely halophilic archaea: application of a novel corrosion-resistant bioreactor, *Appl. Microbiol. Biot.* 54 (2000) 319–325.
- [15] M.H. Ibrahim, A. Willems, A. Steinbüchel, Isolation and characterization of new poly(3HB)-accumulating star-shaped cellaggregates-forming thermophilic bacteria, *J. Appl. Microbiol.* 109 (2010) 1579–1590, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04786.x>.
- [16] A.A. Pantazaki, M.G. Tambaka, V. Langlois, P. Guerin, D.A. Kyriakidis, Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis in *Thermus thermophilus*: purification

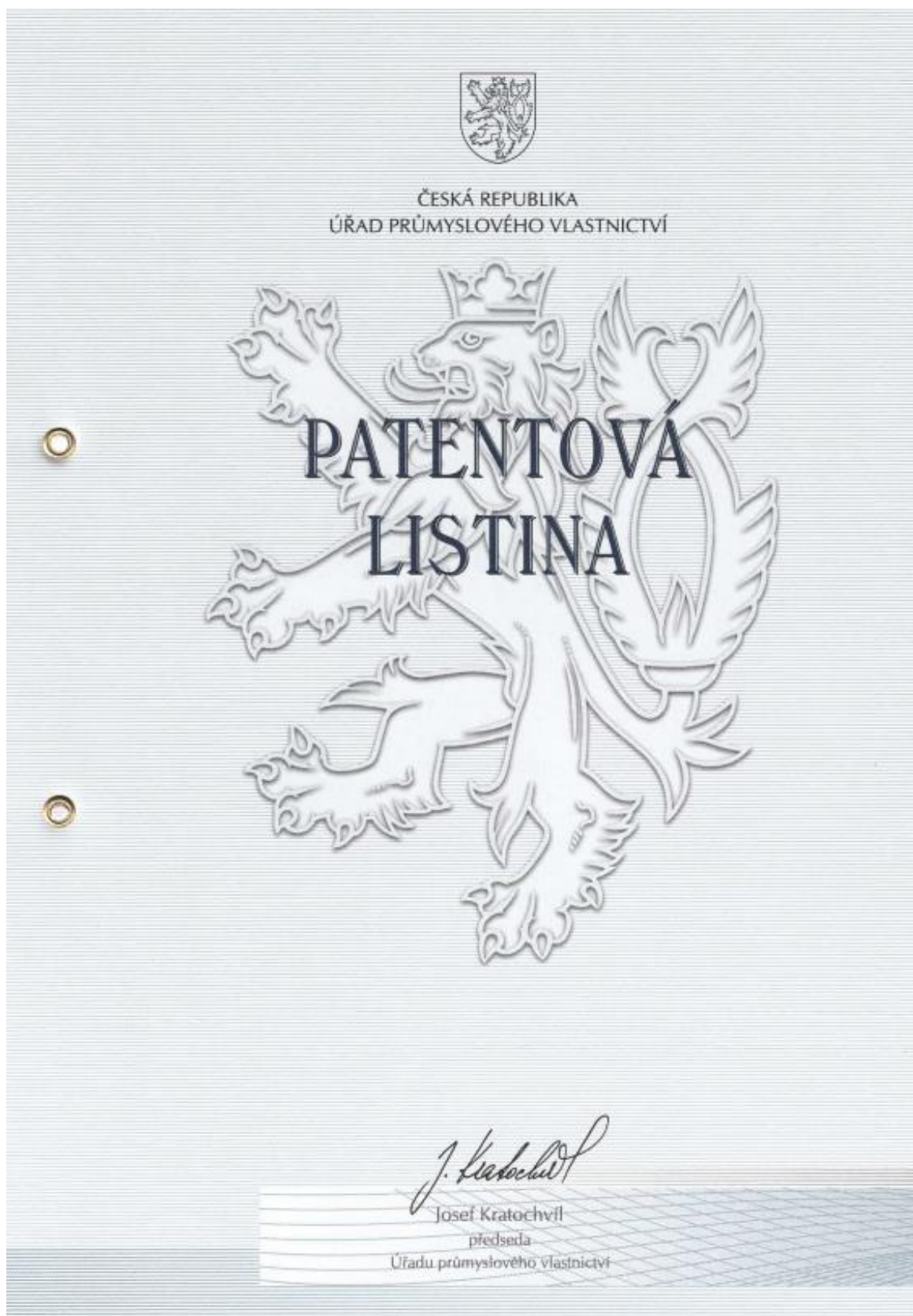


**Fig. 4.** Screening of production of polyhydroxyalkanoates by isolates at 50 °C (A) and 60 °C (B) after 72 h of cultivation in a defined glycerol medium.

- and biochemical properties of PHA synthase, *Mol. Cell. Biochem.* 254 (2003) 173–183, <https://doi.org/10.1023/A:1027373100955>.
- [17] D.S. Sheu, W.M. Chen, J.Y. Yang, R.C. Chang, Thermophilic bacterium *Caldimonas taiwanensis* produces poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from starch and valerate as carbon sources, *Enzyme. Microb. Tech.* 44 (2009) 289–294, <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.01.004>.
- [18] Z. Xiao, Y. Zhang, L. Xi, F. Huo, et al., Thermophilic production of polyhydroxyalkanoates by a novel *Aneurimibacillus* strain isolated from Gadao oilfield, China, *J. Basic. Microb.* 55 (2015) 1125–1133, <https://doi.org/10.1002/jobm.201400843>.
- [19] P. Spierfermann, B.H.A. Rehm, R. Kalscheuer, D. Baumeister, A. Steinbüchel, A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds, *Arch. Microbiol.* 171 (1999) 73–80, <https://doi.org/10.1007/s002030050681>.
- [20] F. Mravec, S. Obraca, V. Krzyzanek, P. Sedláček, et al., Accumulation of PHA granules in *Cupriavidus necator* as seen by confocal fluorescence microscopy, *FEMS Microbiol. Lett.* 363 (2016) 109–114, <https://doi.org/10.1093/femsle/fwv094>.
- [21] M. Chan, R.H. Himes, J.M. Akagi, Fatty acid composition of thermophilic, mesophilic, and psychrophilic clostridia, *J. Bacteriol.* 106 (1971) 876–881.
- [22] T. Režanka, M. Kambourová, A. Dereková, I. Kolouchová, K. Sigler, LC-ESI-MS/MS identification of polar lipids of two thermophilic *Aeropyrum* bacteria containing a unique lipid pattern, *Lipids* 47 (2012) 729–739, <https://doi.org/10.1007/s11745-012-3675-0>.
- [23] Y. Koga, Thermal adaptation of the archaeal and bacterial lipid membranes, *Archaea* 2012 (2012), 789652, <https://doi.org/10.1155/2012/789652>.
- [24] H.A. Wu, D.S. Sheu, C.Y. Lee, Rapid differentiation between short-chain-length and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria with spectrofluorometry, *J. Microbiol. Methods* 53 (2003) 131–135, [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00232-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00232-4).
- [25] C.S.S. Oliveira, C.E. Silva, G. Carvalho, M.A. Reis, Strategies for efficiently selecting PHA producing mixed microbial cultures using complex feedstocks: feast and famine regime and uncoupled carbon and nitrogen availabilities, *New Biotechnol.* 37 (2017) 69–79, <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.10.008>.
- [26] F. Valentino, F. Moezan-Sagastume, S. Campanari, M. Villano, et al., Carbon recovery from wastewater through bioconversion into biodegradable polymers, *New Biotechnol.* 37 (2017) 9–23, <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.05.007>.
- [27] M.F. Roberts, Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms, *Saline Systems* 1 (2005) 5, <https://doi.org/10.1186/1746-1448-1-5>.
- [28] T.K. Wood, S.J. Knabel, B.W. Kwan, Bacterial persister cell formation and dormancy, *Appl. Environ. Microb.* 79 (2013) 7116–7121, <https://doi.org/10.1128/AEM.02636-13>.
- [29] G. Tetz, V. Tetz, Introducing the sporobiota and sporobiome, *Gut. Pathog.* 9 (2017) 38, <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0187-8>.
- [30] M. Koller, L. Marsálek, Potential of diverse prokaryotic organisms for glycerol-based polyhydroxyalkanoate production, *Appl. Food. Biotechnol.* 2 (2015) 3–15, <https://doi.org/10.22037/ajfb.v2i3.8271>.
- [31] R. Mahansaria, A. Dhara, A. Saha, S. Haldar, et al., Production enhancement and characterization of the polyhydroxyalkanoate produced by *Nutrinema ajimwurmsis* (as synonym) *Nutrinema alanense* strain RM-G10, *Int. J. Biol. Macromol.* 107 (2018) 1480–1490, <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2017.10.009>.
- [32] P. Sedláček, E. Sláňanová, V. Enev, M. Koller, et al., What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments, *Appl. Microbiol. Biot.* 103 (2019) 1905–1917, <https://doi.org/10.1007/s00253-018-09584-z>.
- [33] S. Mohapatra, S. Maity, H.R. Dash, S. Das, et al., Bacillus and biopolymer: prospects and challenges, *Biochem. Biophys. Rep.* 12 (2017) 206–213, <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.10.001>.
- [34] M. Lemoigne, Produit de deshydratation et de polymérisation de l'acide  $\beta$ -oxybutyrique, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 8 (1926) 770–782.
- [35] N.E. Welker, L.L. Campbell, Unrelatedness of *Bacillus amyloquelicifaciens* and *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.* 94 (1967) 1124–1130.
- [36] G. Singh, A. Kumari, A. Mittal, A. Yadav, et al., Poly  $\beta$ -hydroxybutyrate production by *Bacillus subtilis* ng220 using sugar industry waste water, *Biomed. Res. Int.* 2013 (2013) 952641, <https://doi.org/10.1155/2013/952641>.
- [37] M. Anjali, C. Sukumar, A. Kanakalakshmi, K. Shanthi, Enhancement of growth and production of polyhydroxyalkanoates by *Bacillus subtilis* from agro-industrial waste as carbon substrates, *Compos. Interfaces.* 21 (2014) 111–119, <https://doi.org/10.1080/15685543.2013.834200>.
- [38] M. Singh, S.K. Patel, V.C. Kalia, *Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates, *Microb. Cell Factories* 8 (2009) 38, <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-38>.
- [39] K. Sangkharak, P. Prasertsan, The production of polyhydroxyalkanoate by *Bacillus licheniformis* using sequential mutagenesis and optimization, *Biotechnol. Bioproc. E.* 18 (2013) 272–279, <https://doi.org/10.1007/s12257-012-0615-z>.
- [40] K. Sangkharak, P. Prasertsan, Municipal wastes treatment and production of polyhydroxyalkanoate by modified two-stage batch reactor, *J. Polym. Environ.* 21 (2013) 1009–1015, <https://doi.org/10.1007/s10924-013-0597-8>.
- [41] A.D. Warth, Relationship between heat resistance of spores and optimum and maximum growth temperatures of *Bacillus* species, *J. Bacteriol.* 134 (1978) 669–705.
- [42] O. Shida, H. Takagi, K. Kadowaki, K. Komagata, Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurimibacillus* gen. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46 (1996) 939–946.
- [43] B. Cui, S. Huang, F. Xu, R. Zhang, et al., Improved productivity of poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) in thermophilic *Chelatococcus daeguensis* TAD1 using glycerol as the growth substrate in a fed-batch culture, *Appl. Microbiol. Biot.* 99 (2015) 6009–6019, <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6489-1>.
- [44] M.H.A. Ibrahim, A. Steinbüchel, High-cell-density cyclic fed-batch fermentation of a poly(3-hydroxybutyrate)-accumulating thermophile, *Chelatococcus* sp. strain MW10, *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (2010) 7890–7895, <https://doi.org/10.1128/AEM.01488-10>.



## 10.4. Patentová listina





Úřad průmyslového vlastnictví  
udělil podle § 34 odst. 3 zákona č. 527/1990 Sb., v platném znění,

# PATENT

číslo

# 308626

na vynález uvedený v příloženém popisu.



V Praze dne 8.1.2021

Za správnost:

Ing. Jan Mrva  
vedoucí oddělení rejstříků

# PATENTOVÝ SPIS


(11) Číslo dokumentu:

## 308 626

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

*C12P 7/02* (2006.01)  
*C12P 7/42* (2006.01)  
*C12P 7/62* (2006.01)  
*C12N 1/32* (2006.01)  
*C12R 1/01* (2006.01)

<p>(19) ČESKÁ REPUBLIKA</p>  <p>ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ</p>	(21) Číslo přihlášky: <b>2019-631</b>
	(22) Přihlášeno: <b>10.10.2019</b>
	(40) Zveřejněno: <b>13.01.2021</b> <b>(Věstník č. 2/2021)</b>
	(47) Uděleno: <b>03.12.2020</b>
	(24) Oznámení o udělení ve věstníku: <b>13.01.2021</b> <b>(Věstník č. 2/2021)</b>

(56) Relevantní dokumenty:  
KUČERA D. et al.: „Biotechnological production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) terpolymer by *Cupriavidus* sp. DSM 19379,“ *Bioengineering*, vol. 6, no. 3, srpen 2019, ISSN 2306-5354; XIAO Z. et al.: „Thermophilic production of polyhydroxyalkanoates by a novel *Aneurinibacillus* strain isolated from Gudao oilfield, China,“ *Journal of Basic Microbiology*, vol. 55, no. 9, 2015, str. 1125 – 1133, ISSN 0233-111X; XI L. et al.: „Complete genome sequence of the novel thermophilic polyhydroxyalkanoates producer *Aneurinibacillus* sp. XH2 isolated from Gudao oilfield in China,“ *Journal of Biotechnology*, vol. 227, 2016, str. 54 – 55, ISSN 0168-1656; PERNICOVÁ I. et al.: „Extremophiles – platform strains for sustainable production of polyhydroxyalkanoates,“ *Materials Science Forum*, vol. 955, květen 2019, str. 74 - 79, ISSN 1662-9752; PERNICOVÁ I. et al.: „Production of polyhydroxyalkanoates on waste frying oil employing selected *Halomonas* strains,“ *Bioresource Technology*, vol. 292, srpen 2019, ISSN 0960-8524.  
CN 103667153.

- (73) Majitel patentu:  
Vysoké učení technické v Brně, Brno, CZ
- (72) Původce:  
doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D., Drásov, CZ  
Ing. Iva Pernicová, Třebíč, Nové Dvory, CZ  
Ing. Dan Kučera, Brno, Staré Brno, CZ  
Ing. Ivana Nováčková, Mokrá-Horákov, CZ  
Ing. Petr Sedláček, Ph.D., Doubravník, CZ
- (74) Zástupce:  
INPROCHES Patentová a známková kancelář,  
Mgr. Alžběta Jurtiková, patentová zástupkyně,  
Mezírka 775/1, 602 00 Brno

(54) Název vynálezu:  
**Způsob výroby polyhydroxyalkanoátů pomocí isolátu termofilního bakteriálního kmene *Aneurinibacillus* sp. H1**

- (57) Anotace:  
Vynález se týká isolátu původního Gram-pozitivního termofilního bakteriálního kmene identifikovaného a označeného jako *Aneurinibacillus* sp. H1 a jeho využití k termofilní biotechnologické produkci polyhydroxyalkanoátů, zejména poly(3-hydroxybutyrátu), kopolymeru poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerátu) a kopolymeru poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrátu) v kultivačním médiu obsahujícím uhlíkatý substrát, komplexní zdroj dusíku a anorganický zdroj dusíku. Způsob podle vynálezu je vhodný pro produkci polyhydroxyalkanoátů v průmyslovém měřítku.

CZ 308626 B6

## Způsob výroby polyhydroxyalkanoátů pomocí isolátu termofilního bakteriálního kmene *Aneurinibacillus* sp. H1

### 5 Oblast techniky

Vynález se týká využití isolátu původního Gram-pozitivního termofilního bakteriálního kmene identifikovaného a označeného jako *Aneurinibacillus* sp. H1 k termofilní biotechnologické produkci polyhydroxyalkanoátů.

10

### Dosavadní stav techniky

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou mikrobiální polyestery, které ve formě intracelulárních granulí akumulují řada prokaryotických mikroorganismů jako zásobní formu uhlíku, energie a redukční síly. Po chemické stránce se jedná o polyestery hydroxykyselin, přičemž karboxylová skupina se obvykle nachází v poloze 3 případně 4. Podle délky monomerní jednotky rozlišujeme dva základní typy PHA - polymery s krátkou délkou řetězce (short-chain-length) tzv. *scl*-PHA a materiály se střední délkou řetězce (medium-chain-length) tzv. *mcl*-PHA. Obecně platí, že PHA jsou velice často uvažovány jako potenciální náhrada za polymery petrochemického původu, a to z několika hlavních důvodů. Mechanické, termické a technologické vlastnosti PHA jsou velice podobné některým petrochemickým polymerům, nicméně na rozdíl od petrochemických materiálů jsou PHA *i.* kompletně připraveny biotechnologickou cestou s využitím obnovitelných případně i odpadních surovin, *ii.* jedná se o přirozeně a kompletně biodegradovatelné a kompostovatelné materiály, a to prakticky ve všech relevantních prostředích, a *iii.* PHA vykazují vysokou míru biokompatibility s lidským tělním prostředím. Tyto jejich vlastnosti z nich činí zajímavou materiálovou základnu pro velice širokou paletu aplikací.

25

Obecně platí, že PHA jsou termoplasty a je tedy možné upravovat standardními postupy. Vlastnosti PHA jsou závislé především na monomerním složení, základní parametry některých zástupců PHA jsou uvedeny v tabulce 1 [1].

30

Tabulka 1. Parametry vybraných vlastností některých PHA a jejich srovnání s polypropylenem [1].

	P(3HB)	P(3HB/3HV) 90:10	P(3HB/3HV) 20:80	P(4HB)	P(3HB/4HB) 90:10	P(3HB/4HB) 10:90	PP
Bod tání (°C)	179	150	135	53	159	50	170
Youngův modul pružnosti (GPa)	3,5	1,2	0,8	149	-	100	1,7
Průtažnost (%)	3	20	100	1000	242	1080	400

35

*P(3HB)* -poly(3-hydroxybutyrát), *P(3HB/3HV)* - poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát), *P(4HB)* - poly(4-hydroxybutyrát), *P(3HB/4HB)* - poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát), *PP* - polypropylen

40

Nejčastějším a nejlépe prostudovaným PHA polymerem je homopolymer 3-hydroxybutyrátu (3HB), poly(3-hydroxybutyrát) - P(3HB). Materiál izolovaný z bakteriálních buněk vykazuje vysokou míru krystalinity - je tedy pevný, křehký a málo elastický. Teplota tání polymeru je přibližně 179 °C, přičemž teplota degradace materiálu (200 °C) je nepříjemně blízko teplotě tání, což významně komplikuje jeho tavení.

45

Mechanické i technologické vlastnosti materiálu je však možné významně zlepšit, pokud je do struktury materiálu inkorporována další monomerní jednotka. Velice často je to 3-hydroxyvalerát (3HV). Vzniká tak kopolymer poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) (P3HB-co-3HV).  
 5 Vlastnosti polymeru jsou potom závislé na obsahu 3HV, celkově je možné konstatovat, že se snižuje krystalinita a Youngův modul, a naopak narůstá jeho průtažnost a elasticita. Zároveň vykazuje polymer nižší teplotu tání než homopolymer PHB při zachování téže hodnoty teploty degradace, což je samozřejmě z pohledu tavení polymeru velice pozitivní.

10 Dalším velice zajímavým materiálem je kopolymer obsahující 4-hydroxybutyrát (4HB), poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát) P(3HB-co-4HB). Tento materiál vykazuje vysoce amorfní strukturu a rostoucím obsahem 4HB výrazně klesá teplota degradace až téměř k hodnotě 50 °C a výrazně roste flexibilita, průtažnost a také Youngův modul. Není bez zajímavosti, že kopolymery P(3HB-co-4HB) vykazují také zvýšenou biodegradabilitu, a to i v prostředí tělních tekutin [2].  
 15 Díky svým vlastnostem má tedy P(3HB-co-4HB) vysoký aplikační potenciál především v oblasti biomedicíny. V roce 2007 americký úřad Food and Drug Administration (FDA) schválil použití P4HB pro medicínské využití (Tepha FLEX® Absorbable Suture a "BioTREK™ Bioabsorbable Septal Repair") a také byla publikována řada úspěšných studií využívajících P(3HB-co-4HB) v klinických aplikacích, jako transportní systém pro léčiva nebo scaffoldy pro proliferaci buněk a tkáňové inženýrství [3 - 5].  
 20

Schopnost produkce P(3HB-co-4HB) indukované přidávkou strukturálního prekurzoru 4HB jako jsou například gama-butyrolakton (GBL), 1,4-butandiol (1,4-BD), nebo přímo 4-hydroxybutyrátu byla pozorována pro několik přirozených bakteriálních producentů PHA, jako jsou například  
 25 *Cupriavidus necator* [6], *Cupriavidus malaysiensis* [7], *Comamonas acidovorans* [8] nebo *Burkholderia sacchari* [9]. Schopnost inkorporace 4HB do struktury polymeru je možné posílit například náhodnou mutagenézou tak, jak ve svém experimentu demonstrovali Kitamura a Doi, kteří zvýšenou schopnost inkorporace 4HB do struktury polymeru pozorovali u mutantních kmenů *C. necator* H16 neschopných růstu na 4HB jako jediném zdroji uhlíku [10]. Schopnost produkce  
 30 P(3HB-co-4HB), a to i bez nutnosti aplikace strukturálních prekurzorů 4HB, je do vhodného producenta také možno vnést pomocí nástrojů genového inženýrství, jak o tom pojednávají patenty US 6689589 B2 [11], US 006117658 A [12], US 8546125 B2 [13] případně další literární zdroje [14].

35 Při medicínských aplikacích polyhydroxyalkanoátů je klíčovou vlastností materiálů jejich čistota a spektrum potenciálních kontaminantů. Pokud je polymerní materiál produkován a následně izolován z Gram-negativních bakterií, je velice často kontaminován endotoxiny na bázi lipopolysacharidů, které jsou lokalizovány na vnější membráně buněčné stěny Gram-negativních bakterií, a proto jsou spolu s PHA ko-isolovány z bakteriální biomasy. Tyto kontaminanty způsobují velice silnou imunitní odpověď, která může v extrémních případech končit až smrtí, jsou  
 40 tedy při uvažované aplikaci PHA v oblasti medicíny extrémně nežádoucí. Proto je obsah endotoxinů monitorován, u zdravotního vybavení nesmí obsah endotoxinů obvykle přesáhnout hodnotu 20 Endotoxin Units (EU) nicméně například u materiálů které mají být v kontaktu cerebrospinálními tekutinami nesmí obsah endotoxinů přesáhnout hodnotu 2,5 EU [15]. Nicméně  
 45 komerčně dostupné PHA materiály obvykle vykazují obsahy endotoxinů na úrovni 100 EU i více. Obsah endotoxinů může být u PHA biomateriálů snížen použitím vhodné isolační techniky [16], případně mohou být endotoxiny selektivně degradovány pomocí oxidačního činidla, jak to popisuje patent US 6245537 B1 [17], nicméně úplné odstranění je obtížné ne-li nemožné. Možné řešení skýtá využití Gram-pozitivních bakterií, které endotoxiny obsahují jen v minimálním množství, a  
 50 PHA materiály připravené pomocí Gram-pozitivních bakterií proto prakticky nejsou endotoxiny kontaminovány.

Extrémofilové jsou schopni přežít a růst v podmínkách, které jsou daleko od podmínek vhodných pro život většiny organismů. V moderních mikrobiálních biotechnologiích jsou v současné době  
 55 procesy založené na využití extrémofilních mikroorganismů považovány za velice perspektivní,



protože extrémofily přinášejí řadu výhod. Předně je to výrazné zvýšení robustnosti procesu vůči kontaminaci, což umožňuje například využít kontinuální kultivační mód nebo redukovat případně úplně eliminovat nároky na sterilizaci zařízení a kultivačního média. Další výhodou extrémofilů jako produkčních jednotek je obvykle jejich vysoká růstová rychlost, schopnost využít širokou paletu substrátů, a to včetně odpadů, možnost využití levnějších zdrojů fermentační vody, a to včetně mořské a snížení energetických nároků na kultivace. Další výhody často vyplývají z využití konkrétní skupiny extrémofilů [18]. Z těchto důvodů jsou v současné době procesy založené na extrémofilních mikroorganismech často označovány jako průmyslové biotechnologie nové generace (Next Generation Industrial Biotechnologies, NGIB) [19]. Pochopitelně je tedy i snaha využít výhod plynoucích ze zapojení extrémofilů při biotechnologické produkci PHA [20]. Z tohoto pohledu je velice zajímavá skupina halofilních mikroorganismů, tedy mikroorganismů, které se adaptovaly na vysokou salinitu prostředí. Schopnost produkce PHA byla popsána u řady halofilů, ať už jsou to středně halofilní Gram-negativní bakterie, jako jsou *Halomonas halophila* [21], *Halomonas boliviensis* [22] nebo *Halomonas bluephagenesis* [23], středně halofilní Gram-pozitivní *Bacillus megaterium uyuni* S29 [24] nebo extrémně halofilní Archea *Haloferax mediterranei* [25]. Bylo prokázáno, že schopnost akumulace PHA představuje účinnou ochrannou strategii vůči negativním efektům hyperosmotického prostředí [26] a výrazným fluktuacím osmolarity prostředí [27], což je pravděpodobně důvodem častého výskytu schopnosti biosyntézy PHA mezi halofilními prokaryoty. Produkce PHA pomocí halofilních mikroorganismů je popsána také v patentové literatuře, je to například patent AT 513449 A1 [28] který popisuje možný způsob výroby PHA a dalších hodnotných metabolitů s využitím odpadu po výrobě bioplynu za využití halofilních mikroorganismů, patent DE 102008045237 B4 [29] se věnuje možné ko-produkci PHA a kompatibilních látek v rámci jednoho biotechnologického procesu pomocí halofilní kultury, patent JP 5164182 B2 [30] deklaruje, že izolát označený jako *Halomonas* sp. HM-1 je velice slibný producent PHA, obdobně i patent JP 2011083204 A věnuje pozornost konkrétnímu kmenu rodu *Halomonas* [31].

Kromě halofilních kmenů jsou za slibné producenty PHA považovány také termofily - mikroorganismy vykazující optimální růst při teplotách 45 °C a více. Jejich využití nabízí celou řadu výhod, předně je třeba zmínit, že procesy využívající termofily jsou často překvapivě energeticky výhodné. To je dáno minimalizací nákladů na chlazení a také tím, že k výhřevu reaktoru je možné do velké míry využít metabolické teplo rychle rostoucí termofilní kultury a energii míchadla [18, 20]. Vysoká kultivační teplota pochopitelně snižuje riziko kontaminace a je možné zvážit snížení sterility procesu. Například Ibrahim a Steinbuechel využili k produkci PHA termofilní kultury *Chelatococcus* sp. a i bez sterilizace zařízení byl proces veden asepticky i po dlouhou kultivační dobu [32]. Nicméně termofilních kmenů schopných produkce PHA nebylo doposud popsáno tolik jako halofilů. Biosyntéza PHA byla popsána především u Gram-negativních kultur jako například u bakterie *Thermus thermophilus* HB8. Tato bakterie je podle literárních údajů schopna růst při 75 °C, obsah PHA v biomase dosahuje 30 až 40 % hmotn. a samotný polymer se skládá ze zajímavých monomerních jednotek, jako je například 3-hydroxydekanoát, 3-hydroxyoktanoát, ale také 3HB a 3HV [33-34]. Dalším Gram-negativním producentem PHA popsaným v literatuře je *Caldimonas taiwanensis*, která je schopna produkce P(3HB) a P(3HB-co-3HV) při teplotě 55 °C [35]. Ibrahim a Steinbuechel isolovali PHA produkující termofilní bakterie z čistírny odpadů a získali několik izolátů, které se dle sekvenace 16S rRNA genu a podle fyziologických a biochemických testů řadily do skupiny *Chelatococcus*, izoláty klasifikovali jako *Chelatococcus thermotellatus*. Tato Gram-negativní bakterie je schopna produkce PHA při teplotách okolo 50 až 55 °C, přičemž jako substrát preferuje glycerol nebo glukózu [36]. V následujících experimentech výzkumná skupina okolo prof. Steinbuechela testovala biotechnologický potenciál tohoto producenta s využitím různých pokročilých kultivačních módů (batch, fed-batch, repeated batch), zároveň byla úspěšně ověřena robustnost procesu vůči mikrobiální kontaminaci při snížených nárocích na sterilizaci zařízení [32]. Gram-pozitivních termofilních producentů PHA bylo doposud popsáno výrazně méně. *Bacillus shackletonii* izolovaný v prostředí čínské uhelné elektrárny je schopen produkce P(3HB) při teplotách 35 až 50 °C [37]. Schopnost produkce P(3HB) byla také popsána u kmene *Geobacillus* sp. AY 946034, který je schopen růstu a produkce PHA při 60 °C [38], a nakonec byla schopnost produkce PHA

popsána u kmene *Aneurinibacillus* sp. XH2, který byl vyisolován v Číně na ropném ložisku, nicméně výtěžky popsané v literatuře jsou i přes použití bohatého a finančně náročného kultivačního média spíše nízké – 111,6 mg/L [39], kmen je patentově chráněn patentem CN 103667153 B [40].

5

#### Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je termofilní Gram-pozitivní kmen *Aneurinibacillus* sp. H1. Tento bakteriální kmen byl izolován speciálním způsobem z kompostu a je uložen v České sbírce mikroorganismů (CCM) pod sbírkovým číslem 8960.

10

Kmen byl izolován z kompostu odebraného v Brněnské kompostárně, odběr vzorku kompostu byl realizován dne 15. 10. 2018. Cílem bylo vyisolovat termofilní producenty PHA. Podle

15

zkušeností vynálezců není možné při práci s termofilními kmeny využít standardní postup aplikace Nilské červeně do agarů tak, jak je popsáno v literatuře, protože termofily často vykazují pozitivní barvení Nilskou červení bez ohledu na jejich schopnost akumulace PHA viz. obr. 1.

20

Při standardním isolačním postupu je možné PHA produkující kmeny odlišit od PHA neprodukcujících pomocí aplikace Nilské červeně do agarů, kolonie producentů PHA pak pod UV zářením vykazují typickou oranžovou fluorescenci. Nicméně pokud je postup využit k izolaci termofilních kultur (kultivační teplota 50 °C a více) vykazuje pozitivní barvení Nilskou červení velká část kolonií bez ohledu na schopnost produkce PHA. Proto nebylo možné isolační postup s využitím Nilské červeně aplikovat na termofilní kultury a bylo nutno zvolit odlišnou strategii na základě předchozích poznatků o tom, že schopnost akumulace PHA zvyšuje odolnost bakterií vůči prudké změně osmolarity prostředí.

25

Byl vyvinut isolační protokol, kdy byla směsná kultura bakterií potenciálně obsahující PHA producenty vystavena nejdříve silně hypertonickému (100 až 200 g/L NaCl) a následně silně hypotonickému prostředí (destilovaná voda). Následně byly buňky vysety na misku, přičemž bylo možné předpokládat, že většina přeživších bakterií schopných tvořit kolonie je schopná produkce PHA. Schéma originálního isolačního postupu je uvedeno na obrázku 2.

30

Při izolaci termofilních PHA producentů byl jako startovací kultura využit kompost odebraný 15. 10. 2018 v podniku Centrální kompostárna Brno, provozovatel SUEZ Využití zdrojů a.s. Cca 1 g kompostu byl rozsuspendován ve 100 ml minerálního kultivačního média M1 o následujícím složení:

35

40 Složení minerálního média M1:

Glycerol	20 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O	9 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 g/L
NH <sub>4</sub> Cl	1 g/L
Yeast Extract	0,5 g/L
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g/L
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,02 g/L
Fe <sup>III</sup> NH <sub>4</sub> – citrát	0,0012 g/L

\* Roztok stopových prvků 1 mL/L

- 5 Úprava pH pomocí 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> nebo NaOH na hodnotu 7,0

\* Složení roztok stopových prvků:

EDTA	50 g/L
FeCl <sub>3</sub>	8,3 g/L
ZnCl <sub>2</sub>	0,84 g/L
CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,13 g/L
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,1 g/L
MnCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,016 g/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,1 g/L

10

Vzorek byl následně submerzně kultivován při 50 °C po dobu 48 h. Následně byla takto připravená směsná kultura převedena (inokulační poměr 10 % obj.) do čerstvého kultivačního média a opět kultivována při teplotě 50 °C po dobu 48 h. Takto připravená směsná kultura byla vystavena působení hypertonického prostředí a následně hypotonickému prostředí tak, jak je schematicky uvedeno na obrázku 2. Po expozici hypertonicnému a hypotonickému šoku byla buněčná suspenze vyseta na misky obsahující totožné médium, které bylo využito k její submerzní kultivaci a inkubována při 50 °C po dobu 48 h. Na miskách se objevily dva typy kolonií - matné ploché béžové kolonie s nepravidelným plazivým okrajem, které významně dominovaly (cca 90 % všech kolonií na miskách) a pak menší podíl drobných bílých kolonií s jasně ohraničeným okrajem. Oba typy kolonií byly vyšetřeny co do přítomnosti PHA pomocí metody infračervené spektroskopie využívající techniky zeslabeného úplného odrazu (ATR- FTIR) a přítomnost PHA byla prokázána pouze u dominantního typu kolonií, což jednoznačně prokazuje efektivitu použitého isolačního postupu. V rámci PHA produkujícího typu kolonií byl vybrán dominantní typ kolonie, která byla označena jako isolát H1.

25

Průkaz přítomnosti PHA granul u získaných isolátů byl proveden nejen pomocí FTIR



spektroskopie, ale také mikroskopickým vyšetřením isolátů pomocí Transmisní Elektronové Mikroskopie (TEM), výsledky pro isolát H1 jsou zobrazeny na obrázku 3.

Bakteriální izolát byl následně identifikován pomocí standardních mikrobiologických testů.

5

*Výsledky fenotypové identifikace isolátu H1 (provedeno Českou sbírkou mikroorganismů):*

*Mikroskopie:* Gram-negativní tyčky (gram-pozitivní stěna potvrzena KOH testem), jednotlivě, v nepravidelných shlucích, spory oválné, zduřující buňku, umístěné centrálně

10

*Morfologie kolonií:* matné, ploché, běžové, okraj nepravidelný, plazivý

*Pozitivní testy:* kataláza, anaerobní růst, hydrolýza želatiny, kaseinu, ONPG a lecithinu, ureáza, kyselina z glukózy, xylózy a laktózy, růst v přítomnosti 7 % NaCl, růst při 60 °C, hemolýza

15

*Negativní testy:* hydrolýza škrobu, Tweenu 80, eskulinu, tyrosinu a DNA, acetoin, redukce nitrátů, kyselina z mannitolu, celobiózy, fruktózy a inositolu, růst v přítomnosti 10% NaCl, růst při 30 °C, růst při 65 °C Simmons citrát, arginin dihydroláza.

20

Kromě standardní fenotypové charakterizace byla také provedena identifikace kmene pomocí systému BIOLOG - v obou případech byla kultura identifikována jako *Aneurinibacillus* sp., bližší taxonomické zařazení nebylo na základě výsledků možné.

25

Dalším přístupem pro taxonomické zařazení isolátu byla parciální sekvenace 16S rRNA genu pomocí primerů 16S-F (5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') a 16S-R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'). Při srovnání sekvence byla nejvyšší podobnost nalezena pro *Aneurinibacillus thermoaerophilus*.

30

Byl tedy získán termofilní Gram-pozitivní izolát *Aneurinibacillus* sp. H1, který může být s výhodou využit k biotechnologické produkci PHA. Kmen byl uložen jako patentová kultura v České sbírce mikroorganismů a bylo mu uděleno sbírkové číslo CCM 8960, doklady o uložení ve sbírce jsou přílohou patentové žádosti.

35

Předmětem vynálezu je způsob biotechnologické výroby polyhydroxyalkanoátů, které jsou produkovány mikroorganismem termofilního Gram-pozitivního kmene *Aneurinibacillus* sp. H1, nebo jeho přirozeně se vyskytujícími mutanty, geneticky modifikovanými buňkami tohoto kmene, které mají stejné vlastnosti, získanými metodami mutagenese nebo technikami rekombinantní DNA v kultivačním médiu obsahujícím uhlikatý substrát, komplexní zdroj dusíku a anorganický zdroj dusíku.

40

Uhlikatým substrátem je výhodně čistý glycerol, odpadní glycerol, glukóza, případně jejich směs, kdy vyrobeným polyhydroxyalkanoátem je homopolymer poly(3-hydroxybutyrát); počáteční koncentrace glycerolu je ve výhodném provedení 20 g/L.

45

V případě, že kultivační médium obsahuje kromě uhlikatého substrátu prekurzor s lichým počtem uhlikových atomů, jako například propionát, kyselinu propionovou, valerát, kyselinu valerovou nebo jejich směs, vyrobeným polyhydroxyalkanoátem je kopolymer poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát).

50

V případě, že kultivační médium obsahuje jako uhlikatý substrát a/nebo přídavek 1,4-butandiolu nebo gamabutyrolaktonu nebo jejich strukturálních analogů obsahujících obdobný strukturální motiv - hydroxylovou skupinu na posledním uhlikatém atomu čtyř případně šesti- uhlikatého skeletu, vyrobeným polyhydroxyalkanoátem je kopolymer poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát).

55

Kultivační médium obsahuje jako uhlikatý substrát výhodně 1,4-butandiol, nejlépe v počáteční



koncentraci 4 až 6 g/L. Uhlíkatým substrátem může být výhodně také 1,4-butandiol v kombinaci s glycerolem, nejvýhodněji v koncentraci glycerolu 2 až 8 g/L.

5 Kultivační teplota při výrobě polyhydroxyalkanoátů se pohybuje v rozmezí 45 °C až 65 °C, nejlépe v rozmezí 45 °C až 50 °C.

Podle výhodného provedení je komplexním zdrojem dusíku v kultivačním médiu při výrobě polyhydroxyalkanoátů Trypton, nejlépe v koncentraci 0,5 g/L, anorganickým zdrojem dusíku v kultivačním médiu při výrobě polyhydroxyalkanoátů je výhodně dusičnan amonný, nejlépe v  
10 koncentraci 1,0 g/L.

Kultivační médium (dále označeno jako M2) pro provedení způsobu podle vynálezu v baňkovém měřítku i laboratorním bioreaktoru obsahuje výhodně následující složky v uvedených koncentracích:

15

Glycerol	20 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O	9 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 g/L
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 g/L
Trypton	0,5 g/L
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g/L
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,02 g/L
Fe <sup>III</sup> NH <sub>4</sub> – citrát	0,0012 g/L
Roztok stopových prvků	1 mL/L,
Uhlíkatý substrát	

kde roztok stopových prvků obsahuje následující složky v uvedených koncentracích:

EDTA	50 g/L
FeCl <sub>3</sub>	8,3 g/L
ZnCl <sub>2</sub>	0,84 g/L
CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,13 g/L
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,1 g/L
MnCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,016 g/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,1 g/L

20

přičemž pH kultivačního média je 7.

#### 25 Objasnění výkresů

Obr. 1: Misky termofilních kultur barveny pomocí aplikace Nilské červeně do agaru, žádná z fluoreskujících kolonií nevykazovala schopnost produkce PHA.

30 Obr. 2: Postup obohacení směsné kultury o producenty PHA pomocí vystavení původní kultury silně hypertonickému a následně silně hypotonickému prostředí.

Obr. 3: Snímky z Transmisní Elektronové Mikroskopie isolátu H1, šipky poukazují na přítomnost PHA granulí v bakteriálních buňkách.

Obr. 4: Záznam základních parametrů vsádkové produkce P(3HB) s využitím isolátu *Aneurinibacillus* sp. H1 a odpadního glycerolu jako substrátu v laboratorním bioreaktoru Sartorius B-Plus o maximálním pracovním objemu 5 L.

Obr. 5: Záznam základních parametrů vsádkové produkce P(3HB-co-4HB) s využitím isolátu *Aneurinibacillus* sp. H1 a 1,4-butandiolu jako substrátu v laboratorním bioreaktoru Sartorius B-Plus o maximálním pracovním objemu 5 L.

#### Příklady uskutečnění vynálezu

Kultivace byly prováděny v Erlenmeyerových baňkách o objemu 250 ml obsahujících 100 mL kultivačního média. Jako inokulum pro samotné produkční experimenty byla využita kultura kultivovaná po dobu 24 h v komplexním NB médiu, použitý inokulační poměr byl 5 %. Pokud není uvedeno jinak, kultivace probíhala po dobu 72 h na termostátované třepačce (180 rpm) při teplotě 45 °C. Po ukončení kultivace byly buňky z 10 mL suspenze centrifugovány (6000 x g, 5 minut), promyty a následně vysušeny do konstantní hmotnosti při 105 °C. Koncentrace biomasy byla stanovena gravimetricky a obsah PHA a monomerní složení polymeru bylo stanoveno pomocí plynové chromatografie s plamenově-ionizační detekcí (GC-FID). Pro analýzu molekulové hmotnosti byl polymer vyextrahován pomocí chloroformu, přebytečné rozpouštědlo bylo odpařeno a molekulová hmotnost získaného polymeru byla stanovena pomocí vylučovací chromatografie (SEC-MALS).

#### Příklad 1

##### Produkce polymeru poly(3-hydroxybutyrátu)

Isoláty mohou být využity k produkci PHA s využitím různých základních uhlikatých substrátů, kdy bakteriální kultura produkovala výhradně homopolymer 3-hydroxybutyrátu P(3HB), jak dokládá tabulka 2.

Tabulka 2. Produkce PHA s využitím různých uhlikatých substrátů. Doba kultivace 72 h, 50 °C, 180 rpm, médium M1, zdroje uhlíku byly aplikovány v koncentraci 20 g/L.

Substrát	Biomasa [g/L]	P(3HB) [%]	P(3HB) [g/L]
Sacharosa	0,41 ± 0,10	16,52 ± 0,31	0,07 ± 0,02
Manosa	0,19 ± 0,08	14,85 ± 0,05	0,03 ± 0,01
Galaktosa	0,22 ± 0,04	8,94 ± 0,13	0,02 ± 0,00
Glukosa	2,00 ± 0,36	27,74 ± 0,18	0,55 ± 0,10
Fruktosa	0,24 ± 0,01	14,32 ± 0,21	0,03 ± 0,00
Laktosa	0,20 ± 0,01	9,06 ± 0,20	0,02 ± 0,00
Glycerol	2,19 ± 0,07	45,95 ± 0,10	1,00 ± 0,04
Olej	0,01 ± 0,00	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>

Z výsledků v tabulce 2 je patrné, že nejlepším substrátem je glycerol, na kterém isolát H1 vykazoval dobrý růst a významnou produkci polymeru. Významného výtěžku bylo dosaženo také s využitím glukózy, u ostatních substrátů je možné růst biomasy a produkci polymeru hodnotit spíše jako slabé, při použití oleje jako jediného testovaného uhlikatého substrátu pak nebyla kultura H1 schopna růstu ani produkce P(3HB).

Dále byla testována schopnost produkce P(3HB) při různých teplotách, jak uvádí tabulka 3.

5 Tabulka 3. Produkce PHA s využitím různých kultivačních teplot. Doba kultivace 72 h, 50 °C, 180 rpm, médium M1, zdroj uhlíku glycerol 20 g/L.

Teplota [C]	Biomasa		P(3HB)
	[g/L]	P(3HB)[%]	[g/L]
45°C	3,68 ± 0,63	55,31 ± 5,81	2,03 ± 0,41
50°C	3,23 ± 0,03	46,01 ± 3,55	1,49 ± 0,37
55°C	1,46 ± 0,05	50,18 ± 1,35	0,73 ± 0,03
60°C	0,80 ± 0,01	30,60 ± 1,35	0,24 ± 0,01
65°C	0,89 ± 0,06	32,66 ± 0,24	0,29 ± 0,02

10 Jak dokládá tabulka 3, je isolát *Aneurinibacillus* sp. H1 schopen produkce P(3HB) v širokém rozmezí teplot, solidní produktivita byla dosažena i při teplotě 65 °C, nicméně teplotní optimum bakterie se pohybuje v rozmezí 45 až 50 °C, což už je teplota dostatečně vysoká k tomu, aby bránila růstu nejčastějším kontaminantům - běžným mesofilním bakteriím. Proces založený na využití isolátu *Aneurinibacillus* sp. H1 je tedy robustní vůči mikrobiální kontaminaci.

15 Produkční parametry procesu je dále možno výrazně zvýšit optimalizací základních kultivačních podmínek, především pak složením kultivačního média, jak dokládají tabulky 4, 5 a 6, ve kterých jsou demonstrovány výsledky výběru a optimalizace použitých komplexních a anorganických zdrojů dusíku.

20 Tabulka 4. Výsledky baňkového experimentu optimalizace počáteční koncentrace kvasničného extraktu (komplexní zdroj dusíku) a chloridu amonného (anorganický zdroj dusíku). Doba kultivace 72 h, 50 °C, 180 rpm, médium M1, zdroj uhlíku glycerol 20 g/L.

Kvasničný extrakt [g/L]	NH <sub>4</sub> Cl [g/L]	Biomasa [g/L]	P(3HB) [%]	P(3HB) [g/L]
0	3	1,48 ± 0,04	48,38 ± 0,01	0,71 ± 0,02
3	1	1,91 ± 0,09	31,35 ± 0,24	0,60 ± 0,03
3	0	1,57 ± 0,16	21,01 ± 1,01	0,33 ± 0,04
0,5	1	1,95 ± 0,18	51,86 ± 1,28	1,01 ± 0,09

25 Tabulka 5. Výsledky baňkového experimentu identifikace optimálního anorganického zdroje dusíku. Doba kultivace 72 h, 50 °C, 180 rpm, médium M1, zdroj uhlíku glycerol 20 g/L.

Anorganický zdroj N	Biomasa [g/L]	P(3HB) [%]	P(3HB) [g/L]
NH <sub>4</sub> Cl	1,86 ± 0,04	42,08 ± 0,39	0,78 ± 0,02
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,26 ± 0,07	51,29 ± 1,62	1,67 ± 0,06
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	3,67 ± 0,06	58,88 ± 0,85	2,16 ± 0,05
močovina	1,48 ± 0,11	44,75 ± 0,25	0,66 ± 0,05

30 Tabulka 6. Výsledky baňkového experimentu identifikace optimálního komplexního zdroje dusíku. Doba kultivace 72 h, 50 °C, 180 rpm, médium M1, zdroj uhlíku glycerol 20 g/L.

<b>Komplexní zdroj</b>	<b>N</b>	<b>Biomasa [g/L]</b>	<b>P(3HB) [%]</b>	<b>P(3HB) [g/L]</b>
Kvasničný extrakt		1,86 ± 0,04	42,08 ± 0,39	0,78 ± 0,02
Masový pepton		2,89 ± 0,06	52,07 ± 3,39	1,50 ± 0,10
Sójový pepton		1,98 ± 0,06	48,71 ± 0,93	0,96 ± 0,03
Trypton		3,46 ± 0,09	53,61 ± 1,74	1,85 ± 0,08
Hovězí extrakt		2,90 ± 0,02	50,49 ± 4,20	1,46 ± 0,12

- 5 Jako optimální zdroj komplexního dusíku byl identifikován Trypton, anorganický zdroj dusíku pak  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , optimální koncentrace komplexního zdroje dusíku je 0,5 g/L a anorganického zdroje pak 1 g/L.

Výstupem optimalizačních experimentů je kultivační médium M2 o následujícím složení:

Glycerol	20 g/L
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	9 g/L
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,5 g/L
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1 g/L
Trypton	0,5 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,02 g/L
$\text{Fe}^{\text{III}}\text{NH}_4$ – citrát	0,0012 g/L

10

\*Roztok stopových prvků 1 mL/L

Úprava pH pomocí 1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  nebo NaOH na hodnotu 7,0

15

\*Složení roztoku stopových prvků:

EDTA	50 g/L
$\text{FeCl}_3$	8,3 g/L
$\text{ZnCl}_2$	0,84 g/L
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,13 g/L
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,1 g/L
$\text{MnCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,016 g/L
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,1 g/L



Jako zdroj uhlíku pro produkci P(3HB) byl testován čistý glycerol i odpadní glycerol, který vzniká jako vedlejší produkt při výrobě bionafty, viz tabulka 7.

5 Tabulka 7. Výsledky baňkového experimentu možnosti využití odpadního glycerolu jako substrátu pro produkci P (3HB). Doba kultivace 72 h, 50 °C, 180 rpm, médium M2.

Substrát	Koncentrace [g/L]	Biomasa [g/L]	P(3HB) [%]	P(3HB) [g/L]
glycerol	10	1,60 ± 0,50	13,00 ± 1,20	0,21 ± 0,03
	20	3,27 ± 0,13	51,97 ± 2,28	1,70 ± 0,11
	30	2,72 ± 0,07	53,40 ± 4,82	1,45 ± 0,19
odpadní glycerol	10	1,08 ± 0,08	10,78 ± 1,33	0,12 ± 0,02
	20	2,88 ± 0,13	49,45 ± 0,65	1,42 ± 0,03
	30	1,67 ± 0,32	46,10 ± 5,55	0,77 ± 0,13

10 Jak dokládají výsledky presentované v tabulce 7, kromě čistého glycerolu je jako substrát pro produkci P(3HB) možné využít také levný odpadní glycerol, který vzniká jako vedlejší produkt při výrobě bionafty. I přes přítomnost řady toxických látek (metanol, těžké kovy, volné mastné kyseliny atd.) je bakteriální kultura *Aneurinibacillus* sp. H1 schopna využívat odpadní glycerol s podobnou efektivitou jako glycerol čistý, optimální počáteční koncentrace jak čistého tak odpadního glycerolu je 20 g/L, při nižší koncentraci je kultura vystavena limitací zdrojem uhlíku, což se negativně projeví na růstu i produkci P(3HB), při vyšší dávce glycerolu je kultura částečně 15 inhibována substrátem, což je patrné na růstu biomasy především u odpadního glycerolu.

Proces produkce PHA byl kromě baněk otestován také v laboratorním bioreaktoru. Kultivace v laboratorním reaktoru byly provedeny ve fermentoru Biostat B-plus od firmy Sartorius. Maximální 20 pracovní objem fermentoru byl 5 L, fermentor obsahoval 3,5 L kultivačního média média M2 s 20 g/L glycerolu a byl inokulován 350 mL inokula kultivovaného 24 hodin v médiu Nutrient Broth (popsáno níže). Během kultivace byla teplota regulována na hodnotě 45 °C, pH bylo regulováno přidávkem 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> nebo 30 % hmotn. NaOH na hodnotě 7, aerace byla nastavena na hodnotu 1,5 vvm a míchání bylo pomocí řídicí jednotky regulováno tak, aby koncentrace 25 rozpuštěného kyslíku dosahovala hodnoty 10 až 30 % saturace. V pravidelných intervalech byly odebrány vzorky na stanovení biomasy, PHA tak, jak je popsáno výše, zbytkový glycerol byl stanoven spektrofotometricky.

#### Nutrient Broth

30 Hovězí extrakt	10 g/L
Pepton	10 g/L
NaCl	5 g/L

Záznam základních parametrů tohoto kultivačního postupu je předmětem obrázku 4.

35 Během vsádkové kultivace kultura vykazovala silný růst až cca do 8 hodiny kultivační, kdy se z kultivačního média vyčerpá dusík, což je patrné především z prudkého poklesu nároků na kyslík, který se projevil poklesem otáček míchadla. Následně byl primárně spotřebováván glycerol především za účelem biosyntézy P(3HB), obsah polymeru biomase v následující kultivační periodě narostl na hodnotu cca 25 % hmotn. V 17 h kultivační byla zastavena spotřeba báze, což 40 pravděpodobně koreluje s vyčerpáním glycerolu. V tomto kultivačním čase bylo pravděpodobně

nejvýhodnější kultivaci ukončit. Po 21 h kultivace bylo dosaženo relativně vysokého výtěžku biomasy 5,7 g/L, obsah P(3HB) v biomase dosáhl cca 26 % hmotn. a výtěžek polymeru pak hodnoty 1,5 g/L. Pro navýšení výtěžku bylo proto potřeba jiné kultivační strategie umožňující nadávkovat vyšší množství uhlíkatého i dusíkatého substrátu a zároveň precizněji využít limitaci dusíkem jako nástroje pro iniciaci syntézy polymeru.

#### Příklad 2

##### Produkce kopolymeru poly(3-hydroxybutyrátu-co-3-hydroxyvalerátu)

Isolát *Aneurinibacillus* sp. H1 je kromě produkce P(3HB) homopolymeru schopen také produkce kopolymeru poly(3-hydroxybutyrátu-co-3-hydroxyvalerátu) (P(3HB-co-3HV)), pokud je do kultivačního média aplikován vhodný prekurzor obsahující lichý počet uhlíkových atomů, tato schopnost je demonstrována v tabulce 8, kde byly jako prekurzory 3HV využity kyselina levulinová, propionát, propanol a valerát.

Tabulka 8. Výsledky baňkového experimentu pro posouzení vhodnosti různých prekurzorů 3HV pro produkci kopolymeru P(3HB-co-3HV). Doba kultivace 72 h, 50 °C, 180 rpm, médium M2, glycerol 20 g/L, prekurzor aplikován ve 24 h kultivační hodině, a to v koncentraci 2 g/L.

Isolát	Prekurzor	Biomasa		3HV [mol %]	
		[g/L]	PHA [%]	PHA [g/L]	%]
H1	Levulinová	1,08 ± 0,06	36,70 ± 0,72	0,39 ± 0,02	<i>n.d.</i>
H1	Propionát	1,11 ± 0,04	28,15 ± 0,27	0,31 ± 0,01	32,10 ± 0,02
H1	Propanol	1,47 ± 0,04	45,11 ± 0,05	0,66 ± 0,02	3,66 ± 0,04
H1	Valerát	1,90 ± 0,02	36,29 ± 0,01	0,69 ± 0,01	66,62 ± 0,83

Všechny testované prekurzory částečně inhibovaly růst mikrobiální kultury a tím také snižovaly výtěžek polymeru. Na druhou stranu především při použití propionátu a valerátu dokázala bakteriální kultura syntetizovat kopolymer P(3HB-co-3HV) s velice vysokým obsahem 3HV.

#### Příklad 3

##### Produkce kopolymeru poly(3-hydroxybutyrátu-co-4-hydroxybutyrátu)

Dalším velice zajímavým PHA polymerem, jehož biosyntézy je izolát *Aneurinibacillus* sp. H1 schopen, je kopolymer P(3HB-co-4HB). Za účelem indukce syntézy kopolymeru musí být obvykle bakteriální kultury kultivovány na 1,4-butandiolu,  $\gamma$ -butyrolaktonu a 1,6-hexandiolu případně jejich strukturních analogiích, tedy látkách obsahujících obdobný strukturní motiv - hydroxylovou skupinu na posledním uhlíkatém atomu čtyř případně šesti- uhlíkatého skeletu, viz tabulka 9.

Tabulka 9. Výsledky baňkového experimentu pro posouzení možnosti produkce P(3HB-co-4HB) kopolymeru s využitím různých substrátů sloužících jako prekurzory 4HB. Doba kultivace 72 h, 50 °C, 180 rpm, médium M2, jednotlivé substráty byly aplikovány jako jediný zdroj uhlíku v počáteční koncentraci 8 g/L.

Prekurzor	Biomasa [g/L]	PHA [%]	PHA [g/L]	4HB [mol %]
1,6-hexandiol	0,37 ± 0,08	9,08 ± 0,31	0,03 ± 0,01	<i>n.d.</i>
$\gamma$ -butyrolakton	0,52 ± 0,00	85,84 ± 1,99	0,45 ± 0,01	63,35 ± 3,27
1,4-butandiol	1,02 ± 0,04	75,48 ± 2,36	0,77 ± 0,04	79,91 ± 1,84

Z výsledků uvedených v tabulce 9 je patrné, že nejvhodnějším substrátem pro produkci P(3HB-co-4HB) je 1,4-butandiol, jehož využití umožňuje jednak dosažení nejvyššího výtěžku kopolymeru a zároveň nejvyššího obsahu 4HB v kopolymeru. Dalším možným vhodným substrátem je  $\gamma$ -butyrolakton, i když v tomto případě jsou výtěžky i obsah 4HB v kopolymeru nižší, navíc obecně platí, že  $\gamma$ -butyrolakton je cenově náročnější substrát než 1,4-butandiol.

Dále byla testována vhodná počáteční koncentrace 1,4-butandiolu, viz tabulka 10.

Tabulka 10. Výsledky optimalizace počáteční koncentrace 1,4-butandiolu. Doba kultivace 72 h, 50 °C, 180 rpm. Médium M2.

1,4-BD [g/L]	Biomasa		4HB			
	[g/L]	PHA [%]	PHA [g/L]	[mol %]	Mw [kDa]	PDI
3	1,22 ± 0,11	50,14 ± 2,65	0,61 ± 0,07	90,56 ± 0,70	115,61 ± 7,58	1,05
4	1,67 ± 0,02	54,78 ± 1,21	0,91 ± 0,02	90,89 ± 1,19	128,97 ± 3,85	1,12
5	1,60 ± 0,23	45,73 ± 0,65	0,73 ± 0,11	88,31 ± 0,29	101,13 ± 6,68	1,16
6	1,23 ± 0,15	56,32 ± 0,56	0,69 ± 0,08	92,81 ± 0,04	130,69 ± 2,32	1,13
7	1,13 ± 0,01	51,80 ± 0,71	0,58 ± 0,01	88,02 ± 0,48	120,81 ± 17,9	1,26
8	0,96 ± 0,00	44,00 ± 2,76	0,42 ± 0,03	86,87 ± 1,32	88,40 ± 2,39	1,11
12	0,72 ± 0,06	43,90 ± 2,28	0,32 ± 0,03	83,61 ± 0,94	41,28 ± 2,28	1,19
16	0,56 ± 0,05	43,38 ± 1,26	0,24 ± 0,02	85,99 ± 4,40	37,86 ± 3,53	1,18

Jak dokládají data uvedená v tabulce 10, optimální počáteční koncentrace 1,4-butandiolu je v rozmezí 4 až 6 g/L, vyšší koncentrace mají negativní vliv na výtěžek, ale také na molekulovou hmotnost polymeru.

Proces produkce P(3HB-co-4HB) byl kromě baněk otestován také v laboratorním bioreaktoru Sartorius B-Plus o maximálním pracovním objemu 5 L ve vsádkovém režimu, za podmínek stejných jako v příkladu 1 při testování produkce PHA v laboratorním bioreaktoru (viz výše).

Obrázek 5 je demonstrací průběhu vsádkové produkce P(3HB-co-4HB) s využitím 1,4-butandiolu jakožto jediného substrátu a isolátu bakteriální kultury *Aneurinibacillus* sp. H1, jakožto produkčního kmene. Také v bioreaktoru bylo dosaženo produkce kopolymeru s vysokým obsahem 4-hydroxybutyrátu.

Nicméně, jak naznačují data prezentovaná v tabulkách 9 a 10 a také na obrázku 5, použití 1,4-butandiolu jakožto jediného substrátu vede spíše k nižší produkci biomasy, a to ve svém důsledku také limituje možné výtěžky polymeru. Zdá se, že 1,4-butandiol je pomocí mikrobiální kultury *Aneurinibacillus* sp. H1 velice efektivně inkorporován do struktury kopolymeru, nicméně je to nepříliš vhodný substrát pro pokrytí energetických a dalších metabolických potřeb bakteriální kultury.

Pro nejvýhodnější počáteční koncentraci 1,4-butandiolu byla testována produkce P(3HB-co-4HB) v kombinaci s různou koncentrací glycerolu, viz tabulka 11.

Tabulka 11. Výsledky optimalizace počáteční koncentrace 1,4-butandiolu a glycerolu. Doba kultivace 72 h, 50 °C, 180 rpm. Médium M2, použitý isolát H1.



1,4-BD [g/L]	Glycerol [g/L]	Biomasa [g/L]	PHA [%]	PHA [g/L]	4HB [mol %]	Mw [kDa]	PDI
4	2	2,69 ± 0,15	68,25 ± 0,62	1,83 ± 0,10	83,56 ± 1,48	125,79 ± 3,06	1,66
4	4	2,79 ± 0,03	65,23 ± 2,64	1,82 ± 0,08	74,43 ± 1,70	64,00 ± 1,66	1,08
4	6	2,28 ± 0,26	50,37 ± 0,87	1,15 ± 0,13	42,45 ± 7,88	57,72 ± 4,51	1,72
4	8	2,43 ± 0,01	40,74 ± 3,35	0,99 ± 0,08	36,42 ± 1,63	48,28 ± 4,22	1,72
4	20	2,56 ± 0,11	44,69 ± 1,23	1,14 ± 0,06	4,59 ± 0,01	9,61 ± 0,59	1,03

Jak demonstrují data uvedená v tabulce 11, je tedy výhodné kombinovat 1,4-butandiol s glycerolem, který dokáže izolovaná bakteriální kultura efektivně využít. Současná aplikace glycerolu a 1,4-butandiolu má výrazně pozitivní vliv na výtěžky biomasy i polymeru a zároveň je pomocí volby poměrů obou substrátů možné regulovat poměr 3HB a 4HB v kopolymeru, nicméně je třeba mít na paměti, že vysoký poměr glycerol/1,4-butandiol má překvapivě negativní vliv na molekulovou hmotnost polymeru.

#### Průmyslová využitelnost

Způsob podle vynálezu umožňuje průmyslovou výrobu polyhydroxyalkanoátů s využitím nově izolované termofilní bakteriální kultury *Aneurinibacillus* sp. H1. Biotechnologický proces může být operován za zvýšené teploty, což má pozitivní dopad především na robustnost procesu vůči nežádoucí mikrobiální kontaminaci. Jako substrát pro produkci polyhydroxyalkanoátů je možné využít glycerol, a to včetně odpadního glycerolu vzniklého při výrobě biodieselu.

#### Reference:

1. Kessler B and B. WITHOLT. Encyclopedia of bioprocess technology fermentation, biocatalysis, and bioseparation: Poly(3-hydroxyalkanoates). New York: J. Wiley, 1999, s. 20242040. ISBN 15912-44579.
2. Alejandra RC et al. 2012. Enzymatic degradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by commercial lipases. *Polymer Degradability and Stability* 97, 597-604.
3. Shrivastav A et al. 2013. Advances in the applications of polyhydroxyalkanoate nanoparticles for novel drug delivery system. *BioMed Research International* Article ID 581684:12
4. Turesin F et al. 2001. Biodegradable polyhydroxyalkanoate implants for osteomyelitis therapy: *in vitro* antibiotic release. *Journal of Biomaterial Science* 12, 195-207.
5. Ma X-H et al. 2016. Myocardial patch formation by three-dimensional 3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate cultured with mouse embryonic stem cells. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering* 6, 629-634.
6. Cavalheiro JMBT et al. 2012. Effect of cultivation parameters on the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Bioresource Technology* 111, 391-397.
7. Huong K-H et al. 2018. Production of high molecular weight poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer by *Cupriavidus malaysiensis* USMAA1020 utilising substrate with longer carbon chain. *International Journal of Biological Macromolecules* 116, 217-223.
8. Lee W-H et al. 2004. Effects of culture conditions on the composition of poly(3-



- hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Comamonas acidovorans*. *Polymer Degradation and Stability* 84, 129-134.
9. Raposo RS et al. 2017. Feeding strategies for tuning poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) monomeric composition and productivity using *Burkholderia sacchari*. *International Journal of Biological Macromolecules* 105, 825-833.
10. Kitamura S and Y. Doi 1994. *Biodegradable Plastics and Polyesters: Production of copolyesters from organic acids by mutant strains of Alcaligenes eutrophus*, p. 373-378. ISBN 9780444817082
11. US 6689589 B2 Biological systems for manufacture of polyhydroxyalkanoate polymers containing 4-hydroxyacids.
12. US 006117658A METHODS OF MAKING POLYHYDROXYALKANOATES COMPRISING 4-HYDROXYBUTYRATE MONOMER UNITS
13. US 8546125 B2 Recombinant hosts and methods for manufacturing polyhydroxyalkanoates
14. Lv L et al. 2015. Application of CRISPRi for prokaryotic metabolic engineering involving multiple genes, a case study: Controllable P(3HB-co-4HB) biosynthesis. *Metabolic Engineering* 29, 160-168.
15. Singh AK et al. 2019. Biomedical applications of microbially engineered polyhydroxyalkanoates: an insight into recent advances, bottlenecks, and solutions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103, 2007-2032.
16. Kunasundari B and Sudesh K. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *eXPRESS Polymer Letters*. 5, 620-634.
17. US 6245537 B1 Removing endotoxin with an oxidizing agent from polyhydroxyalkanoates produced by fermentation.
18. Krüger A et al. 2018. Towards a sustainable biobased industry - highlighting the impact of extremophiles. *New Biotechnology* 40, 144-153.
19. Chen G-Q and Jiang X-R. 2018. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 50, 94-100.
20. Koller M 2017. Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters by Extremophiles. *MOJ Polymer Science* 1, 00011.
21. Kucera D et al. 2018. Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*. *Bioresource Technology* 256, 552-556.
22. Garcia-Torreiro M et al. 2017. Application of flow cytometry for monitoring the production of poly(3-hydroxybutyrate) by *Halomonas boliviensis*. *Biotechnology Progress* 33, 276-284.
23. Ye J et al. 2018. Pilot Scale-up of Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) Production by *Halomonas bluephagenesis* via Cell Growth Adapted Optimization Process. *Biotechnology Journal* 13, 1800074.
24. Rodriguez-Contreras, A et al. 2016. Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] production under different salinity conditions by a novel *Bacillus megaterium* strain. *New Biotechnology* 33, 7377.

25. Melanie et al. 2018. Production of biopolymer polyhydroxyalkanoates (PHA) by extreme halophilic marine archaea *Haloferax mediterranei* in medium with varying phosphorus concentration. *Journal of Engineering and Technological Sciences* 50), 255-271.\
- 5 26. Obruca et al. 2017. The presence of PHB granules in cytoplasm protects non-halophilic bacterial cells against the harmful impact of hypertonic environments. *New Biotechnology* 39, 68-80.
27. Sedlacek et al. 2019. PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances. *New Biotechnology* 49, 129-136.
- 10 28. AT 513449 A1 Use halophilic microorganisms for the production of valuable materials.
29. DE 102008045237 B4 Method for the simultaneous production of PHA and compatible solutes in halophilic bacteria.
- 15 30. JP 5164182 B2 Polyhydroxyalkanoate according halobacterium (PHAs) method of production and halophilic.
31. JP 2011083204 A Method for highly efficiently producing polyhydroxyalkanoate (phas) or the like with halophilic bacterium.
- 20 32. Ibrahim MH and Steinbüchel A 2010 High-cell-density cyclic fedbatch fermentation of a poly (3-hydroxybutyrate)-accumulating thermophile, *Chelatococcus* sp. strain MW10. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 7890-7895.
- 25 33. Pantazaki et al. 2003. Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis in *Thermus thermophilus*. purification and biochemical properties of PHA synthase. *Molecular and Cellular Biochemistry* 254, 173-183.
- 30 34. Papi et al. 2008. Identification of PHA loci in *Thermus thermophilus* HB8 genome. *The FEBS Journal* 275, 422-422.
- 35 35. Sheu et al. 2009. Thermophilic bacterium *Caldimonas taiwanensis* produces poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from starch and valerate as carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology* 44, 289-294.
- 40 36. Ibrahim et al. 2010. Isolation and characterization of new poly (3HB)-accumulating star-shaped cell aggregates forming thermophilic bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 109, 1579-1590.
37. Liu et al. 2014. Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus shackletonii* K5 from a biotrickling filter for the production of polyhydroxybutyrate. *Journal of Environmental Science in China* 26, 1453-1462.
- 45 38. Giedraityte G and Kalediene L. 2015. Purification and characterization of polyhydroxybutyrate produced from thermophilic *Geobacillus* sp. AY 946034 strain. *Chemija* 26, 38-45.
- 50 39. Xiao et al. 2015. Thermophilic production of polyhydroxyalkanoates by a novel *Aneurinibacillus* strain isolated from Gudao oilfield, China. *Journal of Basic Microbiology* 55, 1125-1133.
- 55 40. CN 103667153 B Poly(3-hydroxybutyrate) generating thermophiles.

## PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Termofilní Gram-pozitivní bakteriální kmen *Aneurinibacillus species* H1, uložený v České sbírce mikroorganismů pod označením CCM 8960, produkující polyhydroxyalkanoáty.
2. Způsob biotechnologické výroby polyhydroxyalkanoátů pomocí termofilního Gram-pozitivního bakteriálního kmene *Aneurinibacillus species* H1 podle nároku 1 nebo jeho přirozeně se vyskytujících mutantů, geneticky modifikovanými buňkami tohoto kmene, které mají stejné  
10 vlastnosti, získanými metodami mutagenese nebo technikami rekombinantní DNA v kultivačním médiu obsahujícím uhlikatý substrát, komplexní zdroj dusíku a anorganický zdroj dusíku.
3. Způsob výroby podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že uhlikatým substrátem je čistý glycerol, odpadní glycerol a/nebo glukóza, kde vyrobeným polyhydroxyalkanoátem je homopolymer  
15 poly(3-hydroxybutyrát).
4. Způsob výroby podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že počáteční koncentrace čistého glycerolu nebo odpadního glycerolu je 20 g/L.
- 20 5. Způsob podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že kultivační médium obsahuje také prekurzor s lichým počtem uhlíkových atomů, jako například propionát, kyselinu propionovou, valerát, kyselinu valerovou nebo jejich směs, kdy vyrobeným polyhydroxyalkanoátem je kopolymer poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát).
- 25 6. Způsob podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že uhlikatým substrátem a/nebo prekurzorem v kultivačním médiu je 1,4-butandiol nebo gamabutyrolakton nebo strukturální analog těchto sloučenin obsahující hydroxylovou skupinu na posledním uhlikatém atomu čtyř- nebo šesti-uhlikatého skeletu, kdy vyrobeným polyhydroxyalkanoátem je kopolymer poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát).
- 30 7. Způsob podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že kultivační médium obsahuje jako uhlikatý substrát 1,4-butandiol v počáteční koncentraci 4 až 6 g/L.
8. Způsob podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že kultivační médium obsahuje jako uhlikatý  
35 substrát glycerol v koncentraci 2 až 8 g/L a 1,4-butandiol.
9. Způsob výroby podle nároků 2 až 8, **vyznačující se tím**, že kultivační teplota je v rozmezí 45 °C až 65 °C, nejlépe 45 °C až 50 °C.
- 40 10. Způsob výroby podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že komplexním zdrojem dusíku v kultivačním médiu je Trypton.
11. Způsob výroby podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že koncentrace Tryptonu v kultivačním médiu je 0,5 g/L.
- 45 12. Způsob výroby podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že anorganickým zdrojem dusíku v kultivačním médiu je dusičnan amonný.
13. Způsob výroby podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že koncentrace dusičnanu amonného v  
50 kultivačním médiu je 1,0 g/L.
14. Kultivační médium pro provedení způsobu podle nároku 2 obsahující následující složky v uvedených koncentracích:

	Glycerol	20 g/L
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 12 H <sub>2</sub> O	9 g/L
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 g/L
5	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 g/L
	Trypton	0,5 g/L
	MgSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g/L
	CaCl <sub>2</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	0,02 g/L
	Fe <sup>III</sup> NH <sub>4</sub> - citrát	0,0012 g/L
10	roztok stopových prvků uhlíkatý substrát,	1 mL/L,

kde roztok stopových prvků obsahuje následující složky v uvedených koncentracích:

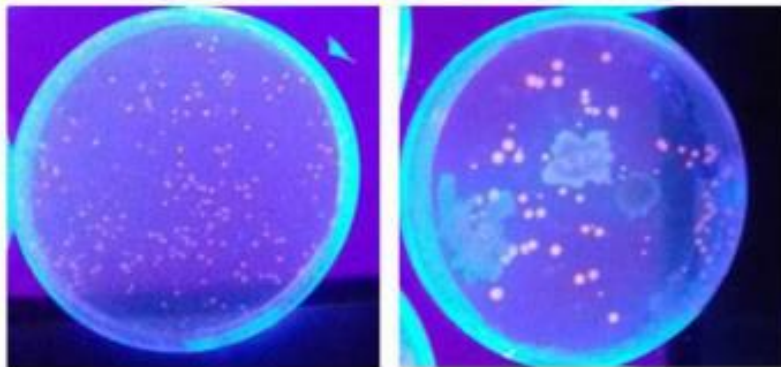
15	EDTA	50 g/L
	FeCl <sub>3</sub>	8,3 g/L
	ZnCl <sub>2</sub>	0,84 g/L
	CuCl <sub>2</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	0,13 g/L
	CoCl <sub>2</sub> • 6 H <sub>2</sub> O	0,1 g/L
20	MnCl <sub>2</sub> • 6 H <sub>2</sub> O	0,016 g/L
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,1 g/L,

přičemž pH kultivačního média je 7.

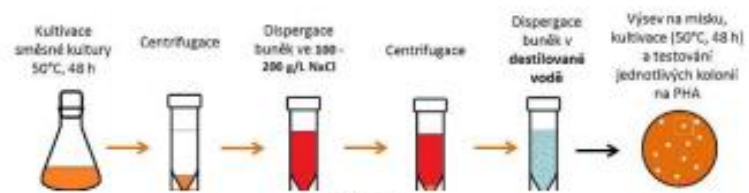
3 výkresy

25

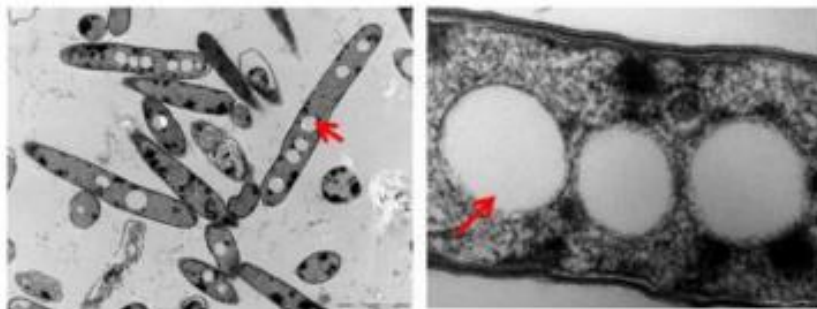




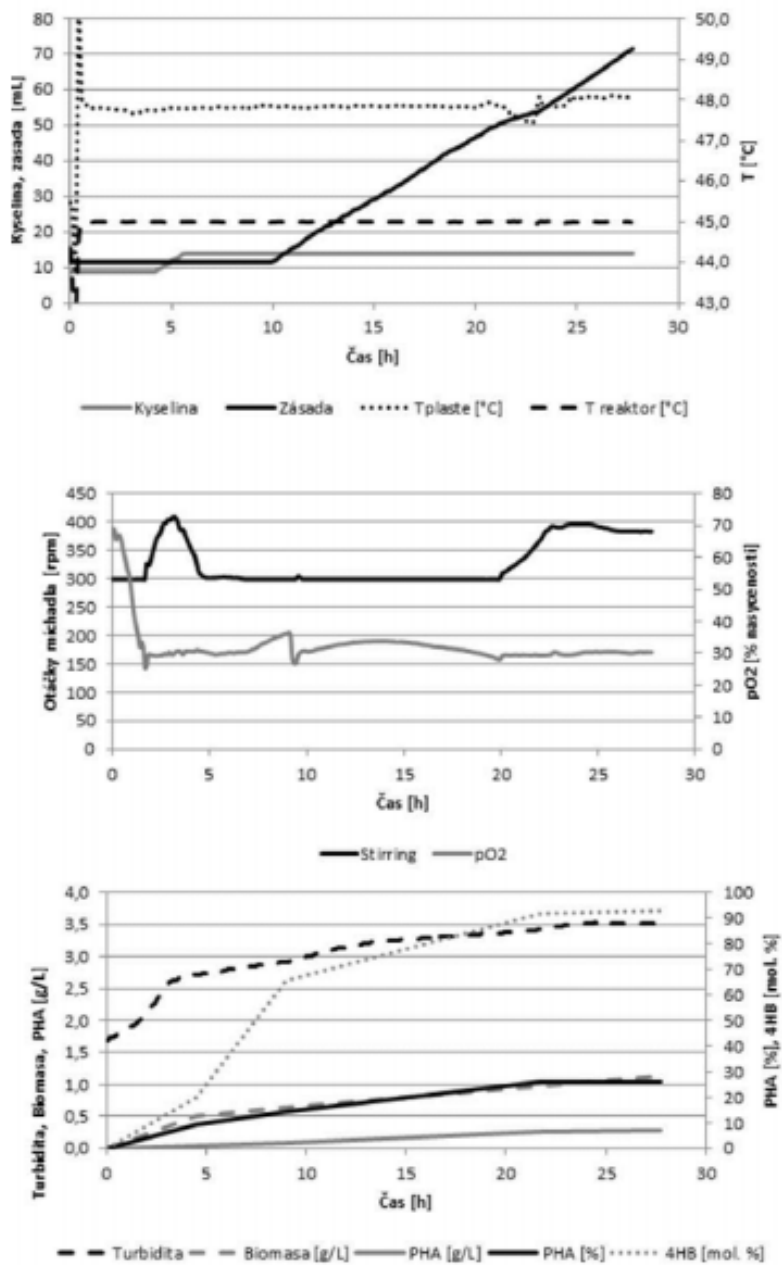
Obr. 1



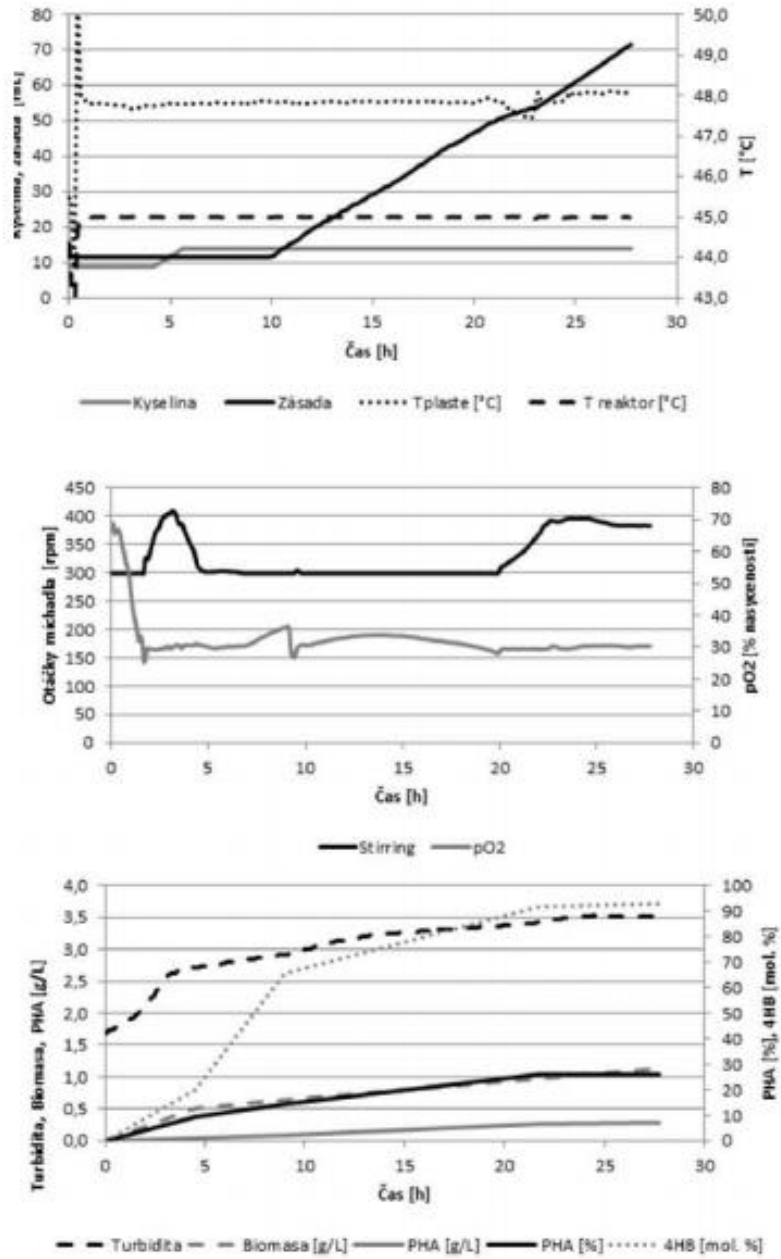
Obr. 2



Obr. 3



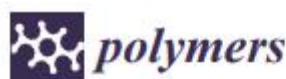
Obr. 4



Obr. 5



## 10.5. 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



Article

### 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

Iva Pernicová<sup>1</sup>, Ivana Novácková<sup>1</sup>, Petr Sedláček<sup>1</sup>, Xenie Kourilová<sup>1</sup>, Michal Kalina<sup>1</sup>, Adriana Kovalčík<sup>1</sup>, Martin Koller<sup>2,3</sup>, Jana Nebesarová<sup>4,5</sup>, Vladislav Krzyžanek<sup>6</sup>, Kamila Hrubanová<sup>6</sup>, Jiri Masilko<sup>1</sup>, Eva Slaninová<sup>1</sup> and Stanislav Obruca<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkynova 118, 612 00 Brno, Czech Republic; xpernicovai@fch.vut.cz (I.P.); xenovackova@fch.vut.cz (I.N.); sedkacek-p@fch.vut.cz (P.S.); xckourilovax@fch.vut.cz (X.K.); kalina-m@fch.vut.cz (M.K.); kovalcik@fch.vut.cz (A.K.); masilko@fch.vut.cz (J.M.); xeslaninovae@fch.vut.cz (E.S.)

<sup>2</sup> Office of Research and Management, c/o Institute of Chemistry, NAWI Graz, University of Graz, Heinrichstrasse 28/VI, 8010 Graz, Austria; martin.koller@uni-graz.at

<sup>3</sup> ARENA Arbeitsgemeinschaft für Ressourcenschonende & Nachhaltige Technologien, Inffeldgasse 21b, 8010 Graz, Austria

<sup>4</sup> Biology Centre, The Czech Academy of Sciences, v.v.i., Branisovska 31, 370 05 Ceske Budejovice, Czech Republic; nebe@paru.cas.cz

<sup>5</sup> Faculty of Science, University of South Bohemia, Branisovska 31, 370 05 Ceske Budejovice, Czech Republic

<sup>6</sup> Institute of Scientific Instruments of the Czech Academy of Sciences, v.v.i., Kralovopolska 147, 612 64 Brno, Czech Republic; krzyzanek@isibrno.cz (V.K.); hrubanova@isibrno.cz (K.H.)

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

Received: 16 April 2020; Accepted: 26 May 2020; Published: 29 May 2020



**Abstract:** Extremophilic microorganisms are considered being very promising candidates for biotechnological production of various products including polyhydroxyalkanoates (PHA). The aim of this work was to evaluate the PHA production potential of a novel PHA-producing thermophilic Gram-positive isolate *Aneurinibacillus* sp. H1. This organism was capable of efficient conversion of glycerol into poly(3-hydroxybutyrate) (P3HB), the homopolymer of 3-hydroxybutyrate (3HB). In flask experiment, under optimal cultivation temperature of 45 °C, the P3HB content in biomass and P3HB titers reached 55.31% of cell dry mass and 2.03 g/L, respectively. Further, the isolate was capable of biosynthesis of PHA copolymers and terpolymers containing high molar fractions of 3-hydroxyvalerate (3HV) and 4-hydroxybutyrate (4HB). Especially 4HB contents in PHA were very high (up to 91 mol %) when 1,4-butanediol was used as a substrate. Based on these results, it can be stated that *Aneurinibacillus* sp. H1 is a very promising candidate for production of PHA with tailored material properties.

**Keywords:** polyhydroxyalkanoates; thermophiles; *Aneurinibacillus* sp.; P(3HB-co-4HB); P(3HB-co-3HV-co-4HB)

#### 1. Introduction

The term “thermophiles” is devoted to microorganisms revealing optimal growth temperature above 45 °C [1]. Actually, these microbes are ubiquitous since they can be isolated from a wide range of

habitats from freshly fallen snow to pasteurized milk to geothermal areas like hot springs [2]. Currently, thermophiles attract attention of industrial biotechnologists since bioprocesses operated at elevated temperatures have a number of advantages, including a reduced risk of microbial contamination, lowered jeopardy by phage infection, improved solubility of substrates such as polysaccharide-rich resources, continuous and direct recovery of volatile metabolites from fermentation broth such as alcohols or volatile fatty acids (VFAs) and decreased cooling costs and demands for cooling water due to the higher temperature difference between bioreactor and the ambient air. On the other side, it should be pointed out that final energy balance of the process must be precisely evaluated at large scale to estimate whether operation of the process at elevated temperature can be economically feasible. Moreover, another aspect which should be taken into account is reduced solubility of oxygen under higher temperatures, which might disadvantage aerobic processes [1]. Professor Chen has recently defined the concept of “Next Generation Industrial Biotechnology” (NGIB), which is based on utilization of extremophilic microorganisms as producing units. Since extremophiles are capable of thriving under conditions which exclude most common mesophilic contaminants, NGIB can be principally operated under semi-sterile or even non-sterile conditions, which reduces costs of the process. Moreover, since NGIB processes are naturally robust against contamination, they can be run in continuous mode for long periods. Continuous processes are positive in terms of productivity and efficiency of the process due to the elimination of permanent unproductive times of revamping, which is needed in non-continuous processes for emptying and preparation of the bioreactor between individual cultivation batches [3].

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are microbial polyesters which are accumulated by numerous prokaryotes in form of intracellular granules primarily as storage compounds; nevertheless, they also enhance robustness of the microbes against various stressors [4]. In most microorganisms, PHA accumulation is favored when external carbon substrate is present in excess, but nitrogen, phosphorous or other elements are lacking in parallel, which inhibits multiplication of cells [5]. PHA are very promising materials because they can be used as fully biodegradable and bioresource-based alternatives to petrochemical polymers since mechanical and technological properties of PHA are similar to some polymers produced from petrochemical resources. In fact, properties of PHA strongly depend upon their monomer composition. The most common and the best-studied member of the PHA family, namely poly(3-hydroxybutyrate) (P(3HB)), the homopolymer of 3-hydroxybutyrate (3HB), has a rather high melting temperature ( $T_m$ ) of about 180 °C, which is very close to the temperature of its degradation ( $T_d$ ; about 200 °C). It is remarkable that the native PHA material, organized as intracellular granules (“carbonosomes”) in the cytoplasm of bacterial cells, is completely amorphous, however, when the material is extracted from the cells, it quickly crystallizes; therefore, the material is rigid and brittle with only limited elongation at break (about 3%) [6]. Nevertheless, material properties can be tailored when other monomer subunits are incorporated into the polymer chain. For instance, when 3-hydroxyvalerate (3HV) is inserted into the polymer chain, the resulting copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (P(3HB-co-3HV)) possesses a lower melting temperature and also a less crystalline structure, which are very positive features considering the processing of the materials [7]. Alternatively, 4-hydroxybutyrate (4HB) can be also introduced into the polymer by some bacteria and haloarchaea; PHA containing 4HB subunits reveal only minor crystallinity, high flexibility and even improved biodegradability in numerous environments including the human body. Therefore, they are very suitable for applications in various fields including high-end medical applications such as implants or drug delivery systems [8].

To achieve biosynthesis of above mentioned copolymers, most microbes require supplementation of precursors structurally related to particular monomers. For instance, to induce synthesis of polymers containing 3HV subunits, odd carbon number precursors such as n-propanol, propionate, n-pentanol or valerate are applied. Similarly, for production of 4HB-containing polymers, precursor compounds structurally related to 4HB such as 1,4-butanediol,  $\gamma$ -butyrolactone (GBL) or 1,6-hexanediol are utilized [9].



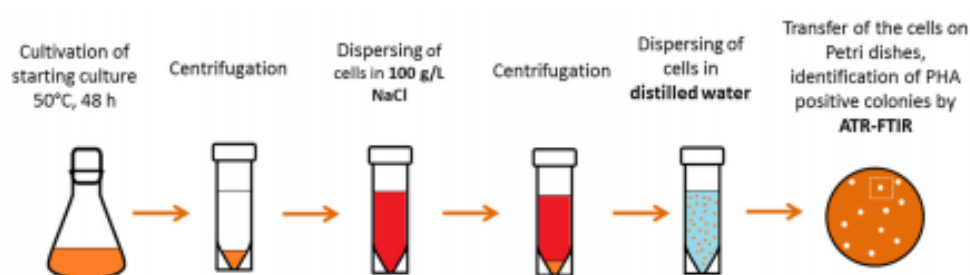
PHA are very promising materials; however, they are disadvantaged in competition with petrochemical polymers by their high production costs [10]. There are several strategies which could facilitate sustainable and economically feasible production of PHA such as utilization of cheap carbon substrates, for instance waste or side products of food industry or agriculture [11], or the use of genetically engineered strains revealing high productivity and substrate-to-product conversion yields [12]. Furthermore, considering all the positive aspects of employing thermophiles in industrial biotechnology mentioned above, also the use of thermophilic PHA producers holds promise to gain sustainable and economically reasonable processes for PHA production. Nevertheless, despite the fact that PHA accumulation is a common feature among many prokaryotes, capability of PHA synthesis was described only for limited number of thermophiles such as *Chelatococcus thermostellatus* [13], *Thermus thermophilus* [14] or *Caldimonas taiwanensis* [15].

Therefore, we made an effort to isolate novel promising PHA-producing thermophiles. To reach this goal, we have recently developed a unique protocol for isolation of PHA-producing thermophiles described in [16]. We have isolated several interesting strains, and, among them, the isolate designated as H1 was identified to be the most promising one. Therefore, we have performed taxonomic classification, basic morphological and metabolic description and, what is the most important, we have also assessed the biotechnological potential of this novel thermophilic isolate for industrial production of PHA and various PHA copolymers with tailored material properties.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Isolation and Characterization of the Thermophilic PHA Producer

A compost sample was taken from the central urban composting plant of the city Brno, Czech Republic (Centrální kompostárna Brno operated by SUEZ CZ a.s.), the temperature of the compost was about 40 °C at time of sample collection. After homogenization of the compost collected, 1 g of the sample was mixed with 100 mL of mineral salt medium (MSM) of the following composition (g/L): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O, 9.0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5; MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 0.2; NH<sub>4</sub>Cl 1.0; CaCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O, 0.02; Fe<sup>III</sup>NH<sub>4</sub>citrate, 0.0012; yeast extract, 0.5 with 20 g/L glycerol as sole carbon source. The MSM included 1 mL/L microelements solution (MES), which contains (g/L): EDTA, 50.0; FeCl<sub>3</sub>·6 H<sub>2</sub>O, 13.8; ZnCl<sub>2</sub>, 0.84; CuCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O, 0.13; CoCl<sub>2</sub>·6 H<sub>2</sub>O, 0.1; MnCl<sub>2</sub>·6 H<sub>2</sub>O, 0.016; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.1; all these compounds were dissolved in distilled water. The cultivation was carried out for 48 h at 50 °C with shaking at 180 rpm. After cultivation, the fresh culture was used to inoculate fresh MSM; this second cultivation was carried out for 48 h at 50 °C with shaking at 180 rpm. After the second cultivation, the original isolation protocol was used to isolate the PHA-producing bacteria. The isolation protocol is based on the protective role of PHA against osmotic challenge. During the isolation, the mixed bacterial consortium obtained after the second cultivation is exposed to hyperosmotic challenge induced by solution of NaCl at a concentration of 100 g/L; subsequently, the culture is exposed to sudden hypotonic shock introduced by transfer of the culture to distilled water. Such a rapid fluctuation of osmotic pressure favors survival of PHA-producing bacteria, which are plated on solidified media, and PHA positive colonies are identified by infrared spectroscopy. The principle of the isolation procedure is depicted at Figure 1 and it was described previously [16].



**Figure 1.** Principle of the “osmoselection”; procedure enabling isolation of PHA-producing thermophiles.

## 2.2. Identification and Metabolic and Morphological Characterization of the Isolate

The isolate was identified by sequencing the 16S rRNA gene. Cells were lysed by heating to extract DNA. A small amount of culture from Petri dishes was added to the lyses buffer (5 mM TrisHCl, pH 8.5) and heated to 95 °C for 10 min. After heating, lysed cells were centrifuged, and the supernatant was used as a DNA template. Polymerase chain reaction (PCR) for detection of bacterial DNA and taxonomy (16S rRNA) was performed using the forward primer 16S-F (5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and the reverse primer 16S-R (5'-GGTACCTTGTACGACTT-3'). The PCR mixture consisted of 12.5 µL One Taq™ Hot Start 2X Master Mix with Standard Buffer, 2.6 µL MgCl<sub>2</sub>, 2 µL DNA template, 0.2 µM of each primer; this solution was added to 25 µL H<sub>2</sub>O, and the resulting PCR mixture was heated at 94 °C for 30 s. The PCR cycle consisted of three steps: denaturation for 30 s at 94 °C, annealing for 30 s at 55 °C and extension for 90 s at 68 °C. This cycle was repeated 30 times, the last extension step was extended for 5 min at 68 °C. The PCR amplicon was detected by 2% agarose gel electrophoresis with 1x TBE. PCR products of 16S rRNA gene were purified using the NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit and sent for commercial sequencing (SEQme, Dobris, Czech Republic). The taxonomic classification was evaluated using the blast NCBI database (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

The standard set of physiological and biochemical tests such as shape and color of colonies, morphology of cells and spores, capability of hydrolysis of gelatin, urea, lecithin, starch, Tween 80, esculine, tyrosine and DNA, production catalase, arginine dehydrogenase and acid formation from various carbohydrates, spore formation, growth in presence of 10% and 70% NaCl, growth at various temperatures in range of 30–60 °C or hemolysis were performed at Czech Collection of Microorganisms according to procedures described in [17]. The isolate was also commercially identified using Biolog MicroStation system at Czech Collection of Microorganisms (CCM).

The morphology of cells was in more details investigated by Transmission Electron Microscopy (TEM) analysis using Microscope JEOL 1010 (JEOL, Pleasanton, USA) as described previously [18]. The high-pressure-freezing was performed using the instrument EM ICE (Leica Microsystems, Vienna, Austria) on the 3 mm aluminum carriers.

## 2.3. Production of PHA in Shaking Flasks by *Aneurinibacillus* sp. H1

To generate the inoculum, the culture was grown in complex media Nutrient Broth (10 g/L beef extract, 10 g/L peptone, 5 g/L NaCl) at 45 or 50 °C with shaking at 190 rpm. For production of PHA, mineral salt medium (MSM) was used consisting of: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O, 9.0 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5 g/L; MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 0.2 g/L; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1.0 g/L; CaCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O, 0.02 g/L; Fe<sup>III</sup>NH<sub>4</sub>citrate, 0.0012 g/L; Tryptone 0.5 g/L with 1 mL/L of MES (composition see 2.1). Various carbon sources (glycerol, glucose, sucrose, mannose, galactose, fructose, lactose, 1,4-butanediol, etc.) were usually applied at a concentration of 20 g/L if not stated otherwise. The inoculum ratio was 10 vol. %. Production cultivations were carried out for 72 h at selected temperature (usually 45 °C if not stated otherwise) under constant shaking of 180 rpm. All the cultivations were performed in duplicate. After cultivation, bacterial cells were harvested by centrifugation (6000× g, 5 min). Biomass was determined gravimetrically as the cell



dry mass (CDM), and the amount and monomer composition of PHA in CDM was analyzed by Gas Chromatography as reported previously [19].

Among the tested substrates, we also included waste glycerol, which was obtained from the oil mill company Victoria Oil, Šid, Serbia. This side product of biodiesel production was previously analyzed on GC/FID as a part of regular control of biodiesel quality. It was found that the composition of waste glycerol mainly consisted of glycerol (83.72 w/w %), water (6.77 w/w %), ash/NaCl (6.5 w/w %) and other organic matter (1.58 w/w %). The pH value of waste glycerol was 6.77.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Taxonomic, Metabolic and Morphological Description the Isolate

Since we observed that among all isolates obtained from compost the strain designated as H1 reveals the most promising PHA production capacity, the isolate was phenotypically characterized by Czech Collection of Microorganisms. The cells are Gram-positive, and grow individually. **Positive tests:** spore formation; catalase; urease; anaerobic growth; hydrolysis of gelatin, ONPG and lecithin; acids produced from glucose, xylose and lactose; growth in presence of 7% NaCl; growth at 60 °C; hemolysis. **Negative tests:** starch hydrolysis, hydrolysis of: Tween 80, esculin, tyrosine and DNA, acetoin; reduction of nitrates; acids produced from mannitol, cellobiose, fructose and inositol; growth in presence of 10% NaCl, growth at 30 °C and 65 °C. Further, the isolate was also identified using the BIOLOG system, according to results of phenotype characterization and BIOLOG analysis, the strain was identified as *Aneurinibacillus* sp. H1 without possible reliable closer taxonomical classification. Further, the isolate was also identified by partial sequencing of 16S rRNA gene, the sequence is available at MT112889; according to comparison of 16S rRNA sequences available in BLAST database, the strain has high similarity to *Aneurinibacillus thermoaerophilus* strain DSM 10154 (99.91%), *Aneurinibacillus thermoaerophilus* strain L420-91 (99.83%), and *Aneurinibacillus sediminis* strain 1-10M-8-7-50 (96.47%).

The fact that the isolate is a Gram-positive bacterium can be considered being very beneficial. Most of the currently used PHA-producing strains are Gram-negative bacteria such as *Cupriavidus necator* [20,21], transgenic *Escherichia coli* [22] or members of the genus *Halomonas* [23,24]. Actually, one of the major obstacles preventing application of PHA in high-value applications such as health care, cosmetics or medicine is the fact that the polymers isolated from Gram-negative strains are heavily contaminated by lipopolysaccharides (LPS), a group of endotoxins produced by Gram-negative bacteria as important component of their outer cell membrane. LPS are co-isolated with PHA during down-stream processing and might cause severe immunological response making PHA biopolymers extremely unsuitable in medical uses [25].

Members of the genus *Aneurinibacillus* are mostly thermophilic or thermotolerant and, of course, they are taxonomically closely related to the genus *Bacillus*, which is well known for its capability of PHA biosynthesis [26–28]. Actually, the genus *Aneurinibacillus* was set aside from genus *Bacillus* in 1996 [29]. It should be pointed out that PHA production capacity was already described for thermophilic *Aneurinibacillus* sp. XH2 isolated from an oilfield in China [30]; hence, it seems that PHA biosynthesis is also ubiquitous among members of *Aneurinibacillus*.

The morphology of the cells of *Aneurinibacillus* sp. H1 grown for 72 h in mineral medium with glycerol was investigated by TEM, the results are shown in Figure 2. The cells contain 8–15 PHA granules, which are not localized in particular parts of the cells but are rather randomly distributed in the cellular space. Actually, size of the cells, localization and diameters of the granules are very similar to those reported for typical well-studied PHA producers such as *C. necator* H16 [31] or *Halomonas halophila* [32]. Apart from PHA granules, in some cells presence of spores in the central part of the cells can be observed as well (marked by red arrows). Generally, sporulation is not considered being a positive feature of the strains used in industrial biotechnology, since sporulation is associated with loss of desirable metabolic activity, and it was also reported that sporulation in *Bacillus* species is associated with mobilization of PHA storage [33]. From the economic point of view, spore formation depletes

carbon sources dedicated to PHA biosynthesis. Nevertheless, despite the fact that cultivation was performed for a relatively long time (72 h), the number of sporulating cells is very low (below 10%), and PHA granules can be clearly seen also in spore forming cells, which indicates that sporulation should not be a major drawback preventing utilization of the isolate *Aneurinibacillus* sp. H1 in industrial production of PHA. However, gaining non-sporulating mutants of the strain would be very desirable. Further experiments could also clarify if shifting process parameters (e.g., pH-value) could be a tool to completely prevent spore formation, as it was previously demonstrated for PHA-accumulating *Bacillus cereus* SPV cultures, which at lower pH-value readily accumulated PHA, but completely stopped sporulation, thus drastically increasing the substrate-to-PHA yield [34].

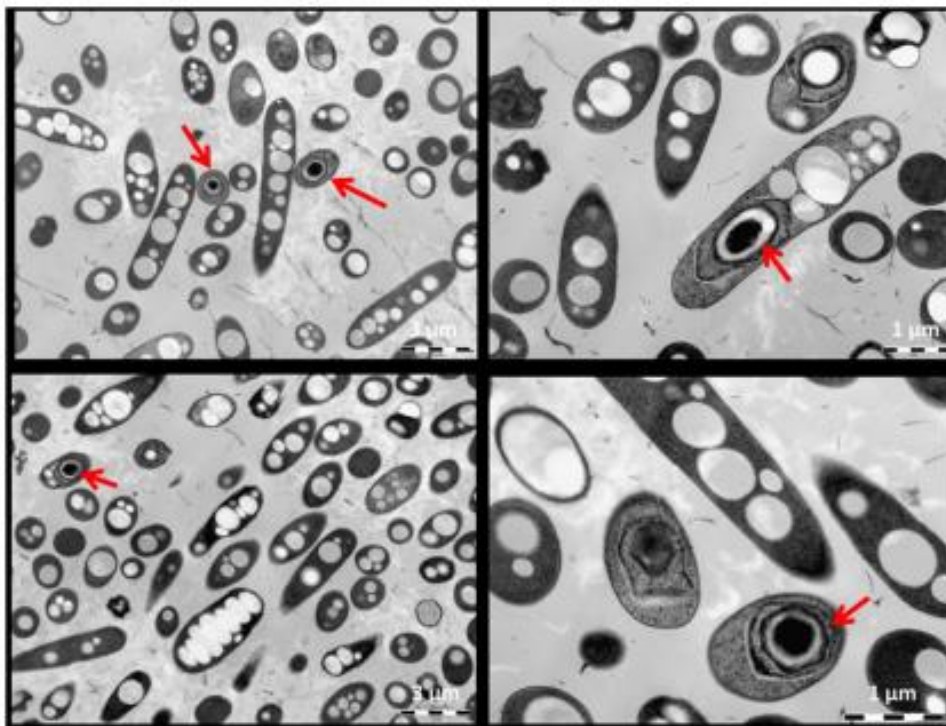


Figure 2. Morphology of the cells of *Aneurinibacillus* sp. H1 observed by TEM; the red arrows show endospores in bacterial cells.

### 3.2. Production of PHA on Various Carbon and Nitrogen Substrates

Further, the production capacity of the isolated strain *Aneurinibacillus* sp. H1 on various carbon substrates was evaluated; results are shown in Table 1. Obviously, the highest biomass growth and PHA titers were achieved on glycerol, since the bacterial strain was capable of reaching a CDM of 2.19 g/L, and the PHA content in CDM amounted to 45.95%. Since glycerol was used as the sole carbon substrate during isolation of the strain, it is not surprising that this strain gained high productivity on this substrate by adaptation. The second-best results, namely a CDM of 2.00 g/L and a PHA content in CDM of 27.74%, were obtained when glucose was used. In all the other tested carbohydrate substrates, CDM values as well as PHA contents were very low. It should be mentioned that, not surprisingly, on all the tested substrates the bacterial culture produced homopolymer P(3HB). Further, the culture is not capable of utilizing lipid substrates, since practically no biomass growth was observed on waste frying oil when used as a sole carbon source.



**Table 1.** Production of PHA on various carbon sources.

Substrate	CDM [g/L]	P(3HB) [% per CDM]	P(3HB) [g/L]
Sucrose	0.41 ± 0.10	16.52 ± 0.31	0.07 ± 0.02
Mannose	0.19 ± 0.08	14.85 ± 0.05	0.03 ± 0.01
Galactose	0.22 ± 0.04	8.94 ± 0.13	0.02 ± 0.00
Glucose	2.00 ± 0.36	27.74 ± 0.18	0.55 ± 0.10
Fructose	0.24 ± 0.01	14.32 ± 0.21	0.03 ± 0.00
Lactose	0.20 ± 0.01	9.06 ± 0.20	0.02 ± 0.00
Glycerol	2.19 ± 0.07	45.95 ± 0.10	1.00 ± 0.04
WFO <sup>1</sup>	0.01 ± 0.00	n.d.	n.d.

<sup>1</sup> WFO stands for Waste Frying Oils. n.d.: not detected.

The fact that glycerol is the most preferred substrate by *Aneurinibacillus* sp. H1 can be considered as positive since waste glycerol is currently produced at steadily increasing quantity as a waste stream of biodiesel production [35]. Glycerol stemming from biodiesel fabrication contains numerous microbial inhibitors such as free fatty acids, methanol and residues of metal catalyst, which complicates its utilization as a substrate in microbial biotechnology. Nevertheless, there are reports on PHA production from waste glycerol employing various mesophilic microbes such as *Bacillus cereus* [36], *Cupriavidus necator* [37], *Burholderia cepacia* [38] or the extremely halophilic archaeon *Haloferax mediterranei* [39]; moreover, there are also some reports on conversion of glycerol into PHA by thermophiles, in particular by *Chelatococcus* sp. isolated from an aerobic organic waste treatment plant in Germany [13], and also by *Caldimonas manganoxidans* [40]. To evaluate the potential of the isolate *Aneurinibacillus* sp. H1 for PHA production from waste glycerol and to estimate robustness of the strain against inhibitors contained in real waste glycerol, we performed an experiment in which PHA production on pure and waste glycerol was assessed at various initial concentrations of both carbon substrates; the results are shown in Table 2. In both waste and pure glycerol, the highest P(3HB) titers were gained at initial substrate concentration of 20 g/L, the better values were, in accordance with our expectations, obtained with pure glycerol. However, *Aneurinibacillus* sp. H1 demonstrated expedient robustness against inhibitors present in waste glycerol, since product titers obtained on waste glycerol were only about 20% lower than on pure glycerol (1.70 g/L in pure and 1.42 g/L in waste glycerol), and polymer contents in biomass were very similar (51.97 and 49.45% of CDM for pure and waste glycerol, respectively).

**Table 2.** Comparison of PHA biosynthesis on pure glycerol and waste glycerol from biodiesel production.

Substrate	Concentration [g/L]	Biomass [g/L]	P(3HB) [% per CDM]	P(3HB) [g/L]
Glycerol	10	1.60 ± 0.50	13.00 ± 1.20	0.21 ± 0.03
	20	3.27 ± 0.13	51.97 ± 2.28	1.70 ± 0.11
	30	2.72 ± 0.07	53.40 ± 4.82	1.45 ± 0.19
Waste/crude Glycerol	10	1.08 ± 0.08	10.78 ± 1.33	0.12 ± 0.02
	20	2.88 ± 0.13	49.45 ± 0.65	1.42 ± 0.03
	30	1.67 ± 0.32	46.10 ± 5.55	0.77 ± 0.13

### 3.3. Influence of Temperature on Production of PHA

We have also investigated the influence of the cultivation temperature on PHA production by *Aneurinibacillus* sp. H1. Cultivations were performed at temperatures in the range of 45–65 °C (Table 3). The highest CDM concentration, PHA content and, therefore, also PHA titers were obtained at 45 °C; hence, this temperature can be considered being the optimal cultivation temperature. Further increase in cultivation temperature inhibited growth of the strain as well as PHA biosynthesis; nevertheless, the strain was capable of growing and synthesizing PHA even at 60 and 65 °C. Xiao et al. isolated *Aneurinibacillus* sp. designated as strain XH2 from the Gudao oilfield in China; optimal growth and PHA production temperature for this strain was reported as 55 °C, nevertheless, maximal PHA titers



were gained at optimal conditions were only 0.268 g/L [30], which is substantially less than achieved with our isolate *Aneurinibacillus* sp. H1, since the maximal P(3HB) titer gained by our strain in flasks experiment was 2.03 g/L, almost one order higher, indicating the auspicious biotechnological potential of our isolate.

**Table 3.** Effect of cultivation temperature on PHA yields obtained by *Aneurinibacillus* sp. H1.

Temperature [°C]	Biomass [g/L]	P(3HB) [% per CDM]	P(3HB) [g/L]
35	0.17 ± 0.01	30.20 ± 0.01	0.05 ± 0.01
40	2.66 ± 0.14	32.12 ± 4.49	0.92 ± 0.08
45	3.68 ± 0.63	55.31 ± 5.81	2.03 ± 0.41
50	3.23 ± 0.03	46.01 ± 3.55	1.49 ± 0.37
55	1.46 ± 0.05	50.18 ± 1.35	0.73 ± 0.03
60	0.80 ± 0.01	30.60 ± 1.35	0.24 ± 0.01
65	0.89 ± 0.06	32.66 ± 0.24	0.29 ± 0.02

The optimal cultivation temperature of 45 °C is most likely not high enough to eliminate the risk of contamination by ubiquitous thermotolerant microorganisms and, therefore, the biotechnological production process probably cannot be operated under economically and energetically attractive nonsterile open fermentation conditions. Nevertheless, despite this fact the industrial process could be energetically favorable since energy and water demands for cooling would be very low when cultivation would be performed at 45 °C as compared to standard mesophilic cultivation setups. Further, since 45 °C is not a very high temperature, energy demands on heating are not enormous and, moreover, it is likely that substantial amounts of heat needed to maintain the temperature at 45 °C would be generated by the metabolism of the microbes and also by the stirring system of the bioreactor, thus, the system could be partially operated as “self-heating system”, as described before [41]. Last but not least, since oxygen solubility negatively correlates with temperature, rational aeration of the bioreactor would be feasible. Nevertheless, these technological presumptions must be evaluated during forthcoming scale-up experiments, which are, nevertheless, above scope of this work focused on characterization of the novel thermophilic PHA producer.

#### 3.4. Biosynthesis of PHA Copolymers and Terpolymer

In a subsequent experiment, we looked into the capability of the *Aneurinibacillus* sp. H1 to incorporate 3HV and 4HB into the polymer structure by using structurally related precursor compounds; results are shown in Table 4. The 3HV precursors (levulinate, propionate, n-propanol, valerate) were applied at a concentration of 2 g/L along with glycerol (20 g/L), which was used as the main carbon substrate. Application of all the tested precursors partially inhibited growth of the bacterial culture, which is not surprising since all of them are well known microbial inhibitors. Among tested substrates, only application of levulinate did not result in production of P(3HB-co-3HV) copolymers, while using all the other 3HV precursors, the bacterial culture was able to incorporate 3HV into the polymer chain. Valerate seems to be the most suitable 3HV precursor since its application resulted in very high 3HV content (66.62 mol %) in P(3HB-co-3HV) copolymer, and its inhibitory effect on the growth of microbial culture was the lowest among the tested precursors.

Based on our experience, we utilized a different cultivation approach to gain copolymers containing 4HB subunits. Selected 4HB precursors (1,6-hexanediol,  $\gamma$ -butyrolactone and 1,4-butanediol) were applied as the sole carbon sources at a concentration of 8 g/L. The bacterial culture was not capable of readily assimilating the precursor with 6 carbon atoms (1,6-hexanediol); hence, only a very low amount of PHA was obtained on this compound, and the polymer contained no 4HB subunits. Oppositely, precursors containing 4 carbon atoms were assimilated by the bacterial culture much more efficiently and their use resulted in very high PHA contents in cells (85.84 and 75.48% of CDM for GBL and 1,4-butanediol, respectively) and also in very high 4HB portion in copolymers (63.35 and 79.91 mol % for GBL and 1,4-butanediol, respectively).

**Table 4.** Production of PHA copolymers and terpolymer using various precursors of 3HV and 4HB.

Desired Monomer	Precursor	Biomass [g/L]	PHA [% per CDM]	PHA [g/L]	3HV [mol %]	4HB [mol %]	3HB [mol %]
3HV <sup>1</sup>	Levullinate	1.08 ± 0.06	36.70 ± 0.72	0.39 ± 0.02	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	100.00 ± 0.00
	Propionate	1.11 ± 0.04	28.15 ± 0.27	0.31 ± 0.01	32.10 ± 0.02	<i>n.d.</i>	67.90 ± 0.02
	Propanol	1.47 ± 0.04	45.11 ± 0.05	0.66 ± 0.02	3.66 ± 0.04	<i>n.d.</i>	96.34 ± 0.04
	Valerate	1.90 ± 0.02	36.29 ± 0.01	0.69 ± 0.01	66.62 ± 0.83	<i>n.d.</i>	33.38 ± 0.83
4HB <sup>2</sup>	1,6-hexandiol	0.37 ± 0.08	9.08 ± 0.31	0.03 ± 0.01	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	100 ± 0.00
	$\gamma$ -butyrolactone	0.52 ± 0.00	85.84 ± 1.99	0.45 ± 0.01	<i>n.d.</i>	63.35 ± 3.27	36.65 ± 3.27
	1,4-butanediol	1.02 ± 0.04	75.48 ± 2.36	0.77 ± 0.04	<i>n.d.</i>	79.91 ± 1.84	20.09 ± 1.84
3HV + 4HB <sup>3</sup>	Valerate + 1,4-butanediol	1.44 ± 0.06	40.27 ± 2.08	0.58 ± 0.03	33.13 ± 1.03	54.18 ± 1.23	12.69 ± 2.26

<sup>1</sup> 3HV precursors were applied at the beginning of cultivation at concentration of 2 g/L. 20 g/L of glycerol was used as the main carbon source. <sup>2</sup> 4HB precursors were applied at the beginning of cultivations as the sole carbon sources at concentration of 20 g/L. <sup>3</sup> Terpolymer production was achieved by applying 1,4-butanediol (4 g/L) and valerate (2 g/L) at the beginning of cultivation, glycerol was not added. *n.d.*: not detected.

Further, we also attempted production of PHA terpolymer consisting of 3HB, 3HV and 4HB subunits. In this experiment, valerate (2 g/L) was used since it was identified as the most promising 3HV precursor, while 1,4-butanediol (4 g/L) was utilized as the most suitable 4HB precursor. This cultivation strategy resulted in production of a very interesting terpolymer consisting of 33.13 mol % of 3HV, 54.18 mol % of 4HB and 12.69 mol % of 3HB.

These experiments proved the extraordinary capacity of *Aneurinibacillus* sp. H1 to biosynthesize polymers containing 3HV and/or 4HB subunits, which generally reveal superior mechanical properties compared to P(3HB) homopolymer. Especially the capacity of the strain to incorporate high portions of 4HB subunits into the polymer chain is very promising since the increased 4HB content in polymer is usually connected with improved flexibility as the crystallinity of the polymer is affected [42]. Capabilities to synthesize materials with so high 4HB fraction, reaching high intracellular PHA content and reasonable PHA titers are rare among PHA producers. Only few microorganisms are capable of production of PHA with 4HB fraction higher than 20–30 mol %. For instance, Huong et al. employed *Cupriavidus* sp. USMAA1020 for production of P(3HB-co-4HB) copolymer and 4HB fractions in polymer varying between 7 and 70 mol % depending on the applied cultivation conditions; nevertheless, increase of the 4HB fraction was accompanied by lowering of PHA content in bacterial cells, reduced biomass growth and lower product titers. When PHA with the highest 4HB portion of 70 mol % was produced, PHA content in CDM achieved only 13%, and the PHA concentration was only 0.3 g/L [43]. Similarly, *Comomonas acidovorans* was capable to synthesize P(3HB-co-4HB) copolymers with 4HB fractions up to 96 mol % when pure 4-hydroxybutyric acid was used as substrate; nevertheless, the PHA fraction in CDM reached only 25% [44]. Hence, it seems that isolate *Aneurinibacillus* sp. H1 is a very promising candidate for production of interesting PHA copolymers with tailored monomer composition and material properties. Apart from P(3HB-co-4HB) copolymers, it is also capable of production of P(3HB-co-3HV-co-4HB) terpolymers with high 3HV and 4HB fraction. Production of P(3HB-co-3HV-co-4HB) terpolymers was recently reported employing *Cupriavidus* sp. DSM 19379, nevertheless, to induce efficient terpolymer production, a sophisticated two-stage fermentation strategy was needed [45]. On the contrary, our isolate *Aneurinibacillus* sp. H1 produced desirable terpolymers in a simple single stage cultivation set up, which is a very positive feature. Further, it should be pointed out that, to our best knowledge, this is the first report on efficient production of PHA copolymers and terpolymers containing 4HB subunits by a thermophilic bacterium.

Since the ability to produce P(3HB-co-4HB) copolymer from 1,4-butanediol was extraordinary and it deserved further attention, we have tested a potential strategy how to further improve productivity and gain even higher product titers. At first, we optimized the initial concentration of 1,4-butanediol, the results are shown in Table 5. Decrease in initial concentration of the substrate from originally used concentration of 8 g/L increased biomass growth. According to our results, the optimal initial concentration of 1,4-butanediol is 4 g/L; at this concentration, biomass growth as well as PHA titer are



enhanced substantially compared to the previous experiment and, surprisingly, the portion of 4HB in copolymer reached even 90 mol %, which further confirmed the promising potential of the bacterium. Increase in substrate concentration above 4 g/L resulted in inhibited growth and reduced PHA yields.

**Table 5.** Effect of initial concentration of 1,4-butanediol and glycerol on production of P(3HB-co-4HB) by *Aneurinibacillus* sp. H1.

1,4-BD [g/L]	Glycerol [g/L]	Biomass [g/L]	PHA in CDM [%]	PHA [g/L]	4HB in PHA [mol %]
3	0	1.22 ± 0.11	50.14 ± 2.65	0.61 ± 0.07	90.56 ± 0.70
4	0	1.67 ± 0.02	54.78 ± 1.21	0.91 ± 0.02	90.89 ± 1.19
5	0	1.60 ± 0.23	45.73 ± 0.65	0.73 ± 0.11	88.31 ± 0.29
6	0	1.23 ± 0.15	56.32 ± 0.56	0.69 ± 0.08	92.81 ± 0.04
7	0	1.13 ± 0.01	51.80 ± 0.71	0.58 ± 0.01	88.02 ± 0.48
8	0	0.96 ± 0.00	44.00 ± 2.76	0.42 ± 0.03	86.87 ± 1.32
12	0	0.72 ± 0.06	43.90 ± 2.28	0.32 ± 0.03	83.61 ± 0.94
16	0	0.56 ± 0.05	43.38 ± 1.26	0.24 ± 0.02	85.99 ± 4.40
4	2	2.69 ± 0.15	68.25 ± 0.62	1.83 ± 0.10	83.56 ± 1.48
4	4	2.79 ± 0.03	65.23 ± 2.64	1.82 ± 0.08	74.43 ± 1.70
4	6	2.28 ± 0.26	50.37 ± 0.87	1.15 ± 0.13	42.45 ± 7.88
4	8	2.43 ± 0.01	40.74 ± 3.35	0.99 ± 0.08	36.42 ± 1.63
4	20	2.56 ± 0.11	44.69 ± 1.23	1.14 ± 0.06	4.59 ± 0.01

To further enhance productivity, we decided to apply also glycerol along with 1,4-butanediol. The purpose of this step was to use glycerol as a co-substrate, which is efficiently utilized by the culture to support growth of the strain and, therefore, also final product titers. Thus, 1,4-butanediol was applied at an optimal concentration of 4 g/L, and glycerol was added at various concentration levels from 2 to 20 g/L; results are shown in Table 5. According to our expectation, introduction of glycerol enhanced growth of the bacterium, CDM values obtained with a mixture of 1,4-butanediol and glycerol are substantially higher than with 1,4-butanediol only. Results indicate that the optimal concentration of additional glycerol is 2 or 4 g/L, since these conditions resulted in high biomass growth (about 2.7 g/L), high PHA content in biomass (more than 65% of CDM), and high portion of 4HB in copolymer (83.56 and 74.43 mol % for 2 and 4 g/L glycerol, respectively). Generally, manipulating the concentration ratios of 1,4-butanediol to glycerol seems to be a simple and rational strategy how to control 4HB content in the polymer.

#### 4. Conclusions

A recently established isolation protocol was utilized to gain new thermophilic PHA producers. Among the isolates tested, isolate designated as H1 turned out to be the most promising strain in terms of PHA production capability. The isolate was further taxonomically classified as a member of the genus *Aneurinibacillus*. According to subsequent experiments, it seems that *Aneurinibacillus* sp. H1 is an interesting thermophilic Gram-positive PHA accumulating bacterium with extraordinary ability to synthesize PHA copolymers and terpolymers containing high molar fractions of 3HV and 4HB subunits when valerate and/or 1,4-butanediol are used as 3HV and 4HB precursors, respectively. In considering all of the positive aspects of PHA production employing thermophiles, our isolate seems to be a highly intriguing potential candidate for PHA production on an industrial scale; therefore, the organism was deposited in Czech Collection of Microorganisms as patent culture CCM 8960. It should be also pointed out that the PHA materials produced by *Aneurinibacillus* sp. H1 were in depth characterized and the results have been submitted in an accompanying paper. Further experiments will be focused on optimization of PHA production under controlled conditions and its scale-up to laboratory bioreactors. In addition, we plan to sequence the entire genome of the bacterium to identify potential targets for genetic improvement of the strain.

**Author Contributions:** Conceptualization, S.O. and P.S.; methodology, S.O. and P.S.; formal analysis, I.P.; investigation, I.P., I.N., X.K., M.K. (Michal Kalina), J.N., V.K., K.H., J.M., E.S.; resources, S.O.; writing—original draft preparation, S.O. and P.S.; writing—review and editing I.P., A.K., M.K. (Martin Koller). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was funded by the project GA19-20697S of the Czech Science Foundation (GAČR). Further, Ivana Novackova is Brno Ph.D. Talent Scholarship Holder—Funded by the Brno City Municipality. TEM analysis was supported by the MEYS CR (LM2015062 Czech-BioImaging) and ERDF (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_013/0001/775). Next, this work was funded through the project SoMoPro (project No. 6SA18032). This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Program under the Marie Skłodowska-Curie, and it is co-financed by the South Moravian Region under grant agreement No. 665860. 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.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts 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

- Zeldes, B.M.; Keller, M.W.; Loder, A.J.; Straub, C.T.; Adams, M.W.W.; Kelly, R.M. Extremely thermophilic microorganisms as metabolic engineering platforms for production of fuels and industrial chemicals. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ranawat, P.; Rawat, S. Stress response physiology of thermophiles. *Arch. Microbiol.* **2017**, *199*, 391–414. [[PubMed](#)]
- Chen, G.-Q.; Jiang, X.-R. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2018**, *50*, 94–100. [[PubMed](#)]
- 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](#)] [[PubMed](#)]
- Koller, M.; Maršálek, L.; Miranda de Sousa Dias, M.; Brauneegg, G. Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. *New Biotechnol.* **2017**, *37*, 24–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sudesh, K.; Abe, H.; Doi, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.* **2000**, *25*, 1503–1555. [[CrossRef](#)]
- Kunioka, M.; Tamaki, A.; Doi, Y. Crystalline and thermal properties of bacterial copolyesters: Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Macromolecules* **1989**, *22*, 694–697. [[CrossRef](#)]
- Koller, M. Biodegradable and biocompatible polyhydroxy-alkanoates (PHA): Auspicious microbial macromolecules for pharmaceutical and therapeutic applications. *Molecules* **2018**, *23*, 362. [[CrossRef](#)]
- Koller, M. Chemical and biochemical engineering approaches in manufacturing Polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters of tailored structure with focus on the diversity of building blocks. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **2019**, *32*, 413–438. [[CrossRef](#)]
- Koller, M. Switching from petro-plastics to microbial polyhydroxyalkanoates (PHA): The biotechnological escape route of choice out of the plastic predicament? *Eur. Biotechnol. J.* **2019**, *3*, 32–44.
- Dietrich, K.; Dumont, M.-J.; Del Río, L.F.; Orsat, V. Sustainable PHA production in integrated lignocellulose biorefineries. *New Biotechnol.* **2019**, *49*, 161–168.
- Favaro, L.; Basaglia, M.; Casella, S. Improving polyhydroxyalkanoate production from inexpensive carbon sources by genetic approaches: A review. *Biofuel Bioprod. Biorefin.* **2019**, *13*, 208–227. [[CrossRef](#)]
- Ibrahim, M.H.; Willems, A.; Steinbüchel, A. Isolation and characterization of new poly (3HB)-accumulating star-shaped cell aggregates-forming thermophilic bacteria. *J. Appl. Microbiol.* **2010**, *109*, 1579–1590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pantazaki, A.A.; Tambaka, M.G.; Langlois, V.; Guerin, P.; Kyriakidis, D.A. Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis in *Thermus thermophilus*: Purification and biochemical properties of PHA synthase. *Mol. Cell. Biochem.* **2003**, *254*, 173–183. [[CrossRef](#)]
- Sheu, D.S.; Chen, W.M.; Yang, J.Y.; Chang, R.C. Thermophilic bacterium *Caldimonas taiwanensis* produces poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from starch and valerate as carbon sources. *Enzyme Microb. Technol.* **2009**, *44*, 289–294.



16. Pernicova, I.; Novackova, I.; Sedlacek, P.; Kourilova, X.; Koller, M.; Obruca, S. Application of osmotic challenge for enrichment of microbial consortia in polyhydroxyalkanoates producing thermophilic and thermotolerant bacteria and their subsequent isolation. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *144*, 698–704.
17. Nováková, D.; Švec, P.; Zeman, M.; Busse, H.-J.; Mašlaňová, I.; Pantůček, R.; Králová, S.; Křištofová, L.; Sedláček, I. *Pseudomonas leptonychotis* sp. nov., isolated from weddell seals in Antarctica. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2020**, *70*, 302–308.
18. Obruca, S.; Sedlacek, P.; Mravec, F.; Krzyzanek, V.; Nebesarova, J.; Samek, O.; Kucera, D.; Benesova, P.; Hrubanova, K.; Milerova, M.; et al. The presence of PHB granules in cytoplasm protects non-halophilic bacterial cells against the harmful impact of hypertonic environments. *New Biotechnol.* **2017**, *39*, 68–80. [[CrossRef](#)]
19. Obruca, S.; Benesova, P.; Oborna, J.; Marova, I. Application of protease-hydrolyzed whey as a complex nitrogen source to increase poly(3-hydroxybutyrate) production from oils by *Cupriavidus necator*. *Biotechnol. Lett.* **2014**, *36*, 775–781.
20. Novackova, I.; Kucera, D.; Porizka, J.; Pernicova, I.; Sedlacek, P.; Koller, M.; Kovalcik, A.; Obruca, S. Adaptation of *Cupriavidus necator* to levulinic acid for enhanced production of P(3HB-co-3HV) copolyesters. *Biochem. Eng. J.* **2019**, *151*, 107350.
21. Johnston, B.; Radecka, L.; Hill, D.; Chiellini, E.; Ilieva, V.I.; Sikorska, W.; Musioł, M.; Zięba, M.; Marek, A.A.; Keddie, D.; et al. The microbial production of Polyhydroxyalkanoates from waste polystyrene fragments attained using oxidative degradation. *Polymers* **2018**, *10*, 957. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Fadzil, F.I.M.; Mizuno, S.; Hiroe, A.; Nomura, C.T.; Tsuge, T. Low Carbon concentration feeding improves medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production in *Escherichia coli* strains with defective  $\beta$ -oxidation. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2018**, *6*, 178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. 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. [[PubMed](#)]
24. Ye, J.; Hu, D.; Yin, J.; Huang, W.; Xiang, R.; Zhang, L.; Wang, X.; Han, J.; Chen, G.-Q. Stimulus response-based fine-tuning of polyhydroxyalkanoate pathway in *Halomonas*. *Metab. Eng.* **2020**, *57*, 85–95. [[CrossRef](#)]
25. Singh, A.K.; Srivastava, J.K.; Chandel, A.K.; Sharma, L.; Mallick, N.; Singh, S.P. Biomedical applications of microbially engineered polyhydroxyalkanoates: An insight into recent advances, bottlenecks, and solutions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 2007–2032.
26. Kumar, P.; Patel, S.K.S.; Lee, J.-K.; Kalia, V.C. Extending the limits of *Bacillus* for novel biotechnological applications. *Biotechnol. Adv.* **2013**, *31*, 1543–1561. [[CrossRef](#)]
27. Kumar, P.; Kim, B.S. Valorization of polyhydroxyalkanoates production process by co-synthesis of value-added products. *Bioresour. Technol.* **2018**, *269*, 544–556. [[CrossRef](#)]
28. Kumar, P.; Ray, S.; Patel, S.K.S.; Lee, J.-K.; Kalia, V.C. Bioconversion of crude glycerol to polyhydroxyalkanoate by *Bacillus thuringiensis* under non-limiting nitrogen conditions. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *78*, 9–16. [[CrossRef](#)]
29. Shida, O.; Takagi, H.; Kadowaki, K.; Komagata, K. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1996**, *46*, 939–946. [[CrossRef](#)]
30. Xiao, Z.; Zhang, Y.; Xi, L.; Huo, F.; Zhao, J.-Y.; Li, J. Thermophilic production of polyhydroxyalkanoates by a novel *Aneurinibacillus* strain isolated from Gudao oilfield, China. *J. Basic Microb.* **2015**, *55*, 1125–1133. [[CrossRef](#)]
31. Mravec, F.; Obruca, S.; Krzyzanek, V.; Sedlacek, P.; Hrubanova, K.; Samek, O.; Kucera, D.; Benesova, P.; Nebesarova, J. Accumulation of PHA granules in *Cupriavidus necator* as seen by confocal fluorescence microscopy. *FEMS Microbiol. Lett.* **2016**, *363*, fnw094. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Kucera, D.; Pernicová, I.; Kovalcik, A.; Koller, M.; Mullerova, L.; Sedlacek, P.; Mravec, F.; Nebesarova, J.; Kalina, M.; Marova, I.; et al. Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*. *Bioresour. Technol.* **2018**, *256*, 552–556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Sadykov, M.R.; Ahn, J.-S.; Widhelm, T.J.; Eckrich, V.M.; Endres, J.L.; Driks, A.; Rutkowski, G.E.; Wingerd, K.L.; Bayles, K.W. Poly(3-hydroxybutyrate) fuels the tricarboxylic acid cycle and de novo lipid biosynthesis during *Bacillus anthracis* sporulation. *Mol. Microbiol.* **2017**, *104*, 793–803.

34. Valappil, S.P.; Misra, S.K.; Boccaccini, A.R.; Keshavarz, T.; Bucke, C.; Roy, I. Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterised *Bacillus cereus* SPV. *J. Biotechnol.* **2007**, *132*, 251–258. [CrossRef] [PubMed]
35. Ciriminna, R.; Pina, C.D.; Rossi, M.; Pagliaro, M. Understanding the glycerol market. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2014**, *116*, 1432–1439.
36. Mohandas, S.P.; Balan, L.; Jayanath, G.; Anoop, B.S.; Philip, R.; Cubelio, S.S.; Bright Singh, I.S. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoate from marine *Bacillus cereus* MCCB 281 utilizing glycerol as carbon source. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *119*, 380–392. [CrossRef] [PubMed]
37. Gahlawat, G.; Soni, S.K. Valorization of waste glycerol for the production of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer by *Cupriavidus necator* and extraction in a sustainable manner. *Bioresour. Technol.* **2017**, *243*, 492–501. [CrossRef]
38. Zain, N.F.M.; Abdullah, W.N.W.; Shun, T.J.; Keong, L.C.; Samian, M.R. Optimization of polyhydroxyalkanoate (PHA) production by *Burkholderia cepacia* BPT1213 utilizing waste glycerol as the sole carbon source. *Malaysian J. Microbiol.* **2018**, *14*, 164–171.
39. Hermann-Krauss, C.; Koller, M.; Muhr, A.; Fasl, H.; Stelzer, F.; Braunegg, G. Archaeal production of polyhydroxyalkanoate (PHA) co- and terpolyesters from biodiesel industry-derived by-products. *Archaea* **2013**, *2013*, 129268. [CrossRef]
40. 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 *Caldinonas manganoxidans* from glycerol. *J. Polym. Res.* **2018**, *25*, 85. [CrossRef]
41. Ibrahim, M.H.; Steinbüchel, A. High-cell-density cyclic fed-batch fermentation of a poly (3-hydroxybutyrate)-accumulating thermophile, *Chelatococcus* sp. strain MW10. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 7890–7895. [CrossRef] [PubMed]
42. Vigneswari, S.; Vijaya, S.; Majid, M.I.A.; Sudesh, K.; Sipaut, C.S.; Azizan, M.N.M.; Amirul, A.A. Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer with manipulated variables and its properties. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *36*, 547–556. [CrossRef] [PubMed]
43. Huong, K.-H.; Mohd Yahya, A.R.; Amirul, A.A. Pronounced synergistic influence of mixed substrate cultivation on single step copolymer P(3HB-co-4HB) biosynthesis with a wide range of 4HB monomer composition. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2014**, *89*, 1023–1029. [CrossRef]
44. Lee, W.-H.; Azizan, M.N.M.; Sudesh, K. Effects of culture conditions on the composition of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Comamonas acidovorans*. *Polym. Degrad. Stab.* **2004**, *84*, 129–134. [CrossRef]
45. Kucera, D.; Novackova, I.; Pernicova, I.; Sedlacek, P.; Obruca, S. Biotechnological Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) terpolymer by *Cupriavidus* sp. DSM 19379. *Bioengineering* **2019**, *6*, 74. [CrossRef]



© 2020 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 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).