



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

TERMOFILNÍ MIKROORGANISMY JAKO PRODUCENTI PHA

THERMOPHILIC PRODUCERS OF PHA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Tereza Hollá

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1383/2018
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Tereza Hollá**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název bakalářské práce:

Termofilní mikroorganismy jako producenti PHA

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Experimentální studium produkce PHA pomocí *Chelatococcus thermostellatus*

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019

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

Tereza Hollá
student(ka)

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Predložená bakalárska práca sa zaoberá produkciou polyhydroxyalkanoátov (PHA) pomocou extrémofilnej baktérie *Chelatococcus thermostellatus*. Polyhydroxyalkanoáty patria medzi prírodné polyméry, ktoré sú produkované mikroorganizmami. Mikroorganizmy ich využívajú ako zásobáreň uhlíka a energie pri stresových podmienkach. V experimentálnej časti boli zisťované najvhodnejšie podmienky pre rast biomasy a produkciu biopolymérov, taktiež schopnosť baktérie produkovať kopolymér P(3HB-co-3HV) za využitia prekursorov. Ako najvhodnejší substrát pre rast bakteriálnej kultúry a produkciu P(3HB) bola zistená glukóza. Po jej použití tvoril obsah P(3HB) 59,42 % obsahu biomasy. Pri zisťovaní schopnosti produkcie kopolyméru bolo zistené, že bakteriálny kmeň ho je schopný produkovať, avšak vo veľmi nízkych koncentráciách.

ABSTRACT

This bachelor's thesis deals with production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by bacterial strain *Chelatococcus thermostellatus*. Polyhydroxyalkanoates are natural biopolymers produced by microorganisms. Microorganisms use them to store energy and carbon under stress conditions. In experimental part of this work the most appropriate conditions for growth of biomass and polyhydroxyalkanoates accumulation were detected. The capability of copolymer P(3HB-co-3HV) production by bacterial strain was also studied. Glucose was determined as the most appropriate carbon source for biomass growth and P(3HB) production. Content of P(3HB) in biomass was 59,42 % per cell weight. The accumulation of the copolymer by bacterial strain was detected, but at very low concentrations.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Polyhydroxyalkanoáty, Poly(3-hydroxybutyrát), Poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát), extrémofilné mikroorganizmy, teplota, *Chelatococcus thermostellatus*

KEYWORDS

Polyhydroxyalkanoates, Poly(3-hydroxybutyrate), Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), extremophilic microorganism, temperature, *Chelatococcus thermostellatus*

HOLLÁ, T. *Termofilní mikroorganismy jako producenti PHA*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie, 2019. 40 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Stanislav Obruča, PhD.

PREHLÁSENIE

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

Podpis študenta

POĎAKOVANIE

Touto cestou by som sa chcela poďakovať môjmu vedúcemu bakalárskej práce doc. Ing. Stanislavovi Obručovi PhD. za odborné rady, trpezlivosť a ústretovosť. Ďalej by som sa chcela poďakovať mojej konzultantke Ing. Ive Pernicovej za pomoc v laboratóriu, cenné rady pri úprave práce a trpezlivosť. Vďaka patrí taktiež Ing. Ivane Nováčkovej a Ing. Danovi Kučerovi za pomoc pri práci v laboratóriu. V neposlednej rade by som sa chcela poďakovať mojej rodine a kamarátom za podporu behom celej doby štúdia.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČASŤ	8
2.1	Polyhydroxyalkanoáty	8
2.1.1	História PHA	8
2.1.2	Typy polyhydroxyalkanoátov	9
2.1.3	Fyzikálne a chemické vlastnosti	9
2.1.4	PHA syntázy	10
2.1.5	Biosyntéza polyhydroxyalkanoátov	11
2.1.6	Biodegradabilita PHA.....	13
2.1.7	Využitie PHA	13
2.2	Baktérie produkujúce PHA	13
2.2.1	Extrémofilné mikroorganizmy	14
2.2.2	Acidofilné a alkalofilné mikroorganizmy.....	14
2.2.3	Halofilné mikroorganizmy	15
2.2.4	Termofilné mikroorganizmy.....	15
2.2.4.1	Charakteristika	15
2.2.4.2	Rozdelenie a podmienky pre život	15
2.2.4.3	Adaptácia biomolekúl na vysoké teploty	15
2.2.4.4	Príklady termofilných baktérií	16
2.2.5	Produkcia PHA pomocou termofilnej baktérie <i>Chelatococcus thermostellatus</i>	17
2.2.5.1	Charakteristika	17
2.2.5.2	Produkcia PHA.....	17
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	18
3.1	Použitie baktérie, chemikálie, prístroje a materiál	18
3.1.1	Použitie baktérie	18
3.1.2	Použitie chemikálie.....	18
3.1.3	Použitie prístroje.....	19
3.2	Kultivácia baktérie <i>Chelatococcus thermostellatus</i>	19
3.2.1	Komplexné médium	19
3.2.2	Príprava inokula.....	20
3.2.3	Minerálne médium.....	20
3.3	Použitie metódy	21
3.3.1	Stanovenie génu <i>phaC</i> a bakteriálneho génu <i>16S</i> rRNA pomocou PCR	21
3.3.1.1	Izolácia a amplifikácia DNA.....	22
3.3.2	Príprava gélov.....	22

3.3.3	Gélová elektroforéza.....	22
3.3.3.1	Zloženie použitých chemikálií	23
3.3.4	Spektrofotometrické meranie zákalu	23
3.3.5	Gravimetrické stanovenie biomasy	23
3.3.6	Optimalizácia pre produkciu PHA	23
3.3.6.1	Určenie vhodného minerálneho média.....	23
3.3.6.2	Stanovenie zdroja uhlíka	23
3.3.6.3	Stanovenie využitia vybraných substrátov	24
3.3.6.4	Stanovenie optimálnej teploty	24
3.3.7	Produkcja PHA za využitia prekurzorov	24
3.3.8	Stanovenie obsahu PHA pomocou plynovej chromatografie.....	25
3.3.8.1	Kalibračná krivka	25
3.3.8.2	Stanovenie obsahu PHA v biomase	27
4	VÝSLEDKY A DISKUSIA	28
4.1	Identifikácia <i>phaC</i> génu a bakteriálneho génu <i>16S</i> rRNA	28
4.2	Optimalizácia podmienok pre produkciu PHA.....	29
4.2.1	Výber vhodného komplexného média.....	29
4.2.2	Výber vhodného minerálneho média.....	30
4.2.3	Stanovenie využitia vybraných substrátov	31
4.2.4	Výber najvhodnejšieho uhlíkového substrátu.....	32
4.2.5	Optimalizácia produkcie pri rôznych teplotách.....	33
4.3	Produkcja PHA za využitia prekurzorov.....	34
5	ZÁVER.....	36
6	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	37
7	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	40

1 ÚVOD

V dnešnej dobe sú veľmi rozšírené syntetické plasty na báze ropy. Vďaka svojim vlastnostiam sú rozšírené do všetkých odvetví. Využívajú sa na výrobu predmetov na každodenné použitie a rôznych obalových materiálov na všestranné použitie. Ich veľkou výhodou sú veľmi nízke náklady na výrobu. Avšak majú mnoho nevýhod, medzi ktoré patrí nerozložiteľnosť v prírode. V súčasnosti tvoria vysokú environmentálnu záťaž pri znečisťovaní oceánov a krajiny. Vďaka ich štruktúre a rezistenciám môžu pretrvávať na skládkach a v oceánoch mnoho rokov. Taktiež sa zvýšili obavy kvôli toxicite syntetických plastov z dôvodu ich výroby v petrochemickom priemysle. Možnosť ako znížiť zaťaženie životného prostredia je ich spaľovanie, avšak aj tento postup je ekologicky veľmi nepriaznivý. Pri spaľovaní syntetických plastov dochádza k uvoľňovaniu toxických a karcinogénnych látok do ovzdušia [1].

Jednou z možností ako znížiť zaťaženie prostredia je hľadanie nových materiálov s priaznivejšími vlastnosťami. Mali by mať podobné vlastnosti ako syntetické plasty, ale nižšiu toxicitu voči životnému prostrediu a mali by byť biodegradabilné.

Ako alternatíva k syntetickým plastom sú polyhydroxyalkanoáty. PHA sú radia medzi organické polyméry, ktoré sú netoxické voči prírode. Majú vlastnosti veľmi podobné ako syntetické plasty. Sú syntetizované rôznymi mikroorganizmami pri nadbytku uhlíka a slúžia ako zásobáreň energie a uhlíka, ktoré sú využiteľné pri stresových podmienkach [2]. Veľkou výhodou PHA je ich biodegradabilita. Za prítomnosti vhodných mikroorganizmov v prostredí dokážu byť rozložené v priebehu niekoľkých mesiacov. Sú produkované z rastlinných olejov a odpadných substrátov, ako napríklad odpad z poľnohospodárskeho alebo z potravinárskeho priemyslu. Doposiaľ je však ich výrobná cena päťkrát vyššia ako cena syntetických plastov [1]. Preto je v súčasnosti dôležité nachádzanie najefektívnejších spôsobov produkcie polyhydroxyalkanoátov a tým zníženie ich výrobných nákladov.

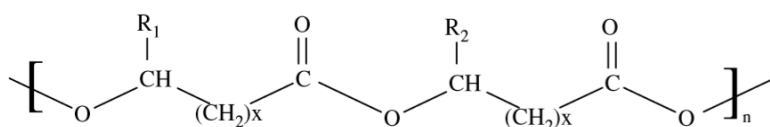
Medzi potenciálnych producentov polyhydroxyalkanoátov sa radia extrémofilné mikroorganizmy, ktoré sa rozdeľujú na halofilné, termofilné, acidofilné alebo alkalofilné. V poslednej dobe narastá záujem o produkciu PHA pomocou termofilných mikroorganizmov. Termofilné mikroorganizmy sú adaptované na prežitie pri vysokých teplotách a ich optimálna teplota pre rast dosahuje hodnoty, pri ktorých nie sú ostatné formy života schopné prežiť. Pri použití termofilných mikroorganizmov na produkciu PHA je možné znížiť náklady na sterilizáciu a chladenie pri kultivácii v priemysle, preto majú veľký potenciál do budúcnosti [3].

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty patria do skupiny opticky aktívnych polyesterov, ktoré obsahujú monomérmne jednotky (*R*)-3-hydroxyalkánových kyselín. Tieto kyseliny sú všetky v *R* konfigurácii kvôli stereospecifite polymerizačného enzýmu – PHA syntáze [1]. Sú to zlúčeniny biologického charakteru, ktoré majú vlastnosti veľmi podobné syntetickým plastom, v dnešnej dobe panujúcim na trhu. Výhodou PHA je ich kompletná biodegradácia v životnom prostredí. PHA môžu byť produkované z obnoviteľných zdrojov, ako sú rastlinné oleje, sacharidy, oxid uhličitý a taktiež rôzne odpadné substráty [4]. Ako jediné bioplasty sú kompletne syntetizované mikroorganizmami [5].

Polyhydroxyalkanoáty sú produkované mikroorganizmami ako odpoveď na náhle zvýšenie množstva uhlíku a limitáciu esenciálnych živín v prostredí, napríklad dusík a fosfor. Využívajú ich na uloženie dôležitých živín potrebných na prežitie pri stresových podmienkach [4]. V baktériách sa vyskytujú v cytoplazme ako inklúzie, ktoré sú nerozpustné vo vode. Granule polyhydroxyalkanoátov môžu byť veľké 0,2 – 0,5 μm [4]. Ich štruktúra je zobrazená na obr. 1.



Obr. 1: Všeobecná štruktúra PHA ($R_1, R_2 =$ alkylová skupina; $x = 1 - 4$; $n = 100 - 30000$) [6]

Najznámejšou PHA je poly(3-hydroxybutyrát), ktorý obsahuje opakujúce sa jednotky (*R*)-3HB. Monoméry sú polymerizované do polymérov s vysokou molekulovou hmotnosťou, v rozmedzí 200 000 – 3 000 000 Da. Typ PHA závisí na mikroorganizme, v ktorom vzniká, na zdroji uhlíka a na podmienkach biosyntézy [7]. Molekulová hmotnosť závisí na type mikroorganizmu a na jeho podmienkach pri raste [1].

2.1.1 História PHA

Už dlhý čas sa vedci snažili predísť syntetickým plastom na báze ropy a nájsť ekologickejšiu náhradu. Syntetické plasty sú univerzálne, ale majú mnoho negatívnych vlastností, ako napríklad toxicita voči prírode, ťažká rozložiteľnosť a ich veľké hromadenie v oceánoch.

Na začiatku minulého storočia boli v bakteriálnom kmeni *Azotobacter chroococcum* prvýkrát objavené inklúzie podobné lipidom a rozpustné v chloroforme. V roku 1926 francúzsky mikrobiológ M. Lemoigne prvýkrát identifikoval P(3HB) v bakteriálnom kmeni *Bacillus megaterium*. Po množstve pokusov sa vedcom podarilo zistiť, že inklúzie obsahujúce P(3HB) fungujú ako zásobáreň živín potrebných pri stresových podmienkach [1]. V roku 1974 boli identifikované nové typy PHA. V aktivovanom kale boli objavené baktérie, ktoré produkovali PHA obsahujúce monoméry 3HV a 3HHx. Po takmer desaťročí pri objavovaní heteropolymérov, bolo zistené, že v podmorskom sedimente je omnoho vyšší obsah P(3HB) a P(3HB-co-3HV) ako zvyšných 11 typov PHA. V roku 1983 bola zistené, že pri kultivácii baktérie *Pseudomonas oleovorans* na uhlíkovom zdroji *n*-oktáne boli produkované PHA

pozostávajúce prevažne z 3-HO podjednotiek [6]. Následné boli skúmané vlastnosti rôznych typov PHA. Bolo zistené, že homopolymér P(3HB) je krehký materiál, avšak zabudovaním druhej monomérskej jednotky do P(3HB) môžu byť významne zvýšené jeho využiteľné vlastnosti [1].

2.1.2 Typy polyhydroxyalkanoátov

Polyhydroxyalkanoáty sa delia do dvoch skupín podľa počtu atómov uhlíka v reťazci monoméru. Reťazce pozostávajúce z 3 – 5 atómov uhlíka sú klasifikované ako krátko reťazcové polyhydroxyalkanoáty (scl – short chain length PHA). Medzi scl PHA patria napríklad poly(3-hydroxybutyrát) a kopolymér P(3HB-co-3HV). Druhá skupina pozostávajúca z 6 – 14 atómov uhlíka je klasifikovaná ako polyhydroxyalkanoáty so stredne dlhým reťazcom (mcl – medium chain length PHA). Patria sem napríklad homopolymér poly(3-hydroxyoktanoát) a kopolymér P(3HHx-co-3HO) [4], [6]. Porovnanie vlastností scl-PHA, mcl-PHA a komerčného syntetického plastu polypropylénu je zobrazené v *tab. 1*. Tretia skupina je klasifikovaná ako scl/mcl-PHA. Patria sem kopolyméry pozostávajúce z scl a mcl-PHA obsahujúce 3 – 14 atómov uhlíka [8].

Tab. 1: Porovnanie vlastností scl-PHA, mcl-PHA a polypropylénu (PP) [6]

Vlastnosti	scl-PHA	mcl-PHA	PP
Kryštalinita [%]	40 - 80	20 - 40	70
Teplota topenia [°C]	53 - 180	30 - 80	176
Hustota [g.cm ⁻³]	1,25	1,05	0,91
Pevnosť v ťahu [MPa]	43	20	34
Teplota skleného prechodu [°C]	-148 - 4	-40 - 150	-10
Maximálne predĺženie [%]	6 -1000	300 - 450	400
Odolnosť voči rozpúšťadlám	slabá	slabá	Dobrá
Biodegradabilita	dobrá	dobrá	Žiadna

2.1.3 Fyzikálne a chemické vlastnosti

Vlastnosti polyhydroxyalkanoátov sú veľmi podobné ako vlastnosti syntetických plastov, ako napríklad polypropylén. Ich vlastnosti určuje typ monoméru a jeho štruktúra [8].

Homopolymér P(3HB) je najčastejším typom scl-PHA, preto je najviac preskúmaný. Je vysoko kryštalický, tuhý, ale zároveň krehký materiál [8]. Vo vnútri buniek ma amorfný charakter a je nerozpustný vo vode, zatiaľ čo po izolovaní z baktérií disponuje 50 – 80 % kryštalinitou [1]. Pri zvláknovaní sa správa ako elastický materiál. P(3HB) má helikálnu kryštalickú štruktúru, táto štruktúra je podobná v rôznych kopolyméroch [8]. Teplota topenia je 180 °C. Zavedením ďalších monomérov HA do reťazca, ako napríklad 3-hydroxyvalerát alebo 3-hydroxyhexanoát, sa výrazne zlepšia vlastnosti polyméru [9].

Kopolymér poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) je druhý najznámejší a najpreskúmanejší polyhydroxyalkanoát. Má dve výhody oproti P(3HB), a to je nižšia teplota topenia a nižšia úroveň kryštalickosti. Fyzikálne vlastnosti P(3HB-co-3HV) závisia na zastúpení 3HV v polymére. Kopolyméry s vyšším obsahom 3HV sú elastickejšie. Produkcia kopolyméru P(3HB-co-3HV) niektorými baktériami je založená na prídavku prekursoru

k uhlíkovému zdroju [10]. V tab. 2 sú zobrazené vlastnosti niektorých PHA v porovnaní so syntetickými plastami.

Tab. 2: Porovnanie fyzikálnych vlastností konkrétnych PHA s komerčným polypropylénom (PP) a polystyrénom (PS) [6]

Polymér	Teplota topenia [°C]	Teplota skleného [°C]	Youngov modul [Gpa]	Maximálne predĺženie [%]	Pevnosť v ťahu [Mpa]
P(3HB)	180	4	3,5	5	40
P(4HB)	53	-48	149	1000	104
P(3HB-co-20% 3HV)	145	-1	1,2	50	20
P(3HB-co-16% 4HB)	150	-7	-	444	26
P(3HB-co-10% 3HHx)	127	-1	-	400	21
P(3HB-co-6% 3HD)	130	-8	-	680	17
PP	176	-10	1,7	400	34,5
PS	240	100	3,1	-	50

2.1.4 PHA syntázy

PHA syntázy sú kľúčové enzýmy pre biosyntézu polyhydroxyalkanoátov. Polymerizačný enzým PHA syntáza (PhaC) je kľúčový enzým, ktorý určuje typ PHA produkovaný mikroorganizmom. PHA syntázy sú rozdelené na štyri rôzne triedy podľa ich primárnej štruktúry a substrátovej špecificity, ktoré sú zobrazené v tab. 3 [11].

Tab. 3: Rozdelenie PHA syntáz do štyroch tried [12]

Trieda	Podjednotky	Mikroorganizmus	Substrátová špecificita
I	PhaC	<i>Cupriavidus necator</i>	3HA _{SCL} -CoA,
II	PhaC	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3HA _{MCL} -CoA
III	PhaC, PhaR	<i>Allochromatium vinosum</i>	3HA _{MCL} -CoA
IV	PhaC, PhaE	<i>Bacillus megaterium</i>	3HA _{SCL} -CoA

Prvá trieda PHA syntáz zahŕňa tie, ktoré sú schopné produkovať scl-PHA. Najznámejšia a najpreštudovanejšia PHA syntáza prvej triedy je PhaC izolovaná z baktérie *Cupriavidus necator* [11]. Syntáza PhaC je kódovaná génom *phaC*, ktorý sa skladá približne z 1700 bp. PHA syntázy *C. necator* môžu inkorporovať malé množstvo monomérov 3HHx, 3HO a 3HDD [1]. PhaC syntáza I triedy pozostáva z podjednotky, ktorá má približne 60-73 kDa [12].

PHA syntáza druhej triedy izolovaná z baktérie *Pseudomonas oleovorans* pozostáva z jednej podjednotky, ktorá je kódovaná dvomi génmi *phaC1* (1700 bp) a *phaC2* (1800 bp) [11]. Táto

podjednotka má približne 60-65 kDa [12]. PHA syntázy druhej triedy syntetizujú prevažne mcl-PHA. Medzi výnimky patria PHA syntázy *Aeromonas caviae* a *P. oleovorans*, ktoré sú schopné produkcie scl/mcl-PHA [11].

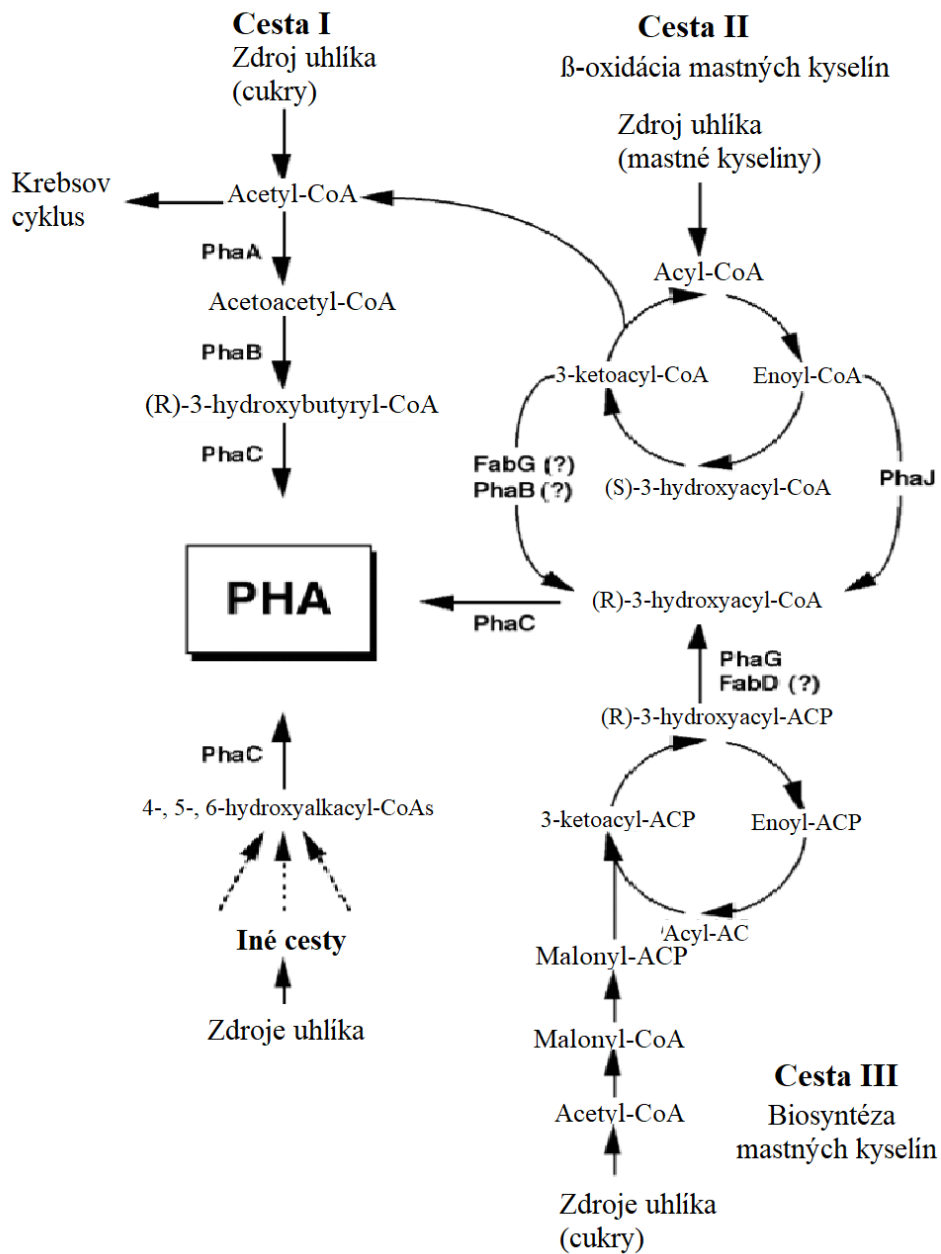
Na rozdiel od prvej a druhej triedy, PHA syntázy tretej a štvrtej triedy pozostávajú z dvoch podjednotiek. PHA syntázy tretej triedy pozostávajú z podjednotky PhaC, ktorá má cca 40 kDa, a PhaE, ktorá má tiež približne 40 kDa [11]. Obe podjednotky sú nevyhnutné pre správnu funkciu PHA syntáz tohto typu. Substrátová špecifita tretieho typu uprednostňuje stredne dlhé reťazce HA [12].

Štvrtý typ PHA syntáz má podobnú štruktúru ako tretí typ, ale namiesto PhaE podjednotky obsahuje PhaR podjednotku, ktorá má molekulovú hmotnosť okolo 22 kDa. PHA syntázy štvrtej triedy syntetizujú scl-PHA [12].

2.1.5 Biosyntéza polyhydroxyalkanoátov

Syntéza PHA je veľmi komplexný proces [6]. Biosyntéza PHA prebieha vďaka veľkému množstvu enzýmov, ktoré sú s ňou priamo alebo nepriamo spojené. Tieto enzýmy sú kódované rôznymi génmi [13]. Syntéza PHA v mikroorganizmoch nastáva vtedy, keď sa mikroorganizmy nachádzajú v nadbytku uhlíkového zdroja a v nedostatku ostatných esenciálnych živín. Veľkosť PHA granúl a ich množstvo závisí na type mikroorganizmu. Fyzikálne aj chemické vlastnosti PHA sa líšia u každého druhu mikroorganizmu, čo je spôsobené rozličným druhom monomérov. Faktory, ktoré ovplyvňujú tvorbu daného monoméru sú napríklad typ mikroorganizmu použitý na produkciu, druh produkčného média, spôsoby fermentácie a kultivačné podmienky [14].

V súčasnosti je známych niekoľko dráh, ktorými je biosyntetizované PHA. Syntéza PHA reťazcov je lokalizovaná v cytoplazme bunky, kde vznikajú granule obsahujúce PHA. Najznámejší a najčastejšie produkovaný je polymér P(3HB). Schéma jeho syntézy je na obr. 2. Cesta I zahŕňa tri kľúčové enzýmy, β -ketothiolázu, NADPH-dependentnú acetoacetyl-CoA reductázu a PHA syntázu. β -ketothiolázu, ktorá je kódovaná génom *phaA*, katalyzuje kondenzáciu dvoch molekúl acetyl-CoA za vzniku acetoacetyl-CoA. Nasleduje stereoselektívna redukcia NADPH-dependentnou acetacetyl-CoA reductázou, ktorá je kódovaná génom *phaB*, za vzniku (R)-3-hydroxybutyryl-CoA. Po tomto kroku dochádza k polymerizácii monoméru PHA syntázou (*phaC*) za vzniku P(3HB) [6]. Cesta II je spojená s nadbytkom mastných kyselín. Touto cestou vznikajú mcl-PHA. Po β -oxidácii mastných kyselín vstupuje acyl-CoA do procesu biosyntézy, kde je pôsobením enzýmov pretransformovaný na (R)-3-hydroxyacyl-CoA. Následne je pôsobením PHA syntázy polymerizovaný na mcl-PHA. Cesta III zahŕňa 3-hydroxyacyl-ACP-CoA transferázu, ktorá je kódovaná génom *phaG*, a malonyl-CoA-ACP transacylázu, kódovanú génom *fabD*. Substrát je pôsobením enzýmov transformovaný na 3-hydroxyacyl-ACP, ktorý následne formuje 3-hydroxyacyl-CoA a ten je polymerizovaný do PHA. Cesta IV využíva enzým NADPH-dependentnú acetoacetyl-CoA reductázu k oxidácii (S)-(+)-3-hydroxybutyryl-CoA. Ostatné cesty sú použité k syntéze kopolymérov, napríklad cestou V a cestou VI sa syntetizuje PHA obsahujúci P(4HB) [13]. Pri biosyntéze PHA je dôležitým regulujúcim faktorom vnútrobunková koncentrácia acetyl-CoA a voľného HSCoA. Acetyl-CoA je prirodzene oxidovaný v Krebsovom cykle. Pri jeho syntéze dochádza k vzniku redukovaného kofaktoru NADH, ktorý sa spotrebúva pri ďalších syntézach [14].

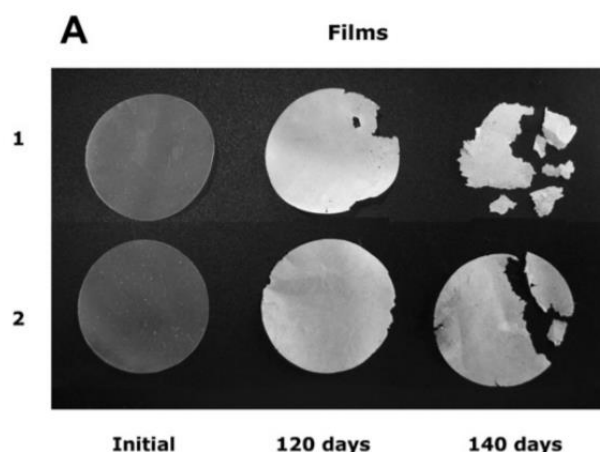


Obr. 2: Metabolické dráhy, ktoré sú zapojené do produkcie PHA v mikroorganizmoch [14]

2.1.6 Biodegradabilita PHA

Najväčšou výhodou polyhydroxyalkanoátov je ich biodegradácia v životnom prostredí. Môžu byť rozkladané ako v aeróbných, tak aj v anaeróbných podmienkach. Mikroorganizmy z rodov *Pseudonocardiaceae*, *Micromonosporaceae*, *Thermomonosporaceae*, *Streptosporangiaceae* a *Streptomyetaceae* rozkladajú P(3HB) v životnom prostredí. Môžu byť degradované teplom a tiež enzymatickou hydrolýzou. V biologických systémoch môžu byť degradované mikrobiálnou depolymeráciou a tiež v živočíšnych tkanivách enzymatickou aj neenzymatickou hydrolýzou. Biodegradabilita PHA je daná predovšetkým ich molekulárnou hmotnosťou a fyzikálno-chemickými vlastnosťami. Bolo zistené, že PHA s nižšou molekulovou hmotnosťou podliehajú biodegradácii ľahšie ako vysokomolekulárne PHA [9].

PHA v mikroorganizmoch zastávajú úlohu zásobárne uhlíka, preto sú mikroorganizmy vybavené na to, aby uhlík z PHA obnovili. Túto úlohu má intracelulárna PHA depolymeráza, ktorá je kódovaná génom *phaZ*. Niektoré mikroorganizmy produkujú extracelulárnu PHA depolymerázu, ktorá má za úlohu degradovať polyhydroxyalkanoáty v prostredí [1].



Obr. 3: Biodegradácia PHA filmu po rôznom počte dní, 1 – P(3HB); 2 – P(3HB-co-3HV) [16]

2.1.7 Využitie PHA

Bioplasty sú potenciálnou možnosťou náhrady syntetických plastov. PHA latex sa využíva na pokrytie papiera alebo kartónu, čím vznikajú vode odolné materiály. Množstvo PHA potrebné na výrobu vode odolných materiálov je malé, preto je táto alternatíva cenovo dostupná. P(3HB-co-3HV) má vhodné vlastnosti na využitie na výrobu fóliových obalov potravín a plastových obalov na nápoje. Polyhydroxyalkanoáty nachádzajú veľké využitie v medicíne, kde je spotrebované veľké množstvo jednorazových materiálov vyrobených z plastov. Taktiež je produkcia PHA zameraná na výrobu kožných náhrad, kostných náhrad a implantátov a na mikročastice určené na doručenie liečiv na potrebné miesto [1]. PHA sa v súčasnosti využívajú aj v poľnohospodárskom priemysle na biodegradabilný film na polia, do ktorého môžu byť zavedené insekticídy alebo herbicídy. Na toto sa používa P(3HB-co-3HV) z ktorého sú postupne uvoľňované insekticídy do pôdy [9].

2.2 Baktérie produkujúce PHA

Priemyselná biotechnologická produkcia v súčasnosti bojuje s problémami, ako napríklad vysoká spotreba čerstvej vody a energie (sterilizácia, dodávanie kyslíka, miešanie), časté

mikrobiálne kontaminácie, náročná separácia a čistenie produktu, pomalý rast produkčných organizmov, nízka účinnosť premeny substrátu a veľmi vysoké investície do zariadení proti kontamináciám [17]. V súčasnosti sú používané produkčné mikroorganizmy, ktorých podmienky sú citlivé voči kontamináciám. Bežné priemyselné kmene *Bacillus spp.*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum* a *Pseudomonas spp.* sú pre produkciu PHA kultivované pri pH 5 – 7 a teplote 30 – 37°C doplnené kvasinkovým extraktom. Tieto podmienky umožňujú rast väčšine mikroorganizmov. Veľmi nízka alebo vysoká teplota, nízke alebo vysoké pH, nízky alebo vysoký osmotický tlak zvyšujú odolnosť produkčného procesu voči kontamináciám. Týmito vlastnosťami disponujú extrémofilné mikroorganizmy [18].

2.2.1 Extrémofilné mikroorganizmy

Extrémne podmienky sú typické pre extrémofilné mikroorganizmy. Veľmi vysoká alebo veľmi nízka teplota, veľmi vysoké alebo nízke pH a veľmi vysoký tlak sú optimálne podmienky pre ich rast a reprodukciu. Veľmi často majú niektoré extrémofilné baktérie viac požiadaviek na extrémne podmienky, preto sa tiež nazývajú polyextrémofily [19]. Rozdelenie extrémofilných mikroorganizmov je zobrazené v tab. 4.

Tab. 4: Rozdelenie extrémofilných mikroorganizmov podľa preferencií [17]

Preferencie pre optimálny rast	Príklady	Mikroorganizmy
Vysoká/nízka teplota	T < 25 °C	psychrofilné
	25 – 45 °C	mezofilné
	T > 45 °C	termofilné
Vysoké/nízke pH	pH < 5	acidofilné
	pH > 8,5	alkalofilné
Vysoký osmotický tlak	NaCl > 30 g/l	halofilné
Utilizácia nezvyčajných substrátov	metán	metanofilné
	Hg, Cd, Zn	metalotolerantné
	H ₂ , CO ₂	utilizátory plynov

2.2.2 Acidofilné a alkalofilné mikroorganizmy

Extrémne kyslé prostredie (pH < 3) sa prirodzene vyskytuje napríklad v geotermálnych a pobrežných oblastiach. Biotická zložka tohto prostredia je hlavne mikrobiálneho typu. Acidotolerantné a obligátne acidofilné baktérie sú veľmi rozšírená skupina. Železo oxidujúce acidofily sú rozdelené podľa ich optimálnej teploty na mezofilné (väčšinou gram-negatívne baktérie), mierne termofilné (väčšinou gram-positívne baktérie) a extrémne termofilné (archaea) [20].

Medzi alkalofilné baktérie patria tie baktérie, ktorých optimálny rast nastáva pri pH 10 – 11. Niektoré druhy alkalofilov môžu požadovať nízke koncentrácie Na⁺, iné práve naopak patria medzi halofilné alkalofilné baktérie [21].

2.2.3 Halofilné mikroorganizmy

Halofilné mikroorganizmy sú organizmy, ktoré potrebujú prítomnosť soli k svojmu rastu. Nachádzajú sa v soľných jazerách, soľných panvách a v oblastiach s vysokým obsahom soli. Rozdeľujú sa v závislosti na ich požiadavkách na koncentráciu NaCl v prostredí na: mierne halofilné (1 - 5%), stredne halofilné (3 – 25%) a extrémne halofilné (20 – 30%) [22]. Taktiež sa delia na halotolerantné, ktoré dokážu rásť pri zvýšenej koncentrácii soli, avšak ich optimálny rast prebieha bez prítomnosti soli. Ako haloversatilné sú označované mikroorganizmy, ktoré sú schopné rásť bez prítomnosti soli, ale ich optimálny rast nastáva pri zvýšenej koncentrácii soli [23].

Halofilné baktérie majú schopnosť prispôbovať sa zmenám osmotického tlaku. Obsahujú špeciálne vyvinuté proteíny, ktoré sú vysoko aktívne a stabilné aj pri vysokých koncentráciách soli. Tieto proteíny nenedaturujú pri vysokých koncentráciách soli, práve naopak, viažu značné množstvá soli a vody. Medzi halofilné baktérie produkujúce P(3HB) patrí napríklad *Halomonas boliviensis* [22].

2.2.4 Termofilné mikroorganizmy

2.2.4.1 Charakteristika

Teplota je jedna z najdôležitejších premenných v našom životnom prostredí. Preto bolo rozdelenie živých organizmov podľa ich vzťahu k teplote zaradené medzi najzákladnejšie prvky biologických systémov. Termofilné mikroorganizmy sú organizmy, ktoré sú adaptované na prežitie pri vysokých teplotách. Ich optimálna kultivačná teplota dosahuje vysokých hodnôt, preto ich môžeme nájsť v geotermálne vyhrievaných oblastiach na Zemi, napríklad v Yellowstonskom národnom parku. Nachádzajú sa tiež v rašeliniskách a kompostoch. Väčšina termofilných baktérií nie je adaptovaná na rast v extrémne vysokých teplotách. Veľké množstvo termofilných baktérií má optimálnu teplotu pre rast pod 75 °C [24].

2.2.4.2 Rozdelenie a podmienky pre život

Mikroorganizmy sa väčšinou delia do troch základných skupín, a to na psychrofilné, mezofilné a termofilné [24]. Psychrofilné mikroorganizmy sú organizmy, ktoré sú schopné prežiť pri veľmi nízkych teplotách, ako napríklad severný pól alebo dno oceána. Optimálna teplota pre ich rast a reprodukciu je $-20 - +10^{\circ}\text{C}$, preto sú radené medzi extrémofilné mikroorganizmy [25]. Mezofilné mikroorganizmy rastú pri priemerných teplotách, ani vysokých ani nízkych. Optimálna teplota pre ich rast a reprodukciu je v rozmedzí $20 - 45^{\circ}\text{C}$, preto sa nezaraďujú medzi extrémofilné mikroorganizmy. Vyskytujú sa v jogurtoch, syroch, pri výrobe piva a vína a taktiež ako ľudské baktérie keďže teplota ľudského tela je 37°C [26].

Ako termofilné mikroorganizmy sú označované tie, ktoré majú maximálnu teplotu pre rast vyššiu ako 50°C . Medzi termofilné mikroorganizmy patria prokaryotické mikroorganizmy, výnimočne aj eukaryotické mikroorganizmy. [24]. Rozsah termofilov sa ďalej rozdeľuje, a to na termofilné, ktoré sú schopné rásť pri $50-64^{\circ}\text{C}$ a extrémne termofilné, ktoré sú schopné rásť pri $65-79^{\circ}\text{C}$. Taktiež sem patria mikroorganizmy, ktoré sú schopné rásť pri teplote vyššej ako 80°C . Táto skupina sa nazýva hypertermofilné mikroorganizmy [3].

2.2.4.3 Adaptácia biomolekúl na vysoké teploty

Skúmaním základov stabilizácie biomolekúl pri vysokých teplotách bolo zistené, prečo termofilné mikroorganizmy prežívajú pri extrémnych teplotách, ktoré zabíjajú ostatné formy

života. Analýza dôležitých biomolekúl u termofilov odhalila mierne zmeny v štruktúre proteínov, nukleových kyselín a tukov. Extrémne termofilné baktérie taktiež produkujú špeciálne zlúčeniny, ktorých funkciou je ochrana a stabilizácia biologických makromolekúl pred vysokými teplotami [24].

Membránové lipidy v termofilných organizmoch väčšinou obsahujú éterové väzby, ktoré sú pri vysokých teplotách stabilné. Naopak esterové väzby sú pri takýchto podmienkach kompletne rozložené. Vďaka éterovým lipidom sú membrány termofilných mikroorganizmov stabilnejšie pri vysokých teplotách, a je zabezpečený správny stupeň priepustnosti membrán, čo je dôležité pre ich rast [27].

Nukleové kyseliny u termofilných organizmov zvyšujú termostabilitu zvýšením obsahu G+C. V géne *16S* rRNA u niektorých termofilov sa obsah G+C úmerne zvyšuje s optimálnou rastovou teplotou. Stabilizácia génomovej DNA je priamo spojená so zložením dinukleotidov. Adaptácia zmenením zloženia dinukleotidov umožňuje väčšiu voľnosť pri tvorbe rôznych sekvencií DNA, ktoré kódujú aminokyseliny proteínov. Taktiež transferová RNA vykazuje špecifickú tepelnú stabilitu vďaka obsahu G+C. Transferová RNA termofilných baktérií obsahuje väčšie množstvo párov báz G+C, vďaka čomu daný úsek obsahuje vyššie množstvo vodíkových mostíkov a je teplotne stabilnejší [28]. V proteínoch termofilných mikroorganizmov je rozdielne zloženie aminokyselín. Sú bohaté na polárne nabité aminokyseliny, ako Glu, Asp, Lys a Arg. Naopak obsahujú len vzácne polárne nenabité aminokyseliny, ako Ser, Thr, Asn a Gln. Zmeny v zložení proteínov sú najzreteľnejšie na ich povrchu v porovnaní s mezofilnými mikroorganizmami [29].

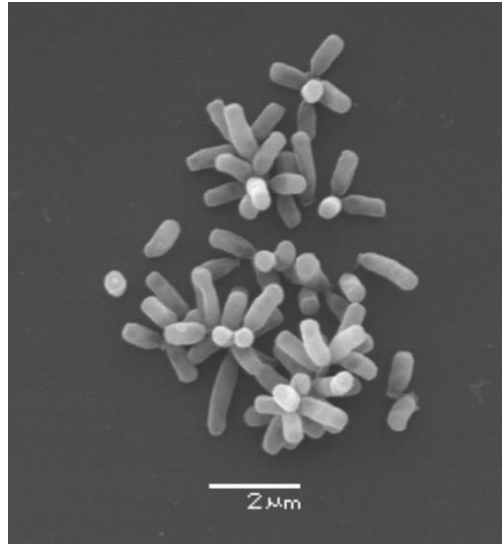
2.2.4.4 Príklady termofilných baktérií

V súčasnosti je známych veľmi veľa druhov termofilných baktérií. Patria sem ako gram-pozitívne, tak aj gram-negatívne baktérie z rôznych častí Zeme. Z rodu *Bacillus* medzi termofilné patrí napríklad *Bacillus acidocaldarius*. Optimálnu teplotu rastu má 58 °C a patrí medzi fakultatívne aeróbne baktérie. Z rodu *Thermus* sem patrí napríklad *Thermus aquaticus*, ktorá má optimálnu teplotu rastu 70 °C, čím sa zaraďuje medzi extrémne termofilné baktérie. Medzi obligátne anaerobné termofilné baktérie môžeme zaradiť niektoré druhy z rodu *Clostridium*. Patrí sem napríklad *Clostridium thermocellum*, ktoré má optimálnu teplotu rastu pri teplote 60 °C [24].

2.2.5 Produkcia PHA pomocou termofilnej baktérie *Chelatococcus thermostellatus*

2.2.5.1 Charakteristika

Chelatococcus thermostellatus patrí do bakteriálneho rodu *Chelatococcus*. Bunky tejto baktérie sú gram-negatívne a majú tyčinkovitý tvar. Je to aeróbná baktéria, ktorá neprodukuje spóry. Pri vysokých teplotách tvorí agregáty v tvare hviezdy, ktoré sú zobrazené na obr. 4 [30].



Obr. 4: Bunkové agregáty v tvare hviezdy tvorené bakteriálnym kmeňom *Ch. thermostellatus* [30]

Baktéria *Chelatococcus thermostellatus* bol izolovaná z organického odpadného kompostu v meste Münster v Nemecku. Rozsah teplôt, pri ktorých je schopná rásť je 37 – 55 °C. Optimálna teplota pre rast je 50 °C, preto sa radí medzi termofilné mikroorganizmy. Rozsah pH, pri ktorom dokáže prežiť je 6,8 – 8,0, ale optimálne pH je v rozsahu 7,0 – 7,5. Taktiež obsahuje enzýmy, ktoré sú schopné hydrolyzovať želatínu [30].

2.2.5.2 Produkcia PHA

Rod *Chelatococcus* je známy tým, že je schopný produkovať polyhydroxyalkanoáty ako zásobáreň uhlíka pri jeho nadbytku. Konkrétne druh *Chelatococcus thermostellatus* je schopný produkovať mnohonásobne väčšie množstvo P(3HB) ako ostatné doteraz skúmané druhy. Toto zistenie robí z druhu *Ch. thermostellatus* potenciálneho kandidáta pre produkciu bioplastov pri termofilných podmienkach. Taktiež môžu byť vďaka termofilným podmienkam minimalizované náklady na produkciu, a to vďaka tomu, že tieto baktérie pri svojom raste produkujú teplo, ktoré môže byť následne využité na prípravu vhodných podmienok pre nové kultivácie [30].

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Použité baktérie, chemikálie, prístroje a materiál

3.1.1 Použité baktérie

V experimentálnej časti bola použitá bakteriálna kultúra *Chelatococcus thermostellatus* DSM 28244.

3.1.2 Použité chemikálie

- Nutrient Broth, Himedia
- Tryptone soya broth, Oxoid
- Yeast extract, Himedia
- Agar powder, Himedia
- Tris-HCl pufer (5 mM, pH 8,5)
- Tris(hydroxymetyl)aminometán, Lachner
- EDTA, Lachner
- Master mix One *Taq* Hot Start DNA polymerázy, BioLabs Inc.
- 100 bp DNA Ladder H3 RTU
- Fruktóza, Lachner
- Glukóza, Lachner
- Sacharóza, Lachner
- Xylóza, Lachner
- Laktóza, Lachner
- Galaktóza, Lachner
- Glycerol, VWR Chemikals
- Acetát sodný
- Propionát sodný, SIGMA-ALDRICH
- Kyselina valerová, SIGMA-ALDRICH
- Kyselina levulová, SIGMA-ALDRICH
- Fe(III)NH₄-citrát, Fluka
- Chloroform, Lachner
- NaCl, Lachner
- Na₂HPO₄ · 12 H₂O, Lachner
- KH₂PO₄, Lachner
- MgSO₄ · 7 H₂O, Lachner
- NH₄Cl, Lachner
- CaCl₂ · 2 H₂O, Lachner
- CuCl₂ · 2 H₂O, Lachner
- ZnCl₂, Lachner
- FeCl₃, Lachner
- CoCl₂ · 6 H₂O, Lachner
- MnCl₂ · 6 H₂O, Lachner
- H₃BO₃, Lachner

- Primery pre *16S* rRNA
- Primery pre *phaC* gén
- Brómfenylová modrá

3.1.3 Použité prístroje

- Laminárny box Aura mini, BioAir Instruments
- Predvážky Kern EW 620
- Analytické váhy Boeco
- Temperovaná trepačka Heidolph unimax 1010, Labicom s.r.o.
- Vortex TK3S, Kartell spa
- Centrifúga Hettich Zentrifugen
- Mikrocentrifúga Sigma 1-14
- ELISA reader BIOTEK EL 808
- Gradientový Palm-cycler, Corbett Research
- Nanofotometer P-class P300, Implen
- Plynový chromatograf Trace GC Ultra FID Detector
-kolóna DB-WAX 30 m by 0,25 mm
- Bežné laboratórne pomôcky a sklo

3.2 Kultivácia baktérie *Chelatococcus thermostellatus*

Bakteriálna kultúra bola rozočkovaná a uchovávaná vo forme kryoskúmaviek. Očkovanie kultúry bolo prevedené do kryoskúmaviek, kde bola uchovávaná v 10% glycerole pri teplote -80°C . Očkovanie bolo taktiež prevedené na Petriho misky, ktoré obsahovali živné médium Nutrient Broth a boli uchovávané pri teplote $5-8^{\circ}\text{C}$.

3.2.1 Komplexné médium

Komplexné médium bolo používané na prípravu inokula. Boli používané dve komplexné médiá, z ktorých bolo vybrané najvhodnejšie pre rast bakteriálnej kultúry.

Ako prvé komplexné médium bolo použité komerčne dostupné médium Nutrient Broth, druhé komplexné médium bolo použité komerčne dostupné médium Luria-Bertani. Ich zloženia sú zobrazené v *tab. 5*.

Tab. 5: Zloženie komplexných médií

Nutrient Broth	Koncentrácia [g/l]	Luria-Bertani	Koncentrácia [g/l]
Pepton	10	Trypton	10
Mäsový extrakt	10	Kvasnicový extrakt	5
NaCl	5	NaCl	10

Komplexné médium bolo sterilizované. Na prípravu média na pevnej fáze (Petriho miskách) bol pred sterilizáciou pridaný agar o koncentrácií 17 g/l.

3.2.2 Príprava inokula

Inokulum bolo pripravené do 50 ml komplexného média v Erlenmeyerovej banke o objeme 100 ml. V očkovačom boxe bola pomocou očkovačej kľučky pridaná bakteriálna kultúra. Kultivácia prebiehala na trepačke po dobu 24 hodín pri teplote 50 °C.

3.2.3 Minerálne médium

Narastené inokulá boli preočkované do minerálneho média za účelom produkcie PHA. Do 250 ml Erlenmeyerovej banky bolo pripravených 100 ml minerálneho média. Boli používané dva druhy minerálnych médií. Minerálne médiá mali zloženia zobrazené v tab. 6 a tab. 7.

Tab. 6: Zloženie minerálneho média

MSM médium			H16 médium		
Látka	m [g]	V [ml]	Látka	m [g]	V [ml]
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	9		KH ₂ PO ₄	1,02	
KH ₂ PO ₄	1,5		(NH ₄) ₂ SO ₄	3	
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2		Na ₂ HPO ₄	11,1	
NH ₄ Cl	1		MgSO ₄	0,2	
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,02		Roztok stopových prvkov MES		1
Fe(III)NH ₄ -citrát	0,0012		Destilovaná voda		1000
Roztok stopových prvkov TES II		1			
Destilovaná voda		1000			

Tab. 7: Zloženie roztokov stopových prvkov

TES II		MES	
Látka	m [g/l]	Látka	m [g/l]
EDTA	50	FeCl ₃ · 6 H ₂ O	9,7
FeCl ₃	8,3	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	7,8
ZnCl ₂	0,84	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,156
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	0,13	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,119
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,1	NiCl ₂ · 6 H ₂ O	0,118
MnCl ₂ · 6 H ₂ O	0,016	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,1
H ₃ BO ₃	0,1	0,1 M HCl	1000 ml

Minerálne médiá boli vysterilizované. Po ochladení médií bol v očkovačom boxe pridaný roztok stopových prvkov TES II alebo MES v objeme 100µl a 10 ml inokula bakteriálnej kultúry *Chelatococcus thermostellatus*. Následne boli pripravené kultúry kultivované na trepačke po dobu 72 hodín pri teplote 50 °C.

3.3 Použité metódy

3.3.1 Stanovenie génu *phaC* a bakteriálneho génu *16S* rRNA pomocou PCR

Výsledkom PCR sú amplikóny, čo sú úseky DNA o konkrétnej dĺžke. Prebieha vďaka komplementarite báz, pričom primery nasadajú na denaturovanú DNA a syntéza nového reťazca je katalyzovaná DNA-polymerázou najčastejšie izolovanou z kmeňa *Thermus aquaticus*. Pri denaturácii DNA sa využíva zvýšená teplota. Z denaturovaného reťazca DNA vzniká dvojreťazcová molekula a cyklus sa následne opakuje. Po 30 cykloch vzniká až 10^9 kópií určitého úseku DNA. Konečné namnožené množstvo DNA sa využíva pri identifikácii daného génu, čo je najčastejšie detekované pomocou gélovej elektroforézy [31].

Pri našom experimente bola použitá metóda multiplex PCR. Pri tejto metóde sa využíva pri jednej reakcii viac druhov primerov, ktoré sa následne viažu k rozdielnym úsekom templátovej DNA. V našom prípade boli použité dva typy primerov k amplifikácii génu *phaC* a génu *16S* rRNA.

Bola používaná zmes pre PCR, ktorá obsahovala:

- 12,5 µl Master mix One *Taq* Hot Start DNA polymerázy
- 2,6 µl MgCl₂
- 2x0,5 µl primery pre *16S* rRNA
- 2x0,5 µl primery pre *phaC* gén
- 2 µl vzorky DNA
- 5,9 µl PCR vody

Tab. 8: Sekvencia báz použitých primerov

	Veľkosť [bp]	Primer	Sekvencia báz
<i>16S</i> rRNA	1500	16S-F	AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG
		16S-R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T
<i>phaC</i>	500	G-D	GTG CCG CCS YRS ATC AAC AAG T
		G1R	GTT CCA GWA CAG SAK RTC GAA

Tab. 9: Priebeh procesu PCR v prístroji *Thermocycler*

Krok	Proces	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklov
1	Denaturácia	94	30	1
2	Denaturácia	94	30	30
	Annealing	55	30	
	Syntéza	68	90	
3	Syntéza	68	300	1
		30	60	1

3.3.1.1 Izolácia a amplifikácia DNA

Z narastenej bakteriálnej kultúry na pevnom médiu boli pomocou očkovacej kľučky odobrané bunky, ktoré boli prenesené do čistej skúmavky obsahujúcej 100 μ l pufru Tris-HCl o koncentrácií 5 mM a pH 8,5 . Skúmavka so vzorkou bola zahrievaná po dobu 15 minút na teplotu 99 °C. Po ukončení zahrievania bola skúmavka vložená do centrifúgy, kde bola odstredená pri otáčkach 10 000 otáčok za minútu po dobu 10 minút. Medzitým boli do skúmavky na PCR napipetované všetky komponenty potrebné k PCR. Po odstredení boli zo supernatantu odobrané 2 μ l do skúmavky na PCR. Zároveň bola pripravená pozitívna kontrola, ktorá obsahovala DNA bakteriálneho kmeňa *Cupriavidus necator H16*. Taktiež bola pripravená negatívna kontrola ktorá obsahovala všetky komponenty pre PCR, ale namiesto vzorky DNA obsahovala 2 μ l PCR vody. Následne boli vzorky uložené do prístroja Thermocycler, kde po dobu 90 minút prebiehala PCR. Zo supernatantu bola zisťovaná čistota DNA zistením pomeru absorbancie vzorku pri vlnových dĺžkach 260/280 nm.

3.3.2 Príprava gélov

Gél na gélovú elektroforézu bol pripravený z 2 g agarózy, ktorá sa pridala k 100 ml 1x koncentrovaného TBE pufru. Tento roztok bol pripravený zriedením 10x koncentrovaného TBE pufru s destilovanou vodou v pomere 1:9. Roztok agarózy s pufrom bol povarený až do úplného rozpustenia. K roztoku gélu bolo po vychladnutí na približne 70 °C pridaných 6 μ l farbiva Midori Green. Následne bol roztok naliaty do formy na gél a bol vložený hrebienok, vďaka ktorému vznikli pravidelné jamky. Po stuhnutí gél bol vybratý z formy a ďalej používaný na gélovú elektroforézu.

3.3.3 Gélová elektroforéza

Gélová elektroforéza je analytická metóda, pri ktorej dochádza k separácii makromolekúl podľa ich veľkosti. DNA má vďaka fosfátovej skupine záporný náboj, preto pod elektrickým prúdom putuje k anóde. Agarózový gél tvorí sieť s pórmí o definovanej veľkosti, ktorými prechádzajú molekuly a nastáva ich separácia podľa veľkosti. Farbivo pridávané do gélu farbí DNA, vďaka čomu môžeme pozorovať jej pohyb v UV žiarení. Ako elektrolyt sa používa pufer. Tento pufer je použitý aj na výrobu gélu ako rozpúšťadlo [32].

Do jamiek bolo pipetovaných 10 μ l vzorku zmiešaných s nanášacím pufrom. Nanášací pufer bol použitý z dôvodu obsahu glycerolu, ktorý zabezpečuje pokles vzoriek v jamkách na dno a tým zabráni ich vyplávaniu. Okrem vzorku DNA boli do gélu nanosené ďalšie látky, a to negatívna kontrola, pozitívna kontrola a hmotnostný marker. Gél so vzorkami bol následne zaliaty 1x koncentrovaným TBE pufrom a boli pripojené elektródy. Bola spustená elektroforéza po dobu 50 minút pri napätí 90 mV.

3.3.3.1 Zloženie použitých chemikálií

10x koncentrovaný TBE pufer:

- | | |
|----------------------------------|---------|
| • Tris(hydroxymetyl)aminometán | 108 g/l |
| • H ₃ BO ₃ | 55 g/l |
| • EDTA | 9,3 g |

Nanášací pufer

- | | |
|----------------------|-------|
| • Brómfenylová modrá | 20 µg |
| • Glycerol | 3 ml |
| • Destilovaná voda | 7 ml |

3.3.4 Spektrofotometrické meranie zákalu

Koncentrácia biomasy po ukončení produkcie bola stanovená pomocou turbidimetrie, meraním rozptylu svetla vo vzorku. Produkcia bola ukončená po 72 hodinách na trepačke pri teplote 50 °C. Odobraná vzorka produkčného média musela byť pre meraním vhodne nariadená, aby absorbanca bola v rozsahu 0,1 až 0,9. Vzorka bola následne meraná na spektrofotometri pri vlnovej 630 nm proti destilovanej vode. Meranie bolo prevedené v kvyete s optickou dráhou o dĺžke 1 cm.

3.3.5 Gravimetrické stanovenie biomasy

Po ukončení produkcie bolo z Erlenmeyerových baniek odobraných 10 ml suspenzie buniek. Suspenzia bola centrifugovaná pri 6 000 otáčkach za minútu po dobu 5 minút. Supernatant bol odliaty a k biomase bolo pridaných 0,5 ml destilovanej vody. Roztok bol následne rozsuspendovaný a kvantitatívne prevedený do skúmavky typu Eppendorf. Nasledovala centrifugácia pri 10 000 otáčkach za minútu po dobu 5 minút. Supernatant bol odliaty a biomasa bola vysušená v termostate pri konštantnej teplote 70 °C.

3.3.6 Optimalizácia pre produkciu PHA

3.3.6.1 Určenie vhodného minerálneho média

Boli pripravené dve minerálne médiá, ktorých zloženie je zobrazené v *tab. 6*. Po sterilizácii boli pridané uhlíkové substráty a bakteriálne inokulum. Kultivácia prebiehala na trepačke po dobu 72 hodín pri teplote 50 °C. Po ukončení kultivácie bola gravimetricky analyzovaná koncentrácia biomasy. Pomocou plynovej chromatografie s FID detektorom bola analyzovaná koncentrácia PHA.

3.3.6.2 Stanovenie zdroja uhlíka

Bakteriálna kultúra bola naočkovaná do inokula a kultivovaná na trepačke pri teplote 50 °C po dobu 24 hodín. Následne boli pripravené minerálne médiá s rôznym obsahom zdroja uhlíka. Na tento experiment boli použité uhlíkové substráty glukóza, fruktóza, glycerol, sacharóza,

slniečnicový olej, xylóza a laktóza o koncentrácií 20 g/l. Kultivácia prebiehala na trepačke po dobu 72 hodín pri teplote 50 °C.

3.3.6.3 Stanovenie využitia vybraných substrátov

Bolo pripravené minerálne médium MSM, 1,5x koncentrované. K minerálnemu médiu bol pridaný roztok stopových prvkov TES II v množstve 1 µl/ml a následne bolo pipetované pomocou multikanálovej pipety v množstve 100 µl do jamky. Následne bolo pridaných 50 µl daného substrátu podľa koncentrácie v tab. 10. Médiá so substrátom boli nakoniec zaočkované 20 µl inokula. Zároveň so vzorkami bol pripravený blank, ktorý pozostával zo 170 µl fyziologického roztoku. Doštička bola opatrená viečkom a zalepená parafilmom. Na ELISA readeru boli pri 630 nm premerané hodnoty absorbancií. Po premeraní bola doštička kultivovaná na trepačke po dobu 72 hodín pri teplote 50 °C. Po ukončení kultivácie boli premerané hodnoty absorbancií pri 630 nm a bol vyhodnotený nárast bunkových kultúr na jednotlivých substrátoch.

Tab. 10: Koncentrácie vybraných substrátov

Koncentrácia [g/l]		
20	4	8
Fruktóza	Acetát sodný	ε-kaprolakton
Glukóza	Propionát sodný	1,4-butándiol
Sacharóza	Kyselina valerová	1,6-hexándiol
D-xylóza	Kyselina levulová	γ-butyrolakton
Laktóza		
Galaktóza		
Glycerol		
Slniečnicový olej		

3.3.6.4 Stanovenie optimálnej teploty

Tento experiment je založený na kultivácii minerálneho média s obsahom uhlíkového zdroja pri rôznych teplotách. Jeho cieľom bolo zistiť optimálnu teplotu bakteriálnej kultúry pre produkciu PHA. Bakteriálna kultúra bola naočkovaná do inokula a kultivovaná na trepačke pri teplote 50 °C po dobu 24 hodín. Následne bolo pripravené minerálne médium. Do minerálnych médií bol pridaný uhlíkový substrát o koncentrácií 20 g/l. Kultivácia minerálnych médií prebiehala na trepačke po dobu 72 hodín pri rôznych teplotách. Skúmané teploty boli 45; 50; 55; 60 a 65 °C. Po ukončení kultivácie bola koncentrácia PHA analyzovaná pomocou plynovej chromatografie s FID detekciou.

3.3.7 Produkcia PHA za využitia prekurzorov

Cieľom tohto experimentu bolo sledovanie podpory produkcie P(3HB-co-3HV) a P(3HB) pomocou prekurzorov. Ako prekurzory boli použité kyselina levulová, kyselina valerová a 1,4-butándiol v koncentráciách 2 g/l. Bolo použité minerálne médium MSM. Do minerálneho média boli ihneď pred začatím kultivácie pridané prekurzory. Kultivácia prebiehala na trepačke pri teplote 50 °C po dobu 72 hodín. Po ukončení kultivácie bola koncentrácia P(3HB) a P(3HB-co-3HV) analyzovaná pomocou plynovej chromatografie s FID detektorom.

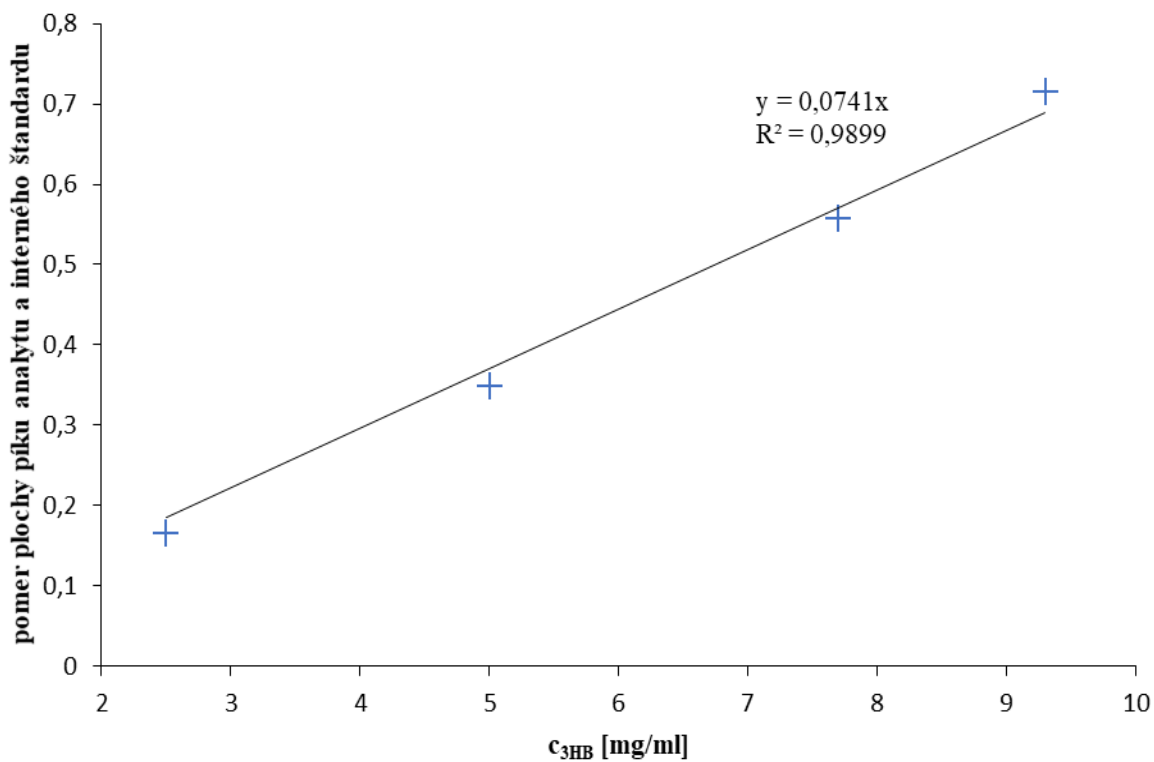
3.3.8 Stanovenie obsahu PHA pomocou plynovej chromatografie

Plynová chromatografia je analytická metóda založená na rozdelení stanovovanej látky medzi stacionárnu a mobilnú fázu. U plynovej chromatografie je mobilnou fázou plyn. Stacionárna fáza môže byť pevná látka alebo kvapalina. Princípom merania obsahu PHA vo vzorku je premena PHA na prchavý metylester β -hydroxykarboxylovej kyseliny pomocou kyslo katalyzovanej esterifikácie. Meranie na chromatografe prebieha pomocou detektora, ktorý detekuje signál a vyhodnocuje ho ako závislosť signálu detektoru na čase. V našom experimente bol používaný plynový chromatogram s FID detektorom.

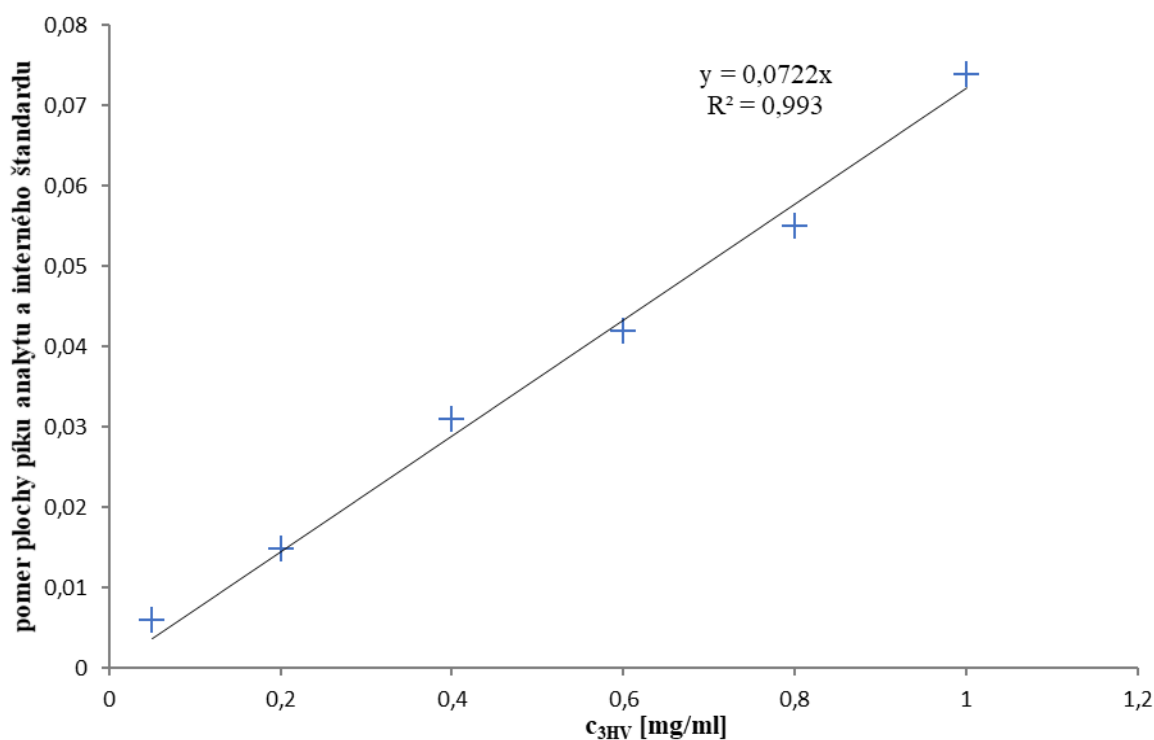
3.3.8.1 Kalibračná krivka

Kalibračná krivka bola zostavená pomocou štandardov P(3HB) a P(3HB-co-3HV) o koncentrácií 10 mg/ml, ktoré boli v množstvách 2,5; 5; 7,7 a 9,3 ml napipetované do vialiek. Následne boli doplnené do 1 ml chloroformom. K roztoku bolo pridaných 0,8 ml esterifikačnej zmesi s interným štandardom, ktorá bola zložená z 15% kyseliny sírovej rozpustenej v metanole a kyseliny benzoovej o koncentrácií 5 mg/ml. Vialky boli následne uzatvorené a umiestnené do termostatu, kde boli pri teplote 94 °C po dobu 3 hodín. Po vychladnutí boli obsahy vialiek zmiešané s 0,5 ml 0,05 mol/l NaOH a poriadne pretrepané. Po rozdelení fáz na vodnú a chloroformovú bolo pipetovaných 0,05 ml spodnej chloroformovej fázy a 0,95 ml chloroformu do skrutkovacej vialky s objemom 1 ml. Takto pripravené vzorky boli analyzované na plynovom chromatogafe s FID detektorom.

Kalibračné priamky (*obr. 5* a *obr. 6*) boli zostavené zo závislosti nameraných pomerov plôch pík analytu a interného štandardu na koncentrácií analytu. Rovnice lineárnej regresie boli použité pre výpočet koncentrácií 3HB a 3HV vo vzorkách.



Obr. 5: Kalibračná závislosť pomeru plochy píku analytu a interného štandardu na koncentrácií 3HB



Obr. 6: Kalibračná závislosť pomeru plochy píku analytu a interného štandardu na koncentrácií 3HV

Rovnica lineárnej regresie pre výpočet koncentrácie 3HB bola z obr. 5 stanovená na $y = 0,0741x$ a regresný koeficient na $R^2 = 0,9899$.

Rovnica lineárnej regresie pre výpočet koncentrácie 3HV bola z obr. 6 stanovená na $y = 0,0722x$ a regresný koeficient na $R^2 = 0,993$.

3.3.8.2 Stanovenie obsahu PHA v biomase

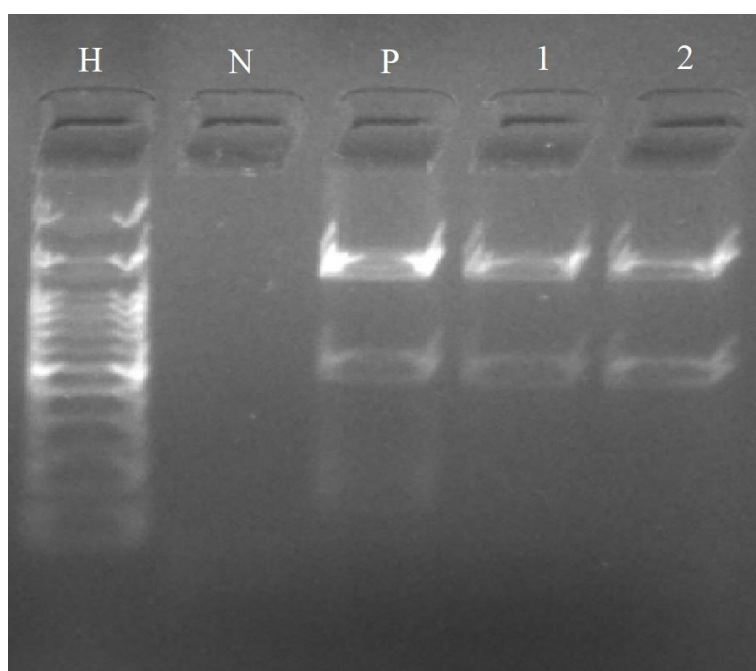
Na analytických váhach bolo navážených približne 10 mg vzorku biomasy s presnosťou na 1 mg. Do vialiek sa pridal 1 ml chloroformu a 0,8 ml esterifikačnej zmesi s interným štandardom, ktorá bola zložená z 15 % kyseliny sírovej rozpustenej v metanole a kyseliny benzoovej o koncentrácií 5 mg/ml. Následne boli vialky umiestnené do termostatu vyhriateho na 94 °C po dobu 3 hodín. Po vychladnutí bol obsah vialiek zmiešaný s 0,5 ml 0,05 mol/l NaOH a premiešaný. Po rozdelení fáz bolo odobraných 0,05 ml spodnej chloroformovej fázy a zmiešaných s 0,95 ml chloroformu v skrukovacej vialke. Vzorky boli následne analyzované plynovým chromatografom s FID detekciou.

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

4.1 Identifikácia *phaC* génu a bakteriálneho génu *16S* rRNA

Pre stanovenie schopnosti bakteriálneho kmeňa *Chelatococcus thermostellatus* produkovať PHA bola použitá metóda PCR – polymerázovej reťazovej reakcie. Pomocou metódy multiplex PCR bola genotypovo potvrdená prítomnosť génu pre produkciu PHA.

Pomocou tejto biologickej metódy boli amplifikované dva gény, a to gén *phaC*, ktorý kóduje PHA syntázu I. triedy a gén *16S* rRNA. Gén *16S* rRNA bol stanovovaný z dôvodu kontroly priebehu izolácie a amplifikácie DNA. Taktiež bola premeraná čistota vzorku DNA na základe pomeru absorbancií (A_{260}/A_{280}). Nameraný pomer absorbancií mal hodnotu 1,785 a vzorka mohla byť považovaná za čistú. Po multiplex PCR bola prevedená detekcia pomocou gélovej elektroforézy, ktorej výsledok je zachytený na obr. 7.



Obr. 7: Gélová elektroforéza: H – hmotnostný marker, N – negatívna kontrola, P – pozitívna kontrola, 1 – stanovovaná vzorka DNA 1x zriedená, 2 – stanovovaná vzorka DNA koncentrovaná

Cieľom tejto metódy bolo zistiť, či bakteriálny kmeň *Chelatococcus thermostellatus* obsahuje vo svojom genóme gén *phaC*, ktorý kóduje PHA syntázu. Taktiež bola zisťovaná prítomnosť bakteriálneho génu *16S* rRNA. Na obr. 7 môžeme vidieť dostatočne viditeľnú zónu zodpovedajúcu génu *16S* rRNA o veľkosti 1500 bp. Vďaka detekcií pomocou gélovej elektroforézy bolo potvrdené, že v genóme bakteriálneho kmeňa je prítomný gén *phaC*. Tento gén má dostatočne viditeľnú zónu a má veľkosť približne 500 bp. Môžeme predpokladať, že bakteriálny kmeň *Chelatococcus thermostellatus* má predispozíciu na produkciu PHA.

4.2 Optimalizácia podmienok pre produkciu PHA

V prvom experimente sme zistili, že bakteriálny kmeň *Chelatococcus thermostellatus* obsahuje v svojom genóme gén *phaC*, tým pádom má predispozíciu na produkciu PHA. V nasledujúcich experimentoch sme sa pokúsili nájsť čo najvhodnejšie podmienky bakteriálneho kmeňa pre produkciu P(3HB). Bola skúmané využitie rôznych zdrojov uhlíka pre rast, rôznych minerálnych médií a tiež rôzne kultivačné teploty. Taktiež bola zisťovaná schopnosť produkcie kopolyméru P(3HB-co-3HV) s prídavkom prekursorov.

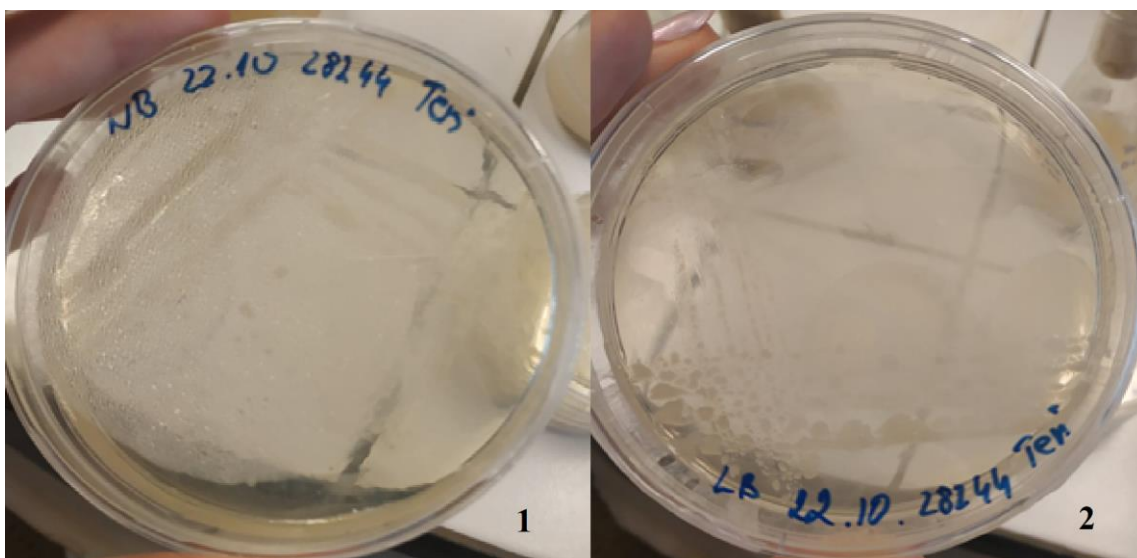
4.2.1 Výber vhodného komplexného média

V tomto experimente sme zisťovali nárast bakteriálneho kmeňa na dvoch rôznych komplexných médiách. Bolo testované komplexné médium Nutrient Broth a Luria-Bertani pomocou spektrofotometrického merania intenzity zákalu. Zloženia komplexných médií sú zobrazené v tab. 5.

Tab. 11: Výsledky merania spektrofotometrického zákalu po 24 hodinovej kultivácii na rôznych komplexných médiách

Komplexné médium	OD (630 nm)
Nutrient Broth	2,46 ± 0,13
Luria-Bertani	2,27 ± 0,20

V tab. 11 môžeme vidieť, že intenzita zákalu a tým pádom aj nárast bakteriálnej kultúry bol o niečo vyšší na komplexnom médiu Nutrient Broth.



Obr. 8: Nárast bakteriálnej kultúry na médiu na pevnej fáze (1 - Nutrient Broth; 1 - Luria-Bertani)

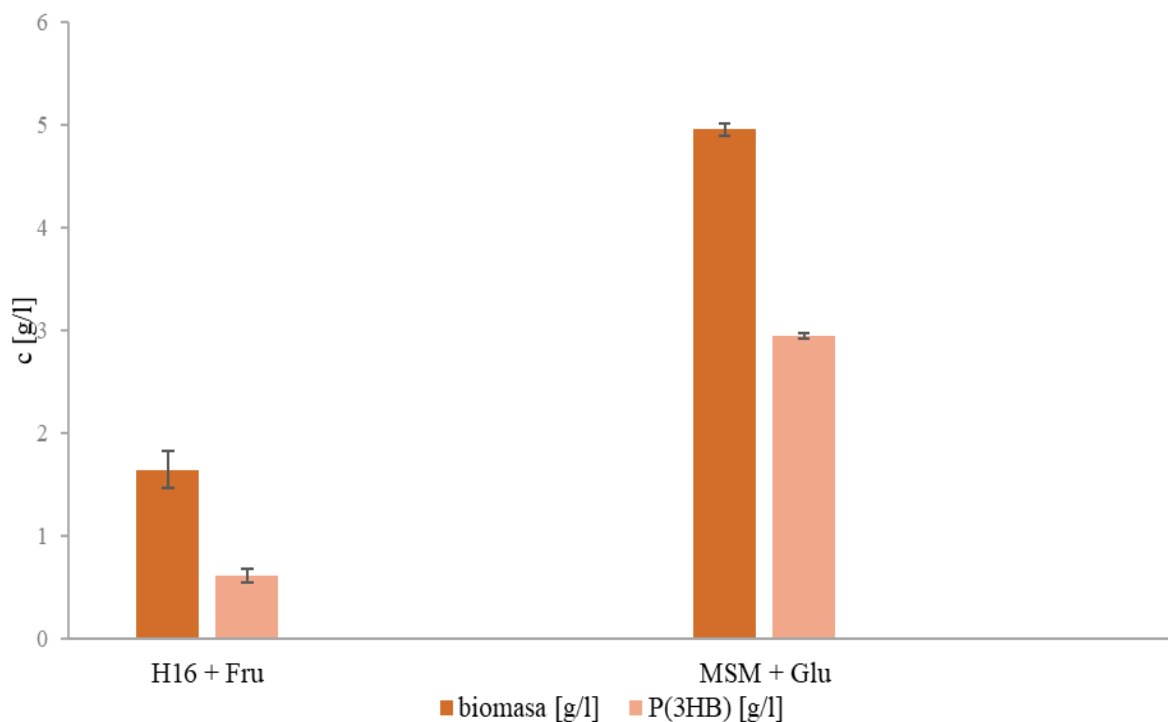
Na obr. 8 môžeme vidieť nárast bakteriálnej kultúry na komplexných médiách na pevnej fáze. Bakteriálna kultúra má vyšší nárast taktiež na komplexnom médiu Nutrient Broth. Podobné výsledky oboch komplexných médií môžu byť spôsobené ich veľmi podobným zložením, avšak bakteriálnej kultúre *Chelatococcus thermostellatus* viac vyhovovalo médium Nutrient Broth, ktoré bolo ďalej používané na tvorbu inokula.

4.2.2 Výber vhodného minerálneho média

V nasledujúcom experimente sme zisťovali nárast bakteriálneho kmeňa na dvoch rôznych minerálnych médiách. Boli testované minerálne médiá H16 a MSM, ktorých zloženia sú zobrazené v *tab. 6*. Pri použití minerálneho média H16 bola ako zdroj uhlíka použitá fruktóza a pri použití minerálneho média MSM bola použitá glukóza.

Na *obr. 9* môžeme vidieť, že produkciou na minerálnom médiu MSM je dosiahnutá koncentrácia biomasy skoro trojnásobne vyššia ako pri produkcii na minerálnom médiu H16. Koncentrácia biomasy pri produkcii na minerálnom médiu MSM dosahuje hodnoty 4,95 g/l. Koncentrácia P(3HB) na minerálnom médiu MSM dosahuje omnoho vyššie hodnoty ako na minerálnom médiu H16. Polymér má na MSM koncentráciu 2,94 g/l.

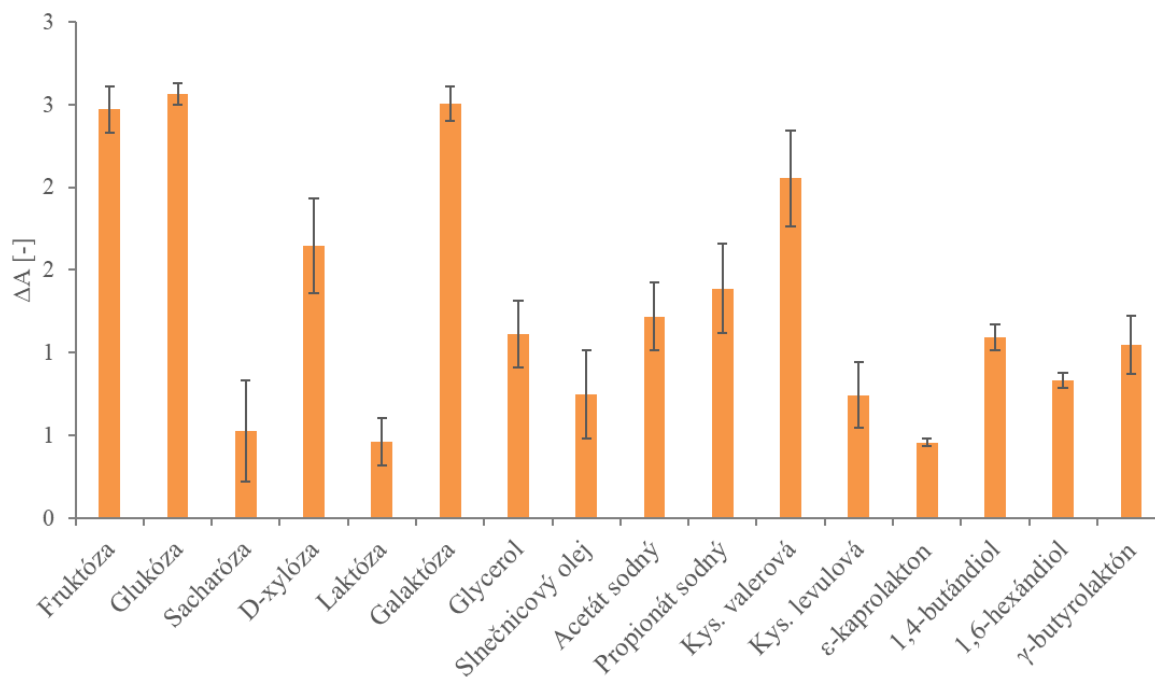
Z nameraných dát vyplýva, že bakteriálny kmeň *Chelatococcus thermostellatus* je schopnejší využívať minerálne médium MSM pre svoj rast a produkciu PHA, z dôvodu vyššej koncentrácie biomasy a taktiež vyššej koncentrácie P(3HB) v biomase. V nasledujúcich experimentoch bolo používané toto minerálne médium.



Obr. 9: Porovnanie produkcie biomasy a P(3HB) na rôznych minerálnych médiách.

4.2.3 Stanovenie využitia vybraných substrátov

V nasledujúcom experimente bolo zisťované, či je bakteriálny kmeň *Chelatococcus thermostellatus* schopný využitia vybraných substrátov. Bol sledovaný nárast bakteriálnej kultúry pomocou premerania intenzity zákalu a následného vypočítania rozdielu. Boli používané sacharidové zdroje (fruktóza, glukóza, sacharóza, D-xylóza, laktóza a galaktóza), nesacharidové zdroje (glycerol a slnečnicový olej), viacuhlíkaté kyseliny a ich soli (acetát sodný, propionát sodný, kyselina valerová a kyselina levulová) a kyslíkaté uhľovodíky (ϵ -kaprolaktón, 1,4-butándiol, 1,6-hexándiol a γ -butyrolaktón).



Obr. 10: Porovnanie využitia rôznych substrátov pre rast bakteriálneho kmeňa pomocou intenzít zákalu.

Na obr. 10 môžeme vidieť, že zo sacharidových zdrojov boli najviac využité fruktóza, glukóza a galaktóza. Celkovo najvyšší nárast bakteriálnej kultúry bol zaznamenaný pri použití glukózy ako uhlíkového zdroja. Veľmi podobný nárast kultúry bol zaznamenaný pri použití galaktózy, čo môže byť spôsobené veľmi podobnou štruktúrou týchto dvoch sacharidov. Použitím disacharidov sacharóza a laktózy bol nárast bakteriálnej kultúry nízky. Môžeme povedať, že bakteriálna kultúra lepšie využíva monosacharidy, ktoré sa skladajú zo šiestich uhlíkov a disacharidy nie je schopná dostatočne využívať.

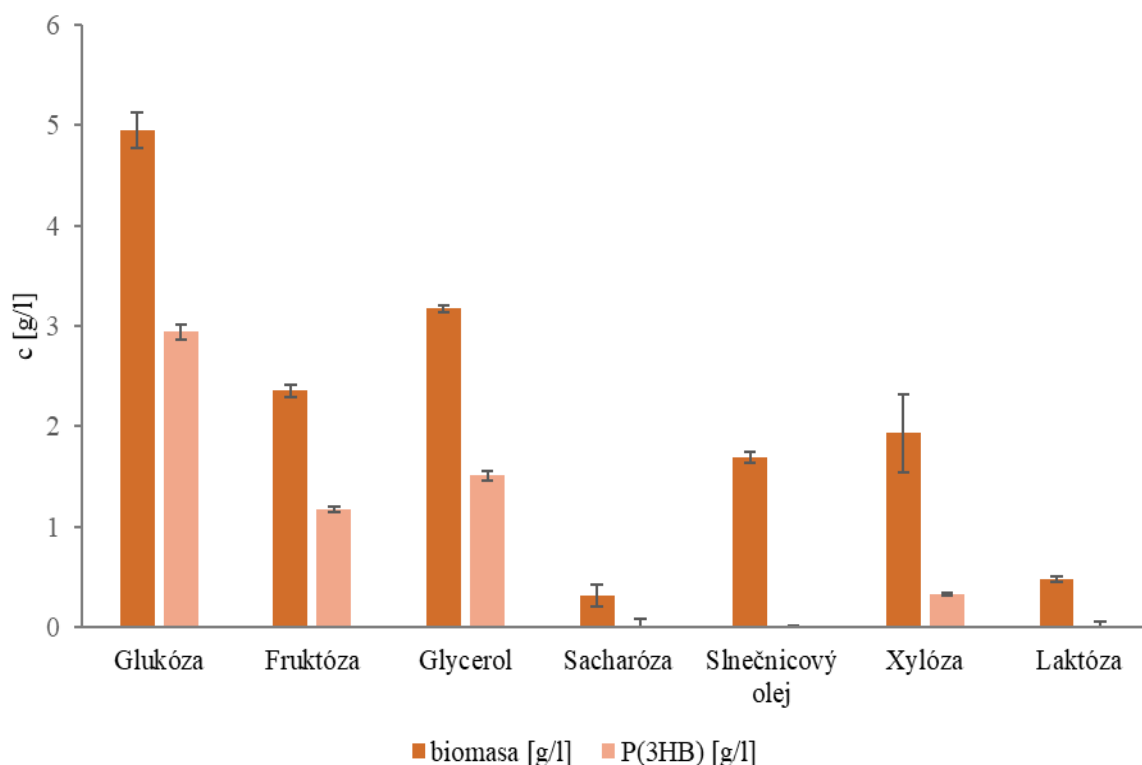
Pri použití viacuhlíkatých kyselín bolo zistené, že bakteriálna kultúra pre svoj rast najlepšie využíva kyselinu valerovú. Kyselina valerová obsahuje najviac atómov uhlíka zo všetkých skúmaných kyselín. Bakteriálna kultúra je podľa našich zistení schopná využívať kyseliny s väčším počtom atómov uhlíka. Kyselina levulová (kyselina 4-oxovalerová) je substitučný derivát kyseliny valerovej. Na štvrtom atóme uhlíka je naviazaná keto skupina. Pri jej použití ako uhlíkového zdroja sa rast bakteriálnej kultúry znížil o viac ako polovicu oproti kyseline valerovej. Podľa tohto zistenia nie je bakteriálna kultúra schopná dostatočne využívať substitučné deriváty viacuhlíkatých kyselín.

Pri skúmaní využitia dvojsýtnych alkoholov bakteriálnou kultúrou sme zistili, že ani pri použití 1,4-butándiolu ani 1,6-hexándiolu nebol nárast kultúry vysoký. Pri použití laktónov ako zdrojov uhlíka bolo zistené, že bakteriálna kultúra pre svoj rast lepšie využíva cyklus s menším počtom atómov uhlíka, avšak jej rast taktiež nebol vysoký.

4.2.4 Výber najvhodnejšieho uhlíkového substrátu

V tomto experimente bola sledovaná produkcia PHA na rôznych uhlíkových substrátoch. Boli využité nesacharidové zdroje (olej a glycerol) a sacharidové zdroje (glukóza, fruktóza, sacharóza, xylóza a laktóza).

Na obr. 11 môžeme vidieť, že najvhodnejším uhlíkovým substrátom zo sacharidov je glukóza. Koncentrácia biomasy pri kultivácii na minerálnom médiu s obsahom glukózy bola 4,95 g/l. Ako najvhodnejší uhlíkový substrát z nesacharidových zdrojov je glycerol. Pri kultivácii s glycerolom dosiahla koncentrácia biomasy hodnotu 3,17 g/l.



Obr. 11: Porovnanie produkcie biomasy a P(3HB) pri použití rôznych uhlíkových substrátov.

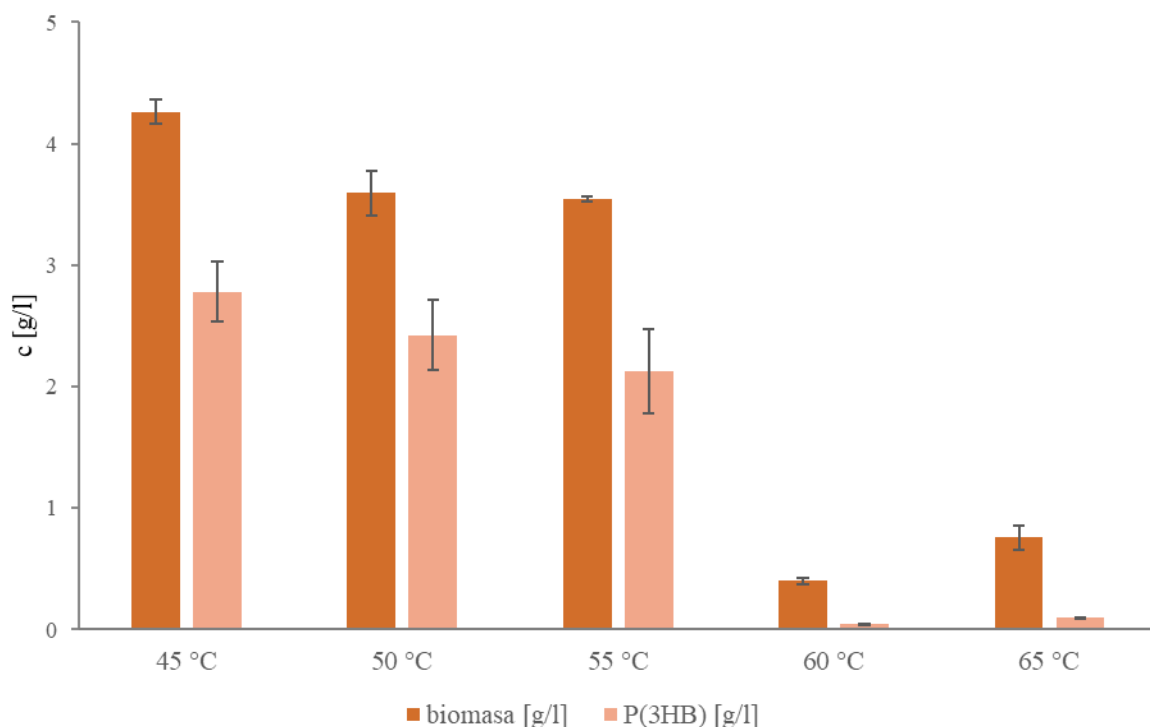
Bakteriálna kultúra bola schopná najlepšie využiť uhlíkové zdroje glukózu, fruktózu a glycerol ako na rast biomasy, tak aj na produkciu P(3HB). Ostatné uhlíkové zdroje neboli vhodné pre použitie, z dôvodu nízkej produkcie P(3HB). Celkovo najlepším uhlíkovým substrátom bola glukóza. Pri jej použití bola taktiež preukázaná najvyššia koncentrácia vyprodukovaného polyméru. Koncentrácia P(3HB) pri použití glukózy bola 2,94 g/l. Koncentrácia biomasy pri uhlíkovom zdroji fruktóze bola skoro o polovicu nižšia než pri glukóze. Taktiež bola nižšia produkcia P(3HB). Mohlo to byť spôsobené tým, že bakteriálna kultúra je prispôbená na lepšie využívanie šesťuhlíkatých sacharidov s aldehydovou

skupinou. Zo sacharidových zdrojov boli ďalej skúmané xylóza, sacharóza a laktóza. Koncentrácia biomasy pri uhlíkovom zdroji xylóze bola o viac ako polovicu nižšia ako pri použití glukózy. Koncentrácia polyméru nedosahovala vysokých hodnôt, konkrétne 0,32 g/l. Dôvodom takejto nízkej produkcie môže byť neschopnosť bakteriálnej kultúry využívať päťuhlíkaté sacharidy. Koncentrácia biomasy pri použití sacharózy a laktózy ako uhlíkové zdroje dosahovala veľmi nízke hodnoty, čo je v súlade s predchádzajúcim experimentom. Pri použití týchto dvoch disacharidov nebola zaznamenaná produkcia P(3HB), čo môže byť spôsobené tým, že bakteriálna kultúra nie je prispôbená na využívanie disacharidov ako uhlíkový zdroj.

Pri použití nesacharidového zdroja glycerolu bola zaznamenaná druhá najvyššia koncentrácia biomasy. Polymér P(3HB) tvoril polovicu obsahu biomasy. Môžeme povedať, že bakteriálna kultúra je schopná využívať ako uhlíkový substrát nie len sacharid, ale aj nesacharidový zdroj, konkrétne glycerol. Zároveň však nie je schopná ho využívať v tak množstve ako monosacharid glukózu.

4.2.5 Optimalizácia produkcie pri rôznych teplotách

Použitý bakteriálny kmeň *Chelatococcus thernostellatus* je termofilný mikroorganizmus, ktorý je schopný rásť v rozmedzí teplôt 37 – 55 °C. V tomto experimente sme zisťovali optimálnu teplotu na produkciu biopolyméru PHA. Kultivácia prebiehala na minerálnom médiu MSM a skúmané teploty boli 45, 50, 55, 60 a 65 °C. Ako zdroj uhlíka bola použitá glukóza.



Obr. 12: Porovnanie produkcie biomasy a P(3HB) pri rôznych kultivačných teplotách.

Na obr. 12 môžeme vidieť, že bakteriálna kultúra dosahovala najvyššie koncentrácie biomasy pri teplotách 45, 50 a 55 °C. Pri týchto teplotách sa koncentrácia polyméru P(3HB) v g/l od

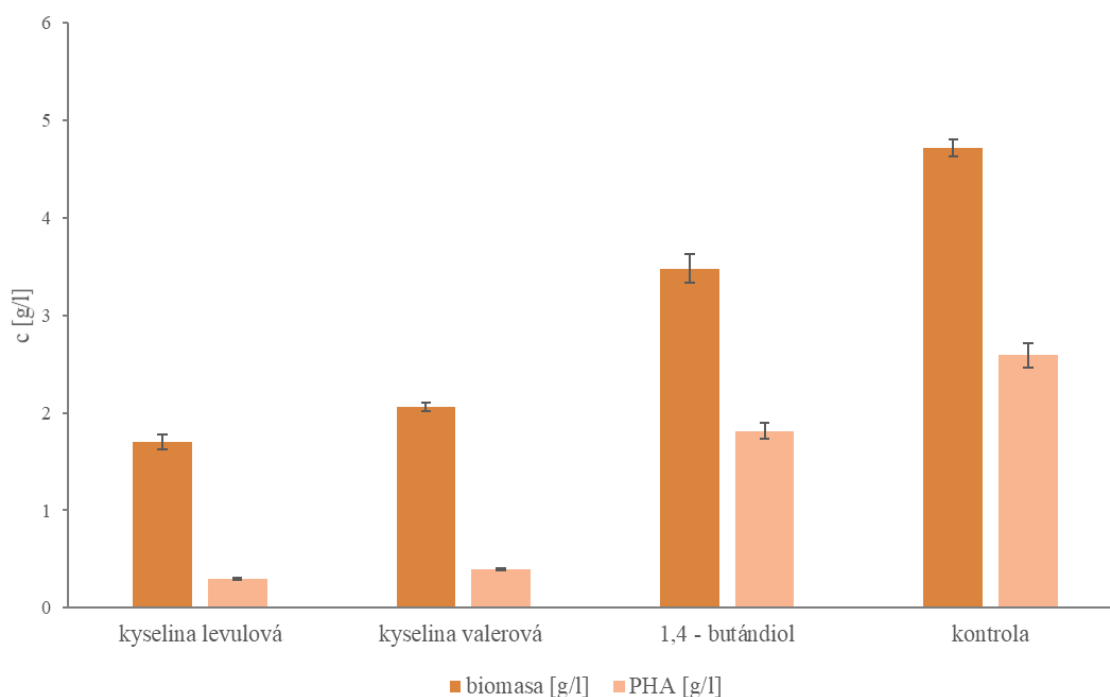
seba veľmi nelíšila. Najvyššia koncentrácia biomasy bola dosiahnutá pri kultivačnej teplote 45 °C, kde bola aj najvyššia koncentrácia polyméru. Pri teplote vyššej ako 55 °C koncentrácia biomasy prudko klesla, čo bolo spôsobené inhibíciou rastu bakteriálnej kultúry vysokou teplotou. Taktiež bola pri týchto teplotách zaznamenaná veľmi nízka produkcia polyméru P(3HB).

Experimentom zistená optimálna teplota pri rast kultúry aj produkciu P(3HB) bola 45 °C, čo je odlišná teplota, ako je uvedená v odbornej literatúre.

4.3 Produkcia PHA za využitia prekurzorov

V tomto experimente bolo sledované, či je bakteriálny kmeň *Chelatococcus therrmostellatus* schopný produkcie kopolyméru P(3HB-co-3HV) a P(3HB-co-4HB) po prídavku prekurzorov (kyselina valerová, kyselina levulová a 1,4-butándiol). Produkcia kopolymérov za využitia prekurzorov bola skúmaná z dôvodu lepších vlastností týchto materiálov oproti P(3HB).

Produkcia prebiehala pri optimálnej teplote 50 °C a ako uhlíkový zdroj bola použitá glukóza. Kontrolná kultivácia prebiehala bez prídavku prekurzoru.



Obr. 13: Porovnanie produkcie PHA s biomasou po prídavku prekurzorov.

Tab. 12: Výsledky produkcie PHA a kopolymérov za využitia prekurzorov.

	biomasa [g/l]	% PHA	PHA [g/l]	zloženie kopolyméru [%]
kyselina levulová	1,71 ± 0,08	17,23 ± 0,1	0,29 ± 0,01	-
kyselina valerová	2,06 ± 0,04	19,26 ± 0,83	0,39 ± 0,01	70,24% 3HB : 29,76% 3HV
1,4 - butándiol	3,48 ± 0,15	52,16 ± 0,09	1,82 ± 0,08	98,23% 3HB : 1,77% 4HB
kontrola	4,72 ± 0,09	54,87 ± 1,57	2,59 ± 0,12	-

Všeobecne môžeme povedať, že prídavok testovaných prekursorov kyseliny valerovej a levulovej výrazne inhiboval rast bakteriálnej kultúry v porovnaní s kontrolnou kultiváciou. Výraznejší nárast koncentrácie biomasy bol zaznamenaný pri použití 1,4-butándiolu ako prekursoru. 1,4-butándiol sa preukázal ako najvýnosnejší z hľadiska nárastu biomasy, z čoho vyplýva, že bol so skúmaných prekursorov najmenej toxický.

Na *obr. 13* môžeme vidieť, že najvyšší nárast PHA bol dosiahnutý pri kultivácií s použitím 1,4-butándiolu ako prekursoru. V *tab. 12* môžeme vidieť, že pri tejto kultivácií bola zaznamenaná produkcia kopolyméru P(3HB-co-4HB). Percentuálne zastúpenie 4HB v celkovom obsahu PHA bolo však iba 1,77%. Produkcia kopolyméru P(3HB-co-3HV) nastala iba pri použití prekursoru kyseliny valerovej. Percentuálne zastúpenie 3HV v celkovom obsahu PHA bolo 29,76%. Pri použití kyseliny levulovej ako prekursoru bola zaznamenaná produkcia PHA, avšak toto množstvo bolo minimálne. Môžeme teda povedať, že bakteriálny kmeň *Chelatococcus themostellatus* je schopný syntézy ako kopolyméru P(3HB-co-3HV), tak aj kopolyméru P(3HB-co-4HB). Kyselina valerová aj 1,4-butándiol boli pridávané v koncentrácií 2 g/l, čo môže byť už veľmi vysoká koncentrácia pre danú bakteriálnu kultúru. Táto koncentrácia pôsobí toxicky a inhibuje ako rast kultúry, tak aj syntézu PHA. Pre ďalšie skúmanie by bolo lepšie pridať prekursor v nižšej koncentrácií, napríklad 0,5 g/l.

5 ZÁVER

Cieľom bakalárskej práce bolo štúdium produkcie polyhydroxyalkanoátov pomocou termofilnej baktérie *Chelatococcus thermostellatus* pri rôznych podmienkach. V experimentálnej časti bola pomocou metódy multiplex PCR zisťovaná prítomnosť génu *phaC*. Tento gén kóduje PHA syntázu, ktorá je zodpovedná za produkciu polyhydroxyalkanoátov. V bakteriálnom kmeni *Ch. thermostellatus* bola detekovaná prítomnosť tohto génu, čo znamená, že baktéria má predispozíciu k produkcii scl-PHA.

Boli študované vhodné podmienky pre produkciu PHA. Ako prvé bolo určené vhodné komplexné médium na tvorbu inokula. Spektrofotometricky bolo ako najvhodnejšie určené komplexné médium Nutrient Broth, ktoré bolo používané v nasledujúcich experimentoch.

Následne bolo určované najvhodnejšie minerálne médium pre nárast biomasy. Zo skúmaných minerálnych médií bolo ako vhodnejšie určené minerálne médium MSM. Koncentrácia biomasy na tomto minerálnom médiu dosahovala takmer trojnásobne vyššie hodnoty ako na druhom skúmanom minerálnom médiu H16.

Na štúdium vhodného uhlíkového zdroja boli využité sacharidové a nesacharidové zdroje. Pomocou plynovej chromatografie s FID detektorom bol stanovený obsah vyprodukovaného PHA. Zo sacharidových zdrojov bola najvhodnejším substrátom glukóza. Pri jej použití dosahovala ako koncentrácia biomasy, tak aj koncentrácia P(3HB) najvyššie hodnoty. Konkrétne bola koncentrácia vyprodukovaného polyméru 2,92 g/l. Z nesacharidových zdrojov bola najvyššia koncentrácia biomasy dosiahnutá na uhlíkovom zdroji glycerole. Avšak táto koncentrácia bola o viac ako 1 g/l nižšia ako pri glukóze. Pre ďalšie experimenty bola ako zdroj uhlíka používaná glukóza.

Bakteriálny kmeň patrí medzi termofilné mikroorganizmy, preto bola zisťovaná najvhodnejšia teplota pre produkciu PHA. Z katalógu baktérií bolo ako optimálna teplota určených 50 °C. V experimente boli testované teploty 45, 50, 55, 60 a 65 °C. Ako najvhodnejšia teplota pre rast bakteriálnej kultúry bola určená teplota 45 °C. Percentuálny obsah vyprodukovaného PHA bol pri teplotách 45, 50 a 55 °C rovnaký. Pri teplotách 60 a 65 °C boli rast biomasy a syntéza PHA inhibované vysokou teplotou.

V poslednom experimente bol sledovaný vplyv použitých prekurzorov na produkciu kopolymérov P(3HB-co-3HV) a P(3HB-co-4HB). Použitím prekurzoru 1,4-butándiolu bola zaznamenaná produkcia kopolyméru P(3HB-co-4HB), avšak obsah 4HB nedosahoval vysokých hodnôt (1,77 %). Pri použití kyseliny valerovej ako prekurzoru bola zaznamenaná produkcia kopolyméru P(3HB-co-3HV). Obsah 3HV v celkovom obsahu PHA dosahoval hodnotu 29,76 %. Celková koncentrácia PHA pri použití kyseliny valerovej však nedosahovala vysokých hodnôt (19,26 %). Nízky obsah 4HB mohol byť spôsobený vysokou koncentráciou použitého prekurzoru, ktorá pôsobila inhibične na rast bakteriálnej kultúry. Do budúcnosti by bolo vhodné pri skúmaní využitia prekurzorov použiť nižšie koncentrácie a tiež prídavok po 24 hodinách.

6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] RAZA, Zulfiqar Ali, Sharjeel ABID a Ibrahim M. BANAT. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. 2018, 126, 45-56. DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.10.001. ISSN 09648305. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830517300276>
- [2] SUDESH, K, H ABE a Y DOI. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*. 2000, **25**(10), 1503-1555. DOI: 10.1016/S0079-6700(00)00035-6. ISSN 00796700. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670000000356>
- [3] STETTER, Karl O. History of discovery of the first hyperthermophiles. *Extremophiles*. 2006, **10**(5), 357-362. DOI: 10.1007/s00792-006-0012-7. ISSN 1431-0651. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00792-006-0012-7>
- [4] LOO, C.-Y., SUDESH, K.: Polyhydroxyalkanoates: Bio-based microbial plastics and their properties. *Malaysian Polymer Journal*. 2007, vol. 2, no. 2, p 31-57.
- [5] CHEN, Guo-Qiang. Plastics from bacteria: Natural functions and applications. New York: Springer, 2010. *Microbiology monographs*, 14. ISBN 978-3-642-03286-8.
- [6] AKARAONYE, Everest, Tajalli KESHAVARZ a Ipsita ROY. Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. *Journal of Chemical Technology*. 2010, **85**(6), 732-743. DOI: 10.1002/jctb.2392. ISSN 02682575. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.2392>
- [7] KESHAVARZ, Tajalli a Ipsita ROY. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*. 2010, **13**(3), 321-326. DOI: 10.1016/j.mib.2010.02.006. ISSN 13695274. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527410000275>
- [8] VERLINDEN, R.A.J., D.J. HILL, M.A. KENWARD, C.D. WILLIAMS a I. RADECKA. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*. 2007, **102**(6), 1437-1449. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x. ISSN 1364-5072. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x>
- [9] PHILIP, S., KESHAVARZ, T., ROY, I.: Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2007, vol. 82, p. 233-247. ISSN 0268-2575.
- [10] BHATI, Ranjana a Nirupama MALLICK. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production by the diazotrophic cyanobacterium *Nostoc muscorum* Agardh: Process optimization and polymer characterization. *Algal Research*. 2015, 7, 78-85. DOI: 10.1016/j.algal.2014.12.003. ISSN 22119264. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211926414001350>
- [11] NOMURA, Christopher T. a Seiichi TAGUCHI. PHA synthase engineering toward superbio-catalysts for custom-made biopolymers. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006, **73**(5), 969-979. DOI: 10.1007/s00253-006-0566-4. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-006-0566-4>

- [12] REHM, Bernd H. A. Genetics and Biochemistry of Polyhydroxyalkanoate Granule Self-assembly: The Key Role of Polyester Synthases. *Biotechnology Letters*. 2006, **28**(4), 207-213. DOI: 10.1007/s10529-005-5521-4. ISSN 0141-5492. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-005-5521-4>
- [13] LAYCOCK, B., P. HALLEY, S. PRATT, A. WERKER a P. LANT. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Progress in Polymer Science*. 2013, **38**(3-4), 536-583. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2012.06.003.
- [14] CHANPRATEEP, Suchada. 2010. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **110**(6): 621-632. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2010.07.014. ISSN 13891723. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172310002525>
- [15] BASTIOLI, Catia. *Handbook of biodegradable polymers*. Shrewsbury: Rapra Technology, 2005. ISBN 978-1-85957-389-1.
- [16] VOLOVA, T.G., A.N. BOYANDIN, A.D. VASILIEV, et al. Biodegradation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) in tropical coastal waters and identification of PHA-degrading bacteria. *Polymer Degradation and Stability*. 2010, **95**(12), 2350-2359. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2010.08.023. ISSN 01413910. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391010003642>
- [17] CHEN, Guo-Qiang a Xiao-Ran JIANG. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. 2018, **50**, 94-100. DOI: 10.1016/j.copbio.2017.11.016. ISSN 09581669. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166917301519>
- [18] FUKUDA, Hideki, Akihiko KONDO a Sriappareddy TAMALAMPUDI. Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. *Biochemical Engineering Journal*. 2009, **44**(1), 2-12. DOI: 10.1016/j.bej.2008.11.016. ISSN 1369703X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X08003835>
- [19] ANTRANIKIAN, Garabed a Ksenia EGOROVA. Extremophiles, a Unique Resource of Biocatalysts for Industrial Biotechnology. *Physiology and Biochemistry of Extremophiles*. American Society of Microbiology, 2007, , 361-406. DOI: 10.1128/9781555815813.ch27. ISBN 9781555814229. Dostupné také z: <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555815813.ch27>
- [20] JOHNSON, D.B. Selective solid media for isolating and enumerating acidophilic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 1995, **23**(2), 205-218. DOI: 10.1016/0167-7012(95)00015-D. ISSN 01677012. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016770129500015D>
- [21] KRULWICH, Terry Ann. Bioenergetics of alkalophilic bacteria. *The Journal of Membrane Biology*. 1986, **89**(2), 113-125. DOI: 10.1007/BF01869707. ISSN 0022-2631. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF01869707>
- [22] YIN, Jin, Jin-Chun CHEN, Qiong WU, Guo-Qiang CHEN a Helga STAN-LOTTER. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Applied Microbiology and*

- Biotechnology*. 2010, **87**(3), 1119-1127. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.10.008. ISBN 10.1016/j.biotechadv.2014.10.008. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975014001578>
- [23] PACKCHUNG, Amalie A. H., SIMPSON, Philippa J.L, CODD, Rachel. Life on earth. Extremophiles continue to move the goal posts. *Environmental chemistry*. 2006, vol. 3, no. 2, s. 77-93.
- [24] KRISTJANSSON, Jakob K. a Karl O. STETTER. *Thermophilic Bacteria*. 1. Reykjavík: CRC Press, 1992. ISBN 0-8493-5239-8.
- [25] CLARKE, Andrew, G. John MORRIS, Fernanda FONSECA, Benjamin J. MURRAY, Elizabeth ACTON, Hannah C. PRICE a Josh NEUFELD. A Low Temperature Limit for Life on Earth. *PLoS ONE*. 2013, **8**(6). DOI: 10.1371/journal.pone.0066207. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0066207>
- [26] PANKOWSKI, Jarosław A., Stephanie M. PUCKETT, Francis E. NANO a R. M. KELLY. Temperature Sensitivity Conferred by ligA Alleles from Psychrophilic Bacteria upon Substitution in Mesophilic Bacteria and a Yeast Species. *Applied and Environmental Microbiology*. 2016, **82**(6), 1924-1932. DOI: 10.1128/AEM.03890-15. ISSN 0099-2240. Dostupné také z: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.03890-15>
- [27] KOGA, Yosuke. Thermal Adaptation of the Archaeal and Bacterial Lipid Membranes. *Archaea*. 2012, **2012**, 1-6. DOI: 10.1155/2012/789652. ISSN 1472-3646. Dostupné také z: <http://www.hindawi.com/journals/archaea/2012/789652/>
- [28] NAKASHIMA, H. Compositional Changes in RNA, DNA and Proteins for Bacterial Adaptation to Higher and Lower Temperatures. *Journal of Biochemistry*. **133**(4), 507-513. DOI: 10.1093/jb/mvg067. ISSN 0021924X. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/jb/article-lookup/doi/10.1093/jb/mvg067>
- [29] FUKUCHI, Satoshi a Ken NISHIKAWA. Protein surface amino acid compositions distinctively differ between thermophilic and mesophilic bacteria. *Journal of Molecular Biology*. 2001, **309**(4), 835-843. DOI: 10.1006/jmbi.2001.4718. ISSN 00222836. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283601947187>
- [30] 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*. 2016, **6**(1). DOI: 10.1186/s13568-016-0209-9. ISSN 2191-0855. Dostupné také z: <http://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-016-0209-9>
- [31] GARIBYAN, Lilit a Nidhi AVASHIA. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 2013, 133(3), 1-4 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1038/jid.2013.1. ISSN 0022202X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X1536139X>
- [32] ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. ISBN 978-802-1440

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

PHA - polyhydroxyalkanoát

P(3HB) – poly(3-hydroxybutyrát)

P(4HB) – poly(4-hydroxybutyrát)

P(3HB-*co*-3HV) – poly(3-hydroxybutyrát-*co*-3-hydroxyvalerát)

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

P(3HHx) – poly(3-hydroxyhexanoát)

P(3HO) – poly(3-hydroxyoktanoát)

P(3HDD) – poly(3-hydroxydodekanoát)

scl-PHA – short-chain-length PHA

mcl-PHA – medium-chain-length PHA

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EDTA – kyselina etyléndiamíntetraoctová

TBE – *tris*-borát-EDTA

FID – detekcia s plameňovou ionizáciou (Flame ionization detection)