



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**BIOTECHNOLOGICKÁ PRODUKCE PHA POMOCÍ
EXTREMOFILNÍCH MIKROORGANISMŮ**

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF PHA EMPLOYING SELECTED EXTREMOPHILES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Pavlína Kurzová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1282/2017
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Pavčina Kurzová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název bakalářské práce:

Biotechnologická produkce PHA pomocí extremofilních mikroorganismů

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracovat literární rešerši na zadané téma
2. Výběr a charakterizace extremofilního producenta PHA
3. Ověření vhodnosti vybraného kmene pro biotechnologický proces výroby PHA

Termín odevzdání bakalářské práce: 21.5.2018

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

Pavčina Kurzová
student(ka)

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

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá studiem produkce polyhydroxyalkanoátů (PHA) bakteriálním kmenem *Halomonas salina* (CCM 4361^T).

V teoretické části jsou zpracovány vlastnosti a biosyntéza PHA a charakteristika extremofilních bakterií. Experimentální část je zaměřena na kultivaci bakterie na různých substrátech a koncentracích soli v médiu pro optimální produkci PHA. Množství biomasy a PHA bylo analyzováno pomocí spektrofotometrické metody a plynové chromatografie s FID detekcí. Pro produkci PHA byla nejlepším substrátem vyhodnocena fruktóza, kdy bylo dosaženo 12,55% PHB v biomase. Optimální koncentrace NaCl byla dosažena při 80 g/l. Bakterie byla testována pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a detekována gelovou elektroforézou. Testování prokázalo obsah *phaC* genu, který kóduje klíčový enzym biosyntézy PHA - PHA syntázu.

Abstract

This bachelor thesis is focused on study of production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by bacteria *Halomonas salina* (CCM 4361^T).

Theoretical part deals with the properties and biosynthesis of PHA and chracterization of extremophiles bacteria. The experimental part is focused on cultivation of bacteria on different substrates and concentration of sodium chloride in medium for optimal production of PHA. Content of biomass and PHA were analyzed by spektrofotometry and gass chromatography with FID. The fructose proved to be the most suitable substrate for a production of PHA, with a content of 12,55 % of PHA in biomass. Optimal concetration of NaCl was found at 80 g/l. Bacteria were investigated by molecular technique polymerase chain reaction (PCR) and detected by gel elctrophoresis. Test confrimed opresence of *phaC* gene encoding for PHA synthase, enzyme which is necessary for PHA biosynthesis.

Klíčová slova

Polyhydroxyalkanoáty, Etremofilní organismy, *Halomonas salina*

Key words

Polyhydroxyalkonoate, extremophiles mikrorganism, *Halomonas salina*

KURZOVÁ, P. *Biotechnologická produkce PHA pomocí extremofilních mikroorganismů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 44 s.
Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D..

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité zdroje jsem správně a úplně citovala. 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:

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mojí bakalářské práce doc. Ing. Stanislavu Obručovi Ph.D., Ing. Ivě Pernicové a Ing. Danu Kučerovi za pomoc při práci v laboratoři, za rady a připomínky, ochotu, trpělivost a vstřícný přístup. Dále bych také ráda poděkovala svému partnerovi, rodině a přátelům za podporu při psaní bakalářské práce a během celého studia.

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část	9
2.1	Polyhydroxyalkanoáty	9
2.1.1	Historie.....	9
2.1.2	Chemická struktura	9
2.1.3	PHB.....	10
2.1.4	Biosyntéza PHA.....	11
2.1.5	Aplikace PHA	13
2.2	Extremofilní mikroorganismy	14
2.2.1	Termofilní mikroorganismy.....	15
2.2.2	Psychrotrofilní mikroorganismy	16
2.2.3	Piezofilní mikroorganismy	16
2.2.4	Acidofilní mikroorganismy.....	17
2.2.5	Alkalofilní mikroorganismy	17
2.2.6	Halofilní mikroorganismy.....	17
2.2.7	Využití extremofilních organismů	18
2.3	Bakteriální producenti PHA	19
2.3.1	<i>Bacillus megaterium</i>	19
2.3.2	<i>Cupriavidus necator</i>	20
2.3.3	Rod <i>Burkholderia</i>	20
2.3.4	Rod <i>Halomonas</i>	20
2.3.5	Extremofilní mikroorganismy jako producenti PHA	21
3	Experimentální část.....	22
3.1	Použité mikroorganizmy, chemikálie a přístroje	22

3.1.1	Použitý mikroorganismus	22
3.1.2	Použité chemikálie	22
3.1.3	Přístrojové vybavení	23
3.2	Kultivace mikroorganismu <i>Halomonas salina</i>	23
3.2.1	Příprava inokula	23
3.3	Použité metody	24
3.3.1	Polymerázová řetězová reakce – PCR	24
3.3.2	Gelová elektroforéza	26
3.3.3	Sekvenace	27
3.3.4	Studium extracelulární lipolytické aktivity	28
3.3.5	Spektrofotometrické měření zákalu	28
3.3.6	Gravimetrické stanovení biomasy	28
3.3.7	Stanovení PHA v pomoci plynové chromatografie	29
3.3.8	Optimalizace pro růst bakterií a produkci PHA	29
3.3.9	Studium vlivu koncentrace soli na produkci PHA	30
3.3.10	Kultivace po přidavku prekurzorů	30
4	Výsledky měření a diskuze	31
4.1	Důkaz lipolytické aktivity	31
4.2	Identifikace <i>phaC</i> genu pomocí PCR	32
4.3	Sekvenace	32
4.4	Optimalizace pro růst bakterií a produkci PHA	33
4.4.1	Optimalizace růstu na uhlíkovém substrátu	33
4.4.2	Vliv koncentrace soli na růst a produkci PHA	35
4.5	Kultivace po přidavku prekurzorů	36
5	Závěr	38

6	Použitá literatura	39
7	Použité zkratky.....	43
8	Přílohy.....	44

1 ÚVOD

Mikroorganismy jsou důležitými činiteli pro procesy v životním prostředí. Podílejí se na degradaci a transformaci většiny organických látek a to včetně syntetických polymerních materiálů. Právě plasty, jsou pro své kvality, jako je pevnost, odolnost či cenová dostupnost, nedílnou součástí našich životů. Využití mají napříč technickými a průmyslovými odvětvími. Často nahrazují tradiční materiály. Nevýhodou využívání plastů představuje jejich ekologická udržitelnost. Výroba je závislá na neobnovitelných fosilních zdrojích, vzniká zde velké množství skleníkových plynů a díky své nerozložitelnosti znečišťují životní prostředí. Díky své neschopnosti biodegradovat se kumulují. Alternativou, šetrnou k životnímu prostředí, je nahrazení syntetických polymerů polymery přírodními, tzv. biodegradabilními polymery. [1]

Biodegradace, proces, kterým se rozkládá materiál, by mohl vyřešit mnohé problémy životního prostředí, jako je například nahromadění pevného odpadu z původního syntetického polymeru. Schopnost biodegradace má mnoho mikroorganismů. Hlavními produkty těchto procesů jsou mikroorganismy samy - biomasa. Velkou a důležitou částí biomasy tvoří polymerní materiály. Velká část z nich jsou bílkoviny a nukleové kyseliny, které jsou zodpovědné za hlavní část metabolických procesů v buňce. Také polymery, které jsou ukládány uvnitř mikroorganismu, jsou důležité jak v samotných buňkách, tak i v přírodním prostředí. Díky svým mechanickým vlastnostem, které jsou často podobné těm vlastnostem syntetickým polymerům s vyšší biologickou rozložitelností, by tyto bakteriální biopolymery mohly působit jako ekologicky šetrná alternativa k syntetickým polymerům. [2]

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou polymery přírodního původu, syntetizované mnoha bakteriemi jak gram-pozitivními a gram-negativními, tak i archeálními kmeny. [3] Lze také říci, že se jedná o materiály podobné, díky svým vlastnostem, plastům-syntetickým polymerům. Bakterie si tyto biopolymery ukládají jako zásoby energie a záložní zdroj uhlíku. V buňkách jsou shromážděny ve formě intracelulárních zrn neboli granulí. [4]

Fyzikální i chemické vlastnosti těchto přírodních polyesterů jako nerozpustnost ve vodě, odolnost vůči hydrolýze a hlavně rozložitelnost v přírodě, jsou pro nás atraktivními. [5]

Jejich nejzajímavějšími a pro nás nejdůležitějšími vlastnostmi jsou biodegradabilita a biokompatibilita. Biodegradabilita je proces biologického odbourávání, v podstatě se jedná o přirozený rozklad a biokompatibilita je biologická snášenlivost, kdy při specifické aplikaci je materiál snášen živým organismem. Můžeme říct, že PHA jsou biologicky odbouratelné polymery degradující jak za aerobních podmínek, tak i za podmínek anaerobních. [6,7]

2.1.1 Historie

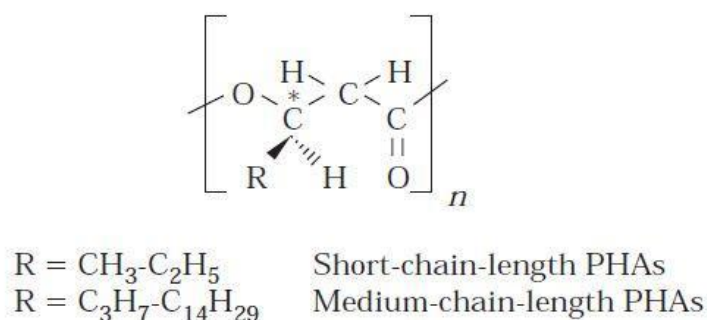
Nizozemský mikrobiolog Beijerinck pozoroval intracelulární zrna PHA v bakteriální buňce již roku 1888. Avšak prvním objeveným PHA byl poly 3-hydroxybutylát (P3HB), který byl vyizolován jako homopolymer kyseliny 3-hydroxybutanové z bakterie *Bacillus megaterium* roku 1926 francouzským biologem Lemoignem. Roku 1958 prováděli Macrae a Wilkinson experimenty, díky kterým bylo prokázáno, že při absenci exogenního zdroje uhlíku i energie, dochází u těchto bakterií k využívání PHA jako zásobního zdroje energetického materiálu. [5]

Hydroxybutyrát je nejčastěji se vyskytujícím monomerem. Doposud je však známo více než 150 dalších monomerních jednotek produkujících PHA. [7]

2.1.2 Chemická struktura

Fyzikální vlastnosti PHA i vlastnosti materiální záleží na složení jejich monomerů a chemické struktuře. Jedná se o opticky aktivní látky skládající se z monomerů 3-hydroxykyselin v konfiguraci R. Typ monomeru, který je začleněn do rostoucího řetězce je ovlivněn a závislý jak na použitém mikroorganismu, tak požitým zdroji uhlíku a podmínkách kultivace. [5,6]

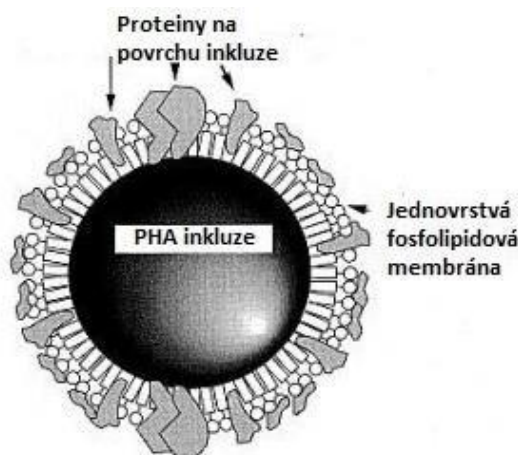
Polyhydroxyalkanoáty obecně klasifikujeme do dvou hlavních skupin podle počtu atomů uhlíku v monomerní jednotce. PHA s krátkým řetězcem označované jako *ScI*-PHA (short-chain-length), jejichž monomerní jednotky jsou tvořeny 3-5 uhlíkovými sloučeninami jsou nejvíce prostudovanou skupinu biopolymeru tohoto typu. Nejznámějším je poly(3-hydroxybutyrát) (PHB) a jeho kopolymery. PHA se středně dlouhým řetězcem označujeme *Mcl*-PHA (medium-chain-length) se skládají z monomerních jednotek o 6-18ti uhlíkovými sloučeninami. [8,12]



Obrázek 1: Struktura PHA, znázornění řetězců Mcl a Scl

2.1.2.1 Struktura intracelulárních granulí PHA

Polyhydroxyalkanoáty se hromadí v buněčné cytoplazmě ve formě oddělených inkluzí neboli intracelulárních granulí o velikosti 0,2 – 0,5 μm . Na povrchu polyesterů se nachází proteiny a fosfolipidy, které představují rozmezí mezi hydrofobním polymerem a cytoplazmou. Po zkoumání PHA v oblasti spektroskopie, konkrétně spektroskopii nukleární magnetické rezonance, bylo stanoveno, že polyester se vyskytuje v metastabilním amorfním stavu. Hustota PHB granulí byla stanovena na přibližně 1,18 - 1,24 g.cm^{-3} . Phasiny, proteiny spojené s granulemi ve fosfolipidové dvojvrstvě, jsou zodpovědné za metabolismus PHA a regulaci PHA syntézy, obecně lze říci, že jsou to proteiny o malé molekulové hmotnosti. [2]



Obrázek 2: Schématické znázornění struktury PHA [3]

2.1.3 PHB

Homopolymer poly 3-hydroxybutyrát (P3HB) je polyhydroxyalkanoátem, patřícím do homologické řady alifatických polyesterů. Jedná se o netoxický, částečně krystalický, biologicky odbouratelný polymer, který je využíván a biosyntetizován různými kmeny bakterií. Nízkomolekulární PHB, obsahující přibližně 120-200 monomerních jednotek, se vyskytuje jako zásobní materiál mikroorganismů, ovšem je také všudypřítomný v přírodě. Studium prokázalo jeho vysokou rozšířenost nejen u mikroorganismů, ale i rostlin a zvířat. Jako vysokomolekulární biodegradabilní polymer má velké možnosti využití v průmyslu. Díky jeho termoplastickým vlastnostem je využíván v odvětví průmyslu zabývajícím se plasty. Dále

se využívá jako možná alternativa při výrobě nosičů léčiv. Křehkým a zároveň tuhým materiálem jej dělá jeho vysoká krystalinita, která je způsobena tím, že se jedná o stereoregulární homopolymer s uhlíkatými atomy o asymetrickém tvaru v (R)-konfiguraci. Mechanické vlastnosti má podobné syntetickému polypropylenu. V porovnání s polypropylenem vykazuje vyšší tuhost a vyšší bod tání. Se zvyšujícím se zastoupením 3HV v polymeru se snižuje jeho krystalinita a zvyšuje se flexibilita. [13]

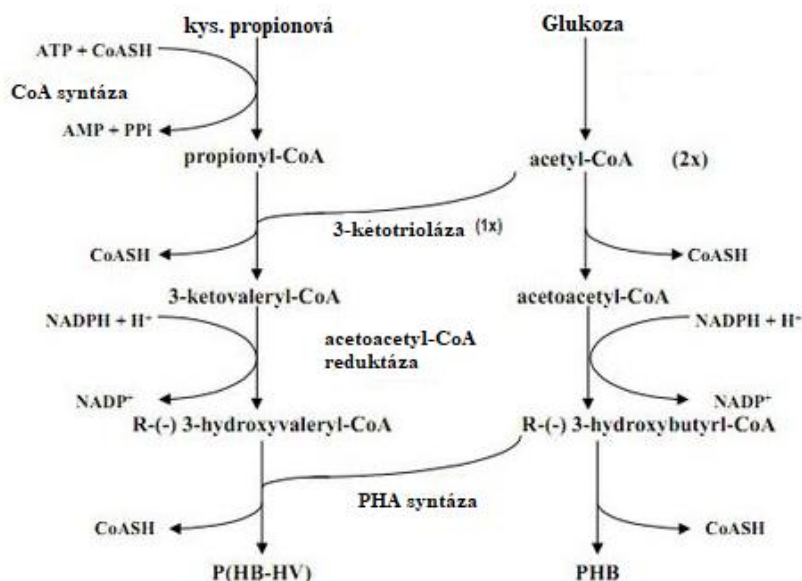
Při zkoumání tohoto polyesteru bylo stanoveno složení granulí díky výzkumu granulí bakterie *Bacillus megaterium*. Složení stanovené výzkumem činí 97,7 % polyesteru 1,87 % bílkovin a 0,46 % tuků nebo fosfolipidů. [2]

Teoreticky je tolerován organismy i ve vyšších koncentracích. Za anaerobních podmínek jej umí bakterie v odpadních vodách i kompostu rozkládat na vodu a oxid uhličitý. [13]

2.1.4 Biosyntéza PHA

Biosyntéza PHA může probíhat dvěma způsoby a to jak chemicky, tak biologicky. Tento proces je dnes velmi dobře prostudovaný u mnohých bakterií, nejlépe u mikroorganismu *Cupriavidus necator*, který můžeme považovat za modelový v souvislosti s produkcí PHA. K syntéze polyesterů dochází u mikroorganismů tehdy, pokud mají nadbytek uhlíkatého zdroje, ale naopak jsou limitovány některou z esenciálních živin. Produkce bioplastů mikroorganismy je technicky náročná a její uskutečnění je obtížné. Problémem průmyslového využití je i fakt, že výroba řady PHA je spojená s nízkou produktivitou a vysokými náklady. [2,15]

Jak už bylo řečeno, PHA jsou syntetizovány ve formě intracelulárních granulí, na kterých se ve fosfolipidové dvojvrstvě nacházejí proteiny zodpovědné za metabolismus PHA. Mezi tyto proteiny patří depolymerázy, PHA syntázy, regulační a strukturní proteiny. [4,14] Klíčovým enzymem je PHA-syntáza. Důležitým komponentem pro uskutečnění biosyntézy je Acetyl-CoA, který dodává jako substrát 3-hydroxyalkanoyl-CoA. Tento substrát lze dodat také jako produkt β -oxidace mastných kyselin v případě, že výchozím substrátem jsou oleje. [15,16]



Obrázek 3: Biosyntéza PHB *Alcaligenes eutrophus* [54]

Zdrojem acetyl-CoA je cukr, pyruvát nebo acetát nebo může vznikat při β -oxidaci mastných kyselin. Reakce probíhá ve třech krocích a je katalyzována třemi zásadními enzymy, β -ketothiolázou, Acetyl-CoA reduktázou a PHB syntázou. Tyto enzymy jsou kódovány geny *phbA*, *phbB* a *phbC*, tvořící jeden operon *phb-ABC*. [11]

Reakce začíná kondenzací dvou molekul acetylů (acetyl-CoA). Enzymem je β -ketothioláza katalyzující kondenzační reakci za vzniku dvou molekul acetoacetylů (acetoacetyl-CoA). Následně probíhá redukce na (R)-3hydroxybutyryl-CoA, katalyzovaná enzymem NADPH acetoacetyl-CoA reduktázou. Reakce končí polymerizací (R)-3hydroxybutyryl-CoA enzymem PHB syntázou na PHB. V tomto cyklu vzniká NADH, který je následně odbouráván. Při zvýšení množství vznikajícího NADH způsobeného například limitací způsobenou nedostatkem dusíku, začne NADH působit inhibičně na enzymy citrátového cyklu, což je důvodem, že nemůže být acetyl-CoA odbouráván a dojde k syntéze PHB. [11,16]

2.1.4.1 Biodegradace

Pro nás neocenitelnou výhodou polyhydroxalkanoátu je možnost jejich biodegradace, jinak řečeno přirozeného rozkladu. PHA může být rozkládáno uvnitř buňky (intracelulárně) pomocí intracelulárních depolymeráz i extracelulárně (do okolí buňky) pomocí extracelulárních depolymeráz. Rozdíl mezi těmito dvěma biodegradačními procesy není dán jen lokací průběhu degradace, ale především také odlišnou biofyzikální konformací intracelulárních (nativních) PHA a extracelulárních (denaturovaných) PHA. Při izolování inkluzí z buňky, dochází k buněčnému rozkladu a na PHA začnou působit venkovní vlivy. Působením vlivů jsou nevratné změny, jejichž následkem dojde ke krystalizaci struktury a změně konformace. [11]

Intracelulární biodegradace PHA

Jedná se o regulovaný proces, kdy jsou PHA degradovány vně buňky jako zásobní zdroj energie. Při procesu intracelulárního rozpadu PHA je nutné dodat náhradní zdroj uhlíku a energie, vzhledem k limitaci nebo úplné absenci exogenního zdroje, aby mohlo, působením intracelulárních depolymeráz, k rozkladu dojít. Procesy polymerace i depolymerace probíhají v buňce souběžně. [17,18]

U mikroorganismů bylo objeveno velké množství intracelulárních depolymeráz, které lze rozdělit do dvou skupin na základě jejich lokace v buňce na enzymy začleněné do membrány, které katalyzují hydrolýzu PHA na krátké oligomerní řetězce a enzymy volně se vyskytující v cytoplazmě, jenž štěpí krátké oligomerní PHA až na monomerní jednotky. [19]

Extracelulární biodegradace PHA

V případě extracelulární biodegradace PHA dochází, v porovnání s intracelulárními PHA, k odlišnému mechanismu odbourávání. V přírodě existuje velké množství mikroorganismů, například plísně, kvasinky nebo bakterie, které extracelulární PHA využívají jako zdroj energie a podílí se na přirozeném rozkladu. Při tomto procesu degradace je nezbytná přítomnost extracelulárních depolymeráz. Což znamená, že bez tvorby a exkrece nezbytného enzymu daným mikroorganismem do okolí nebude organismus PHA odbourávat. Syntéza těchto depolymeráz je vysoce regulovaná. Extracelulární depolymerázy jsou produkovány mikroorganismy v prostředí buňky. Velká část mikroorganismů rozkládajících PHA potlačuje, v přítomnosti jiného zdroje uhlíku, proces syntézy depolymerázy až do vyčerpání živin, kdy je syntéza znovu zpuštěna. [11,20]

Tento typ degradace probíhá v každém ekosystému jak za aerobních, tak i anaerobních podmínek. Proces degradace polymeru je ovlivněn daným ekosystémem a jeho mikrobiologickými parametry, čili populační hustotou, mikrobiální diverzitou, mikrobiální aktivitou a také prostorovým zastoupením mikroorganismů. Je také nutné brát ohled a pozornost na fyzikálně-chemické parametry ekosystému, kterými je ovlivňován proces na biodegradaci, teplota, pH, obsah vody a kyslíku, redoxní potenciál a zásoba živin. Dalším důležitým prvkem ovlivňujícím biodegradabilitu je vliv polymeru samotného. Nejdůležitějším faktorem pro rozklad PHA jsou krystalinita, stereoregularita, dále také molekulární hmotnost a typy monomerních jednotek, a v neposlední řadě i způsob zpracování materiálu. [19,20]

2.1.5 Aplikace PHA

Vzhledem ke svým vlastnostem, především podobnosti plastům, mají vysoký potenciál pro využití v mnoha odvětvích průmyslu. Velkou výhodou je i hydrobobicita, která jim přidává uplatnění při povrchových úpravách vyžadujících polopropustnost či úplnou voděodolnost. Neocenitelnou schopností PHA je možnost využít k jejich produkci obnovitelné zdroje, a to vzhledem k faktu, že na rozdíl od syntetických polymerů nejsou závislé na dostupnosti a produkci ropy. Biodegradace PHA vede k rozkladu na neškodné, k přírodě šetrné a běžně se vyskytující produkty. Unikátní kombinace vlastností PHA činí tyto přírodní polymery velice

atraktivními pro využití v mnoha odvětvích průmyslu a především zajímavými pro naši budoucnost. [12]

Některé PHA, jako například PHB, poly(4-hydroxybutyrát) (P4HB), kopolymery 3-hydroxybutyrátu a 4-hydroxybutyrátu (P3HB4HB), kopolymer 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu (PHBV) a jiné se ve velké míře vyrábí jako obalové materiály, šetrné k přírodě a biologicky odbouratelné. Příkladem využití PHA jako obalového materiálu může být pytel na odpadky, který, při použití bioodpadu, lze kompostovat spolu s obalovým materiálem. [21,22]

Dalšími možnostmi využití těchto přírodních plastů v běžném životě jsou nákupní tašky, různé textilie, či spotřební elektronika. Pro výrobu ultra silných vláken, jenž naleznou uplatnění například jako rybářské vlasce a sítě, se využívají PHA s velmi vysokou molekulovou hmotností. V zahradnictví a zemědělství nachází uplatnění jako aplikace pro cílenou dopravu insekticidu, pesticidu, herbicidů a živin. [12,20]

Díky své biokompatibilitě jsou velkým přínosem v oblasti biomedicínských aplikací. Po procesu degradace zůstává jako jediný produkt (R)-3-hydroxybutanová kyselina, jenž, jakožto běžný savčí metabolit, se dokáže vstřebat v těle bez jakéhokoliv narušení jak metabolického, tak histologického. PHA proto bývají hojně využívány v lékařství, především ve formě mikročásteček, jako kardiovaskulární produkty, využívané při perikardiálních a atriálních opravách. V současné době probíhá rozsáhlý výzkum použití PHA při opravě či konstrukci srdeční chlopně. PHB a PHV bývají využívány jako matrice pro *in vitro* množení lidských buněk. Také jsou vhodnými na opravu, doplnění či jiné úpravy měkkých i tvrdých tkání a to jak u lidí, tak i u zvířat. Rigidní struktura PHB bývá využívána jako fixační materiál při frakturách kostí. PHB a jeho kopolymery, se využívají pro výrobu cévním náhrad, protéz a jiných implantátů, či kontrole adhezního tlaku, vzhledem k faktu, že vykazují větší flexibilitu. Dále je lze využít pro výrobu součástí k podávání léčiv, kde nano sféra PHA tvoří obal, do kterého je začleněné léčivo. Léčivá látka se uvolní při degradaci obalu. Uplatnění nachází při zašívání otevřených ran. Díky jejich piezoelektrické vlastnosti je lze využít k opravě poškozených nervů. Jejich využití je rozmanité a lze je právoplatně považovat za materiál budoucnosti. [21,22]

2.2 Extremofilní mikroorganismy

Označení extrémofilní organismy používáme pro takové organismy, jež obývají prostředí jevící se extrémním jak z hlediska lidského, tak z hlediska jiných mikroorganismů. Tyto organismy jsou na své prostředí adaptované. Tuto vlastnost lze považovat za konkurenční výhodu. Velká část extrémofilů patří do domény Archea, jiné jsou z domény Bacteria a některé houby zastupují doménu Eucarya. V důsledku jejich adaptace na extrémní prostředí často obsahují unikátní sekvenci aminokyselin. Z těchto aminokyselin bylo vyizolováno velké množství enzymů a zároveň tvoří speciální metabolity, čímž se stávají ještě zajímavějšími. Vyizolované metabolity a enzymy mají velký potenciál využití v biotechnologických aplikacích a stávají se atraktivními pro využití v budoucnosti. V současné době jsou hojně využívány v potravinářském průmyslu, v oblasti molekulární biologie, ve farmacii a při čištění odpadních vod. Většina organismů potřebuje k životu standartní, mírné podmínky, tj. neutrální

prostředí, teplota v rozmezí od 20 do 40 °C tlak vzduchu 1 atm a v neposlední řadě vyvážené množství vody a živin. Jako extremofily označujeme tedy mikroorganismy obývající oblast kyselých a termálních pramenů, slaných jezer, pouště, arktického mrazu nebo dna oceánů. Pro svůj život vyžadují podmínky, pro nás extrémní, životu neumožňující, jako jsou vysoké, nebo extrémně nízké hodnoty pH, teploty, tlak, koncentraci soli, koncentraci živin nebo bez přístupu vody. Jsou schopny života i rozmnožování také při působení toxických látek či v oblastech zvýšené radiace. [23]

Při výskytu a životě organismu v takovém prostředí je důležité udržet si své funkce a především díky udržení vnějšího prostředí mimo buňku. V případě že to není možné udržet vnější prostředí mimo buňku, zajistila evoluce mikroorganismu ochranné mechanismy, posílení schopností opravy či změna fyziologie. [24]

2.2.1 Termofilní mikroorganismy

Jako termofilní označujeme mikroorganismy s optimální teplotou růstu přesahující 45 °C. Termofilů máme dnes 10 řádů zahrnujících 29 rodů, příkladem termofilních bakterií jsou *Aquifex* a *Thermotoga*. [25]

V závislosti na lokalitě místa jejich působení vytvářejí komplexní ekosystémy, složené z mikroorganismů produkujících a rozkládajících organickou hmotu. Nejvýznamnějšími producenty jsou mikroorganismy chemolitoautotrofní využívající pro získání energie anorganické donory a akceptory elektronů. [26]

2.2.1.1 Hypertermofilní mikroorganismy

Hypertermofilní mikroorganismy potřebují teplotu pro růst v rozmezí 80 až 106 °C. Při těchto teplotních podmínkách dochází k rychlému rozpadu některých malých biomolekul. Nejvyšší teplota růstu byla zaznamenána u mikroorganismu *Pyrolobus fumarii* a činila 113 °C. Hypertermofily jsou dobře adaptované na své biotopy, které jim pro život zajišťují vysoké teploty při různém pH prostředí, salinitě a redoxnímu potenciálu. [27]

Při teplotě nad 70 °C dochází, u mezofilních mikroorganismů, běžně k denaturaci deoxyribonukleové kyseliny, která je nevratná. Tento problém je u hypertermofilních mikroorganismů vyřešen pomocí přítomnosti jednomocných a dvoumocných solí, které zvyšují stabilitu zastíněním negativního náboje fosfátových skupin. Ochrana DNA před depurinací a hydrolýzou je připisována také páru bází Guanin – Cytosin. [24,28]

Hypertermofilní organismy se vyskytují v oblastech vysokých teplot, nejčastěji se vyskytují ve vulkanicky a geotermálně vyhřívané hydrotermální systémy, například v neutrálních horských pramenech. Nalézt je lze jak v podzemích, tak i mořských vodách. Teploty v aktivních vulkánech jsou příliš vysoké pro živé organismy, teplota lávy zde může přesahovat teplotu 1000 °C, ale prameny a fumaroly spojené s vulkanickou činností jsou pro život termofilů ideálními, vzhledem k nižší teplotě. Termální prameny disponují teplotami od 30 °C až do teploty varu, jenž je závislá na nadmořské výšce, kdežto fumaroly jsou složeny z výronů par a plynů a mohou mít teploty vyšší. Mořské hydrotermální prameny, složené

z fumarolů, pramenů a sedimentů, dosahují teploty až 400 °C. Takovéto prostředí má mírně kyselé až zásadité pH způsobené vysokou koncentrací chloridu sodného. Systémy jak hlubokomořské tak blízko hladiny jsou útočištěm pro mnoho termofilů, příkladem může být rod *Ignioccoccales*, *Thermococcales*, *Methanococcales* nebo *Thermotogales*. V okolí uměle vytvořených biotopů se vyskytují rody *Thermoplasma*. Nepřirozeným prostředím termofilů jsou odpadní vroucí vody. [24,30]

2.2.2 Psychrotrofilní mikroorganismy

Tyto mikroorganismy se vyskytují v chladném prostředí a lze je rozdělit na psychrotrofní a psychrofilní. Psychrotrofní, neboli psychrotolerantní mikroorganismy dosahují maximální rychlosti růstu při teplotách 20 °C a více, jsou ovšem schopny života i za teplot běžných pro tuhnutí vody. Psychrofilní organismy mají optimální hodnotu pro život pod 15 °C, růst se jim zastavuje při teplotě 20 °C. [24]

Mikroorganismy se adaptovaly díky změnám na úrovni cytoplazmatické membrány a evoluci enzymů schopných udržovat katalytickou aktivitu při nízkých teplotách. Jejich nespornou výhodou je vytvoření takzvaných Antifreeze proteins neboli proteinů zabráňujících promrznutí, které mají schopnost vázat krystaly ledu na svůj povrch, čímž vytvářejí termální hysterezi a snižují teplotu optimální pro růst mikroorganismů. [30]

Výskyt těchto mikroorganismů je v trvale chladných oblastech, včetně arktických, horských oblastí i podmořských oblastí. Vzhledem k faktu, že velká část Země je vystavena teplotám pod 0 °C, jsou psychrotrofilní mikroorganismy rozšířené v půdě, vodě jak slané tak i sladké, v symbióze s chladnokrevnými rostlinami i živočichy. Velice často se jedná o mikroorganismy adaptované nejen na nízké teploty, označujeme je jako polyextremofilní mikroorganismy. Například jako baro-psychrotrofní označujeme mikroorganismy obývající sedimenty na dně oceánu adaptované na nízké teploty a vysoký hydrostatický tlak. Mikroorganismy na mořských ledovcích nazýváme halo-psychrotrofní vzhledem k jejich adaptaci na nízké teploty a vysokou koncentraci solí. Jako zástupce gramnegativních bakterií můžeme jmenovat *Pseudoalteromonas*, *Moraxella*, *Psychrobacter*, *Moritella*, *Polaromonas*, *Psychroflexus*, *Polaribacter*, *Vibrio* a *Pseudomonas*. U grampozitivních bakterií jsou nejznámějšími zastupci *Arthrobacter*, *Bacillus* a *Micrococcus*. [24,30,41]

2.2.3 Piezofilní mikroorganismy

Jedná se o mikroorganismy schopné života za vysokého tlaku, dříve také označované jako barofily. Můžeme je rozdělit na piezofilní, s optimální rychlostí růstu při tlaku vyšším než 1 atm a na piezotolerantní schopné růstu za vysokého tlaku avšak optimální růstové rychlosti dosahují při standardním tlaku. Ovlivnit účinek rychlosti růstu díky tlaku mohou i chemické a fyzikální vlastnosti. Piezofilních mikroorganismů je celá řada a můžeme je také rozdělit vzhledem k jejich vztahu k jejich kultivační teplotě na termofilní, mezofilní a psychrotrofní. Mořské piezofily obývají především hlubiny. Dalšími extrémy tohoto prostředí jsou i tma, nedostatek živin a nízká teplota pohybující se v okolí 1-2 °C. Jako první vyizolovanou bakterií je *Pseudomonas bathycetes*, z Mariánského příkopu, kde je na nejhlubším prozkoumaném místě

tlak 110 MPa. Dále se piezofily vyskytují na dně hlubokých jezer nebo hluboko pod povrchem. [24,31]

Adaptace na vysoký tlak je známa nejen u bakterií a archeí ale i eukaryot, jako například u ryb, obratlovců a některých savců. [24]

2.2.4 Acidofilní mikroorganismy

Jedná se o mikroorganismy vyskytující se při nízkých hodnotách pH. Optimální hodnota pro růst extrémních acidofilů je při pH 3 a nižším, zatímco pro mírné acidofily je optimální hodnota v rozmezí 3 až 5 a acidotolerantní mikroorganismy mají optimální hodnotu pro růst při pH větší než 5. Nejčastěji jsou součástí biochemických procesů zahrnujících cyklus síry a železa, jejichž schopnost oxidace je využívána k vyplavování kovů z odpadních vod i důlních odpadů. [28]

2.2.4.1 Extrémní acidofilní hypertermofily

Tyto mikroorganismy se vyskytují v oblastech pozemské i podmořské oblasti postvulkanické činnosti bohatých na síru. Optimální hodnota pH se pohybuje v oblasti 2-3, nejnižší pH je 0,7 a je optimální hodnotou pro život *Picrophilus oshimae* a *Picrophilus torridus*. Řadí se mezi aerobní, fakultativně anaerobní a přísně anaerobní mikroorganismy. Jako zástupce můžeme jmenovat *Sulfolobus*, *Mettalosphaera*, *Acidianus* a *Stygiolobus*. [32]

2.2.4.2 Mírní acidofilové a neutrofilové

Mírně acidofilní a neutrofilní hypertermofily jsou mikroorganismy obývající oblasti postvulkanické činnosti, hydrotermálních podmořských pramenů nebo v hlubokých ropných nádrží. Většina mikroorganismu se řadí mezi striktně anaerobní. [32]

2.2.5 Alkalofilní mikroorganismy

Alkalofilními označujeme mikroorganismy s optimální rychlostí růstu při vysokém pH. Lze je rozdělit na alkalofily, vyžadující pro svůj růst pH větší než 9 a hodnota pH pro jejich optimální růst činí 10 a na haloalkalofily, které kromě vysokého pH vyžadují i vysokou hodnotu salinity. Nejčastějšími zástupci alkalofilních bakterií jsou *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* a *Streptomyces*. Schopnost udržet rozdílné pH vnitřního i vnějšího prostředí je dána změnou buněčné stěny, ta chrání vnitřní obsah buňky od vnějšího vysoce alkalického prostředí. Buněčná stěna obsahuje, kromě peptidoglykanu, kyselé složky jako kyselinu glutamátovou, glukonovou, asparágovou, fosforečnou nebo galakturonovou. Cytoplazmatická membrána udržuje stálost vnitřního pH. [32,33]

2.2.6 Halofilní mikroorganismy

Tyto mikroorganismy potřebují pro svůj růst koncentraci solí vyšší jak 2,5 mol/dm³ NaCl. Můžeme je rozdělit na halotolerantní, které jsou schopné růst rychlostí za zvýšené koncentrace solí, avšak jejich optimální růst probíhá bez přítomnosti solí. Haloversatilní pak

označujeme mikroorganismy schopné růstu v rozsahu koncentrace soli od nuly po saturaci a nevyšší rychlosti růstu dosahují při přítomnosti soli. [28,34]

Schopnost těchto mikroorganismů přežít v prostředí s vyšší koncentrací soli je dána vlastností udržet si osmotickou rovnováhu. Tato vlastnost je dána reakcí na zvýšení koncentrace akumulací osmoticky aktivních látek v cytosolu, díky nim se chrání před dehydratací a vysycháním cytoplasmy. [34]

Pro udržení osmotické rovnováhy využívají halofilové akumulace intracelulárních iontů nebo osmolytů. Akumulace intracelulárních iontů, tedy iontů draselných a sodných, vyžaduje adaptaci enzymů v systému na přítomnost soli. U druhého typu akumulace je využíváno kombinace polárních a hydrofobních skupin osmoticky aktivních látek, díky kterým je z hydratační sféry vylučován osmolyt, čím dochází k poklesu entalpie a stabilizaci proteinů. [35]

Mírné halofilní a haloversatilní bakterie mají optimum pro svůj růst koncentraci v rozmezí 1,5 až 3 mol/dm³. Jako zástupci gram-negativních halofilních bakterií bývají nejčastěji izolovány rody *Halomonas* a *Halovibrio*. Nejčastěji se vyskytují v méně extrémních solných prostředích. Gram-pozitivní halofilní bakterie se nejčastěji izolují ze solných půd a nejdůležitějšími zástupci jsou rody *Marinococcus*, *Sporosarcina*, *Salinicoccus*, a *Bacillus*. [32]

2.2.7 Využití extremofilních organismů

Využití extremofilních mikroorganismů je velmi atraktivní především pro oblast biotechnologie. Každý z těchto organismů má unikátní vlastnosti. Především enzymy extremofilů mají vysokou stabilitu a nižší riziko kontaminace. Příklad velice využívaného enzymu je DNA polymeráza z *Thermus aquaticus* a *Pyrococcus furiosus*. Je využíván v řetězové polymerázové reakci, která spočívá v rychlém a účinném namnožení specifických sekvencí DNA a její využití je například v kriminalistice, klinické medicíně či analýze potravin. Další důležitou aplikací je použití celulasy vyizolované z halofilní bakterie. Aplikuje se pro rozrušení jemných mikroskopických vláken celulózy, aby příliš nezachytávali nečistoty bez poškození přírodní tkaniny. Další enzymy izolované z extremofilů, jako například amylasy, celulasy nebo proteinasy, degradující polymery bývají využívány farmaceutickým, chemickým potravinářským nebo papírenským průmyslem. [36,37]

Termofilní mikroorganismy jsou díky vysokým teplotám při růstu teplotně stabilní. Enzymy termofilů se využívají při výrobě detergentů, v papírenském a škopárenském či mlékařském průmyslu. [32,38]

Produkty metabolismů psychofilních mikroorganismů nebo jejich enzymy se využívají jako rezervoár biotechnologických aplikací. Psychrotolerantní bakterie jako například rody *Pseudomonas*, *Erwinia* a *Xanthomonas* tvoří ledové krystaly na povrchu listů nebo květů produkcí speciálních proteinů. Tyto proteiny našly využití při výrobě zmrzliny a umělého sněhu, také se přidávají k mraženým výrobkům a jejich tvorba je způsobena *ina* geny. [32]

Halofilní mikroorganismy jsou pro biotechnologickou aplikaci výhodné především díky své nenáročnosti kultivace. V lékařství se využívá protein z halofilních bakterií k detekci protilátky při rakovině. Z halofilů se využívají i liposomy v odvětví kosmetiky a cyanobakterie *Spirulina* jako kvalitní zdroj výživy pro sportovce a kosmonauty především díky nízkému obsahu nukleových kyselin a kvalitou spektra aminokyselin. [32,40]

Ve srovnání s termofilními a alkalifilními extremofily mají halofilní mikroorganismy poměrně málo biotechnologických aplikací. Halofily se podílejí na historických procesech, jako je výroba soli z mořské vody a výroba tradičních fermentovaných potravin. Úspěšnými procesy, na nichž se halofilní mikroorganismy podílejí, jsou produkce β -karotenu ze zelené řasy *Dunaliella* a výroba ectoinu, čili kyseliny 1,4,5,6-tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinkarboxylové, jenž je používána jako stabilizátor pro enzymy a hojně se využívá v kosmetických výrobcích. Bylo zkoumáno potenciální využití bakteriopentinu, retinální proteinové protónové pumpy *Halobacterium* v optoelektronických přístrojích a fotochemických procesech. Jsou zkoumána jiná možná použití halofilních mikroorganismů, jako je například úprava fyziologického roztoku a hypersalinových odpadních vod a výroba exopolysacharidů, bioplastů a biopaliv. Halofily jsou využívány především pro výrobu polyhydroxyalkanoátů (PHA) z bioplastů, ectoinů, enzymů a bio-povrchově aktivních látek. [39]

2.3 Bakteriální producenti PHA

Od vyizolování poly(3-hydroxybutyrátu) z bakterie *Bacillus megaterium* máme doposud identifikovaných více než 90 druhů bakterií produkujících PHA. Asi nejdůležitějším předpokladem pro potenciální produkci PHA je jednoduchá genová manipulace. Moderní metody a pokroky ve výzkumu v oblasti systémové a syntetické biologie nám umožňují vytvořit efektivní kmen produkující PHA pomocí modifikací genů. Dalším podstatným kritériem je nepatogenita a neschopnost produkce toxinů. Žádanou vlastností je širší rozmezí pH a teploty, při kterém jsou producenti schopni rychlejšího růstu a také křehčí buněčná stěna pro lepší izolaci granulí PHA. [42]

2.3.1 *Bacillus megaterium*

Jedná se o prokaryotní organismus taxonomicky spadající do rodu *Bacillus*. Rod *Bacillus* je známých pro svou produkci antibiotik, například bicitracinu, subtilitu nebo gramicidinu. *Bacillus megaterium* je aerobní mikroorganismus, který se vyskytuje od půdy po mořskou vodu, v sedimentech, rybách, či sušených potravinách. Je využíván v biotechnologickém a farmaceutickém průmyslu, především pro své enzymy a schopnost výroby exoenzymu na výrobu vitamínu B12. Žádaným je i díky své nízké proteázové aktivitě, stabilitou proteinů a schopnosti růst na široké škále substrátů, například i na laktóze. Je jedna z velmi málo organismů, které jsou schopny přeměnit laktózu, přímo na PHA. Je prvním organismem, ze kterého byl izolován PHB. [2,43]

2.3.2 *Cupriavidus necator*

Kmen bakterií známý také jako *Hydrogenomonas eutropha*, *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha* nebo také *Wautersia eutropha*. Jedná se o gram-negativní, fakultativně chemolitotrofní mikroorganismus, schopný růstu heterotrofně s použitím fruktózy, kyseliny glukonové, organických i aromatických sloučenin, jako zdroji uhlíku. Slouží jako modelová organismus pro výzkum PHA a je důležitým prokaryotickým kmenem pro biotechnologické aplikace. Vzhledem k faktu, že není schopen produkovat enzym 1,6-bisfosfát-aldolázu, není schopen využívat glykolýzu při svém metabolismu. Využívá fruktózu, kterou metabolizuje Entner-Doudoroffovou cestou. Díky rozsáhlému výzkumu této bakterie, především ve spojení s produkcí PHA, je považována za potencionálního průmyslového producenta. *C. necator* akumuluje i velké množství PHB, které je schopen produkovat až do 95% své hmotnosti. V případě nevyvážených růstových podmínek a využívá velké množství uhlíkatých zdrojů s výjimkou glukózy a dalších sacharidů. [2,44]

2.3.3 Rod *Burkholderia*

Jedná se o gram-negativní, striktně aerobní bakterie. PHB produkují jako zásobní zdroj energie. Kmen *Burkholderia cepacia* je považován, díky produkci z hydrolyzátů celulózy a hemicelulózy, za velmi perspektivního kandidáta pro produkci PHA. Má schopnost využívat různé hexózy a pentózy, které vznikají po hydrolyze lignocelulózových materiálů. Výhodou je také její dobrá snášenlivost k antimikrobiálním látkám. Nevýhodou je fakt, že *B. cepacia* se řadí mezi oportunní patogeny a to hlavně k osobám s poruchami imunitního systému a pro pacienty trpící cystickou fibrózou. [45]

B. sacchari vyizolovaná z půdy plantáží cukrové třtiny, je považována také za slibného producenta PHA. Se sacharózou jako zdrojem uhlíku je schopná produkce až 68% PHB. Mimo sacharózy je také schopná rovněž využívat hydrolyzát hemicelulózy z cukrové třtiny. Její další schopností je produkce kopolymerů, k čemuž ji je nutné dodat kosubstrát v podobě kyseliny valerové, hexanové nebo propionové. [46]

2.3.4 Rod *Halomonas*

Halofilní organismy jsou schopné degradace aromatických sloučenin a rozpouštědel. Výhodou je jejich nenáročnost na kultivaci a prostředí s obsahem soli, která proces konzervuje a chrání před kontaminací. [47]

Výzkum halofilů ukázal pozoruhodný potenciál pro biotechnologickou produkci PHA. Halofilní kmen *Haloferax mediterranei* má schopnost akumulovat kopolymer ve velkém množství za použití glukózy, škrobu a hydrolyzované syrovátky jako zdrojů uhlíku. PHA, produkované tímto kmenem, mohou být modifikovány při použití různého substrátu jako prekurzoru. [48]

Kmen *Halomonas campisalis* je schopný produkce biofilmu PHA, který je biologicky odbouratelný a propylenové sáčky vyrobené z tohoto filmu mohou být využívány jako obalový materiál. [49]

Středně halofilní bakterie *Halomonas elongata* současně syntetizují PHA a molekulu ectoine. Syntéza PHA je reakcí na nedostatek živin, kdežto produkce ectoinu působí proti osmotické nerovnováze. Podmínky bi-faktoriálního stresu iniciují rychlou simultánní syntézu ectoinu a PHA. Schopnost produkovat jak PHA, tak ectoin byly pozorovány i u jiných druhů halomonas, například *Halomonas halodenitrificans* a vlastní izoláty *Halomonas halodeneurihalina* a *Halomonas salina*. [47]

2.3.5 Extremofilní mikroorganismy jako producenti PHA

PHA byli vyizolovány z mnoha extremofilních bakterií, nejvíce pravděpodobně halofilními bakteriemi, jako jsou rody *Haloferax* (kmeny *Haloferax mediterranei*, *Haloferax gibonsii*, *Haloferax denitrificans*), *Haloarcula*, *Halococcus*, *Notronococcus* a *Halobacterium* a rod *Halomonas*. Extremofily mají velmi dobré adaptační mechanismy na ochranu v extrémních podmínkách. Jejich výhodou je právě tato adaptace na vysokou teplotu, salinitu, nízké nebo vysoké pH a v některých případech i odolnost vůči toxickým látkám a radiaci. Biosyntéza PHA závisí na prostředí, ze kterého je mikroorganismus izolován, také na dostatku energie. Tento proces vyžaduje velké množství energie (až 70% celkové energie), což znamená významnou investici uhlíkatého zdroje pro mikroorganismus. Množství i složení produktů je závislé na složení média a podmínkách kultivace. Biosyntéza bývá ovlivněna ještě dalšími parametry, jakými jsou zdroj uhlíku a dusíku, přítomnost stopových prvků, pH, teplota nebo koncentrace kyslíku. [47,50]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité mikroorganismy, chemikálie a přístroje

3.1.1 Použitý mikroorganismus

K experimentální práci charakterizující produkci PHA pomocí extrémofilního organismu byl vybrán bakteriální kmen *Halomonas salina* CCM 4361^T, jenž byl zakoupen v České sbírce mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

3.1.2 Použité chemikálie

- Nutrient Broth (Himedia,IND)
- Peptone (Himedia, IND)
- Yeast Extract (Himedia, IND)
- Agar Powder (Himedia, IND)
- Spirit Blue Agar (SIGMA-ALDRICH,DE)
- Tris-HCl pufr (5 mM, pH 8,5)
- Master mix One *Taq* Hot Start DNA polymerázy (BioLabs Inc., UK)
- 100 bp DNA Ladder H3 RTU (NIPPON Genetics, EU)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Lachner,ČR)
- H₃BO₃ (VWR Chemicals, USA)
- EDTA (Lachner, ČR)
- Agaróza (SIGMA-ALDRICH,DE)
- TBE pufr
- Xylóza (SIGMA-ALDRICH,DE)
- Glukóza (PENTA, ČR)
- Arabinóza (Lachner, ČR)
- Sacharóza (Lachner, ČR)
- Fruktóza (Lachner, ČR)
- Laktóza (Lachner, ČR)
- Galaktóza (Lachner, ČR)
- Glycerol (VWR Chemikals,USA)
- Kys. Levulová (SIGMA-ALDRICH, DE)
- Kys. Valerová (SIGMA-ALDRICH,DE)
- Propionát sodný (SIGMA-ALDRICH,DE)
- Kyselina benzoová (VWR Chemicals, USA)
- Chloroform (VWR Chemicals, USA)
- Midori Green Advanced (DNA barvivo) (NIPPON Genetics, EU)
- NaCl (Lachner, ČR)
- MgSO₄ · 7 H₂O (Lachner, ČR)
- MgCl₂ · 6 H₂O (PENTA, ČR)
- CaCl₂ · 2 H₂O (LaChema, ČR)
- KCl (Lachner, ČR)
- NaHCO₃ (Lachner, ČR)

- NaBr (Lachner, ČR)
- Primery pro 16SrRNA (16S-F, 16S-R)
- Primery pro *phaC* (G-D, G₁R)
- Bromfenylová modř

3.1.3 Přístrojové vybavení

Analytické váhy, Boeco

Vortex TK3S, techno Kartell

Spektrofotometr Helios δ , Unicam

Laminární box Aura mini, Bio Air Instruments

Temperovaná třepačka, Heidolph Unimax 1010, Labicom s.r.o.

Centrifuga U-32R, Boeco

Centrifuga Sigma, Sartorius

Termostat, LS-35

Gradientový Palm-cycler, Corbett Research

Zdroj napětí MP 300 V, Major science

UV-transluminátor, Major Science

Plynový chromatograf GC-FID, Hewlett Packard, Series II 5890

Kolona: DB-WAX 30 m by 0,25 mm

Běžné laboratorní pomůcky a sklo

3.2 Kultivace mikroorganismu *Halomonas salina*

Zakoupená bakteriální kultura byla rozočkována a uchována ve formě kryozkumavek. Očkování kultury bylo provedeno do kryozkumavek, kde byla uchována v 10% glycerolu při teplotě – 80 °C a na petriho misky obsahující pevné médium B82, kdy byla uchovávána při teplotě 5-8 °C.

3.2.1 Příprava inokula

Inokulum *Halomonas salina* bylo připraveno v objemu 50 ml živného média do Erlenmayerovy baňky o objemu 100 ml. Kultivace probíhala na třepačce temperované na 30 °C a 180 rpm po dobu 24 hodin. Poté byla kultura přeočkována na minerální média obsahující zpravidla koncentraci 20 g/l různých zdrojů uhlíku.

Složení média B 82:

· Kvasničný extrakt	10 g/l
· Pepton	5 g/l
· Glukóza	1 g/l
· NaCl	81 g/l
· MgSO ₄ · 7 H ₂ O	9,6 g/l
· MgCl ₂ · 6 H ₂ O	7 g/l
· CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,36 g/l
· KCl	2 g/l

· NaHCO_3	0,06 g/l
· NaBr	0,026 g/l
· Agar (v případě že se jedná o pevné médium)	20 g/l

Složení živného média (inokula):

· Pepton	15 g/l
· Extrakt z kvasnic	3 g/l
· NaCl	80 g/l
· Glukóza	1 g/l

Složení minerálního média (produkčního média):

· KH_2PO_4	1,02 g/l
· $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3 g/l
· $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$	11,1 g/l
· $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,2 g/l
· NaCl	80 g/l
· Glukóza	20 g/l
· Roztok stopových prvků (MES)	1 ml

Složení roztoku MES

· $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	9,7 g/l
· $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	7,8 g/l
· $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$	0,156 g/l
· $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,119 g/l
· $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,118 g/l
· $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,1 g/l
· 0,1 M HCl	1000 ml

3.3 Použité metody

3.3.1 Polymerázová řetězová reakce – PCR

PCR je základní molekulární technika sloužící k rychlému a snadnému zmnožení, čili amplifikaci, úseku DNA. Principem je replikace nukleových kyselin. Amplifikovaný úsek bývá ohraničen takzvanými primery, což jsou krátké fragmenty DNA oligonukleotidů. Díky své komplementaritě přisadají ke koncům vybraného úseku, odkud probíhá syntéza. Pomocí PCR je možno vytvořit mnoho milionů kopií vybraného fragmentu DNA, což umožňuje provést například analýzu DNA. Reakce probíhá v přístroji Thermocykler, který je schopný měnit rychle a přesně teplotu. Výsledný namnožený úsek DNA lze využít k sekvenaci, či identifikaci osob v kriminalistice. PCR bývá nejčastěji detekováno gelovou elektroforézou. [51]

Byla provedena metoda multiplex PCR, kdy je využíváno v jedné reakci více než jeden pár primerů, které se pak váží k různým úsekům templátové DNA. V našem experimentu byly využity 2 páry primerů pro amplifikaci dvou genů (16SrRNA a *phaC*).

Tabulka 2: Program PCR

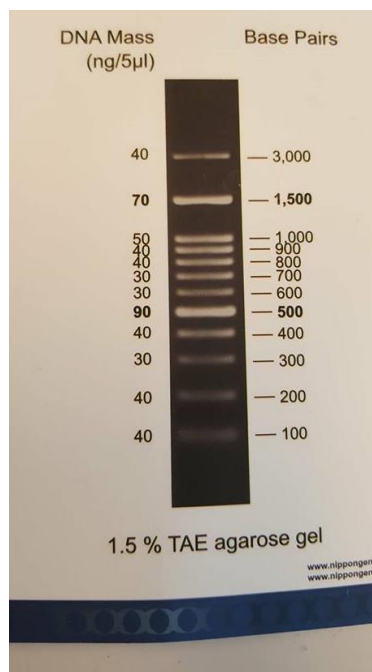
krok	proces	teplota (°C)	čas (s)	počet cyklů
1	Denaturace	94	30	1
2	Denaturace	94	30	30
	Annealing	55	30	
	Syntéza	68	90	
3	Syntéza	68	300	1
		30	60	1

3.3.1.1 Směs pro PCR

· Master mix One <i>Taq</i> Hot Start DNA polymerázy	12,5 µl
· MgCl ₂	2,6 µl
· Primery pro 16SrRNA (16S-F, 16S-R)	2 x 1 µl
· Primery pro <i>phaC</i> (G-D, G ₁ R)	2 x 1 µl
· Vzorek DNA	2 µl
· PCR voda	3,9 µl

3.3.1.2 Isolace a amplifikace

Cílem tohoto experimentu byla amplifikace bakteriální DNA. Z narostlé kultury na pevném médiu byly kličkou odebrány buňky a převedeny do čisté zkumavky obsahující 100 µl pufru tris-HCl o koncentraci 5 mM a hodnotě pH 8,5. Zkumavka se vzorkem byla následně zahřívána na 90 °C po dobu 15 minut. Poté byla zkumavka se vzorkem odstředěna po dobu 10 minut při 10 000 otáčkách za minutu. Ze supernatanu byly odebrány 2 µl do zkumavky pro PCR obsahující Master mix One *Taq* Hot Start DNA polymerázy, MgCl₂, jeden pár primerů pro 16SrRNA, jeden pár primerů pro *phaC* a speciální PCR vodu. Paralelně byla připravena negativní a pozitivní kontrola. Pozitivní kontrola obsahovala vzorek DNA bakterie *Cupriavidus necator* H16, připraveným obdobným způsobem jako stanovovaný vzorek. Negativní kontrola byla připravena obdobně, pouze místo vzorku DNA obsahovala 2 µl PCR vody. Následně bylo provedeno PCR na Thermocycleru. Čistota vzorku DNA byla spektrofotometricky měřena poměrem A₂₆₀ proti pufru.



Obrázek 4: Hmotnostní marker (100 bp DNA Ladder H3 RTU)

3.3.2 Gelová elektroforéza

Jedná se o analytickou separační metodu makromolekul na základě rozdílné velikosti náboje. DNA molekula má náboj záporný a tudíž se pohybuje v elektrickém poli gelem směrem od katody katodě. Gel zde tvoří síť o definované velikosti pórů, kterými prochází molekuly. Separovaná DNA se barví a její pohyb v gelu se pozoruje pomocí UV transluminátoru. Elektroforéza se provádí na vhodném nosiči, kterým je nejčastěji agarózový gel nebo polyakrylamid. Agarózový gel se připravuje rozpuštěním práškové agarózy v pufru, který se použije i jako elektrolyt. [52]

3.3.2.1 Složení použitých chemikálií

10 x koncentrovaný TBE pufr:

· Tris(hydroxymethyl)aminomethan	108 g/l
· H ₃ BO ₃	55 g/l
· EDTA	9,3 g/

Agarózový gel

· Agaróza	2 g
· 1 x koncentrovaný TBE pufr	100 ml
· Midori Green Advanced (DNA barvivo)	2x 6 µl

Nanášecí pufr

· Bromfenylová modř	20 µg
· Glycerol	3 ml
· Destilovaná voda	7 ml

3.3.2.2 Postup

Pro přípravu gelu byla použita agaróza o navážce 2 g v roztoku 1 x koncentrovaného TBE pufru o objemu 100 ml, který byl připravený zředěním 10x koncentrovaného TBE pufru destilované vody v poměru 1:9. Takto vzniklý roztok byl šestkrát povařen v mikrovlnné troubě. Byl sledován var z důvodu možného vypěnění kapaliny z baňky. K převařenému roztoku bylo přidáno 6 µl barviva Midori Green. Roztok gelu byl nalit do formy a proložen hřebínkem. Díky hřebínku vznikly pravidelné jamky, do kterých byly nanášeny vzorky o objemu 5 µl s 5 µl nanášecího pufru. Pomocí modré barvy pufru bylo možné kontrolovat správné vložení PCR produktu do jamek. Pro porovnání velikosti pozorovaných vzorků byl, mezi vzorek DNA, pozitivní a negativní kontrolu, do jedné z jamek nanesen velikostní marker (hmotnostní standard, žebříček). Poté byl gel se vzorky přelit 1x koncentrovaným TBE pufrem a byly zapojeny elektrody. Elektroforéza byla prováděna po dobu přibližně 50 minut při napětí 90 mV, kdy začaly, mezi elektrodami, vznikat malé bublinky signalizující průchod proudem.

3.3.3 Sekvenace

Sekvenování neboli sekvenace je biochemická metoda pro zjištění pořadí nukleových bází (A, C, G, T) v sekvencích DNA. Tyto sekvence jsou součástí genetické informace v jádru, plazmidech, mitochondriích a plastidech.

Chemikálie pro přečištění

· NTI pufr	80 µl
· NT3 pufr	700 µl
· NE pufr (eluční pufr)	20 µl

3.3.3.1 Postup:

Nejprve byla provedena metoda PCR, která byla detekována gelovou elektroforézou. Vzorek s DNA bakteriální kultury *Halomonas salina* byl přečištěn pomocí Nucleo Spin Gel and PCR Clean-up Kit následujícím postupem: Vzorek byl smíchán s NTI pufrem v poměru 1:2. Takto smíchaný vzorek byl převeden do kolonky s křemíkovou mikrofiltrační membránou a centrifugován po dobu 30 sekund při 10000xg. Roztok ze sběrné zkumavky byl vylit a k sedimentu nad sběrnou zkumavkou byl přidán NT3 pufr. Poté byla zkumavka se vzorkem opět centrifugována za stejných podmínek. Roztok ve sběrné zkumavce byl opět vylit a zkumavka se vzorkem byla inkubována v sušárně při 60°C po dobu 4 minut. Poté byla opět provedena centrifugace při 10000xg po dobu 1 minuty. Vzorek byl přenesen do čisté zkumavky a byl přidán NE pufr, který byl již předtím inkubován při 60°C. Poté probíhala inkubace po dobu 4 minut při 60°C. Následně byl vzorek zaslán na komerční sekvenaci u firmy SEQme s.r.o.

3.3.4 Studium extracelulární lipolytické aktivity

Lipolytická aktivita je schopnost organismu produkovat enzymy katalyzující hydrolýzu tuků, čili štěpit triacylglycerol na glycerol a volné mastné kyseliny. Látky, zajišťující hydrolýzu tuků, nazýváme lipolytické enzymy neboli lipázy. Extracelulárními označujeme ty organismy, které tento enzym uvolňují do okolí buňky. Lipolytické enzymy jsou hojně využívány pro svoji funkci biokatalyzátorů, kdy jsou využívány v biotechnologických aplikacích, kde se využívají například pro výrobu polymerů, léčiv či bionaft. Jsou velice hodnotnými pro možnost syntézy průmyslově významných produktů jako opticky aktivních látek nebo esterů. [53]

K ověření extracelulární lipolytické aktivity polyhydroxyalkanoáty posloužila kultivace bakteriálního kmene na pevném agaru Spirit Blue, který byl připravený rozpuštěním práškového agaru. Jako důkaz bylo sledováno odbarvení agaru v místě nanesení bakterie.

Složení agaru Spirit Blue:

· Kaseinový hydrolyzát	10 g/l
· Extrakt z kvasnic	5 g/l
· Spirit Blue	0,15 g/l
· Agar	17 g/l

3.3.5 Spektrofotometrické měření zákalu

Principem spektrofotometrického měření zákalu je měření rozptylu světla ve vzorku, turbidimetrie. Měříme zdánlivou koncentraci biomasy.

Kultivace v minerálním médiu probíhala po dobu 72 hodin na temperované třepačce při 30°C a 180 rpm. Následně byla kultivace ukončena a byl odebrán vzorek pro spektrofotometrické měření. Nejprve bylo důležité naředit vzorek minerálního média s kulturou tak, aby byla absorbance v intervalu hodnot od 0,100 do 0,900. Následně byl vzorek měřen při vlnové délce 630 nm proti destilované vodě. Spektrofotometrické měření probíhalo v kyvetě o délce optické dráhy 1 cm.

3.3.6 Gravimetrické stanovení biomasy

Po 72 hodinách kultivace bylo z kultury odebráno 10 ml do zkumavky. Vzorek byl odstředěn v centrifuze po dobu 10 minut při 6 tisících otáčkách za minutu. Následně byl supernatant, roztok nad usedlinou, slit a k sedimentu bylo přidáno 5 ml destilované vody. Po zvortexování byla kultura znovu odstředěna a supernatant slit. Usedlá biomasa byla kvantitativně převedena do zkumavky s destilovanou vodou o celkovém objemu 1,5 ml. Zkumavka byla vložena do centrifugy a odstředěna při 8000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut. Supernatan byl opět slit a biomasa byla sušena do konstantní hmotnosti při 60 °C.

3.3.7 Stanovení PHA v pomoci plynové chromatografie

Plynová chromatografie (Gas chromatography – GC) je analytická separační metoda založená na rozdělování složek mezi dvě fáze, a to mobilní (neboli pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou). Mobilní fází je zde nosný plyn. Stacionární fáze může být pevná látka nebo kapalina. Vzorek je vnesen do kolony a zde separován. Látky vycházejí z kolony na detektor, který indikuje signál a vyhodnocuje jej chromatografem odpovídajícím závislosti signálu detektoru na čase. Principem našeho stanovení je přeměna PHA na těkavý metylester β -hydroxykarboxylové kyseliny, pomoci kyselě katalyzované esterifikace.

3.3.7.1 Stanovení kalibrační přímky

Kalibrační přímka byla sestavena pomocí standardního vzorku kopolymeru P(3HB-co-3HV). Navážka přibližně 40 μ g kopolymeru byla rozpuštěna ve 4 ml chloroformu při 70 °C. Do čistých vialek bylo rozpipetováno 0,05 0,2 0,4 0,6 a 1 ml připraveného roztoku kopolymeru a doplněno chloroformem do objemu 1 ml. K takto připraveným roztokům bylo přidáno 0,8 ml vnitřního standardu složeného z 5 mg/ml kyseliny benzoové v 15% kyselině sírové v metanolu. Následně byly vzorky pečlivě uzavřeny pomocí krimplovačky a umístěny v termostatu temperovaném na 94°C po dobu 3 hodin, kdy probíhala esterifikace. Po ukončení esterifikace a vychladnutí vialek byl celkový objem smíchán s 0,5 ml NaOH a protřepán. Po oddělení fází bylo ze spodní, chloroformové fáze odpipetováno 0,05 ml do menších vialek s obsahem 0,950 ml chloroformu. Vialky byly uzavřeny a vzorky analyzovány pomoci plynové chromatografie.

3.3.7.2 Stanovení koncentrace PHA v biomase

Celková koncentrace PHA v biomase, respektive koncentrace 3HB a 3HV byly stanoveny pomoci plynové chromatografie s FID detekcí. Do vialek bylo naváženo přibližně 8 až 11 mg biomasy s přesností na 0,1 mg. Následně bylo ke vzorku přidáno 1 ml chloroformu a 0,8 ml vnitřního standardu 5 mg/ml kyseliny benzoové v roztoku 15% kyseliny sírové v metanolu. Vialky byly pečlivě uzavřeny víčkem. Následně byly tyto vzorky umístěny do termostatu vyhřátého na 94°C po dobu 3 hodin, kdy probíhala esterifikace.

Po ukončení esterifikace byly vialky odstaveny z termostatu. Po vychladnutí byly vzorky převedeny do vialek o větším objemu a bylo přidáno 0,5 ml 0,05 M NaOH a celý objem byl protřepán, čímž došlo k oddělení fází. Následně bylo odpipetováno 0,05 ml spodní (chloroformové) vrstvy do vialek s obsahem 0,950 ml chloroformu. Vialky byly uzavřeny a vzorky byly analyzovány pomoci plynového chromatografu s plamenovou ionizační detekcí (GC-FID).

3.3.8 Optimalizace pro růst bakterií a produkci PHA

3.3.8.1 Optimalizace růstu na uhlíkovém substrátu

Bakteriální kultura byla naočkována do inokula se zdrojem uhlíku v podobě glukózy a kultivována po dobu 24 hodin na temperované třepačce při 30°C a 180 rpm. Následně byly

kultury očkované na minerální médium s obsahem různých uhlíkatých substrátů. Tato optimalizace byla prováděna ve více krocích s různými zdroji uhlíku. Jako referenční (srovnávací) vzorek bylo použito minerální médium s glukózou jako zdrojem uhlíku. Doba kultivace na minerálních médiích byla vždy 72 hodin.

Sacharidy a lipidy jako zdroj uhlíku

Byly provedeny kultivace pro srovnání sacharidů a lipidů jako zdroje uhlíku. Na tento experiment byl využit odpadní glycerol a kuchyňský odpad o koncentracích 20 g/l. Oleje jsou bohaté na lipidy a pro srovnání byla využita kultivace na fruktóze, jako zástupce sacharidů.

Sacharidy jako zdroj uhlíku

Byla provedena kultivace bakteriálního kmene na minerálním médiu s obsahem různých sacharidů jako zdrojem uhlíku. Experiment byl zaměřen na vybrání nejvhodnějšího sacharidu pro produkci PHA. Pro kultivaci byly využity cukry arabinóza, galaktóza, glukóza, fruktóza, manóza, laktóza, sacharóza a xylóza o koncentracích 20 g/l.

3.3.9 Studium vlivu koncentrace soli na produkci PHA

Tento experiment je založen na pozorování růstu biomasy a produkci PHA v závislosti na osmotické síle minerálního (produkčního) média. Bakteriální kultura byla naočkována do inokula s obsahem glukózy o koncentraci 20 g/l, jako zdrojem uhlíku a kultivována po dobu 24 hodin na temperované třepačce při 30°C a 180 rpm. Poté byla kultura rozočkována na minerální média s koncentracemi chloridu sodného 20, 40, 60, 80 a 100 g/l a byla provedená kultivace při stejných podmínkách po dobu 72 hodin.

3.3.10 Kultivace po přidavku prekurzorů

V tomto experimentu byla sledována podpora produkce PHV pomocí přísad prekurzorů. V minerálních médiích byla, jako zdroj uhlíku, použita fruktóza, která byla experimentem s různými zdroji uhlíku zvolena jako nejvhodnější ze zkoumaných sacharidů. Studium probíhalo s prekurzory propionátem sodným, kyselinou valerovou (valerátem) a kyselinou levulovou o koncentracích 2 g/l. Kultivace probíhala na temperované třepačce při 30°C a 180 rpm, kdy se po 24 hodinách přidávali prekurzory. Celková doba kultivace byla 72 hodin. Pro kontrolu bylo použito zahušťování pomocí fruktózy.

4 VÝSLEDKY MĚŘENÍ A DISKUZE

Cílem experimentální části bylo testování bakteriálního kmene *Halomonas salina* na schopnost produkce PHA. Základem práce bylo využít vhodné techniky jak spektrofotometrické, molekulární či mikrobiální pro důkaz schopnosti produkce PHA daným bakteriálním kmenem.

Byla tak využita kultivace na agaru Spirit Blue, pro důkaz produkce enzymů lipáz, které mají schopnost syntetizovat polymery. Jako další vhodná metoda byla použita metoda polymerázové řetězové reakce (PCR), pomocí které je replikován úsek stanovované DNA. Nejprve byla provedena izolace DNA pomocí tepelné lyze buněk. Za účelem amplifikace dvou genů byla provedena multiplexová PCR, kdy byl detekován jak gen 16SrRNA k ověření bakteriální DNA ve vzorku, tak *phaC* gen schopný syntézy PHA. Výsledek PCR byl detekován pomocí gelové elektroforézy. Produkt PCR byl přečištěn a sekvenován.

V práci byl také studován vliv substrátu na růst kultury a produkci PHA. Prováděny byly experimenty na uhlíkovém substrátu při použití lipidů a různých druhů sacharidů jako zdroji uhlíku. Byl také studován vliv množství NaCl v produkčním médiu na schopnost *Halomonas salina* produkovat PHB a biomasu. Dále byla studována tvorba kopolymeru P(3HB-co-3HV) pomocí přísadků prekurzorů 3HV.

4.1 Důkaz lipolytické aktivity

Cílem experimentu bylo studium lipolytické aktivity PHA, čili studium produkce enzymů štěpících tuky. Při degradaci lipidů dochází ke změně pH a to zapříčiňuje odbarvení agaru z modré barvy na transparentní.



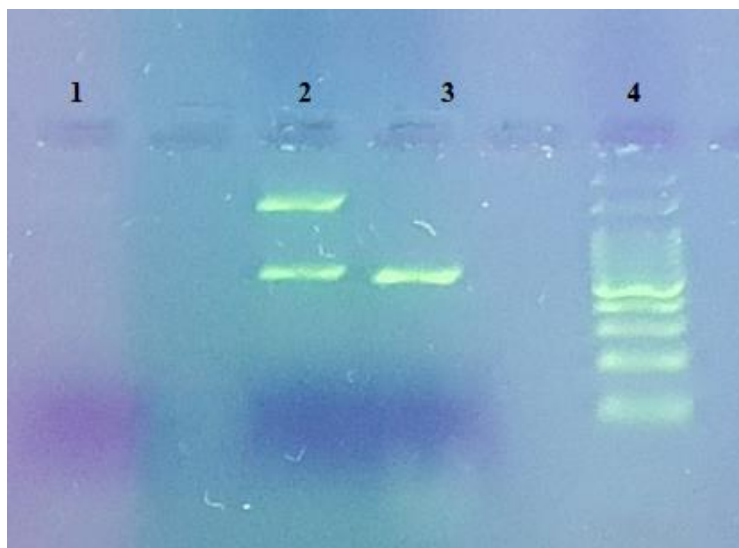
Obrázek 5: Odbarvení agaru Spirit Blue pomocí *Halomonas salina*

Z obrázku je patrné odbarvení agaru v okolí nanesení bakteriální kultury *Halomonas salina*. Jedná se o důkaz schopnosti bakteriálního kmene využít lipidy z okolí a tedy i schopnost produkce lipáz.

4.2 Identifikace *phaC* genu pomocí PCR

Pomocí metody multiplexové PCR byly amplifikovány dva geny a to gen 16SrRNA k potvrzení bakteriální DNA a taxonomickému začlenění a gen *phaC* k důkazu PHA-syntázy. Stanovována byla také čistota vyizolované DNA na základě poměru absorbancí (A_{260}/A_{280}). Měřená čistota činila hodnotu 1,982, tudíž se nacházela v intervalu $1,8 \leq A_{260}/A_{280} \leq 2$. Vyizolovaná DNA je tudíž považována za čistou.

Po procesu PCR byla provedena detekce gelovou elektroforézou, zachycená na obrázku níže.



Obrázek 6: Gelová elektroforéza: 1-Negativní kontrola, 2-Pozitivní kontrola s genem *Cupriavidus necator* H16, 3-Stanovovaný vzorek DNA, 4-hmotnosti

Cílem této metody bylo detekovat, zda bakteriální kmen *Halomonas salina*, má gen *phaC*, který kóduje PHA syntázu. Pomocí genu 16SrRNA byla potvrzena přítomnost bakteriálního genu a díky detekci bylo potvrzeno, že druhý stanovovaný gen, *phaC*, je v genomu *Halomonas salina* přítomen. Lze tedy říci, že stanovovaný bakteriální kmen disponuje PHA syntázou a má tedy predispozice k biosyntéze PHA.

4.3 Sekvence

V předchozím experimentu, byla dokázána přítomnost genu *phaC* u vzorku bakteriálního vzorku DNA kmene *Halomonas salina*. Vzorek byl poslán na komerční sekvenaci, kde se podařilo osekvenovat *phaC* gen. (viz Přílohy)

4.4 Optimalizace pro růst bakterií a produkci PHA

V předchozích experimentech jsme si experimentálně ověřili, že studovaná bakterie disponuje potenciálem pro produkci PHA (přítomnost *phaC* genu) a je také schopna utilizace lipidických substrátů. V dalším experimentu jsme se pokusili nalézt co nejvhodnější podmínky pro růst bakteriálního kmene *Halomonas salina* a jeho produkci PHA, respektive PHB. Zkoumána byla aktivita kultury na různých zdrojích uhlíku a při různé osmotické síle produkčního média. Také byla studována produkce kopolymer P(3HB-co-3HV) při suplementaci kultury prekurzory.

4.4.1 Optimalizace růstu na uhlíkovém substrátu

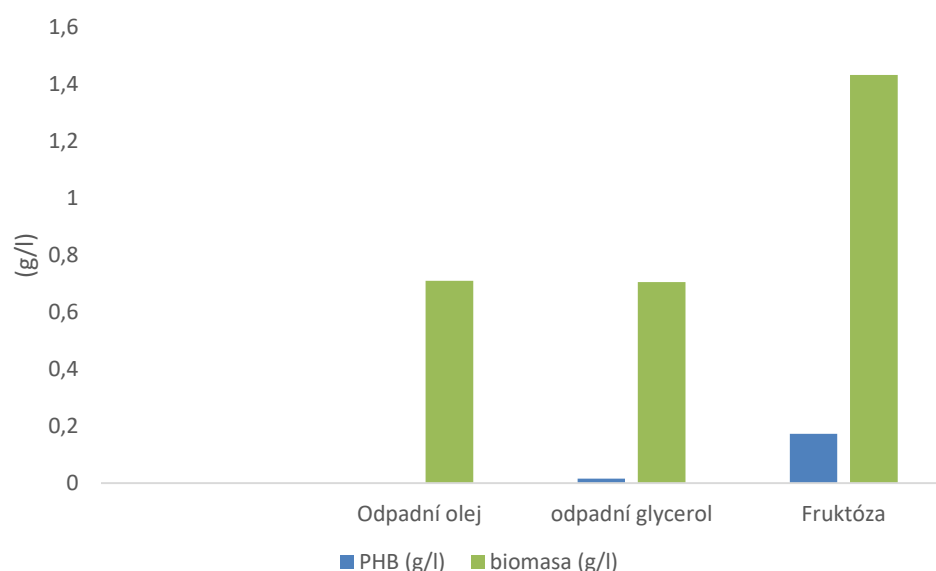
4.4.1.1 Sacharidy a lipidy jako zdroj uhlíku

V tomto experimentu byla studována produkce biomasy a PHB při použití lipidů a sacharidů jako zdroj uhlíku v produkčním médiu.

Z tabulky 3 je zřejmé, že nejvhodnějším substrátem ze studovaných látek se, při daných podmínkách jeví sacharid. Využitě lipidy vykazují poloviční koncentraci biomasy v porovnání s využitým sacharidem.

Tabulka 3: Měření závislosti produkce PHB a biomasy

	OD 630	biomasa (g/l)	PHB (g/l)	W _{PHB} (%)
Kuchyňský odpad	3,37 ± 0,01	0,71	neprodukuje	neprodukuje
Odpadní glycerol	10,60 ± 0,01	0,71	0,02	2,58
Fruktóza	6,40 ± 0,01	1,43	0,17	12,55



Graf 1: Srovnání produkce PHB s produkcí biomasy kulturou při použití sacharidů a lipidů v produkčním médiu

Experimentem byl vyhodnocen sacharid, konkrétně fruktóza, jako lepší zdroj uhlíku pro produkci biomasy při daných podmínkách. Koncentrace biomasy zde dosahuje hodnoty 1,43 g/l. Použité lipidy, odpadní glycerol a kuchyňský odpad, vedou k nízké produkci biomasy o koncentraci 0,71 g/l, tudíž poloviční hodnotu oproti zkoumanému sacharidu. Produkce PHB na lipidech je skoro zanedbatelná. Při použití kuchyňského odpadu nebyla produkce PHB zaznamenána a při použití odpadního glycerolu hodnota této produkce činila 0,02 g/l. Z výsledku je zřejmé, že použité lipidy při zadaných podmínkách nejsou vhodnými substráty pro produkci polymeru.

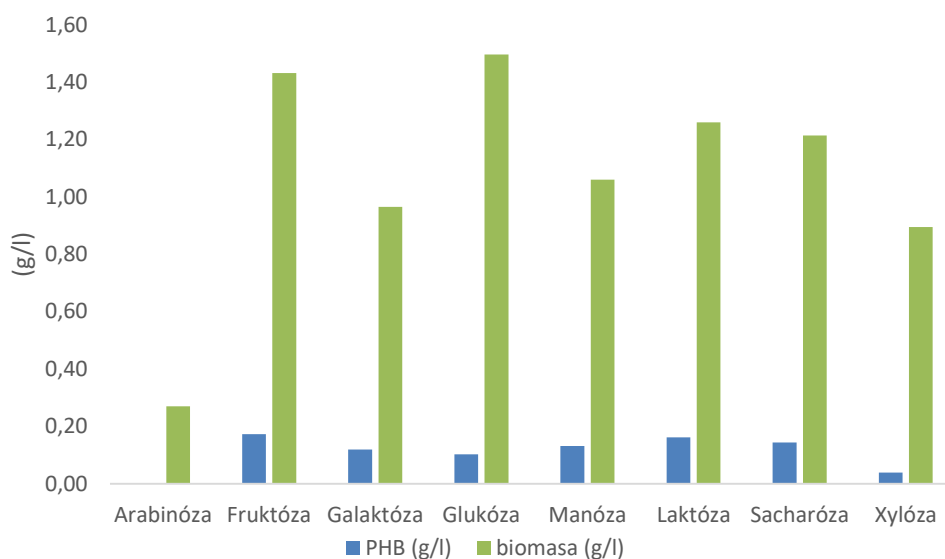
4.4.1.2 Sacharidy jako zdroj uhlíku

Zde byla studována schopnost mikroorganismu tvořit biomasu a produkovat biopolymery při použití různých sacharidů jako zdroj uhlíku v produkčním médiu.

Z tabulky 4 vyplývá, že pro produkci biomasy jsou nejvhodnějšími zdroji uhlíku fruktóza a glukóza, kde hodnoty koncentrace biomasy činili 1,43 g/l při použití fruktózy a 1,50 g/l při použití glukózy. Jako nejméně hodný sacharid ze zkoumaných látek se projevila arabinóza, kdy koncentrace biomasy činila 0,27 g/l a produkce PHB se nepotvrdila. Měřením rozptylu světla při 630 nm byla naměřena nejvyšší zdánlivá koncentrace biomasy u fruktózy.

Tabulka 4: Výsledky měření závislosti produkce biomasy a PHB na použitém zdroji uhlíku v produkčním médiu pomocí plynové chromatografie a spektrofotometrického měření zákalu

	OD 630	biomasa (g/l)	PHB (g/l)	W _{PHB} (%)
Arabinóza	0,42 ± 0,00	0,27	neprodukuje	neprodukuje
Fruktóza	6,61 ± 0,01	1,43	0,17	12,55
Galaktóza	3,82 ± 0,00	0,97	0,12	12,30
Glukóza	5,36 ± 0,00	1,50	0,10	6,28
Manóza	4,43 ± 0,01	1,06	0,13	12,35
Laktóza	4,92 ± 0,01	1,26	0,16	12,77
Sacharóza	5,30 ± 0,02	1,22	0,14	11,81
Xylóza	3,07 ± 0,00	0,90	0,04	4,28



Graf 2: Srovnání produkce PHB s biomasou bakteriálním kmenem při požití různých sacharidů jako zdroji uhlíku

Studovány byly různé sacharidy jako zdroje uhlíku a jejich vliv na produkci biomasy a PHB. Z výsledků je zřejmé, že produkce PHB v porovnání s množstvím biomasy není, při zadaných podmínkách příliš intenzivní. Nejvhodnějšími sacharidy pro růst biomasy ze sacharidů použitých v tomto experimentu jsou glukóza a fruktóza. Koncentrace biomasy při použití glukózy jako zdroji uhlíku činila 1,50 g/l a na fruktóze 1,43 g/l. Pro produkci kopolymeru je nejvhodnějším ze zkoumaných sacharidů fruktóza s výtěžkem 0,17 g/l a laktóza s hodnotou 0,16 g/l. Hmotnostní podíl PHB v biomase činí u laktózy 12,77%, což je nejvíce ze zkoumaných sacharidů při zadaných podmínkách. Celkově je možné konstatovat, že *Halomonas salina* produkuje spíše menší množství PHB, intracelulární obsah polymeru se pohybuje v rozmezí 4 – 12 hm. %, což je v porovnání s jinými produkčními kmeny, kdy produkce může dosáhnout až 80-90 hm. % relativně málo. Nejméně vhodným sacharidem v produkčním médiu se při daných podmínkách jeví arabinóza, kdy hodnota koncentrace biomasy je zanedbatelná produkce PHB nebyla zaznamenána.

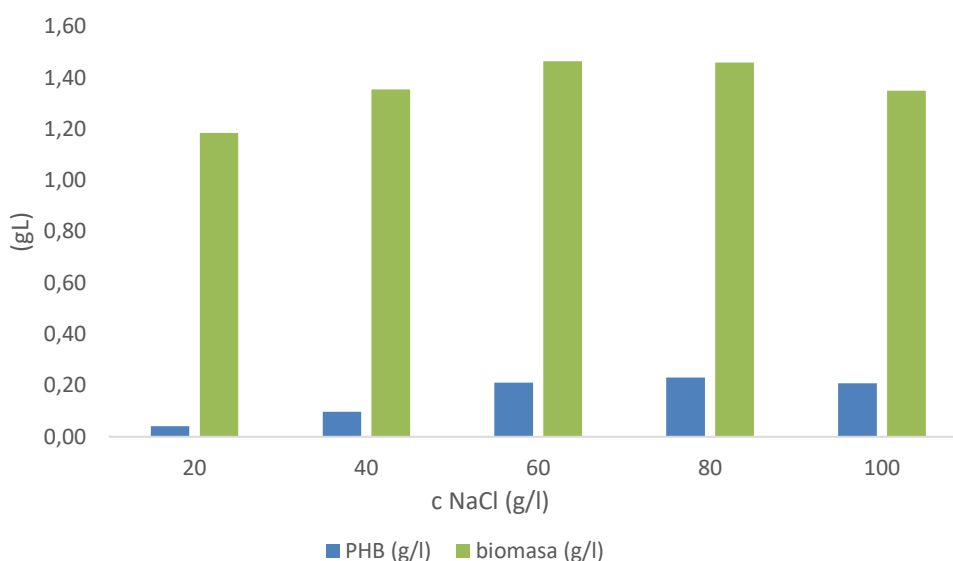
4.4.2 Vliv koncentrace soli na růst a produkci PHA

Požívaný mikroorganismus *Halomonas salina* je halofilním mikroorganismem, který je schopný žít v širokém rozmezí koncentrace soli v médiu. Pro experiment byly zvoleny hodnoty koncentrací NaCl v rozmezí 20-100 g/l. Studován byl vliv obsahu NaCl na produkci biopolymerů.

Z hodnot uvedených v tabulce 5 je patrné, že biomasa dosahovala nejvyšší koncentrace při hodnotě 80g/l chloridu sodného v médiu a to 1,47 g/l. Při těchto podmínkách byla pozorována i nejvyšší hodnota produkce PHB, kdy se procentuální obsah dostal na 15,83 %. Při koncentracích 40 a 20 g/l NaCl byl obsah PHB v biomase skoro zanedbatelný.

Tabulka 5: Měření závislosti produkce PHB a biomasy na osmotické síle produkčního média pomocí plynové chromatografie a spektrofotometrického měření zákalu.

	OD 630	biomasa (g/l)	PHB (g/l)	W _{PHB} (%)
100	5,49 ± 0,03	1,35	0,21	15,45
80	5,19 ± 0,01	1,46	0,23	15,83
60	5,27 ± 0,03	1,47	0,21	14,42
40	4,89 ± 0,00	1,36	0,10	7,29
20	4,11 ± 0,02	1,19	0,04	3,43



Graf 3: Srovnání závislosti produkce PHB a biomasou na množství NaCl v produkčním médiu.

V experimentu byl studován vliv růstu a produkce PHB bakteriálním kmenem při různých koncentracích NaCl, určujícího osmotickou sílu produkčního média. Z naměřených hodnot je patrná nejvyšší hodnota koncentrace biomasy i produkce PHB při použití 80 g/l NaCl za daných podmínek. Z grafu je patrné, že s klesající koncentrací NaCl v produkčním médiu, klesá výtežnost biomasy i PHA. Při použití 100 g/l NaCl je hodnota produkce PHB 0,21 g/l a přibližně stejná jako při použití 60 g/l NaCl.

4.5 Kultivace po přidavku prekurzorů

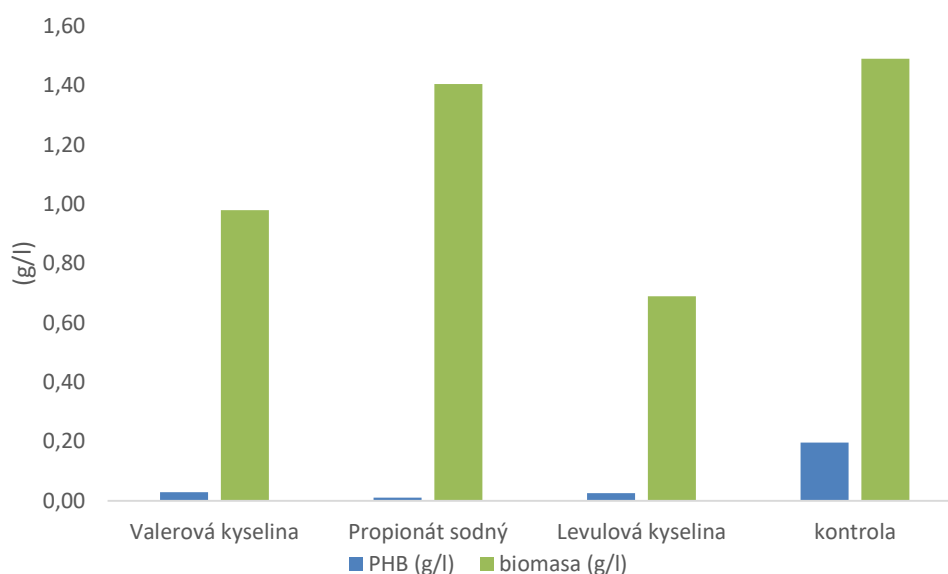
V tomto experimentu měla být indukována produkce kopolymeru P(3HB-co-3HV) přidavkem prekurzorů 3HV. Prekurzory byly přidávány po 24 hodinách. Zdrojem uhlíku zde byla fruktóza. Sledován byl vliv přidavku prekurzorů na produkci biopolymerů.

Z výsledných hodnot uvedených v *tabulce 6* lze vyčíst, že biomasa dosahovala nejvyšší koncentrace při použití prekurzoru Propionátu sodného. Dále byla sledována i produkce PHB, kdy

nejvyšší procentuální obsah byl 3,75 % a to při použití levulové kyseliny jako prekurzoru. Hodnoty však nejsou příliš vysoké.

Tabulka 6: Měření závislosti produkce PHB na osmotické síle produkčního média pomocí plynové chromatografie

	OD 630	biomasa (g/l)	PHV (g/l)	PHB (g/l)	W _{PHB} (%)
Valerová kyselina	2,50 ± 0,00	0,98	neprodukuje	0,03	2,96
Propionát sodný	4,79 ± 0,00	1,41	neprodukuje	0,01	0,78
Levulová kyselina	2,54 ± 0,00	0,69	neprodukuje	0,03	3,75
kontrola	5,71 ± 0,02	1,49	neprodukuje	0,20	13,44



Graf 4: Srovnání produkce PHB s biomasu při přidavku prekurzorů.

V tomto experimentu byla sledována produkce kopolymeru P(3HB-co-3HV) přidavkem prekurzorů 3HV. Z výsledků je zřejmé, že i přes podporu prekurzory, *Halomonas salina* kopolymer při daných podmínkách neprodukuje. Byla studována i růst biomasy a produkce PHB, kde nejvhodnějším prekurzor pro růst biomasy i produkci PHB kyselinu valerovou. Při daných podmínkách činila koncentrace biomasy 0,98 g/l a PHB 0,03 g/l při použití prekurzoru kyseliny valerové. Nejvhodnějším prekurzorem pro růst biomasy je, ze zkoumaných prekurzorů v daných podmínkách, propionát sodný avšak produkce PHB byla při jeho využití zanedbatelná. Kontrola s obsahem glukózy zde dosahovala skoro dvojnásobného množství PHB, kdy výtěžnost PHB z biomasy činila 13,44 hmotnostních %. Lze tedy říci, že přidavkem prekurzorů 3HV je syntéza PHA inhibována.

5 ZÁVĚR

Bakalářská práce byla věnována studiu produkce biopolymerů bakteriálním kmenem *Halomonas salina* při různých podmínkách.

V experimentální části byla sledována produkce PHA. Pomocí kultivace bakteriální kultura na agaru Spirit Blue byl sledován důkaz lipolytické aktivity. Byla potvrzena schopnost *Halomonas salina* produkovat. Metodou PCR byl proveden důkaz přítomnosti *phaC* genu, který kóduje PHA syntázu, enzym nezbytný pro biosyntézu PHA., po přечиštění vzorku byla provedena sekvenace příslušného ampliconu *phaC* genu.

Studována byla produkce při využití různých sacharidů a lipidů jako zdrojů uhlíku v produkčním médiu, produkce biopolymerů při přidavku prekuzorů a také byl sledován vliv koncentrace NaCl na růst a produkci PHA. Studium vlivu substrátu s obsahem lipidů byl stanoven, jako nejvhodnějším lipidem glycerol, který ovšem v porovnání se srovnávacím sacharidem vykazoval poloviční tvorbu biomasy a zanedbatelné množství produkce PHB. Při srovnávání různých sacharidů jako zdroj uhlíku byla nejvhodnějším cukrem vyhodnocena fruktóza, která se dále využívala jako referenční (srovnávací) substrát. Bakteriální kmen byl, jako zástupce rodu *Halomonas* schopný žít ve slaném prostředí, podroben experimentu, jehož cílem bylo studium vlivu koncentrace NaCl na růst a produkci PHA. Jako nejvhodnější koncentrací byla experimentálně určena navážka 80 g NaCl na 1 litr média. Tatož koncentrace byla využita v produkčním médiu.

Experimentálně byly prokázány schopnosti bakteriálního kmene produkce PHA. Z výsledných hodnot lze pozorovat, že *Halomonas salina* není za daných podmínek příliš ideálním producentem PHA, respektive PHB). Nespornou výhodou studovaného kmene je její schopnost života při vyšší koncentraci soli, která proces konzervuje a zabraňuje kontaminaci.

Do budoucna by bylo vhodné při využívání *Halomonas salina* provést experimenty na produkci PHA při jiných podmínkách, například optimalizaci pH, teploty, složení kultivačního média a jiné.

6 POUŽITÁ LITERATURA

1. ŠALANDA, Pavel. *Biodegradabilní plasty v systému nakládání s odpady*. Praha, 2017. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Ústav pro životní prostředí. Vedoucí práce Innemanová, Petra
2. OBRUČA, S.: Controlled production and degradation of selected biomaterials. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 169 s. Vedoucí dizertační práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc
3. REDDY, C.S.K, R GHAI, RASHMI a V.C KALIA. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology* [online]. [cit. 2017-05-14]. DOI: 10.1016/S0960-8524(02)00212-2. ISBN 10.1016/S0960-8524(02)00212-2. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852402002122>
4. Polyhydroxyalkanoates from palm oil: biodegradable plastics. New York: Springer Berlin Heidelberg, 2012. ISBN 978-364-2335-389.
5. SUDESH, K, H ABE a Y DOI. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. DOI: 10.1016/S0079-6700(00)00035-6. ISBN 10.1016/S0079-6700(00)00035-6. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670000000356>
6. SATKOWSKI, Michael M., David H. MELIK, Jean-Phillipe AUTRAN, Phillip R. GREEN, Isao NODA, Lee A. SCHECHTMAN, Yoshiharu DOI a Alexander STEINBÜCHEL. Physical and Processing Properties of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Copolymers. *Biopolymers Online*. Weinheim, Germany, 2005, 2005-01-15. DOI: 10.1002/3527600035.bpol3b09. ISBN 3527600035. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/3527600035.bpol3b09>
7. VOLTOVA, T. Polyhydroxyalkanoates--plastic materials of the 21st century: production, properties, applications. Hauppauge, N.Y: Nova Science Publishers, 2004. ISBN 15-903-3992-4.
8. RAI, R., T. KESHAVARZ, J.A. ROETHER, A.R. BOCCACCINI a I. ROY. Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. DOI: 10.1016/j.mser.2010.11.002. ISBN 10.1016/j.mser.2010.11.002. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927796X10001671>
9. SURIYAMONGKOL, Pornpa, Randall WESELAKE, Suresh NARINE, Maurice MOLONEY a Saleh SHAH. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants — A review: note II [online]. [cit. 2017-05-14]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.11.007. ISBN 10.1016/j.biotechadv.2006.11.007. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975006001443>
10. BRAUNEGG, Gerhart, Gilles LEFEBVRE, Klaus F GENSER, Maurice MOLONEY a Saleh SHAH. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects [online]. [cit. 2017-05-14]. DOI: 10.1016/S0168-1656(98)00126-6. ISBN 10.1016/S0168-1656(98)00126-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165698001266>
11. FLICKINGER, Michael C a Stephen W DREW. The encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation. New York: Wiley, 1999. ISBN 04711666851
12. SINGH, Mamtesh, Prasun KUMAR, Subhasree RAY, Vipin C. KALIA a Saleh SHAH. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects [online]. [cit. 2017-05-14]. DOI: 10.1007/s12088-015-0528-6. ISBN

- 10.1007/s12088-015-0528-6. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12088-015-0528-6>
13. CZERNIECKA, A., A. MAGOŃ, J. SCHLIESSER, B.F. WOODFIELD a M. PYDA. Heat capacity of poly(3-hydroxybutyrate): Physiological and engineering aspects [online]. [cit. 2017-05-14]. DOI: 10.1016/j.jct.2013.10.020. ISBN 10.1016/j.jct.2013.10.020. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196141300387X>
 14. LOO, C.-Y., SUDESH, K.: Polyhydroxyalkanoates: Bio-based microbial plastics and their properties. *Malaysian Polymer Journal*, 2007, vol. 2, no. 2, p 31-57.
 15. ŠNAJDAR, O. Regulovaná produkce polyhydroxyalkanoátů bakterií *Ralstonia eutropha* s využitím různých typů substrátů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 67 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
 16. ZOU, Huibin, Mengxun SHI, Tongtong ZHANG, Lei LI, Liangzhi LI a Mo XIAN. *Natural and engineered polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase: key enzyme in biopolyester production*. DOI: 10.1007/s00253-017-8485-0. ISBN 10.1007/s00253-017-8485-0. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-017-8485-0>
 17. STEINBÜCHEL, A, A. MAGOŃ, J. SCHLIESSER, B.F. WOODFIELD a M. PYDA. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids: Physiological and engineering aspects [online]. [cit. 2017-05-14]. DOI: 10.1016/0378-1097(95)00125-O. ISBN 10.1016/0378-1097(95)00125-O. Dostupné z: [http://doi.wiley.com/10.1016/0378-1097\(95\)00125-O](http://doi.wiley.com/10.1016/0378-1097(95)00125-O)
 18. Jendrossek D., Knoke I., Habibian R.B., Steinbuchel A., Schlegel H.G. Degradation of poly(3-hydroxybutyrate), PHB, by bacteria and purification of novel PHB depolymerase from *Comamonas sp.*, *Journal of Polymers and the Environment*, 1993, vol. 1, 53-61 p., ISSN 1572-8900
 19. CHEN, H.-J., S.-C. PAN a G.-C. SHAW. *Identification and Characterization of a Novel Intracellular Poly(3-Hydroxybutyrate) Depolymerase from Bacillus megaterium*. DOI: 10.1128/AEM.00621-09. ISBN 10.1128/AEM.00621-09. ISSN 03781097. Dostupné také z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.00621-09>
 20. BASTIOLI, Catia. *Handbook of biodegradable polymers*. Shrewsbury: Rapra Technology, 2005.
 21. KOLLER, Martin. *Recycling of Waste Streams of the Biotechnological Poly(hydroxyalkanoate) Production by Haloferax mediterranei on Whey*. DOI: 10.1155/2015/370164. ISBN 10.1155/2015/370164. Dostupné také z: <http://www.hindawi.com/journals/ijps/2015/370164/>
 22. OREN, Aharon. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environmental Technology*. 2010, **31**(8-9), 825-834. DOI: 10.1080/09593330903370026. ISSN 0959-3330. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09593330903370026>
 23. SATYANARAYANA, T., C. RAGHUKUMAR a S. SHIVAJI. Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current Science*. 2015, **89**(1), 78-90.
 24. ROTHCHILD, Lynn J., MANCINELLI, Rocco L. Life in extreme environments . *Nature*. 2005, vol. 409, s. 1092-1101.
 25. MADIGAN, M.T, J.M. MARTINKO, P.V. DUNLAP a D.P. CLARK. *Brock biology of microorganisms*. 2009. ISBN 0-321-53615-0.
 26. BEBLO-VRANESEVIC, Kristina, Erwin A. GALINSKI, Reinhard RACHEL, Harald HUBER a Petra RETTBERG. Influence of osmotic stress on desiccation and irradiation

- tolerance of (hyper)-thermophilic microorganisms. *Archives of Microbiology*. 2017, **199**(1), 17-28. DOI: 10.1007/s00203-016-1269-6. ISSN 0302-8933. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00203-016-1269-6>
27. STETTER, Karl O. Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Letters*. 1999, **452**(1), 22-25.
 28. PACKCHUNG, Amalie A. H., SIMPSON, Philippa J.L, CODD, Rachel. Life on earth. Extremophiles continue to move the goal posts. *Environmental chemistry*. 2006, vol. 3, no. 2, s. 77-93.
 29. BROCK, Thomas D. *Thermophilic microorganisms and life at high temperatures*. New York: Springer-Verlag, 1978. Springer series in microbiology. ISBN 35-409-0309-7.
 30. D'AMICO, Salvino, COLLINS, Tony, MARX, Jean-Claude, FELLER, Georges, GERDAY, Charles. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Rep*. 2006, vol. 7, no. 4, s. 385-389.
 31. KATO, Chiaki a Mohammad Hassan QURESHI. Pressure response in deep-sea piezophilic bacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 1999, **1**(1), 87-92.
 32. HORIKOSHI, Kōki a W. D. GRANT, ed. *Extremophiles: microbial life in extreme environments*. New York: Wiley-Liss, 1998. Ecological and applied microbiology. ISBN 04-710-2618-2.
 33. HORIKOSHI, Koki. Alkaliphiles . C, Ser. B. 2004, vol. 80, no. 4, s. 166-178. *Proceedings of the Japan Academy*. 2004, **80**(4), 166-178.
 34. VAN DEN BURG, Bertus. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*. 2003, **6**(3), 213-218.
 35. CHRISTIAN, J. H. B a J. A. WALTHO. Solute concentrations within cells of halophilic and non-halophilic bacteria. *Biochimica et biophysica acta*. 1962, **65**(3), 508-509.
 36. AGUILAR, Alfredo. Extremophile research in the European Union: from fundamental aspects to industrial expectations. *FEMS Microbiology Reviews*. 1996, **18**(2), 88-92.
 37. SCHIRALDI, Chiara a Mario DE ROSA. The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. *Trends in Biotechnology*. 2002, **20**(12), 515-521.
 38. HUBER, Herald a Karl O. STETTER. Hyperthermophiles and their possible potential in biotechnology. *Journal of Biotechnology*. 1998, **64**(1), 39-52.
 39. OREN, Aharon. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environmental Technology*. 2010, **31**(9-10), 825-834.
 40. YINJIN, Jin, Jin-Chun CHEN, Wu QIONG a Guo-Qiang CHEN. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Biotechnology Advances*. 2015, **33**(7), 1433-1442. DOI: QiongWuQiongChen QiongWuGuo-Qiang.
 41. DUDOVÁ, P. *Psychrofilní a psychrotolerantní mikroorganismy a jejich využití k biodegradaci škodlivin*. Brno, 2006. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Fakulta přírodovědecká. Vedoucí práce RNDr. Dana Horáková, CSc.
 42. IVANOV, V., V. STABNIKOV, Z. AHMED, S. DOBRENKO a A. SALIUK. *Production and applications of crude polyhydroxyalkanoate-containing bioplastic from the organic fraction of municipal solid waste* [online]. [cit. 2018-02-05]. DOI: 10.1007/s13762-014-0505-3. ISBN 10.1007/s13762-014-0505-3. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13762-014-0505-3>
 43. VARY, Patricia S., Rebekka BIEDENDIECK, Tobias FUERCH, Friedhelm MEINHARDT, Manfred ROHDE, Wolf-Dieter DECKWER a Dieter JAHN. *Bacillus megaterium*—from simple soil bacterium to industrial protein production host. *Applied Microbiology and*

- Biotechnology* [online]. 2007, **76**(5), 957-967 [cit. 2018-02-05]. DOI: 10.1007/s00253-007-1089-3. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-007-1089-3>
44. REINECKE, Frank a Alexander STEINB&UML. CHEL. *Ralstonia eutropha* Strain H16 as Model Organism for PHA Metabolism and for Biotechnological Production of Technically Interesting Biopolymers. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* [online]. [cit. 2018-02-05]. DOI: 10.1159/000142897.
 45. SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. 1. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 978-80-210-4207-0
 46. MENDONÇA, T.T., J.G.C. GOMEZ, E. BUFFONI, R.J. SÁNCHEZ RODRIGUEZ, J. SCHRIPEMA, M.S.G. LOPES a L.F. SILVA. *Exploring the potential of Burkholderia sacchari to produce polyhydroxyalkanoates* [online]. [cit. 2018-02-05]. DOI: 10.1111/jam.12406. ISBN 10.1111/jam.12406. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jam.12406>
 47. MOTHE, G., T. SCHUBERT, H. HARMS a T. MASKOW. *Biotechnological Coproduction of Compatible Solutes and Polyhydroxyalkanoates using the Genus Halomonas*. DOI: 10.1002/elsc.200800097. ISBN 10.1002/elsc.200800097. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elsc.200800097>
 48. QUILLAGUAMÁN, J., H. GUZMÁN, D. VAN-THUOC a R. HATTI-KAUL. Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, **85**(6), 1687-1696.
 49. KULKARNI, Snehal O., Pradnya P. KANEKAR, Jyoti P. JOG, Prashant A. PATIL, Smita S. NILEGAONKAR, Seema S. SARNAIK a Pranav R. KSHIRSAGAR. Characterisation of copolymer, poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHB-co-PHV) produced by *Halomonas campisalis* (MCM B-1027), its biodegradability and potential application. *Bioresource Technology*. 2011, **102**(11), 6625-6628. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.03.054. ISSN 09608524. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852411004111>
 50. RAZA, Zulfiqar Ali, Sharjeel ABID a Ibrahim M. BANAT. *Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications*. 2018, **126**, 45-56. DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.10.001. ISSN 09648305. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830517300276>
 51. GARIBYAN, Lilit a Nidhi AVASHIA. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 2013, **133**(3), 1-4 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1038/jid.2013.1. ISSN 0022202X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X1536139X>
 52. *IGEM: Team:HKU Hong Kong* [online]. In: . [cit. 2018-05-07]. Dostupné z: http://2011.igem.org/Team:HKU-Hong_Kong/Lab_Protocol
 53. CHROMÝ, Vratislav. *Bioanalytika: analytická chemie v laboratorní medicíně*. Brno: Masarykova univerzita, 2002. ISBN 80-210-2917-X.
 54. OJUMU, T.V., J. YU, a B.O. SOLOMON. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology*. 2004, **3**(1), 18-24. ISSN 1684-5315.

7 POUŽITÉ ZKRATKY

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

PCR – polymerázová řetězová reakce

PHA - polyhydroxyalkanoát

PHB - polyhydroxybutyrát

PHV - polyhydroxyvalerát

TBE – *tris*-borát-EDTA pufr

8 PŘÍLOHY

Příloha 1: Sekvenace genu *phaC* u bakterie *Halomonas salina*:

AAGTATTACGTGCTCGACCTTCGTCAGGAGAACTCGCTGGTCAAGTGGCTG
GTGGATCAGGGCCACAGCGTCTTCCTGATCTCCTGGCGCAATCCCGGTCCCGAGC
AGCGTGATCTGACCTGGGCCGATTACATGCAGATGGGGCCCATTGCGGCCATGGA
AGCCATCGAGCAGGCCGTGGGCGAAAAGTCGGTCAACCTGCTGAGCTACTGTGTC
GGCGGGACTCTGACGGCCTCGACAGTGGCCTACCTGACCAGCACCCGGCGCGGC
CGCAAGGTGCGCTCGGTCACCTACATGGCGACTCTGCAGGACTTCCGCGATCCCG
GCGAGCTGGGCGTCTTCCTTGCCGAGCCGGTGCTCAGGGGCATAGAAGAAAAAC
TCGAGCAGGACGGCTATCTGGATGGCCGAGTCATGGCCTATTCCTTCAACCTGCT
GCGCGAGAACGATCTGTTCTGGTCGTTCTACATCAACAACCTATCTGAAAGGCGAC
GCGCCGGCTCC