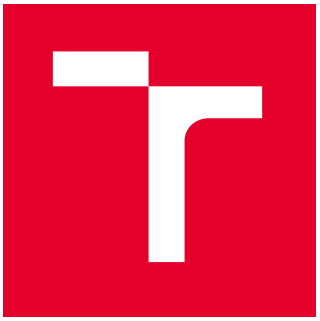


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

PRODUKCE KOPOLYMERŮ NA BÁZI POLYHYDROXYALKANOÁTŮ POMOCÍ BAKTERIE SCHLEGELELLA THERMODEPOLYMERANS

PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATES BY BACTERIUM SCHLEGELELLA THERMODEPOLYMERANS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE — **Vojtěch Černý**

AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE — **Ing. Iva Pernicová, Ph.D.**

SUPERVISOR

BRNO 2023

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ

Zadání bakalářské práce

Číslo práce:	FCH-BAK1748/2022	Akademický rok: 2022/23
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student:	**Vojtěch Černý**	
Studijní program:	Chemie pro medicínské aplikace	
Studijní obor:	bez specializace	
Vedoucí práce:	**Ing. Iva Pernicová, Ph.D.**	

Název bakalářské práce:

Produkce kopolymerů na bázi polyhydroxyalkanoátů pomocí bakterie Schlegelella thermodepolymerans

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na zadané téma – produkce PHA polymerů pomocí termofilních mikroorganismů
2. Studium schopnosti S. thermodepolymerans inkorporovat různé prekurzory do struktury PHA
3. Charakterizace připravených materiálů

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2023:

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

Vojtěch Černý student	Ing. Iva Pernicová, Ph.D. vedoucí práce	prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc. vedoucí ústavu

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

V Brně dne 1.2.2023

ABSTRAKT

Cílem této práce bylo prostudovat schopnost různých kmenů termofilní bakterie *Schlegelella thermodepolymerans* inkorporovat do struktury polyhydroxyalkanoátů (PHA) různé monomerní jednotky a tvořit tak kopolymery. Byly testovány prekurzory pro produkci monomerů mcl-PHA, 4-hydroxybutyrátu (4HB) a 3-hydroxyvylerátu (3HV). Teoretická část práce pojednává o charakteristice studovaných polymerů, jejich vlastnostech a využití, a také o termofilních organismech a jejich možnosti uplatnění v průmyslu. V experimentální části práce byly prováděny kultivace s různými prekurzory, u kterých se měnily časy přidání a koncentrace. Během těchto kultivací byly použity čtyři bakteriální kmeny *S. thermodepolymerans* pocházející z různých veřejných sbírek mikroorganismů. Po sérii prvotních screeningů byl vyhodnocen jako nejlepší prekurzor kyselina levulová přidaná v čase zaočkování produkčního média inokulem. Následně byla provedena kultivační série koncentrační řady, kde bylo zjišťováno, zda úprava koncentrace prekurzoru ovlivní složení kopolymeru. Při zvyšování množství prekurzoru klesalo množství biomasy a PHA, avšak vznikly velmi zajímavé materiály s vysokým obsahem 3HV. Při přidání 8 g/l prekurzoru to bylo až 52 %. Nakonec byla u vzniklých materiálů zjištěna molekulová váha polymeru pomocí gelové permeační chromatografie (SEC) s detektorem statického rozptylu světla ve více úhlech (MALS).

ABSTRACT

The aim of this work was to study capability of various strains of thermophilic bacteria *Schlegelella thermodepolymerans* incorporate diverse monomer units to structure of polyhydroxyalkanoates (PHA). Precursors for production mcl-PHA, 4-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate were tested. The theoretical part deals with characteristic of studied polymers, properties and applications and usage of thermophilic bacteria in industry. In experimental part there were undergone cultivations with different precursors, which were added in different times and concentrations. Four bacterial strains *S. thermodepolymerans* from various public collections of microorganisms were used during these cultivations. Levulinic acid, added at start of cultivation, was chosen as the best precursor. Afterwards there was cultivation with concentration line to find out, whether concentration influence composition of copolymer. Increasing the amount of precursor led to decreasing quantity of biomass and PHA, but there were very interesting materials with high amount of 3HV. Addition 8 g/l of precursor led up to 52 %. Subsequently there was found out molecular height of polymers by size-excluion chromatography (SEC) combined with multi-angle light scattering (MALS).

KLÍČOVÁ SLOVA

Polyhydroxyalkanoáty (PHA), termofilní bakterie, *Schlegelella thermodepolymerans*

KEYWORDS

Polyhydroxyalkanoates (PHA), thermophilic bacteria, *Schlegelella thermodepolymerans*

MOJE CITACE

ČERNÝ, Vojtěch. *Produkce kopolymerů na bázi polyhydroxyalkanoátů pomocí bakterie Schlegelella thermodepolymerans.* Brno, 2023. Dostupné také z: https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/148652. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Iva Pernicová.

PROHLÁŠENÍ

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

……

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval vedoucí mé bakalářské práce Ing. Ivě Pernicové, Ph.D. za odborné vedení, inspiraci při studiu a velkou trpělivost. Mé poděkování patří též konzultantkám Ing. Veronice Řehákové a Ing. Xenii Kouřilové za ochotu a pomoc v laboratoři a s organizací a uskutečněním experimentů. Chci poděkovat i své rodině a nejbližším, kteří při mně stáli a podporovali mě během celého studia.

OBSAH

1. ÚVOD 7
2. TEORETICKÁ ČÁST 8
   2.1. Polyhydroxyalkanoáty 8
      2.1.1. Biosyntéza a metabolismus PHA 9
      2.1.2. PHA syntázy 11
   2.2. Funkce PHA v bakteriích 11
   2.3. Vlastnosti PHA 12
   2.4. Využití PHA 12
   2.5. Termofilní mikroorganismy 14
   2.6. Využití termofilních organismů 15
   2.7. Termofilní producenti PHA 15
      2.7.1. *Caldimonas taiwanensis* 15
      2.7.2. Schlegelella thermodepolymerans 16
      2.7.3. Chelatococcus daeguensis 16
      2.7.4. Aneurinibacillus 17
   2.8. Využití termofilních bakterií při produkci kopolymerů na bázi PHA 17
      2.8.1. Kopolymery PHA 17
      2.8.2. Poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) 17
      2.8.3. Poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyhexanoát) 17
      2.8.4. Aplikace kopolymerů 18
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 20
   3.1. Použité chemikálie, přístroje a mikroorganismy 20
      3.1.1. Použité mikroorganismy 20
      3.1.2. Použité chemikálie 20
      3.1.3. Přístrojové vybavení 21
   3.2. Kultivace bakterií 21
      3.2.1. Příprava inokulačního média 21
      3.2.2. Příprava a složení produkčního média 22
      3.2.3. Produkce kopolymerů 3HB a mcl-PHA 24
      3.2.4. Produkce kopolymerů PHA s obsahem 3HB a 4HB 24
      3.2.5. Produkce kopolymerů PHA s obsahem 3HB a 3HV 24

3.3. Použité metody 24
3.3.1. Stanovení optické hustoty spektrofotometricky 24
3.3.2. Stanovení obsahu biomasy gravimetricky 25
3.3.3. Příprava vzorků na GC-FID analýzu PHA 25
3.3.4. Sledování změn v molekulové hmotnosti PHA pomocí SEC-MALS 25
4. VÝSLEDKY A DISKUZE 27
4.1. Optimalizace produkce kopolymerů 27
4.1.1. Screening produkce kopolymerů mcl-PHA 27
4.1.2. Screening produkce kopolymerů s obsahem 4HB 28
4.1.3. Screening produkce kopolymerů s obsahem 3HV 33
4.1.4. Screening produkce kopolymerů s vybranými prekurzory 39
4.1.5. Screening produkce kopolymerů koncentrační řady 41
5. ZÁVĚR 45
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 47
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK 54

1. ÚVOD

V dnešní době je jeden z největších problémů ochrana životního prostředí. S tím je spojená i problematika nadměrné produkce plastů. Drtivá většina používaných plastů je petrochemického původu. Ty mají řadu výhod, jako je například jejich nízká cena, stabilita a dobrá odolnost. Proto byly schopny nahradit jiné materiály. Nicméně právě jejich odolnost je zároveň i nevýhoda, protože se jako odpad hromadí v přírodě. Zvyšuje se tak množství plastového odpadu na skládkách, v přírodě a oceánech.

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou polyestery hydroxyalkanových kyselin. Tyto polymery jsou syntetizovány v buňkách různých mikroorganismů, které je využívají jako zásobní látky. Materiály tvořené těmito polymery jsou považované za šetrné k přírodě a mohou tak tvořit alternativní zdroj plastů. Problémem jsou však stále vysoké výrobní náklady oproti nízkým výtěžkům. Velkou část produkční ceny tvoří vhodný substrát ke kultivaci. Zde by se nabízelo řešení v podobě odpadních materiálů jakožto levných zdrojů uhlíku.

Produkce PHA byla pozorována u velké škály bakterií, často pak u extremofilů. Mezi extremofily patří například termofilní nebo halofilní bakterie. Díky vlastnostem, které extremofilové mají, by mohli být vhodnými kandidáty pro produkci PHA. Nejsou tak náchylní k běžným mezofilním kontaminacím, kvůli podmínkám, které jsou nevhodné pro ostatní mikroorganismy. Tím jsou zároveň sníženy náklady na sterilizaci.

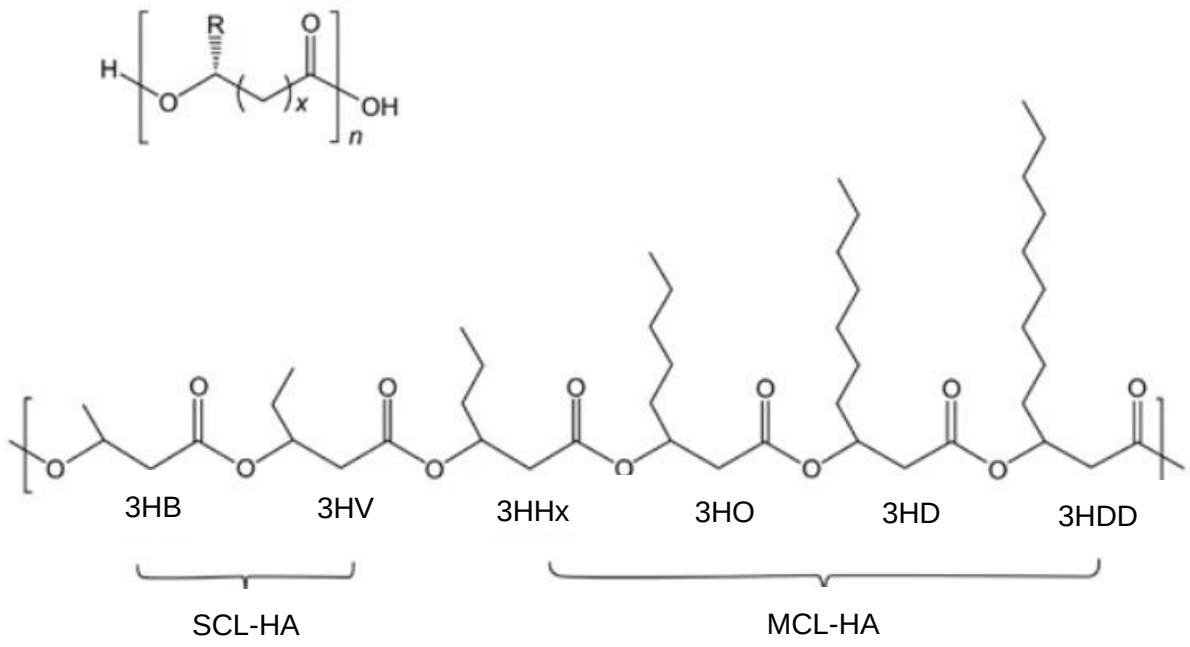
Vhodným adeptem pro produkci PHA by mohla být bakterie *Schlegelella thermodepolymerans*. Jedná se o termofilní bakterii s teplotním optimem 50 °C. U této bakterie bylo zjištěno, že je schopna produkovat poly-3-hydroxybutyrát P(3HB). Jako substrát upřednostňuje xylózu před ostatními sacharidy.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty jsou biopolymery, konkrétně polyhydroxyestery, které jsou syntetizovány v určitých rodech bakterií. Tyto polymery jsou tvořeny skrze různé metabolické dráhy těchto organismů [1]. Jsou složeny z 3-, 4-, 5- nebo 6-hydroxykyselin [2, 3].
V průběhu výzkumů se zjišťuje, že mají daleko komplexnější funkce v metabolismu bakterií než jen zásobní [4]. Jejich široké využití se může uplatnit například v medicíně, kde bude rozhodující jejich biodegradovatelnost [1].

PHA se dělí do tří skupin podle toho, kolik uhlíků tvoří jejich podjednotku na scl-PHA (short chain length), mcl-PHA (medium chain length) nebo lcl-PHA (long chain length) [3]. Scl-PHA obsahují ve své monomerní podjednotce 3-5 uhlíků, kdežto mcl-PHA se skládají z 6 až 14 uhlíků (Obrázek 1) [4]. Pokud obsahují více jak 14 uhlíků, tak se jedná o lcl-PHA. Tyto podjednotky mohou tvořit jak homopolymery, tak heteropolymery [1].



Obrázek 1 Struktura podjednotek [2]

V přírodě má největší zastoupení poly(3-hydroxybutyrát) P(3HB). Může mít molekulovou hmotnost od 200 do 3 000 kDa, avšak záleží na podmínkách, ve kterých se bakterie nachází a také na konkrétní bakterii [2]. Existují však i polymery, jež obsahují v jedné molekule kolem 20 000 monomerních jednotek [5].

V buňce se PHA vyskytuje ve formě granulí. Granule PHA mají většinou v průměru 0,2 - 0,5 μm. Mohou tak být snadno rozpoznatelné pod mikroskopem. Shluky PHA také mohou být obarveny súdánskou černí B. To značí, že mají charakter lipidů. Díky tomu však může docházet k falešným výsledkům, kdy se barvivo může navázat i na jiné části buňky. Vedle súdánské černi bylo sledováno zbarvení i nilskou modří A, které způsobuje

silnou oranžovou fluorescenci. Tato fluorescence měla vlnovou délku kolem 460 nm. Kromě nilské modři A může být použit i jeho derivát nilská červeň. Nilská červeň je vhodná k detekci PHA přímo v koloniích bakterií. Ačkoliv tyto metody prokáží, zda se PHA v mikroorganismu vyskytuje, je zapotřebí využít chemické analýzy k určení stavby a struktury PHA. Pro tento účel se používá plynová chromatografie (GC) a jaderná magnetická resonance (NMR) [2].

2.1.1. Biosyntéza a metabolismus PHA

Dráhy metabolismu PHA jsou cyklické, takže se jedná o řetězec na sebe navazujících syntéz a degradací. Tyto reakce jsou regulovány jednak množstvím přítomného substrátu, ale také enzymatickou regulací. Konkrétně u β-ketothiolázy a PHA syntázy se jedná o allosterickou regulaci. Další možností regulace je fosforylace PHA syntázy [7].

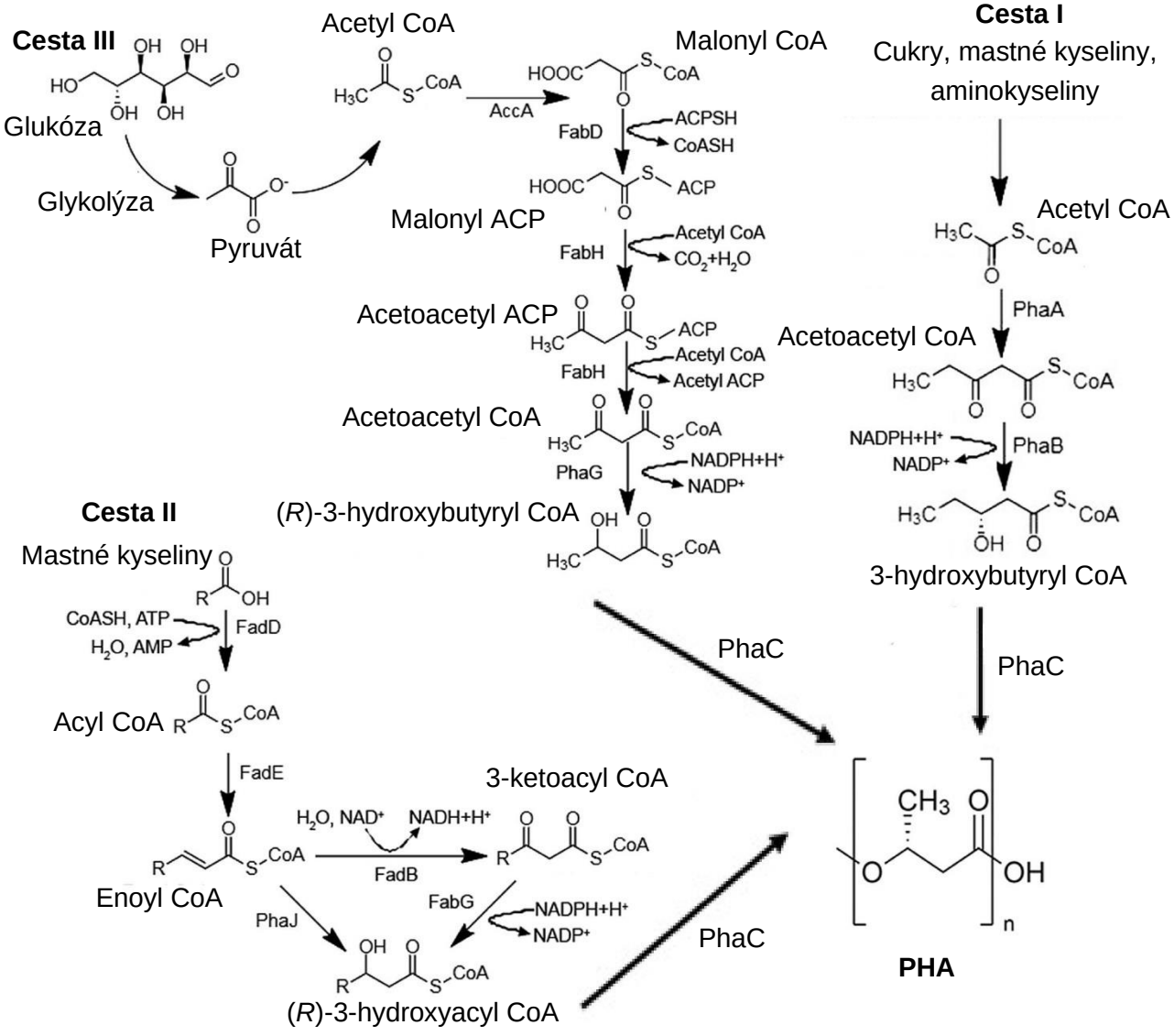
PHA jsou tvořeny v řetězci několika enzymaticky katalyzovaných reakcí uvnitř bakterie. Schopnost syntetizovat PHA byla zjištěna u velkého počtu bakterií [8]. Syntéza je možná jak u gramnegativních, tak u grampozitivních bakterií [3].

Struktura syntetizovaného PHA je závislá na použitém zdroji uhlíku. Tyto zdroje uhlíku nám pak mohou poskytnout monomery, které jsou identické se zdrojem. Pak o nich mluvíme jako o souvisejících zdrojích (mastné kyseliny). Tvorba PHA ze souvisejících zdrojů využívá různé mastné kyseliny jako prekurzory pro stavbu polymerů. Prekurzory z mastných kyselin jsou získávány β-oxidací. Dochází k tomu, že mastné kyseliny jsou aktivovány acyl-CoA syntézou a adenosintrifosfátem (ATP). V dalších krocích, které zahrnují enzymové reakce, se produkuje acetyl-CoA. Počet uhlíků v mastné kyselině je snížen o dva uhlíky [1]. Můžeme se však setkat i s nesouvisejícími zdroji (glukóza), které při syntéze PHA dají vzniknout kompletně jinému monomeru, než by napovídala jejich struktura [3].

Dále je struktura závislá na metabolické cestě. Existuje více metabolických cest (Obrázek 2), ale nejvíce prostudované jsou tři cesty. Cesta 1 je založena na přítomnosti koenzymu A z Krebsova cyklu. Jednotlivé monomery 3-hydroxybutyryl-CoA vznikají z molekul acetyl-CoA. Jedná se o reakci katalyzovanou dvěma enzymy: β-ketothiolázou (PhaA) a acetoacetyl-CoA reduktázou (PhaB) [9]. Výsledkem je, že vzniklé monomery jsou inkorporovány do struktury PHB. Polymerizace je zajištěna PHA syntázou (PhaC) [10]. Bylo zjištěno, že PhaC polymerizuje pouze (*R*)-izomery 3-hydroxybutyrylu-CoA [11]. Molekuly acetyl-CoA použité v první metabolické cestě jsou vytvořeny ze zdrojů uhlíku, jako jsou cukry, mastné kyseliny nebo aminokyseliny [12]. Preferovanými zdroji uhlíku v této metabolické dráze jsou cukry, zejména glukóza [11].

Cesta 2 byla sledována u bakterií využívajících mastné kyseliny jako primární zdroje uhlíku. Produkty druhé cesty jsou mcl-PHA [13]. Na počátku je Acyl-CoA produkován díky acyl-CoA syntáze (FadD). Zdrojem acyl-CoA jsou mastné kyseliny. Acyl-CoA podléhá přeměně na enoyl-CoA [1]. Proces je umožněn acyl-CoA dehydrogenázou (FadE). Enoyl CoA se změní na (*R)*-3-hydroxyacyl-CoA. Tato přeměna je katalyzována (*R*)-3-hydroxacyl-CoA hydratázou (PhaJ) [14]. Dalším meziproduktem je 3-ketoacyl CoA, který vzniká působením enzymu enoyl-CoA hydratázy (FadB) [1]. Poté je 3-ketoacyl-CoA přeměněn 3-ketoacyl reduktázou (FabG) na (*R*)-3-hydroxacyl CoA [15]. Výsledný (*R*)-3-hydroxacyl-CoA je poté polymerizován PHA syntázou(PhaC) do PHA [16].

A nakonec cesta 3 je využívána k tvorbě mcl-PHA z různých zdrojů uhlíku. Těmito zdroji mohou být cukry, oleje a mastné kyseliny [9, 17]. Nejdříve je vytvořen acetyl-CoA z glukózy. Acetyl-CoA je poté přeměněn na malonyl-CoA. To zajišťuje enzym acetyl-CoA karboxyláza (AccC). Přeměna malonyl-CoA na malonyl-ACP využívá enzym malonyl-CoA-ACP transacylázou (FabD). Následně je malonyl-ACP převeden na acetoacyl-ACP acetoacyl-CoA-3-ketoacyl-ACP syntézou (FabH). Následuje konverze acetoacetyl-CoA na (*R*)-3-hydroxacyl-CoA. Tento krok je uskutečněn díky enzymu 3-hydroxyacyl-ACP-CoA tranferáze (PhaG). Vzniklý (*R*)-3-hydroxacyl-CoA je inkorporován do struktury PHA prostřednictvím PHA syntázy (PhaC) [1, 9].



Obrázek 2 Metabolické cesty syntézy PHA [9]

U enzymů katalyzujících tyto reakce je rozhodující jejich odolnost vůči vyšším teplotám. Například u bakterie *Bacillus sp*. INT005 byl pozorován pokles produkce PHA kvůli tomu, že teplota inaktivovala enzym zodpovědný za tvorbu monomerních jednotek. Existuje

spojení mezi PHA a zvýšenou teplotou prostředí v tom smyslu, že PHA funguje jako tzv. chaperon a chrání enzymy proti teplotní degradaci [17].

2.1.2. PHA syntázy

Při biosyntéze PHA jsou klíčové enzymy. PHA syntázy mají za úlohu katalyzovat polymerizaci hydroxyacylových monomerních jednotek do řetězců PHA. Existuje více tříd těchto enzymů, které byly izolovány z různých druhů mikroorganismů. Každá třída tak má svou vlastní substrátovou specifitu. Pokud má enzym nízkou substrátovou specifitu, je pak schopen inkorporovat velice rozdílné monomerní jednotky [1].

PHA syntázy se rozdělují do čtyř tříd. První, třetí a čtvrtá třída obvykle vykazují polymerizaci kratších řetězců PHA, zatímco třída druhá polymerizuje středně dlouhé řetězce. První třída se vyskytuje například u *Cupriavidus necator* a jedná se o typ syntázy pro scl-PHA. Druhá třída se od první liší především tím, že je schopná začleňovat hydroxyalkanoáty obsahující 6 - 14 uhlíků, tedy dochází ke vzniku mcl-PHA [6].

2.2. Funkce PHA v bakteriích

Bakterie primárně akumulují PHA jako zásobní materiály a zdroje uhlíku. Poslední výzkumy však ukázaly, že funkce PHA v bakteriích je komplexnější než jen zásobní. PHA tvoří až 90 % sušiny buňky [17].

Zpětné získávání PHA ze zásobních materiálů je velmi jednoduché, protože mikroorganismy mají k dispozici depolymerizační systémy pro zpětné získání uhlíku z PHA. Některé mikroorganismy jsou schopné produkovat extracelulární PHA depolymerázy, které jsou vylučovány do prostředí, aby zpracovaly PHA v prostředí kolem mikroorganismu [2].

V bakteriích tyto polymery tvoří kompaktní granulovité útvary, které jsou obklopeny konkrétními bílkovinami a lipidy [1, 4]. Jedná se zejména o PHA syntázu, PHA depolymerázy a strukturní a regulační bílkoviny [17]. Je tak vytvořena komplexní molekula, pro kterou byl přijat název „karbonosom“ [18].

Bylo sledováno, že bakterie jsou schopné regulovat a ovlivňovat svou velikost a rozměry. Tím regulují relativní objem PHA nacházejícího se v buňce. Objem PHA tak nepřesáhne 40 % celkového objemu buňky [9, 18].

Množství PHA také ovlivňuje šanci buňky přežít stresové situace způsobené extrémními podmínkami. Bakterie, které měly kolem 40 % PHA v sušině, měly větší odolnost proti fyzikálním faktorům jako například UV záření, vysoušení nebo osmotickému tlaku [17, 19]. Navíc byla u několika bakterií objevena i přímá přeměna jinak toxických látek jako jsou methanol [20] a styren [21] na PHA [17].

I přes potvrzení skutečnosti, že PHA mají vliv na odolnost bakterií a jejich rezistenci vůči extrémním podmínkám, nebyly zcela pochopeny mechanismy, které jsou za to odpovědné [7].

2.3. Vlastnosti PHA

Vlastnosti PHA záleží na monomerních jednotkách přítomných v řetězci. PHA mohou být jak tvrdé a krystalické, tak i pružné [3]. Některé vlastnosti PHA jsou podobné vlastnostem syntetických polymerů, které jsou používány k výrobě plastů, jako například polystyren, polykarbonát nebo polypropylen. Z toho plyne, že by jednou PHA mohly alespoň částečně nahradit tyto komerčně využívané polymery. Poly(3-hydroxybutyrát), zkráceně P(3HB), se oproti polypropylenu, se kterým sdílí podobnou strukturu, nevznáší na vodní hladině, ale klesá ke dnu. Na dně se pak může degradovat a jeho zbytky tak mohou být lépe zachyceny [5]. Navíc nejsou toxické a mohou být vyráběny z obnovitelných zdrojů [8].

PHA je skupina opticky aktivních polyesterů. Monomerní jednotky, ze kterých jsou složeny všechny PHA, jsou v *R*-konfiguraci, kvůli stereospecifitě enzymů využitých při jejich syntéze. *S*-konfigurace byla zaznamenána pouze ve velmi ojedinělých případech [2].

P(3HB) má krystalický charakter a jeho bod tání je 180 °C. Naproti tomu se u kopolymeru poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerátu), zkráceně P(3HB-*co*-HV), snižuje hodnota bodu tání a je méně krystalický. Bod tání se snížil ze 180 °C na 150 °C [3]. Zatímco homopolymer P(3HB) má jen omezené možnosti použití, jeho kopolymery jsou daleko lépe zpracovatelné a využitelné [2]. Dalším příkladem je poly(4-hydroxybutyrát), což je pevný, avšak tvárný materiál. Navíc jeho síla v tahu je porovnatelná s polyethylenem [3].

2.4. Využití PHA

Využití PHA plyne z potřeby biodegradovatelných materiálů, které by ulehčily naší planetě. První produkty vyrobené z PHA se objevily již v roce 1990. Jednalo se o lahve na šampon vyrobené z Biopolu [3]. Biopol je obchodní název pro PHA plasty produkované firmou ICI (Imperial Chemical Industries). Ačkoliv byla jejich výroba více než dvakrát dražší než výroba jiných plastů, staly se na trhu důležitými hlavně kvůli jejich degradovatelnosti [5].

Dalším důležitým aspektem využití PHA je cena a dostupnost zdrojů uhlíku pro biosyntézu bakteriemi. Ukázalo se, že pro některé bakterie jsou nejvhodnějšími zdroji uhlíku rostlinné oleje. Ty samozřejmě obsahují triacylglyceroly, které v metabolismu buňky podstupují β-oxidaci [22]. Rostlinné oleje jsou celosvětově rozšířené a průměrně 11 miliard litrů oleje v Americe a 1 miliarda litrů v Evropě se ročně spotřebuje během vaření nebo v potravinářském průmyslu [23, 24]. Odpadní oleje mohou být zpracovány pomocí technologie Hydal, u které se využívá bakterie *Cupriavidus nestor* [25]. Problém s velkým množstvím odpadních produktů je i u výroby sýrů a mléčných výrobků. Během ní totiž dochází k produkci velkého množství syrovátky, která je primárně tvořena bílkovinami, laktózou a kyselinou mléčnou. V tomto případě je většinou nutné, na rozdíl od odpadních olejů, substrát podrobit předúpravě, aby byla laktóza rozštěpena na galaktózu a glukózu. Vzniklá galaktóza je přeměněna na glukózu a následuje produkce PHA. V petrochemickém průmyslu vzniká jako vedlejší produkt výroby biopaliv glycerol. Ten se ukázal jako další možný kandidát na to být použitý jako zdroj uhlíku do PHA [17, 26].

Monomery PHA, které obsahují místo hydroxylové skupiny navázaný zbytek mastné kyseliny, se nazývají (*R*)-3-hydroxyalkanoáty (RHA). Tyto upravené polymery se vyznačují

antibakteriálními vlastnostmi, kvůli jejich povrchově aktivnímu chování a také kvůli chirálním centrům a funkčním skupinám. To pasuje kopolymery PHA do role vhodných kandidátů k výrobě obalů a balících materiálů. Zde však hraje velkou roli typ jídla, které bude baleno a také jeho trvanlivost [27].

PHA mohou být užitečné zejména jako nosičové systémy pro různá léčiva nebo jako materiály pro umělé tkáně. PHA jsou neškodné pro lidské zdraví a nijak nepoškozují lidské buňky. Díky tomu že se monomery PHA vyskytují výhradně v (R) konfiguraci, se mohou v budoucnu stát prekurzory pro syntézu antibiotik, vitamínů a jiných léčiv [28]. Na stranu druhou PHA mohou být snadno depolymerizovány na jednotlivé monomerní jednotky [8].

PHA v kombinaci s terpeny (linalool) byly využity pro výrobu antibakteriálních membrán. PHA část zaručovala mechanickou odolnost membrány. Výsledkem bylo, že membrány měly antiadhezivní vlastnosti vůči *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* [29]. Částice PHA se dají použít také k imobilizování bakteriofágů a některých mikroorganismů. Jedná se o sférické struktury s velikostí kolem 10 μm. Lze tak dosáhnout částečné ochrany buněk před nevhodným prostředím a oxidativním stresem [30].

Zásadním přínosem PHA oproti jiným polymerům je jeho biodegradabilita. V porovnání s ostatními biodegradovatelnými polymery mají PHA výhodu v tom, že mohou být odbourávány aerobně i anaerobně. Dále je možný termický rozklad a enzymatická hydrolýza [3]. Bylo zjištěno, že PHA s nižší molekulovou hmotností jsou mnohem lépe degradovatelné. Dalším důležitým faktorem je bod tání. Čím větší má PHA bod tání, tím méně degradovatelný bude a klesá i degradovatelnost enzymatická [3]. Degradovatelnost je ovlivněna chemickou strukturou, krystalinitou a dalšími strukturními vlastnostmi [3]. V přírodě jsou dalšími faktory vlhkost, teplota, pH, množství bakterií a povrch degradovaného materiálu [8].

S výrobou se úzce spojuje také recyklace a opětovné použití vyrobených materiálů. Je několik cest pro recyklování. Prvním je mechanická recyklace, která zahrnuje shromáždění odpadního materiálu na příslušných místech, třídění, omytí a rozmělnění na stejnorodé částice, aby mohlo dojít k dalším úpravám [31]. Samozřejmě ne všechny polymery mohou být zpracovávány touto cestou, jelikož jsou často vystavovány podmínkám, které způsobují degradaci jako například teplo, světlo nebo vlhkost [32]. Další možností je chemická recyklace. Polymer je degradován různými chemickými látkami a následně jsou tyto jednotky opět polymerizovány na původní materiál [33]. To je vhodné i pro biodegradovatelné polymery, avšak tyto procesy jsou ekonomicky náročné. Z toho důvodu se nabízí možnost využití mikroorganismů k rozložení těchto bioplastů. Jedná se tak v podstatě o kompostování [34].

Pro PHA se nedoporučuje mechanická metoda z důvodu zhoršení mechanických vlastností při opakovaném zpracovávání. Dochází tak například ke snížení pevnosti v tahu. Na stranu druhou se takové materiály dají použít jako změkčovadlo při výrobě kyseliny polymléčné (PLA) [35, 36]. Polymery PHA jsou velmi často směsi mnoha látek. Tím vzrůstá složitost a cena případné likvidace. Přidáním malého množství PLA se může docílit větší stability PHA při recyklaci [37]. Při použití pyrolýzy je šance dostat jednotky kyseliny krotonové. Tyto monomery mohou být použity v další výrobě [38].

2.5. Termofilní mikroorganismy

Termofilní mikroorganismy patří spolu s ostatními, jako jsou například acidofily, alkalofily nebo piezofily, do skupiny extremofilů. Extremofilní organismy jsou takové, které vyžadují pro život extrémní podmínky. U termofilů je to vyšší teplota, u halofilů vysoká koncentrace solí v jejich prostředí [39]. Při využití halofilních mikroorganismů v průmyslu může být vysoký obsah soli i nevýhoda kvůli korozi materiálů, kterou vysoká salinita může způsobit [40]. Tento problém odpadá při využití termofilních organismů.

Termofily jsou považovány za ideální zdroj enzymů, které jsou stabilní i při vyšších teplotách. Tato vlastnost je důležitá, protože enzymy mají proteinový charakter a mnoho enzymů při vyšších teplotách ztrácí svou aktivitu [41]. V porovnání s halofilními a mesofilními bakteriemi je však biosyntéza PHA termofilů méně prozkoumána [42].

Mezi termofilní organismy se řadí takové, které jsou schopné žít v prostředí, jehož teplota je vyšší než 45 °C. Nejenže mají schopnost v těchto podmínkách přežít, ale tyto podmínky k životu potřebují. Díky tomu, že jsou odolné i proti extrémním podmínkám, jsou vhodnými kandidáty pro syntézu PHA, a ne jen jako zdroj termostabilních enzymů. Navíc je zde i menší riziko kontaminace mezofilními bakteriemi, které jsou nejčastějším zdrojem kontaminace. Navíc se snižuje i spotřeba vody potřebná pro chladicí procesy. Zvýšená teplota při kultivaci také zvyšuje rozpustnost některých substrátů, zvyšuje homogenitu média a snižuje jeho viskozitu [43]. Vyšší teplota podle Arrhenia zvyšuje reakční rychlost, takže metabolické procesy probíhají rychleji, avšak nevýhodou je nižší rozpustnost kyslíku v médiu [44].

Při klasifikaci termofilů je možné se setkat s mírně odlišnými hodnotami na základě použité literatury. Obecně ovšem bývají rozděleni do tří kategorií podle teploty, v nichž žijí. První kategorií jsou střední termofily, které mají svou optimální teplotu mezi 45 a 65 °C. Další jsou extrémní termofily. Ty mají svou optimální teplotu posunutou na 65 až 79 °C. Poslední skupinou jsou hypertermofily se svou optimální teplotou nad 80 °C. Mezi termofily patří mimo jiné i archea [28].

Míst s výskytem termofilních bakterií je celá řada. Jedná se například o místa s vysokou vulkanickou aktivitou, geotermální prameny nebo hlubokomořské průduchy. To jsou spíše ta exotická místa, ale s prostředím s vysokou teplotou se můžeme setkat i u nás. Plno takových míst vzniklo činností člověka. To se týká například kompostů nebo různých průmyslových zón [39].

Důvodem schopnosti termofilů přežívat v extrémních teplotních podmínkách je využívání a shromažďování různých speciálních látek, sloužících jako chaperony. Chaperony jsou molekuly upravující prostorové uspořádání molekul proteinů. Tahle úprava vede k ochraně před tepelnou denaturací bílkovin. Další látky, které prošly změnou, jsou fosfolipidy, které jsou jednou z hlavních složek struktury biomembrán [39]. U termofilů je odlišné pořadí a výskyt jednotlivých aminokyselin v proteinech než u mezofilů. Bílkoviny termofilů mají ve své struktuře zabudované nabité aminokyseliny jako lysin, arginin a glutamát. Stabilita proteinů je pravděpodobně odolnější i kvůli početnějšímu výskytu slabých vazebných interakcí jako jsou například disulfidické vazby, iontové vazby, hydrofobní interakce nebo vodíkové můstky [45].

2.6. Využití termofilních organismů

V porovnání s mezofily jsou kultivační procesy termofilů výhodnější z hlediska získávání tepla. Prostředí termofilních bakterií nemusí být výrazně ochlazováno, čímž se sníží náklady na jejich kultivaci. Navíc je při vyšších teplotách výrazně sníženo riziko kontaminace mezofilními organismy. Na stranu druhou známe méně termofilů než mezofilů, kteří jsou schopni produkovat PHA.

Termofily se využívají například k získání specifických enzymů. Tyto enzymy se vyznačují zvýšenou odolností proti vyšším teplotám. Často však také bývají odolné proti chemické denaturaci či zvýšené salinitě. Takové enzymy jsou nazývány termozymy. Největší uplatnění nacházejí termozymy při polymerázové řetězcové reakci (PCR). V tomto případě jde o DNA polymerázy [46]. Lakázové enzymy z termofilní bakterie *Geobacillus thermocatenulatus* MS5 jsou velmi odolné v různých hodnotách pH. Toho je využito při odbourávání barviv, která mohou způsobit znečistění v přírodě [47].

Termofilní bacily jsou používány v potravinářství jako indikátory nehygienické výroby potravin. Bacil *Anoxybacillus flavithermus* je důležitým kontaminantem mléčných výrobků. Samotný bacil není patogenní, nicméně jeho přítomnost v potravinách je nežádoucí. Produkováním kyselin a enzymů negativně ovlivňuje chuť výrobků [48]. Další uplatnění mohou nalézt například při výrobě biopaliv. Některé kroky výroby totiž vyžadují vyšší teploty a hodnoty pH, které by mezofilní mikroorganismy nepřežily [49].

Významným odvětvím v těžebním průmyslu je tzv. biotěžba. Jedná se o proces, v němž jsou mikroorganismy využívány k odstranění nerozpustných sulfidů a oxidů. V roce 1992 bylo 10 % mědi na světě vyprodukováno právě touto metodou. V dnešní době činí produkce 15 % u mědi a 5 % u zlata. Výtěžky biotěžby jsou zhruba o 30 % vyšší než při loužení. I přesto že metoda biotěžby je relativně bezpečná, může dojit k vylití roztoků pryč z dolů. Při použití termofilů je však riziko vylití menší a výdaje spojené s ochlazováním systémů jsou minimální [50].

2.7. Termofilní producenti PHA

2.7.1. Caldimonas taiwanensis

Caldimonas taiwanensis byla poprvé izolována z horkého pramenu nacházejícího se v jižní části ostrova Taiwan. Je schopna hromadit a syntetizovat PHB ze zdrojů obsahujících glukózu. Enzymy, které byly odhaleny v této bakterii, dovolují získávat PHB přímou cestou ze škrobu, aniž by bylo zapotřebí jeho předúpravy [51].

Studie ukázaly, že při použití velkého množství mastných kyselin jako zdroje uhlíku, *C. taiwanensis* nevykazovala růst a neobsahovala ani žádné PHA. Navíc bylo zjištěno, že vyšší koncentrace mastných kyselin v médiu je pro tuto bakterii toxická a způsobila inhibici růstu těchto bakterií [51].

Při použití směsi kyseliny valerové a kyseliny glukonové bylo naměřeno množství 3HV ve vzniklém PHA. Valerát byl v procesu syntézy PHA použit jako prekurzor PHA, avšak ne jako zdroj energie pro růst buňky [51].

2.7.2. Schlegelella thermodepolymerans

Jedná se o termofilní gramnegativní bakterii. Primárně byla bakterie objevena díky schopnosti degradovat PHA vně buňky. Zejména se jednalo o kopolymery 3-hydroxybutyrátu a 3-merkaptopropionátu [52, 53]. Tyto kopolymery obsahují oxo- a thioesterové skupiny, které byly považovány za naprosto odolné vůči biologické degradaci. Tuto schopnost má díky enzymu PHA depolymeráze. Optimální hodnota bakterie je 50 °C, což postačuje k tomu, aby šance toho, že její vzorky budou kontaminovány jinými mikroroganismy, budou minimální [43].

Genomy této bakterie uložené v bance jsou označeny kódy QQAP01 a PSNY01. Z těchto genomů bylo zjištěno, že bakterie má kompletní operon pro kódování vhodných enzymů pro produkci scl-PHA řetězců, zejména homopolymer P(3HB). Navíc je možná i produkce kopolymerů obsahující 4HB a 3HV [43].

Genom *S. thermodepolymerans* taktéž obsahuje geny pro metabolismus xylózy. Nejdříve je xylóza izomerázou převedena na D-xylulózu a následně je tento produkt izomerační reakce fosforylován xylulokinázou. Je tak získána D-xylulóza-5-fosfát. Ten je dále zpracováván v pentosofosfátové dráze [43].

Bakterie je schopna utilizace různých uhlíkatých substrátů (arabinóza, fruktóza, galaktóza, manóza, glycerol), nicméně nejvyšších výtěžků dosahuje při využití xylózy jako zdroje uhlíku. Navíc preferuje xylózu před glukózou. Tato vlastnost není příliš běžná, protože i *Burkholderia sacchari* DSM 17165, která je považována za jednoho z nejlepších producentů PHA ze zdrojů bohatých na xylózu, upřednostňuje glukózu před xylózou [54]. Z ekonomického hlediska jde o dobrou zprávu, jelikož xylóza je stavebním prvkem hemicelulózy a vyskytuje se v mnoha odpadních lignocelulózových materiálech. Zároveň je druhým nejrozšířenějším sacharidem v přírodě. Všechny tyto informace napovídají, že by se mělo jednat o vhodnou bakterii v rámci průmyslové výroby PHA [43].

2.7.3. Chelatococcus daeguensis

V roce 1993 byl *Chelatococcus daeguensis* popsán jako obligátně aerobní, gramnegativní bakterie. Patří do třídy *Alphaproteobacteria* [55]. Vedle druhu *C. daeguensis* je známo ještě dalších pět druhů. Jsou to *C. asaccharovorans*, *C. caeni*, *C. sambhunathii*, *C. reniformis* a *C. composti*. Největší zájem je však o *C. daeguensis*, protože má schopnosti zpracovávat nejrůznější zdroje uhlíku a aerobně denitrifikovat za vysokých teplot [56].

U kmenu HB-4 byla sledována biodegradace surové ropy tím, že bakterie štěpila dlouhé uhlíkové řetězce, které měly od 23 do 37 uhlíků, na kratší řetězce, které měly 8 až 22 uhlíků. Spolu se zkracováním řetězců docházelo i k poklesu viskozity, protože je tato bakterie schopna produkce emulgačních látek [57].

2.7.4. Aneurinibacillus

Mikroorganismy patřící do rodu *Aneurinibacillus* jsou grampozitivní, aerobní bakterie. Mají tvar tyčinek a tvoří endospory. Mnoho ze zástupců tohoto rodu jsou termotolerantní a termofilní organismy [58].

Z ropného pole v Číně byla izolována bakterie *Aneurinibacillus thermoaerophilus* XH2. Jedná se o bakterii, která byla schopná inkorporovat do řetězce PHA kromě 3HB i ostatní monomery jako jsou 3-hydroxyvalerát, 3-hydroxyacetát a 3-hydroxy-4-fenylbutyrát [59].

Další zástupce tohoto rodu byl izolován z kompostu. Jeden z izolátů byl označen jako *Aneurinibacillus* sp. H1. Bylo zjištěno, že za použití určitých prekurzorů je bakterie schopná produkce PHA s vysokým obsahem 4-hydroxybutyrátu (4HB). Použité prekurzory byly 1,4-butandiol a γ-butyrolakton. Zásadní bylo, že pouze změnou koncentrace prekurzoru bylo dosaženo různého množství 4HB [60, 61].

2.8. Využití termofilních bakterií při produkci kopolymerů na bázi PHA

2.8.1. Kopolymery PHA

Ačkoliv je nejprostudovanějším zástupcem PHA poly(3-hydroxybutyrát), jeho nevýhody vedly ke studiu kopolymerů, které by tyto nedostatky mohly eliminovat. Kopolymery PHA na rozdíl od homopolymerů neobsahují pouze jeden druh monomerní jednotky, ale jsou složeny ze dvou a více různých jednotek. Těmito kopolymery může být například poly(3-hydroxybutyrát-*co*-3-hydroxyvalerát) (P(3HB-*co*-3HV)) nebo poly(3-hydroxybutyrát-*co*-3-hydroxyhexanoát) (P(3HB-*co*-3HH)) [62].

2.8.2. Poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát)

Tento kopolymer v sobě kombinuje monomerní jednotky 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu. Jak bylo řečeno v kapitole 1.3, spojení těchto jednotek má vliv na fyzikální a chemické vlastnosti této látky. Oproti homopolymerům má nižší bod tání, je pružnější a tvrdší a je méně krystalický. Tyto vlastnosti jsou závislé na jednotlivém poměru složek. Například při obsahu 3HV ve více jak 20 mol. % je materiál vhodný pro tvorbu filmů a vláken [63]. Při použití v medicíně má výhodu oproti polymeru tvořeného pouze 3HB v tom, že rychlost degradace může být až 1,4-2krát vyšší [64] .

Studie z roku 2006 se zabývala snížením nákladů na výrobu tohoto polymeru tím, že by se jako zdroje uhlíku pro tvorbu PHA mohly používat obnovitelné zdroje pocházející z lesnického průmyslu [42].

2.8.3. Poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyhexanoát)

P(3HB-*co*-3HH) se skládá z podjednotek 3HB a 3HH. 3HH je středně dlouhá monomerní jednotka odvozená z 3-hydroxyhexanové kyseliny, která obsahuje 6 uhlíků a ve svém

postranním řetězci má 3 uhlíky. 3HB a 3HH se tedy od sebe velmi liší. Kopolymer P(3HB-*co*-3HH) může být ve dvou typech. První typ je blokový. Druhý typ je kopolymer, který má nahodilou formu. Vlastnosti těchto dvou forem jsou taktéž odlišné [62].

V porovnání s P(3HB-*co*-3HV) a P(3HB) má tento kopolymer lepší tepelnou odolnost. Jeho charakter vychází z toho, že kombinuje krystalické vlastnosti 3-hydroxybutyrátu a elastické vlastnosti 3-hydroxyhexanoátu. Množství 3-hydroxyhexanoátu snižuje krystalický charakter a bod tání. PHBH by tak mohlo být aplikováno tam, kde je zapotřebí elastický materiál. Může tak být zpracováván různými metodami jako je například zpěňování, nejrůznější tepelné úpravy, výroba vláken nebo 3D tisk. Navzdory těmto výhodám se zatím P(3HB-*co*-3HH) moc neujal, zejména kvůli vysoké výrobní ceně [62].

Teplota, při které dochází k degradaci kopolymeru, je silně závislá na obsahu 3HH. Při zvýšení mol. % z 2,5 na 9,5 se teplota, při níž dochází k degradaci materiálu, zvýšila z 200 na 230 °C. Na obsahu 3HH jsou taktéž závislé i mechanické vlastnosti [62].

Odbourávání pomocí mikroorganismů probíhá ve dvou krocích. Jedná se o enzymatické reakce, kdy je nejdříve použita hydrolýza ke štěpení esterových vazeb. To znamená, že vznikají oligomery a ty jsou poté dále štěpeny. Poté přichází na řadu dehydrogenáza, která vzniklé monomerní jednotky rozkládá na acetoacetát. P(3HB-*co*-3HH) může být v anaerobním prostředí odbouráno na methan a oxid uhličitý, zatímco v aerobním na vodu a oxid uhličitý [62].

Syntéza P(3HB-*co*-3HH) je závislá na mnoha faktorech jako jsou podmínky prostředí, typ mikroorganismu a zdroje uhlíku. První zmínka o syntéze PHBH bakterií pochází z roku 1989. Jednalo se o syntézu pomocí bakterií *Rhodospirillum rubrum* a zdrojem uhlíku byly butyrát a hexanoát. V roce 1993 se podařilo izolovat kmen bakterie *Aeromonas caviae* z půdy, u které byly zjištěny kopolymery 3HB a 3HH využívající jako zdroj uhlíku mastné kyseliny a tuky [62].

Díky bioinženýrství bylo možné nahradit PHA syntázu za P(3HB-*co*-3HH) syntázu v bakterii *Cupriavidus necator* a docílit tak syntézy, která by u této bakterie normálně neprobíhala. Jako zdroje uhlíku byly použity palmový olej, palmojádrový olej, fruktóza, sacharóza, olej ze sójových bobů a rostlinné oleje. Největší výtěžek byl z palmojádrového oleje. U něj činila hmotnost PHA 61-77 % sušiny, z toho 41-62 % tvořily jednotky 3HH [62].

2.8.4. Aplikace kopolymerů

Materiály určené k balení by měly být dostatečně odolné a měly by mít některé vlastnosti, jako jsou zejména dostatečná ochrana proti vzdušné vlhkosti, vhodná propustnost plynů, nenáročná výroba, žádná toxicita nebo jiné negativní vlivy a nízká cena [38]. Kopolymer P(3HB-*co*-3HV) produkovaný bakterií *Halomonas campisalis* byl použit k balení pšeničné krupice, mléka a rostlinného oleje [27].

Aplikace v medicíně se odvíjí od biokompatibility a možnosti bezproblémového odbourávání v organismu. Pokud chceme nějakou látku používat v lidském těle, jeho biokompatibilita je stěžejní vlastností, která by měla být na prvním místě. Je ovlivněna jak samotným charakterem látky, což znamená tvar, molekulová stavba, rozpustnost atd., tak i prostředím [65]. Prostředí je v našem případě lidské tělo. Studie, zabývající se zkoumáním

PHA, ukázaly, že některé komponenty přítomné v PHA jsou obsaženy v lidské krvi [66]. Tento fakt nahrává použití PHA v medicíně, protože se tím snižuje šance na negativní odpověď imunitního systému nebo odmítnutí PHA organismem [67]. Je tak možné produkovat materiály pro tkáňové inženýrství, ortopedické nebo kardiovaskulární implantáty, nosiče léčiv nebo protirakovinné látky [38].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Použité chemikálie, přístroje a mikroorganismy

3.1.1. Použité mikroorganismy

V praktické části bakalářské práce byly použity mikroorganismy zakoupené z německé sbírky Liebnitz Institut DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, a to bakteriální kmeny *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15264 a Schlegelella thermodepolymerans DSM 15344^{T}. Z belgické sbírky byl použit kmen Schlegelella thermodepolymerans LMG 21645. Poslední použitý kmen byl *Schlegelella thermodepolymrans* M 15344. Jedná se o znovu lyofilizovanou bakterii z původního sbírkového kmene DSM 15344.

3.1.2. Použité chemikálie

- trypton (HiMedia, India)
- yeast extract (HiMedia, India)
- chlorid sodný (LachNer, Česká republika)
- glycerol (LachNer, Česká republika)
- xylóza (HiMedia, India)
- hydroxid sodný (LachNer, Česká republika)
- isopropylalkohol (Penta, Česká republika)
- chloroform (VWR Internacional, USA)
- sírová kyselina (LachNer, Česká republika)
- methanol (LachNer, Česká republika)
- benzoová kyselina (LachNer, Česká republika)
- levulová kyselina (Sigma-Aldrich, Německo)
- valerová kyselina (Sigma-Aldrich, Německo)
- propanol (Sigma-Aldrich, Německo)
- n-amylalkohol (LachNer, Česká republika)
- propionát sodný (Sigma-Aldrich, Německo)
- ε-kaprolakton (Sigma-Aldrich, Německo)
- 1,6-hexandiol (Sigma-Aldrich, Německo)
- γ-butyrolakton (Sigma-Aldrich, Německo)
- 1,4-butandiol (Sigma-Aldrich, Německo)
- hexanová kyselina (P-LAB, Česká republika)
- oktanová kyselina (Sigma-Aldrich, Německo)
- dekanová kyselina (Sigma-Aldrich, Německo)
- chlorid vápenatý dihydrát (LachNer, Česká republika)
- citrát železito-amonný (Fluka, Česká republika)
- hydrogenfosforešnan disodný dodekahydrát (LachNer, Česká republika)
- chlorid amonný (LachNer, Česká republika)

- síran hořečnatý heptahydrát (LachNer, Česká republika)

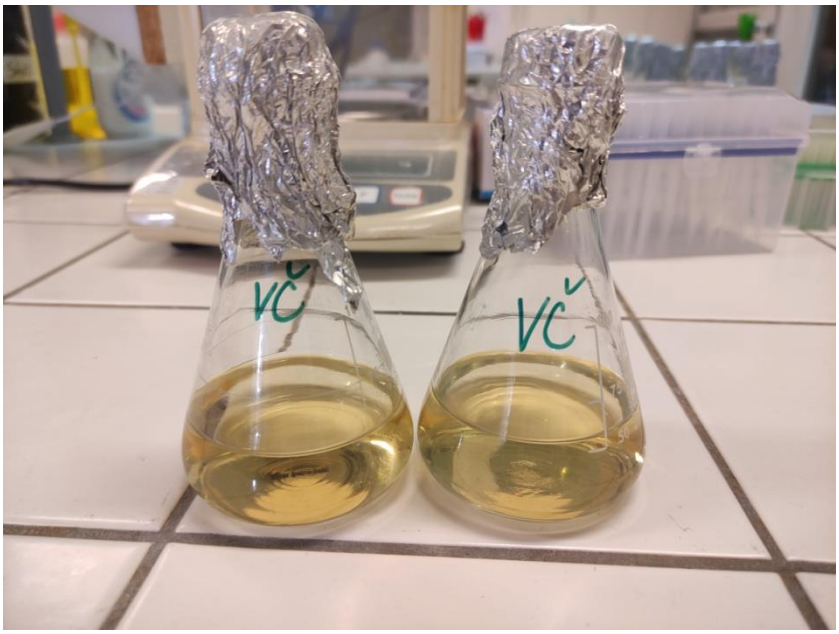
3.1.3. Přístrojové vybavení

- Předvážky Kern EW 620-3NM (Boeco, Německo)
- Analytické váhy (Boeco, Německo)
- Nanofotometr PEARL (Implen, Německo)
- Centrifuga EBA Hettich (Maneko, Česká republika)
- Centrifuga EBA 200 (Maneko, Česká republika)
- Vortex, Mixer Bench V2 Vortex, 230V (BenchramkScientific, Inc., Spojené státy americké)
- Plynový chromatograf s FID, Thermo Scientific, Trace 1300; Kolona: Stabilwax (RESTEK, Francie)
- Magnetická míchačka - typ TKO (Kartell, Itálie)
- Blokový termostat Stuart SBH 200 D (Cole-Parmer, USA)
- Blokový termostat Stuart SBH 130 (Cole-Parmer, USA)
- Třepačka KS 4000 (IKA-WERKE, Německo)
- Třepačka termostatovaná TS-100C (Biosan, Lotyšsko)
- Inkubátor BD056 (Binder, Česká republika)
- pH metr (Thermo Scientific, Nizozemí)
- Standardní vybavení laboratoře

3.2. Kultivace bakterií

3.2.1. Příprava inokulačního média

Mikroorganismy byly uchovávány v hlubokomrazicím boxu. Byly připraveny kryozkumavky v celkovém objemu 1,5 ml. Jako kryoprotektant byl použit 10% roztok glycerolu. Tyto kryozkumavky byly skladované pří - 80 °C v hlubokomrazicím boxu. Komplexní média byla připravována do 100 ml Erlenmeyerových baněk. Objem komplexního média v Erlenmeyerově baňce byl vždy 50 ml. Komplexní médium bylo médium nutrient broth (HiMedia). Přesné složení média je uvedeno v tabulce 1. Po sterilizaci byly do těchto médií očkované bakteriální kultury z připravených kryozkumavek. Takto připravená inokula se kultivovala na třepačkách při teplotě 50 °C při 160 rpm (Obrázek 3).



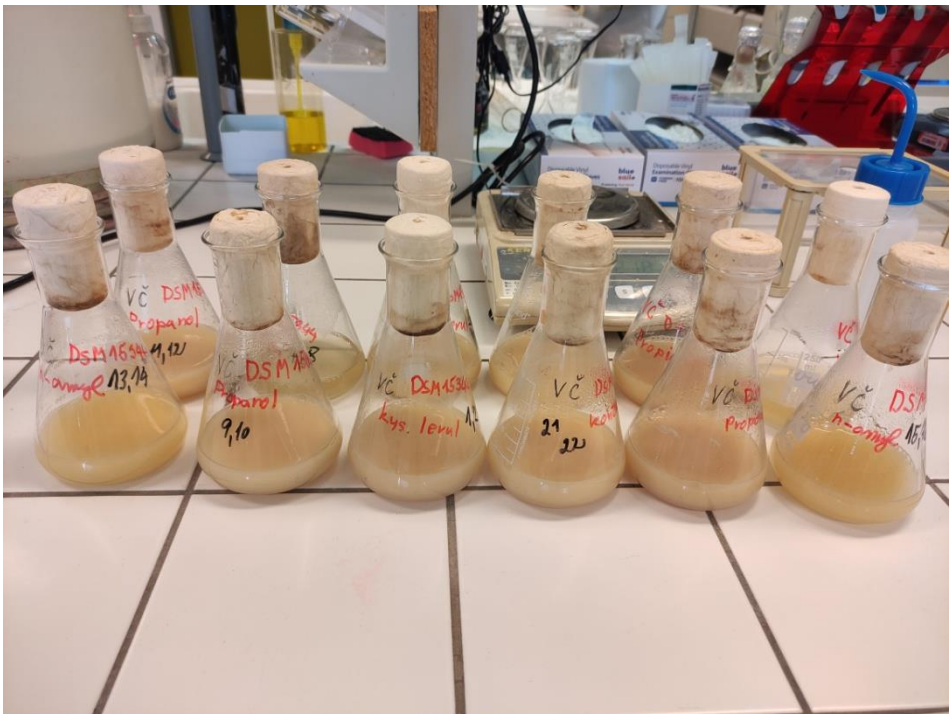
Obrázek 3 Inokulační média

Tabulka 1 Složení inokulačního média

Látka	**Koncentrace [g/l]**
beef extract	10
pepton	10
NaCl	5

3.2.2. Příprava a složení produkčního média

Produkční minerální média byla připravována do 250 ml Erlenmeyerových baněk, které obsahovaly 100 ml minerálního média. Složení média je popsáno v tabulce 2. Následně byla produkční média vysterilizována a temperována na teplotu 50 °C. Ve sterilním laminárním boxu byl do takto připravených vytemperovaných médií přidán zdroj uhlíku (pokud to určovala povaha experimentu) a roztok stopových prvků TES II. Jeho složení je uvedeno v tabulce 3. Jako sacharidový zdroj uhlíku byla použita výhradně xylóza. Do takto připravených médií byla očkovaná bakteriální inokula. Množství přidaného inokula bylo 5 % z celkového objemu produkčního média. Následně byly tyto naočkované produkce dány na temperované třepačky a nechány zde po dobu 72 hodin při 50 °C a 160 rpm (Obrázek 4).



Obrázek 4 Produkční média

Tabulka 2 Složení minerálního média na produkci

Látka	**Koncentrace [g/l]**
$Na_2HPO_3 \cdot 12\ H_2O$	9,0
KH_2PO_4	1,5
NH_4Cl	1,0
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,2
$CaCl_2 \cdot H_2O$	0,02
$Fe^{(III)}NH_4$ citrát	0,0012
Yeast extract	0,5
TES II	1 ml/l

Tabulka 3 Složení roztoku stopových prvků TES II

Látka	**Koncentrace [g/l]**
EDTA	50
$FeCl_3$	13,8
$ZnCl_2$	0,84
$CuCl \cdot 2\ H_2O$	0,13
$CoCl \cdot 6\ H_2O$	0,1
$MnCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,016
H_3BO_3	0,1

3.2.3. Produkce kopolymerů 3HB a mcl-PHA

Při kultivaci kopolymerů mcl-PHA byly využity tři prekurzory: kyselina hexanová, kyselina oktanová a kyselina dekanová. Všechny prekurzory byly přidány v koncentraci 2 g/l v čase 0 hodin. Navíc bylo standardně přidáno 20 g/l xylózy. Produkce byly dány na třepačku na 72 hodin při 50 °C při 160 rpm.

3.2.4. Produkce kopolymerů PHA s obsahem 3HB a 4HB

U této kultivace byly prekurzory přidávány ve dvou rozdílných koncentracích. Do jedné sady byl přidán pouze prekurzor o koncentraci 8 g/l jako jediný zdroj uhlíku. Do druhé sady byly přidány 4 g/l prekurzoru a 4 g/l xylózy. Prekurzory a xylóza byly vždy přidány v čase 0 hodin. Použité prekurzory při této kultivaci byly: ε-kaprolakton, 1,6-hexandiol, γ-butyrolakton a 1,4-butandiol. Produkce byly ponechány na třepačce po dobu 72 hodin při teplotě 50 °C a při 160 rpm.

3.2.5. Produkce kopolymerů PHA s obsahem 3HB a 3HV

Cílem kultivace, při které byly přidávány prekurzory v časech 0 a 24 hodin, bylo zjistit schopnost mikroorganismů produkovat kopolymer P(3HB-*co*-3HV). Použité prekurzory byly: kyselina valerová, kyselina levulová, propanol, n-amylalkohol a propionát sodný. Množství přidaného prekurzoru bylo 2 g/l. Do média byl dále přidán roztok xylózy, aby její výsledná koncentrace byla 20 g/l. Do médií jsme očkovali 5 ml inokula. Takto připravené produkce byly ponechány 72 hodin na třepačce při teplotě 50 °C a při 160 rpm.

Dalším postupem bylo vybrat pro každou bakterii takové kultivační podmínky, které byly zajímavé jednak z hlediska výsledného množství biomasy a PHA, ale také kvůli obsahu 3HV. Za těchto podmínek byla kultivace znovu opakována a následně byl z těchto vzorků vybrán nejslibnější prekurzor. Následovala kultivace při různých koncentracích prekurzoru a xylózy.

Jednalo se o čtyři kultivace s nezměněnou koncentrací xylózy 20 g/l a prekurzory o koncentracích 2, 4, 6 a 8 g/l. Dále to byly 3 kultivace, při kterých se koncentrace xylózy měnila v závislosti na koncentraci prekurzoru: 18 g/l xylózy + 4 g/l prekurzoru, 16 g/l xylózy + 6 g/l prekurzoru, 14 g/l xylózy + 8 g/l prekurzoru.

3.3. Použité metody

3.3.1. Stanovení optické hustoty spektrofotometricky

Po 72 hodinách kultivace byla stanovena intenzita zákalu. Absorbance byla měřena při 600 nm. Jako slepý vzorek byla použita destilovaná voda. Každý vzorek byl proměřen třikrát. Kvůli malé přesnosti byly výsledky použity jen pro ověření výsledků z gravimetrického stanovení.

3.3.2. Stanovení obsahu biomasy gravimetricky

Po uplynutí 72 hodin bylo z paralelních produkcí odebráno 10 ml kultury. Toto množství bylo odstředěno na centrifuze po dobu 5 minut při 6000 rpm. Supernatant byl odlit a k biomase ve zkumavce bylo přidáno 5 ml destilované vody. Směs byla vortexována a znovu dána na centrifugu. Odstředění znovu probíhalo po dobu 5 minut při 6000 rpm. Supernatant byl znovu slit a vzorek biomasy byl sušen do konstantní hmotnosti. Po vysušení vzorků byla biomasa zvážena na analytických vahách. Z naměřené hmotnosti byla vypočtena koncentrace vyprodukované biomasy.

3.3.3. Příprava vzorků na GC-FID analýzu PHA

Pomocí plynové chromatografie se kvalitativně a kvantitativně stanovil obsah PHA v biomase. Do krimpovacích vialek byla na analytických vahách navážena usušená biomasa v rozmezí 8 - 11 mg. K biomase ve vialce byl přidán 1 ml chloroformu a 0,8 ml roztoku interního standardu (15% roztok kyseliny sírové v methanolu s kyselinou benzoovou 5 mg/ml). Hermeticky uzavřené vialky byly dány do termobloku po dobu 3 hodin při teplotě 94 °C. Při reakci v termobloku došlo ke kysele katalyzované hydrolýze polyhydroxyalkanoátů. Následně docházelo k transesterifikaci monomerních jednotek. Po ochlazení na laboratorní teplotu byly vialky otevřeny a jejich obsah přelit do čisté vialky, kde bylo napipetováno 0,5 ml 0,05 M NaOH. Vialky s touto směsí byly několikrát pečlivě protřepány, aby se zajistilo správné ustanovení fázového rozhraní. Do čistých vialek s isopropylakloholem o objemu 900 µl bylo přidáno 50 µl spodní organické fáze. Takto připravené vzorky byly připravené na analýzu GC-FID.

3.3.4. Sledování změn v molekulové hmotnosti PHA pomocí SEC-MALS

Této analýze byly podrobeny pouze vzorky ze sady pro výběr nejlepšího prekurzoru pro tvorbu kopolymerů s 3HV a vzorky koncentrační řady. Z vysušené biomasy byl izolován polymer. K biomase byl přidán chloroform a celá směs byla uložena na 12 hodin do termobloku. Směs byla následně přefiltrována přes filtrační papír na Petriho misku. Následně se nechal odpařit chloroform a vznikly tak fólie (Obrázek 5).

Molekulové hmotnosti polymerů byly měřeny pomocí gelové permeační chromatografie (SEC) s detektorem statického rozptylu světla (MALS). Do šroubovacích vialek byly naváženy 3 mg fólie. Následně byl vzorek fólie zalit 1,5 ml chloroformu. Tato směs byla ponechána v termostatu při teplotě 70 °C do úplného rozpuštění fólie. Poté byly vzorky ochlazeny na laboratorní teplotu. Roztok byl přefiltrován pomocí stříkaček a stříkačkových filtrů. Filtry měly pórovitost 0,45 µm. Směs byla přefiltrována do šroubovacích vialek. Analýza byla provedena ve spolupráci s Ústavem fyzikální a spotřební chemie FCH VUT.

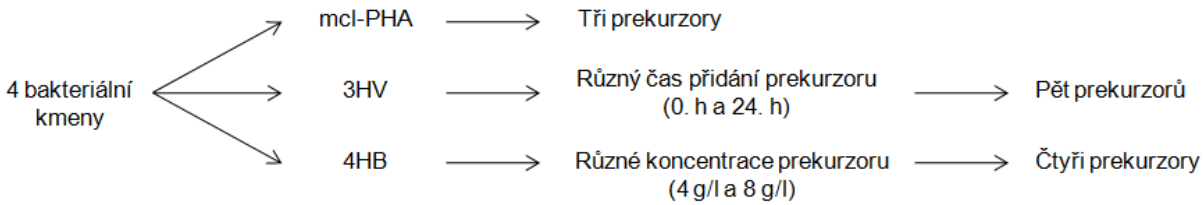
Obrázek 5 Fólie po odpaření chloroformu

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Polymery PHA nabízejí uplatnění v mnoha odvětvích, nicméně každé uplatnění potřebuje specifické vlastnosti materiálů, a ty jsou u homopolymerů dost limitované. Možnost ovlivnit tyto vlastnosti přichází v podobě kopolymerů. Ačkoliv jsou bakterie rodu *S. thermodepolymerans* schopny produkce PHA, bylo nutné zjistit, zda umí inkorporovat různé monomerní jednotky do struktury PHA a vyrobit tak kopolymery.

4.1. Optimalizace produkce kopolymerů

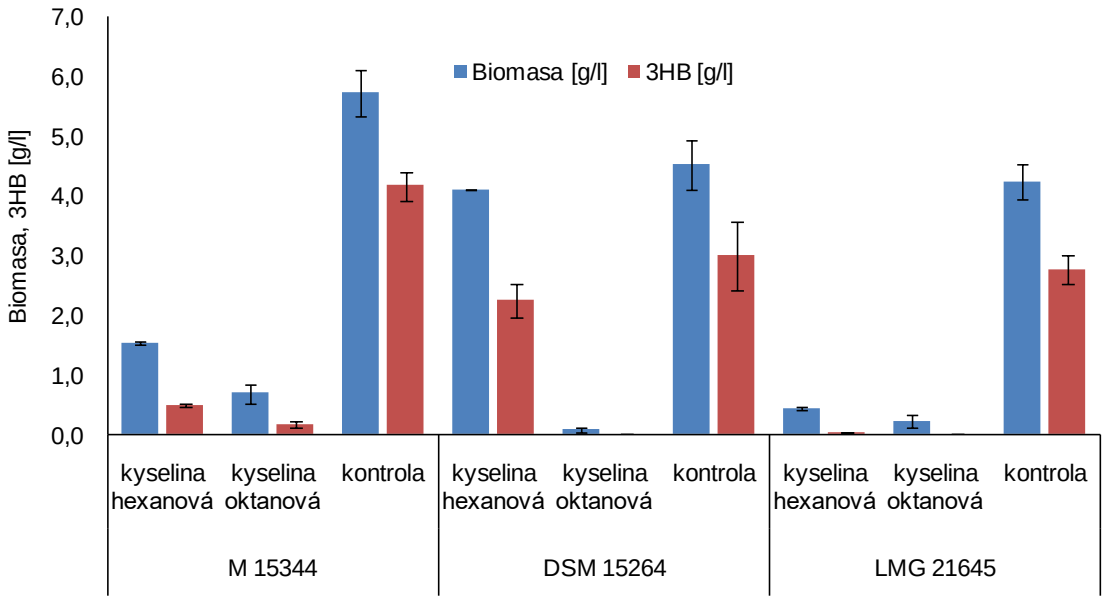
Kmeny bakterie *S. thermodepolymerans* byly testovány na produkci PHA kopolymerů za využití prekurzorů pro monomery 3-hydroxyvalerátu, 4-hydroxybutyrátu nebo mcl-PHA. Pro produkci mcl-PHA byly použity prekurzory kyselina hexanová, kyselina oktanová a kyselina dekanová. Pro 4HB to byly ε-kaprolakton, 1,6-hexandiol, γ-butyrolakton a 1,4-butandiol a pro 3HV byly jako prekurzory použity kyselina levulová, kyselina valerová, propanol, n-amylalkohol a propionát sodný (Obrázek 6). Experimenty měly ukázat, které kopolymery je bakterie *S. thermodepolymerans* schopná syntetizovat. Zároveň byl pozorován vliv koncentrace prekurzoru a doby přidání na produkci kopolymerů.



Obrázek 6 Schéma práce

4.1.1. Screening produkce kopolymerů mcl-PHA

PHA se středně dlouhým řetězcem obsahují v monomerní jednotce 6 - 14 uhlíků, jejich materiálové vlastnosti se tedy liší od scl-PHA. Do sady kultivací pro produkci kopolymerů mcl-PHA byly přidávány tři prekurzory. Jednalo se o mastné kyseliny se sudým počtem uhlíků, konkrétně kyselina kapronová (hexanová), kyselina kaprylová (oktanová) a kyselina kaprinová (dekanová) v koncentraci 2 g/l. Cílem bylo dostat kopolymery se středně dlouhým řetězcem a otestovat, zda jsou kmeny bakterie *S. thermodepolymerans* schopny produkce mcl-PHA.

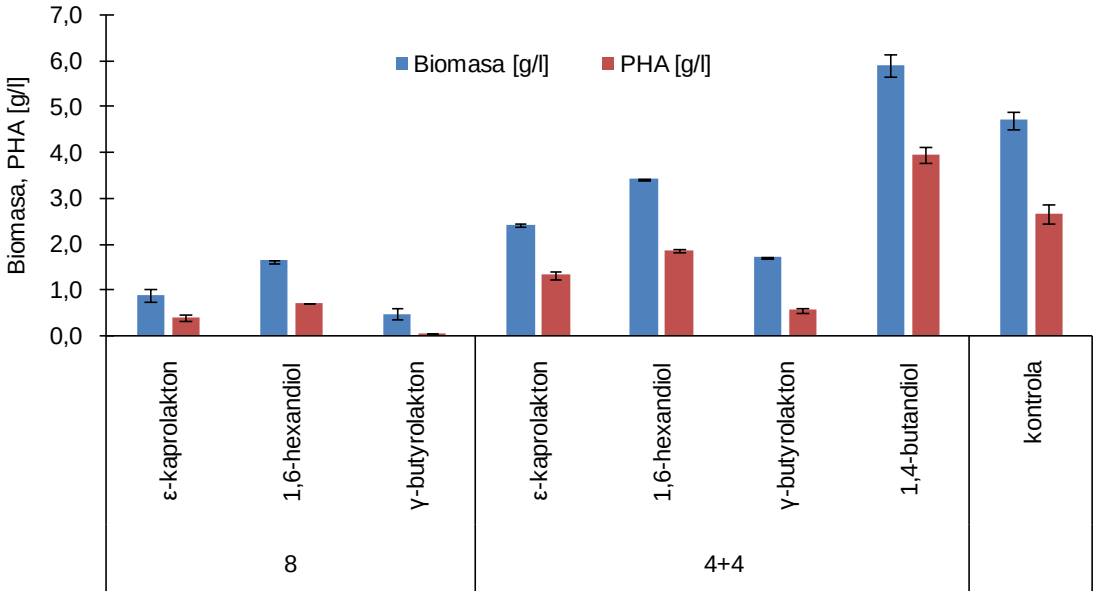


Obrázek 7 Koncentrace biomasy a 3HB při produkci kopolymerů mcl-PHA

Tento experiment (Obrázek 7) byl proveden pro všechny čtyři kmeny, nicméně u typového kmene DSM 15344^T nebylo naměřeno žádné množství biomasy ani PHA pro žádný prekurzor, protože všechny použité mcl-PHA prekurzory působily inhibičně. To ukazuje na fakt, že mezi různými kmeny stejné bakterie mohou být velké rozdíly. Celkově se kyselina dekanová ukázala jako nevhodný prekurzor, protože působila inhibičně na všechny kmeny. Nejlepší produkce PHA byla zaznamenána po přidání kyseliny hexanové pro kmen DSM 15264. Množství biomasy bylo 4,11 g/l a PHA tvořilo 55 % hmotnosti suché biomasy. *S. thermodepolymerans* není vhodná pro tvorbu mcl-PHA, protože prekurzory pro stavbu těchto polymerů patrně fungují inhibičně. Navíc nebyla zjištěna přítomnost žádného mcl-PHA.

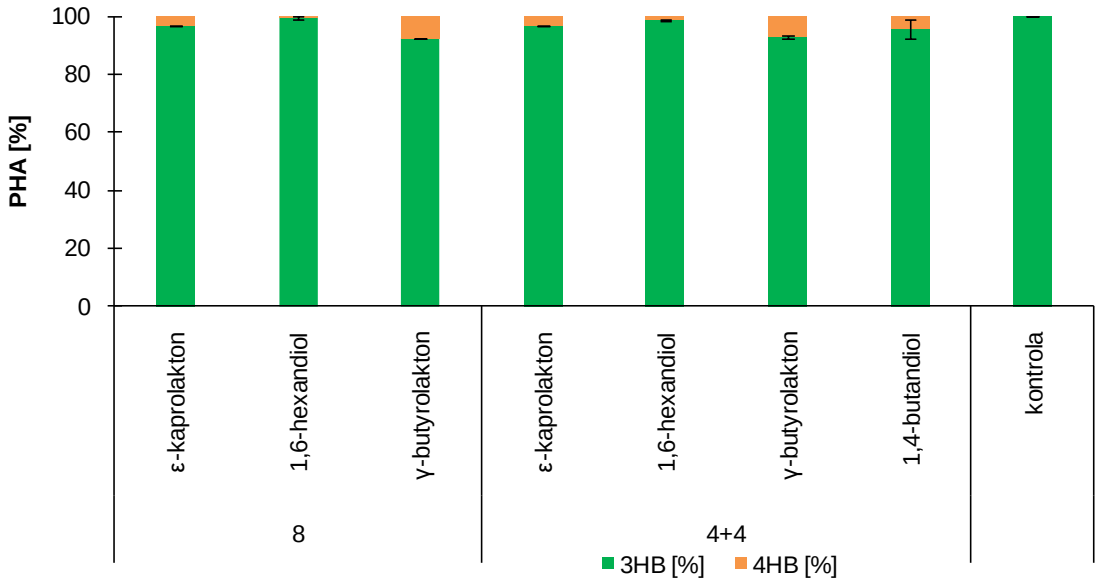
4.1.2. Screening produkce kopolymerů s obsahem 4HB

Pro začlenění 4HB do struktury PHA byly zvoleny čtyři prekurzory: ε-kaprolakton, 1,6-hexandiol, γ-butyrolakton, 1,4-butandiol. Vzorky byly rozděleny do dvou sad, které se lišily koncentrací přidaného prekurzoru. K sadě s menším množstvím prekurzoru bylo přidáno 4 g/l xylózy. Koncentrace byly 8 g/l a 4 g/l prekurzoru.



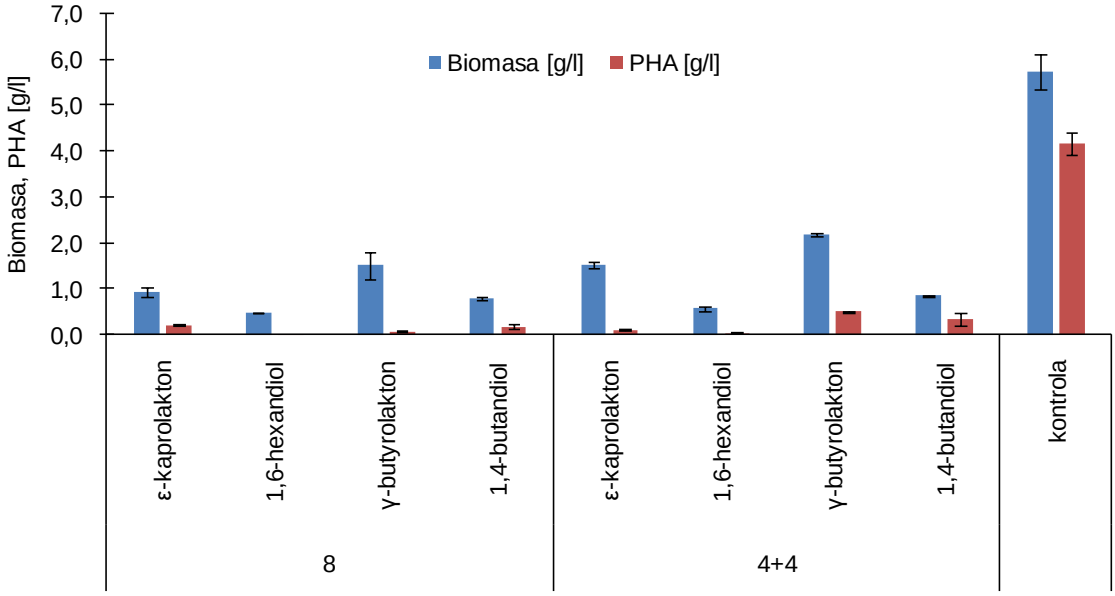
Obrázek 8 Koncentrace biomasy a PHA vytvořené bakterií S. thermodepolymerans DSM 15344^T

Nejvyšší množství biomasy a PHA, pro kmen DSM 15344^T, bylo dosaženo při přidání 1,4-butandiolu v koncentraci 4 g/l (Obrázek 8). Biomasa dosahovala 5,89 g/l a PHA 3,95 g/l. Naopak nejhůře dopadl vzorek s prekurzorem 1,4-butandiolem o koncentraci 8 g/l. U tohoto vzorku nebylo naměřeno žádné množství biomasy ani PHA. Lze říci, že vyšších výtěžků bylo dosaženo u kultivací s přidanou xylózou. Největší rozdíl je pak vidět u vzorků s 1,4-butandiolem, kde při jedné koncentraci prekurzoru nebyl výtěžek žádný a při druhé byl výtěžek nejvyšší z celé sady (5,89 g/l), dokonce byl vyšší než u kontroly.



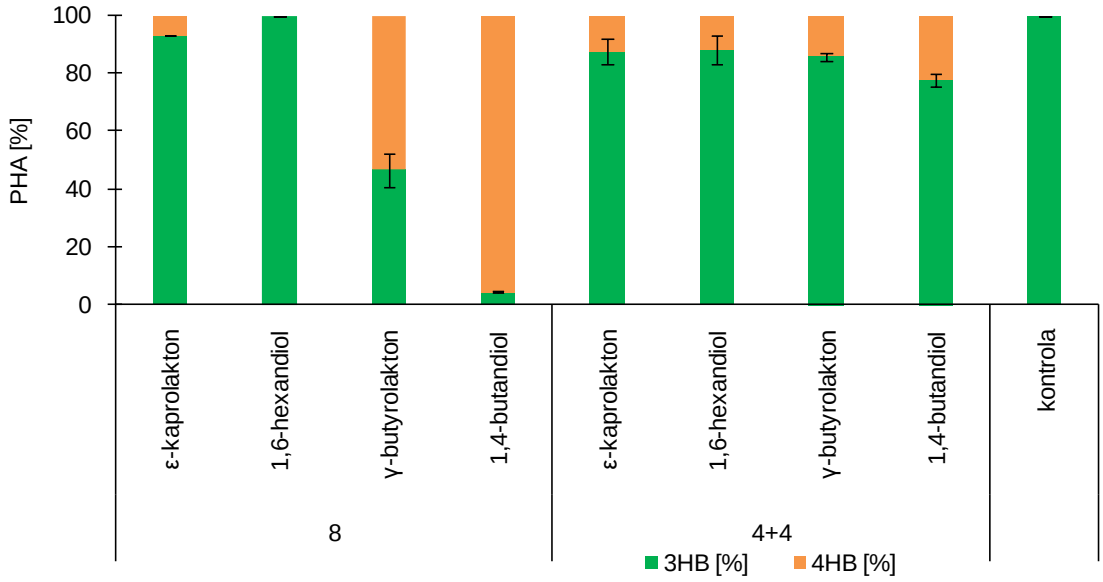
Obrázek 9 Obsah 3HB a 4HB pro bakteriální kmen S. thermodepolymerans DSM 15344^T

Nejvíce 4HB bylo u vzorku s γ-butyrolaktonem a to 7,6 % (Obrázek 9). Bohužel se zároveň jedná o vzorek s nejnižším množstvím biomasy a PHA. Nejvhodnějším se tedy zdá přídavek 1,4-butandiolu spolu s xylózou. V tomto případě bylo naměřeno 4,4 % 4HB a bylo tedy potvrzeno, že kmen DSM 15344^{T} je schopný inkorporovat 4HB do polymeru.



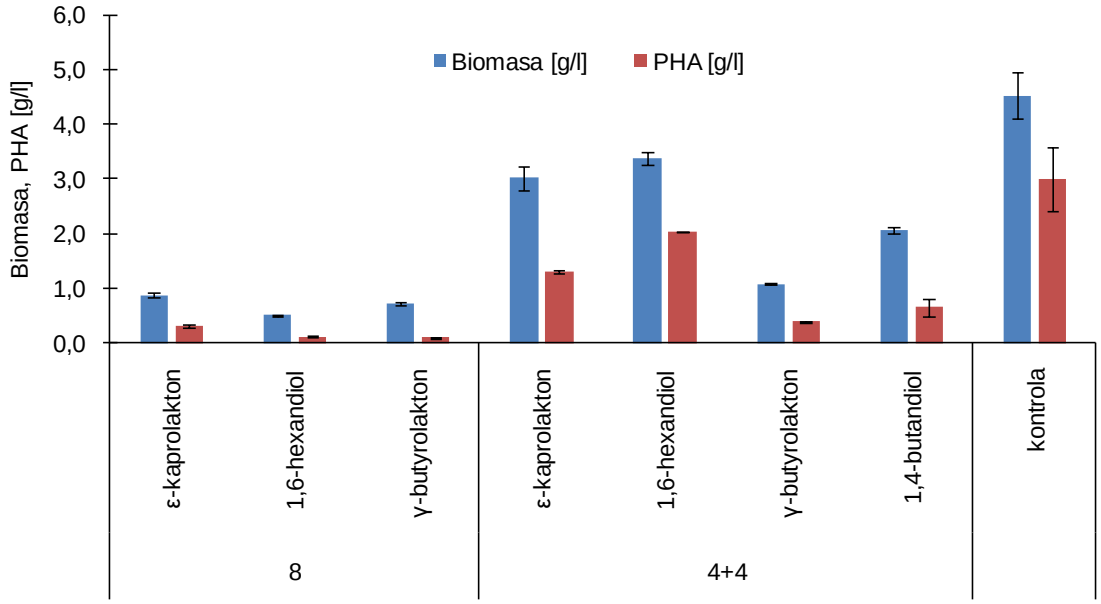
Obrázek 10 Koncentrace biomasy a PHA vytvořené bakterií S. thermodepolymerans M 15344

Z výsledků z obrázku 10 vyplývá, že bakterie *S. thermodepolymerans* M 15344 nebude vhodným kandidátem pro tvorbu kopolymerů s 4HB, protože prekurzory měly negativní vliv na růst biomasy. Nejvyšší množství biomasy činí pouze 2,19 g/l. Toho bylo docíleno u vzorku s γ-butyrolaktonem. Zároveň je u všech vzorků velmi malé množství PHA. Nejvíce PHA bylo taktéž u vzorku s γ-butyrolaktonem, bylo ho 0,51 g/l.



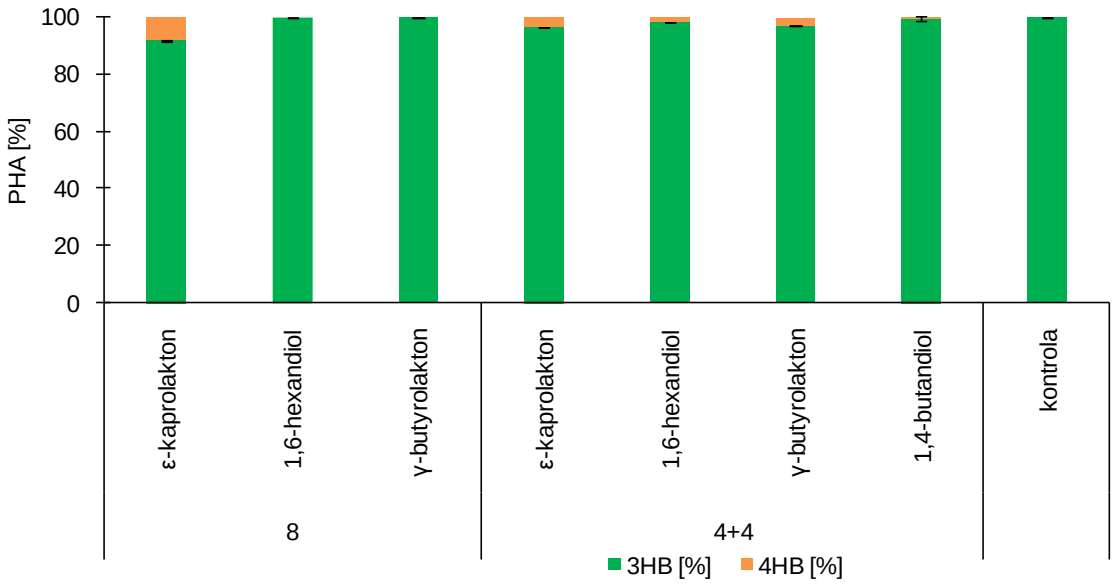
Obrázek 11 Obsah 3HB a 4HB pro bakteriální kmen S. thermodepolymerans M 15344

Zajímavé výsledky poskytuje obrázek 11, na kterém je možné vidět, že ačkoliv byly výtěžky biomasy a PHA malé, tak obsah 4HB je vysoký. Obsah 4HB u 1,4-butandiolu s koncentrací prekurzoru 8 g/l byl 95 % (množství biomasy bylo 0,8 g/l). Hned druhá nejvyšší hodnota 4HB je u vzorku γ-butyrolaktonu ze stejné sady jako předešlý vzorek. Bohužel se však jedná o vzorky, u kterých je množství biomasy velmi nízké.



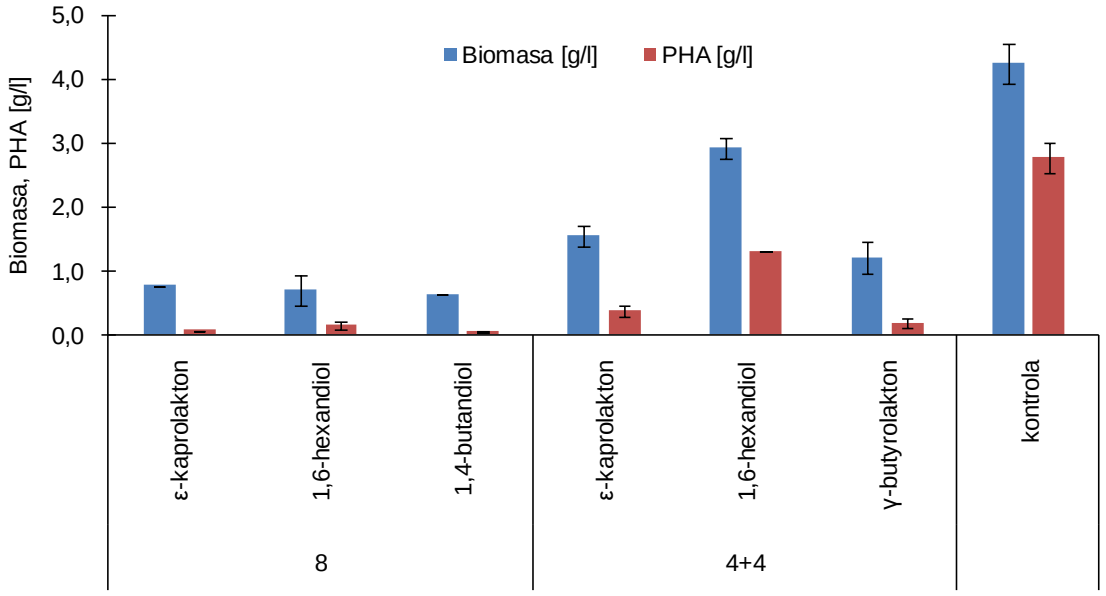
Obrázek 12 Koncentrace biomasy a PHA vytvořené bakterií S. thermodepolymerans DSM 15264

U kmene DSM 15264 je možné pozorovat, že vyšších výtěžků bylo dosaženo při přidání 4 g/l prekurzoru a xylózy, nejvíce pak u 1,6-hexandiolu (Obrázek 12). Množství biomasy bylo 3,38 g/l a PHA 2,04 g/l. Tento trend byl vidět již u kmene DSM 15344^{T}. Při použití 1,4-butandiolu jako jediného zdroje uhlíku nebylo naměřeno žádné množství biomasy ani PHA.



Obrázek 13 Obsah 3HB a 4HB pro bakteriální kmen pro bakteriální kmen S. thermodepolymerans DSM 15264

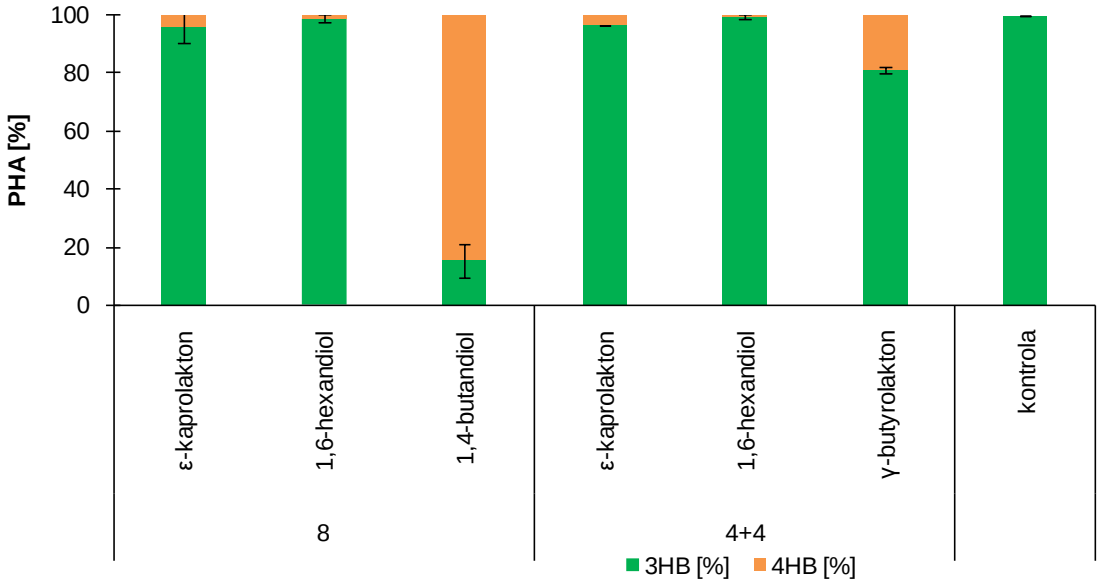
Nejvíce 4HB obsahoval vzorek s ε-kaprolaktonem při použití 8 g/l prekurzoru (Obrázek 13). U této kultivace však bylo jen 0,32 g/l PHA. U zbylých vzorků bylo do 3,6 % 4HB v PHA. U vzorků s 1,6-hexandiolem a γ-butyrolaktonem při koncentraci 8 g/l byl akumulovaný polymer tvořen pouze 3HB.



Obrázek 14 Koncentrace biomasy a PHA vytvořené bakterií S. thermodepolymerans LMG 21645

U bakterie LMG 21645 z belgické sbírky byl nejzajímavější výsledek při přidání 1,6-hexandiolu spolu s xylózou (Obrázek 14). Výtěžek dosáhl hodnoty 2,92 g/l pro biomasu a 1,31 g/l pro PHA. Opět je možné pozorovat vyšší výtěžky u vzorků s přidanou xylózou.

V tomto případě je to pravděpodobně způsobeno velkým množstvím prekurzoru, který bakterie není schopna zpracovávat a potřebuje přijatelnější zdroj uhlíku v podobě xylózy.



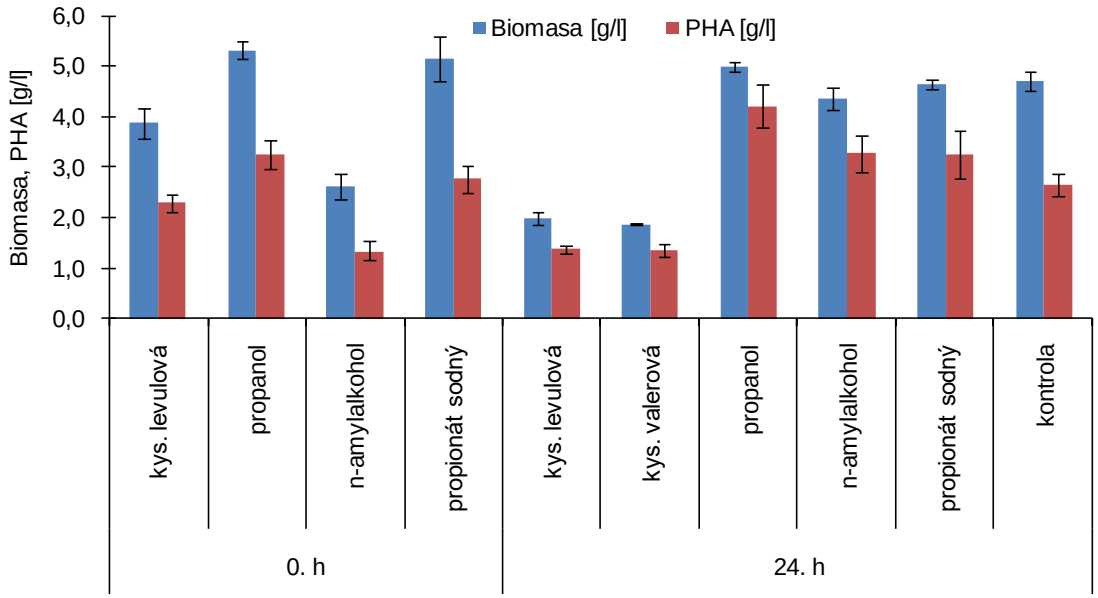
Obrázek 15 Obsah 3HB a 4HB pro bakteriální kmen pro bakteriální kmen S. thermodepolymerans LMG 21645

Nejvyšší obsah 4HB byl u 1,4-butandiolu (Obrázek 15), což je stejný případ jako u kmene M 15344. Tam byl obsah 95 %. Zde je obsah nižší o 10 %. Bohužel množství PHA bylo pouze 0,05 g/l, toto množství polymeru je velmi nízké a může docházet ke zkreslení výsledku. U vzorku s 1,6-hexandiolem, který obsahoval nejvíce biomasy ze sady, bylo jenom 0,5 % 4HB. Druhý nejvyšší obsah byl u vzorku s γ-butyrolaktonem, nicméně množství biomasy je opět velice nízké.

Podobným znakem všech kmenů bakterií byly větší výtěžky u kombinace prekurzoru s xylózou. Nejvyšší výtěžek celé sady byl zaznamenán u typového kmene DSM 15344^T při kombinaci 1,4-butandiolu a xylózy (5,89 g/l). U kmene M 15344 při koncentraci prekurzoru bylo dosaženo největšího obsahu 4HB (95,7 %).

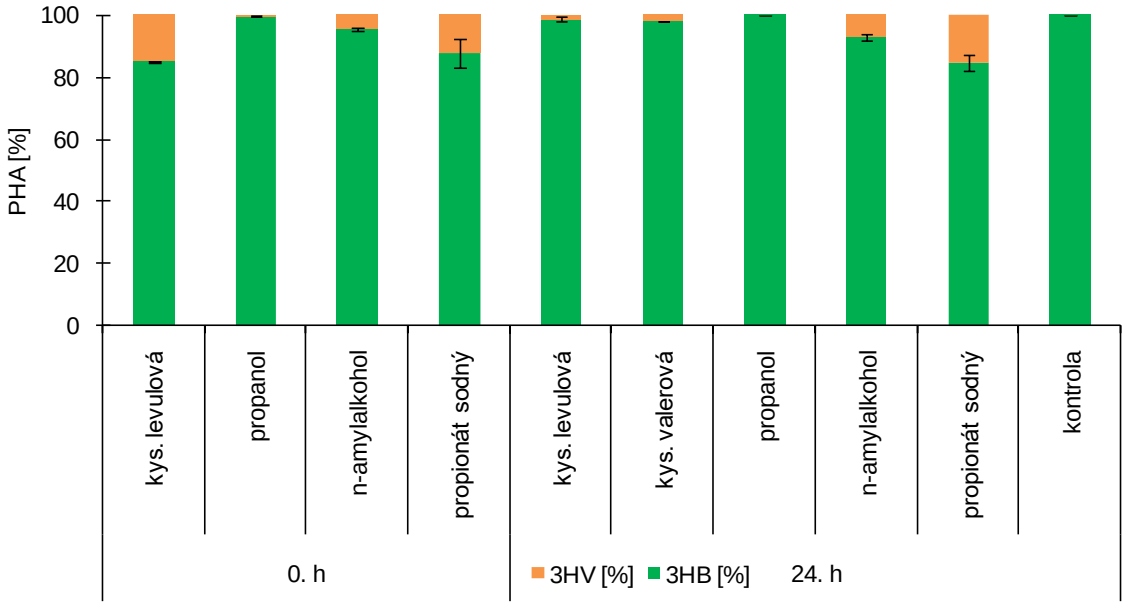
4.1.3. Screening produkce kopolymerů s obsahem 3HV

Jedním z dalších možných kopolymerů je P(3HB-*co*-3HV). U tohoto experimentu byla sledována schopnost bakterií začleňovat prekurzory pro 3HV do struktury PHA. Bylo vybráno pět prekurzorů. Jejich koncentrace byla vždy 2 g/l. Kvůli tomu, že tyto prekurzory mohou působit inhibičně, byly testovány také dva časy přídavku daného prekurzoru, a to v čase 0 (počátku produkční kultivace) a po 24 hodinách kultivace. Kromě prekurzoru byl také přidán zdroj uhlíku, kterým byla xylóza v koncentraci 20 g/l.



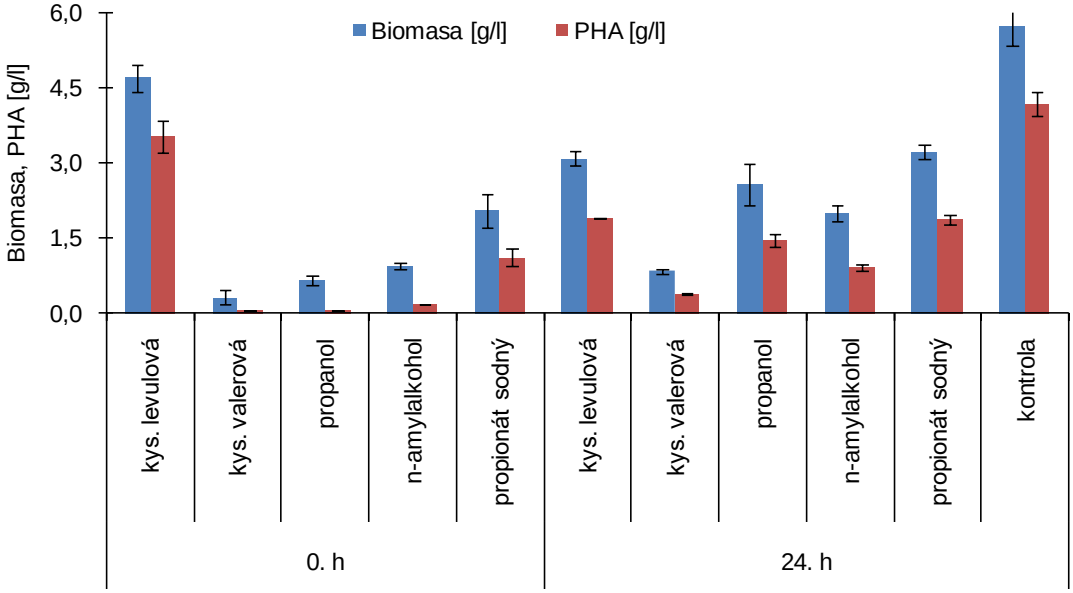
Obrázek 16 Koncentrace biomasy a PHA vytvořené bakterií S. thermodepolymerans DSM 15344^T

U typového kmene *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344^T (Obrázek 16) bylo dosaženo nejvyššího nárůstu biomasy u kultivací, kde byl do média přidán jako prekurzor propanol a propionát sodný v čase 0. h, avšak vyšší obsah PHA byl naměřen u vzorků se stejnými prekurzory a n-amylalkoholu v čase 24. h, a to i přesto že koncentrace jejich biomasy byla nižší. U kyseliny valerové je trend nízkých nebo žádných výtěžků u přídavku prekurzoru v čase 0. h. Kyselina valerová vykazovala výrazné inhibiční účinky. V případě, kdy byla kyselina valerová přidána do média v počátku produkce, byl nárůst biomasy téměř neznatelný.



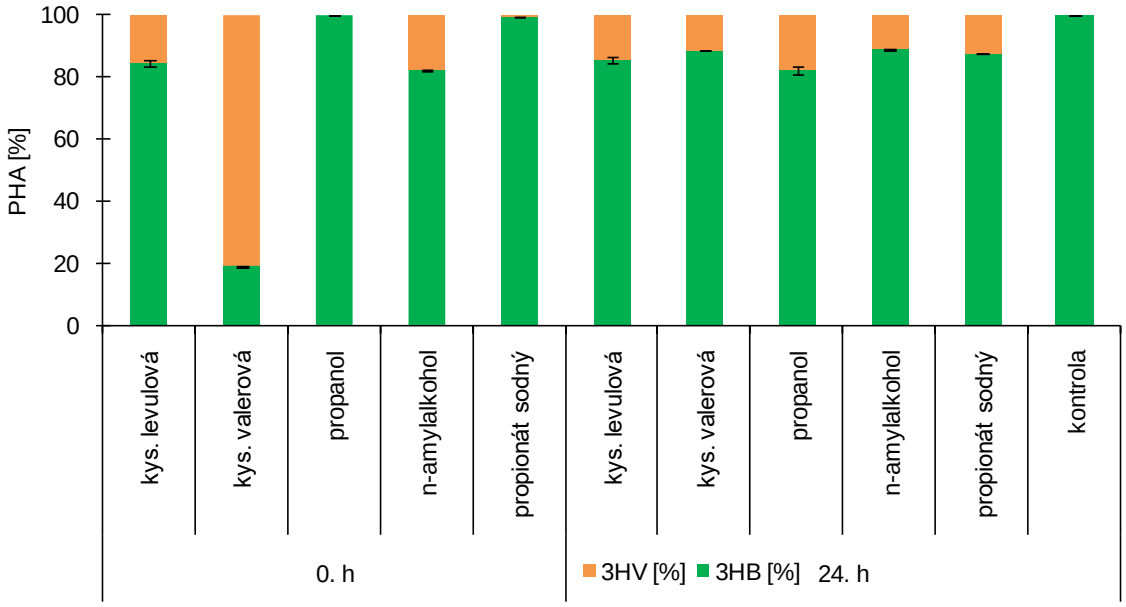
Obrázek 17 Obsah 3HB a 3HV pro bakteriální kmen pro bakteriální kmen S. thermodepolymerans DSM 15344^T

Nejvyšší obsah 3HV byl v případě kmene *S. thermodepolymerans* DSM 15344^T naměřen u propionátu sodného přidaného v čase 24. h (Obrázek 17). Koncentrace 3HV v tomto vzorku byla 1,08 g/l. To je 15,3 % z celkového PHA. Nejméně 3HV bylo naměřeno u vzorků s propanolem. Tento prekurzor se ukázal, jako skvělý pro tvorbu biomasy a PHA, avšak koncentrace 3HV při přidání v čase 0. h byla pouze 0,3 %.



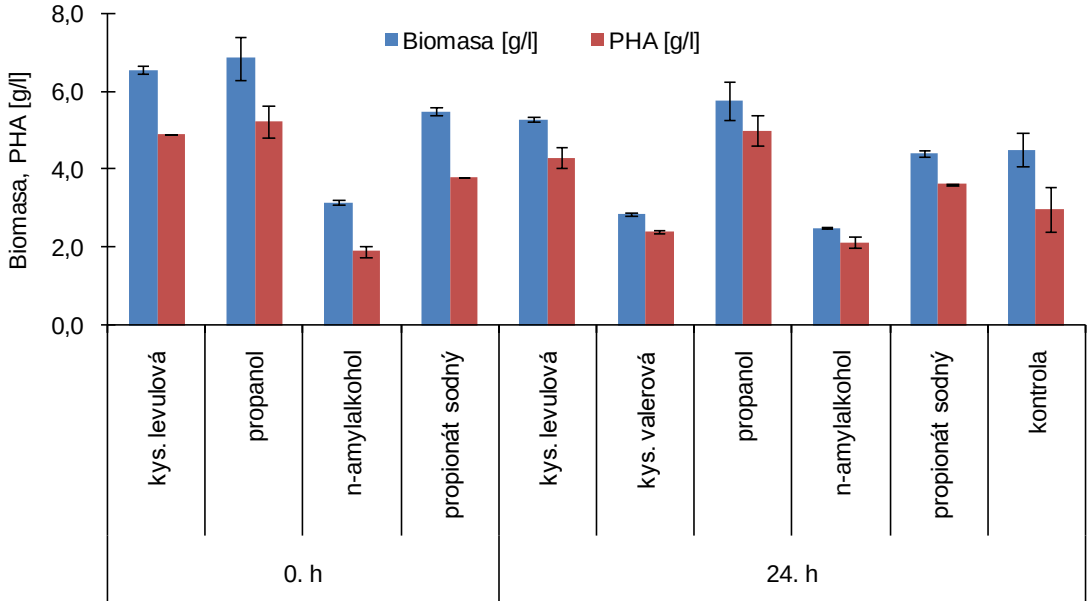
Obrázek 18 Koncentrace biomasy a PHA vytvořené bakterií S. thermodepolymerans M 15344

Z obrázku 18 je patrné, že vyšších výsledků u kmene M 15344 dosáhly produkce s přidáním prekurzoru v čase 24. h, pravděpodobně je to kvůli tomu, že tyto prekurzory fungují inhibičně a kultura není schopna se s nimi v počáteční fázi vypořádat. Tomuto trendu však neodpovídá produkce s kyselinou levulovou, která byla přidána v čase 0. h. Jedná se o největší výtěžek celé kultivace, zároveň je množství PHA vyšší než množství biomasy u ostatních produkcí. Koncentrace biomasy byla 4,7 g/l a PHA 3,52 g/l. Nejmenší výtěžky byly zaznamenány u kyseliny valerové přidané v čase 0. h.



Obrázek 19 Obsah 3HB a 3HV pro bakteriální kmen pro bakteriální kmen S. thermodepolymerans M 15344

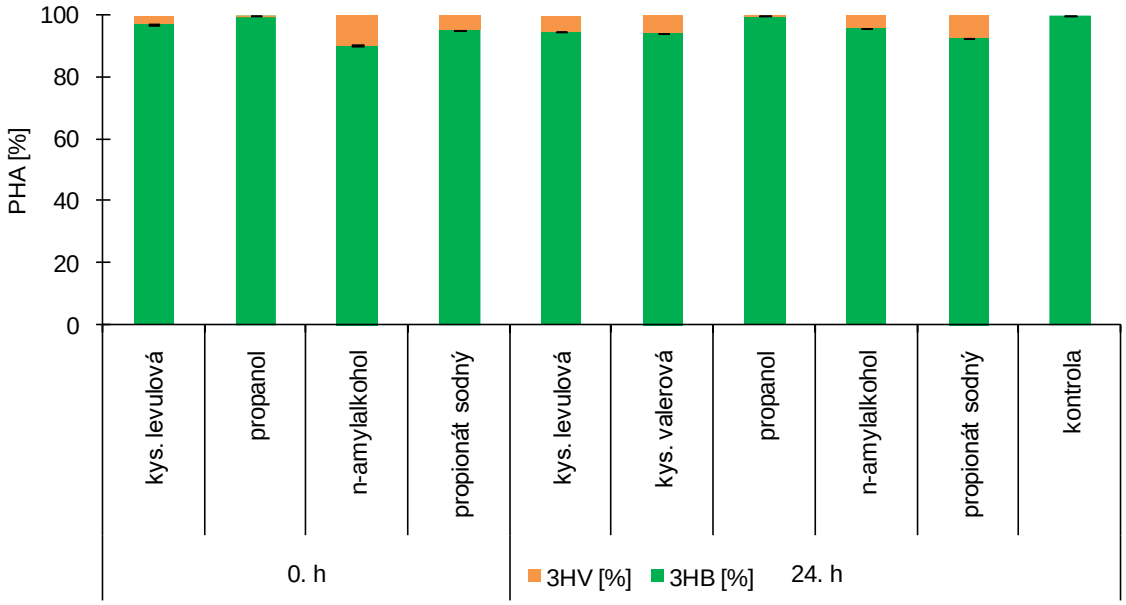
Kromě tří případů se obsah 3HV v polymeru pohyboval v rozmezí 15-18 % (Obrázek 19). Ve dvou případech byl obsah 3HV zanedbatelný a to u prekurzorů propanolu a propionátu sodného, které byly přidány v čase 0. h. Zajímavý je však obsah 3HV u vzorku s kyselinou valerovou přidanou v čase 0h. Obsah 3HV zde dosahuje 81,1 %, nicméně množství PHA bylo pouze 0,04 g/l. Vzhledem k malému množství mohlo dojít ke zkreslení tohoto výsledku.



Obrázek 20 Koncentrace biomasy a PHA vytvořené bakterií S. thermodepolymerans DSM 15264

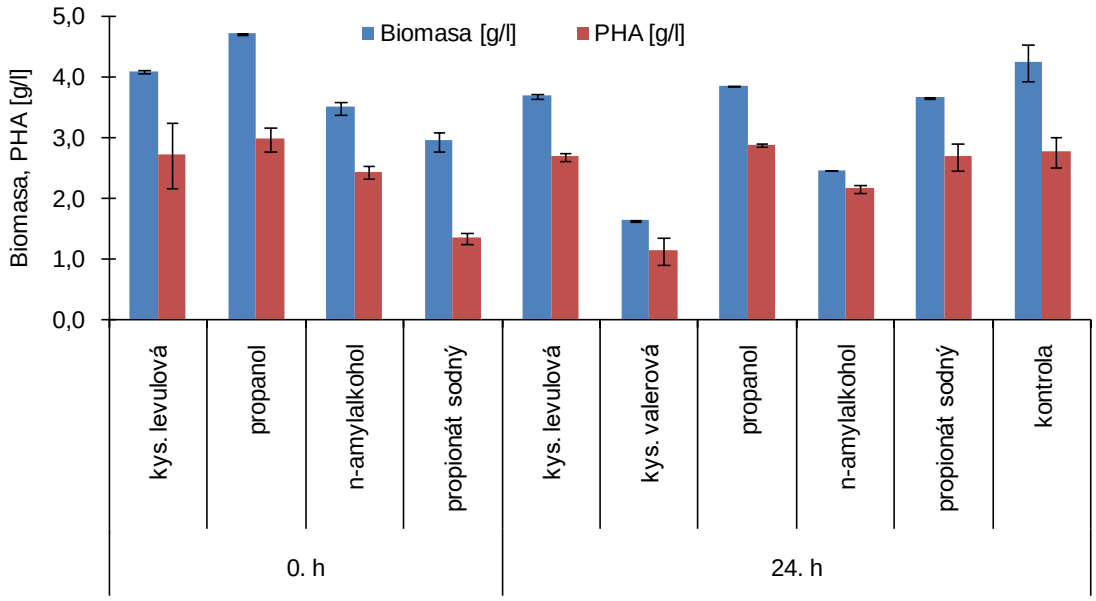
U bakteriálního kmene *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15264 bylo zjištěno, že největšího množství biomasy a PHA je dosaženo při použití propanolu jako prekurzoru

v čase 0. h (Obrázek 20). Koncentrace biomasy dosáhla 6,88 g/l. Z toho bylo 76,4 % PHA. U kyseliny valerové přidané v čase 0. h bylo naměřeno mizivé množství biomasy. Nejvíce obsahu PHA (86,6 %) vzhledem k biomase bylo naměřeno u vzorků s propanolem, který byl přidán v čase 24. h.



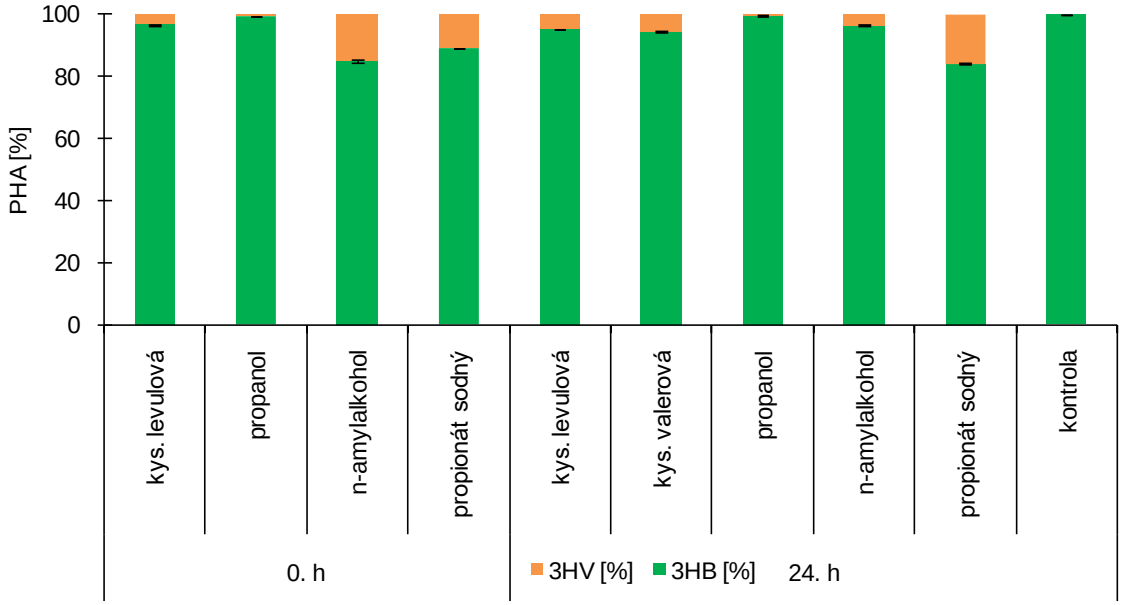
Obrázek 21 Obsah 3HB a 3HV pro bakteriální kmen pro bakteriální kmen S. thermodepolymerans DSM 15264

Jak vyplývá z obrázku 21, nejvíce 3HV bylo akumulováno při použití n-amylalkoholu v čase 0. h. PHA v tomto případě bylo tvořeno 3HV z 10,1 %. U ostatních vzorků obsah 3HV tvořil 0,3-7,6 % PHA. I přesto že bylo nejvíce PHA naměřeno u vzorků s propanolem, pro další měření byly vybrány kultivace s kyselinou levulovou, protože poskytovaly nejlepší poměr množství PHA a množství 3HV.



Obrázek 22 Koncentrace biomasy a PHA vytvořené bakterií S. thermodepolymerans LMG 21645

U kmene LMG 21645 pocházejícího z belgické sbírky bylo znovu docíleno největšího výtěžku biomasy a PHA u vzorku propanolu přidaného v čase 0. h (Obrázek 22). Naměřená koncentrace biomasy činila 4,71 g/l. V případě PHA to bylo 2,97 g/l. U kyseliny valerové je možné vidět další potvrzení její výrazné inhibiční aktivity.



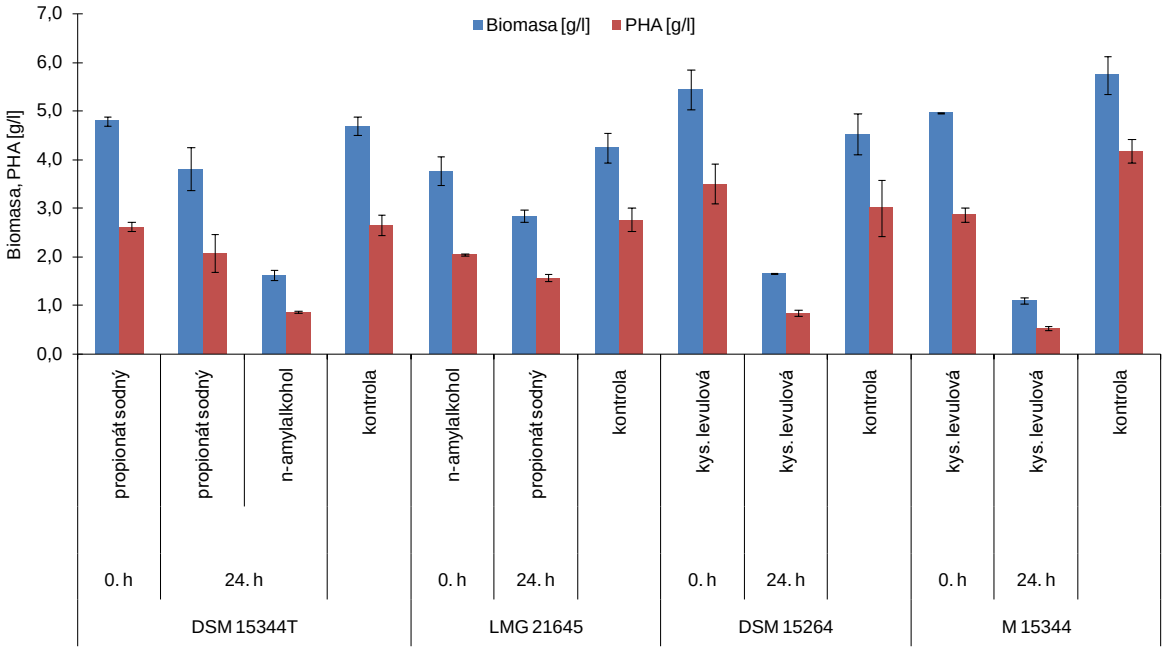
Obrázek 23 Obsah 3HB a 3HV pro bakteriální kmen pro bakteriální kmen S. thermodepolymerans LMG 21645

Nejvyšší obsah 3HV pro kmen LMG 21645 byl naměřen s propionátem sodným přidaným v čase 24. h, a to 16,1 % (Obrázek 23). Druhý největší obsah byl u n-amylalkoholu v čase 0. h. Obsah 3HV u ostatních testovaných prekurzorů byl až 10,8 %. U vzorku s propanolem

přidaného na začátku kultivace bylo naměřeno velmi malé množství 3HV a u vzorku s přidáním v čase 24. h nebylo naměřeno žádné množství 3HV.

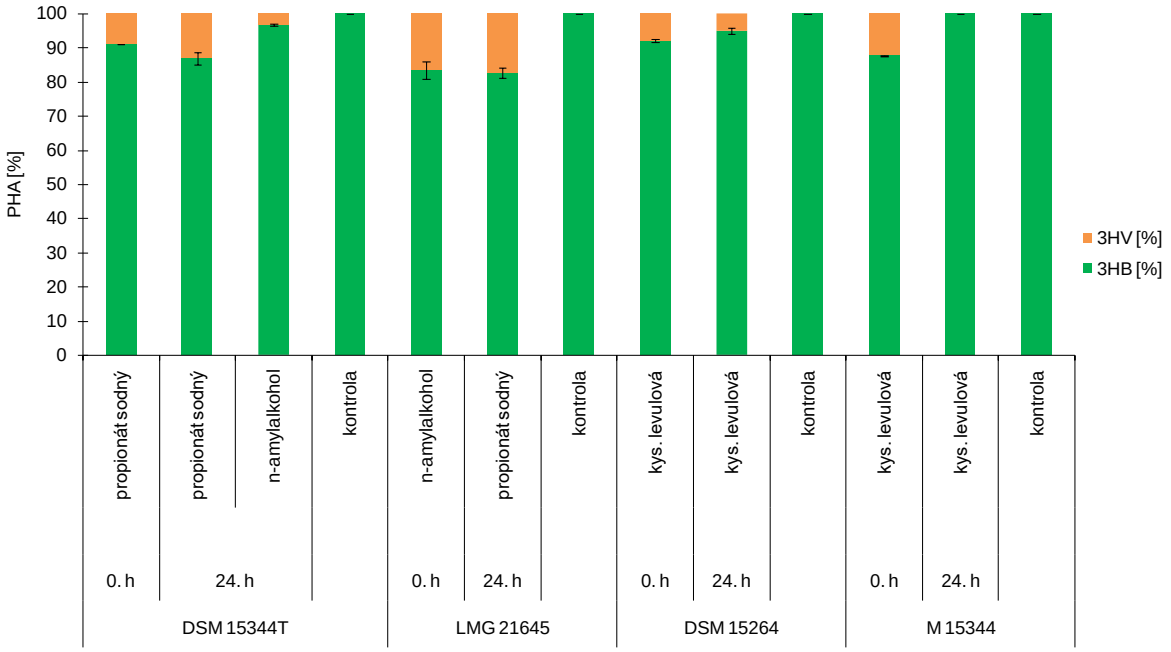
4.1.4. Screening produkce kopolymerů s vybranými prekurzory

S. thermodepolymerans se nejlépe osvědčila právě při produkci kopolymerů obsahující 3HV. Proto i následující experimenty byly zaměřeny právě na tvorbu těchto kopolymerů. Cílem kultivace, jejíž data jsou uvedena na obrázku 24, bylo vybrat nejlepší kombinaci prekurzoru a času přidání pro největší výtěžek a zároveň co nejvyšší obsah 3HV. Prekurzory byly vybrány na základě předešlého screeningu.



Obrázek 24 Koncentrace biomasy a PHA pro vybrané prekurzory (20 g/l xylózy + 2 g/l prekurzoru)

Výsledky screeningů naznačily, že nejvhodnější bude pokračovat v kultivacích zaměřených na produkci kopolymerů s 3HV, proto byly pro každou bakterii vybrány dvě kombinace s výjimkou typového kmene, u kterého byly vybrány kombinace tři. Data z obrázku 24 naznačují, že nejvyšší obsah biomasy a PHA byl u kmene DSM 15264 s prekurzorem kyselinou levulovou přidanou v čase 0. h. Jednalo se o 5,44 g/l biomasy a 3,50 g/l PHA. Tato kombinace byla nakonec také vybrána jako vhodná pro kultivaci s koncentrační řadou. Nejméně biomasy bylo naměřeno u bakterie M 15344 s kyselinou levulovou v čase 24. h. Větší výtěžek je u kyseliny levulové vždy při přidání v čase 0. h. V grafu je vidět, že jednotlivé bakterie upřednostňují různé prekurzory pro tvorbu PHA.



Obrázek 25 Poměr obsahu 3HB a 3HV pro vybrané prekurzory

Ačkoliv byla pro další experimenty vybrána zmíněná kultivace bakterie DSM 15264, nejvyšší obsah 3HV byl zaznamenán u bakterie LMG 21645 s propionátem sodným přidaným v čase 24. H (Obrázek 25). Obsah 3HV v polymeru byl 17,3 %. To je sice o 9,4 % více 3HV než u vybrané produkce, celkové množství biomasy a PHA vzorku s propionátem sodným však bylo malé. Biomasy bylo pouze 2,84 g/l a PHA 1,56 g/l.

Polymery vzniklé během této kultivace a následující kultivace koncentrační řady byly podrobeny analýze SEC-MALS. Tato analýza poskytuje výsledky, které vypovídají o vlivu prekurzoru na molekulovou hmotnost polymeru. Tato analýzy poskytla hodnoty pro molekulovou hmotnost a index polydisperzity Đ. Tento index vyjadřuje distribuci velikosti částic. Lze také říct, že určuje míru uniformity velikostí řetězců polymeru. Jestliže je polymer ideálně uniformní, je hodnota indexu rovna 1. Charakterizace pro vybrané kopolymery, které dosáhly nejlepších výsledků, jsou znázorněny v tabulce 4.

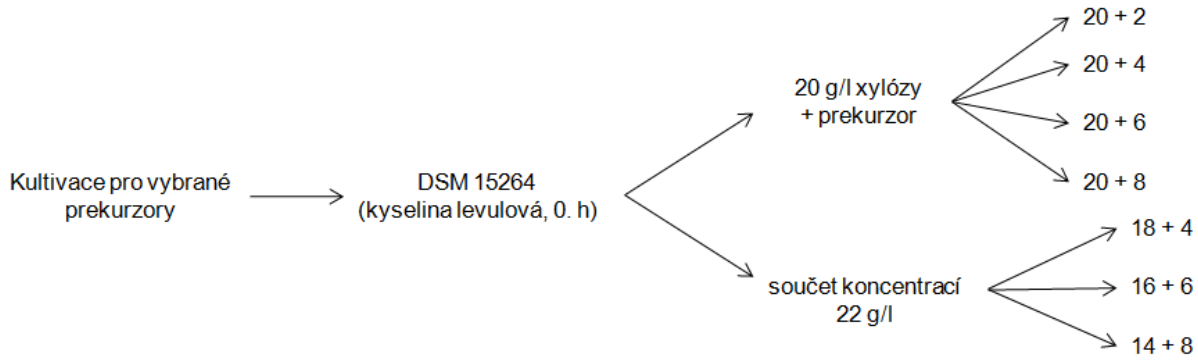
Tabulka 4 Přehled molekulových hmotností a polydisperzity pro vybrané prekurzory

Bakterie	Prekurzor	Čas přidání	Množství PHA [g/l]	Zastoupení 3HV [%]	Mw [kDa]	Polydisperzita [-]
DSMT 15344	propionát sodný	0. h	2,62 ± 0,10	8,82 ± 0,02	500,19 ± 9,07	1,19
		24. h	2,07 ± 0,38	13,09 ± 1,77	430,61 ± 18,21	1,27
	n-amylalkohol	24. h	0,87 ± 0,02	3,16 ± 0,36	232,44 ± 6,16	2,65
LMG 21645	n-amylalkohol	0. h	2,04 ± 0,02	16,49 ± 2,60	222,15 ± 6,71	1,57
	propionát sodný	24. h	1,56 ± 0,07	17,29 ± 1,50	405,35 ± 1,32	1,31
DSM 15264	kyselina levulová	0. h	3,50 ± 0,41	7,87 ± 0,38	355,84 ± 13,54	1,26
		24. h	0,84 ± 0,07	4,98 ± 0,82	414,80 ± 14,12	1,48
M 15344	kyselina levulová	0. h	2,86 ± 0,15	12,29 ± 0,24	503,07 ± 10,07	1,24
		24. h	0,53 ± 0,05	0	482,81 ± 4,23	1,26

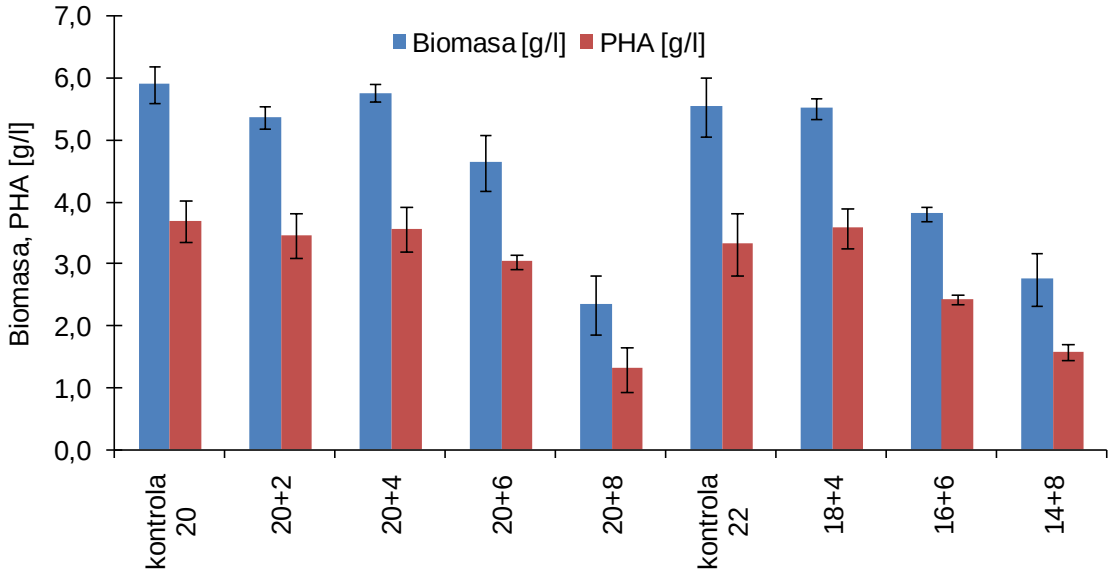
Nejnižší hodnotu polydisperzity, a tudíž i největší míru uniformity, představuje vzorek kmene DSM^T 15344 při přidání propionáty sodného v čase 0. h. Polydisperzita tohoto vzorku byla 1,19. Zároveň se jedná o vzorek s druhou největší hodnotou molekulové hmotnosti. M_w je 500,19 kDa. Naopak největší hodnota polydisperzity byla zaznamenána u vzorku stejného kmene s n-amylalkoholem přidaným po 24. h. Polydisperzita byla 2,65. Použití n-amylalkohlu vedlo k polymerům s nejnižší molekulovou hmotností. To potvrzuje fakt, že použití alkoholu jako prekurzor vede ke kratším řetězcům polymeru. Přítomnost alkoholů totiž způsobuje častější ukončení elongace polymerních řetězců PHA syntázou [43]. U vzorků se stejným kmenem a prekurzorem, lišícím se pouze v době přídavku, byly až na výjimku naměřeny větší hodnoty pro obě molekulové hmotnosti v čase 0. h.

4.1.5. Screening produkce kopolymerů koncentrační řady

Na základě předešlých kultivací byl vybrán bakteriální kmen DSM 15264 jako slibný producent P(3HB-*co*-3HV). Za kultivační podmínky byl zvolen přídavek kyseliny levulové jako prekurzoru v čase 0, hned na počátku produkční fáze. Kultivace byla rozdělena na dvě části. V první části se měnilo pouze množství prekurzoru a množství xylózy zůstalo stejné tudíž 20 g/l. V druhé části se měnila spolu s koncentrací prekurzoru i koncentrace xylózy (Obrázek 26). Paralelně byly provedeny dvě kontrolní kultivace s koncentrací xylózy 20 g/l a 22 g/l.

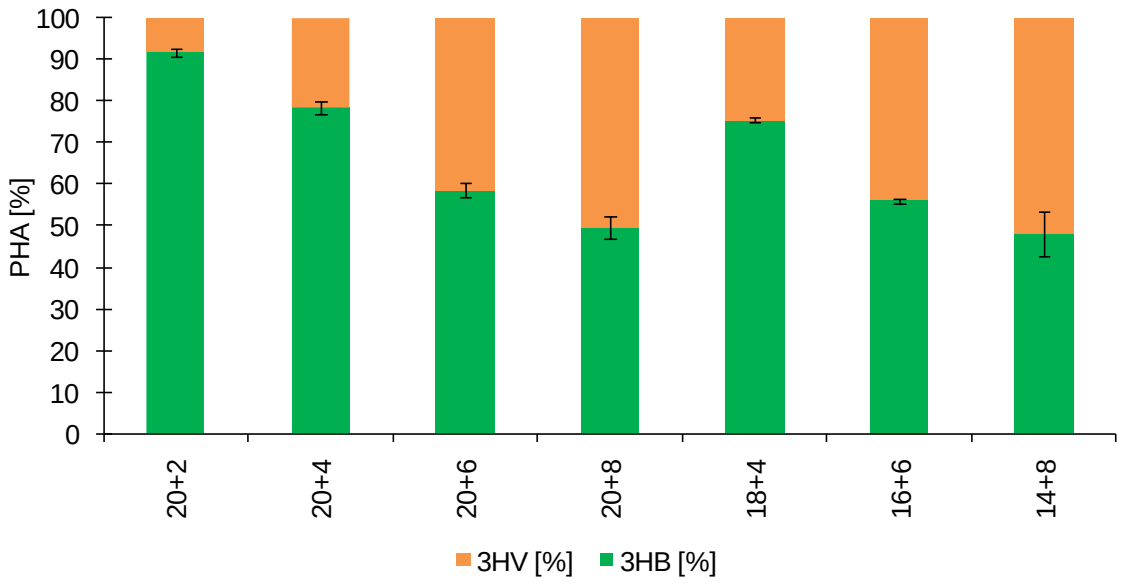


Obrázek 26 Schéma koncentrací xylózy a kyseliny levulové u kultivace koncentrační řady



Obrázek 27 Koncentrace biomasy a PHA pro vybraný prekurzor (koncentrační řada kyseliny levulové v čase 0. h u kmene DSM 15264)

Vybrané koncentrace měly ukázat, jaký poměr prekurzoru a xylózy je vhodný pro produkci kopolymerů. Obrázek 27 ukazuje, že s vyšší koncentrací prekurzoru klesá množství biomasy. Pravděpodobně bakterie potřebuje vhodnější zdroj uhlíku ve formě xylózy. Nejvyšší množství biomasy bylo u vzorků, kde byl přidán prekurzor v koncentraci 4 g/l. Paralelně byly provedeny kultivace pouze s xylózou v koncentraci 20 g/l a 22 g/l, kde vetší množství bylo naměřeno u kultivace s 20 g/l. Tyto kultivace fungovaly jako kontroly růstu.



Obrázek 28 Poměr obsahu 3HB a 3HV pro vybraný prekurzor (koncentrační řada kyseliny levulové v čase 0. h u kmene DSM 15264)

Bylo zjištěno, že množství 3HV roste s množstvím přidaného prekurzoru (Obrázek 28). Do kontrolních produkcí byla přidána pouze xylóza, takže v tomto grafu nejsou tyto kontroly znázorněny. U kontrol se vyskytuje pouze 3HB. Nejvíce 3HV je tak u vzorků s 8 g/l prekurzoru. Bylo dosaženo až 51,9 % množství 3HV zastoupeného v PHA ve vzorku 14+8. Druhý nejvyšší obsah 3HV byl u kultivace se stejným množstvím prekurzoru s přídavkem 20 g/l xylózy a to 50,3 %. Jak je vidět, oba tyto výsledky jsou přes 50 %. S rostoucí koncentrací prekurzoru roste zastoupení 3HV v polymeru. Je tak možné upravovat složení kopolymeru množstvím prekurzoru. Rozdíly ve složení polymeru mezi oběma způsoby kultivací jsou poměrně malé, takže by se do budoucna mohlo uvažovat o té, u které vyjdou zdroje uhlíku cenově přijatelněji.

Tabulka 5 Přehled molekulových hmotností a polydisperzity pro koncentrační řadu (koncentrační řada kyseliny levulové v čase 0. h u kmene DSM 15264)

Koncentrace xylózy [g/l]	Koncentrace prekurzoru [g/l]	Množství PHA [g/l]	Zastoupení 3HV [%]	Mw [kDa]	Polydisperzita [-]
20	2	3,45 ± 0,33	8,22 ± 0,94	559,94 ± 8,30	1,16
	4	3,55 ± 0,36	21,44 ± 1,57	459,22 ± 4,54	1,27
	6	3,03 ± 0,36	41,41 ± 1,67	485,87 ± 2,94	1,25
	8	1,30 ± 0,12	50,32 ± 2,86	393,01 ± 2,07	1,24
18	4	3,57 ± 0,36	24,50 ± 0,48	493,35 ± 13,03	1,23
16	6	2,42 ± 0,50	43,98 ± 0,62	426,85 ± 0,74	1,33
14	8	1,58 ± 0,32	51,96 ± 5,34	517,95 ± 13,30	1,22

Jak vyplývá z tabulky 5, žádný ze vzorků neobsahoval polymer s molekulovou hmotností menší než 300 kDa. Nejnižší hodnota polydsperzity je 1,16 a patří vzorku s 2 g/l prekurzoru. V tomto případě byla naměřena i největší molekulová hmotnost 559,94 kDa. Zároveň byl však obsah 3HV v polymeru pouze 8,2 %, což je nejméně z řady s 20 g/l xylózy. Naopak při přidání 14 g/l xylózy + 8 g/l prekurzoru došlo k vytvoření polymerů s vekou molekulovou hmotností, která dosahovala přes 500 kDa, a zastoupení 3HV v polymeru bylo téměř 52 %. 3HV v řetězci. Nejkratší řetězce byly pozorovány u kombinace 20 g/l xylózy a 8 g/l prekurzoru. Molekulová hmotnost byla 393,01 kDa, i přesto, že zastoupení 3HV bylo podobné s kultivací 14+8.

5. ZÁVĚR

Polyhydroxyalkanoáty jsou v poslední době tématem řady diskusí, zejména díky jejich biodegradovatelnosti a biokompatibilitě. Tato schopnost jim umožňuje aplikaci v medicíně a v dalších odvětvích, kde je tato vlastnost vyžadována. Do struktury PHA lze zakomponovat více druhů monomerních jednotek. Změnou poměru jednotlivých monomerů dochází ke zlepšení vlastností, čímž dostáváme mnoho možností, jak se bude polymer chovat. Zajímavými kandidáty na produkci těchto materiálů představují termofilní mikroorganismy, u kterých tyto schopnosti nebyly ještě zcela prozkoumány. Prosperují v podmínkách nepřijatelných pro ostatní mikroorganismy. Snižuje se tím pravděpodobnost kontaminace, nejčastěji mezofilními mikroorganismy. Proto byla tato práce zaměřena na termofilní bakterii *Schlegelella thermodepolymerans*. Cílem bylo najít vhodný prekurzor pro tvorbu kopolymerů.

Bylo provedeno několik kultivací na zjištění schopnosti inkorporovat do struktury PHA různé prekurzory a dostat tak zajímavé materiály. Kultivace byly provedeny pro všechny čtyři bakteriální kmeny. Jednalo se o kmeny *S. thermodepolymerans* DSM 15264, *S. thermodepolymerans* 15344^{T}, *S. thermodepolymerans* LMG 21645 a *S. thermodepolymerans* M 15344. Jako sacharidový zdroj uhlíku byla vždy použita xylóza, protože předešlé studie ukázaly, že *S. thermodepolymerans* nejlépe roste právě na tomto sacharidu.

První sada produkcí byla zaměřena na produkci kopolymerů mcl-PHA. Tam byly vybrány pouze tři prekurzory: kyselina hexanová, kyselina oktanová a kyselina dekanová. Bylo přidáno 2 g/l prekurzoru a 20 g/l xylózy. Výtěžky jednotlivých produkcí byly malé nebo žádné. Navíc nebyla u žádného vzorku naměřena přítomnost kopolymeru, protože veškeré PHA bylo tvořené pouze monomerem 3HB. U typového kmene nedošlo ani k naměření biomasy natož tvorbě dostatečně velkého množství PHA. Jediný vzorek s uspokojivým množstvím byl u kmene DSM 15264 s kyselinou hexanovou. U tohoto vzorku bylo 4,11 g/l biomasy a PHA tvořilo 55 % suché hmotnosti buněk. Prekurzory pro produkci mcl-PHA fungovaly inhibičně.

Produkce kopolymerů s 4HB byla testována se čtyřmi prekurzory: ε-kaprolakton, 1,6-hexandiol, γ-butyrolakton a 1,4-butandiol. Substráty byly přidávány v rozdílné koncentraci, kdy byl prekurzor jako jediný zdroj uhlíku v koncentraci 8 g/l nebo byl prekurzor přidán spolu s xylózou v koncentraci 4 + 4 g/l. U experimentu zaměřeného na 4HB docházelo k větší produkci při použití 4 g/l prekurzoru spolu s xylózou. Nejvyšší výtěžek celé sady byl u vzorku s 1,4-butandiolem v koncentraci 4 g/l pro kmen DSM 15344^{T}. Jednalo se o 5,89 g/l biomasy což bylo o 0,8 g/l více než u kontroly provedené spolu s produkcí. Monomer 4HB tvořil 4 % v polymeru. Jako nevhodný se ukázal kmen M 15344. Množství biomasy a PHA bylo malé v obou typech kultivací. Kmeny *S. therodepolymerans* inkorporovaly malé množství 4HB do polymeru, ale nejsou vhodným kandidátem pro biotechnologickou produkci tohoto kopolymeru.

U kultivací pro produkci kopolymeru P(3HB-*co*-3HV) bylo přidáno pět prekurzorů: kyselina levulová, kyselina valerová, propanol, n-amylalkohol a propionát sodný. U tohoto experimentu byly dvě sady vzorků, do každé se přidalo 2 g/l prekurzoru a 20 g/l xylózy.

Screening pro produkci kopolymerů s 3HV ukázal několik vhodných kombinací prekurzorů a časů přidání. Prekurzor se přidal v čase 0. h od zahájení kultivace a v druhém případě šlo o přidání po 24. h. S těmito kombinacemi byla provedena další kultivace pro potvrzení výsledků. Z těchto možností byla vybrána kombinace s kyselinou levulovou přidanou v čase 0. h. Jednalo se o bakterii *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15264. Následná úprava koncentrace přinesla zajímavé výsledky v podobě vysokého množství biomasy a PHA. Bylo zjištěno, že s přibývajícím množstvím prekurzoru klesá množství biomasy a PHA, zároveň však roste množství 3HV v kopolymeru. Obsah 3HV u některých vzorků byl dokonce vyšší než 50 % celkového PHA. Tyto hodnoty byly naměřeny u vzorků s prekurzorem v koncentraci 8 g/l. V několika případech byla pozorována inhibiční schopnost na růst a produkci kultury. Například při přidání kyseliny valerové často nebylo naměřeno žádné nebo velmi malé množství biomasy a PHA.

Analýza zaměřená na charakterizaci vzniklých materiálů byla provedena pomocí SEC-MALS. Měřenými veličinami byly molekulová hmotnost a polydisperzita. Měření bylo provedeno jak pro vybrané prekurzory, tak pro koncentrační řadu. Při použití n-amylalkohlu byly řetězce nejkratší. To potvrzuje, že použití alkoholových prekurzorů vede k tvorbě kratších polymerů. Výsledky pro koncentrační řadu ukázaly, že materiály měly od 300 do 500 kDa. Polydisperzita nepřekročila hodnotu 1,3.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] LU, Jingnan, Ryan C. TAPPEL a Christopher T. NOMURA, 2009. Mini-Review: Biosynthesis of Poly(hydroxyalkanoates). *Polymer Reviews* [online]. **49**(3), 226-248 [cit. 2022-11-19]. ISSN 1558-3724. Dostupné z: doi:10.1080/15583720903048243

[2] SUDESH, K, H ABE a Y DOI, 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science* [online]. **25**(10), 1503-1555 [cit. 2022-11-19]. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/S0079-6700(00)00035-6

[3] PHILIP, S., T. KESHAVARZ a I. ROY, 2007. *Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications* [online]. **82**(3), 233-247 [cit. 2022-11-19]. ISSN 02682575. Dostupné z: doi:10.1002/jctb.1667

[4] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Eva SLANINOVA, Ines FRITZ, Christina DAFFERT, Katharina MEIXNER, Zuzana SEDRLOVA a Martin KOLLER, 2020. Novel unexpected functions of PHA granules. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **104**(11), 4795-4810 [[cit. 2022-11-19]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-020-10568-1

[5] WEINER, R, 1997. Biopolymers from marine prokaryotes. *Trends in Biotechnology* [online]. **15**(10), 390-394 [cit. 2022-11-19]. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-7799(97)01099-8

[6] GAO, Qiang, Hao YANG, Chi WANG, et al., 2022. Advances and trends in microbial production of polyhydroxyalkanoates and their building blocks. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. **10** [cit. 2022-11-19]. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2022.966598

[7] MITRA, Ruchira, Tong XU, Guo-Qiang CHEN, Hua XIANG a Jing HAN, 2022. An updated overview on the regulatory circuits of polyhydroxyalkanoates synthesis. *Microbial Biotechnology* [online]. **15**(5), 1446-1470 [cit. 2022-11-19]. ISSN 1751-7915. Dostupné z: doi:10.1111/1751-7915.13915

[8] REDDY, C.S.K, R GHAI, RASHMI a V.C KALIA, 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology* [online]. **87**(2), 137-146 [cit. 2022-11-19]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/S0960-8524(02)00212-2

[9] SINDHU, Raveendran, Aravind MADHAVAN, K.B. ARUN, et al., 2021. Metabolic circuits and gene regulators in polyhydroxyalkanoate producing organisms: Intervention strategies for enhanced production. *Bioresource Technology* [online]. **327** [cit. 2022-11-19]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2021.124791

[10] DOI, Yoshiharu, Akira TAMAKI, Masao KUNIOKA a Kazuo SOGA, 1988. Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by Alcaligenes eutrophus from butyric and pentanoic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **28**(4-5), 330-334 [cit. 2022-11-19]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/BF00268190

[11] MENG, De-Chuan, Rui SHEN, Hui YAO, Jin-Chun CHEN, Qiong WU a Guo-Qiang CHEN, 2014. Engineering the diversity of polyesters. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. **29**, 24-33 [cit. 2022-11-19]. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2014.02.013

[12] LEE, Sang Yup, Yoo Kyung LEE a Ho Nam CHANG, 1995. Stimulatory effects of amino acids and oleic acid on poly(3-hydroxybutyric acid) synthesis by recombinant

Escherichia coli. *Journal of Fermentation and Bioengineering* [online]. **79**(2), 177-180 [cit. 2022-11-19]. ISSN 0922338X. Dostupné z: doi:10.1016/0922-338X(95)94089-A

[13] WANG, Ying, Ahleum CHUNG a Guo-Qiang CHEN, 2017. Synthesis of Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate Homopolymers, Random Copolymers, and Block Copolymers by an Engineered Strain of Pseudomonas entomophila. *Advanced Healthcare Materials* [online]. **6**(7) [cit. 2022-11-19]. ISSN 21922640. Dostupné z: doi:10.1002/adhm.201601017

[14] TSUGE, Takeharu, Toshiaki FUKUI, Hiromi MATSUSAKI, Seiichi TAGUCHI, Genta KOBAYASHI, Ayaaki ISHIZAKI a Yoshiharu DOI, 2000. Molecular cloning of two (R)-specific enoyl-CoA hydratase genes from Pseudomonas aeruginosa and their use for polyhydroxyalkanoate synthesis. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **184**(2), 193-198 [cit. 2023-05-15]. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.2000.tb09013.x

[15] NOMURA, C.T., T. TANAKA, T.E. EGUEN, A.S. APPAH, K. MATSUMOTO, S. TAGUCHI, C.L. ORTIZ a Y. DOI, 2008. FabG Mediates Polyhydroxyalkanoate Production from Both Related and Nonrelated Carbon Sources in Recombinant Escherichia coli LS5218. *Biotechnology Progress* [online]. **24**(2), 342-351 [cit. 2023-05-15]. ISSN 8756-7938. Dostupné z: doi:10.1021/bp070303y

[16] CHEN, Guo-Qiang, Ivan HAJNAL, Hong WU, Li LV a Jianwen YE, 2015. Engineering Biosynthesis Mechanisms for Diversifying Polyhydroxyalkanoates. *Trends in Biotechnology* [online]. **33**(10), 565-574 [cit. 2022-11-19]. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2015.07.007

[17] CHAVAN, Shraddha, Bhoomika YADAV, R.D. TYAGI a Patrick DROGUI, 2021. A review on production of polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters by thermophilic microbes using waste feedstocks. *Bioresource Technology* [online]. **341** [cit. 2022-11-19]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2021.125900

[18] MRAVEC, Filip, Stanislav OBRUCA, Vladislav KRZYZANEK, et al., 2016. Accumulation of PHA granules in Cupriavidus necator as seen by confocal fluorescence microscopy. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **363**(10) [cit. 2022-11-19]. ISSN 1574-6968. Dostupné z: doi:10.1093/femsle/fnw094

[19] TAL, Sara a Yaacov OKON, 1985. Production of the reserve material poly-β-hydroxybutyrate and its function in Azospirillum brasilense Cd. *Canadian Journal of Microbiology* [online]. **31**(7), 608-613 [cit. 2023-02-25]. ISSN 0008-4166. Dostupné z: doi:10.1139/m85-115

[20] KHOSRAVI-DARANI, Kianoush, Zahra-Beigom MOKHTARI, Tomohito AMAI a Kenji TANAKA, 2013. Microbial production of poly(hydroxybutyrate) from C1 carbon sources. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **97**(4), 1407-1424 [[cit. 2023-02-25]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-012-4649-0

[21] GOH, Lay-Koon, Ravi Kiran PURAMA a Kumar SUDESH, 2014. Enhancement of Stress Tolerance in the Polyhydroxyalkanoate Producers without Mobilization of the Accumulated Granules. *Applied Biochemistry and Biotechnology* [online]. **172**(3), 1585-1598 [cit. 2023-05-15]. ISSN 0273-2289. Dostupné z: doi:10.1007/s12010-013-0634-z

[22] TALAN, Anita, Rajwinder KAUR, Rajeshwar D. TYAGI a P. DROGUI, 2020. Bioconversion of oily waste to polyhydroxyalkanoates: Sustainable technology with circular bioeconomy approach and multidimensional impacts. *Bioresource*

Technology Reports [online]. **11** [cit. 2023-02-25]. ISSN 2589014X. Dostupné z: doi:10.1016/j.biteb.2020.100496

[23] JIANG, Guozhan, David HILL, Marek KOWALCZUK, Brian JOHNSTON, Grazyna ADAMUS, Victor IRORERE a Iza RADECKA, 2016. Carbon Sources for Polyhydroxyalkanoates and an Integrated Biorefinery. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **17**(7) [cit. 2023-05-15]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms17071157

[24] VASTANO, Marco, Iolanda CORRADO, Giovanni SANNIA, Daniel K. Y. SOLAIMAN a Cinzia PEZZELLA, 2019. Conversion of no/low value waste frying oils into biodiesel and polyhydroxyalkanoates. *Scientific Reports* [online]. **9**(1) [cit. 2023-02-25]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-50278-x

[25] MÁROVÁ, I.; OBRUČA, S.; PŘIKRYL, R.; VUT v Brně: *Způsob produkce polyhydroxyalkanoátů (PHA) na olejovém substrátu*. 304183, patent. (2013)

[26] KOLLER, Martin, Rodolfo BONA, Gerhart BRAUNEGG, et al., 2005. Production of Polyhydroxyalkanoates from Agricultural Waste and Surplus Materials. *Biomacromolecules* [online]. **6**(2), 561-565 [cit. 2023-02-25]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm049478b

[27] TRIPATHI, Abhishek Dutt, Pradeep Kumar MISHRA, Kianoush Khosravi DARANI, Aparna AGARWAL a Veena PAUL, 2022. *Hydrothermal treatment of lignocellulose waste for the production of polyhydroxyalkanoates copolymer with potential application in food packaging* [online]. **123**, 233-250 [cit. 2023-04-23]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2022.03.018

[28] RUTH, Katinka, Andreas GRUBELNIK, René HARTMANN, Thomas EGLI, Manfred ZINN a Qun REN, 2007. Efficient Production of (R)-3-Hydroxycarboxylic Acids by Biotechnological Conversion of Polyhydroxyalkanoates and Their Purification. *Biomacromolecules* [online]. **8**(1), 279-286 [cit. 2023-04-23]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm060585a

[29] MODJINOU, Tina, Davy Louis VERSACE, Samir ABBAD ANDALOUSSI, Valérie LANGLOIS a Estelle RENARD, 2020. Co-Networks Poly(hydroxyalkanoates)-Terpenes to Enhance Antibacterial Properties. *Bioengineering* [online]. **7**(1) [cit. 2023-02-25]. ISSN 2306-5354. Dostupné z: doi:10.3390/bioengineering7010013

[30] GONZÁLEZ, Erika, Cristina HERENCIAS a M. Auxiliadora PRIETO, 2020. A polyhydroxyalkanoate-based encapsulating strategy for 'bioplasticizing' microorganisms. *Microbial Biotechnology* [online]. **13**(1), 185-198 [cit. 2023-02-25]. ISSN 1751-7915. Dostupné z: doi:10.1111/1751-7915.13492

[31] LAMBERTI, Fabio M., Luis A. ROMÁN-RAMÍREZ a Joseph WOOD, 2020. Recycling of Bioplastics: Routes and Benefits. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. **28**(10), 2551-2571 [cit. 2023-05-15]. ISSN 1566-2543. Dostupné z: doi:10.1007/s10924-020-01795-8

[32] RAGAERT, Kim, Laurens DELVA a Kevin VAN GEEM, 2017. Mechanical and chemical recycling of solid plastic waste. *Waste Management* [online]. **69**, 24-58 [cit. 2023-05-15]. ISSN 0956053X. Dostupné z: doi:10.1016/j.wasman.2017.07.044

[33] HATTI-KAUL, Rajni, Lars J. NILSSON, Baozhong ZHANG, Nicola REHNBERG a Stefan LUNDMARK, 2020. Designing Biobased Recyclable Polymers for Plastics. *Trends in Biotechnology* [online]. **38**(1), 50-67 [cit. 2023-05-15]. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2019.04.011

[34] ARIKAN, Ezgi Bezirhan a Havva Duygu OZSOY, 2015. A Review: Investigation of Bioplastics. *Journal of Civil Engineering and Architecture* [online]. **9**(2) [cit. 2023-05-15]. ISSN 19347359. Dostupné z: doi:10.17265/1934-7359/2015.02.007

[35] RIVAS, Leonardo Fábio, Suzan Aline CASARIN, Neymara Cavalcante NEPOMUCENO, et al., 2017. Reprocessability of PHB in extrusion: ATR-FTIR, tensile tests and thermal studies. *Polímeros* [online]. **27**(2), 122-128 [cit. 2023-05-15]. ISSN 1678-5169. Dostupné z: doi:10.1590/0104-1428.2406

[36] YANG, Xi, Jocelyn CLÉNET, Huan XU, Karin ODELIUS a Minna HAKKARAINEN, 2015. Two Step Extrusion Process: From Thermal Recycling of PHB to Plasticized PLA by Reactive Extrusion Grafting of PHB Degradation Products onto PLA Chains. *Macromolecules* [online]. **48**(8), 2509-2518 [cit. 2023-05-15]. ISSN 0024-9297. Dostupné z: doi:10.1021/acs.macromol.5b00235

[37] ZEMBOUAI, Idris, Stéphane BRUZAUD, Mustapha KACI, Aida BENHAMIDA, Yves-Marie CORRE a Yves GROHENS, 2014. Mechanical Recycling of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate)/Polylactide Based Blends. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. **22**(4), 449-459 [cit. 2023-05-15]. ISSN 1566-2543. Dostupné z: doi:10.1007/s10924-014-0684-5

[38] DALTON, Bryan, Purabi BHAGABATI, Jessica DE MICCO, Ramesh Babu PADAMATI a Kevin O'CONNOR, 2022. A Review on Biological Synthesis of the Biodegradable Polymers Polyhydroxyalkanoates and the Development of Multiple Applications. *Catalysts* [online]. **12**(3) [cit. 2023-05-15]. ISSN 2073-4344. Dostupné z: doi:10.3390/catal12030319

[39] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Martin KOLLER, Dan KUCERA a Iva PERNICOVA, 2018. Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. *Biotechnology Advances* [online]. **36**(3), 856-870 [cit. 2023-05-15]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2017.12.006

[40] UMA, Ganapathi, Mariavincent Michael BABU, Vincent Samuel Gnana PRAKASH, Selvaraj Jeraldin NISHA a Thavasimuthu CITARASU, 2020. Nature and bioprospecting of haloalkaliphilics: a review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. **36**(5) [cit. 2023-05-15]. ISSN 0959-3993. Dostupné z: doi:10.1007/s11274-020-02841-2

[41] KRÜGER, Anna, Christian SCHÄFERS, Carola SCHRÖDER a Garabed ANTRANIKIAN, 2018. Towards a sustainable biobased industry – Highlighting the impact of extremophiles. *New Biotechnology* [online]. **40**, 144-153 [cit. 2023-05-15]. ISSN 18716784. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbt.2017.05.002

[42] KEENAN, Thomas M., James P. NAKAS a Stuart W. TANENBAUM, 2006. *Polyhydroxyalkanoate copolymers from forest biomass* [online]. **33**(7), 616-626 [cit. 2023-05-15]. ISSN 1367-5435. Dostupné z: doi:10.1007/s10295-006-0131-2

[43] KOURILOVA, Xenie, Iva PERNICOVA, Karel SEDLAR, Jana MUSILOVA, Petr SEDLACEK, Michal KALINA, Martin KOLLER a Stanislav OBRUCA, 2020. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a thermophilic strain of Schlegelella thermodepolymerans from xylose rich substrates. *Bioresource Technology* [online]. **315** [cit. 2023-05-15]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2020.123885

[44] PELEG, Micha, Mark D. NORMAND a Maria G. CORRADINI, 2012. The Arrhenius Equation Revisited. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. **52**(9),

830-851 [cit. 2023-05-15]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2012.667460

[45] SHIH, Tsung-Wei a Tzu-Ming PAN, 2011. Stress responses of thermophilic Geobacillus sp. NTU 03 caused by heat and heat-induced stress. *Microbiological Research* [online]. **166**(5), 346-359 [cit. 2023-05-15]. ISSN 09445013. Dostupné z: doi:10.1016/j.micres.2010.08.001

[46] BRUINS, Marieke E., Anja E. M. JANSSEN a Remko M. BOOM, 2001. Thermozymes and Their Applications: A Review of Recent Literature and Patents. *Applied Biochemistry and Biotechnology* [online]. **90**(2), 155-186 [cit. 2023-05-15]. ISSN 0273-2289. Dostupné z: doi:10.1385/ABAB:90:2:155

[47] MEHTA, Ridhi, Paavan SINGHAL, Hardeep SINGH, Dhanashree DAMLE a Anil K. SHARMA, 2016. Insight into thermophiles and their wide-spectrum applications. *3 Biotech* [online]. **6**(1) [cit. 2023-05-15]. ISSN 2190-572X. Dostupné z: doi:10.1007/s13205-016-0368-z

[48] BURGESS, Sara A., Denise LINDSAY a Steve H. FLINT, 2010. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **144**(2), 215-225 [cit. 2023-05-15]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.027

[49] DEMAIN, Arnold L., Michael NEWCOMB a J. H. David WU, 2005. Cellulase, Clostridia, and Ethanol. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. **69**(1), 124-154 [cit. 2023-05-15]. ISSN 1092-2172. Dostupné z: doi:10.1128/MMBR.69.1.124-154.2005

[50] VERA, Mario, Axel SCHIPPERS a Wolfgang SAND, 2013. Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation—part A. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **97**(17), 7529-7541 [cit. 2023-05-15]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-013-4954-2

[51] SHEU, Der-Shyan, Wen-Ming CHEN, Jr-Yung YANG a Rey-Chang CHANG, 2009. Thermophilic bacterium Caldimonas taiwanensis produces poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from starch and valerate as carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. **44**(5), 289-294 [cit. 2023-05-15]. ISSN 01410229. Dostupné z: doi:10.1016/j.enzmictec.2009.01.004

[52] ELBANNA, Khaled, Tina LÜTKE-EVERSLOH, Dieter JENDROSSEK, Heinrich LUFTMANN a Alexander STEINBÜCHEL, 2004. Studies on the biodegradability of polythioester copolymers and homopolymers by polyhydroxyalkanoate (PHA)-degrading bacteria and PHA depolymerases. *Archives of Microbiology* [online]. **182**(2-3) [cit. 2023-02-25]. ISSN 0302-8933. Dostupné z: doi:10.1007/s00203-004-0715-z

[53] ELBANNA, Khaled, Tina LÜTKE-EVERSLOH, Stefanie VAN TRAPPEN, Joris MERGAERT, Jean SWINGS a Alexander STEINBÜCHEL, 2003. 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]. **53**(4), 1165-1168 [cit. 2023-02-25]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.02562-0

[54] RAPOSO, Rodrigo S., M. Catarina M.D. DE ALMEIDA, M. da Conceição M.A. DE OLIVEIRA, M. Manuela DA FONSECA a M. Teresa CESÁRIO, 2017. A Burkholderia sacchari cell factory: production of poly-3-hydroxybutyrate, xylitol and xylonic acid

from xylose-rich sugar mixtures. *New Biotechnology* [online]. **34**, 12-22 [cit. 2023-05-15]. ISSN 18716784. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbt.2016.10.001

[55] AULING, Georg, Hans-Jürgen BUSSE, Thomas EGLI, Tarek EL-BANNA a Erko STACKEBRANDT, 1993. Description of the Gram-Negative, Obligately Aerobic, Nitrilotriacetate (NTA)-Utilizing Bacteria as Chelatobacter heintzii, gen. nov., sp. nov., and Chelatococcus asaccharovorans, gen. nov., sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* [online]. **16**(1), 104-112 [cit. 2023-04-23]. ISSN 07232020. Dostupné z: doi:10.1016/S0723-2020(11)80254-7

[56] YOON, J.-H., S.-J. KANG, W.-T. IM, S.-T. LEE a T.-K. OH, 2008. Chelatococcus daeguensis sp. nov., isolated from wastewater of a textile dye works, and emended description of the genus Chelatococcus. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* [online]. **58**(9), 2224-2228 [cit. 2023-05-15]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.65291-0

[57] KE, Cong-Yu, Guo-Min LU, Ying-Lin WEI, Wu-Juan SUN, Jun-Feng HUI, Xiao-Yan ZHENG, Qun-Zheng ZHANG a Xun-Li ZHANG, 2019. Biodegradation of crude oil by Chelatococcus daeguensis HB-4 and its potential for microbial enhanced oil recovery (MEOR) in heavy oil reservoirs. *Bioresource Technology* [online]. **287** [cit. 2023-05-15]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2019.121442

[58] REHAKOVA, Veronika, Iva PERNICOVA, Xenie KOURILOVA, et al., 2023. Biosynthesis of versatile PHA copolymers by thermophilic members of the genus Aneurinibacillus. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. **225**, 1588-1598 [cit. 2023-04-23]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.11.215

[59] XIAO, Zijun, Yu ZHANG, Lijun XI, Fangfang HUO, Jing-yi ZHAO a Jing LI, 2015. Thermophilic production of polyhydroxyalkanoates by a novel Aneurinibacillus strain isolated from Gudao oilfield, China. *Journal of Basic Microbiology* [online]. **55**(9), 1125-1133 [cit. 2023-03-18]. ISSN 0233111X. Dostupné z: doi:10.1002/jobm.201400843

[60] PERNICOVA, Iva, Ivana NOVACKOVA, Petr SEDLACEK, et al., 2020. Introducing the Newly Isolated Bacterium Aneurinibacillus sp. H1 as an Auspicious Thermophilic Producer of Various Polyhydroxyalkanoates (PHA) Copolymers–1. Isolation and Characterization of the Bacterium. *Polymers* [online]. **12**(6) [cit. 2023-04-23]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym12061235

[61] SEDLACEK, Petr, Iva PERNICOVA, Ivana NOVACKOVA, et al., 2020. 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]. **12**(6) [cit. 2023-03-18]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym12061298

[62] ERASLAN, Kerim, Clizia AVERSA, Mohammadreza NOFAR, Massimiliano BARLETTA, Annamaria GISARIO, Reza SALEHIYAN a Yonca Alkan GOKSU, 2022. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBH): Synthesis, properties, and applications - A review. *European Polymer Journal* [online]. **167** [cit. 2023-04-23]. ISSN 00143057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2022.111044

[63] ANJUM, Anbreen, Mohammad ZUBER, Khalid Mahmood ZIA, Aqdas NOREEN, Muhammad Naveed ANJUM a Shazia TABASUM, 2016. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. **89**, 161-

174 [cit. 2023-04-23]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069

[64] SHISHATSKAYA, E. I., T. G. VOLOVA, S. A. GORDEEV a A. P. PUZYR, 2012. Degradation of P(3HB) and P(3HB-co-3HV) in biological media. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. **16**(5), 643-657 [cit. 2023-04-23]. ISSN 0920-5063. Dostupné z: doi:10.1163/1568562053783678

[65] ZINN, Manfred, Bernard WITHOLT a Thomas EGLI, 2001. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. **53**(1), 5-21 [cit. 2023-03-18]. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/S0169-409X(01)00218-6

[66] FABRA, María José, Amparo LOPEZ-RUBIO a Jose M. LAGARON, 2014. Nanostructured interlayers of zein to improve the barrier properties of high barrier polyhydroxyalkanoates and other polyesters. *Journal of Food Engineering* [online]. **127**, 1-9 [cit. 2023-04-23]. ISSN 02608774. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.11.022

[67] RAY, Subhasree a Vipin Chandra KALIA, 2017. Biomedical Applications of Polyhydroxyalkanoates. *Indian Journal of Microbiology* [online]. **57**(3), 261-269 [cit. 2023-04-23]. ISSN 0046-8991. Dostupné z: doi:10.1007/s12088-017-0651-7

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

PHA	Polyhydroxyalkanoáty
scl-PHA	Polyhydroxyalkanoáty s krátkými postranními řetězci
mcl-PHA	Polyhydroxyalkanoáty se středně dlouhými postranními řetězci
lcl-PHA	Polyhydroxyalkanoáty s dlouhými postranními řetězci
PHB	Polyhydroxybutyrát
P(3HB)	Poly-3-hydroxybutyrát
P(3HV)	Poly-3-hydroxyvalerát
P(3HB-*co*-3HV)	Poly-3-hydroxybutyrát-*co*-3-hydroxyvalerát
P(3HB-*co*-4HB)	Poly-3-hydroxybutyrát-*co*-4-hydroxybutyrát
P(3HB-*co*-3HH)	Poly-3-hydroxybutyrát-*co*-3-hydroxyhexanoát
3HB	3-hydroxybutyrát
3HV	3-hydroxyvalerát
CoA	Koenzym A
ACP	Acyl přenášející protein
ATP	Adenosintrifosfát
SEC	Gelová permeační chromatografie
MALS	Detektor statického rozptylu světla ve více úhlech
GC	Gelová chromatografie
NMR	Jaderná magnetická rezonance
PhaA	β-ketothioláza
PhaB	Acetoacetyl-CoA reduktáza
PhaC	PHA syntáza
FadD	Acyl-CoA syntáza
FadE	Acyl-CoA dehydrogenáza