



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

PRODUKCE PHA POMOCÍ EXTREMOFILNÍCH BAKTERIÍ

PRODUCTION OF PHA BY SELECTED EXTREMOPHILIC BACTERIA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Patrícia Šarköziová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1544/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Patrícia Šarköziová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Produkce PHA pomocí extremofilních bakterií

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše na zadané téma
2. PCR identifikace phaC genu u termofilních bakterií *Chelatococcus composti* a *Chelatococcus sambhunathii*
3. Posouzení biotechnologického potenciálu PHA producentů

Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2020:

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

Patrícia Šarköziová
student(ka)

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Bakalárska práca sa zaoberala produkciou polyhydroxyalkanoátov (PHA) pomocou termofilných bakteriálnych kmeňov *Chelatococcus composti* a *Chelatococcus sambhunathii*. U oboch bakteriálnych kmeňov boli zisťované najvhodnejšie podmienky, pri ktorých dochádza k tvorbe PHA granúl vo vnútri bunky. U *Chelatococcus composti* a *Chelatococcus sambhunathii* bol na začiatku experimentu pomocou PCR detekovaný *phaC* gén, ktorý kóduje PHA syntázu, enzým nevyhnutný pre produkciu PHA. Následne bol skúmaný najvhodnejší zdroj uhlíka, optimálna teplota na produkciu polyhydroxyalkanoátov a vplyv vybraných prekurzorov na nárast biomasy a tvorbu kopolymérov. Posledná časť experimentálnej práce bola zameraná na skúmanie využitia vybraných modelových hydrolyzátov lignocelulóзовých materiálov. U oboch baktérii *Chelatococcus composti* a *Chelatococcus sambhunathii* slúžila ako najvhodnejší uhlíkový zdroj glukóza a optimálna teplota pre rast a produkciu P(3HB) u oboch bakteriálnych kmeňov dosiahla 45°C. Vplyv vybraných prekurzorov na nárast biomasy pôsobil v oboch prípadoch inhibične. Napriek tomu baktérie *Chelatococcus composti* a *Chelatococcus sambhunathii* dokázali vyprodukovať kopolymér P(3HB-co-3HV) po pridaní prekurzorov propionátu sodného a kyseliny valerovej. U oboch bakteriálnych kmeňov boli najlepšie využité modelové hydrolyzáty, ktoré vo svojom zložení obsahovali najvyšší podiel glukózy. Navyše boli bakteriálne bunky obsahujúce PHA granule pozorované pomocou fluorescenčnej a transmisnej elektrónovej mikroskopie.

Abstract

This bachelor's thesis deals with production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by thermophilic bacterial strains of *Chelatococcus composti* and *Chelatococcus sambhunathii*. We were finding out the best conditions for production of PHA granules inside the cells. In the beginning of the experiment we employed PCR to detect the *phaC* gene, encoding for PHA synthase, which is requisite for production of PHA. We also analyse the best source of carbon, optimal temperature for production of polyhydroxyalkanoates and influence of chosen precursors to grow of biomass and production of copolymers. The last part of this experimental thesis deals with research utilization of selected model hydrolysates. Glucose was the best source of carbon for both bacteria *Chelatococcus composti* and *Chelatococcus sambhunathii* and optimal temperature for grow and production of P(3HB) was 45°C. The applied precursors inhibited cell grow, but both bacterial strains *Chelatococcus composti* and *Chelatococcus sambhunathii* could produce copolymer P(3HB-co-3HV) after addition of precursors sodium propionate and valeric acid. For both bacterial strains was the most useful model hydrolysates, which contains the biggest part of glucose. Moreover, bacterial cells containing PHA granules were observed by fluorescence and transmission electron microscopy.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Polyhydroxyalkanoáty, termofilné baktérie, *Chelatococcus composti*, *Chelatococcus sambhunathii*, Polyhydroxybutyrát, Kopolymér 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu

KEYWORDS

Polyhydroxyalkanoates, thermophilic bacteria, *Chelatococcus composti*, *Chelatococcus sambhunathii*, Polyhydroxybutyrate, Copolymer 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate

ŠARKÖZIOVÁ, Patrícia. *Produkce PHA pomocí extremofilních bakterií*. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123994>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

PREHLÁSENIE

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

.....
Podpis študenta

POĎAKOVANIE

Na tomto mieste by som sa rada poďakovala môjmu vedúcemu bakalárskej práce doc. Ing. Stanislavovi Obručovi, Ph.D. za jeho odborné rady, trpezlivosť a ústretovosť. Ďalej by som sa chcela poďakovať mojej konzultantke Ing. Ive Pernicovej za jej trpezlivosť, cenné rady pri úprave bakalárskej práce a taktiež za pomoc v laboratóriu. Taktiež by som sa rada poďakovala Ing. Xénii Kouřilovej za pomoc v laboratóriu.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická časť	8
2.1	Polyhydroxyalkanoáty	8
2.1.1	Charakteristika, štruktúra a vlastnosti polyhydroxyalkanoátov	8
2.1.2	Biosyntéza PHA	9
2.1.3	Biosyntetické cesty	10
2.1.4	Využitie PHA	13
2.2	Extrémofilné baktérie	13
2.2.1	Rozdelenie	13
2.2.2	Termofilné baktérie	15
2.2.3	Vybraný PHA producenti z rodu <i>Chelatococcus</i>	18
3	Experimentálna časť	20
3.1	Použité mikroorganizmy, chemikálie a prístroje	20
	Použité chemikálie:	20
	Použité prístroje:	21
3.2	Kultivácia baktérií <i>Chelatococcus composti</i> a <i>Chelatococcus sambhunathii</i>	21
3.2.1	Príprava inokula	21
3.2.2	Produkčné médium.....	21
3.3	Použité metódy	22
3.3.1	Izolácia DNA oboch bakteriálnych kmeňov	22
3.3.2	Spektrofotometrické stanovenie čistoty a koncentrácie vyizolovanej DNA.....	22
3.3.3	Polymerázová reťazová reakcia (PCR)	23
3.3.4	Vyhodnotenie PCR produktov pomocou agarózovej gélovej elektroforézy.....	24
3.3.5	Stanovenie optimálneho zdroja uhlíka	25
3.3.6	Produkcia polyhydroxyalkanoátov za použitia prekursorov	25
3.3.7	Spektrofotometrické stanovenie obsahu biomasy	25
3.3.8	Gravimetrické stanovenie obsahu biomasy	25
3.3.9	Stanovenie množstva polyhydroxyalkanoátov v biomase prostredníctvom plynovej chromatografie	26
3.3.10	Produkcia polyhydroxyalkanoátov za použitia odpadných hydrolyzátov.....	26
3.3.11	Príprava bakteriálnej kultúry na fluorescenčnú mikroskopiu	27
4	Výsledky a diskusia	29
4.1	Stanovenie <i>phaC</i> génu a bakteriálneho génu <i>16S rRNA</i> pomocou molekulárnej metódy 29	
4.2	<i>Chelatococcus composti</i> DSM 101465.....	30
4.2.1	Stanovenie optimálneho zdroja uhlíka	30
4.2.2	Výber najvhodnejšieho uhlíkového substrátu pre produkciu PHA.....	31
4.2.3	Stanovenie optimálnej teploty pre produkciu PHA.....	32
4.2.4	Produkcia PHA za využitia prekursorov	33
4.2.5	Produkcia PHA za využitia modelových hydrolyzátov	34
4.2.6	Mikroskopické pozorovanie PHA u baktérie <i>Chelatococcus composti</i>	36

4.3	<i>Chelatococcus sambhunathii</i> DSM 18167	36
4.3.1	Stanovenie optimálneho zdroja uhlíka	36
4.3.2	Výber najvhodnejšieho uhlíkového substrátu pre produkciu PHA	37
4.3.3	Stanovenie optimálnej teploty pre produkciu PHA.....	38
4.3.4	Produkcia PHA za využitia prekurzorov.....	39
4.3.5	Produkcia PHA za využitia modelových hydrolyzátov	40
4.3.6	Mikroskopické pozorovanie PHA u baktérie <i>Chelatococcus sambhunathii</i>	42
5	Záver.....	43
6	Použitá literatúra	44
7	Zoznam použitých skratiek	50

1 ÚVOD

V dnešnej dobe hrajú plasty veľmi dôležitú úlohu v našom každodennom živote. Každoročne je na svete vyprodukovaných 140 miliónov ton týchto syntetických polymérov. Vďaka nízkym nákladom na výrobu, trvanlivosti, dobrým mechanickým a tepelným vlastnostiam našli uplatnenie v mnohých odvetviach ako sú napríklad medicína, stavebníctvo, taktiež sa využívajú ako obalové materiály a sú z nich vyrábané produkty pre domácnosť. Napriek výhodným vlastnostiam a širokému uplatneniu spôsobuje používanie plastov dva hlavné celosvetové problémy. Kvôli ich stabilite sa hromadia v životnom prostredí niekoľko desaťročí a tým spôsobujú environmentálne a zdravotné problémy. Druhý problém predstavuje pokles fosílnych surovín a preto je potrebný rozvoj alternatívnych zdrojov. Aby sa predišlo problémom, ktoré sú spôsobené používaním plastov, je potrebné vyvinúť biologicky rozložiteľné polyméry, ktoré majú podobné vlastnosti ako bežné plasty [1].

Medzi najznámejšie alternatívne náhrady polymérov na báze ropy patria polyhydroxyalkanoáty, ktoré boli objavené v roku 1926 francúzskym vedcom Lemoigne. Tieto biopolyméry patria medzi polyestery hydroxyalkánových kyselín a sú produkované mnohými gram-negatívnymi a gram-pozitívnymi mikroorganizmami vo forme granúl, ktoré slúžia na ukladanie nadbytočného uhlíka. Veľkou výhodou je ich biokompatibilita a biodegradácia. Napriek výhodnejším vlastnostiam oproti bežným plastom, hlavnú nevýhodu pri produkcii PHA predstavujú vysoké výrobné náklady pri fermentácii. Medzi hlavné faktory, ktoré výrazne ovplyvňujú náklady na produkciu týchto bioplastov patria zdroje uhlíka, prevádzkové náklady na fermentáciu, produktivita výrobného procesu a nadväzujúce spracovanie produktov. Jednou z možností ako znížiť náklady pri výrobe PHA je použitie odpadných substrátov ako zdroj uhlíka [2],[3].

Zníženie ekonomických nákladov pri výrobe PHA sa dá dosiahnuť použitím termofilných mikroorganizmov. Kultivačné procesy termofilov sú považované za energeticky účinnejšie, pretože sa tu spotrebuje menej energie pri chladení. Proces fermentácie taktiež nevyžaduje sterilné podmienky, pretože kultivácia týchto mikroorganizmov prebieha pri vyšších teplotách, a tým sa minimalizuje riziko kontaminácie inými mikroorganizmami [4].

Práve kvôli týmto výhodným vlastnostiam sa bakalárska práca zaoberá produkciou polyhydroxyalkanoátov pomocou dvoch termofilných baktérií, ktoré patria do bakteriálneho rodu *Chelatococcus*.

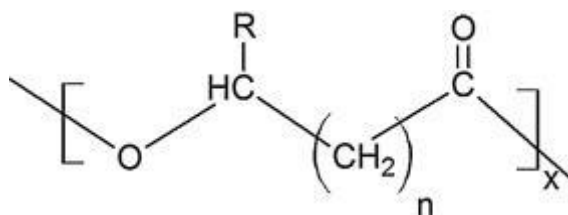
2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Polyhydroxyalkanoáty

2.1.1 Charakteristika, štruktúra a vlastnosti polyhydroxyalkanoátov

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) zahŕňajú jednu z reprezentatívnych skupín biopolymérov, ktoré môžu byť prirodzene syntetizované rôznymi mikroorganizmami prostredníctvom tvorby polyhydroxyesterov z hydroxyalkánových kyselín s krátkym alebo stredne dlhým reťazcom. Hlavnou fyziologickou úlohou prírodných PHA je ukladanie uhlíka a energie v granulových formách vo vnútri bunkovej štruktúry, keď je uhlík prítomný v nadbytku. V prípade potreby môže byť tento nahromadený uhlík katabolizovaný, ak sú ďalšie nevyhnutné živiny pre rast mikrobiálnej bunky obmedzené [3],[5].

PHA sú prírodné termoplastické polyester kyseliny 3-, 4-, 5-, 6-hydroxyalkánovej a patria do skupiny opticky aktívnych biologických polyesterov, ktoré obsahujú hydroxyalkánové monomérmne jednotky v konfigurácii R kvôli stereotypnej špecifčnosti biosyntetických enzýmov (obrázok 1). V závislosti od počtu atómov uhlíka v monomérmnej jednotke sú PHA klasifikované do troch tried: PHA s krátkym reťazcom (SCL-PHA; C3 až C5), PHA so stredne dlhým reťazcom (MCL-PHA; C6 až C14) a PHA s dlhým reťazcom (LCL-PHA; viac ako C14). Ďalšia klasifikácia rozdeľuje PHA na homopolyméry a heteropolyméry. Homopolyméry obsahujú iba jeden typ monomérmnej jednotky, zatiaľ čo heteropolyméry sú zložené z viacerých typov monomérmnych jednotiek. PHA majú bočný reťazec tvorený napríklad aromatickým kruhom, esterovou skupinou, alylovou skupinou, kyano skupinou, epoxidom a ďalšími rôznymi skupinami [2],[3],[6],[7].



Obrázok 1 Všeobecný vzorec PHA ($n = 1 - 4$, $x = 100 - 300\,000$, R -alkylová skupina) [8]

PHA existujú v bakteriálnych bunkách ako diskkrétne inklúzie nerozpustné vo vode, ktoré majú v priemere 0,2-0,5 μm a sú lokalizované v bunkovej cytoplazme. Povrch granúl je tvorený proteínovou vrstvou a na nej sa nachádza PHA polymeráza, PHA depolymeráza a phasíny. Napríklad PhaF a PhaI hrajú stavebnú úlohu pri vzniku granúl. PhaF kontroluje tvar a veľkosť. PHA granule môžu byť vizualizované pomocou fázového kontrastného svetelného mikroskopu kvôli ich vysokej refraktivite alebo použitím farbív ako je Sudan Black B alebo oxazínové farbivo Nile Blue A [8],[9],[10].

Polyhydroxyalkanoáty v posledných rokoch priťahujú veľkú pozornosť, pretože majú podobné vlastnosti ako petrochemické polyméry polypropylén a polystyrén [8].

Vlastnosti homopolymérov so stredne dlhým reťazcom sa výrazne líšia od vlastností homopolymérov s krátkym reťazcom (tabuľka 1). Tieto vlastnosti závisia od bakteriálneho producenta a od fermentačných podmienok používaných na ich produkciu [8].

PHA s krátkym reťazcom sú vysoko kryštalické (55-80%) a majú vysoké teploty topenia a nízke teploty skleného prechodu. Vysoká kryštalinita spôsobuje, že sú relatívne tuhé a krehké. Kopolymér P(3HB-co-3HV) s krátkym reťazcom má oveľa nižšiu teplotu topenia a menšiu kryštalinitu spôsobuje ich ľahšie formovanie a sú tvrdšie. PHA so stredne dlhým reťazcom

zastupujú elastoméry s veľmi úzkym teplotným rozsahom topenia. Ich teplota skleného prechodu býva obvykle nižšia ako je izbová teplota a pohybuje sa v rozsahu od -43°C do -25°C a ich kryštalinita je okolo 25%. Vďaka tomu sú PHA so stredne dlhým reťazcom flexibilnejšie a elastickejšie ako PHA s krátkym reťazcom [8].

Tabuľka 1 Porovnanie vlastností homopolymérov s krátkym a stredne dlhým reťazcom a ich kopolymérov s polypropylénom [8]

	Homopolymér scl-PHAs	Homopolymér mcl-PHAs	Kopolymér P(3HB-co- 3HV)	Kopolymér P(3HB-co- 6%3HD)	Polypropylén
Teplota topenia [°C]	179	80	137-170	130	176
Teplota skleného prechodu [°C]	4	-40	10 až -6	-8	-10
Youngov modul [GPa]	3,5	-	0,7-2,9	-	1,7
Predĺženie [%]	40	300	30-38	680	38
Pevnosť v ťahu [Mpa]	5	20	až do 690	17	400

2.1.2 Biosyntéza PHA

PHA patrí do skupiny biologicky odbúrateľných polymérov produkovaných rôznymi gram-negatívnymi a gram-pozitívnymi baktériami. Tieto baktérie môžu akumulovať bio-polyméry vo svojej cytoplazme ako intracelulárnu rezervu uhlíka a energie. Baktérie, ktoré sa používajú na produkciu PHA môžeme rozdeliť do dvoch skupín na základe stresových podmienok požadovaných na syntézu PHA. Prvá skupina baktérií vyžaduje obmedzenie esenciálnych živín ako je dusík, fosfor, horčík alebo síra a prebytočných zdrojov uhlíka. Do tejto skupiny patria napríklad baktérie *Cupriavidus necator*, *Protomonas extorquens* a *Protomonas oleovorans*. Druhá skupina baktérií nevyžaduje obmedzenie živín pre syntézu PHA. Sem patria baktérie *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii* a rekombinantná *E. coli* [7].

2.1.2.1 Biosyntetická dráha

Prirodzené bio-syntetické dráhy PHA zahŕňajú viacnásobné kroky začínajúce na hydroxyalkánových kyselinách. PHA syntáza katalyzuje polymerizáciu tioesterov koenzýmu A (CoA) do polymérov PHA, čo vedie k uvoľňovaniu skupiny CoA. PHA syntázy

sú rozdelené do štyroch tried podľa ich primárnej štruktúry, zloženia podjednotiek a substrátovej špecifickosti pre monoméry s rôznymi dĺžkami reťazca [5].

Syntázy triedy I

Syntázy triedy I sa skladajú z jedinej podjednotky PhaC s molekulovou hmotnosťou v rozsahu od 60 do 70 kDa. Syntázy triedy I prednostne využívajú monoméry s krátkym reťazcom, ktoré majú hydroxylovú skupinu v polohe C3 alebo C4. Preto sú PHA s krátkym reťazcom tuhé, krehké a majú vyšší stupeň kryštalinity. PHA syntázy triedy I dosahujú vyššiu rýchlosť pri uvoľňovaní CoA v porovnaní so syntázou triedy III. PHA syntáza triedy I bola prvý raz študovaná na *Cupriavidus necator* [5].

Syntázy triedy II

PHA syntáza triedy II je taktiež zložená z jednej podjednotky PhaC₁ alebo PhaC₂. PHA triedy II polymerizuje hlavne CoA tioestery stredne dlhých monomérov pozostávajúcich zo 6 až 12 atómov uhlíka, ktoré sú získané prostredníctvom β -oxidácie alebo biosyntézy mastných kyselín. Vďaka tomu majú PHA so stredne dlhým reťazcom nižšiu pevnosť v ťahu, nižšie teploty topenia a sú flexibilné. Pri analýze PhaC₁ a PhaC₂ z *Pseudomonas mendocina* bolo zistené, že PhaC₁ vykazuje vyššiu katalytickú rýchlosť a produkuje PHA s nižšou molekulovou hmotnosťou ako PhaC₂. Niektoré PHA syntázy triedy II majú širokú substrátovú špecifitu a preto môžu katalyzovať biosyntézu kopolymérov PHA obsahujúcich monoméry s krátkym a stredne dlhým reťazcom [5].

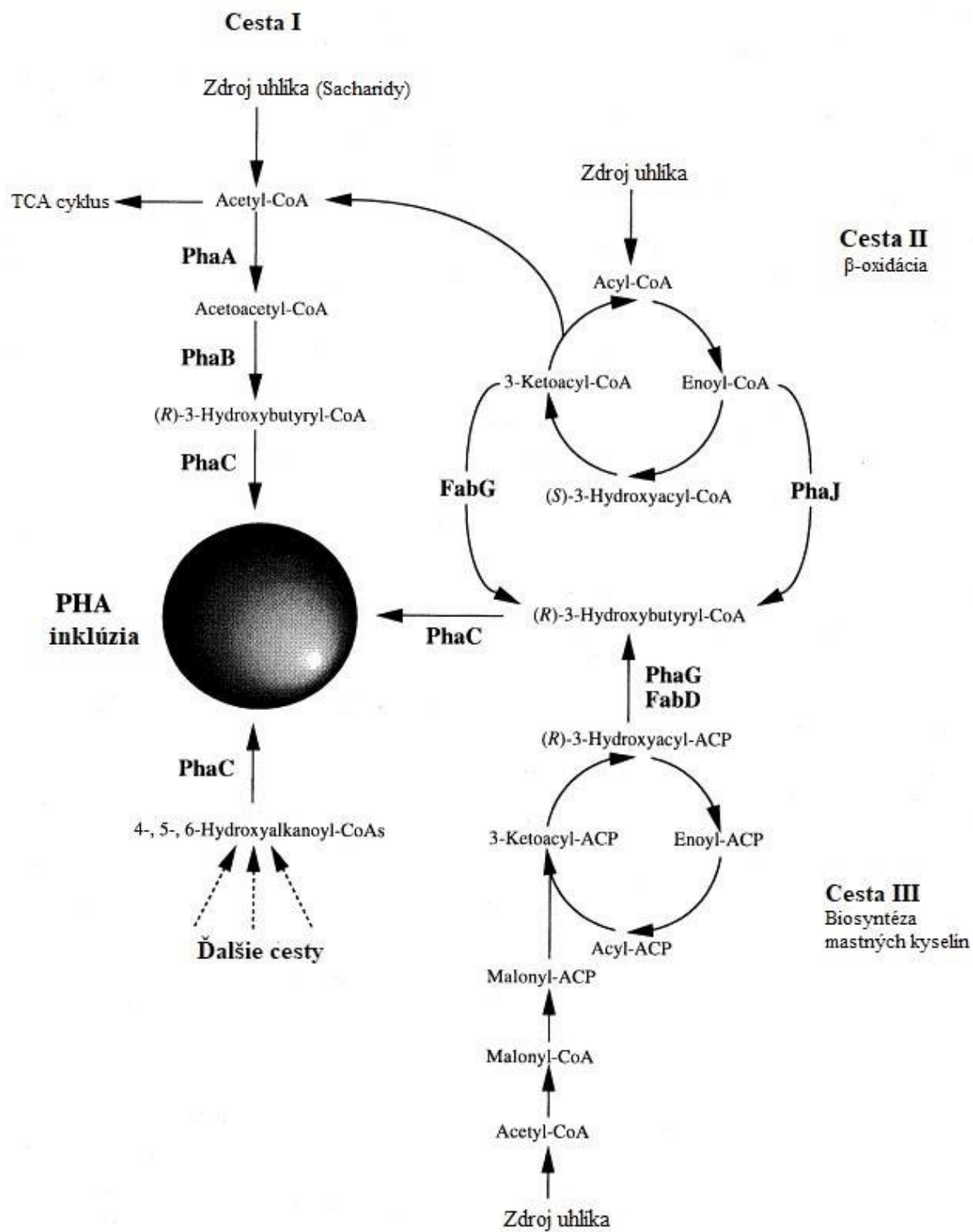
Syntázy triedy III a IV

PHA syntáza triedy III, ktorá pochádza z baktérie *Allochromatium vinosum* je zložená z dvoch podjednotiek PhaC a PhaE. Táto bakteriálna syntáza bola široko využívaná pri *in vivo* a *in vitro* produkcii PHA s krátkym reťazcom. PHA syntázu triedy III používa na syntézu PHA s krátkym reťazcom kmeň *Haloarchea*. PHA syntáza triedy IV obsahuje dve podjednotky PhaC a PhaR. Prvá známa syntáza triedy IV bola objavená v *Bacillus megaterium*. PHA syntáza triedy IV má v porovnaní s inými PHA syntázami jedinečné vlastnosti, tj. PhaR podjednotka je schopná štiepiť reťazec polyméru a na jeho karboxylový koniec inkorporovať alkohol. Hlavným účelom tejto reakcie je pravdepodobne regulovať molekulovú hmotnosť vyrobeného PHA [5].

2.1.3 Biosyntetické cesty

Všeobecná biosyntetická cesta polyhydroxybutyrátu (PHB) zahŕňa tri rôzne enzýmy, ktoré katalyzujú tri rôzne reakcie (obrázok 2). Tieto tri enzýmy sú kódované rôznymi génmi. V prvom kroku reakcie sú dve molekuly acetyl-koenzýmu A kondenzované na acetoacetyl-koenzým A. Túto reakciu katalyzuje enzým β -ketotioláza, ktorá je kódovaná génom *phbA* a katalyzuje tvorbu väzby uhlík-uhlík. V druhom kroku reakcie je acetoacetyl-koenzým A redukovaný na (R)-3-hydroxybutyryl koenzým A enzýmom acetoacetyl-koenzým A reduktázou, ktorá je závislá na NADPH. Acetoacetyl-koenzým A reduktázu kóduje *phbB* gén. V treťom kroku reakcie PHB syntáza kódovaná génom *phbC*, katalyzuje polymerizáciu (R)-3-hydroxybutyryl koenzýmu A na PHB [1],[7].

Kľúčovou molekulou, ktorá poskytuje substrát 3-hydroxyalkanoyl-CoA pre syntézu PHA je acetyl CoA. Substrát 3-hydroxyalkanoyl-CoA môže byť získaný taktiež z β -oxidácie mastných kyselín. Medziprodukt trans 2-enoyl-CoA konvertuje na (R)- hydroxyacyl-CoA pomocou špecifickej enoyl-CoA hydratázy. Monoméry pre PHA syntézu môžu byť vytvorené z jednoduchých a lacných zdrojov ako sú glukóza, fruktóza a sacharóza. Medziprodukt (R)-3-hydroxyacyl z biosyntézy mastných kyselín je konvertovaný z formy acylového nosičového proteínu na formu CoA enzýmom acyl-ACP-CoA transacylázou [1],[7].



Obrázok 2 Biosyntéza PHA [11]

2.1.4 Využitie PHA

Vďaka svojej biologickej kompatibilite a biologickej degradácii sa polyhydroxyalkanoáty vo veľkej miere používajú v rôznych oblastiach. Podobne ako plasty sa používajú vo výrobe jednorazových predmetov ako sú žiletky, ženské hygienické produkty, kozmetické fľaše na šampón. Vzhľadom na ich vlastnosti sa v posledných rokoch uplatňujú v medicínskych aplikáciách a v tkanivovom inžinierstve na výrobu kardiovaskulárnych produktov (srdcové chlopne, vaskulárne štepy), pri liečbe rán (stehy). Taktiež sú používané ako osteosyntetické materiály na stimuláciu rastu kostí vďaka svojim piezoelektrickým vlastnostiam. Uplatnenie taktiež nachádzajú vo farmaceutickom priemysle vo forme nanočastíc, ktoré môžu byť použité na riadené uvoľňovanie liečiva. PHA sa považujú za zdroj syntézy chirálnych zlúčenín a používajú sa ako surovina pri výrobe farieb [3],[8],[12].

2.2 Extrémofilné baktérie

Väčšina organizmov sa vyvinula za relatívne benígnych klimatických podmienok a normálne nie sú schopné prežiť v extrémnych prostrediach (teplota, pH, prítomnosť xenobiotík). Na Zemi však existujú oblasti, kde životné podmienky presahujú normálne limity pre vývin organizmov a teda ich môžeme považovať za extrémne. Organizmy, ktoré sa dokážu vyrovnávať s extrémnymi podmienkami (extrémne teploty, pH, tlak, slanosť) označujeme ako extrémofily (tabuľka 2). Tieto organizmy majú ďalšie vlastnosti ako je schopnosť vyrovnávať sa s veľmi vysokou úrovňou plynov ako je CO₂ alebo rastú v prítomnosti vysokej koncentrácie kovov [1].

Tabuľka 2 Porovnanie mikrobiálnych vlastností vybraných mikroorganizmov [14]

Rastové podmienky	Príklady	Typické mikroorganizmy
Nízka alebo vysoká teplota	$T < 25^{\circ}\text{C}$; $T > 45^{\circ}\text{C}$	Psychrofilly a Termofilly
Nízke alebo vysoké pH	$\text{pH} < 5$; $\text{pH} > 8,5$	Acidofilly a Alkalofilly
Vysoký osmotický tlak	$\text{NaCl} > 30 \text{ g/l}$	Halofilly
Využitie nezvyčajných substrátov	Celulóza, chitín, metán, metanol, CO ₂	Xerofilly a Metanotrofné baktérie

2.2.1 Rozdelenie

2.2.1.1 Alkalofilné a acidofilné baktérie

Alkalofilné baktérie patria do skupiny extrémofilov, ktoré prosperujú v prostredí s pH 8 a vyšším ako sú napríklad jazerá a pôdy bohaté na uhličitany. Alkalofilné druhy *Bacillus* a ich extracelulárne enzýmy sú intenzívne študované a aplikované v priemysle pri výrobe čistiacich prostriedkov, pri výrobe papiera a buničiny, pretože sú stabilné, nepatogénne a majú vysokú produkciu extracelulárnych enzýmov [13],[14].

Acidofilné baktérie naopak preferujú kyslé podmienky na rast s optimálnym pH 3 a nižším. Niektoré extracelulárne enzýmy z acidofilov lepšie fungujú pri omnoho nižšom pH ako je cytoplazmatické pH. Môžu produkovať enzýmy ako sú amyláza, proteáza, ligáza,

α -glukozidáza, esteráza stabilné pri nízkom pH. Enzýmy z acidofilov sa používajú hlavne pri degradácii biopolymérneho substrátu ako je škrob, proteíny a celulóza. Rast pri nízkom pH na biopolymérnych substrátoch zvyšuje možnosť zabrániť mikrobiálnej kontaminácii. Acidofily sa uplatňujú aj pri spracovaní nerastných surovín [13],[14].

2.2.1.2 Halofilné baktérie

Halofilné baktérie obývajú rôzne ekosystémy, ktoré majú vyššiu koncentráciu soli ako morská voda. Tento typ baktérií preto môžeme nájsť v pôdach s vyšším obsahom solí, soľných jazerách a prameňoch, močiaroch a morských sedimentoch. Podľa optimálnej koncentrácie NaCl v prostredí sa delia do troch skupín: mierne halofilné (1-3%), stredne halofilné (3-15%) a extrémne halofilné baktérie (15-30%). Miera optimálnej koncentrácie soli závisí od teploty, pH a rastového média. Všeobecnými vlastnosťami halofilných mikroorganizmov sú nízke nutričné požiadavky, odolnosť voči vysokým koncentráciám solí a schopnosť vyrovnat' osmotický tlak prostredia. Ich mechanizmus adaptácie na prostredie so zvýšeným obsahom soli spočíva v intracelulárnom skladovaní KCl alebo v akumulácii kompatibilných vo vode rozpustných organických zlúčenín, aby udržali vyvážené sodíka v cytoplazme [15],[16].

Halotolerantné mikroorganizmy dokážu rásť pri zníženej aj pri zvýšenej koncentrácii solí v prostredí [17].

Halofilné mikroorganizmy sú uznávanými producentmi karotenoidových pigmentov, hydrolytických enzýmov a biopolymérov. Halofilné baktérie a haloarchea hrajú dôležitú úlohu v mnohých priemyselných aplikáciách, napríklad v potravinárstve, kozmetike, pri výrobe umelých sietnic a biosenzorov [15].

Väčšina halofilných baktérií patrí do čeľade *Halomonadaceae*. V poslednom čase sa halofilné baktérie používajú na vývoj fermentačných procesov založených na morskej vode k výrobe polyhydroxyalkanoátov. Napríklad *Halomonas bluephagenesis* a *Halomonas campaniensis* sú schopné rásť v morskej vode za nesterilných kontinuálnych podmienok bez kontaminácie niekoľko týždňov až mesiacov [14],[15],[16].

2.2.1.3 Xerofilné a metanotrofné baktérie

Xerofilné baktérie boli skúmané v suchých oblastiach, ktoré sú spojené s relatívne vysokými teplotami a žiarením. Do tohto druhu patria baktérie z rodu *Streptomyces*, *Saccharothrix*, *Cellulomonas*, *Amycolatopsis*, *Nocardia*, *Actinomadura*, *Lechevalieria* a *Geodermatophilus*. Z týchto baktérií pochádzajú molekuly s ochranným účinkom proti sušeniu, ktoré majú využitie v priemysle a poľnohospodárstve [14].

Xerofilné baktérie by tiež mohli poskytnúť možnosť biologického spracovania bez kontaminácie. Termostabilné enzýmy pochádzajúce z týchto baktérií môžu nájsť potencionálne využitie na účely enzymatického štiepenia pri vyšších teplotách [14].

Výrazné množstvo metánu je odstránené pomocou metanotrofných baktérií. Niektoré metanotrofné baktérie boli objavené pri odstraňovaní metánu a biodegradácii toxických zlúčenín pochádzajúcich zo skládok a uhoľných baní [14].

2.2.2 Termofilné baktérie

2.2.2.1 Charakteristika a rozdelenie

Teplota je jednou z najdôležitejších premenných životného prostredia. Triedenie živých organizmov na základe ich vzťahu k teplote sa vždy považovala za jeden z najzákladnejších prvkov biologického systému. Mikroorganizmy boli v tomto ohľade rozdelené do troch hlavných skupín na psychrofilny, mezofily a termofily (tabuľka 3) [18].

Optimálna teplota pre rast termofilných baktérií je okolo 45°C a u extrémnych termofilov sa táto teplota pohybuje v okolí 70°C až 80°C. Extrémne termofilné baktérie sa vyskytujú na obmedzenom a extrémne horúcom zemskom alebo podmorskom nálezisku, ktoré sa zvyčajne spája s geotermálnou a sopečnou aktivitou ako sú napríklad gejzíry, horúce pramene, ropné nádrže. U psychrofilných baktérií sa teplota rastu pohybuje v okolí 15°C a nižšie a ich výskyt bol zaznamenaný v polárnych oblastiach, ľadovcoch, oceánskych hĺbinách. Mezofily rastú pri miernych teplotách v rozmedzí 20°C až 45°C a boli izolované z pôdy aj vodného prostredia [13],[19],[20].

Tabuľka 3 Rozdelenie mikroorganizmov na základe teploty [21]

Trieda	Optimálna teplota pre rast [°C]	Zástupcovia
Psychrofilny	< 20	<i>Bacillus globisporus</i> <i>Micrococcus cryophilus</i>
Mezofily	20 - 40	<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Bacillus subtilis</i>
Termofily	45 - 65	<i>Clostridium thermocellum</i> <i>Bacillus stearothermophilus</i>
Extrémne termofily	> 70	<i>Thermus aquaticus</i> <i>Bacillus caldotenax</i>

2.2.2.2 Adaptívne mechanizmy termofilov

Život pri vysokých koncentráciách solí, zásaditých hodnotách pH a vysokých teplotách bezpochyby vyžaduje špeciálne adaptívne fyziologické mechanizmy. Termofily tak čelia výzve regulovať permeabilitu cytoplazmatickej membrány pri vysokých teplotách. Zvýšený intramolekulárny pohyb lipidov vedie k zvýšenej priepustnosti protónov pri vysokých teplotách. V dôsledku tohto pohybu sa molekuly vody zachytávajú v lipidovom jadre membrán a to umožňuje prechádzať protónom z jednej molekuly na druhú. Iné ióny na rozdiel od protónov môžu prechádzať cez membránu difúziou. Štúdie, ktoré boli zamerané na permeabilitu bakteriálnej cytoplazmatickej membrány preukázali, že *Bacteria* a *Archea* upravujú permeabilitu cytoplazmatickej membrány na rastovú teplotu mikroorganizmu [22].

Všetky makromolekuly- DNA, RNA a proteíny musia byť stabilné a funkčné pri vysokých teplotách. Nukleové kyseliny zvyšujú termostabilitu DNA zvýšením pomeru G+C páru. V ribozomálnej 16S rRNA je obsah G+C úmerný optimálnej rastovej teplote. Stabilizácia genómovej DNA závisí od zloženia nukleotidov. Proteíny termofilných baktérií obsahujú vo svojej štruktúre polárne nabité aminokyseliny ako je Glu, Asp, Lys a Arg a vzácne sa tu vyskytujú polárne pozostatky z aminokyselín Ser, Thr, Asn a Gln [23],[24].

2.2.2.3 Biotechnologické použite termofilných baktérií

Termofilné mikroorganizmy priťahujú veľký záujem v oblasti biotechnológií, a to najmä v priemyselných procesoch. Tieto mikroorganizmy sa využívajú v priemyselnom spracovaní, pri výrobe materiálov, chemikálií, energie a taktiež môžu byť použité pri odstraňovaní ťažkých kovov z odpadného materiálu [25].

Termofily produkujú termostabilné enzýmy, ktoré hrajú dôležitú úlohu v priemysle a vo farmaceutických aplikáciách (tabuľka 4). Okrem ich stability pri vysokých teplotách, ponúkajú tieto enzýmy ďalšie výhodné vlastnosti, napríklad znášanosť voči rozpúšťadlám, odolnosť voči denaturačným činidlám, selektivitu substrátu a vyššiu reakčnú rýchlosť. Termoenzýmy produkujú mikroorganizmy, ktoré patria do rodu *Bacillus*, *Clostridium*, *Pyrococcus*, *Thermus*, *Thermotoga* a *Aquifex*. Hlavný zlom v potencionálnom uplatnení enzýmov nastal pri opise použitia DNA polymerázy *Thermus aquaticus* v polymerázovej reťazovej reakcii [25],[26],[27].

Celuláza patrí k jedným z najviac používaných termostabilných enzýmov v priemyselných aplikáciách. Celulolytické enzýmy produkujú mnohé bakteriálne rody, napríklad *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus* a *Thermomonospora*. Vďaka svojej tepelnej stabilite je používaná v potravinárskom priemysle na zlepšenie extrakcie, čistenia a na odstránenie horkosti. V textilnom priemysle sa zase pridáva do čistiacich prostriedkov, aby nedochádzalo k vyblednutiu farby a tiež sa spomaľuje opotrebovanie odevu. Taktiež sa celuláza využíva pri spracovaní papiera a buničiny. Svoje uplatnenie našla aj pri výrobe etanolu [28].

Termostabilné proteázy našli radu uplatnení v niekoľkých priemyselných procesoch vďaka svojej stabilite pri zvýšenom pH a v organických rozpúšťadlách a hlavne sú odolné voči vysokým teplotám. Termostabilné proteázy sú používané pri syntéze peptidov, pretože sú kompatibilné s organickými rozpúšťadlami. Napríklad proteáza – termolizín pochádza z baktérie *Bacillus thermoproteolyticus* a používa sa na syntézu prekursora, ktorý má využitie pri príprave aspartámového sladidla. Proteázy sa taktiež pridávajú do pracích prostriedkov, pretože odolávajú zásaditým a aniónovým povrchovo aktívnym látkam. Pre ich keratinolytické a elastolytické vlastnosti sú používané v koženom priemysle [29].

α -amylázy patria medzi endoaktívne enzýmy, ktoré štiepia α -1,4- glykozidové väzby a preto sa používajú v prvej fáze konverzie škrobu. Tento enzým produkujú baktérie *Bacillus licheniformis* a *Pyrococcus woesei*. Glukoamylázy sú enzýmy, ktoré štiepia α -1,4 a α -1,6- glykozidové väzby a preto sú používané v druhej fáze konverzie škrobu, pri ktorej vzniká glukózový sirup vytvorený zo škrobových polysacharidov. V priemyselnej výrobe sa používa glukoamyláza produkovaná baktériou *Aspergillus niger* [29].

Tabuľka 4 Prehľad priemyselných aplikácií termostabilných enzýmov [30]

Enzým	Producent	Priemyselná aplikácia
Kyslé proteázy	Rod <i>Brevibacillus</i>	Produkcia bioaktívnych peptidov z kazeínu
Alkalické proteázy	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i>	Výroba čistiacich prostriedkov
Amyloglukozidáza, Glykozyltransferáza, β -glukanázy	<i>Thermus thermophilus</i> , <i>Bacillus stearothermophilus</i> , <i>Neisseria polysaccharea</i>	Potravinársky a pekársky priemysel
α -amyláza	<i>Bacillus licheniformis</i>	Spracovanie agropriemyselného odpadu
β -amyláza	Rod <i>Bacillus</i>	Spracovanie škrobu, potravinársky priemysel
Hemicelulázy	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Výroba biopalív
Laktáza	Rod <i>Aspergillus</i>	Potravinársky priemysel
Pektinázy	<i>Aspergillus niger</i>	Spracovanie ovocia
Taq DNA polymeráza	<i>Thermus aquaticus</i>	PCR

Termofilné baktérie sú schopné rásť na povrchoch, ktoré sú znečistené ropnými uhl'ovodíkmi. Tieto ropné zásobárne sú bohaté na polycyklické aromatické uhl'ovodíky, ktoré znečisťujú životné prostredie a majú škodlivé účinky na biodiverzitu. Termofily a halofily sú schopné tieto polycyklické aromatické uhl'ovodíky odbúrať enviromentálne prijateľnými cestami. Napríklad *Stenotrophomonas maltophilia* je schopná degradovať uhl'ovodíky s nízkou aj vysokou molekulovou hmotnosťou. Na základe týchto vlastností by mohli byť termofily použité na čistenie priemyselných vôd, ktoré sú znečistene polycyklickými aromatickými uhl'ovodíkmi a taktiež by mohli nájsť uplatnenie pri odstraňovaní ropných škvrn [30].

2.2.2.4 Príklady termofilov, ktorý produkujú polyhydroxyalkanoáty

PHA syntetizuje široká škála gram-pozitívnych a gram-negatívnych baktérií v aeróbnom a anaeróbnom prostredí. Medzi termofilné baktérie, ktoré dokážu syntetizovať PHA patrí kmeň *Aneurinibacillus*, ktorý bol izolovaný z ropného poľa v Číne. Jeho optimálna teplota rastu je okolo 55°C. Ďalší producenti PHA patria k druhom rodu *Pseudomonas*, ktoré sú schopné akumulovať PHA so stredne dlhým reťazcom. Termofilná baktéria *Thermus thermophilus* je schopná využiť laktózu zo srvátkového média na biosyntézu heteropolyméru, ktorý pozostáva z 3-hydroxyvalerátu, 3-hydroxyheptanoátu a 3-hydroxyundekanoátu. Medzi gram- negatívne

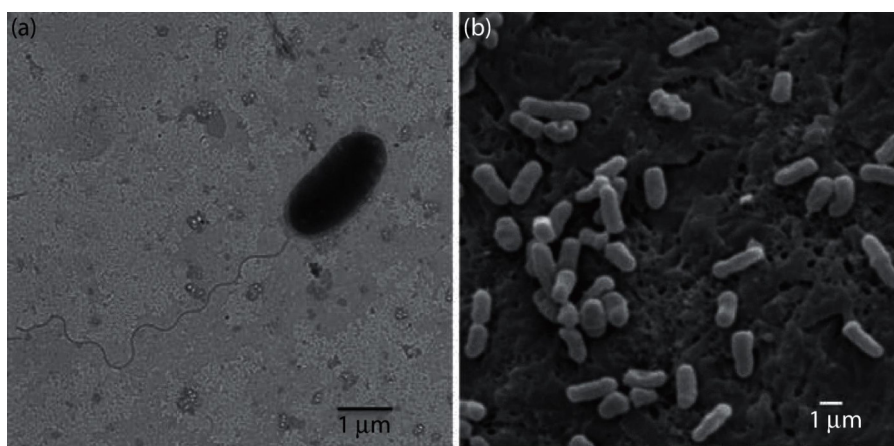
baktérie, ktoré sú schopné produkovať PHA pri zvýšených teplotných podmienkach patrí rod *Chelatococcus*. Ich optimálna teplota rastu je okolo 50°C [31],[32],[33],[34].

2.2.3 Vybraný PHA producenti z rodu *Chelatococcus*

2.2.3.1 *Chelatococcus composti*

Nová gram-negatívna baktéria bola prvýkrát izolovaná pri kompostovaní zvyškov húb po fermentácii penicilínu a hnoja ošipáných v Číne. Fylogenetická analýza založená na porovnaní 16S rRNA génových sekvencií preukázala, že kmeň PC-2^T vykazuje 98,9% podobnosť s *Chelatococcus daeguensis*, 98,8% s *Chelatococcus sambhunathii* a 98,4% s *Chelatococcus caeni*. Na základe týchto podobností bol novo vyizolovaný kmeň priradený k rodu *Chelatococcus* [35].

Bunky tejto baktérie sú tyčinkovitého tvaru, ktoré sú 0,8-1 µm široké a 1,8-2,8 µm dlhé. Baktéria tvorí hladké, lesklé kruhové kolónie bledo žltej farby, ktoré dokážu rásť pri teplote 20°C až 60°C. Ideálna teplota pre rast sa pohybuje okolo 35°C až 40°C. Rozmedzie pH, pri ktorom dokáže prežiť je 5,5 až 10, ale optimálne pH pre rast je 7,5 až 8. Baktéria nedokáže hydrolyzovať škrob a želatínu a tiež nemôže redukovať dusičnany [35].



Obrázok 3 Transmisný a skenovací elektrónový mikrogram zobrazujúci bunky *Ch. composti* [35]

2.2.3.2 *Chelatococcus sambhunathii*

Bakteriálny kmeň *Chelatococcus sambhunathii* patrí do bakteriálneho rodu *Chelatococcus* a bol prvýkrát vyizolovaný z horúceho prameňa v oblasti Athamaliku v Indii. Bunky tejto baktérie sú gram-negatívne a majú tyčinkovitý tvar. Je to aeróbna baktéria, ktorá neprodukuje spóry. Baktéria tvorí hladké kruhové kolónie mukoidnej povahy. Optimálna teplota pre rast tejto baktérie je v rozmedzí 37°C až 42°C ale dokáže rásť v teplotnom rozmedzí 20°C až 50°C. Rozmedzie pH, pri ktorom dokáže prežiť je v rozmedzí 6-8,5. Optimálne pH sa pohybuje v okolí 7,5-8. Baktéria dokáže hydrolyzovať želatínu a redukovať dusičnany [36].



Obrázok 4 Elektrónový mikrogram zobrazujúci bunku *Ch. sambhunathii* [36]

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Použité mikroorganizmy, chemikálie a prístroje

V praktickej časti bakalárskej práce boli použité nemecké zbierkové kmene baktérií, *Chelatococcus composti* DSM 101465 a *Chelatococcus sambhunathii* DSM 18167.

Použité chemikálie:

- Agaróza (Serva),
- 1,4-butandiol (Fluka),
- γ -butyrolakton (Sigma-Aldrich),
- Citrát železito-amónny (Fluka),
- Dihydrát chloridu vápenatého (Lach-Ner),
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner),
- Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Lach-Ner),
- DNA standard – FastGenne 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs),
- Fruktóza (Lach-Ner),
- Galaktóza (Lach-Ner),
- Glukóza (Lach-Ner),
- Glycerol (Lachema),
- Heptahydrát síranu horečnatého (Lach-Ner),
- Chlorid amónny (Lach-Ner),
- Chlorid horečnatý (Thermo Scientific),
- Chloroform (Lach-Ner),
- Kyselina boritá (Penta),
- Kyselina etyléndiaminotetraoctová (Lach-Ner),
- Kyselina 3,5-dinitrosalicylová (Sigma-Aldrich),
- Kyselina valerová (Sigma-Aldrich),
- Laktóza (Lach-Ner),
- Manóza (Lach-Ner),
- Master mix One *Taq* Hot Start DNA polymerázy (BioLabs Inc.),
- Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe),
- Nutrient Broth (HiMedia),
- PCR loading buff, Yellow load (Top-Bio),
- Primery pre *phaC* gén (GeneriBiotech),
- Primery pre *16S* rRNA (GeneriBiotech),
- Propionát sodný (Sigma-Aldrich),
- Sacharóza (Lach-Ner),
- Škrob (Penta),
- Tris(hydroxymetyl)aminometán (Lach-Ner),
- Xylóza (Lach-Ner),
- Yeast extract Powder (HiMedia).

Použité prístroje:

- Analytické váhy ew 620-3NM, KERN,
- Centrifuga Hettich EBA20, MANEKO,
- Centrifuga Sartorius Weender Landestrasse, Sigma Santorius,
- ELISA reader, BioTek, ELx808,
- Fluorescenčný mikroskop MicroTime 200, Picoquant GmbH, DE,
- Laminárny box Aura mini, BioAir – Euroclone,
- Magnetická miešачka bez ohrevu technoKartell, MERCI s.r.o,
- Nanofotometr P 300, Implen,
- Plynový chromatograf s FID, Thermo Scientific, Trace 1300 (kolóna: DB-WAX 30 m by 0,25 mm),
- Termoblok Block heater SBH130D, Stuart,
- Temperovaná trepačka, Heidolph, Incubator 1000,
- Temperovaná trepačka KS4000, IKA,
- Temperovaná trepačka Orbital Shaker ES-20, Biosan,
- Vortex BENCHMIXER, Benchmark Scientific Inc.,
- Bežné laboratórne sklo a vybavenie.

3.2 Kultivácia baktérií *Chelatococcus composti* a *Chelatococcus sambhunathii*

3.2.1 Príprava inokula

V 100 ml Erlenmeyerovej banke bolo pripravených 50 ml komplexného média Nutrient Broth, ktorého zloženie je uvedené v tabuľke 5. Po sterilizácii média boli obe bakteriálne kultúry zaočkované v laminárnom boxe. Po zaočkovaní prebiehala kultivácia bakteriálnej kultúry na temperovanej trepačke po dobu 24 hodín pri teplote 50°C a 180 rpm.

Tabuľka 5 Zloženie komplexného média Nutrient Broth

Zloženie	Množstvo [g/l]
Pepton	10
Beef Extract	10
NaCl	5

3.2.2 Produkčné médium

V 250 ml Erlenmeyerovej banke bolo pripravených 100 ml produkčného média za účelom produkcie bakteriálnych polyhydroxyalkanoátov. U oboch baktérií *Chelatococcus composti* a *Chelatococcus sambhunathii* bolo použité rovnaké minerálne médium, ktorého zloženie je uvedené v tabuľke 6, a k nemu bola ako zdroj uhlíka pridaná glukóza s koncentráciou 20 g/l. Po sterilizácii bolo do minerálneho média pridané potrebné množstvo zásobného roztoku glukózy, 100 µl stopových prvkoch TES II v zložení, ktoré je uvedené v tabuľke 7 a 10 ml bakteriálnej kultúry. Po zaočkovaní bakteriálnej kultúry nasledovala kultivácia na temperovanej trepačke po dobu 72 hodín pri teplote 50°C a 180 rpm.

Tabuľka 6 Zloženie minerálneho média

Zloženie	Množstvo [g/l]	V [ml/l]
Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O	9	
KH ₂ PO ₄	1,5	
NH ₄ Cl	1	
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,2	
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0,02	
Fe(III)NH ₄ - citrát	0,0012	
Yeast Extract	0,5	
TES II		1
Destilovaná voda		1000

Tabuľka 7 Zloženie stopových prvkov TES II

Zloženie	Množstvo [g/l]
EDTA	50
FeCl ₃	8,3
ZnCl ₂	0,84
CuCl ₂ ·2 H ₂ O	0,13
CoCl ₂ ·6 H ₂ O	0,1
MnCl ₂ ·6 H ₂ O	0,016
H ₃ BO ₃	0,1
Destilovaná voda	1000

3.3 Použité metódy

3.3.1 Izolácia DNA oboch bakteriálnych kmeňov

Na izoláciu bakteriálnej DNA bola použitá tepelná lýza. Do Eppendorfovej skúmavky bolo napipetovaných 100 µl lyzačného pufru – Tris(hydroxymetyl)aminometánu s koncentráciou 5 mM s pH 8,5, ku ktorému bola asepticky pridaná bakteriálna kultúra pomocou očkovacej kľučky. Následne prebiehala inkubácia v termobloku pri teplote 98°C po dobu 10 minút. Po inkubácii boli vzorky centrifugované pri 10 000 rpm opäť po dobu 10 minút. Získaný supernatant o objeme 60 µl bol pipetovaný do čistých Eppendorfových skúmaviek.

3.3.2 Spektrofotometrické stanovenie čistoty a koncentrácie vyizolovanej DNA

Na spektrofotometre bol najprv nastavený blank pomocou nesterilného lyzačného pufru, ktorý bol v množstve 1 µl nanosený na nanodrop. Následne boli na nanodrop nanosené vzorky DNA oboch bakteriálnych kmeňov v množstve 1 µl a bola stanovená ich koncentrácia v ng/µl a čistota. Na stanovenie čistoty sa použil pomer absorbancií A₂₆₀/A₂₈₀. DNA možno považovať

za čistú, ak hodnota pomeru A_{260}/A_{280} je rovná 1,8. Ak je hodnota tohto pomeru vyššia, v DNA je prítomná RNA, naopak ak je hodnota nižšia, vo vzorke sú prítomné proteíny.

3.3.3 Polymerázová reťazová reakcia (PCR)

Princípom polymerázovej reťazovej reakcie je replikácia nukleových kyselín. Podstata PCR spočíva v cyklicky sa opakujúcej enzýmovej syntéze nových reťazcov vybraných úsekov DNA prostredníctvom DNA – polymerázy, ktorá je izolovaná z termofilných mikroorganizmov. Najčastejšie sa používa DNA – polymeráza z *Thermus aquaticus*, ktorá odoláva vysokým teplotám. Polymerázová reťazová reakcia je proces, pri ktorom sa v závislosti od teploty striedajú tri kroky a to denaturácia DNA, pripojenie primerov a syntéza nových reťazcov DNA. Postupným opakovaním tohto procesu sa vytvára miliarda kópií vybraného úseku DNA [37].

V našom experimente sme na amplifikáciu génu *16S rRNA* a génu *phaC* syntázy prvej triedy použili multiplex PCR.

Na amplifikáciu génu *16S rRNA* boli použité primery 16S-F a 16S-R, ktoré mali potvrdiť prítomnosť bakteriálnej DNA o veľkosti fragmentov 1500 bp. Súčasne prebiehala amplifikácia *phaC* génu, na ktorú boli využité primery G-D a G₁-R. Vzniknuté fragmenty *phaC* génu dosahovali veľkosť 550 bp. Zároveň pri každej reakcii bola pripravená pozitívna kontrola, ktorá obsahovala DNA baktérie *Cupriavidus necator* H16 a negatívna kontrola, ktorá obsahovala PCR vodu.

Tabuľka 8 Sekvencia báz primerov

	Veľkosť [bp]	Primer	Sekvencia báz
<i>16S rRNA</i>	1500	16S-F	AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG
		16S-R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T
<i>phaC</i>	550	G-D	GTG CCG CCS YRS ATC AAC AAG T
		G ₁ -R	GTT CCA CWA CAG SAK RTC GAA

3.3.3.1 Príprava vzoriek na polymerázovú reťazovú reakciu

Vzorky pre amplifikáciu *16S rRNA* a *phaC* génu obsahovali:

- 12,5 µl Mastermix
- 2,6 µl MgCl₂
- 1 µl primerov 16S-F a 16S-R
- 1 µl primerov G-D a G₁-R
- 2,0 µl DNA
- 5,9 µl PCR vody

Tabuľka 9 Nastavenie prístroja thermocycler

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

3.3.4 Vyhodnotenie PCR produktov pomocou agarózovej gélovej elektroforézy

3.3.4.1 Príprava 2% agarózového gélu

Ku 100 ml 1x koncentrovaného TBE pufru (ktorý vznikol zriedením 10x koncentrovaného TBE pufru s destilovanou vodou v pomere 1:9) bola pridaná navážka 2 g agarózy. Vzniknutá zmes bola následne zahrievaná do rozpustenia agarózy. K mierne vychladenému roztoku bolo následne pridaných 6 µl interkalačného farbiva Midori Green a pripravený gél bol naliaty do elektroforetickej vane.

3.3.4.2 Príprava 10x koncentrovaného TBE pufru

Na prípravu 10x koncentrovaného TBE pufru boli použité chemikálie uvedené v tabuľke 10.

Tabuľka 10 Zloženie 10x koncentrovaného TBE pufru

Zloženie	Množstvo [g]	Množstvo [ml]
Tris(hydroxymetyl)aminometán	108,0	
H ₃ BO ₃	55,0	
EDTA	9,3	
Destilovaná voda		1000

3.3.4.3 Vyhodnotenie PCR produktov

Do jamiek 2% agarózového gélu bolo napipetovaných 10 µl vzorky, ktorá bola pripravená zmiešaním 3 µl nanášajúceho pufru s glycerolom a 10 µl produktu PCR. V rovnakom množstve bola do jamiek napipetovaná pozitívna a negatívna kontrola. Nakoniec bol do jamiek napipetovaný veľkostný štandard s definovanou veľkosťou fragmentov v množstve 5 µl. Pripravený gél bol zaliaty 1x koncentrovaným TBE pufrom a následne bola spustená elektroforetická separácia pri napätí 90 V po dobu 30 minút. Po skončení elektroforézy bol gél pozorovaný pod UV transluminátorom.

3.3.5 Stanovenie optimálneho zdroja uhlíka

Na stanovenie optimálneho zdroja uhlíka pre bakteriálnu produkciu PHA boli použité uhlíkové substráty glycerol, glukóza, fruktóza, galaktóza, manóza, xylóza, sacharóza, laktóza a škrob všetky s koncentráciou 20 g/l.

Pre oba bakteriálne kmene bolo pripravené 2x koncentrovanejšie minerálne médium, ktoré bolo v množstve 75 µl napipetované do jamôk sterilnej mikrotitračnej doštičky. Následne boli k médiu pridané uhlíkové substráty v množstve 75 µl, roztok stopových prvkov TES II v množstve 1 µl/ml a bakteriálna kultúra v množstve 20 µl. Pred kultiváciou boli na ELISA readeru premerané vstupné hodnoty absorbancie pri vlnovej dĺžke 630 nm. Následne sa mikrotitračná doštička s bakteriálnou kultúrou nechala kultivovať na temperovanej trepačke pri teplote 50°C po dobu 72 hodín. Po skončení kultivácie boli opäť premerané hodnoty absorbancie pri 630 nm a bol vyhodnotený nárast bakteriálnych kultúr na jednotlivých uhlíkových substrátoch.

3.3.6 Produkcia polyhydroxyalkanoátov za použitia prekursorov

U bakteriálnych kmeňov *Chelatococcus composti* a *Chelatococcus sambhunathii* bolo skúmané, či dokážu produkovať kopolyméry 4-hydroxybutyrátu (4HB) a 3-hydroxyvalerátu (3HV) za použitia vhodných prekursorov. Ako prekursor na produkciu (4HB) bol použitý 1,4- butandiol a γ -butyrolaktón v koncentrácii 8 g/l. Na produkciu (3HV) bol použitý prekursor propionát sodný a kyselina valerová v koncentrácii 2 g/l spolu s uhlíkovým substrátom s koncentráciou 20 g/l. Prekursory boli pridané k minerálnemu médiu a následne prebiehala kultivácia pri teplote 50°C po dobu 72 hodín. Po ukončení kultivácie bola koncentrácia oboch kopolymérov analyzovaná pomocou plynovej chromatografie s plameňovo ionizačným detektorom (GC-FID).

3.3.7 Spektrofotometrické stanovenie obsahu biomasy

Na spektrofotometre bol najprv nastavený blank pomocou destilovanej vody. Následne bola každá vzorka nariadená destilovanou vodou a bola zmeraná hodnota absorbancie pri vlnovej dĺžke 630 nm. Celkový objem v kyvete bol 3 ml, a vzorky boli riedené tak, aby hodnota absorbancie nepresiahla hodnotu 1. Pre každú vzorku boli prevedené tri merania hodnôt absorbancie.

3.3.8 Gravimetrické stanovenie obsahu biomasy

Z každého minerálneho média bola odobratá bakteriálna kultúra v množstve 10 ml v dvoch paralelných prevedeniach. Následne prebehla centrifugácia pri 6000 otáčkach po dobu 5 minút. Po centrifugácii bol supernatant odliaty a k sedimentu bolo pridaných 5 ml destilovanej vody. Následne bol sediment rozsuspendovaný a opäť centrifugovaný pri 6000 otáčkach po dobu 5 minút. Po vylíatí supernatantu bola biomasa sušená v termostate do konštantnej hmotnosti.

3.3.9 Stanovenie množstva polyhydroxyalkanoátov v biomase prostredníctvom plynovej chromatografie

Na stanovenie množstva a zloženia polyhydroxyalkanoátov v biomase bola použitá plynová chromatografia s plameňovým ionizačným detektorom. Princípom analýzy je prevedenie PHA pomocou kyseliny katalyzovanej hydrolýzy na prchavé metylestery 3- hydroxylalkánových kyselín.

3.3.9.1 Príprava vzoriek PHA na plynovú chromatografiu

Do krimpovacích vialiek bola navážená vysušená biomasa v približnom množstve 11 mg. K biomase bol pridaný 1 ml chloroformu a 0,8 ml esterifikačnej zmesi, ktorá bola zložená z 15% kyseliny sírovej v metanole (ako inertný štandard slúžila kyselina benzoová s koncentráciou 5 mg/ml). Následne prebiehala esterifikácia zmesi v termobloku pri teplote 94°C po dobu 3 hodín. Po ochladnutí bol k zmesi pridaný 0,05 M roztok hydroxidu sodného v množstve 0,5 ml a celý obsah vialky bol premiešaný. Po oddelení fáz bolo zo spodnej chloroformovej fázy odpipetovaných 50 µl do skrutkovacej vialky, do ktorej bol opäť pridaný chloroform v množstve 900 µl. Pripravené vzorky boli analyzované pomocou plynovej chromatografie s FID detektorom.

3.3.10 Produkcia polyhydroxyalkanoátov za použitia odpadných hydrolyzátorov

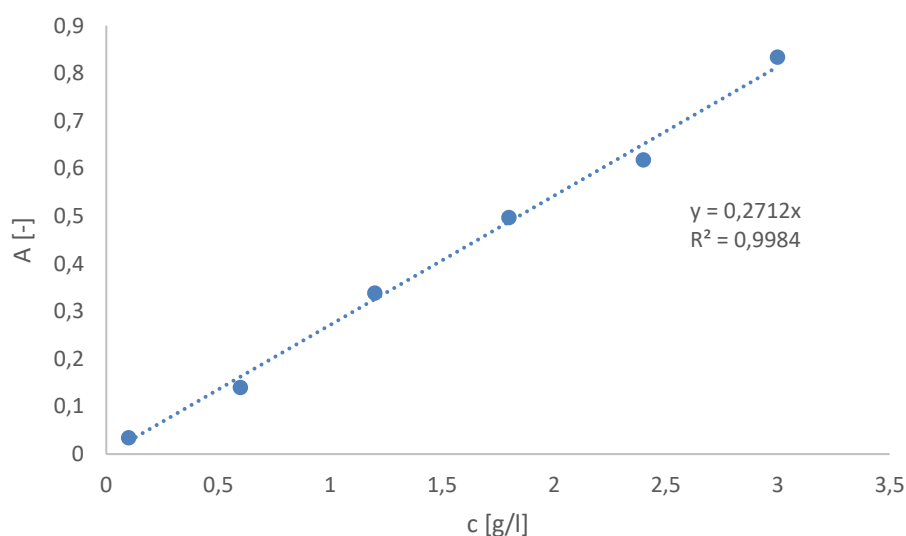
V 250 ml Erlenmeyerovej banke bolo pripravených 100 ml produkčného média a bolo použitých šesť modelových hydrolyzátorov, ktoré obsahovali rôzne koncentrácie sacharidov a to glukózu, xylózu, arabinózu, manózu a galaktózu (tabuľka 11). Po sterilizácii bolo do média pridaných 100 µl stopových prvkov TES II a následne tu bolo zaočkovaných 10 ml bakteriálnej kultúry. Následne prebiehala kultivácia 72 hodín pri 50°C a 180 rpm. Po kultivácii boli vzorky analyzované pomocou GC-FID a boli stanovené redukujúce sacharidy pomocou kyseliny 3,5- dinitrosalicylovej.

Tabuľka 11 Použité modelové hydrolyzáty a ich zloženie

	Sacharidy [g/l]				
	Glukóza	Xylóza	Arabinóza	Manóza	Galaktóza
Mäkké drevo	16,6	1,0	0,1	2,0	0,3
Tvrde drevo	3,2	12,4	1,0	1,8	1,6
Ryžová slama	4,2	13,4	2,4	-	-
Cukrová trstina	2,8	15,0	2,2	-	-
Pšeničná slama	11,2	7,2	0,9	-	0,7
Pšeničné otruby	0,8	12,4	6,8	-	-

3.3.10.1 Stanovenie kalibračnej priamky

Na stanovenie kalibračnej priamky bol použitý roztok xylózy s koncentráciou 3 g/l. Do pripravených skúmaviek bolo pipetovaných 0,1; 0,6; 1,2; 1,8; 2,4 a 3 ml tohto roztoku. Následne boli skúmavky doplnené destilovanou vodou na objem 3 ml. Z pripravených vzoriek bolo odpipetovaných 0,5 ml a bolo k nim pridaných 0,5 ml činidla kyseliny 3,5- dinitrosalicylovej. Skúmavky boli následne vložené do vodného kúpeľa vyhriateho na 70°C a nechali sa temperovať 10 minút. Po schladení na tmavom mieste boli vzorky doplnené na objem 10 ml a bola zmeraná absorbancia na spektrofotometre pri vlnovej dĺžke 540 nm.



Obrázok 5 Kalibračná krivka zobrazujúca závislosť absorbancie na koncentrácii vzorky

Rovnica lineárnej regresie bola zo získanej závislosti stanovená na $y = 0,2712x$ a regresný koeficient na $R^2 = 0,9984$.

3.3.10.2 Stanovenie redukujúcich sacharidov pomocou kyseliny 3,5-dinitrosalicylovej

Do skúmavky bolo napipetovaných 0,5 ml vzorky, ktorá bola vhodne nariedená destilovanou vodou a 0,5 ml činidla kyseliny 3,5-dinitrosalicylovej. Následne boli skúmavky vložené do vodného kúpeľa vyhriateho na 70°C a nechali sa temperovať 10 minút. Po vychladnutí na tmavom mieste boli vzorky doplnené destilovanou vodou na objem 10 ml. Po premiešaní boli vzorky premerané na spektrofotometre pri vlnovej dĺžke 540 nm. Spolu so vzorkami bol pripravený blank, ktorý obsahoval 0,5 ml činidla.

3.3.11 Príprava bakteriálnej kultúry na fluorescenčnú mikroskopiu

Do Eppendorfovej skúmavky bol odobratý 1 ml bakteriálnej kultúry a následne prebiehala centrifugácia pri 6000 otáčkach po dobu 5 minút. Po skončení centrifugácie bol supernatant odliaty a k sedimentu bol pridaný 1 ml vytemperovaného PBS pufru na teplotu 50°C s pH 7,4. Sediment bol rozsuspendovaný a opäť centrifugovaný pri rovnakých otáčkach 5 minút. Znova

bol odliaty supernatant a k sedimentu bol pridaný 1 ml PBS pufru vytemperovaného na teplotu 50°C. Nakoniec sa k rozsuspendovanému sedimentu pridalo 0,5 µl fluorescenčného farbiva BODIPY 493/503.

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Cieľom bakalárskej práce bolo stanovenie najvhodnejších podmienok pre produkciu polyhydroxyalkanoátov u bakteriálnych kmeňov *Chelatococcus composti* a *Chelatococcus sambhunathii*. Na začiatku experimentu bola u oboch bakteriálnych kmeňov najprv overená prítomnosť *phaC* génu, ktorý je potrebný pri syntéze PHA granúl, pomocou molekulárnej metódy multiplex PCR. Následne boli vykonané experimenty na stanovenie optimálneho zdroja uhlíka, optimálnej produkčnej teploty a produkciu kopolymérov pomocou prekurzorov. Ďalej bol vykonaný experiment s použitím modelových odpadných substrátov na zistenie, či dané bakteriálne kmene dokážu syntetizovať PHA z odpadných priemyselných produktov. Navyše boli PHA granule pozorované pomocou fluorescenčnej a transmisnej elektrónovej mikroskopie (TEM).

4.1 Stanovenie *phaC* génu a bakteriálneho génu *16S rRNA* pomocou molekulárnej metódy

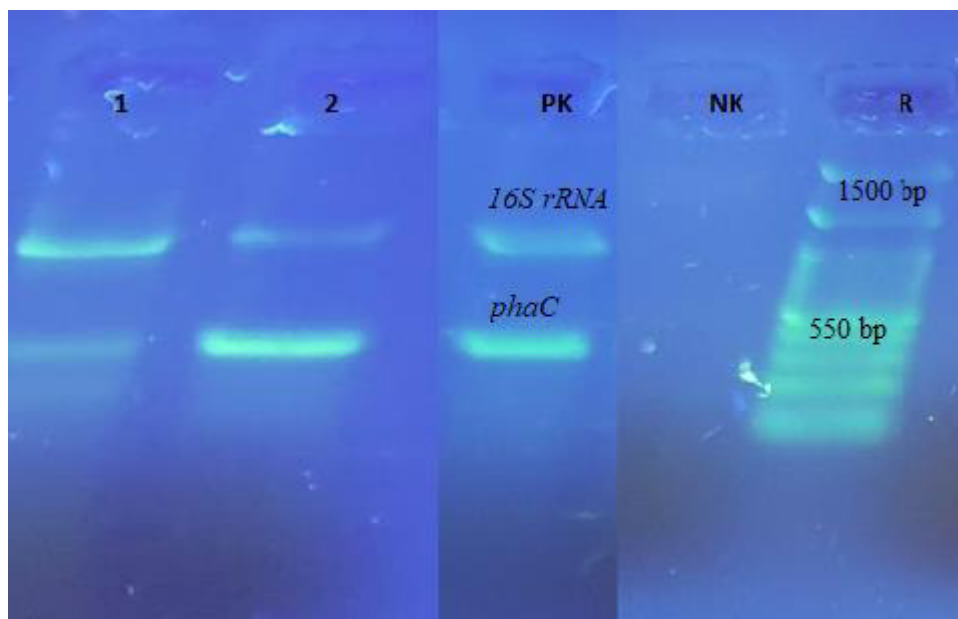
Pre stanovenie oboch génov bola využitá molekulárna biologická metóda – polymerázová reťazová reakcia. Cieľom tohto stanovenia bolo zistiť, či oba bakteriálne kmene *Chelatococcus composti* a *Chelatococcus sambhunathii* majú predispozíciu na syntézu PHA granúl. Taktiež bola premeraná čistota a koncentrácia vyizolovanej DNA pomocou spektrofotometrického merania. Výsledky merania sú zaznamenané v tabuľke 12.

Tabuľka 12 Stanovená čistota a koncentrácia vyizolovanej DNA bakteriálneho kmeňa *Chelatococcus composti* DSM 101465 a *Chelatococcus sambhunathii* DSM 18167

	$\frac{A_{260}}{A_{280}}$ [-]	c [ng/μl]
<i>Chelatococcus composti</i>	1,603	62,6
<i>Chelatococcus sambhunathii</i>	1,562	102,0

V tabuľke 12 môžeme vidieť, že u oboch bakteriálnych kmeňov čistota vyizolovanej DNA dosahuje pomerne nízke hodnoty. Príčinou nízkych hodnôt čistoty DNA pri oboch bakteriálnych kmeňoch *Chelatococcus composti* aj *Chelatococcus sambhunathii* pravdepodobne môže byť kontaminácia proteínmi, ktoré sa nachádzali vo vzorke.

Na amplifikáciu génu *phaC* syntázy I. triedy a bakteriálneho génu *16S rRNA* bola použitá multiplex PCR. Bakteriálny gén *16S rRNA* bol stanovený kvôli kontrole priebehu izolácie a následnej amplifikácii DNA. Vyhodnotenie amplikónov prebiehalo na gélovej agarózovej elektroforéze (obrázok 6). Na tomto obrázku môžeme vidieť bendy pre bakteriálny gén *16S rRNA*, ktorý má veľkosť 1500 bp a tiež gén pre *phaC* syntázu I. triedy o veľkosti 550 bp. Na základe získaných výsledkov môžeme potvrdiť, že oba bakteriálne kmene – *Chelatococcus composti* a *Chelatococcus sambhunathii* majú predispozíciu na produkciu PHA granúl.

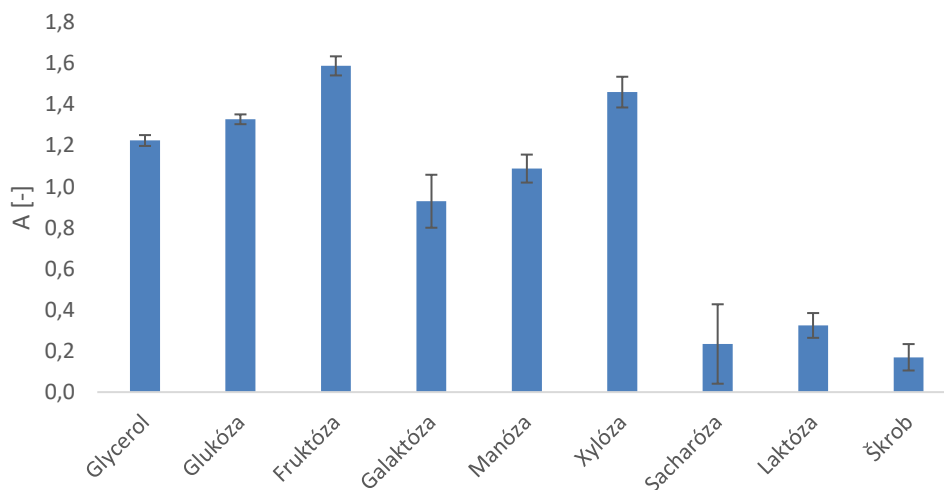


Obrázok 6 1-*Chelatococcus composti*, 2-*Chelatococcus sambhunathii*, PK-pozitívna kontrola, NK-negatívna kontrola, R-rebríček

4.2 *Chelatococcus composti* DSM 101465

4.2.1 Stanovenie optimálneho zdroja uhlíka

Po prevedení a následnom vyhodnotení polymerázovej reťazovej reakcie nasledovalo testovanie uhlíkových substrátov. Cieľom tohto experimentu bolo zistiť, ktorý sacharidový alebo nesacharidový zdroj uhlíka bude najvýhodnejší pri raste bakteriálnej kultúry. Ako uhlíkové zdroje boli použité sacharidy - glukóza, fruktóza, galaktóza, manóza, xylóza, sacharóza, laktóza a škrob a nesacharidový zdroj – glycerol. Vyhodnotenie výsledkov prebiehalo pomocou spektrofotometrického merania zákalu jednotlivých substrátov pred kultiváciou a po nej. Ako môžeme vidieť na obrázku 7, najlepší nárast bakteriálnej kultúry bol dosiahnutý pri použití fruktózy ako uhlíkového zdroja s hodnotou absorbancie 1,588. Pri použití xylózy ako uhlíkového zdroja dosahovala absorbancia druhú najvyššiu hodnotu 1,461, čo je veľmi priaznivé, pretože tento monosacharid sa nachádza v odpadných lignocelulózových substrátoch, a tým pádom môžu mať tieto odpadné substráty využitie pri produkcii PHA. O niečo nižšiu hodnotu absorbancie 1,328 vykazovala vzorka, u ktorej bola uhlíkovým zdrojom glukóza. Na základe výsledkov môžeme konštatovať, že bakteriálny kmeň *Chelatococcus composti* DSM 101465 najviac využíva ako uhlíkové substráty monosacharidy, pretože sa jedná o rýchlejší zdroj uhlíka pre rast a produkciu PHA granúl. V prípade použitia disacharidov a polysacharidov je nárast bakteriálnej kultúry omnoho nižší ako pri použití monosacharidov, pretože sú náročnejšie na utilizáciu, ale napriek tomu bola baktéria schopná rásť aj na týchto substrátoch. Zaujímavosťou je, že vysoká hodnota absorbancie 1,225 bola nameraná pri použití glycerolu ako zdroja uhlíka. Z tohto zistenia vyplýva, že baktéria *Chelatococcus composti* dokáže využiť na svoj rast aj nesacharidové zdroje, čo je veľmi výhodné, pretože glycerol patrí medzi ľahko dostupný odpadný substrát, ktorý vzniká pri výrobe bionafty. Po vyhodnotení všetkých výsledkov budú ďalej pre produkciu polyhydroxyalkanoátov použité uhlíkové substráty fruktóza, xylóza a glukóza, pretože bol na nich zaznamenaný najvyšší nárast bakteriálnej kultúry.



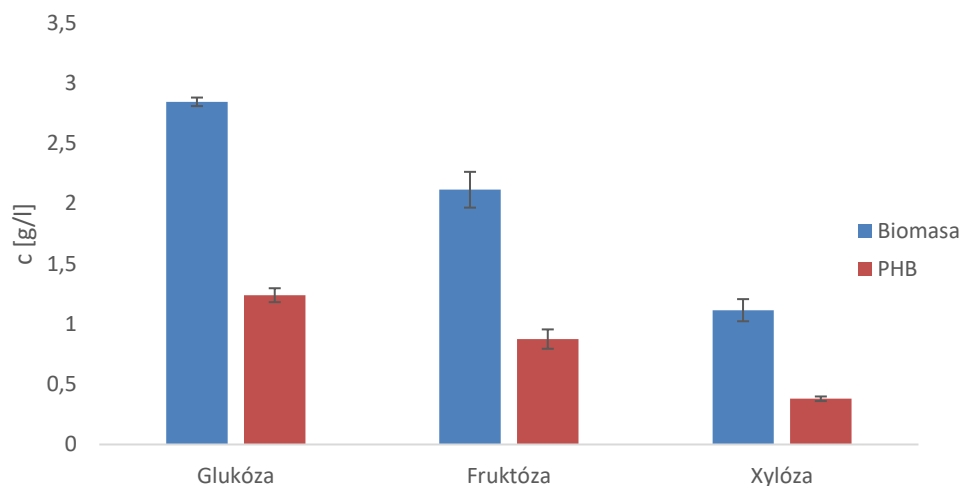
Obrázok 7 Porovnanie jednotlivých uhlíkových substrátov pre rast bakteriálnej kultúry pomocou spektrofotometrického merania zákalu u baktérie *Chelatococcus composti* DSM 101465

4.2.2 Výber najvhodnejšieho uhlíkového substrátu pre produkciu PHA

Po stanovení optimálneho zdroja uhlíka nasledoval výber troch substrátov, na ktorých bol dosiahnutý najvyšší nárast bakteriálnej kultúry a následne boli tieto substráty použité na produkciu polyhydroxybutyrátu (PHB). Pre bakteriálny kmeň *Chelatococcus composti* boli použité ako zdroj uhlíka monosacharidy fruktóza, xylóza a glukóza.

Na kultiváciu boli použité uhlíkové substráty s rovnakou hodnotou koncentrácie, a to 20 g/l. Následne prebiehala kultivácia bakteriálneho kmeňa v minerálnom médiu na trepačke po dobu 72 hodín pri teplote 50°C a 180 rpm. Po ukončení kultivácie nasledovalo spektrofotometrické meranie zákalu jednotlivých kultúr pri 630 nm. Najvyššia hodnota absorpcie bola nameraná u vzorky, ktorá obsahovala uhlíkový substrát glukózu 9,160. Naopak najnižšiu hodnotu absorpcie mala vzorka, u ktorej bola ako zdroj uhlíka použitá xylóza 4,135. Po vyhodnotení výsledkov na základe spektrofotometrického merania zákalu je vidieť, že baktéria *Chelatococcus composti* pre svoj rast a produkciu PHB využíva viac šesť uhlíkové monosacharidy ako päť uhlíkové.

Pomocou GC-FID bolo stanovené množstvo PHB v biomase. Zo získaných výsledkov, ktoré sú znázornené na obrázku 8 najvyššiu hodnotu koncentrácie biomasy 2,85 g/l a PHB 1,24 g/l mali vzorky, u ktorých bola ako zdroj uhlíka použitá glukóza a preto slúžila ako uhlíkový substrát pre ďalšie produkcie PHA. Hodnota koncentrácie biomasy 2,12 g/l, pri použití fruktózy ako zdroja uhlíka, sa o moc nelíšila od hodnoty koncentrácie biomasy pri použití glukózy. Môže to byť spôsobené tým, že oba monosacharidy patria medzi primárne energetické zdroje. Výrazne sa ale líšila hodnota koncentrácie PHB 0,88 g/l pri použití fruktózy ako uhlíkového zdroja. Pri použití xylózy ako substrátu, hodnota koncentrácie biomasy dosahovala iba polovicu 1,115 g/l z hodnoty koncentrácie biomasy bakteriálnej kultúry narastenej na glukóze. Taktiež koncentrácia PHB 0,38 g/l dosahovala veľmi nízkych hodnôt. Príčinou nízkej koncentrácie biomasy a taktiež koncentrácie PHB môže byť horšia schopnosť baktérie *Chelatococcus composti* využívať päť uhlíkové substráty, v tomto prípade xylózu na produkciu PHB.



Obrázok 8 Stanovenie koncentrácie biomasy a PHB pri vybraných uhlíkových zdrojoch u baktérie *Chelatococcus composti* DSM 101465

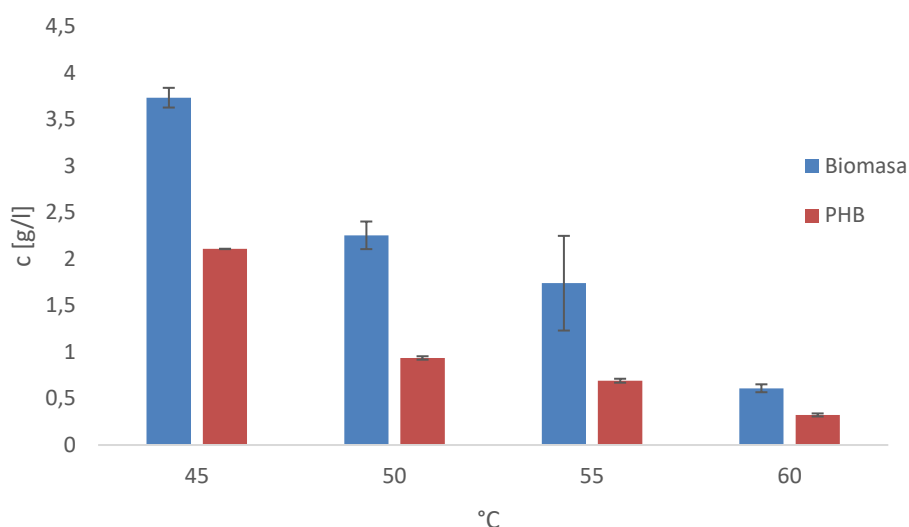
4.2.3 Stanovenie optimálnej teploty pre produkciu PHA

Bakteriálny kmeň *Chelatococcus composti* patrí medzi termotolerantné, prípadne mierne termofilné baktérie, u ktorých sa optimálna teplota rastu pohybuje v rozmedzí 35°C až 40°C [35]. Teplotné rozsahy boli preto zvolené tak, aby sme zistili, pri akej najvyššej teplote dokáže ešte bakteriálny kmeň rásť a produkovať PHA. Na tento experiment boli vybrané teploty 45°C, 50°C, 55°C a 60°C.

Po kultivácii pri zvolených teplotách bolo u každej vzorky prevedené spektrofotometrické meranie zákalu pri 630 nm. Najvyššia hodnota absorbancie 13,230 bola nameraná u vzorky, ktorá bola kultivovaná pri teplote 45°C. Naopak, najnižšia hodnota absorbancie 1,603 bola zaznamenaná pri vzorke, ktorej kultivácia prebiehala pri 60°C. Týmto sa nám potvrdilo, že bakteriálny kmeň *Chelatococcus composti* patrí medzi termotolerantné baktérie a pri vyšších teplotách klesá nárast bakteriálnej kultúry.

Po spracovaní a vyhodnotení výsledkov, ktoré sú uvedené na obrázku 9 môžeme vidieť, že najvyššiu koncentráciu biomasy 3,74 g/l vykazujú vzorky, ktoré boli kultivované pri 45°C. Pri tejto teplote bola taktiež dosiahnutá najvyššia koncentrácia PHB 2,11 g/l. O niečo nižšiu hodnotu koncentrácie 2,26 g/l biomasy vykazuje vzorka kultivovaná pri 50°C, ale hodnota koncentrácie PHB 0,94 g/l výrazne klesla. Pri vyšších teplotách hodnoty koncentrácie biomasy a tak isto hodnoty koncentrácie PHB, nedosahujú ani z polovice takých hodnôt ako pri kultivácii bakteriálnej kultúry pri 45°C. Z daného experimentu preto vyplýva, že najvhodnejšia teplota pre produkciu PHB pre *Chelatococcus composti* je 45°C, čo nám potvrdzuje, že táto baktéria patrí medzi termotolerantné mikroorganizmy ako je uvedené v literatúre [35].

Pri vyšších teplotách nastáva zníženie rastu bakteriálnej kultúry a tak isto je znížená produkcia PHA aj napriek tomu, že pri teplote 60°C bol nameraný druhý najväčší percentuálny obsah 52,97 % PHB v biomase. Pravdepodobne je to spôsobené tým, že vysoká teplota spôsobuje baktérii teplotný stres a produkcia PHB je tak odpoveďou na teplotný šok. Pri skúmaní baktérie *Chelatococcus daeguensis* (Fuqian Xu et al. 2014,[38]) bolo dokázané, že produkcia PHA pri vysokej teplote a ďalších extrémnych podmienkach významne posilňuje odolnosť baktérie voči vysokému stresu v životnom prostredí. Na základe týchto zistení sa domnievam, že bakteriálna bunka sa týmto chráni pred vysokými teplotami.



Obrázok 9 Stanovenie koncentrácie biomasy a PHB pri rôznych teplotách u baktérie *Chelatococcus composti* DSM 101465

4.2.4 Produkcia PHA za využitia prekursorov

Cieľom tohto experimentu bolo zistiť, či bakteriálny kmeň *Chelatococcus composti* bude schopný po prídavku prekursorov produkovať kopolyméry 4-hydroxybutyrátu (4HB) a 3-hydroxyvalerátu (3HV). Ako prekursorsy boli použité 1,4-butandiol, γ -butyrolaktón v koncentrácii 8 g/l a propionát sodný, kyselina valerová v koncentrácii 2 g/l spolu s uhlíkovým substrátom - glukózou s koncentraciou 20 g/l.

Produkcia týchto kopolymérov pomocou prekursorov bola skúmaná kvôli ich výhodnejším vlastnostiam oproti PHB ako sú nižšia kryštalinita, nižšia teplota topenia, nižšia tuhosť, majú vyššiu pružnosť a pevnosť [39].

Po ukončení kultivácie bolo opäť prevedené spektrofotometrické meranie zákalu pri 630 nm. Najvyššiu hodnotu absorbancie 9,530 vykazovala vzorka, v ktorej bol ako prekursor použitý propionát sodný. Môže to byť spôsobené tým, že k tomuto prekursoru bola navyše pridaná glukóza s koncentraciou 20 g/l ako zdroj uhlíka. Naopak najnižšia hodnota absorbancie 0,256 bola nameraná u vzorky, v ktorej bol použitý γ -butyrolaktón ako prekursor, ktorý na základe získaných výsledkov pôsobí na baktériu *Chelatococcus composti* najviac toxicky, a tým inhibuje jej rast.

Ako môžeme vidieť v tabuľke 13, najvyššia koncentrácia biomasy 2,70 g/l bola zaznamenaná vo vzorke, v ktorej bol ako prekursor použitý propionát sodný a taktiež tu bolo najvyššie percentuálne zastúpenie PHA okolo 40%, čo môže byť spôsobené tým, že propionát sodný vykazuje najnižšiu toxicitu spomedzi vybraných prekursorov. Najnižšiu hodnotu koncentrácie biomasy 0,26 g/l vykazovala vzorka, v ktorej bola ako prekursor kyselina valerová, ale napriek tomu percentuálne zastúpenie PHA činilo okolo 22%, čo je druhá najvyššie nameraná hodnota. Pri prekursoru γ -butyrolaktóne nebolo získané dostatočné množstvo biomasy, a preto neprebehla analýza vzorky na GC-FID. Na základe získaných výsledkov môžeme konštatovať, že pri použití prekursorov nastáva inhibícia rastu bakteriálnej kultúry na substráte. Pravdepodobne za to môže toxicita vybraných prekursorov, ktorá inhibuje rast baktérie v lag fáze a taktiež nedostatočné množstvo uhlíkového zdroja pri prekursoroch 1,4-butandiole a γ -butyrolaktóne. Napriek tomu baktéria *Chelatococcus composti* bola

schopná vyprodukovať kopolymér P(3HB-co-3HV) po prídavku prekursoru propionátu sodného a kyseliny valerovej, pri čom väčšie zastúpenie 3-hydroxybutyrátu a to 98 mol% vykazovala vzorka, v ktorej bol ako prekursor použitý propionát sodný. Vo vzorke, v ktorej bola ako prekursor kyselina valerová, mal vo vzniknutom kopolyméry väčšie zastúpenie 3- hydroxyvalerát a to necelých 87 mol%.

Tabuľka 13 Produkcia PHA za využitia prekursorov a jednotlivé zastúpenie 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu v PHA

Prekursor	Biomasa [g/l]	PHA [g/l]	PHA [%]	3HB [mol %]	3HV [mol %]	4HB [mol %]
Propionát sodný	2,70 ± 0,13	1,080	40,06 ± 0,04	98,05	1,95	-
Kyselina valerová	0,26 ± 0,15	0,055	21,68 ± 0,04	13,20	86,80	-
1,4-butandiol	0,33 ± 0,11	0,012	3,67 ± 0,01	100	-	-

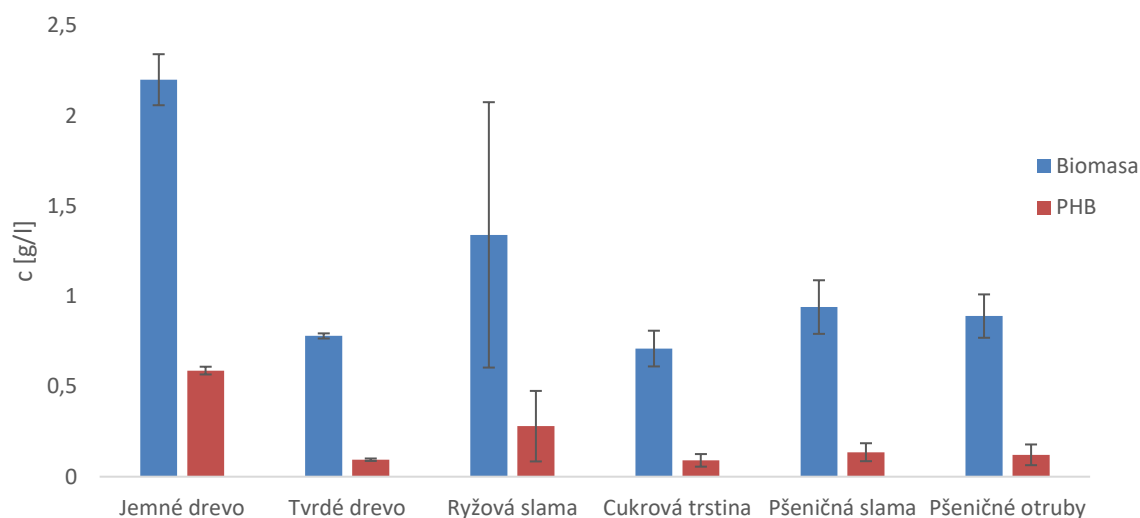
Pozn.: Pri použití prekursora 1,4-butandiolu baktéria Chelatococcus composti nebola schopná vyprodukovať kopolymér P(3HB-co-4HB).

4.2.5 Produkcia PHA za využitia modelových hydrolyzátov

Účelom tohto experimentu bolo zistiť, či daný bakteriálny kmeň *Chelatococcus composti* dokáže produkovať PHA granule za využitia odpadných substrátov. Na daný experiment bolo použitých šesť modelových hydrolyzátov, ktoré obsahovali rôzne koncentrácie sacharidov a to glukózu, xylózu, arabinózu, manózu a galaktózu. Kultivácia prebiehala 72 hodín pri 50°C a 180 rpm.

Po kultivácii bolo prevedené spektrofotometrické meranie zákalu u jednotlivých vzoriek. Najvyššiu hodnotu absorbancie 10,900 vykazovala vzorka, v ktorej bol použitý modelový hydrolyzát z jemného dreva. Pravdepodobne to bude spôsobené tým, že v tomto odpadnom substráte je najviac zastúpená glukóza, na ktorej bol zaznamenaný najvyšší nárast bakteriálnej kultúry z predchádzajúceho experimentu. Naopak najnižšia hodnota absorbancie 3,950 bola nameraná u vzorky, v ktorej bol použitý hydrolyzát z pšeničných otrúb, v ktorom je najviac zastúpená xylóza.

Na obrázku 10 môžeme vidieť, že najvyššia koncentrácia biomasy 2,20 g/l bola dosiahnutá u vzorky, v ktorej bol použitý modelový hydrolyzát jemného dreva. V tejto vzorke bola taktiež zaznamenaná najvyššia koncentrácia PHB a to 0,59 g/l. O polovicu nižšiu koncentráciu biomasy 1,34 g/l obsahovala vzorka, v ktorej bol použitý modelový hydrolyzát z ryžovej slamy, v ktorom má najvyššie zastúpenie xylóza, avšak koncentrácia PHB 0,28 g/l nedosahovala ani polovičnú hodnotu koncentrácie PHB pri použití modelového hydrolyzátu z jemného dreva. Pravdepodobne to bude spôsobené tým, že v hydrolyzáte z jemného dreva má najvyššie zastúpenie glukóza, ktorú dokáže baktéria *Chelatococcus composti* najlepšie využívať pre svoj rast a produkciu PHB. V ostatných hydrolyzátach je zastúpenie glukózy omnoho nižšie, čo môže mať za následok horší rast tejto baktérie a taktiež aj zníženú produkciu PHB.



Obrázok 10 Stanovenie koncentrácie biomasy a PHB pri použití rôznych modelových hydrolyzátov u baktérie *Chelatococcus composti* DSM 101465

4.2.5.1 Stanovenie redukujúcich sacharidov pomocou kyseliny 3,5-dinitrosalicylovej

Po kultivácii boli vo všetkých vzorkách spektrofotometricky stanovené redukujúce sacharidy pri vlnovej dĺžke 540 nm, aby sme zistili ako efektívne dokáže baktéria *Chelatococcus composti* využívať rôzne modelové hydrolyzáty na svoj rast a produkciu PHB.

Počiatková koncentrácia sacharidov vo všetkých vzorkách dosahovala hodnotu 20 g/l. Po zmeraní absorbie a následnom výpočte koncentrácie u zostatkových sacharidov (na výpočet bola použitá kalibračná rovnica z obrázka 5) dosahovala najvyššiu koncentráciu 12,48 g/l vzorka, v ktorej bola ako odpadný hydrolyzáat použitá cukrová trstina. Ako môžeme vidieť v tabuľke 14, na tomto hydrolyzáte dosahoval nárast biomasy najnižšiu koncentráciu a to 0,71 g/l a taktiež tu bola zaznamenaná najnižšia koncentrácia PHB a to 0,09 g/l. Na základe získaných výsledkov môžeme konštatovať, že baktéria *Chelatococcus composti* na svoj rast a produkciu PHB najmenej využíva hydrolyzáty, v ktorých má najväčšie zastúpenie xylóza, a ktoré obsahujú veľmi nízke koncentrácie glukózy. Ako sa nám potvrdilo v predchádzajúcich experimentoch, bakteriálny kmeň *Chelatococcus composti* ťažšie utilizuje päť uhlíkové substráty, v našom prípade xylózu.

Tabuľka 14 Vypočítané koncentrácie biomasy, PHB a residuálnych sacharidov pri použití rôznych modelových hydrolyzátov

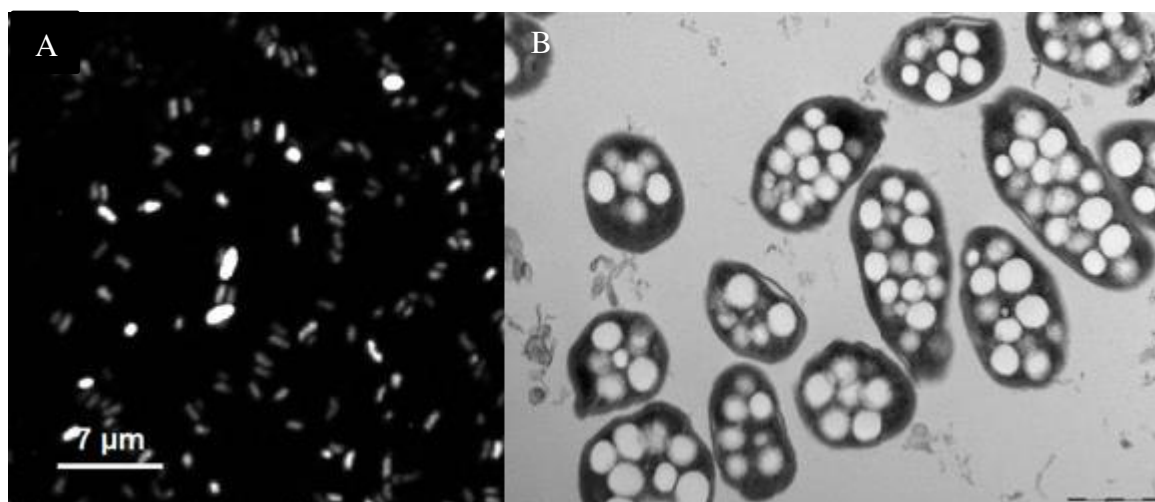
	Biomasa [g/l]	PHB [g/l]	Residuálne sacharidy [g/l]	Spotrebované sacharidy [g/l]	$Y_{P/S}$
Mäkké drevo	$2,20 \pm 0,14$	$0,59 \pm 0,02$	$6,22 \pm 0,50$	13,78	0,04
Tvrdé drevo	$0,78 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,01$	$11,07 \pm 0,78$	8,93	0,01
Ryžová slama	$1,34 \pm 0,74$	$0,28 \pm 0,20$	$8,20 \pm 0,85$	11,80	0,02

	Biomasa [g/l]	PHB [g/l]	Residuálne sacharidy [g/l]	Spotrebované sacharidy [g/l]	Y _{P/S}
Cukrová trstina	0,71 ± 0,10	0,09 ± 0,03	12,48 ± 0,27	7,52	0,01
Pšeničná slama	0,94 ± 0,15	0,14 ± 0,05	7,07 ± 0,35	12,93	0,01
Pšeničné otruby	0,89 ± 0,12	0,12 ± 0,06	9,59 ± 0,17	10,41	0,01

4.2.6 Mikroskopické pozorovanie PHA u baktérie *Chelatococcus composti*

Na mikroskopické pozorovanie polyhydroxyalkanoátov bola využitá fluorescenčná a transmisná elektrónová mikroskopia.

Bakteriálne bunky boli zafarbené fluorescenčným farbivom BODIPY 493/503 a následne boli pozorované fluorescenčnou mikroskopiou. Ako môžeme vidieť na obrázku 11 A, bakteriálne bunky majú tyčinkovitý tvar ako je uvedené v literatúre. Pre veľmi malú veľkosť bakteriálnych buniek nebolo možné pomocou fluorescenčnej mikroskopie pozorovať PHA granule a preto boli vzorky poslané na transmisnú elektrónovú mikroskopiou. Ako môžeme vidieť na obrázku 11 B, bakteriálne bunky sú plné menších PHA granúl čo je veľmi nezvyčajné, pretože ostatné baktérie napr. *Cupriavidus necator* tvoria tieto granule väčšie a v jednej bunke ich je maximálne do desať [40].



Obrázok 11 Zobrazenie bakteriálnej bunky *Chelatococcus composti* DSM 101465 pomocou fluorescenčnej mikroskopie (A) a transmisnej elektrónovej mikroskopie (B)

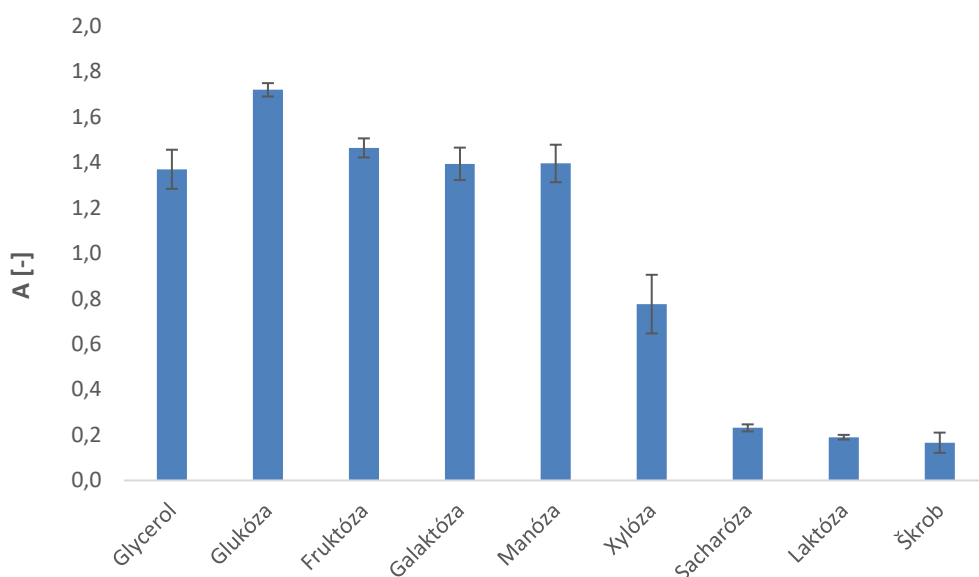
4.3 *Chelatococcus sambhunathii* DSM 18167

4.3.1 Stanovenie optimálneho zdroja uhlíka

Podobne ako u bakteriálneho kmeňa *Chelatococcus composti* DSM 101165 bol pomocou spektrofotometrického merania zákalu stanovený optimálny zdroj uhlíka u baktérie *Chelatococcus sambhunathii* DSM 18167. Aj v tomto prípade bol ako uhlíkový zdroj použitý

sacharidový substrát - glukóza, fruktóza, galaktóza, manóza, xylóza, sacharóza, laktóza a škrob a nesacharidový substrát - glycerol.

Ako môžeme vidieť na obrázku 12, najlepší nárast bakteriálnej kultúry bol zaznamenaný na minerálnom médiu, v ktorom bola ako uhlíkový zdroj použitá glukóza s hodnotou absorbancie 1,719. Druhý najvyšší nárast bakteriálnej kultúry bol zaznamenaný na fruktóze, kde absorbancia dosahovala hodnotu 1,463. Z nameraných dát vyplýva, že práve na týchto monosacharidoch bol nárast bakteriálnej kultúry najvyšší, pretože glukóza a fruktóza patria medzi základné sacharidy, ktoré dokáže utilizovať rada mikroorganizmov. O niečo nižšiu hodnotu absorbancie vykazovala vzorka, v ktorej bola ako zdroj uhlíka použitá manóza a galaktóza. Pravdepodobne to bude spôsobené tým, že manóza a galaktóza sú epimérom glukózy (tieto monosacharidy sa od seba líšia konfiguráciou hydroxylovej skupiny na C2 a C4). Dosiahnutie vysokej hodnoty absorbancie pri uhlíkovom zdroji - manóze je veľmi priaznivé, pretože sa tento sacharid nachádza v lignocelulóзовých hydrolyzátoch a taktiež v kábovej usadenine, ktoré môžu byť použité pri produkcii PHA. Vysoký nárast bakteriálnej kultúry bol tiež zaznamenaný pri uhlíkovom substráte glycerole, čo je výhodné, pretože baktéria *Chelatococcus sambhunathii* dokáže na svoj rast využívať aj nesacharidové zdroje. Podobne ako u kmeňa *Chelatococcus composti* môžeme na základe výsledkov potvrdiť, že táto baktéria taktiež nedokáže dobre utilizovať disacharidy a polysacharidy, ale napriek tomu bol na nich zaznamenaný nízky nárast bakteriálnej kultúry. Po vyhodnotení všetkých výsledkov budú ďalej pre produkciu polyhydroxyalkanoátov použité uhlíkové substráty glukóza, fruktóza a manóza, pretože bol na nich zaznamenaný najvyšší nárast bakteriálnej kultúry.



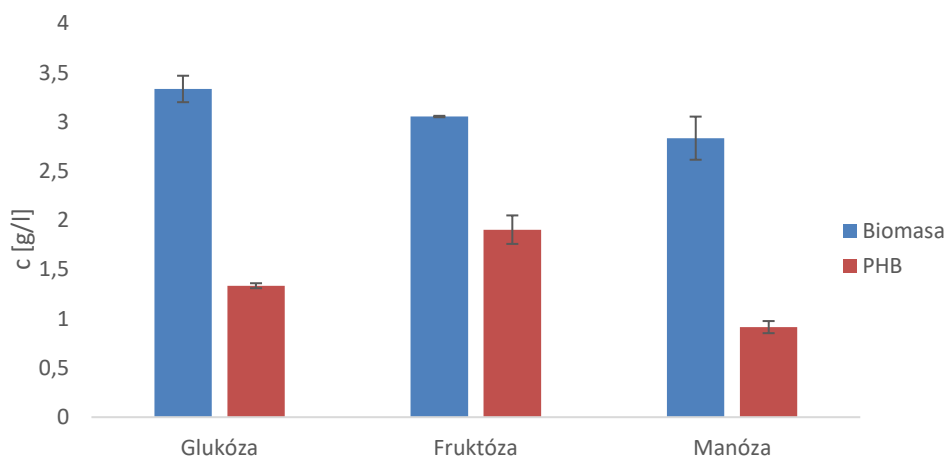
Obrázok 12 Porovnanie jednotlivých uhlíkových substrátov pre rast bakteriálnej kultúry pomocou spektrofotometrického merania zákalu u baktérie *Chelatococcus sambhunathii* DSM 18167

4.3.2 Výber najvhodnejšieho uhlíkového substrátu pre produkciu PHA

Po stanovení optimálneho zdroja uhlíka boli vybraté tri substráty, na ktorých bol dosiahnutý najlepší nárast bakteriálnej kultúry. Vybrané substráty boli použité na produkciu PHB. Pre kmeň *Chelatococcus sambhunathii* boli ako zdroj uhlíka použité monosacharidy- glukóza, fruktóza a manóza, všetky s rovnakou koncentráciou 20 g/l.

Po ukončení kultivácie bolo opäť prevedené spektrofotometrické meranie zákalu pri 630 nm. Najvyššia hodnota absorbancie 13,960 bola zaznamenaná pri použití fruktózy ako uhlíkového zdroja. Najnižšia hodnota absorbancie 9,660 bola nameraná u vzorky, kde bola ako uhlíkový substrát použitá manóza. Pravdepodobne to môže byť spôsobené tým, že fruktóza patrí medzi základné sacharidy, ktoré dokáže utilizovať rada mikroorganizmov.

Pomocou GC-FID bola stanovené množstvo PHB v biomase. Po vyhodnotení výsledkov najvyššiu hodnotu koncentrácie biomasy 3,34 g/l mala vzorka, u ktorej bola ako zdroj uhlíka použitá glukóza. Pri použití fruktózy ako uhlíkového substrátu dosahovala koncentrácia biomasy 3,06 g/l, čo je nepatrný rozdiel v porovnaní s uhlíkovým substrátom glukózou. Najnižší výťažok biomasy 2,84 g/l a tak isto aj najnižšia koncentrácia PHB 0,92 g/l bola zaznamenaná u manózy. Najvyššia koncentrácia PHB 1,92 g/l bola nameraná u vzorky, v ktorej bola ako zdroj uhlíka použitá fruktóza. Ako môžeme vidieť na obrázku 13, nepatrný rozdiel v hodnotách koncentrácie PHB dosahovala vzorka, v ktorej bola ako uhlíkový substrát použitá glukóza. Napriek tomu, že najvyššia hodnota koncentrácie PHB bola nameraná u fruktózy ako uhlíkového zdroja, na ďalšie produkcie PHB pre bakteriálny kmeň *Cheatooccus sambhunathii* bola zvolená glukóza, pretože na nej prebiehal najlepší nárast bakteriálnej kultúry, a tým bola získaná väčšia koncentrácia biomasy.



Obrázok 13 Stanovenie koncentrácie biomasy a PHB pri vybraných uhlíkových zdrojoch u baktérie *Chelatococcus sambhunathii* DSM 18167

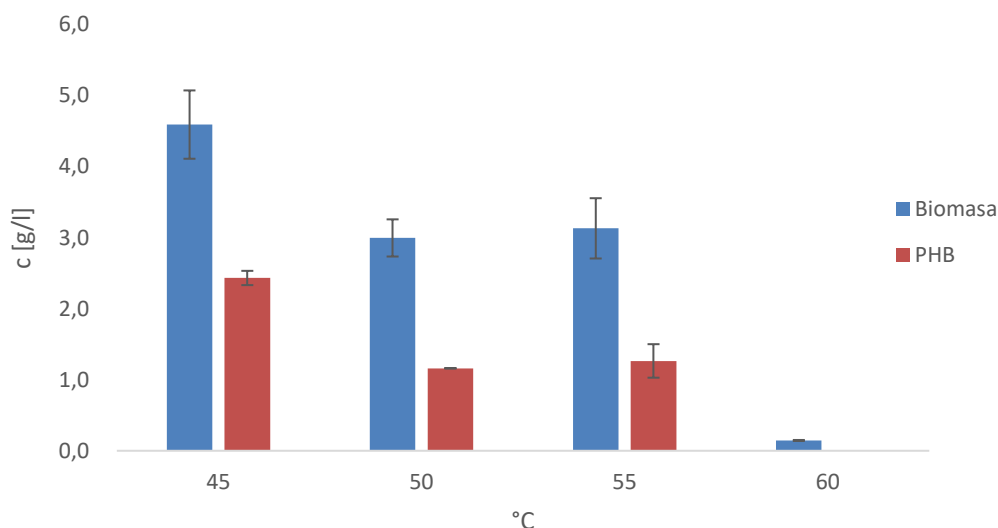
4.3.3 Stanovenie optimálnej teploty pre produkciu PHA

Bakteriálny kmeň *Chelatococcus sambhunathii* sa zaraďuje medzi termotolerantné, prípadne mierne termofilné baktérie, a jeho optimálna teplota pre rast sa pohybuje v rozmedzí 37°C až 42°C [36]. Podobne ako u predchádzajúcej baktérie *Chelatococcus composti* sme skúmali, pri akej najvyššej teplote dokáže ešte bakteriálna kultúra rásť a produkovať PHB. Hodnoty skúmaných teplôt boli rovnaké ako pri predchádzajúcom experimente a to 45°C, 50°C, 55°C a 60°C.

Po 72 hodinovej kultivácii bolo prevedené spektrofotometrické meranie zákalu pri 630 nm u každej vzorky. Po spracovaní získaných výsledkov bola najvyššia hodnota absorbancie 14,570 dosiahnutá pri kultivačnej teplote 45°C. O niečo nižšiu hodnotu absorbancie 10,710 vykazovala vzorka, ktorá mala kultivačnú teplotu nastavenú na 55°C. Naopak, najnižší nárast bakteriálnej kultúry bol podobne ako u *Chelatococcus composti* zaznamenaný vo vzorke, ktorá

bola kultivovaná pri teplote 60°C. Na základe získaných výsledkov môžeme konštatovať, že najvyššia teplota, pri ktorej bakteriálny kmeň *Chelatococcus sambhunathii* dokáže rásť je 55°C. Pri vyšších teplotách nastáva rapidne zníženie rastu bakteriálnej kultúry, čo nám opäť potvrdzuje, že táto baktéria patrí medzi termotolerantné mikroorganizmy.

Po vyhodnotení výsledkov, ktoré sú zaznamenané na obrázku 14 najvyššiu hodnotu koncentrácie biomasy 4,59 g/l vykazovala vzorka, ktorá bola kultivovaná pri teplote 45°C. Pri tejto teplote bola taktiež zaznamenaná najvyššia koncentrácia PHB a to 1,78 g/l. Celkom vysokú hodnotu koncentrácie biomasy 3,13 g/l vykazovala tiež vzorka, ktorej kultivácia prebiehala pri 55°C. Naopak, pri tejto teplote bola dosiahnutá najnižšia hodnota koncentrácie PHB 0,45 g/l. Najnižšia hodnota koncentrácie biomasy bola zaznamenaná pri teplote 60°C. Pretože celkový zisk biomasy, ktorá bola kultivovaná pri 60°C, nebol dostačujúci na analýzu pomocou GC-FID, nebol vo vzorke stanovený obsah PHB. Na základe získaných výsledkov môžeme vidieť, že optimálna teplota pre produkciu PHB pomocou bakteriálneho kmeňa *Chelatococcus sambhunathii* je 45°C. Pri teplotách do 55°C je rast bakteriálnej kultúry a koncentrácia biomasy pomerne vysoká, čo sa nám zhoduje s tvrdením, ktoré je uvedené v literatúre, ale na druhej strane nastáva pokles koncentrácie PHB.



Obrázok 14 Stanovenie koncentrácie biomasy a PHB pri rôznych teplotách u baktérie *Chelatococcus sambhunathii* DSM 18167

4.3.4 Produkcia PHA za využitia prekursorov

Podobne ako u bakteriálneho kmeňa *Chelatococcus composti* bol sledovaný vplyv prekursorov na nárast bakteriálnej kultúry a produkciu PHA. Ako prekurzory boli opäť zvolené 1,4- butandiol a γ -butyrolaktón v koncentrácii 8 g/l na produkciu kopolyméru 4- hydroxybutyrátu (4HB). Na tvorbu kopolyméru 3- hydroxyvalerátu (3HV) boli ako prekurzory použité propionát sodný a kyselina valerová v koncentrácii 2 g/l spolu s uhlíkovým substrátom - glukózou s koncentráciou 20 g/l. Kultivácia bakteriálnej kultúry prebiehala 72 hodín pri teplote 50°C.

Po ukončení kultivácie bolo opäť prevedené spektrofotometrické meranie zákalu pri 630 nm. Najvyššiu hodnotu absorbancie 9,660 vykazovala vzorka, v ktorej bol ako prekursor použitý propionát sodný. Podobne ako u baktérie *Chelatococcus composti* to mohlo byť spôsobené tým, že k tomuto prekursoru bol navyše pridaný zdroj uhlíka. Naopak najnižšia hodnota absorbancie 0,375 bola nameraná u vzorky, v ktorej bol použitý γ -butyrolaktón ako prekursor, čo je

spôsobené tým, že na bakteriálny kmeň *Chelatococcus sambhunathii* pôsobí toxicky a tak inhibuje jej rast.

Po vyhodnotení výsledkov, ktoré sú znázornené v tabuľke 15 môžeme vidieť, že najvyššia koncentrácia biomasy 2,80 g/l bola zaznamenaná u vzorky, v ktorej bol ako prekursor použitý propionát sodný. V tejto vzorke bolo taktiež zaznamenané najvyššie percentuálne zastúpenie PHA a to okolo 42% čo môže byť spôsobené tým, že propionát sodný pôsobí na bakteriálny kmeň najmenej toxicky a taktiež sa tu nachádza glukóza, ktorá predstavuje zdroj uhlíka. Najnižšia koncentrácia biomasy 0,29 g/l bola dosiahnutá u vzorky, v ktorej bol použitý prekursor 1,4- butandiol. Taktiež tu bolo namerané najnižšie percentuálne zastúpenie PHA a to necelých 7%. Predpokladám, že to mohlo byť spôsobené tým, že v tomto prekurzore nebol navyše pridaný zdroj uhlíka, čo má za následok zníženie rastu bakteriálnej kultúry a taktiež zhoršenie produkcie PHA. Pri γ -butyrolaktóne opäť nebolo získané dostatočné množstvo biomasy a preto neprebehla analýza vzorky na GC-FID. Na základe získaných výsledkov môžeme konštatovať (tabuľka 15), že podobne ako pri baktérii *Chelatococcus composti* pôsobia aj v tomto prípade vybrané prekursorové toxicky na bakteriálny kmeň *Chelatococcus sambhunathii* a tým inhibujú jej rast. Napriek tomu bola vybraná baktéria schopná produkcie kopolyméru P(3HB-co-3HV) a to pri použití propionátu sodného a kyseliny valerovej, pri čom väčšie zastúpenie 3-hydroxybutyrátu a to približne 97 mol% vykazovala vzorka, v ktorej bol ako prekursor použitý propionát sodný. Vo vzorke, v ktorej bola ako prekursor kyselina valerová, mal vo vzniknutom kopolyméry väčšie zastúpenie opäť 3-hydroxybutyrát a to približne 96 mol%.

Tabuľka 15 Produkcia PHA za využitia prekursorov a jednotlivé zastúpenie 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu v PHA

Prekursor	Biomasa [g/l]	PHA [g/l]	PHA [%]	3HB [mol %]	3HV [mol %]	4HB [mol %]
Propionát sodný	2,80 ± 0,11	1,164	41,59 ± 0,04	97,40	2,60	-
Kyselina valerová	0,57 ± 0,06	0,090	15,90 ± 0,00	95,70	4,31	-
1,4-butandiol	0,29 ± 0,00	0,019	6,61 ± 0,01	100	-	-

Pozn.: Pri použití prekursora 1,4-butandiolu baktéria *Chelatococcus sambhunathii* nebola schopná vyprodukovať kopolymér P(3HB-co-4HB).

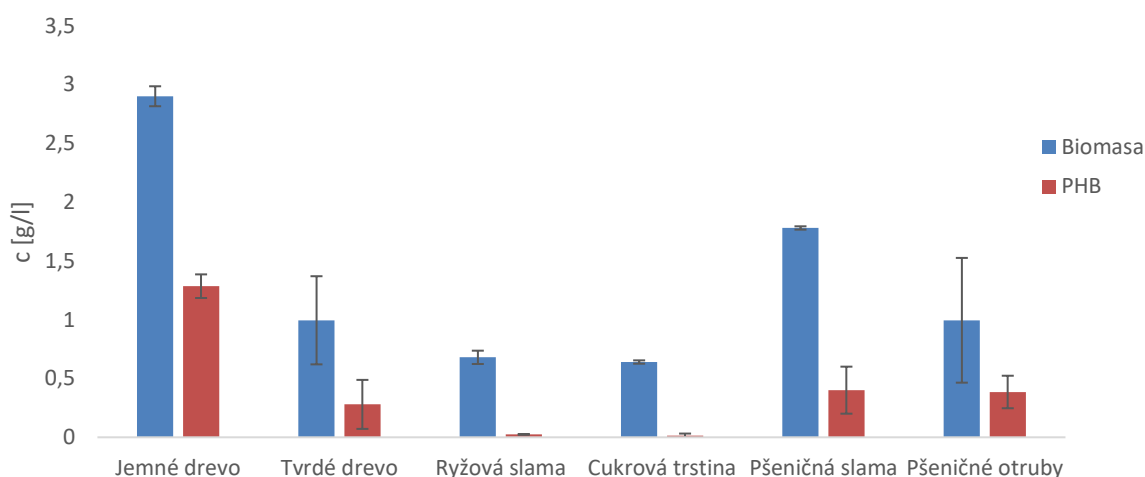
4.3.5 Produkcia PHA za využitia modelových hydrolyzátov

Obdobne ako u predchádzajúcej baktérie bol aj u bakteriálneho kmeňa *Chelatococcus sambhunathii* vykonaný experiment, u ktorého sme zisťovali či daná baktéria dokáže využiť modelové hydrolyzáty na produkciu PHB. Opäť boli použité rovnaké odpadné substráty ako v predchádzajúcom experimente. Kultivácia prebiehala 72 hodín pri 50°C a 180 rpm.

Po kultivácii bolo prevedené spektrofotometrické meranie zákalu pri 640 nm. Najvyššia hodnota absorbancie 0,440 bola nameraná u vzorky, v ktorej bol použitý hydrolyzát z jemného dreva. Predpokladám, že obdobne ako u baktérie *Chelatococcus composti* to je spôsobené tým, že v tomto odpadnom substráte je najviac zastúpená glukóza. Najnižšia hodnota absorbancie 0,148 bola zaznamenaná u vzorky, v ktorej bola použitá ryžová slama. V tomto hydrolyzáte má

najvyššie zastúpenie xylóza, čo má za následok, že baktéria *Chelatococcus sambhunathii* na svoj rast horšie využíva päť uhlíkové monosacharidy.

Ako môžeme vidieť na obrázku 15, najvyššia hodnota biomasy 2,90 g/l bola zaznamenaná u vzorky, v ktorej bol použitý substrát modelujúci zloženie hydrolyzáta z jemného dreva. Na tomto hydrolyzáte bola tiež dosiahnutá najvyššia koncentrácia PHB a to 1,28 g/l. O nepatrne nižšiu koncentráciu biomasy 1,78 g/l mala vzorka, v ktorej bol použitý modelový hydrolyzáta z pšeničnej slamy. Na tomto substráte bola tiež nameraná druhá najvyššia koncentrácia PHB a to 0,40 g/l. Predpokladám, že najlepšie využila baktéria *Chelatococcus sambhunathii* na svoj rast a produkciu PHB práve tieto dva substráty, pretože je tu najvyššia koncentrácia glukózy, u ktorej bol zaznamenaný z predchádzajúcich experimentov najlepší nárast bakteriálnej kultúry a taktiež druhá najvyššia koncentrácia PHB. Naopak najnižšiu koncentráciu biomasy 0,64 g/l a taktiež najnižšiu koncentráciu PHB 0,01 g/l obsahovala vzorka, ktorá bola kultivovaná na minerálnom médiu s obsahom modelového hydrolyzáta z cukrovej trstiny. V tomto hydrolyzáte má najvyššie zastúpenie xylóza, a ako môžeme vidieť aj v predchádzajúcich experimentoch, na tomto monosacharide je nárast bakteriálnej kultúry o polovicu nižší ako u glukózy. Z výsledkov, ktoré sú uvedené na obrázku 15 je vidieť, že baktéria *Chelatococcus sambhunathii* na svoj rast a produkciu PHB využíva najviac modelové hydrolyzáty, v ktorých má najvyššie zastúpenie glukóza.



Obrázok 15 Stanovenie koncentrácie biomasy a PHB pri použití rôznych modelových hydrolyzáto u baktérie *Chelatococcus sambhunathii* DSM 18167

4.3.5.1 Stanovenie redukujúcich sacharidov pomocou kyseliny 3,5-dinitrosalicylovej

Po kultivácii boli vo všetkých vzorkách spektrofotometricky stanovené redukujúce sacharidy pri vlnovej dĺžke 540 nm, aby sme zistili ako efektívne dokáže bakteriálny kmeň *Chelatococcus sambhunathii* využívať rôzne modelové hydrolyzáty na svoj rast a produkciu PHB. Počiatočná koncentrácia sacharidov vo všetkých vzorkách dosahovala hodnotu 20 g/l.

Po zmeraní absorbancie a následnom výpočte koncentrácie u zostatkových sacharidov (na výpočet bola opäť použitá kalibračná rovnica z obrázka 5) dosahovala najvyššiu koncentráciu 15,41 g/l vzorka, v ktorej boli použité ako odpadný hydrolyzáta pšeničné otruby, pretože je v tomto substráte najmenej zastúpená glukóza. Najnižšiu koncentráciu redukujúcich sacharidov 7,31 g/l a 7,97 g/l vykazovali vzorky, v ktorých boli použité hydrolyzáty z jemného dreva a pšeničnej slamy. Na týchto substrátoch dosahovala najvyššiu koncentráciu biomasa a taktiež tu bol zaznamenaný najvyšší obsah PHB (tabuľka 16).

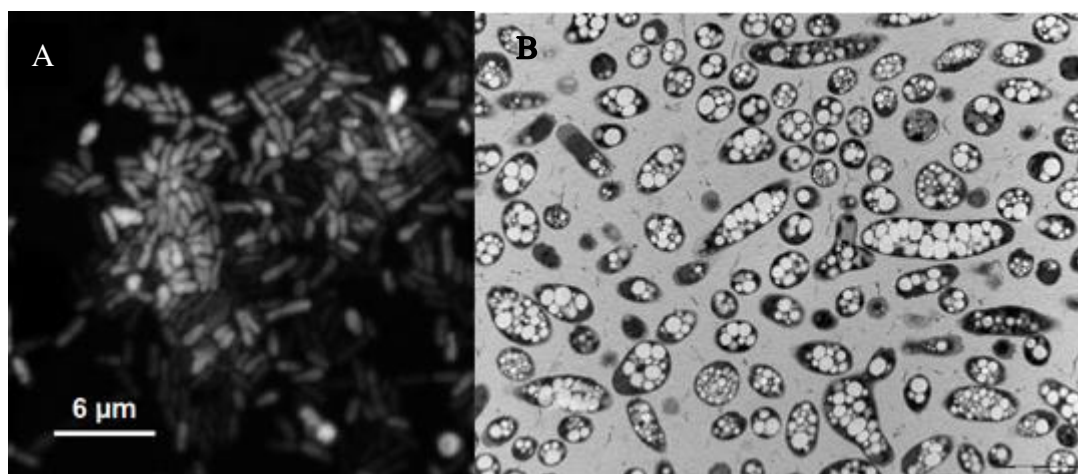
Tabuľka 16 Vypočítané koncentrácie biomasy, PHB a residuálnych sacharidov pri použití rôznych modelových hydrolyzátorov

	Biomasa [g/l]	PHB [g/l]	Residuálne sacharidy [g/l]	Spotrebované sacharidy [g/l]	Y _{P/S}
Mäkké drevo	2,90 ± 0,08	1,28 ± 0,10	7,97 ± 0,48	12,03	0,11
Tvrde drevo	1,00 ± 0,37	0,28 ± 0,21	12,26 ± 0,91	7,74	0,04
Ryžová slama	0,68 ± 0,06	0,02 ± 0,00	12,08 ± 1,05	7,92	0,003
Cukrová trstina	0,64 ± 0,01	0,01 ± 0,02	14,44 ± 0,55	5,56	0,002
Pšeničná slama	1,78 ± 0,01	0,40 ± 0,20	7,31 ± 0,01	12,69	0,03
Pšeničné otruby	1,00 ± 0,53	0,39 ± 0,14	15,41 ± 0,53	4,59	0,08

4.3.6 Mikroskopické pozorovanie PHA u baktérie *Chelatococcus sambhunathii*

Na mikroskopické pozorovanie polyhydroxyalkanoátov bola taktiež využitá fluorescenčná a transmisná elektrónová mikroskopia.

Bakteriálne bunky boli zafarbené fluorescenčným farbivom BODIPY 493/503 a následne boli pozorované fluorescenčnou mikroskopiou. Ako môžeme vidieť na obrázku 16 A, bakteriálne bunky majú tyčinkovitý tvar ako je uvedené v literatúre. Pre veľmi malú veľkosť bakteriálnych buniek podobne ako u baktérie *Chelatococcus composti* nebolo možné pomocou fluorescenčnej mikroskopie pozorovať PHA granule a preto boli vzorky poslané na transmisnú elektrónovú mikroskopiou. Ako môžeme vidieť na obrázku 16 B, bakteriálne bunky sú opäť plné menších PHA granúl, čo je charakteristické pre rod *Chelatococcus*.



Obrázok 16 Zobrazenie bakteriálnej bunky *Chelatococcus sambhunathii* DSM 18167 pomocou fluorescenčnej mikroskopie (A) a transmisnej elektrónovej mikroskopie (B)

5 ZÁVER

Cieľom bakalárskej práce bolo stanovenie najvhodnejších podmienok pre produkciu polyhydroxyalkanoátov pomocou bakteriálnych kmeňov *Chelatococcus composti* a *Chelatococcus sambhunathii*. Experimentálna časť bola zameraná na výber najvhodnejšieho uhlíkového substrátu, optimálnej teploty a taktiež bol sledovaný vplyv prekursorov na nárast biomasy a produkciu PHA. Posledná časť experimentu skúmala, či dané bakteriálne kmene dokážu využiť modelové hydrolyzáty na produkciu PHA. Navyše boli bakteriálne bunky a PHA granule pozorované pomocou fluorescenčnej a transmisnej elektrónovej mikroskopie.

Na začiatku experimentálnej časti bol u bakteriálnych kmeňov *Chelatococcus composti* a *Chelatococcus sambhunathii* preukázaný *phaC* gén pomocou polymerázovej reťazovej reakcie, čím sa nám potvrdilo, že oba bakteriálne kmene majú predispozíciu na produkciu PHA.

Pri výbere najvhodnejšieho uhlíkového zdroja pre nárast biomasy bolo pomocou spektrofotometrického merania zákalu zistené, že najlepšie zdroje uhlíka pre baktériu *Chelatococcus composti* predstavujú glukóza, fruktóza a xylóza. U baktérie *Chelatococcus sambhunathii* boli za najlepšie uhlíkové zdroje na základe získaných výsledkov určené glukóza, fruktóza a manóza. Tieto zdroje uhlíka boli ďalej použité pre produkciu PHA.

Ako najvhodnejší uhlíkový substrát pre produkciu PHA bola u oboch bakteriálnych kmeňov zistená glukóza. U baktérie *Chelatococcus composti* bola na tomto substráte zaznamenaná najvyššia produkcia PHA a taktiež najvyšší nárast biomasy. U bakteriálneho kmeňa *Chelatococcus sambhunathii* bol na tomto substráte dosiahnutý najvyšší nárast biomasy a bola tu zaznamenaná druhá najvyššia koncentrácia PHA.

Pri výbere optimálnej teploty pre rast bakteriálnej kultúry a taktiež produkciu PHA bola u oboch bakteriálnych kmeňov stanovená teplota 45°C. Pri vyšších kultivačných teplotách nastalo zhoršenie rastu bakteriálnej kultúry a taktiež tu bola znížená produkcia PHA.

Pri sledovaní vplyvu vybraných prekursorov na nárast biomasy a taktiež tvorbu PHA bolo zistené, že prekursor pôsobí inhibične na oba bakteriálne kmene, čo mohlo byť spôsobené tým, že prekursor bol pridaný k bakteriálnemu kmeňu hneď na začiatku experimentu, čiže v lag fáze. Najvyšší nárast biomasy a taktiež najvyššia koncentrácia PHA bola dosiahnutá pri vzorke, ktorá v minerálnom médiu obsahovala propionát sodný. Pravdepodobne to bolo spôsobené tým, že k tomuto prekursoru bola najviac pridaná glukóza, ktorá slúžila ako zdroj uhlíka. Najvyššie množstvo 3-hydroxyvalerátu bolo stanovené u baktérie *Chelatococcus composti* po pridaní kyseliny valerovej, kde bol daný prekursor využitý najlepšie pre syntézu kopolyméru. Napriek toxickému pôsobeniu vybraných prekursorov na nárast bakteriálnej kultúry bola u oboch bakteriálnych kmeňov zaznamenaná tvorba kopolyméru P(3HB-co-3HV) po pridaní propionátu sodného a kyseliny valerovej do minerálneho média.

Oba bakteriálne kmene boli schopné utilizovať modelové hydrolyzáty k tvorbe PHA. U bakteriálneho kmeňa *Chelatococcus composti* a *Chelatococcus sambhunathii* boli najlepšie využité hydrolyzáty, ktoré obsahovali najvyšší podiel glukózy. Na týchto substrátoch bol zaznamenaný najlepší nárast biomasy a taktiež najvyššia koncentrácia PHA. Naopak, najhoršie boli využité odpadné hydrolyzáty, ktoré vo svojom zložení obsahovali najvyšší podiel xylózy, čo sa nám potvrdilo aj pri stanovení redukujúcich sacharidov vo vzorke, kde koncentrácia zostatkových sacharidov dosahovala najvyšších hodnôt.

Na základe získaných výsledkov môžeme konštatovať, že oba bakteriálne kmene sú vhodné pre biotechnologickú produkciu PHA. Baktérie *Chelatococcus composti* a *Chelatococcus sambhunathii* majú rovnaké nároky pre rast a produkciu biopolymérov a na základe získaných výsledkov sa skôr radia k termotolerantným baktériám, napriek tomu sú schopné rastu a produkcie aj pri vyšších teplotách, ale sa znižuje kvantita biomasy a tvorby PHA.

6 POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] SATHYA, A. B., V. SIVASUBRAMANIAN, A. SANTHIAGU, Chitra SEBASTIAN a R. SIVASHANKAR. Production of Polyhydroxyalkanoates from Renewable Sources Using Bacteria. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2018, **26**(9), 3995-4012 [cit. 2019-11-30]. DOI: 10.1007/s10924-018-1259-7. ISSN 1566-2543. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10924-018-1259-7>
- [2] KOSSEVA, Maria R. a Edy RUSBANDI. Trends in the biomanufacture of polyhydroxyalkanoates with focus on downstream processing. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2018, 107, 762-778 [cit. 2019-05-05]. ISSN 0141-8130. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813017323140>
- [3] ALI RAZA, Zulfiqar, Sharjeel ABID a Ibrahim M. BANAT. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation* [online]. 2018, 126, 45-56 [cit. 2019-05-05]. ISSN 0964-8305. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830517300276>
- [4] KOLLER, Martin, Christos P. PAPANEOPHYTOU, Agathi G. PRITSA, et al. Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters by Extremophiles? *MOJ Polymer Science* [online]. 2017, 1(2), 847-853 [cit. 2019-12-02]. DOI: 10.15406/mojps.2017.01.00011. ISSN 25749773. Dostupné z: <https://medcraveonline.com/MOJPS/production-of-poly-hydroxyalkanoate-pha-biopolyesters-by-extremophiles.html>
- [5] ZOU, Huibin, Mengxun SHI, Tongtong ZHANG, Lei LI, Liangzhi LI a Mo XIAN. Natural and engineered polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase: key enzyme in biopolyester production. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2017, 101(20), 7417-7426 [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.1007/s00253-017-8485-0. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-017-8485-0>
- [6] SON, Hyeoncheol Francis, Sagong HYE-YOUNG, Choi SO YOUNG, Lee SANG YUP a Kim KYUNG-JIN. Structural Insights into Polyhydroxyalkanoates Biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 2018, 43(10), 790-805 [cit. 2019-05-05]. ISSN 0968-0004. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968000418301531>
- [7] ANJUM, Anbreen, Mohammad ZUBER, Khalid Mahmood ZIA, Aqdas NOREEN, Muhammad NAVEED ANJUM a Shazia TABASUM. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2016, 89, 161-174 [cit. 2019-05-05]. ISSN 0141-8130. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813016303774>

- [8] MOŹEJKO-CIESIELSKA, Justyna a Robert KIEWISZ. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous?. *Microbiological Research* [online]. 2016,192, 271-282 [cit. 2019-05-05]. ISSN 0944-5013. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S094450131630043X>
- [9] SUDESH, K, H ABE a Y DOI. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science* [online]. 2000, **25**(10), 1503-1555 [cit. 2019-11-18]. DOI: 10.1016/S0079-6700(00)00035-6. ISSN 00796700. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670000000356>
- [10] MAESTRO, Beatriz a Jesús M. SANZ. Polyhydroxyalkanoate-associated phasins as phylogenetically heterogeneous, multipurpose proteins. *Microbial Biotechnology* [online]. 2017, 10(6), 1323-1337 [cit. 2020-04-06]. DOI: 10.1111/1751-7915.12718. ISSN 1751-7915. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1751-7915.12718>
- [11] CHEN, G. Q., I. HAJNAL, H. WU, L LV a J. YE. Engineering Biosynthesis Mechanisms for Diversifying Polyhydroxyalkanoates. *Trends in Biotechnology*. 2015, 33(10), 565-574. DOI: 10.1016/j.tibtech.2015.07.007. ISSN 01677799. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779915001596>
- [12] REDDY, C.S.K, R GHAI, RASHMI a V.C KALIA. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology* [online]. 2003, **87**(2), 137-146 [cit. 2019-12-01]. DOI: 10.1016/S0960-8524(02)00212-2. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852402002122>
- [13] GUPTA, G.N., S. SRIVASTAVA, S.K. KHARE a V. PRAKASH. Extremophiles: An Overview of Microorganism from Extreme Environment. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology* [online]. 2014, 7(2), 137-146 [cit. 2019-12-01]. DOI: 10.5958/2230-732X.2014.00258.7. ISSN 0974-1712. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852402002122>
- [14] GUO-QIANG, Chen a Jiang XIAO-RAN. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2018, 50, 94-100 [cit. 2019-05-05]. ISSN 0958-1669. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166917301519>
- [15] CORRAL, Paulina, Mohammad A. AMOOZEGAR a Antonio VENTOSA. Halophiles and Their Biomolecules: Recent Advances and Future Applications in Biomedicine. *Marine Drugs* [online]. 2020, 18(1) [cit. 2020-04-06]. DOI: 10.3390/md18010033. ISSN 1660-3397. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1660-3397/18/1/33>

- [16] YIN, Jin, Jin-Chun CHEN, Qiong WU a Guo-Qiang CHEN. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Biotechnology Advances* [online]. 2015, 33(7), 1433-1442 [cit. 2020-04-07]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.10.008. ISSN 07349750. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975014001578>
- [17] LE BORGNE, Sylvie, Dayanira PANIAGUA a Rafael VAZQUEZ-DUHALT. Biodegradation of Organic Pollutants by Halophilic Bacteria and Archaea. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* [online]. 2008, 15(2-3), 74-92 [cit. 2020-04-08]. DOI: 10.1159/000121323. ISSN 1464-1801. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/121323>
- [18] KRISTJANSSON, Jakob K. Thermophilic bacteria. Boca Raton, c1992. ISBN 08-493-5239-8.
- [19] CHARLIER, D. a L. DROOGMANS. Microbial Life at high temperature, the challenges, the strategies. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2005, 62(24), 2974-2984 [cit. 2019-12-01]. DOI: 10.1007/s00018-005-5251-8. ISSN 1420-682X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-005-5251-8>
- [20] SCHIRALDI, Chiara a Mario DE ROSA. Mesophilic Organisms. *Encyclopedia of Membranes* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016, 2014-12-9, 62(24), 1-2 [cit. 2019-12-01]. DOI: 10.1007/978-3-642-40872-4_1610-2. ISBN 978-3-642-40872-4. ISSN 1420-682X. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-40872-4_1610-2
- [21] BERGQUIST, P.L., D.R. LOV, J.E. CROFT, M.B. STREIFF, R.M. DANIEL a W.H. MORGAN. Genetics and Potential Biotechnological Applications of Thermophilic and Extremely Thermophilic Microorganisms. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* [online]. 1987, 5(1), 199-244 [cit. 2020-04-08]. DOI: 10.1080/02648725.1987.10647838. ISSN 0264-8725. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02648725.1987.10647838>
- [22] MESBAH, Noha M. a Juergen WIEGEL. Life at Extreme Limits. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008, 2014-12-9, 1125(1), 44-57 [cit. 2019-12-01]. DOI: 10.1196/annals.1419.028. ISBN 978-3-642-40872-4. ISSN 00778923. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1196/annals.1419.028>
- [23] FUKUCHI, Satoshi a Ken NISHIKAWA. Protein surface amino acid compositions distinctively differ between thermophilic and mesophilic bacteria. *Journal of Molecular Biology* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2001, 2014-12-9, 309(4), 835-843 [cit. 2019-12-01]. DOI: 10.1006/jmbi.2001.4718. ISBN 978-3-642-40872-4. ISSN 00222836. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283601947187>

- [24] NAKASHIMA, H. a Ken NISHIKAWA. Compositional Changes in RNA, DNA and Proteins for Bacterial Adaptation to Higher and Lower Temperatures. *Journal of Biochemistry* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2001, 2014-12-9, 133(4), 507-513 [cit. 2019-12-01]. DOI: 10.1093/jb/mvg067. ISBN 978-3-642-40872-4. ISSN 0021924X. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jb/article-lookup/doi/10.1093/jb/mvg067>
- [25] URBIETA, M. Sofía, Edgardo R. DONATI, Kok-Gan CHAN, Saleha SHAHAR, Lee Li SIN a Kian Mau GOH. Thermophiles in the genomic era: Biodiversity, science, and applications. *Biotechnology Advances* [online]. 2015, 33(6), 633-647 [cit. 2020-04-09]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.04.007. ISSN 07349750. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975015000725>
- [26] SHARMA, Sunny, Surbhi VAID, Bilqeesa BHAT, Satbir SINGH a Bijender Kumar BAJAJ. Thermostable Enzymes for Industrial Biotechnology. *Advances in Enzyme Technology* [online]. Elsevier, 2019, 2019, , 469-495 [cit. 2020-04-09]. DOI: 10.1016/B978-0-444-64114-4.00017-0. ISBN 9780444641144. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444641144000170>
- [27] CAVA, Felipe, Aurelio HIDALGO a José BERENGUER. *Thermus thermophilus* as biological model. *Extremophiles* [online]. 2009, 13(2), 213-231 [cit. 2020-04-09]. DOI: 10.1007/s00792-009-0226-6. ISSN 1431-0651. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00792-009-0226-6>
- [28] SAHOO, Kalpana, Rajesh Kumar SAHOO, Mahendra GAUR a Enketeswara SUBUDHI. Cellulolytic thermophilic microorganisms in white biotechnology: a review. *Folia Microbiologica* [online]. 2020, 65(1), 25-43 [cit. 2020-04-12]. DOI: 10.1007/s12223-019-00710-6. ISSN 0015-5632. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12223-019-00710-6>
- [29] BRUINS, Marieke E., Anja E. M. JANSSEN a Remko M. BOOM. Thermozyms and Their Applications: A Review of Recent Literature and Patents. *Applied Biochemistry and Biotechnology* [online]. 2001, 90(2), 155-186 [cit. 2020-04-13]. DOI: 10.1385/ABAB:90:2:155. ISSN 0273-2289. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1385/ABAB:90:2:155>
- [30] REKADWAD, Bhagwan a Juan M. GONZALEZ. Multidisciplinary involvement and potential of thermophiles. *Folia Microbiologica* [online]. 2019, 64(3), 389-406 [cit. 2020-04-13]. DOI: 10.1007/s12223-018-0662-8. ISSN 0015-5632. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12223-018-0662-8>
- [31] XIAO, Zijun, Yu ZHANG, Lijun XI, Fangfang HUO, Jing-yi ZHAO a Jing LI. Thermophilic production of polyhydroxyalkanoates by a novel *Aneurinibacillus* strain isolated from Gudao oilfield, China. *Journal of Basic Microbiology* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015, 2014-12-9, 55(9), 1125-1133 [cit. 2019-12-01]. DOI: 10.1002/jobm.201400843. ISBN 978-3-642-40872-4. ISSN 0233111X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jobm.201400843>

- [32] DAVIS, Reeta, Rashmi KATARIA, Federico CERRONE, et al. Conversion of grass biomass into fermentable sugars and its utilization for medium chain length polyhydroxyalkanoate (mcl-PHA) production by *Pseudomonas* strains. *Bioresource Technology* [online]. 2013, 150, 202-209 [cit. 2019-12-02]. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.10.001. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852413015812>
- [33] PANTAZAKI, Anastasia A., Christos P. PAPANEOPHYTOU, Agathi G. PRITSA, et al. Production of polyhydroxyalkanoates from whey by *Thermus thermophilus* HB8. *Process Biochemistry* [online]. 2009, 44(8), 847-853 [cit. 2019-12-02]. DOI: 10.1016/j.procbio.2009.04.002. ISSN 13595113. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511309001123>
- [34] KOLLER, Martin, Christos P. PAPANEOPHYTOU, Agathi G. PRITSA, et al. Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters by Extremophiles? *MOJ Polymer Science* [online]. 2017, 1(2), 847-853 [cit. 2019-12-02]. DOI: 10.15406/mojps.2017.01.00011. ISSN 25749773. Dostupné z: <https://medcraveonline.com/MOJPS/production-of-poly-hydroxyalkanoate-polybiopolyesters-by-extremophiles.html>
- [35] ZHANG, Zhenhua, Juan ZHAO, Cigang YU, et al. *Chelatococcus composti* sp. nov., isolated from penicillin fermentation fungi residue with pig manure co-compost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2017, 67(3), 565-569 [cit. 2019-12-02]. DOI: 10.1099/ijsem.0.001651. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.001651>
- [36] PANDAY, D., S. K. DAS, Cigang YU, et al. *Chelatococcus sambhunathii* sp. nov., a moderately thermophilic alphaproteobacterium isolated from hot spring sediment. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* [online]. 2010, 60(4), 861-865 [cit. 2019-12-02]. DOI: 10.1099/ijs.0.013466-0. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.013466-0>
- [37] ŠMARDA, Jan, Jiří DOŠKAŘ, Roman PANTŮČEK, Vladislava RŮŽIČKOVÁ a Jana KOPTÍKOVÁ. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.
- [38] XU, Fuqian, Shaobin HUANG, Yong LIU, Yongqing ZHANG a Shaowei CHEN. Comparative study on the production of poly(3-hydroxybutyrate) by thermophilic *Chelatococcus daeguensis* TAD1: a good candidate for large-scale production. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2014, 98(9), 3965-3974 [cit. 2020-06-29]. DOI: 10.1007/s00253-014-5524-y. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-014-5524-y>

- [39] ANJUM, Anbreen, Mohammad ZUBER, Khalid Mahmood ZIA, Aqdas NOREEN, Muhammad Naveed ANJUM a Shazia TABASUM. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2016, 89, 161-174 [cit. 2020-06-23]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813016303774>
- [40] BEEBY, M., M. CHO, J. STUBBE a G. J. JENSEN. Growth and Localization of Polyhydroxybutyrate Granules in *Ralstonia eutropha*. *Journal of Bacteriology* [online]. 2012, 194(5), 1092-1099 [cit. 2020-07-09]. DOI: 10.1128/JB.06125-11. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <https://jb.asm.org/content/194/5/1092>

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

PHA - polyhydroxyalkanoáty

scl-PHA - polyhydroxyalkanoáty s krátkym reťazcom

mcl-PHA - polyhydroxyalkanoáty so stredne dlhým reťazcom

lcl-PHA - polyhydroxyalkanoáty s dlhým reťazcom

P(3HB-co-3HV) - kopolymér 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalterátu

P(3HB-co-4HB) – kopolymér 3-hydroxybutyrátu a 4-hydroxybutyrátu

CoA - koenzým A

PHB - polyhydroxybutyrát

DNA - deoxyribonukleová kyselina

RNA - ribonukleová kyselina

G - guanidín

C - cytozín

Glu - kyselina glutámová

Asp - kyselina asparágová

Lys - lyzín

Arg - arginín

Ser - serín

Thr - threonín

Asn - asparagín

Gln - glutamín

EDTA - etyléndiamíntetraoctová kyselina

TES - trace elements solution

PCR - polymerázová reťazová reakcia

TBE - Tris-borát-EDTA

ELISA reader - Enzyme-linked immunosorbent assai reader

4HB - 4-hydroxybutyrát

3HV - 3-hydroxyvalerát

GC-FID - plynová chromatografia s plameňovo-ionizačným detektorom

TEM - transmisná elektrónová mikroskopia

PK - pozitívna kontrola

NK - negatívna kontrola

R - rebríček