

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# PRODUKCE MCL-PHA POMOCÍ VYBRANÝCH BAKTERIÍ

PRODUCTION OF MCL-PHA BY SELECTED BACTERIA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

LIBOR EREMKA

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2011



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0593/2010** Akademický rok: **2010/2011**  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student(ka): **Libor Eremka**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin (B2901)  
Studijní obor: Potravinářská chemie (2901R021)  
Vedoucí práce **doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.**  
Konzultanti:

### Název bakalářské práce:

Produkce mcl-PHA pomocí vybraných bakterií

### Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše - struktura polyhydroxyalkanoátů, biosyntéza a možnosti jejich řízené bakteriální produkce, přehled producentů.
2. Optimalizace metod analýzy biomasy a struktury produkovaných PHA.
3. Regulovaná produkce PHA se střední délkou řetězce (mcl-PHA) vybranými kmeny bakterií.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 6.5.2011

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

-----  
Libor Eremka  
Student(ka)

-----  
doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
Vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2011

-----  
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Cílem práce bylo studium možnosti mikrobiální produkce polyhydroxyalkanoátů se střední délkou řetězce (mcl-PHA, „medium-chain-length PHA“). Pro produkci byly využity bakterie *Pseudomonas putida* a *Pseudomonas aeruginosa*. Teoretická část bakalářské práce se zabývá biosyntézou polyhydroxyalkanoátů, jejich materiálovými vlastnostmi a mikrobiálními producenty. V experimentální části byly vybrané bakterie kultivovány na různých substrátech za účelem vyhodnocení jejich schopnosti využívat různé uhlíkaté zdroje a akumulovat mcl-PHA. Množství a složení akumulovaných mcl-PHA v biomase bylo analyzováno pomocí plynové chromatografie s FID detektorem. Kmen *Pseudomonas putida* akumuluje více mcl-PHA v médiu obsahujícím řepkový olej ve srovnání s kmenem *Pseudomonas aeruginosa*. *P. putida* akumuluje 2,11 % mcl-PHA při kultivaci na glycerolovém médiu.

## **ABSTRACT**

The aim of this work is to study the possibility of microbial production of polyhydroxyalkanoates with medium chain length (mcl-PHA). For production two bacterial strains were used: *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. Theoretical part of bachelor thesis deals with the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates, their material properties and microbial producers. In experimental part selected bacteria were cultivated on different substrates to evaluate their ability to utilize various carbon sources and accumulate mcl-PHA. Content and composition of mcl-PHA accumulated in biomass were analyzed by gas chromatography with FID. *Pseudomonas putida* produced more mcl-PHA in medium containing canola oil as sole carbon source when compared with *Pseudomonas aeruginosa*. *P. putida* produced 2,11 % mcl-PHA in medium containing glycerol as carbon source.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Polyhydroalkanoáty, mcl-PHA, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*

## **KEY WORDS**

Polyhydroxyalkanoates, mcl-PHA, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*

EREMKA, L. *Produkce mcl-PHA pomocí vybraných bakterií*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 42 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc..

## 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:*

Chtěl bych poděkovat vedoucí mé bakalářské práce doc. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za všestrannou pomoc. A dále bych chtěl poděkovat Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D. za ochotu a pomoc při práci v laboratoři. Předložená práce byla finančně podpořena z prostředků projektu CZ.1.05/2.1.00/01.0012/ERDF.

# 1. OBSAH

1.	OBSAH .....	5
2.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....	7
3.	ÚVOD .....	8
4.	TEORETICKÁ ČÁST .....	9
4.1.	PHA .....	9
4.1.1.	Polyhydroxyalkanoáty s krátkou délkou řetězce – scl-PHA .....	9
4.1.2.	Polyhydroxyalkanoáty se střední délkou řetězce – mcl-PHA .....	9
4.1.3.	Polyhydroxyalkanoáty s dlouhou délkou řetězce – lcl-PHA .....	10
4.1.4.	Struktura granulí .....	10
4.1.5.	Materiálové vlastnosti .....	11
4.2.	Mikrobiální producenti PHA .....	12
4.3.	Biosyntéza polyhydroxyalkanoátů .....	13
4.3.1.	Biosyntéza scl-PHA .....	14
4.3.2.	Biosyntéza mcl-PHA .....	15
4.4.	Biodegradace PHA .....	15
5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	17
5.1.	Použité chemikálie, materiál, bakterie a přístroje .....	17
5.1.1.	Produkční bakterie .....	17
5.1.2.	Chemikálie pro kultivaci .....	17
5.1.3.	Ostatní chemikálie .....	17
5.1.4.	Přístrojové vybavení .....	17
5.2.	Stanovení obsahu biomasy .....	17
5.2.1.	Kalibrace stanovení .....	17
5.2.2.	Stanovení biomasy v jednotlivých kultivacích .....	18
5.3.	Kultivace bakterie <i>Pseudomonas putida</i> .....	18
5.3.1.	Oživení, uchování kultury a příprava inokula .....	18
5.3.2.	Použitá živná media .....	18
5.3.3.	Kultivace na různých substrátech .....	19
5.3.4.	Stanovení růstové křivky bakterie <i>Pseudomonas putida</i> .....	19
5.3.5.	Vliv stresových faktorů na tvorbu biomasy a akumulaci PHA u bakterie <i>Pseudomonas putida</i> .....	19
5.3.6.	Stanovení proteázové aktivity .....	19
5.4.	Kultivace bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	20
5.4.1.	Oživení, uchování kultury a příprava inokula .....	20
5.4.2.	Použitá živná media .....	20
5.4.3.	Kultivace na různých substrátech .....	20
5.5.	Analýza PHA plynovou chromatografií s FID detekcí .....	20
5.5.1.	Stanovení kalibrační křivky .....	20
5.5.2.	Stanovení PHA v biomase .....	20
6.	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	22
6.1.	Kalibrace metod .....	22
6.1.1.	Stanovení biomasy .....	22
6.1.2.	Stanovení PHA v biomase .....	23
6.2.	Kultivace bakterie <i>Pseudomonas putida</i> .....	26
6.2.1.	Kultivace na různých substrátech .....	26

6.2.2.	Složení PHA <i>P.putida</i> akumulovaných na různých substrátech .....	30
6.2.3.	Stanovení růstové křivky bakterie <i>P.putida</i> .....	32
6.2.4.	Vliv stresových faktorů na tvorbu biomasy a akumulaci PHA u bakterie <i>Pseudomonas putida</i> .....	33
6.2.5.	Stanovení proteázové aktivity .....	35
6.3.	Kultivace bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	36
6.3.1.	Kultivace na různých substrátech.....	36
6.3.2.	Složení PHA akumulovaných na různých substrátech.....	37
6.4.	Porovnání bakteriálních kmenů <i>Pseudomonas putida</i> a <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
7.	ZÁVĚR.....	40
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....	41

## 2. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

C <sub>6</sub>	kyselina 3-hydroxyhexanová
C <sub>7</sub>	kyselina 3-hydroxyheptanová
C <sub>8</sub>	kyselina 3-hydroxyoktanová
C <sub>9</sub>	kyselina 3-hydroxynonanová
C <sub>10</sub>	kyselina 3-hydroxydekanová
C <sub>11</sub>	kyselina 3-hydroxyundekanová
C <sub>12</sub>	kyselina 3-hydroxydodekanová
C <sub>12:1</sub>	kyselina 3-hydroxy-5-cis-dodekanová
C <sub>14:1</sub>	kyselina 3-hydroxy-7-cis-tetradekanová
C <sub>14</sub>	kyselina 3-hydroxytetradekanová
HDPE	vysoko hustotní polyethylen
LDPE	nízko hustotní polyethylen
P4HB	poly(4-hydroxybutyrát)
PHB	poly(3-hydroxybutyrát)
P(HB/HHx)	poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyhexanoat)
PHHx	poly(hydroxyhexanoat)
PHHp	poly(hydroxyheptanoat)
PHV	poly(hydroxyvalerát)
PHO	poly(hydroxyoktanoat),
PP	polypropylen
T <sub>g</sub>	teplota skelného přechodu
T <sub>t</sub>	teplota tání
T <sub>r</sub>	teplota rozkladu

### 3. ÚVOD

Plasty jsou vyráběny chemickým průmyslem od třicátých let dvacátého století a tvoří velmi důležitou skupinu materiálů, bez kterých si dnešní svět již nelze představit. Díky své vysoké molekulové hmotnosti, inertnosti a specifickým vlastnostem jsou používány téměř všude a postupně narůstajícím trendem nahrazují tradiční materiály jako kovy, keramika, sklo či dřevo. Avšak jejich inertnost se brzy stala i jejich ekologickým negativem, protože po použití a skládkování těchto látek dochází k jejich akumulaci v životním prostředí a jeho znečišťování. Dalším negativem syntetických polymerů je jejich závislost na fosilních palivech a jejich náročná recyklovatelnost.

Všeobecným trendem v současnosti je tedy nalezení nových polymerních materiálů vhodných pro průmyslovou výrobu, jejichž produkce by byla nezávislá na fosilních surovinách, jejich vlastnosti by byly podobné syntetickým polymerům a byly biodegradabilní, tzn. po použití těchto materiálů by došlo k jejich přirozenému rozkladu.

Ideální plast by měl být dostatečně trvanlivý, biodegradabilní, recyklovatelný a vyráběný z obnovitelných zdrojů. Většina těchto biopolymerů se chemicky řadí k polysacharidům nebo polyhydroxyalkanoátům (PHA).

Poly-3-hydroxyalkanoáty jsou skupina intracelulárních mikrobiálních polyesterů produkovaných řadou mikroorganismů jako zásobní zdroj uhlíku a energie a vyskytující se intracelulárně ve formě granulí oddělených od cytoplazmy.

Polyhydroxyalkanoáty je možné produkovat z obnovitelných zdrojů, jako jsou např. rostlinné tuky, škroby nebo nepotravinářské obilniny, případně z odpadních zdrojů jako syrovátka, odpadní tuky či melasa. Při vhodném způsobu skládkování těchto materiálů dojde, ve srovnání se syntetickými polymery, k jejich rychlému rozkladu a utilizaci přítomnou mikroflórou až na oxid uhličitý a vodu. Oxid uhličitý se vrací zpět do atmosféry, kde je opět fixován fotosyntetizujícími rostlinami, jejichž produkt či odpad při jejich zpracování se používá k produkci těchto materiálů.



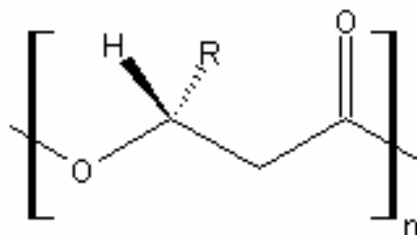
## 4. TEORETICKÁ ČÁST

### 4.1. PHA

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou lineární polyestery složené především z hydroxyalkanových kyselin. Hydroxylová skupina se vyskytuje výhradně v R konfiguraci, což je dáno specificitou enzymů zapojených do syntézy PHA. Polyhydroxyalkanoáty akumulují řada gramnegativních, grampozitivních bakterií a archaebakterií jako zásobní zdroj uhlíku a energie [1].

PHA byly poprvé popsány Lemoignem v roce 1926, který charakterizoval polyhydroxybutyrát obsažený v bakterii *Bacillus megaterium* [1].

Podle počtu atomů uhlíku obsažených v monomerech polyesteru, se PHA rozdělují na scl, mcl a lcl-PHA.



Obrázek 1: Obecné schéma PHA

PHA jsou biodegradabilní termoplasty, jejichž molekulová hmotnost se pohybuje mezi  $10^5$ - $10^6$  Da. Více než 80 různých hydroxyalkanových kyselin bylo nalezeno jako monomery různých PHA [2].

#### 4.1.1. Polyhydroxyalkanoáty s krátkou délkou řetězce – scl-PHA

Scl-PHA neboli „short chain length“ polyhydroxyalkanoáty jsou biopolymery tvořeny hydroxykyselinami o uhlíkatém řetězci tvořeným třemi až pěti atomy uhlíku.

Nejnámější scl-PHA je homopolymer poly(3-hydroxybutyrát), který se vyskytuje nejen jako zásobní materiál u mikroorganismů, ale jako oligomer (120-200 monomerů) se vyskytuje v celé řadě mikroorganismů, rostlin a živočichů včetně člověka. V řadě případů je přítomen jako vápenatý polyfosfátový komplex v membránách, kde pravděpodobně plní funkci iontového kanálu, dále se vyskytuje v rostlinných pletivech a živočišných tkáních (lidská plazma, vepřové ledviny, hovězí srdce a další) [2].

#### 4.1.2. Polyhydroxyalkanoáty se střední délkou řetězce – mcl-PHA

Mcl-PHA neboli „medium chain length“ polyhydroxyalkanoáty jsou tvořeny hydroxykyselinami o uhlíkatém řetězci tvořeným šesti až čtrnácti atomy uhlíku.

Schopnost akumulovat mcl-PHA je unikátní pro rod *Pseudomonas* [2].

Tabulka 1: Vliv substrátu na složení mcl-PHA produkované bakterií *P. putida* [2]

substrát	složení akumulovaného PHA [mol%]						
	C <sub>6</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>12:1</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>14:1</sub>	C <sub>14</sub>
Glukosa	<0,1	6,9	74,3	8,8	7,7	1,6	<0,1
Dekanoát	5,3	52,3	42,4	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabulka 2: Složení mcl-PHA produkované bakterií *Pseudomonas oleovorans* v závislosti na použitém substrátu [2]

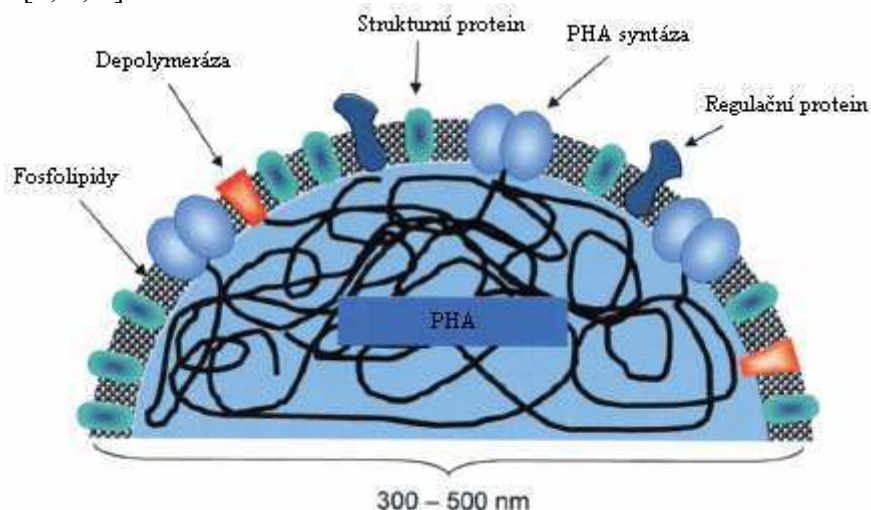
substrát	složení akumulovaného PHA [mol%]						
	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>9</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>	C <sub>12</sub>
Hexanoát	95		5				
Heptanoát		100					
Oktanoát	8		91		1		
Nonanoát		35		65			
Dekanoát	7		75		18		
Undekanoát		28		59		13	
Dodekanoát	4		60		34		3

#### 4.1.3. Polyhydroxyalkanoáty s dlouhou délkou řetězce – lcl-PHA

Lcl-PHA neboli „long chain length“ polyhydroxyalkanoáty jsou tvořeny hydroxykyselinami o uhlíkatém řetězci tvořeným více než patnácti atomy uhlíku. Lcl-PHA zatím byly pouze připraveny *in vitro* a dosud nebyla pozorována jejich přítomnost v přírodě [3].

#### 4.1.4. Struktura granulí

PHA granule se nacházejí v cytoplasmě, v buňkách bohatých na PHA jsou to granule oddělené od cytoplazmy o velikosti 0,2-0,7 μm, které obsahují přibližně 98% polyesteru, 1,5% proteinů a odhadem 0,5% lipidů. Granule jsou viditelné pomocí elektronového mikroskopu. Pomocí NMR spektrometrie bylo zjištěno, že PHA se v granulích nachází v metastabilním amorfním stavu. Struktura scl-PHA granulí a mcl-PHA granulí není nijak zásadně odlišná [3, 4, 5].



Obrázek 2: Schéma struktury PHA granule [6]

Hustota granulí poly(3-hydroxybutyrátu) se pohybuje v rozmezí 1,18-1,24 g/cm<sup>3</sup>, zatímco hustota granulí obsahující mcl-PHA je pohybuje okolo 1,05 g/cm<sup>3</sup> [2].

Proteiny, lipidy a fosfolipidy tvoří obal, na povrchu granule je lipidická vrstva, do které jsou zanořeny polymerázy, depolymerázy, phasiny a další proteiny. Lipidická vrstva odděluje hydrofobní jádro granule od hydrofilního cytoplazmatického prostoru [2].

Granule v buňkách bohatých na PHA mohou být obarveny barvivy Sudan Black, Nile blue A nebo Nile red [3, 4].

#### 4.1.5. Materiálové vlastnosti

Fyzikální vlastnosti polyhydroxyalkanoátů závisejí na monomerním složení a molekulové hmotnosti polyesteru. Mcl- i scl-PHA vznikají enzymově katalyzovanou polymerací, z toho důvodu se vyskytují pouze v R konfiguraci a jsou proto plně izotaktické [2, 7].

PHB homopolymer je kompletně stereoregulární polyester se všemi asymetrickými uhlíky v R konfiguraci, z toho důvodu je vysoce krystalický. Vysoká krystaličnost (typicky 55-80%) ho činí poměrně tuhým a křehkým materiálem s vysokým bodem tání. Mechanické vlastnosti jsou podobné polypropylenu, až na relativní prodloužení, které je u PHB okolo 3%, kdežto u PP okolo 400% [2].

Flexibilita materiálu se výrazně mění, pokud je do polyesteru inkorporován 3-hydroxyvalerát. Relativní prodloužení roste s obsahem 3-hydroxyvalerátu. Kopolymer P(HB-co-HV) je méně tuhý a má větší pružnost a elasticitu než PHB. Kopolymer P(HB-co-HV) s různým obsahem 3-hydroxyvalerátu (0 – 30%) je komerčně dostupný pod názvem Biopol™ [2, 8].

Kopolymer 3-hydroxybutyrátu a 4-hydroxybutyrátu nemůže tvořit isomorfní krystaly z důvodu rozdílné monomerní struktury. Z toho důvodu teplota skelného přechodu klesá až na -50 °C a teplota tání klesá na přibližně 50 °C v závislosti na obsahu 4-hydroxybutyrátu [2].

Stejně jako ostatní PHA jsou mcl-PHA stereoregulární isotaktické polyesteru. To jim dovoluje dosáhnout určitého stupně krystaličnosti. Teplota skelného přechodu je u mcl-PHA obvykle v rozsahu -43 až -25 °C. Teplota tání, relativní prodloužení a další materiálové vlastnosti velmi závisí na monomerní složení polyesteru [2].

**Tabulka 3: Srovnání teploty skelného přechodu, tání a rozkladu jednotlivých PHA [2, 3, 7]**

Typ PHA	T <sub>g</sub> [°C]	T <sub>t</sub> [°C]	T <sub>r</sub> [°C]
PHB	-3	163	228
P4HB	-46	50	308
PHV	-15	112	231
PHHx	-28	-	212
PHHp	-32	-	240
PHO	-38	66	256
P(3HB-co-HHx)	-2	98	238

**Tabulka 4: Porovnání některých syntetických polymerů s PHA [3]**

	PP	HDPE	LDPE	PHB	Poly (3HB-co- 20 %3HV)	Poly (3HO-co- 12 %3HH)
T <sub>g</sub> [°C]	-15	-	-30	4	-1	-35
T <sub>t</sub> [°C]	170	137	130	177	145	61
Pevnost v tahu [MPa]	38	30	10	40	32	9
Pružnost v tahu [GPa]	1,7	1,4	0,2	3,5	1,2	0,008
Rel. prodloužení [%]	400	10	620	6	50	380

## 4.2. Mikrobiální producenti PHA

Od doby, kdyby byl poprvé identifikován poly(3-hydroxybutyrát) v bakterii *Bacillus megaterium*, bylo nalezeno více než 90 bakteriálních druhů akumulující PHA [9].

Tabulka 5: Mikroorganismy u kterých byla prokázána akumulace PHA [3]

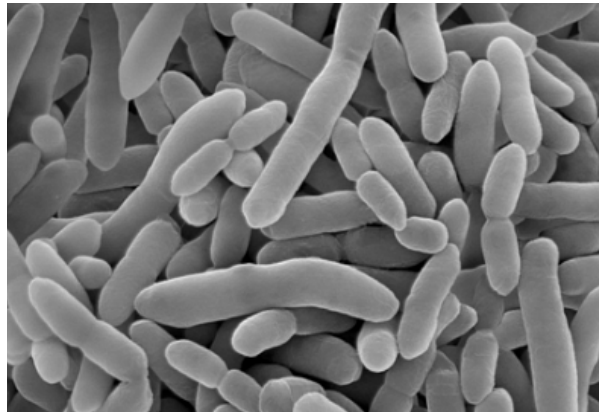
<i>Acidovorax</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Lampropedia</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Cupriavidus</i>	<i>Leptothrix</i>	<i>Rhodobacter</i>
<i>Actinobacillus</i>	<i>Cyanobacterium</i>	<i>Legionella</i>	<i>Rhodococcus</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>Defluviicoccus</i>	<i>Methanomonas</i>	<i>Rhodopseudomonas</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Derxia</i>	<i>Methylobacterium</i>	<i>Rhodospirillum</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Delftia</i>	<i>Methylosinus</i>	<i>Rubrivivax</i>
<i>Allochromatium</i>	<i>Ectothiorhodospira</i>	<i>Methylocystis</i>	<i>Saccharophagus</i>
<i>Anabaena</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Methylomonas</i>	<i>Shinorhizobium</i>
<i>Aphanothece</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Methylovibrio</i>	<i>Sphaerotilus</i>
<i>Aquaspirillum</i>	<i>Ferrobacillus</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Spirillum</i>
<i>Asticcaulus</i>	<i>Gamphosphaeria</i>	<i>Microvoleus</i>	<i>Spirulina</i>
<i>Axobacter</i>	<i>Gloeocapsa</i>	<i>Microlunatus</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Azomonas</i>	<i>Gloeotheca</i>	<i>Microcystis</i>	<i>Stella</i>
<i>Aureobasidium</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Azohydromonas</i>	<i>Halobacterium</i>	<i>Mycoplana</i>	<i>Synechococcus</i>
<i>Azospirillum</i>	<i>Haloarcula</i>	<i>Nitrobacter</i>	<i>Syntrophomonas</i>
<i>Azotobacter</i>	<i>Haloferax</i>	<i>Nitrococcus</i>	<i>Thiobacillus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Halomonas</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Thiocapsa</i>
<i>Beggiatoa</i>	<i>Haloquadratum</i>	<i>Nostoc</i>	<i>Thiococcus</i>
<i>Beijerinckia</i>	<i>Haloterrigena</i>	<i>Oceanospirillum</i>	<i>Thiocystis</i>
<i>Beneckea</i>	<i>Hydrogenophaga</i>	<i>Oscillatoria</i>	<i>Thiodictyon</i>
<i>Brachymonas</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Paracoccus</i>	<i>Thiopedia</i>
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Chloroflexus</i>	<i>Paucispirillum</i>	<i>Thiosphaera</i>
<i>Burkholderia</i>	<i>Chlorogloea</i>	<i>Pedomicrobium</i>	<i>Variovorax</i>
<i>Caryophanon</i>	<i>Chromatium</i>	<i>Photobacterium</i>	<i>Vibrio</i>
<i>Caulobacter</i>	<i>Chromobacterium</i>	<i>Protomonas</i>	<i>Xanthobacter</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Zoogloea</i>
<i>Comamonas</i>	<i>Lamprocystis</i>	<i>Ralstonia</i>	

Rod *Pseudomonas* patří do rRNA homologní skupiny I, syntetizující P(3HA), které obsahují různé 3-hydroxyalkanoátové monomery od C<sub>6</sub> do C<sub>14</sub> [1, 2].

Bakterie rodu *Pseudomonas* jsou gram-negativní, rovné nebo mírně zakřivené nesporelující tyčinkové bakterie schopné využít řadu organických materiálů. Většina pseudomonád jsou volně žijící saprofytické bakterie, které žijí v půdě a ve vodě, kde hrají důležitou úlohu při degradačních a rozkladných procesech v koloběhu uhlíku a dusíku. Jsou to pohyblivé bakterie s jedním nebo několika bičíky, pouze zřídka jsou nepohyblivé [4, 8, 10].

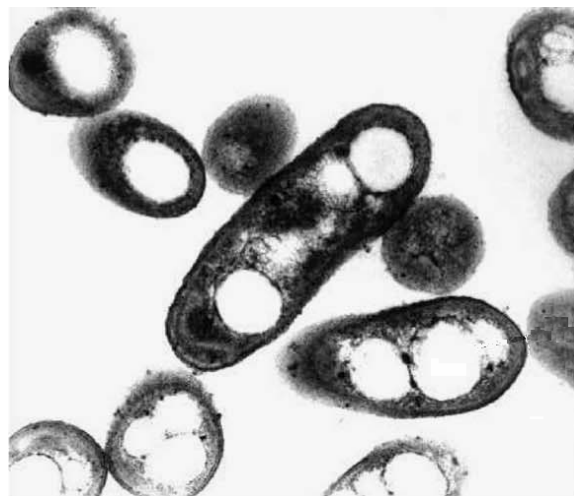
Bakterie rodu *Pseudomonas* jsou striktně aerobní tyčinky, které dávají pozitivní katalázový test a podle bakteriálního kmenu pozitivní i negativní oxidázový test. Některé pseudomonády fluoreskují a tvoří modrozelený pigment pyocyanin a zelený pigment chloraphin, příležitostně i hnědá, růžová a fialová barviva, dobře pozorovatelná v UV světle [11].

*Pseudomonas putida* není patogenní bakterií, je široce rozšířenou bakterií, některé kmeny *P. putida* produkují fluorescein [10].



Obrázek 3: Bakterie *Pseudomonas putida* [12]

*Pseudomonas aeruginosa* je důležitý patogenní mikroorganismus, který může způsobit nemocniční infekce a příležitostně je patogenní i pro rostliny. Tento patogen je zvláště nebezpečný pro pacienty s rozsáhlými popáleninami či pro pacienty podstupující imunosupresivní terapii, mimořádně nebezpečný je pro pacienty trpící cystickou fibrózou [10].



Obrázek 4: Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* [13]

*Pseudomonas syringae* je rostlinný patogen, který získal jméno podle šeríku obecného (*Syringa vulgaris*) odkud byl poprvé izolován [8].

*Pseudomonas oleovorans* byly na základě 16S rRNA analýzy přesunuty do skupiny *Pseudomonas aeruginosa* [14].

*Pseudomonas stutzeri* je druh pseudomonád, jehož některé kmeny jsou schopny využívat nitrát jako alternativní akceptor elektronů a jsou tedy schopny za určitých podmínek anaerobního růstu. Bývají někdy označovány jako denitrifikující pseudomonády [10].

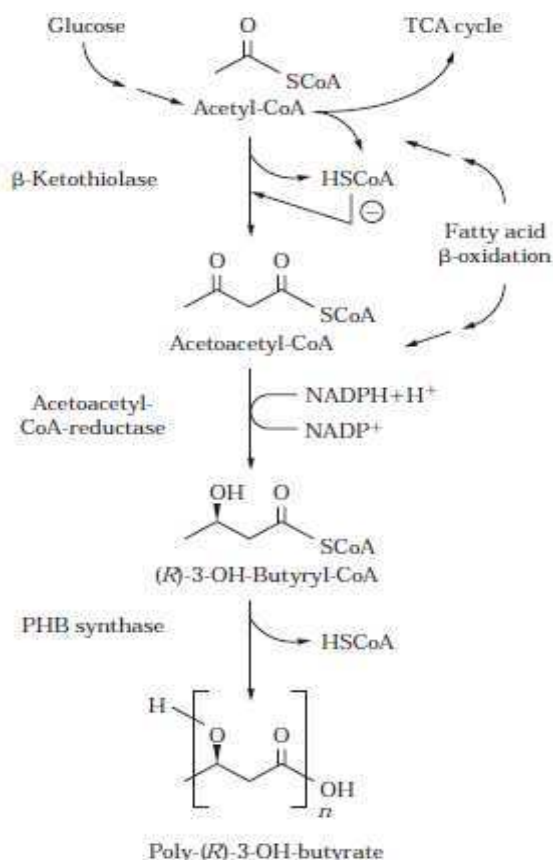
### 4.3. Biosyntéza polyhydroxyalkanoátů

V závislosti na kinetice akumulace PHA mohou být mikroorganismy rozděleny do dvou základních skupin [3, 9]. První skupinu tvoří bakterie, které vyžadují pro akumulaci PHA

limitní nedostatek některého nutrietu a přebytek uhlíkatého zdroje. Do této skupiny patří např.: *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas oleovorans* a další [3, 9]. Druhu skupinu tvoří mikroorganismy, které nevyžadují žádnou limitaci některého z nutrietů a PHA akumulují během buněčného růstu. Do druhé skupiny patří např.: *Azohydromonas lata*, *Azotobacter vinelandi*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* a další [3].

#### 4.3.1. Biosyntéza scl-PHA

Biochemie syntézy PHB je velmi dobře prostudována a probíhá ve třech základních krocích: 1) dvě molekuly acetyl-CoA kondenzují za katalýzy  $\beta$ -ketothiolázy na acetoacetyl-CoA, 2) acetoacetyl-CoA je stereoselektivně redukován acetoacetyl-CoA-reduktázou za vzniku čistého enantiomeru (R)-3-OH-butyryl-CoA, 3) PHA syntáza katalyzuje polymeraci jednotlivých (R)-3-OH-butyryl-CoA za vzniku polyesteru. Molekulová hmotnost vzniklého polyesteru závisí na řadě faktorů, především je to typ substrátu, produkční kmen a kultivační podmínky [2].



Obrázek 5: PHB syntéza u bakterie *Cupriavidus necator* [2]

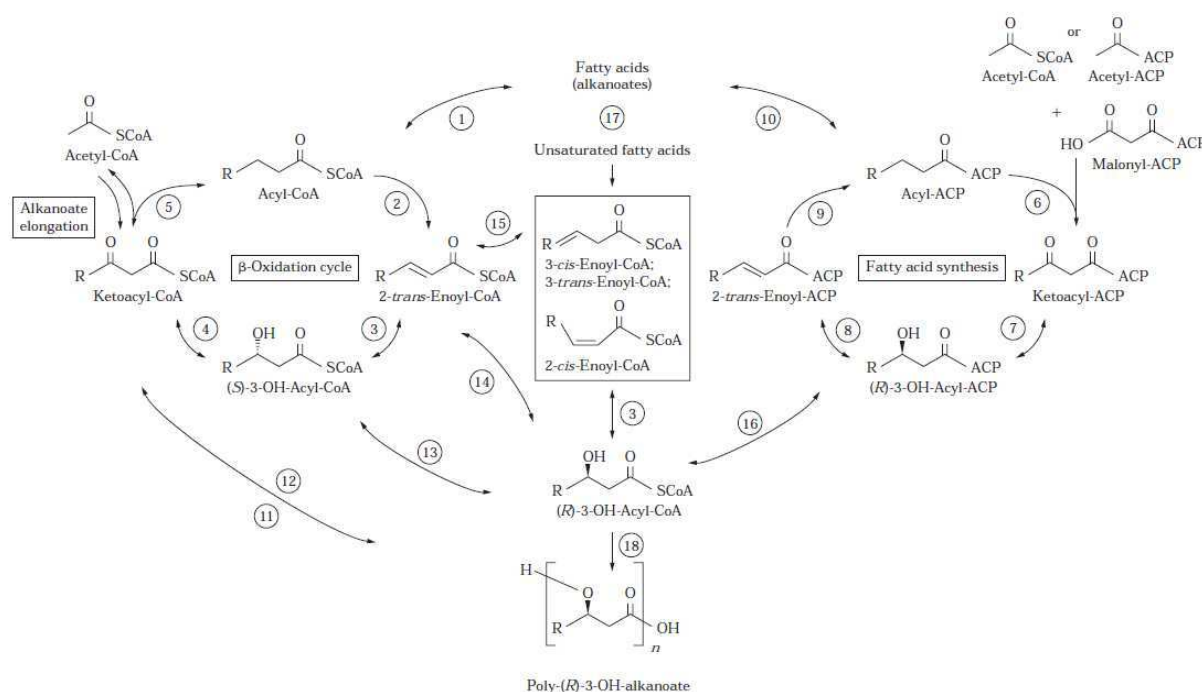
PHB biosyntéza a akumulace se vyskytuje u většiny bakterií, jestliže uhlíkatý energetický zdroj je v nadbytku a pokud některý z dalších nutričních faktorů jako např.: dusík, síra, fosfor, železo, hořčík, draslík nebo kyslík limitují bakterii ve výživě. Bylo zjištěno, že vnitrobuněčná koncentrace acetyl-CoA a volného koenzymu A hrají klíčovou úlohu v regulaci biosyntézy. Při vyváženém růstu je acetyl-CoA oxidován v citrátovém cyklu, takto vzniklý NADH je použit pro biosyntetické účely. Jakmile se omezí růst bakterie, koncentrace NADH vzrůstá a inhibuje NADH-dependentní citrátsyntázu a izocitrátdehydrogenázu, následkem toho nemůže být acetyl-CoA oxidován v citrátovém cyklu a vstupuje do PHB syntetické dráhy.  $\beta$ -

ketothioláza, enzym zahrnutý v syntetické dráze, je inhibován volným koenzymem A, k čemuž dochází při normálním vyváženém růstu [2].

Kopolymer PHB a PHV může být syntetizován řadou bakterií, a to s využitím substrátu, který obsahuje prekurzory 3-hydroxyvalerátu [2].

#### 4.3.2. Biosyntéza mcl-PHA

Tři základní metabolické dráhy jsou zahrnuty v biosyntéze PHA v bakterii *Pseudomonas putida*. *Pseudomonas putida* odvozuje PHA od prekurzorů vytvořených pomocí následujících metabolických drah: 1) de novo syntéza mastných kyselin je hlavní dráha, pokud bakterie roste na jednoduchých substrátech, jako např. glukóza, 2) degradace karboxylových kyselin β-oxidací je hlavní dráha, pokud jsou jako substrát použity mastné kyseliny a 3) prodlužování řetězce použitého substrátu (především karboxylových kyselin), ve kterém je acyl-CoA prodlužován pomocí acetyl-CoA, přičemž tato dráha je srovnatelná se syntézou PHB, kde dochází ke kondenzaci dvou molekul acetyl-CoA [2].



Obrázek 6: Hlavní dráhy zahrnuté v mcl-PHA syntéze u rodu *Pseudomonas* [2]

#### 4.4. Biodegradace PHA

PHA mohou být degradovány uvnitř buňky pomocí intracelulárních depolymeráz jako zásobní zdroj uhlíku a energie, ale i extracelulárně pomocí extracelulárních depolymeráz produkovaných různými bakteriemi, kvasinkami či plísněmi, které jsou přítomné v prostředí [2, 3].

Intracelulární PHA depolymerázy nejsou schopny degradovat extracelulární PHA a naopak, z důvodu zcela amorfni struktury intracelulárního PHA a částečně krystalické formy extracelulárního PHA [2].

Protože jsou PHA tolik rozšířené, řada bakterií, kvasinek a plísní si vyvinula schopnost využít PHA. Bylo dokázáno, že PHA degradace se vyskytuje v řadě velmi rozličných ekosystémů, aerobních i anaerobních, v půdě, v moři či v odpadní vodě [3].

Na biodegradabilitu PHA má vliv řada faktorů, především biodiverzita a aktivita mikroorganismů v prostředí, teplota, pH, redoxní potenciál, obsah vody v prostředí a další parametry. Stavba a složení polymeru zásadně ovlivňuje jeho biodegradabilitu, především jeho molekulová hmotnost, monomerní složení a stupeň krystaličnosti polymeru [2].

Nenasycené zesíťované mcl-PHA zůstávají biodegradabilní, avšak se stoupajícím stupněm zesíťování je biodegradace redukována [2].



## 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1. Použité chemikálie, materiál, bakterie a přístroje

#### 5.1.1. Produkční bakterie

V experimentální práci byla použita bakterie *Pseudomonas putida* CCM 1977 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, které byla získány z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

#### 5.1.2. Chemikálie pro kultivaci

Nutrient Broth (Himedia)

Agar Powder (Himedia)

#### 5.1.3. Ostatní chemikálie

Azokasein – Sigma-Aldrich

Chemikálie pro standardizaci: kyselina 3-hydroxyhexanová, 3-hydroxyoktanová, 3-hydroxydekanová, 3-hydroxyundekánová, 3-hydroxydodekánová, 3-hydroxytetradekánová – Larodan – Fine Chemicals

Triton X – Sigma Aldrich

Všechny použité chemikálie byly čistoty p.a. a vyšší.

#### 5.1.4. Přístrojové vybavení

Plynový chromatograf:

GC-FID (Hewlett Packard, Series II 5890)

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

Ostatní přístroje:

Spektrofotometr VIS, Helios  $\delta$

Spektrofotometr UV-VIS, Helios  $\alpha$

Centrifuga Boeco C-28, Hettich Mikro 200

Analytické váhy Boeco

Laminární box Aura mini, Bio Air Instruments

Termostat, LS-35

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

### 5.2. Stanovení obsahu biomasy

#### 5.2.1. Kalibrace stanovení

Obsah biomasy byl stanovován spektrofotometrickou metodou měření zákalu. Měření bylo prováděno při vlnové délce  $\lambda = 630$  nm. Jako blank byla použita destilovaná voda.

Kalibrační křivka byla získána měřením absorbance suspenze buněk o známé koncentraci, ředěných destilovanou na vhodnou koncentraci a souběžným stanovením sušiny gravimetricky.

Pro stanovení sušiny bylo použito 10 ml suspenze buněk. Suspenze buněk byla centrifugována (8000 rpm, 5 min), supernatant byl slit a odstředěná biomasa byla promyta 5% roztokem Tritonu X, centrifugována, znovu promyta destilovanou vodou a opět

centrifugována. Promytá biomasa byla kvantitativně převedena na sušící misku o známé hmotnosti a sušena do konstantní hmotnosti při 105 °C. Z rozdílu hmotnosti prázdné misky a misky se suspenzí buněk bylo stanoveno množství biomasy v g/l.

### 5.2.2. Stanovení biomasy v jednotlivých kultivacích

Po skončení kultivace byl u vzorků stanoven obsah biomasy. Každý vzorek byl naředěn tak, aby hodnota absorbance při  $\lambda = 630$  nm měřená proti destilované vodě, byla zahrnuta v sestrojené kalibrační křivce.

## 5.3. Kultivace bakterie *Pseudomonas putida*

### 5.3.1. Oživení, uchování kultury a příprava inokula

Bakterie *Pseudomonas putida* byla dodána v lyofilizovaném stavu. Bakterie byla oživena dle přiloženého návodu a kultivována na pevném médiu Nutrient Broth při 30 °C. Bakterie byla pravidelně přeočkována v intervalu 30 dní.

Inokulum pro všechny kultivace bylo připraveno do Erlenmayerových baněk o objemu 100 ml obsahujících 50 ml média Nutrient Broth. Inokulum bylo zaočkováno třikrát bakteriologickou kličkou z agarové plotny a po 24 hodinách kultivace při 30 °C na temperované třepačce (170 rpm) bylo použito pro zaočkování produkčního média.

### 5.3.2. Použitá živná media

Pro přípravu inokula bylo použito kapalně médium, pro uchování kultury bylo použito pevné agarové médium:

Nutrient Broth

Beef extract 10 g/l

Pepton 10 g/l

NaCl 5 g/l

Agar 20 g/l

Pro kultivaci bakterie *Pseudomonas putida* bylo použito následující minerální médium [15]:

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,02 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,1 g
MgSO <sub>4</sub>	0,2 g
Roztok stopových prvků*	1 ml
Destilovaná voda	1000 ml

\*Roztok stopových prvků

FeCl <sub>3</sub>	9,7 g
CaCl <sub>2</sub>	7,8 g
CuSO <sub>4</sub>	0,156 g
CoCl <sub>2</sub>	0,119 g
NiCl <sub>2</sub>	0,118 g
CrCl <sub>2</sub>	0,062 g
0,1 M HCl	1 000 ml

### 5.3.3. Kultivace na různých substrátech

Bakterie *Pseudomonas putida* byla kultivována na různých sacharidových substrátech, na médiu obsahujícím řepkový olej a na glycerolu.

Jako produkční médium bylo použito minerální médium (4.3.2.), koncentrace substrátu byla pro všechny kultivace 10 g/l. Celkový objem kultivační směsi činil 30 ml, kultivace byla u všech substrátů provedena v Erlenmayerově baňce o objemu 100 ml. Kultivace byla provedena na temperované třepačce při 30 °C, třepací frekvence u všech kultivací byla 170 rpm.

U všech provedených kultivací byl vyhodnocen výtěžnostní koeficient  $Y_{PHA/S}$  podle vzorce 1., jedná se o bezrozměrnou veličinu, která udává poměr akumulovaného PHA ku množství použitého substrátu

$$Y_{PHA/S} = \frac{\text{koncentrace produktu [g/l]}}{\text{koncentrace substrátu [g/l]}} \quad (1.)$$

### 5.3.4. Stanovení růstové křivky bakterie *Pseudomonas putida*

Stanovení růstové charakteristiky bakterie *Pseudomonas putida* bylo provedeno na řepkovém oleji jako jediném uhlíkatém zdroji za stejných experimentálních podmínek (4.3.3.) jako ostatní kultivace.

Po pravidelných intervalech byl za aseptických podmínek odebírán vzorek, pro stanovení obsahu biomasy (4.2.2.) a stanovení obsahu PHA v biomase (4.5.2).

### 5.3.5. Vliv stresových faktorů na tvorbu biomasy a akumulaci PHA u bakterie *Pseudomonas putida*

Byla připravena produkční média (4.3.2.) obsahující řepkový olej jako jediný uhlíkatý a energetický zdroj. Po 45 hodinách kultivace byl za aseptických podmínek aplikován stresový faktor. Jako stresový faktor byl použit buď chlorid sodný, nebo ethanol či peroxid vodíku. Stresový faktor byl aplikován vždy pro dvě paralelní kultivace. Vliv stresových faktorů byl porovnán s kontrolním pokusem, kde bakteriální kultura rostla za nezměněných podmínek.

Výsledné koncentrace stresových faktorů v produkčních médiích byly následující: NaCl 3%, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH 1%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mmol/dm<sup>3</sup>.

### 5.3.6. Stanovení proteázové aktivity

Principem stanovení proteázové aktivity je enzymové štěpení azokaseinu na azooligopeptidy. Azokasein je bílkovina, jejíž některé aminokyseliny jsou substituovány vhodným azobarvivem. Princip testu spočívá ve vysrážení azokaseinu působením kyseliny trichloroctové. Vzniklá sraženina přechází při centrifugaci do sraženiny, zatímco azopeptidy vzniklé enzymovou hydrolýzou azokaseinu zůstávají v supernatantu. Rozdíl absorbance supernatantu ( $\lambda = 440 \text{ nm}$ ) a blanku udává po přepočtu enzymovou aktivitu přítomných proteáz. Jednotka (U) proteázové aktivity je definována jako množství enzymu, které katalyzuje nárůst  $A_{440\text{nm}}$  o 0,001 za 1 min za podmínek testu. [16]

Za aseptických podmínek byl odebírán vzorek z paralelních kultivací na řepkovém oleji a na NB médiu za výše uvedených kultivačních podmínek (4.3.3.). Použitá koncentrace NB média byla 25 g/l.

## 5.4. Kultivace bakterie *Pseudomonas aeruginosa*

### 5.4.1. Oživení, uchování kultury a příprava inokula

Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* byla dodána ve formě želatinových disků. Bakterie byla oživena dle přiloženého návodu a kultivována na pevném médiu Nutrient Broth při 30 °C. Bakterie byla pravidelně přeočkována v intervalu 30 dní.

Inokulum pro všechny kultivace bylo připraveno stejným způsobem jako u bakterie *Pseudomonas putida* (4.3.1.).

### 5.4.2. Použitá živná media

Pro přípravu inokula bylo použito kapalné médium, pro uchování kultury bylo použito pevné agarové médium:

Nutrient Broth

Beef extract 10 g/l

Pepton 10 g/l

NaCl 5 g/l

Agar 20 g/l

Pro kultivaci bakterie *Pseudomonas aeruginosa* bylo použito minerální médium o stejném složení jako u bakterie *Pseudomonas putida* (4.3.2.).

### 5.4.3. Kultivace na různých substrátech

Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* byla kultivována na médiu obsahujícím řepkový olej a na glukosovém médiu za stejných kultivačních podmínek jako bakterie *Pseudomonas putida*.

## 5.5. Analýza PHA plynovou chromatografií s FID detekcí

Principem stanovení je hydrolýza akumulovaných polyesterů v biomase na volné 3-hydroxyalkanové kyseliny a jejich převedení kyselé katalyzovanou esterifikací na nízkovroucí methylestery, které je možné analyzovat plynovou chromatografií.

### 5.5.1. Stanovení kalibrační křivky

Do vialek bylo naváženo přesné množství kyseliny 3-hydroxyhexanové, 3-hydroxyoktanové, 3-hydroxydekanové, 3-hydroxydodekanové a 3-hydroxytetradekanové.

Dále byl přidán chloroform 1 ml a 0,8 ml 15% kyseliny sírové v methanolu. Vialky byly uzavřeny a udržovány při teplotě 100 °C po dobu 3 hodin. Po ukončení esterifikace byly ochlazeny a byl přidán 0,5 ml 0,05 mol/dm<sup>3</sup> NaOH. Po protřepání a vytvoření fázového rozhraní byla odpipetována spodní chloroformová frakce do nové vialky, která byla uzavřena a následně analyzována na GC.

### 5.5.2. Stanovení PHA v biomase

Vzorek biomasy byl odebrán a odstředěn na centrifuze (10000 rpm, 5 min). Supernatant byl slit a biomasa byla suspendována v 5% roztoku Tritonu X a centrifugována. Suspenze byla suspendována v malém množství vody a vzorek byl převeden do zkumavky typu Eppendorf a centrifugován na mikrocentrifuze (10000 rpm, 5 min). Supernatant byl slit a vzorek biomasy pro stanovení obsahu PHA byl vysušen při 75°C v termostatu.

Do vialek bylo naváženo přibližně 10 mg suché biomasy. Dále byl do vialek přidán 1 ml chloroformu a 0,8 ml 15% kyseliny sírové v methanolu. Vialky byly zavíčkované a tato směs byla udržována při teplotě 100 °C po dobu 3 hodin. Po esterifikaci byla směs ochlazená, odvíčkována a extrahována 0,5 ml roztoku 0,05 mol/dm<sup>3</sup> NaOH. Po extrakci a vytvoření fázového rozhraní byla spodní chloroformová frakce odpipetována do nových vialek, ty byly uzavřeny a analyzovány pomocí GC.

## 6. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 6.1. Kalibrace metod

#### 6.1.1. Stanovení biomasy

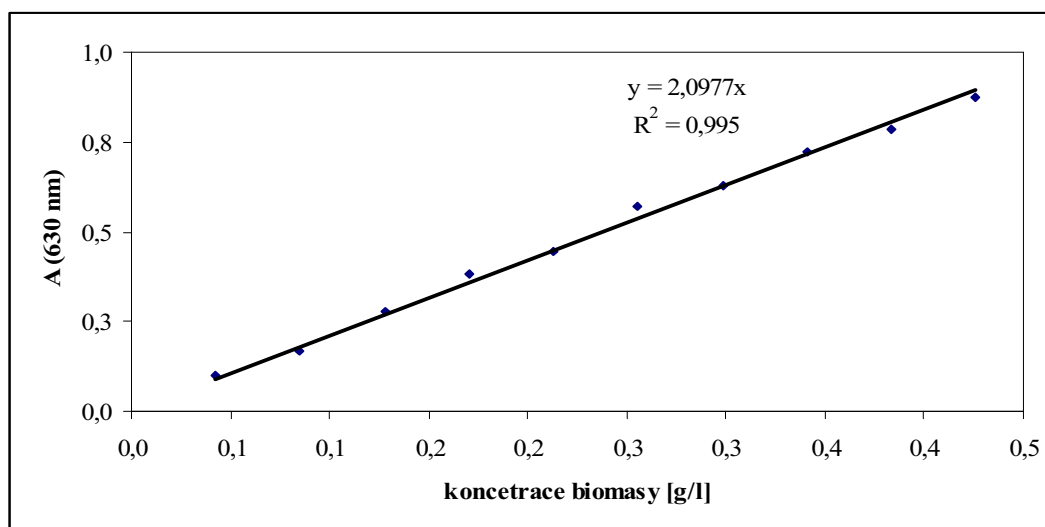
Kalibrační závislost množství suché biomasy byla stanovena z hodnot spektrofotometrického měření zákalu suspenze buněk při vlnové délce  $\lambda=630$  nm. Suspenze buněk byla připravena přesným ředěním kultury, u které byla počáteční koncentrace biomasy stanovena vázkovou metodou.

Tabulka 6: Stanovení sušiny biomasy

Hmotnost prázdné misky [g]	Hmotnost misky se sušinou [g]	Hmotnost sušiny [g]	Koncentrace biomasy [g/l]
15,9093	15,9299	0,0206	2,06
15,7510	15,7730	0,0220	2,20
15,6201	15,6411	0,0210	2,10
			2,12±0,06

Tabulka 7: Závislost zákalu stanoveného při  $\lambda = 630$  nm na množství biomasy

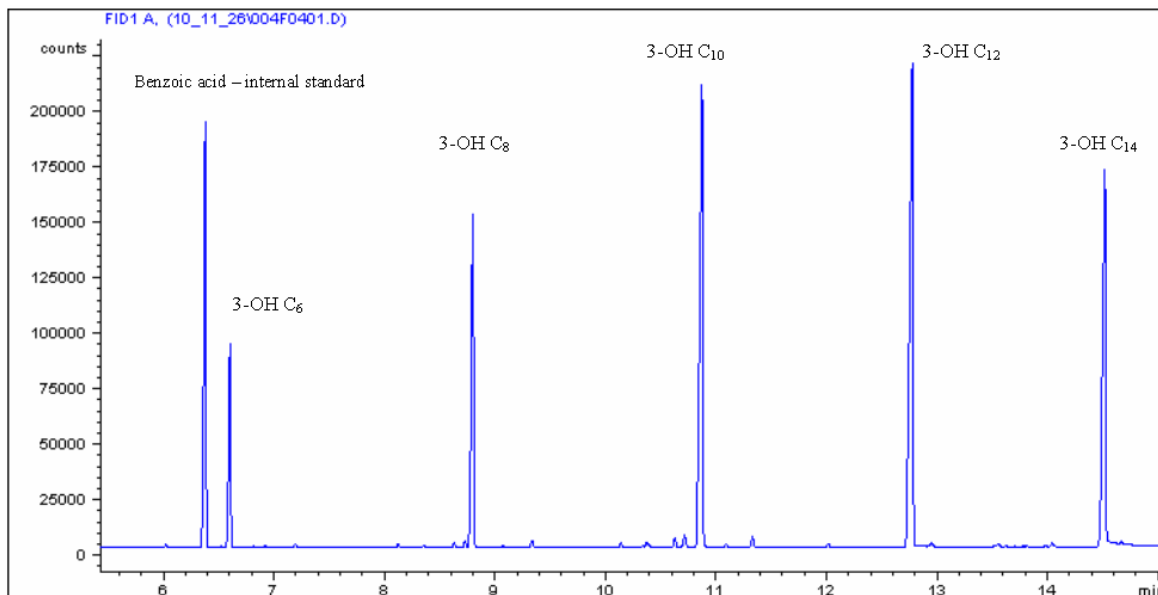
Koncentrace biomasy [g/l]	A(630 nm)
0,0426	0,100
0,0852	0,166
0,1278	0,280
0,1704	0,381
0,2130	0,447
0,2556	0,572
0,2982	0,628
0,3408	0,720
0,3834	0,784
0,4260	0,873



Obrázek 7: Kalibrační závislost stanovení biomasy

Z grafické závislosti absorbance na koncentraci biomasy byla stanovena kalibrační rovnice  $y = 2,0977x$ . Regresní koeficient je  $R^2 = 0,995$ .

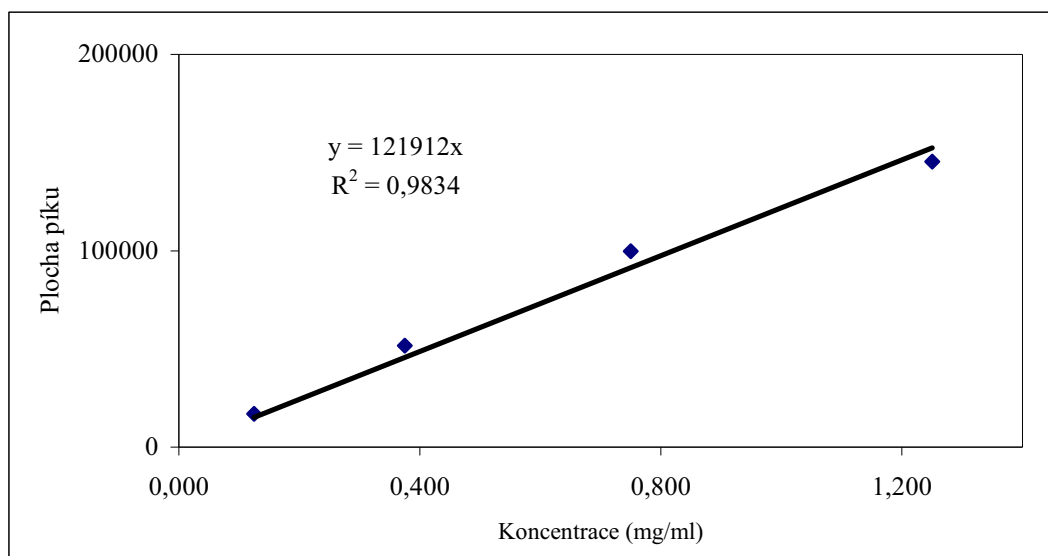
### 6.1.2. Stanovení PHA v biomase



Obrázek 8: Chromatogram standardů esterů 3-hydroxyalkanových kyselin

Tabulka 8: Závislost plochy píku na koncentraci standardu metylesteru 3-hydroxyhexanové kyseliny

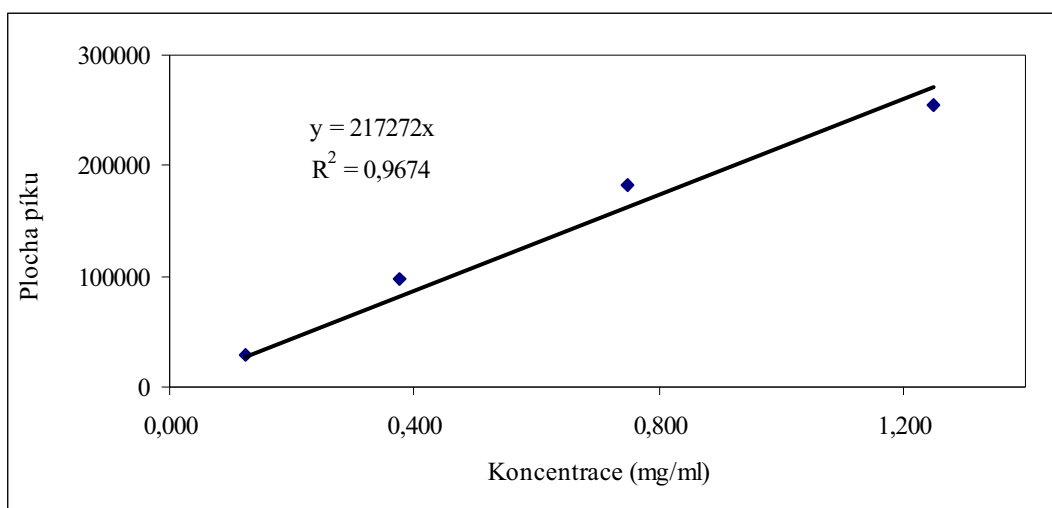
Koncentrace [mg/ml]	Plocha píku
0,125	16907
0,375	51693
0,750	99777
1,250	145424



Obrázek 9: Kalibrační závislost standardu metylesteru kyseliny 3-hydroxyhexanové

Tabulka 9: Závislost plochy píku na koncentraci standardu metylesteru kyseliny 3-hydroxyoktanové

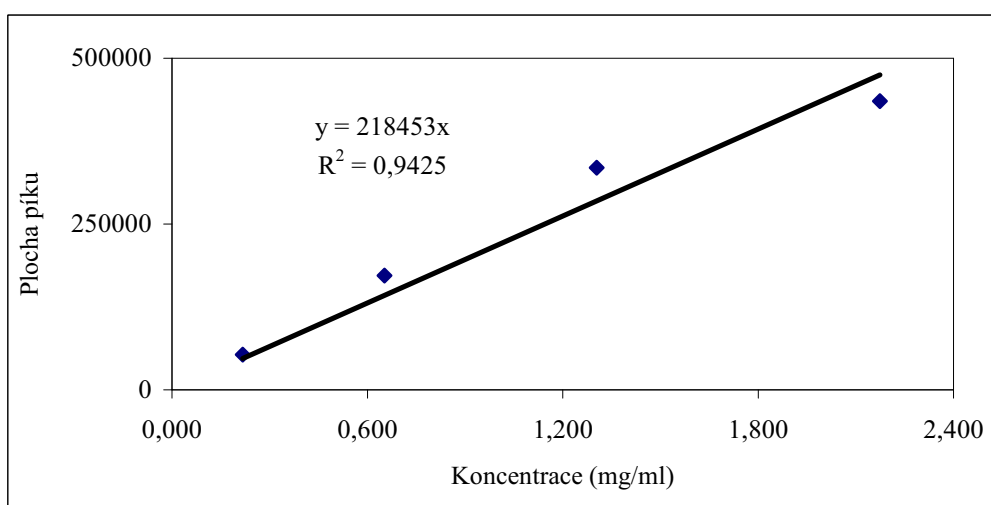
Koncentrace [mg/ml]	Plocha píku
0,125	29710
0,375	97141
0,750	183023
1,250	254594



Obrázek 10: Kalibrační závislost standardu metylesteru kyseliny 3-hydroxyoktanové

Tabulka 10: Závislost plochy píku na koncentraci standardu metylesteru kyseliny 3-hydroxydekanové

Koncentrace [mg/ml]	Plocha píku
0,194	46884
0,581	149418
1,162	285266
1,936	391597

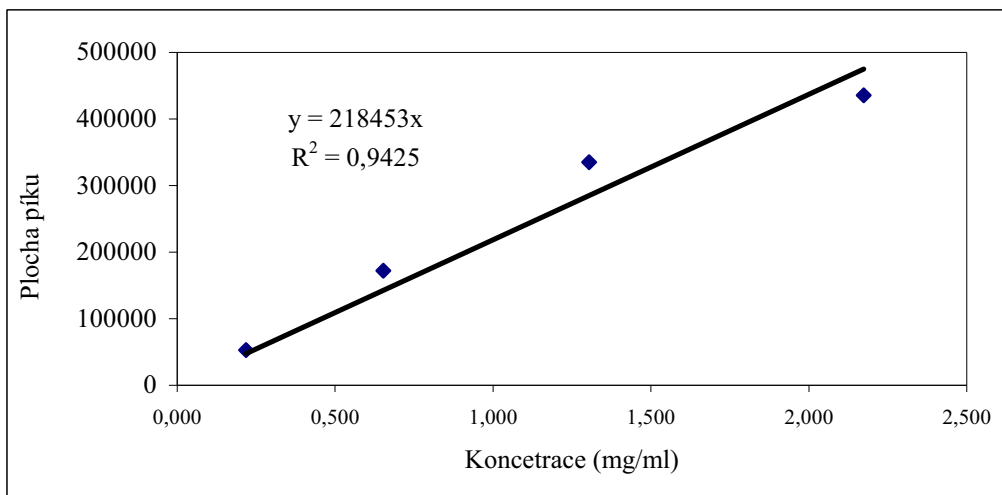


Obrázek 11: Kalibrační závislost standardu metylesteru kyseliny 3-hydroxydekanové



Tabulka 11: Závislost plochy píku na koncentraci standardu metylesteru kyseliny 3-hydroxydodekanové

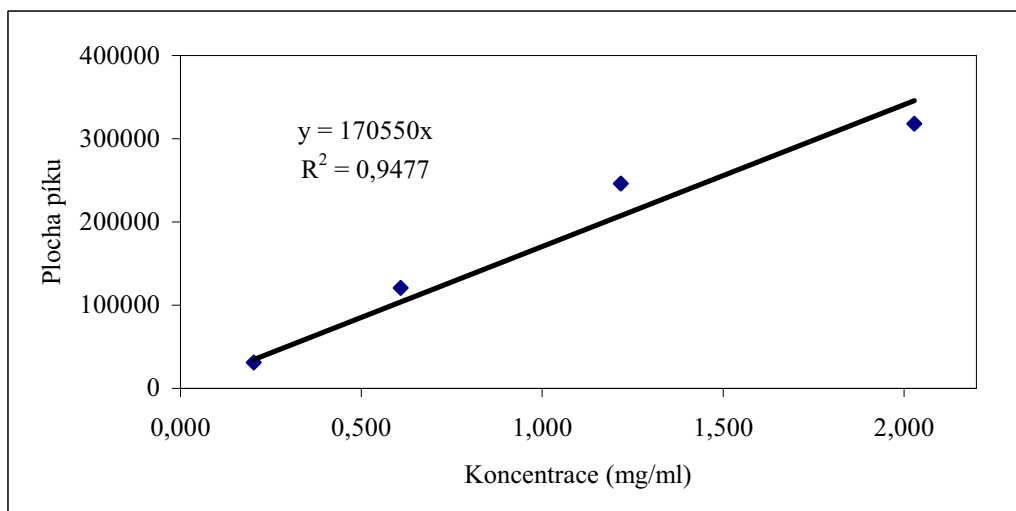
Koncentrace [mg/ml]	Plocha píku
0,217	52911
0,652	172109
1,304	335035
2,174	435433



Obrázek 12: Kalibrační závislost standardu metylesteru kyseliny 3-hydroxydodekanové

Tabulka 12: Závislost plochy píku na koncentraci standardu metylesteru kyseliny 3-hydroxytetradekanové

Koncentrace [mg/ml]	Plocha píku
0,203	31018
0,608	120764
1,217	246129
2,028	317971



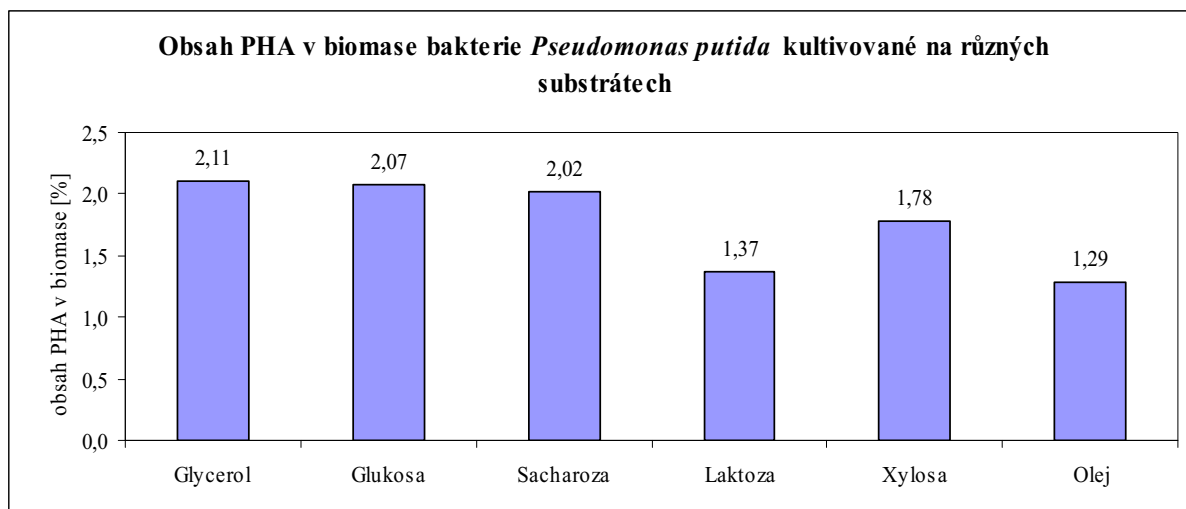
Obrázek 13: Kalibrační závislost standardu metylesteru kyseliny 3-hydroxytetradekanové

## 6.2. Kultivace bakterie *Pseudomonas putida*

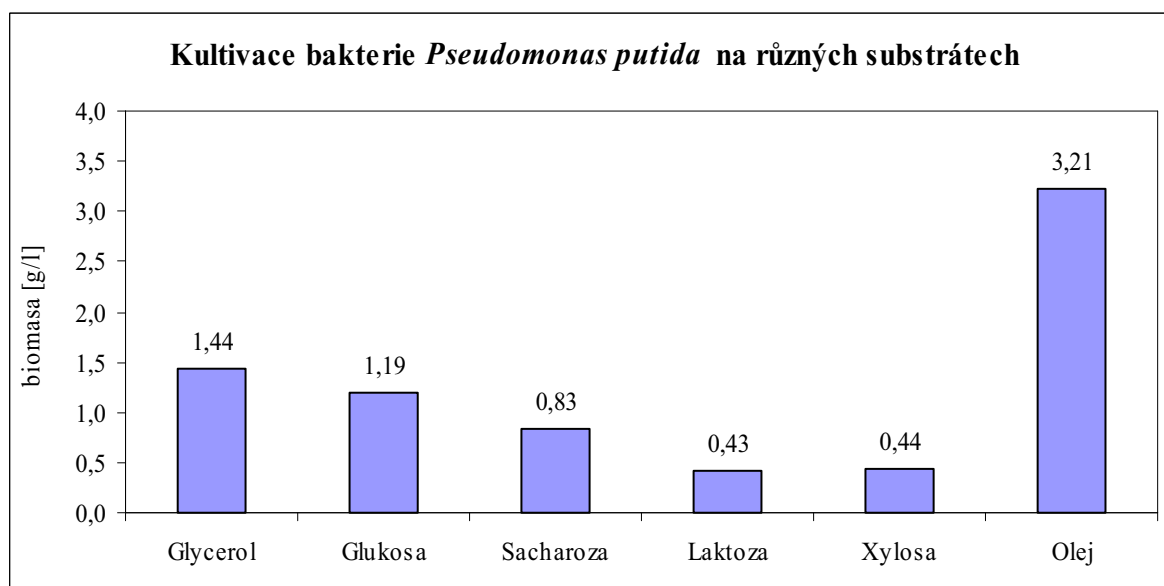
### 6.2.1. Kultivace na různých substrátech

Bakterie *Pseudomonas putida* byla kultivována na různých substrátech za výše uvedených experimentálních podmínek (4.3.3.) za účelem zhodnocení její schopnosti využívat různé uhlíkaté zdroje pro svou výživu a akumulaci PHA.

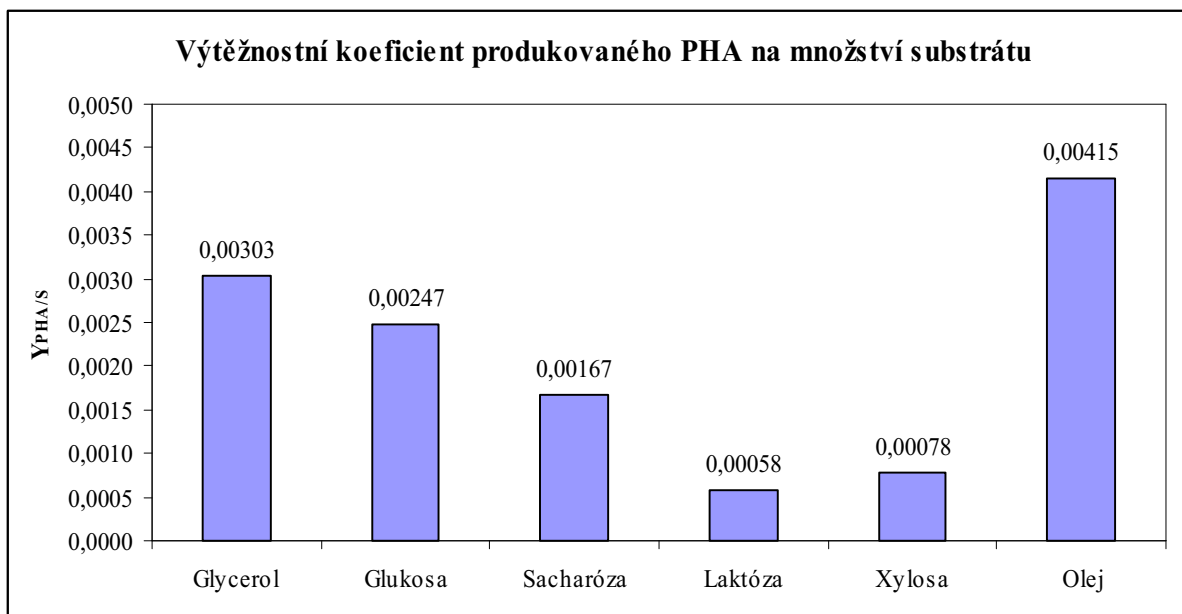
Cílem práce bylo pokusit se najít nejvhodnější substrát pro produkci PHA, a to takový, na kterém je nejvyšší výtěžnostní koeficient vzniklého PHA vztážený na množství použitého substrátu.



Obrázek 14: Množství PHA (%) v biomase po 72 hod kultivace



Obrázek 15: Produkce biomasy kulturou *P.putida* po 72 hod kultivace



**Obrázek 16:** Výtěžnostní koeficient  $Y_{PHA/S}$  pro bakterii *Pseudomonas putida*

**Tabulka 13** Obsah biomasy a PHA po 72. h kultivace

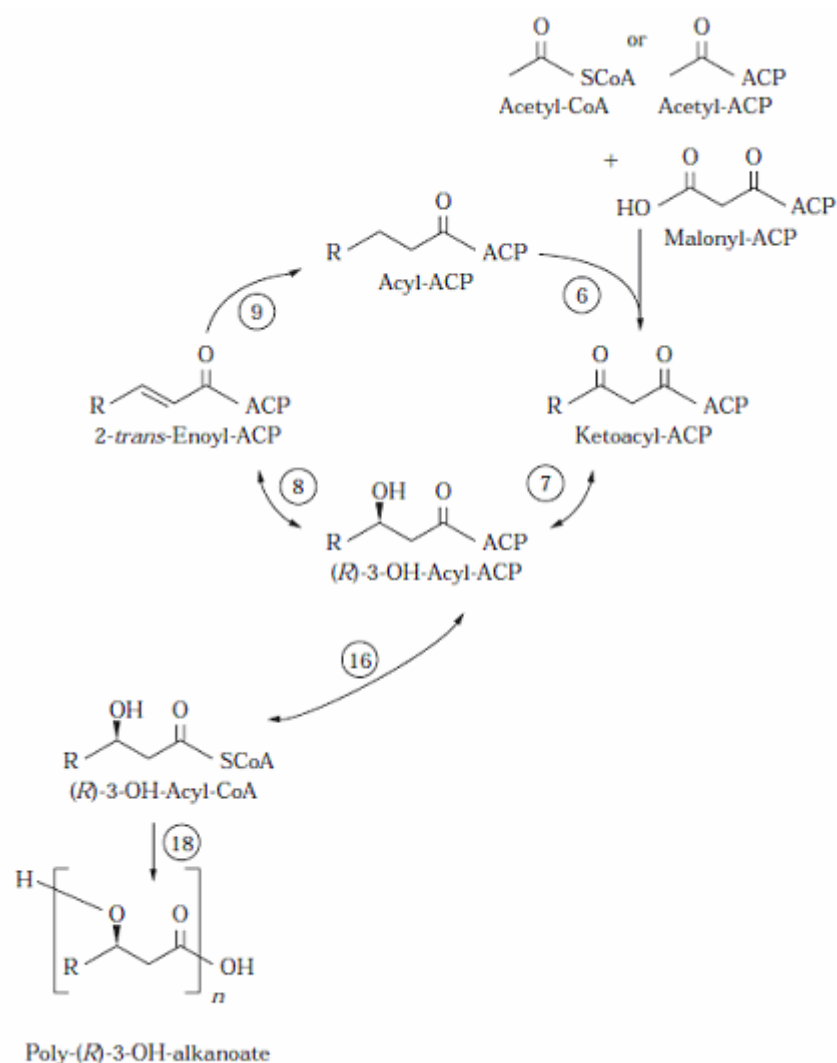
Substrát	Biomasa [g/l]	PHA v biomase [%]	$Y_{PHA/S}$
Glycerol	1,44	2,11	0,00303
Glukosa	1,19	2,07	0,00247
Sacharóza	0,83	2,02	0,00167
Laktóza	0,43	1,37	0,00058
Xylosa	0,44	1,78	0,00078
Olej	3,21	1,29	0,00415

Z naměřených dat vyplývá, že bakterie *Pseudomonas putida*, byla schopna využít všechny sacharidové substráty, glycerol i řepkový olej.

Nejvyšší množství biomasy bylo získáno při kultivaci na řepkovém oleji, a to 3,21 g/l.

Obsah PHA v biomase po 72-hodinové kultivaci byl nejnižší v případě použití řepkového oleje jako substrátu, a to 1,29%, nejvyšší hodnota PHA byla zaznamenána v případě použití glycerolu jako substrátu, kdy obsah PHA činil 2,11%. Rozdíl mezi nejnižším a nejvyšším množstvím akumulovaného PHA nepřesahuje jedno procento. Druh substrátu použitý pro kultivaci měl vliv především na množství narostlé biomasy, vliv substrátu na množství akumulovaného PHA byl minimální.

Výtěžnostní koeficient  $Y_{PHA/S}$ , vyjadřující procentuální množství akumulovaného PHA v biomase na množství použitého substrátu byl nejvyšší u kultivace na řepkovém oleji, a to 0,00415.



Obrázek 17: Biosyntéza PHA pomocí syntézy mastných kyselin de novo [2]

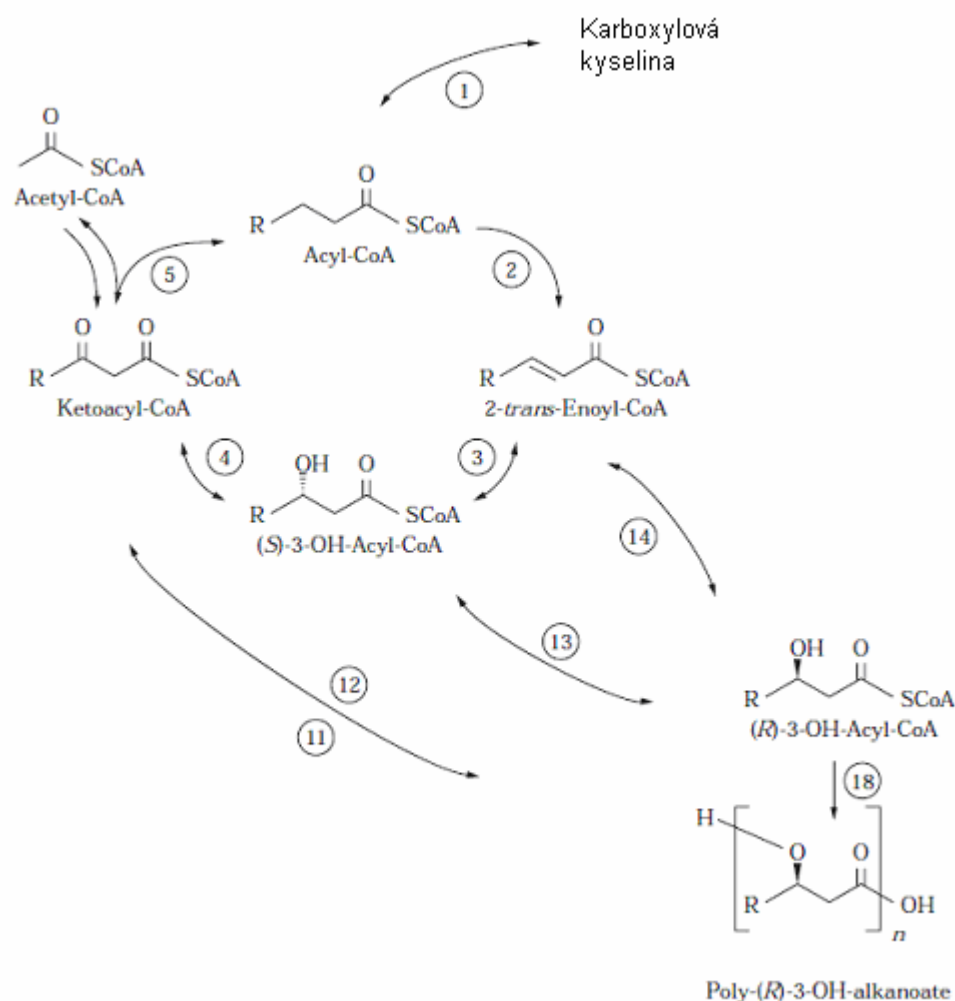
Biosyntéza PHA je anabolický proces, který vyžaduje dodání energie, která vzniká při katabolismu použitého substrátu.

Biosyntetická dráha PHA využívající biosyntézu mastných kyselin de novo byla pravděpodobně hlavní PHA biosyntetickou dráhou při kultivaci na glycerolu a na použitých monosacharidech a disacharidech. Monosacharidy a disacharidy byly pravděpodobně aerobně metabolizovány v glykolýze a pomocí PDH komplexu za vzniku acetyl-CoA. Glycerol jako prekurzor sacharidů, byl pravděpodobně metabolizován také v glykolýze, podobně jako použité sacharidy, kam vstupoval po enzymové přeměně na některý z meziproductů glykolýzy, pravděpodobně glyceraldehyd-3-fosfát nebo dihydroxyaceton-fosfát.

V prvním kroku biosyntézy PHA je acetyl-CoA karboxylován za vzniku malonyl-CoA a dále je vázán malonyl na ACP komplex s navázaným acetyl-CoA. V dalším kroku malonyl-ACP kondenzuje s acetyl-ACP, produktem kondenzace je acetoacetyl-ACP, volný ACP a odštěpený  $\text{CO}_2$ . Acetyl-ACP kondenzuje na začátku biosyntézy, při prodlužování řetězce kondenzuje s malonyl-CoA rostoucí acyl-ACP a vzniká ketoacyl-ACP.

Ketoacyl-ACP je stereoselektivně redukován na příslušný (*R*)-3-OH-acyl-ACP, který může být po přeměně na (*R*)-3-OH-acyl-CoA substrátem PHA syntázy za vzniku PHA, nebo může být dehydratován na 2-trans-enoyl-ACP a následně redukován na acyl-ACP, který se opět

využit ke kondenzaci a malonyl-ACP. Prodlužování řetězce je prováděno tak dlouho, dokud není syntetizována 3-hydroxykarboxylová kyselina o žádaném počtu uhlíků.



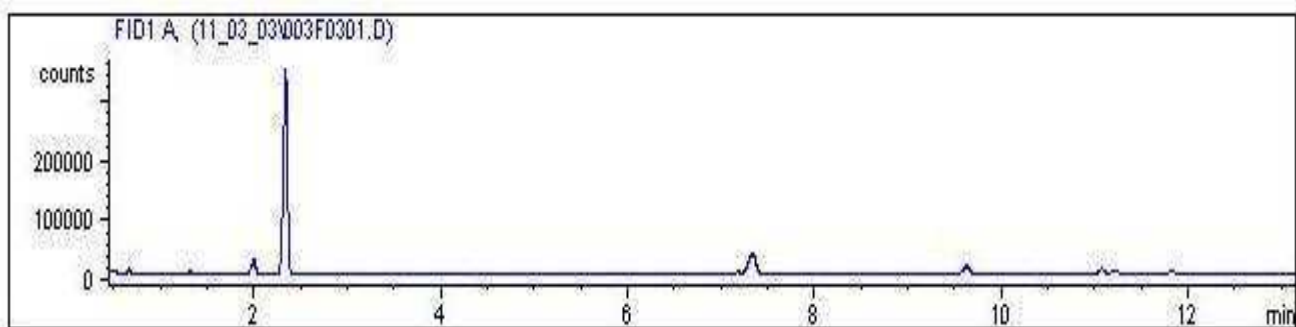
**Obrázek 18: Biosyntéza PHA pomocí  $\beta$ -oxidace a prodloužení řetězce karb. kyseliny [2]**

Při kultivaci na řepkovém oleji jako jediném uhlíkatém substrátu došlo postupně k enzymatické hydrolýze oleje na glycerol a karboxylové kyseliny. Glycerol byl metabolizován výše uvedeným způsobem. Karboxylové kyseliny mohly být využity k biosyntéze PHA dvojím způsobem.

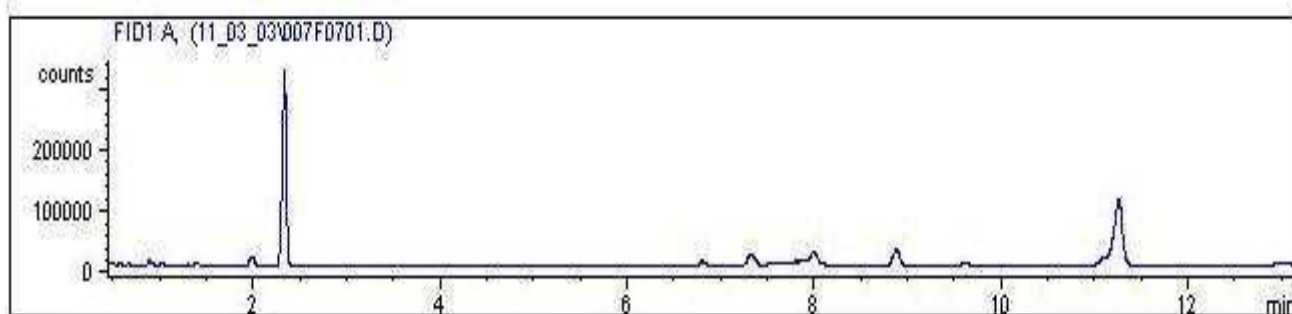
Karboxylová kyselina mohla vstoupit do degradačního  $\beta$ -oxidačního cyklu, kde prošla cyklem jednou nebo vícekrát a zkrátila se tak o  $2n$  atomů uhlíků, kde  $n$  značí počet otáček cyklů. Poté mohla být karboxylová kyselina převedena na (R)-3-OH-acyl-CoA jednou z možných enzymatických reakcí (Obrázek 18). Vzniklý (R)-3-OH-acyl-CoA je substrátem PHA polymerázy za vzniku PHA.

Acyl-CoA může být prodloužen také pomocí acetyl-CoA za vzniku ketoacyl-CoA, který je postupně redukován až na (R)-3-OH-acyl-CoA, který je posléze použit pro polymeraci PHA.

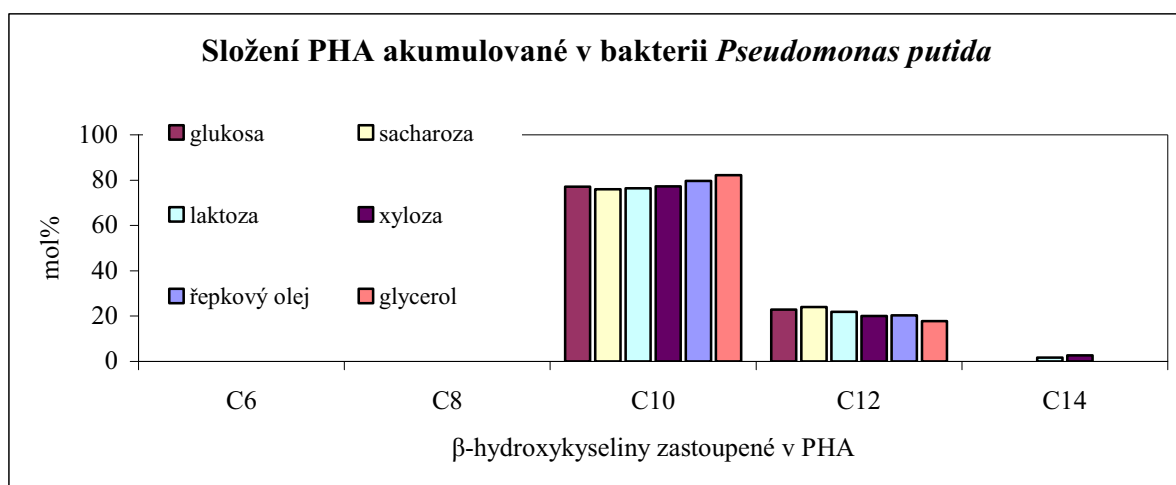
## 6.2.2. Složení PHA *P.putida* akumulovaných na různých substrátech



Obrázek 19: Chromatogram vzorku *P. putida* na glukosovém médiu



Obrázek 20: Chromatogram vzorku *P. putida* na řepkovém oleji



Obrázek 21: Složení PHA akumulované na různých substrátech

Z naměřených dat vyplývá, že při kultivaci na všech použitých substrátech byla dominantní monomerní složkou akumulovaného polyesteru kyselina o počtu uhlíků 10, tedy kyselina 3-hydroxydekanová. Druhou nejvíce zastoupenou složkou byla kyselina 3-hydroxydodekanová. Při kultivaci na laktóze a xylóze byla detekována přítomnost kyseliny 3-hydroxytetradekanové v akumulovaném PHA. Hydroxykyseliny C<sub>8</sub> a C<sub>6</sub> nebyly přítomny, nebo byly přítomny v množství pod detekčním limitem.

Tabulka 14: Koncentrace a obsah PHA v biomase bakterie *Pseudomonas putida*

Substrát	Koncentrace [mg/ml]					PHA [%]
	C <sub>6</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>14</sub>	
Glycerol	n.d.	n.d.	0,205	0,033	n.d.	2,11
Glycerol	n.d.	n.d.	0,196	0,042	n.d.	2,10
Sacharóza	n.d.	n.d.	0,151	0,046	n.d.	1,90
Sacharóza	n.d.	n.d.	0,179	0,044	n.d.	2,14
Laktóza	n.d.	n.d.	0,112	0,028	0,002	1,36
Laktóza	n.d.	n.d.	0,114	0,028	0,002	1,38
Xylosa	n.d.	n.d.	0,133	0,034	0,004	1,71
Xylosa	n.d.	n.d.	0,151	0,029	0,004	1,84
Olej	n.d.	n.d.	0,128	0,024	n.d.	1,45
Olej	n.d.	n.d.	0,094	0,025	n.d.	1,13
Glukóza	n.d.	n.d.	0,174	0,045	n.d.	2,07

Tabulka 15: Složení PHA akumulované v bakterii *Pseudomonas putida*

Substrát	Navážka pro GC [mg]	Biomasa [g/l]	Složení PHA [mol%]				
			C <sub>6</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>14</sub>
Glycerol	11,30	1,44	n.d.	n.d.	84,28	15,72	n.d.
Glycerol	11,30	1,44	n.d.	n.d.	80,24	19,76	n.d.
Sacharóza	10,40	0,83	n.d.	n.d.	73,97	26,03	n.d.
Sacharóza	10,40	0,83	n.d.	n.d.	78,05	21,95	n.d.
Laktóza	10,40	0,43	n.d.	n.d.	76,37	21,86	1,77
Laktóza	10,40	0,43	n.d.	n.d.	76,38	21,87	1,75
Xylosa	10,00	0,44	n.d.	n.d.	74,69	22,26	3,05
Xylosa	10,00	0,44	n.d.	n.d.	79,71	17,86	2,43
Olej	10,50	3,21	n.d.	n.d.	82,26	17,74	n.d.
Olej	10,50	3,21	n.d.	n.d.	76,94	23,06	n.d.
Glukoza	10,60	1,19	n.d.	n.d.	77,07	22,93	n.d.

Při analýze vzorku PHA z kultivace na řepkovém oleji (Obrázek 22) byl detekován velký pík v čase 11 min, poloha píku však neodpovídala žádnému z použitých standardů pro kalibraci stanovení PHA. Řepkový olej obsahuje velké množství nenasycených mastných kyselin. Při jejich odbourávání pomocí  $\beta$ -oxidace vznikají nenasycené 3-hydroxy mastné kyseliny, které mohou být PHA syntázou inkorporovány do struktury mcl PHA. Je tedy možné, že pík v 11. minutě odpovídá právě některé nenasycené 3-hydroxy mastné kyselině, nicméně tuto hypotézu nebylo možné potvrdit, neboť nebyly k dispozici potřebné standardy. V případě, že by se jednalo o monomerní složku PHA, obsah PHA akumulovaných v bakterii *P. putida* by činil 8 %.

### 6.2.3. Stanovení růstové křivky bakterie *P.putida*

Polyhydroxyalkanoáty jsou syntetizovány a akumulovány v bakteriální buňce jako zásobní zdroj uhlíku a energie. Obsah PHA v biomase je tedy závislý na řadě kultivačních podmínek a také na čase. Všechny kultivace bakterie *Pseudomonas putida*, které byly provedeny, byly vsádkové kultivace. V průběhu vsádkové kultivace dochází k poklesu využitelného substrátu a vzrůstu obsahu odpadních produktů metabolismu s růstem kultury, je tedy žádoucí zastavit kultivaci v čase, kdy je obsah PHA maximální a nedochází již k dalšímu nárůstu biomasy.

Tabulka 16: Závislost obsahu biomasy bakterie *P.putida* na čase

ředění	A (630 nm)	A (630 nm)	A (630 nm)	čas [h]	biomasa [g/l]
-	-	-	-	0	0
1	0,240	0,231	0,252	4	0,11
1	0,301	0,294	0,305	9	0,14
1	0,327	0,311	0,339	18	0,16
1	0,585	0,581	0,567	22	0,28
1	0,756	0,750	0,761	31	0,36
1	0,680	0,687	0,671	42	0,32
1	0,761	0,752	0,772	46	0,36
6	0,259	0,263	0,257	55	0,74
10	0,284	0,289	0,281	65	1,36
10	0,520	0,531	0,509	70	2,48
10	0,485	0,492	0,471	76	2,31
10	0,501	0,512	0,488	138	2,39
10	0,487	0,501	0,471	144	2,32

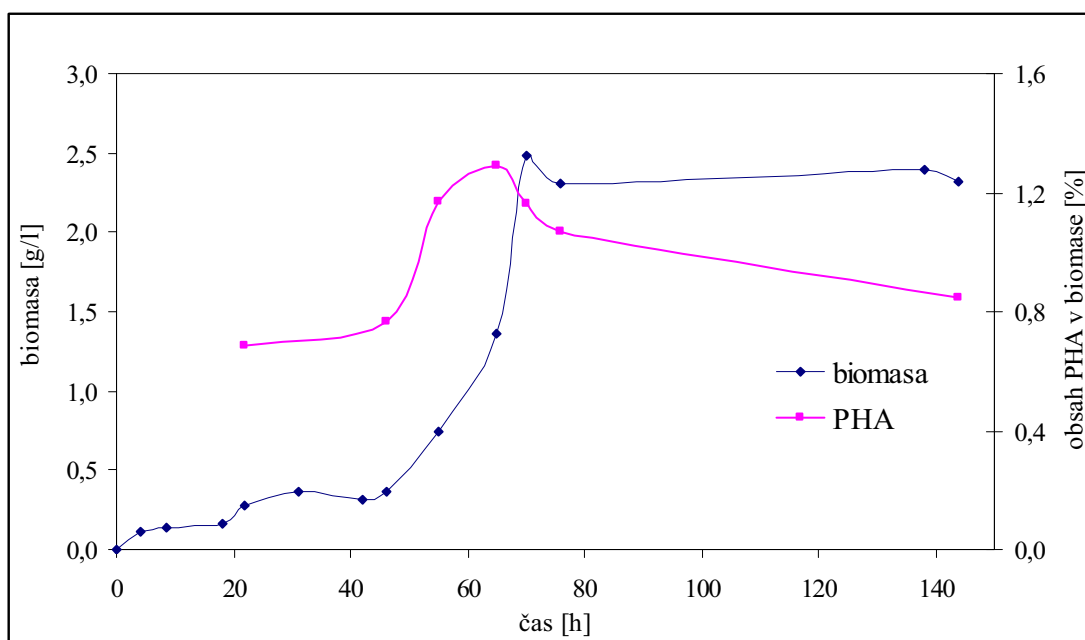
Ke stanovení růstové charakteristiky bakterie *P. putida* byl použit řepkový olej jako jediný uhlíkatý zdroj za výše uvedených kultivačních podmínek (4.3.3). Při kultivaci na řepkovém oleji (5.2.1) bylo dosaženo největšího výtěžnostního koeficientu  $Y_{PHA/S}$ , proto byla růstová charakteristika stanovena právě na řepkovém oleji. Dalším faktorem byla potenciální možnost ekonomicky perspektivního využití odpadních a rostlinných tuků pro mikrobiální produkci polyhydroxyalkanoátů.

Bakterie *P. putida* vykazovala při kultivaci na řepkovém oleji nezvykle dlouhou lag-fázi. Maximální koncentrace biomasy byla pozorována v 70. hodině kultivace, její hodnota byla 2,48 g/l. Obsah PHA v biomase byl nejvyšší v 65. hodině kultivace, hodnota PHA v biomase byla 1,29 %. Po 70. hodině kultivace bakterie *P. putida* přešla do stacionární fáze růstu, obsah biomasy se již nezvyšoval a obsah PHA v biomase klesal, protože akumulované PHA byly pravděpodobně využívány k výživě bakterie.

Tabulka 17: Závislost obsahu PHA v biomase bakterie *P.putida* na čase

čas kultivace [h]	22	46	55	65	70	76	144
obsah PHA [%]	0,68	0,77	1,17	1,29	1,16	1,07	0,84





Obrázek 22: Růstová křivka bakterie *P. putida*

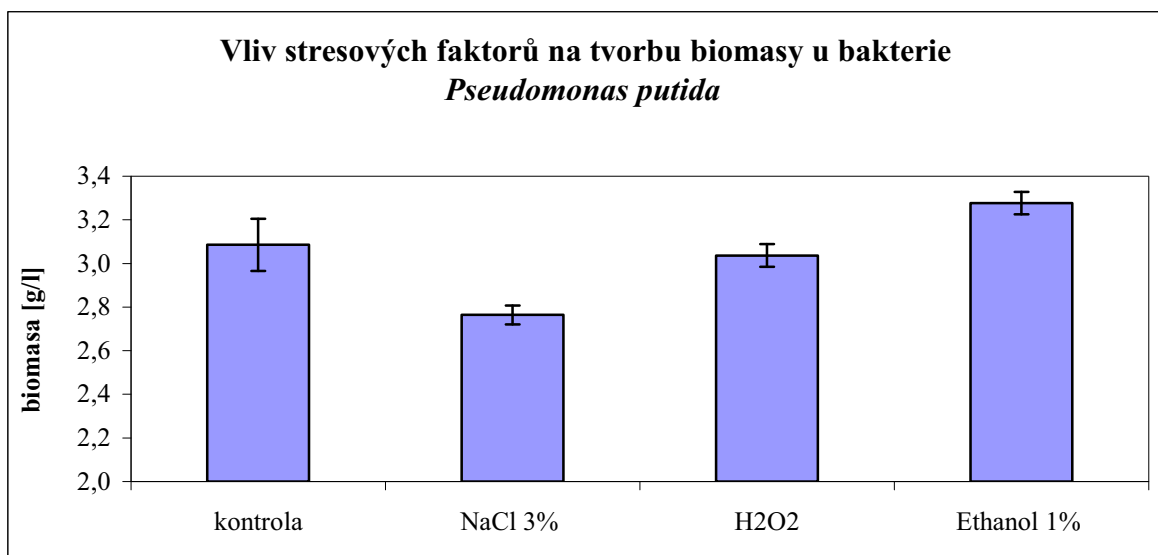
#### 6.2.4. Vliv stresových faktorů na tvorbu biomasy a akumulaci PHA u bakterie *Pseudomonas putida*

*Pseudomonas putida* se řadí do skupiny mikroorganismů, které syntetizují a akumulují PHA v průběhu buněčného růstu. Přítomnost dalších látek v médiu ve vhodné koncentraci může způsobit zvýšení nebo útlum některých metabolických drah či nárůstu biomasy. Při volbě vhodného stresového faktoru o vhodné koncentraci může dojít ke zvýšení biosyntézy a akumulace PHA v biomase nebo ke zvýšení tvorby biomasy.

Při tomto experimentu byla bakterie *P. putida* vystavena exogenním stresovým faktorům - ethanolu, peroxidu vodíku a chloridu sodného za výše uvedených experimentálních podmínek (4.3.5).

Tabulka 18: Vliv stresových faktorů na tvorbu biomasy bakterie *P. putida*

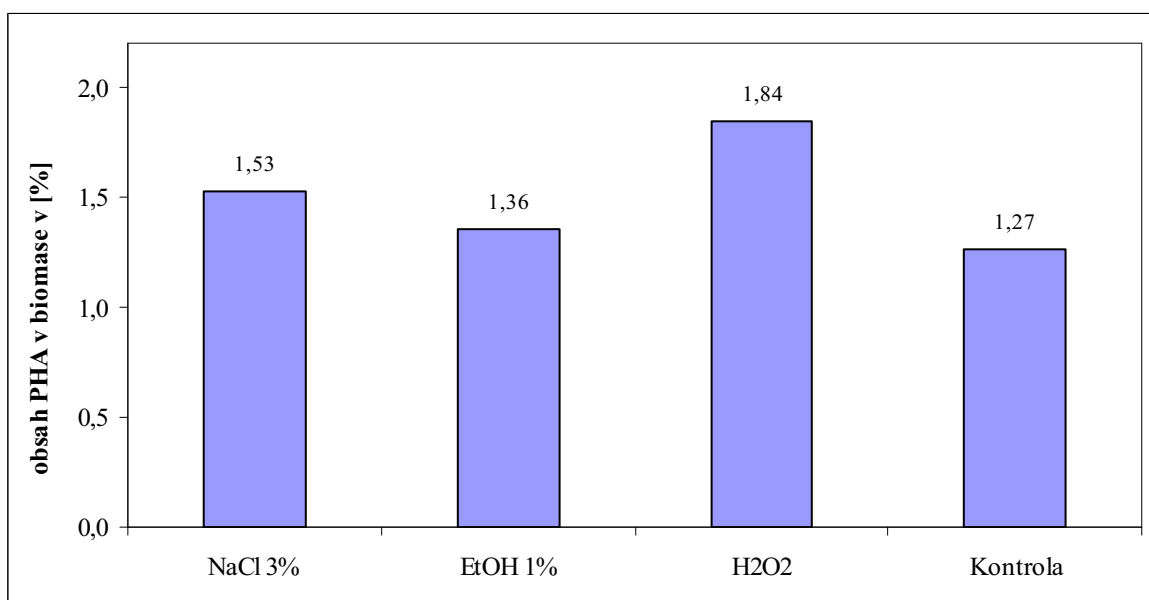
vzorek	ředění	A(630 nm)	A(630 nm)	A(630 nm)	X [g/l]
kontrola	10	0,608	0,667	0,660	3,07
kontrola	10	0,643	0,636	0,670	3,10
					<b>3,09±0,12</b>
3% NaCl	10	0,567	0,583	0,573	2,74
3% NaCl	10	0,578	0,597	0,581	2,79
					<b>2,76±0,04</b>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	0,655	0,646	0,679	3,15
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	0,609	0,618	0,615	2,93
					<b>3,04±0,05</b>
1% EtOH	10	0,683	0,682	0,700	3,28
1% EtOH	10	0,677	0,699	0,683	3,27
					<b>3,28±0,05</b>



Obrázek 23: Vliv stresových faktorů na tvorbu biomasy *P.putida*

Tabulka 19: Obsah PHA v biomase *P.putida* a výtěžnostní koeficient

Stresový faktor	PHA [%]	$Y_{PHA/S}$	Biomasa [g/l]
NaCl 3%	1,53	0,00422	2,76
EtOH 1%	1,36	0,00445	3,28
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,84	0,00560	3,04
Kontrola	1,27	0,00450	3,09



Obrázek 24: Obsah PHA v biomase bakterie *P. putida* po 72 hod kultivace

Tvorba biomasy u bakterie *Pseudomonas putida* byla největší při kultivaci na řepkovém oleji (5.2.1.), z tohoto důvodu byl tento substrát vybrán i pro studium vlivu stresových faktorů.

Obsah biomasy při kontrolní kultivaci byl  $3,09 \pm 0,12$  g/l. Nejvyšší hodnoty biomasy bylo dosaženo při použití ethanolu ve výsledné koncentraci 1%. Množství biomasy v tomto případě bylo  $3,28 \pm 0,05$  g/l. Při použití NaCl jako stresového faktoru došlo k mírnému poklesu tvorby biomasy, obsah biomasy byl  $2,76 \pm 0,04$  g/l. Při použití peroxidu vodíku ve výsledné koncentraci  $0,5 \text{ mmol/dm}^3$  byl obsah biomasy  $3,04 \pm 0,05$  g/l.

Obsah PHA v biomase byl při kontrolní kultivaci 1,27 %, při použití všech exogenní stresových faktorů došlo k mírnému zvýšení obsahu PHA v biomase. Nejvyšší množství PHA bylo při použití peroxidu vodíku jako stresového faktoru, hodnota PHA činila 1,84%, při použití ethanolu 1,36% a v případě chloridu sodného 1,53%.

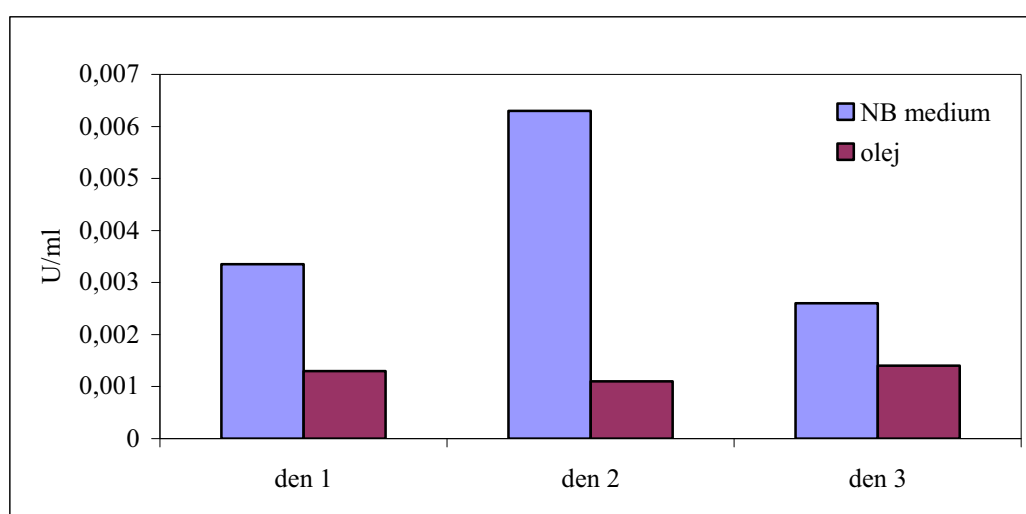
### 6.2.5. Stanovení proteázové aktivity

Byla provedena kultivace bakterie *Pseudomonas putida* na řepkovém oleji a na Nutrient Broth mediu pro srovnání produkce extracelulárních proteolytických enzymů.

Proteázová aktivita extracelulárních enzymů přítomných v médiu při kultivaci na NB médiu jakožto komplexním proteinovém substrátu vzrůstala v průběhu kultivace a byla maximální v druhém dni. Proteázová aktivita extracelulárních enzymů při kultivaci na řepkovém oleji byla konstantní v průběhu celé kultivace.

Tabulka 20: Stanovení enzymové aktivity v závislosti na čase

substrát	den 1		den 2		den 3	
	A(440 nm)	mU	A(440 nm)	mU	A(440 nm)	mU
Nutrient Broth	0,102	3,4	0,199	6,6	0,075	2,5
Nutrient Broth	0,098	3,3	0,180	6,0	0,080	2,7
	<b>0,100</b>	<b>3,35</b>	<b>0,190</b>	<b>6,3</b>	<b>0,078</b>	<b>2,6</b>
řepkový olej	0,033	1,1	0,028	9,3	0,042	1,4
řepkový olej	0,044	1,5	0,039	1,3	0,043	1,4
	<b>0,039</b>	<b>1,3</b>	<b>0,033</b>	<b>1,1</b>	<b>0,043</b>	<b>1,4</b>



Obrázek 25: Enzymová aktivita extracelulárních proteáz

Z naměřených dat je patrné, že aktivita proteolytických enzymů bakterie *P. putida* je závislá na složení média. Vyšší proteolytická aktivita byla naměřena na NB médium, protože zde docházelo k hydrolýze proteinů v médiu, které bakterii využila jako zdroj uhlíku a energie. Bakterie *Pseudomonas putida* tvořila extracelulární proteolytické enzymy i na médiu neobsahující žádný bílkovinný substrát.

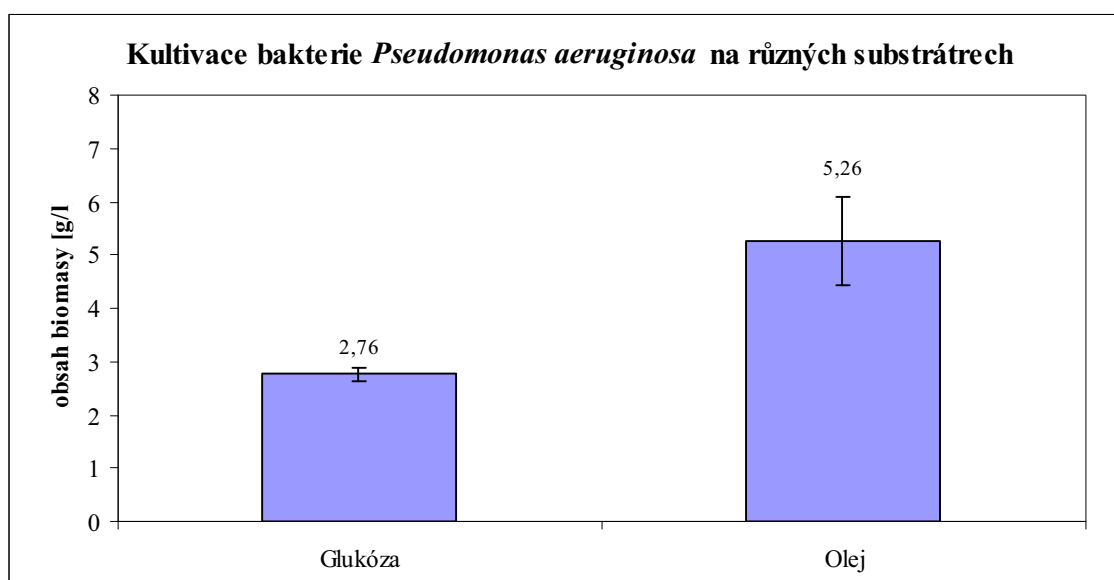
### 6.3. Kultivace bakterie *Pseudomonas aeruginosa*

#### 6.3.1. Kultivace na různých substrátech

Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* byla kultivována na různých substrátech za výše uvedených experimentálních podmínek (4.6.3.) pro zhodnocení její schopnosti využívat různé uhlíkaté zdroje pro svou výživu a akumulaci PHA.

Tabulka 21: Obsah biomasy a PHA u bakterie *Pseudomonas aeruginosa* po 72. hodinové kultivaci

Substrát	Biomasa [g/l]	PHA v biomase [%]	$Y_{PHA/S}$
Glukoza	2,76±0,13	1,57	0,00433
Olej	5,26±0,82	0,83	0,00437

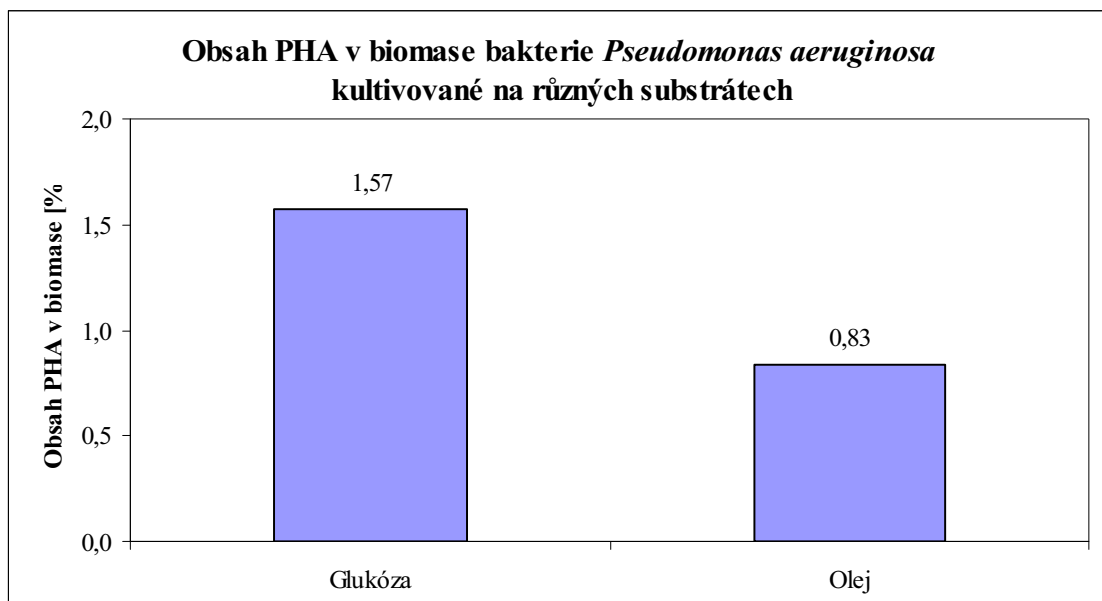


Obrázek 26: Obsah biomasy po 72 hod kultivace

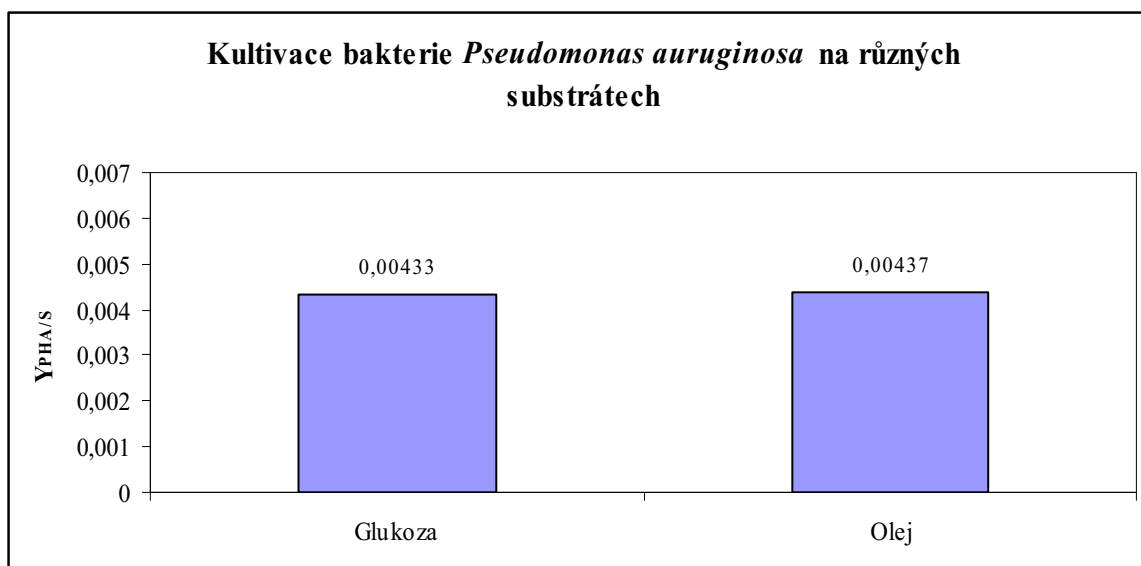
Cílem práce bylo pokusit se najít nejvhodnější substrát pro produkci PHA, to je takový, na kterém je nejvyšší výtěžnostní koeficient vzniklého PHA vztažený na množství použitého substrátu.

Z naměřených dat vyplývá, že bakterie *Pseudomonas aeruginosa* byla schopna využít glukosu i řepkový olej jako substrát. Nejvyšší hodnota biomasy byla získána při kultivaci na řepkovém oleji, a to 5,26 g/l.

Obsah PHA v biomase po 72. hodinové kultivaci byl 0,83 % při akumulaci na glukosovém substrátu a 1,57 % při kultivaci na řepkovém oleji. Výtěžnostní koeficient  $Y_{PHA/S}$ , vyjadřující množství akumulovaného PHA v biomase na množství použitého substrátu byl u kultivace na řepkovém oleji 0,00437 a 0,00433 při kultivaci na glukosovém substrátu.



Obrázek 27: Obsah PHA v bakterii *P. aeruginosa* po 72 hod kultivace

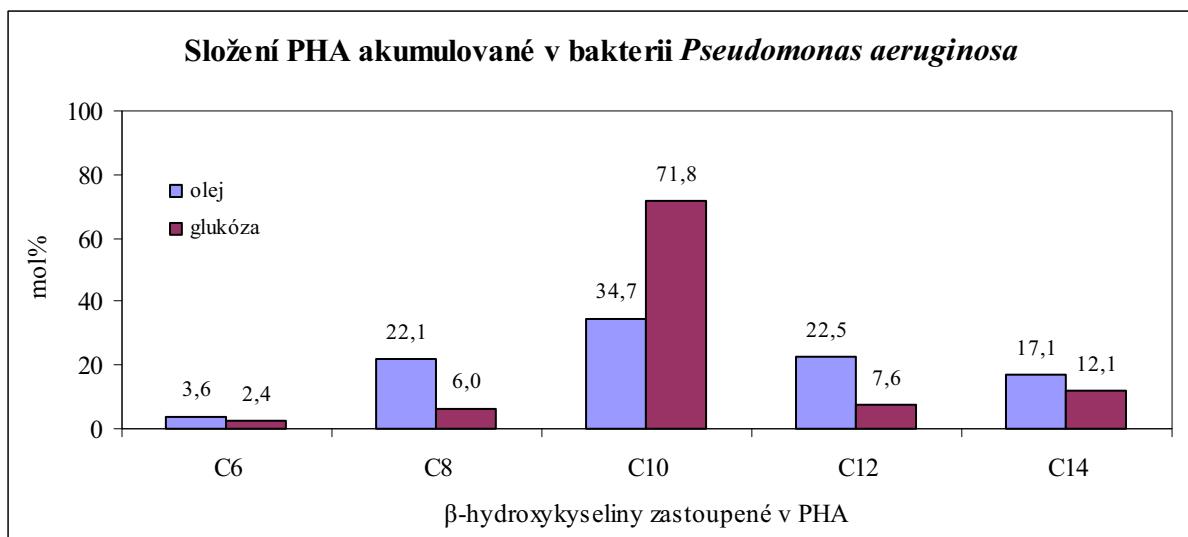


Obrázek 28: Výtěžností koeficient  $Y_{PHA/S}$  bakterie *P. aeruginosa*

### 6.3.2. Složení PHA akumulovaných na různých substrátech

Tabulka 22: Koncentrace a obsah PHA v biomase bakterie *Pseudomonas aeruginosa*

Substrát	Koncentrace [mg/ml]					PHA [%]
	C <sub>6</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>14</sub>	
Olej	0,0076	0,0238	0,0312	0,0183	0,0119	0,90
Olej	0,0020	0,0234	0,0318	0,0172	0,0120	0,77
Glukosa	0,0024	0,0061	0,0641	0,0038	0,0074	1,64
Glukosa	0,0038	0,0065	0,0638	0,0082	0,0094	1,50



Obrázek 29: Složení PHA *P.aeruginosa* akumulovaných na různých substrátech

Tabulka 23: Složení PHA akumulované v bakterii *Pseudomonas aeruginosa*

Substrát	Navážka pro GC [mg]	Biomasa [g/l]	Složení PHA [mol%]				
			C <sub>6</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>14</sub>
Olej	10,30	5,26	5,69	21,68	33,50	22,56	16,58
Olej	11,30	5,26	1,59	22,48	35,94	22,35	17,64
Glukosa	5,10	2,76	1,98	6,16	75,48	5,14	11,25
Glukosa	6,10	2,76	2,88	5,87	68,14	10,11	13,00

Při analýze PHA akumulovaných na obou substrátech byla detekována přítomnost všech hydroxyalkanových kyselin celé homologické řady od C<sub>6</sub> až C<sub>14</sub>. Nejvíce zastoupenou hydroxyalkanovou kyselinou byla v obou případech kyselina 3-hydroxydekanová. V případě kultivace na glukose byl obsah 3-hydroxydekanové kyseliny 71,8 mol% a v případě kultivace na řepkovém oleji 34,7 mol%.

Zastoupení jednotlivých monomerů PHA v biomase klesalo od C<sub>10</sub> do C<sub>6</sub> a od C<sub>10</sub> do C<sub>14</sub>. Z poklesu molárního zastoupení PHA v biomase lze usuzovat, že PHA polymeráza v bakterii *Pseudomonas aeruginosa* má největší substrátovou specifitu pro 3-hydroxydekanovou kyselinu, z toho důvodu je její obsah v PHA největší.

#### 6.4. Porovnání bakteriálních kmenů *P. putida* a *P. aeruginosa*

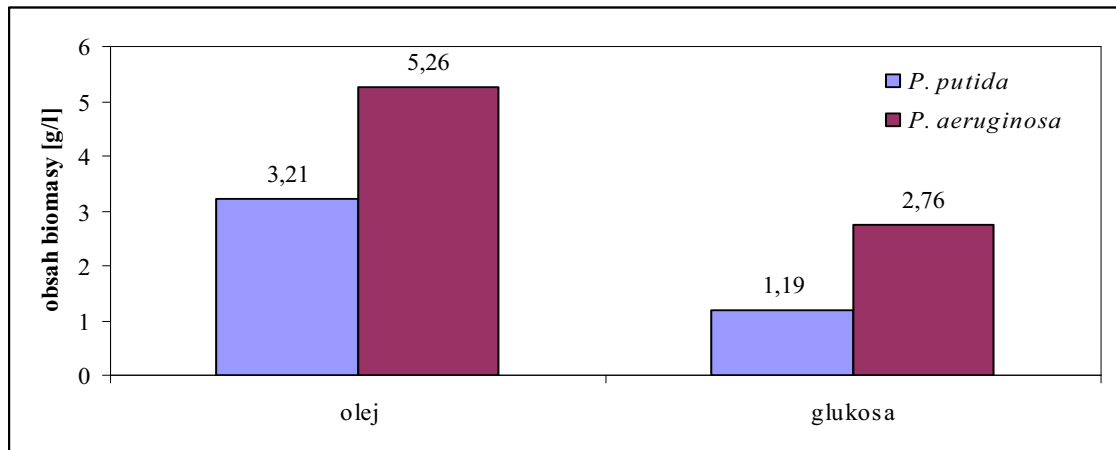
Na základě provedených experimentů (4.3.3. a 4.6.3.) bylo provedeno porovnání produkčních schopností bakterií *Pseudomonas putida* a *Pseudomonas aeruginosa* pro produkci mcl-PHA.

U bakterie *P. aeruginosa* bylo dosaženo většího nárůstu biomasy po 72 -hodinové kultivaci na glukose i na řepkovém oleji. Obsah biomasy bakterie *P. aeruginosa* na řepkovém oleji byl 5,26 g/l, obsah na glukosovém mediu byl 2,76 g/l. Obsah biomasy u bakterie *P. putida* činil 3,21 g/l při kultivaci na řepkovém oleji a 1,19 g/l při kultivaci na glukose.

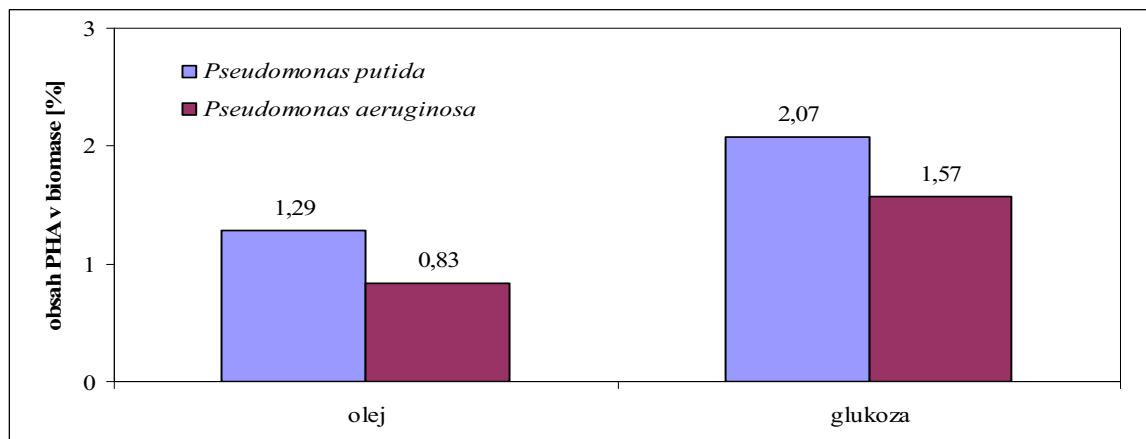
Množství PHA akumulovaného v bakteriích bylo vyšší u bakterie *P. putida*, a to při kultivaci na obou substrátech. Množství PHA v bakterii *P.putida* při kultivaci na řepkovém oleji bylo 1,29 % a 2,07 % při kultivaci na glukose. Bakterie *P. aeruginosa* akumulovala 0,83 % PHA při růstu na řepkové oleji a 1,57 % při kultivaci na glukose.

Výtěžnostní koeficient  $Y_{PHA/S}$  při kultivaci na řepkovém oleji je u obou druhů porovnatelný, u bakterie *P.putida* 0,00415 a u bakterie *P. aeruginosa* 0,00437. Při kultivaci na glukose byl výtěžnostní koeficient u *P. putida* 0,00247 a u *P. aeruginosa* 0,00433.

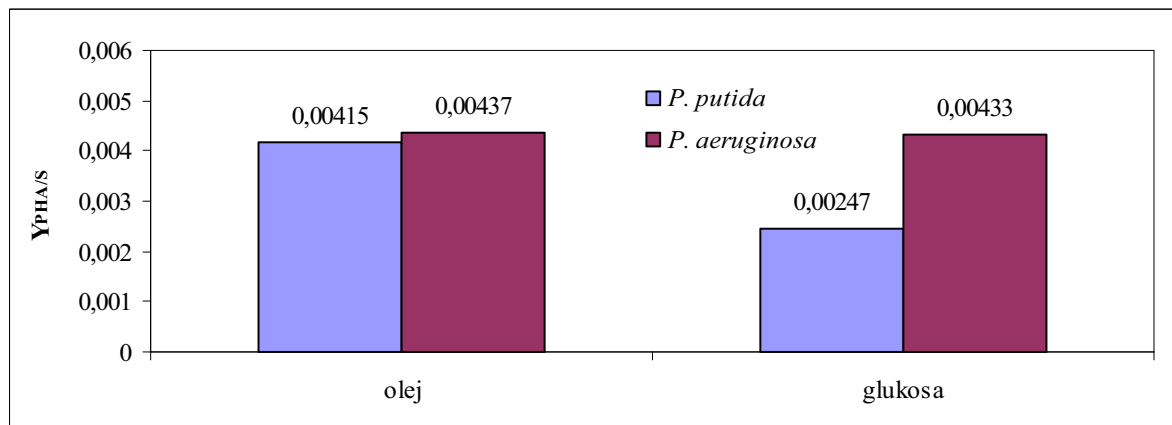
Pro většinu kultivací byla použita bakterie *Pseudomonas putida*, a to z důvodu větší produkce PHA a větší bezpečnosti při práci s tímto bakteriálním druhem.



Obrázek 30: Porovnání produkce biomasy u kultur *P. putida*. a *P. aeruginosa* po 72 hodinách kultivace



Obrázek 31: Porovnání množství PHA v biomase u *P. putida*. a *P. aeruginosa* po 72-hodinové kultivaci



Obrázek 32: Porovnání výtěžnostních koeficientů produkovaného PHA v závislosti na množství substrátu

## 7. ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo ověřit bakteriální kmeny *P. putida* CCM 1977 a *P. aeruginosa* CCM 3955 jako potenciální producenty PHA. Dle dostupných informací, nebyla produkce PHA pomocí těchto konkrétních kmenů doposud studována.

Z hlediska ekonomiky provozu lze za vhodný substrát pro mikrobiální produkci PHA považovat řadu odpadních substrátů, jako je např. melasa či odpadní tuk, případně nepotravinářské obilniny či olejiny. Použitím sekundárních nebo odpadních surovin lze snížit výrobní náklady na produkci PHA.

Bakterie *Pseudomonas putida* byla schopna využívat všechny použité uhlíkaté substráty, pro růst a akumulaci PHA. Z růstové charakteristiky bakterie *P. putida* kultivované na řepkovém oleji vyplývá nejvhodnější čas pro ukončení kultivace, a to 68-72 hodin. V této době je bakterie na konci exponenciální fáze růstu, obsah PHA je nejvyšší a maximální hodnoty dosahuje i narostlá biomasa. Obsah PHA na konci exponenciální fáze růstu činil 1,29 %. Při kultivaci bakterie *P. putida* na řepkovém oleji bylo produkováno 1,29 % PHA po 72 hodinách kultivace a obsah biomasy byl 3,21 g/l. Aplikací peroxidu vodíku jako stresového faktoru ve výsledné koncentraci 1% ke kultuře bakterie *P. putida* rostoucí na řepkovém oleji došlo ke zvýšení obsahu PHA na 1,84 %. Nejvyšší obsah PHA byl dosažen při kultivaci na glycerolu ( 2,11 %). Substrát použitý pro kultivaci bakterie *Pseudomonas putida* měl minimální vliv na složení akumulovaného PHA. Při použití sacharidů, glycerolu i řepkového oleje jako substrátu byla dominantní monomerní složkou akumulovaných PHA kyselina 3-hydroxydekanová.

Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* byla schopna využívat glukosu i řepkový olej jako substrát pro růst a akumulaci PHA. Dominantní monomerní složkou PHA akumulovaných v bakterii *P. aeruginosa* byla stejně jako u bakterie *P. putida* kyselina 3-hydroxydekanová. Kyselina 3-hydroxydekanová byla nejvíce zastoupená v PHA jak při kultivaci na glukose, tak při kultivaci na řepkovém oleji. Z naměřených dat o složení PHA lze usuzovat, že PHA polymeráza u bakterie *P. aeruginosa*, má největší substrátovou specifitu pro kyselinu 3-hydroxydekanovou.

Z porovnání výsledků kultivace bakterií *P. putida* a *P. aeruginosa* na glukose a na řepkovém oleji je patrné, že výtěžnostní koeficienty  $Y_{PHA/S}$  u obou bakterií na řepkovém oleji nejsou příliš odlišné, *P. putida*  $Y_{PHA/S}=0,00415$  a *P. aeruginosa*  $Y_{PHA/S}=0,00437$  a při kultivaci na glukose *P. putida*  $Y_{PHA/S}=0,00247$ , a *P. aeruginosa*  $Y_{PHA/S}=0,00433$ .

Bakterie *Pseudomonas putida* CCM 1977 ani *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 se pravděpodobně nehodí pro produkci mcl-PHA na výše uvedených substrátech, a to zejména z důvodu nízkého výtěžnostního koeficientu  $Y_{PHA/S}$ , který u žádného ze substrátů nepřekračuje hodnotu 0,6%, ani při aplikaci exogenních stresových faktorů.



## 8. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1]. Hori, K., Soga, K., Doi, Y.: Effects of culture conditions on molecular weights of poly(3-hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas putida* from octanoate. *Biotechnology letters*. 1994, no. 7, s. 709-714.
- [2]. Michael, F., Stephen, D.: *Encyclopedia of bioprocess technology - fermentation, biocatalysis, and bioseparation, volumes 1-5* [online]. : John Wiley & Sons, 1999 [cit. 2011-04-06]. Dostupné z WWW: <[http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?\\_EXT\\_KNOVEL\\_DISPLAY\\_bookid=678&VerticalID=0](http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=678&VerticalID=0)>.
- [3]. Koller, M., et al.: Biotechnological polymer synthesis: a review, *Food Technol. Biotechnol.* 48 (3) 255–269 (2010)
- [4]. Šilhánková, L.: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologie*. Praha : Victoria Publishing, 1995. 361 s. ISBN 80-85605-71-6.
- [5]. Grace, K., et al.: Bacterial polyhydroxyalkanoate granules: biogenesis, structure, and potential use as nano-/micro-beads in biotechnological and biomedical applications. *Biomacromolecules*. 2009, č. 10, s. 660–669.
- [6]. Sudesh, K. et al.: Surface structure, morphology and stability of polyhydroxyalkanoate inclusions characterised by atomic force microscopy. *Polymer Degradation and Stability*. 2002, č. 77, s. 9.
- [7]. Wang, H., et al.: Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate homopolymers by *Pseudomonas putida*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, s. 11.
- [8]. Queiroz, S., et al.: PHA mcl biosynthesis systems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* strains show differences on monomer specificities. *Journal of Biotechnology*. 2009, č.143, s. 111-118.
- [9]. Hoffmann, N., Rehm, B.: Regulation of polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology letters*. 2004, 237, s. 7.
- [10]. Sedláček, I.: *Taxonomie prokaryot*. Brno : TYPO ART PRES, Brno, 2006. 270 s. ISBN 80-210-4207-9.
- [11]. Görner, F., Valík, L.: *Aplikovaná mikrobiológia potravín*. Bratislava : MALÉ CENTRUM, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- [12]. *Visuals unlimited* [online]. c2010 [cit. 2011-03-31]. *Pseudomonas putida*. Dostupné z WWW: <[http://visualsunlimited.photoshelter.com/search?I\\_DSC=pseudomonas+putida&I\\_DSC\\_AND=t&\\_ACT=search](http://visualsunlimited.photoshelter.com/search?I_DSC=pseudomonas+putida&I_DSC_AND=t&_ACT=search)>.
- [13]. Fernandez, D., et al.: Agro-industrial oily wastes as substrates for PHA production by the new strain *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 40045: Effect of culture conditions. *Biochemical Engineering Journal*. 2005, 26, s. 159–167.
- [14]. Anzai, Y.: Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2000, č. 50, s. 1563–1589.

- [15]. Hiroshi, K., Takeshi O., Taisuke M., TakuzaA I.: 2008. Effective biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrat) with high 4-hydroxybutyrate fractions by *Wausteria eutropha* in presence of  $\alpha$ -amino acids. *Polymer International* 57:149-157
- [16]. Morita. Y., Hasan, Q., Sakaguchi, T., Murakami, Y., Yokoyama, K.: Properties if cold-active protease from psychrotrophic *Flavobacterium balustinum* P104. *Applied Microbiology and Biotechnology* (1998), 50:669-675