



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

ELEKTROCHEMICKÁ GENERACE PEROXIDU VODÍKU PRO BIOTECHNOLOGICKÉ APLIKACE

ELECTROCHEMICAL EVOLUTION OF HYDROGEN PEROXIDE FOR BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Nikola Runštuková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jiří Ehlich, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1797/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Nikola Runštuková**
Studijní program: Chemie přírodních látek
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **Ing. Jiří Ehlich, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Elektrochemická generace peroxidu vodíku pro biotechnologické aplikace

Zadání diplomové práce:

- Proveďte rešerši na téma chronického stresu mikroorganismů pomocí peroxidu vodíku za účelem zvýšené produkce PHA.
- Prozkoumejte závislosti mezi všemi proměnnými při elektrochemické produkci peroxidu vodíku pomocí redukce kyslíku v adekvátním biotechnologickém reaktoru.
- Aplikujte výše získané poznatky při chronickém stresování mikroorganismů pomocí elektrochemicky generovaného peroxidu vodíku za účelem zvýšené produkce PHA

Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

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

Bc. Nikola Runštuková
studentka

Ing. Jiří Ehlich, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá propojením dvou odlišných oborů, elektrochemie a biotechnologie, kdy je elektrochemicky generovaný peroxid vodíku následně využit při bakteriálních kultivacích. Peroxid byl syntetizován v elektrolytickém článku redukcí kyslíku na katodě, na kterou byl aplikován vhodný elektrický potenciál. Cílem práce bylo prozkoumat závislost produkovaného množství peroxidu vodíku na několika vybraných parametrech, jako je katodový potenciál, elektrodový materiál, geometrie měřící cely či rychlost míchání, a následně tyto poznatky aplikovat při kontinuálním stresování bakterie *Cupriavidus necator* H16, za účelem zvýšené produkce polyhydroxyalkanoátů. Vybrané parametry byly nejprve otestovány v malých měřicích celách a následně byly provedeny experimenty ve větším měřítku, tedy Erlenmeyerových baňkách. Během experimentů byla zkoumána velikost produkovaného elektrického proudu a měřena koncentrace peroxidu spektrofotometricky a koncentrace kyslíku pomocí optického senzoru. Na základě dosažených výsledků byly následně kultivovány bakterie v baňkách se zabudovaným systémem ocelových elektrod, díky nimž docházelo ke kontinuálnímu působení oxidačního stresu v podobě *in situ* generovaného peroxidu vodíku. Bakteriální kultury byly hodnoceny na základě změny optické hustoty, gravimetrické analýzy a analýzy pomocí GC-FID. Bylo zjištěno, že i malé množství peroxidu vodíku (~25 μM) dokáže vyvolat stresovou odpověď organismu v podobě zvýšené syntézy polyhydroxybutyrátu (PHB). Bylo dosaženo procentuálního zvýšení obsahu PHB v biomase, nicméně celkový výtěžek polymeru byl nižší z důvodu nižšího nárůstu biomasy.

KLÍČOVÁ SLOVA

redukce kyslíku, generace peroxidu vodíku, oxidační stres, stresová odpověď bakterií, polyhydroxyalkanoáty

ABSTRACT

This master's thesis deals with the connection of two distinct fields, electrochemistry and biotechnology, where electrochemically generated peroxide was subsequently used in bacterial cultivation. The peroxide was synthesized in an electrolytic cell by reducing oxygen at the cathode to which suitable electrical potential was applied. The aim of this thesis was to investigate the dependence of the amount of hydrogen peroxide produced on a few selected parameters, such as cathode potential, electrode material, the geometry of the measuring cell, or the stirring speed, and then to apply these findings in the continuous stressing of the bacterium *Cupriavidus necator* H16, in order to increase the production of polyhydroxyalkanoates. The selected parameters were first tested in small-scale measuring cells and then experiments were carried out on a larger scale, in Erlenmeyer flasks. During the experiments, the amount of electric current produced was measured and also the peroxide concentration was examined spectrophotometrically along with the oxygen concentration measured by using an optical sensor. Based on the obtained results, bacteria were cultivated in flasks with a built-in system of steel electrodes, due to which oxidative stress in the form of *in situ* generated hydrogen peroxide was continuously applied. The bacterial cultures were evaluated by measuring the change in optical density, gravimetric analysis and GC-FID analysis. It was found that even small amounts of hydrogen peroxide (~25 μM) can induce a stress response in the organism in the form of increased polyhydroxybutyrate (PHB) synthesis. A percentage increase in the PHB content of the biomass was achieved, however, the overall polymer yield was lower due to lower biomass growth.

KEY WORDS

oxygen reduction, peroxide generation, oxidative stress, bacterial stress response, polyhydroxyalkanoates

RUNŠTUKOVÁ, Nikola. *Elektrochemická generace peroxidu vodíku pro biotechnologické aplikace*. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/146805>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Jiří Ehlich.

PROHLÁŠENÍ:

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ:

Ráda bych poděkovala vedoucímu své diplomové práce Ing. Jiřímu Ehlichovi, Ph.D. a konzultantce Ing. Evě Slaninové, Ph.D. za cenné rady a pomoc s realizací práce. Dále bych ráda poděkovala kolegům Ondřeji Studničkoví a Čeňkovi Vašíčkovi za pomoc při experimentech a vytvoření příjemného pracovního prostředí. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat i svým přátelům, rodině a příteli za podporu během studií.

OBSAH

1	Úvod.....	9
2	Teoretická část.....	10
2.1	Peroxid vodíku.....	10
2.2	Využití peroxidu vodíku.....	11
2.3	Syntéza peroxidu vodíku.....	12
2.3.1	Elektrochemický článek.....	14
2.3.2	Elektrochemická syntéza peroxidu vodíku.....	15
2.4	Stresová odpověď bakterií.....	19
2.4.1	Stresové faktory	19
2.5	Polyhydroxyalkanoáty.....	23
2.5.1	Struktura a vlastnosti PHA	24
2.5.2	Syntéza PHA	25
2.5.3	Degradace PHA.....	28
2.5.4	Producenti PHA	30
2.5.5	Substráty pro syntézu PHA.....	31
2.5.6	Využití PHA.....	31
2.5.7	Zapojení PHA ve stresové odpovědi	32
3	Současný stav řešené problematiky	36
4	Cíle práce.....	38
5	Experimentální část.....	39
5.1	Použité mikroorganismy, chemikálie a přístroje	39
5.1.1	Použité mikroorganismy	39
5.1.2	Použité chemikálie	39
5.1.3	Použité přístroje	39
5.2	Výroba měřících cel	41
5.2.1	Výroba solného můstku	42
5.2.2	Výroba pseudoreferenční elektrody	42
5.3	Metody zkoumání požadovaných veličin.....	43
5.3.1	Spektrofotometrické měření koncentrace peroxidu vodíku.....	43
5.3.2	Měření koncentrace kyslíku pomocí optického senzoru	44

5.3.3	Měření elektrického proudu.....	45
5.3.4	Měření elektrochemické impedanční spektroskopie	45
5.4	Testování vlivu různých parametrů na koncentraci generovaného peroxidu vodíku.....	45
5.4.1	Vliv velikosti potenciálu aplikovaného na pracovní elektrodu.....	45
5.4.2	Vliv různé rychlosti míchání.....	46
5.5	Testování rychlosti difuze kyslíku do měřicí cely	46
5.6	Vliv oceli jako materiálu pro pracovní elektrodu na produkované množství peroxidu vodíku.....	47
5.7	Testování dlouhodobé stability.....	48
5.8	Měření cyklické voltametrie při použití PBS a kultivačního média	48
5.9	Testování vlivu použitého elektrolytu na koncentraci generovaného peroxidu.....	48
5.10	Experimenty v Erlenmeyerově baňce	49
5.10.1	Výroba elektrodových systémů pro Erlenmeyerovy baňky.....	49
5.10.2	Experimenty v Erlenmeyerově baňce za použití PBS jako elektrolytu.....	50
5.10.3	Experimenty v Erlenmeyerově baňce za použití kultivačního média jako elektrolytu	51
5.11	Kultivace bakterií.....	51
5.11.1	Oživení bakteriálních kultur a jejich uchovávání.....	51
5.11.2	Příprava minerálního média pro kultivaci za účelem produkce biomasy produkující PHA	52
5.11.3	Inokulace a kultivace za účelem produkce biomasy produkující zvýšené množství PHA vyvolané stresováním v podobě <i>in situ</i> generovaného peroxidu vodíku	53
5.12	Stanovení biomasy	56
5.12.1	Stanovení růstu biomasy spektrofotometricky.....	56
5.12.2	Stanovení obsahu biomasy gravimetricky	56
5.13	Stanovení množství PHA v biomase.....	56
6	Výsledky a diskuze	57
6.1	Výsledky vlivu aplikovaného potenciálu na produkci peroxidu vodíku.....	57
6.2	Výsledky vlivu rychlosti míchání na produkci peroxidu vodíku.....	64
6.3	Výsledek testování rychlosti difuze kyslíku do měřicí cely	66
6.4	Výsledky vlivu oceli jako elektrodového materiálu na produkci peroxidu vodíku..	67
6.5	Výsledky testu dlouhodobé stability	69

6.6	Výsledky cyklické voltametrie pro porovnání PBS a kultivačního média jako elektrolytu.....	70
6.7	Výsledky experimentů za použití kultivačního média jako elektrolytu.....	71
6.8	Výsledky experimentů v Erlenmeyerových baňkách při použití PBS jako elektrolytu	73
6.9	Výsledky experimentů v Erlenmeyerových baňkách při použití kultivačního média jako elektrolytu	75
6.10	Výsledky kultivačních experimentů	77
7	Závěr	83
8	Seznam použité literatury	85
9	Seznam použitých zkratk	96
10	Přílohy	98
10.1	Stanovení obsahu PHB v biomase	98

1 ÚVOD

Peroxid vodíku je široce využívaná chemická látka, která mimo jiné slouží i jako oxidant šetrný k životnímu prostředí, jelikož produktem jeho rozkladu není nic jiného než kyslík a voda. Majoritní výroba peroxidu je založena převážně na antrachinonovém procesu, který nicméně není příliš ekologický. Alternativou k němu může být elektrochemická syntéza. V této práci byla využita metoda redukce kyslíku na katodě, jejímž důsledkem dochází k produkci peroxidu vodíku. Nastavením vhodných parametrů, jako je elektrodový materiál, potenciál aplikovaný na pracovní elektrodu, geometrie elektrod a měřících cel, či rychlost míchání, může být regulováno množství vznikajícího peroxidu. Metoda *in situ* elektrochemicky generovaného peroxidu je momentálně využívána například v papírenském průmyslu, kde slouží k bělení buničiny [1].

Vzhledem k oxidačním vlastnostem peroxidu, je možné ho využít i jako původce oxidačního stresu při bakteriálních kultivacích. Pro tyto účely byl vybrán kmen *Cupriavidus necator* H16, který je schopen syntetizovat biopolymery zvané polyhydroxyalkanoáty.

V posledních dekádách přitahuje stále větší pozornost odborníků i veřejnosti otázka ekologie a ochrany životního prostředí. Velikým problémem se stávají petrochemické plasty a jejich dopady na životní prostředí. Plasty se v dnešní době využívají ve všech odvětvích průmyslu, od potravinářství, přes zemědělství až po medicínu. Přestože momentálně jejich výhody převažují nad nevýhodami a jejich pole působnosti je široké díky rozdílným vlastnostem, hlavní překážkou zůstává plastový odpad, který je všudypřítomný. Úlevou pro životní prostředí by mohly být biodegradabilní plasty, mezi které patří zmíněné polyhydroxyalkanoáty. Biodegradabilita, tedy schopnost rozkládat se v přírodě za asistence mikroorganismů, by mohla přispět k vyřešení problémů s rostoucím objemem odpadu, který nás v přírodě obklopuje.

Polyhydroxyalkanoáty se ukazují být slibnou alternativou k petrochemickým plastům, avšak jejich výrobní cena zatím neumožňuje plné využití jejich potenciálu. Ke snížení ceny by mohla přispět efektivnější produkce a větší výtěžnost biopolymeru z daných mikroorganismů. A právě na to se zaměřuje tato diplomová práce. Je známo, že intracelulární granule polymeru neslouží pouze jako zásobárna energie a uhlíku, ale mají i protektivní funkci, což znamená, že pomáhají mikroorganismům odolávat nepříznivým podmínkám. V závislosti na přítomnosti stresu tak dochází k jejich zvýšené syntéze. Za tímto účelem byla v této práci otestována metoda chronického stresování bakterií pomocí *in situ* generovaného peroxidu vodíku.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Peroxid vodíku

Peroxid vodíku je důležitá chemická látka používaná v mnoha průmyslových odvětvích, například při výrobě papíru nebo syntéze organických sloučenin, v medicíně jako dezinfekční prostředek nebo při ochraně životního prostředí při čištění vody. Využití bude blíže popsáno v kapitole 2.2 [2]. Malé množství plynného peroxidu se přirozeně vyskytuje i ve vzduchu ale vzhledem k vysoké nestabilitě se ihned rozkládá na kyslík a vodu. Jedná se o široce rozšířený oxidant šetrný k životnímu prostředí, jelikož vedlejším produktem rozkladu nejsou žádné nebezpečné látky, ale pouze voda a kyslík [3]. H_2O_2 je čirá, bezbarvá kapalina neomezeně mísitelná s vodou. Při koncentraci vyšší než 65 % je rozpustný v mnoha organických rozpouštědlech. Peroxid vodíku a voda netvoří azeotropickou směs a mohou být teoreticky odděleny destilací, nicméně 100% peroxid vodíku se obvykle získává frakční krystalizací vodného roztoku. Fyzikální vlastnosti peroxidu vodíku v porovnání s vodou jsou uvedeny v *Tabulce 1* [4].

Tabulka 1: Vybrané fyzikální vlastnosti peroxidu vodíku a vody [4]

Fyzikální vlastnost	H_2O_2	H_2O
Molární hmotnost ($g \cdot mol^{-1}$)	34,016	18,015
Teplota tání ($^{\circ}C$)	-0,43	0
Teplota varu ($^{\circ}C$)	150,2	100
Relativní hustota ($g \cdot cm^{-3}$)		
0 $^{\circ}C$	14700	0,9998
20 $^{\circ}C$	1,4500	0,9980
25 $^{\circ}C$	1,4425	0,9971
Viskozita ($mPa \cdot s$)		
0 $^{\circ}C$	1,819	1,792
20 $^{\circ}C$	1,249	1,002

Atomy v molekule peroxidu jsou vázány kovalentně a mezi jednotlivými molekulami vzniká vodíková vazba, slabší než v případě vody [5]. Peroxid vodíku se ve formě vodného roztoku chová jako slabá kyselina s disociační konstantou $1,78 \cdot 10^{-12}$ ($pK = 11,75$) při 20 $^{\circ}C$ a díky tomu může tvořit soli s množstvím kovů. Peroxid se může chovat buď jako oxidační, nebo redukční činidlo v závislosti na pH a standardním potenciálu systému. Příkladem oxidačního účinku peroxidu vodíku je reakce (2.1), která probíhá při $pH = 0$ a standardním potenciálu $E^{\circ} = +1,8V$ vs. SHE (z anglického: *standard hydrogen electrode*):



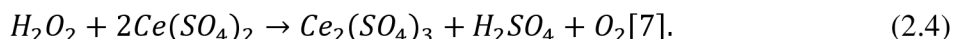
nebo reakce (2.2), která probíhá při $pH = 14$ a potenciálu $E^{\circ} = +0,87 V$ vs. SHE:



Redukční účinek peroxidu vodíku může být demonstrován na reakci (2.3), která probíhá při $\text{pH} = 0$ a standardním potenciálu $E^\circ = +1,51 \text{ V vs. SHE}$:



Nebo reakce (2.4), která probíhá při $\text{pH} = 0$ a standardním potenciálu $E^\circ = +1,61 \text{ V vs. SHE}$:



Reakce (2.3) a (2.4), kdy peroxid reaguje s manganistanem draselným nebo síranem ceričitým se využívají ke kvantitativnímu stanovení peroxidu vodíku (volumetrická titrace).

Samovolný rozklad peroxidu se projevuje disproportionační reakcí (2.5), a je velmi důležité brát tuto skutečnost v potaz při uchovávání peroxidu [4].



Tato reakce má zápornou Gibbsovu energii $\Delta G^\circ = -172,3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, a proto nastává spontánně i v přítomnosti malého množství katalyzátoru, kterým mohou být rozpuštěné ionty kovů železa, manganu nebo chromu, oxidy některých kovů (Mn, Fe, Cu, Pd, Hg) a nebo kovy, jako je platina, osmium a stříbro. Reakci dále urychluje teplo či světlo, a proto je vhodné peroxid uchovávat ve tmavých plastových lahvích a na chladném místě [4].

Peroxid vodíku jako silné oxidační činidlo může způsobovat oxidační stres buněk, což může vést k poškození biomolekul včetně DNA a následnému rozvoji rakoviny [8]. Peroxid je ale v organismu přítomný v malém množství stále a je nezbytný, jelikož funguje jako signální molekula [9]. Vliv peroxidu vodíku na organismus je dále popsán v kapitole 2.4.1.1 zabývající se oxidačním stresem.

2.2 Využití peroxidu vodíku

Peroxid vodíku nachází široké uplatnění jak v průmyslu, tak například v medicíně. Komerčně se využívá zejména jako bělicí činidlo či ke sterilizaci. V textilním průmyslu je využíván k bělení bavlny, lnu, dřeva, hedvábí, či umělých vláken jako je polyester nebo polyuretan. Při výrobě papírů se používá k bělení sulfátové i sulfitové celulózy. V chemickém průmyslu je využíván pro syntézu peroxy sloučenin, epoxidaci a hydroxylaci. Jeho bělicích účinků se také využívá a přípravků určených k bělení vlasů [4]. Jako dezinfekční činidlo se využívá zejména při ošetřování obalových materiálů, a to buď ve formě lázně nebo sprejováním [10].

V medicíně nachází peroxid vodíku uplatnění zejména jako dezinfekční prostředek. Ve formě 3% roztoku se prodává jako běžné populaci dostupná dezinfekce na drobné odřenininy a zranění. Peroxid pro medicínské využití se může vyskytovat i ve formě 30% roztoku, který je možné zředit na požadovanou koncentraci pro konkrétní využití. Peroxid má antiseptické a antibakteriální účinky, působí proti gram-pozitivním i gram-negativním bakteriím, bakteriálním sporám, virům i kvasinkám [11]. V zubním lékařství se využívá pro dezinfekci dutiny ústní po chirurgickém ošetření [12] či jako součást prostředků na bělení zubů [13]. Kromě zmíněných aplikací může být peroxid vodíku využit jako oxidační činidlo v raketových motorech [14, 15], k čištění odpadních

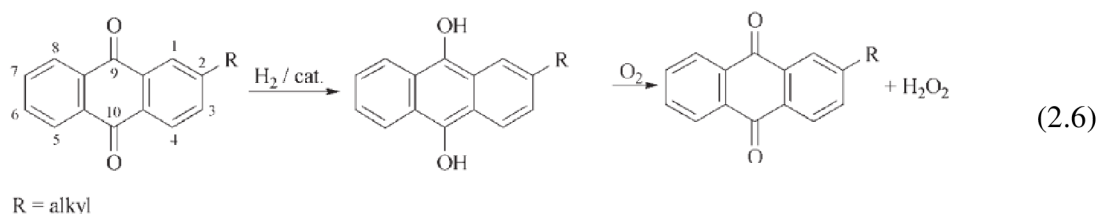
vod [16], a v těžebním průmyslu k čištění odtoku obsahujícího kyanid, zejména ze stříbrných a zlatých dolů [17, 18].

Peroxid vodíku je možné využít i jako zdroj oxidačního stresu v biotechnologických aplikacích, což bude detailně popsáno v následujících kapitolách. Aplikací stresu je možné dosáhnout zvýšené akumulace polymerů zvaných polyhydroxyalkanoáty, které si některé mikroorganismy syntetizují jako zdroj uhlíku a energie [19].

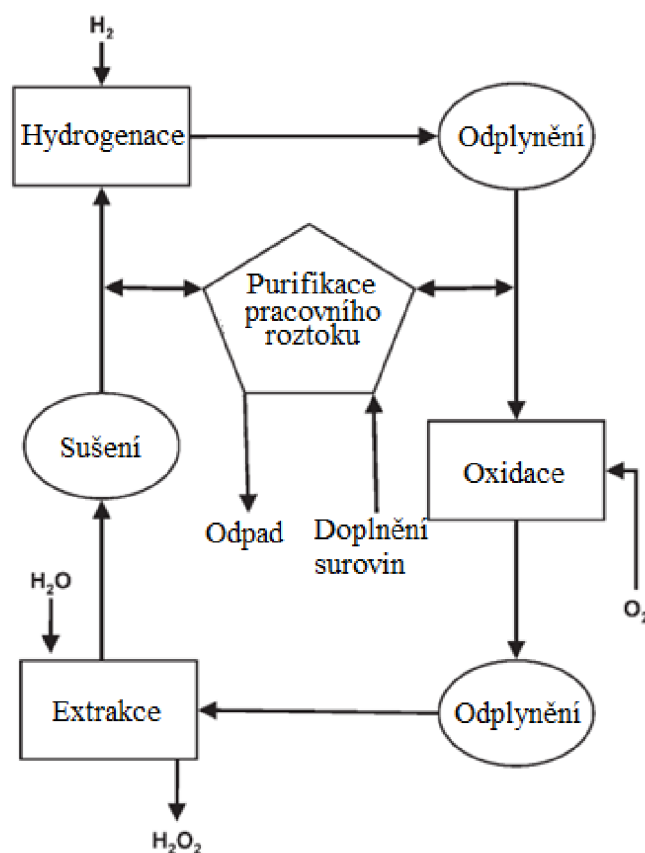
2.3 Syntéza peroxidu vodíku

Peroxid vodíku byl poprvé syntetizován roku 1818 Louisem Jacquesem Thenardem pomocí reakce peroxidu barnatého a kyseliny dusičné. Následně byla výroba vylepšena použitím kyseliny chlorovodíkové a sírové. Tento proces byl využíván od konce 19. století do poloviny 20. století. Tří procentní roztok vzniklý touto metodou měl však ale omezené využití z důvodu vysokých nákladů na výrobu, nízké koncentrace a nestability. Tyto nevýhody pomohlo vyřešit využití elektrochemických procesů. V roce 1853 Meidinger objevil vznik peroxidu během elektrolýzy vodného roztoku kyseliny sírové [4]. Stoprocentní peroxid vodíku byl poprvé získán roku 1894 pomocí vakuové destilace [3].

Velký pokrok v průmyslové výrobě peroxidu vodíku přinesl rozvoj organických autooxidačních procesů, zejména antrachinonový proces (Obrázek 1). Tato metoda byla představena firmou IG Farbenindustrie v Německu ve 40. letech 20. století. Princip této výroby spočívá v reakci 2-alkyl-9,10-antrachinonu s vodíkem za přítomnosti katalyzátoru za vzniku příslušného hydrochinonu, což je možné vidět v rovnici (2.6) [4].



Následně je katalyzátor odebrán, aby nedošlo k rozkladu peroxidu, a hydrochinon je oxidován na chinon pomocí oxidačního činidla, obvykle vzduchu. Při reakci vzniká kvantitativní množství peroxidu vodíku. Peroxid je poté extrahován vodou a chinon se vrací zpět. Během tohoto procesu tedy vzniká peroxid vodíku z plynného vodíku a kyslíku. Základní koncept této metody je využíván po desetiletí [20].



Obrázek 1: Schéma syntézy peroxidu vodíku pomocí antrachinonové metody [20]

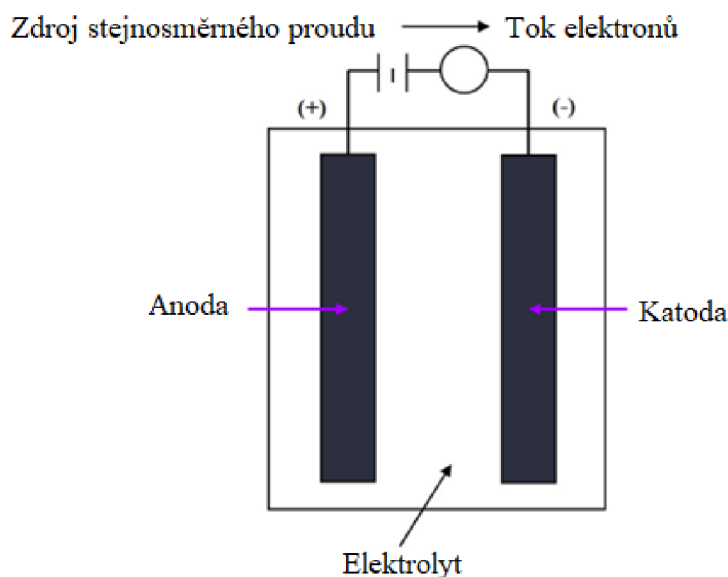
Peroxid je pomocí této metody produkován v koncentraci asi 80 %. Ta je následně ředěna v závislosti na požadovaném použití, což s sebou přináší určitá rizika a je nutno dbát zvláštních opatření. Dalším rizikovým faktorem je transport takto koncentrovaného roztoku, kde hrozí riziko výbuchu [21].

Vzhledem k nedostatkům pojícím se s antrachinonovou výrobou, přišli vědci s přímou syntézou peroxidu z vodíku a kyslíku na kovových katalyzátorech [22, 23]. Přestože tato metoda je jednokroková a není tak náročná jako antrachinonová metoda, rizikem stále zůstává potenciální výbušnost směsi plynného vodíku a kyslíku. Tomu se obvykle předchází přidáním inertních plynů do reakčního média [21].

Navzdory tomu, že peroxid vodíku je nejekologičtější oxidační činidlo ze všech, jeho výrobě stále dominuje antrachinonový proces vyvinutý v minulém století. Alternativou může být elektrochemická syntéza, která je šetrná k životnímu prostředí. Na rozdíl od antrachinonového procesu nevyžaduje použití karcinogenních látek, destilace, a navíc probíhá za běžné teploty. Oproti přímé syntéze nehrozí riziko výbuchu, jelikož není potřeba použít stlačený plynný vodík nebo kyslík [21].

2.3.1 Elektrochemický článek

V elektrochemických zařízeních je základní jednotkou elektrochemický článek, který můžeme rozdělit na dva typy. Galvanický článek, kde chemické reakce produkují elektrickou energii, a elektrolytický článek (Obrázek 2), kde je elektrická energie využita na pohánění chemických reakcí. Elektrochemický článek se skládá z pozitivní a negativní elektrody, které jsou odděleny elektrolytem. Na elektrodách se odehrávají takzvané redoxní reakce, což zahrnuje přenos elektronů z jedné chemické látky na druhou. Oxidace látky probíhá při ztrátě elektronu, zatímco redukce získáním elektronu. V elektrochemickém článku to znamená, že oxidační reakce poskytuje elektrony, aby redukční reakce mohla probíhat. V případě elektrolytického článku oxidace probíhá na kladné elektrodě, tedy anodě, a redukce probíhá na záporné elektrodě, tedy katodě. V případě galvanického článku je polarita elektrod obrácená [24].



Obrázek 2: Schéma elektrolytického článku [24]

Uvažujme následující reakci (2.7):



kde O je oxidovaná látka, R je redukovaná látka a n je počet vyměněných elektronů. Vztah mezi koncentrací oxidované látky, redukované látky a volnou energií ΔG [$\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$] je dán rovnicí (2.8):

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[R]}{[O]}, \quad (2.8)$$

kde R je univerzální plynová konstanta ($8,3145 \text{ J} \cdot (\text{mol} \cdot \text{K})^{-1}$) a T je teplota v Kelvinech. Poměr redukovaných a oxidovaných látek lze vztáhnout ke změně Gibbsovy volné energie ΔG , ze které je možné získat potenciál E (V) podle rovnice (2.9):

$$\Delta G = -nFE, \quad (2.9)$$

kde E je maximální potenciál mezi dvěma elektrodami, též známý jako napětí naprázdno, kdy přes článek neprotéká žádný proud, F je Faradayova konstanta ($1F = 96485,3 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$). Pokud mají

reaktanty a produkty jednotkovou aktivitu a E je bráno ve směru redukce, podle konvekce zleva doprava, tak rovnici (2.9) můžeme napsat jako rovnici (2.10):

$$\Delta G^0 = -nFE^0. \quad (2.10)$$

V tomto případě je potenciál elektrody znám jako standardní elektrodový potenciál E^0 [V]. Vzhledem k zápornému znaménku v rovnici (2.10) budou mít všechny spontánní reakce, které se vyznačují $\Delta G^0 < 0$, kladný standardní elektrodový potenciál $E^0 > 0$. Propojením rovnice (2.8) a (2.9) dostáváme Nernstovu rovnici (2.11):

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[O]}{[R]}. \quad (2.11)$$

Nernstova rovnice je důležitou rovnicí v elektrochemii a spojuje redukční potenciál elektrochemické reakce (poločlánek nebo celého článku) se standardním elektrodoým potenciálem, teplotou a koncentracemi chemických látek [25].

Potenciál elektrochemického článku $E^0_{\text{článek}}$, také známý jako elektromotorické napětí (*emf*), se vypočítá jako suma standardních potenciálů jednotlivých elektrod (2.12):

$$E^0_{\text{článek}} = E^0_{\text{pozitivní}} - E^0_{\text{negativní}}. \quad (2.12)$$

Teoretický standardní potenciál E^0 pro elektrodové reakce, psán dle konvence jako redukční reakce, je potenciál generován reakcí za standardních podmínek, kdy reaktanty i produkty jsou ve standardním stavu vůči referenční elektrodě. Ve vodných roztocích je standardní vodíkový potenciál brán jako univerzální referenční elektroda a rovná se 0. Standardní vodíková elektroda (SHE) je jinak známá i jako normální vodíková elektroda (NHE, z anglického: *normal hydrogen electrode*) [24].

V elektrolytickém článku se elektrody označují dle jejich specifické funkce. Pracovní elektroda (WE, z anglického: *working electrode*) je elektroda, na níž se dějí reakce, které jsou předmětem zkoumání. Dále pak protielektróda (CE, z anglického: *counter electrode*) a referenční elektroda (RE, z anglického: *reference electrode*). Referenční elektrody se vyznačují stabilním potenciálem po celou dobu reakce, dle kterého je monitorován potenciál pracovní elektrody. Protielektróda může být umístěna v elektrolytu společně s pracovní a referenční elektrodou, v tom případě se jedná o jednokomorový článek, nebo může být oddělena membránou či solným můstkem, přičemž v tomto případě se jedná o dvoukomorový článek [25].

2.3.2 Elektrochemická syntéza peroxidu vodíku

První zmínka o produkci peroxidu touto metodou pochází z roku 1853, kdy byl objeven vznik peroxidu pomocí elektrolýzy kyseliny sírové [26]. Mechanismus syntézy vodíku a peroxidu vodíku s použitím vody jako substrátu byl vysvětlen roku 1878 [27]. Na počátku 20. století procesy jako Degussa-Weisstein, Pietzsc-Adolph a Reidl-Lowenstein navrhly využívání kyseliny peroxosírové, peroxodisíranu draselného a peroxodisíranu amonného k produkci H_2O_2 , které se poté vyvinuly ve tři nejvyužívanější anodické procesy [28]. Nízké výtěžky těchto metod vedly ke vzniku nových postupů jako například od roku 1991 komerčně využívaného Huron-Dow procesu, který se využívá k bělení buničiny a papíru [1].

Momentálně se elektrochemická syntéza soustředí na dvě následující metody. Peroxid vodíku může být elektrochemicky syntetizován buď částečnou redukcí kyslíku nebo částečnou oxidací vody. Na rozdíl od přímé syntézy peroxidu vyžaduje elektrochemická syntéza přítomnost pouze vody a kyslíku jako substrátu a používá protony a elektrony generované *in situ* na protielektrodě [21].

Elektrochemické reakce kyslíku lze popsat rovnicí (2.13), která probíhá při napětí $E^\circ = -1,23 \text{ V vs. SHE}$.



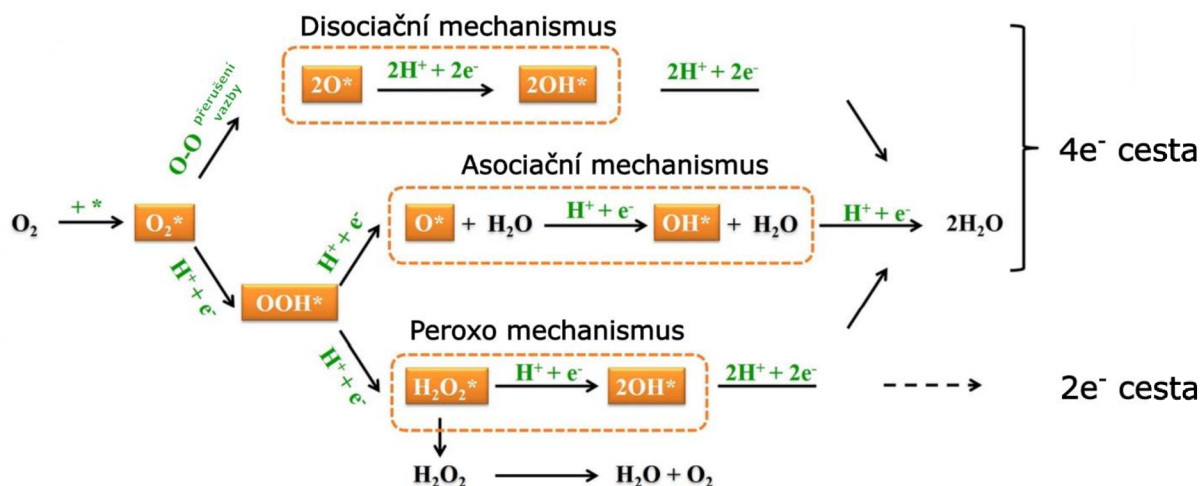
Oxidace vody je jedna z nejslibnějších technologií pro velkoobjemovou produkci vodíku. Úplná reakce zahrnuje vznik vodíku na katodě a kyslíku na anodě. Generování peroxidu na anodě je termodynamicky méně výhodné než vznik kyslíku, a proto dosahuje tato reakce nízké Faradaické účinnosti. Částečnou oxidaci vody popisuje rovnice (2.14):



Peroxid vzniklý na anodě může být dále oxidován až na kyslík nebo podléhat disproportionaci na vodu a kyslík [2].

V této diplomové práci se budeme prakticky věnovat pouze syntéze peroxidu pomocí redukce kyslíku. Pro reakce redukce kyslíku neboli ORR (z anglického: *oxygen reduction reaction*) jsou možné 3 reakční mechanismy (Obrázek 3).

- Disociační mechanismus, kde se O—O vazba kyslíku rozštěpí a vznikne O^{ads} , který je redukován na OH^{ads} a následně na H_2O^{ads} .
- Asociační mechanismus, kde je generováno OOH^{ads} , které se rozpadne na O^{ads} a OH^{ads} .
- Peroxo mechanismus, kde dvouelektronový transfer vede ke vzniku OOH^{ads} a $HOOH^{ads}$ a $HOOH^{ads}$ se následně rozpadá na OH^{ads} [2].



Obrázek 3: Schéma reakčních mechanismů ORR [29]

Redukční reakce kyslíku zahrnují multielektronový přenos, kdy kyslík může být redukován na vodu pomocí čtyřelektronového procesu nebo pomocí dvouelektronového procesu na peroxid vodíku. I když je kyslík redukován na peroxid vodíku, stále může docházet k následné redukci na vodu, nebo ke disproportionaci na O_2 . Čtyřelektronová cesta je žádoucí například v odvětví palivových článků a baterií [30] zatímco dvouelektronová cesta je nezbytná například pro aplikace jako čištění odpadních vod [31] či úprava podzemních vod [32].

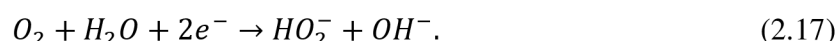
Čtyřelektronovou cestu představují reakce (2.15) a (2.16), kdy v alkalickém médiu dochází při $E^\circ = 0,40$ V vs. SHE k reakci (2.15):



a v kyselém médiu při $E^\circ = 1,23$ V vs. SHE dochází k reakci (2.16):



Pro dvouelektronovou cestu platí rovnice (2.17)-(2.19), kde v alkalickém médiu s potenciálem $E^\circ = 0,06$ V vs. SHE dochází k reakci (2.17):



Kterou následuje buď další dvouelektronová redukce (2.18) se standardním potenciálem $E^\circ = 0,86$ V vs. SHE



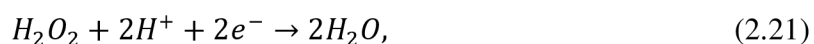
nebo chemický rozklad:



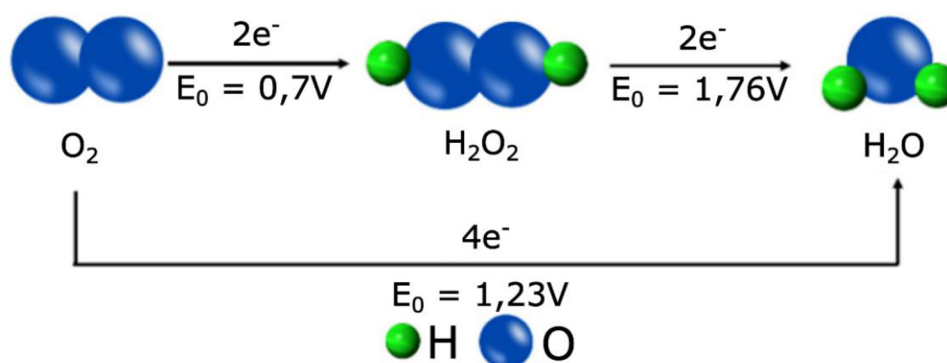
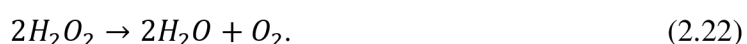
V kyselém médiu dochází k reakci (2.20) s potenciálem $E^\circ = 0,7$ V vs. SHE:



kde může následovat další dvouelektronová redukce (2.21) s potenciálem $E^\circ = 1,76$ V vs. SHE



nebo disproportionace (2.22) [1, 2]:



Obrázek 4: Dvouelektronová a čtyřelektronová redukce v kyselém prostředí [33]

Původní studie produkce peroxidu vodíku se zabývaly zejména syntézou v alkalických roztocích, kde je na katodě generován anion HO_2^- . První zmínka o katodické produkci peroxidu

vodíku pochází z roku 1887, kdy byla použita Hg—Au katoda v roztoku NaOH. Jedná se o průkopnickou práci v tomto odvětví [34]. V alkalickém prostředí ale může docházet k častější degradaci peroxidu, což může značně limitovat následné použití. Z tohoto důvodu byla zkoumána produkce peroxidu i v kyselých médiích [2]. Produkce peroxidu v alkalických médiích může být využita například v procesech bělení papíru a buničiny [35], zatímco produkci v kyselém prostředí lze použít pro oxidaci v organických syntézách. Nicméně nejužitečnější se zdá být produkce peroxidu v neutrálním prostředí, vzhledem k širokém rozptylu potenciálních aplikací, jako jsou dezinfekce pro koupelny, vzduchotechniku nebo tekoucí vodu [2, 36].

2.3.2.1 Katalyzátory vhodné pro elektrochemickou syntézu H₂O₂

Aby byla zajištěna dvouelektronová cesta redukce kyslíku a docházelo k efektivní produkci peroxidu vodíku, a ne kompletní redukci až na vodu, je potřeba využít katalyzátory, tedy katodové materiály, které jsou selektivní právě pro vznik peroxidu vodíku. Byly popsány různé druhy materiálů, které se vyhýbají čtyřelektronové cestě a mají selektivitu skoro 100%. Patří mezi ně uhlíkové materiály obsahující heteroatomy jako N, S, O, dále pak komplexy s N-donory v uhlíkové matici, kovy a jejich slitiny [21].

Jako jedny z nejučinnějších katalyzátorů se jeví ušlechtilé kovy jako palladium [37], slitina palladia a zlata [38], slitina platiny a rtuti [39] nebo slitina paladia a rtuti [40].

V této diplomové práci budou využívány čistě kovové katalyzátory, a proto se podrobně zaměříme pouze na ně. **Ehlich a kol. (2022)** zkoumali reakce redukce kyslíku na několika materiálech včetně titanu, platiny, zlata, wolframu, nebo organického materiálu PEDOT:PSS a otestovali potenciály od 0 V do -1 V vs. Ag/AgCl. Měření probíhalo po dobu 600 sekund ve vzdálenosti 200 μM nad pracovní elektrodou. Jako nejlepší materiál se jeví zlato, kdy koncentrace získaná při potenciálu -0,6 V vs. Ag/AgCl se rovnala 6 mM. Další materiály, které vykazovaly vyšší syntézu peroxidu byly organický PEDOT:PSS, který při potenciálu -0,9 V vs. Ag/AgCl generoval asi 2 mM peroxidu, a wolfram, který taktéž při -0,9 V vs. Ag/AgCl generoval zhruba 1,5 mM peroxidu. Platina se v této studii jeví jako nevhodný materiál pro syntézu peroxidu v porovnání s ostatními, jelikož nejvyšší naměřená koncentrace byla menší než 0,02 mM při potenciálu 0 V vs. Ag/AgCl. Na druhou stranu platina vykazuje výborné schopnosti redukovat kyslík v médiu již při nízkých aplikovaných potenciálech, čehož lze potenciálně využít v jiných aplikacích. Au, W i PEDOT:PSS se vyznačují vysokou selektivitou pro dvouelektronovou cestu redukce kyslíku, zatímco platina je známa pro svou selektivitu pro čtyřelektronovou cestu. Koncentrace peroxidu vodíku byla měřena pomocí amperometrického senzoru a pouze v těsné blízkosti elektrody. Vzhledem k tomu, že roztok nebyl míchán je pravděpodobné, že koncentrace měřená v celém objemu média se bude značně lišit od hodnot naměřených v rámci této studie [41].

2.4 Stresová odpověď bakterií

Bakterie jsou všudypřítomné mikroorganismy, které se dokáží přizpůsobit mnoha různým enviromentálním podmínkám. V půdě můžeme například nalézt grampozitivní bakterii *Bacillus subtilis*, gramnegativní *Escherichia coli* zase dokáže přežít ve střevech savců, nebo bakterie *Deinococcus radiodurans*, která dokáže přežít i v jaderných reaktorech, v prostředí vysoké radiace, které by zabilo všechny ostatní organismy. V enormním rozpětí různých životních prostředí jsou bakterie vystaveny neustálým změnám podmínek a různým druhům stresů. Mezi stresové faktory patří například teplota, pH, osmotický tlak, radiace, oxidační stres nebo nedostatek živin. Aby bakterie přežily v nepříznivých podmínkách, musely si vyvinout systémy, které jim v tom pomohou [42].

Organismus je schopen života, pokud si buněčná membrána a nukleové kyseliny zachovávají integritu a není narušen proces skládání proteinů. Během působení stresorů může docházet k poškození makromolekul, například mRNA, ale jejich krátká životnost umožňuje vyhnout se trvalým následkům poškození, jelikož chyby jsou samy eliminovány [43]. Systémy stresové odpovědi vykazují u prokaryot velkou podobnost, a některé jsou dokonce zachovány u eukaryot nebo archea. Nicméně podmínky, za kterých dojde k aktivaci těchto systémů, se liší mezi jednotlivými organismy. Například teploty, při kterých dochází ke stresové odpovědi budou jiné u mezofilů a termofilů, nebo reakce na přítomnost solí bude u halofilů rozdílná [44].

Některé druhy bakterií disponují bičíkem, který jim umožňuje uprchnout ze špatného prostředí a přesunout se blíže k příznivým podmínkám [45]. Další možností, jak čelit stresovým faktorům je adaptace na nově vzniklou situaci a změnu podmínek. První metodou, kterou bakterie využívají je regulace genové exprese genů, jejichž produkty se účastní boje proti daným nepříznivým podmínkám. Regulace transkripce je dosahováno aktivací transkripčních faktorů, které interagují s RNA-polymerázou a řídí genovou expresi [42]. Každý z několika sigma faktorů je v buňce potřeba k transkripci určitých skupin genů nebo operonů v rámci jejich regulonu [46]. Při pozorování bakterie *Bacillus subtilis* byla zjištěna rozsáhlá indukce genů pomocí sigma faktoru σ^B . Tyto geny kódují stresové proteiny, které se objevují v návaznosti na teplotní změny, výskytu ethanolu, solí nebo kyseliny, či během nedostatku zdrojů energie [47]. Dalším příkladem sigma faktoru zapojeného do stresové odpovědi je σ^F , který iniciuje sporulaci buňky během nepříznivých podmínek [48]. Dostupnost některých sigma faktorů k formaci komplexu s RNA-polymerázou je kontrolována navázáním vazebného partnera známého jako anti-sigma faktor, který může být regulován proteolýzou nebo fosforylací [42].

2.4.1 Stresové faktory

Původ stresorů může být chemického, fyzikálního či biologického charakteru, jak je uvedeno v Tabulce 2. Dokonce i organismy samy mohou být zdrojem stresových faktorů. Mnoho bakterií dokáže vytvářet peroxid vodíku, superoxidové radikály nebo další reaktivní formy kyslíku uvnitř buňky. Stresové faktory způsobují denaturaci proteinů, indukují zlomy v DNA řetězcích nebo způsobují oxidaci molekul [49]. V této diplomové práci se budeme detailněji věnovat pouze jednomu typu stresu, a to konkrétně oxidativnímu.

Tabulka 2: Typy stresových faktorů [50]

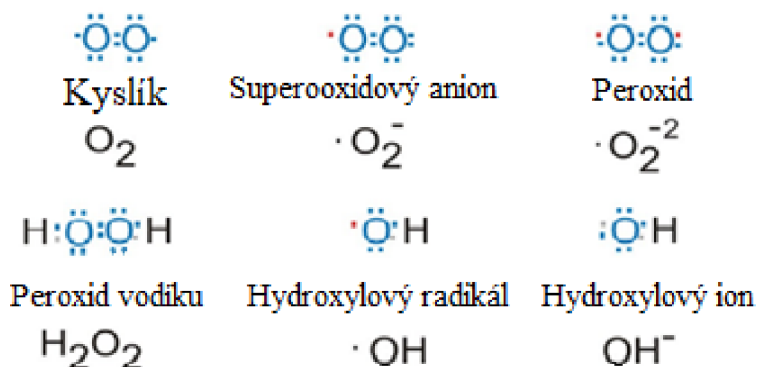
Fyzikální stres	Chemický stres	Biologický stres
Teplota	Ethanol (toxické metabolity)	Stárnutí buněk
Osmotický tlak	Nedostatek živin	Změny genotypu
Vysušení	Oxidativní stres	Kompetice s dalšími organismy
Vysoký tlak	pH	
Smykové napětí	Ionty kovů	
Radiace	Chemická mutagenese	

2.4.1.1 Oxidativní stres

Oxidativní stres nastává v případě, kdy počet oxidantů působících na organismus převyšuje jeho antioxidační kapacitu. Oxidativní stres je způsoben přítomností volných radikálů, což jsou reaktivní chemické substance existující velmi krátkou dobu. Volné radikály se vyznačují přítomností jednoho nebo více nepárových elektronů, které mohou oxidovat sloučeniny, na které narazí. Přítomnost nepárového elektronu jim umožňuje reagovat téměř se všemi molekulami v blízkém okolí [51].

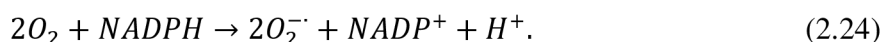
Reakce probíhá následovně: volný radikál atakuje nejbližší stabilní molekulu a odebere jí elektron. Z neutrální molekuly se tak stane volný radikál a řetězová reakce pokračuje dál. Jakmile proces jednou začne, dokáže zničit celou živou buňku, pokud není včas zastaven. Volné radikály reagují zejména s lipidy, aminokyselinami, sacharidy nebo narušují DNA a mohou způsobit mutace [51].

Rozlišujeme několik typů volných radikálů. Jedním z nich jsou reaktivní formy kyslíku neboli ROS (z anglického: *reactive oxygen species*) (Obrázek 5), což jsou volné radikály odvozené od molekuly kyslíku. Druhou skupinou jsou volné radikály odvozené od molekuly dusíku nazývané reaktivní formy dusíku neboli RNS (z anglického: *reactive nitrogen species*) [51].



Obrázek 5: Reaktivní formy kyslíku [51]

Reaktivní formy kyslíku jsou molekuly reaktivnější než samotný kyslík. Primární ROS je superoxid, který vzniká jedoelektronovou redukcí molekulárního kyslíku: rovnice (2.23). Tato reakce je katalyzovaná NADPH dependentní oxidázou, kdy jsou elektrony získávány právě z NADPH: rovnice (2.24)



Následnou redukcí vzniká peroxid vodíku. Dochází k tomu buď dismutací superoxidu, která se objevuje zejména při nízkém pH (2.25), nebo je reakce katalyzována pomocí enzymu superoxid dismutázy:



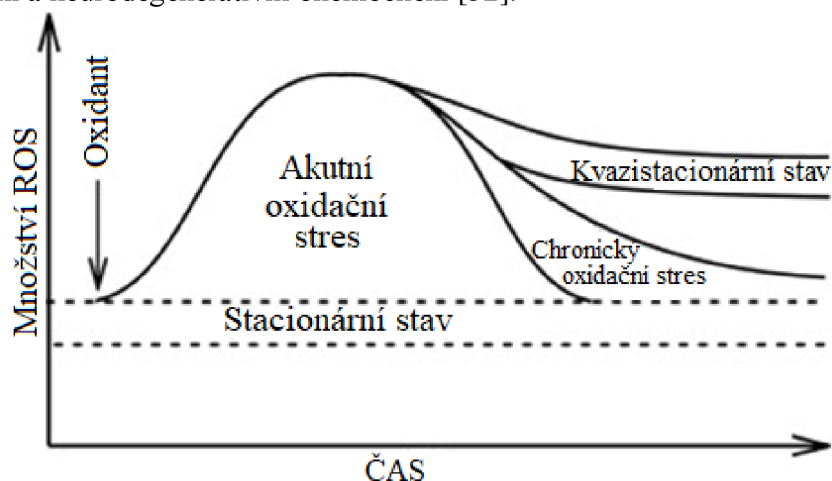
Další reakce mohou vést ke vzniku hydroxylových radikálů OH^{\cdot} , zejména v přítomnosti kovových iontů železa nebo mědi skrze Fentonovou či Haber-Weissovu reakci. Hydroxylové radikály jsou extrémně reaktivní a mají krátký poločas rozpadu. Reagují tudíž pravděpodobně s první molekulou, která se dostane do jejich blízkosti [9].

Až 90 % reaktivních forem kyslíku vzniklých uvnitř buňky pochází z elektron-transportních řetězců v mitochondriích, endoplazmatickém retikulu, plazmatické a jaderné membráně nebo fotosyntetickém systému. Menší množství ROS je generováno enzymy zvanými oxidázy, mezi které patří NADPH oxidázy, lipoxygenázy, cyklooxygenázy nebo xantinové oxidázy. Produkce ROS je kontinuální a za standardních podmínek je v rovnováze s jejich eliminací. Za určitých podmínek se ale tento rovnovážný stav může změnit a koncentrace ROS rapidně vzroste, což vede k oxidaci buněčných součástí a následnému narušení metabolismu buňky a jeho regulace. Důvody k narušení rovnovážného stavu mohou být:

- zvýšený výskyt endogenních nebo exogenních sloučenin, které autooxidací produkují ROS,
- vyčerpání zásob antioxidantů,
- inaktivace antioxidačních enzymů,
- pokles produkce antioxidačních enzymů a nízkomolekulárních antioxidantů,
- kombinace výše zmíněných [8].

Dva možné mechanismy redukce kyslíku za aerobních podmínek v elektrontransportním řetězci je možné vidět na Obrázku 6. První způsob znázorňuje čtyřelektronovou cestu redukce kyslíku na vodu, který nastává v 90 % případů. Méně než 10 % kyslíku je redukováno pomocí jedoelektronové cesty za vzniku superoxidového radikálu a následně peroxidu vodík, který se po reakci s elektronem rozpadá na hydroxylový radikál a hydroxylový anion. V posledním kroku hydroxylový radikál reaguje s elektronem za vzniku vody [8].

na svou původní hladinu, označuje se tento typ stresu jako akutní. Pokud dochází k dlouhodobému působení ROS na organismus, může to vyústit v chronický stres, kdy může docházet k modifikaci buněčných složek, což narušuje homeostázu. Poslední možností, která může nastat v důsledku změny fyziologického stavu organismu, je vytvoření nového kvazistacionárního stavu, kdy se ROS již nevrátí do původní hladiny a stabilizuje se na nové, zvýšené hladině. Nový kvazistacionární stav je u lidí spojován s některými patologiemi jako je diabetes mellitus, ateroskleróza, kardiovaskulární a neurodegenerativní onemocnění [52].



Obrázek 7: Závislost působení ROS v čase [8]

Kromě již zmíněných negativních účinků mohou mít některé ROS v buňce také pozitivní roli. Účastní se buněčné signalizace, včetně apoptózy, genové exprese a aktivace signální kaskády a mohou sloužit jako extra- i intracelulární posli. Molekuly splňující kritéria pro potenciální signální molekuly jsou peroxid vodíku a superoxid [9].

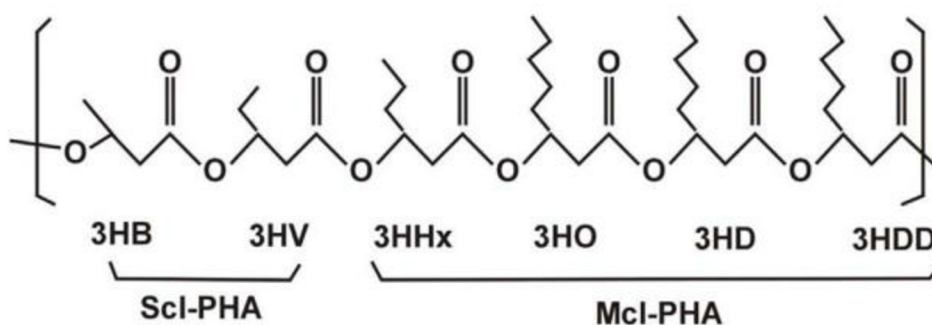
Jak již bylo zmíněno dříve, aplikování stresu může mít kromě negativních účinků i ty pozitivní. V biotechnologiích se aplikace stresu využívá za účelem zvýšené produkce metabolitů některých mikroorganismů. V případě této diplomové práce to jsou bakterie akumulující polyhydroxyalkanoáty, které jsou blíže popsány v následující kapitole.

2.5 Polyhydroxyalkanoáty

S rostoucí zátěží na životní prostředí v posledních desetiletích roste i snaha o nahrazení petrochemických plastů alternativními materiály. Jedním z těchto materiálů mohou být i polyhydroxyalkanoáty neboli PHA. Jedná se o biodegradabilní a biokompatibilní polymery syntetizované některými mikroorganismy ve formě intracelulárních granulí. První zmínka o PHA pochází již z roku 1926, kdy francouzský vědec Lemoigne objevil přítomnost poly-3-hydroxybutyrátu (P3HB) uvnitř bakterie *Bacillus megaterium*. Vzhledem k velké dostupnosti petrochemických plastů a vysokým nákladům na produkci bioplastů nejsou zatím tyto materiály využívány ve velké míře. Pro zefektivnění procesů produkce PHA je možné využít rekombinantní kmeny bakterií, účinnější fermentaci nebo purifikaci, či používat levné odpadní substráty jako zdroj uhlíku [53, 54].

2.5.1 Struktura a vlastnosti PHA

Polyhydroxyalkanoáty jsou lineární polyestery hydroxykyselin, přičemž v dnešní době je známo více než 150 různých druh. PHA je možné rozdělit podle počtu uhlíků monomerní jednotky do tří skupin: s krátkým řetězcem (scl, z anglického: *short-chain-length*), které mají 3–5 uhlíků; se středně dlouhým řetězcem (mcl, z anglického: *medium-chain-length*), které mají 6–14 atomů uhlíku a s dlouhým řetězcem (lcl, z anglického: *long-chain-length*), které mají více než 14 atomů uhlíku. Nejznámějšími zástupci scl-PHA jsou polyhydroxybutyrát a polyhydroxyvalerát, u mcl-PHA jsou to například polyhydroxyoktanoát a polyhydroxyhexanoát. PHA se mohou vyskytovat ve formě homopolymerů, tedy obsahují pouze jeden typ monomeru, nebo ve formě kopolymerů, tedy obsahují více typů monomerů navázaných za sebou [53].



Obrázek 8: Struktury některých polyhydroxyalkanoátů [53]

Vlastnosti PHA se liší zejména v závislosti na jejich chemické struktuře, tedy počtu uhlíků či funkčních skupinách a konkrétním zastoupení jednotlivých monomerů v případě kopolymeru. Alternativní plasty jsou charakterizovány stejnými parametry jako běžné petrochemické plasty. Následující příklady PHA se svými vlastnostmi značně podobají polypropylenu, jak lze vidět v *Tabulce 3*. Polymery vyobrazené v tabulce jsou poly-3-hydroxybutyrát (P3HB), poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) (PHB3HV), poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát) (PHB4HB) a poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyhexenoát) (PHB3Hx) [55].

Tabulka 3: Vlastnosti vybraných kopolymerů (s 3HB) v porovnání s PP [55]

Vlastnost	PHB	20%3HV	16%4HB	10%Hx	PP
Teplota tání (°C)	177	145	150	127	176
Teplota skelného přechodu (°C)	2	-1	-7	-1	-10
Krystalinita (%)	60	56	45	34	50–70
Pevnost v tahu (MPa)	43	20	26	21	38
Prodloužení při přetržení (%)	5	50	444	400	400

Všechny PHA jsou nerozpustné ve vodě, dobře odolávají hydrolyze, jsou odolné vůči UV záření, slouží jako výborná bariéra pro plyny a ve vodě klesají ke dnu, což může usnadnit anaerobní biodegradaci v sedimentech. Polymery jsou biokompatibilní a biodegradabilní, což je jejich velkou výhodou i při medicínských aplikacích (viz kapitola 2.5.6). PHA jsou rozpustné v chloroformu a dalších chlorovaných rozpouštědlech, čehož je využíváno při jejich extrakci z bakteriálních buněk. Teploty skleného přechodu a tání se liší mezi jednotlivými polymery, ale pohybují se v rozmezí $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro teplotu skelného přechodu a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro teplotu tání. Při zpracování polymerů a jejich následném využití je také důležité znát teplotu rozkladu, která se pro PHB udává jako $246,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ a pro P(3HB-co-10,4%HV) jako $260,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ [56].

Průměrná molární hmotnost PHA produkovaných bakteriemi je udávána až okolo 4 MDa a polydisperzita přibližně 2 [57]. Homopolymer PHB je vysoce krystalický, pevný, ale křehký. Pokud se zformuje do podoby vláken, chová se jako vysoce elastický materiál [54].

Kromě typických posuzovaných vlastností připadá u biopolymerů v úvahu i biodegradabilita. Některé mikroorganismy jsou schopny v přírodě degradovat PHA použitím vhodných enzymů (PHA hydrolázy a PHA depolymerázy). Rychlost degradace závisí na složení polymeru a environmentálních podmínkách. Rozmezí se pohybuje v řádech několika měsíců v případě anaerobního zpracování odpadní vody a v řádu několika let v případě vody mořské. PHA jsou rozložitelné i v půdě a lze je i kompostovat. Další důležitou vlastností je biokompatibilita, což znamená, že polymer nevykazuje žádné toxické efekty pro živé organismy, a může tak být použit pro medicínské aplikace [54].

2.5.2 Syntéza PHA

Metabolismus akumulace PHA byl poprvé zkoumán v roce 1958 u kmene *B. megaterium*. Macrae a Wilkinson zjistili, že množství PHA se zvyšuje, se zvyšujícím se poměrem uhlíku ku dusíku v médiu. Z jejich výsledků vyplývá, že stejně jako u sacharidových zásob a polyfosfátů, dochází k akumulaci PHA jako odpovědi na limitaci některých nutrientů. Pokud mikroorganismům chybí dostatek esenciálních látek na buněčné dělení (amonné kationty, sírany, fosforečnany, hořčík, železo), ale mají dostatečný přísun uhlíku, mohou si ho ukládat právě v podobě PHA. Akumulace může nastat i při limitaci kyslíkem. Nicméně jsou známy i kmeny bakterií, které syntetizují PHA během růstové fáze jako například *Alcaligenes latus* nebo mutantní kmen *Azotobacter vinelandii*. Pokud je přísun živin vyvážený, dochází k inhibici syntézy PHA kvůli vysoké koncentraci CoA, kdy základní stavební kámen PHA, tedy acetyl-CoA, je metabolizován v Krebsově cyklu. Při limitaci nutrientů nemůže docházet k syntéze proteinů a dochází k nahromadění NADH, které inhibuje syntézu citrátu a acetyl-CoA, který se nemůže rychle oxidovat v Krebsově cyklu, se akumuluje. Rovnováha je pak posunuta ve prospěch syntézy PHA [58].

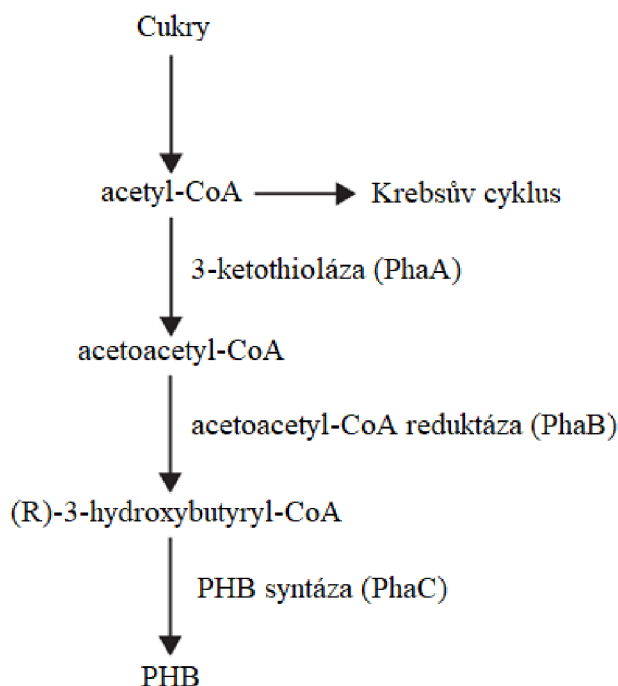
Vzhledem k širokému rozpětí možných monomerních jednotek vykazuje enzym zodpovědný za polymerizaci monomerů širokou substrátovou specifitu. Jeden z faktorů, který určuje výsledné složení PHA, je zdroj uhlíku. Bakterie mohou využít širokou škálu substrátů jako jsou jednoduché cukry, alkany, rostlinné oleje, mastné kyseliny nebo různé odpadní substráty, což mohou být směsi předem zmíněných substrátů. Na základě typu monomeru jsou do syntézy PHA zapojeny různé metabolické dráhy a biosyntéza PHA může být rozdělena do tří základních typů.

Prvním z nich je syntéza z cukerných prekurzorů, kterou můžeme vidět u bakterie *Cupriavidus necator* H16, což bude blíže popsáno v následující kapitole. Při dalších typech biosyntézy jsou využívány dráhy degradace mastných kyselin, což můžeme nalézt například u pseudomonád, nebo dráhy biosyntézy mastných kyseliny [59].

2.5.2.1 Syntéza PHA u bakterie *Cupriavidus necator*

Klíčovým enzymem při syntéze PHA je polymerační enzym PHA syntáza (PhaC). Můžeme rozlišit 3 druhy PHA syntázy s ohledem na jejich substrátovou specifitu a primární strukturu. První typ tohoto enzymu je schopen polymerizovat zejména krátké (scl) monomery, druhý typ polymerizuje hlavně monomery se středně dlouhým řetězcem (mcl). Zatímco první dva typy enzymu se skládají pouze z jedné podjednotky, třetí typ se skládá z podjednotek dvou [59].

Prvním krokem syntézy je přeměna substrátu na acetát a poté následuje navázání CoA, univerzálního přenašeče acylových skupin, pomocí thioesterové vazby. V případě bakterie *Cupriavidus necator* H16 (dříve známé jako *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha* nebo *Wautersia eutropha*) se biosyntézy PHA účastní tři enzymy. První z nich je β -ketothioláza (PhaA), která katalyzuje kondenzaci dvou acetyl-CoA na acetoacetyl-CoA. Produkt následně prochází redukcí pomocí NADPH-dependentní acetoacetyl-CoA reduktázy (PhaB), kdy vzniká (*R*)-izomer 3-hydroxybutyryl-CoA. Na rozdíl od *C. necator* H16 vzniká během syntézy pomocí bakterie *R. rubrum*, která využívá téměř stejnou dráhu, (*S*)-izomer, který je následně pomocí dvou enoyl-CoA hydratáz konvertován na (*R*)-izomer. Dochází k tomu, jelikož následující a nejdůležitější enzym celé této metabolické dráhy, PHA syntáza, je stereospecifický a je tedy schopen akceptovat pouze substráty v (*R*)-konfiguraci. PHA syntáza katalyzuje polymerizaci monomerních jednotek za vzniku specifických homopolymerů či kopolymerů. Propagace řetězce pokračuje navázáním dalšího monomeru a v případě 3-hydroxybutyryl-CoA bude výsledným polymerem poly-3-hydroxybutyrát (PHB) [58, 59].



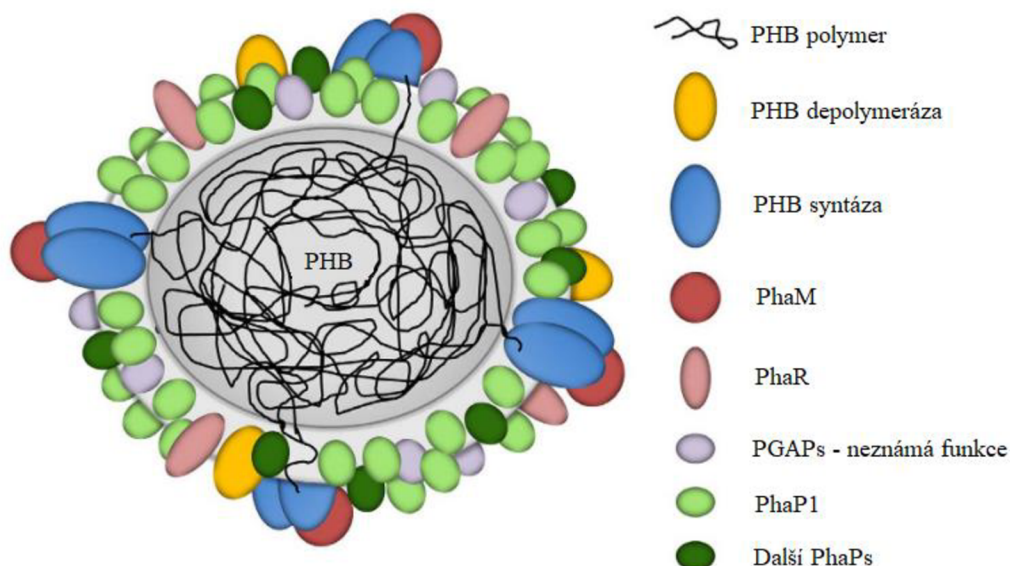
Obrázek 9: Schéma syntézy PHA [54]

2.5.2.2 PHA granule

Polyhydroxyalkanoáty jsou uvnitř bakteriálních buněk shromažďovány ve formě intracelulárních inkluzí neboli granulí. Jedná se o komplexní struktury podobné organelám nazývané karbonozomy. Na povrchu těchto inkluzí se nachází velké množství proteinů, které plní jak strukturální, tak funkční roli. Původně bylo zamýšleno, že PHA granule ve své struktuře obsahují kromě proteinů i fosfolipidy. Důvodem této domněnky bylo nalezení fosfatidové kyseliny a dalších lipidických sloučenin v purifikovaných PHB granulích bakterie *Bacillus megaterium* před 50 lety. Dalším potenciálním důkazem o přítomnosti fosfolipidů ve struktuře byly výsledky z elektronové mikroskopie, které naznačovali tloušťku povrchové vrstvy jako 4 nm, což odpovídá fosfolipidové monovrstvě. Žádný z těchto tvrzení ale stoprocentně nepotvrzuje přesné složení PHA granulí *in vivo*. Ve studii z roku 2016 **Bresan a kol.** potvrdili pomocí několika experimentů zahrnujících expresi proteinů vázajících se na fosfolipidy, že povrchová vrstva PHA granulí je složena pouze z proteinů, nikoliv fosfolipidů, a že v případě fosfolipidů nalezených v purifikovaných PHA granulích *in vitro* se patrně jednalo o fosfolipidy navázané až následně po porušení buněčné membrány [60, 61].

Na povrchu granulí jsou navázané všechny proteiny nezbytně nutné pro syntézu a degradaci PHA. Mezi ty nejdůležitější patří PHA syntáza a PHA depolymeráza. Další velkou složkou jsou proteiny zvané phasiny (PhaPs), analogy oleosinů, což jsou proteiny vázané na povrchu olejových globulí u některých rostlin. Bylo zjištěno, že phasiny pokrývají velkou část inkluzí a pomocí experimentů s *phaP* mutanty byla stanovena i jejich funkce. U mutantů byla syntetizována pouze jedna velká inkluze PHA, zatímco vysoká exprese PhaP vedla k vytvoření většího počtu menších

granulí. Z výsledků vyplývá, že tyto proteiny nejen ovlivňují velikost granulí, tedy poměr povrchu ku objemu, ale také zabraňují koalescenci granulí *in vivo*. Struktura granule polyhydroxybutyrátu je k nahlédnutí na Obrázku 10 [61].



Obrázek 10: Struktura PHB granulí [60]

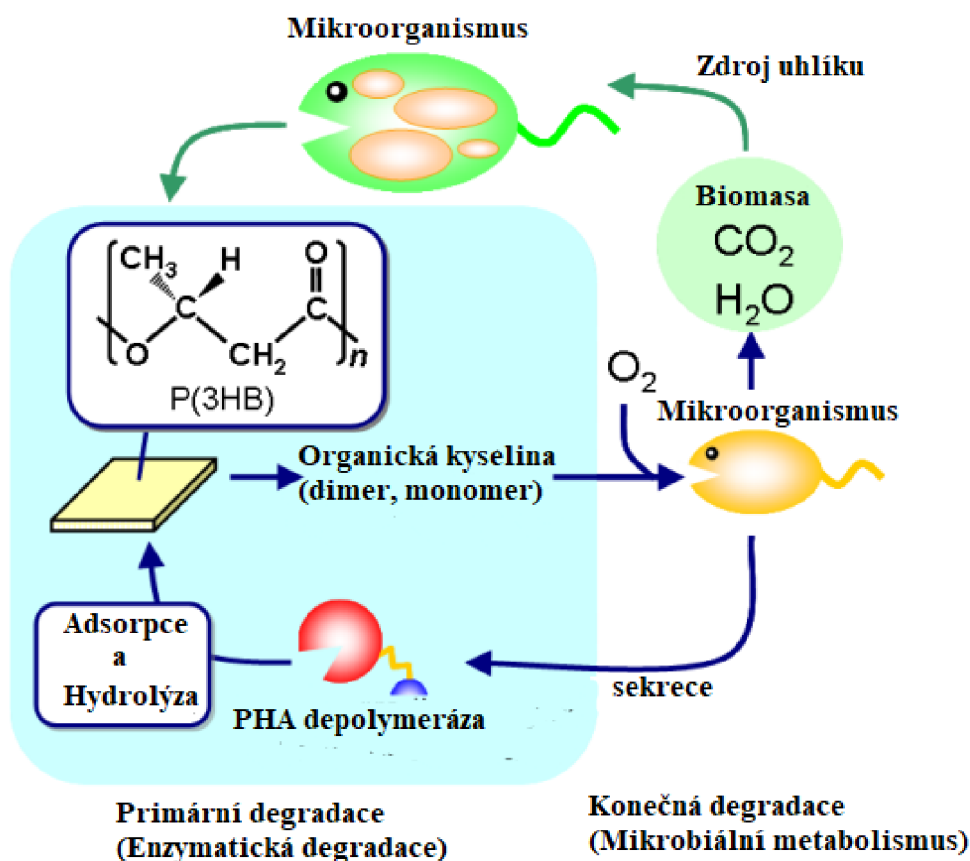
2.5.3 Degradace PHA

Vzhledem k tomu, že PHA slouží bakteriím jako zdroj uhlíku, je důležité, aby bakterie také disponovaly schopností následného využití těchto zdrojů. Jsou proto vybaveny depolymerizačním systémem zahrnujícím enzym PHA depolymerázu, která je schopna depolymerizovat intracelulární granule PHA. PHA inkluze jsou pravděpodobně chráněny proti případné předčasné depolymerizaci pomocí proteinů a je potřeba přítomnost aktivátoru, který modifikuje inhibitor, což následně umožní intracelulární PHA depolymeráze nasednout na polymer [60, 62]. Jedná se o velmi pomalý proces a rychlost depolymerizace je asi 10x nižší než rychlost polymerizace. Vzhledem ke zjištění, že počet řetězců PHA je téměř neměnný po celou dobu degradace, v případě tohoto enzymu se nejspíše jedná o exo-typ hydrolázy, která štěpí jednotlivé monomery od konce polymerního řetězce [63]. Je důležité zmínit, že intracelulární depolymeráza je schopná rozkládat pouze nativní inkluze PHA, tedy v amorfním stavu a mechanismus depolymerizace se tedy liší od té extracelulární [59].

Důležitým aspektem těchto polymerů je jejich biodegradabilita. Při jejím hodnocení se přihlíží na faktory jako velikost vzorku, molekulová hmotnost a mechanická pevnost. Bylo zjištěno, že rychlost biodegradace závisí na mnoha vnějších faktorech jako teplota, pH, vlhkost nebo dostupnost nutrientů. Ale také na vnitřních faktorech, tedy vlastnostech polymeru, jako jsou monomerní složení, stupeň krystalinity, přítomnost aditiv anebo velikost povrchu [59].

Některé mikroorganismy nebo houby disponují extracelulární depolymerázou, která se vyznačuje schopností degradovat krystalické formy polymeru a následně je použit jako zdroj uhlíku. Jelikož PHA jsou polymery s velkou molekulovou hmotností, které nemohou přecházet

skrz buněčnou stěnu, je nejprve nutné je naštěpit, aby mohly být využity jako zdroj nutrientů. Extracelulární depolymeráza hydrolyzuje polymer na ve vodě rozpustné monomery a oligomery. Mikroorganismy mající schopnost degradovat tyto polymery byly nalezeny v rozmanitých prostředích, jako jsou půda [64], moře [65], jezera [66], horké prameny [67] či kompost [68]. Enzym PHA depolymeráza se skládá ze dvou domén a spojovacího regionu. Doména na N-konci je označována jako katalytická, zatímco doména na C-konci je označována jako vazebná. Enzymatická degradace polymeru je heterogenní reakce sestávající ze dvou kroků, adsorpce a hydrolýzy. Prvním krokem je adsorpce vazebné domény na povrchu polymeru a druhým je hydrolýza pomocí aktivního místa enzymu. Rychlost depolymerace je ovlivněna koncentrací enzymu. V přítomnosti menšího množství je většina katalytických domén adsorbovaného enzymu schopna hydrolýzy polymeru. Zatímco v přítomnosti vysoké koncentrace enzymu nemá katalytická doména přístup k řetězcům PHA, jelikož jsou blokovány vazebnou doménou [59]. Schéma biodegradace PHA je zobrazeno na Obrázku 11.



Obrázek 11: Biodegradace PHA [69]

2.5.4 Producenti PHA

Syntéza PHA se objevuje u mnoha mikroorganismů. Potenciál pro velkovýrobu mají ale zejména bakterie nebo transgenní rostliny. Zatímco u rostlin se ale dosahuje produkce PHA pouze do 10 % suché hmotnosti, u bakterií je zisk o mnoho větší, až 90 %. Větší množství polymeru u rostlin negativně ovlivňuje jejich růst a vývoj a tento problém zatím nebyl překonán [70].

Akumulace PHA je přirozená cesta, jak uchovávat energii a uhlík pro mnoho bakterií. Bylo popsáno více než 300 bakteriálních druhů, které mají schopnost syntézy PHA. Většina z nich patří mezi mezofilní kmeny, které jsou také momentálně používány pro průmyslovou výrobu. Do této skupiny bakterií patří například již zmíněný *Cupriavidus necator* H16, a dále pak *Pseudomonas aeruginosa*, *Chromatium vinosum*, *Aeromonas caviae* nebo *Bacillus megaterium* [71]. Nevýhodou využití mezofilů, tedy bakterií, jejichž teplotní optimum je v rozmezí 25–40 °C [72], je zejména velká náchylnost na kontaminaci dalšími mezofily. Do této skupiny se řadí většina běžných i patogenních bakterií [71].

Odpovědí na tyto problémy by mohlo být využití fermentace, která používá termofilní bakteriální kmeny s teplotním optimem 50–60 °C. Nejen že by to pomohlo předejít případné kontaminaci mezofilními mikroorganismy, ale také by to mohlo podstatně zlevnit výrobu. Metabolické teplo vzniklé při fermentaci a rozptýlené mícháním, je využito na ohřívání reaktoru. Další výhodou je zlevnění nákladů na sterilizaci a možnost pracování v kontinuálním nebo semi-kontinuálním módu. V neposlední řadě je také spotřebováno mnohem méně vody a energie na chlazení reaktoru. Příkladem termofilních bakterií využívaných k produkci PHA jsou například *Caldimonas taiwanensis*, *Thermus thermophilus*, *Chelatococcus daeguensis*, *Schelegella thermodepolymerans* a *Bacillus licheniformis* [71].

Rozvojem syntetické biologie a genetického inženýrství a úspěšným naklonováním všech tří genů účastníků se syntézy PHA bylo možné exprimovat tyto geny v organismech, které běžně biosyntézou PHA nedisponují. Modelovým organismem využívaným pro genetické manipulace je bakterie *Escherichia coli*. Jelikož fyziologie, biochemie i genetika *E. coli* jsou detailně prostudované, dělá to z kmene ideálního kandidáta pro vytvoření rekombinantní bakterie schopné produkce PHA. Výhodou využití rekombinantního kmenu oproti normálnímu je skutečnost, že nejen že může využívat větší škálu levějších substrátů jako zdroj uhlíku, ale také purifikace výsledného produktu je levnější. Rekombinantní kmen také nedisponuje enzymem intracelulární PHA depolymerázy, což znamená, že již nasyntetizované PHA nemůže být degradováno [59].

Kromě bakterií přicházejí v úvahu jako potenciální producenti transgenní rostliny, kde byly zkoumány například *Arabidopsis thaliana* [73], *Gossypium hirsutum* [74] nebo tabáková rostlina [75]. Vedle transgenních rostlin byly zkoumány i transgenní kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* [76] a *Yarrowia lipolytica* [77] nebo hmyz *Spodoptera frugiperda* [78] a také cyanobakterie [79].

2.5.5 Substráty pro syntézu PHA

Klasické substráty využívané pro kultivace mikroorganismů pro produkci PHA jsou sacharidy, kam se řadí například glukóza, fruktóza, sacharóza a mnoho dalších. Dále pak kyseliny jako je acetát, malát, laktát nebo sukcinát atd. [54]. Používání těchto substrátů má ale na celou výrobu neblahé ekonomické dopady, kdy právě cena substrátů nezbytných pro produkci je jedním z nejdražších aspektů celé výroby. Cena těchto bioplastů je 5 až 10 krát vyšší v porovnání s petrochemickými plasty. Proto se současné výzkumy orientují na zapojení odpadních substrátů jako zdroje uhlíku [53].

Prvním z možných alternativních substrátů je syrovátka. Jedná se o vedlejší produkt při výrobě sýrů a tvoří až 90 % objemu zpracovávaného mléka. Polovina tohoto odpadu se zpracovává na produkty pro zvířata nebo lidi a zbytek se vyhodí. **Koller a kol. (2008)** zkoumali produkci PHA pomocí *P. hydrogenovora* a získali výtěžek 1,27 g/l PHA při zisku 5 g/l biomasy [80].

Dalším potenciálním substrátem je škrob. Jedná se o komplexní matici, kterou ale mnoho bakteriálních kmenů neumí samo hydrolyzovat, jelikož neprodukuje α -amylázu. Je proto nutné přidávat externí zdroj hydrolytického enzymu. **Chen a kol. (2006)** zkoumali produkci PHA pomocí bakterie *H. mediterranei*, kdy dostali výtěžek PHA 43 % hm. při zisku 1,14 g/l biomasy [81]. V další studii zkoumali **Haas a kol. (2014)** bakterii *Ralstonia eutropha* NCIM 5149, přičemž získali 179 g/l biomasy s obsahem 55 hm. % PHB [82].

Melasa jako odpadní produkt po výrobě cukru je také možný zdrojem uhlíku při fermentacích. Tato komplexní matrice je zdrojem sacharózy, fruktózy, glukózy a řady důležitých prvků jako železo, hořčík, vápník a draslík včetně některých vitaminů, což ji činí ideální pro růst bakterií. **Santiamo a kol. (2009)** získali 6 g/l PHA za použití melasy jako substrátu při kultivaci *Bacillus* sp. Strain COL1/A6 [83]. **Jiang a kol. (2008)** dosáhli až 70 hm. % PHA při kultivaci *P. fluorescens* A2a5 s výtěžkem biomasy 32 g/l [84].

Dalšími alternativami jsou například přesmažené rostlinné oleje, které tvoří velkou část odpadů z řetězců s rychlým oběrem, anebo odpadní vody z různých odvětví průmyslu, přičemž bakterie by mohly zároveň čistit odpadní vody a vytvářet PHA. Nevýhodou používání odpadních produktů je zejména přítomnost nečistot ve výsledném produktu a také jeho nejistý výtěžek, jelikož složení substrátu není standardizované a pokaždé se liší. Nečistoty ve výsledném produktu předurčují jeho využití k jiným než medicínským účelům. Pro využití v medicíně musí být produkty té nejvyšší čistoty bez přítomnosti toxických látek a dalších kontaminantů. Takto produkované PHA vyžadují další proces purifikace, který ale zase zvedá výslednou cenu produktu. To ale nemusí být až takový problém pro využití v medicíně, kde vysoká cena není velkou překážkou [53].

2.5.6 Využití PHA

Většinové aplikace PHA se soustředí na nahrazení petrochemických plastů. Potenciální uplatnění PHA má velmi široké rozpětí. Jejich fyzikální vlastnosti se liší v závislosti na složení konkrétního polymeru, či jeho následných modifikacích nebo smícháním s jinými materiály. Nahrazení klasických plastů polyhydroxyalkanoáty je možné úplně či částečně například v případě obalových materiálů. Aplikace se zaměřují na obaly v podobě krabiček či tenkých filmů. Biodegradabilita

těchto polymerů jim nahřává i pro využití v rozložitelných pomůckách osobní hygieny, jako jsou plenky či jejich obaly [54].

Kompozity bioplastů jsou již aktuálně využívány v elektronice, například v mobilních telefonech. Potenciální uplatnění v zemědělství nachází PHA zejména jako materiál pro enkapsulaci semínek a hnojiv nebo jako biodegradabilní filmy pro ochranu obilí [54].

PHA polymery mohou být využity jako biopaliva po podstoupení methylesterifikačních technik a mají také nespočet potenciálních využití v medicínských aplikacích. Výhodou je, že po jejich vložení do těla nemusí být opět vyjmuty právě díky biodegradabilitě. PHA jsou zcela biokompatibilní, jelikož produkt jejich degradace 3-hydroxybutyrát je běžně přítomen v buňkách. Ne každý PHA ale může být využit v medicíně. PHA, které přichází do kontaktu s krví, musí být zbaveny všech bakteriálních endotoxinů, což vyžaduje velmi důkladnou extrakci a purifikaci [53, 54]

Využití PHA je možné například ve tkáňovém inženýrství, kde slouží jako adhesivní matrice pro různé druhy buněk od endotheliálních, přes hepatocyty po fibroblasty. Tyto buňky vykazují dobrou přilnavost k matricím z PHB či PHBV [53]. Kompozity z PHB a hydroxyapatitu byly testovány jako matrice pro růst kostních buněk, kde byl prokázán jejich rychlý nárůst v okolí kompozitu a po roce používání tkáň nevykazovala žádné známky zánětu. Hydroxyapatit se přidává k PHB z důvodu zvýšení pevnosti pro použití právě u tvrdých tkání [53, 85]. PHB je možné využít i jako scaffold pro srdeční chlopně [86] či neurony [87]. Další důležitou aplikací PHA je využití ve farmaceutickém průmyslu jako nosiče léčiv. Mikro a nanočástice PHA jsou používány jako obalová vrstva, do které jsou zakomponována léčiva a k jejich uvolnění dochází po rozkladu obalu. U zvířat byly PHA testovány jako nosiče vakcín [53].

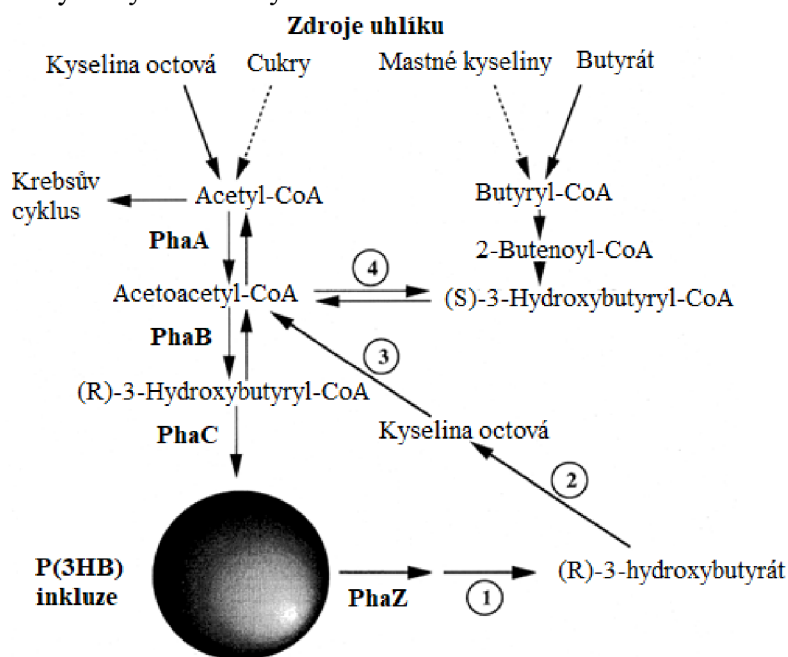
2.5.7 Zapojení PHA ve stresové odpovědi

Mikroorganismy primárně syntetizují polyhydroxyalkanoáty, jako zásobárnu uhlíku a energie za účelem jejich využití při nepříznivých podmínkách. Kromě této již dobře prozkoumané zásobní funkce PHA polymerů, slouží PHA také jako určitá ochrana proti působení různých stresových faktorů a zvyšují odolnost buňky. Jelikož schopnost syntézy PHA se vyskytuje u mikroorganismů žijících v rozmanitých podmínkách a řadí se mezi ně jak aeroby, tak anaeroby, autotrofní, heterotrofní i fototrofní organismy, můžeme usuzovat, že PHA mohou mít schopnost pomáhat mikroorganismům se vypořádat s nejrůznějšími typy stresu [88].

Schopnost bakterií syntetizovat, ale i degradovat polyhydroxyalkanoáty byla spojena se zvýšenou viabilitou buněk a navýšením produkce PHA po vystavení rozmanitým stresovým podmínkám. Byla prokázána větší odolnost u bakterie *Azospirillum brasilense* obsahující větší množství PHA při vystavení UV záření, vysoušení nebo osmotickému tlaku [89]. Zmíněné stresové faktory plus některé další jako ethanol, peroxid vodíku, teplo či chlad byly zkoumány v další studii, kde byla též potvrzena větší odolnost buněk obsahujících PHA [90]. Některé bakterie jsou dokonce schopné využít některé toxické látky jako methanol [91] nebo styren [92] a syntetizovat z nich PHA. Z provedených studií je jasné, že protektivní funkce PHA se vyskytuje u všech mikroorganismů schopných jejich syntézy neohledně na jejich druh či původ stresu. Přesný mechanismus zapojení PHA v obraně proti stresovým faktorům není zatím znám, nicméně se

pravděpodobně jedná o synergický efekt několika různých účinků, které budou rozebrány následovně.

Bylo zjištěno, že intracelulární hydrolýza PHA indukuje expresi regulátoru RpoS, který následně aktivuje expresi genů zodpovídajících za protektivní funkci vůči různým druhům stresu [93]. Dalším důležitým objevem bylo zjištění, že phasiny, proteiny obklopující granule PHA, u kterých bylo původně uvažováno, že fungují pouze jako amfifilní rozhraní mezi vodnou fází cytoplazmy a hydrofobními granulemi, se ve skutečnosti chovají jako chaperony, které mají schopnost chránit proteiny a další biomolekuly před denaturací [88]. Jako chaperony se chovají i monomerní jednotky PHB, tedy 3-hydroxybutyrát. Přestože v metabolismu PHA vždy převažuje buď anabolismus nebo katabolismus, k syntéze i rozkladu dochází současně. Tento proces je často označován jako PHA cyklus (Obrázek 12) [94]. V důsledku této skutečnosti je v buňce vždy přítomné nějaké množství monomerů. Monomery 3HB byly spojeny s ochranou buněk proti vysoké teplotě, těžkým kovům či oxidativnímu stresu [95], a také se chovají jako účinný kryoprotektant [96]. V následující kapitole jsou rozebrány některé mechanismy zapojení PHA do stresové odpovědi u vybraných stresových faktorů.



Obrázek 12: PHA cyklus [59]

2.5.7.1 Protektivní efekt PHA proti chladu

Protektivní funkce PHA může být vysvětlená proč v nepříznivých podmínkách antarktické půdy [97] či ledovců v Grónsku [98] byly nalezeny konsorcia bakterií obsahující i ty schopné syntézy PHA. Pro lepší porozumění zapojení PHA v ochraně proti chladu, zkoumali **Ayub a kol. (2007)** antarktické bakterie *Pseudomonas sp.* 14-3 během adaptace na nízké teploty. Objevíli, že metabolismus PHA je nepostradatelný pro udržení redoxního stavu uvnitř buňky [99]. **Obruča a kol. (2016)** zkoumali kryoprotektivní účinek PHA u bakterie *Cupriavidus necator* H16.

Kromě již známé funkce jednotlivých monomerů 3HB schopných fungovat jako kryoprotektant bylo objeveno, že PHB granule si zachovávají svou flexibilitu i při velmi nízkých teplotách, což může mít za následek ochranu před případným zraněním od extracelulárních ledových krystalků. Bakterie obsahující PHB také vykazovaly mnohem rychlejší transport vody, což může pomoci předcházet vytváření ledových krystalků uvnitř buňky [96].

2.5.7.2 Protektivní funkce proti osmotickému tlaku

Ochrana proti osmotickému tlaku je stejně jako v případě kryoprotektivity souborem několika různých mechanismů. Rychle se měnící osmolarita je realitou v mnoha různých prostředích. Bylo prokázáno, že akumulace PHA pomáhá v ochraně proti osmotickému stresu u nehalofilních bakterií. Fakt, že schopnost syntézy PHA se vyskytuje u mnoha halofilních bakterií také nahrává zapojení PHA v bakteriální rezistenci proti osmotickému stresu. Schopnost hydrolýzy PHA při stresovém působení vede k vytvoření produktů – 3HB, které se chovají jako chaperony a chrání biomolekuly před ztrátou aktivity [95]. Na druhou stranu další zkoumaná bakterie, *Cupriavidus necator* H16, nereaguje na osmotický stres mobilizací polymeru, ale předchází plazmolýze buňky doprovázené poškozením buněčné membrány a následným vylitím cytoplazmatického obsahu tím, že PHA částečně zacelí trhlinu v buněčné membráně, a buňku tak stabilizují [100].

2.5.7.3 Protektivní funkce PHA proti oxidačnímu stresu

Roli v boji proti oxidačnímu stresu hraje již zmíněný cyklus PHA a přítomnost volných monomerů v buňce. Monomery 3HB vykazovaly protektivní funkci jak proti působení oxidačního stresu v podobě peroxidu vodíku, tak i v podobě měďnatých iontů [95]. Je předpokládáno, že proteiny budou proti oxidaci chráněny pomocí antioxidantů nebo chelatačních činidel. Je ale velmi nepravděpodobné, že by se 3HB oxidoval pomocí Cu^{2+} nebo peroxidu vodíku a choval se tak jako antioxidant. Stejně tak i účinkování jako chelatační činidlo je velmi sporné [95]. Dalším mechanismem bojujícím nejen proti oxidačnímu stresu je již popsána exprese RpoS, která vede k expresi genů zodpovědných za ochranu buňky před nepříznivými faktory [90]. Přesný mechanismus účinku polyhydroxyalkanoátu proti oxidačnímu stresu není znám, ale je jisté, že nejen produkty degradace, která nastává při působení stresu, mohou buňku chránit. Při expozici oxidačnímu stresu v podobě H_2O_2 byla zjištěna zvýšená syntéza PHA, což značí, že větší množství PHA pomáhá buňce se lépe vypořádat se stresem [19].

Mechanismus účinku oxidačního stresu na buněčný metabolismus a následné navýšení syntézy PHA se dá vysvětlit následovně. Klíčovým faktorem v regulaci metabolismu PHA jsou koncentrace acetyl-CoA, volného CoA a NADPH. Volný CoA dokáže inhibovat 3-ketothiolázu, která zajišťuje první krok v syntéze PHA. NADPH je zase potřebné pro reakci katalyzovanou acetoacetyl-CoA reduktázou, kterou inhibuje oxidovaný koenzym NAD(P)^+ . Citrát syntáza a isocitrát syntáza jsou inhibovány koenzymem NAD(P)H . Znamená to tedy, že hlavním regulačním faktorem, který určuje, zda bude probíhat syntéza PHA nebo bude acetyl-CoA směřován do citrátového cyklu, je koncentrace NAD(P)H [19].

NADH a NADPH jsou důležité neenzymatické antioxidanty, mezi které patří i β -karoten nebo glutathion (GSH). GSH zajišťuje silné redukční prostředí uvnitř buňky a k jeho zpětné regeneraci je potřeba redukční síla v podobě kofaktoru NADPH. Při vystavení oxidačnímu stresu je tedy

pro buňku nezbytné zachovat si vysoký poměr NADPH/NADP⁺. NADPH je u většiny mikroorganismů generováno v pentózo-fosfátovém cyklu pomocí enzymu glukóza-6-fosfát dehydrogenázy (G6PD). Bylo zjištěno, že během působení oxidačního stresu dochází ke zvýšení aktivity G6PD, což může vést ke zvýšení poměru NADPH/NADP⁺. To vede přeměrování toku acetyl-CoA z Krebsova cyklu k syntetické dráze PHA a inhibici Krebsova cyklu. Synergický efekt všech těchto faktorů vede ke zvýšené produkci PHA. Tato zjištění naznačují, že aplikace stresu může být využita biotechnologicky jako efektivní způsob získání většího množství polymeru [19]. Tohoto faktu bude také využito v méj diplomové práci, kdy budou bakterie syntetizující PHA vystaveny oxidačnímu stresu v podobě peroxidu vodíku za účelem zvýšené akumulace PHA.

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

V této kapitole jsou rozebrány výsledky již publikovaných studií zaměřujících se na využití peroxidu vodíku pro stresování bakterií se schopností syntézy polyhydroxyalkanoátů.

Jung a Lee (2000) zkoumali účinky oxidativního stresu na produkci PHB a PHBV u bakterie *Ralstonia eutropha*. Jako oxidační činidla byly vybrány peroxid vodíku a methyl viologen. Kultivace probíhala 48 hodin a oxidanty byl přidány po 10 h od začátku kultivace. Nejvyšších výtěžků biomasy i PHB bylo u obou činidel dosaženo při jejich koncentraci 4 μM . U peroxidu vodíku bylo dosaženo 6,91 g/l biomasy oproti kontrolnímu vzorku, který dosahoval 6,42 g/l. Výtěžek PHB se zvýšil z 1,78 g/l u kontrolního vzorku na 2,64 g/l u koncentrace peroxidu 4 μM , což je nárůst zhruba o 50 %. Methyl viologen se jeví jako lepší oxidační stresor než peroxid vodíku, jelikož výtěžek PHB byl při koncentraci 4 μM 3,24 g/l oproti kontrole, kde byl 1,88 g/l. což činí nárůst 70 % [101].

Obruča a kol. (2010a) zkoumali působení několika typů vnějších stresů na bakterii *Cupriavidus necator* H16 syntetizující polyhydroxybutyrát. Mezi zkoumanými stresy byly kromě peroxidu vodíku i ethanol, NaCl, CoCl_2 a NiCl_2 . Při vystavení mírným stresovým podmínkám, tedy nižším koncentracím stresoru, vykazovala kultura větší výtěžek biomasy a vyšší akumulaci PHB. Při působení vyšších koncentrací stresorů docházelo k inhibici bakteriálního růstu a nižšímu výtěžku PHB. Bylo zkoumáno 8 různých koncentrací peroxidu vodíku, přičemž v čase 0 h bylo do kultivačního média přidáno vždy 0,5 mM H_2O_2 a následně po 60 h byly přidávány koncentrace od 0 mM do 11 mM. Největší nárůst biomasy i nejvyšší akumulace PHB, byla pozorována při koncentraci 5 mM H_2O_2 . Při těchto podmínkách byl výtěžek PHB 10,9 g/l zatímco kontrolní vzorek dosahoval pouze 8,5 g/l. Výtěžky PHB nebyly výrazně nižší při využití koncentrace 1 mM nebo 3 mM H_2O_2 . Při použití vyšší koncentrace, tedy 7 mM až 11 mM dochází k výraznému snížení růstu biomasy a i výtěžek PHB je podstatně nižší [102].

V další studii **Obruča a kol. (2010b)** zkoumali kromě výtěžku PHB a biomasy i molekulovou hmotnost polymerů. Tato studie byla zaměřena na testování účinku ethanolu a peroxidu vodíku na produkci PHB též u bakterie *Cupriavidus necator* H16. Pro H_2O_2 byly testovány koncentrace 5; 8 a 11 mM. Stresor byl do média přidán po 60 h kultivace, která celkem trvala 100 h. Výtěžky biomasy se v tomto případě u všech tří případu pohybují v rozmezí 13,29–13,44 g/l a výtěžky PHB od 10,23 g/l do 10,57 g/l. Kontrolní vzorek obsahoval 12,18 g/l biomasy a 8,63 g/l PHB. Zvýšení výtěžnosti PHB je tedy okolo 20 %. Co se ale velmi liší je molekulová hmotnost získaných polymerů. U kontrolního vzorku je tato hodnota 187 kDa, zatímco u koncentrace H_2O_2 5 mM je to 905,4 kDa. Tyto výsledky naznačují, že aplikací stresu se dá ovlivnit nejen výtěžek PHB ale i jeho molekulová hmotnost [19].

Přestože studií zaměřených na zkoumání navýšení produkce PHA aplikací stresových faktorů je mnoho, působení peroxidu vodíku nebylo příliš prozkoumáno. Uvedené články se zabývají akutním stresováním, což znamená, že peroxid vodíku byl do kultivačního média přidán pouze jednou a v relativně vysoké koncentraci. V této diplomové práci se budeme zabývat kontinuálním stresováním bakterií, které bude způsobeno elektrochemickým generováním peroxidu vodíku

přímo v kultivačním médiu. Tato práce tedy přináší novou metodu stresování bakterií pomocí H_2O_2 , kdy není potřeba manuálně přidávat roztok peroxidu do média, ale je možné požadované množství generovat přímo v médiu pouze za použití vhodných elektrod a aplikovaného potenciálu.

4 CÍLE PRÁCE

Tato diplomová práce se zabývá zkoumáním elektrochemických reakcí vedoucích k syntéze peroxidu vodíku, konkrétně redukcí kyslíku na katodě. Cílem práce bylo prozkoumat závislost produkovaného množství peroxidu vodíku na několika vybraných parametrech, jako je katodový potenciál, elektrodový materiál, geometrie měřící cely či rychlost míchání, a poznatky následně aplikovat při kontinuálním stresování bakterie *Cupriavidus necator* H16, za účelem zvýšené produkce polyhydroxyalkanoátů

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité mikroorganismy, chemikálie a přístroje

5.1.1 Použité mikroorganismy

Kmen *Cupriavidus necator* H16 – CCM 3726 získaný z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

5.1.2 Použité chemikálie

- 3,3',5,5'-Tetrametylbenzidin (SIGMA-ALDRICH)
- Agar (Carl Roth)
- Chlorid draselný (Penta)
- Chloroform (Lach-Ner)
- Dichlormethan (Penta)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner)
- Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Lach-Ner)
- Fruktosa (Lach-Ner)
- Heptahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (SIGMA-ALDRICH)
- Heptahydrát síranu hořečnatého (Lach-Ner)
- Hydroxid sodný (Penta)
- Izopropylalkohol (Penta)
- Kyselina citronová (BS vinařské potřeby s.r.o.)
- Nutrient Broth (HiMedia)
- Ocelová mřížka, ocel SS 316L, (složení: C ≤ 0,03 %; Si ≤ 1 %; Mn ≤ 2 %; P ≤ 0,045 %; S ≤ 0,03 %; N ≤ 0,1 %; Ni 10,0—13,0 %; Cr 16,5—18,5 %; Mo 2,0—2,5 %)
- PDMS – Sylgard (DOW)
- Peroxidáza (SIGMA-ALDRICH)
- Roti®fair PBS 7,4 (Carl Roth)
- Síran amonný (Lachema)
- Titanový drát, Sigma Aldrich, průměr = 0,8 mm, 99,7 % čistota

5.1.3 Použité přístroje

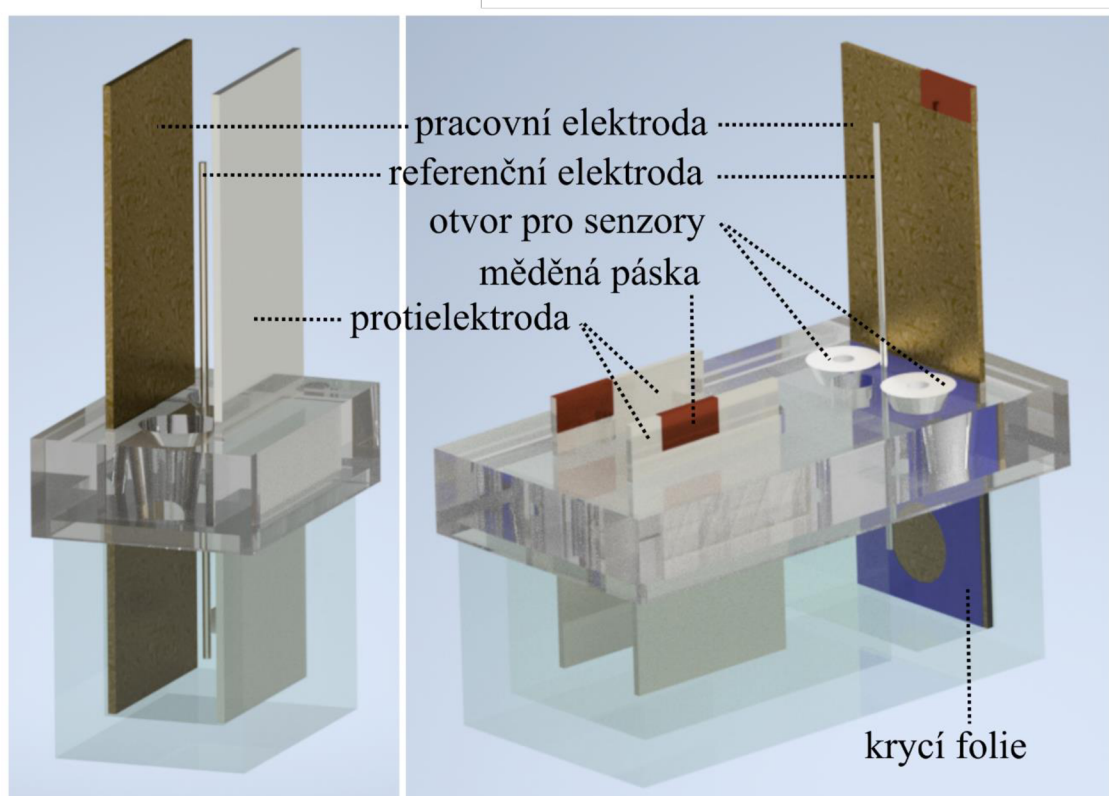
- 3D tiskárna, Raise3D E2
- 3D tiskárna, Anycubic Photon S
- Analytické váhy, OHAUS, Pioneer
- Centrifuga, Hettich EBA 20
- Centrifuga, Hettich EBA 200
- ELISA reader, Biotek, SYNERGY H1
- Laboratorní zdroj, Keysight E36313A
- Laminární box Aura mini, BioAir – Euroclone
- Laserová řezačka, Trotec Rayjet 50
- Magnetická míchačka bez ohřevu, Kartell, TKO
- Magnetická míchačka bez ohřevu, VELP SCIENTIFICA

- Nanofotometr, Implen, P300
- Plynový chromatograf s FID, Thermo Scientific, Trace 1300; kolona: DB-WAX 30 m by 0,25 mm
- Potenciostat, Ivium Octostat
- Potenciostat, Ivium Vertex. 20A
- Temperovaná třepačka, Heidolph, Incubator 1000
- Termoblok, Stuart, SBH130D
- Třepačka, Witeg, SHO-2D
- Unisense μ Sensor Instruments, Opto-F1 UniAmp
- Váhy, Kern EW 620-3NM
- Vortex, Benchmark, Benchmixer V2
- Běžné laboratorní sklo a vybavení

5.2 Výroba měřících cel

Před samotným zahájením experimentů stresování bakterií pomocí *in situ* generovaného peroxidu vodíku, bylo zapotřebí otestovat různé parametry, a zjistit tak jejich nejúčinnější kombinaci pro efektivní produkci peroxidu v dostatečném množství. Mezi parametry, které byly zkoumány se řadí různé typy materiálů, různé hodnoty aplikovaného potenciálu, odlišná geometrie měřících cel, rychlost míchání nebo typ použitého elektrolytu.

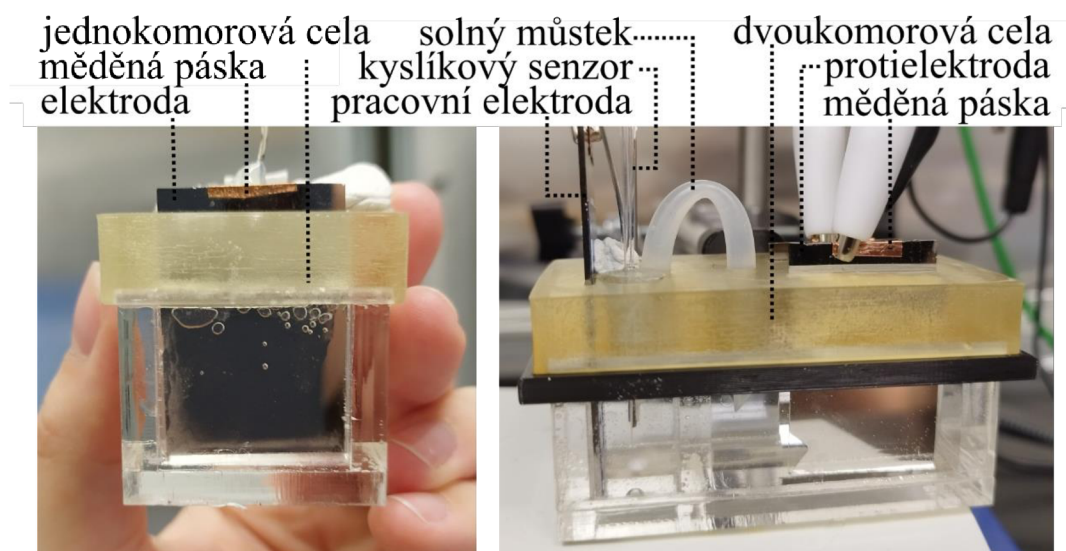
Prvním krokem byla výroba měřících cel pro prvotní experimenty. Cely byly vyrobeny dvě, a to jednokomorová a dvoukomorová. V jednokomorové cele jsou umístěny všechny elektrody, tedy pracovní, referenční i protielektroda společně. Ve dvoukomorové cele se v první komoře nachází společně pracovní elektroda a referenční elektroda a ve druhé komoře protielektroda. Obě komory jsou propojeny solným můstkem vyrobeným z roztoku agaru v PBS nadávkovaným do tenké silikonové trubičky. Ve dvoukomorové cele jsou ve větší komoře umístěny dvě protielektrody, které jsou během experimentů propojeny vodičem. Zajistí se tím celkově větší povrch protielektrody.



Obrázek 13: Návrh jednokomorové a dvoukomorové cely v programu Autodesk inventor

Nejprve byl vytvořen návrh obou cel pomocí softwaru Autodesk Inventor Professional 2023 a následně byly jednotlivé části cel vyrobeny a slepeny k sobě. Spodní a boční části byly vyřezány z materiálu PMMA pomocí laseru (Trotec Rayjet 50) a víko s příslušnými otvory bylo vytištěno z fotosenzitivní pryskyřice pomocí 3D tiskárny (Anycubic Photon S). Stěny byly nejprve spojeny

pomocí dichlormethanu a následně bylo přilepeno víko ke zbytku cely pomocí PDMS. Cella byla poté vložena do sušárny vyhřáté na 50 °C na 1 hodinu kvůli vytvrzení lepidla. Po vytažení ze sušárny byly cely připraveny k použití. Objem takto vytvořené jednokomorové cely a objem komory s pracovní elektrodou u dvoukomorové cely byl 9 ml.



Obrázek 14: Ukázka jednokomorové a dvoukomorové měřící cely

5.2.1 Výroba solného můstku

V případě dvoukomorové cely bylo potřeba vytvořit solný můstek, který vodivě propojí obě komory. Nejprve byl připraven 2% roztok agarů v PBS, který byl následně zahřát na 60 až 70 °C. Po zgelování byl roztok pomocí stříkačky natažen do tenké silikonové trubičky, která byla následně vložena do studené vody, aby došlo k ochlazení roztoku agarů a jeho ztuhnutí.

5.2.2 Výroba pseudoreferenční elektrody

Během experimentů bylo kromě pracovní elektrody a protielektrody potřeba zapojit i referenční elektrodu. Ta byla vyrobena následovně. Do nasyceného roztoku KCl byl vložen stříbrný drát a zapojen jako pracovní elektroda. Jako protielektroda byla použita platinová spirála, která byla zároveň zkratována s referenční elektrodou. Na pracovní elektrodu byl přiveden potenciál +1,5 V na 5 minut. Během této doby se na ponořené části stříbrného drátu vytvořila vrstva AgCl. Vznikla tak tzv. pseudoreferenční Ag/AgCl elektroda s potenciálem +100 mV vs. Ag/AgCl standardní referenční elektrodě.

5.3 Metody zkoumání požadovaných veličin

Během každého experimentu bylo zjišťováno několik veličin, a to konkrétně koncentrace vyprodukovaného peroxidu, koncentrace kyslíku a produkovaný proud.

5.3.1 Spektrofotometrické měření koncentrace peroxidu vodíku

Měření koncentrace peroxidu vodíku probíhalo vždy až po skončení experimentu, nebo v případě pozdějších měření v Erlenmeyerově baňce, bylo v průběhu experimentu odebráno malé množství vzorku v nespecifických intervalech. Peroxid byl stanovován spektrofotometricky pomocí Elisa readeru Biotek Synergy H1.

Pro stanovení bylo využito faktu, že peroxid vodíku se chová jako oxidační činidlo, a dokáže tak oxidovat bezbarvé substráty za vzniku barevného produktu, které mohou být kvantitativně stanoveny měřením absorbance. V této práci byla využívána reakce mezi tetramethylbenzidinem (TMB) a H_2O_2 za přítomnosti HRP enzymu jako katalyzátoru, přičemž reakce probíhala v roztoku pufru. TMB se v přítomnosti peroxidu vodíku oxiduje a vytváří modrý produkt. Koncentrace peroxidu byla stanovována pomocí měření absorbance modrého produktu při 653 nm. Pro tuto analýzu bylo potřeba připravit tři základní komponenty, a to: roztok TMB v DMSO, roztok HRP v deionizované vodě a roztok pufru.

- **McIlvaine pufr**

Pufr byl připraven z 0,2M roztoku Na_2HPO_4 a 0,1M roztoku kyseliny citronové a to tak, že od každého bylo připraveno 500 ml a následně bylo smícháno 435 ml Na_2HPO_4 a 315 ml kyseliny citronové. Dále bylo změřeno pH a pomocí přidávání buď zásady nebo kyseliny bylo docíleno pH okolo 5,7. Pufr bylo možné skladovat při pokojové teplotě i za přístupu světla.

- **TMB v DMSO**

Roztok TMB v DMSO byl připraven v koncentraci 10 mg/ml. Připravený roztok byl následně rozpipetován do eppendorfových zkumavek po menším objemu a uložen v mrazáku. Následně při každém použití byla použita pouze jedna zkumavka, která byla po rozmrazení a odebrání požadovaného množství vrácena zpět do mrazáku.

- **Roztok HRP**

Roztok peroxidázy v DI vodě byl připraven v koncentraci 2 mg/ml při použití peroxidázy s aktivitou 89,63 U/mg. Roztok byl stejně jako TMB rozdělen do eppendorfových zkumavek a uložen v mrazáku. Pro použití byla vždy rozmrazena pouze jedna zkumavka a po odebrání příslušného množství byl zbytek vrácen do mrazáku.

- **Příprava reakční směsi pro analýzu.**

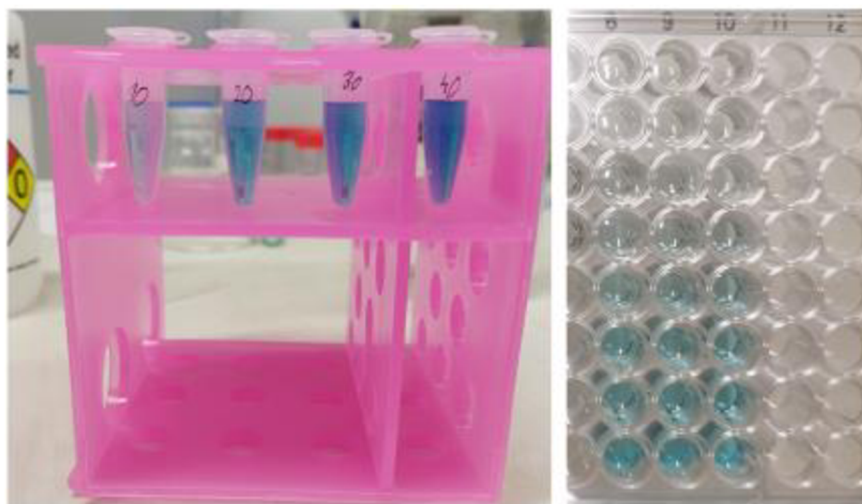
Pro přípravu 1 ml směsi bylo potřeba smíchat 993 μ l pufru, 2 μ l roztoku HRP a 5 μ l roztoku TMB. Směs byla vždy připravena v požadovaném množství před prvním měřením a následně byla používána daný den. Mezi měřeními byl roztok uchováván v lednici, aby byla zajištěna delší stabilita.

- **Kalibrační křivka**

Kalibrační křivka byla změřena vždy při přípravě nového pufru. Řada kalibračních roztoků byla připravena pomocí 1mM roztoku peroxidu vodíku a předem připravené reakční směsi. Roztoky kalibrační řady byly připraveny v koncentracích: 0; 2,5; 5; 10; 15; 20; 25; 30 μM , vždy ve dvou paralelních provedení.

- **Měření koncentrace vzorků**

Koncentrace peroxidu byla vždy měřena po skončení experimentu či v Erlenmeyerových baňkách průběžně. Z reaktoru bylo vždy odebráno příslušné množství vzorku a smícháno s reakční směsí ve vhodném poměru, tak aby se následná hodnota absorbance vyskytovala v rozmezí kalibrační křivky. Vzorky byly vždy smíchány alespoň ve dvou různých poměrech, aby bylo možné výsledky porovnat.



Obrázek 15: Ukázka z měření kalibrační křivky pro spektrofotometrické stanovení peroxidu vodíku

5.3.2 Měření koncentrace kyslíku pomocí optického senzoru

Koncentrace kyslíku byla měřena během experimentů v jednokomorové a dvoukomorové cele vždy po čas celého experimentu. Ve dvoukomorové cele byl senzor umístěn v katodové komoře. Měření probíhalo za účelem pozorování jeho měnící se koncentrace vzhledem k tomu, že právě jeho redukcí dochází ke vzniku požadovaného peroxidu vodíku. K měření byl využíván optický senzor značky UNISENSE. Principem měření koncentrace pomocí optického senzoru je zhášení luminiscence indikátoru způsobené srážkou s molekulami kyslíku. Větší koncentrace kyslíku má tedy za následek nižší emisní signál. Senzor byl vždy ponořen zhruba do poloviny roztoku v měřící cele a snímal koncentraci kyslíku v průběhu celého experimentu každých 5 sekund.

Senzor byl kalibrován každý den před použitím a získané nastavení bylo používáno pro všechny experimenty daný den. Kalibrace probíhala tak, že nejprve byl senzor ponořen do roztoku PBS s atmosférickou koncentrací kyslíku, tedy 21 %, a následně byla zaznamenána hodnota emise. Poté byl senzor ponořen do roztoku PBS s nulovou koncentrací kyslíku. Toho bylo dosaženo probubláním dusíkem po dobu alespoň 20 minut. Byla zaznamenána hodnota emise a následně byla

programem automaticky vygenerována kalibrační křivka a bylo možné zaznamenávat přímo koncentraci kyslíku v obj. %. Získané grafy tedy zobrazují koncentraci kyslíku na škále od 0 % do 21 %, přičemž 0 % značí úplné odkysličení roztoku a 21 % běžnou koncentraci kyslíku v atmosféře.

5.3.3 Měření elektrického proudu

K realizaci všech experimentů bylo zapotřebí využít potenciostat, který na elektrody aplikuje požadovaný potenciál. K ovládání přístroje byl využit program IviumSoft, kde byly vždy nastaveny všechny potřebné parametry. K experimentům bylo využito módu chronoamperometrie, což je elektrochemická metoda, při které je na pracovní elektrodu přikládán potenciál a výsledný elektrický proud způsobený faradaickými procesy je zaznamenáván v závislosti na čase.

Základní měření, kdy bylo zkoumáno množství generovaného peroxidu v závislosti na různých parametrech, trvalo vždy dvě hodiny. Takto byly koncipovány experimenty využívající různé potenciály, materiály či rychlost míchání, nebo odlišné měřící cely.

5.3.4 Měření elektrochemické impedanční spektroskopie

Elektrochemická impedanční spektroskopie byla využita především při experimentech ve dvoukomorové cele. Jedná se o metodu, díky které lze zjistit celkový elektrický odpor. Při experimentech ve dvoukomorových celách byl využíván ručně vyrobený solný můstek, a tak bylo před každým měřením zapotřebí otestovat, zda solný můstek nemá příliš vysoký odpor a obvodem může protékat elektrický proud. Na pracovní elektrodu byla přikládáno střídavé napětí v rozmezí 1 MHz až 1 Hz s danou amplitudou 10 mV a krokem 10 frekvencí na dekádu. Toto měření sloužilo pouze jako informativní a na základě jeho výsledků bylo buďto pokračováno v experimentu nebo byl upraven solný můstek tak, aby odpor byl co nejmenší.

Impedance byla následně měřena i při kultivačních experimentech, a to za účelem pozorování růstu biofilmu bakterií na elektrodách a s tím spojené případné změny odporu elektrod. Nastavení bylo stejné jako při měření odporu dvoukomorových cel se solným můstkem, a tedy přikládané napětí bylo v rozmezí 1 MHz – 1 Hz s amplitudou 10 mV a krokem 10 frekvencí na dekádu.

5.4 Testování vlivu různých parametrů na koncentraci generovaného peroxidu vodíku

5.4.1 Vliv velikosti potenciálu aplikovaného na pracovní elektrodu

V prvních prováděných experimentech bylo zkoumáno množství generovaného peroxidu v závislosti na elektrickém potenciálu přikládaném na pracovní elektrodu. Vybrané potenciály byly testovány na odlišných elektrodových materiálech a odlišných typech měřících cel. Všechny experimenty probíhaly v roztoku fosfátového pufru (PBS), do něhož bylo umístěno magnetické míchadlo. Otáčky na magnetické míchačce byly nastaveny na 300 rpm. Během experimentu byla konstantně měřena koncentrace kyslíku a zaznamenáván elektrický proud. Koncentrace peroxidu byla změřena po skončení experimentu.

Pro tyto experimenty byly vybrány potenciály: $-0,8\text{ V}$; $-0,6\text{ V}$; $-0,4\text{ V}$; $-0,2\text{ V}$ a 0 V . Tyto potenciály byly testovány jak pro jednodukomorovou, tak dvoukomorovou měřící celu. Vybranými materiály pro elektrody byly platina a zlato, které byly připraveny pomocí tenkovrstvých

technologií. Elektrody obsahovaly 90 nm vrstvu vybraného kovu s 10 nm adhezní vrstvou titanu. Jako materiál protielektrody byla vždy využita platina, a jako materiál pracovní elektrody bylo otestováno jak zlato, tak platina. Pracovní elektroda byla vždy přelepena folií s vyříznutým kruhovým otvorem o průměru 1 cm. Protielektroda folií překryta nebyla a byla vsunuta až na dno měřicí cely. Bylo tak zajištěno, že protielektroda má větší povrch než pracovní. Na vrchu těchto elektrod bylo přilepeno menší množství měděné pásky, aby se zajistila lepší vodivost a lepší kontakt připojených vodičů.

Dle výsledků těchto experimentů byly následně otestovány další hodnoty potenciálů, které se vyskytují v okolí potenciálu, při kterém je produkováno nejvíce peroxidu vodíku z předchozích experimentů. Měření opět probíhala v roztoku PBS při 300 rpm v obou měřicích celách a se stejnými materiály pro pracovní a protielektrody jako v předchozích případech.

Naměřené elektrické proudy byly poté přepočítány na proudové hustoty, a to díky známému rozměru pracovní elektrody, který byl $0,785 \text{ cm}^2$.

5.4.2 Vliv různé rychlosti míchání

Pro zjištění vlivu rychlosti míchání elektrolytu na množství vznikajícího peroxidu bylo využito platinové pracovní elektrody a platinové protielektrody. Vliv míchání byl testován jak v jednokomorové cele, tak ve dvoukomorové cele. Experimenty opět probíhaly v roztoku PBS a v průběhu byla konstantně měřena koncentrace kyslíku a zaznamenáván elektrický proud. Který byl následně opět přepočítán na proudové hustoty. Koncentrace peroxidu byla změřena na konci experimentu.

Zkoumané rychlosti míchání elektrolytu byly vybrány dle možností nastavení magnetické míchačky. Nejmenší rychlost byla zvolena ta již dříve použitá u předchozích experimentů, tedy 300 rpm. Maximální možná rychlost magnetické míchačky byla 1500rpm. Pro tyto experimenty byly vybrány následující rychlosti míchání: 300 rpm, 600 rpm, 900 rpm, 1200 rpm a 1500 rpm.

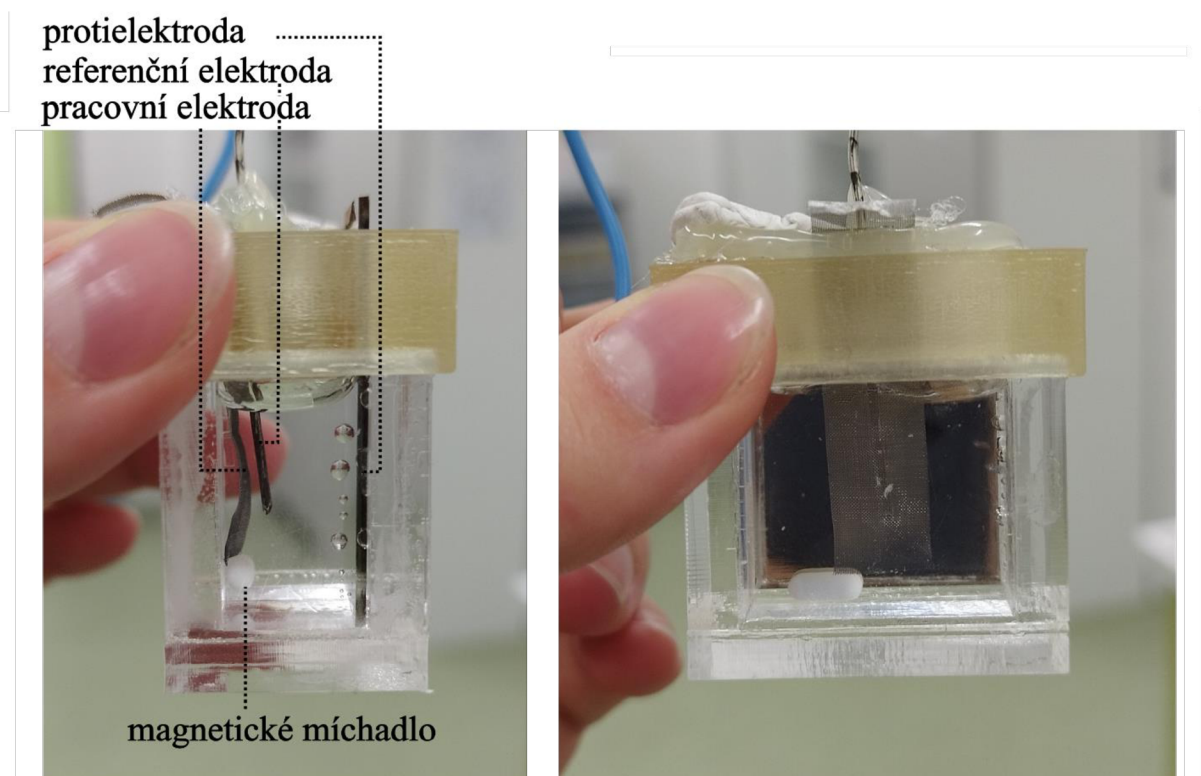
5.5 Testování rychlosti difuze kyslíku do měřicí cely

Jelikož během všech experimentů byla měřena i měnící se koncentrace kyslíku, byl proveden experiment za účelem zjištění rychlosti difuze kyslíku do měřicí cely. Pro tento experiment byla vybrána jednokomorová cela, do níž byly umístěny platinové elektrody a senzor pro měření kyslíku. Použitým elektrolytem bylo PBS, které bylo předem probubláváno dusíkem po dobu 30 minut k zajištění nulové koncentrace kyslíku. V tomto experimentu nebyl přikládán žádný potenciál na pracovní elektrodu, ale byla pouze měřena koncentrace kyslíku. Předmětem experimentu bylo zjistit, za jak dlouho se koncentrace kyslíku dostane z původních 0 % na atmosférických 21 %.

5.6 Vliv oceli jako materiálu pro pracovní elektrodu na produkované množství peroxidu vodíku

Po otestování všech vybraných parametrů byla vybrána jejich vhodná kombinace pro následující experiment, kdy byl testován materiál potenciálně vhodný pro využití v kultivačních experimentech. Zvoleným materiálem byla ocel, vzhledem k její snadné dostupnosti na trhu a mechanickým vlastnostem, a tudíž i snadnému zakomponování do systému elektrod pro následné umístění do Erlenmeyerovy baňky. Jako materiál protielektrody byla vybrána platina na základě předem prováděných experimentů, aby bylo možné výsledky porovnat.

Ocel byla použita ve formě ocelové mřížky, která byla uchycena do otvoru ve víku měřicí cely pomocí tavné pistole. Před použitím byla ocelová mřížka očištěna od možných přítomných nečistot díky vývoji vodíku na jejím povrchu. Toho bylo dosaženo tak, že mřížka byla připojena k zápornému pólu zdroje napětí. Ke kladnému pólu zdroje napětí byla připojen ocelový plíšek. Elektrody byly umístěny do 1M roztoku NaOH a na elektrody byl aplikován potenciál 1,5 V po dobu 1 minuty. Experimenty probíhaly v roztoku PBS při rychlosti míchání 900 rpm. Tyto experimenty probíhaly v obou měřících celách a byly testovány různé potenciály stejně jako v prvotních experimentech, tedy $-0,8$ V až 0 V s krokem 0,2 V. Během experimentů byla opět kontinuálně měřena koncentrace kyslíku a na konci experimentu koncentrace peroxidu vodíku.



Obrázek 16: Jednokomorová měřicí cely s ocelovou mřížkou jako pracovní elektrodou

5.7 Testování dlouhodobé stability

Vzhledem k faktu, že kultivace bakterií běžně probíhá v řádu několika dnů a všechny předchozí experimenty probíhaly pouze po dobu 2 hodin, bylo třeba otestovat dlouhodobou stabilitu těchto experimentů. K tomu byla použita jednokomorová cela, ve které byla umístěna ocelová mřížka jako pracovní elektroda a titanový drát jako protielektroda. Titan byl vybrán vzhledem k jeho elektrochemické inertnosti a nižší ceně oproti platině. Experiment probíhal 138 hodin v roztoku PBS při aplikovaném potenciálu $-0,4$ V a rychlosti míchání 900 rpm. Během experimentu byla kontinuálně měřena koncentrace kyslíku a v nespecifických intervalech byly odebírány vzorky roztoku pro zjištění koncentrace peroxidu vodíku.

5.8 Měření cyklické voltametrie při použití PBS a kultivačního média

Dále byla změřena cyklická voltametrie, a to jak pro roztok PBS, tak i pro roztok kultivačního média, které bylo používáno v následujících experimentech. Experiment byl proveden za účelem prozkoumání elektrochemických vlastností elektrolytu a porovnání těchto dvou roztoků. Experiment byl proveden dvakrát, s různými elektrodami. V prvním experimentu byly jako elektrodové materiály použity platina jako pracovní elektroda i protielektroda a ve druhém pak ocel jako pracovní elektroda a titan jako protielektroda. Experimenty probíhaly za využití stejného potenciostatu a příslušného programu jako v případě měření chronoamperometrie v tříelektrodovém zapojení s využitím pseudoreferenční Ag/AgCl elektrody. Potenciál pro experiment byl zvolen v rozpětí od -1 V do $+1,2$ V s krokem 10 mV a skenovací rychlostí 100 mV/s, přičemž bylo nastaveno opakování 5 cyklů.

5.9 Testování vlivu použitého elektrolytu na koncentraci generovaného peroxidu

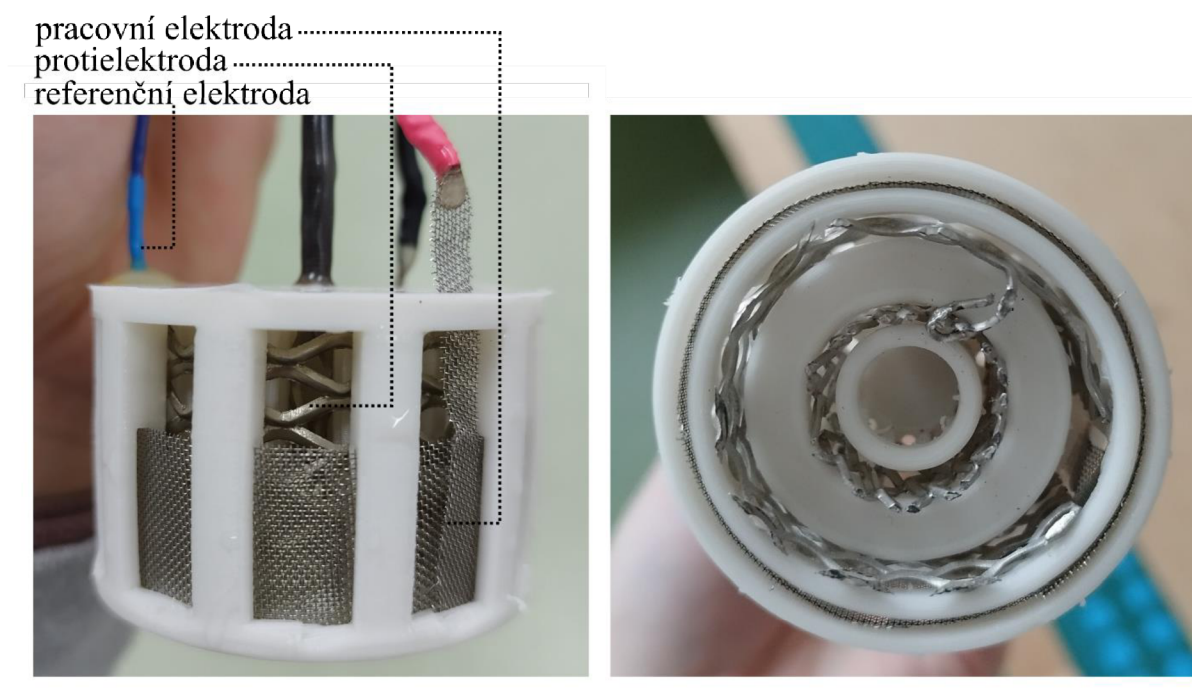
Po otestování všech vybraných parametrů v roztoku PBS byla zkoumána generace peroxidu vodíku v médiu, které bylo následně využíváno při kultivacích bakterie *Cupriavidus necator* H16. Složení média je popsáno v kapitole 5.11.2. Tyto experimenty probíhaly pouze v jednokomorové cele, jelikož následné kultivační experimenty byly prováděny v Erlenmeyerových baňkách, což ve své podstatě představuje jednokomorovou celu, kde jsou umístěny všechny elektrody společně.

Jelikož médium má jiné složení než původně používaný roztok PBS, bylo třeba opět najít ideální potenciál tak, aby produkce peroxidu vodíku byla co největší. Pro tyto experimenty bylo využito ocelové mřížky jako materiálu pro pracovní elektrodu a jako materiál pro protielektrodu byl otestován titan a ocel. Použitá rychlost míchání byla 900 rpm. V těchto experimentech byly testovány následující hodnoty příkladného potenciálu: $-0,4$ V; $-0,5$ V; $-0,6$ V; $-0,65$ V; $-0,7$ V a $-0,8$ V. Během experimentů byla opět měřena koncentrace kyslíku pomocí optického senzoru. Potenciál, při kterém bylo produkováno nejvíce peroxidu, byl následně využit pro experimenty v Erlenmeyerových baňkách obsahujících kultivační médium.

5.10 Experimenty v Erlenmeyerově baňce

5.10.1 Výroba elektrodových systémů pro Erlenmeyerovy baňky

Pro následující experimenty, kdy byla testována produkce peroxidu v Erlenmeyerových baňkách, které byly následně použity i pro kultivace bakterií, bylo nejprve potřeba vytvořit vhodný systém elektrod. Ten sestával z plastového držáku, do kterého byly usazeny všechny tři elektrody. Model držáku byl nejprve navržen v programu Autodesk Inventor Professional 2023 a následně vytisknut na 3D tiskárně. Do něj byla následně navinuta protielektroda, která byla soustředěna ve vnitřní části, a kolem ní ve vnější části byla navinuta pracovní elektroda. Referenční elektroda byla umístěna poblíž pracovní elektrody.



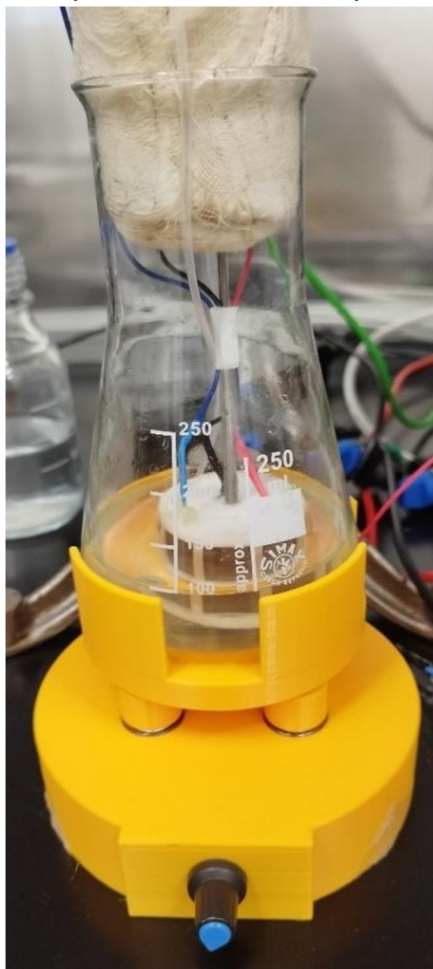
Obrázek 17: Elektrodové systémy využití v Erlenmeyerových baňkách

Plastový držák měl ve středu umístěnou tyč z oceli typu 308 potaženou plastovou trubičkou tak, aby nedocházelo do styku s elektrolytem. Tyč byla přilepena k plastovému držáku elektrod pomocí epoxidu. Jelikož při kultivacích bakterií musí být zajištěna sterilita prostředí, baňka musí být opatřena špuntem. Kovová tyč byla tedy vsazena do tohoto špuntu a k elektrodám byly připájeny dráty které vedly ven z baňky okolo špuntu. Na konci drátu byly přidělané konektory, aby elektrody mohly být následně připojeny k potenciostatu. Takto vytvořený systém elektrod byl nakonec vsazen do baňky a díky kovové tyči uprostřed bylo zajištěno jeho snadné vyndávání a vkládání. Elektrody byly před experimenty očištěny dle stejného postup, jako je uvedeno v kapitole 5.6.

Během experimentů bylo zapotřebí sledovat hladinu vznikajícího peroxidu. Proto byly dovnitř média umístěna velmi tenká plastová hadička vedoucí ven z baňky kolem špuntu. Na jejím konci

byla umístěna jehla a pomocí stříkačky byly následně odebírány vzorky pro měření koncentrace peroxidu. Během experimentů v Erlenmeyerově baňce již nebyla sledována koncentrace kyslíku v elektrolytu, jelikož nebylo možné senzor do baňky jakkoliv umístit.

Baňka byla vložena do „podomácku“ vyrobené třepačky, která zajistila míchání roztoku v průběhu experimentu. Maximální rychlost otáčení takto vyrobené třepačky byla 110 rpm.



Obrázek 18: Erlenmeyerova baňka na „podomácku“ vyrobené třepačce

5.10.2 Experimenty v Erlenmeyerově baňce za použití PBS jako elektrolytu

K experimentům byly použity Erlenmeyerovy baňky o objemu 250 ml, které byly naplněny 100 ml roztoku PBS. Tento objem byl vybrán tak, aby se shodoval s objemem média, které bude použito při kultivacích. Poměr objemu média a vzduchu nad ním je důležitý z hlediska aerace média a také zajištění dostatečného přísunu kyslíku k redukci na katodě. Experimenty trvaly vždy několik dní, během nichž byly v nespécifických intervalech odebírány pomocí injekční stříkačky vzorky ke stanovení koncentrace peroxidu. Zkoumaným materiálem pracovní elektrody byla vždy ocel. Jako protielektroda byla testována ocel ve formě ocelové mřížky a titanový drát. Pro tyto testy byl na pracovní elektrodu aplikován potenciál $-0,4$ V.

5.10.3 Experimenty v Erlenmeyerově baňce za použití kultivačního média jako elektrolytu

Posledním krokem před samotnými kultivacemi bylo otestování množství produkovaného peroxidu v Erlenmeyerově baňce v přítomnosti kultivačního média. Systém elektrod byl vyroben stejně jak v předchozích případech. Byly provedeny dva experimenty. V prvním byla použita ocelová mřížka jako pracovní elektroda a titanový drát jako protielektroda. Ve druhém byla pracovní elektroda i protielektroda ve formě ocelové mřížky. V případě prvního experimentu byl na pracovní elektrodu přiváděn potenciál $-0,65$ V po dobu 123 hodin. V případě druhého experimentu potenciál $-0,7$ V po dobu 68 hodin. Během experimentů byly v nespécifických intervalech odebírány vzorky pro zjištění aktuální koncentrace peroxidu vodíku. Baňka byla po celou dobu umístěna na třepačce s rychlostí otáčení 110 rpm.

5.11 Kultivace bakterií

5.11.1 Oživení bakteriálních kultur a jejich uchovávání

Bakteriální kmen *Cupriavidus necator* H16 byl dodán v lyofilizované formě a před začátkem experimentu byl oživen pomocí návodu dodavatele, konkrétně byl bakteriální kmen oživen v komplexním médiu Nutrien Broth při 30 °C po dobu 2 dnů. Během oživení bakteriální kultury byly připraveny 1,7 % agarové plotny s Nutrien Broth (NB). Nejprve byl namíchán roztok NB média s agarem, který byl sterilizován v tlakovém hrnci po dobu 50 minut. Následně bylo médium rozlito na Petriho misky ve sterilním laminárním boxu, na které byla po jejich ztuhnutí zaočkována bakteriální kultura *Cupriavidus necator* H16. Tyto zaočkované agarové plotny byly poté inkubovány v termostatu při 30 °C po dobu 24 hodin.

Složení pevného NB media:

- Nutrient Broth: 25 g
- Agarový prášek: 17 g
- Destilovaná voda: 1 000 ml

Následně byly narostlé bakteriální kultury přeočkovány z Petriho misek do kapalného NB média s koncentrací 25 g/l, tzv. inokula.

Složení kapalného NB media:

- Pepton: 10 g
- Beef extract: 10 g
- NaCl: 5 g
- Destilovaná voda 1 000 ml

Navážka média byla rozpuštěna v 50 ml destilované vody v Erlenmeyerové baňce o objemu 100 ml a následně byla média sterilována v tlakovém hrnci s uzavřeným ventilem po dobu 50 minut. Po ochlazení bylo do medií ve sterilním prostředí laminárního boxu zaočkováno malé množství kolonií z Petriho misky, třikrát vždy sterilní bakteriologickou kličkou. Zaočkovaná inokula byla kultivována na temperované třepačce po dobu 24 hodin při teplotě 30 °C a 180 rpm.

Uchovávání oživených kultur probíhalo v kryozkumavkách s glycerolem. Do kryozkumavek bylo napipetováno 0,5 ml 30% glycerolu a následně po vysterilování kryozkumavek v tlakovém hrnci byl přidán 1 ml oživené kultury v NB médiu (24 hodin). Zkumavky byly poté zamrazeny a uschovány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.11.2 Příprava minerálního média pro kultivaci za účelem produkce biomasy produkující PHA

Kultivace za účelem produkce biomasy s vysokým obsahem polyhydroxyalkanoátů probíhala ve 300 ml Erlenmeyerových baňkách s obsahem 100 ml minerálního produkčního média s přídavkem fruktózy jako zdroje uhlíku.

Složení minerálního média:

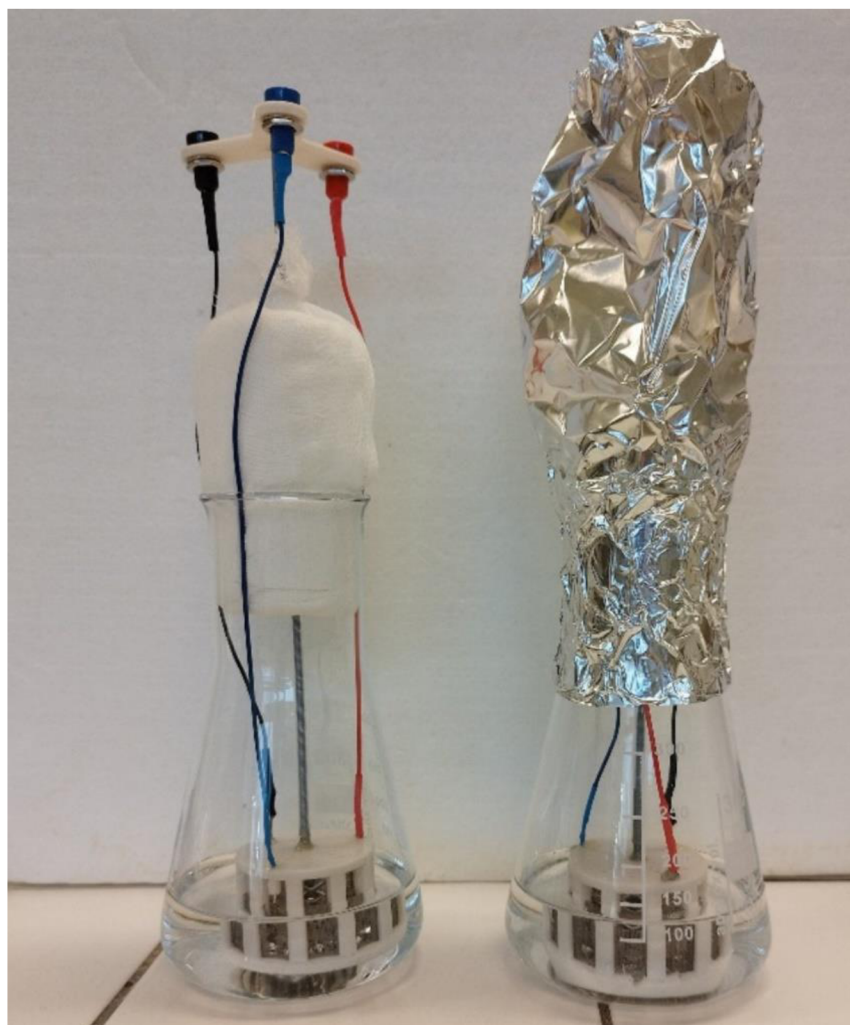
- KH_2PO_4 1,02 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 11,1 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g
- Fruktóza 20 g
- Roztok MES 0,1 ml
- Destilovaná voda 1 000 ml

Zásobní roztok stopových prvků (MES) a zásobní roztok fruktózy o koncentraci 400 g/l byly připraveny a vysterilizovány samostatně.

Složení roztoku MES:

- FeCl_3 9,7 g
- CaCl_2 7,8 g
- CuSO_4 0,156 g
- CoCl_2 0,119 g
- NiCl_2 0,118 g
- CrCl_2 0,062 g
- 0,1 M HCl 1 000 ml

Roztok stopových prvků byl sterilován v tlakovém hrnci s uzavřeným ventilem a roztok fruktózy byl sterilován separátně v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem. Minerální médium bylo nalito do 300ml Erlenmeyerových baněk v objemu 100 ml. Poté bylo do baněk napipetováno i 100 μl roztoku MES. Baňky byly poté uzavřeny špunty se zabudovanými systémy elektrod a následně byly takto připravená média vložena do autoklávu ke sterilaci.

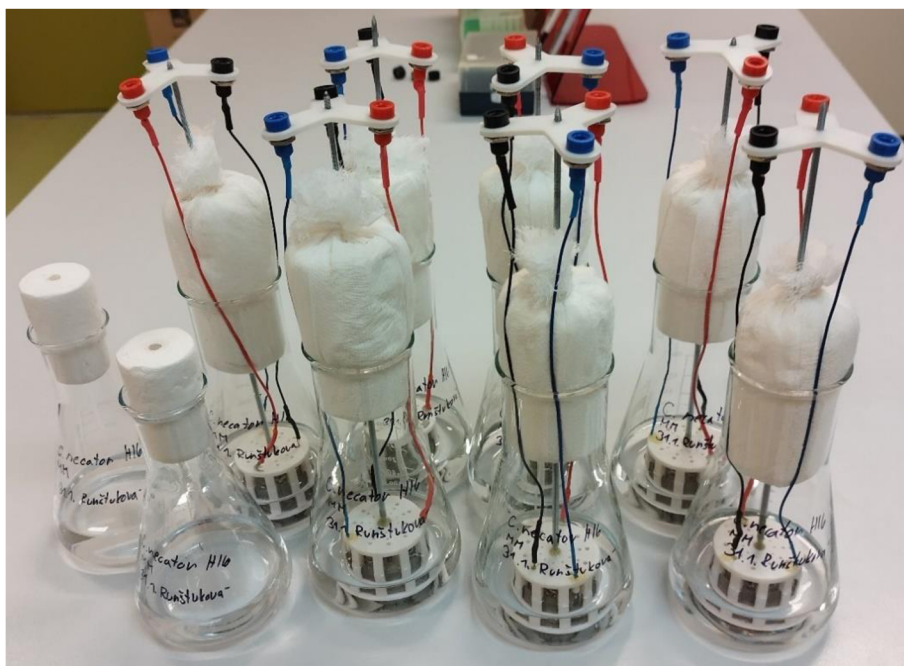


Obrázek 19: Erlenmeyerova baňka se systémem elektrod připravená ke sterilizaci

Po vysterilování všech médií byly jak Erlenmeyerovy baňky, tak roztok fruktózy přeneseny do laminárního boxu a do baňek s minerálním médiem bylo napipetováno příslušné množství fruktózy na konečnou koncentraci 20 g/l.

5.11.3 Inokulace a kultivace za účelem produkce biomasy produkující zvýšené množství PHA vyvolané stresováním v podobě *in situ* generovaného peroxidu vodíku

Po nárůstu inokul (viz kapitola 5.11.1), tedy po 24 hodinách, byly Erlenmeyerovy baňky obsahující sterilní minerální médium inokulovány v 5 obj. %. Do baňek tedy bylo napipetováno 5 ml inokula ve sterilním prostředí laminárního boxu. Celkem bylo připraveno 8 baňek ke kultivaci, z toho 2 kontroly neobsahující systém elektrod, 2 kontroly obsahující systém elektrod a 4 vzorky obsahující systém elektrod, na které byl dle protokolu přikládán potenciál za účelem vývoje peroxidu a následného stresování bakterií.



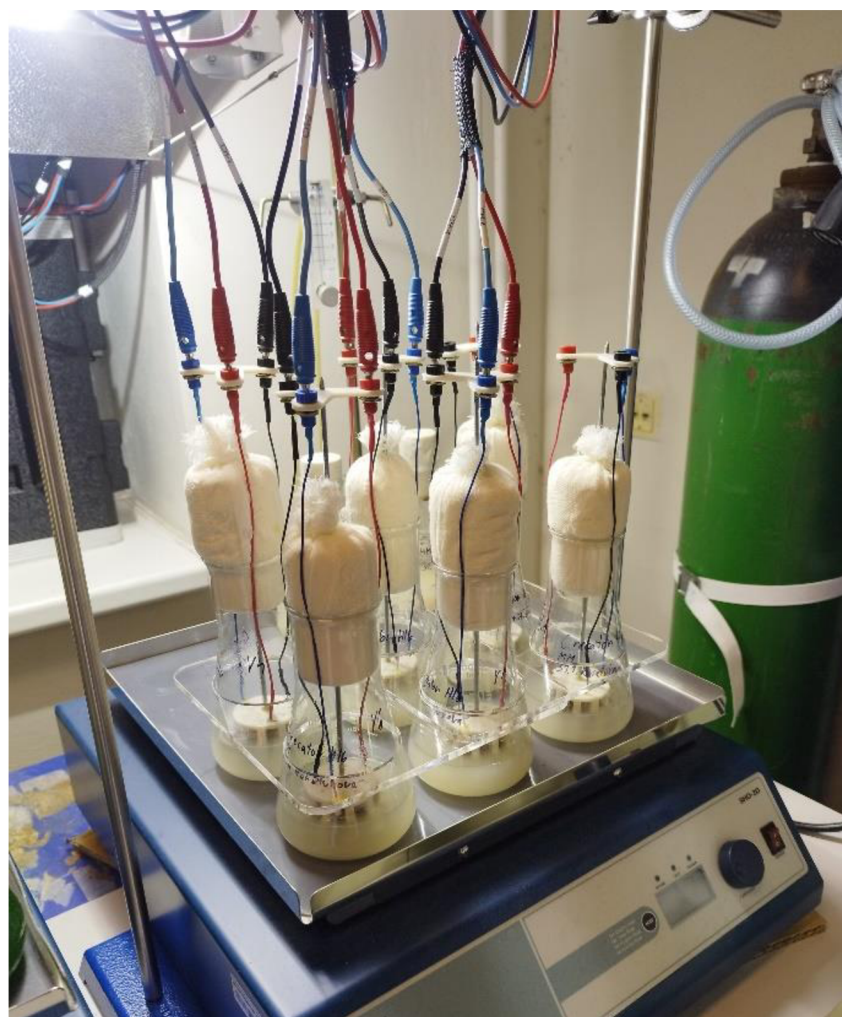
Obrázek 20: Erlenmeyerovy baňky s připraveným médiem

Všechny baňky byly vloženy na třepačku umístěnou pod lampou k zajištění tepla, a kultivovány po dobu 74 hodin při 95 rpm. Baňky byly opatřeny držákem z PMMA s vyřezanými otvory, aby nedošlo k jejich převržení v důsledku míchání. Prvních 24 hodin probíhala kultivace bez aplikace stresového faktoru tak, aby došlo k nárůstu kultury. Následujících 50 hodin probíhala kultivace s aplikací stresového faktoru podle protokolu v Tabulce 4.

Tabulka 4: Protokol stresování bakterií a měření impedance

	čas [h]	
	start	konec
EIS 1		24
Stres 1	24	29,5
EIS 2		29,5
Stres 2	30	45
EIS 3		45
Stres 3	45,5	49
EIS 4		49
Stres 4	49,5	53,5
EIS 5		53,5
Stres 5	54	68,5
EIS 6		68,5
Stres 6	69	73,5

Na elektrody byl pomocí osmikanálového potenciostatu přiváděn potenciál $-0,7\text{ V}$ vždy po vybraný čas. Následně bylo stresování pozastaveno a proběhlo měření impedanční spektroskopie. Poté bylo vypnuto třepání a baňky byly odpojeny od elektrod a přeneseny do laminárního boxu, kde proběhl odběr vzorků pro spektrofotometrické měření optické hustoty. Následně byly baňky opět připojeny k elektrodám, bylo zapnuto třepání a byl opět aplikován stres.



Obrázek 21: Erlenmeyerovy baňky na třepačce během kultivace

Po 74 hodinách kultivace byly z baněk odebrány vzorky pro gravimetrické stanovení biomasy a následnou analýzu pomocí plynové chromatografie, vzorky pro spektrofotometrické stanovení peroxidu vodíku a byla změřena i optická hustota. Tyto odběry již probíhaly bez zabezpečení sterilního prostředí.

5.12 Stanovení biomasy

Biomasa byla stanovována po dobu experimentu spektrofotometricky vždy, když došlo k přerušení protokolu stresování a na konci experimentu gravimetricky. Ve vysušené biomase byl následně stanovován obsah polyhydroxybutyrátu pomocí plynové chromatografie.

5.12.1 Stanovení růstu biomasy spektrofotometricky

Biomasa byla stanovována spektrofotometricky měřením optické hustoty zákalu při 600 nm oproti destilované vodě jako blanku. Tato metoda byla použita pouze pro sledování, zda biomasa narůstá či nikoliv, jelikož se nejedná o příliš přesnou metodu.

Měření optické hustoty probíhalo vždy při přerušení stresování. Baňky byly přeneseny do laminárního boxu, kde bylo odebráno 100 µl suspenze buněk v médiu a napipetováno přímo do kyvety, kde následně došlo k naředění fosfátovým pufrem do objemu 1 ml. V případě potřeby byla roztok naředěn tak, aby se absorbance nacházela v rozsahu přístroje. Každý vzorek byl proměřen minimálně dvakrát.

5.12.2 Stanovení obsahu biomasy gravimetricky

Po skončení kultivace bylo z každé baňky odebráno po 10 ml vzorku do dvou centrifugačních zkumavek. Vzorky ve zkumavkách byly stáčeny 5 minut v centrifuze při 6000 rpm. Po stočení byly odlity supernatanty a sediment byl promyt tak, že do zkumavek bylo přidáno 10 ml vody a sediment byl opět rozsuspendován. Následně byly suspenze opět stáčeny po dobu 5 minut při 6000 rpm. Poté byl odlit supernatant a otevřené zkumavky byly vloženy do sušárny vyhřáté na 70 °C a sušeny do konstantní hmotnosti. Ze supernatantů po první centrifugaci byly odebrány vzorky pro spektrofotometrické stanovení peroxidu vodíku. Po vysušení byla biomasa kvantitativně přenesena na váženky a zvážena na analytických vahách. Následně byla stanovena koncentrace biomasy v g/l.

5.13 Stanovení množství PHA v biomase

Byla provedena jak kvalitativní, tak kvantitativní analýza obsažených PHA v biomase pomocí plynové chromatografie s FID detektorem. Principem analýzy je kyselá katalyzovaná hydrolyza polyesterů a následná esterifikace monomerních jednotek. Takto vzniklé methylestery 3-hydroxyalkanových kyselin jsou těkavé, a je možné je stanovit pomocí GC-FID analýzy.

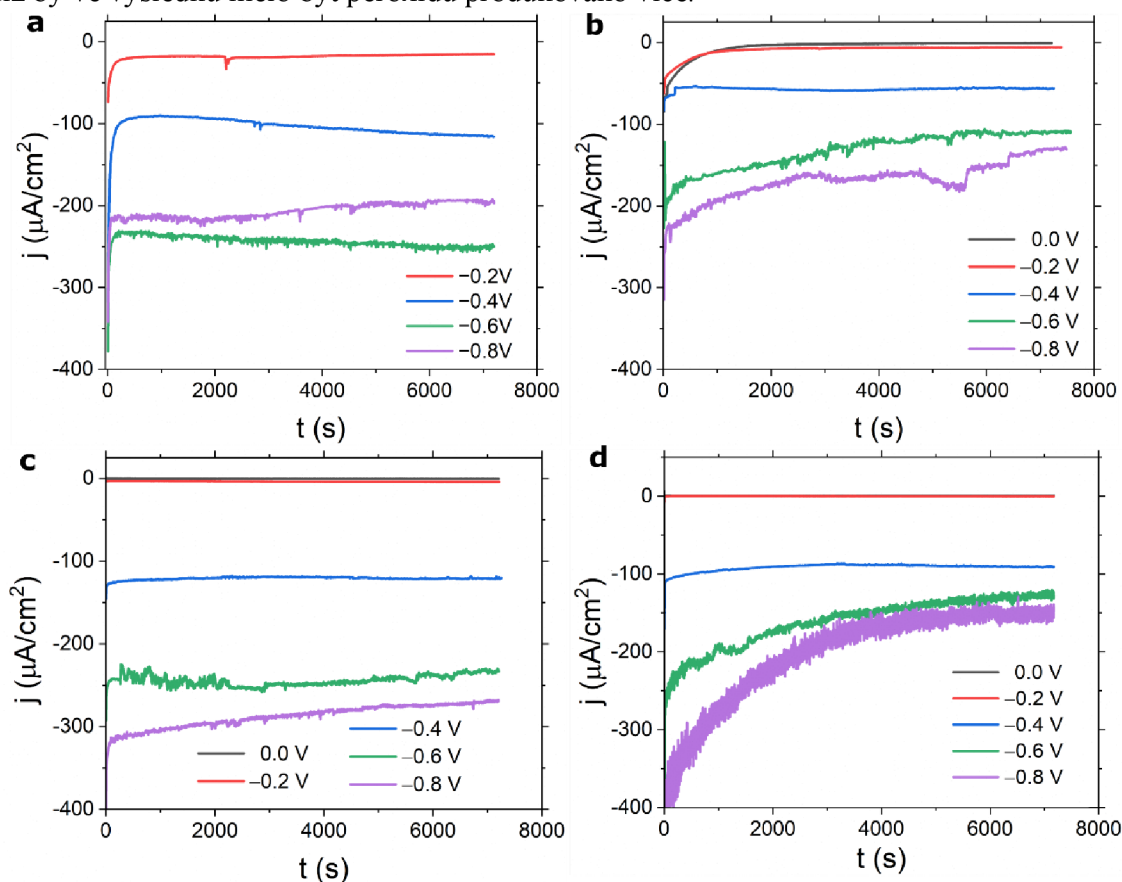
Vzorky pro analýzu byly připraveny následovně. Do krimpovacích vialek bylo navaženo mezi 8 až 10 mg vysušené biomasy po gravimetrické analýze. Z každé centrifugační zkumavky bylo odebráno po jednom vzorku pro GC-FID analýzu. K navažené biomase byl přidán 1 ml chloroformu a 0,8 ml transesterifikační směsi, která se skládá z 15% kyseliny sírové v methanolu a kyseliny benzoové v koncentraci 5 mg/ml jakožto vnitřního standardu. Vialky byly zakrimpovány a umístěny do termobloku vyhřátého na 94 °C a esterifikovány po dobu 180 minut. Po esterifikaci byly vialky zchlazeny na laboratorní teplotu a následně přelity do vialek s větším objemem. Směs byla následně neutralizována 0,5 ml 50mmol/l roztoku hydroxidu sodného. Po protřepání a oddělení fází bylo ze spodní chloroformové fáze obsahující PHA odpipetováno 50 µl a přeneseno do nových vialek obsahujících 950 µl isopropylalkoholu. Takto připravené vzorky byly stanovovány pomocí plynové chromatografie.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem této práce bylo otestovat různé podmínky pro elektrochemickou generaci peroxidu vodíku a následně tuto metodu použít při chronickém stresování bakterií za účelem zvýšené produkce polyhydroxyalkanoátů. Než bylo možné přejít k testování metody v Erlenmeyerových baňkách s přítomností bakterií, byly provedeny experimenty v menších reaktorech neboli měřících celách. Mezi testovanými parametry byly různé elektrodové materiály, různé potenciály přikládáné na pracovní elektrodu, rychlost míchání, geometrie měřících cel a jejich vzájemné kombinace.

6.1 Výsledky vlivu aplikovaného potenciálu na produkci peroxidu vodíku

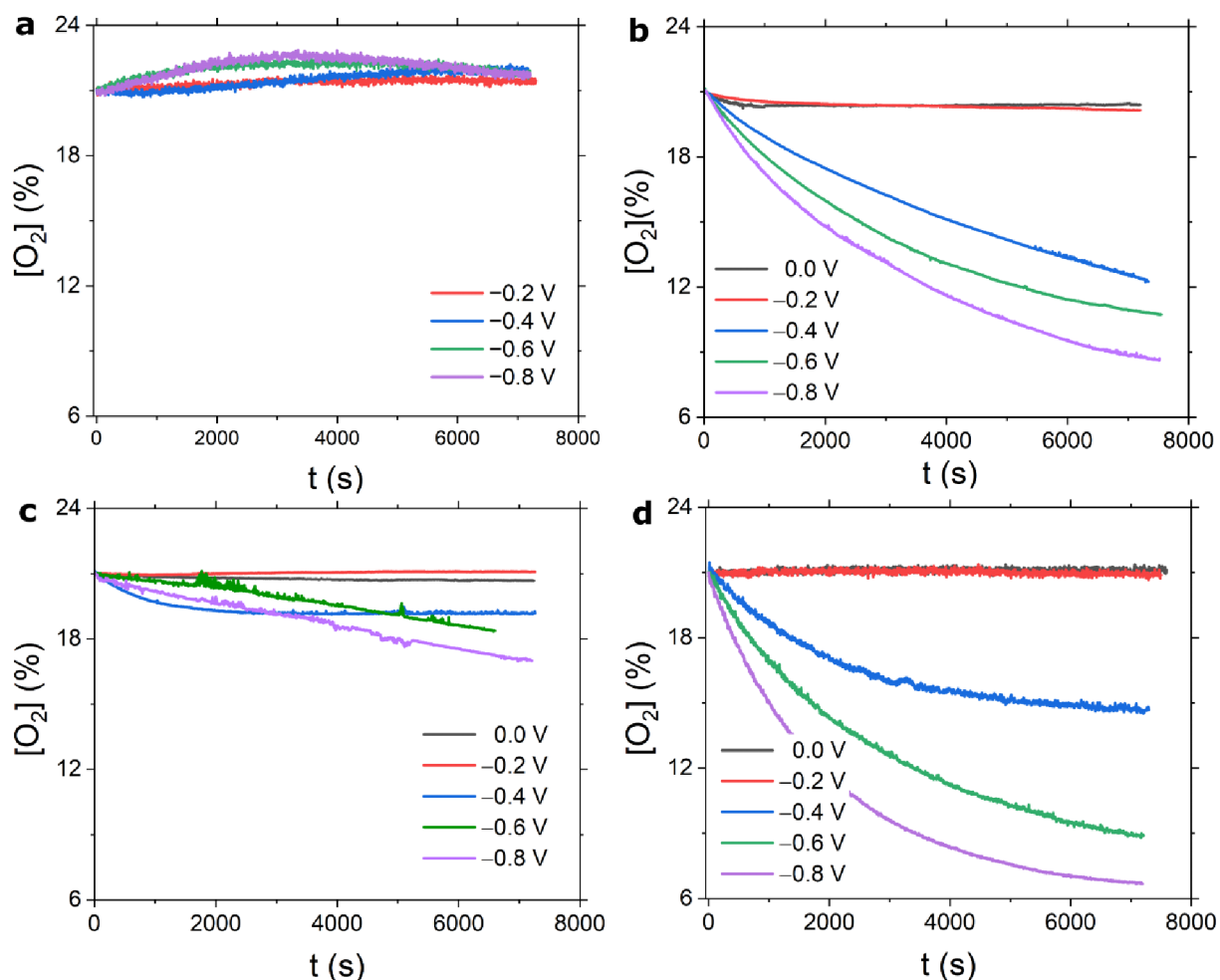
První provedené experimenty měly za úkol otestovat množství peroxidu produkovaného pomocí pracovních elektrod ze dvou vybraných materiálů, a to platiny a zlata. Tyto materiály byly vybrány na základě výsledků ve článku od **Ehlich a kol. 2022**, kde zkoumali produkci peroxidu a redukci kyslíku na různých materiálech. Platinové a zlaté elektrody byly testovány ve dvou odlišných měřících celách, jednokomorové a dvoukomorové. Podstatným rozdílem těchto dvou cel je to, že ve dvoukomorové cele nemůže být již vzniklý peroxid oxidován na protielektrodě zpět na kyslík, a tudíž by ve výsledku mělo být peroxidu produkováno více.



Obrázek 22: Grafy závislosti proudové hustoty na čase (a – platinová pracovní elektroda v jednokomorové cele, b – platinová pracovní elektroda ve dvoukomorové cele, c – zlatá pracovní elektroda v jednokomorové cele, d – zlatá pracovní elektroda ve dvoukomorové cele)

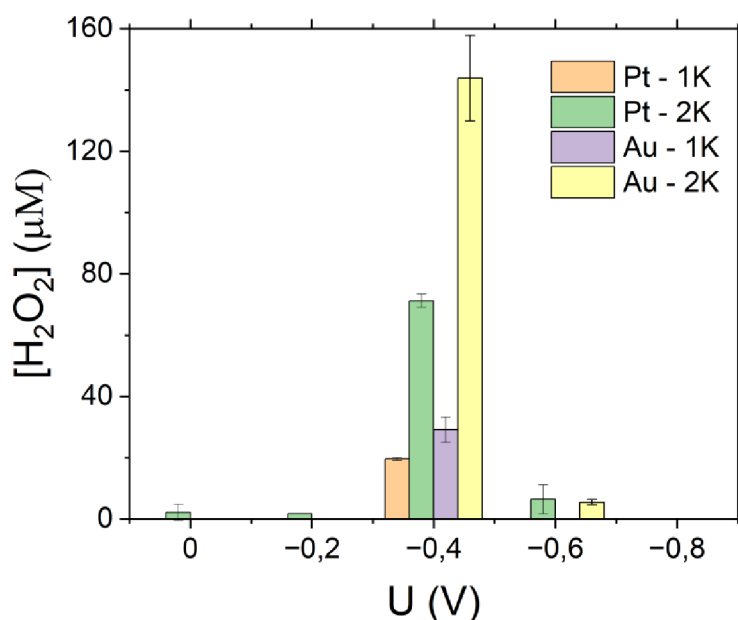
Produkce peroxidu na těchto materiálech byla zkoumána při různých potenciálech aplikovaných na pracovní elektrodu. Jako protielektroda byla v obou celách používána platina, vždy s větším povrchem, než měla pracovní elektroda. Větší povrch byl zajištěn z důvodu, aby nedocházelo k limitaci elektrochemickými ději probíhajícími na protielektrodě. Tyto experimenty probíhaly v roztoku PBS.

Z Obrázku 22 je patrné, že ve všech případech dochází se záporně rostoucím aplikovaným potenciálem i k zápornému nárůstu proudové hustoty. S větším záporným potenciálem totiž narůstá ochota kyslíku se redukovat a dochází tak k většímu přenosu elektronů, čímž narůstá i měřený elektrický proud. Můžeme si všimnout, že hodnoty proudové hustoty pro příslušné potenciály jsou ve všech kombinacích materiálů a měřících cel velmi podobné. Tyto výsledky tedy neznačí přílišný rozdíl mezi reakcemi probíhajícími na elektrodách za různých podmínek.



Obrázek 23: Grafy závislosti koncentrace kyslíku v měřící cele na čase (a – platinová pracovní elektroda v jednokomorové cele, b – platinová pracovní elektroda ve dvoukomorové cele, c – zlatá pracovní elektroda v jednokomorové cele, d – zlatá pracovní elektroda ve dvoukomorové cele)

Na Obrázku 23 můžeme vidět, jak se mění koncentrace kyslíku v měřící cele v průběhu 2 hodin experimentu. Ze všech grafů je patrné, že při aplikovaném potenciálu 0 V a $-0,2$ V nedochází k žádné redukci kyslíku, a to ani ve dvoukomorové cele. V případě platinové pracovní elektrody v jednokomorové cele, což je vyobrazeno na Obrázku 23a, dochází v počátku k mírnému nárůstu kyslíku a následně jeho poklesu a ustálení na konstantní hodnotě. V případě zlata ve dvoukomorové cele (Obrázek 23d) pozorujeme toto ustálení při potenciálech 0 V, $-0,2$ V, $-0,4$ V. V případě experimentů s potenciálem $-0,6$ V a $-0,8$ V dochází v době ukončení experimentu ke stálému poklesu, a tudíž by k dosažení rovnováhy bylo potřeba více času. V cele se zlatou pracovní elektrodou (Obrázek 23d) se při potenciálu $-0,8$ V dostáváme až na koncentraci kyslíku kolem 6 %. V případě platiny (Obrázek 23b) je to při stejném potenciálu asi 8 %. Můžeme tedy říci, že pro redukci kyslíku se zdá být efektivnějším materiálem zlato než platina. Přesto, že kyslík je při vyšších záporných potenciálech více redukován, neznamená to, že bude produkováno i více peroxidu.

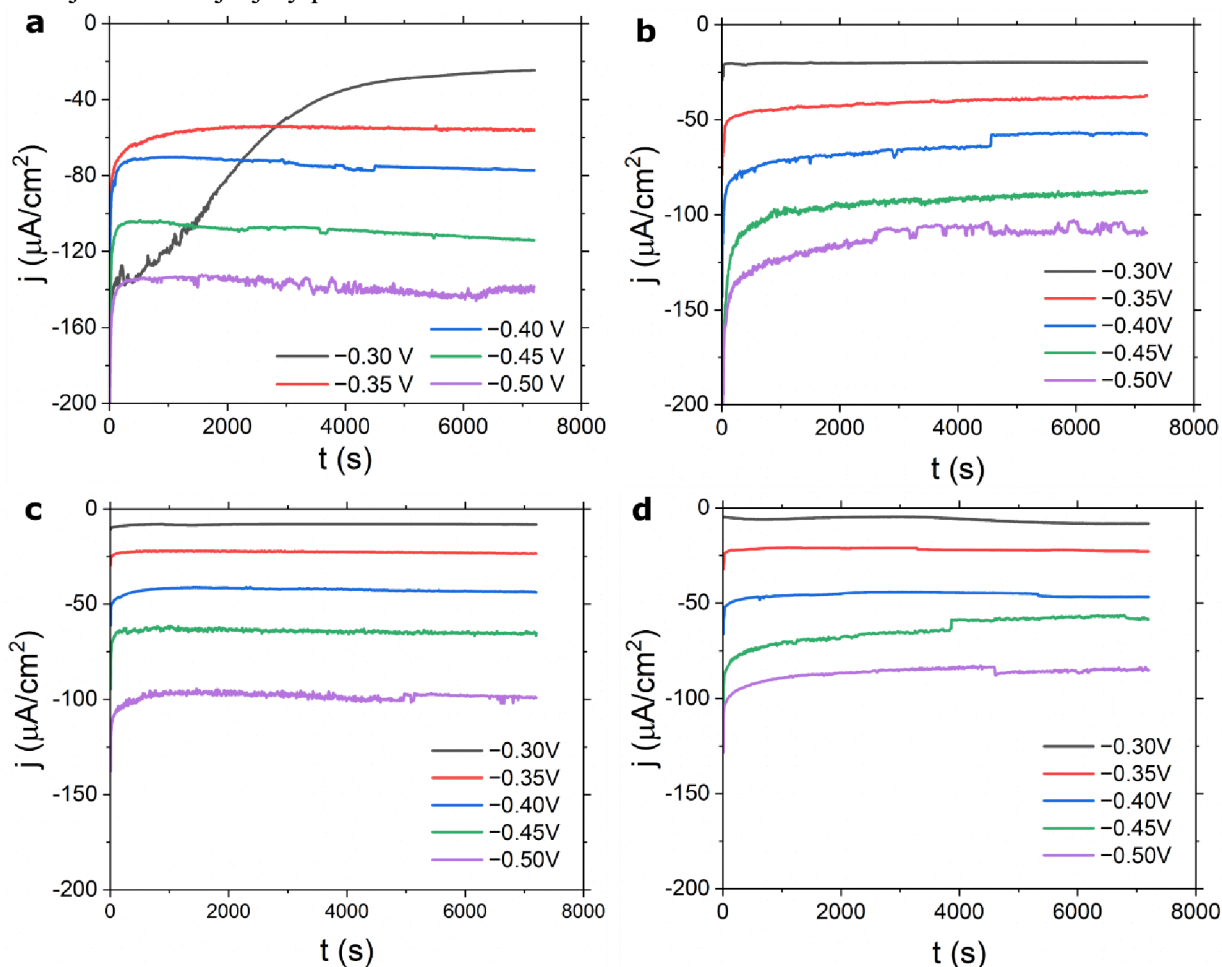


Obrázek 24: Graf závislosti koncentrace peroxidu na aplikovaném potenciálu (Pt – 1K – jednokomorová cela s platinovou elektrodou, Pt – 2K – dvoukomorová cela s platinovou elektrodou, Au – 1K – jednokomorová cela se zlatou elektrodou, Pt – 2K – dvoukomorová cela se zlatou elektrodou)

Na Obrázku 24 je vyobrazena závislost koncentrace peroxidu na použitých potenciálech. Můžeme jednoznačně vidět, že ideálním potenciálem pro produkci peroxidu v roztoku PBS je $-0,4$ V. Z grafu také vyplývá, že dvoukomorová cela má na produkci peroxidu příznivý vliv a jeho produkce je oproti jednokomorové cele značně vyšší. Při kombinaci zlaté pracovní elektrody a dvoukomorové cely se dostáváme ke koncentraci $140 \mu\text{M}$. Dvoukomorová cela je oddělena nepropustnou přepážkou a komory jsou propojeny pouze solným můstkem, který odděluje oba elektrolyty, a tak nemůže docházet k jejich promíchání. Je tedy zabráněno tomu, aby se peroxid vznikající na katodě následně zpětně oxidoval na anodě, a může tak docházet k jeho většímu

hromadění v komoře s pracovní elektrodou. Pokud spojíme výsledky znázorňující koncentrace kyslíku a koncentraci peroxidu, můžeme vidět, že se snižující se koncentrací kyslíku se nejprve produkce peroxidu zvyšuje a poté klesá. To lze vysvětlit tím, že při aplikování zápornější hodnoty potenciálu sice dochází k efektivnější redukci kyslíku, ale výsledný produkt redukce není peroxid vodíku, ale voda.

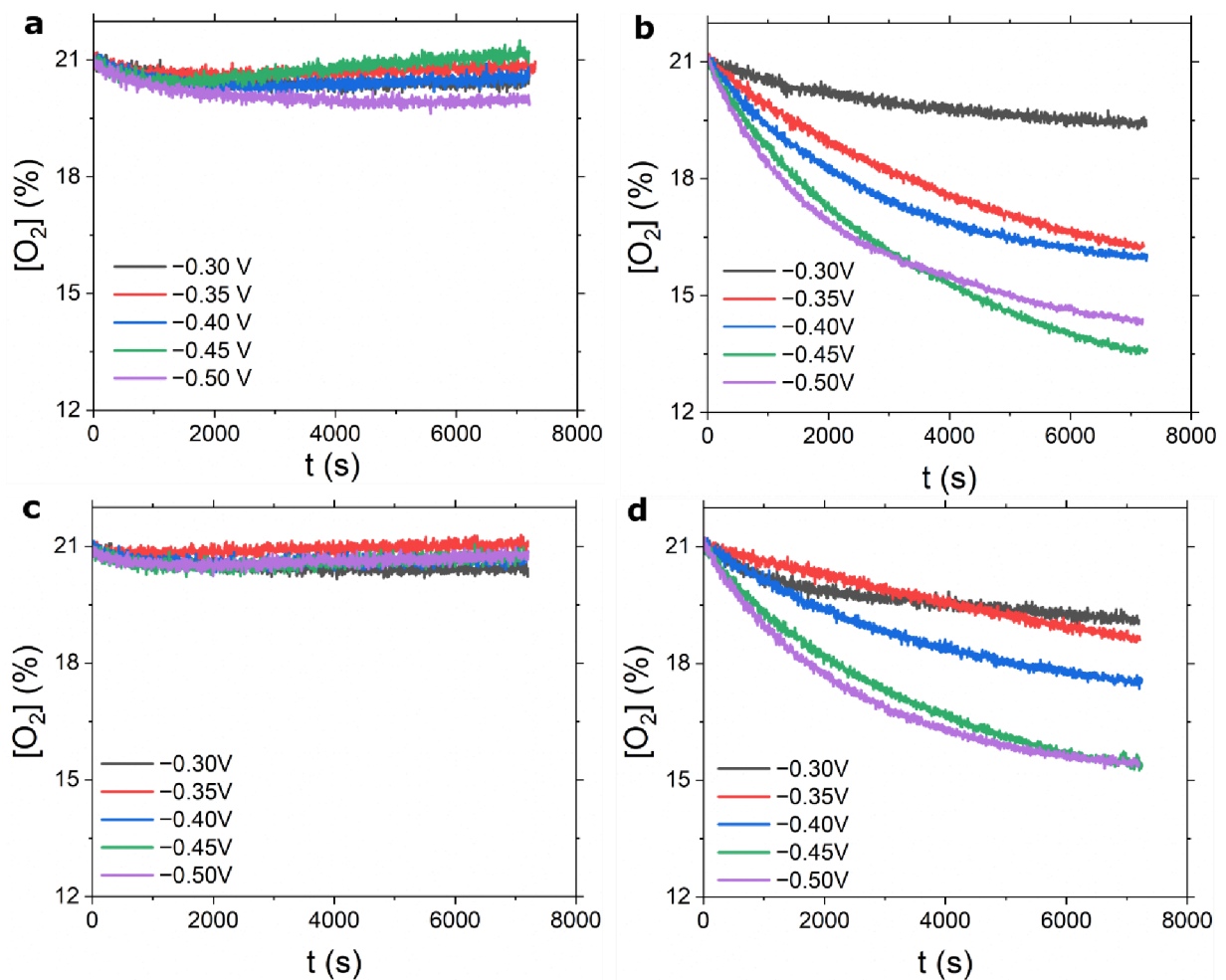
Na základě výsledků těchto úvodních měření a zjištění, že ideální potenciál pro produkci peroxidu za použití roztoku PBS jako elektrolytu je $-0,4\text{ V}$, byla provedena další měření, která testovala potenciály v okolí tohoto maxima. Účelem bylo ověřit, zda se jedná o skutečné maximum, nebo je efektivnější jiný potenciál.



Obrázek 25: Grafy závislosti proudové hustoty na čase (a – platinová pracovní elektroda v jednokomorové cele, b – platinová pracovní elektroda ve dvoukomorové cele, c – zlatá pracovní elektroda v jednokomorové cele, d – zlatá pracovní elektroda ve dvoukomorové cele)

Z Obrázku 25 je patrné, že potenciály testované v těchto experimentech se pohybovaly v rozmezí $\pm 0,1\text{ V}$ v okolí předem zjištěného maxima produkované koncentrace peroxidu. Můžeme vidět, že proudová hustota je vyšší v případě platiny (Obrázek 25a,b) oproti zlatu (Obrázek 25c,d), což značí, že platina je efektivnějším materiálem než zlato. Pokud porovnáme hodnoty proudové

hustoty pro potenciál $-0,4$ V, který již byl testován v předchozím experimentu, můžeme si všimnout odlišných výsledků. To může být způsobeno použitím jiných elektrod. Všechny elektrody ze stejných materiálů byly vyráběny pomocí stejného postupu, ale důvodem rozdílu může být velikost elektrody. Pracovní elektroda byla opatřena folií s ručně vyřezaným otvorem, který tedy nemusel být naprosto stejně velký ve všech případech. V průběhu experimentů mohlo také v některých místech dojít působením roztoku k odlepení folie a povrch elektrody by se tak zvětšil, a tudíž by mohlo dojít i k nárůstu měřeného elektrického proudu.

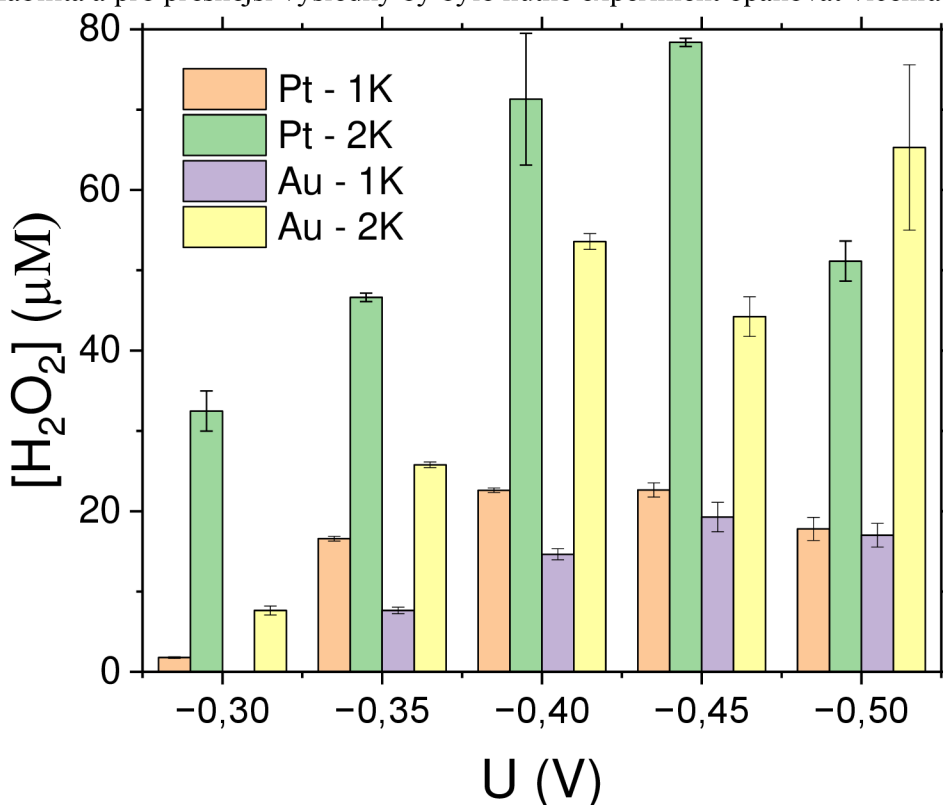


Obrázek 26: Grafy závislosti koncentrace kyslíku v měřicí cele na čase (a – platinová pracovní elektroda v jednokomorové cele, b – platinová pracovní elektroda ve dvoukomorové cele, c – zlatá pracovní elektroda v jednokomorové cele, d – zlatá pracovní elektroda ve dvoukomorové cele)

Na Obrázku 26, který znázorňuje závislost koncentrace kyslíku na čase, můžeme vidět stejný trend jako v předchozích experimentech. Při použití jednokomorové cely (Obrázek 26a,c) dochází k ustálení koncentrace kyslíku u všech potenciálů na velmi podobné hodnotě v rozmezí 20 až 21,5 %. V případě dvoukomorové cely (Obrázek 26b,d) je koncentrace tím nižší, čím je vyšší záporný potenciál. V případě dvoukomorové cely a použitého potenciálu $-0,4$ V, který již byl

otestován dříve, se dostáváme s platinovou elektrodou na koncentraci asi 16 %, zatímco v předchozím experimentu to bylo téměř 12 %. V případě zlaté elektrody je to v tomto případě asi 18 % a v předchozím experimentu 15 %. Tyto výsledky, stejně jako výsledky proudové hustoty značí tedy jistou variabilitu mezi jednotlivými měřeními i v případě testování stejného potenciálu za totožných podmínek.

Výsledky měření koncentrace peroxidu po dvou hodinách těchto experimentů jsou uvedeny na Obrázku 27. V tomto případě se jeví jako nejúčinnější kombinace materiálu a měřící cely platina ve dvoukomorové cele. Za ní následuje zlato ve dvoukomorové cele a poté jednokomorové cely s platinou a zlatem. Z grafu můžeme vyzorovat, že v některých případech není nejvyšší koncentrace dosaženo při potenciálu $-0,4$ V, ale v případě dvoukomorové cely je to u platiny potenciál $-0,45$ V a v případě zlata dokonce $-0,5$ V. Koncentrace dosažené při potenciálu $-0,4$ V jsou ale nižší než v předchozím experimentu. Tyto výsledky potvrzují zjištění získaná na základě výsledků proudové hustoty a koncentrace kyslíku a to, že mezi jednotlivými měřeními existuje určitá variabilita a pro přesnější výsledky by bylo nutné experiment opakovat vícekrát.



Obrázek 27: Graf závislosti koncentrace peroxidu vodíku na použitém potenciálu

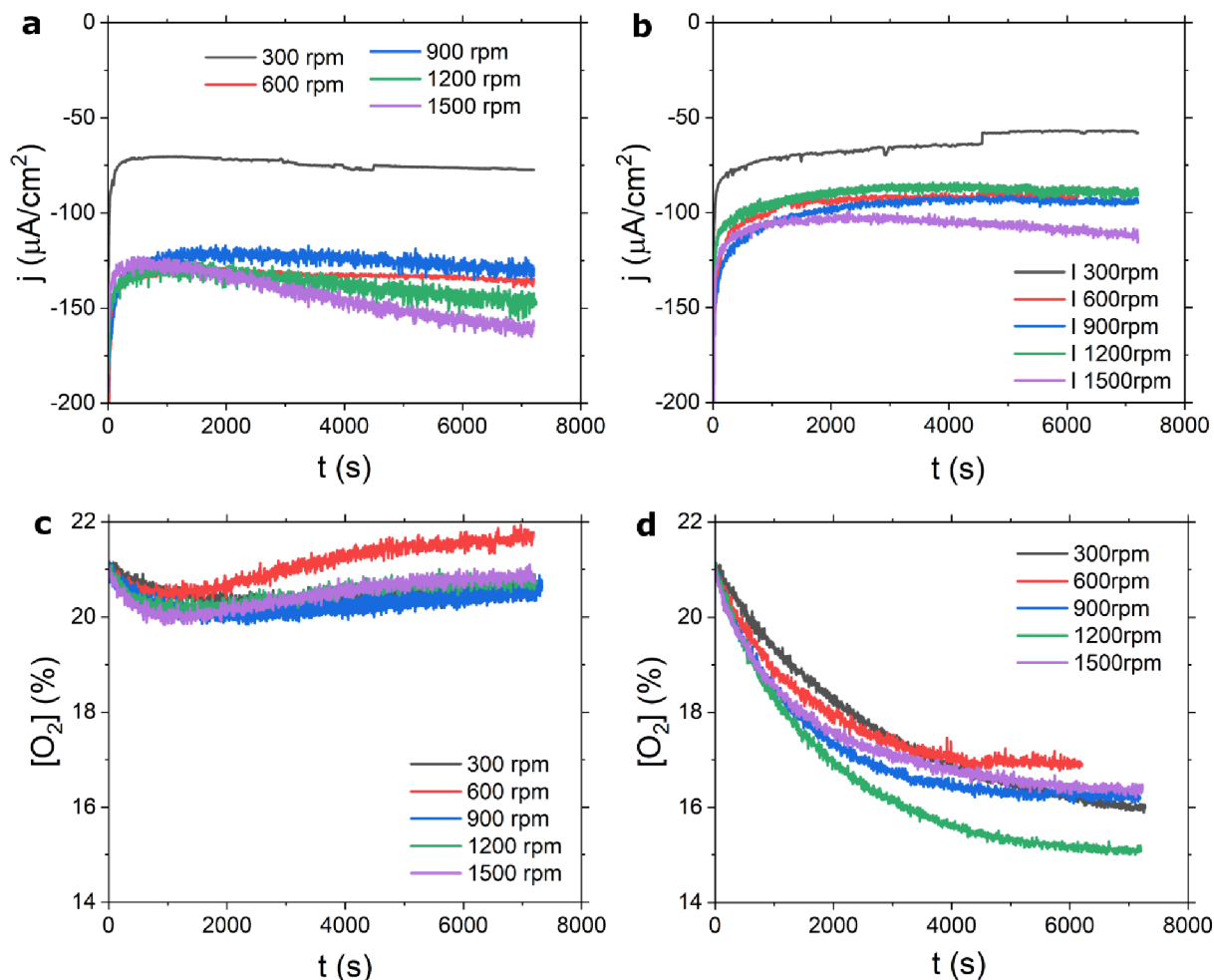
S využitím prozatímních výsledků můžeme provést porovnání s výsledky dosaženými v článku od **Ehlich a kol. 2022.**, na základě kterého byly vybrány tyto materiály k prozkoumání. Dle jejich výsledků se původně zlato jeví jako ideální materiál pro produkci peroxidu vodíku, zatímco při použití platiny peroxidu příliš produkováno není a dle jejich závěrů platina využívá spíše čtyř elektronovou cestu redukce kyslíku, kde výsledným produktem je voda. Naše výsledky přinášejí

zjištění, že v případě platiny je možné také produkovat značné množství peroxidu a vyvrací tedy původní hypotézu. Dalším očekávaným výsledkem bylo, že platina se bude chovat jako ideální materiál pro redukci kyslíku a dojde tak k výraznějšímu odkysličení než u zlata, a to i v případě nízkých aplikovaných potenciálů. Našimi experimenty jsme však ověřili, že tomu tak není, a v případě redukce kyslíku a s tím spojeného odkysličení elektrolytu je efektivnější zlato. Jejich experimenty byly ale prováděny ve zcela jiné konfiguraci a měření koncentrace peroxidu probíhalo pouze ve vzdálenosti 0,2 mm od povrchu elektrody a k měření koncentrace peroxidu byl použit amperometrický senzor. Klíčovým faktorem při hodnocení rozdílů těchto dvou experimentů je fakt, že v případě studie uvedené v daném článku byla měřena lokální koncentrace peroxidu a roztok nebyl míchán. Nedošlo tedy k tak rychlé distribuci peroxidu a ten se mohl v daném místě hromadit. V případě této diplomové práce probíhala všechna měření koncentrace peroxidu na základě odběru vzorku z celého objemu, který byl po dobu experimentu neustále míchán, a došlo tak rovnoměrné distribuci peroxidu. To vysvětluje i nízké koncentrace peroxidu, kterých bylo dosaženo, v porovnání s výsledky v daném článku.

Dle výsledků z tohoto prvního experimentu můžeme říci, že ideální potenciál pro produkci peroxidu vodíku za použití PBS jako elektrolytu je v rozmezí $-0,4$ V až $-0,5$ V. V případě potenciálního využití této metody k odkysličování roztoků, je ideální volbou použití dvoukomorové cely a vyššího záporného potenciálu. Úskalím může být produkce vodíku na katodě při aplikaci příliš vysokého záporného potenciálu, který může být v daném procesu nežádoucí.

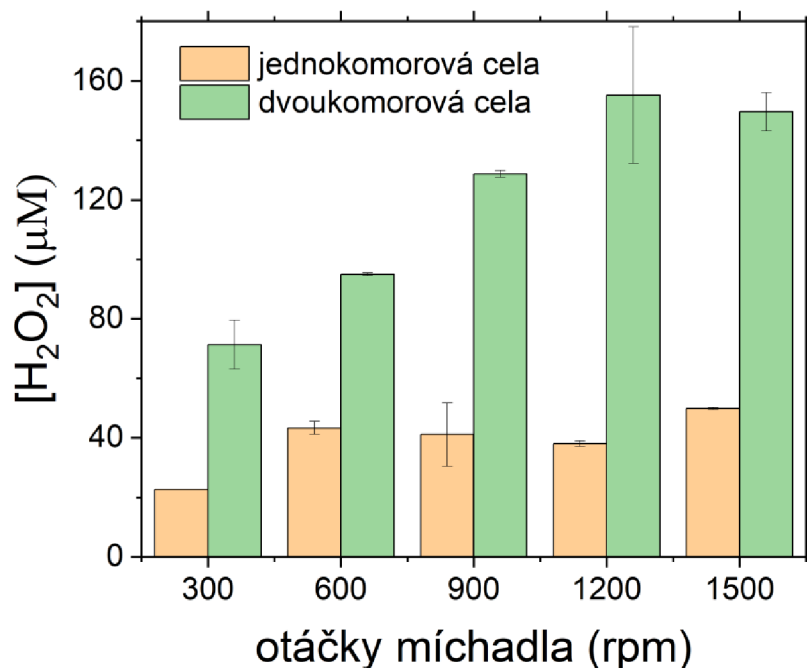
6.2 Výsledky vlivu rychlosti míchání na produkci peroxidu vodíku

Následující experiment se zabýval vlivem odlišné rychlosti míchání na produkovanou koncentraci peroxidu. K tomuto experimentu byla využita pouze platina jako pracovní elektroda i protielektroda a předpokládá se, že efekt by byl stejný pro ostatní elektrodové materiály. Testován byl efekt rychlosti míchání jak v jednokomorové, tak ve dvoukomorové cele. Potenciál aplikovaný na elektrody v tomto experimentu byl $-0,4$ V a jako elektrolyt byl použit roztok PBS.



Obrázek 28: a, b – grafy závislosti proudové hustoty na čase; c, d – grafy závislosti koncentrace kyslíku na čase (a, c – jednokomorová cela, b, d – dvoukomorová cela)

Na Obrázku 28a, b můžeme vidět závislost proudové hustoty na čase, kde je patrné, že vyšší otáčky míchadla způsobí značný skok proudové hustoty oproti původně testovaným 300 rpm. Proudová hustota se se zvyšujícími otáčkami lehce zvyšuje ale rozdíl již není tak velký jako v případě prvního zvýšení z 300 rpm na 600 rpm. Na Obrázku 28c, d můžeme vidět koncentraci kyslíku v roztoku v průběhu experimentu a v případě dvoukomorové cely je nejvyššího odkysličení dosaženo při otáčkách 1200 rpm. Ostatní otáčky dosahují velmi podobného odkysličení.



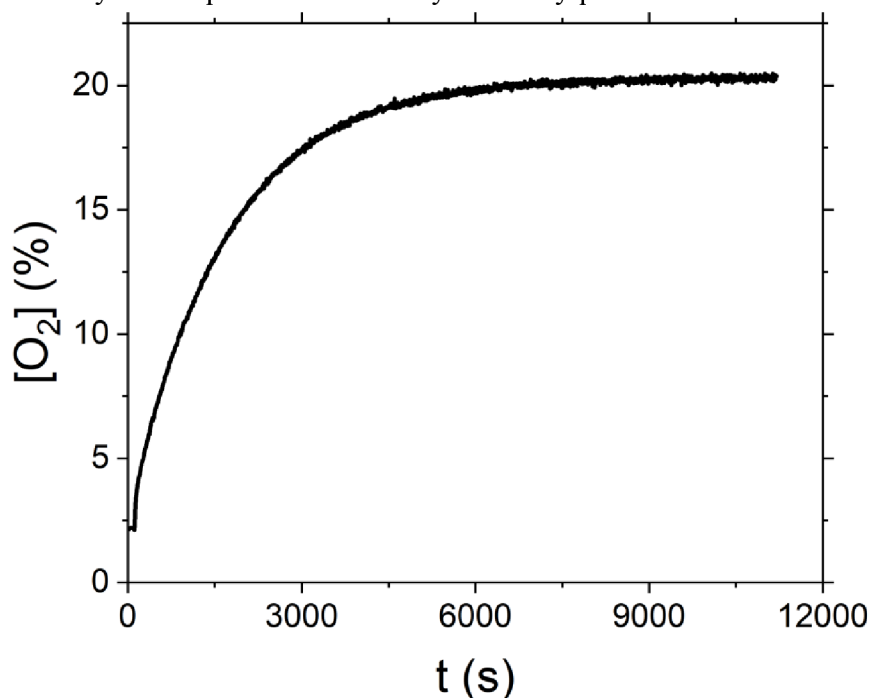
Obrázek 29: Graf závislosti koncentrace produkovaného peroxidu na otáčkách míchadla

Na Obrázku 29 můžeme vidět koncentraci produkovaného peroxidu v závislosti na rychlosti otáček míchadla. V případě dvoukomorové cely vidíme značný nárůst koncentrace po celou dobu zvyšování otáček. Pokud ale vezmeme v úvahu i znázorněné chybové úsečky, můžeme usoudit, že koncentrace peroxidu dosáhne nasycení při 900 rpm. V případě jednokomorové cely dochází k ustálení dosažených koncentrací v podstatě ihned při 600 rpm. Zvyšování otáček nepřináší výrazné zvýšení koncentrace peroxidu. Na základě těchto výsledků byla pro následné experimenty vybrána rychlost otáčení míchadla 900 rpm. Vyšší rychlosti nebyly zvoleny zejména z toho důvodu, že přílišná rychlost otáčení míchadla by mohla poškodit elektrody, což nebylo nutné riskovat, jelikož nárůst koncentrace peroxidu by při vyšších otáčkách nebyl tak markantní.

Rychlost míchání ovlivňuje produkci peroxidu zejména z důvodu rychlejší výměny elektrolytu u povrchu elektrody, čímž dosáhneme přísunu dalšího kyslíku, a tedy jeho následné redukce ve větším množství.

6.3 Výsledek testování rychlosti difuze kyslíku do měřicí cely

Vzhledem k tomu, že během všech experimentů je měřena i měnící se koncentrace kyslíku v elektrolytu, byl proveden test, který zkoumal rychlost difuze kyslíku z okolí do měřicí cely. Během tohoto testu byly do cely uloženy elektrody a senzor, tak aby byly správně simulovány podmínky běžných experimentů a bez aplikovaného potenciálu byla měřena koncentrace kyslíku. Použitým roztokem bylo PBS předem zbavené kyslíku díky probublání dusíkem.



Obrázek 30: Graf závislosti koncentrace kyslíku na čase

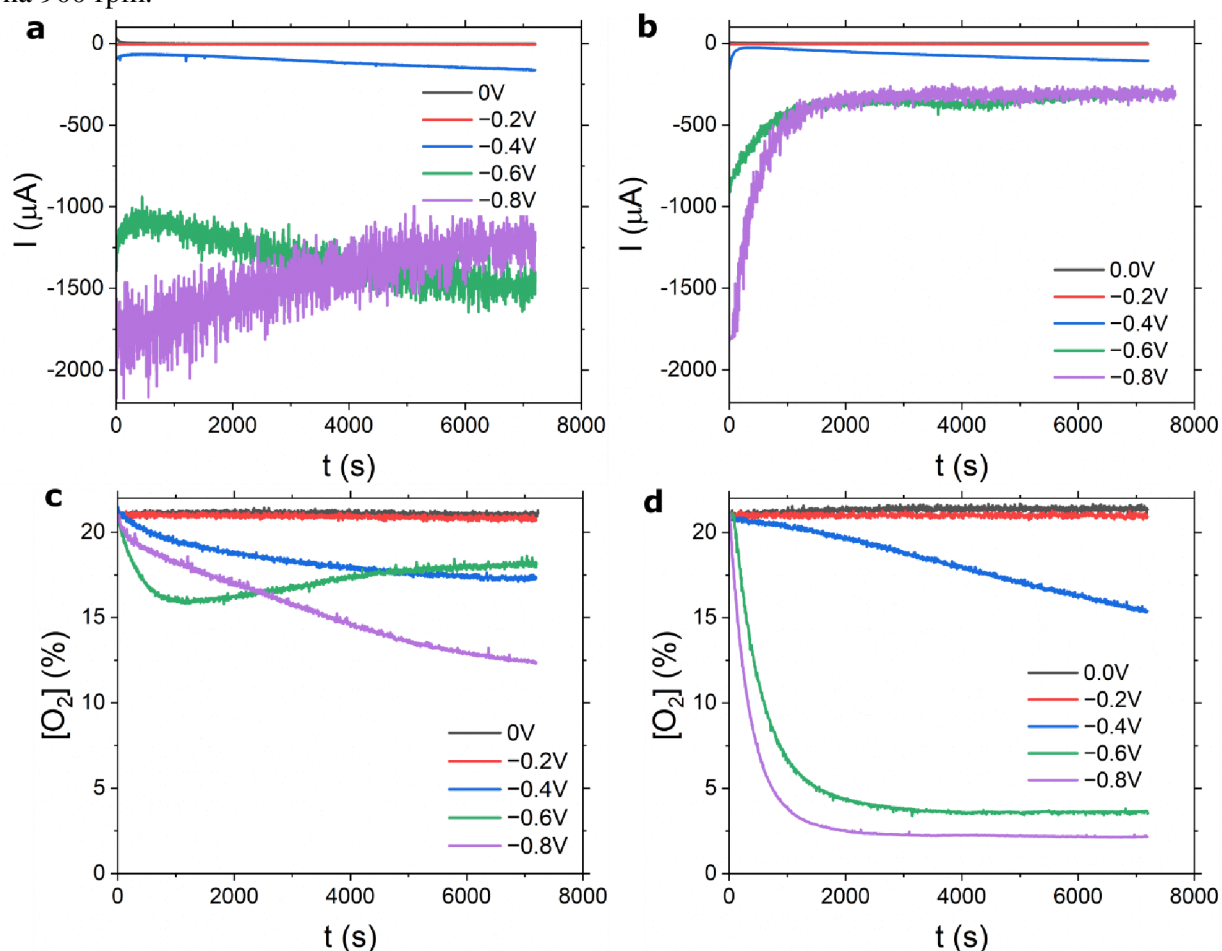
Výsledky měření je možné vidět na Obrázku 30. Bylo zkoumáno, jak dlouho bude trvat, než se hladina kyslíku ustálí na hodnotě 21 %, což je běžné zastoupení kyslíku v atmosféře. Výsledek experimentu ukazuje, že během jedné hodiny došlo k nasycení roztoku kyslíkem téměř na hodnotu 18 % a během další hodiny byla koncentrace téměř zpět na běžných 21 %. Toto zjištění nabízí vysvětlení, proč nebylo možné se při předchozích experimentech dostat při měření odkysličení na nulovou koncentraci kyslíku. Kyslík do měřicí cely difunduje poměrně velkou rychlostí, a tak v některých případech předchozích experimentů můžeme vidět, že koncentrace kyslíku v cele dále neklesá ale ustanoví se rovnováha na nějaké hodnotě koncentrace. Dojde tedy k vyrovnání rychlosti difuze kyslíku do cely a rychlosti redukce kyslíku na katodě.

Pokud by tento proces elektrochemické redukce kyslíku na katodě měl být použit k úplnému odkysličení roztoku, bylo by zapotřebí použít hermeticky uzavřenou celu, aby nedocházelo k neustálému přísunu nového kyslíku skrz stěny reaktoru.

6.4 Výsledky vlivu oceli jako elektrodového materiálu na produkci peroxidu vodíku

Další experimenty byly zaměřeny na otestování vhodných elektrodových materiálů, které je možné využít pro výrobu elektrodových systémů, které byly následně umístěny do baněk při kultivacích. Předchozí používané elektrody není možné použít, vzhledem k jejich křehkosti, ceně materiálu a složitému způsobu výroby.

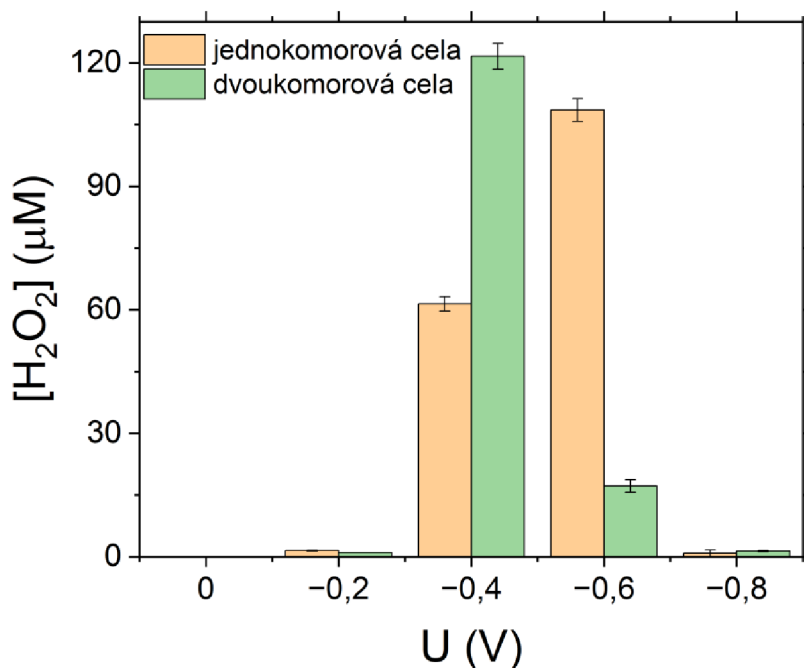
Jako materiál pracovní elektrody byla vybrána ocel v podobě ocelové mřížky. Takovýto materiál je možné snadno ohýbat a následně použít pro konstrukci elektrodových systémů. Vzhledem k tomu, že ocel je ve formě mřížky, má tudíž i poměrně velký povrch, což potenciálně znamená vysokou produkci peroxidu vodíku. Ocel byla testována v jednodukomorové a dvoukomorové cele za použití platiny jako protielektrody. Provedené experimenty měly za úkol zjistit koncentraci produkovaného peroxidu v závislosti na různých potenciálech, podobně jako v úvodních experimentech. Platina jako protielektroda byla vybrána, aby bylo případně možné porovnat výsledky s předchozími, kde byla taktéž využita platina. Elektrolyt použitý pro experimenty bylo opět PBS a rychlost míchání byla dle předchozích výsledků nastavena na 900 rpm.



Obrázek 31: Grafy testování vlivu oceli (a,b – závislost elektrického proudu na čase, c,d – závislost koncentrace kyslíku na čase, a,c – jednodukomorová cela, b,d – dvoukomorová cela)

Z výsledků na Obrázku 31a,b můžeme vidět, že při potenciálu 0 V a $-0,2$ V není produkován téměř žádný elektrický proud, což znamená, že reakce redukce kyslíku neprobíhají ve znatelné míře. Trend zvyšování proudu se zvyšujícím se potenciálem kopíruje výsledky získané v úvodních experimentech. Koncentrace kyslíku klesá v případě dvoukomorové cely a potenciálu $-0,8$ V až na 2,5 %, což může být způsobeno větším povrchem elektrod ve srovnání s předchozími experimenty. Koncentrace změřená v jednokomorové cele při potenciálu $-0,6$ V se vymyká předchozímu viděnému trendu a je možné, že tento materiál se chová jinak při použití právě tohoto potenciálu.

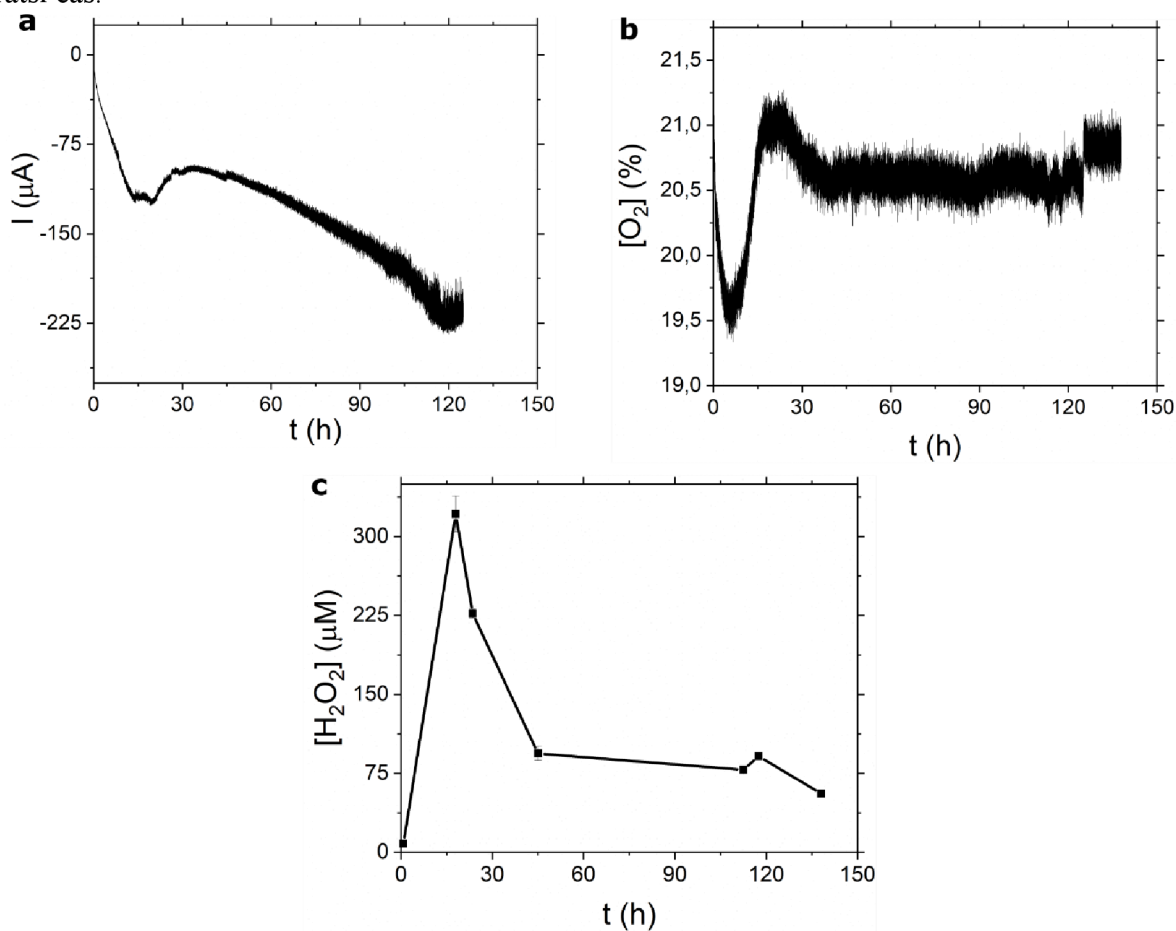
Z následujícího grafu je možné zjistit, že ideální potenciál pro jednokomorovou celu je právě zmíněných $-0,6$ V, kdy se dostáváme na koncentraci peroxidu $105 \mu\text{M}$. V případě dvoukomorové cely se dostáváme až ke koncentraci $120 \mu\text{M}$, ale při potenciálu $-0,4$ V. Při tomto potenciálu je i v jednokomorové cele produkováno poměrně velké množství peroxidu. Tímto experimentem byl ověřeno, že ocel je vhodným elektrodovým materiálem pro využití při reakcích redukce kyslíku a je možné pomoci něj produkovat uspokojivé množství peroxidu.



Obrázek 32: Graf závislosti koncentrace peroxidu na aplikovaném potenciálu (ocelová pracovní elektroda)

6.5 Výsledky testu dlouhodobé stability

Po otestování materiálu vhodného pro použití v Erlenmeyerových baňkách bylo zapotřebí otestovat také stabilitu těchto materiálů a reakcí v delším časovém úseku. Všechny předchozí experimenty probíhaly po přesně stanovenou dobu 7200 s. Vzhledem k faktu, že kultivace bakterií se provádí v řádu několika dnů, je nutno znát, zda reakce probíhá v tomto časovém horizontu, a zda je stále produkován peroxid v uspokojivém množství. Experiment trval 138 hodin, což je dostatečná doba pro zhodnocení stability systému, jelikož kultivační experimenty s bakteriemi trvají podstatně kratší čas.



Obrázek 33: Testování stability (grafy závislosti zkoumaných veličin na čase, a – elektrický proud, b – koncentrace kyslíku, c – koncentrace peroxidu vodíku)

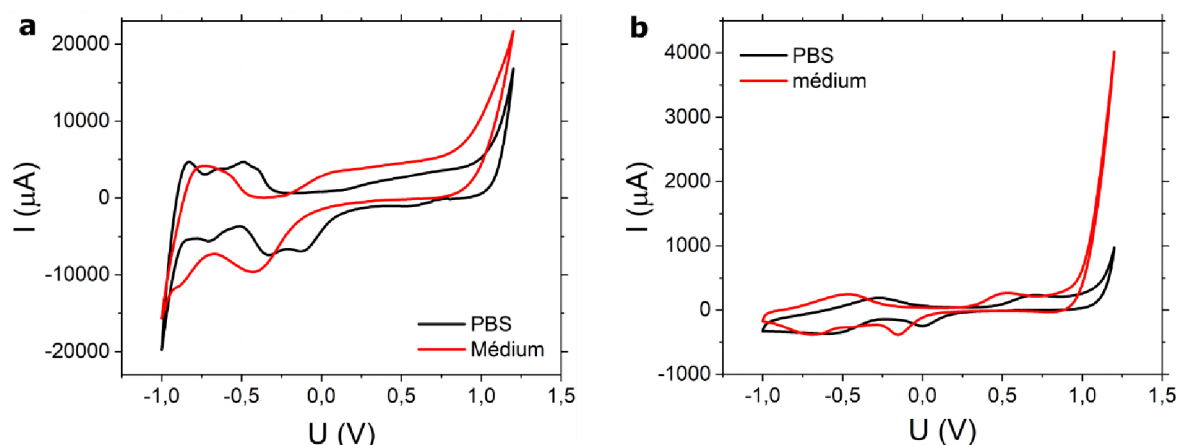
Na Obrázku 33a můžeme vidět velikost elektrického proudu v průběhu experimentu. Překvapivé je, že proud neustále rostl do záporných hodnot, a to po celou dobu experimentu. U koncentrace kyslíku na Obrázku 33b můžeme vidět nejprve mírný pokles a poté nárůst, kdy po 30 hodinách experimentu došlo k ustálení koncentrace zhruba na 20,5 %. Výsledky koncentrace peroxidu jsou zobrazeny na Obrázku 33c. Můžeme vidět, že po dobu prvních asi 15 hodin vzrostla koncentrace peroxidu na více než 300 μM . Od této doby docházelo pouze ke snižování dané koncentrace, kdy po zhruba 45 hodinách došlo k jejímu ustálení na hodnotě okolo 80 μM , což je

poměrně uspokojivá koncentrace v porovnání s předchozími experimenty. Po 120 hodinách se koncentrace začala znovu snižovat a během ukončení experimentu dosahovala $55 \mu\text{M}$.

Tímto experimentem bylo ověřeno, že danou metodu je možné použít pro dlouhodobé experimenty a testované materiály jsou schopny produkovat peroxid alespoň po dobu několika dnů v množství velmi blízkém hodnotám naměřeným v úvodních dvouhodinových experimentech.

6.6 Výsledky cyklické voltametrie pro porovnání PBS a kultivačního média jako elektrolytu

Vzhledem k tomu, že kultivační experimenty probíhají v roztoku kultivačního média, které se svým složením výrazně liší od doposud používaného roztoku PBS, bylo třeba otestovat dané reakce a jejich chování v příslušném médiu. Na rozdíl od PBS obsahuje vybrané kultivační médium řadu kovových iontů, které teoreticky mohou podléhat redukci a ovlivnit tak reakce redukce kyslíku. Dalším rozdílem je koncentrace chloridových iontů, která se v obou typech roztoků liší o 3 řády, což může ovlivnit hodnotu ideálního potenciálu pro produkci peroxidu.

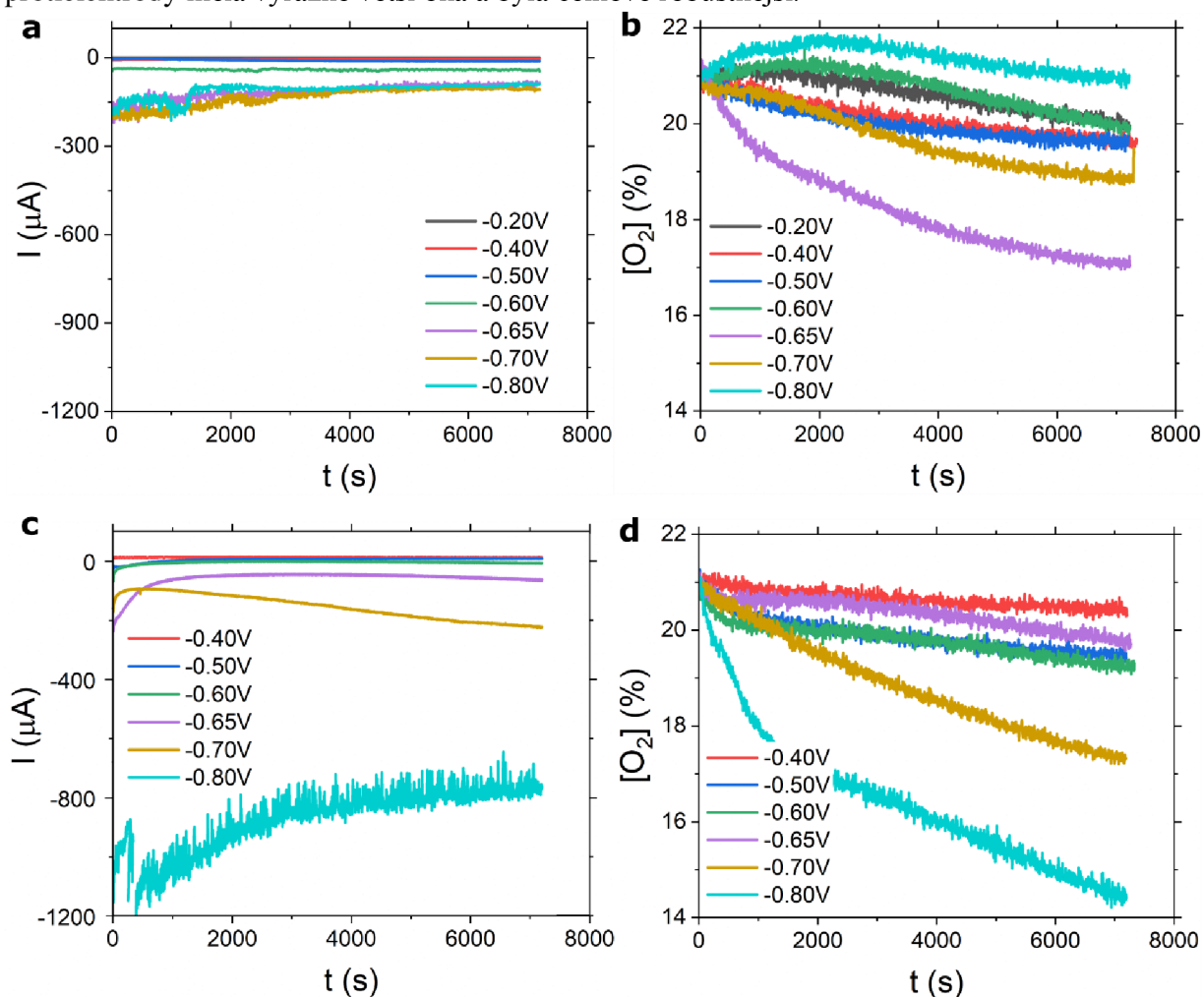


Obrázek 34: Grafy závislosti elektrického proudu na potenciálu (a – platinová pracovní elektroda s platinovou protielektrodou, b – ocelová pracovní elektroda s titanovou protielektrodou)

Prvním experimentem, který byl proveden za použití média, bylo porovnání cyklické voltametrie za použití PBS nebo média jako elektrolytů. V prvním případě byly testovány platinové elektrody, a to jak pro pracovní, tak protielektrodu. Ve druhém případě pak ocel jako pracovní elektroda a titanový drát jako protielektroda. Z výsledků na Obrázku 34 je v případě použití média vidět posun píků doleva, směrem k zápornějším potenciálům. Dle hodnot elektrického proudu, je možné usoudit, že na platinové elektrodě probíhají elektrochemické reakce ve značně větší míře než v případě použití oceli a titanu. Vzhledem ke zjištění posunu píků v médiu oproti PBS, bylo zapotřebí otestovat médium a produkci peroxidu v něm, za použití různých potenciálů, tak jako tomu bylo v úvodních experimentech.

6.7 Výsledky experimentů za použití kultivačního média jako elektrolytu

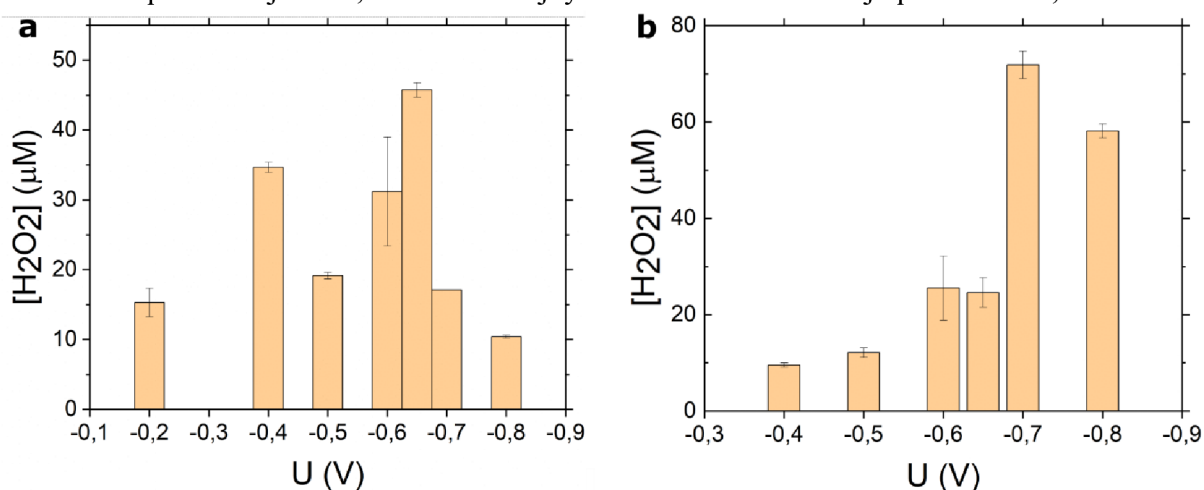
Experimenty probíhající v kultivačním médiu jakožto elektrolytu již byly prováděny pouze v jednodukomorové cele, a to z toho důvodu, že v následných kultivačních experimentech byly použity Erlenmeyerovy baňky. Kultivace bakterií probíhají v reaktoru, který svou konstrukcí připomíná jednodukomorovou celu. Přestože bylo zjištěno, že pro vyšší produkci peroxidu je vhodnější použití dvouukomorových reaktorů, v případě kultivací v Erlenmeyerových baňkách to ale není možné. Testovanými materiály byla v prvním experimentu ocelová mřížka jako pracovní elektroda a titanový drát jako protielektroda a vedruhém experimentu ocelová mřížka jako pracovní elektroda i protielektroda. Ve druhém případě se od sebe ocelové mřížky lišily. Mřížka ocelové protielektrody měla výrazně větší oka a byla celkově robustnější.



Obrázek 35: Testování vlivu velikosti potenciálu v kultivačním médiu (a,c – grafy závislost elektrického proudu na čase, b,d – grafy závislost koncentrace kyslíku na čase, a,b – ocelová pracovní elektroda a titanová protielektroda, c,d – ocelová pracovní i protielektroda)

Na Obrázku 35a,b můžeme vidět výsledky pro ocelovou pracovní elektrodu s titanovou protielektrodou. Můžeme si všimnout, že oproti výsledkům měření v roztoku PBS se proud začne markantně zvyšovat, a tedy začnou probíhat elektrochemické reakce až při potenciálu $-0,6$ V. Následující tři potenciály poskytují téměř shodné výsledky. Co se týče kyslíku tak nedochází k výraznému odkysličení ani při jednom z aplikovaných potenciálů, což je konzistentní s předem získanými výsledky experimentů v jednodukomorové cele. Nejvyšší odkysličení nastává při potenciálu $-0,65$ V, kde se dostáváme na 17 %. V druhém případě, na Obrázku 35c,d, kde byla použita ocel jako pracovní i protielektroda, můžeme vidět, že proud se začne zvyšovat výrazně až při potenciálu $-0,7$ V. V případě potenciálu $-0,8$ V můžeme vidět obrovský skok směrem k záporným hodnotám. Výsledek při použití tohoto potenciálu koresponduje i s výsledkem koncentrace kyslíku, kde je opět vidět určitý skok a při tomto potenciálu dochází k výraznějšímu odkysličení, kdy se dostáváme až na 14 %.

Výsledky měření koncentrace peroxidu můžeme vidět na Obrázku 36. Dle výsledků v grafu na Obrázku 36a, kde se jedná o závislost koncentrace peroxidu za použití ocelové pracovní elektrody a titanové protielektrody, se jako nejefektivnější potenciál jeví $-0,65$ V. Druhou největší koncentraci dosahuje potenciál $-0,4$ V a $-0,6$ V. Při použití ocelové pracovní i protielektrody se jako ideální potenciál jeví $-0,7$ V. Druhé nejvyšší koncentrace dosahuje potenciál $-0,8$ V.



Obrázek 36: Grafy závislosti koncentrace peroxidu na aplikovaném potenciálu (a – ocelová pracovní elektroda a titanová protielektroda, b – ocelová pracovní i protielektroda)

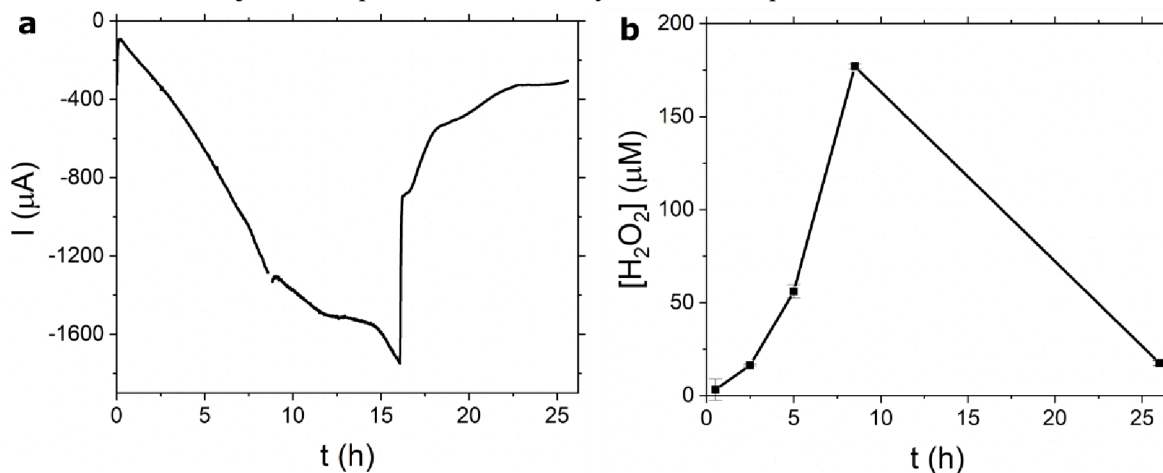
Ze zjištěných výsledků je možné vyvodit, že maximum dosažené koncentrace se v případě použití kultivačního média jako elektrolytu posunuje směrem k zápornějším hodnotám aplikovaného potenciálu. Za použití stejné pracovní elektrody a stejného elektrolytu bylo dosaženo odlišných výsledků při použití různých protielektrod. Z výsledků vyplývá, že nezáleží pouze na materiálu použité pracovní elektrody, ale i na materiálu použité protielektrody. Tyto zjištěné potenciály byly následně použity při experimentech v Erlenmeyerových baňkách za použití média jako elektrolytu.

6.8 Výsledky experimentů v Erlenmeyerových baňkách při použití PBS jako elektrolytu

Po otestování všech vybraných parametrů v provizorních reaktorech, byly realizovány experimenty v Erlenmeyerově baňce, která je využívána při kultivaci bakterií. Produkce peroxidu byla nejprve zkoumána za použití PBS a následně i za použití kultivačního média.

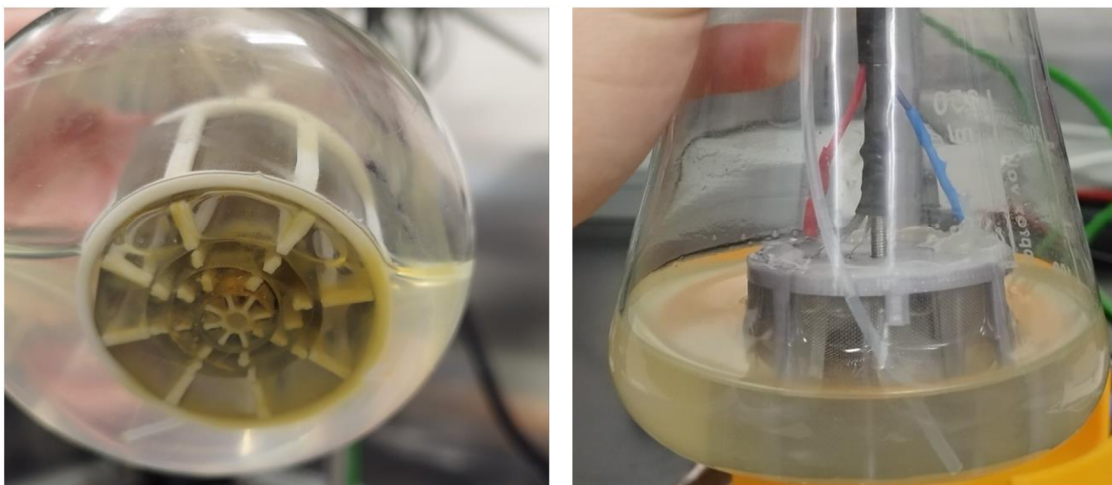
Prvními testovanými materiály byla ocelová pracovní elektroda a ocelová protielektroda. V tomto případě se jednalo o stejný typ ocelové mřížky v případě obou elektrod. Potenciál aplikovaný na pracovní elektrodu byl $-0,4$ V. Baňka byla umístěna na „podomáčku“ vyrobenou třepačku, kde byl roztok míchán rychlostí 110 rpm. Experiment byl plánován tak, aby trval několik dní, aby byla otestována stabilita elektrod. Dle nečekaných výsledků byl ale ukončen po 25 hodinách.

Na Obrázku 37a můžeme vidět závislost proudu na čase. Je patrné, že proud narůstá do záporných hodnot až zhruba do 15. hodiny, kdy začne strmě klesat směrem k nule. Na Obrázku 37b je možné vidět koncentraci peroxidu v průběhu experimentu a výsledky potvrzují trend viděný na grafu závislosti proudu. Koncentrace peroxidu narůstá do 8. hodiny a následující měření ukazuje již velmi nízkou hodnotu koncentrace. Je předpokládáno, že koncentrace peroxidu rostla zhruba do 15. hodiny, jak ukazuje graf závislosti proudu na čase a poté se začala rapidně snižovat. Bohužel nejsou k dispozici data, která by toto tvrzení potvrdila.



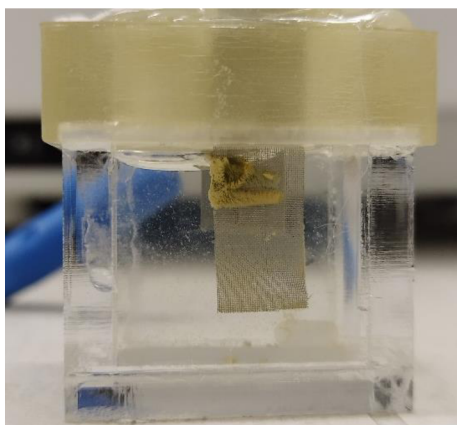
Obrázek 37: a – graf závislosti elektrického proudu na čase, b – graf závislosti koncentrace peroxidu na čase

Po ukončení experimentu byl prozkoumán jak použitý elektrolyt, tak elektrody. Bylo objeveno, že elektrolyt je zakalený a má žlutohnědou barvu a povlak podobné barvy se objevuje i na elektrodách. Toto je možné vidět na následující fotografii. Bylo zjištěno, že dochází ke korozi protielektrody.



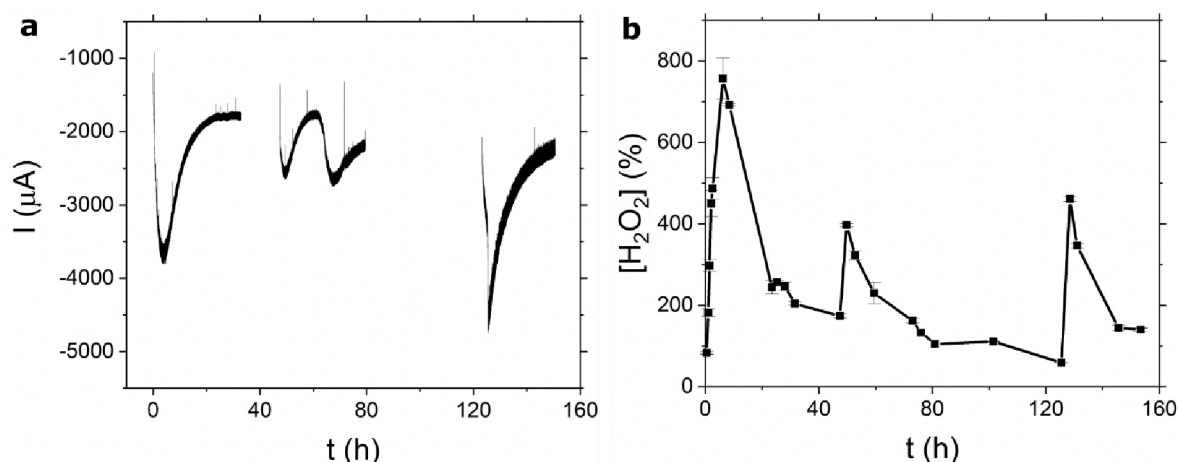
Obrázek 38: Zkorodované elektrody v Erlenmeyerově baňce

Aby byla potvrzena hypotéza o korozi protielektrody a bylo jisté, že se nejedná pouze o jednorázovou záležitost, byl proveden experiment se stejnými elektrodami v jednokomorové cele. Výsledek tohoto testu je možné vidět na následujícím obrázku a potvrzuje, že dochází ke korozi protielektrody.



Obrázek 39: Zkorodovaná protielektroda v jednokomorové cele

Na základě tohoto zjištění bylo nutné upravit materiál protielektrody, tak aby nedocházelo ke korozi. Vzhledem ke svým vlastnostem byl vybrán titanový drát, který je také snadné zakomponovat do systému elektrod. Aplikovaný potenciál byl stejný jako v případě ocelových elektrod, tedy $-0,4$ V. Experiment probíhal 160 hodin. Jedná se o podobný experiment jako při testování stability reakce, kde byla použita stejná kombinace elektrod. V tomto případě se jedná a zkoušku, zda reakce bude probíhat i ve větším měřítku s použitím větších elektrod a většího objemu elektrolytu.



Obrázek 40: a – graf závislosti elektrického proudu na čase, b – graf závislosti koncentrace peroxidu na čase

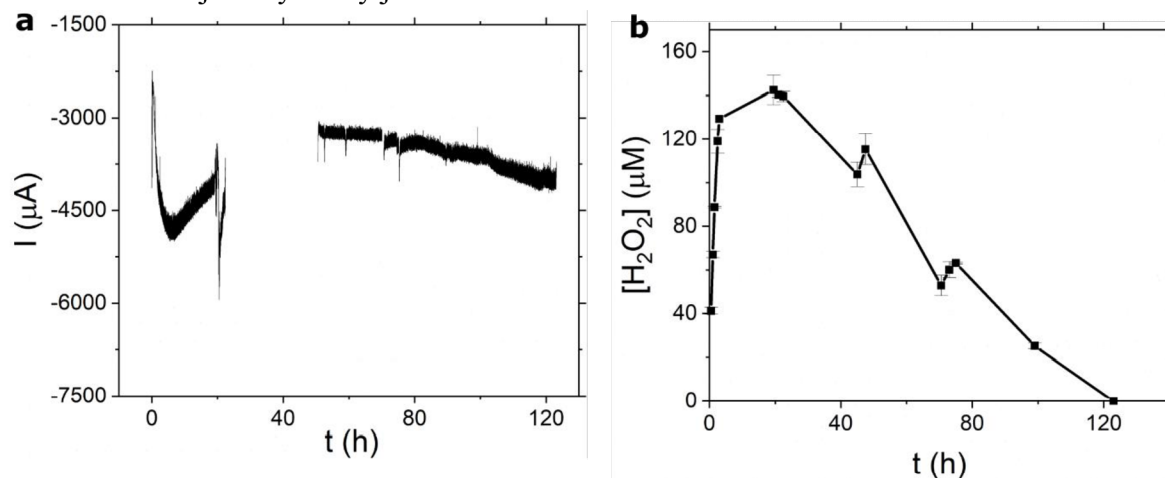
Výsledky tohoto experimentu je možné vidět na Obrázku 40. Podle výsledků v grafu na Obrázku 40a je patrné, že hodnota elektrického proudu byla po celou dobu reakce poměrně vysoká a to $-2000 \mu\text{A}$ a v nejnižších bodech bylo ale dosaženo i proudových hodnot $-5000 \mu\text{A}$. Již tyto výsledky naznačují, že reakce na elektrodách probíhají ve značném množství. To potvrzuje i graf na Obrázku 40b, kde je vyobrazena závislost koncentrace peroxidu na čase. Během prvních deseti hodin koncentrace peroxidu dosáhla téměř $800 \mu\text{M}$. Následně však koncentrace peroxidu klesala a stoupala v závislosti na aplikování potenciálu. I nejnižší dosažená koncentrace se však stále drží v poměrně vysokých hodnotách kolem $100 \mu\text{M}$.

Na Obrázku 40a můžeme v grafu vidět několik mezer, a to z důvodu chybějících dat. Během experimentu došlo několikrát k odpojení potenciostatu od počítače, a tedy i přerušení obvodu a pozastavení aplikování potenciálu na elektrody. Tato situace trvala obvykle několik hodin. Tyto výpadky je v grafu koncentrace peroxidu možné pozorovat jako minima křivky. Po opětovném přiložení potenciálu došlo k nárůstu proudu i peroxidu a po určité době k jejich poklesu. Z grafu koncentrace peroxidu lze usoudit, že reakce je dlouhodobě stálá a peroxid lze vytvářet i po delší čas. Vzhledem k neočekávaným okolnostem, jako je neúmyslné přerušení experimentu, se nabízí další možnost jako vytvářet peroxid v co nejvyšším množství. Na rozdíl od původně zamýšleného konstantního přikládání potenciálu na pracovní elektrodu, by mohl být potenciál přikládán dle daných protokolů, s různě dlouhými pauzami. Tuto teorii by bylo nutné dále prozkoumat, aby bylo zjištěno, zda je tímto způsobem možné dosáhnout vyšší koncentrace peroxidu než kontinuálním působením.

6.9 Výsledky experimentů v Erlenmeyerových baňkách při použití kultivačního média jako elektrolytu

Po otestování funkčnosti metody v Erlenmeyerově baňce za použití roztoku PBS, bylo potřeba otestovat produkci peroxidu také v kultivačním médiu. Experiment byl nejprve proveden s ocelovou mřížkou jako pracovní elektrodou a titanovým drátem jako protelektrodou. Aplikovaný

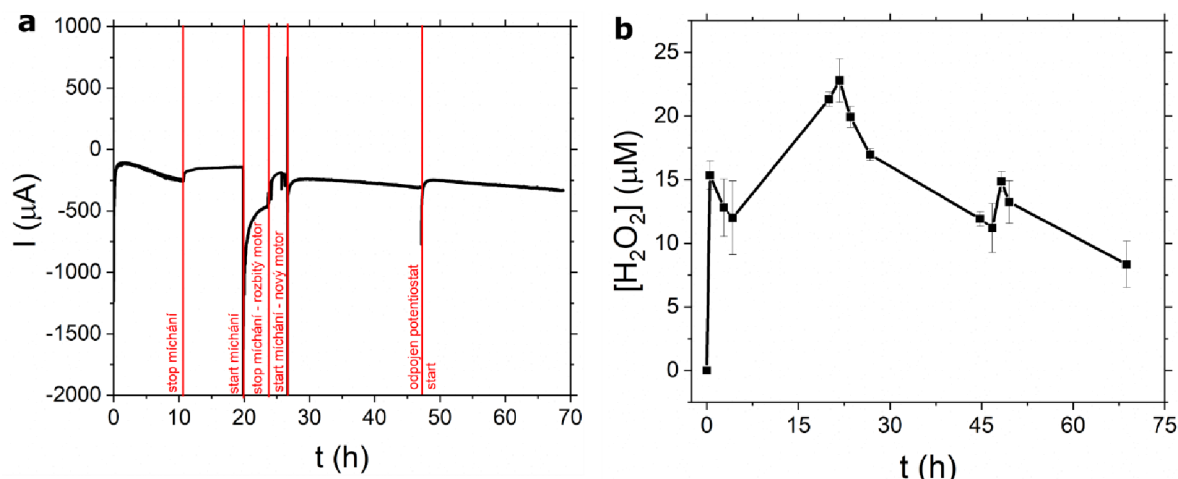
potenciál byl vybrán na základě experimentů v jednodílné cele, tedy $-0,65$ V. Experiment trval 120 hodin a jeho výsledky je možné vidět na Obrázku 41.



Obrázek 41: Experiment v Erlenmeyerově baňce s kultivačním médiem za použití oceli jako pracovní elektrody a titanu jako protielektrody (a – graf závislosti elektrického proudu na čase, b – graf závislosti koncentrace peroxidu na čase)

Na Obrázku 41a můžeme vidět, že elektrický proud na počátku experimentu nejprve roste do záporných hodnot, kde se dostává až na -5000 μA . Následně lehce klesá a poté se drží téměř konstantní s mírným nárůstem do záporných hodnot. Koncentrace peroxidu v grafu na Obrázku 41b koresponduje s výsledky grafu závislosti elektrického proudu. Můžeme vidět, že koncentrace peroxidu nejprve prudce narůstá, až k hodnotám 140 μM . A poté začíná klesat. Na křivce je možné vidět dva skoky, znázorňující mírný nárůst peroxidu. Koncentrace v těchto bodech byly vždy měřeny před krátkým přerušením aplikování potenciálu a po něm. Toto přerušení bylo provedeno za účelem uložení dat, aby nedošlo k jejich ztrátě. Přerušení experimentu nikdy netrvalo více než pár minut. Z grafu na Obrázku 41a je také patrné, že část dat chybí, a to právě z důvodu samovolného přerušení experimentu v důsledku odpojení potenciostatu od počítače. Během 120 hodin experimentu došlo k úplnému poklesu koncentrace peroxidu, což ale nemusí být problémem, jelikož kultivační experimenty netrvaly tak dlouho. Použití těchto elektrod by tedy po požadovanou dobu mělo být stabilní a peroxid by měl být stále produkován.

Stejný experiment byl poté proveden i s jinými elektrodami, a to konkrétně ocelovou mřížkou jako pracovní elektrodou a robustnější ocelovou mřížkou s většími oky jako protielektrodou. Původně zamýšlené použití stejné ocelové mřížky jako pracovní i protielektrody bylo přehodnoceno po výsledku experimentu v Erlenmeyerově baňce s PBS, kdy došlo ke korozi elektrod. Byla tedy zvolena odlišná, robustnější ocelová mřížka, která byla následně ve spojení s původní ocelovou mřížkou jako pracovní elektrodou otestována v jednodílné cele za použití média jako elektrolytu. Z výsledků těchto experimentů vyplynul ideální potenciál pro produkci peroxidu ve spojení s touto kombinací elektrod jako $-0,7$ V. Tento potenciál byl použit pro následný test.



Obrázek 42: Experiment v Erlenmeyerově baňce s kultivačním médiem za použití oceli jako pracovní i protielektrody (a – graf závislosti elektrického proudu na čase, b – graf závislosti koncentrace peroxidu na čase)

Na Obrázku 42a můžeme vidět závislost elektrického proudu na čase. Během tohoto experimentu došlo k několika neočekávaným událostem jako například rozbítí motoru třepačky, který bylo v průběhu experimentu nutné vyměnit. Došlo tedy k pozastavení míchání na určitou dobu, po kterou byl ale stále aplikován potenciál na elektrody a měřen peroxid. Výsledky koncentrace peroxidu je možné vidět na Obrázku 42b. Můžeme vidět, že nejprve došlo k nárůstu koncentrace peroxidu i během období, kdy roztok nebyl míchán. Poté v době, kdy došlo k výměně motoru, začala koncentrace pomalu klesat. Hodnoty koncentrace peroxidu při použití těchto elektrod nejsou nijak vysoké, a jsou dokonce nižší, než jakých bylo dosaženo se stejnými elektrodami a elektrolytem v jednokomorové cele. Příčinou může být i již zmíněná rozbitá třepačka a následný nedostatek míchání. Vzhledem k těmto výsledkům byl proveden i výpočet poměru velikosti elektrod použitých v jednoduché cele a Erlenmeyerově baňce. Poměr objemu elektrolytu v jednokomorové cele a baňce činí zhruba 1:10. Poměr pracovní elektrody je 1:11, zatímco poměr protielektrody je pouze 1:6. Je tedy možné, že dochází k limitaci ději probíhajícími na protielektrodě, jelikož její velikost není dostatečná.

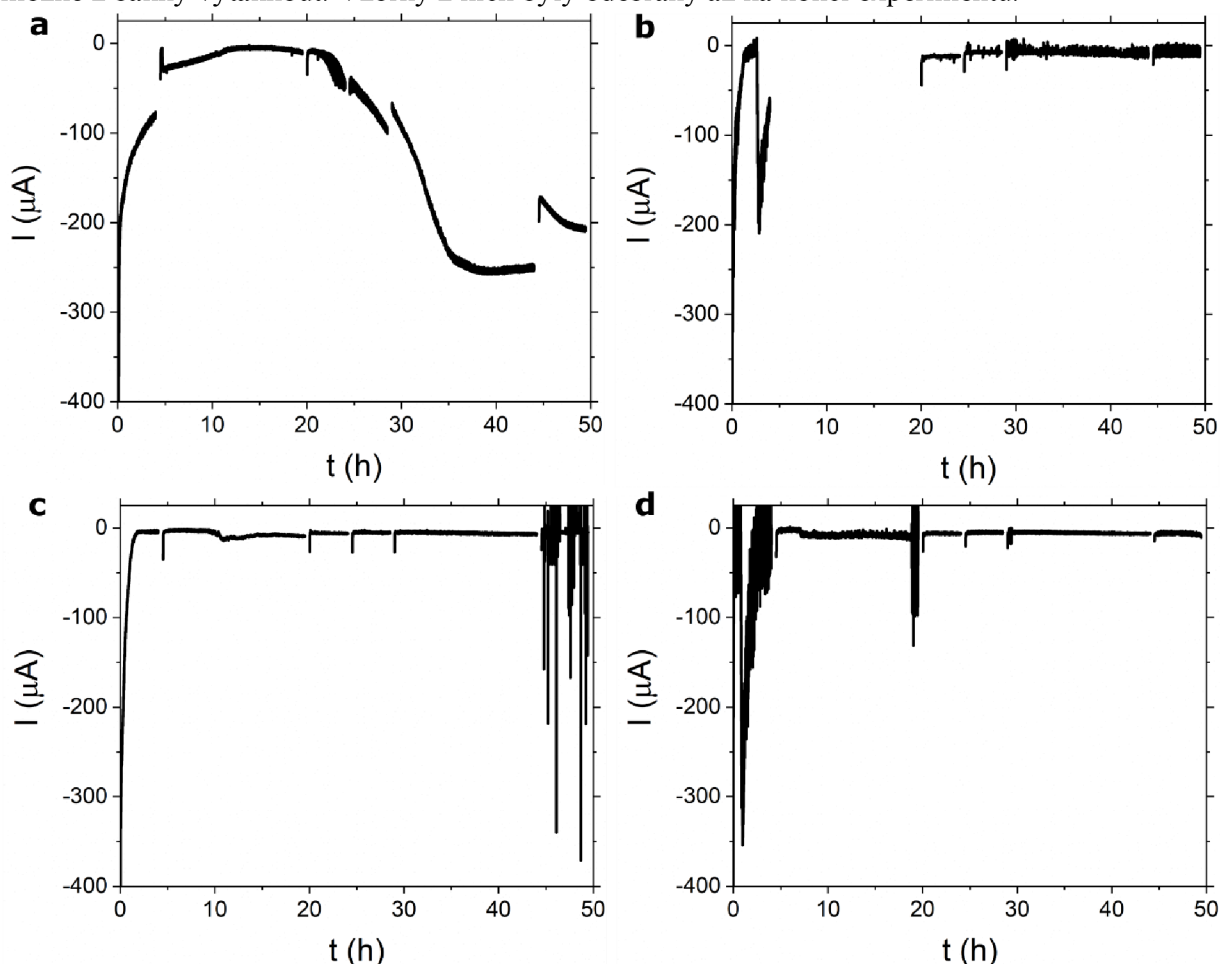
Přesto tyto výsledky nejsou příliš uspokojivé z hlediska koncentrace produkovaného peroxidu, bylo na základě dostupnosti elektrodoých materiálů rozhodnuto vyzkoušet tyto elektrody i při kultivačních experimentech.

6.10 Výsledky kultivačních experimentů

Poznatky získané během všech předchozích experimentů byly nakonec využity pro biotechnologickou aplikaci, a to při kultivaci bakteriálního kmene *Cupriavidus necator* H16. Tyto bakterie jsou schopny produkce polyhydroxyalkanoátů, a ta může být za určitých podmínek zvýšena. Naším cílem bylo bakterie vystavit oxidačnímu stresu ve formě *in situ* generovaného peroxidu právě za účelem navýšení produkce PHA. Do Erlenmeyerových baněk obsahující inokulované médium byly vloženy elektrodové systém a po vybranou dobu byl na elektrody

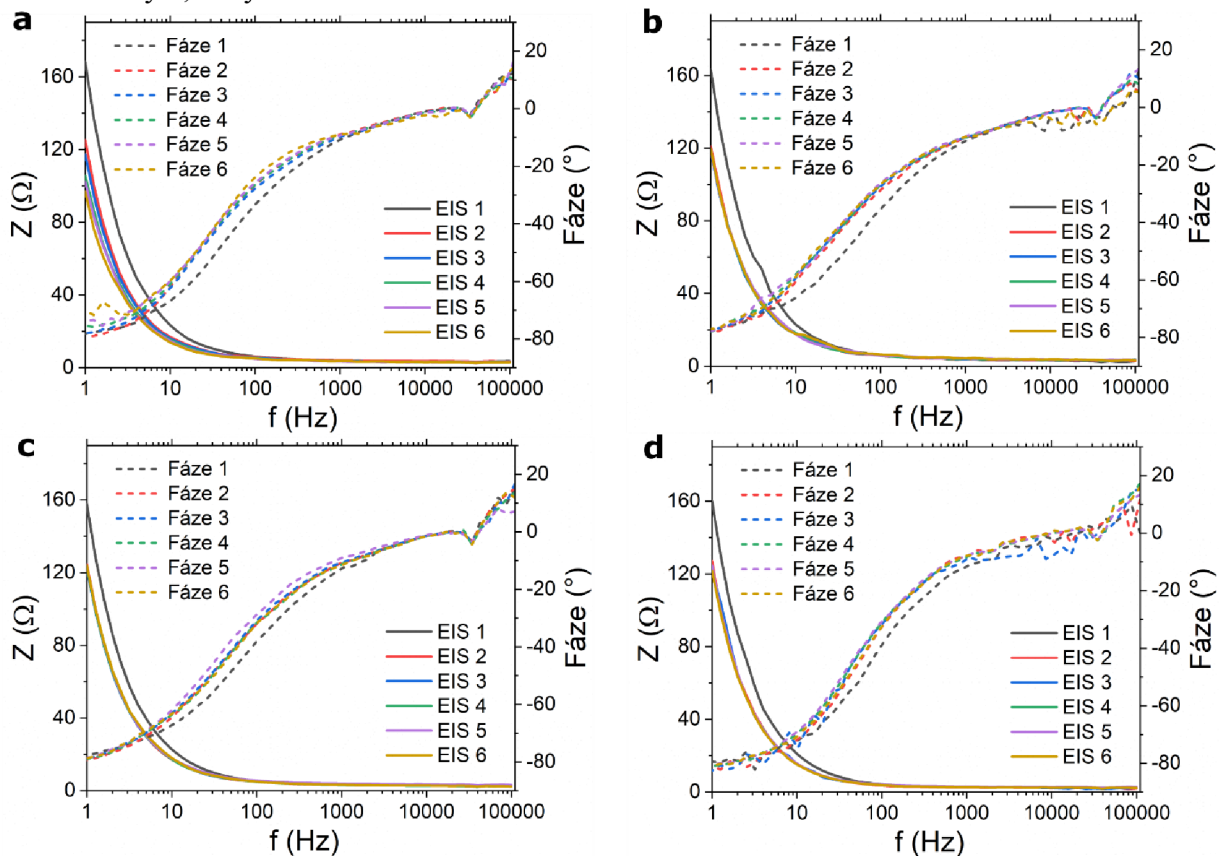
přiváděn potenciál $-0,7$ V. Kultivace nejprve probíhala 24 hodin bez aplikace stresu a následně po nárůstu buněk byl aplikován stres po dobu dalších dvou dnů. Stresování bylo v průběhu kultivace několikrát přerušeno z důvodu nutnosti odběru vzorků média z baněk. Po přerušení experimentu byla vždy měřena elektrochemická impedanční spektroskopie. Tato metoda nám umožňuje ukázat, jak se mění odpor elektrod v průběhu experimentu, což může značit nárůst biofilmu na elektrodách. Po odběru vzorků byl opět na elektrody přiveden potenciál a experiment pokračoval dál. Jelikož byl v daném experimentu využit potenciostat, který umožňuje ovládání až 8 kanálů najednou, bylo v daném experimentu k dispozici 8 baněk.

Celý experiment probíhal v 8 Erlenmeyerových baňkách, kdy dvě baňky sloužily jako kontrola bez přítomnosti elektrodového systému a dvě baňky jako kontrola s elektrodovým systémem, ale bez aplikace stresu a zbylé 4 baňky, u kterých probíhalo stresování. Během experimentu byly odebrány vzorky ze všech baněk kromě kontroly s elektrodami K2 a vzorku V1. V jejich případě došlo totiž během sterilace v autoklávu k potrhání plastového držáku elektrod, a ty následně nebylo možné z baňky vytáhnout. Vzorky z nich byly odebrány až na konci experimentu.



Obrázek 43: Grafy závislosti elektrického proudu na čase (a – vzorek V1, b – vzorek V2, c – vzorek V3, d – vzorek V4)

Na Obrázku 43 můžeme vidět závislosti elektrického proudu na čase pro jednotlivé vzorky. Na první pohled je vidět, že graf na Obrázku 43a se liší od tří ostatních, a to jak tvarem, tak hodnotami dosaženého proudu. Vzhledem k tomu, že se jedná o vzorek v baňce, ve které nebylo možné provádět odběry v průběhu experimentu, byl důvod tohoto nestandardního chování prozkoumán až po skončení experimentu. U ostatních grafů je patrné, že proud nedosahuje takových hodnot, jaké byly očekávané. Hodnoty se pohybují v rozmezí od $-15 \mu\text{A}$ do $-5 \mu\text{A}$, což značí nepříliš vysokou produkci peroxidu. Vzhledem k faktu, že v průběhu těchto experimentů koncentrace peroxidu měřena nebyla, nebylo možné tuto domněnku ověřit.

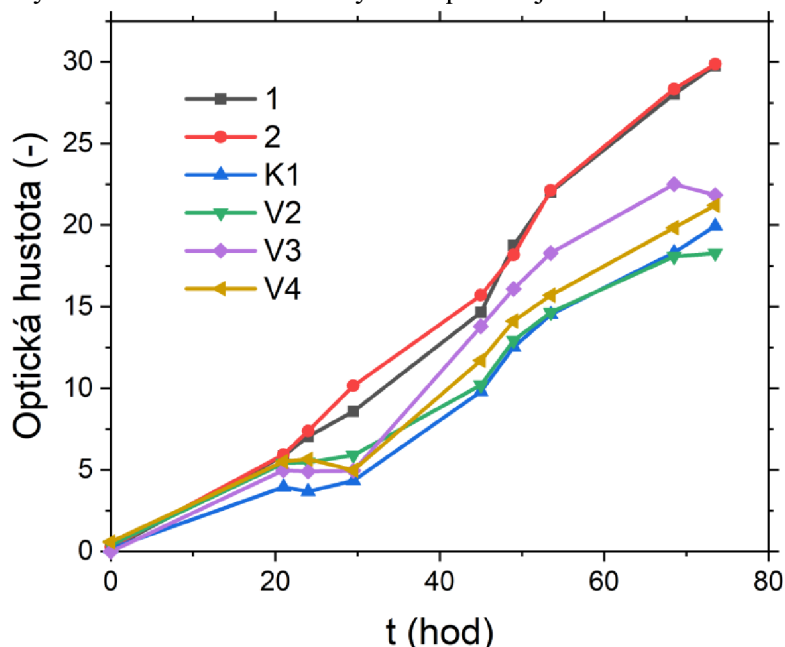


Obrázek 44: Bodeho diagram (a – vzorek V1, b – vzorek V2, c – vzorek V3, d – vzorek V4)

Na Obrázku 44 můžeme vidět Bodeho diagramy, které znázorňují výsledky měření impedanční spektroskopie pro jednotlivé vzorky. Měření proběhlo celkem 6x s tím, že první měření bylo provedeno před začátkem aplikace stresu. Ze všech grafů je patrné, že impedance před aplikací stresu byla vyšší než v průběhu stresování. Grafy na Obrázku 44b,c,d mají obdobné výsledky, liší se pouze graf na Obrázku 44a, který přísluší vzorku V1, u kterého byl pozorován i nestandardní průběh závislosti proudu na čase. Z grafů vyplývá že v průběhu experimentu se impedance nezvyšovala, a tedy můžeme říct, že případný biofilm, který narostl na elektrodách, neměl vliv na odpor elektrod.

Během experimentů byly vždy několikrát denně odebírány z baněk vzorky pro změření optické hustoty, za účelem pozorování růstu buněk. Vzorky nebyly odebírány z baňky kontroly

s elektrodami K2 a vzorku V1, z důvodu již zmíněné nemožnosti vytažení elektrodového systému. Výsledky měření optické hustoty je možné vidět na Obrázku 45. Z grafu je možné si všimnout, že výrazně vyšší optické hustoty dosahují kontroly (1 a 2), které v baňce nemají zabudovaný systém elektrod. Z tohoto výsledku vyplývá, že i samotná přítomnost elektrod v médiu ovlivňuje bakteriální růst (K1). Může to být způsobeno nepříznivým vlivem přítomnosti kovů či plastů v médiu. Pokud se podíváme na výsledky optické hustoty pro kontrolu s elektrodami a vzorky, můžeme říci, že růst biomasy u kontrol s elektrodami ještě vzrůstal oproti vzorkům. Vzhledem k tomu, že neustále docházelo k růstu kultur u kontrol, bylo by vhodné daný experiment zopakovat a prodloužit kultivační dobu. Nicméně design experimentu byl navrhnout a proveden dle standardních kultivačních protokolů pro bakteriální kmen *C. necator* H16 za účelem vysoké produkce PHB. Přestože u vzorku V1 nebylo možné měřit optickou hustotu, bylo možné vizuálně vyhodnotit, že buňky v tomto vzorku rostou výrazně pomaleji než v ostatních baňkách.



Obrázek 45: Graf závislosti optické hustoty kultury *C. necator* H16 na čase

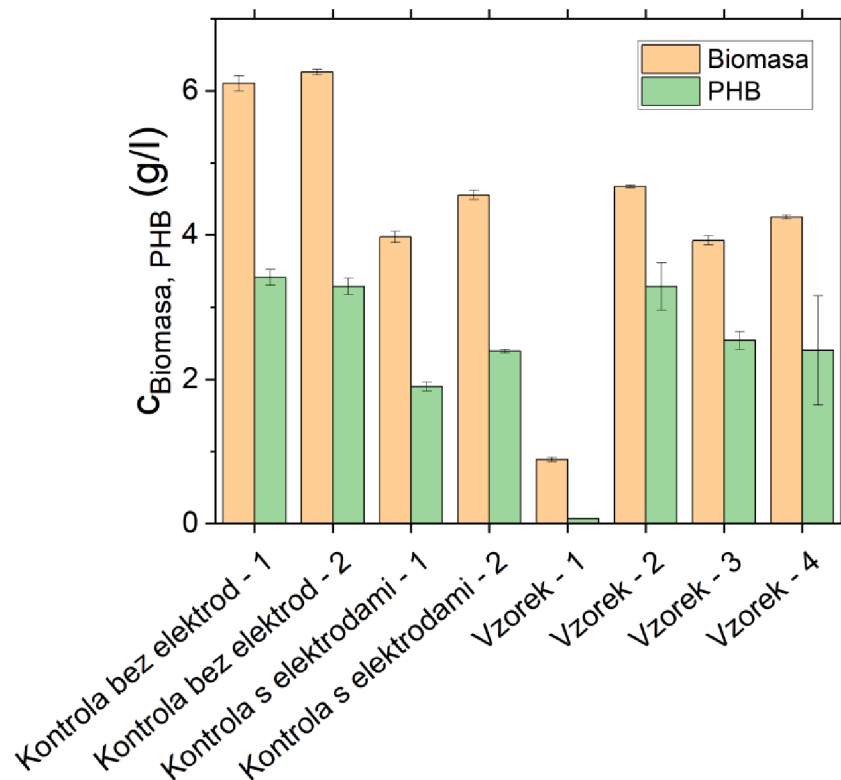
Po vyjmutí elektrod z baňek byly všechny elektrodové systémy důkladně prozkoumány a bylo zjištěno, že referenční elektroda ve vzorku V1, který vykazoval nestandardní chování po celou dobu experimentu, je poničená. Došlo tedy nejspíše k tomu, že na elektrody byl aplikován jiný než nastavený potenciál, pravděpodobně značně vyšší, což nepříznivě ovlivnilo růst buněk.

Stanovená koncentrace biomasy v gramech vztažená na litr média je vyobrazena na Obrázku 46. Z výsledků je patrné, že nejvíce biomasy bylo produkováno v kontrolách bez elektrodových systémů. To potvrzuje výsledky zjištěné při měření optické hustoty. Množství biomasy v kontrolách s elektrodovými systémy a ve vzorcích s aplikovaným stresem se výrazně neliší, což se opět shoduje s výsledky měření optické hustoty.

Na Obrázku 46 je možné vidět i výsledky stanovení koncentrace PHB pomocí GC-FID. Jak již bylo prokázáno mnoha publikacemi (viz např. kapitola 3), je možné u kmene *C. necator* H16 zvýšit

produkci PHA aplikováním stresových podmínek. Cílem experimentu bylo otestovat jejich produkované množství při vystavení oxidativnímu stresu v podobě peroxidu vodíku. Bakterie se nepříznivým, tedy stresovým podmínkám mohou bránit různými způsoby. Jedním z nich je právě syntéza polymerů, v tomto případě PHA. Jak již bylo popsáno v teoretické části, tak oxidační stres může ovlivnit enzym glukóza-6-fosfát dehydrogenázu (G6PD), což může vést ke zvýšení poměru NADPH/NADP⁺. Koncentrace NADP(H) ovlivňuje směřování acetyl-CoA buď do citrátového cyklu nebo do dráhy syntézy PHA. V důsledku oxidačního stresu může tedy dojít k přesměrování toku acetyl-CoA, a tím dojde i ke zvýšené syntéze PHA.

Z výsledků na Obrázku 46 vyplývá, že koncentrace PHB v g/l média je nejvyšší v kontrolách bez elektrodových systémů. Pokud porovnáme kontroly s elektrodami a vzorky, uvidíme, že ve vzorcích, kde probíhalo stresování, je zastoupení PHB vyšší. Z předchozích výsledků, tedy z grafu optické hustoty a koncentrace biomasy se ale zdálo, že kontroly s elektrodami a vzorky poskytují totožné výsledky a chování. Z analýzy obsahu PHB vyplývá, že samotná přítomnost elektrod má na růst buněk nepříznivý vliv, který ústí v nižší produkci biomasy a nižší celkovou produkci PHB vztáženou na objem média. Pokud se podíváme na výsledky analýzy koncentrace PHB, můžeme si všimnout, že celková koncentrace PHB je nižší u vzorků oproti kontrolám bez elektrod, ale poměr produkované biomasy a PHB se značně liší. Aplikaci stresu tedy došlo k nárůstu obsahu PHB v biomase.



Obrázek 46: Výsledky koncentrace biomasy a PHB

Poslední analýza byla zaměřena na stanovení koncentrace peroxidu vodíku, kde bylo zjištěno, že ve vzorcích se nenachází žádný peroxid. Je tedy pravděpodobné, že veškerý produkovaný peroxid byl buňkami odbourán. Dalším možným vysvětlením je jeho ztráta v průběhu centrifugování a přípravy vzorků. Pravděpodobnější je ale první teorie, jelikož na základě experimentu provedeného v Erlenmeyerově baňce se stejnými elektrodami a médiem bylo zjištěno, že koncentrace produkovaného peroxidu je velmi nízká, a tak mohlo dojít k jeho celkovému odbourání skrze protektivní mechanismy bakteriálních buněk.

I přes nízkou koncentraci produkovaného peroxidu vybranými elektrodami bylo dosaženo uspokojivých výsledků a bylo prokázáno, že tato metoda stresování bakterií funguje. Na základě výsledků experimentů v této diplomové práci je možné usuzovat, že při použití jiných elektrodových materiálů, například titanového drátu jako protielektrody, by bylo možné bakterie stresovat efektivněji, což by mohlo vyústit v ještě vyšší produkci PHB. Pro nalezení ideálních parametrů a jejich kombinace s co nejefektivnějším účinkem na dané bakterie, je ale potřeba provést mnoho dalších testů.

7 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá zkoumáním elektrochemických reakcí vedoucích k syntéze peroxidu vodíku, konkrétně redukcí kyslíku na katodě. Cílem práce bylo prozkoumat závislost produkovaného množství peroxidu vodíku na několika vybraných parametrech, jako je katodový potenciál, elektrodový materiál, geometrie měřící cely či rychlost míchání, a poznatky následně aplikovat při kontinuálním stresování bakterie *Cupriavidus necator* H16, za účelem zvýšené produkce polyhydroxyalkanoátů

K účelům prvotních screeningových testů byl vyroben minireaktor, měřící cela, ve které byly prováděny všechny experimenty. Měřící cela byla vyrobena ve dvou provedeních, a to jednodokomorová a dvoudokomorová. U počátečních experimentů byl jako elektrolyt využit fosfátový pufr.

Nejprve byl zkoumán vliv potenciálu aplikovaného na pracovní elektrodu na koncentraci produkovaného peroxidu. V rámci těchto experimentů byl hodnocen i vliv typu měřící cely a materiálu pracovní elektrody. Z těchto experimentů vyplývá, že ideální potenciál pro syntézu peroxidu leží mezi $-0,4$ V až $-0,5$ V. Efektivnější z hlediska koncentrace peroxidu je dvoudokomorová cela, jelikož na anodě nedochází ke zpětné oxidaci již vzniklého peroxidu, nicméně pro následující biotechnologické aplikace tato geometrie cely není vhodná. Co se týče materiálů tak jak platina, tak i zlato prokázaly schopnost katalyzovat redukcí kyslíku za vzniku peroxidu. Tyto poznatky však nebyly konzistentní s výsledky studie, na jejímž základě byly tyto materiály vybrány, kde autoři tvrdili, že platina se hodí spíše k účelům odkysličení roztoků, zatímco zlato je schopné vysoké produkce peroxidu.

Další parametr, který může ovlivnit množství produkovaného peroxidu, je míchání, které ovlivňuje rychlost přísunu kyslíku k pracovní elektrodě. Bylo zjištěno, že se zvyšováním otáček míchadla dojde při určité hodnotě k ustálení a při dalším zvýšení již koncentrace neroste nebo roste nevýznamnou rychlostí. Tato hodnota byla pro jednodokomorovou celu stanovena na 600 rpm a pro dvoudokomorovou celu na 900 rpm. Pro pozdější experimenty byla vybrána rychlost otáčení 900 rpm.

Vzhledem k účelu použití této metody, byly jako materiál pracovní elektrody vybrány ocelové mřížky, které se svými vlastnostmi hodí pro výrobu elektrodových systémů pro Erlenmeyerovy baňky. Jako materiál protielektrody byl využit titanový drát či ocelová mřížka. S těmito materiály byl proveden i test stability, kdy bylo potvrzeno, že zařízení je schopné produkovat peroxid v řádu několika dnů, což je dostačující doba pro bakteriální kultivace.

Experimenty byly po vybrání vhodných materiálů provedeny i v minerálním kultivačním médiu, které je běžně využíváno při kultivacích bakteriálního kmene *Cupriavidus necator* H16. Bylo zjištěno, že ideální potenciál pro produkci peroxidu se značně liší od dříve používaného elektrolytu, kterým bylo PBS. Pro kombinaci ocelová pracovní elektroda a titanová protielektroda byl tento potenciál $-0,65$ V, pro kombinaci ocelová pracovní elektroda a ocelová protielektroda pak $-0,7$ V. Posun potenciálu lze vysvětlit jiným složením elektrolytu, zejména rozdílnou koncentrací

chloridových iontů. Vzhledem k rozdílnému složení elektrolytu nedosahuje produkce peroxidu takového množství jako při použití PBS, nicméně peroxid stále vzniká v uspokojivém množství.

Před samotnými kultivačními experimenty byly všechny získané poznatky otestovány také ve větším měřítku, tedy Erlenmeyerově baňce o objemu 250 ml, která se běžně používá při kultivacích bakterií. Byla zkoumána produkce peroxidu jak při použití PBS, tak kultivačního média, a zároveň byly otestovány i dostupné elektrodové materiály. Při kombinaci ocelové mřížky jako pracovní elektrody a titanového drátu jako protielektrody bylo dosaženo koncentrace peroxidu blízké se k 800 μM , avšak pouze za použití PBS. Při experimentech v kultivačním médiu byla dosažena koncentrace pouze okolo 140 μM . Za použití ocelové mřížky jako pracovní elektrody i protielektrody bylo v kultivačním médiu dosaženo koncentrace okolo 25 μM .

Přestože kombinace s titanovou protielektrodou vykazuje téměř 6x efektivnější produkci peroxidu, byla, vzhledem k dostupnosti materiálu, pro kultivační experimenty vybrána kombinace ocelové pracovní a ocelové protielektrody.

Bakterie byly kultivovány v zastoupení dvou kontrol bez přítomnosti elektrod v baňce, dvou kontrol s elektrodami v baňce a čtyř vzorků obsahujících v baňce elektrody, na které byl přiváděn potenciál. Během kultivace byla spektrofotometricky měřena optická hustota odebraných vzorků média za účelem pozorování nárůstu biomasy. Biomasa byla po skončení experimentu analyzována i gravimetricky a následně z ní byly připraveny vzorky pro analýzu pomocí GC-FID za účelem zjištění obsahu PHB.

Ze zjištěných výsledků vyplývá, že nejvyšší nárůst biomasy byl dosažen u kontrol, které neobsahovaly elektrodové systémy. Množství biomasy bylo v kontrolách s elektrodami a ve vzorcích velmi podobné. Co ale bylo značně odlišné u kontrol s elektrodami a vzorků, byl obsah PHB v biomase. Z výsledků lze jednoznačně vyvodit, že aplikace oxidačního stresu má vliv na biosyntézu polymeru u daného bakteriálního kmene. Samotná přítomnost elektrod má tedy na bakteriální buňky nepříznivý vliv, nicméně v kombinaci s aplikovaným stresem dochází k žádoucí stresové odpovědi a buňky produkují více PHB. Celkový výtěžek PHB u vzorků je ale nižší než v případě kontrol bez elektrod, vzhledem k nižšímu nárůstu biomasy.

Dle naměřených dat lze říci, že testovaná metoda splnila očekávání, a podařilo se prokázat, že vlivem oxidačního stresu způsobeného peroxidem vodíku generovaným *in situ* je možné dosáhnout zvýšené produkce PHB. Nicméně tato metoda má ještě řadu nedostatků a je zde velký prostor pro optimalizaci. Jako první se nabízí otestování druhé kombinace materiálů, tedy ocelové mřížky jako pracovní elektrody a titanového drátu jako protielektrody, kdy v důsledku vyšší produkce peroxidu může dojít i k většímu působení stresu a následnému zvýšení syntézy PHB. Vhodné by bylo prozkoumat i další materiály a jejich vliv na organismy a také vytvořit elektrodové systémy s jinou geometrií tak, aby usnadnily manipulaci a odebírání vzorků.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ZHOU, Wei, Xiaoxiao MENG, Jihui GAO a Akram N. ALSHAWABKEH. Hydrogen peroxide generation from O₂ electroreduction for environmental remediation: A state-of-the-art review. *Chemosphere* [online]. 2019, **225**, 588-607 [cit. 2023-01-06]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2019.03.042
- [2] JIANG, Yuanyuan, Pengjuan NI, Chuanxia CHEN, Yizhong LU, Ping YANG, Biao KONG, Adrian FISHER a Xin WANG. Selective Electrochemical H₂O₂ Production through Two-Electron Oxygen Electrochemistry. *Advanced Energy Materials* [online]. 2018, **8**(31) [cit. 2023-01-02]. ISSN 16146840. Dostupné z: doi:10.1002/aenm.201801909
- [3] ABDOLLAHI, M. a A. HOSSEINI. Hydrogen Peroxide. In: *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition* [online]. B.m.: Elsevier, 2014, s. 967–970 [cit. 2022-12-30]. ISBN 9780123864543. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-386454-3.00736-3
- [4] GOOR, Gustaaf, Jürgen GLENNEBERG a Sylvia JACOBI. Hydrogen Peroxide. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007, s. 393–427. [cit. 2022-11-20]. Dostupné z: doi:10.1002/14356007.a13_443.pub2
- [5] HESS, Wayne T. Hydrogen Peroxide. In: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* [online]. B.m.: Wiley, 2000 [cit. 2023-01-15]. Dostupné z: doi:10.1002/0471238961.0825041808051919.a01
- [6] BOURGOUGNOUN, A. ON THE REACTION OF HYDROGEN PEROXIDE WITH POTASSIUM PERMANGANATE IN PRESENCE OF SULPHURIC ACID. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 1889, **11**(6), 94–98. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja02126a008
- [7] FURMAN, N Howell a John H WALLACE. APPLICATIONS OF CERIC SULFATE IN VOLUMETRIC ANALYSIS. VI. OXIDATION OF HYDROGEN PEROXIDE BY CERIC SULFATE. INDIRECT DETERMINATION OF LEAD. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 1929, **51**(5), 1449–1453. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja01380a020
- [8] LUSHCHAK, Volodymyr I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2014, **224**, 164-175 [cit. 2023-01-10]. ISSN 00092797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2014.10.016
- [9] HANCOCK, J.T., R. DESIKAN a S.J. NEILL. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochemical Society Transactions* [online]. 2001, **29**(2), 345–350 [cit. 2023-01-09]. ISSN 03005127. Dostupné z: doi:10.1042/0300-5127:0290345
- [10] DOTSCHE, Werner a WOOST OTMAR. AQUEOUS SOLUTION FOR THE CHEMICAL STERILIZATION OF PACKAGING MATERIALS, PROCESS FOR ITS PREPARATION AND ITS USE. US 7,776,261 B2. 17. srpen 2010. US.
- [11] URBAN, Michael Vincent, Thomas RATH a Christine RADTKE. Hydrogen peroxide (H₂O₂): a review of its use in surgery. *Wiener Medizinische Wochenschrift* [online].

- 2019, **169**(9-10), 222-225 [cit. 2022-12-29]. ISSN 0043-5341. Dostupné z: doi:10.1007/s10354-017-0610-2
- [12] MARSHALL, Milton V., Lewis P. CANCRO a Stuart L. FISCHMAN. Hydrogen Peroxide: A Review of Its Use in Dentistry. *Journal of Periodontology* [online]. 1995, **66**(9), 786–796 [cit. 2022-12-29]. ISSN 0022-3492. Dostupné z: doi:10.1902/jop.1995.66.9.786
- [13] ALKAHTANI, Rawan, Simon STONE, Matthew GERMAN a Paula WATERHOUSE. A review on dental whitening. *Journal of Dentistry* [online]. 2020, **100** [cit. 2022-12-29]. ISSN 03005712. Dostupné z: doi:10.1016/j.jdent.2020.103423
- [14] PELIN, George, Cornel STOICA, Cristina Elisabeta PELIN a Raluca BALASA. High concentration hydrogen peroxide for rocket fuel applications. *INCAS Bulletin* [online]. 2020, **12**(3), 151–157 [cit. 2022-12-29]. ISSN 22474528. Dostupné z: doi:10.13111/2066-8201.2020.12.3.12
- [15] KOPACZ, Wioleta, Adam OKNINSKI, Anna KASZTANKIEWICZ, Paweł NOWAKOWSKI, Grzegorz RARATA a Paweł MAKSIMOWSKI. Hydrogen peroxide – A promising oxidizer for rocket propulsion and its application in solid rocket propellants. *FirePhysChem* [online]. 2022, **2**(1), 56–66 [cit. 2022-12-29]. ISSN 26671344. Dostupné z: doi:10.1016/j.fpc.2022.03.009
- [16] ASGHAR, Anam, Abdul Aziz ABDUL RAMAN a Wan Mohd Ashri WAN DAUD. Advanced oxidation processes for in-situ production of hydrogen peroxide/hydroxyl radical for textile wastewater treatment: a review. *Journal of Cleaner Production* [online]. 2015, **87**, 826-838 [cit. 2022-12-30]. ISSN 09596526. Dostupné z: doi:10.1016/j.jclepro.2014.09.010
- [17] KITIS, M., A. AKCIL, E. KARAKAYA a N. O. YIGIT. Destruction of cyanide by hydrogen peroxide in tailings slurries from low bearing sulphidic gold ores. *Minerals Engineering* [online]. 2005, **18**(3), 353–362 [cit. 2022-12-30]. ISSN 08926875. Dostupné z: doi:10.1016/j.mineng.2004.06.003
- [18] ARANGURI LLERENA, Gonzalo a Iván Alberto REYES LÓPEZ. Cyanide Degradation from Mining Effluent Using Two Reagents: Sodium Metabisulphite and the Metabisulphite Mixture with Hydrogen Peroxide. *TECCIENCIA* [online]. 2019, **13**(25), 1–9 [cit. 2022-12-30]. ISSN 19093667. Dostupné z: doi:10.18180/tecciencia.2018.25.1
- [19] OBRUCA, Stanislav, Ivana MAROVA, Marie STANKOVA, Ludmila MRAVCOVA a Zdenek SVOBODA. Effect of ethanol and hydrogen peroxide on poly(3-hydroxybutyrate) biosynthetic pathway in *Cupriavidus necator* H16. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2010b, **26**(7), 1261–1267 [cit. 2023-01-15]. ISSN 09593993. Dostupné z: doi:10.1007/s11274-009-0296-8
- [20] CAMPOS-MARTIN, Jose M., Gema BLANCO-BRIEVA a Jose L.G. FIERRO. *Hydrogen peroxide synthesis: An outlook beyond the anthraquinone process* [online].]. 2006, **45**(42), 6962-6984 [cit. 2022-12-30]. ISSN 14337851. Dostupné z: doi:10.1002/anie.200503779
- [21] ANANTHARAJ, Sengeni, Sudhagar PITCHAIMUTHU a Suguru NODA. A review on recent developments in electrochemical hydrogen peroxide synthesis with a critical assessment of perspectives and strategies. *Advances in Colloid and Interface*

- Science* [online]. 2021, **287** [cit. 2022-12-31]. ISSN 00018686. Dostupné z: doi:10.1016/j.cis.2020.102331
- [22] LUNSFORD, Jack H. The direct formation of H₂O₂ from H₂ and O₂ over palladium catalysts. *Journal of Catalysis* [online]. 2003, **216**(1-2), 455-460 [cit. 2022-12-31]. ISSN 00219517. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9517(02)00070-2
- [23] EDWARDS, Jennifer K., Simon J. FREAKLEY, Albert F. CARLEY, Christopher J. KIELY a Graham J. HUTCHINGS. Strategies for designing supported gold-palladium bimetallic catalysts for the direct synthesis of hydrogen peroxide. *Accounts of Chemical Research* [online]. 2014, **47**(3), 845–854 [cit. 2022-12-31]. ISSN 15204898. Dostupné z: doi:10.1021/ar400177c
- [24] SUNDÉN, Bengt. Electrochemistry and thermodynamics. In: *Hydrogen, Batteries and Fuel Cells* [online]. B.m.: Elsevier, 2019, s. 15–36 [cit. 2023-01-15]. ISBN 9780128169506. Dostupné z: doi:10.1016/b978-0-12-816950-6.00002-6
- [25] CIOBANU, Madalina, Jeremy P WILBURN, Morgan L KRIM a David E CLIFFEL. Fundamentals. In: *Handbook of Electrochemistry 3* [online]. B.m.: Elsevier, 2007, s. 3–27 [cit. 2023-01-15]. ISBN 9780444519580. Dostupné z: doi:10.1016/B978-044451958-0.50002-1
- [26] MEIDINGER, Heinrich. Ueber voltametrische Messungen. *Annalen der Chemie und Pharmacie* [online]. 1853, **88**(1), 51–81 [cit. 2023-01-06]. ISSN 00754617. Dostupné z: doi:10.1002/jlac.18530880103
- [27] BERTHELOT, M. Sur la formation de l'eau oxygénée, de l'ozone et de l'acide persulfurique pendant l'électrolyse. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. 1878, **86**, 71–76.
- [28] WENDT, Hartmut a gerhard KREYSA. *Electrochemical engineering: science and technology in chemical and other industries*. B.m.: Springer Science & Business Media, 1999.
- [29] ZHAO, Jinyu, Jie LIAN, Zhenxin ZHAO, Xiaomin WANG a JiuJun ZHANG. A Review of In-Situ Techniques for Probing Active Sites and Mechanisms of Electrocatalytic Oxygen Reduction Reactions. *Nano-Micro Letters* [online]. 2023, **15**(1) [cit. 2023-01-15]. ISSN 21505551. Dostupné z: doi:10.1007/s40820-022-00984-5
- [30] RAJ, C. Retna, Arpan SAMANTA, Seung Hyo NOH, Siniya MONDAL, Takeyoshi OKAJIMA a Takeo OHSAKA. *Emerging new generation electrocatalysts for the oxygen reduction reaction* [online]. B.m.: Royal Society of Chemistry. 2016. ISSN 20507496. Dostupné z: doi:10.1039/c6ta03300h
- [31] SIRÉS, Ignasi, Enric BRILLAS, Mehmet A. OTURAN, Manuel A. RODRIGO a Marco PANIZZA. Electrochemical advanced oxidation processes: Today and tomorrow. A review. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2014, **21**(14), 8336–8367 [cit. 2023-01-06]. ISSN 16147499. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-014-2783-1
- [32] ZHANG, Haichuan, Xinyuan WAN, Guanghe LI a Fang ZHANG. A Three-electrode Electro-Fenton System Supplied by Self-generated Oxygen with Automatic pH-regulation

- for Groundwater Remediation. *Electrochimica Acta* [online]. 2017, **250**, 42–48 [cit. 2023-01-06]. ISSN 00134686. Dostupné z: doi:10.1016/j.electacta.2017.08.040
- [33] DAS, Srijib, Souvik GHOSH, Tapas KUILA, Naresh Chandra MURMU a Aniruddha KUNDU. Biomass-Derived Advanced Carbon-Based Electrocatalysts for Oxygen Reduction Reaction. *Biomass* [online]. 2022, **2**(3), 155–177 [cit. 2023-01-06]. Dostupné z: doi:10.3390/biomass2030010
- [34] TRAUBE, Moritz. Ueber die elektrolytische Entstehung des Wasserstoffhyperoxyds an der Anode. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* [online]. 1887, **20**(2), 3345–3351. Dostupné z: doi:10.1002/cber.188702002250
- [35] FOLLER, P. C. a R. T. BOMBARD. Processes for the production of mixtures of caustic soda and hydrogen peroxide via the reduction of oxygen. *Journal of Applied Electrochemistry* [online]. 1995, **25**, 41 [cit. 2023-01-03]. ISSN 0021-891X. Dostupné z: doi:10.1007/BF00241923
- [36] YAMANAKA, Ichiro a Toru MURAYAMA. Neutral H₂O₂ synthesis by electrolysis of water and O₂. *Angewandte Chemie - International Edition* [online]. 2008, **47**(10), 1900–1902 [cit. 2023-01-03]. ISSN 14337851. Dostupné z: doi:10.1002/anie.200704431
- [37] FORTUNATO, Guilherme V., Enrico PIZZUTILO, Andrea M. MINGERS, Olga KASIAN, Serhiy CHEREVKO, Eduardo S.F. CARDOSO, Karl J.J. MAYRHOFER, Gilberto MAIA a Marc LEDENDECKER. Impact of Palladium Loading and Interparticle Distance on the Selectivity for the Oxygen Reduction Reaction toward Hydrogen Peroxide. *Journal of Physical Chemistry C* [online]. 2018, **122**(28), 15878–15885 [cit. 2023-01-06]. ISSN 19327455. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jpcc.8b04262
- [38] JIRKOVSKÝ, Jakub S., Itai PANAS, Elisabet AHLBERG, Matej HALASA, Simon ROMANI a David J. SCHIFFRIN. Single atom hot-spots at Au-Pd nanoalloys for electrocatalytic H₂O₂ production. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2011, **133**(48), 19432–19441 [cit. 2023-01-06]. ISSN 00027863. Dostupné z: doi:10.1021/ja206477z
- [39] SIAHROSTAMI, Samira, Arnau VERDAGUER-CASADEVALL, Mohammadreza KARAMAD, et al. Enabling direct H₂O₂ production through rational electrocatalyst design. *Nature Materials* [online]. 2013, **12**(12), 1137–1143 [cit. 2023-01-06]. ISSN 1476-1122. Dostupné z: doi:10.1038/nmat3795
- [40] VERDAGUER-CASADEVALL, Arnau, Davide DEIANA, Mohammadreza KARAMAD, et al. Trends in the Electrochemical Synthesis of H₂O₂: Enhancing Activity and Selectivity by Electrocatalytic Site Engineering. *Nano Letters* [online]. 2014, **14**(3), 1603–1608 [cit. 2023-01-06]. ISSN 1530-6984. Dostupné z: doi:10.1021/nl500037x.
- [41] EHLICH, Jiří, Ludovico MIGLIACCIO, Ihor SAHALIANOV, et al. Direct measurement of oxygen reduction reactions at neurostimulation electrodes. *Journal of Neural Engineering* [online]. 2022, **19**(3) [cit. 2023-01-15]. ISSN 1741-2560. Dostupné z: doi:10.1088/1741-2552/ac77c0

- [42] MARLES-WRIGHT, Jon a Richard J. LEWIS. *Stress responses of bacteria* [online]. prosinec 2007. ISSN 0959440X. Dostupné z: doi:10.1016/j.sbi.2007.08.004
- [43] BOOTH, Ian R. Stress and the single cell: Intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2002, **78**(1–2), 19–30 [cit. 2023-01-08]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-1605(02)00239-8
- [44] RON, Eliora Z. Bacterial stress response. In: *The Prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry* [online]. B.m.: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013, s. 589–603 [cit. 2023-01-08]. ISBN 9783642301414. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-30141-4_79
- [45] MITCHELL, James G. a Kazuhiro KOGURE. Bacterial motility: Links to the environment and a driving force for microbial physics. *FEMS Microbiology Ecology* [online]. 2006, **55**(1), 3–16 [cit. 2023-01-07]. ISSN 01686496. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6941.2005.00003.x
- [46] MOONEY, Rachel Anne, Seth A. DARST a Robert LANDICK. Sigma and RNA polymerase: An on-again, off-again relationship? *Molecular Cell* [online]. 2005, **20**(3), 335–345 [cit. 2023-01-08]. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2005.10.015
- [47] HECKER, Michael a Uwe VÖLKER. General Stress Response of *Bacillus subtilis* and Other Bacteria. In: *Advances in Microbial Physiology* [online]. 2001, s. 35–91 [cit. 2023-01-07]. ISBN 978012027744. Dostupné z: doi:10.1016/S0065-2911(01)44011-2
- [48] YUDKIN, Michael D. a Joanna CLARKSON. Differential gene expression in genetically identical sister cells: The initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* [online]. 2005, **56**(3), 578–589 [cit. 2023-01-08]. ISSN 0950382X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04594.x
- [49] VOROB'EVA, L. I. Stressors, Stress Reactions, and Survival of Bacteria: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology* [online]. 2004, **40**(3), 217–224 [cit. 2023-01-08]. ISSN 0003-6838. Dostupné z: doi:10.1023/B:ABIM.0000025941.11643.19
- [50] WALKER, Graeme M. *Yeast Physiology and Biotechnology*. B.m.: John Wiley & Sons, 1998. ISBN 978-0-471-96446-9.
- [51] KASHMIRI, Z.N. a S.A. MANKAR. Free radicals and oxidative stress in bacteria. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* [online]. 2014, **3**(9), 33–40 [cit. 2023-01-02]. ISSN 2319-7706. Dostupné z: <https://www.ijcmas.com/vol-3-9/Z.N.Kashmiri%20and%20S.A.Mankar.pdf>
- [52] LUSHCHAK, Volodymyr I. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* [online]. 2011, **153**(2), 175–190 [cit. 2023-01-10]. ISSN 15320456. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbpc.2010.10.004
- [53] RAZA, Zulfiqar Ali, Sharjeel ABID a Ibrahim M. BANAT. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration and Biodegradation* [online]. 2018, **126**, 45–56 [cit. 2023-01-11]. ISSN 09648305. Dostupné z: doi:10.1016/j.ibiod.2017.10.001

- [54] VERLINDEN, R. A.J., D. J. HILL, M. A. KENWARD, C. D. WILLIAMS a I. RADECKA. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2007, **102**(6), 1437–1449 [cit. 2023-01-11]. ISSN 13645072. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x
- [55] TSUGE, Takeharu. Metabolic Improvements and Use of Inexpensive Carbon Sources in Microbial Production of Polyhydroxyalkanoates. *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING* [online]. 2002, **94**(6), 579–584 [cit. 2023-01-11]. ISSN 13891723. Dostupné z: doi:10.1016/S1389-1723(02)80198-0
- [56] CARRASCO, F., D. DIONISI, A. MARTINELLI a M. MAJONE. Thermal stability of polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2006, **100**(3), 2111–2121 [cit. 2023-01-11]. ISSN 00218995. Dostupné z: doi:10.1002/app.23586
- [57] AGUS, Jumiarti, Prihardi KAHAR, Hideki ABE, Yoshiharu DOI a Takeharu TSUGE. Molecular weight characterization of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] synthesized by genetically engineered strains of *Escherichia coli*. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2006, **91**(5), 1138–1146 [cit. 2023-01-11]. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2005.07.006
- [58] CHODAK, Ivan. Polyhydroxyalkanoates: Origin, Properties and Applications In: Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources. In: [online]. 2008, s. 451–477 [cit. 2023-01-15]. ISBN 9780080453163. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-045316-3.00022-3
- [59] 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. 2023-01-12]. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/S0079-6700(00)00035-6
- [60] BRESAN, Stephanie, Anna SZNAJDER, Waldemar HAUF, Karl FORCHHAMMER, Daniel PFEIFFER a Dieter JENDROSSEK. Polyhydroxyalkanoate (PHA) granules have no phospholipids. *Scientific Reports* [online]. 2016, **6**. ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/srep26612
- [61] JENDROSSEK, Dieter. Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). *Journal of Bacteriology* [online]. 2009, **191**(10), 3195–3202. ISSN 00219193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.01723-08
- [62] MERRICK, Joseph M., Robert STEGER a Darlene DOMBROSKI. Hydrolysis of native poly(hydroxybutyrate) granules (PHB), crystalline PHB, and artificial amorphous PHB granules by intracellular and extracellular depolymerases. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 1999, **25**, 129–134 [cit. 2023-01-13]. Dostupné z: doi:10.1016/S0141-8130(99)00026-4
- [63] DOI, Yoshiharu, Yasushi KAWAGUCHI, Naoyuki KOYAMA, Shigeo NAKAMURA, Masaya HIRAMITSU, Yoshinori YOSHIDA a Hiroshi KIMURA. Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiology*

- Letters* [online]. 1992, **103**(2–4), 103–108 [cit. 2023-01-13]. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.1992.tb05827.x
- [64] MERGAERT, J., A. WEBB, C. ANDERSON, A. WOUTERS a J. SWINGS. Microbial Degradation of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Poly(3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate) in Soils. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1993, **59**(10), 3233–3238 [cit. 2023-01-13]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/aem.59.10.3233-3238.1993
- [65] KITA, Keiko, Kaori ISHIMARU, Masafumi TERAOKA, Hideshi YANASE a Nobuo KATO. Properties of Poly(3-Hydroxybutyrate) Depolymerase from a Marine Bacterium, *Alcaligenes faecalis* AE122. *Applied and environmental microbiology* [online]. 1995, **61**(5), 1727–1730 [cit. 2023-01-13]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/aem.61.5.1727-1730.1995
- [66] MUKAI, Katsuyuki, Kenji YAMADA a Yoshiharu DOI. Efficient hydrolysis of polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas stutzeri* YM1414 isolated from lake water. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 1994, **43**(3), 319–327 [cit. 2023-01-13]. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/0141-3910(94)90002-7
- [67] TAKEDA, Minoru, Jun-Ichi KOIZUMI, Kenji YABE a Kenji ADACHI. Thermostable Poly(3-hydroxybutyrate) Depolymerase of a Thermophilic Strain of *Leptothrix* sp. Isolated from a Hot Spring. *Journal of Fermentation and Bioengineering* [online]. 1998, **85**(4), 375–380 [cit. 2023-01-13]. ISSN 0922338X. Dostupné z: doi:10.1016/S0922-338X(98)80080-
- [68] MERGAERT, Joris, Caroline ANDERSON, Ann WOUTERS a Jean SWINGS. Microbial Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in Compost. *Journal of Environmental Polymer Degradation* [online]. 1994, **2**(3), 177–183 [cit. 2023-01-13]. ISSN 1064-7564. Dostupné z: doi:10.1007/BF02067443
- [69] NUMATA, Keiji, Hideki ABE a Tadahisa IWATA. Biodegradability of poly(hydroxyalkanoate) materials. *Materials* [online]. 2009, **2**(3), 1104–1126 [cit. 2023-01-11]. ISSN 19961944. Dostupné z: doi:10.3390/ma2031104
- [70] BOHMERT, Karen, Ilse BALBO, Alexander STEINBÜCHEL, Gilbert TISCHENDORF a Lothar WILLMITZER. Constitutive expression of the β -ketothiolase gene in transgenic plants. A major obstacle for obtaining polyhydroxybutyrate-producing plants. *Plant Physiology* [online]. 2002, **128**(4), 1282–1290 [cit. 2023-01-12]. ISSN 00320889. Dostupné z: doi:10.1104/pp.010615
- [71] CHAVAN, Shraddha, Bhoomika YADAV, R.D. TYAGI a Patrick DROGUI. A review on production of polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters by thermophilic microbes using waste feedstocks. *Bioresource Technology* [online]. 2021, **341** [cit. 2023-01-12]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2021.125900
- [72] SINGH, Vaishali a Debabrata DAS. Potential of hydrogen production from biomass. In: *Science and Engineering of Hydrogen-Based Energy Technologies: Hydrogen Production and Practical Applications in Energy Generation* [online]. B.m.: Elsevier, 2018,

- s. 123–164 [cit. 2023-01-12]. ISBN 9780128142516. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814251-6.00003-4
- [73] POIRIER, Yves, Douglas E. DENNIS, Karen KLOMPARENS a Chris SOMERVILLE. Polyhydroxybutyrate a biodegradable thermoplastic produced in transgenic plants. *Science* [online]. 1992, **256**(5056), 520–523 [cit. 2023-01-12]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.256.5056.520
- [74] JOHN, Maliyakal E a Greg KELLER. Metabolic pathway engineering in cotton: Biosynthesis of polyhydroxybutyrate in fiber cells. *Applied Biological Sciences and Associates* [online]. 1996, **93**(23), 12768–12773 [cit. 2023-01-12]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.93.23.12768
- [75] WANG, Yuhua, Zhongyi WU, Xiuhai ZHANG, Guoqiang CHEN, Qiong WU, Conglin HUANG a Qing YANG. Synthesis of medium-chain-length-polyhydroxyalkanoates in tobacco via chloroplast genetic engineering. *Chinese Science Bulletin* [online]. 2005, **50**(11), 1113–1120 [cit. 2023-01-12]. ISSN 10016538. Dostupné z: doi:10.1360/982005-130
- [76] LEAF, Timothy A, Marvin S PETERSON, Sandra K STOUP, David SOMERS3, Friedrich SRIENCL a Myers SQUI. *Saccharomyces cerevisiae* expressing bacterial polyhydroxybutyrate synthase produces poly-3-hydroxybutyrate. *Microbiology* [online]. 1996, **142**(5), 1169–1180 [cit. 2023-01-12]. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi:10.1099/13500872-142-5-1169
- [77] GAO, Cuijuan, Qingsheng QI, Catherine MADZAK a Carol Sze Ki LIN. Exploring medium-chain-length polyhydroxyalkanoates production in the engineered yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* [online]. 2015, **42**(9), 1255–1262 [cit. 2023-01-12]. ISSN 14765535. Dostupné z: doi:10.1007/s10295-015-1649-y
- [78] WILLIAMS, Mark D, John A RAHN a David H SHERMAN. Production of a Polyhydroxyalkanoate Biopolymer in Insect Cells with a Modified Eucaryotic Fatty Acid Synthase. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* [online]. 1996, **62**(7), 2540–2546 [cit. 2023-01-12]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/aem.62.7.2540-2546.1996
- [79] CARR, N.G. The occurrence of poly- β -hydroxybutyrate in the blue-green alga, *Chlorogloea fritschii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biophysics including Photosynthesis* [online]. 1966, **120**(2), 308–310 [cit. 2023-01-12]. ISSN 09266585. Dostupné z: doi:10.1016/0926-6585(66)90353-0
- [80] KOLLER, Martin, Rodolfo BONA, Emo CHIellini, Elizabeth Grillo FERNANDES, Predrag HORVAT, Christoph KUTSCHERA, Paula HESSE a Gerhart BRAUNEGG. Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*. *Bioresource Technology* [online]. 2008, **99**(11), 4854–4863 [cit. 2023-01-12]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2007.09.049
- [81] CHEN, C. Will, Trong Ming DON a Hsiao Feng 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 [cit. 2023-01-12]. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2006.05.026
- [82] HAAS, Richard, Bo JIN a Florian Tobias ZEPF. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from waste potato starch. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* [online]. 2008, **72**(1), 253–256 [cit. 2023-01-12]. ISSN 09168451. Dostupné z: doi:10.1271/bbb.70503
- [83] SANTIMANO, M.C., Nimali N. PRABHU a S. GARG. PHA Production Using Low-Cost Agro-Industrial Wastes by *Bacillus* sp. Strain COL1/A6. *Research Journal of Microbiology* [online]. 2009, **4**(3), 89–96 [cit. 2023-01-12]. ISSN 18164935. Dostupné z: doi:10.3923/jm.2009.89.96
- [84] JIANG, Yuji, Xin SONG, Lei GONG, Ping LI, Chuanchao DAI a Weilan SHAO. High poly(β -hydroxybutyrate) production by *Pseudomonas fluorescens* A2a5 from inexpensive substrates. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2008, **42**(2), 167–172 [cit. 2023-01-12]. ISSN 01410229. Dostupné z: doi:10.1016/j.enzmictec.2007.09.003
- [85] PORTER, Michael M., Steve LEE, Nuttapol TANADCHANGSAENG, Matt J. JAREMKO, Jian YU, Marc MEYERS a Joanna MCKITTRICK. Porous hydroxyapatite-polyhydroxybutyrate composites fabricated by a novel method via centrifugation. In: *Conference Proceedings of the Society for Experimental Mechanics Series* [online]. 2013, s. 63–71 [cit. 2023-01-13]. ISBN 9781461444268. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4614-4427-5_10
- [86] HONG, Hao, Nianguo DONG, Jiawei SHI, Si CHEN, Chao GUO, Ping HU a Hongxu QI. Fabrication of a novel hybrid heart valve leaflet for tissue engineering: An in vitro study. *Artificial Organs* [online]. 2009, **33**(7), 554–558 [cit. 2023-01-13]. ISSN 15251594. Dostupné z: doi:10.1111/j.1525-1594.2009.00742.x
- [87] CHEN, Wenhui a Yen Wah TONG. PHBV microspheres as neural tissue engineering scaffold support neuronal cell growth and axon-dendrite polarization. *Acta Biomaterialia* [online]. 2012, **8**(2), 540–548 [cit. 2023-01-13]. ISSN 18787568. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2011.09.026
- [88] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Martin KOLLER, Dan KUCERA a Iva PERNICOVA. Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. *Biotechnology Advances* [online]. 2018, **36**(3), 856–870 [cit. 2023-01-14]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2017.12.006
- [89] TAL, Sara a Yaacov OKON. Production of the reserve material poly-P-hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. *Canadian Journal of Microbiology* [online]. 1985, **31**(7), 608–613 [cit. 2023-01-14]. ISSN 0008-4166. Dostupné z: doi:10.1139/m85-115
- [90] ZHAO, Yan Hong, Hong Ming LI, Ling Fang QIN, Hong Hui WANG a Guo Qiang 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 [cit. 2023-01-14]. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00904.x

- [91] KHOSRAVI-DARANI, Kianoush, Zahra Beigom MOKHTARI, Tomohito AMAI a Kenji TANAKA. Microbial production of poly(hydroxybutyrate) from C1 carbon sources. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2013, **97**(4), 1407–1424 [cit. 2023-01-14]. ISSN 14320614. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-012-4649-0
- [92] GOFF, Miriam, Patrick G. WARD a Kevin E. O’CONNOR. Improvement of the conversion of polystyrene to polyhydroxyalkanoate through the manipulation of the microbial aspect of the process: A nitrogen feeding strategy for bacterial cells in a stirred tank reactor. *Journal of Biotechnology* [online]. 2007, **132**(3), 283–286 [cit. 2023-01-14]. ISSN 01681656. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiotec.2007.03.016
- [93] RUIZ, J. A., N. I. LÓPEZ, R. O. FERNÁNDEZ a B. S. MÉNDEZ. Polyhydroxyalkanoate degradation is associated with nucleotide accumulation and enhances stress resistance and survival of *Pseudomonas oleovorans* in natural water microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2001, **67**(1), 225–230 [cit. 2023-01-14]. ISSN 00992240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.67.1.225-230.2001
- [94] KADOURI, Daniel, Edouard JURKEVITCH, Yaacov OKON a Susana CASTRO-SOWINSKI. Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Critical Reviews in Microbiology* [online]. 2005, **31**(2), 55–67 [cit. 2023-01-14]. ISSN 1040841X. Dostupné z: doi:10.1080/1040841059089922
- [95] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Filip MRAVEC, Ota SAMEK a Ivana MAROVA. Evaluation of 3-hydroxybutyrate as an enzyme-protective agent against heating and oxidative damage and its potential role in stress response of poly(3-hydroxybutyrate) accumulating cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2016, **100**(3), 1365–1376 [cit. 2023-01-14]. ISSN 14320614. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-015-7162-4
- [96] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Vladislav KRZYZANEK, Filip MRAVEC, Kamila HRUBANOVA, Ota SAMEK, Dan KUCERA, Pavla BENESOVA a Ivana MAROVA. Accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) helps bacterial cells to survive freezing. *PLoS ONE* [online]. 2016, **11**(6). ISSN 19326203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0157778
- [97] GOH, Yuh Shan a Irene Kit Ping TAN. Polyhydroxyalkanoate production by antarctic soil bacteria isolated from Casey Station and Signy Island. *Microbiological Research* [online]. 2012, **167**(4), 211–219 [cit. 2023-01-14]. ISSN 09445013. Dostupné z: doi:10.1016/j.micres.2011.08.002
- [98] KAARTOKALLIO, H., D. H. SØGAARD, L. NORMAN, S. RYSGAARD, J. L. TISON, B. DELILLE a D. N. THOMAS. Short-term variability in bacterial abundance, cell properties, and incorporation of leucine and thymidine in subarctic sea ice. *Aquatic Microbial Ecology* [online]. 2013, **71**(1), 57–73 [cit. 2023-01-14]. ISSN 09483055. Dostupné z: doi:10.3354/ame0166
- [99] AYUB, Nicolás D., M. Julia PETTINARI, Beatriz S. MÉNDEZ a Nancy I. LÓPEZ. The polyhydroxyalkanoate genes of a stress resistant Antarctic *Pseudomonas* are situated within a genomic island. *Plasmid* [online]. 2007, **58**(3), 240–248 [cit. 2023-01-14]. ISSN 0147619X. Dostupné z: doi:10.1016/j.plasmid.2007.05.003

- [100] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Filip 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 [cit. 2023-01-14]. ISSN 18716784. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbt.2017.07.008
- [101] JUNG, Young-Mi a Yong-Hyun LEE. Utilization of Oxidative Pressure for Enhanced Production of Poly-P-Hydroxybutyrate and Poly(3-Hydroxybutyrate-3-Hydroxyvalerate) in *Ralstonia eutropha*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. 2000, **90**(3), 266–270 [cit. 2023-01-15]. ISSN 13891723. Dostupné z: doi:10.1016/S1389-1723(00)80080-8
- [102] 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 Microbiol* [online]. 2010a, **55**(1), 17–22 [cit. 2023-01-15]. ISSN 0015-5632. Dostupné z: doi:10.1007/s12223-010-0003-z

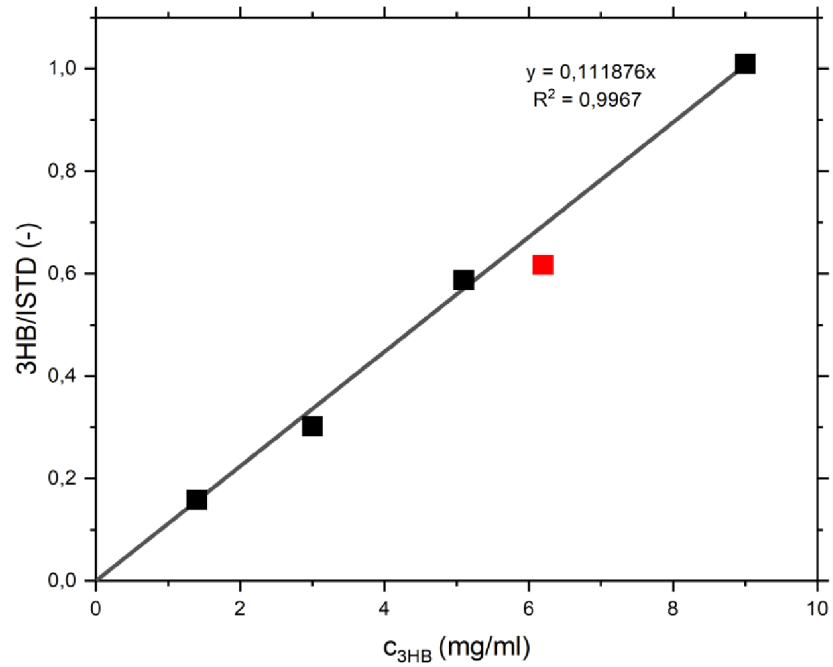
9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3HB	3-hydroxybutyrát
3HD	3-hydroxydecenoát
3HDD	3-hydroxydodekadeconoát
3HHx	3-hydroxyhexenoát
3HO	3-hydroxyoktanoát
3HV	3-hydroxyvalerát
CE	protielektroda
CV	cyklická voltametrie
DI	deionizovaná voda
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
E	elektroodový potenciál
E ⁰	standardní elektroodový potenciál
EIS	elektrochemická impedanční spektroskopie
emf	elektromotorické napětí
F	Faradayova konstanta
G6PD	glukóza-6-fosfát dehydrogenáza
GC-FID	plynová chromatografie s plamenově-ionizační detekcí
GSH	glutathion
HRP	peroxidáza křenu selského
I	elektrický proud
j	proudová hustota
lcl-PHA	polyhydroxyalkanoáty s dlouhým řetězcem
mcl-PHA	polyhydroxyalkanoáty se středně dlouhým řetězcem
MES	roztok stopových prvků
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
n	počet vyměněných elektronů
NADH	nikotinamidadeninukleotid
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NB	Nutrient broth medium
NHE	normální vodíková elektroda
ORR	redukční reakce kyslíku
PBS	fosfátový pufr
PDMS	polydimethylsiloxan

PEDOT:PSS	poly(3,4-ethylendioxythiopen): polystyrensulfonát
PHA	polyhydroxyalkanoáty
PHB	polyhydroxybutyrát
PHB4B	poly-3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát
PHBHx	polyhydroxybutyrát-co-hydroxyhexenoát
PHBV	polyhydroxybutyrát-co-valerát
PMMA	polymethylmethakrylát
PP	polypropylen
R	molární plynová konstanta
RE	referenční elektroda
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
scl-PHA	polyhydroxyalkanoáty s krátkým řetězcem
SHE	standardní vodíková elektroda
t	čas
T	termodynamická teplota
TMB	tetramethylbenzidin
U	napětí
WE	pracovní elektroda
ΔG^0	změna Gibbsovy energie

10 PŘÍLOHY

10.1 Stanovení obsahu PHB v biomase



Obrázek 47: Kalibrační závislost pro stanovení obsahu PHB v biomase pomocí GC-FID