



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**BIOINFORMATICKÁ ANALÝZA PHA SYNTÁZ U
TERMOFILNÍCH BAKTERIÍ**

BIOINFORMATIC ANALYSIS OF PHA SYNTHASES OF THERMOPHILIC BACTERIA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Zuzana Brondová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1486/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Zuzana Brondová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Bioinformatická analýza PHA syntáz u termofilních bakterií

Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Vyhledání příslušných sekvencí PhaC genů termofilních bakterií
3. Komparativní analýza získaných sekvencí

Termín odevzdání diplomové práce: 30.7.2021:

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

Bc. Zuzana Brondová
student(ka)

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Diplomová práca sa zaoberala bioinformatickou analýzou, ktorej cieľom bolo nájsť vhodného producenta PHA pre priemyselné biotechnológie novej generácie zo zbierky nájdených termofilných baktérií. Súčasťou experimentálnej časti bolo nájdenie niekoľko termofilných baktérií na základe podobnosti proteínovej sekvencie génu *phaC* baktérie *Cupriavidus necator*. Ďalšou časťou práce bola literárna rešerš schopností týchto termofilných baktérií zameraná na kultivačné podmienky a spektrum využiteľných substrátov. Následne na základe získaných informácií bolo vybratých päť bakteriálnych kmeňov, ktoré spĺňajú podmienky pre použitie v NGIB. Počas experimentálnej práce boli použité voľne dostupné databázy, pričom evolučná analýza bola vykonaná v programe MEGA X a Operon-mapper. Za najideálnejšieho potenciálneho producenta PHA v NGIB bol zo zbierky nájdených bakteriálnych kmeňov vybratý *Rubrobacter xylanophilus* so zbierkovým číslom DSM 9941. Rozhodujúcimi údajmi bola považovaná vysoká kultivačná teplota dosahujúca až 70 °C a veľké množstvo utilizovaných sacharidových substrátov. Zaujímavým výsledkom analýzy *Rubrobacter xylanophilus* bolo nájdenie sekvencií génu dvoch tried PHA syntázy – I. a III. triedu, ako u jediného bakteriálneho kmeňa z celej zbierky. Pri analýze genómu boli nájdené ďalšie gény napojené na metabolizmus PHA.

ABSTRACT

The thesis deals with bioinformatics analysis, the aim of which was to find a suitable producer of PHA for new generation industrial biotechnologies from the collection of found thermophilic bacteria. Part of experiments was the finding of several thermophilic bacteria based on the similarity of the protein sequence of the *phaC* gene of the bacterium *Cupriavidus necator*. The next part of thesis was a literature search of the abilities of these thermophilic bacteria focused on culture conditions and the spectrum of usable substrates. Subsequently, five bacteria were selected for use in NGIB based on the information obtained. Freely available databases were used during the experimental work, and evolutionary analysis were performed in MEGA X and Operon-mapper. *Rubrobacter xylanophilus* with collection number DSM 9941 was selected from the collection of bacterial strains as the most promising PHA producer for NGIB. The high culture temperature of up to 70 °C and a large amount of utilized carbohydrate substrates were considered decisive. An interesting result of the analysis was to find the gene sequences of two classes of PHA synthase – I. and III. class, as for a single bacterial strain from the entire collection. Additional genes linked to PHA metabolism were found in genome analysis.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Termofilné baktérie, PHA syntáza, *phaC* gén, Priemyselné biotechnológie novej generácie, bioinformatická analýza, MEGA X, Operon-mapper

KEYWORDS

Thermophilic bacteria, PHA synthase, *phaC* gene, Next-Generation Industrial Biotechnology, bioinformatics analysis, MEGA X, Operon-mapper

BRONDOVÁ, Zuzana. *Bioinformatická analýza PHA syntáz u termofilních bakterií*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131513>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Stanislav Obruča.

PREHLÁSENIE

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

.....

podpis študenta

Pod'akovanie:

Na tomto mieste by som rada pod'akovala svojmu vedúcemu diplomovej práce pánovi doc. Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D. za jeho odborné vedenie, pomoc a cenný čas, ktorý mi venoval. Moje ďakujem patrí pánovi Mgr. Ing. Karlovi Sedlářovi Ph.D. za odborné rady a podnetné návrhy k práci. Ďalej by som sa chcela pod'akovať Ing. Ive Pernicovej Ph.D. za jej pomoc, čas a rady pri spracovaní práce.

OBSAH

1	Úvod	7
2	Teoretická časť	8
2.1	Polyhydroxyalkanoáty	8
2.1.1	Delenie a vlastnosti polyhydroxyalkanoátov	9
2.1.2	Aplikácia polyhydroxyalkanoátov	11
2.2	Metabolizmus polyhydroxyalkanoátov	12
2.2.1	Biosyntéza PHA	12
2.2.2	Degradácia polyhydroxyalkanoátov	15
2.3	Extrémofilné mikroorganizmy	16
2.3.1	Rozdelenie extrémofilných mikroorganizmov	17
2.3.2	Ďalšia generácia priemyselných biotechnológií	18
2.3.3	Halofilné mikroorganizmy	19
2.3.4	Halofilné baktérie v NGIB	19
2.3.5	Termofilné mikroorganizmy	20
2.3.6	Termofilné baktérie v NGIB	20
2.4	Bioinformatická analýza	20
2.4.1	Verejne dostupné zdroje dát	21
2.4.2	Sekvenovanie DNA a proteínov	24
2.4.3	Fylogenetický strom	26
3	Experimentálna časť	28
3.1	Použité metódy	28
3.1.1	Vyhľadávanie termofilných bakteriálnych kmeňov produkujúcich PHA.....	28
3.1.2	Zbierka utilizovaných substrátov pre konkrétne bakteriálne kmene.....	28
3.1.3	Vyhľadávanie vedeckých článkov o produkcii PHA termofilnými baktériami.	29
3.1.4	Vyhľadanie génu <i>phaC/16S rRNA</i> v online dostupných databázach	29
3.1.5	Sekvencie sekvencie génu <i>phaC</i> u nájdených termofilných baktérií	29
3.1.6	Sekvencie génu <i>16S rRNA</i> u nájdených termofilných baktérií	29
3.1.7	Zarovnanie sekvencií v programe CLUSTAL OMEGA.....	29
3.1.8	Vyobrazenie zarovnaných sekvencií softvérom MEGA X	30
3.1.9	Bioinformatická analýza v MEGA X.....	30
4	Výsledky a diskusia	32

4.1	Termofilné baktérie – potenciálni producenti polyhydroxyalkanoátov pre NGIB	32
4.1.1	Kultivačné podmienky u nájdených termofilných bakteriálnych kmeňov.....	32
4.1.2	Vyhľadanie sekvencie génu <i>phaC</i> a publikácií o produkcii PHA z online dostupných databáz	45
4.1.3	Výber najlepších potenciálnych producentov PHA pre NGIB	47
4.1.4	Analýza bakteriálnych termofilných kmeňov z fylogenetických stromov.....	51
4.1.5	Predikcia operónu v bakteriálnom genóme	53
5	Záver	58
6	Zoznam použitej literatúry	60
7	Zoznam použitých skratiek a symbolov.....	72
8	Prílohy	73
8.1	Utilizované substráty.....	73

1 ÚVOD

V posledných rokoch je jednou z najdôležitejších celosvetových tém otázka ochrany životného prostredia. Veľkým problémom je obrovské množstvo odpadu z nerozložiteľných materiálov, ktoré sa používajú vo všetkých priemyselných odvetviach, v každej domácnosti a spotrebitelia prídu s nimi do kontaktu každý deň. Nejedná sa len o zvyšovanie recyklácie napríklad syntetických plastov, ale čím ďalej je kladený väčší dôraz na navrhovanie materiálov, ktoré sú vyrobené z biologicky rozložiteľných plastov. Kvôli vynikajúcim vlastnostiam a cene syntetických plastov je miera ich aplikácie veľmi veľká. Preto výzvou bioplastov je dosahovanie takých vlastností biologických materiálov, ktoré by boli konkurencie schopné z hľadiska fyzikálnych vlastností, ceny materiálu a možnostiach aplikácie.

Medzi jedny z potenciálnych alternatív k súčasným jednorazovým plastom patria materiály vyrobené z polyhydroxyalkanoátov, ktorú sú syntetizované mnohými zástupcami baktérií. Aj keď výskum polyhydroxyalkanoátov stále viac a viac posúva tieto materiály ku komercializácii, stále nedošlo k nahradeniu súčasných plastových materiálov biologicky rozložiteľnými. Veľkým problémom, ktorý brzdí použitie polyhydroxyalkanoátov sú vysoké náklady biotechnologického procesu, ktoré sú stále veľmi vysoké oproti nákladom pri výrobe syntetickým plastov. Vysoké náklady sú spojené s udrжанím aseptického prostredia a zabránením kontaminácie. Problémom sú aj nízke výťažky výsledného produktu a pomalý rast použitých mikroorganizmov.

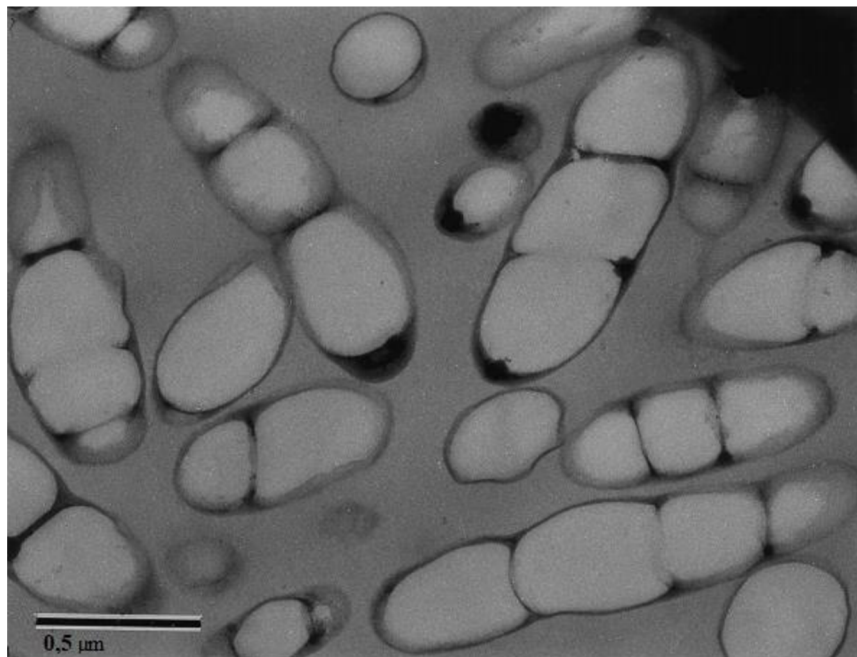
Tieto problémy rieši aj ďalšia generácia priemyselných biotechnológií známa pod skratkou NGIB. Zaoberá sa výskumom vhodných mikrobiologických producentov biotechnologickej produkcie polyhydroxyalkanoátov a to z pomedzi zástupcov extrémofilných mikroorganizmov. Tie môžu byť odpoveďou na otázku týkajúcu sa znižujúcich nákladov na biotechnologickú produkciu biologicky rozložiteľných materiálov.

Medzi extrémofilné mikroorganizmy zaraďujeme aj termofilné baktérie. Tento typ baktérií nie lenže vynikajú neobyčajnými hodnotami kultivačných teplôt, ale výskumy z posledných rokov o nich hovoria ako aj o potenciálnych producentoch polyhydroxyalakoátov. Použitie termofilných baktérií v biotechnologickom priemysle nás posúva bližšie k nahradeniu syntetických plastov za biologicky rozložiteľné materiály vďaka ich špeciálnym vlastnostiam.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) sú polyester, ktoré sú syntetizované mnohými zástupcami gramnegatívnych a grampozitívnych baktérií, ako materiály plniace zásobnú funkciu uhlíka a energie. Tieto polyméry sú kumulované ako intracelulárne zlúčeniny v cytoplazme buniek produkujúcich baktérií. Monomérmne jednotky hydroxyalkanoátov sú v D-konfigurácii vďaka stereošpecifickosti syntetického enzýmu. V závislosti od podmienok rastu mikroorganizmu, molekulárna hmotnosť polymérov sa pohybuje v rozmedzí od 200 kDa do 3000 kDa. PHA granule (Obrázok 1) uložené v cytoplazme bunky dosahujú veľkosť od 0,2 do 0,5 μm [1-3].



Obrázok 1 Snímka tenkých rezov z transmisného elektrónového mikroskopu rekombinantných buniek *Cupriavidus necator* obsahujúcich vo svojej bunecnej štruktúre granule P(3HB-co-3HHx) [4]

Lipidové inklúzie rozpustené v chloroforme boli po prvýkrát pozorované u *Azobacter chroococcum* v roku 1888 Beijerinckym, no nebolo objasnené aká je ich funkcia a zloženie. Podobné chemické zloženie bolo neskôr pozorované aj u bakteriálneho kmeňa *Bacillus megaterium*. Prvýkrát boli tieto intracelulárne zlúčeniny označené za kyselinu poly(3-hydroxy maslovú) – PHB. Až v roku 1923 francúzsky vedec Lemoigne v Pasteurovom inštitúte preukázal prítomnosť kyseliny 3-hydroxymaslovej v anaeróbných suspenziách u *Bacillus megaterium*, bakteriálneho kmeňa schopného tvoriť aeróbne spóry. Po dostatočnom preskúmaní tohto mikroorganizmu sa v roku 1927 podarilo extrahovať túto látku pomocou chloroformu a Lemoigne došiel k záveru, že sa jedná o polymér kyseliny 3-hydroxymaslovej, ktorý plní funkciu intracelulárnej rezervy uhlíka a energie [4-7].

V roku 1959 bolo založených niekoľko spoločností na výrobu PHB. Jednou z najznámejších je firma W.R. Grace & Co. Baptistu a Werbera, ktorá patentovala niekoľko postupov na izoláciu PHB a začala ako prvá komerčnú výrobu tohto polyméru. Obmedzeniam, ktorým výroba PHB musela čeliť, boli veľmi nízke výťažky produktu a častá bakteriálna kontaminácia výrobného procesu. Rovnako proces extrakcie rozpúšťadlom bol veľmi nákladný, čo obmedzilo

komerčnú výrobu. Ropná kríza v sedemdesiatych rokoch, ale opäť spustila výskum alternatív k syntetickým plastom [5, 7].

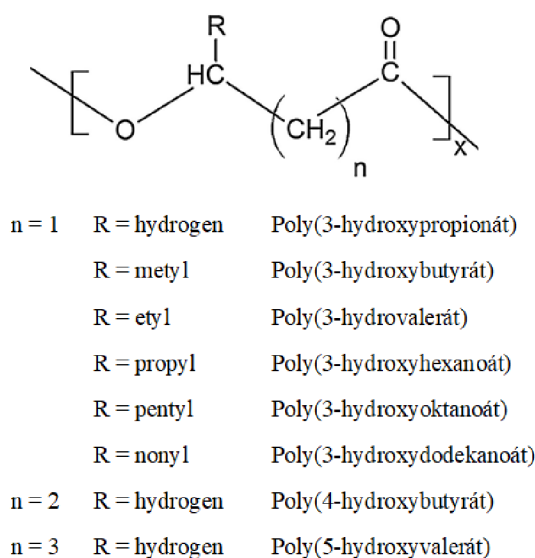
Do roku 1973 sa jednotka 3-hydroxybutyrátu považovala za jedinú zložku hydroxyalkanoátov. Wallen a Rohwedder v roku 1974 identifikovali nové jednotky hydroxyalkanoátov v chloroformových extraktoch zo splaškového kalu. Jednalo sa o 3-hydroxyvalerát (3HV) a 3-hydroxyhexanoát (3HHx). Identifikácia nových hydroxyalkanoátov viedla k výskumu ich charakterizujúcich vlastností, ktoré sa prejavili na záujme komerčnej výroby polyhydroxyalkanoátov. V tomto období sa začala 2. etapa priemyselnej výroby kopolyméru 3HB a 3HV. V roku 1962 bol PHB patentovaný ako materiál použiteľný na výroby biologicky rozložiteľných plastov [4].

Pri výskume kopolymérov sa rovnako prišlo na to, že tento materiál neakumulujú len gramnegatívne baktérie, ale aj široké spektrum grampozitívnych baktérií, aeróbne baktérie, anaeróbne a dokonca aj archea. V ďalšej etape vývoja PHA bola pozornosť zameraná na charakterizáciu génov zapojených do biosyntézy PHA. Na konci sedemdesiatych rokov nová revolúcia molekulárnej biológie priniesla nástroje na dešifrovanie genetickej informácie a tým pochopenie princípu biosyntézy polyhydroxyalkanoátov [4].

Na prelome 20. a 21. storočia sa výskum zameril na určovanie terciárnych a kvartérnych štruktúr PHA syntázy. To nám umožnilo porozumieť katalytickým mechanizmom a substrátovej špecificite tejto skupiny enzýmov a tým aj faktorom určujúcim výslednú molekulovú hmotnosť produktu. V posledných rokoch prevláda proteínové inžinierstvo, ktoré umožňuje manipulácie génmi enzýmov zúčastnených v biosyntéze PHA a tým zefektívnenie priemyselnej výroby polyhydroxyalkanoátov [4].

2.1.1 Delenie a vlastnosti polyhydroxyalkanoátov

Vo všeobecnom štruktúrnom vzorci polyhydroxyalkanoátov rozlišujeme podľa substituovanej skupiny niekoľko najznámejších polyhydroxyalkanoátov, ktorí sú zobrazení v obrázku 2.



Obrázok 2 Všeobecný štruktúrny vzorec polyhydroxyalkanoátov a najznámejšie polyméry PHA podľa charakteru substituovanej skupiny v štruktúre, upravené z [3, 5]

Polyhydroxyalkanoáty sa klasifikujú do troch tried podľa dĺžky reťazca monoméru. Prvou skupinou sú monoméry s krátkym reťazcom – s menej ako 5 atómami uhlíka (scl-PHA). Druhou skupinou sú monoméry so stredne dlhým reťazcom – s 5–14 atómami uhlíka v reťazci (mcl-PHA). Posledným typom PHA sú monoméry s dlhým reťazcom – s viac ako 14 atómami uhlíka v štruktúre monoméru (lcl-PHA). Zatiaľ čo polyméry z scl-PHA sú tuhé a krehké, s vysokým stupňom kryštalinity, tak mcl-PHA sú naopak pružné s nízkou hodnotou kryštalinity a vyznačujú sa pevnosťou v ťahu a nízkou teplotou topenia. Najčastejšími zástupcami scl-PHA sú 3-hydroxybutyrát a 3-hydroxyvalerát. Do skupiny mcl-PHA sa zaraďujú napríklad 3-hydroxydekanóat, 3-hydroxyoktanoát a 3-hydroxyhexanoát [6, 7].

Vlastnosti jednotlivých typov PHA sa líšia vzhľadom k štrukturálnym odlišnostiam a tým, či sa jedná o homopolymér alebo kopolymér (Tabuľka 1). Polyhydroxyalkanoáty sú nerozpustné vo vode, sú vysoko odolné voči hydrolytickému pôsobeniu a UV žiareniu. PHA sú rozpustné v chlórových rozpúšťadlách (napr. chloroform) a majú pomerne vysokú hodnotu molekulovej hmotnosti, čím sa vlastnosťami približujú k vlastnostiam konvenčným polymérom (napr. polypropylén). Teplota sklovitého prechodu sa pohybuje v rozmedzí od -50 až 4 °C a teplota topenia od 40 do 180 °C. Polyhydroxybutyrát, ktorý je najrozsiahlejšie charakterizovaný, sa v bunke nachádza v tekutom, amorfnom stave. Po extrakcii z bunky organickými rozpúšťadlami sa stáva vysoko kryštalickým (stupeň kryštalinity 50% – 60%). Je teda tuhým a krehkým materiálom, čím nedostatočne odolným voči vysokému namáhaniu. Aj keď má vysokú odolnosť voči vlhkosti, teplota topenia okolo 170 °C je blízka teplote, pri ktorej sa polymér rozkladá. Mechanické vlastnosti, vrátane hodnoty pevnosti v ťahu dosahujúce 40 MPa, sú podobné mechanickým vlastnostiam polypropylénu. Avšak ťažnosť PHB (5%) je markantne nižšia, než ťažnosť polypropylénu (400%). Vlastnosti tohto polyméru sa stávajú v istej miere prekážkou pri jeho spracovaní pre viaceré aplikácie. Biotechnologický výskum zameraný na ľahšie spracovateľné PHA priniesol vznik výroby kopolymérov. Jedným z nich je kopolymér, ktorý vzniká začlenením 3-hydroxyvalerátu do štruktúry PHB – poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát). Tento kopolymér rieši vysokú krehkosť a kryštalitu bežného PHB, čím sa zdokonaľuje vlastnosť polyméru. V porovnaní s PHB má nižší bod topenia (130 °C). Polymér poly(4-hydroxybutyrát) je silný a tvárny termoplastický materiál s mimoriadnymi elastickými vlastnosťami. Jeho pevnosť v ťahu sa približuje hodnote, ktorá je zrovnateľná s polyetylénom. Mcl-PHA v porovnaní s vyššie spomenutými PHB a P(3HB-co-3HV) disponujú ešte s nižšou hodnotou kryštalinity a sú pružnejšie, čím otvárajú nové možnosti aplikácií mcl-PHA než scl-PHA [1, 2, 6, 7, 8].

PHA sú biokompatibilné a biologicky odbúrateľné (podliehajú degradácii v pôde). Degradácia polyméru závisí na type a konkrétnom zložení PHA a je ovplyvnená vlastnosťami okolitého prostredia. Vzhľadom k tomu, že rôzne mikroorganizmy produkujú odlišné typy PHA (scl-PHA alebo mcl-PHA), spôsob degradácie závisí aj na vybranom producentovi PHA [6].

Tabuľka 1 Porovnanie mechanických vlastností poly(3-hydroxybutyrátu), poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerátu) obsahujúceho 20 % 3HV, poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrátu) obsahujúceho 16 % 4HB, poly(3hydroxyoktanoátu-co-4hydroxyhexanoátu) obsahujúceho 11 % 3HH a polypropylénu [8]

	PHB	P(3HB-co-3HV)	P(3HB-co-4HB)	P(3HO-co-4HH)	PP
Teplota topenia [°C]	177	145	150	61	176
Teplota sklovitého prechodu [°C]	2	-1	-7	-36	-10
Kryštalinita [%]	70	56	45	30	60
Ťažnosť [%]	5	50	444	300	400

2.1.2 Aplikácia polyhydroxyalkanoátov

Vďaka vlastnostiam, ktorými disponujú polyhydroxyalkanoáty, a to predovšetkým biologická odbúrateľnosť, biokompatibilita, termoplastičita a netoxičita, sa stali konkurencieschopnými u petrochemických polymérov. V počiatočných komerčných aplikáciách sa PHA používali hlavne u predmetov každodennej potreby – obalový materiál, fľaše, bariérová vrstva proti vlhkosti v detských plienkach alebo dámskych hygienických potrebách atď. Za posledné roky sa zvýšila rozmanitosť a špecializácia aplikácií PHA. Okrem materiálových aplikácií nájdeme využitie PHA aj pri syntéze nových, komerčne atraktívnych molekúl, akými sú β -hydroxykyseliny, 2-alkenoové kyseliny, β -aminokyseliny a estery β -hydroxykyselín, ktoré je možné využiť ako biologicky odbúrateľné rozpúšťadlá. Veľký aplikačný potenciál PHB a kopolyméru P(3HB-co-3HV) môžeme pozorovať aj v biomedicínskej oblasti. Konkrétne pri výrobe kardiovaskulárnych produktov, v systémoch podávania liečiva, v tkaninovom inžinierstve a pri liečbe rán [2, 5, 7, 8].

2.1.2.1 PHA v medicínskych aplikáciách

Bolo zistené, že produkt degradácie PHB – (D)-3-hydroxybutyrát je bežným medziproduktom metabolizmu u vyšších zvierat. Aj u prokaryotických a eukaryotických organizmoch bol nájdený nízkomolekulový PHB (obsahujúci 100–200 monomérov), ktorý bol súčasťou zložky iónového kanála v bunkovej membráne. Vďaka biokompatibilite PHA polyméry, ktoré nachádzajú využitie v medicínskych aplikáciách sú najmä PHB, P(3HB-co-3HV), P(4HB), P(3HO) a P(3HB-co-3HHx). Ich biodegradabilita bola testovaná na zvieratách a potvrdila sa aj biokompatibilita v rôznych hostiteľských systémoch. Výroba PHA pre medicínske aplikácie by sa mala zamerať na stratégiu procesu purifikácie a mala by spĺňať špecifické požiadavky na čistotu PHA. Avšak súčasne komerčne dostupné PHA sú skôr zamerané na iné priemyselné využitie, než na aplikáciu v zdravotníctve a často obsahujú zvyškové proteíny, povrchovo aktívne látky, vysoké hladiny endotoxínov a iné nečistoty, ktoré nespĺňajú vysoké požiadavky pre medicínske aplikácie PHA. Aby bolo možné použiť polyméry PHA v zdravotníctve je potrebné zaistiť vysokú čistotu výsledných produktov a zabezpečiť absenciu organických rozpúšťadiel [1, 7].

Vysoká imunotolerancia, nízka toxicita a biologická odbúrateľnosť sú vlastnosti, vďaka ktorým našli polyhydroxyalkanoáty využitie v tkaninovom inžinierstve. Použitím hydroxyapatitu zabudovaného do polyméru PHB vzniká bioaktívny a biodegradabilný kompozit, ktorý môže nájsť uplatnenie v regenerácii tvrdých tkanív, napríklad v kostnom

tkanive, kedy mechanická pevnosť tohto kompozitu je zrovnateľná s ľudskou kosťou. PHB alebo kopolymér P(3HB-co-3HV) je možné implantovať do poškodeného tkaniva, kde bude pôsobiť ako výborný skelet – nosné lešenie pre rast nových buniek a regeneráciu tkaniva. P(4HB) vďaka svojej pevnosti v ťahu našiel uplatnenie v použití polyméru ako kardiovaskulárnej náplasti, vaskulárnych štepov alebo ako náhrada srdcových chlopní. PHA polyméry sa stali kandidátmi nosičov liečiv s riadením uvoľňovaním. Zvyšovaním molekulovej hmotnosti polyméru sa zvyšovala aj rýchlosť uvoľňovania liečiva. Pórovitosť, rýchlosť erózie a teda aj rýchlosť uvoľňovania liečiva sa dá riadiť prímiesami iných biokompatibilných materiálov a tým získať väčšiu kontrolu nad uvoľňovaním liečiva. Aj pri iných použitíach v medicíne je možné riadiť vlastnosti PHA podľa požiadaviek konkrétnej aplikácií. Buď je možné PHA povrchovo upraviť alebo zmiešať s inými polymérami, enzýmami alebo aj anorganickými materiálmi, čím sa môžu nastaviť rozličné mechanické vlastnosti [5, 7, 9, 10].

2.2 Metabolizmus polyhydroxyalkanoátov

Informácie o metabolizme, biochémií a fyziológii PHA boli upresnené štúdiami z molekulárnej genetiky, kedy veľký počet génov kódujúcich enzýmy PHA syntézy boli charakterizované z rôznych mikroorganizmov. Potvrdilo sa, že je vyvinutých viacero dráh – ciest pre tvorbu PHA. Taktiež sa potvrdilo, že vplyv na syntézu PHA závisí aj od podmienok rastu mikroorganizmu, a teda prispôbením kultivačných podmienok môžeme regulovať syntézu PHA. Tieto informácie otvárajú možnosti návrhu a konštrukcie rekombinantných producentov PHA [8].

2.2.1 Biosyntéza PHA

Štruktúra PHA je do značnej miery závislá na type dodávaného zdroja uhlíka. Zdroje uhlíka sa delia na PHA štruktúrne príbuzné a nepríbuzné zdroje. Jedným z príkladov príbuzných zdrojov sú mastné kyseliny, ktoré sa svojou štruktúrou podobajú na hydroxyalkánové kyseliny. Na rozdiel od glukózy, ktoré nemajú štruktúrnu podobnosť s PHA a sú teda nepríbuzným substrátom. Na základe typu monomérov zabudovaných v PHA sa preukázalo, že pri biosyntéze polymérov sú zapojené rôzne metabolické dráhy [4].

2.2.1.1 PHA cyklus

Biosyntéza PHA pozostáva z troch hlavných mechanizmov syntézy, ktoré zahŕňajú približne 12 ciest k rôznym typom PHA (Obrázok 3). Všetky tieto cesty sú v spojení s prirodzenými alebo umelými metabolickými cestami. Všetky cesty syntézy PHA u väčšine mikroorganizmov vyžadujú prídanie substrátov, väčšinou sa jedná o mastné kyseliny a alkoholy. Vzhľadom na vysokú cenu čistých substrátov je možné vytvoriť dodatočné cesty k zásobe nových monomérnych prekursorov. V takýchto prípadoch je možné použiť sacharidy [11].

Polymér PHB, ktorý je v tejto oblasti najviac preštudovaný, je syntetizovaný tromi enzymatickými reakciami katalyzovanými tromi odlišnými enzýmami. I. dráha biosyntézy PHB ilustruje klasický prípad syntézy scl-PHA. Syntéza začína dvoma molekulami acetyl-CoA, ktoré do reakcie vstupujú z citrátového cyklu. Enzým β -ketotioláza (PhaA) kondenzuje dva acetyl-CoA na acetoacetyl-CoA. Druhou reakciou je redukcia v tretej polohe acetoacetyl-CoA na (R)-3-hydroxybutyryl-CoA pomocou acetoacetyl-CoA dehydrogenázy (PhaB). Táto reakcia je stereošpecifická, čo znamená, že všetky výsledné 3-hydroxybutyryl-CoA sú v R-konfigurácií v tretej polohe. Poslednou reakciou je polymerizácia monomérnych jednotiek (R)-

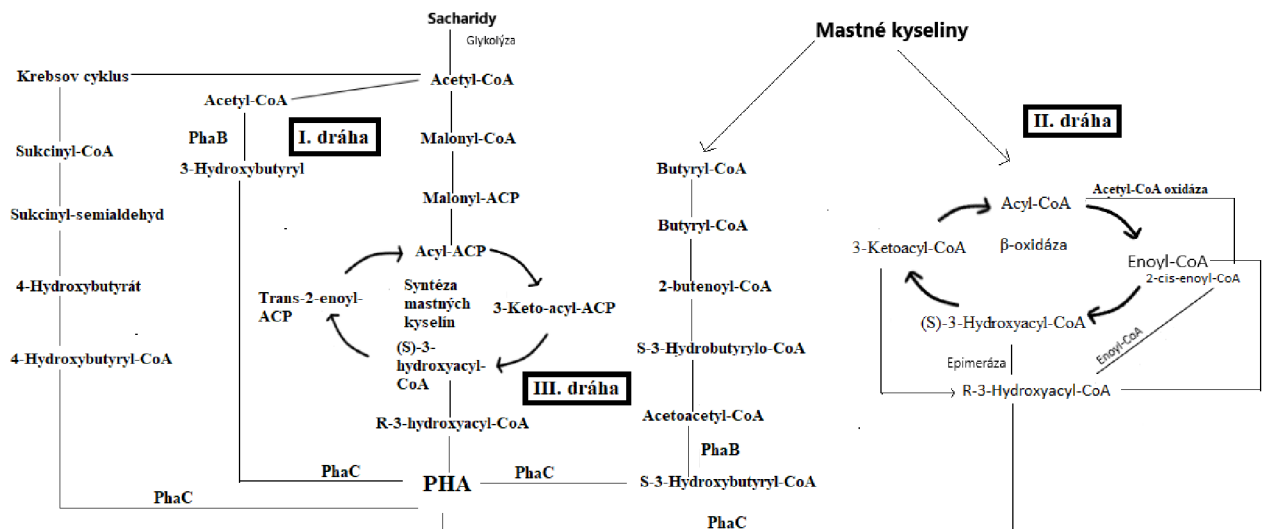
3-hydroxybutyryl-CoA na polymér PHB pomocou PHB polymerázy (PhaC). Táto reakcia prebieha len na povrchu granule. Tvorba PhaB je regulovaná intracelulárne koncentráciou acetyl-CoA. V kultivačných podmienkach, kedy nedochádza k obmedzeniu živín (v exponenciálnej fáze rastu) sa zvyšuje koncentrácia voľného CoASH. Avšak, ak obmedzíme živiny v tejto fáze rastu dochádza k zníženiu hladiny CoASH a v tomto momente je uprednostňovaná syntéza PHB. Enzým β -thioláza je kódovaný génom *phbA*, acetoacetyl-CoA dehydrogenáza je kódovaná *phbB* a PHB polymeráza pomocou *phbC* [8, 11, 12].

V prípade biosyntézy scl-PHA biosyntetickou I. dráhou sa štrukturálne príbuzné substráty, akými sú napríklad propionát, valerát a 1,4-butandiol pridali do kultivačných médií k bakteriálnym kultúram. Dochádzalo k syntéze scl-PHA, konkrétne k P(3HB-co-3HV) alebo P(3HB-co-4HB). Vzhľadom k toxicite a vysokej cene boli substráty nahradené glukózou a prebiehala polymerizácia kopolymérov. P(3HP) sa môže kopolymerizovať s ďalšími monomérmi za vzniku P(3HP-co-3HB). V prípade pridania 1,4-butandiolu sa 4HB inkorporuje do PHB za vzniku P(3HB-co-4HB) [12].

II. dráha biosyntézy PHA sa tiež nazýva β -oxidačná cesta, pretože využíva medziprodukty β -oxidačného cyklu mastných kyselín na zdroj uhlíka. Mastné kyseliny sa v prvom kroku prevedú v β -oxidácii na enoyl-CoA. Ten je následne prostredníctvom R-3-hydroxyacyl-CoA hydratázou transformovaný na R-3-hydroxyacyl-CoA, ktorý je prekursorom syntézy mcl-PHA. β -oxidačná cesta je typická pre rod *Pseudomonas*. Bakteriálne kmene z rodu *Pseudomonas* sú schopné rásť na širokej škále rôznych substrátov, ktoré je možné inkorporovať do PHA. Do skupiny týchto substrátov patria n-alkánové kyseliny, n-alkanály, n-alkonoly alebo aj n-alkány. Znížením regulácie dráhy β -oxidácie mastných kyselín a zároveň 3-hydroxyacyl-ACPCoA transacylázy v bakteriálnom kmeni *Pseudomonas putida* je možné smerovať tok mastných kyselín k akumulácii PHA zo substrátu alebo prekursorov. Tento kmeň bol schopný syntetizovať mcl-PHA homopolyméry, napríklad poly(3-hydroxyhexanoát), poly(3-hydroxyheptanoát) v prítomnosti hexanoátu, heptanoátu a oktanoátu. β -oxidačná cesta umožňuje syntézu PHA s definovanými štruktúrami a tvorby homopolymérov, náhodných alebo blokových kopolymérov [11, 12].

Môže dôjsť k využívaniu súčasne I. a II. dráhy, kedy len niekoľko PHA syntáz schopných kopolymerizácie scl- a mcl-monomérov vytvorí scl-mcl-PHA [11].

III. dráha – cyklus, kedy sa dodáva R-3-hydroxyacyl-ACP na syntézu PHA z dráha syntézy mastných kyselín *in situ*. Konkrétne enzým 3-hydroxyacyl-acyl nosič proteín-CoA transferáza (PhaG) transformuje 3-hydroxyacyl-ACP na 3-hydroxyacyl-CoA. Ukázalo sa, že cykly syntézy mastných kyselín *in situ* a β -oxidačné cykly môžu byť nezávisle aktívne na dodávaní prekursorov. To potvrdzuje fakt, že bakteriálny kmeň *Pseudomonas aeruginosa* je schopný produkcie mcl-PHA použitím nepríbuzných substrátov – glukózy, ako zdroja uhlíka. To umožňuje použitie lacných surovín ako substrátov na výrobu mcl-PHA [11].









Obrázok 3 Dráhy biosyntézy PHA, upravené z [5]

2.2.1.2 PHA syntáza

PHA syntáza – PhaC je polymerizačný enzým, ktorý je kľúčový pri biosyntéze polyhydroxyalkanoátov. Tento proteín je lokalizovaný na povrchu PHA inklúzie. PHA syntáza vykazuje širokú substrátovú špecifickosť a tým aj širokú škálu monomérov. Vzhľadom k primárnej štruktúre a substrátovej špecifickosti rozlišujeme štyri hlavné typy PhaC vyobrazené na obrázku 4. Všetky štyri typy majú striktno zakonzervovaný cysteínový zvyšok, ktorý je aktívnym miestom pri polymerizačnej reakcii. PHA syntázy I. a II. triedy zahŕňajú enzýmy, ktoré pozostávajú iba z jedného typu podjednotky, ktorého molekulárna hmotnosť sa pohybuje v rozmedzí od 61–68 kDa. PHA syntázy I. triedy účinne začleňujú monoméry 3-hydroxylových kyselín obsahujúce 3–5 atómov uhlíka vo svojej štruktúre (3HA_{SCL}), zatiaľ čo PHA syntázy II. triedy inkorporujú 3-hydroxykyseliny obsahujúce viac ako 5 atómov uhlíka (3HA_{MCL}). Enzým PHA syntázy III. triedy pozostáva z dvoch rôznych podjednotiek – PhaC podjednotka s molekulovou hmotnosťou 40 kDa (vykazuje 21–28 % podobnosť s aminokyselinovou sekvenciou PHA syntázy I. a II. triedy). Druhou podjednotkou je PhaE s molekulovou hmotnosťou rovnako okolo 40 kDa (nevykazuje žiadnu podobnosť s PHA syntázami I. a II. triedy). Substrátová špecifita III. triedy nie je dostatočne preskúmaná, ale vo všeobecnosti PHA syntázy III. triedy uprednostňujú 3HA_{SCL} . Rovnako ako enzým PHA syntázy III. triedy, aj enzým IV. triedy sa skladá z dvoch rôznych podjednotiek – PhaC podjednotka a PhaR podjednotka s molekulovou hmotnosťou okolo 20 kD. Porovnanie 30 PHA syntáz prinieslo informáciu, že tieto enzýmy u rôznych druhov baktérií prejavujú vysokú podobnosť. Vzhľadom k tejto podobnosti bolo možné charakterizovať 6 zakonzervovaných blokov, pričom N terminálna oblasť je vysoko variabilná a je nenahraditeľná vo funkcii aktívneho enzýmu [4, 5, 13].

PHA syntázy I. triedy syntetizujú PHA s vyššou molekulovou hmotnosťou v rozmedzí od 500 000 do niekoľko miliónov. PHA syntázy II. triedy syntetizujú PHA s molekulovou hmotnosťou 50 000 do 500 000, zatiaľ čo PHA syntázy III. triedy syntetizujú PHA s molekulovou hmotnosťou medzi týmito hodnotami. Molekulová hmotnosť PHA závisí od viacerých faktorov. Jedným z faktorov je stupeň expresie PHA syntázy v bunke. Čím vyššia

je koncentrácia aktívnej PHA syntázy, tým nižšia je molekulová hmotnosť nasyntetizovaného polyméru [13].

Trieda	Podjednotka	Zástupca	Substrát
I	 ~60-73 kDa	<i>Cupriavidus necator</i>	$3\text{HA}_{\text{SCL}}\text{-CoA}$ (~C3-C5) $4\text{HA}_{\text{SCL}}\text{-CoA}$, $5\text{HA}_{\text{SCL}}\text{-CoA}$, $3\text{MA}_{\text{SCL}}\text{-CoA}$
II	 ~60-65 kDa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$3\text{HA}_{\text{MCL}}\text{-CoA}$ (~ \geq C5)
III	  ~40 kDa ~40 kDa	<i>Allochromatium vinosum</i>	$3\text{HA}_{\text{SCL}}\text{-CoA}$ ($3\text{HA}_{\text{MCL}}\text{-CoA}$ [~C6-C8], $4\text{HA}\text{-CoA}$, $5\text{HA}\text{-CoA}$)
IV	  ~40 kDa ~22 kDa	<i>Bacillus megaterium</i>	$3\text{HA}_{\text{SCL}}\text{-CoA}$

Obrázok 4 Klasifikácia PHA syntázy založenej na primárnej štruktúre a substrátovej špecifite, upravené z [14]

PHA syntáza je sulfhydrylový enzým, na základe čoho bol navrhnutý najpravdepodobnejší mechanizmus PHA syntázy, ktorý si zakladá na dobre charakterizovanej syntéze mastných kyselín. Z toho vyplýva, že sú potrebné dve tiolové skupiny počas katalytického cyklu. Avšak vo viacerých porovnaní PHA syntáz bolo preukázané, že iba jeden cysteínový zvyšok v polohe 319 v štruktúrnom géne (Cys-319) je zakonzervovaný a ktorý je zároveň schopný poskytnúť tiolovú skupinu. Vo viacerých štúdiách sa považovalo za druhú tiolovú skupinu produkt kovalentnej posttranslačnej modifikácii prostredníctvom 4-fosfopanteteínu. Jeden z kandidátov na túto modifikáciu je serínový zvyšok (Ser-260), ktorý je tiež vysoko zakonzervovaný. No posledné výsledky nedokázali hypotézu o posttranslačnej modifikácii potvrdiť. Súčasný model aktívnej PHA syntázy zahrňuje dve podjednotky na tvorbu homodiméru (PHA syntáza I. a II. triedy) a heterodiméru (PHA syntáza III. triedy). V prípade PHA syntáz I. a II. triedy sa objavujú tiolové skupiny, ktoré poskytuje konzervovaný Cys-319 každej PHA syntázy. Na druhej strane, u PHA syntázy pozostávajúce z dvoch podjednotiek na vytvorenie heterodiméru sa predpokladá, že druhá tiolová skupina je poskytovaná zakonzervovaným cysteínovým zvyškom Cys-130 podjednotky PhaE [4, 13].

2.2.2 Degradácia polyhydroxyalkanoátov

Biodegradácia PHA sa rozdeľuje na intracelulárnu a extracelulárnu degradáciu. Intracelulárna degradácia je aktívna degradácia endogénnej, naakumulovanej zásoby PHA v baktérii. Intracelulárne PHA depolymerázy (i-PHA depolymerázy) sú enzýmy, ktoré sa podieľajú na intracelulárnej degradácii PHA. Extracelulárna degradácia je utilizácia exogenného polyméru, ktorý je vylučovaný extracelulárnou PHA depolymerázou (e-PHA depolymeráza). Extracelulárny polymér PHA je uvoľňovaný z naakumulovaných buniek po smrti alebo po lýze buniek. Intracelulárne molekuly PHA sa označujú ako natívne granule PHA (sú v amorfnom stave a mobilné). Tieto granule majú povrchovú vrstvu tvorenú

z proteínov a fosfolipidov, ktorá je senzitívna na chemické a fyzikálne namáhanie. Extracelulárne PHA sú v čiastočne kryštalickej forme (stupeň kryštalinity 50–60%) [15].

2.2.2.1 Intracelulárna degradácia

Keďže PHA plnia funkciu zásoby uhlíka pre bunku, mikroorganizmus musí disponovať depolymerizačným systémom, vďaka ktorému získa spätne zdroj uhlíka z PHA. Rýchlosť degradácie PHA granúl je mnohonásobne pomalší proces než syntéza PHA. Metabolická cesta intracelulárnej degradácie z PHB prostredníctvom PHB depolymerizácie vedie k 3HB. Ďalej pomocou 3HB-dehydrogenázy vzniká acetoacetát a výsledkom je acetyl-CoA. Kľúčovým intracelulárnym enzýmom je už vyššie spomenutá intracelulárna depolymeráza, ktorá má schopnosť hydrolyzovať natívne granule polyhydroxyalkanoátov [4, 15].

2.2.2.2 Extracelulárna degradácia

Existujú mikroorganizmy, ktoré využívajú extracelulárnu PHA depolymerázu na hydrolyzu polyméru, ktorý je zdrojom uhlíka a energie. Mikrobiálna degradácia PHA je proces, kedy enzymatickou povrchovou eróziou polyméru vznikajú vo vode rozpustné monoméry. Extracelulárne depolymerázy prejavujú vysokú stabilitu pri širokom rozmedzí pH a rovnako aj pri rôznych teplotách [15].

2.3 Extrémofilné mikroorganizmy

Na Zemi existuje obrovská rozmanitosť prostredí s extrémnymi podmienkami, v ktorých nie len prežívajú, ale dokonca prosperujú extrémofilné organizmy (Obrázok 5). Tieto podmienky, ktoré označujeme za abnormálne, zahŕňajú fyzikálne a geochemické extrémy. Za extrémne fyzikálne podmienky považujeme napríklad vysokú alebo naopak veľmi nízku teplotu, vysoký/nízky tlak alebo žiarenie. Extrémofilné organizmy, ktoré obývajú extrémne geochemické prostredia sa musia prispôbiť neobvyklým hodnotám pH, koncentrácii solí, kyslíku atď. Pozornosť pútajú mikroorganizmy žijúce v týchto podmienkach kvôli ich mechanizmom biochemickej adaptácie. Čoraz viac sa v súčasnosti využívajú extrémofilné mikroorganizmy a ich enzýmy v biotechnologických procesoch. Enzýmy syntetizované extrémofilnými mikroorganizmami sú spravidla stabilné voči abnormálnym podmienkam. Sú vysoko termostabilné a odolné voči chemickým denaturantom. To umožňuje aplikáciu týchto mikroorganizmov v priemyselných biotechnológiách, napríklad použitie biologicky aktívnych látok z extrémofilov v medicíne, kozmetológii alebo v potravinárskom priemysle [16-19].



Obrázok 5 Príklad ekosystému s extrémnymi podmienkami na život - Jazero Searles Lake v Kalifornii, prevzaté z [20]

2.3.1 Rozdelenie extrémofilných mikroorganizmov

Extrémofilné organizmy sa klasifikujú na základe prostredia, v ktorom žijú. Vzhľadom na rozmanitosť extrémnych prostredí existuje veľa rôznych tried extrémofilov. Tie charakterizujeme podľa okrajových údajov rastových profilov (napríklad T_{\min} , T_{opt} , T_{\max}). Na základe kultivačnej teploty rozdeľujeme extrémofily na termofily s toleranciou na vysokú teplotu a psychrofilny, ktoré sa vyskytujú na miestach s nízkou teplotou. Podľa hodnoty pH prostredia mikroorganizmu rozlišujeme acidofily (nízke pH) a alkalifily (vysoké pH). Extrémofilné mikroorganizmy, ktoré žijú v miestach s vysokým tlakom označujeme za piezofily. Halofily patria medzi extrémofily, ktoré sú schopné rasti v prostredí s vysokou koncentráciou solí. Osmofily sa nachádzajú v prostredí s vysokým obsahom organických látok. Vo veľmi suchom prostredí nájdeme extrémofily z kategórie xerofilov. Základné rozdelenie extrémofilných organizmov je uvedené v tabuľke 2 [21].

Tabuľka 2 Základné rozdelenie extrémofilov a ich rastový profil, upravené z [17]

Extrémne podmienky	Typ extrémofilov	Optimálne podmienky	Príklad mikroorganizmu
Teplota	Hypertermofilné	> 80 °C	<i>Pyrolobus fumarii</i>
	Termofilné	60–80 °C	<i>Synechococcus lividis</i>
	Psychofilné	< 15 °C	<i>Psychrobacter</i>
Salinita	Halofilné	2-5 M	<i>Dunaliella salina</i>
pH	Alkalofilné	> 9,0	<i>Natronobacterium</i>
	Acidofilné	< 2,0	<i>Cyanidium caldarium</i>
Tlak	Piezofilné/barofilné	> 0,1 MPa	
Radiácia	Radiorezistentné	–	<i>Deinococcus radiodurans</i>
Vysušenie	Xerofilné	bezvodé	<i>Artemia salina</i>
Chemické extrémy	Metalofilné	tolerancia Cu, As, Cd, Zn	<i>Ralstonia</i> sp. CH34
	Kapnofilné	čistý O ₂	<i>Cyanidium caldarium</i>

2.3.2 Ďalšia generácia priemyselných biotechnológií

Tradičné procesy v biotechnologickom priemysle vyžadujú použitie bioreaktorov zo špeciálneho materiálu, ktoré nepodliehajú korózii a taktiež je potrebné zabezpečiť zložité a cenovo nákladné postupy sterilizácie. Tieto procesy vyžadujú skúsených pracovníkov, ktorí sú schopní viesť biologické spracovanie za sterilných podmienok. Súčasná biotechnologická produkcia sú celkovo náročná na spotrebu energie a vody. Spomínané nevýhody súčasnej biotechnologickej výroby by mohla vyriešiť nová generácia biotechnologického priemyslu (NGIB). V NGIB sa pracuje za otvorených – nesterilných podmienok použitím mikroorganizmov, ktoré odolávajú kontaminácii inými mikróbnymi. Zároveň je NGIB postavená na použití nízkonákladového substrátu, ktorý nahrádza drahé, čisté uhľikové substráty. Rovnako v NGIB je možnosť zníženia spotreby sladkej pitnej vody použitím široko dostupnej morskej vody. Súčasnému biotechnologickému priemyslu NGIB prináša aj použitie inteligentných bioprosesorov, ktoré sú ovládané umelou inteligenciou, čím môže dôjsť k zníženiu celkovej spotrebovanej energie celého procesu [22, 23].

Aby sa vyšlo časovo a cenovo náročnému kroku sterilizácie, je NGIB postavená na využití extrémofilných mikroorganizmov kultivovaných v nesterilných podmienkach. Tieto mikroorganizmy sú schopné rasti v abnormálnych hodnotách teploty, pH alebo aj pri vysokom osmotickom tlaku. To bráni kontaminácii biotechnologického procesu zo vzduchu, vody, substrátov alebo celkovo z prostredia inými mikroorganizmami. Použitie extrémofilov v rámci NGIB taktiež ponúka možnosť použitia neobvyklých substrátov akými sú napríklad celulóza, chitín alebo dokonca aj kultiváciu na plynných substrátoch (H₂, CO, CO₂, CH₄) [23, 24].

Mikroorganizmus zo skupiny extrémofilov použitý v rámci NGIB by mal byť schopný rýchleho rastu na rôznych substrátoch a zároveň odolný voči inej mikrobiálnej kontaminácii. Vhodný producent v NGIB disponuje najčastejšie kombináciou viacerých výnimočných kultivačných vlastností, čím získava ešte väčšiu odolnosť voči kontaminácii. Mnoho archeí spĺňa spomínané požiadavky, no obmedzenie použitia v produkcii NGIB je v ich pomalom raste. Ďalšími možnými kandidátmi na NGIB producentov sú extrémofilné riasy, huby a najmä extrémofilné baktérie. V súčasnosti je možné použiť nástroje molekulárneho

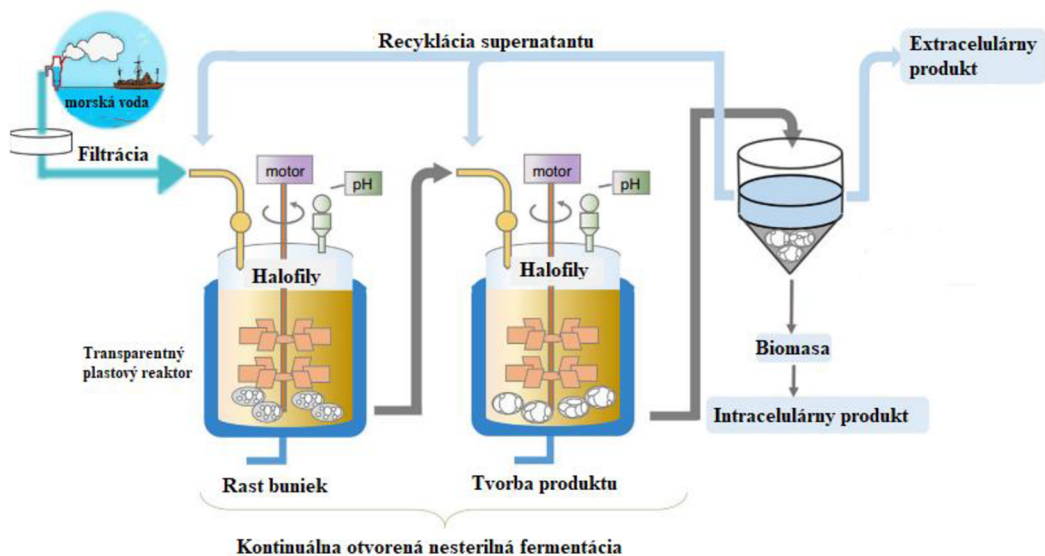
inžinierstva na návrh ideálneho bakteriálneho kmeňa pre NGIB, pokiaľ máme k dispozícii jeho genómové informácie [22].

2.3.3 Halofilné mikroorganizmy

Extrémofilné mikroorganizmy dokážu rásť v prostredí s rozmedzím koncentrácie soli od destilovanej vody až po nasýtený slaný roztok. Organizmami, ktoré zvládajú veľmi dobre osmotický stres sú halofilné alebo halotolerantné mikroorganizmy. Ich zástupcami sú rôzne druhy archeí, siníc, zelených rias a baktérií. Tieto mikroorganizmy rastú v prostredí s koncentráciou soli od 0,5–5,2 M. Halofily sa adaptujú na život v prostredí s vysokou koncentráciou soli pomocou rôznych mechanizmov, ktoré im pomáhajú udržiavať vysoký intracelulárny osmotický tlak. Jedným zo spôsobov ako udržať tento stav, je kumulácia vysokého obsahu soli v cytoplazme. Tento proces je riadený cez iónové pumpy a transportné proteíny. Ďalším spôsobom, ako halofilné mikroorganizmy vyrovnávajú osmotický tlak je akumuláciou vysokých koncentrácií organických osmotických rozpustených látok [17, 18, 25].

2.3.4 Halofilné baktérie v NGIB

Vzhľadom k podmienkam, v ktorých halofilné baktérie žijú, sa stávajú odolnejšími voči mikrobiálnej kontaminácii. Bolo potvrdené, že halofily dokážu rásť v otvorených nesterilných podmienkach v prostredí morskej vody bez kontaminácie niekoľko týždňov až mesiacov (Obrázok 6). Tým sa stávajú výbornými kandidátmi na použitie v NGIB. Halofilné baktérie sa úspešne používajú v rámci fermentačných procesov na výrobu polyhydroxyalkanoátov použitím morskej vody. Zároveň sa nástrojmi genetického inžinierstva halofilných baktérií zvýšila účinnosť produkcie PHA, konkrétne napríklad u rekombinantného bakteriálneho rodu *Halomonas* spp. TD01. Ide o možné vylepšenia konkrétnych vlastností, vďaka ktorým dôjde k syntéze viacerých produktov. Pri použití halofilných baktérií na produkciu PHA a vynechaní kroku sterilizácie sa ušetrí veľké množstvo vody a energie (premena vody na vysokoteplotnú vodnú paru) [22, 26].



Obrázok 6 Použitie halofilného bakteriálneho kmeňa *Halomonas bluephagenesis* v NGIB. Biotechnologický proces prevádzkovaný za otvorených, nesterilných podmienok s úsporou vody a energie, upravené z [22].

2.3.5 Termofilné mikroorganizmy

Teplota prostredia mikroorganizmov vo veľkej miere ovplyvňuje ich fyzikálne a biochemické procesy. Pri vysokej teplote sa zvyšuje tekutosť membrán a dochádza k denaturácii biomolekúl. Vzhľadom na meniacu sa teplotu sa mení aj rozpustnosť plynov (O₂, CO₂), čo spôsobuje problém vodným organizmom. Naopak pri nízkych teplotách sa tvoria ľadové kryštály, ktoré poškadzujú cytoplazmatickú membránu [17, 18].

Z hľadiska teploty rozdeľujeme mikroorganizmy na psychrofilny s optimálnou teplotou rastu menšou než je 15 °C a na mezofily, ktorých optimálna teplota rastu je okolo 37 °C. Pokiaľ je teplota rastu vyššia než 50 °C hovoríme o termofilných mikroorganizmoch. Hypertermofily rastú pri teplote vyššej než 80 °C. Termofilné mikroorganizmy sú zastúpené rôznymi druhmi baktérií, napríklad fotosyntetické baktérie (sinice, zelené a fialové baktérie), enterobaktérie (napríklad *Bacillus*) a tionicke baktérie (napr. *Thiobacillus*), ale aj archea (*Pyrococcus*, *Thermococcus* a iné) [18].

Rovnako ako iné extrémofilné mikroorganizmy, aj termofily sa musia prispôbiť na život vo vysokých teplotách tým, že disponujú špeciálnymi mechanizmami. Jedným z príkladov dopadu vysokej teploty v živom organizme je aj meniacu sa permeabilita cytoplazmatickej membrány v závislosti od teploty. Vzhľadom k zvýšenej priepustnosti protónov cez cytoplazmatickú membránu väčšina termofilov sa tomuto deju prispôbila tak, že používa bioenergetiku spojenú s iontami Na⁺. Na rozdiel od termofilov, psychrofilné a mezofilné mikroorganizmy udržujú konštantnú permeabilitu cytoplazmatickej membrány reguláciou fosfolipidového zloženia. Pri teplotnej adaptácii proteínov na vysokú teplotu, buď dochádza k adaptácii aminokyselinovej sekvencie proteínu mutáciami alebo k vplyvu rôznych metabolitov a kofaktorov. Avšak vždy sa pozeráme na viacero jemných interakcií, ktoré sú charakterizované pre každý druh proteínu [21].

2.3.6 Termofilné baktérie v NGIB

Termofilné baktérie sú taktiež odolné voči viacerým ďalším extrémnym podmienkam, než je len vysoká teplota. Denaturačné činidlá alebo veľký rozsah hodnôt pH sú ďalšími extrémnymi podmienkami, ktoré rozhodujú o použití termofilných baktérií v NGIB. Enzýmy termofilov (napr. celulózy, xylázy, amylázy, proteázy) majú vďaka výnimočným vlastnostiam široké uplatnenie v potravinárskom a farmaceutickom priemysle. Jedným z týchto enzýmov je napríklad xylanáza z bakteriálneho kmeňa *Thermus brockianus* a *Thermotoga thermarum*. Vďaka vysokej optimálnej reakčnej teplote približujúcej sa k hodnote 95 °C, tepelnej stabilite a vysokej špecifickej aktivite enzýmu xylanázy sú tieto bakteriálne kmene vhodnými kandidátmi na použitie v priemyselných biotechnológiách. Jedinečné fyziologické, metabolické a biotechnologické vlastnosti termofilných baktérií sú študované na základe sekvencie ich genómu. *Thermotoga*, *Thermus* a *Caldicellulosiruptor* patria medzi najviac preštudované bakteriálne rody termofilných baktérií. Dnešné moderné genetické nástroje prinášajú možnosti použitia metabolického inžinierstva pre nové biotechnologické aplikácie termofilných baktérií [22].

2.4 Bioinformatická analýza

Bioinformatika, ako vedný odbor spájajúci biológiu s informatikou, sa zaoberá skúmaním sekvencií biologických makromolekúl v genóme. Jej úlohou je vyhľadávanie, spracovanie

a analýza dát zo sekvencie a štruktúry nukleových kyselín a proteínov za pomoci výpočtovej techniky. Analýza genetického kódu nástrojmi bioinformatiky neprináša len výsledky o postupnosti báz DNA alebo odpoveďou na otázku, ktoré úseky sekvencie aminokyselín sú zodpovedné za štruktúrnu a regulačnú úlohu. Ale môžeme dokonca vyvodit' aj zákonitosti, na základe ktorých sme schopní odhadnúť funkcie jednotlivých úsekov genómu alebo sekvenčných motívov proteínov. Cieľom bioinformatickej analýzy je vyhľadávanie funkčných sekvencií v genómoch, katalogizácia sekvencií proteínov a nukleových kyselín, napríklad podľa evolučnej príbuznosti alebo biologickej úlohe. Bioinformatika sa rovnako zaoberá aj vývojom algoritmov a programov, ktoré slúžia na spracovanie a analýzu týchto sekvencií. Ďalšou z úloh bioinformatickej analýzy je vzájomné skúmanie príbuzných génov, s cieľom vytvoriť evolučnú históriu skúmaných organizmov [27].

2.4.1 Verejne dostupné zdroje dát

Významné odborné časopisy požadujú od autorov vedeckých článkov, ktorých súčasťou sú aj sekvenčné dáta, aby tieto dáta boli voľne prístupné odbornej verejnosti. Databázy rozdeľujeme na moderované a nemoderované. Nemoderované databázy nie sú nijak kontrolované, môže do nich ktokoľvek prispievať s novými dátami, čo vedie k otázke ohľadne dôveryhodnosti týchto dát. Jedinou podmienkou vloženia dát do nemoderovaných databáz je, aby boli dáta správneho typu a v správnom formáte. Pri moderovaných databázach môže správca vyžadovať od prispievateľa niekoľko kritérií, ako napríklad vloženie dát, ktoré boli už zverejnené v rámci experimentálnych výsledkov v recenzovanom časopise. Dnes existuje niekoľko desiatok verejne dostupných databáz. V prípade DNA sekvencií sú dostupné tri najznámejšie, navzájom prepojené veľké online dostupné verejné zdroje dát – GenBank, EMBL (European molecular biology laboratory data library) a DDBJ (DNA data bank of Japan), ktoré sú súčasťou medzinárodného konsorcia – International nucleotide sequence database collaboration [28, 29, 30].

2.4.1.1 Vyhľadávanie v online dostupných databázach

V prípade aktívneho používateľa dát z týchto databáz je výhodne si zaobstarať kompletne vydanie celej databázy. Pre užívateľa, ktorý potrebuje z databázy len konkrétne informácie, slúži webové užívateľské rozhranie k vyhľadávaniu a sťahovaniu záznamov podľa vopred zvolených kritérií. Aj keď obsah databáz je zjednotený, každá databáza sa líši užívateľským rozhraním. Užívateľ sa dostáva k dátam prostredníctvom rozhrania Entrez pre databázu GenBank v americkom Národnom centre pre biotechnologické informácie (National center for biotechnology information-NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/search/>) a cez rozhranie SRS (Sequence retrieval system) pre databázu EMBL na Európskom ústave pre bioinformatiku (European bioinformatics institute, <https://www.ebi.ac.uk/>). V oboch rozhraniach je možné vyhľadávať záznamy na základe prístupových kódov, kľúčových slov v názvoch, mien autorov alebo literárnych citácií. Vzhľadom k tomu, že rozhranie SRS poskytuje viacej nástrojov, stránky prechádzajú neustálym vývojom a teda používanými nástrojmi sa užívateľ ťažšie orientuje, je rozhranie Entrez viac obľúbené medzi užívateľmi. Aj keď disponuje menším počtom nástrojov na vyhľadávanie, je stabilne usporiadané, jednoduchšie a pre začiatočníkov oveľa prívetivejšie [27, 28, 29, 30].

2.4.1.2 Rozhranie Entrez databázy NCBI

Entrez nie je samostatná databáza, ale ide o rozhranie, prostredníctvom ktorého je možné do databázy vstúpiť a prechádzať všetky jej časti. Entrez obsahuje informácie o nukleotidových/proteínových sekvenciách a o ich 3D štruktúre, ďalej obsahuje mapovacie informácie a záznam z PubMed. Entrez poskytuje integrované vyhľadávanie informácií pomocou susedných a pevných odkazov. Koncept susedného odkazu umožňuje pri prehľadávaní sekvencií, štruktúr a informácií z PubMed vzájomné prepojenie záznamov v rámci databázy a to použitím možnosti zobrazenia „príbuzných objektov“. Napríklad pri vyhľadávaní sekvencie, môžeme pomocou Entrez vyhľadať ďalšie sekvencie, ktoré sú podobné pôvodnej sekvencii a zároveň pri jednom vyhľadávaní môžeme získať prístup k odkazom na citácie v PubMed. Príbuzné objekty sú vybrané a zoradené na základe kombinácii kritérií, napríklad zhodných kľúčových slov, mien autorov [32].

Entrez Gene je géново špecifická databáza v Národnom centre pre biotechnologické informácie NCBI, ktorá poskytuje celočíselné identifikátory génov modelových organizmov. Dáta zahŕňajú nomenklatúru, chromozomálnu lokalizáciu, génové produkty a ich atribúty, súvisiace markery, sekvencie, podrobnosti variácií, mapy, informácie o expresii, fenotypové interakcie, odkazy na citácie a mimo iného aj odkaz na externé databázy. Entrez Gene je súčasťou reprezentácie génových informácií v NCBI [33].

2.4.1.3 Algoritmus BLAST

Algoritmus BLAST bol vyvinutý na vyhľadávanie podobností medzi nukleotidovými sekvenciami DNA alebo aminokyselinovými sekvenciami proteínov. Je založený na rovnakom princípe ako iné metódy, avšak v porovnaní s inými algoritmami je rýchlejší kvôli vyhľadávaniu iba vzácnejších a významnejších vzorov v aminokyselinových alebo nukleotidových sekvenciách. Medzi používateľmi je program BLAST veľmi populárny vďaka svojej ľahkej dostupnosti na mnohých webových lokalitách, napr. v rámci veľkého servera v NCBI [31].

2.4.1.4 PubMed

Pubmed je voľne dostupná databáza od roku 1996 na vyhľadávanie a získavanie biomedicínskej a prírodovednej literatúry (Obrázok 7). PubMed spadá pod NCBI v Národnej lekárskej knižnici USA (NLM), ktorá sa nachádza v Národnom inštitúte zdravia (NIH). Je to opäť databáza dostupná cez rozhranie Entrez. Obsahuje viac ako 32 miliónov citácií a abstraktov. Aj keď nezahŕňa celé vedecké články, pomocou Pubmed vieme vyhľadať odkazy na celý text z iných zdrojov, napríklad z PubMed Central (PMC). PubMed Central je centrálné úložisko pre literatúru prírodných vied. Jeho cieľom je poskytovať komplexný archív recenzovanej literatúry v elektronickej podobe [34, 35].

Každý vedecký článok v databáze má vlastný identifikátor. Buď globálny identifikátor nezávislý na databáze, ktorým je napríklad DOI číslo (Digital object identifier). Pokiaľ je recenzovaný článok zverejnený v PubMed je k nemu priradený ešte aj patentovaný identifikačný systém NLM – PMID (jedinečné 8-miestne číslo). Priradenie PMID je nevyhnutným krokom pri ukladaní, vyhľadávaní a načítaní informácií [36].

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

Log in

PubMed.gov

Search PubMed

Advanced User Guide

Save Email Send to Display options

Review > Appl Microbiol Biotechnol. 2019 Feb;103(3):1131-1141.
doi: 10.1007/s00253-018-9538-8. Epub 2018 Dec 3.

PHA synthase (PhaC): interpreting the functions of bioplastic-producing enzyme from a structural perspective

názov vedeckého recenzovaného článku

Min Fey Chek¹, Ayaka Hiroe^{2,3}, Toshio Hakoshima¹, Kumar Sudesh⁴, Seiichi Taguchi^{5,6}

Affiliations + expand
PMID: 30511262 DOI: 10.1007/s00253-018-9538-8 DOI identifikátor

patentovaný identifikačný systém NLM

Abstract

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are biopolymers synthesized by a wide range of bacteria, which serve as a promising candidate in replacing some conventional petrochemical-based plastics. PHA synthase (PhaC) is the key enzyme in the polymerization of PHA, and the crystal structures were successfully determined using the catalytic domain of PhaC from *Cupriavidus necator* (PhaC_{Cn}-CAT) and *Chromobacterium* sp. USM2 (PhaC_{USM2}-CAT). Here, we review the beneficial mutations discovered in PhaCs from a structural perspective. The structural comparison of the residues involved in beneficial mutation reveals that the residues are near to the catalytic triad, but not inside the catalytic pocket. For instance, Ala510 of PhaC_{Cn} is near catalytic His508 and may be involved in the open-close regulation, which presumably play an important role in substrate specificity and activity. In the class II PhaC1 from *Pseudomonas* sp. 61-3 (PhaC1_{P61-3}), Ser325 stabilizes the catalytic cysteine through hydrogen bonding. Another residue, Gin508 of PhaC1_{P61-3} is located in a conserved hydrophobic pocket which is next to the catalytic Asp and His. A class I, II-conserved Phe420 of PhaC_{Cn} is one of the residues involved in dimerization and its mutation to serine greatly reduced the lag phase. The current structural analysis shows that the Phe362 and Phe516 of PhaC from *Aeromonas caviae* (PhaC_{Ac}) are assisting the dimer formation and maintaining the integrity of the core beta-sheet, respectively. The structure-function relationship of PhaCs discussed in this review will serve as valuable reference for future protein engineering works to enhance the performance of PhaCs and to produce novel biopolymers.

Keywords: Beneficial mutation; Dimerization; Evolutionary engineering; Open-closed form; Polyhydroxyalkanoate synthase; Substrate specificity; Tertiary structure.

Similar articles

ďalšia podobná literatúra na tému PhaC syntáza

Structure of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase PhaC from *Chromobacterium* sp. USM2, producing biodegradable plastics.
Chek MF, Kim SY, Mori T, Arsad H, Samian MR, Sudesh K, Hakoshima T.
Sci Rep. 2017 Jul 13;7(1):5312. doi: 10.1038/s41598-017-05509-4.
PMID: 28706283 Free PMC article.

FULL TEXT LINKS
SpringerLink

ACTIONS
Cite Favorites

SHARE
Twitter Facebook LinkedIn

PAGE NAVIGATION
Title & authors
Abstract
Similar articles
Cited by
Publication types
MeSH terms
Substances
Related information
Grant support
LinkOut - more resources

Obrázok 7 Databáza PubMed vedeckých recenzovaných článkov z oblastí prírodných vied, ukážka vyhľadávania kľúčového slova PhaC syntáza

2.4.1.5 Uniprot

Uniprot (The universal protein resource) je zbierka proteínových sekvencií a ich anotácií, ktorá poskytuje vedeckej komunite jediný centralizovaný autoritatívny zdroj voľne dostupných informácií. Používateľ môže identifikovať konkrétnu skupinu druhov/poddruhov a kmeňov, aby mohol sledovať pôvod týchto sekvencií. Pre všetky záznamy v Uniprot boli zavedené skóre anotácií, ktoré nám hovoria o množstve informácií o konkrétnom proteíne. Toto skóre je užitočné pri identifikácii najviac charakterizovaných proteínov v rámci porovnávacej analýzy. Vzhľadom k nepretržitému pokroku v sekvenovaní ďalších generácií proteínov, existuje veľa ďalších, ktoré nebudú experimentálne charakterizované. Zároveň sa vďaka rýchlo vyvíjajúcim technológiám v proteomike a genomike zavádzajú nové dátové typy. Toto všetko poskytuje veľkú príležitosť pre biologické a biomedicínske vedy. Preto je veľmi dôležité identifikovať v literatúre experimentálne charakterizácie proteínov a tým uľahčiť výskumníkom ich vedecké objavy [37, 38].

2.4.2 Sekvenovanie DNA a proteínov

Sekvenčné dáta sú digitálne zápisy lineárnej postupnosti monomérov – poradie nukleotidov v molekule DNA alebo poradie aminokyselín v proteíne. Smer sekvencie odpovedá smeru biosyntézy makromolekuly, teda pre DNA alebo RNA je to od 5' k 3' koncu a pre proteíny od N-koncu k C-koncu. Najjednoduchšia podoba zápisu sekvencie, či už nukleotidov alebo aminokyselín je zápis reťazca monomérov v IUPAC v znakoch uložených v textovom súbore. Takýto formát je označovaný ako surové dáta (raw data, raw format) [28].

2.4.2.1 Formát FASTA

Aby bolo možné ďalej pracovať so sekvenciami v raw formáte a dlhodobo uchovávať s dodatočnými informáciami, sa používajú rôzne iné formáty zápisu. Jedným z najpoužívanejších je formát FASTA, ktorý je zobrazený na obrázku 8. Tento formát je vhodný pre nukleotidové a aj aminokyselinové sekvencie. Dáta zapísané v textovom súbore FASTA začínajú znakom väčší než > a za ním pokračuje zápis v hlavičke, kde sú zapísané základné informácie o sekvencii (názov sekvencie, anotácie a iné). Samotná sekvencia býva bez medzier a cudzích znakov. Často sa stretávame s formátom FASTA, ktorý je spojením viacerých sekvencií rovnakého typu a je možné ich naraz importovať do programu a následne ďalej so sekvenciami pracovať [28].

```
>class I poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase Tepidimonas thermarum
MTANPRDQGNPWLQWSQQALQQWTQAVQTTLQGVQPAGGAGAVPGSGDAAGLSQVLQRLSGQPFVQLDPR
AWLEIQDYLRRELQGLVQVQPPRRDRRFAADAWARNPVAAYSAAWYLLNARTLMRMADAVQADPKT
RARVRFVAVQQWIDASAPSNFLALNAEAQQKALETQGESIAKGVQNLHDMKQGFVSMTHSAFEVGRNVA
TTEGQVVFENELFQLIEYKPLTPKVHERPFLVVPKINKYYILDLQPDNSFLRYAVEQGHRTFVMSWRNP
DAELAQATWDDYIENAVIRAIDVREIGKADTVNALGFCVGGTMLGTALAVLAARGERKVESVTFLTLL
DFTDTGVLDVFIIDEAFVQLRELOFANGGILPGRELATTFSLRPNLDLVWNYVVGNYLKGETPPPFLLY
NSDSTNLPGRYYAWYLRHLYLQNELCQPGTLTVCGERIDLGAIDI PAYVYGSREDHIVPIGGAYATTQHL
GGPVRVFMGASGHIAGVINPAAKGKRSYWTGAPNHFPFAVDWDIDAATEHKGSSWTDWAPWLAHAGPQV
AAPRSYGNRRHKPIEPAPGRYVRVSAQEALATLAAGGRSV
```

Obrázok 8 Aminokyselinová sekvencia génu *phaC* bakteriálneho kmeňa *Tepidimonas thermarum*

2.4.2.2 Priradenie podobností sekvencií

Porovnávanie dvoch alebo viacerých sekvencií rovnakého typu patrí medzi najdôležitejšie operácie v analýze sekvencií. Výsledkom porovnania sekvencií je napríklad nájdenie podobnosti medzi sekvenciami dvoch proteínov. To nám môže priniesť informáciu o pôvode, štruktúre alebo funkcii týchto proteínov v prípade, ak poznáme biologické údaje u príbuzných typoch proteínov alebo u predka týchto proteínov. Presnosť týchto údajov závisí od toho, do akej miery sú obe sekvencie navzájom podobné [39].

Pri porovnaní sekvencií je prvým krokom priradenie – alignment, kedy sekvencie po celej dĺžke priložíme k sebe. Týmto zarovnaním získame zápis dvoch pod sebou umiestnených riadkov tak, aby identické časti aminokyselín alebo báz ležali pod sebou a vytvárali dvojicu. Ďalším krokom priradíme identickej dvojici znakov konkrétnu číselnú hodnotu, ktorá bude vyjadrovať vzájomnú podobnosť. Napríklad v prípade podobnosti priradíme páru hodnotu 1 a v prípade odlišnosti hodnotu 0. Posledným krokom je výpočet celkovej hodnoty podobnosti (score). Ten získame súčtom hodnôt podobnosti všetkých pozícií. Pokiaľ porovnáваме rôzne dlhé sekvencie, je dôležité vydeliť celkovú hodnotu podobnosti počtom jednotlivých priradených pozícií. Pri hľadaní podobnosti sekvencií rozlišujeme globálne a lokálne priradenie

dvoch alebo viacerých sekvencií. Globálne priradenie je jednoduchší proces a používa sa napríklad pri proteínoch, pri ktorých predpokladáme vysokú podobnosť. Alternatívou je lokálne priradenie iba najpodobnejšej časti sekvencie [27, 28, 39].

Počas analýzy pracujeme so sekvenčnými motívmi, ktorými môže byť napríklad poradie aminokyselín v určitej skupine proteínov. Táto skupina proteínov je prepojená rovnakým pôvodom, teda hovoríme o evolučne prepojených homologických proteínov, ktoré sú evolučne konzervované. Motív definujeme a zapisujeme rovnakým spôsobom ako jednotlivú sekvenciu. V takýchto prípadoch motív zdieľa viacero sekvencií, z ktorých pri analýze vychádzame. Pri viacnásobnom priradení – multiple alignment sa podobne ako pri jednoduchom priradení zapisujú sekvencie pod seba tak, aby sa na týchto pozíciách vyskytovali rovnaké, poprípade podobné aminokyseliny. Zarovnanie viacerých sekvencií je užitočné pri identifikácii príbuzných skupín proteínov na základe ich primárnej štruktúry a pomocou štatistických modelov je rovnako možné vyhodnotiť funkčný význam týchto motívov (napr. identifikácia aktívnych miest enzýmov alebo regulačne dôležité miesta posttranslačných modifikácií) [28, 41].

Medzi najbežnejšie formáty súboru používané k zápisu priradenia je formát CLUSTAL. Hlavička začína slovom CLUSTAL a môže byť v nej zapísaný krátky komentár. Konsenzuálne pozície sú vyznačené voliteľným znakom, najčastejšie „ * “ pre pozíciu, ktorá je úplne konzervovaná, niekedy tiež „ : “ a „ . “ pre pozície, kde väčšina zastúpenia je konzervovaná. Ďalším formátom, ktorý je oveľa jednoduchší je formát FASTA [28].

2.4.2.3 CLUSTAL

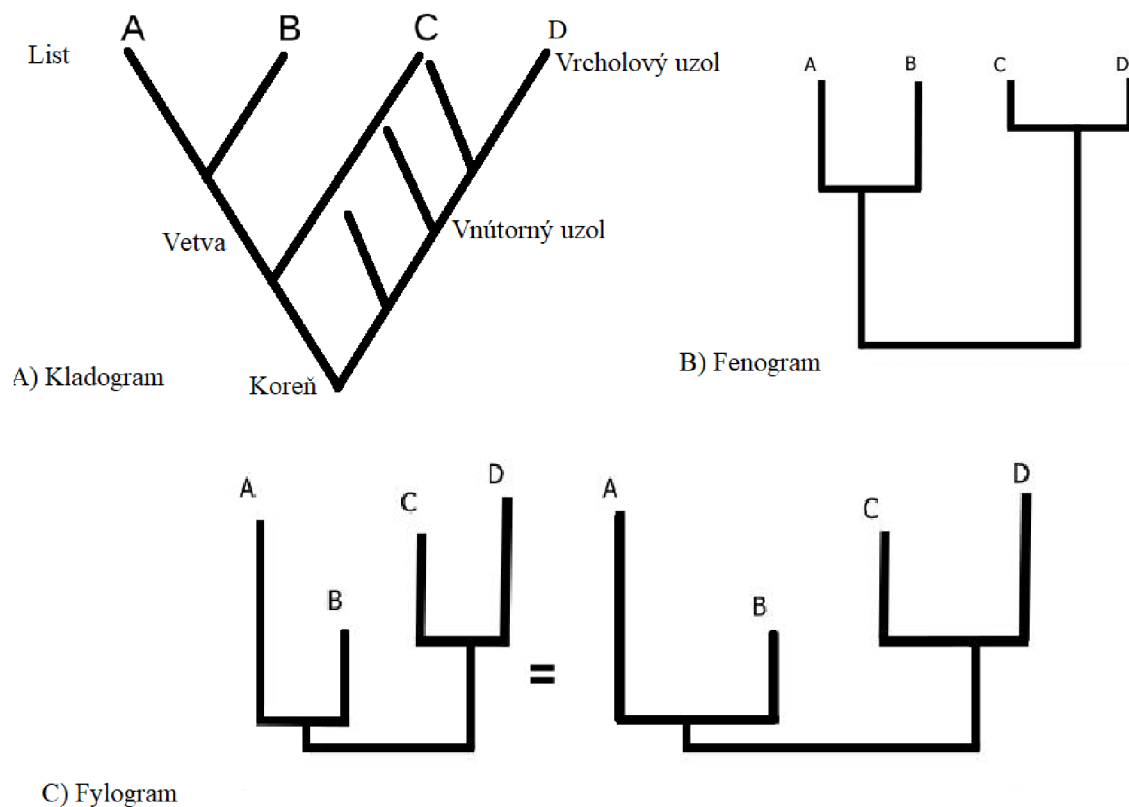
Priradenie sekvencie nukleotidov alebo aminokyselín je významnou metódou molekulárnej biológie. Vďaka multiple alignment dokážeme identifikovať a charakterizovať „proteínové rodiny“, detegovať alebo demonštrovať homológiu medzi novými nájdenými sekvenciami a existujúcimi rodinami sekvencií. Dokážeme predpovedať sekundárne a terciárne štruktúry nových sekvencií alebo navrhnúť primery pre PCR. Kládie sa veľký dôraz na vývoj účinných a presných automatizovaných postupov konštrukcie viacnásobného priradenia. Konkrétny prípad stratégie pre plne automatickú konštrukciu viacnásobného priradenia je príklad algoritmu CLUSTAL, na ktorom je založený program CLUSTAL W. Tento program je voľne dostupný a často používaný. Stretávame sa s rôznymi verziami tohto programu, ktoré sa líšia užívateľským rozhraním, prednastavenými parametrami a výberom meniteľných parametrov. Na každodennú analýzu slúži kópia programu – CLUSTAL X. Oba programy prijímajú vstupné dáta v niekoľkých formátoch, vrátane formátu FASTA. Postup k vytvoreniu viacnásobného priradenia je zarovnanie najbližších príbuzných sekvencií a tie sa potom zarovnávajú k sebe, pričom sa ponechajú počiatočné zarovnania. Tento postup funguje v prípade, že sú sekvencie dostatočne úzko spojené (viac ako polovica konzervovaných skupín). Rozhranie CLUSTAL X poskytuje prostredie, kde používateľ môže vykonávať viac zarovnaní, zobrazovať výsledky a v prípade potreby vylepšiť manuálne zarovnanie. Program CLUSTAL OMEGA je opäť používaný pri vytváraní viacnásobného priradenia viac ako dvoch homológnych sekvencií aminokyselín alebo proteínov. Tento program bol navrhnutý na rýchle a presné zarovnanie extrémne veľkých sekvencií [28, 42, 40].

2.4.3 Fylogenetický strom

Molekulárna fylogenéza skúma evolučné vzťahy medzi makromolekami – medzi génmi a proteínmi. V rámci fylogenetickej analýzy sa hodnotia zmeny v sekvenciách nukleotidov a aminokyselín a ich korelácie sa ilustrujú prostredníctvom dendrogramov. Dendrogram (z gréckeho slova dendron – strom) je v numerickej taxonómii nazývaný akýkoľvek grafický výkres alebo dvojrozmerný diagram, ktorý vytvára taxonomický systém. Reprezentácia taxonomického systému je najviac vhodná pri interpretácii výsledkov analýzy z hľadiska taxonomickej hierarchie [43, 44].

Informácie získané v rámci fylogenetickej analýzy majú zvyčajne formu morfológických, behaviorálnych alebo molekulárnych údajov. Na základe tejto analýzy sa odhadujú historické vzťahy medzi génmi alebo druhmi. Taxóny – študované objekty fylogenetickej analýzy (gény, proteíny, druhy alebo iná organizačná úroveň) sú prepojené prostredníctvom historických vzťahov. Aplikácia fylogenetickej analýzy je pomerne široká a jej uplatnenie nájdeme v mnohých biologických a medicínskych odvetviach. Pomocou fylogenetickej analýzy je možné zrekonštruovať sekvenciu pôvodných génov, z ktorých sú odvodené existujúce gény. V rámci medicínskych aplikácií je analýza vhodná na štúdium pôvodu a epidemiológie ľudských chorôb a v rámci ekológie sa s ňou stretávame pri odvodzovaní vývoja ekologických vlastností a správania v čase, pri odhade historických biogeografických vzťahov a tým spojenej ochrany ohrozených druhov. V rámci fylogenetickej analýzy sa pri odvodení vzťahov používajú najzakonzervovanejšie gény, jedným z takýchto génov je napríklad gén kódujúci 16S rRNA ribozomálnu podjednotku. Ribozomálna RNA kóduje hlavnú štruktúrnu zložku ribozómov, je prítomná počas celého života a vyvíja sa tak veľmi pomaly, že pri sekvencii rRNA baktérií a ľudí by bolo možné nájsť ešte nejakú podobnosť a vytvoriť fylogenetickú analýzu [46].

Základnou časťou fylogenetického stromu sú operačné taxonomické jednotky (Operational taxonomic unit – OTU), reprezentované sekvenciami makromolekúl. Dendrogram spojuje OTU prostredníctvom vetví (branches) s uzlami (nodes). Pokiaľ je vo fylogenetickom strome vyobrazená súvislosť medzi organizmami, ktorá je spojená časom, ide o tzv. zakorenený strom. V takom prípade koreň (root) predstavuje spoločného predka. Dĺžka vetví predstavuje evolučnú vzdialenosť uzlov, čo si môžeme napríklad predstaviť ako počet mutácií, ktoré nastali. Často sa ale dĺžka vetví v dendrograme neuvádza a záujem vzbudzuje len topológia stromu. Koncové vetvy znázorňujú jednotlivé druhy a listy konkrétny organizmus. Fylogenetické stromy rozdeľujeme na základe prítomnosti koreňa na koreňové a nekoreňové a podľa obsahu informácií na fylogram, fenogram a kladogram (Obrázok 9) [28, 47].



Obrázok 9 Typy fylogenetických stromov [47]

Základom klastrovej analýzy je matica podobnosti, ktorej riadky a stĺpce odkazujú na operačné taxonomické jednotky – taxóny. Jej vstupy sú odhady podobnosti medzi týmito jednotkami. Na základe topológií fylogenetických stromov je možné sekvencie patriace do tej istej rodiny rozdeliť do podrodín, čo ilustruje evolučný vzťah a funkčnú rozmanitosť v rámci jednej rodiny. Ak by sme skúmali už existujúce biochemicky experimentálne charakteristiky proteínov vykreslené vo fylogenetickom strome, vedeli by sme preskúmať koreláciu medzi podobnosťami sekvencií a biochemickými vlastnosťami. Tým by sme vedeli získať informácie o štruktúre a funkcii necharakterizovaných proteínových členov rodiny [43, 44].

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

Súčasťou experimentálnej časti diplomovej práce bolo vyhľadávanie termofilných bakteriálnych kmeňov na základe podobnosti proteínovej sekvencie I. triedy génu *phaC* termofilnej baktérie *Cupriavidus necator*. Experimenty boli ďalej založené na bioinformatickej analýze zbierky baktérií a to konkrétne na práci v online dostupných databázach a v softvère MEGA X a v programe Operon-mapper.

3.1 Použité metódy

3.1.1 Vyhľadávanie termofilných bakteriálnych kmeňov produkujúcich PHA

Na vyhľadávanie termofilných baktérií bola použitá sekvencia génu *phaC* bakteriálneho kmeňa *Cupriavidus necator* (Obrázok 10), ktorý je modelovým organizmom pre metabolizmus PHA. Jednalo sa o I. triedy PHA syntázy. Na túto analýzu bola použitá databáza GenBank, kde pomocou algoritmu BLAST boli na základe podobnosti tejto sekvencie nájdení potenciálni producenti PHA medzi bakteriálnymi kmeňmi. Rovnako bol použitý aj algoritmus HMMER, ktorý pracuje na podobnom princípe ako BLAST algoritmus. Následne zo všetkých nájdených baktérií boli podľa názvu oddelené len termofilné baktérie a to použitím filtra, ktorý vyhľadával bakteriálne kmene, ktoré v názve obsahovali -thermo, -tepidi, -caldi, -thio. Termofilita u nájdených baktérií bola skontrolovaná pri vyhľadávaní ich kultivačných podmienok (hodnoty optimálnej teploty rastu nad 45 °C) v databázach podľa čísla zbierky. Zároveň boli doplnené ďalšie informácie ohľadne grampozitivity/negativity, kultivačných podmienok (hodnoty optimálnej teploty, pH a koncentrácie soli) a webový odkaz na odborný článok zahrňujúci taxonomické zaradenie konkrétnej termofilnej baktérie. Rovnako boli preštudované základné morfológické informácie o bunkách a kolóniách.

```
MATGKGAAASTQEGKSQPFKFTPGPFDPATWLEWSRQWQGTEGNGHAAASGI PGLDALAG
VKIEPAQLGDIQQRYMKDFSALWQAMAEGKAEATGPLHRRFAGDAWRTNLPYRFAAAFY
LLNARALTELADEADAKTRQRIRFAISQWVDAMSPANFLATNPEAQRLLIIESGGESLR
AGVRNMEDLTRGKISQTDSESAFEVGRNVAVSEGAVVFENEYFQLLQYKPLTDKVHARPL
LMVPPCINKYYILDLQPESSLVRHVVEQGHTVFLVSWRNPDASMGSTWDDYIEHAAIRA
IEVARDISGQDKINVLGFCVGGTIVSTALAVMAARGQHPAASVTLLTLLDFADTGILDV
FVDEGHVQLREATLGGAGAPCALLRGLLELANTFSFLRPNDLVWNYVVDNYLKGNTVPVFF
DLLFWNGDATNLPGPWYCWYLRHTYLQDELKVPKGLTVCGVPVDLASIDVPTYIYGSRED
HIVPWTAAYASTALLANKLRFVLGASGHIAGVINPPAKNKRSHWTNDALPESPOQWLAGA
TEHHGSWWPDWTAWLAGQAGAKRAAPANYGNARYPAIEPAPGRYVKAKA
```

Obrázok 10 Proteínový zápis sekvencie génu *phaC* I. triedy bakteriálneho kmeňa *Cupriavidus necator* vo formáte FASTA, na základe ktorej boli podľa podobnosti sekvencií vyhľadávané termofilné baktérie v online databázach NCIB BLAST a HMMER

3.1.2 Zbierka utilizovaných substrátov pre konkrétne bakteriálne kmene

Ďalšou časťou experimentálnej časti diplomovej práce bolo zhromaždenie možných druhov substrátov, ktoré dokážu nájdené bakteriálne kmene utilizovať ako zdroj uhlíka. Táto informácia je kľúčová pre určenie biotechnologického potenciálu daného mikroorganizmu. Postup pri vytvorení tejto zbierky pozostával z vyhľadávania vedeckých článkov z online databáz PubMed a NCBI – taxonomické vyhľadávanie. Na základe názvu bakteriálneho kmeňa boli nájdené vedecké články obsahujúce taxonomické zaradenie termofilnej baktérie, spolu s opisom základných charakteristík tohto bakteriálneho kmeňa a s experimentami rôznych

druhov substrátov, ktoré baktéria využila ako zdroj uhlíka. Na základe typu substrátov boli následne vybraté tie bakteriálne kmene, ktoré boli najviac vhodné pre priemyselné použitie k produkcii polyhydroxyalkanoátov.

3.1.3 Vyhľadanie vedeckých článkov o produkcii PHA termofilnými baktériami

Pokiaľ bolo v rámci BLAST analýzy nájdený bakteriálny kmeň, ktorý disponoval s génom *phaC*, následne sa overovala produkcia PHA v rámci dostupnej literatúry. Na vyhľadanie vedeckých článkov, ktoré obsahovali zmienku o produkcii PHA konkrétnej termofilnej baktérie alebo už konkrétne experimenty s produkciou PHA bola opäť využitá online dostupná databáza PubMed. Všetky vedecké články o produkcii polyhydroxyalkanoátov termofilnými baktériami boli odcitované a vypísané spolu s informáciami o kultivačných podmienkach.

3.1.4 Vyhľadanie génu *phaC/16S rRNA* v online dostupných databázach

V niektorých prípadoch došlo k tomu, že boli nájdené informácie o produkcii polyhydroxyalkanotátov vo vedeckých prácach, no chýbala sekvencia *phaC* génu alebo frekvencia génu *16S rRNA*. V takomto prípade boli opäť použité voľne dostupné databázy. Pre vyhľadanie génu *phaC* bola použitá databáza UniProt (konkrétne UniProtKb), kde som do vyhľadávania zadala ako kľúčové slove názov bakteriálneho kmeňa. V prípade sekvencie génu *16S rRNA* bola použitá databáza NCBI, kde som v nastavení skonkretizovala vyhľadanie na zdroje o DNA/RNA. Ako kľúčové slovo som opäť použila názov termofilnej baktérie a po zobrazení výsledkov som vyfiltrovala sekvencie zamerané na rRNA.

3.1.5 Sekvencie sekvencie génu *phaC* u nájdených termofilných baktérií

Po vyhľadaní baktérií na základe podobnosti sekvencií génu *phaC* a následného overenia kultivačných podmienok, či sa jedná o termofilné baktérie, sekvencie *phaC* génu boli stiahnuté z online databázy BLAST vo formáte FASTA a uložené v textovom dokumente.

3.1.6 Sekvencie génu *16S rRNA* u nájdených termofilných baktérií

Rovnako ako pri sekvencii génu *phaC*, boli zoskupené aj sekvencie génu *16S rRNA* nájdených termofilných baktérií. Gén *16S rRNA* je konzervovaný a pomaly mutuje a preto bol využitý na fylogenetickú analýzu. Opäť boli tieto sekvencie prístupné v online databáze BLAST stiahnuté a uložené vo formáte FASTA v textovom dokumente.

3.1.7 Zarovnanie sekvencií v programe CLUSTAL OMEGA

Aby bolo možné viacnásobné sekvencie zobrazit' a následne s nimi pracovať v softvéri MEGA X, bolo potrebné zozbierané sekvencie zarovnať (alignment). Na to bol použitý online program CLUSTAL OMEGA (Obrázok 11). Ako prvé boli všetky nájdené sekvencie génu *phaC* a *16S rRNA* termofilných baktérií vložené do jedného textového dokumentu a správne popísané. Následne boli tieto dáta vložené do programu CLUSTAL OMEGA. Po zarovnaní bol výsledok uložený vo formáte .clustal, s ktorým sa ďalej pracovalo v softvéri MEGA X.

The screenshot shows the Clustal Omega web interface. At the top, there is a navigation bar with 'Input form', 'Web services', 'Help & Documentation', and 'Bioinformatics Tools FAQ'. Below this, the page title is 'Multiple Sequence Alignment'. The main content area is divided into three steps:

- STEP 1 - Enter your input sequences:** A dropdown menu is set to 'PROTEIN'. A text box contains a long sequence of amino acid letters. A red box highlights the text 'Správne zvolený typ sekvencie' (Correctly chosen sequence type).
- STEP 2 - Set your parameters:** The 'OUTPUT FORMAT' dropdown is set to 'ClustalW'. A red box highlights the text 'Uloženie výsledkov vo formáte .clustal' (Saving results in .clustal format).
- STEP 3 - Submit your job:** There is a checkbox for 'Be notified by email' and a 'Submit' button.

At the bottom of the interface, there is a footer with the EMBL-EBI logo and links for 'Services', 'Research', 'Training', 'Industry', and 'About EMBL-EBI'.

Obrázok 11 Viacnásobné zarovnanie sekvencií génu *phaC* nájdených termofilných baktérií v online programe Clustal Omega

3.1.8 Vyobrazenie zarovnaných sekvencií softvérom MEGA X

Stiahnuté zarovnané sekvencie génu *phaC* a *16S rRNA* boli vyobrazené pomocou softvéru MEGA X. Vzhľadom k tomu, že tieto zarovnania boli stiahnuté vo formáte .clustal, ktorý nie je podporovaný týmto programom, bolo potrebné prekonvertovať stiahnuté zarovnania do formátu .fasta. Na prekonvertovanie formátu bol použitý online dostupný program Sequence conversion (sequenceconversion.bugaco.com). Pri práci v MEGA X je možné sa rozhodnúť uložiť aktuálny stav všetkých zarovnaní a v neskor v ňom pokračovať pre budúce úpravy.

3.1.9 Bioinformatická analýza v MEGA X

Na bioinformatickú analýzu bol vybraný softvér MEGA X, ktorý je voľne stiahnuteľný. Jedná sa o počítačový program, ktorý poskytuje nástroje pre skúmanie a analýzu nukleotidových a proteínových sekvencií z evolučného hľadiska. Program MEGA vo verzii MEGA X ponúka pokročilé výkonnostné schopnosti na konštrukciu fylogenetických stromov

a rovnako aj bootstrap testov, ktoré boli využité pri analýze zbierky termofilných producentov PHA.

3.1.9.1 Hodnotenie kvality konštrukcie fylogenetických stromov

Pri hodnotení kvality metódy konštrukcie fylogenetických stromov bol v programe MEGA X zhotovený bootstrap test. Aby bol výsledok relevantný, bolo vytvorených 1000 bootstrapových vzoriek. Vzhľadom na cieľ analýzy a výpočtovú náročnosť rôznych konštrukčných metód bola zvolená Neighbor-joining konštrukčná metóda. Vetvy so 70 % zhodou s pôvodným stromom boli považované za dostatočne podporené.

3.1.9.2 Konštrukcia fylogenetických stromov

Na určenie evolučnej analýzy boli skonštruované fylogenetické stromy metódou Neighbor-joining. Pomocou nástrojov, ktoré ponúka program MEGA X boli fylogenetické stromy upravené do výslednej podoby.

3.1.10 Analýza operónu

Na analýzu operónu u vybraných 5 potenciálnych producentov PHA zo zbierky termofilných baktérií bol použitý webový server Operon-Mapper, ktorý predpovedal operón bakteriálneho genómu na základe vzdialenosti susedných génov a ich funkcionality. Najskôr bolo potrebné stiahnutie bakteriálneho genómu vo FASTA formáte z databázy GenBank a rovnako aj .gff formát súboru s anotáciou genómu [45].

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledkom experimentálnej časti bola zbierka termofilných bakteriálnych kmeňov potenciálne schopných produkovať polyhydroxyalkanoáty. Biotechnologický potenciál PHA produkcie týchto termofilných baktérií bol potvrdený na úrovni genómu a pri niektorých baktériách aj na fenotypovej úrovni. Zo získaných informácií z online dostupných databáz a vedeckých prác boli vypracované základné informácie zahrňujúce napríklad kultivačné podmienky daných baktérií a druhy utilizovaných substrátov. Po uložení sekvencie génu *phaC* a *16S rRNA* u jednotlivých baktérií nasledovalo zarovnanie sekvencií v programe CLUSTAL OMEGA. Experimentálna časť pokračovala v softvéri MEGA X, kde bolo na základe zarovnaných sekvencií vykonané fylogenetické porovnanie termofilných baktérií a ich zaradenie do dendrogramu. Pomocou programu Operon-mapper bol analyzovaný genóm potenciálnych producentov PHA z vybraných termofilných baktérií. Výsledkom experimentálnej práce je výber 5 najlepších potenciálnych producentov z pohľadu priemyselných biotechnológií, konkrétne NGIB. Tento výber je teoretickým podkladom pre experimentálne preskúmanie produkcie PHA u termofilných baktérií.

4.1 Termofilné baktérie – potenciálni producenti polyhydroxyalkanoátov pre NGIB

Na základe podobnosti sekvencie génu *phaC* a informácií z dostupnej literatúry bolo nájdených spolu 44 termofilných baktérií. Prítomnosť I. triedy génu *phaC* v genóme baktérie udáva relatívnu možnosť tohto kmeňa produkovať PHA aj na fenotypovej úrovni. Aby sme určili, či bakteriálny kmeň je vhodným producentom polyhydroxyalkanoátov pre novú generáciu priemyselných biotechnológií, bolo potrebné zistiť a porovnať základné kultivačné podmienky. Konkrétne bola pozornosť zameraná na kultivačnú teplotu, hodnotu pH a koncentráciu soli. Rozhodujúcim údajom pre použitie extrémofilov v priemysle je sporulácia a gramovo sfarbenie, ktoré bolo taktiež zaznamenané u každej baktérii. Ďalší parameter, ktorý určuje potenciál kandidáta produkovať PHA na priemyselnej úrovni je typ substrátov, ktorý je schopný utilizovať. Z týchto informácií bolo vybratých 5 najzaujímavejších termofilných baktérií, ktoré by z teoretického hľadiska mohli byť producentami PHA v NGIB.

4.1.1 Kultivačné podmienky u nájdených termofilných bakteriálnych kmeňov

Po vytvorení virtuálnej zbierky termofilných baktérií boli získané základné informácie o podmienkach kultivácie, ktoré sú nižšie konkrétne popísané. Informácie o schopnosti utilizácie jednotlivých substrátov sú obsahom tabuliek v prílohách 8.1.

1. *Amphiplicatus metriothermophilus*

- O gramnegatívnej termofilnej baktérii *Amphiplicatus metriothermophilus* s číslom zbierky DSM 105738 máme dostatok informácií o kultivačných podmienkach. Hodnoty teploty rastu tejto baktérie sa pohybujú v širokom rozmedzí od 37 °C do 65 °C a hodnoty optimálnej teploty sú 48–50 °C. Počas kultivácie je nutné udržiavať hodnoty pH od 6,0 do 9,0, avšak najlepší rast baktérie spozorujeme u hodnoty pH 7,5. Tento bakteriálny kmeň dokáže rásť pri maximálnych hodnotách koncentrácie soli pri 7,5 %. *Amphiplicatus metriothermophilus* je nesporujúca, striktno aeróbná baktéria, ktorej bunky

sú pohyblivé pomocou jedného bičíku. Bakteriálny kmeň je schopný utilizovať N-acetyl-glukosamin, glycerol a rôzne alkoholy.

2. *Aneurinibacillus danicus*

- Tento bakteriálny kmeň s číslom zbierky DSM 21566 je gramvariabilná termofilná baktéria. Teplotný profil tejto baktérie je od 35 °C do 55 °C, pričom optimálna teplota je 45–50 °C. Optimálne hodnoty pH sú 6,5–7,0. Koncentrácia soli počas kultivácie je viac než 5,0 %. Baktéria je schopná tvoriť elipsoidné spóry. Bunky sú tyčinkovitého tvaru dlhé 4,0–6,0 µm a široké 0,8–1,0 µm. Kolónie sú kruhovitého tvaru, hladké, ploché a priesvitné, resp. bielej farby. Zdrojom energie pre rast sú alkoholové substráty.

3. *Aneurinibacillus terranovensis*

- Aj tento bakteriálny kmeň so zbierkovým číslom DSM 18919 je opäť gramvariabilný (po 48 hodinách sa mení z grampozitívnej baktérie na gramnegatívnu). *Aneurinibacillus terranovensis* má veľký teplotný rozsah od 20 °C až do 55 °C, pričom aj optimum teploty je pomerne široké (37–45 °C). Minimálna hodnota pH je 3,5 a maximálna hodnota 6,0, avšak optimum sa pohybuje okolo 5,0. Koncentrácia soli môže dosiahnuť 2,0–3,0 %. Bunky sú pohyblivé, guľovitého tvaru vo veľkosti 0,8–1,0 µm široké a 2,0–8,0 µm, tvoriace elipsoidné endospóry. Kolónie sú kruhovitého tvaru, ploché o priemere 1–5 mm s krémovým zafarbením a mierne lesklým vzhľadom, pripomínajúci maslovú konzistenciu. Medzi substrátmi, ktoré tento bakteriálny kmeň utilizuje patrí väčšina monosacharidov, alkohol glycerol a z aminokyselín glutamát.

4. *Aneurinibacillus thermoaerophilus*

- Bakteriálny kmeň *Aneurinibacillus thermoaerophilus* s číslom zbierky DSM 10154 je grampozitívna baktéria. Táto termofilná baktéria dokáže rásť pri teplotách v rozmedzí od 40–60 °C a optimálna teplota rastu je 55 °C. Hodnoty pH sa pohybujú v rozmedzí od 5,5 do 9,0, pričom $pH_{opt} = 7,0–8,0$. Koncentrácia soli počas kultivácie dosahuje hodnoty 2,0 %. Bunky tejto baktérie sú tyčinkovitého tvaru veľké 0,5–1,0 µm a dlhé 2,0–6,0 µm. Bunky sú pohyblivé, tvoriace elipsoidné endospóry, prísne aeróbne. Kolónie sú ploché, veľké v priemere od 1 mm až do 10 mm, nepravidelného tvaru. Sú matné, priesvitné a krémovo-šedé až belavé a zároveň nepriehľadné v strede. Energiu pre rast čerpá z monosacharidov, aminosacharidov (N-acetyl-glukosamin), z veľkého množstvo solí kyselín, glycerolu a z aminokyselín alanínu a aspartátu.

5. *Anoxybacillus calidus*

- Jedná sa o gramnegatívnu termofilnú baktériu so zbierkovým číslom DSM 25220. Táto baktéria dokáže rásť pri 35 °C a maximum kultivačnej teploty je až 70 °C. Avšak za optimum kultivačnej teploty sa považuje hodnota 55 °C. Optimálna hodnota pH je 8,0–8,5, ale dokáže rásť pri hodnotách 6,5 až 9,0. Koncentrácia soli, pri ktorej je rast maximálny je hodnota 2,5 %, avšak optimálna hodnota je 0,5 %. Bunky sú pohyblivé,

tvoriace spóry, tvaru rovných tyčínok s veľkosťou 0,1–0,7 μm , široké 4,0–13,0 μm . Kolónie o veľkosti 1,0–3,0 mm sú nepriehľadné až krémovej farby, kruhové, s hladkým povrchom, na krajoch zaoblené. Utilizuje mono- a disacharidy a aj alkoholický cukor manitol.

6. *Anoxybacillus vitaminiphilus*

- Termofilita u tohto grampozitívneho bakteriálneho kmeňa so zbierkovým číslom JCM 16594 bola potvrdená na základe optimálnej kultivačnej teploty dosahujúcu 55 °C, ale rast tejto baktérie je schopný v rozmedzí teplôt od 35 do 70 °C. Hodnoty pH sú v úzkom rozmedzí od 6,5 do 9,0, pričom za optimum sa považuje 8,0–8,5. Táto baktéria dokáže rásť pri maximálnej koncentrácii soli 2,5 %, avšak optimum je 0,5 %. Bunky sú pohyblivé, tvoriace elipsoidné endospóry, striktné aeróbne. Majú tvar tyčinky: 0,5–0,7 μm široké a 4,0–13,0 μm dlhé. Kolónie veľké približne 1–3 mm sú nepriehľadné až krémové, kruhové, s hladkým povrchom, s pravidelnými okrajmi a zaoblenými hranami. Utilizácia opäť mono- a di- sacharidov a alkoholického cukru manitolu.

7. *Aquabacterium tepidophilum*

- Zbierkové číslo tohto bakteriálneho kmeňa je YIM 730274. Jedná sa o opäť o gramnegatívnu termofilnú baktériu, ktorá rastie pri teplote 25–50 °C. Jej optimálna teplota sa pohybuje v rozmedzí od 37–45 °C. Hodnoty pH sú 6,0 až 8,5, pričom za optimálnu hodnotu považujeme 7,0 až 8,0. Koncentrácia soli je v rozmedzí od 0,5–1,0 % a optimum 0,5 %. Bunky sú aeróbne, pohyblivé, tyčinkovitého tvaru o veľkosti 1,0–1,3 μm a 1,6–2,0 μm dlhé. Bunky netvorí spóry. Utilizovanými substrátmi pre rast sú mono- a disacharidy, aminosacharid N-acetylglukosamín, alkoholový cukor manitol a zopár aminokyselín.

8. *Bacillus thermoamylovorans*

- Termofilita u tohto grampozitívneho bakteriálneho kmeňa so zbierkovým číslom DSM 28918 bola potvrdená na základe optimálnej kultivačnej teploty 50 °C. Hodnoty pH sú v úzkom rozmedzí do 5,4 do 8,5, pričom za optimum sa považuje 6,5–7,5. Bunky sú rovné, tyčinkovitého tvaru, široké 0,45–0,5 μm a dlhé 3,0–4,0 μm , mierne pohyblivé pomocou peritrichózných bičiek. Baktéria je fakultatívne anaeróbna a nesporujúca. Utilizuje veľké množstvo monosacharidov a len pár disacharidov.

9. *Caldimonas manganoxidans*

- O gramnegatívnej termofilnej baktérie so zbierkovým číslom JCM 10698 máme informácie, že hodnoty optimálnej teploty sú 50 °C a optimálne hodnoty pH sú 7,0 až 8,0. Bunky sú tyčinkovitého tvaru o priemere 0,6–2,6 μm , spóry neboli pozorované. Kolónie sú kruhové, konvexné, nepriehľadné až krémovo-šedé. Utilizácia veľkého množstva monosacharidov a disacharidov, glycerolu, alkoholových cukrov a soli kyselín.

10. *Caldimonas taiwanensis*

- Gramnegatívny bakteriálny kmeň s číslom zbierky LMG 22827 je schopný rastu pri teplotách v rozmedzí od 35 °C do 60 °C, pričom hodnota 55 °C a pH = 7,0 sú optimálne hodnoty rastu. Bunky v tvare tyčiniek sú veľké 0,6–0,8 µm a dlhé 1,2–2,2 µm. Vyskytujú sa jednotlivo, sú pohyblivé a nesporujúce. Utilizuje rovnaké typy substrátov než rod *Caldimonas manganoxidans*, avšak ich množstvo je menšie.

11. *Dichotomicrobium thermohalophilum*

- Zberkové číslo tohto bakteriálneho kmeňa je DSM 5002. Jedná sa o opäť o gramnegatívnu termofilnú baktériu, ktorej optimálna teplota je 44–50 °C. Hodnoty pH sa pohybujú okolo 5,8 až 9,5, pričom za optimálnu hodnotu považujeme 8,0 až 8,5. Koncentrácia soli je v rozmedzí od 8,0–14,2 %. Bunky o veľkosti 0,8–1,8 µm a 0,8–2,0 µm sú nesporujúce. Utilizuje monosacharidy, veľké množstvo solí kyselín a z aminokyselín aspartát a glutamát.

12. *Elioraea tepidiphila*

- U gramnegatívneho bakteriálneho kmeňa *Elioraea tepidiphila* so zberkovým číslom DSM 17972 máme opäť dostatok informácií o kultivačných podmienkach. Optimum kultivačnej teploty je 45 °C až 50 °C a optimum pH hodnôt je 8,0 až 8,5. Optimálna koncentrácia soli počas kultivácie je 1,5 %. Bunky sú dlhé 1,0–1,5 µm a široké 0,5–1,0 µm, pohyblivé, striktné aeróbne a nevytvárajúce endospóry. Kolónie nie sú pigmentované. Utilizuje pár sacharidov, veľkého množstva solí kyselín a pár aminokyselín.

13. *Elioraea thermophila*

- Gramnegatívna termofilná baktéria s číslom zbierky YIM 72297 má rozmedzie hodnôt kultivačnej teploty od 45 °C do 60 °C a optimálnu teplotu rastu pri 55 °C. Tento bakteriálny kmeň dokáže rásť pri hodnotách pH od 5,0 do 9,0. Informácie o hodnotách koncentrácie nie sú známe. Bunky sú zakrivené, tyčinkovitého tvaru, 0,7–0,9 µm široké a 2,2–3,2 µm dlhé, nepohyblivé. Rod *Elioraea* nevytvára endospóry. Svetlo ružové kolónie sa časom menia na tmavoružovo. Schopný využitia väčšieho množstva sacharidových substrátov než bakteriálny rod *Elioraea tepidiphila*, žiadne aminokyseliny, ale len alkoholy a alkoholové cukry.

14. *Geobacillus kaustophilus*

- Na rozdiel od predchádzajúcej baktérii je bakteriálny kmeň s číslom zbierky DSM 7263 grampozitívna termofilná baktéria s $T_{opt} = 55$ °C. Pohyblivé bunky vytvárajúce spóry sú aeróbne, resp. fakultatívne anaeróbne. Kolónie u rodu *Geobacillus* sú v priemere veľké 1 mm, guľovitého tvaru, bezfarebné. Utilizácia len mono- a disacharidov.

15. *Geobacillus stearothermophilus*

- Kultivačné podmienky grampozitívneho bakteriálneho kmeňa *Geobacillus stearothermophilus* sú podobné ako pri vyššie zmienenej termofilnej

baktérie, kedy $T_{\text{opt}} = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Rovnako aj bunky sú opäť pohyblivé, vytvárajúce spóry. Kolónie veľké 1 mm sú guľaté a bez farby. Opäť utilizuje len mono- a disacharidov.

16. *Hydrogenophilus thermoluteolus*

- Podľa zbierkového čísla DSM 6765 tejto gramnegatívnej termofilnej baktérie bolo zistené, že optimálna teplota rastu sa pohybuje okolo $50\text{--}52\text{ }^{\circ}\text{C}$ a pH optimum je 7,0. Bunky o veľkosti $0,55\text{--}0,6\text{ }\mu\text{m}$ ku $2,05\text{--}3,0\text{ }\mu\text{m}$ rastúce jednotlivito sú nesporujúce, striktno aeróbne. Kolónie sú matne, žltej farby. Utilizácia len soli kyselín ako napr. laktát, pyruvát a iné.

17. *Chelatococcus thermostalatus*

- Tento bakteriálny kmeň s číslom zbierky DSM 28244 je gramnegatívna termofilná baktéria s $T_{\text{opt}} = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $\text{pH}_{\text{opt}} = 7,0\text{--}7,5$. Bunky sú pohyblivé, v tvare tyčinky ($0,2\text{--}0,4\text{ }\mu\text{m}$ široké a $1,0\text{--}2,5\text{ }\mu\text{m}$ dlhé). Rast je aeróbný bez spór. Kolónie sú kruhové, s jasne bielou farbou, jemne do béžova o priemere $0,5\text{--}1,0\text{ mm}$. Utilizuje z monosacharidov len manózu a z disacharidov – sacharózu a trojsýtny alkohol glycerol.

18. *Inmirania thermothiophila*

- Zbierkové číslo tohto bakteriálneho kmeňa je DSM 100275. Jedná sa opäť o gramnegatívnu termofilnú baktériu, ktorá rastie pri teplote $35\text{--}68\text{ }^{\circ}\text{C}$. Jej optimálna teplota je $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Hodnoty pH sa pohybujú okolo 5,5 až 8,8, pričom za optimálnu hodnotu považujeme 6,5. Koncentrácia soli je v rozmedzí od $0,5\text{--}3,5\text{ }\%$ a optimum $1,5\text{--}2,0\text{ }\%$. Bunky s veľkosťou $0,6\text{--}0,7\text{ }\mu\text{m}$ ku $1,0\text{--}2,0\text{ }\mu\text{m}$ sú pohyblivé vďaka bičíkom, nesporujúce. Rast je chemolitoautotrofný za použitia síry/tiosíry, pričom kvasnicový extrakt stimuluje rast. Neutilizuje žiadne sacharidy, alkoholy alebo aminokyseliny, ale len veľké množstvo solí rôznych organických kyselín.

19. *Pseudonocardia thermophila*

- O gramnegatívnom bakteriálnom kmeni *Pseudonocardia thermophila* s číslom zbierky DSM 43832 máme len informáciu o optimálnej kultivačnej teplote dosahujúcu hodnotu $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Bunky sú schopné tvoriť spóry za fakultatívne aeróbných podmienok. Kolónie sú viacfarebné s prevahou žltej farby ostro ohraničené. Nie sú zverejnené žiadne informácie o utilizácii substrátov.

20. *Rubellimicrobium thermophilum*

- Rovnako aj pri tejto gramnegatívnej termofilnej baktérii chýba dostatok informácií o kultivačných podmienkach. Avšak hodnoty optimálnej teploty rastu dosahujúce $45\text{--}52\text{ }^{\circ}\text{C}$ ju zaraďujú ku potenciálnym extrémofilným producentom PHA. Bunky o veľkosti $0,6\text{--}0,8\text{ }\mu\text{m}$ ku $2,0\text{--}4,0\text{ }\mu\text{m}$ sú pohyblivé pomocou bičikov. Rod *Rubellimicrobium* nevytvára spóry. Kolónie sú kruhové, celé, konvexné, hladké a červeno pigmentované. K rastu nedochádza pri anaeróbných podmienkach. Utilizácia veľkého množstva rôznych sacharidov, alkoholových cukrov, solí rozličných kyselín a pár aminokyselín.

21. *Rubrobacter spartanus*

- Táto termofilná grampozitívna baktéria s číslom zbierky DSM 102139 má pomerne malý rozsah kultivačných teplôt od 45 °C do 55 °C, pričom $T_{opt} = 50$ °C. Optimálne hodnoty pH počas kultivácie, kedy táto baktéria vykazuje najlepší rast sú 7,5 až 9,5. Bunky sú krátke, nepravidelné tyčinky o dĺžke 1 µm, vyskytujúce sa jednotlivo, ale aj v zhlukoch. Vytvára kolónie svetloružovej farby. Nie sú zverejnené informácie o sporulácii. V utilizovaných substrátoch prevažujú sacharidy, ďalej asimiluje trojsýtny alkohol glycerol a z aminokyselín je to prolín a alanín.

22. *Rubrobacter xylanophilus*

- O grampozitívnom bakteriálnom kmeni *Rubrobacter xylanophilus* so zbierkovým číslom DSM 9941 existujú len základné informácie o podmienkach kultivácie. Optimálna hodnota kultivačnej teploty je 60 °C a pH optimum 7,5–8,0. Maximálna dovolená koncentrácia soli je 6,0 %. Bunky sú pleomorfné krátke tyčinky široké 0,9–1,0 µm a dlhé 1,0–3,0 µm. Kolónie veľké v priemere 1,5–2,0 mm sú kruhové, konvexné, hladké, nepriehľadné, svetlo ružovej farby. Pohyblivosť a endospóry nie sú pozorované. Za anaeróbných podmienok nedochádza k rastu. Utilizuje menšie množstvo monosacharidov ako bakteriálny kmeň *Rubrobacter spartanus*, ale možná utilizácia oligosacharidov, alkoholu glycerol a alkoholový cukor sorbitol, veľké množstvo solí rôznych kyselín a z aminokyselín len glutamín.

23. *Schlegelella aquatica*

- Tento gramnegatívny bakteriálny kmeň má číslo zbierky LMG 23380. Kultivačná teplota sa pohybuje od 30 °C do 60 °C a $T_{opt} = 50$ °C. Rozsah pH hodnôt je pomerne úzky, od 6,0 do 8,0 a optimum pH je 7,0. Bunky nevytvárajúce spóry majú tyčinkovitý tvar o priemere 0,4–0,5 µm a dĺžke 0,8–2,0 µm. Bunky sa vyskytujú jednotlivo a sú pohyblivé pomocou bičička. Kolónie sú krémovej alebo bielej farby s celistvým okrajom o veľkosti 1,0–1,5 mm. Rod *Schlegelella* je nesporujúci. Utilizuje malé množstvo monosacharidov, z disacharidov len maltózu, N-acetyl-glukosamín, a polysacharidy, soli kyseliny mliečnej, kyseliny pyrohroznovej a kyseliny jablčnej. Z aminokyselín utilizuje len alanín, prolín a asparagín.

24. *Schlegelella thermodepolymerans*

- Bakteriálny kmeň so zbierkovým číslom DSM 15344 je gramnegatívny mikroorganizmus s kultivačnou teplotou od 37–60 °C, pričom optimálna teplota sa pohybuje medzi 45–50 °C. Optimálna hodnota pH je 7,0, pričom tento bakteriálny kmeň je schopný kultivácie už pri hodnote pH od 3,7. Informácie o koncentrácii soli počas kultivácií nie sú známe. Bunky sú dlhé 1,0–2,8 µm a široké 0,5–0,6 µm, pohyblivé vďaka bičičku. Kolónie sú biele a hladké, s celým okrajom, buď nepriehľadné alebo priesvitné. Rod *Schlegelella* je nesporujúci. Utilizuje väčšie množstvo monosacharidov ako predchádzajúca termofilná baktéria. Ďalšími utilizovanými substrátmi sú soli kyseliny mliečnej a jantárovej.

25. *Tepidicella baoligensis*

- Opäť u tohto bakteriálneho kmeňa máme dostatok informácií o kultivačných podmienkach. Jedná sa o gramnegatívnu termofilnú baktériu so zbierkovým číslom KCTC-62779. Táto baktéria dokáže rásť už pri 20 °C a maximum kultivačnej teploty je pri 60 °C. Avšak za optimum kultivačnej teploty sa považuje hodnota 45 °C. Optimálna hodnota pH je 7,5–8,5, ale dokáže rásť už pri hodnotách 6,5 až 10,5. Koncentrácia soli, pri ktorej je rast maximálny je hodnota 3,0 %, avšak optimálna hodnota je 0,5 %. Bunky sú aeróbne, nesporujúce, pohyblivé vďaka bičíku, tyčinkovitého tvaru (šírka 0,5–1,0 µm a dĺžka 1,5–2,5 µm). Kolónie (0,5–1,0 mm) sú krémovo-biele, kruhové, hladké s pravidelnými okrajmi. Neutilizuje žiadne sacharidy a alkoholy, len veľké množstvo solí rôznych kyselín a aminokyseliny.

26. *Tepidicella xavieri*

- Gramnegatívna termofilná baktéria s číslom zbierky DSM 19605 má rozmedzie hodnôt kultivačnej teploty už od 25 °C až do 55 °C a optimálnu teplotu rastu pri 45 °C. Tento bakteriálny kmeň dokáže rásť pri hodnotách pH od 8,5 do 9,0. Opäť nie sú známe hodnoty koncentrácie soli. Bunky sú tyčinkovité v priemere 0,5–1,0 µm 1,0–2,0 µm, pohyblivé bičíkom. Rod nesporuluje. Kolónie sú krémovo-biele, prísne aeróbne a chemoorganotrofné. Utilizuje niekoľko aminokyselín a organických kyselín.

27. *Tepidimonas alkaliphilus*

- Tento bakteriálny kmeň so zbierkovým číslom YIM 72238 má optimálne kultivačné podmienky: $T_{opt} = 45\text{ °C}$, $pH_{opt} = 7,0\text{--}9,0$. Pohyblivé bunky tyčinkovitého tvaru majú rozmery 0,6–0,7 µm ku 1,0–1,6 µm. Kolónie sú nepigmentované, kruhové a hladké. Pri tomto bakteriálnom kmeni nie sú zverejnené informácie o sporulácii, avšak sa dozvedáme, že rod *Tepidimonas* nesporuluje. Neutilizuje žiadne substráty zo sacharidov a alkohol, len pár aminokyselín.

28. *Tepidimonas aquatica*

- Jedná sa o gramnegatívnu termofilnú baktériu so zbierkovým číslom DSM 14833. Táto baktéria dokáže rásť už pri 35 °C a maximum kultivačnej teploty je pri 60 °C. Avšak za optimum kultivačnej teploty sa považuje hodnota 55 °C. Optimálna hodnota pH je 7,0. Koncentrácia soli, pri ktorej je rast maximálny je hodnota 0,2 %, avšak dokáže rásť aj pri 1,0 % koncentrácie soli. Tvorí tyčinkovité bunky o dĺžke 1,0–2,0 µm a 0,5–1,0 µm priemere. Nesporujúce bunky sú pohyblivé bičíkom. Kolónie nie sú pigmentované, ich priemer je 1,0–2,0 mm. Bakteriálny kmeň je prísne aeróbny. Utilizácia solí rôznych kyselín ako napr. malát, laktát, pyruvát a pár aminokyselín.

29. *Tepidimonas fonticaldi*

- Termofilita u tohto gramnegatívneho bakteriálneho kmeňa so zbierkovým číslom LMG 26746 bola potvrdená na základe optimálnej kultivačnej teploty 55 °C, ale rast tejto baktérie je schopný v rozmedzí teplôt od 35 °C do 60 °C.

Hodnoty pH sú v úzkom rozmedzí od 7,0 do 9,0, pričom za optimum sa považuje hodnota 7,0. Táto baktéria dokáže rásť pri maximálnej koncentrácii soli 1,0 %, avšak optimum je 0,2 %. Bunky sú aeróbne, pohyblivé, tyčinkovité s priemerom 0,3–0,5 μm a dĺžky 0,6–1,7 μm . Kolónie sú nepigmentované, kruhové, hladké a konvexné s celým okrajom (priemer 1,0–2,0 mm). Pri tomto bakteriálnom kmeni nie sú zverejnené informácie o sporulácii. Rovnako ako všetky kmene z rodu *Tepidimonas* neutilizuje žiadne sacharidy. Z mála používaných substrátov na rast však utilizuje glycerol a z aminokyselín len glutamín.

30. *Tepidimonas charontis*

- Bakteriálny kmeň *Tepidimonas charontis* s číslom zbierky LMG 30884 je gramnegatívna termofilná baktéria s kultivačnou teplotou pohybujúcou sa už od 25 °C a až do 60 °C, pričom T_{opt} je 50 °C. Optimálne hodnoty pH sú 7,5 až 9,0. Krátke tyčinkovité bunky o šírke 0,5–0,8 μm a dĺžky 1,0–2,0 μm netvorí endospóry Bunky sú pohyblivé pomocou bičíku. Kolónie veľkosti 1,0–2,0 mm sú bez pigmentu. Opäť ako v predchádzajúcich prípadoch bakteriálnych kmeňov z rodu *Tepidimonas*, je možná utilizácia veľkého množstva aminokyselín a solí rôznych kyselín.

31. *Tepidimonas ignava*

- Tento bakteriálny kmeň je gramnegatívna termofilná baktéria. Na základe čísla zbierky DSM 12034 bola zistená optimálna kultivačná teplota, ktorá sa pohybuje od 50 °C do 55 °C. Optimálne hodnoty pH sú 7,5 až 8,5. Krátke tyčinkovité bunky o dĺžke 1,0–2,0 μm a priemere 0,5–1,0 μm sú pohyblivé pomocou bičíkov a sú prísne aeróbne. Rod netvorí endospóry. Kolónie nie sú pigmentované (priemer 1,0–2,0 mm). Bakteriálny kmeň *Tepidimonas ignava* utilizuje veľké množstvo aminokyselín a solí rôznych kyselín.

32. *Tepidimonas sediminis*

- Bakteriálny kmeň so zbierkovým číslom YIM 72259 je gramnegatívna termofilná baktéria. Kultivačná teplota je od 37 °C do 55 °C, pričom za optimálnu teplotu sa považuje teplota 45 °C. Táto baktéria dokáže rásť pri hodnotách pH od 6,0 do 11,0. Najlepší rast bol pozorovaný pri pH 7,0–9,0. Optimálna koncentrácia solí počas kultivácie je 0,5 %. Pohyblivé bunky majú tyčinkovitý tvar o veľkosti 0,6–0,8 μm ku 0,7–1,0 μm . Kolónie sú bez pigmentu, kruhové a hladké. Pri tomto bakteriálnom kmeni nie sú zverejnené informácie o sporulácii, avšak sa dozvedáme, že rod *Tepidimonas* nesporuluje. Ako zdroj energie využíva aminokyselinové substráty.

33. *Tepidimonas taiwanensis*

- Gramnegatívny bakteriálny kmeň so zbierkovým číslom LMG 22826 má podobné kultivačné vlastnosti ako *Tepidimonas fonticaldi* : $T_{\text{opt}} = 55$ °C a $\text{pH}_{\text{opt}} = 7,0$. Nesporujúce, tyčinkovité bunky sú 0,4–0,5 μm široké a 0,8–2,0 μm dlhé. Vyskytujú sa jednotlivo a pohybujú sa bičikom. Kolónie sú krémovej farby, okrúhle, konvexné a s vlnitým okrajom. Tento kmeň utilizuje amokyseliny a soli kyselín ako zdroj uhlíka a energie.

34. *Tepidimonas thermarum*

- Zberkové číslo gramnegatívneho bakteriálne kmeňa je LMG 23094. baktéria dokáže kultivovať na širokom rozpätí hodnôt teploty a to od 25–60 °C. Vzhľadom k optimálnej kultivačnej teplote, ktorá sa pohybuje v rozmedzí od 50–55 °C môžeme bakteriálny kmeň *Tepidimonas thermarum* označiť za termofilnú baktériu. Aj rozmedzie hodnôt pH je široké : 5,5–9,8. Krátke tyčinkovité bunky 1,0–2,0 µm dlhé a 0,5–1,0 µm široké sú pohyblivé bičíkom. Kolónie veľké 1,0–2,0 mm sú pigmentované a prísne aeróbne. Pri tomto bakteriálnom kmeni nie sú zverejnené informácie o sporulácii, avšak sa dozvedáme, že rod *Tepidimonas* nesporuluje. *Tepidimonas thermarum* utilizuje oveľa menšie množstvo substrátov z radu aminokyselín a solí než predchádzajúce kmene z rodu *Tepidimonas*.

35. *Tepidiphilus margaritifera*

- Bakteriálny kmeň so zberkovým číslom DSM 15129 je gramnegatívna termofilná baktéria s možnosťou rastu pri teplote už od 25 °C do 60 °C, pričom $T_{opt} = 50$ °C. Optimálne hodnoty pH sú 6,0 až 8,0. Tyčinkovité bunky dĺžky 2,0 µm a 0,7 µm široké sú nesporujúce a pohybujúce sa bičíkom. Kolónie sú perleťové, s priemerom 1,0-2,0 mm. Rôznorodosť substrátov použitých pre rast tohto bakteriálneho kmeňa je veľká, avšak nie všetky substráty dokáže utilizovať. Z pomedzi alkoholov je to etanol a z aminokyselín prolín a asparagín.

36. *Tepidiphilus succinatimandens*

- O gramnegatívnej termofilnej baktérie *Tepidiphilus succinatimandens* so zberkovým číslom DSM 15512 poznáme len základné kultivačné podmienky a to hodnoty $T_{opt} = 50–55$ °C a $pH_{opt} = 6,5–7,0$. Bunky sú nesporujúce, krátke tyčinky, pohyblivé vďaka bičíkom a schopné anaeróbny rastu. Kolónia sú krémovej farby. Z monosacharidov je možné použiť pre rast tohto kmeňa substrát glukózy a rôzne aminokyseliny, resp. soli kyselín.

37. *Tepidiphilus thermophilus*

- Bakteriálny kmeň so zberkovým číslom DSM 27220 je gramnegatívna termofilná baktéria. Dokáže rásť už od 30 °C a najvyššia teplota, pri ktorej je schopná rastu dosahuje až 60 °C. Za optimálnu kultivačnú teplotu považujeme 50–55 °C. Optimum pH je 6,5–7,0. Bunky sú nesporujúce, široké 0,6–0,65 µm a dlhé 1,5–1,8 µm, schopné rastu pri aeróbnych aj pri anaeróbnych podmienkach a len v prítomnosti dusičnanov. Kolónie sú guľaté, krémové, hladké s priemerom 1,0–2,0 mm. Utilizácia monosacharidov a malého množstva aminokyselín.

38. *Thauera hydrothermalis*

- *Thauera hydrothermalis* je opäť gramnegatívna termofilná baktéria, ktorej číslo zbierky je CGMCC 1.15527. Teplota, pri ktorej tento bakteriálny kmeň je schopný kultivácie sa pohybuje v rozmedzí od 37 °C do 55 °C, pričom hodnoty optimálnej kultivačnej teploty sú 45–50 °C. Optimum je 7,0–7,5, aj keď táto baktéria je schopná rásť už pri pH 5,5 alebo aj pri hodnote 11,0. Koncentrácia NaCl počas kultivácie môže dosiahnuť až 4,0 %. Bunky

tyčinkovitého tvaru (0,3–0,5 μm široké a 1,0–2,5 μm dlhé) netvoria spóry. Kolónie sú kruhové, celé, hladké, nepriehľadné a bielej farby. Utilizuje veľké množstvo monosacharidov a aminokyselín, rovnako aj etanol a soli kyseliny mliečnej a kyseliny jantárovej.

39. *Thermomonas hydrothermalis*

- Pri gramnegatívnom bakteriálnom kmeni *Thermomonas hydrothermalis* so zbierkovým číslom DSM 14834 sú známe len hodnoty optimálnej kultivačnej teploty a to konkrétne 50–55 °C. Bunky tyčinkovitého tvaru široké 0,6–0,9 μm a 2,0–4,0 μm dlhé sú nepohyblivé. Kolónie svetlo hnedej farby majú priemer 0,5–2,0 mm a rastú aeróbne. Nie sú informácie o tom, či baktéria tvorí spóry. Skôr než monosacharidy, bakteriálny kmeň *Thermomonas hydrothermalis* uprednostňuje pre rast disacharidy a aminokyseliny.

40. *Thermosyntropha lipolytica*

- Grampozitívna termofilná baktéria *Thermosyntropha lipolytica* má zbierkové číslo DSM 11003. Táto baktéria má vysoké maximum kultivačnej teploty a to až 70 °C. Optimálna teplota sa pohybuje v rozmedzí od 60–66 °C. Počas kultivácie by sa mali pH hodnoty pohybovať medzi 7,5–9,5, $\text{pH}_{\text{opt}} = 8,1\text{--}8,9$. Bunky sú rovné alebo mierne zakrivené tyčinky veľkosti od 0,3–0,4 μm do 2,0–3,5 μm , nespojujúce a nepohyblivé. Kolónie sú biele a 0,5 mm veľké. Utilizuje malé množstvo sacharidových substrátov.

41. *Thermus thermophilus*

- O gramnegatívnom bakteriálnom kmeni *Thermus thermophilus* s číslom zbierky DSM 579 máme len informáciu o optimálnej kultivačnej teplote $T_{\text{opt}} = 75$ °C. Bunky tyčinkovitého tvaru majú rozmer od 0,5–3,0 μm . Nebola pozorovaná žiadna pohyblivosť a žiadne spóry. Kolónie guľovitého tvaru (1mm) s hladkým, plochým povrchom a žltoranžovou farbou rastú aeróbne. Utilizuje monosacharidy a disacharidy, glycerol a z aminokyselín len serín a asparagín.

42. *Ureibacillus terrenus*

- Gramnegatívna termofilná baktéria s číslom zbierky DSM 12654 má rozsah kultivačných teplôt od 42 do 65 °C, $T_{\text{opt}} = 55$ °C. Optimálna hodnota pH je 9,0 a koncentrácia soli je 5,0 %. Bunky tyčinkovitého tvaru široké 0,5–0,7 μm a dlhé 1,0–6,0 μm rastú aeróbne, jednotlivo alebo v reťazci. Tvoria sférické endospóry. Kolónie sú kruhové, celé, ploché a priehľadné. Pre rast utilizuje sacharidové substráty, ale aj alkoholový cukor manitol. Rod *Ureibacillus* neutilizuje žiadne aminokyseliny.

43. *Ureibacillus thermophilus*

- DSM 17952 je zbierkové číslo gramnegatívneho bakteriálneho kmeňa *Ureibacillus thermophilus*. Rozsah kultivačných teplôt sa pohybuje medzi hodnotami 30 °C až 65 °C. Pri teplote 50 °C dokáže táto baktéria rásť najlepšie a teda možno túto hodnotu považovať za optimálnu. Ako aj pri predchádzajúcom bakteriálnom kmeni, koncentrácia soli počas kultivácie je 5,0 %. Bunky tyčinkovitého tvaru s 0,8–1,2 μm šírkou a 2,5–

3,5 µm dĺžkou sú sporujúce, ktoré nerastú v anaeróbných podmienkach. Pohyblivé kolónie sú svetlo hnedé a guľaté. Utilizuje rovnaké druhy substrátov ako bakteriálny kmeň *Ureibacillus terrenus*.

44. *Zhizhongheella caldifontis*

- *Zhizhongheella caldifontis* je opäť gramnegatívna termofilná baktéria, ktorej číslo zbierky je DSM 27262. Hodnoty optimálnej kultivačnej teploty sú 40–50 °C. Optimum pH sa pohybuje okolo 8,0–9,0. Koncentrácia NaCl počas kultivácie môže dosiahnuť 3,0 %. Nie sú informácie o tom, či sa jedná o sporujúcu baktériu. Kolónie sú svetlo hnedé, kruhové, konvexné a schopné rasti len pri aeróbných podmienkach. V utilizácii substrátov preferuje sacharidy, z alkoholov glycerol. Neutilizuje žiadne aminokyseliny.

Nájdene termofilné baktérie s ich základnými informáciami o kultivačných podmienkach sú zhrnuté v tabuľke 3. Údaje o kultivačnej teplote a pH sú doplnené aj o gramovo sfarbenie. Pokiaľ sa jedná o grampozitívny bakteriálny kmeň, je uňho uvedený symbol „+“. V prípade gramnegativity sú baktérie označené znakom „-“. V prípade, že bunky bakterií sú sporujúce, sú označené opäť znakom „+“ a naopak, v prípade, že netvoria spóry, sú označené znakom „-“. Stretávame sa ale aj s termofilami, u ktorých nebolo možné nájsť tieto informácie a preto u jednotlivých údajoch nájdeme symbol „X“. V tabuľke 3 sú citácie publikácií, ktoré hovoria o taxonomickom zaradení konkrétnej termofilnej baktérii, poprípade morfológiu buniek a kolónii, ktoré sú opísané vyššie.

Tabuľka 3 Prehľad informácií o kultivačných podmienkach nájdených termofilných baktérií v databáze BLAST/HMMER spolu s odkazmi na vedecké články obsahujúce taxonomické zaradenie konkrétnych bakteriálnych kmeňov.

Názov bakteriálneho kmeňa	Zbierkové číslo	Gramovo sfarbenie	Kultivačná teplota [°C]	Topt [°C]	pH	pH _{opt}	Sporulácia	Zdroj informácií o taxonómii
<i>Amphiplicatus metriothermophilus</i>	DSM 105738	–	37–65	48–50	6,0–9,0	7,5	–	[48]
<i>Aneurinibacillus danicus</i>	DSM 21566	gramvariabilná	35–55	45–50	X	6,5–7,0	+	[49]
<i>Aneurinibacillus terranovensis</i>	DSM 18919	gramvariabilná	20–55	37–45	3,5–6,0	5,0–5,5	+	[50]
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	DSM 10154	+	40–60	55	5,5–9,0	7,0–8,0	+	[51]
<i>Anoxybacillus calidus</i>	DSM 25220	–	35–70	55	6,5–9,0	8,0–8,5	+	[52]
<i>Anoxybacillus vitaminiphilus</i>	JCM 16594	+	35–70	55	6,5–9,0	8,0–8,5	+	[53]
<i>Aquabacterium tepidiphilum</i>	YIM 730274	–	25–50	37–45	6,0–8,5	7,0–8,0	–	[54]
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	DSM 28918	+	50	X	5,4–8,5	6,5–7,5	–	[55]
<i>Caldimonas manganoxidans</i>	JCM 10698	–	50	X	X	7,0–8,0	–	[56]
<i>Caldimonas taiwanensi</i>	LMG 22827	–	35–60	55	7,0	X	–	[57]
<i>Dichotomicrobium thermohalophilum</i>	DSM 5002	–	20–65	44–50	5,8–9,5	8,0–8,5	–	[58]
<i>Elioraea tepidiphila</i>	DSM 17972	–	X	45–50	–	8,0–8,5	–	[59]
<i>Elioraea thermophila</i>	YIM 72297	–	45–60	55	5,0–9,0	X	–	[60]
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	DSM 7263	+	55	X	X	X	+	[61]
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	CCM 2062	+	60	X	X	X	+	[61]
<i>Hydrogenophilus thermoluteolus</i>	DSM 6765	–	X	50–52	–	okolo 7,0	–	[62]
<i>Chelatococcus thermostalatus</i>	DSM 28244	–	X	50	–	7,0–7,5	–	[63]
<i>Inmirania thermoithiophila</i>	DSM 100275	–	35–68	65	5,5–8,8	4,5	–	[64]
<i>Pseudonocardia thermophila</i>	DSM 43832	–	50	–	–	–	+	[65]
<i>Rubellimicrobium thermophilum</i>	DSM 16684	–	28–56	45–52	X	X	–	[66]
<i>Rubrobacter spartanus</i>	DSM 102139	+	45–55	50	7,5–9,5	X	–	[67]
<i>Rubrobacter xylanophilus</i>	DSM 9941	+	40–70	60	7,5–8,0	X	–	[68, 69]

Názov bakteriálneho kmeňa	Zbierkové číslo	Gramovo sfarbenie	Kultivačná teplota [°C]	Topt [°C]	pH	pH _{opt}	Sporulácia	Zdroj informácií o taxonómii
<i>Schlegelella aquatica</i>	LMG 23380	–	30–60	50	6,0–8,0	7,0	–	[70]
<i>Schlegelella thermodepolymerans</i>	DSM 15344	–	37–60	45–50	3,7–6,0	7	–	[71]
<i>Tepidicella baoligensis</i>	KCTC -62779	–	20–60	45	6,5–10,5	7,5–8,5	–	[72]
<i>Tepidicella xavieri</i>	DSM 19605	–	25–55	45	8,5–9,0	X	–	[73]
<i>Tepidimonas alkaliphilus</i>	YIM 72238	–	37–55	45	6,0–11,0	7,0–9,0	–	[74]
<i>Tepidimonas aquatica</i>	DSM 14833	–	35–60	55	7,0–9,0	7,0	–	[75]
<i>Tepidimonas fonticaldi</i>	LMG 26746	–	35–60	55	7,0–9,0	7,0	–	[76]
<i>Tepidimonas charontis</i>	LMG 30884	–	25–60	50	6,5–9,5	7,5–9,0	–	[77]
<i>Tepidimonas ignava</i>	DSM 12034	–	50–55	X	7,5–8,5	X	–	[78]
<i>Tepidimonas sediminis</i>	YIM 72259	–	37–55	45	6,0–11,0	7,0–9,0	–	[79]
<i>Tepidimonas taiwanensis</i>	LMG 22826	–	35–60	55	6,0–8,0	7,0	–	[80]
<i>Tepidimonas thermarum</i>	LMG 23094	–	25–60	50–55	5,5–9,8	7,5–8,5	–	[81]
<i>Tepidiphilus margaritifer</i>	DSM 15129	–	25–61	50	6,0–8,0	X	–	[82]
<i>Tepidiphilus succinatimandens</i>	DSM 15512	–	50–55	X	6,5–7,0	X	–	[83]
<i>Tepidiphilus thermophilus</i>	DSM 27220	–	30–60	50–55	5,5–7,5	6,5–7,0	–	[84]
<i>Thauera hydrothermalis</i>	CGMCC 1.15527	–	37–55	45–50	5,5–11,0	7,0–7,5	–	[85]
<i>Thermomonas hydrothermalis</i>	DSM 14834	–	50–55	X	X	X	X	[86]
<i>Thermosyntropha lipolytica</i>	DSM 11003	+	52–70	60–66	7,5–9,5	8,1–8,9	–	[87]
<i>Thermus thermophilus</i>	DSM 579	–	75	X	X	X	–	[88, 89]
<i>Ureibacillus terrenus</i>	DSM 12654	–	42–65	55	9,0	X	+	[90, 91]
<i>Ureibacillus thermophilus</i>	DSM 17952	–	30–65	50	6,0–8,0	X	–	[92]
<i>Zhizhongheella caldifontis</i>	DSM 27262	–	40–50	X	8,0–9,0	X	X	[93]

Väčšina nájdených bakteriálnych kmeňov sú gramnegatívne termofilné baktérie, schopné rastu v rozmedzí už od 20 °C do 75 °C. Bakteriálne kmene *Aneurinibacillus terranovensis*, *Dichotomicrobium thermohalophilum* a *Tepidicella baoligensis* patria medzi tie s najnižšou kultivačnou teplotou, pričom termofilná baktéria *Thermus thermophilus* je baktéria, ktorej hodnota kultivačnej teploty dosahuje najvyššie hodnoty teploty z pomedzi všetkých nájdených kmeňov a to až 75 °C. U niektorých bakteriálnych kmeňoch môžeme hovoriť skôr o termotolerancii, avšak v priemere sa hodnoty optimálnej teploty rastu pohybujú okolo 50 °C pri všetkých nájdených termofilných baktériách a preto aj nižšie možné hodnoty teploty kultivácie tento dojem o termotolerancii negujú. Rozmedzie pH hodnôt je pomerne široké – hraničnými hodnotami sú 3,5 a 11,0, pričom optimálna hodnota pH sa najčastejšie pohybovala pri hodnote 7,0.

4.1.2 Vyhľadanie sekvencie génu *phaC* a publikácií o produkcii PHA z online dostupných databáz

Pri blastovaní termofilných baktérií na základe podobnosti s proteínovým zápisom PHA syntázy bola získaná sekvencia *phaC* génu vo FASTA formáte. V prípade, ak bola baktéria pridaná do zbierky potenciálnych producentov na základe zverejnených publikácií, tak bola dohľadaná sekvencia *phaC* génu v NCBI alebo Uniprot databáze. U niektorých bakteriálnych kmeňoch aj napriek tomu neboli tieto sekvencie nájdené. Rovnako boli vyhľadané aj triedy PHA syntázy. Pokiaľ existuje publikácia, v ktorej je zverejnená produkcia polyhydroxyalkanoátov u istých baktérií a zároveň nie je osekvenovaný gén *phaC*, trieda PHA syntázy bola doplnená na základe informácií zo zmienenej publikácii. Ku každej sekvencii *phaC* génu bolo uložené accession number pre jednoduchšie vyhľadávanie proteínu v konkrétnej databáze. Všetky tieto informácie sú uvedené v nasledujúcej tabuľke 4.

Tabuľka 4 Prehľad informácií o produkcii PHA u termofilných bakteriálnych kmeňoch

Názov bakteriálneho kmeňa	<i>phaC</i> gén	Databáza	Accession number	Trieda génu <i>phaC</i>	Literárny zdroj o produkcii PHA
<i>Amphiplicatus metriothersophilus</i>	+	Uniprot	A0A239PPA0	I	
<i>Aneurinibacillus danicus</i>	+	Uniprot	A0A511V2L8	III	[94-97]
<i>Aneurinibacillus terranovensis</i>	+	NCBI	WP_027415498	III	[94-97]
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	+	Uniprot	A0A1G7YN68	III	[94-97]
<i>Anoxybacillus calidus</i>	+	NCBI	WP_181538453	III	
<i>Anoxybacillus vitaminiphilus</i>	+	Uniprot	A0A327YRB8	III	
<i>Aquabacterium tepidiphilum</i>	+	NCBI	WP_119153972	I	[53]
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	–	–	–	–	[98-100]
<i>Caldimonas manganoxidans</i>	+	NCBI	WP_026330149	I	[56, 101]
<i>Caldimonas taiwanensi</i>	+	NCBI	WP_062192707	–	[102]
<i>Dichotomicrobium thermohalophilum</i>	+	Uniprot	A0A397PFH9	I	
<i>Eliaorea tepidiphila</i>	+	NCBI	WP_019014986	I	
<i>Eliaorea thermophila</i>	+	NCBI	WP_114377842	I	
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	–	–	–	–	[103]

<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	–	–	–	–	[104]
<i>Hydrogenophilus thermoluteolus</i>	+	NCBI	WP_119336121	I	[105]
<i>Chelatococcus thermostalatus</i>	–	–	–	–	[63]
<i>Inmirania thermothiophila</i>	+	Uniprot	A0A3N1XZJ2	–	
<i>Pseudonocardia thermophila</i>	+	Uniprot	A0A1M6NS27	–	
<i>Rubellimicrobium thermophilum</i>	+	Uniprot	S9R3V0	I	
<i>Rubrobacter spartanus</i>	–	–	–		[106]
<i>Rubrobacter xylanophilus</i>	+	Uniprot	A0A510HIB4	I.,III.	[106]
<i>Schlegelella aquatica</i>	–	–	–	–	[70]
<i>Schlegelella thermodepolymerans</i>	+	NCBI	WP_104356814	I	[107-110]
<i>Tepidicella baoligensis</i>	+	NCBI	WP_180683314	I	
<i>Tepidicella xavieri</i>	+	Uniprot	A0A4R6UK17	I	
<i>Tepidimonas alkaliphilus</i>	+	Uniprot	A0A554WAE1	I	
<i>Tepidimonas aquatica</i>	+	Uniprot	A0A554WST1	I	
<i>Tepidimonas fonticaldi</i>	+	Uniprot	A0A554XR46	I	
<i>Tepidimonas charontis</i>	+	Uniprot	A0A554XJ58	I	
<i>Tepidimonas ignava</i>	+	Uniprot	A0A4R3LLD4	I	
<i>Tepidimonas sediminis</i>	+	Uniprot	A0A554WVC5	I	
<i>Tepidimonas taiwanensis</i>	+	Uniprot	A0A554X3G4	I	
<i>Tepidimonas thermarum</i>	+	Uniprot	A0A554X158	I	
<i>Tepidiphilus margaritifera</i>	+	NCBI	WP_083961935	I	[82]
<i>Tepidiphilus succinatimandens</i>	+	NCBI	WP_141055803	I	
<i>Tepidiphilus thermophilus</i>	+	NCBI	WP_055423697	I	
<i>Thauera hydrothermalis</i>	+	NCBI	WP_114649837	I	
<i>Thermomonas hydrothermalis</i>	+	Uniprot	A0A1M5AXZ2	–	
<i>Thermosyntropha lipolytica</i>	+	Uniprot	SHG52908	–	
<i>Thermus thermophilus</i>	–	–	–	–	[111-113]
<i>Ureibacillus terrenus</i>	+	Uniprot	A0A540V6R0	III	
<i>Ureibacillus thermophilus</i>	+	Uniprot	A0A4P6UST4	III	
<i>Zhizhongheella caldifontis</i>	+	Uniprot	A0A2S5SUW7	I	

Pri blastovaní termofilných baktérii na základe podobnosti génu *phaC* termofilnej baktérie *Cupriavidus necator* bolo zo 44 bakteriálnych kmeňov nájdených 37 sekvencií *phaC* génu z databáz NCBI a Uniprot. Pokiaľ termofilná baktéria mala osekvenovaný gén *phaC* bola vykonaná aj analýza triedy tohto génu. Vo väčšine prípadov sa jednalo o I. triedu génu *phaC*. Pri bakteriálnom kmeni *Bacillus thermoamylovorans* nebola nájdená sekvencia génu *phaC*, avšak v dostupnej literatúre, ktorá hovorí o produkcii PHA touto baktériou, bola detekovaná I. trieda PHA syntázy. U bakteriálneho kmeňa *Rubrobacter xylanophilus* boli nájdené dve triedy *phaC* syntázy – I. a III. trieda. S najväčšou pravdepodobnosťou existujú v skutočnosti viaceré mikroorganizmy s viacerými triedami PHA syntázy, avšak v dostupných databázach tieto sekvencie neboli nájdené. Všetky informácie o PHA syntáze vychádzajú len z dostupných databáz, resp. publikácií.

4.1.3 Výber najlepších potenciálnych producentov PHA pre NGIB

Na základe informácií o kultivačných podmienkach a produkcie PHA z prechádzajúcich kapitol bolo vybratých nasledujúcich 5 termofilných baktérií z virtuálnej zbierky potenciálnych producentov PHA pre NGIB. Tie sú spolu s ich základnými informáciami spísané v tabuľke 5. Kritérium výberu týchto termofilných baktérií bola kombinácia čo najvyššej kultivačnej teploty a čo najväčšie množstvo utilizovaných sacharidov. Monosacharidy glukóza, galaktóza, xylóza, manóza, arabinóza a disacharidy sacharóza, laktóza a maltóza boli vybraté ako biotechnologicky výhodné substráty pre produkciu PHA. Ku každému bakteriálnemu kmeňu bolo pripísané dosiahnuté skóre. Body v skóre boli získané za každý sacharidový substrát, ktorý kmeň dokáže utilizať ako zdroj energie a uhlíka. V prípade ak sú bakteriálne bunky sporujúce považujeme to za biotechnologickú prekážku. Ak nastane nejaký biotechnologický problém (náhla zmena teploty/pH) vytvoria sa spóry. Na tento proces bunky využijú naakumulované PHA v bunkách ako zdroj energie a tým pádom klesá množstvo PHA v získanej biomase. Preto pokiaľ baktéria nepatrí medzi sporujúce, opäť získala pomyselný bod vo finálnom skóre. Rovnako aj grampozitivita je v biotechnologickom priemysle žiadaná. Grampozitívne bunky neprodukurujú endotoxíny, ktoré sú významnými kontaminantami PHA, čo komplikuje využitie PHA vo viacerých aplikáciách. Opäť ak sa jednalo o grampozitívnu baktériu, jej skóre mohlo dosiahnuť vyššie hodnoty. Avšak v praxi sa často stretávame s tým, že sporujúce baktérie sú grampozitívne. Aby bola možná ďalšia bioinformatická analýza bakteriálneho kmeňa, bolo potrebné, aby potenciálny producent PHA mal zverejnenú sekvenciu génu *phaC* v online dostupných databázach. Pokiaľ existuje publikácia, v ktorej je popísaná produkcia polyhydroxyalkanoátov, opäť je zacytovaná v tabuľke 5.

Tabuľka 5 Výber piatich biotechnologicky najvýhodnejších potenciálnych producentov PHA na základe získaného skóre zo zbierky termofilných bakteriálnych kmeňov.

Bakteriálny kmeň	<i>Anoxybacillus vitaminiphilus</i>	<i>Caldimonas manganoxidans</i>	<i>Rubellimicrobium thermophilum</i>	<i>Rubrobacter xylanophilus</i>	<i>Zhizhongheella caldifontis</i>
Zbierkové číslo	JCM 16594	JCM 10698	DSM 16684	DSM 9941	DSM 27262
Gramovo sfarbenie	+	-	-	+	-
Sporulácia	+	+	+	-	X
Kultivačná teplota [°C]	35–70	50	28–56	40–70	40–50
Sekvencia <i>phaC</i> génu	+	+	+	+	+
Trieda génu <i>phaC</i>	III.	I.	I.	I., III.	I.
Databáza	Uniprot	NCBI	Uniprot	Uniprot	Uniprot
Accession number pre <i>phaC</i> gén	A0A327YRB8	WP_026330149	S9R3V0	WP_156787884 A0A510HIB4	A0A2S5SUW7

Zdroj o produkcii PHA	X	[56],[101]	X	[106]70	X
Glukóza	+	+	+	–	+
Galaktóza	–	+	+	+	+
Xylóza	–	+	+	+	+
Manóza	–	+	+	+	–
Arabinóza	–	+	+	+	+
Sacharóza	+	+	+	–	+
Laktóza	+	+	–	–	+
Maltóza	+	+	+	–	–
Skóre	5/10	8/10	7/10	6/10	6/10

V tabuľke 5 sú zhrnuté základné kultivačné podmienky a informácie o možnej produkcii PHA u termofilných baktérií *Anoxybacillus vitaminiphilus*, *Caldimonas manganoxidans*, *Rubellimicrobium thermophilum*, *Rubrobacter xylanophilus* a *Zhizhongheella caldifontis*. Výber týchto baktérií disponuje I. a III. triedou PHA syntázy. Obe triedy PHA syntázy začleňujú do svojej štruktúry monoméry s 3–5 atómami uhlíka – teda PHA s krátkym reťazcom. Informácie o type triedy vychádzajú z dostupných informácií z jednotlivých databáz.

1. *Anoxybacillus vitaminiphilus*

Termofilná grampozitívna baktéria *Anoxybacillus vitaminiphilus* so zbierkovým číslom JCM 16594 má optimálnu kultivačnú teplotu 55 °C, no pri kultivácii môžeme dosiahnuť až hodnoty okolo 70 °C. Sekvencie génu *phaC* pod identifikačným číslom A0A327YRB8 sme získali z dostupnej databázy Uniprot. Jedná sa o III. triedu *phaC* génu. Aj keď termofilná baktéria *Anoxybacillusn vitaminiphilus* neutilizuje veľa nami vybraných sacharidových substrátov, aj tak je zaradená do zbierky potenciálnych producentov PHA. Spomedzi ostatných bakteriálnych kmeňov ju jej neobyčajné kultivačné podmienky a grampozitivita zaraďuje k producentom PHA pre NGIB. Najčastejšie utilizuje disacharidy sacharózu, laktózu a maltózu, ale aj z monosacharidov glukózu. Produkcia OHA u tohto kmeňa je predpokladaná len na základe prítomnosti génu kódujúceho PhaC, na úrovni fenotypu nebola schopnosť produkcie doposiaľ popísaná. Táto skutočnosť by mohla byť námetom pre nadväzujúcu experimentálnu prácu.

Bakteriálny kmeň *Anoxybacillus vitaminiphilus* bol izolovaný z horúceho prameňa Puge v juhozápadnej geotermálnej oblasti Číny. Po 40 hodinách inkubácie kmeň vytvára belavo-žlté a priesvitné kolónie, ktoré majú voskový povrch a zúbkovanými okrajmi o priemere okolo 3 mm. Bunky v tvare tyčiniek sú pohyblivé, tvoriace elipsoidné endospóry a s grampozitívnou stenou. Jedná sa o striktno aeróbnu rast, v anaeróbnom raste nebol pozorovaný absolútne žiadny rast ani s anaeróbnym dýchaním prostredníctvom NO_3^- , Fe^{3+} , $\text{S}_2\text{SO}_3^{2-}$ alebo SO_4^{2-} ako receptorov elektrónov. Najvýraznejšou charakteristikou tohto bakteriálneho kmeňa, ktorá odlišuje kmeň *Anoxybacillus vitaminiphilus* spomedzi iných kmeňov v rode *Anoxybacillus* je rast kmeňa závislého od vitamínovej zmesi alebo rast len pri prídavku kvasnicového extraktu. Z tejto podmienky rastu je odvodený aj názov tejto termofilnej baktérie.

2. *Caldimonas manganoxidans*

Bakteriálny kmeň so zbierkovým číslom JCM 10698 nemá uvedených veľa informácií o kultivačných podmienkach, avšak jeho termofilnata je potvrdená pomerne vysokou kultivačnou teplotou dosahujúcou 50 °C. Táto termofilná baktéria bola vybratá za potenciálneho producenta na základe dostupnej sekvencie I. triedy *phaC* génu, ktorá je uložená v databáze NCBI pod prístupovým kódom WP_026330149. Rovnako sú dostupné informácie o produkcii polyhydroxyalkanoátov bakteriálnym kmeňom *Caldimonas manganoxidans* v dvoch dostupných vedeckých publikáciách. Zároveň ďalším dôvodom, prečo je tento bakteriálny kmeň vhodným kandidátom pre produkciu PHA v rámci NGIB je množstvo utilizovaných substrátov. V tomto prípade *Caldimonas manganoxidans* utilizuje všetky nami vybrané mono- a disacharidy.

Tento bakteriálny kmeň bol izolovaný z horúceho prameňa v Matsue v Japonsku ako termofilná baktéria, ktorá degraduje PHB. Jedná sa o gramnegatívnu, aeróbnu baktériu, ktorej bunky majú tvar tyčinky.

V štúdiách od Hsiao a kol. sa vykonávali experimenty na produkciu PHB touto termofilnou baktériou, konkrétne na vplyv zdroja uhlíka, pH a limitácia dusíka, kyslíka na bakteriálny rast a PHB produkciu. V tejto práci bola zistená súvislosť medzi bakteriálnym rastom, koncentráciou PHB a počiatočnou koncentráciou glukózy dosahujúcu 20 g/l. Pokiaľ koncentrácia glukózy presahovala 30 g/l, nastala inhibícia substrátu a výrazne sa znížila produkcia PHB. Pri poklese koncentrácie glukózy pod 5 g/l klesol obsah PHB z 50 % na 10 %. Tento fakt sa pripísal k indukcii expresie *phaZ* génu, ktorý bol v bakteriálnom kmeni *Caldimonas manganoxidans* detekovaný v stresových podmienkach pri nízkej koncentrácii glukózy. Záverom tejto časti štúdie je, že je potreba nájsť vhodnú koncentráciu sacharidového substrátu, ktorá by bola vhodná pre bakteriálny rast, ale zároveň by sa pri nej mal brať do úvahy inhibícia substrátu a indukcia *phaZ* génu. Na základe tejto informácii bola vykonaná ďalšia bioinformatická analýza v databázach NCBI a Uniprot, zameraná na ďalšie gény napojené na metabolizmus PHA. V databáze Uniprot bola nájdená jedna PHA depolymeráza – gén *phaZ* uložený pod prístupovým kódom Q9LBN6. Rovnako je táto sekvencia dostupná aj v databáze NCBI pod prístupovým kódom WP_019559620. Ďalej neboli v databázach nájdené žiadne ďalšie gény, ktoré by súviseli s metabolizmom PHA [101].

Záverom odvodeným z tejto štúdie je sľubné zastúpenie *Caldimonas manganoxidans* vo výrobe PHB s vysokou molekulovou hmotnosťou na priemyselnej úrovni. Aj keď jedna z výhod – vysoká kultivačná teplota znižuje koncentráciu rozpusteného kyslíka, čo môže viesť k obmedzeniu fermentácii s vysokou hustotou buniek, vyrovnáva vysoká špecifická rýchlosť rastu. Produkcia tejto termofilnej baktérie je porovnateľná s produkciou PHB mezofilnými baktériami, ktoré sa používajú v komerčnej výrobe PHB.

3. *Rubellimicrobium thermophilum*

O termofilnej baktérii so zbierkovým číslom DSM 16684 máme viac informácií o podmienkach kultivácie, pričom optimálna kultivačná teplota presahujúca 50 °C je ďalšou výhodou pri biotechnologickej produkcii v NGIB. Jediná informácia o možnej produkcii PHA je daná dostupnou sekvenciou I. triedy *phaC* génu z databázy Uniprot pod prístupovým kódom S9R3V0. V tomto prípade nie je zverejnená žiadna publikácia, ktorá by potvrdila produkciu PHA na úrovni fenotypu. Ďalším dôvodom, prečo bola táto termofilná baktéria zaradená do

výberu ideálnych producentov PHA je množstvo sacharidových substrátov, ktoré dokáže utilizovať. Tento bakteriálny kmeň bol izolovaný z farebných mikrobiálnych usadenín biofilmov, ktoré sa vytvorili počas výroby papiera. Prirodzené prostredie výskytu bakteriálneho kmeňa *Rubellimicrobium thermophilum* nie je známe. Pri vyhľadávaní sekvencií ďalších génov pripojených k metabolickej dráhe PHA bol v databáze NCBI nájdený represor génu *phaR*. Sekvencia tohto génu je uložená v databáze pod prístupovým kódom WP_021097564 [106].

4. *Rubrobacter xylanophilus*

Aj keď bakteriálny kmeň *Rubrobacter xylanophilus* so zbierkovým číslom DSM 9941 utilizuje len polovicu vybraných sacharidov, jeho výber medzi ideálnych kandidátov na NGIB produkciu PHA mu zaisťuje veľmi vysoká kultivačná teplota dosahujúca až 70 °C. Optimálna kultivačná teplota 60 °C vyniká z pomedzi všetkých termofilných producentov PHA. Medzi sacharidové substráty, ktoré dokáže tento bakteriálny kmeň utilizovať zaraďujeme monosacharidy galaktózu, manózu, xylózu a arabinózu. Ako u jediného bakteriálneho kmeňa bolo možné vyhľadať sekvencie dvoch tried PHA syntázy – I. a III. triedu génu *phaC* dostupnej v databáze NCBI a Uniprot pod prístupovým kódom WP_156787884 (pre I. triedu v databáze NCBI) a A0A510HIB4 (pre III. triedu v databáze Uniprot bola nájdená sekvencia podjednotky PhaC). Grampozitívne bunky sú pleomorfné tyčinkovité útvary. Kolónie svetlo-ružovej farby sú hladké, kruhové a konvexné. Tento bakteriálny kmeň vyniká tým, že nesporuluje. Totiž bacily tvoriace spóry prinášajú veľa komplikácií do biotechnologického procesu v čase náhlejšej sporulácie, ktorá zastaví metabolickú aktivitu tejto kultúry. Tento proces je spojený s mobilizáciou naakumulovanej PHA, čo znižuje celkové výťažky produktu.

Pre konkrétny bakteriálny kmeň nebolo možné nájsť ďalšie sekvencie génov týkajúcich sa PHA syntázy, resp. PHA depolymerázy. Avšak zo zverejnenej publikácie sa dozvedáme prítomnosť génov intracelulárnej nPHA_{SCL} a dokonca aj extracelulárnej nPHA_{MCL} depolymerázy u rodu *Rubrobacter*.

Existujú aj štúdie potvrdzujúce produkciu PHA na fenotypovej úrovni. Tento bakteriálny kmeň dosahoval najvyššie množstvo PHA pri použití sacharidového substrátu, kedy prítomnosť v biomase dosahovala až 50 w/w% v sušine. Aj na iných uhlíkových substrátoch bola pozorovaná produkcia PHA, avšak množstvo nedosiahlo ani 10 % v sušine. Rovnako bol potvrdený široký rozsah teplôt pri kultivácii, ktorý nemal absolútne žiaden vplyv na akumuláciu PHA. Ďalšou vlastnosťou, ktorá nespochybňuje možnosť produkcie PHA v NGIB týmto bakteriálnym kmeňom je schopnosť inkorporovať 3HV do polymérnej štruktúry a tým vyprodukovať prekurzor. Použitie kyseliny valerovej prinášalo veľké celkové výťažky polyméru a rovnako aj pomerne vysoký podiel jednotiek 3HV v štruktúre.

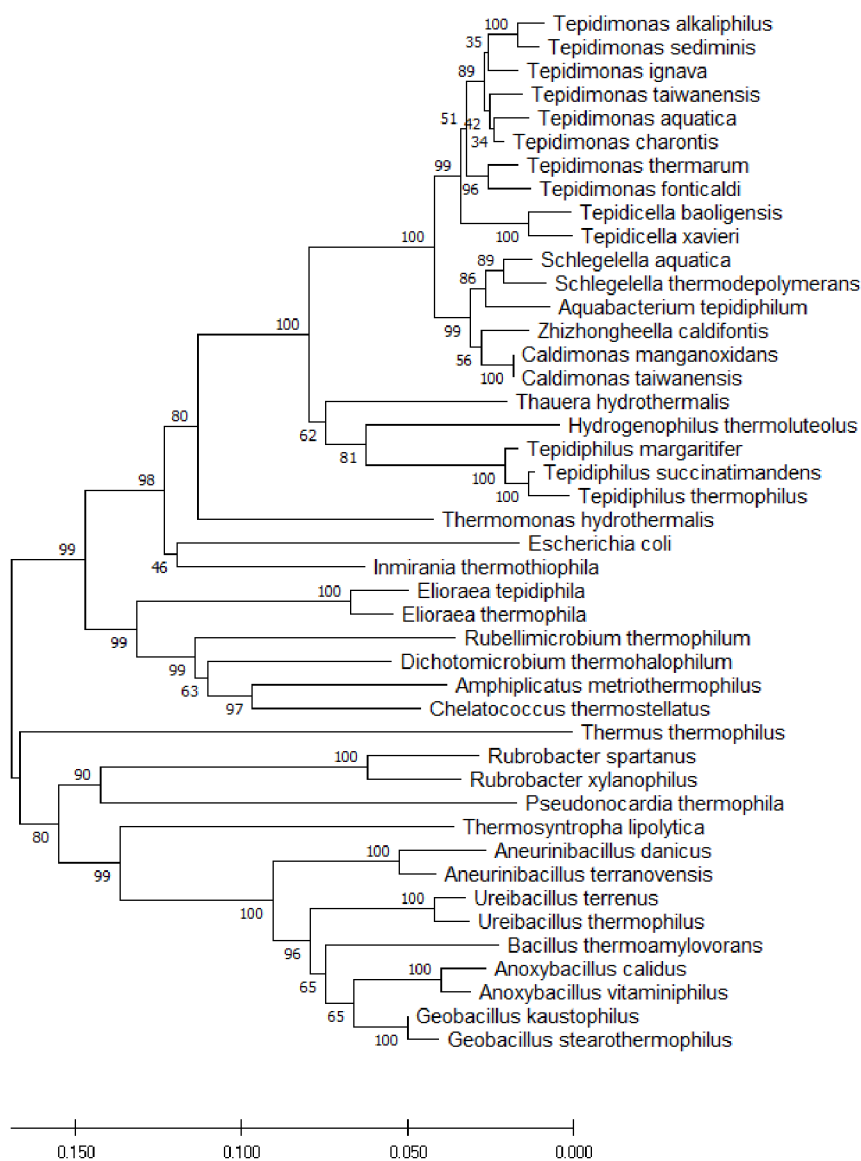
5. *Zhizhongheella caldifontis*

Bakteriálny kmeň *Zhizhongheella caldifontis* so zbierkovým číslom DSM 27262 bol do výberu potenciálnych producentov PHA vybraný na základe vysokej kultivačnej teploty a množstva utilizovaných sacharidov. V prípade tejto termofilnej baktérie neexistujú zatiaľ žiadne informácie o produkcii polyhydroxyalkanoátov vo vedeckých publikáciách. Zároveň disponuje *phaC* génom a teda je možné experimentálne overiť produkciu PHA. Sekvencia tohto génu bola vyhľadávaná v databáze Uniprot pod prístupovým kódom A0A2S5SUW7. Jedná sa o alkalitolerantný a striktne aeróbný bakteriálny kmeň, ktorý bol izolovaný z horúceho prameňa

Hehua v juhozápadnej Číne. Kolónie boli svetlo-hnedej farby, vypuklé a okrúhle. Na základe morfológických, fyziologických, chemotaxonomických a fylogenetických štúdií bol tento bakteriálny kmeň zaradený pod čeľaď *Comamonadaceae*. V pokračovaní bioinformatickej analýze bola nájdená sekvencia represoru génu *phaR* pod prístupovým kódom A0A2S5SUN5.

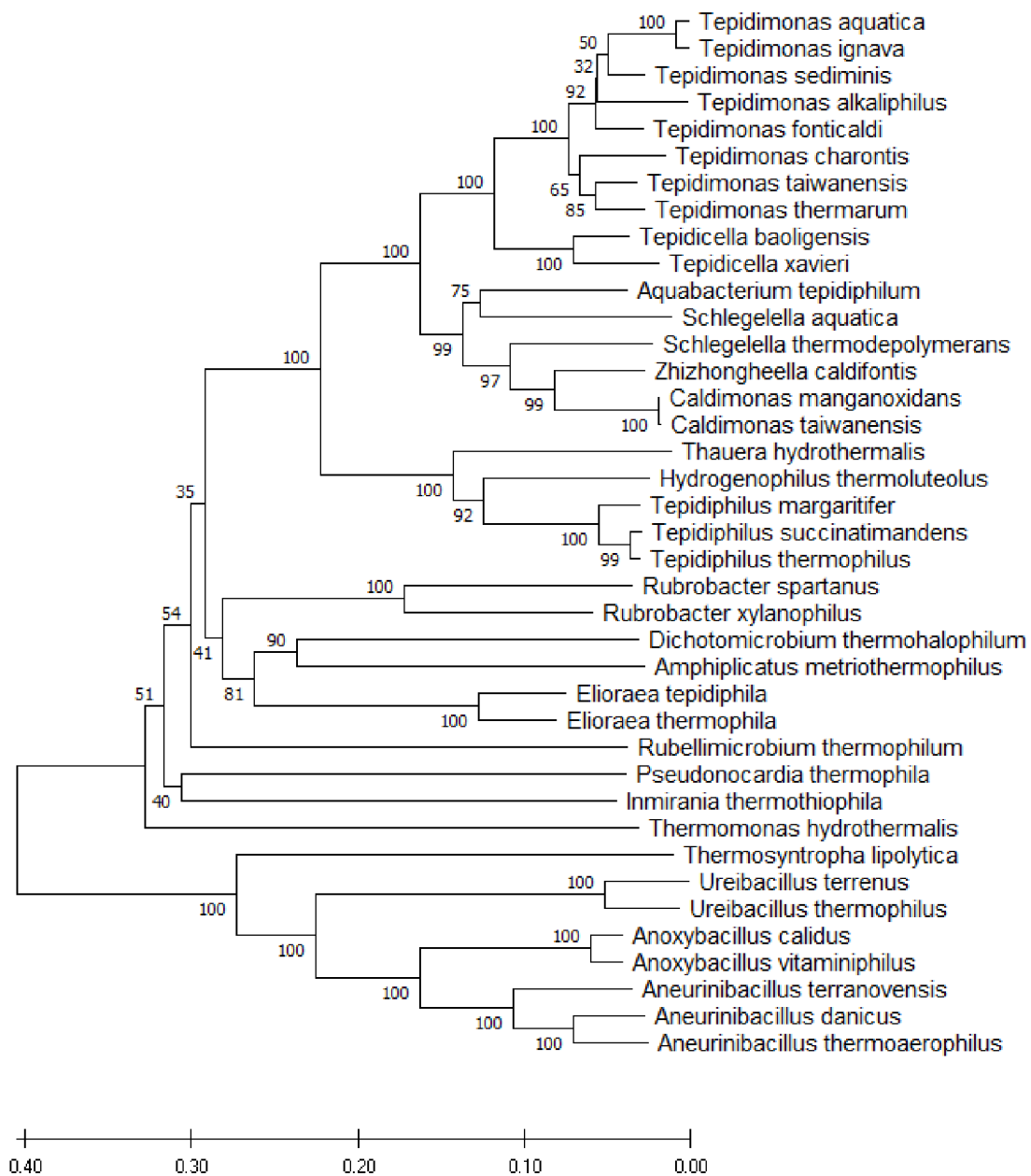
4.1.4 Analýza bakteriálnych termofilných kmeňov z fylogenetických stromov

Fylogenetické stromy (obrázok 12 a obrázok 13) boli skonštruované metódou Neighbor-Joining v programe MEGA X. Výsledky vykonaných bootstrap testov ukazujú, že vybraná metóda konštrukcie fylogenetických stromov je vhodná na evolučnú analýzu. V analýze boli ponechané aj sekvencie, ktorých uzly majú menšiu podporu než 70 %. Teda pozície niektorých bakteriálnych kmeňov v rámci fylogenetického stromu nie sú dobre štatisticky podložené, avšak v rámci tejto diplomovej práce sú získané informácie dostačujúce na interpretáciu evolučného výsledku.



Obrázok 12 Fylogenetický strom vytvorený zo sekvencií génu *16S rRNA*, pomocou programu MEGA X, metódou Neighbor-joining a výpočtom s použitím Maximum Composite Likelihood metódy

Fylogenetický strom na obrázku 12 je zostrojený NJ metódou zo 43 sekvencií génu *16S rRNA*. Z fylogenetického stromu je viditeľné vetvenie na dve časti. Jedna z hlavných vetví je vytvorená z bakteriálnych kmeňov patriacich medzi aktinobaktérie a bacily, druhú – najväčšiu vetvu tvoria proteobaktérie. Samostatnú vetvu tvorí bakteriálny kmeň *Thermus thermophilus*. Fylogenetický strom sekvencie génu *16S rRNA* poskytuje informácie o evolučnej rýchlosti mikroorganizmu a to konkrétne z dĺžky vetvy. Pri bakteriálnych kmeňoch z rovnakého druhu je dĺžka vetvy identická, čo značí podobnú evolučnú rýchlosť. Vo fylogenetickom strome na obrázok 12 je viditeľných niekoľko zhlukov, ktoré sú vytvorené kvôli viacerým bakteriálnym kmeňom z rovnakého druhu. Najväčší zhluk tvorí bakteriálny rod *Tepidimonas*. Rody *Tepidicella* a *Tepidimonas* sú si evolučne podobné, čo potvrdzuje fakt, že vychádzajú z rovnakého radu *Burkholderiales*.



Obrázok 13 Fylogenetický strom vytvorený zo sekvencií génu *phaC*, pomocou programu MEGA X, metódou Neighbor-joining a výpočtom p-distance

Fylogenetický strom na obrázok 13 zostrojený metódou NJ pre 39 sekvencií génu *phaC* (I. triedy PhaC) je rozdelený na dve časti – pre gény kódujúce I. a III. triedu PHA syntázy. Najväčšiu časť tvorí I. trieda PHA syntázy a druhou skupinou vo fylograme tvoria bakteriálne kmene, ktorých gén *phaC* kóduje III. triedy PHA syntázy. To potvrdzuje aj informácie, ktoré boli získané z databáz a publikácií k jednotlivým bakteriálnym kmeňom. U termofilnej baktérii *Thermosyntropha lipolytica* nebolo možné v predchádzajúcej analýze nájsť zaradenie osekvenovaného génu do konkrétnej triedy. Vzhľadom k tomu, že vo fylogenetickom strome tento bakteriálny kmeň tvorí ďalšiu vetvu, jedná sa pravdepodobne o inú triedu PHA syntázy, než je I. a III. trieda. Na druhú stranu tento výsledok mohol vzniknúť aj z nízkej podobnosti génu *phaC* baktérie *Thermosyntropha lipolytica* ku sekvencii génu *phaC* baktérii *Cupriavidus necator*. Pri vyhľadávaní termofilných baktérií sa v rámci experimentálnej časti tejto diplomovej práce nebrala do úvahy podobnosť sekvencií.

Pri porovnaní oboch skonštruovaných fylogenetických stromov boli pozorované rozdiely v dĺžkach vetvy pri niektorých bakteriálnych kmeňoch. To svedčí o tom, že sa líši evolučná rýchlosť pre celý mikroorganizmus a pre gén *phaC*. Veľký rozdiel je napr. viditeľný pri baktériách *Thermomonas hydrothermalis*, *Inmirania thermoithiophila* alebo pri rode *Schlegelella*.

4.1.5 Predikcia operónu v bakteriálnom genóme

Program Operon-Mapper pomocou konkrétneho algoritmu označil gény, ktoré sa nachádzajú v rovnakom operóne a sú zapojené do jednej rovnakej metabolickej dráhy. Vopred bolo potrebné získať genóm a anotáciu ku genómu jednotlivých 5 potenciálnych producentov PHA z databázy GenBank. Analýza bola zameraná na gény súvisiace s metabolizmom PHA. Získali sa informácie o operóne, v ktorom sa nachádzal gén *phaC*, rovnako sa vyhľadali v genóme ďalšie gény napojené na PHA metabolizmus. Vzhľadom k tomu, že Operon-mapper označí za operón v niektorých prípadoch len jeden gén, pre správnu interpretáciu budeme ďalej hovoriť namiesto operónu o transkripčnej jednotke. Všetky tieto informácie boli spísané do nasledujúcich tabuliek k jednotlivým 5 vybraným potenciálnym producentom PHA v NGIB.

Anoxybacillus vitaminiphilus:

Program Operon-mapper predikoval 1945 transkripčných jednotiek. V dokumente – list of operon boli nájdené gény spojené s metabolizmom PHA a následne boli vyhľadávané základné informácie o ďalších génoch nachádzajúcich sa v tejto transkripčnej jednotke. Opäť na doplnenie informácií o génoch bola použitá databáza NCBI Protein. V tabuľke 6 sú zapísané všetky získané informácie o týchto génoch.

Tabuľka 6 Informácie o génoch metabolizmu PHA pre bakteriálny kmeň *Anoxybacillus vitaminiphilus*

Operón	Označenie génu	Accession number	Predikovaná funkcia génu
26	<i>phaC</i>	WP_111643468.1	Poly (3-hydroxyalkanoát) syntéza
	WP_111643467.1	WP_111643467.1	3-oxoacyl-ACP reduktáza
24	<i>phaQ</i>	WP_111643465.1	PHB represor
	<i>PhaP_Bmeg</i>	WP_111643464.1	PHA inklúzný proteín
	WP_181502669.1	WP_181502669.1	(R)-špecifická enoyl-CoA hydratáza
25	<i>phaR</i>	WP_111643466.1	podjednotka PHA syntázy

V tabuľke 6 sú vypísané tri transkripčné jednotky nájdené v genóme baktérie *Anoxybacillus vitaminiphilus*, z toho sú 2 operóny. V operóne s génom *phaC* je ďalší gén s accession number WP_111643467.1. Pri analýze v databáze NCBI bolo zistené, že sa jedná o gén kódujúci enzým 3-oxoacyl-ACP reduktáza, ktorý sa podieľa na biosyntéze mastných kyselín. Ďalším operón obsahuje gény *phaQ*, *PhaP_Bmeg* a gén kódujúci (R)-špecifická enoyl-CoA hydratázu. Gén s označením *phaQ* kóduje represor PHB (PhaQ proteín), ktorý reguluje expresiu génov *phaR* a *phaQ*. Inklúzný proteín je zabudovaný v granulách PHA a jeho úlohou je ukladanie aminokyselín. Gén kódujúci tento proteín má označenie *PhaP_Bmeg*. (R)-špecifická enoyl-CoA hydratáza katalyzuje hydratáciu trans-2-enoyl-CoA na (R)3-hydroxyacyl-CoA. Tento enzým je opäť súčasťou biosyntetickej dráhy PHA. V genóme bol nájdený aj gén *phaR* kódujúci druhú podjednotku IV. triedy PHA syntázy. Táto informácia prináša možnosť prítomnosti IV. triedy PHA syntázy, avšak pri predchádzajúcej analýze nebola nájdená sekvencia tejto triedy.

Caldimonas manganoxidans:

V prípade bakteriálneho kmeňa *Caldimonas manganoxidans* program Operon-mapper predikoval dokopy 1542 transkripčných jednotiek. Rovnako ako v predchádzajúcom prípade boli všetky informácie o génoch súvisiacich s metabolizmom PHA dohľadané v databáze NCBI a súhrn týchto informácií je v tabuľke 7.

Tabuľka 7 Informácie o génoch metabolizmu PHA pre bakteriálny kmeň *Caldimonas manganoxidans*

Operón	Označenie génu	Accession number	Oblasť
723	<i>phaC</i>	WP_026330149.1	Poly (3-hydroxyalkanoát) syntéza
	WP_019560719.1	WP_019560719.1	Acetyl-CoA-C-acetyltransferáza
	<i>phbB</i>	WP_019560720.1	Acetoacetyl-CoA reduktáza
1382	<i>phaR</i>	WP_019562122.1	Represor PHA syntázy
	WP_026330382.1	WP_026330382.1	PLP transferáza
	WP_019562120.1	WP_019562120.1	Hypotetický proteín
	<i>rimO</i>	WP_019562121.1	2-methylthioadenín syntetáza

V tabuľke 7 sú vyznačené dva operóny obsahujúce gény podieľajúce sa na metabolizme PHA. Prvým operónom je transkripčná jednotka v poradí 723 a obsahuje *phaC*, *phbB* gén a gén

bez označenie s accesion number WP_019560719.1. Pri analýze bolo zistené, že gén s označením *phbB* kóduje acetoacetyl-CoA reduktázu, ktorá patrí medzi alkoholové dehydrogenázy s krátkym reťazcom. Acetyl-CoA-C-acetyltransferáza je enzým patriaci do skupiny acyltransferáz a je súčasťou niekoľkých dôležitých metabolických dráh ako napr. metabolizmus mastných kyselín alebo syntéza a odbúravanie ketolátok. Rovnako ako pri baktérii *Anoxybacillus vitaminiphilus* aj tento bakteriálny kmeň má gén kódujúci PhaR – represor PHA syntázy. PhaR je regulačný proteín, ktorý sa nachádza v blízkosti iných proteínov spojených s biosyntézou a reguláciou PHA. Konkrétne reguluje buď samých seba alebo fazíny, ktoré obaľujú granule PHA. Tiež napríklad regulujú enzýmy, ktoré ovplyvňujú ukladanie uhlíka do polymérov. C-koncová oblasť je v rodine týchto proteínov slabo zakonzervovaná. Ďalší predikovaný operón obsahuje 3 gény: 2 bez označenie s accesion number WP_026330382.1 a WP_019562120.1 a jeden gén s označením *rimO*, ktorý súvisí s enzýmom 2-methylthioadenín syntetáza.

Rubellimicrobium thermophilum:

Program Operon-mapper pri analýze genómu bakteriálneho kmeňa *Rubellimicrobium thermophilum* predikoval 1537 transkripčných jednotiek, o ktorých boli doplnené informácie z databázy NCBI Protein a Uniprot. V tabuľke 8 sú zhrnuté všetky získané informácie.

Tabuľka 8 Informácie o génoch metabolizmu PHA pre bakteriálny kmeň *Rubellimicrobium thermophilum*

Operón	Označenie génu	Accession number	Oblasť
682	<i>phaC</i>	WP_021097566.1	Poly (3-hydroxyalkanoát) syntéza
	WP_021097565.1	WP_021097565.1	Hypotetický proteín
683	<i>phaZ</i>	S9SJZ3	Poly (β -hydroxyalkanoát) depolymeráza
681	<i>phaR</i>	–	Necharakterizovaný proteín

V tabuľke 8 sú naznačené tri predikované transkripčné skupiny bakteriálneho kmeňa *Rubellimicrobium thermophilum*, pričom len jednu z nich môžeme označiť za operón. Spolu s génom *phaC* je v operóne gén bez označenia s accesion number WP_021097565.1, ktorého funkcia je neznáma. Baktéria obsahuje vo svojom genóme gén *phaR*, ktorý síce bol označený ako necharakterizovaný, avšak pravdepodobne sa jedná o gén súvisiaci s proteínom PhaR alebo o enzymatickú podjednotku IV. triedy PHA syntázy. *Rubellimicrobium thermophilum* disponuje aj s génom *phaZ* kódujúcim intracelulárnu depolymerázu PHA.

Rubrobacter xylanophilus:

Z genómu bakteriálneho kmeňa *Rubrobacter xylanophilus* bolo predikovaných 1330 transkripčných jednotiek, z toho 2 jednotky obsahujúce po 2 gény boli ďalej analyzované v databázach NCBI. Všetky získané informácie sú spísané v tabuľke 9.

Tabuľka 9 Informácie o génoch metabolizmu PHA pre bakteriálny kmeň *Rubrobacter xylanophilus*

Operón	Označenie génu	Accession number	Názov génu
930	<i>phaC</i>	WP_011565326.1	Poly (3-hydroxyalkanoát) syntéza
	WP_083760190.1	WP_083760190.1	dihydrolipoamid acyltransferáza
931	<i>phaC_2</i>	WP_011565327.1	Poly (3-hydroxyalkanoát) syntéza
936	<i>phaQ</i>	WP_197735430.1	PHB represor
	WP_011565332.1	WP_011565332.1	hypotetický proteín

Program Operon-mapper v tejto analýze predikoval 2 operóny obsahujúce gény spojené s metabolizmom PHA. Prvý operón s označením transkripčnej jednotky 930 obsahuje gén *phaC* kódujúci druhú podjednotku PhaC syntázy III. triedy. Okrem *phaC* génu je predikovaný v tejto transkripčnej jednotke aj neoznačený gén s accession number WP_083760190.1. Tento gén je napojený na enzým dihydrolipoamid acyltransferáza, ktorý funguje ako podjednotka E2 komplexu pyruvátdehydrogenázy. Je nevyhnutný pri glykolýze a v citrátovom cykle. Program operon-mapper predikoval aj gén s označením *phaC_2*. Podľa proteínovej sekvencie boli v databáze NCBI Protein vyhladané informácie o tom, že sa jedná o gén *phaC* kódujúci I. triedu PhaC syntázy. V ďalšom operóne 936 transkripčnej jednotky je gén *phaQ*, ktorý sa viaže na PHB represor a gén s necharakterizovaným prepojením na metabolizmu.

Zhizhongheella caldifontis:

Program Operon-mapper predikoval v genóme termofilnej baktérie *Zhizhongheella caldifontis* 1547 transkripčných jednotiek. Operón obsahujúci *phaC* gén bol ďalej analyzovaný opäť v databáze NCBI Protein a získané základné informácie sú v tabuľke 10.

Tabuľka 10 Informácie o génoch metabolizmu PHA pre bakteriálny kmeň *Zhizhongheella caldifontis*

Operón	Označenie génu	Accession number	Názov génu
825	<i>phaC</i>	WP_211286910.1	Poly (3-hydroxyalkanoát) syntéza
	<i>phbB</i>	WP_104302467.1	Acetoacetyl-CoA reduktáza
	WP_104302468.1	WP_104302468.1	Acetyl-CoA acetyltransferáza
769	<i>phaR</i>	–	Necharakterizovaný proteín

Z výsledkov v tabuľke 10 z programu Operon-mapper boli analyzované 2 transkripčné jednotky, kde jednu z nich môžeme označiť za operón. V operóne s označením 825 boli okrem génu *phaC* prítomné ďalšie dva gény napojené na metabolizmus PHA. Prvým génom kódujúcim acetoacetyl-CoA reduktázu je gén s označením *phbB*. Druhý je gén bez označenia s accession number WP_104302468.1, ktorý súvisí s acetyl-CoA acetyltransferáza. Posledným detekovaným génom je *phaR*, ktorému v tomto prípade nebola pridelená funkcia, avšak pravdepodobne sa opäť jedná o gén kódujúci represor PHB – PhaR alebo o podjednotku enzýmu PHA syntázy patriacej do IV. triedy.

Pri porovnaní výsledkov génovej analýzy z databáz NCBI Protein/Uniprot a z programu Operon-mapper sú viditeľné malé rozdiely. V prípade bakteriálneho kmeňa *Anoxybacillus vitaminiphilus* sa pri vyhľadávaní génov napojených na metabolizmus PHA v databázach nepodarilo nájsť žiadne iné gény okrem génu *phaC*. Na druhú stranu výsledok z programu Operon-mapper hovorí o tom, že táto baktéria ma dostatočné množstvo ďalších génov súvisiacich s biosyntézou PHA. To isté platí aj pre termofilnú baktériu *Caldimonas manganoxidans*. Pri analýze *Rubellimicrobium thermophilum* v databázach NCBI Protein a Uniprot bola nájdená sekvencia len génu *phaR* aj napriek tomu, že v Operon-mapper bol nájdený aj gén súvisiaci s depolymeráciou PHA. Naopak pri bakteriálnom kmeni *Rubrobacter xylanophilus* bola v databázach nájdená sekvencia génu depolymerázy PhaZ, avšak v Operon-mapper tento gén nebol predikovaný. Podobný výsledok vidieť aj pri baktérii *Zhizhongheella caldifontis*.

5 ZÁVER

- Výsledkom tejto práce je rozsiahla teoretická príprava experimentálnej práce skúmania produkcie polyhydroxyalkanoátov termofilnými baktériami, ktorá napomáha pri výbere potenciálneho producenta PHA z radu extrémofilov. V rámci práce bolo pomocou podrobnej literárnej rešerši a bioinformatickej analýze celogenomových sekvencií identifikovaných 44 termofilných bakteriálnych kmeňov, ktoré sú na základe použitých informácií schopné produkovať PHA. Jedným zo zistením práce je, že aj napriek tomu, že niektoré kmene sú pravdepodobne schopné produkcie PHA, avšak sú z viacerých dôvodov nevhodné na použitie v NGIB.
- Všetky zozbierané informácie o termofilných baktériách, s ktorými sa pracovalo v tejto práci pochádzajú z online dostupných databáz a literárnych rešerši. Dáta, ktoré sme dostali s najväčšou pravdepodobnosťou sa môžu stiahnuť na celý rod alebo príbuzné bakteriálne kmene v danom rode.
- Pri fylogenetickej analýze génov *phaC* a *16S rRNA* bolo vyvedených niekoľko informácií, resp. boli potvrdené výsledky z predchádzajúcej analýzy. Oba fylogenetické stromy boli rozdelené na dve veľké skupiny. V prípade fylogramu zostrojeného z génu *16S rRNA* boli bakteriálne kmene rozdelené na aktinobaktérie a bacily a na druhú vetvu vytvorenú z proteobaktérií. Fylogenetický strom zostrojený z génu *phaC* je rozdelený na dve základne vetvy – I. a III. triedu PHA syntázy. Tieto údaje odpovedajú aj predchádzajúcej analýze tried génu *phaC*. Spoločným rysom oboch fylogenetických stromov je tvorba veľkého množstva zhlukov z toho dôvodu, že v analýze sa nachádzalo mnoho bakteriálnych kmeňov patriacich do rovnakého rodu.
- Analýza genómu piatich vybraných potenciálnych producentov PHA priniesla informácie o génoch napojených na PHA metabolizmus. Po doplnení výsledkov z databáz programom Operon-mapper boli zistené ďalšie gény súvisiace s PHA biosyntézou a to najčastejšie gény *phaR*, *phaQ*, *phaZ* a gény kódujúce rôzne enzýmy z metabolizmu PHA. V tejto analýze mal najväčšie zastúpenie génov PHA bakteriálny kmeň *Caldimonas manganoxidans*.
- Zo zbierky potenciálnych producentov polyhydroxyalkanoátov bol vybraný jeden termofilný bakteriálny kmeň, ktorý najviac spĺňa požiadavky novej generácie priemyselných biotechnológií. Týmto bakteriálnym kmeňom je *Rubrobacter xylanophilus* vedený pod zbierkovým číslom DSM 9941. Jedná sa o grampozitívnu, nesporujúcu termofilnú baktériu, ktorej hodnoty kultivačnej teploty sa pohybujú v rozmedzí od 40 °C do 70 °C, pričom optimálna hodnota teploty pre rast je 60 °C. Možná produkcia PHA je na genotypovej úrovni potvrdená dostupnou sekvenciou *phaC* génu v databáze Uniprot pod číslom A0A510HIB4. Tento bakteriálny kmeň disponuje I. a III. triedou PHA syntázy. Je dostupná jedna vedecká publikácia zahrňujúca informácie o produkcii PHA. Medzi substráty, ktoré dokáže utilizovať patrí galaktóza, ribóza, xylóza, manóza, arabinóza, rafinóza, glycerol, sorbitol, acetát, laktát, fumarát, malát, sukcinát a glutamín. V rámci fylogenetickej analýzy génu *phaC* sa nachádzal vo viac zastúpenej časti fylogramu, ktorá je charakteristická pre I. triedu

PHA syntázy, čo odpovedá aj analýze z dostupných databáz. V porovnaní s ďalším bakteriálnym kmeňom z rovnakého druhu – *Rubrobacter spartanus*, s ktorým sa zhlučuje, má *Rubrobacter xylanophilus* nižšiu evolučnú rýchlosť génu *phaC*. To isté platí aj v prípade fylogenetického stromu zostaveného z génu *16S rRNA*. Táto baktéria vykazuje evolučnú podobnosť génu *phaC* (I. trieda PhaC syntázy) s bakteriálnymi kmeňmi z rodu *Elioraea* a s bakteriálnym kmeňom *Dichotomicrobium thermohalophilum*. Na druhú stranu je vidieť príbuzenský vzťah v rámci génu *16S rRNA* s bakteriálnym kmeňom *Pseudonocardia thermophila*. Pri bioinformatickej analýze genómu boli nájdené ďalšie gény napojené na metabolizmus PHA, pričom jedným z nich okrem *phaC* génu je gén *phaQ*. Na základe týchto informácií je možné hovoriť o *Rubrobacter xylanophilus* ako o vhodnom producentovi PHA v rámci NGIB, resp. o jeho blízko príbuzných kmeňoch v rode.

6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] LEE, Sang Yup. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING*. 1996, 49(1), 1-14. ISSN 0006-3592.
- [2] REDDY, C.S.K, R GHAI, RASHMI a V.C KALIA. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology* [online]. 2003, 87(2), 137-146 [cit. 2020-12-03]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/S0960-8524(02)00212-2
- [3] KHANNA, Shilpi a Ashok K. SRIVASTAVA. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry* [online]. 2005, 40(2), 607-619 [cit. 2020-12-03]. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2004.01.053
- [4] 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. 2021-01-27]. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/S0079-6700(00)00035-6
- [5] MOŽEJKO-CIESIELSKA, Justyna a Robert KIEWISZ. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiological Research* [online]. 2016, 192(1), 271-282 [cit. 2021-01-27]. ISSN 09445013. Dostupné z: doi:10.1016/j.micres.2016.07.010
- [6] RAZA, Zulfiqar Ali, Sharjeel ABID a Ibrahim M. BANAT. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation* [online]. 2018, 126(1), 45-56 [cit. 2021-01-27]. ISSN 09648305. Dostupné z: doi:10.1016/j.ibiod.2017.10.001
- [7] PHILIP, S., T. KESHAVARZ a I. ROY. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* [online]. 2007, 82(3), 233-247 [cit. 2021-01-27]. ISSN 02682575. Dostupné z: doi:10.1002/jctb.1667
- [8] MADISON, Lara L. a Gjalt W. HUISMAN. Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 1999, 63(1), 21-53 [cit. 2021-02-10]. ISSN 1098-5557. Dostupné z: doi:10.1128/MMBR.63.1.21-53.1999
- [9] CHEN, Guo-Qiang. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society Reviews* [online]. 2009, 38(8), 2434-2446 [cit. 2021-02-12]. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/b812677c
- [10] CHEN, Guo-Qiang a Qiong WU. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* [online]. 2005, 26(33), 6565-6578 [cit. 2021-02-15]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2005.04.036
- [11] CHEN, Guo-Qiang, Ivan HAJNAL, Hong WU, Li LV a Jianwen YE. Engineering Biosynthesis Mechanisms for Diversifying Polyhydroxyalkanoates. *Trends in Biotechnology* [online]. 2015, 33(10), 565-574 [cit. 2021-02-17]. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2015.07.007
- [12] ZINN, Manfred, Bernard WITHOLT a Thomas EGLI. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2001, 53(1), 5-21 [cit. 2021-02-17]. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/S0169-409X(01)00218-6

- [13] REHM, Bernd H.A. a Alexander STEINBÜCHEL. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis: natural catalysts for plastics. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 1999, 25(1-3), 3-19 [cit. 2021-02-15]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/S0141-8130(99)00010-0
- [14] REHM, Bernd H. A. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochemical Journal* [online]. 2003, 376(1), 15-33 [cit. 2021-02-24]. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/bj20031254
- [15] JENDROSSEK, Dieter a René HANDRICK. Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates. *Annual Review of Microbiology* [online]. 2002, 56(1), 403-432 [cit. 2021-02-15]. ISSN 0066-4227. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.160838
- [16] CAVICCHIOLI, Ricardo. Extremophiles and the Search for Extraterrestrial Life. *Astrobiology* [online]. 2002, 2(3), 281-292 [cit. 2021-02-26]. ISSN 1531-1074. Dostupné z: doi:10.1089/153110702762027862
- [17] ROTHSCILD, Lynn J. a Rocco L. MANCINELLI. Life in extreme environments. *Nature* [online]. 2001, 409(6823), 1092-1101 [cit. 2021-02-26]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/35059215
- [18] MOROZKINA, E. V., E. S. SLUTSKAYA, T. V. FEDOROVA, T. I. TUGAY, L. I. GOLUBEVA a O. V. KOROLEVA. Extremophilic microorganisms: Biochemical adaptation and biotechnological application (review). *Applied Biochemistry and Microbiology* [online]. 2010, 46(1), 1-14 [cit. 2021-02-26]. ISSN 0003-6838. Dostupné z: doi:10.1134/S0003683810010011
- [19] NIEHAUS, F., C. BERTOLDO, M. KÄHLER a G. ANTRANIKIAN. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 1999, 51(6), 711-729 [cit. 2021-02-28]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s002530051456
- [20] Extremophiles: The Most Extreme Life Forms on Earth. In: Kids discover [online]. Westport: Kids discover, 2014 [cit. 2021-03-02]. Dostupné z: <https://kidsdiscover.com/teacherresources/extremophiles-extreme-life-forms-earth/>
- [21] MESBAH, Noha M. a Juergen WIEGEL. Life at Extreme Limits. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 2008, 1125(1), 44-57 [cit. 2021-02-28]. ISSN 00778923. Dostupné z: doi:10.1196/annals.1419.028
- [22] CHEN, Guo-Qiang a Xiao-Ran JIANG. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2018, 50(1), 94-100 [cit. 2021-03-02]. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2017.11.016
- [23] YU, Lin-Ping, Fu-Qing WU a Guo-Qiang CHEN. Next-Generation Industrial Biotechnology-Transforming the Current Industrial Biotechnology into Competitive Processes. *Biotechnology Journal* [online]. 2019, 14(9) [cit. 2021-03-02]. ISSN 1860-6768. Dostupné z: doi:10.1002/biot.201800437
- [24] ZHENG, Yang, Jin-Chun CHEN, Yi-Ming MA a Guo-Qiang CHEN. Engineering biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) for diversity and cost reduction. *Metabolic Engineering* [online]. 2020, 58(1), 82-93 [cit. 2021-03-02]. ISSN 10967176. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymben.2019.07.004

- [25] GUPTA, G.N., S. SRIVASTAVA, S.K. KHARE a V. PRAKASH. Extremophiles: An Overview of Microorganism from Extreme Environment. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology* [online]. 2014, 7(2), 371-380 [cit. 2021-03-05]. ISSN 0974-1712. Dostupné z: doi:10.5958/2230-732X.2014.00258.7
- [26] CHEN, Guo-Qiang a Xiao-Ran JIANG. Engineering bacteria for enhanced polyhydroxyalkanoates (PHA) biosynthesis. *Synthetic and Systems Biotechnology* [online]. 2017, 2(3), 192-197 [cit. 2021-03-07]. ISSN 2405805X. Dostupné z: doi:10.1016/j.synbio.2017.09.001
- [27] CVRČKOVÁ, Fatima. Jak se čtou genomy: bioinformatika jakožto obor na pomezí biologie a exaktních věd. *Pokroky matematiky, fyziky a astronomie*. 2006, 51(4), 288-300.
- [28] CVRČKOVÁ, Fatima. Úvod do praktické bioinformatiky. Praha: Academia, 2006. ISBN 80-200-1360-1.
- [29] BENSON, Dennis A., Mark CAVANAUGH, Karen CLARK, Ilene KARSCH-MIZRACHI, David J. LIPMAN, James OSTELL a Eric W. SAYERS. GenBank. *Nucleic Acids Research* [online]. 2012, 41(D1), D36-D42 [cit. 2021-7-16]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gks1195
- [30] KANZ, C., Mark CAVANAUGH, Karen CLARK, Ilene KARSCH-MIZRACHI, David J. LIPMAN, James OSTELL a Eric W. SAYERS. The EMBL Nucleotide Sequence Database. *Nucleic Acids Research* [online]. 2004, 33(Database issue), D29-D33 [cit. 2021-7-16]. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gki098
- [31] MOUNT, David W. Using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2010, 2001-05-30, 2007(7) [cit. 2021-7-16]. ISSN 1940-3402. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.top17
- [32] BAXEVANIS, Andreas D. Searching the NCBI Databases Using Entrez. *Current Protocols in Human Genetics* [online]. 2006, 51(1), 1-24 [cit. 2021-04-03]. ISSN 1934-8266. Dostupné z: doi:10.1002/0471142905.hg0610s51
- [33] MAGLOTT, D. Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Research* [online]. 2004, 33(Database issue), D54-D58 [cit. 2021-04-01]. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gki031
- [34] PubMed.gov. National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information [online]. Rockville: National Library of Medicine [cit. 2021-04-03]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/about/>
- [35] ROBERTS, R. J. PubMed Central: The GenBank of the published literature. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2001, 98(2), 381-382 [cit. 2021-04-03]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.98.2.381
- [36] FATEHI, Farhad, Leonard C GRAY a Richard WOOTTON. How to improve your PubMed/MEDLINE searches: 2. display settings, complex search queries and topic searching. *Journal of Telemedicine and Telecare* [online]. 2013, 20(1), 44-55 [cit. 2021-04-03]. ISSN 1357-633X. Dostupné z: doi:10.1177/1357633X13517067
- [37] UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Research* [online]. 2015, 43(D1), D204-D212 [cit. 2021-04-04]. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gku989

- [38] BAIROCH, A. The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Research* [online]. 2004, 33(Database issue), D154-D159 [cit. 2021-04-04]. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gki070
- [39] EIDHAMMER, Ingvar a W. R. TAYLOR. *Protein bioinformatics: an algorithmic approach to sequence and structure analysis* [online]. Chichester: J. Wiley, c2004 [cit. 2021-03-16]. ISBN 04-708-4839-1.
- [40] SIEVERS, Fabian a Desmond G. HIGGINS. Clustal Omega. *Current Protocols in Bioinformatics* [online]. 2014, 48(1) [cit. 2021-7-16]. ISSN 1934-3396. Dostupné z: doi:10.1002/0471250953.bi0313s48
- [41] BACON, David J. a Wayne F. ANDERSON. Multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology* [online]. 1986, 191(2), 153-161 [cit. 2021-03-31]. ISSN 00222836. Dostupné z: doi:10.1016/0022-2836(86)90252-4
- [42] THOMPSON, J. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* [online]. 1997, 25(24), 4876-4882 [cit. 2021-03-31]. ISSN 13624962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/25.24.4876
- [43] SONG, Letian, Sherry WU a Adrian TSANG. Phylogenetic Analysis of Protein Family. *Fungal Genomics* [online]. New York, NY: Springer New York, 2018, 2018-06-07, 1775(1), 267-275 [cit. 2021-04-05]. *Methods in Molecular Biology*. ISBN 978-1-4939-7803-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-7804-5_21
- [44] CALINSKI, Tadeusz. Dendrogram. *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online* [online]. 2014, 1(1) [cit. 2021-04-05]. ISSN 9781118445112. Dostupné z: doi:10.1002/9781118445112.stat05624
- [45] TABOADA, Blanca, Karel ESTRADA, Ricardo CIRIA, Enrique MERINO a John HANCOCK. Operon-mapper: a web server for precise operon identification in bacterial and archaeal genomes. *Bioinformatics* [online]. 2018, 34(23), 4118-4120 [cit. 2021-7-16]. ISSN 1367-4803. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/bty496
- [46] HILLIS, David M. Phylogenetic analysis. *Current Biology* [online]. 1997, 7(3), R129-R131 [cit. 2021-04-05]. ISSN 09609822. Dostupné z: doi:10.1016/S0960-9822(97)70070-8
- [47] FLEGR, Jaroslav. *Evoluční biologie. 2., opr. a rozš. vyd.* Praha: Academia, 2009. ISBN 978-80-200-1767-3.
- [48] ZHEN-LI, Zhang, Zhang XIN-QI, Wu NAN, Zhang WEN-WU, Zhu XU-FEN, Cao YI a Wu MIN. *Amphiplicatus metriothermophilus* gen. nov., sp. nov., a thermotolerant alphaproteobacterium isolated from a hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2014, 64(Pt_8), 2805-2811 [cit. 2021-04-09]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.062471-0
- [49] GOTO, Keiichi, Rieko FUJITA, Yuko KATO, Mika ASAHARA a Akira YOKOTA. Reclassification of *Brevibacillus brevis* strains NCIMB 13288 and DSM 6472 (=NRRL NRS-887) as *Aneurinibacillus danicus* sp. nov. and *Brevibacillus limnophilus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2004, 54(2), 419-427 [cit. 2021-04-09]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.02906-0

- [50] ALLAN, R. N., L. LEBBE, J. HEYRMAN, P. DE VOS, C. J. BUCHANAN a N. A. LOGAN. *Brevibacillus levickii* sp. nov. and *Aneurinibacillus terranovensis* sp. nov., two novel thermoacidophiles isolated from geothermal soils of northern Victoria Land, Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2005, 55(3), 1039-1050 [cit. 2021-04-09]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.63397-0
- [51] HEYNDRIKX, M., L. LEBBE, M. VANCANNEYT, et al. A Polyphasic Reassessment of the Genus *Aneurinibacillus*, Reclassification of *Bacillus thermoaerophilus* (Meier-Stauffler et al. 1996) as *Aneurinibacillus thermoaerophilus* comb. nov., and Emended Descriptions of *A. aneurinilyticus* corrig., *A. migulanus*, and *A. thermoaerophilus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 1997, 47(3), 808-817 [cit. 2021-04-09]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/00207713-47-3-808
- [52] CIHAN, Arzu Coleri, Cumhur COKMUS, Melih KOC a Birgul OZCAN. *Anoxybacillus calidus* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from soil near a thermal power plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2014, 64(Pt_1), 211-219 [cit. 2021-04-09]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.056549-0
- [53] ZHANG, Xin-Qi, Zhen-Li ZHANG, Nan WU, Xu-Fen ZHU a Min WU. *Anoxybacillus vitaminiphilus* sp. nov., a strictly aerobic and moderately thermophilic bacterium isolated from a hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2013, 63(Pt_11), 4064-4071 [cit. 2021-6-28]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.050096-0KHAN
- [54] Inam Ullah, Neeli HABIB, Mipeshwaree Devi ASEM, Nimaichand SALAM, Min XIAO, En-Min ZHOU, Xiao-Yang ZHI a Wen-Jun LI. *Aquabacterium tepidiphilum* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium isolated from a hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2019, 69(2), 337-342 [cit. 2021-04-09]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijsem.0.003103
- [55] COMBET-BLANC, Y., B. OLLIVIER, C. STREICHER, B. K. C. PATEL, P. P. DWIVEDI, B. POT, G. PRENSIER a J.-L. GARCIA. *Bacillus thermoamylovorans* sp. nov., a Moderately Thermophilic and Amyolytic Bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* [online]. 1995, 45(1), 9-16 [cit. 2021-04-09]. ISSN 0020-7713. Dostupné z: doi:10.1099/00207713-45-1-9
- [56] TAKEDA, Minoru, Yoichi KAMAGATA, William C GHIORSE, Satoshi HANADA a Jun-ichi KOIZUMI. *Caldimonas manganoxidans* gen. nov., sp. nov., a poly(3-hydroxybutyrate)-degrading, manganese-oxidizing thermophile. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2002, 52(3), 895-900 [cit. 2021-04-09]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/00207713-52-3-895
- [57] CHEN, Wen-Ming, Jo-Shu CHANG, Ching-Hsiang CHIU, Shu-Chen CHANG, Wen-Chieh CHEN a Chii-Ming JIANG. *Caldimonas taiwanensis* sp. nov., a amylase producing bacterium isolated from a hot spring. *Systematic and Applied Microbiology* [online]. 2005, 28(5), 415-420 [cit. 2021-04-09]. ISSN 07232020. Dostupné z: doi:10.1016/j.syapm.2005.02.008

- [58] HIRSCH, P. a B. HOFFMANN. *Dichotomicrobium thermohalophilum*, gen. nov., spec. nov., Budding Prosthecate Bacteria from the Solar Lake (Sinai) and Some Related Strains. *Systematic and Applied Microbiology* [online]. 1989, 11(3), 291-301 [cit. 2021-04-09]. ISSN 07232020. Dostupné z: doi:10.1016/S0723-2020(89)80027-X
- [59] ALBUQUERQUE, L., F. A. RAINEY, M. F. NOBRE a M. S. DA COSTA. *Elioraea tepidiphila* gen. nov., sp. nov., a slightly thermophilic member of the Alphaproteobacteria. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* [online]. 2008, 58(4), 773-778 [cit. 2021-04-09]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijms.0.65294-0
- [60] HABIB, Neeli, Inam Ullah KHAN, Min XIAO, Mohammad Saeid HEJAZI, Vahideh TARHRIZ, Xiao-Yang ZHI a Wen-Jun LI. *Elioraea thermophila* sp. nov., a thermophilic bacterium from hot spring of the class Alphaproteobacteria, emended description of the genus *Elioraea* and proposal of *Elioraeaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2020, 70(2), 1300-1306 [cit. 2021-04-09]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijsem.0.003915
- [61] NAZINA, T N, T P TOUROVA, A B POLTARAUS, et al. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. th.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2001, 51(2), 433-446 [cit. 2021-04-10]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/00207713-51-2-433
- [62] HAYASHI, Nobuhiro R., Tatsuya ISHIDA, Akira YOKOTA, Tohru KODAMA a Yasuo IGARASHI. *Hydrogenophilus thermoluteolus* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, facultatively chemolithoautotrophic, hydrogen-oxidizing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 1999, 49(2), 783-786 [cit. 2021-04-10]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/00207713-49-2-783
- [63] IBRAHIM, Mohammad H. A., Liesbeth LEBBE, Anne WILLEMS a Alexander STEINBÜCHEL. *Chelatococcus thermostellatus* sp. nov., a new thermophile for bioplastic synthesis: comparative phylogenetic and physiological study. *AMB Express* [online]. 2016, 6(1) [cit. 2021-04-10]. ISSN 2191-0855. Dostupné z: doi:10.1186/s13568-016-0209-9
- [64] SLOBODKINA, Galina B., Roman V. BASLEROV, Andrei A. NOVIKOV, Mikhail B. VIRYASOV, Elizaveta A. BONCH-OSMOLOVSKAYA a Alexander I. SLOBODKIN. *Inmirania thermothiophila* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, facultatively autotrophic, sulfur-oxidizing gammaproteobacterium isolated from a shallow-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2016, 66(2), 701-706 [cit. 2021-04-10]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijsem.0.000773
- [65] HENSSEN, A. Beiträge zur Morphologie und Systematik der thermophilen Actinomyceten. *Archiv für Mikrobiologie* [online]. 1957, 26(4), 373-414 [cit. 2021-04-10]. ISSN 0302-8933. Dostupné z: doi:10.1007/BF00407588

- [66] DENNER, Ewald B. M., Marko KOLARI, Douwe HOORNSTRA, Irina TSITKO, Peter KÄMPFER, Hans-Jürgen BUSSE a Mirja SALKINOJA-SALONEN. *Rubellimicrobium thermophilum* gen. nov., sp. nov., a red-pigmented, moderately thermophilic bacterium isolated from coloured slime deposits in paper machines. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2006, 56(6), 1355-1362 [cit. 2021-04-10]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.63751-0
- [67] NORMAN, Jeffrey S., Gary M. KING a Maren L. FRIESEN. *Rubrobacter spartanus* sp. nov., a moderately thermophilic oligotrophic bacterium isolated from volcanic soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2017, 67(9), 3597-3602 [cit. 2021-04-10]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.002175
- [68] ALBUQUERQUE, Luciana, Megan M. JOHNSON, Peter SCHUMANN, Fred A. RAINEY a Milton S. DA COSTA. Description of two new thermophilic species of the genus *Rubrobacter*, *Rubrobacter calidifluminis* sp. nov. and *Rubrobacter naiadicus* sp. nov., and emended description of the genus *Rubrobacter* and the species *Rubrobacter bracarensis*. *Systematic and Applied Microbiology* [online]. 2014, 37(4), 235-243 [cit. 2021-04-10]. ISSN 07232020. Dostupné z: doi:10.1016/j.syapm.2014.03.001
- [69] CARRETO, L., E. MOORE, M. F. NOBRE, R. WAIT, P. W. RILEY, R. J. SHARP a M. S. DA COSTA. *Rubrobacter xylanophilus* sp. nov., a New Thermophilic Species Isolated from a Thermally Polluted Effluent. *International Journal of Systematic Bacteriology* [online]. 1996, 46(2), 460-465 [cit. 2021-04-10]. ISSN 0020-7713. Dostupné z: doi:10.1099/00207713-46-2-460
- [70] CHOU, Yi-Ju, Shih-Yi SHEU, Der-Shyan SHEU, Jih-Terng WANG a Wen-Ming CHEN. *Schlegelella aquatica* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from a hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2006, 56(12), 2793-2797 [cit. 2021-04-10]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.64446-0
- [71] ELBANNA, Khaled, Tina LÜTKE-EVERSLOH, Stefanie VAN TRAPPEN, Joris MERGAERT, Jean SWINGS a Alexander STEINBÜCHEL. *Schlegelella thermodepolymerans* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic bacterium that degrades poly(3-hydroxybutyrate-co-3-mercaptopropionate). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2003, 53(4), 1165-1168 [cit. 2021-04-10]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.02562-0
- [72] YOU, Jing, Yongbin LI, Shan HONG, Jing WANG, Jiliang YU, Bozhong MU, Xiaochen MA a Yanfen XUE. *Tepidicella baoligensis* sp. nov., A Novel Member of Betaproteobacterium Isolated from an Oil Reservoir. *Current Microbiology* [online]. 2019, 76(4), 410-414 [cit. 2021-04-10]. ISSN 0343-8651. Dostupné z: doi:10.1007/s00284-018-1604-z
- [73] FRANÇA, Luis, Fred A. RAINEY, M. Fernanda NOBRE a Milton S. DA COSTA. *Tepidicella xavieri* gen. nov., sp. nov., a betaproteobacterium isolated from a hot spring runoff. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2006, 56(4), 907-912 [cit. 2021-04-10]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.64193-0

- [74] HABIB, Neeli, Inam Ullah KHAN, Nimaichand SALAM, Min XIAO, Iftikhar AHMED, Xiao-Yang ZHI a Wen-Jun LI. *Tepidimonas sediminis* sp. nov. and *Tepidimonas alkaliphilus* sp. nov., two novel moderately thermophilic species isolated from a hot spring. *Antonie van Leeuwenhoek* [online]. 2018, 111(7), 1023-1031 [cit. 2021-04-10]. ISSN 0003-6072. Dostupné z: doi:10.1007/s10482-017-1002-8
- [75] FREITAS, Mariana, Fred A. RAINEY, M. Fernanda NOBRE, Armando J.D. SILVESTRE a Milton S. DA COSTA. *Tepidimonas aquatica* sp. nov., A New Slightly Thermophilic β -Proteobacterium Isolated from a Hot Water Tank. *Systematic and Applied Microbiology* [online]. 2003, 26(3), 376-381 [cit. 2021-04-11]. ISSN 07232020. Dostupné z: doi:10.1078/072320203322497400
- [76] CHEN, Wen-Ming, Hsing-Wei HUANG, Jo-Shu CHANG, Yin-Lung HAN, Tai-Rong GUO a Shih-Yi SHEU. *Tepidimonas fonticaldi* sp. nov., a slightly thermophilic betaproteobacterium isolated from a hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2013, 63(Pt_5), 1810-1816 [cit. 2021-04-11]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijms.0.043729-0
- [77] ALBUQUERQUE, Luciana, Nadine CASTELHANO, Pedro RAPOSO, et al. Comparative genome sequence analysis of several species in the genus *Tepidimonas* and the description of a novel species *Tepidimonas charontis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2020, 70(3), 1596-1604 [cit. 2021-04-11]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijsem.0.003942
- [78] MOREIRA, C, F A RAINEY, M F NOBRE, M T DA SILVA a M S DA COSTA. *Tepidimonas ignava* gen. nov., sp. nov., a new chemolithoheterotrophic and slightly thermophilic member of the beta-Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2000, 50(2), 735-742 [cit. 2021-04-11]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/00207713-50-2-735
- [79] HABIB, Neeli, Inam Ullah KHAN, Nimaichand SALAM, Min XIAO, Iftikhar AHMED, Xiao-Yang ZHI a Wen-Jun LI. *Tepidimonas sediminis* sp. nov. and *Tepidimonas alkaliphilus* sp. nov., two novel moderately thermophilic species isolated from a hot spring. *Antonie van Leeuwenhoek* [online]. 2018, 111(7), 1023-1031 [cit. 2021-04-11]. ISSN 0003-6072. Dostupné z: doi:10.1007/s10482-017-1002-8
- [80] CHEN, Tien-Lai, Yi-Ju CHOU, Wen-Ming CHEN, Bhagwath ARUN a Chiu-Chung YOUNG. *Tepidimonas taiwanensis* sp. nov., a novel alkaline-protease-producing bacterium isolated from a hot spring. *Extremophiles* [online]. 2006, 10(1), 35-40 [cit. 2021-04-11]. ISSN 1431-0651. Dostupné z: doi:10.1007/s00792-005-0469-9
- [81] ALBUQUERQUE, Luciana, Igor TIAGO, António VERÍSSIMO a Milton S. DA COSTA. *Tepidimonas thermarum* sp. nov., a new slightly thermophilic betaproteobacterium isolated from the Elisenquelle in Aachen and emended description of the genus *Tepidimonas*. *Systematic and Applied Microbiology* [online]. 2006, 29(6), 450-456 [cit. 2021-04-11]. ISSN 07232020. Dostupné z: doi:10.1016/j.syapm.2005.12.004
- [82] MANAIA, Célia M., Balbina NOGALES a Olga C. NUNES. *Tepidiphilus margaritifer* gen. nov., sp. nov., isolated from a thermophilic aerobic digester. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2003, 53(5), 1405-1410 [cit. 2021-04-11]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijms.0.02538-0

- [83] PODDAR, Abhijit, Rinchen T. LEPCHA a Subrata K. DAS. Taxonomic study of the genus *Tepidiphilus*: transfer of *Petrobacter succinatimandens* to the genus *Tepidiphilus* as *Tepidiphilus succinatimandens* comb. nov., emended description of the genus *Tepidiphilus* and description of *Tepidiphilus thermophilus* sp. nov., isolated from a terrestrial hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2014, 64(Pt_1), 228-235 [cit. 2021-04-11]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijms.0.056424-0
- [84] PODDAR, Abhijit, Rinchen T. LEPCHA a Subrata K. DAS. Taxonomic study of the genus *Tepidiphilus*: transfer of *Petrobacter succinatimandens* to the genus *Tepidiphilus* as *Tepidiphilus succinatimandens* comb. nov., emended description of the genus *Tepidiphilus* and description of *Tepidiphilus thermophilus* sp. nov., isolated from a terrestrial hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2014, 64(Pt_1), 228-235 [cit. 2021-04-11]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijms.0.056424-0
- [85] YANG, Lan, Jiang-Baota MUHADESI, Meng-Meng WANG, Bao-Jun WANG, Shuang-Jiang LIU a Cheng-Ying JIANG. *Thauera hydrothermalis* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2018, 68(10), 3163-3168 [cit. 2021-04-11]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijsem.0.002960
- [86] ALVES, Marta P., Fred A. RAINEY, M. Fernanda NOBRE a Milton S. DA COSTA. *Thermomonas hydrothermalis* sp. nov., A New Slightly Thermophilic γ -Proteobacterium Isolated from a Hot Spring in Central Portugal. *Systematic and Applied Microbiology* [online]. 2003, 26(1), 70-75 [cit. 2021-04-11]. ISSN 07232020. Dostupné z: doi:10.1078/072320203322337335
- [87] SVETLITSHNYI, V., F. RAINEY a J. WIEGEL. *Thermosyntropha lipolytica* gen. nov., sp. nov., a Lipolytic, Anaerobic, Alkalitolerant, Thermophilic Bacterium Utilizing Short- and Long-Chain Fatty Acids in Syntrophic Coculture with a Methanogenic Archaeum. *International Journal of Systematic Bacteriology* [online]. 1996, 46(4), 1131-1137 [cit. 2021-04-11]. ISSN 0020-7713. Dostupné z: doi:10.1099/00207713-46-4-1131
- [88] OSHIMA, T. a K. IMAHORI. Description of *Thermus thermophilus* (Yoshida and Oshima) comb. nov., a Nonsporulating Thermophilic Bacterium from a Japanese Thermal Spa. *International Journal of Systematic Bacteriology* [online]. 1974, 24(1), 102-112 [cit. 2021-04-13]. ISSN 0020-7713. Dostupné z: doi:10.1099/00207713-24-1-102
- [89] CHUNG, A P, F A RAINEY, M VALENTE, M F NOBRE a M S DA COSTA. *Thermus igniterrae* sp. nov. and *Thermus antranikianii* sp. nov., two new species from Iceland. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2000, 50(1), 209-217 [cit. 2021-04-13]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/00207713-50-1-209
- [90] FORTINA, M G, R PUKALL, P SCHUMANN, D MORA, C PARINI, P L MANACHINI a E STACKEBRANDT. *Ureibacillus* gen. nov., a new genus to accommodate *Bacillus thermosphaericus* (Andersson et al. 1995), emendation of *Ureibacillus thermosphaericus* and description of *Ureibacillus terrenus* sp. nov.

- International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology [online]. 2001, 51(2), 447-455 [cit. 2021-04-13]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/00207713-51-2-447
- [91] KIM, Byung-Yong, Seon-Young LEE, Hang-Yeon WEON, Soon-Wo KWON, Seung-Joo GO, Yong-Keun PARK, Peter SCHUMANN a Dagmar FRITZE. *Ureibacillus suwonensis* sp. nov., isolated from cotton waste composts. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology [online]. 2006, 56(3), 663-666 [cit. 2021-04-13]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijms.0.63703-0
- [92] WEON, Hang-Yeon, Seon-Young LEE, Byung-Yong KIM, Hyung-Jun NOH, Peter SCHUMANN, Jong-Shik KIM a Soon-Wo KWON. *Ureibacillus composti* sp. nov. and *Ureibacillus thermophilus* sp. nov., isolated from livestock-manure composts. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology [online]. 2007, 57(12), 2908-2911 [cit. 2021-04-13]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijms.0.65232-0
- [93] DONG, Lei, Hong MING, Lan LIU, et al. *Zhizhongheella caldifontis* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Comamonadaceae. Antonie van Leeuwenhoek [online]. 2014, 105(4), 755-761 [cit. 2021-04-13]. ISSN 0003-6072. Dostupné z: doi:10.1007/s10482-014-0131-6
- [94] XIAO, Zijun, Yu ZHANG, Lijun XI, Fangfang HUO, Jing-yi ZHAO a Jing LI. Thermophilic production of polyhydroxyalkanoates by a novel *Aneurinibacillus* strain isolated from Gudao oilfield, China. Journal of Basic Microbiology [online]. 2015, 55(9), 1125-1133 [cit. 2021-04-09]. ISSN 0233111X. Dostupné z: doi:10.1002/jobm.201400843
- [95] PERNICOVA, Iva, Ivana NOVACKOVA, Petr SEDLACEK, et al. Introducing the Newly Isolated Bacterium *Aneurinibacillus* sp. H1 as an Auspicious Thermophilic Producer of Various Polyhydroxyalkanoates (PHA) Copolymers–1. Isolation and Characterization of the Bacterium. Polymers [online]. 2020, 12(6), 1-13 [cit. 2021-5-11]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym12061235
- [96] SEDLACEK, Petr, Iva PERNICOVA, Ivana NOVACKOVA, et al. Introducing the Newly Isolated Bacterium *Aneurinibacillus* sp. H1 as an Auspicious Thermophilic Producer of Various Polyhydroxyalkanoates (PHA) Copolymers–2. Material Study on the Produced Copolymers. Polymers [online]. 2020, 12(6), 1-18 [cit. 2021-5-11]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym12061298
- [97] PERNICOVA, Iva, Ivana NOVACKOVA, Petr SEDLACEK, Xenie KOURILOVA, Martin KOLLER a Stanislav OBRUCA. Application of osmotic challenge for enrichment of microbial consortia in polyhydroxyalkanoates producing thermophilic and thermotolerant bacteria and their subsequent isolation. International Journal of Biological Macromolecules [online]. 2020, 144(1), 698-704 [cit. 2021-5-11]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.12.128
- [98] CHOONUT, Aophat, Poonsuk PRASERTSAN, Sappasith KLOMKLAO a Kanokphorn SANGKHARAK. *Bacillus thermoamylovorans*-Related Strain Isolated from High Temperature Sites as Potential Producers of Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate (mcl-PHA). Current Microbiology [online]. 2020, 77(10), 3044-

- 3056 [cit. 2021-04-09]. ISSN 0343-8651. Dostupné z: doi:10.1007/s00284-020-02118-9
- [99] CHOONUT, Aophat, Poonsuk PRASERTSAN, Sappasith KLOMKLAO a Kanokphorn SANGKHARAK. Study on mcl-PHA Production by Novel Thermotolerant Gram-Positive Isolate. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2020, 28(9), 2410-2421 [cit. 2021-04-09]. ISSN 1566-2543. Dostupné z: doi:10.1007/s10924-020-01779-8
- [100] SANGKHARAK, Kanokphorn, Pimchanok KHAITHONGKAEAO, Teeraphorn CHUAIKHUNUPAKARN, Aopas CHOONUT a Poonsuk PRASERTSAN. The production of polyhydroxyalkanoate from waste cooking oil and its application in biofuel production. *Biomass Conversion and Biorefinery* [online]. [cit. 2021-04-09]. ISSN 2190-6815. Dostupné z: doi:10.1007/s13399-020-00657-6
- [101] HSIAO, Li-Jung, Ji-Hong LIN, Pantitra SANKATUMVONG, Tzong-Ming WU a Si-Yu LI. The Feasibility of Thermophilic *Caldimonas manganoxidans* as a Platform for Efficient PHB Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology* [online]. 2016, 180(5), 852-871 [cit. 2021-04-09]. ISSN 0273-2289. Dostupné z: doi:10.1007/s12010-016-2138-0
- [102] SHEU, Der-Shyan, Wen-Ming CHEN, Jr-Yung YANG a Rey-Chang CHANG. Thermophilic bacterium *Caldimonas taiwanensis* produces poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from starch and valerate as carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2009, 44(5), 289-294 [cit. 2021-5-6]. ISSN 01410229. Dostupné z: doi:10.1016/j.enzmictec.2009.01.004
- [103] GEDIKLI, Serap, Pınar Aytar ÇELİK, Murat DEMIRBILEK, Mehmet Burçin MUTLU, Emir Baki DENKBAŞ a Ahmet ÇABUK. Experimental Exploration of Thermostable Poly (β -Hydroxybutyrates) by *Geobacillus kaustophilus* Using Box-Behnken Design. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2019, 27(2), 245-255 [cit. 2021-04-10]. ISSN 1566-2543. Dostupné z: doi:10.1007/s10924-018-1335-z
- [104] GIEDRAITYTĖ, Gražina a Lilija KALĖDIENĖ. Purification and characterization of polyhydroxybutyrate produced from thermophilic *Geobacillus* sp. AY 946034 strain. *Chemija. Vilnius : Lietuvos mokslų akademija* [online]. Vilnius : Lietuvos mokslų akademija, 2015, 26(1), 38-45 [cit. 2021-04-10]. ISSN 0235-7216. Dostupné z: <https://epublications.vu.lt/object/elaba:8206134/>
- [105] NGUYEN, Tri Huu, Fumiko ISHIZUNA, Yuya SATO, Hiroyuki ARAI a Masaharu ISHII. Physiological characterization of poly- β -hydroxybutyrate accumulation in the moderately thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. 2019, 127(6), 686-689 [cit. 2021-04-10]. ISSN 13891723. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiosc.2018.11.011
- [106] KOUŘILOVÁ, Xenie, Jana SCHWARZEROVÁ, Iva PERNICOVÁ, Karel SEDLÁŘ, Kateřina MRÁZOVÁ, Vladislav KRZYŽÁNEK, Jana NEBESÁŘOVÁ a Stanislav OBRUČA. The First Insight into Polyhydroxyalkanoates Accumulation in Multi-Extremophilic *Rubrobacter xylanophilus* and *Rubrobacter spartanus*. *Microorganisms* [online]. 2021, 9(5) [cit. 2021-6-6]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms9050909

- [107] KOURILOVA, Xenie, Iva PERNICOVA, Karel SEDLAR, Jana MUSILOVA, Petr SEDLACEK, Michal KALINA, Martin KOLLER a Stanislav OBRUCA. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a thermophilic strain of *Schlegelella thermodepolymerans* from xylose rich substrates. *Bioresource Technology* [online]. 2020, 315 [cit. 2021-04-10]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2020.123885
- [108] MUSILOVA, Jana, Xenie KOURILOVA, Matej BEZDICEK, Martina LENGEROVA, Stanislav OBRUCA, Helena SKUTKOVA, Karel SEDLAR a Howard OCHMAN. First Complete Genome of the Thermophilic Polyhydroxyalkanoates-Producing Bacterium *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344. *Genome Biology and Evolution* [online]. 2021, 13(4) [cit. 2021-04-10]. ISSN 1759-6653. Dostupné z: doi:10.1093/gbe/evab007
- [109] ELBANNA, Khaled, Tina LÜTKE-EVERSLOH, Dieter JENDROSSEK, Heinrich LUFTMANN a Alexander STEINBÜCHEL. Studies on the biodegradability of polythioester copolymers and homopolymers by polyhydroxyalkanoate (PHA)-degrading bacteria and PHA depolymerases. *Archives of Microbiology* [online]. 2004, 182(2-3) [cit. 2021-04-10]. ISSN 0302-8933. Dostupné z: doi:10.1007/s00203-004-0715-z
- [110] KOURILOVA, Xenie, Ivana NOVACKOVA, Martin KOLLER a Stanislav OBRUCA. Evaluation of mesophilic *Burkholderia sacchari*, thermophilic *Schlegelella thermodepolymerans* and halophilic *Halomonas halophila* for polyhydroxyalkanoates production on model media mimicking lignocellulose hydrolysates. *Bioresource Technology* [online]. 2021, 325 [cit. 2021-04-10]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2021.124704
- [111] PANTAZAKI, Anastasia A., Maria G. TAMBAKA, Valerie LANGLOIS, Philippe GUERIN a Dimitrios A. KYRIAKIDIS. Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis in *Thermus thermophilus*: Purification and biochemical properties of PHA synthase. *Molecular and Cellular Biochemistry* [online]. 2003, 254(1/2), 173-183 [cit. 2021-04-13]. ISSN 03008177. Dostupné z: doi:10.1023/A:1027373100955
- [112] 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. 2021-04-13]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2017.12.006
- [113] CHOONUT, Aophat, Poonsuk PRASERTSAN, Sappasith KLOMKLAO a Kanokphorn SANGKHARAK. *Bacillus thermoamylovorans*-Related Strain Isolated from High Temperature Sites as Potential Producers of Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate (mcl-PHA). *Current Microbiology* [online]. 2020, 77(10), 3044-3056 [cit. 2021-04-13]. ISSN 0343-8651. Dostupné z: doi:10.1007/s00284-020-02118-9

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

3HV	3-hydroxyvalerát
3HHx	3-hydroxyhexanoát
3HHp	3-hydroxyheptanoát
μm	mikrometre
DDBJ	DNA dátová banka Japonska (DNA Data Bank of Japan)
EMBL	Európska knižnica laboratórných dát molekulárnej biológie (European Molecular Biology Laboratory data library)
IUPAC	Medzinárodná únia pre čistú a aplikovanú chémiu (Union of Pure and Applied Chemistry)
kDa	kilodaltóny
lcl-PHA	polyhydroxyalkanoáty s dlhým reťazcom
mcl-PHA	polyhydroxyalkanoáty so stredne dlhým reťazcom
NCBI	Národné centrum pre biotechnologické informácie (National Center for Biotechnology Information)
NIH	Národný inštitút zdravia (National Institutes of Health)
NJ	Neighbor-joining
NLM	Národná lekárska knižnica USA (National Library of Medicine)
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean
OTU	Operačná taxonomická jednotka (Operational Taxonomic Unit)
P(3HB- <i>co</i> -3HHx)	poly(3-hydroxyvalerát- <i>co</i> -3-hydroxyhexanoát)
P(3HB- <i>co</i> -3HV)	poly(3-hydroxybutyrát- <i>co</i> -3-hydroxyvalerátu)
P(3HB- <i>co</i> -4HB)	poly(3-hydroxybutyrát- <i>co</i> -4-hydroxybutyrátu)
P(3HO- <i>co</i> -4HH)	poly(3hydroxyoktanoátu- <i>co</i> -4hydroxyhexanoátu)
PHA	polyhydroxyalkanoát
PhaC	polymerizačný enzým biosyntézy polyhydroxyalkanoátov
PHB	poly(3-hydroxybutyrát)
PMC	databáza PubMed Central
PMID	Identifikačné číslo databázy PubMed (PubMed ID)
PP	polypropylénu
scl-PHA	polyhydroxyalkanoáty s krátkym reťazcom

8 PRÍLOHY

8.1 Utilizované substráty

Tabuľka 11 Prehľad možných utilizovaných substrátov u bakteriálnych termofilných kmeňoch *Amphiplicatus metriothersophilus* (DSM 105738), *Aneurinibacillus danicus* (DSM 21566), *Aneurinibacillus terranovensis* (DSM 18919), *Aneurinibacillus thermoaerophilus* (DSM 10154), *Anoxybacillus calidus* (DSM 25220), *Anoxybacillus rupiensis* (DSM 17127), *Anoxybacillus vitaminiphilus* (JCM 16594), *Aquabacterium tepidiphilum* (YIM 730274), *Bacillus thermoamylovorans* (DSM 28918), *Caldimonas manganoxidans* (JCM 10698), *Caldimonas taiwanensi* (LMG 22827), *Dichotomicrobium thermohalophilum* (DSM 5002), *Elioraea tepidiphila* (DSM 17972), *Elioraea thermophila* (YIM 72297), *Geobacillus kaustophilus* (DSM 7263) a *Geobacillus stearothermophilus* (CCM 2062).

	Glukóza	Fruktóza	Galaktóza	Ribóza	Xylóza	Manóza	Arabinóza	Ramnóza	Sorbóza	Sacharóza
<i>Amphiplicatus metriothersophilus</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Aneurinibacillus danicus</i>	–	+	–	+	+	+	+	–	+	–
<i>Aneurinibacillus terranovensis</i>	+	+	–	–	–	+	–	–	–	–
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	–	+	–	+	–	–	–	–	+	–
<i>Anoxybacillus calidus</i>	+	+	–	+	–	–	–	–	–	+
<i>Anoxybacillus vitaminiphilus</i>	+	+	–	+	–	–	–	–	–	+
<i>Aquabacterium tepidiphilum</i>	+	–	–	–	–	+	+	–	–	–
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	+	+	–	+	–	+	+	+	–	–
<i>Caldimonas manganoxidans</i>	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+
<i>Caldimonas taiwanensi</i>	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Dichotomicrobium thermohalophilum</i>	+	+	+	+	–	+	–	–	–	–
<i>Elioraea tepidiphila</i>	–	+	–	+	–	–	–	–	+	–
<i>Elioraea thermophila</i>	+	+	–	+	–	–	–	–	–	+
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	+	+	–	–	–	+	–	–	–	+
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	+	+	–	–	–	+	–	–	–	+

	Celobióza	Laktóza	Maltóza	Melibióza	Trehalóza	Rafinóza	N-acetyl-glukosamin	Glykogén	Etanol	Glycerol
<i>Amphiplicatus metriothermophilus</i>	–	–	–	–	–	–	+	+	–	+
<i>Aneurinibacillus danicus</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
<i>Aneurinibacillus terranovensis</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	–	–	–	–	–	–	+	–	–	+
<i>Anoxybacillus calidus</i>	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–
<i>Anoxybacillus vitaminiphilus</i>	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–
<i>Aquabacterium tepidiphilum</i>	–	–	+	–	–	–	+	–	–	–
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–
<i>Caldimonas manganoxidans</i>	–	+	+	–	–	–	–	–	–	+
<i>Caldimonas taiwanensi</i>	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–
<i>Dichotomicrobium thermohalophilum</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Elioraea tepidiphila</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Elioraea thermophila</i>	–	–	+	–	–	–	+	+	+	+
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–

	Arabitol	Xylitol	Manitol	Sorbitol	Acetát	Glycerát	Laktát	Pyruvát	Fumarát	Malát	Sukcinát	Oxaloacetát
<i>Amphiplicatus metriothermophilus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aneurinibacillus danicus</i>	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aneurinibacillus terranovenssis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
<i>Anoxybacillus calidus</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Anoxybacillus vitaminiphilus</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aquabacterium tepidiphilum</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Caldimonas manganoxidans</i>	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-
<i>Caldimonas taiwanensi</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Dichotomicrobium thermohalophilum</i>	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-
<i>Elioraea tepidiphila</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
<i>Elioraea thermophila</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	α -Ketoglutarát	Alanín	Serin	Asparagín	Aspartát	Treonín	Glutamát	Glutamín
<i>Amphiplicatus metriothermophilus</i>	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Aneurinibacillus danicus</i>	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Aneurinibacillus terranovenssis</i>	–	–	–	–	–	–	+	–
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	–	+	–	–	+	–	–	–
<i>Anoxybacillus calidus</i>	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Anoxybacillus vitaminiphilus</i>	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Aquabacterium tepidiphilum</i>	–	–	+	–	–	–	–	–
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Caldimonas manganoxidans</i>	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Caldimonas taiwanensi</i>	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Dichotomicrobium thermohalophilum</i>	–	–	–	–	+	–	+	–
<i>Elioraea tepidiphila</i>	+	–	–	–	–	–	+	+
<i>Elioraea thermophila</i>	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	–	–	–	–	–	–	–	–

	Leucín	Prolín	Arginín	Histidín	Isoleucín	Lysín	Fenylalanín	Tryptofan	Ornitín
<i>Amphiplicatus metriothermophilus</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	+
<i>Aneurinibacillus danicus</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Aneurinibacillus terranovensis</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Anoxybacillus calidus</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Anoxybacillus vitaminiphilus</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Aquabacterium tepidiphilum</i>	–	+	+	–	–	–	–	–	–
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Caldimonas manganoxidans</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Caldimonas taiwanensi</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Dichotomicrobium thermohalophilum</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Elioraea tepidiphila</i>	–	+	–	–	–	–	–	–	–
<i>Elioraea thermophila</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Tabuľka 12 Prehľad možných utilizovaných susbrátov pre bakteriálne termofilné kmene *Hydrogenophilus thermoluteolus* (DSM 6765), *Chelatococcus thermostalatus* (DSM 28244), *Inmirania thermoithiophila* (DSM 100275), *Rubellimicrobium thermophilum* (DSM 43832), *Rubrobacter spartanus* (DSM 102139), *Rubrobacter xylanophilus* (DSM 9941), *Schlegelella aquatica* (LMG 23380), *Schlegelella thermodepolymerans* (DSM 15344), *Tepidicella baoligensis* (KCTC-62779), *Tepidimonas alkaliphilus* (YIM 72238), *Tepidimonas aquatica* (DSM 14833), *Tepidimonas fonticaldi* (LMG 26746), *Tepidimonas charontis* (LMG 30884), *Tepidimonas ignava* (DSM 12034), *Tepidimonas sediminis* (YIM 72259) a *Tepidimonas taiwanensis* (LMG 22826).

	Glukóza	Fruktóza	Galaktóza	Ribóza	Xylóza	Manóza	Arabinóza	Ramnóza	Sorbóza	Sacharóza
<i>Hydrogenophilus thermoluteolus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chelatococcus thermostalatus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Inmirania thermoithiophila</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rubellimicrobium thermophilum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>Rubrobacter spartanus</i>	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+
<i>Rubrobacter xylanophilus</i>	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>Schlegelella aquatica</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Schlegelella thermodepolymerans</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Tepidicella baoligensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tepidimonas alkaliphilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tepidimonas aquatica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tepidimonas fonticaldi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tepidimonas charontis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tepidimonas ignava</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tepidimonas sediminis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tepidimonas taiwanensis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	Celobióza	Laktóza	Maltóza	Melibióza	Trehalóza	Rafinóza	N-acetyl-glukosamin	Glykogén	Etanol	Glycerol
<i>Hydrogenophilus thermoluteolus</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Chelatococcus thermostalatus</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
<i>Inmirania thermothiophila</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Rubellimicrobium thermophilum</i>	+	–	+	+	+	–	–	–	–	–
<i>Rubrobacter spartanus</i>	+	+	+	–	–	–	–	–	–	+
<i>Rubrobacter xylanophilus</i>	–	–	–	–	–	+	–	–	–	+
<i>Schlegelella aquatica</i>	–	–	+	–	–	–	+	+	–	–
<i>Schlegelella thermodepolymerans</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Tepidicella baoligensis</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Tepidimonas alkaliphilus</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Tepidimonas aquatica</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Tepidimonas fonticaldi</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
<i>Tepidimonas charontis</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Tepidimonas ignava</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
<i>Tepidimonas sediminis</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Tepidimonas taiwanensis</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

	α -Ketoglutarát	Alanín	Serin	Asparagín	Aspartát	Treonín	Glutamát	Glutamín
<i>Hydrogenophilus thermoluteolus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chelatococcus thermostalatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Inmirania thermothiophila</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rubellimicrobium thermophilum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Rubrobacter spartanus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rubrobacter xylanophilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Schlegelella aquatica</i>	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>Schlegelella thermodepolymerans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tepidicella baoligensis</i>	-	+	-	+	-	-	+	+
<i>Tepidimonas alkaliphilus</i>	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Tepidimonas aquatica</i>	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Tepidimonas fonticaldi</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Tepidimonas charontis</i>	-	+	-	+	+	-	+	+
<i>Tepidimonas ignava</i>	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>Tepidimonas sediminis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tepidimonas taiwanensis</i>	+	-	-	-	-	+	-	-

	Leucín	Prolín	Arginín	Histidín	Isoleucín	Lysín	Fenylalanín	Tryptofan	Ornitín
<i>Hydrogenophilus thermoluteolus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chelatococcus thermostalatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Inmirania thermoithiophila</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rubellimicrobium thermophilum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Rubrobacter spartanus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rubrobacter xylanophilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Schlegelella aquatica</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Schlegelella thermodepolymerans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tepidicella baoligensis</i>	+	+	-	-	-	+	+	+	-
<i>Tepidimonas alkaliphilus</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>Tepidimonas aquatica</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tepidimonas fonticaldi</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>Tepidimonas charontis</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Tepidimonas ignava</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Tepidimonas sediminis</i>	-	-	+	+	-	+	-	-	-
<i>Tepidimonas taiwanensis</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	+

Tabuľka 13 Prehľad možných utilizovaných substrátov pre bakteriálne termofilné kmene *Tepidimonas thermarum* (LMG 23094), *Tepidiphilus margaritifer* (DSM 15129), *Tepidiphilus succinatimandens* (DSM 15512), *Tepidiphilus thermophilus* (DSM 27220), *Thauera hydrothermalis* (CGMCC 1.15527), *Thermomonas hydrothermalis* (DSM 14834), *Thermosyntropha lipolytica* (DSM 11003), *Thermus thermophilus* (DSM 579), *Ureibacillus terrenus* (DSM 12654), *Ureibacillus thermophilus* (DSM 17952) a *Zhizhongheella caldifontis* (DSM 27262).

	Glukóza	Fruktóza	Galaktóza	Ribóza	Xylóza	Manóza	Arabinóza	Ramnóza	Sorbóza	Sacharóza
<i>Tepidimonas thermarum</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Tepidiphilus margaritifer</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Tepidiphilus succinatimandens</i>	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Tepidiphilus thermophilus</i>	+	+	–	–	–	–	+	–	–	–
<i>Thauera hydrothermalis</i>	–	–	+	+	+	+	+	–	–	–
<i>Thermomonas hydrothermalis</i>	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Thermosyntropha lipolytica</i>	–	–	–	+	+	–	–	–	–	–
<i>Thermus thermophilus</i>	+	+	–	–	+	–	–	–	–	+
<i>Ureibacillus terrenus</i>	+	–	–	–	–		+	+	–	+
<i>Ureibacillus thermophilus</i>	+	–	–	–	+	–	+	–	–	–
<i>Zhizhongheella caldifontis</i>	+	+	+	–	+	–	+	–	+	–

	Celobióza	Laktóza	Maltóza	Melibióza	Trehalóza	Rafinóza	N-acetyl- glukosamin	Glykogén	Etanol	Glycerol
<i>Tepidimonas thermarum</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Tepidiphilus margaritifer</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–
<i>Tepidiphilus succinatimandens</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Tepidiphilus thermophilus</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Thauera hydrothermalis</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–
<i>Thermomonas hydrothermalis</i>	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–
<i>Thermosyntropha lipolytica</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Thermus thermophilus</i>	+	–	–	–	+	–	–	–	–	+
<i>Ureibacillus terrenus</i>	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–
<i>Ureibacillus thermophilus</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Zhizhongheella caldifontis</i>	–	+	+	–	–	–	–	–	–	+

	Arabitol	Xylitol	Manitol	Sorbitol	Acetát	Glycerát	Laktát	Pyruvát	Fumarát	Malát	Sukcinát	Oxaloacetát
<i>Tepidimonas thermarum</i>	–	–	–	–	+	–	+	+	–	–	+	–
<i>Tepidiphilus margaritifera</i>	–	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–	–
<i>Tepidiphilus succinatimandens</i>	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	–	–
<i>Tepidiphilus thermophilus</i>	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–
<i>Thauera hydrothermalis</i>	–	–	+	–	–	–	+	–	–	–	+	–
<i>Thermomonas hydrothermalis</i>	–	–	–	–	+	–	–	+	–	–	–	–
<i>Thermosyntropha lipolytica</i>	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–
<i>Thermus thermophilus</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Ureibacillus terrenus</i>	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Ureibacillus thermophilus</i>	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Zhizhongheella caldifontis</i>	–	–	–	–	+		–	+	–	+	–	–

	α -Ketoglutarát	Alanín	Serin	Asparagín	Aspartát	Treonín	Glutamát	Glutamín
<i>Tepidimonas thermarum</i>	–	+	–	–	–	–	+	+
<i>Tepidiphilus margaritifer</i>	–	–	–	+	–	–	–	–
<i>Tepidiphilus succinatimandens</i>	–	+	–	–	–	–	–	–
<i>Tepidiphilus thermophilus</i>	–	+	–	–	–	–	–	–
<i>Thauera hydrothermalis</i>	–	–	–	+	+	–	+	+
<i>Thermomonas hydrothermalis</i>	–	–	–	–	–	–	+	–
<i>Thermosyntropha lipolytica</i>	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Thermus thermophilus</i>	–	–	+	+	–	–	–	–
<i>Ureibacillus terrenus</i>	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Ureibacillus thermophilus</i>	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Zhizhongheella caldifontis</i>	–	–	–	–	–	–	–	–

	Leucín	Prolín	Arginín	Histidín	Isoleucín	Lysín	Fenylalanín	Tryptofan	Ornitín
<i>Tepidimonas thermarum</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+
<i>Tepidiphilus margaritifera</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tepidiphilus succinatimandens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tepidiphilus thermophilus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Thauera hydrothermalis</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>Thermomonas hydrothermalis</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>Thermosyntropha lipolytica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Thermus thermophilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ureibacillus terrenus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ureibacillus thermophilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Zhizhongheella caldifontis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-