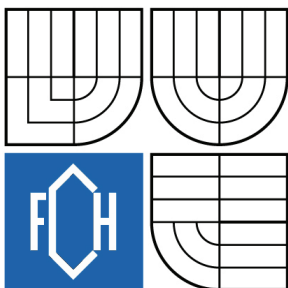


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM PRODUKCE POLYHYDROXYBUTYRÁTU U BAKTERIÍ

STUDY OF POLYHYDROXYBUTYRATE PRODUCTION IN BACTERIA

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

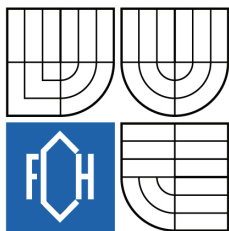
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. SOŇA MELUŠOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

doc. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2009



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0239/2008	Akademický rok: 2008/2009
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Soňa Melušová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí diplomové práce:	doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.	
Konzultanti diplomové práce:		

Název diplomové práce:

Studium produkce polyhydroxybutyrátu u bakterií

Zadání diplomové práce:

1. Rešerše - struktura a fyziologická role PHB, produkční mikroorganismy
2. Metody stanovení PHB, optimalizace postupů regulace produkce PHB.
3. Studium podmínek produkce PHB u vybraných bakteriálních druhů, regulace tvorby PHB pomocí změny kultivačních podmínek a složení média.

Termín odevzdání diplomové práce: 22.5.2009

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

Bc. Soňa Melušová
Student(ka)

doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.10.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Predložená diplomová práca je zameraná na štúdium produkcie polyhydroxybutyrátu (PHB) u baktérií. Po stručnej charakteristike PHB ako najvýznamnejšieho predstaviteľa širokej skupiny polyhydroxyalkanoátov (PHA) v teoretickej časti, bola prakticky sledovaná produkcia polyméru PHB, resp. kopolyméru P(HB-co-HV), u vybraných bakteriálnych kmeňov. V prvej časti bola študovaná produkcia PHB baktériou *Bacillus megaterium* na syntetickom médiu. Dosahované koncentrácie PHB v bunkách boli navýšené až prevedením kultúry do limitovaného média, na úkor rastu. Prídavok etanolu do média podporil nielen syntézu produktu, ale aj rast (21 % PHB z 1,8 g/l biomasy). Následne bolo otestované produkčné BM médium s prídavkom glukózy (8 g/l). Produkcia PHB bola viac ako 1 g/l pri výraznom náraste kultúry oproti syntetickému médiu. Baktéria *B.megaterium* okrem glukózy preukázala schopnosť utilizovať xylózu a maltózu. Ďalšie kultivácie boli prevedené s baktériou *Azotobacter vinelandii* syntetizujúcou kopolymér P(HB-co-HV). Maximum rastu a produkcie kopolyméru bolo dosiahnuté na Burkovom médiu s 30 g/l glukózy. Prídavok peroxidu do média vyvolal nárast v obsahu P(HB-co-HV) – 46 % kopolyméru z 2,6 g/l biomasy. Baktéria *A.vinelandii* najlepšie rástla na maltóze, dokonca aj v porovnaní s glukózou (54 % kopolyméru z obsahu biomasy). V závere bola sledovaná produkcia PHB s využitím priemyselného odpadného produktu – srvátky. Modifikácia srvátkového média bola vykonaná pomocou štatistickej optimalizačnej metódy Plackett-Burman. Baktéria *B.megaterium* vyprodukovala na upravenej srvátke 0,5 g/l PHB, 32 % z biomasy.

KLÍČOVÁ SLOVA

Polyhydroxyalkanoáty, polyhydroxybutyrát, *Bacillus megaterium*, *Azotobacter vinelandii*, srvátka.

ABSTRACT

Presented work is focused on study of polyhydroxybutyrate production in bacteria. In theoretical part short characterization of PHB was given and the most common representative of wide group of polyhydroxyalkanoates (PHA) were described. Then, production of PHB and copolymer P(HB-co-HV) in selected bacterial strains was experimentally proven. First, PHB production in *Bacillus megaterium* using synthetic medium was studied. The PHB content in cells was increased during cultivation under limiting conditions, despite low growth. Addition of ethanol into production media resulted in increased PHB synthesis as well as biomass production (21 % PHB of 1,8 g/l biomass). Further, BM medium containing 8 g/l glucose was tested. PHB production was more than 1 g/l at significant growth increase when compared with synthetic medium. The bacteria *B.megaterium* showed, except glucose, ability to utilize maltose and xylose. Another cultivations were tested with bacterial strain *Azotobacter vinelandii*, which is capable of copolymer P(HB-co-HV) synthesis. Maximal growth and copolymer content was reached on Burk's medium with 30 g/l of glucose. Addition of peroxide to growth medium influenced P(HB-co-HV) synthesis to 46 % of 2,6 g/l biomass. Bacteria *A.vinelandii* showed the best growth on maltose, even compared with glucose (54 % copolymer of biomass content). Finally, PHB production on industrial waste product – whey was monitored. Using Plackett-Burman design for statistical media optimization, the whey content was modified. *B.megaterium* grown on adjusted whey reached 0,5 g/l PHB, 32 % of cell's content.

KEYWORDS

Polyhydroxyalkanoates, polyhydroxybutyrate, *Bacillus megaterium*, *Azotobacter vinelandii*, whey.

MELUŠOVÁ, S. *Studium produkce polyhydroxybutyrátu u bakterií*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 84 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Podakovanie:

Moje podakovanie patrí predovšetkým doc. RNDr. Ivane Márovej, CSc. za všestranné rady, a taktiež Ing. Stanislavovi Obručovi za trpezlivú pomoc v priebehu celej diplomovej práce.

Rovnako chcem poďakovať Ing. Zdenkovi Svobodovi z Výskumného ústavu pivovarského a sladařského v Brne.

1. OBSAH

2. ÚVOD	9
3. TEORETICKÁ ČASŤ	10
3.1. Polyhydroxyalkanoáty	10
3.1.1. Štruktúra PHA	10
3.1.2. Formovanie PHA v bunkách	11
3.1.3. Syntéza PHA	12
3.1.4. Vlastnosti PHB a jeho kopolymérov	14
3.1.5. Aplikácie PHA polymérov v rôznych odvetviach	14
3.1.5.1. Stratégie priemyselnej výroby PHA	15
3.1.5.2. Vybrané priemyselné formy PHA	16
3.1.5.3. Vývoj priemyselnej produkcie PHA	16
3.1.6. Biodegradácia PHA	17
3.2. Produkčné mikroorganizmy	17
3.2.1. <i>Bacillus megaterium</i>	17
3.2.2. <i>Azotobacter vinelandii</i>	18
3.2.3. <i>Wautersia eutropha</i>	19
4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	20
4.1. Použitý materiál, chemikálie a prístroje	20
4.1.1. Bakteriálne kmene	20
4.1.2. Chemikálie	20
4.1.2.1. Chemikálie pre kultiváciu mikroorganizmov	20
4.1.2.2. Chemikálie pre stanovenie PHA	20
4.1.3. Prístrojové vybavenie	21
4.2. Analytické metódy stanovenia obsahu PHA	21
4.2.1. Spektrofotometrická analýza v UV oblasti	21
4.2.2. HPLC analýza PHB	22
4.2.3. GC analýza PHB a P(HB-co-HV) s FID detekciou	22
4.3. Kultivácia baktérie <i>Bacillus megaterium</i> CCM 2037	22
4.3.1. Uchovávanie kultúry	22
4.3.1.1. Živné médiá	23
4.3.1.2. Kultivačné podmienky	23
4.3.2. Rast a produkcia PHB na BM médiu	24
4.3.2.1. Stanovenie sušiny a kalibrácia biomasy	24
4.3.2.2. Stanovenie koncentrácie PHB	24
4.3.3. Rast a produkcia PHB na syntetickom médiu	24
4.3.3.1. Vplyv limitácie obsahu dusíka a fosforu	24
4.3.3.2. Vplyv rôznych stresových faktorov	25
4.3.4. Kultivácia <i>B. megaterium</i> na ďalších médiách	25
4.3.5. Optimalizácia zloženia BM média	25
4.3.6. Rast a produkcia PHB na obohatenom BM médiu	25

4.3.6.1. Stanovenie koncentrácie zvyškovej glukózy v médiu	25
4.3.6.2. Testovanie limitácie kyslíkom na obohatenom médiu.....	26
4.3.7. Kultivácia <i>B.megaterium</i> na rôznych sacharidových substrátoch	26
4.4. Kultivácia baktérie <i>Azotobacter vinelandii</i> CCM 289	26
4.4.1. Uchovávanie kultúry	26
4.4.1.1. Živné médiá	26
4.4.1.2. Kultivačné podmienky	27
4.4.2. Porovnanie rastu <i>A.vinelandii</i> a produkcie PHA na rôznych médiách.....	28
4.4.2.1. Stanovenie sušiny a kalibrácia biomasy	28
4.4.2.2. Stanovenie kopolyméru P(HB-co-HV).....	28
4.4.3. Optimalizácia koncentrácie glukózy v médiu A a Burkovom médiu	28
4.4.4. Rast <i>A.vinelandii</i> a produkcia PHA na Burkovom médiu.....	28
4.4.4.1. Vplyv aplikácie stresových faktorov	28
4.4.5. Kultivácia <i>A.vinelandii</i> na rôznych zdrojoch uhlíka	29
4.5. Kultivácie bakteriálnych kmeňov na odpadnej srvátke	29
4.5.1. Analýza chemického zloženia srvátky.....	29
4.5.1.1. Prvotná úprava srvátky	29
4.5.1.2. Stanovenie sušiny.....	29
4.5.1.3. Stanovenie popola.....	29
4.5.1.4. Biuretové stanovenie bielkovín v srvátke	29
4.5.1.5. Celkový obsah fosforu v popole srvátky	30
4.5.1.6. Určenie celkového obsahu dusíka podľa Kjeldalha.....	30
4.5.1.7. Spektrofotometrická analýza hrubej bielkoviny v srvátke.....	31
4.5.1.8. HPLC analýza obsahu cukrov v srvátke	31
4.5.2. Porovnanie rastu a produkcie vybraných bakteriálnych kmeňov kultivovaných na srvátke.....	31
4.5.2.1. Analýza úbytku cukrov v srvátke pri kultivácii rôznych baktérií.....	34
4.5.3. Kultivácia <i>B.megaterium</i> na upravenej a neupravenej srvátke.....	34
4.5.4. Optimalizácia zloženia srvátky pomocou štatistickej metódy Plackett-Burman	34
4.5.5. Optimalizácia riedenia srvátky.....	35
5. VÝSLEDKY A DISKUSIA	36
5.1. Porovnanie metód analýzy PHA	36
5.1.1. Spektrofotometrické stanovenie v UV oblasti	36
5.1.2. HPLC analýza PHB	39
5.1.3. GC analýza PHB a P(HB-co-HV) s FID detekciou	42
5.2. Kultivácia baktérie <i>Bacillus megaterium</i> CCM 2037	46
5.2.1. Rast a produkcia na BM médiu.....	46
5.2.2. Rast a produkcia PHB baktériou <i>B. megaterium</i> na syntetickom médiu.....	48
5.2.2.1. Stanovenie rastovej krivky.....	48
5.2.2.2. Rast na syntetickom médiu so zníženým obsahom dusíka a fosforu.....	50
5.2.2.3. Vplyv aplikácie stresových faktorov na rast a produkciu PHB	53
5.2.3. Rast baktérie <i>B. megaterium</i> na rôznych živných médiách	54
5.2.4. Optimalizácia zloženia BM média.....	55
5.2.5. Rast na obohatenom BM médiu.....	56

5.2.5.1. Vplyv limitácie kyslíkom v médiu na rast a produkciu PHB	57
5.2.6. Kultivácia <i>B.megaterium</i> na rôznych substrátoch	58
5.3. Kultivácia baktérie <i>Azotobacter vinelandii</i> CCM 289	60
5.3.1. Rast a produkcia P(HB-co-HV) baktériou <i>A.vinelandii</i> na rôznych médiách....	60
5.3.1.1. Stanovenie kalibračnej závislosti nárastu biomasy	60
5.3.1.2. Porovnanie rastu <i>A.vinelandii</i> na rôznych médiách	60
5.3.1.3. Výsledky optimalizácie obsahu glukózy v médiách	62
5.3.2. Rast a produkcia <i>A.vinelandii</i> na Burkovom médiu s 30 g/l glukózy	63
5.3.2.1. Vplyv aplikácie stresových faktorov	65
5.3.3. Rast <i>A.vinelandii</i> na rôznych substrátoch	66
5.4. Kultivácia bakteriálnych kmeňov na srvátke.....	68
5.4.1. Chemické zloženie upravenej srvátky	68
5.4.1.1. Stanovenie sušiny	68
5.4.1.2. Stanovenie popola	69
5.4.1.3. Biuretové stanovenie rozpustných bielkovín v srvátke	69
5.4.1.4. Stanovenie celkového obsahu fosforu v popole srvátky	70
5.4.1.5. Stanovenie celkového dusíku podľa Kjeldahla	70
5.4.1.6. Spektrofotometrické stanovenie obsahu bielkovín Nesslerovým činidlom	71
5.4.1.7. HPLC analýza obsahu cukrov v srvátke	72
5.4.2. Rast a produkcia PHA vybraných bakteriálnych kmeňov kultivovaných na srvátke..	73
5.4.2.1. Utilizácia laktózy baktériami	75
5.4.3. Rast baktérie <i>B.megaterium</i> na upravenej a neupravenej srvátke	75
5.4.4. Optimalizácia zloženie srvátky pomocou štatistickej metódy Plackett-Burman	76
5.4.5. Optimalizácia riedenia srvátky	78
6. ZÁVER.....	79
7. ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV	81
8. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV	84

2. ÚVOD

Už viac ako jedno storočie sú ropné plasty bežnou súčasťou nášho života. Takmer všetky potraviny sú zabalené práve do plastov. Plasty sú v oblečení aj elektronike. Plasty sú všade. Získali si našu pozornosť obdivuhodnými vlastnosťami ako je nízka hmotnosť v kontraste s pevnosťou ocele, tvarovateľnosť, elasticita, tepelná stálosť, možnosť rôznorodých povrchových úprav a zafarbenia. Široké využitie ropných plastov je v tomto prípade zaslúžilé.

Svetová spotreba petrochemických polymérov činí viac ako 200 mil. ton, s každoročným nárastom približne o 5 %, pričom k spracovaniu je potrebné vyťažiť viac ako 215 mil. ton fosílnych palív. Zvyšujúca sa cena ropy a zemného plynu môže mať preto značný vplyv na petrochemický priemysel výroby plastov. Okrem iného, v dnešnej dobe ohrozuje výrobu fakt, že aj niekoľko desaťročí dokážu odolávať rozkladu pôsobením prírodných environmentálnych síl, a aj keď začnú podliehať korozívnym vplyvom, uvoľňujú do životného prostredia množstvo nebezpečných chemických aditív používaných pri ich výrobe [1,2].

V posledných rokoch bol preto záujem zameraný na vývoj „ekologicky priateľských“ polymérov. Tieto tzv. biopolyméry sú rozložiteľné v prírode do niekoľkých týždňov, v závislosti na ich štruktúre. Jediné, čo po nich zostane, je voda a oxid uhličitý. K výrobe sú zväčša používané obnoviteľné zdroje, inak nezaťažujúce životné prostredie. Postup bežnej chemickej syntézy je využívaný minimálne, najväčší podiel má biotechnologický princíp výroby pomocou mikroorganizmov alebo transgénnych rastlín [3].

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) a ich deriváty predstavujú širokú skupinu biopolymérov s výbornými fyzikálno-chemickými vlastnosťami porovnateľnými s ropnými plastmi, ako je napr. polypropylén alebo polyetylén. Mikroorganizmy ich syntetizujú ako zásobnú formu energie a uhlíka, pri fermentácii cukrov, lipidov alebo alkánov, väčšinou pod vplyvom nejakého exogénneho stresu. PHA sa bežne vyskytujú u rôznych druhoch baktérii vo forme cytoplazmatických inklúzií, niekedy zabierajúcich až 80 % z objemu bunky. Prednosti PHA sú okrem rýchlej biodegradovateľnosti aj termoplastickosť a elasticita, predurčujúce široké využitie týchto biopolymérov v obalovom priemysle, medicíne či poľnohospodárstve [4,5].

Prvým a najviac preskúvaným polyhydroxyalkanoátom, z hľadiska materiálovej charakteristiky, biosyntézy a degradácie, je polyhydroxybutyrát (PHB) produkovaný bakteriálnymi kmeňmi ako je *Bacillus megaterium*, *Azotobacter vinelandii* a *Wautersia eutropha*. Vo forme kopolyméru poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát), P(HB-co-HV), pod komerčným názvom Biopol®, bola britskou firmou ICI naštartovaná tzv. „zelená vlna“ využívania nových biodegradabilných polymérov, ktorá mala nahradiť bežné ropné plasty a postupne ich úplne vytesniť z nášho života [4].

Predpokladaná vízia zatiaľ nenastala. Jediným, za to významným dôvodom je stále vysoká produkčná cena priemyselných biopolymérov. Takmer 50 % z ceny tvoria substráty potrebné na kultiváciu mikroorganizmov. Práve utilizácia odpadných priemyselných produktov by mohla radikálne znížiť výrobné náklady na syntézu biopolymérov [6].

Cieľom práce je skúmať priebeh biosyntézy PHB u vybraných bakteriálnych kmeňov a optimálnymi zmenami kultivačných podmienok, s prípadným zavedením stresu alebo limitácie niektorým z rastových faktorov, či testovaním niektorých odpadových substrátov dosiahnuť maximálnu produkciu polyméru v bunkách.

3. TEORETICKÁ ČASŤ

3.1. Polyhydroxyalkanoáty

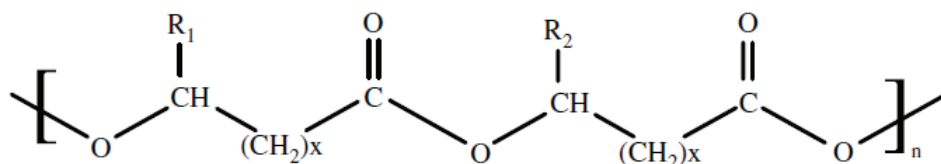
V roku 1923 Maurice Lemoigne z Pasteurovho inštitútu objavil schopnosť aeróbných spórotvorných baktérií vytvárať 3-hydroxybutyrát (3HB). Pokračoval vo výskume a v roku 1926 pomocou chloroformu izoloval z baktérie *Bacillus megaterium* poly(3-hydroxybutyrát). Až koncom päťdesiatych rokov, po nazbieraní dostatku informácií o bakteriálnom rode *Bacillus*, bola preukázaná významná metabolická funkcia polyhydroxybutyrátu (PHB) ako zásobnej formy energie a uhlíka pre bunku. Výskyt tohto fenoménu bol dokázaný vo väčšine Gram-negatívnych baktérií [3,4,7].

Predpokladalo sa však, že 3HB je jediný hydroxyalkanoátový (HA) monomér podieľajúci sa na stavbe zásobného polyméru. Až L.L.Wallen a W.K.Rohwedder [29] identifikovali v roku 1974 odlišné, menej sa vyskytujúce HA – 3-hydroxyvalerát (3HV) a 3-hydroxyhexanoát (3HH). O pár rokov neskôr sa podarilo dokázať prítomnosť ďalších 11 monomérov [7].

Široká možnosť využitia polyhydroxyalkanoátov (PHA), prameniaca z ich jedinečnej rôznorodej štruktúry, podnietila k výskumu potenciálnych spôsobov priemyselnej syntézy s následným využitím PHA v bežnom živote.

3.1.1. Štruktúra PHA

Polyhydroxyalkanoáty sú skupinou lineárnych polyesterov 3, 4, 5 & 6-hydroxykyselín syntetizovaných baktériami ako zásobný zdroj energie a uhlíka počas fermentácie cukrov, lipidov, alkánov, alkénov a alkánových kyselín (obr. 1) [4].



Obr. 1: Všeobecná štruktúra PHA.

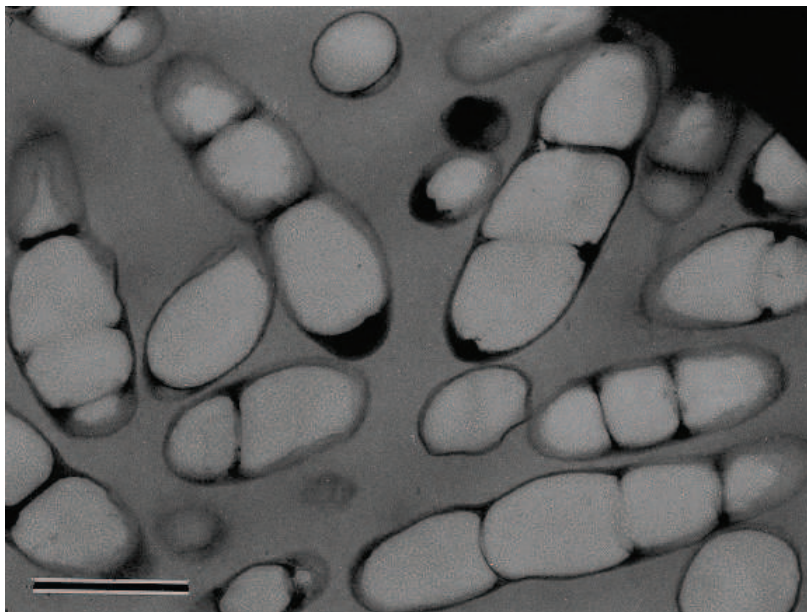
(R_1/R_2 = alkylové skupiny $\text{C}_1 - \text{C}_{13}$, $x = 1 - 4$, $n = 100 - 30\,000$) [4].

Významnou charakteristikou PHA je *R*-konfigurácia všetkých monomérnych jednotiek spôsobená stereošpecifickosťou biosyntetizujúcich enzýmov. Molekulová hmotnosť polyesterov je od 200 000 do 3 000 000 Da a závisí na zložení PHA, druhu mikroorganizmu, ktorý ho vyprodukoval a na kultivačných podmienkach (charakter substrátu a i.) [3].

PHA sa delia do dvoch základných podskupín podľa počtu uhlíkov v monomérnych jednotkách: PHA s krátkym reťazcom (počet C v jednotke 3 – 5), alebo aj „short-chain-length PHA“ (SCL PHA); a s dlhším reťazcom (6 – 14 C v jednotke), inak známe pod skratkou MCL PHA („medium-chain-length PHA“). Polyméry SCL PHA sú tvrdé a lámavé, s vysokým stupňom kryštalichnosti. Oproti tomu sú MCL PHA viac pružné, so znižujúcou sa kryštalichnosťou, pevnosťou v ťahu a bodom topenia [3,4].

3.1.2. Formovanie PHA v bunkách

Polymér sa v bunkách vyskytuje v podobe cytoplazmatických inklúzií – granúl približnej veľkosti $0,2 \pm 0,5 \mu\text{m}$ v priemere. Počet aj veľkosť granúl však závisí od druhu bakteriálnych kultúr a od substrátu utilizovaného baktériou. Hustota PHB granúl sa pohybuje v rozmedzí $1,18 - 1,24 \text{ g.cm}^{-3}$ a MCL PHA granúl $1,05 \text{ g.cm}^{-3}$. Granule sa prevažne skladajú z polyesterov, proteínov a lipidov, v prípade *B.megaterium* z 97,7 % polyesterov, 1,87 % proteínov a 0,46 % lipidov a fosfolipidov [3].

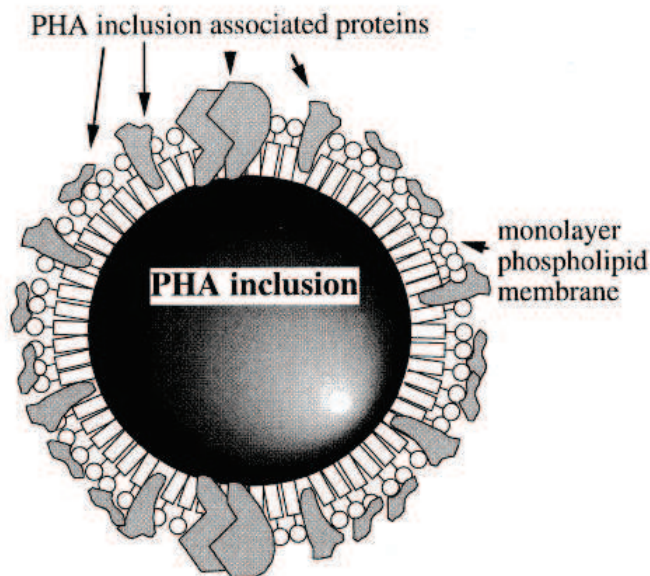


Obr. 2: Snímka buniek rekombinantnej *W.eutropha* obsahujúcej granule PHB zhotovená pomocou transmisnej elektrónovej mikroskopie (TEM). Čiara predstavuje veľkosť $0.5 \mu\text{m}$ [7].

Polymér sa nachádza vo vnútri granúl. Povrch je tvorený vrstvou fosfolipidov so zabudovanými proteínmi plniacimi rôzne metabolické funkcie. Zároveň vytvára bariéru medzi vodným prostredím cytoplazmy v bunke a hydrofóbnym polymérom [7].

Najvýznamnejším proteínom vo fosfolipidovej vrstve granúl je PHA syntáza vyskytujúca sa pravdepodobne v troch modifikáciách líšiacich sa primárnou štruktúrou a substrátovou špecifickosťou, avšak spoločným znakom je aktívne miesto s inkorporovaným cysteínom. Prvý typ PHA syntézy katalyzuje syntézu SCL PHA, dlhšie molekuly MCL PHA sú produkované druhým typom syntázy. Tretí typ je od prvých dvoch odlišný na štrukturálnej úrovni. Predchádzajúce 2 typy PHA syntáz sú tvorené len jednou podjednotkou vo veľkosti 60-70 kDa, zatiaľ čo tretí typ je tvorený kombináciou dvoch podjednotiek približne rovnakej veľkosti (40 kDa): C-podjednotka a E-podjednotka. Obe majú podiel pri syntéze PHA, ale ich substrátová špecifickosť nie je ostro vyhranená ako u predchádzajúcich dvoch typov [7].

PHA depolymeráza sa tiež vyskytuje v granulách – je zodpovedná za využívanie PHA ako zdroja energie a uhlíku pri nedostatku substrátov v prostredí bunky. Výskumy ukazujú, že degradácia PHA intracelulárnymi depolymerázami je približne 10krát pomalšia než ich syntéza. Regulácia intracelulárnych depolymeráz však nie je zatiaľ úplne jasná [7].



Obr. 3: Základná schéma štruktúry PHA granule [7].

Na rozdiel od vyextrahovaného polyméru má PHA v bunke amorfnú štruktúru. Mechanizmy brániace kryštalizácii vo vnútri buniek nie sú doposiaľ presne objasnené. Existuje teória zakladajúca sa na predpoklade, že prítomnosť vody, aj keď minimálna, dokáže v kostre polyméru vytvárať vodíkové mostíky s prítomnými karbonylovými skupinami monomérov [7].

Granule PHA je možné v živých bunkách vyfarbiť farbivom Sudan Black, indikujúcim lipofilný charakter polyméru. Viac špecifické farbenie je pomocou oxazínového farbiva Nile Blue A poskytujúcim s PHB silne oranžovo fluoreskujúci komplex s absorpciou pri 460 nm [5].

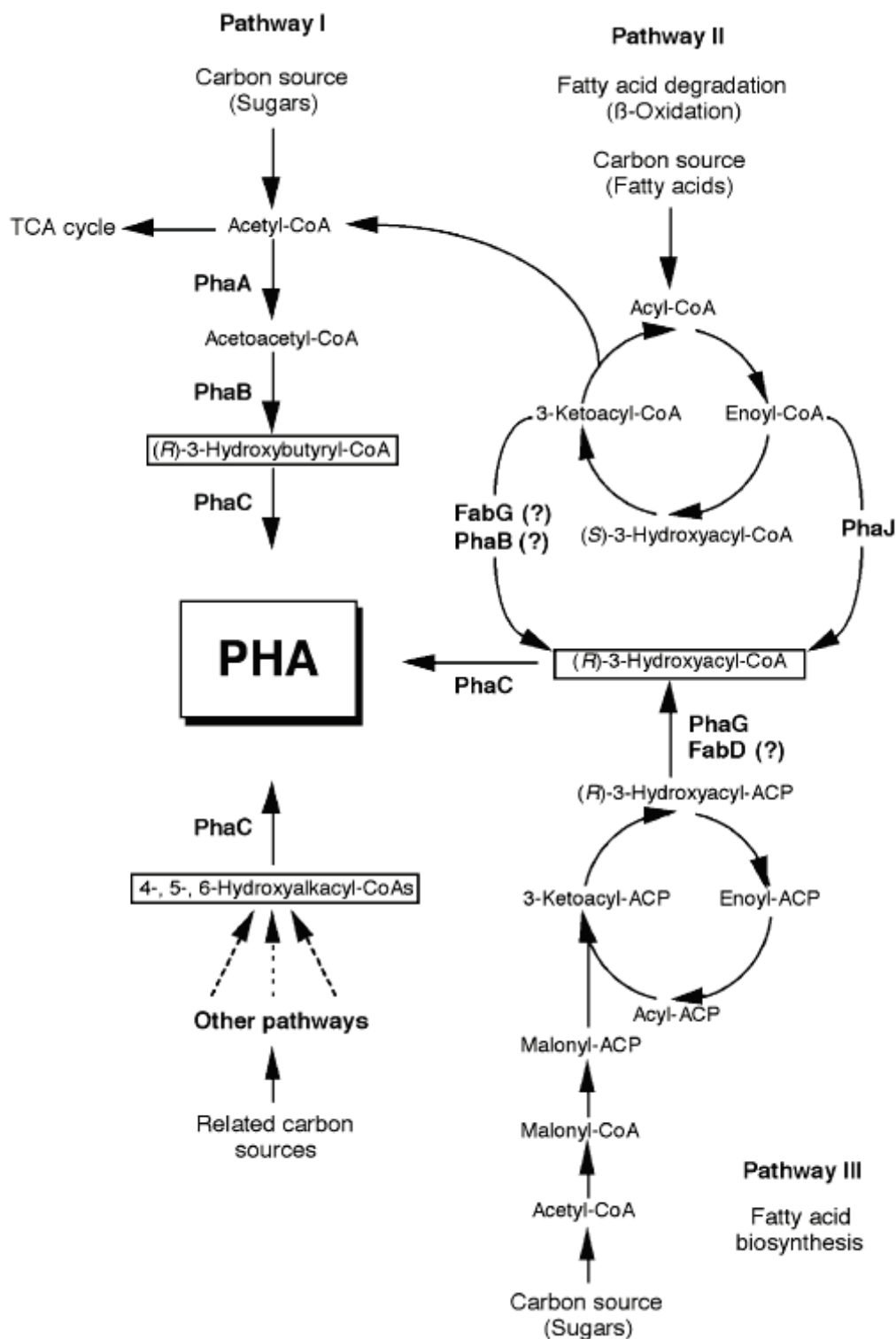
3.1.3. Syntéza PHA

Metabolické dráhy biosyntézy polyhydroxyalkanoátov sú dôkladne preskúvané u širokého spektra mikroorganizmov. Na obr. 4 vidieť najčastejšie sa vyskytujúce dráhy syntézy PHA. Práve tieto metabolické dráhy majú rozhodujúcu úlohu v určení typu PHA produkovaného jednotlivými mikroorganizmami.

Bežne produkovaným PHA je polyhydroxybutyrát. Schéma jeho syntézy je vykreslená na obr. 4, metabolická dráha 1 (Pathway I, [8]). Anabolizmus PHB je veľmi jednoduchý, prebieha v troch krokoch, pričom v každom kroku je jeden príslušný enzým riadený jedným génom. Prvý enzým β -ketothioláza kódovaný *phaA* génom katalyzuje kondenzáciu dvoch molekúl acetyl-CoA za tvorby molekuly acetoacetyl-CoA. V druhom kroku je acetoacetyl-CoA stereoselektívne redukovaný na (R)-3-hydroxybutyryl-CoA NADPH-dependetným enzýmom acetoacetyl-CoA reduktázou (*phaB*). Poslednou reakciou je polymerizácia monoméru (R)-3-hydroxybutyryl-CoA katalyzovaná PHA syntázou (*phaC*) [2].

Podľa štruktúry substrátu použitého ako prídavku do glukózového média, a špecifickosti PHA syntázy, sú mikroorganizmy schopné produkovať rozdielne typy monomérov. Príkladom je baktéria *Wautersia eutropha*, ktorá dokáže utilizovať kyselinu propiónovú a kyselinu valérovú, a tak vytvárať významný druh PHA kopolyméru P(HB-co-HV). Proces

syntézy sa od klasickej dráhy PHB líši len v prvom kroku katalyzovanom ketothiolázou – na acetyl-CoA sa naviaže propionyl-CoA [2,8].



Obr.4: Základné schéma metabolických dráh podieľajúcich sa na biosyntéze PHA v mikroorganizmoch. (PhaA – β -ketothioláza, PhaB – NADPH-dependentná acetoacetyl-CoA reduktáza, PhaC – PHA syntáza, PhaG – 3-hydroxyacyl-ACP:CoA transferáza, PhaJ – (R)-enoyl-CoA hydratáza, FabD – malonyl-CoA:ACP transacyláza, FabG 3-ketoacyl-CoA reduktáza) [8].

Substrát pre syntézu PHA môže pochádzať napr. z β -oxidácie mastných kyselín (obr. 4, Pathway II). Napr. bakteriálny kmeň *Pseudomonas oleovorans* dokáže takto syntetizovať MCL PHA z alkánov, alkanolov a alkanóátov. Opačnou metabolickou dráhou k β -oxidácii (syntéza mastných kyselín *de novo*) je rovnako možné zapojiť medziprodukty do syntézy PHA (obr. 4, Pathway III) [8].

Syntéza zásobných látok býva podmienená nedostatkom zdroja uhlíka a limitáciou niektorými pre rast dôležitých látok ako je napr. dusík, fosfor, železo, draslík, síra alebo kyslík. Biosyntéza PHA je regulovaná na enzýmovej úrovni. Významným regulačným faktorom je intracelulárna koncentrácia acetyl-CoA a voľného HSCoA [3].

Acetyl-CoA je za bežných podmienok rastu oxidovaný v Krebsovom cykle, pričom je produkovaný redukovaný kofaktor NADH vystupujúci v ďalších biosyntézach. Pri zastavení rastu kultúry narastá koncentrácia NADH, dochádza k zníženiu aktivity citrátsyntázy a isocitrátdehydrogenázy. Acetyl-CoA nemôže byť teda oxidovaný v Krebsovom cykle a vstupuje do biosyntetickej dráhy tvorby PHB [3].

Enzým 3-ketothioláza je inhibovaná voľným HSCoA, ktorý je produkovaný behom oxidácie acetyl-CoA v Krebsovom cykle v priebehu normálneho rastu mikroorganizmu [3].

3.1.4. Vlastnosti PHB a jeho kopolymérov

Homopolymér PHB je izotaktický s (R)-konfiguráciou všetkých asymetrických uhlíkov. Kryštaliznosť dosahuje vysokých hodnôt (50-80 %) čo spôsobuje tuhosť a krehkosť polyméru. Teplota skleného prechodu je 5-9 °C, teplota topenia 173-180 °C, no už pri 200 °C nastáva topenie polyméru. V chloroformovom roztoku vytvára pravotočivú závitnicu. Mechanickými vlastnosťami, ako je napr. Youngov model pružnosti (3,5 GPa) alebo pružnosť v ťahu (40 MPa), pripomína polypropylén, ale pružnosťou je PHB (3 %) oproti PP (400 %) výrazne odlišný [3].

Zvýšenie pružnosti nastáva po zabudovaní 3HV do štruktúry PHB za vzniku kopolyméru P(HB-co-HV). Youngov model pružnosti klesne pod 0,7 GPa a pružnosť v ťahu klesne na 30 MPa. So zvyšujúcim sa podielom 3-hydroxyvalerátu rastie pružnosť polyméru. Bod topenia kopolyméru je 130 °C, klesá však aj teplota rozkladu. Vďaka týmto vlastnostiam môže byť kopolymér tavený bez zapríčinenia rozkladu polymérnej štruktúry [3].

Kopolyméry 3-hydroxybutyrátu a 4-hydroxybutyrátu nevytvárajú kryštalické štruktúry. Teplota skleného prechodu klesá od 5 do -50 °C, teplota topenia taktiež klesá od 180 do 54 °C s rastúcim obsahom 4-hydroxybutyrátu (0 – 100 %) v polymére. Pre 94 % 4-hydroxybutyrát je Youngov modul pružnosti približne 55 MPa, pružnosť v ťahu 39 MPa a prietlačnosť 500 % [3].

3.1.5. Aplikácie PHA polymérov v rôznych odvetviach

Z polyhydroxyalkanoátov sa začali vyrábať predmety na každodenné využitie – fľašky od šampónov a iné obalové materiály. Prvý spotrebiteľský produkt priniesla v roku 1990 firma Wella, ktorá zavádzala novú radu šampónov Sanara v biodegradabilných fľaškách vyrobených z Biopolu® [4].

PHA latex môže byť použitý k pokrytiu papiera alebo kartónu vodeodolnou vrstvou ako náhrada za doteraz používaný alumíniový film neschopný biodegradácie.

Nemecká spoločnosť Biomer má technológiu na produkciu P(3-HB) z bakteriálneho kmeňa *Alcaligenes latus* do 90% hmotnosti sušiny. Gulôčky polyméru sú komerčne dostupné pre ďalšie transformácie. Konečný produkt je tvrdý, odoláva veľkej škále teplôt (-30°C – 120°C) a v prostredí je degradovaný do dvoch mesiacov. Používa sa na výrobu pier, hrebeňov a projektilov [4].

V USA firma Metabolix vytvorila rekombinantný druh *Escherichia coli* K12, ktorý je schopný akumulovať 90 % Metabolix PHA (zmes poly(3-hydroxybutyrátu) a poly(3-hydroxyoktanoátu)) z hmotnosti sušiny za 24 hodín. Zdokonaľovanie Metabolix PHA vedie k jeho využitiu v potravinárskom obalovom priemysle [4].

Na základe ich piezoelektrických vlastností môžu byť z PHA polymérov vytvorené tlakové senzory na klávesniciach, ťahové a akceleračné meracie zariadenia, zariadenia na testovanie materiálu, senzory nárazových vln a zapalovače. Rovnako sú využiteľné aj akustické a oscilačné schopnosti na výrobu mikrofónov, ultrazvukových senzorov, meradiel tlaku zvuku, slúchadiel, reproduktorov pre ultrazvukovú terapiu a atomizáciu kvapalín.

Vzduchotesnosť kopolyméru P(3HB-3HV) má široké uplatnenie v balení potravín a výrobe plastových fliaš na nápoje. V podobe filmu sa používa na pokrytie kartónov na mlieko alebo detských plienok.

Biodegradabilné polyméry polyhydroxyalkanoátov, špeciálne P(3HB), P(3HB-3HV), P(4HB) a i., sú využívané v tkanivovom inžinierstve na prípravu kostených platničiek, pretože ich mechanická pevnosť je podobná kostiam, osteosyntetickým materiálom a chirurgickým stehov. S vlákien PHA sa produkujú sterilné tampóny a obvazy. Významný príspevok PHA v medicíne je v kardiovaskulárnej oblasti – perikardiálne záplaty, arteriálne náhrady, cievne transplantáty a srdcové chlopne [4].

V poľnohospodárstve našli svoje uplatnenie mulčovacie filmy z PHA používané pri výsadbách. Sú schopné zadržiavať plyny, odolávať plevelom a udržiavať pôdnu teplotu. Môžu byť do nich zakomponované hnojivá a insekticídy postupne sa uvoľňujúce v priebehu degradácii filmu [4].

3.1.5.1. Stratégie priemyselnej výroby PHA

K priemyselnej produkcii pomocou fermentačných technológií je potrebné vybrať vhodný mikroorganizmus na základe rôznych faktorov – schopnosť využitia lacných substrátov, rýchlosť rastu kultúry a syntézy polyhydroxyalkanoátov a maximálna akumulácia polyméru v bunkách.

Produkčné baktérie možno rozdeliť do dvoch skupín. Prvá reprezentuje baktérie vyžadujúce k podpore syntézy PHA kultiváciu v limitovanom médiu, napr. bez zdroja dusíka, fosforu či horčíka a s dostatočným prísunom substrátu. Patria sem bakteriálne kmene ako *Wautersia eutropha* a *Protomonas oleovorans*. Druhá skupina baktérii akumuluje polymér v priebehu rastu, bez nutnosti limitácie – *Azohydromonas lata*, *Azotobacter vinelandii* [3,5].

Vysoká produkcia PHA sa získava vsádkovou fed-batch kultiváciou alebo kontinuálnym procesom. Pre prvý druh produkčných baktérií je typický dvojfázový systém – najskôr kultúra rastie na kompletnom živnom médiu bez limitácie a následne je prevedená do limitovaného média k navodeniu syntézy a akumulácie PHA. *W.eutropha* akumuluje vysoké množstvá polyméru, viac ako 80 % z biomasy, po vyčerpaní dusíka alebo fosforu z média. Ostatné baktérie požadujú aspoň minimálnu koncentráciu limitujúcich faktorov k efektívnej produkcii PHA. Dôležitý je teda pomer zdroja uhlíka a ostatných látok v médiu [3,5].

Baktérie z druhej skupiny vyžadujú pri fed-batch kultivácii optimálnu stratégiu živenia. Do média bývajú zväčša pridávané komplexné dusíkaté zdroje (kvasničný autolyzát, peptón) k podpore rastu buniek a syntézy polyméru. Významnú úlohu hrá práve udržiavanie rovnováhy medzi rastom a syntézou počas kultivácie, aby sa zabránilo nekompletnej akumulácii PHA alebo predčasne ukončenej fermentácii z dôvodu nízkej koncentrácie produkčnej biomasy [5].

3.1.5.2. *Vybrané priemyselné formy PHA*

Biopol®

Ako už bolo spomínané v úvode kap. 3.1.5., za vývojom Biopolu® stojí britská spoločnosť ICI. Jedná sa o kopolymér poly(3hydroxybutyrátu) a poly(3-hydroxyvalerátu). Je to termoplast s teplotou topenia 140-180°C. Kryštalickosť klesá s nárastom obsahu 3-hydroxyvalerátu a polymér sa stáva viac elastickým. Biopol® sa dá použiť na potiahnutie papiera alebo kartónu. Antistatickosť je využitá pri balení elektronických súčiastok. Taktiež je používaný v medicíne. Vlákna boli aplikované na výrobu rybárskych sietí a lán. Biopol® pokrytý vrstvou poly(vinylalkoholu) je výbornou živnou pôdou pre pestovanie morských chaluáh. Najviac sa presadil ako materiál na výrobu fľašiek, olejových kanistrov a jednorazových holiacich strojčekov [4].

Nodax™

Pomerne nedávny prírastok do skupiny komerčných PHA polymérov vyvinula firma Procter&Gamble. Pozostáva z 3-hydroxybutyrátu a relatívne malého množstva monomérov so stredne dlhým reťazcom s postrannými skupinami s minimálne tromi a viac uhlíkmi. Stavebné monoméry obsahujú 3-hydroxyhexanoát, 3-hydroxyoktanoát a 3-hydroxydekanoát. Nodax™ má nižšiu kryštalickosť a teplotu topenia, čo sa prejavuje v tvrdosti a ťažnosti materiálu s obchodným využitím.

Podlieha aeróbnej aj anaeróbnej degradácii, je hydrolyticky stabilný a elastický. Prístupný je vo forme pien, vlákien a filmov. Môže byť degradovaný v septiku, preto sa dá použiť na výrobu hygienických utierok a tampónových aplikátorov. Využíva sa aj pri výrobe chirurgických odevov, čalúnenia, kobercov, obalov, kompostovateľných tašiek a viečok, alebo vedier [4].

DegraPol®

Jedná sa o blok-kopolyester uretánu. Ten je syntetizovaný z poly(3-hydroxybutyrát)-diolu a α,ω -dihydroxy-poly(ϵ -kaprolaktón-blok-dietylglykol-blok- ϵ -kaprolaktónu). Nezávislé štúdie ukázali, že peny z DegraPolu® boli pri biodegradácii atakované makrofágmi a osteoblastmi. Ich využitie sa teda orientovalo na metódy hojenia kostí [4].

3.1.5.3. *Vývoj priemyselnej produkcie PHA*

Trvalý výskum biopolymérov neustále napreduje vo všetkých významných krajinách, avšak je väčšinou sponzorovaný súkromným sektorom. Potreba bioplastov v bežnom živote narastá každým dňom. Svetová produkcia biodegradabilných polymérov prekročila 300 000 t za rok. Napriek takmer 20 ročnému komerčnému využívaniu PHA však nedokázal svetový obchod prekonať priemyselnú trhlinu spôsobenú vysokými cenami. Záujem bol zameraný na

využitie vhodných a hlavne lacných substrátov. Firma Metabolix sa pokúša znížiť cenu PHA na cca \$ 1 za lb a svetová spoločnosť Procter&Gamble chce znížiť výrobnú cenu kopolyméru Nodax™ na \$ 0,45/lb z pôvodných \$ 2,20/lb. Rovnako významným negatívnym aspektom ovplyvňujúcim použitie PHA je nedostatočná informovanosť ľudí v oblasti biodegradabilných materiálov [4].

3.1.6. Biodegradácia PHA

Na mikrobiálnej biodegradácii PHA sa podieľajú buď extracelulárne alebo intracelulárne depolymerázy. Za extrémnych podmienok (zvýšené pH a vysoká teplota) podlieha PHA hydrolýze, čo má význam pri použití PHA v medicíne – chirurgické stehy, nosiče postupne uvoľňujúce lieky. PHA môže byť degradované v rôznych ekosystémoch celou radou mikroorganizmov. Samotný proces biodegradácie ovplyvňujú: vlastnosti ekosystému – populácia mikróbov, ich hustota, druhová pestrosť, aktivita; charakteristika prostredia – pH, teplota, prítomnosť vody, kyslíka alebo iného substrátu; vlastnosti polyméru – pomer R a S izoméru, prítomnosť kryštalickej štruktúry, molekulová hmotnosť, typ monoméru [3].

Všetky depolymerázy sú špecifické len k R-konfigurácii monomérov PHA. Syntetizovaný PHB zložený z S-monomérov nebol prírodnými PHA depolymerázami degradovaný [3]. Detailným výskumom bolo zistené, že PHB depolymeráza je zložená z jedného polypeptidického reťazca s molekulovou hmotnosťou 37 000- 60 000 Da, pričom obsahuje N-katalytickú a C-terminálnu doménu, obe typické aj pre iné typy hydrolytických enzýmov (celuláz, chitináz) [7, 9, 10].

Schopnosť biodegradácie PHA bola preukázaná u mnohých mikroorganizmov: *Pseudomonas lemogni*, *Pseudomonas syringe* subsp. *savanostoi*, *Alcaligenes faecalis*, *Acidovorax facilis*, *Variovorax paradoxus*, *Comamonas testosteroni*, *Cytophaga johnsonae*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus polymyxa*, *Wautersia eutropha*, *Streptomyces spp* [11,12].

3.2. Produkčné mikroorganizmy

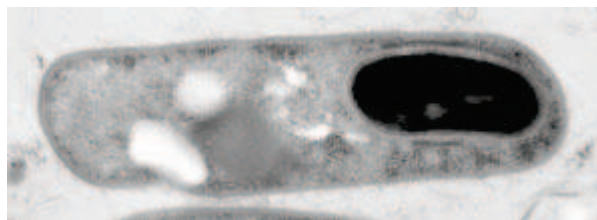
Ako bolo spomenuté v kapitole 3.1.3., biosyntéza polyhydroxyalkanoátov bola skúmaná u širokého spektra baktérii, u ktorých boli popísané metabolické dráhy syntézy PHB, P(HB-co-HV) a iných PHA. Biosyntetické dráhy majú rovnaký základ u všetkých druhov baktérii, malé odlišnosti sú spôsobené najmä substrátovou špecifickosťou enzýmov a podmienkami za akých prebieha optimálny rast sledovanej kultúry. Tieto rozdiely následne ovplyvňujú štruktúru výsledného PHA [2].

K štúdiu produkcie PHA v experimentálnej časti práce boli vybraté štyri druhy baktérii – syntéza PHB bola sledovaná na bakteriálnych kmeňoch *Bacillus megaterium*, *Wautersia eutropha*, *Azohydromonas lata*; syntéza kopolyméru P(HB-co-HV) *Azotobacter vinelandii*. Nižšie je uvedená stručná charakteristika jednotlivých kmeňov [2].

3.2.1. *Bacillus megaterium*

Bacillus megaterium je prvý bakteriálny kmeň, u ktorého Lemoigne pozoroval produkciu poly(3-hydroxybutyrátu). Metabolické dráhy syntézy PHB a ich regulácia sú teda u tejto baktérie dôkladne preskúmané.

B.megaterium je Gram-pozitívna aeróbna mezofilná baktéria tyčinkového tvaru. Vyskytuje sa najmä v pôde, kde sa živí látkami odumretých organických tel (saprofyt). Tvorí typické endospóry a pokiaľ je to nevyhnutelné, prechádza na anaeróbnou formu dýchania. Patrí medzi najväčšie eubaktérie (*mega* – veľký), dosahujú priemer 1,2 - 1,5 μm . dokáže odolávať extrémnym podmienkam. Nie je náročná na živiny a rastové faktory. Bunky sa pomocou extracelulárnych polysacharidov navzájom spájajú do reťazcov [13].



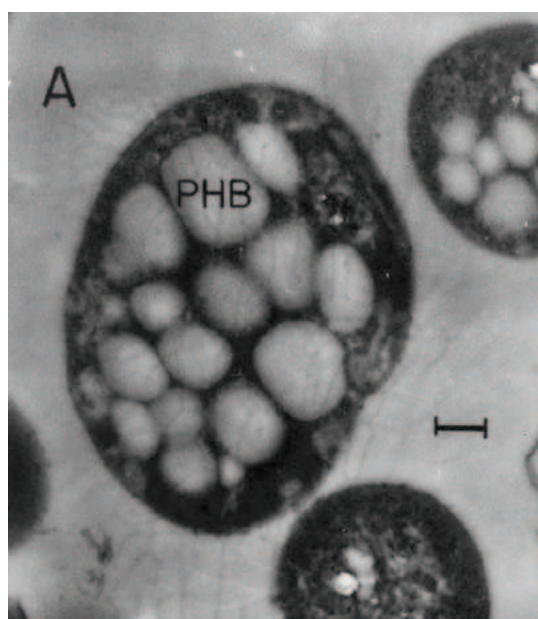
Obr. 5: TEM snímka *B.megaterium* [14].

Ako už bolo spomenuté, *B.megaterium* používa k uchovaniu zásob energie a uhlíka polymér polyhydroxybutyrát. Biosyntézu PHB podporuje rast v limitovaných podmienkach, pri nedostatku zdroja dusíka, príp. fosforu, v živnom médiu však musí byť dostatočne vysoký obsah uhlíka. Syntéza PHB prebieha tou najjednoduchšou cestou v 3 krokoch s prvotnou kondenzáciou 2 molekúl acetyl-CoA (kap. 3.1.3.).

3.2.2. *Azotobacter vinelandii*

Gram-negatívna mezofilná baktéria *A.vinelandii* je zaujímavá svojou schopnosťou syntetizovať dva významné priemyselné polyméry – alginát a PHA.

Rovnako ako baktéria *B.megaterium* má tyčinkový tvar a jej výskyt je sústredený v pôde. Je striktno aeróbny diazotrop, čo znamená, že dokáže viazať vzdušný dusík, a to aj za prítomnosti kyslíka. Má vyvinutý mechanizmus na chránenie enzýmov – nitrogenáz, ktoré sú u iných diazotropov citlivé na prítomnosť kyslíka [15].

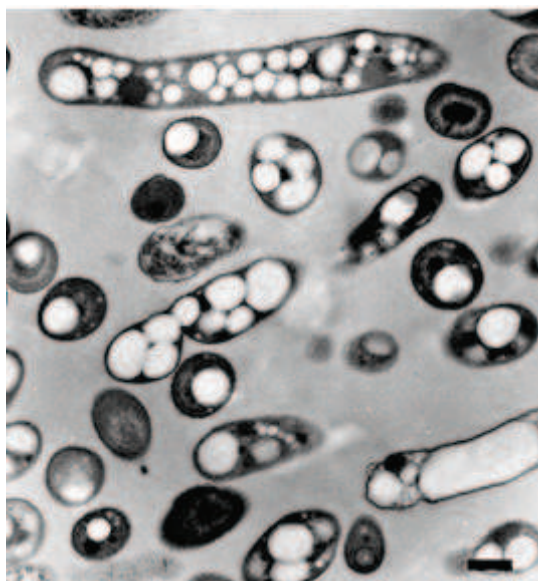


Obr.6: *Azotobacter vinelandii* s granulami P(HB-co-HV)[16].

Druh *A.vinelandii* biosyntetizuje významnú formu PHA, kopolymér 3HB a 3HV – P(HB-co-HV). Ten je svojimi vlastnosťami (kap. 3.1.4.) zaujímavý pre využitie vo viacerých priemyselných odvetviach.

3.2.3. *Wautersia eutropha*

Jedná sa o najviac študovanú baktériu z hľadiska syntézy PHB a možnosti amplifikácie obsahu PHB v bunkách až nad 80 % kultiváciou na jednoduchých substrátoch. V publikáciách sa používajú ešte dva ekvivalenty názvu druhu – *Ralstonia eutropha*, *Cupriavidus necator* a pod starším názvom *Alcaligenes eutropha* [28].



Obr.7: *Wautersia eutropha* s granulami PHB. Čiara na obrázku predstavuje 0,5 μm [12].

Táto Gram-negatívna fakultatívne aeróbna baktéria sa vyskytuje vo vode aj v pôde. Mezofilná *W.eutropha* nevytvára spóry, je nepatogénna, zväčša tyčinkového tvaru a k pohybu používa dva bičíky. Syntézu poly(3-hydroxybutyrátu) stimuluje kultivácia v limitovanom médiu, bez prídavku dusíka. Vyznačuje sa rýchlym rastom do vysokej koncentrácie biomasy [17].

Produkcia PHA je momentálne sledovaná u mnohých iných Gram-negatívnych a Gram-pozitívnych baktérii: *Azohydromonas lata*, *Methylobacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Aeromonas sp.*, *Comamonas acidovorans*, *Comamonas testosteronii*, *Caryophanon latum*, *Caulobacter crescentus* a i. [2,5,7,30]

Okrem baktérii sa však k priemyselnej výrobe PHA využívajú aj rekombinantné bunky *E.coli* a rôzne transgénne rastliny – PHB syntéza prebieha v cytoplazme buniek *Arabidopsis thaliana* [5].

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1. Použitý materiál, chemikálie a prístroje

4.1.1. Bakteriálne kmene

K sledovaniu produkcie PHB boli použité tieto bakteriálne kmene:

- *Bacillus megaterium* CCM 2037.
- *Azotobacter vinelandii* CCM 289
- *Wautersia eutropha* CCM 3726
- *Azohydromonas lata* CCM 4448^T

Všetky bakteriálne kmene boli získané z České sbírky mikroorganismů Masarykovské univerzity v Brně.

4.1.2. Chemikálie

4.1.2.1. Chemikálie pre kultiváciu mikroorganizmov

Agar Powder, Himedia (India)
Beef extract, Himedia (India)
Peptone, Himedia (India)
Nutrient Broth, Himedia (India)
LB Broth, Sigma (Nemecko)
Yeast extract, Himedia (India)
Glukóza, Lachema (ČR)
Fruktóza, Lachema (ČR)
Laktóza, Lachema (ČR)
Molybdenan sodný, Lachema (ČR)
Síran horečnatý, Lachner (ČR)
Síran mangánatý, Lachner (ČR)
Síran amónny, Lachner (ČR)
Síran železnatý, Lachner (ČR)
Hydrogénfosforečnen disodný, Lachema (ČR)
Hydrogénfosforečnen didraselný, Lachema (ČR)
Dihydrogénfosforečnen draselný, Lachema (ČR)

4.1.2.2. Chemikálie pre stanovenie PHA

Poly[(R)-3-hydroxybutiric acid], Fluka (USA)
P(3HB-3HV) (12% 3HV), Fluka
Kyselina krotónová, Sigma

Všetky ostatné použité chemikálie boli čistoty p.a.

4.1.3. Prístrojové vybavenie

Zostava pre GC: Finnigan Trace GC Ultra, kolóna – DB-WAX 30 m/0,25 mm, FID detektor

Zostava pre HPLC: pumpa – Surveyor MS Pump Plus (Finnigan), detektor – Surveyor PDA Plus Detector (Finnigan), termostat kolóny – Column Oven LCO 101 (Ecom), kolóna – Ultra Aqueous C18 5 μ m 250 $\times$ 4,6 mm (Restek)

Zostava pre HPLC (stanovenie cukrov v srvátke): Ecom spol. s.r.o. ČR, programátor gradientu GP 5, čerpadlo LCP 4020, degaser DG-1210, dávkovací analytický ventil smyčkový C a D, termostat kolóny LCO 101, spektrofotometrický detektor LCD 2084, refraktometrický detektor RIDK 102, integrátor Data Apex CSW v. 1.7., HPLC kolóna ZOBRAx NH₂ 150 cm $\times$ 4,6 mm, 5 μ m, Chromservis (ČR)

Spektrofotometer VIS, Helios δ , Unicam (Veľká Británia)

Spektrofotometer UV-VIS, Helios α , Unicam (UK)

Centrifuga Boeco U-32R, Hettich Zentrifugen (Nemecko)

Lyofilizátor a koncentrátor, Labconco (USA)

Analytické váhy, Boeco (Nemecko)

Laminárny box Aura Mini, Bio Air Instruments (USA)

Termostat IP 60, LTE Scientific, Ltd. (Nemecko)

Termostat, LS-35 (ČR)

Termostatovaná trepačka, Heidolph Unimax 1010, Labicom s.r.o. (ČR)

Trepačka, LT 2, Sklářny Kavalier n.p. (ČR)

Trepačka, Yellow line, Labkom s.r.o. (ČR)

Vortex, TK3S, Kartell spa (USA)

Bežné laboratórne sklo a vybavenie

4.2. Analytické metódy stanovenia obsahu PHA

Cieľom experimentu bolo otestovať v literatúre uvádzané metódy kvantifikácie obsahu PHA a vybrať najvhodnejšiu metódu, ktorá bude používaná pre stanovenie obsahu PHA v biomase vo všetkých nasledujúcich kultivačných experimentoch.

4.2.1. Spektrofotometrická analýza v UV oblasti

K analýze boli použité komerčné štandardy polyhydroxybutyrátu a kyseliny krotónovej, a vzorka biomasy *A.vinelandii* kultivovanej na Burkovom médiu s 30 g/l glukózy (kap. 4.4.3.).

V prvom rade bola zostrojená kalibračná závislosť absorbancie pri 210 nm a koncentrácie PHB. Do piatich skúmaviek bolo postupne naváženených 20 – 100 mg štandardu PHB, ku ktorým bolo pridaných po 1 ml 96 % H₂SO₄. Hydrolýza prebiehala 1 hodinu pri 100 °C. Schladené vzorky boli zriedené zmesou metanol:voda (1:1) a vytvorená kyselina krotónová bola premeraná pri 210 nm oproti slepej vzorke [18].

Podobne bola stanovená absorpčná závislosť štandardu kyseliny krotónovej, pričom navážené vzorky v rozmedzí 20 – 100 mg boli rovno zriedené zmesou metanol:voda. Absorbancia bola zmeraná pri 210 nm oproti blanku (čistá zmes metanol:voda).

V prípade *A.vinelandii* bolo do skúmavky navážených približne 10 mg biomasy a rovnakou metódou ako pri stanovení štandardu PHB bol stanovený obsah polyméru v bunkách.

Pre všetky merané vzorky (štandard kyseliny krotónovej, rozpustený a derivatizovaný štandard PHB a reálna vzorka) bolo zaznamenané absorpčné spektrum v rozmedzí vlnových dĺžok 180 – 320 nm.

4.2.2. HPLC analýza PHB

Vzorky pripravené pre spektrofotometrické stanovenie PHB v UV oblasti boli použité aj k analýze obsahu polyméru HPLC metódou.

Analýza prebehla na HPLC zostave uvedenej v kap. 4.1.3. Ako mobilná fáza bola použitá zmes metanol:voda (50:50). Prietoková rýchlosť mobilnej fázy bola 0,3 ml.min⁻¹, kolóna bola temperovaná na 30 °C. Detekcia prebiehala pri 210 nm [19].

Koncentrácia PHB v reálnej vzorke bola stanovená s využitím kalibračnej priamky zostrojenej pomocou kalibračnej rady derivatizovaného štandardu PHB pripravenej v kap. 4.2.1.

4.2.3. GC analýza PHB a P(HB-co-HV) s FID detekciou

Princíp stanovenia spočíva v kyslej transesterifikácii polyesterov za vzniku metylesterov príslušných hydroxykyselín. Tieto metylestery sú následne stanovené s využitím plynovej chromatografie [20].

Do krmpovacích vialiek o objeme 1,8 ml boli navážené cca 2-3 mg štandardov a vzorka lyofilizovanej biomasy. Po pridaní 1 ml chloroformu a 0,8 ml 15 % kyseliny sírovej v metanole bol polymér reesterifikovaný pri teplote 100 °C po dobu 140 minút. K ochladenej zmesi bolo pridaných 0,5 ml 0,25 M NaOH a zmes bola po dobu 1 minúty intenzívne pretrepaná. Po následnom oddelení fáz bola spodná chloroformová frakcia obsahujúca metylestery kyseliny 3-hydroxybutánovej prevedená do vialky s insertom a pripravená k analýze.

Samotná analýza prebehla pri definovanom teplotnom režime, aby došlo k efektívnej separácii jednotlivých metylesterov – prvé 4 minúty 80 °C, nárast po 8 °C/min a 160 °C počas 6 minút. Nosným plynom bol dusík. Teplota na injektore bola 230 °C, na detektore 275 °C. K detekcii bol použitý plameňový ionizačný detektor – FID.

4.3. Kultivácia baktérie *Bacillus megaterium* CCM 2037

4.3.1. Uchovávanie kultúry

Oživená lyofilizovaná zbierková bakteriálna kultúra bola kultivovaná v temperovanom boxe pri teplote 30 °C na Petriho miskách obsahujúcich pevné médium pre kultiváciu *Bacillus megaterium*. Preočkovanie bolo vykonávané pravidelne v intervale 14 dní. Narastená kultúra bola uchovávaná v chladničke pri 4 °C a v tme.

4.3.1.1. Živné médiá

I. Bacillus médium - BM

Pepton	5 g
Beef extrakt	3 g
MnSO ₄	0,01 g
Agar	20 g
Destilovaná voda	1000 ml

II. Syntetické médium

Glukóza	10 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
Na ₂ HPO ₄	2,5 g
KH ₂ PO ₄	2,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
MnSO ₄	0,01 g
FeSO ₄	0,01 g
Destilovaná voda	1000 ml

III. NB médium (Himedia)

Pepton	10 g
Beef extract	5 g
NaCl	5 g
Agar	20 g
Destilovaná voda	1000 ml

IV. LB médium – LB Broth (Sigma)

Tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	10 g
Destilovaná voda	1000 ml

4.3.1.2. Kultivačné podmienky

Submerzná kultivácia baktérie *Bacillus megaterium* bola počas všetkých experimentov vykonávaná v 250 ml (100 ml) Erlenmeyerových bankách s 100 ml (50 ml) živného média, na temperovanej trepačke pri 30 °C a neustálom miešaní (150 rpm). Inokulum bolo zaočkované tromi kličkami kultúry z pevného média. Po 24 hodinách bolo týmto inokulom zaočkované produkčné médium, inokulačný objem odpovedal 5 % produkčného média.

4.3.2. Rast a produkcia PHB na BM médiu

Kultivácia prebiehala na BM médiu pri podmienkach stanovených v kap. 4.3.1.2. Odber bol vykonávaný každých 5 hodín v časovom rozmedzí 20 – 45 hodín. Biomasa bola stanovená spektrofotometricky pri 630 nm oproti blanku (čisté médium), každá vzorka bola premeraná trikrát, pričom koncentrácia biomasy bola spočítaná s kalibračnej priamky stanovenia sušiny. K stanoveniu obsahu PHB bolo odobraných 10 ml kultúry.

4.3.2.1. Stanovenie sušiny a kalibrácia biomasy

Pre stanovenie sušiny boli odobrané tri vzorky bunečnej suspenzie po 10 ml. Bunky boli stočené (8 000 rpm, 5 min.), premyté destilovanou vodou, opäť stočené a kvantitatívne prevedené do vopred vysušených a zvážených váženiek. Váženky s biomasou boli sušené do konštantnej hmotnosti pri teplote 100 °C, ochladené na laboratórnu teplotu v exsikátore a zvážené na analytických váhach. Z rozdielu hmotnosti prázdnej váženky a váženky so sušinou bola stanovená priemerná koncentrácia biomasy. Zároveň bola riedením kultúry o známej koncentrácii biomasy zostrojená kalibračná priamka $A_{630\text{ nm}} = f(X)$, ktorá bola následne použitá k určeniu presnej koncentrácie biomasy vo vzorkách. Absorbancia bola premeraná dvakrát pre každú koncentráciu biomasy kalibračnej závislosti a zo získaných výsledkov bola spočítaná priemerná hodnota.

4.3.2.2. Stanovenie koncentrácie PHB

Odobraných 10 ml kultúry bolo stočených pri 8000 rpm po dobu 10 minút. Následne rozsuspendovaná biomasa v destilovanej vode bola kvantitatívne prevedená do plastovej zkušavky typu Eppendorf a opäť stočená (10 000 rpm, 10 minút). Po zliatí supernatantu bola biomasa lyofilizovaná. Ďalší postup analýzy sa zhodoval s postupom uvedeným v kap. 4.2.3.

4.3.3. Rast a produkcia PHB na syntetickom médiu

Kultúra *B.megaterium* bola taktiež kultivovaná na syntetickom médiu. Podmienky boli rovnaké ako pri predchádzajúcej kultivácii. Sušina bola stanovená spektrofotometricky pri 630 nm proti blanku, jednotlivé vzorky boli premeraná trikrát k získaniu priemernej hodnoty a smerodajnej odchýlky stanovenia, pričom bola použitá nová kalibrácia pre syntetické médium (kap.4.3.2.1.) a obsah PHB bol zistený GC analýzou s FID detektorom (kap. 4.3.2.2.).

4.3.3.1. Vplyv limitácie obsahu dusíka a fosforu

Po 20-hodinovej kultivácii bola celá kultúra stočená (5000 rpm, 40 minút) a kvantitatívne prevedená do sterilného média bez zdroja dusíka, fosforu a poslednom prípade oboch faktorov dohromady. Rast kultúry a produkcia PHB bola sledovaná po dobu nasledujúcich 25 hodín, odbery boli vykonané vždy po 5 hodinách.

4.3.3.2. *Vplyv rôznych stresových faktorov*

Pre zvýšenie produkcie PHB boli vyskúšané rôzne vybrané stresové faktory – H_2O_2 , NaCl, etanol, citrát, NiCl_2 a SO_3^{-2} , sterilne pridané do syntetického média tak, aby ich koncentrácia bola: etanol 1 % (vol/vol), peroxid vodíka 5 mM, NaCl 5 % (w/w), SO_3^{-2} 1 mmol, citrát 1 mmol, NiCl_2 2 mmol. Stresové médium bolo zaočkované pripraveným inokulom a kultivácia prebiehala ako v predchádzajúcich prípadoch. Pre stanovenie rastu biomasy a obsahu syntetizovaného PHB boli odoberané vzorky v 20. a 24. hodine. Výsledné hodnoty boli porovnané s kontrolnou kultiváciou bez stresu.

4.3.4. *Kultivácia *B.megaterium* na ďalších médiách*

Ďalším krokom bolo testovanie iných produkčných médií k dosiahnutiu výraznejšieho rastu kultúry *B.megaterium* a produkcie PHB týmto bakteriálnym kmeňom. Porovnávané boli komerčné média LB broth a Nutrient Broth, spolu so spomínaným BM médiom v dvoch pozmenených zloženiach – s prídavkom 5 g/l peptonu alebo 5 g/l glukózy. Kultivácia prebiehala pri podmienkach stanovených v kap. 4.3.1.2. Odbery k stanoveniu nárastu kultúry a produkcie PHB boli vykonané v 24., 29. a 47. hodine.

4.3.5. *Optimalizácia zloženia BM média*

Pre lepší pomer rastu a syntézy PHB bolo potrebné zistiť optimálny pomer zloženia BM média, konkrétne obsah „beef extraktu“ a peptónu (ďalej len BEP), a koncentrácie glukózy. Experiment prebiehal v dvoch základných smeroch: v prvom bola zachovaná konštantná koncentrácia BEP 8 g/l a menila sa len koncentrácia glukózy (5, 10, 15 a 20 g/l); pri druhom pokuse bola zachovaná nemenná koncentrácia glukózy pri rôznych koncentráciách BEP (3, 6, 9 a 12 g/l). Na základe výsledkov bol v závere odskúšaný optimálny pomer BEP a glukózy pri rovnakých kultivačných podmienkach.

4.3.6. *Rast a produkcia PHB na obohatenom BM médiu*

Na základe výsledkov z predchádzajúceho experimentu bol bakteriálny kmeň *B.megaterium* kultivovaný na BM médiu obohatenom o 8 g/l glukózy. Za rovnakých kultivačných podmienok bola stanovená rastová krivka mikroorganizmu, priebeh koncentrácie syntetizovaného PHB touto baktériou a nakoniec aj úbytok glukózy v médiu. Kultivácia prebiehala po dobu 45 hodín s odbermi každú 5. hodinu.

4.3.6.1. *Stanovenie koncentrácie zvyškovej glukózy v médiu*

K stanoveniu obsahu glukózy bola použitá metóda podľa Somogyi-Nelsona založená na detekcii redukujúceho cukru, ktorý redukuje mednaté kationy za vzniku oxidu medného a následne, pomocou hydrogénarzeničnanu, vytvára farebný komplex spektrofotometricky stanoviteľný pri 720 nm [21].

V prvom kroku bola zostrojená kalibračná závislosť absorbie farebného produktu reakcie na koncentrácii cukru. Do 12 skúmaviek bolo postupne napipetovaných 0,1 – 5 ml roztoku glukózy s koncentráciou 0,2 g/l, ktoré boli doplnené do 10 ml destilovanou vodou.

K 1 ml takto pripravených roztokov s gradientom koncentrácií bol pridaný 1 ml zmesi Somogyi-Nelsonových činidiel I a II v pomere 4:1. Vzorky boli povarené 10 minút a po ochladení k nim bolo pripipetovaných 0,5 ml Somogyi-Nelsonového činidla III. Premiešané vzorky boli doplnené do 10 ml destilovanou vodou a zmerané proti slepej vzorke pri 720 nm.

So zriedených vzoriek kultivačného média bolo odobraných 100 µl doplnených do 1 ml destilovanou vodou. Ďalší postup analýzy sa zhodoval s postupom pri stanovení kalibračnej závislosti, na základe ktorej bola spočítaná presná koncentrácia glukózy v danom čase.

4.3.6.2. Testovanie limitácie kyslíkom na obohatenom médiu

Kultivácia prebiehala v 250 ml Erlenmeyerových bankách s rozdielnym objemom BM média obohatenom o 8 g/l glukózy (50, 100, 150 a 200 ml). Vzorky k stanoveniu nárastu biomasy a obsahu PHB boli odobrané po 48 hodinách.

4.3.7. Kultivácia *B.megaterium* na rôznych sacharidových substrátoch

Bakteriálny kmeň *Bacillus megaterium* je široko rozšírená baktéria čo predpokladá schopnosť utilizovať rôzne zdroje uhlíka. Preto boli otestované rôzne jednoduché sacharidy až po komplexnejšie polysacharidy (fruktóza, galaktóza, laktóza, sacharóza, maltóza, xylóza, škrob, v koncentrácii 8 g/l) pridané do pôvodného BM média. Vzorky boli odobrané po 48 hodinách. Výsledky boli porovnané s rastom a produkciou PHB na BM médiu s glukózou (8 g/l).

4.4. Kultivácia baktérie *Azotobacter vinelandii* CCM 289

4.4.1. Uchovávanie kultúry

Oživená lyofilizovaná zbierková bakteriálna kultúra bola kultivovaná na Petriho miskách obsahujúcich pevné živné médium pre kultiváciu *Azotobacter vinelandii* v temperovanom boxe pri teplote 30 °C. Preočkovanie bolo vykonávané pravidelne v intervale 14 dní. Narastená kultúra bola uchovávaná v chladničke pri 4 °C a v tme.

4.4.1.1. Živé médiá

V dôsledku rôznych možností kultivovania baktérie *Azotobacter vinelandii* [15] boli v prvom kroku vyskúšané viaceré živné médiá k dosiahnutiu optimálneho pomeru rastu a produkcie PHA, s ktorých bolo vybrané jedno k ďalším experimentom.

I. Pevné živné médium pre kultiváciu *Azotobacter vinelandii* (A)

Glukóza	10 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,2 g
CaCl ₂ .2 H ₂ O	0,1 g
NaCl	0,2 g
CaCO ₃	2,5 g

Agar	20 g
Destilovaná voda	1000 ml

II. Burkovo médium (B)

Glukóza	10 g
K ₂ HPO ₄	0,9 g
KH ₂ PO ₄	0,1 g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,1 g
CaCl ₂ .2 H ₂ O	0,1 g
FeSO ₄ .7 H ₂ O	10 mg
Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	5 mg
Destilovaná voda	1000 ml

III. PY médium

Glukóza	20 g
Pepton	5 g
Yeast extract	3 g
Destilovaná voda	1000 ml

IV. Seed and production medium – SP médium

Glukóza	20 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,6 g
Na ₂ HPO ₄	2 g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,3 g
Yeast extract	3 g
Destilovaná voda	1000 ml

V. Nutrient broth – NB médium

Glukóza	10 g
Pepton	10 g
Beef extract	10 g
NaCl	5 g
Destilovaná voda	1000 ml

4.4.1.2. Kultivačné podmienky

A. vinelandii je mezofilná baktéria schopná fixovať vzdušný dusík, preto bola počas všetkých experimentov kultivovaná v 100 ml Erlenmeyrových bankách (50 ml média), resp. 250 ml (100 ml živného média) pri stanovovaní rastovej krivky, na temperovanej trepačke pri 30 °C a intenzívnom miešaní (170 rpm). Inokulum bolo zaočkované 3 kličkami kultúry z pevného média. Po 24 hodinách bolo týmto inokulom (v objeme 5 % produkčného média) zaočkované produkčné médium.

4.4.2. Porovnanie rastu *A.vinelandii* a produkcie PHA na rôznych médiách

Kultivácia prebiehala pri podmienkach určených v kap. 4.4.1.2 na živných médiách A, B, PY, SP a NB (kap. 4.4.1.1.). Odber bol vykonaný po 70 hodinách rastu. Zákal pre stanovenie biomasy bol meraný spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 630 nm proti blanku (čisté médium). Pre stanovenie PHA bolo odobraných 10 ml kultúry.

4.4.2.1. Stanovenie sušiny a kalibrácia biomasy

K stanoveniu sušiny bola použitá kultúra kultivovaná na Burkovom médiu. K zostrojeniu lineárnej závislosti absorbancie pri 630 nm na koncentrácii biomasy bol použitý rovnaký postup ako pri kultivácii *B.megaterium* (kap. 4.3.2.1.).

4.4.2.2. Stanovenie kopolyméru P(HB-co-HV)

Baktéria *A.vinelandii* je schopná i pri raste na jednoduchom substráte produkovať kopolymér P(HB-co-HV). V rámci jednej analýzy bol stanovený obsah dvoch možných monomérov: 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu s pomocou komerčne dostupného kopolyméru P(HB-co-HV) s 12 % obsahom 3-hydroxyvalerátu (Fluka). Pracovný postup bol rovnaký ako pri stanovení PHB (4.3.2.2.).

4.4.3. Optimalizácia koncentrácie glukózy v médiu A a Burkovom médiu

Dôležitým krokom bolo zistiť optimálnu koncentráciu glukózy v médiu pre dostatočný rast kultúry ako aj výraznú produkciu PHA. Z predchádzajúceho experimentu boli na základe výsledkov vybrané 2 živné médiá – médium A a Burkovo médium. Každé bolo pripravené s 5 rôznymi koncentráciami glukózy (10 – 50 g/l) a zaočkované inokulom o objeme 5 % produkčného média. Kultivácia prebiehala za podmienok uvedených v kap. 4.4.1.2. Po 70 hodinách bola stanovená koncentrácia biomasy a obsah PHA, resp. kopolyméru P(HB-co-HV).

4.4.4. Rast *A.vinelandii* a produkcia PHA na Burkovom médiu

Priebeh rastu bakteriálneho kmeňa *A.vinelandii* bol sledovaný na Burkovom médiu s koncentráciou glukózy 30 g/l po dobu 100 hodín. Odbery k určeniu rastu biomasy boli vykonávané každú piatu hodinu, zatiaľ čo odbery pre stanovenie produkcie PHA prebiehali vždy po 10 hodinách.

4.4.4.1. Vplyv aplikácie stresových faktorov

A.vinelandii bol podrobený rôznym stresovým kultiváciám za účelom dosiahnutia výraznejšej produkcie PHA. Stresové faktory boli aplikované v 50. hodine. Po uplynutí kultivácie (70 hodín) bol stanovený vplyv stresových faktorov na produkciu PHA a biomasy. Výsledné hodnoty boli porovnané s kontrolnou kultiváciou bez stresu.

4.4.5. Kultivácia *A.vinelandii* na rôznych zdrojoch uhlíka

Podobne ako u baktérie *B.megaterium* (kap. 4.3.6.) prebehla kultivácia *A.vinelandii* na rôznych sacharidoch a polysacharidoch, ako je galaktóza, laktóza, maltóza, fruktóza, sacharóza, xylóza a škrob, pridaných v koncentrácii 10 g/l. Po 70 hodinovom raste prebehli odbery k určeniu nárastu biomasy a produkcie PHA, pričom výsledky boli zrovnané s pôvodnou kontrolnou kultiváciou na glukóze.

4.5. Kultivácie bakteriálnych kmeňov na odpadnej srvátke

Nielen úpravou kultivačných podmienok je možné znížiť náklady na mikrobiálnu syntézu PHA – vhodnou cestou sa ukazuje využitie odpadných priemyselných produktov ako živnej pôdy pre produkčné organizmy. Srvátka typická zložením schopným podporiť rast mikroorganizmov – obsah bielkovín, cukrov a stopových prvkov, bola vybraná pre ďalšie kultivácie za účelom syntézy PHA rôznymi baktériami.

4.5.1. Analýza chemického zloženia srvátky

4.5.1.1. Prvotná úprava srvátky

Srvátka získaná od firmy Pribina Příbyslav, ako odpadný produkt pri výrobe syra Hermelín, bola po rozmrazení okyslená 0,1 M H_2SO_4 na pH 4,6. Následným povarením vo vodnom kúpeli po dobu 20 min sa vyzrážali bielkoviny – najmä kazeíny a globulíny, ktoré boli odstredené pri 5000 rpm (10 min). Pred samotnou kultiváciou bolo opäť upravené pH pomocou 1 M NaOH na výsledné pH 7.

4.5.1.2. Stanovenie sušiny

Do troch vopred vysušených a zvážených váženík bolo napipetovaných po 5 ml srvátky a zároveň bola stanovená aj hmotnosť vzorky srvátky pre určenie obsahu vody. Vzorky boli sušené 1 hod pri cca 100 °C. Vychladnuté vzorky boli opäť zvážené a z rozdielu hmotnosti bol určený obsah vody a sušiny v srvátke.

4.5.1.3. Stanovenie popola

Do vyžíhaného a zváženého porcelánového kelímku boli napipetované 2 ml srvátky s presne určenou hmotnosťou na štyri desatinné miesta. V prvej fáze boli vzorky opatrne zuhoľnatené na elektrickej platni, druhá fáza pozostávala zo žihania v elektrickej peci pri teplote 800 °C po dobu 2 hodín – až do bielo-šedého sfarbenia popola. Po vychladnutí v exsíkátore boli vzorky zvážené a bol stanovený presný obsah popola v srvátke.

4.5.1.4. Biuretové stanovenie bielkovín v srvátke

Biuretová reakcia slúži k dôkazu peptidickej väzby $-CO-NH-$ bielkovín vo vzorke. S roztokom síranu meďnatého reagujú v zásaditom prostredí za vzniku červenofialového komplexu absorbujúceho pri 550 nm [22].

K určeniu koncentrácie bielkovín bola zostrojená kalibračná závislosť. Do piatich skúmaviek bolo postupne napipetovaných 0,5 – 2,5 ml zásobného roztoku štandardu albumínu (0,3 mg/ml). Vzorky boli doplnené do 3 ml destilovanou vodou. Po 30 minútach od pridania 0,3 ml biuretového činidla bola zmeraná absorbanca pri 550 nm oproti slepej vzorke.

Rovnaký postup bol použitý pri určovaní obsahu bielkovín vo vzorke srvátky, z ktorej bol odobraný vždy 1 ml. Výsledná koncentrácia bola vypočítaná z kalibračnej závislosti absorbancie na koncentrácii bielkoviny vo vzorke.

4.5.1.5. Celkový obsah fosforu v popole srvátky

Podiel fosforu sa zisťuje z popola vzorky, kedy fosforečnany reagujú s molybdenom amónnym na fosfomolybdenany redukujúce sa roztokom zmesi hydrochinónu a siričitanu sodného na molybdénovú modrú stanoviteľnú spektrofotometrickými metódami.

Do siedmych skúmaviek bolo postupne rozpipetovaných 0,1 – 0,7 ml zásobného roztoku dihydrogénfosforečnanu draselného (25 µg/ml), ku ktorým bolo pridaných po 1 ml z roztokov molybdenanu amónneho, hydrochinonu a siričitanu sodného. Obsah skúmaviek bol doplnený do 10 ml destilovanou vodou. Po 30 minútach bola zmeraná absorbanca vzoriek pri 610 nm oproti slepej vzorke a zostrojená kalibračná závislosť na koncentrácii.

Vzorka popola srvátky rozpustená v 10 % kyseline chlorovodíkovej bola kvantitatívne prevedená do 10 ml odmernej banky a doplnená destilovanou vodou po rysku. K 0,1 ml rozpustenej vzorky bol pridaný 1 ml molybdenanu a po chvíli aj hydrochinonu a siričitanu. Vzorky boli doplnené do 10 ml destilovanou vodou. Absorbanca bola premeraná pri 610 nm oproti blanku, z ktorej bola po dosadení do kalibračnej rovnice stanovená koncentrácia fosforu v srvátke [23].

4.5.1.6. Určenie celkového obsahu dusíka podľa Kjeldalha

Kjeldalhovou metódou je možné stanoviť celkový obsah dusíka v mineralizovanej vzorke. Jedná sa o stanovenie tzv. hrubej bielkoviny, ktorá v sebe zahŕňa aj dusikaté látky nebielkovinovej povahy.

Do 3 mineralizačných trubíc boli napipetované 2 ml srvátky s hmotnosťou stanovenou na dve desatinné miesta. Ku každej vzorke v trubici bolo pridaných 10 ml koncentrovanej kyseliny sírovej a 2 g Weiningerovho katalyzátoru. Trubice boli vložené do mineralizačného bloku, kde prebiehala mineralizácia po dobu 24 hodín, až do číreho sfarbenia vzorky.

Pred samotným stanovením obsahu dusíka titráciou museli byť štandardizované odmerné roztoky hydroxidu sodného a kyseliny sírovej.

Vypočítané množstvo dihydrátu kyseliny šťaveľovej k získaniu 0,05 M roztoku bolo kvantitatívne prevedené do 100 ml odmernej banky, doplnené destilovanou vodou po rysku a dôkladne premiešané. Do 3 titračných baniek bolo napipetovaných po 10 ml pripraveného zásobného roztoku $C_2H_2O_4 \cdot 2 H_2O$ s prídavkom 3 kvapiek indikačného činidla fenoltaleínu. Titrovalo sa odmerným roztokom NaOH do trvalého ružového sfarbenia a z priemernej hodnoty spotreby bola vypočítaná jeho presná koncentrácia.

Rovnakým postupom bola zisťovaná presná koncentrácia odmerného roztoku H_2SO_4 . Do troch titračných baniek s 10 ml kyseliny boli pridané 3 kvapky Tashirovho indikátora.

Štandardizovaným odmerným roztokom NaOH bola kyselina titrovaná do prvého trvalého žltého sfarbenia.

Mineralizát vzorky srvátky bol destilovanou vodou kvantitatívne prevedený do destilačnej banky s pár kvapkami fenolftaleínu. Po pripojení banky k destilačnému prístroju bol deliacim lievikom postupne pridávaný 33 % roztok NaOH až do fialového sfarbenia. Amoniak uvoľnený pri reakcii bol vodnou parou predestilovaný do predlohy pod hladinu štandardizovaného roztoku kyseliny sírovej (25 ml). Po ukončení destilácie (30 min) bolo do predlohy s destilátom pridaných pár kvapiek Tashirovho indikátoru a titrovalo sa odmerným roztokom NaOH do prvého žltého sfarbenia.

Obsah celkového dusíka bol vypočítaný po dosadení jednotlivých výsledkov do vzorca [23].

4.5.1.7. *Spektrofotometrická analýza hrubej bielkoviny v srvátke*

Rovnako ako Kjeldahlovou metódou je možné z mineralizátu vzorky srvátky spektrofotometricky stanoviť obsah bielkovín reakciou s Nesslerovým činidlom. Metóda sa však vyznačuje vyššou mierou nepresnosti.

V 100 ml odmernej banke bolo zriedených 10 ml štandardného roztoku síranu amónneho (4,706 g/l). Postupným napipetovaním 0,2 – 0,6 ml zriedeného zásobného roztoku do piatich 50 ml odmerných baniek, bol po pridaní 30 ml destilovanej vody, 2 ml Nesslerovho činidla a doplnením po rysku, získaný koncentračný gradient v rozmedzí 20 – 60 µg dusíka. Absorbancia bola zmeraná po 15 minútach pri 450 nm oproti slepej vzorke. Zo závislosti absorbancie na koncentrácii dusíka bola zostrojená rovnica lineárnej závislosti.

Mineralizát pripravený v predchádzajúcej metóde (kap. 4.4.1.8.) bol zneutralizovaný roztokom 1 M NaOH, kvantitatívne prevedený do 500 ml odmernej banky a doplnený destilovanou vodou po rysku. Z roztoku vzorky bolo odpipetovaných 7,5 ml do 50 ml odmernej banky, ku ktorým boli pridané 2 ml Nesslerovho činidla a destilovaná voda. Po 15 minútach bola zmeraná absorbancia pri 450 nm a z výsledných hodnôt bola po dosadení do spočítanej rovnice lineárnej závislosti stanovená koncentrácia dusíka vo vzorke [23].

4.5.1.8. *HPLC analýza obsahu cukrov v srvátke*

Chromatografia prebiehala na kolóne Zorbax (4.6 × 150 mm) s aminofázou (C18-NH₂, 5 µm) pri 25 °C. Nástreky vzorky bol vykonaný pomocou dávkovacej smyčky. Ako mobilná fáza bola použitá zmes so zložením: 75 % acetonitrilu a 25 % vody, prietoková rýchlosť mobilnej fázy kolónou bola nastavená na 1 ml.min⁻¹. Detekcia bola vykonaná pomocou refraktometrického detektora. K výpočtu koncentrácie jednoduchých sacharidov v srvátke bola použitá externá kalibrácia s použitím príslušných štandardných roztokov.

4.5.2. *Porovnanie rastu a produkcie vybraných bakteriálnych kmeňov kultivovaných na srvátke*

V prvej kultivácii boli otestované štyri rôzne mikroorganizmy – *Azohydromonas lata*, *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus megaterium* a *Wautersia eutropha*. Z každej kultúry bolo

pripravené inokulum na príslušnom tekutom živnom médiu. Po 24 hodinách vývoja bolo týmto inokulum zaočkované produkčné médium – srvátka.

I. *Azohydromonas lata*

Submerzná kultivácia

Laktóza	10 g
Peptone	5 g
Yeast autolysate	5 g
Destilovaná voda	1000 ml

Pevné médium – NB médium (kap. 4.3.1.1.)

II. *Azotobacter vinelandii*

Submerzná kultivácia – Burkovo médium (kap. 4.4.1.1.) a 15 g/l glukózy.

Pevné médium – A médium (kap. 4.4.1.1.)

III. *Bacillus megaterium*

Submerzná kultivácia – BM médium (kap. 4.3.1.1.) a 8 g/l laktózy.

Pevné médium – BM médium

IV. *Wautersia eutropha*

Submerzná kultivácia [24]

Fruktóza	10 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	3 g
Na ₂ HPO ₄	11,1 g
KH ₂ PO ₄	1,02 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,2 g
<i>Microelement solution</i> *	1 ml
Destilovaná voda	1000 ml

pH 7,6

*Microelement solution (MS 2)

FeCl ₃	9,7 g
CaCl ₂	7,8 g
CuSO ₄	0,156 g
CoCl ₂	0,119 g

NiCl ₂	0,118 g
CrCl ₂	0,062 g
0,1 M HCl	1000 ml

Pevné médium – NB médium (kap. 4.3.1.1.)

Samotná produkčná fáza prebiehala na neupravenej aj upravenej srvátke (v oboch prípadoch predchádzala úprava pH na neutrálne 1 M roztokom NaOH). Úprava srvátky spočívala v prídavku solí a iných pre rast dôležitých látok špecifických pre jednotlivé bakteriálne kmene podľa nižšie uvedenej tabuľky:

Tab. 1.: Zloženie srvátkového média pre jednotlivé bakteriálne kultúry.

	<i>A.lata</i>	<i>A.vinelandii</i>	<i>B.megaterium</i>	<i>W.eutropha</i>
Na ₂ HPO ₄			1 g/l	
KH ₂ PO ₄			1 g/l	
(NH ₄) ₂ SO ₄			1 g/l	
MgSO ₄ .7 H ₂ O			0,2 g/l	
FeSO ₄ .7 H ₂ O		10 mg/l		
NaMoO ₄ . 2 H ₂ O		5 mg/l		
MnSO ₄			0,01 g/l	
MS 1*	1 ml/l			
MS 2				1 ml/l

* MS 1 – zloženie [25]:

Citran železito-amónny	6 g
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	10 g
H ₃ BO ₃	0,3 g
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,2 g
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,1 g
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	0,03 g
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,03 g
NiSO ₄ . 7 H ₂ O	0,02 g
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,01 g
Dest.voda	1000 ml

Sterilné médium obsahujúce upravenú a neupravenú srvátku bolo zaočkované pripraveným inokulom. Kultivácia prebiehala 70 hodín pri teplote 30 °C a intenzívnom miešaní (150 rpm). Po ukončení boli odobrané vzorky k spektrofotometrickému stanoveniu nárastu biomasy a koncentrácie vyprodukovaných PHA (kap. 4.3.2.2.).

4.5.2.1. Analýza úbytku cukrov v srvátke pri kultivácii rôznych baktérií

Zo vzoriek získaných pri kultivácii baktérií na srvátke z predchádzajúceho experimentu bol odobraný supernatant po oddelení biomasy k HPLC analýze (kap. 4.5.1.8.) laktózy a glukózy v srvátkovom médiu. Jednotlivé koncentrácie boli porovnané s obsahom cukrov v srvátke pred kultiváciou.

4.5.3. Kultivácia *B.megaterium* na upravenej a neupravenej srvátke

Z predchádzajúceho experimentu bol pre ďalšie kultivácie na srvátkovom médiu vybraný bakteriálny kmeň *B.megaterium*. Opäť bolo pripravené médium z neupravenej a upravenej srvátky s prídavkom solí ako v predchádzajúcom prípade, a to podľa syntetického média pre kultiváciu *B.megaterium* (kap. 4.5.2., tab. 1). Rast a produkcia bola sledovaná v 25., 30. a 45. hodine.

4.5.4. Optimalizácia zloženia srvátky pomocou štatistickej metódy Plackett-Burman

Získať médium o zložení maximálne podporujúcom rast kultúry, prípadne syntézy významného produktu, je večným „kameňom úrazu“ väčšiny biotechnológov. K optimálnemu zloženiu média je možné sa dopracovať pomerne jednoduchým, ale zdĺhavým procesom, pri ktorom sa skúšajú jednotlivé zložky v média v rôznych koncentráciách postupne jeden za druhým. Inováciu do tohto postupu priniesla štatistická optimalizačná metóda Plackett-Burman umožňujúca vyhodnotiť vplyv rôznych nezávislých faktorov v niekoľko málo experimentoch [17].

V tomto prípade sa jedná o vplyv zloženia srvátkového média na rast a produkciu kultúry *B.megaterium*. K sledovaniu bolo vybraných päť faktorov – riedenie srvátky, prídavok dusičnanov a fosforečnanov, horčíka a kvasničného autolyzátu. Koncentrácia parametrov bola zvolená vo vysokej (1) a nízkej hladine (-1) optimálnej pre rast kultúry.

	parameter	1	-1
A	srvátka	neriedená	riedená 4x
B	(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g/l	1 g/l
C	Na ₂ HPO ₄ ; KH ₂ PO ₄	5 g/l	1 g/l
D	MgSO ₄	0,2 g/l	0,04 g/l
E	Yeast autolysate (YA)	1 g/l	0,1 g/l

Pomocou počítačového programu Minitab® bol zostavený experiment s 12 rozličnými kombináciami parametrov (kombinácie hladín 1 a -1), z ktorých boli pripravené produkčné média pre baktériu *B.megaterium* kultivovanú za štandardných podmienok (48 h, 30 °C, 150 rpm). Do každého média bol pridaný MnSO₄ (0,01 g/l) ako nevyhnutný faktor pre rast *B.megaterium*.

Tab. 2: Zloženia experimentov zostavené podľa programu Minitab® (uvedené hodnoty sú koncentrácie v g/l).

	Srvátka	Dusík*	Fosfor*	Mg*	YA
1	neriedená	1,00	5,00	0,04	0,10
2	neriedená	5,00	1,00	0,20	0,10
3	riedená	5,00	5,00	0,04	1,00
4	neriedená	1,00	5,00	0,20	0,10
5	neriedená	5,00	1,00	0,20	1,00
6	neriedená	5,00	5,00	0,04	1,00
7	riedená	5,00	5,00	0,20	0,10
8	riedená	1,00	5,00	0,20	1,00
9	riedená	1,00	1,00	0,20	1,00
10	neriedená	1,00	1,00	0,04	1,00
11	riedená	5,00	1,00	0,04	0,10
12	riedená	1,00	1,00	0,04	0,10

* dusík bol pridaný vo forme $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, fosfor – Na_2HPO_4
a KH_2PO_4 (1:1), horčík – MgSO_4

Vyhodnotenie experimentu prebehlo opäť v programe Minitab® dosadením výsledných hodnôt koncentrácie biomasy a nasyntetizovaného PHB do tabuľky, kde boli spočítané T a P hodnoty jednotlivých parametrov. T hodnota udáva aký vplyv má daná zložka na sledovanú premennú (biomasa, PHB) – pokiaľ je T hodnota kladná, vplyv je pozitívny a opačne, pokiaľ má zápornú hodnotu, vplyv je negatívny. Zmyslupnosť T hodnoty určuje práve P hodnota. Test je založený na hladine štatistickej významnosti 0,05 – ak je P hodnota vyššia ako 0,05, T hodnota je štatisticky nevýznamná [17].

4.5.5. Optimalizácia riedenia srvátky

Zriedená srvátka mala pozitívny vplyv pre rast a rovnako aj pre produkciu PHB u baktérie *B.megaetrium*, bolo však potrebné zistiť optimálny pomer riedenia.

Podľa výsledného obsahu laktózy v srvátke boli pripravené štyri média s riedenou srvátkou (5, 10, 20, 30 g/l laktózy) a jedno s neriedenou (laktóza – 40 g/l). Kultivácia prebehla za štandardných podmienok, s prídavkom MnSO_4 . Po 48 hodinách bol porovnaný rast biomasy a koncentrácia produkovaného PHB.

5. VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1. Porovnanie metód analýzy PHA

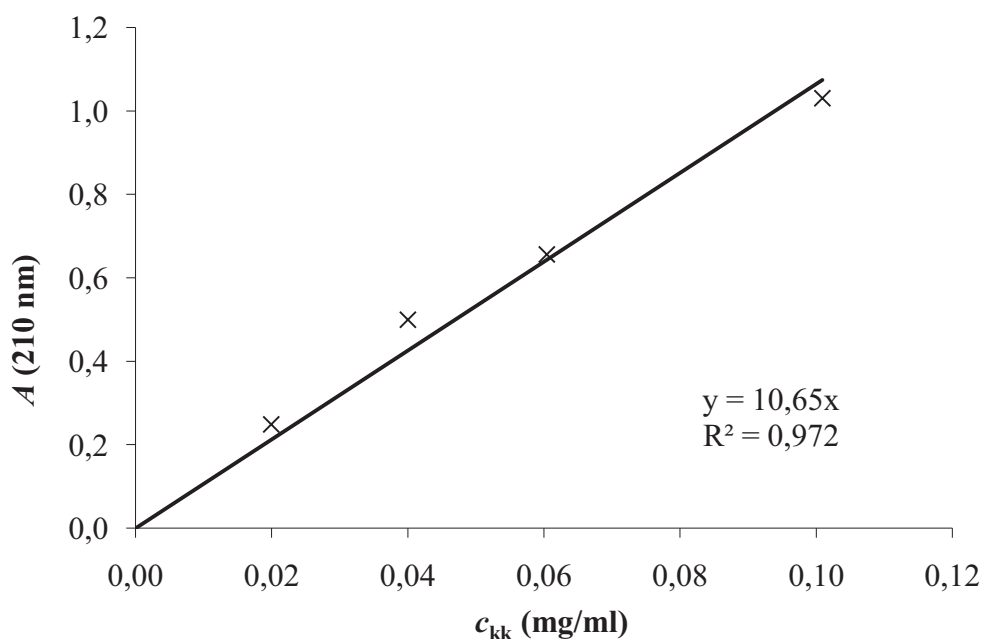
5.1.1. Spektrofotometrické stanovenie v UV oblasti

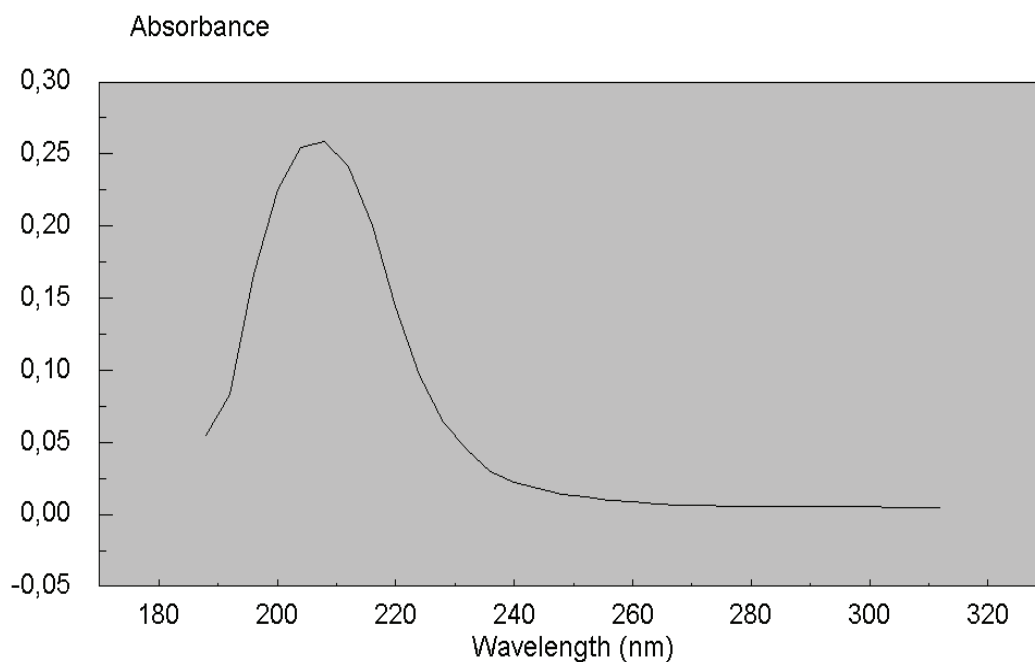
Polyhydroxybutyrát sa pôsobením koncentrovanej kyseliny sírovej hydrolyzuje na kyselinu krotónovú absorbujúcu UV žiarenie pri 210 nm, preto boli porovnané absorbancie štandardu PHB a aj štandardu kyseliny krotónovej so vzorkou lyofilizovanej biomasy *A.vinelandii* (kap. 4.4.3.).

Tab. 3: Hodnoty pre stanovenie kalibračnej závislosti absorbancie pri 210 nm na obsahu kyseliny krotónovej.

Navážka (mg)	c_{kk} (mg/ml)	$A_{210\text{ nm}}$
19,9	0,0199	0,249
40,0	0,0400	0,500
60,4	0,0604	0,656
100,9	0,1009	1,030

Graf 1: Kalibračná závislosť absorbancie na koncentrácii k. krotónovej.





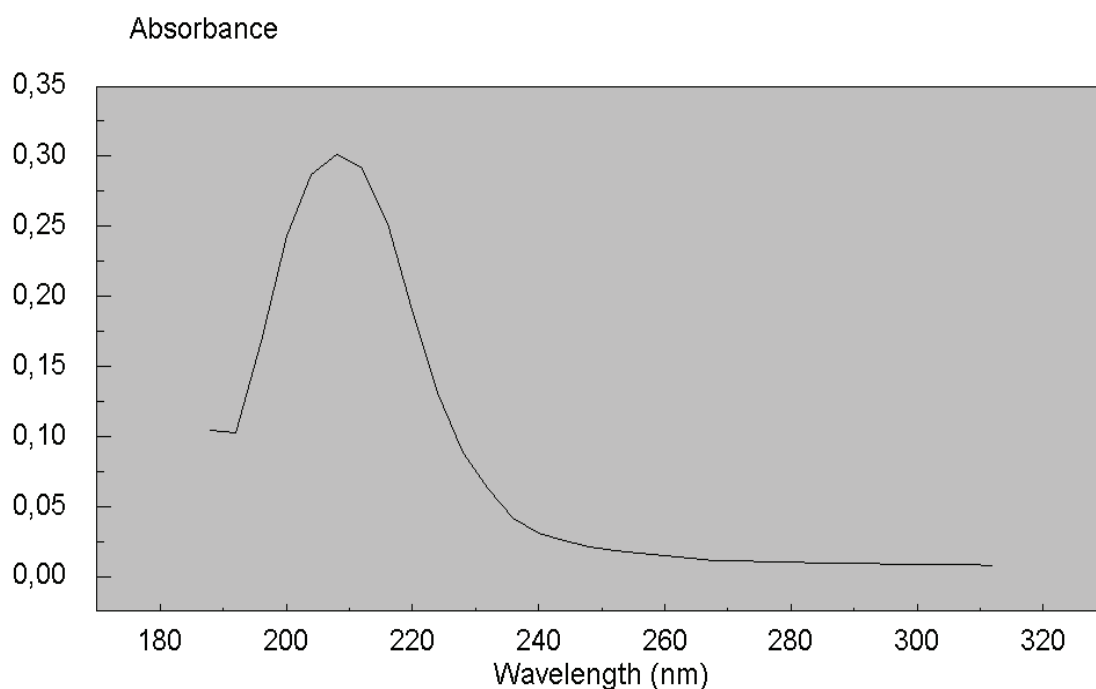
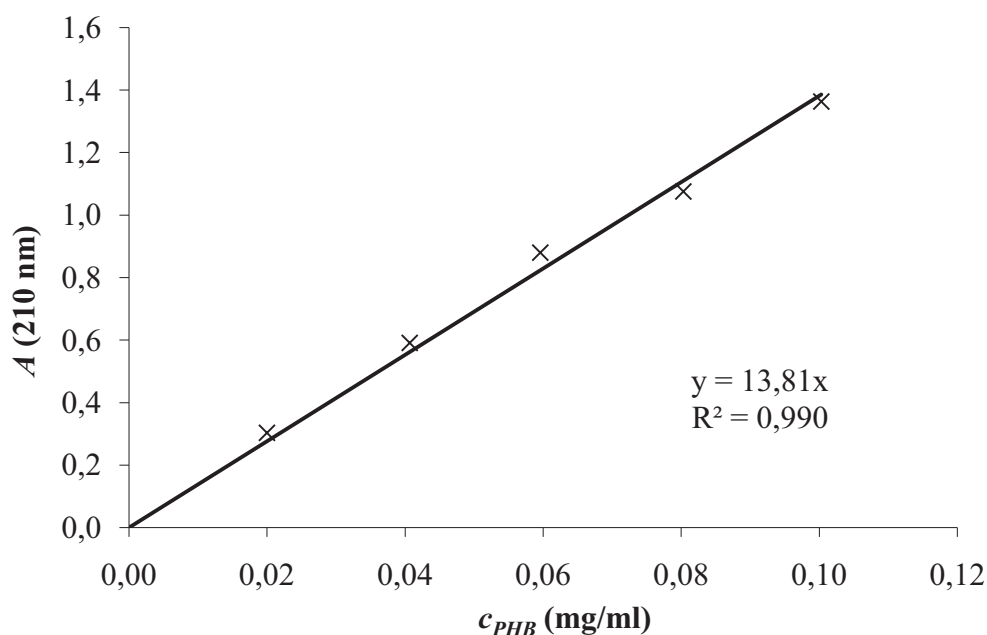
Obr.8: Absorpčné spektrum štandardu kyseliny krotónovej.

Obe kalibračné rovnice – kyseliny krotónovej a štandardu PHB boli zostrojené s výbornou spoľahlivosťou (graf 1 a 2). Jednotlivé vzorky boli ešte pred samotným meraním 1000krát zriedené, aby bola dosiahnutá primeraná hodnota absorbancie.

Tab. 4: Hodnoty kalibračnej závislosti absorbancie pri 210 nm na obsahu PHB .

Navážka (mg)	C_{PHB} (mg/ml)	$A_{210 \text{ nm}}$
20,0	0,0200	0,303
40,7	0,0407	0,590
59,6	0,0596	0,879
80,3	0,0803	1,075
100,3	0,1003	1,363

Graf 2: Kalibračná závislosť absorbancie na koncentrácii PHB.

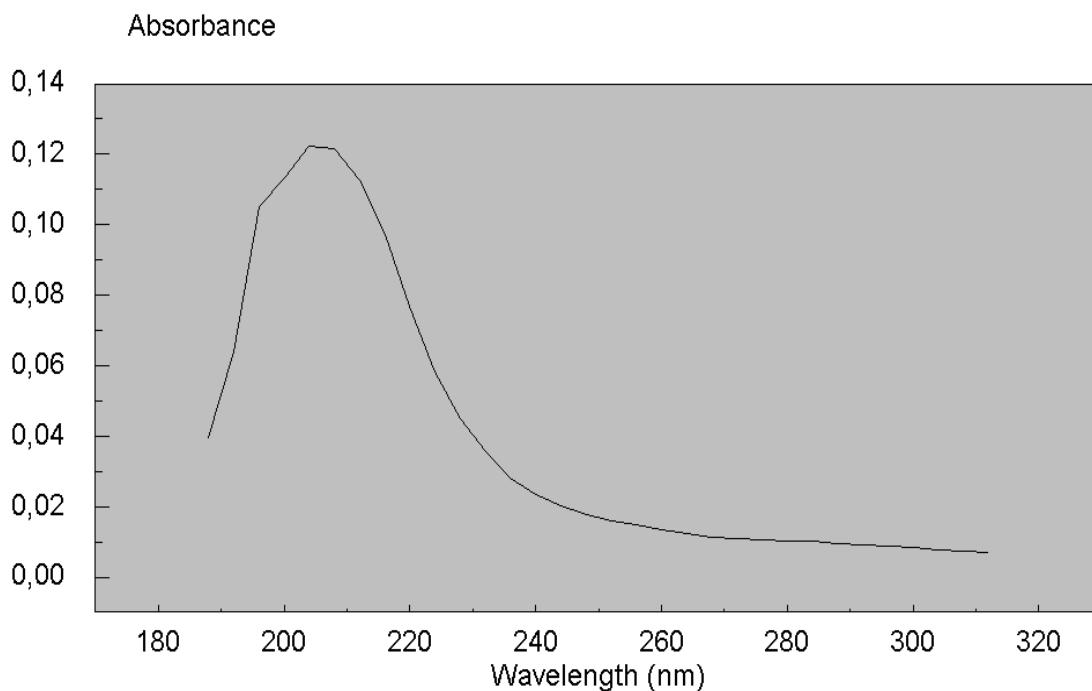


Obr.9: Absorpčné spektrum štandardu PHB.

Pre optimálne koncentrované vzorky boli rovnako zostrojené absorpčné spektrá v rozmedzí vlnových dĺžok 180 – 320 nm (obr. 8 a 9). Štandard kyseliny krotónovej a PHB vykazuje hladký pík v okolí 210 nm, pričom vzorka mala viac rozťahnutý priebeh, zrejme v dôsledku prítomnosti kopolyméru a iných látok obsiahnutých v biomase.

Tab. 5: Hodnoty absorbancie a výslednej koncentrácie PHB meraných vzoriek.

Vzorka	Navážka (mg)	$A_{210\text{ nm}}$	c_{PHB} (mg/ml)	PHB (%)
A1	10,1	0,121	8,7599	86,73
A2	10,1	0,135	9,7734	95,82



Obr.10: Absorpčné spektrum vzorky biomasy *A.vinelandii* obsahujúcej kopolymér *P(HB-co-HV)*.

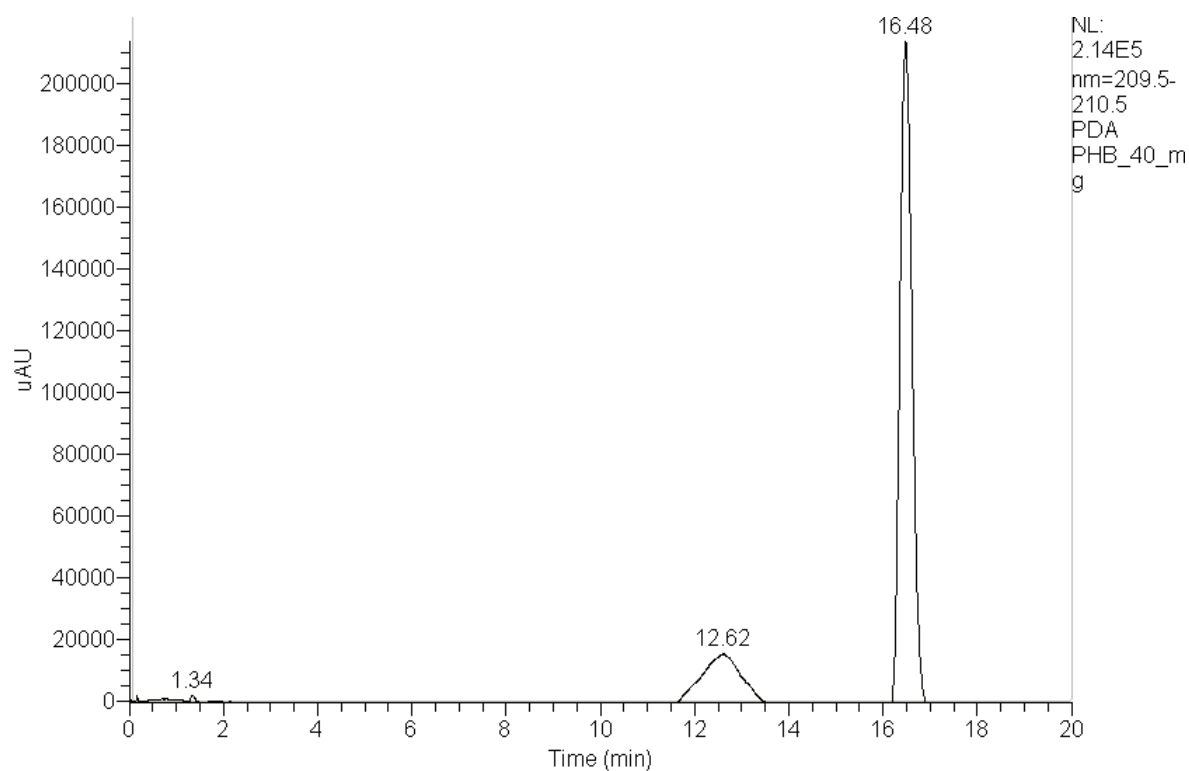
Výsledná koncentrácia polyméru vo vzorke *A.vinelandii* bola stanovená na 91% z obsahu biomasy, čo by v konečnom dôsledku bol veľmi pekný zisk, ale nie je reálny, a to najmä v porovnaní s ostatnými metódami, kde je bola nameraná nižšia koncentrácia PHB v biomase. Keby sa k stanoveniu koncentrácie PHB použila kalibrácia na kyselinu krotónovú, vyšiel by nereálny obsah PHB – viac ako 100%.

Pravdepodobne sú takto vysoké výtťažky spôsobené prítomnosťou ďalších látok v biomase, taktiež absorbujúcich pri 210 nm za daných podmienok. Priame spektrofotometrické stanovenie PHB preto nie je vhodné a pred UV analýzu by bolo potrebné zaradiť separačný krok – HPLC.

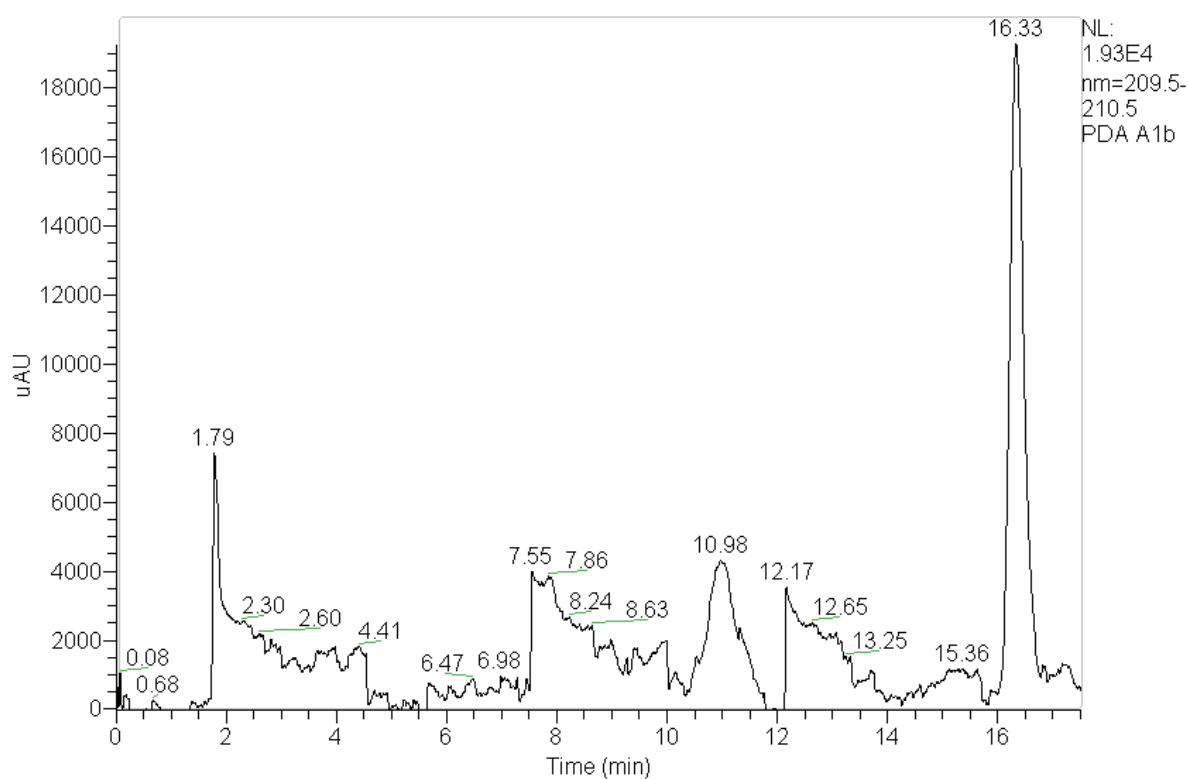
5.1.2. HPLC analýza PHB

HPLC analýzou boli premerané rovnaké vzorky a štandardy ako pri spektrofotometrickom stanovení, bola zostrojená nová kalibračná závislosť, tentokrát plochy píku od koncentrácie PHB, a v závere bol stanovený obsah PHB vo vzorke biomasy *A.vinelandii* ako v predchádzajúcom prípade.

Nižšie sú uvedené príklady chromatogramov – štandardu PHB a vzorky biomasy, s retenčným časom PHB okolo 16,4 minúte (obr. 11 a 12).



Obr.11: Chromatogram štandardu PHB

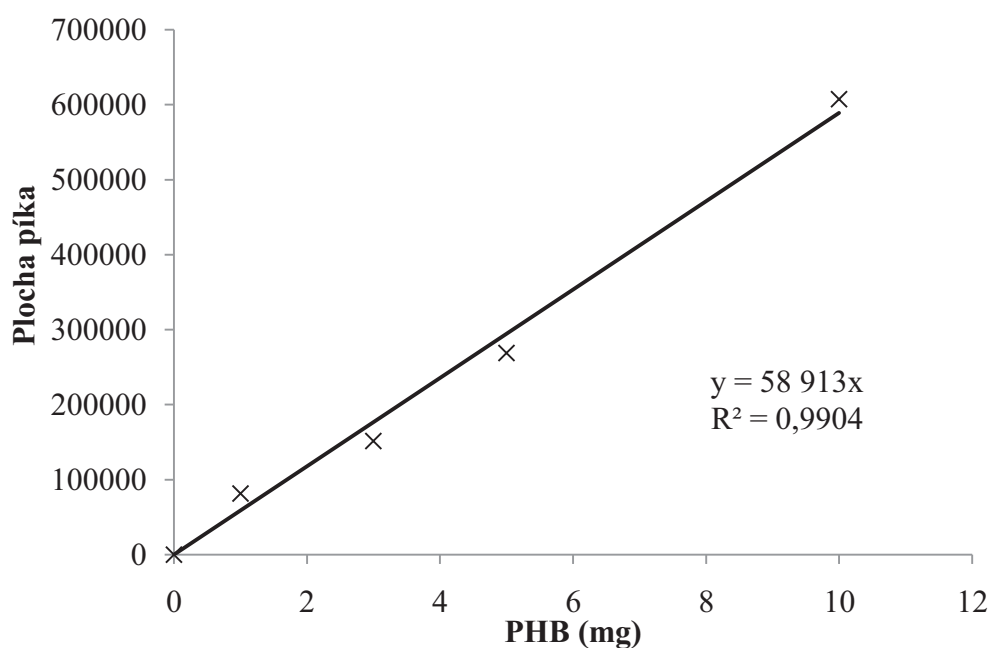


Obr.12: Chromatogram vzorky biomasy *A. vinelandii*

Tab. 6: Hodnoty kalibračnej závislosti plochy píkovo od navážky štandardu PHB.

PHB (mg)	Plocha píka
1	81688
3	151518
5	268704
10	607355

Graf 3: Kalibračná závislosť plochy píkovo od navážky PHB.



Tab. 7: Hodnoty absorbancie a výslednej koncentrácie PHB meraných vzoriek metódou HPLC analýzy.

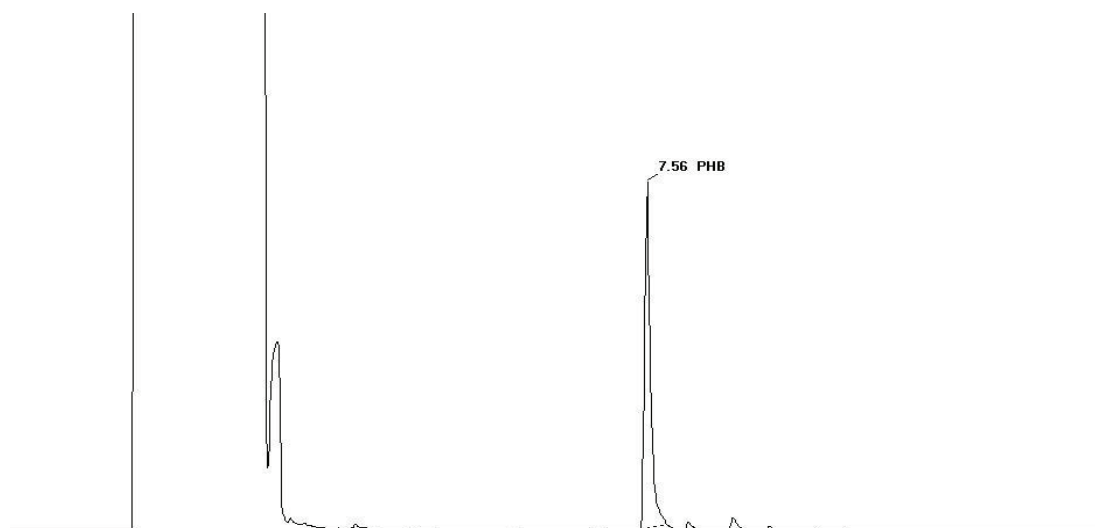
Vzorka	Navážka (mg)	Plocha	PHB (mg)	PHB %
A1	10,1	359704	6,11	60,45
A2	10,1	349813	5,94	58,79

V porovnaní s priamou spektrofotometrickou metódou analýzy obsahu PHB bolo vo vzorke biomasy zistených o 30 % menej polyméru, čo s predpokladanou spoľahlivosťou chromatografických metód poukazuje na značnú nepresnosť spomínaného spektrofotometrického stanovenia PHB. Zараdenie separačného kroku je pre spoľahlivé stanovenie PHB nevyhnutné.

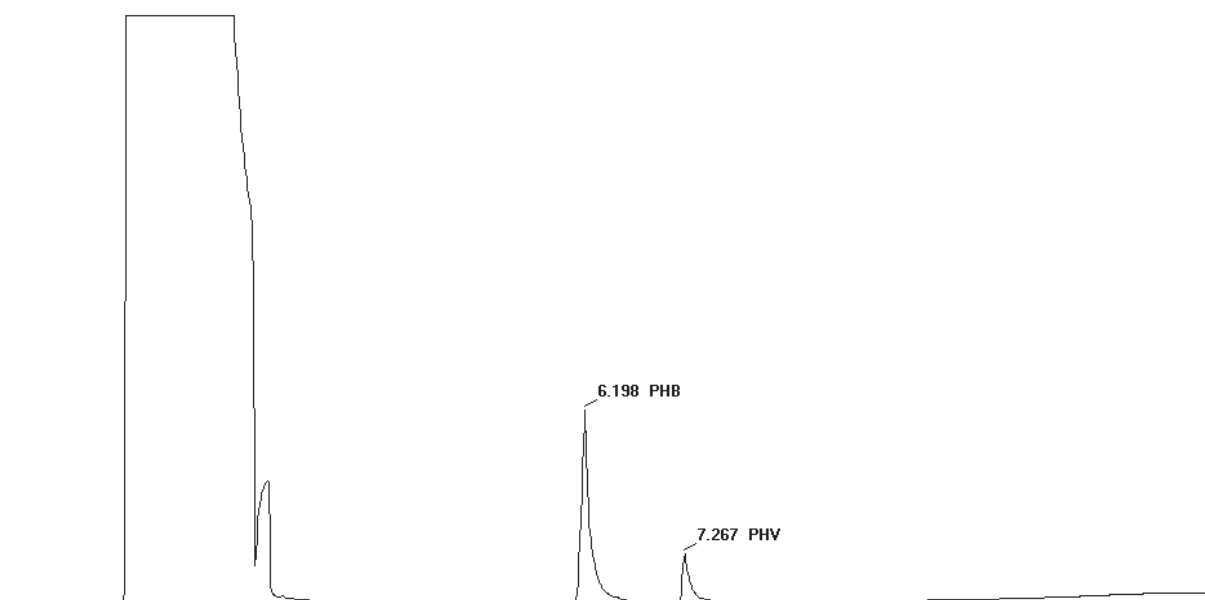
5.1.3. GC analýza PHB a P(HB-co-HV) s FID detekciou

GC analýza sa od predošlých dvoch metód líši najmä v príprave vzorky, keďže sa nestanovuje kyselina krotónová, ale obsah metylesterov príslušných hydroxykyselín.

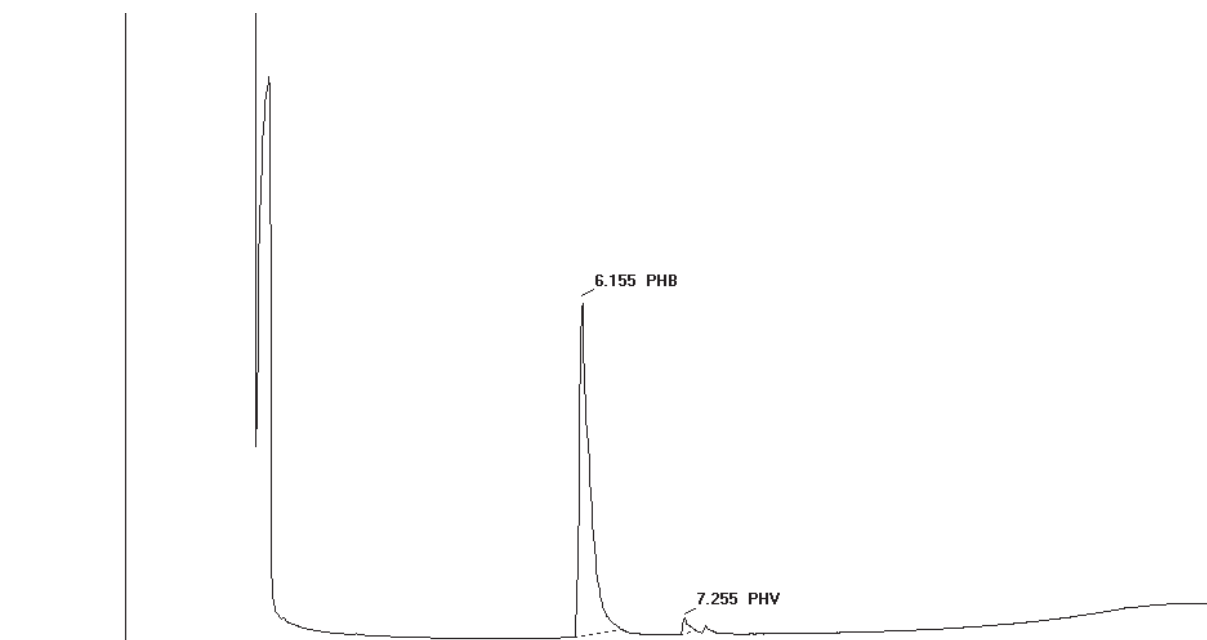
U baktérie *A.vinelandii* bola zistená predispozícia k syntéze kopolyméru P(HB-co-HV) [15], preto bol k stanoveniu potrebný aj štandard, ktorého chromatogram, ako aj chromatogram PHB, je zobrazený nižšie (obr.13, 14). Retenčné časy sú u GC analýzy takmer o polovicu kratšie.



Obr.13: Chromatogram štandardu PHB.



Obr.14: Chromatogram štandardu P(HB-co-HV).

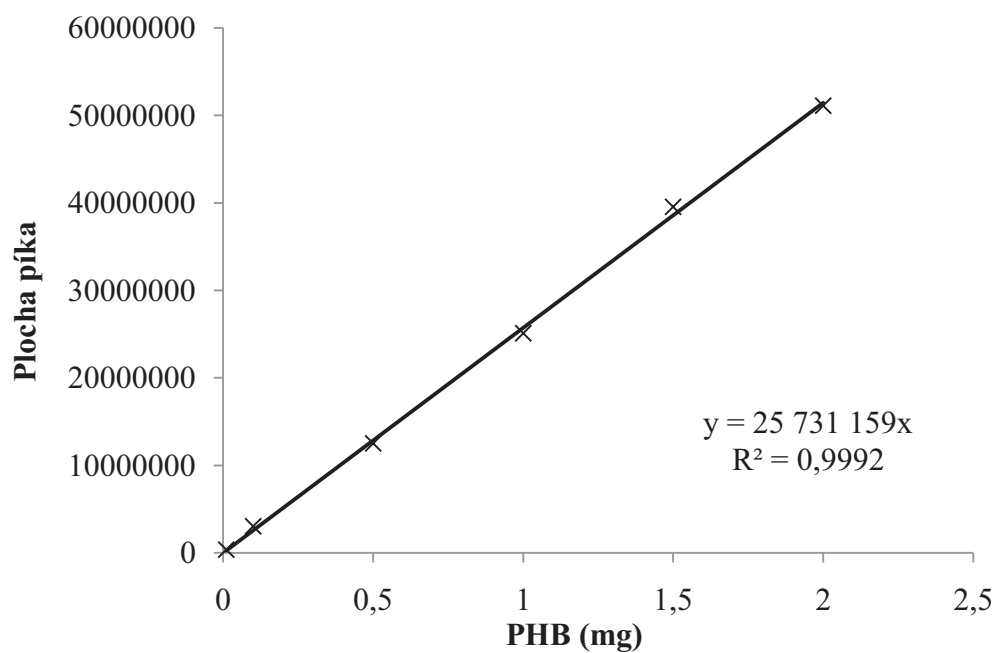


Obr.15: Chromatogram vzorky *A.vinelandii*.

Tab. 8: Hodnoty pre stanovenie kalibračnej závislosti plochy píku od množstva metylesteru 3-hydroxybutyrovej kyseliny.

PHB (mg)	Plocha píka
0,01	357963
0,10	3014028
0,50	12522100
1,00	25112453
1,50	39560270
2,00	51112345

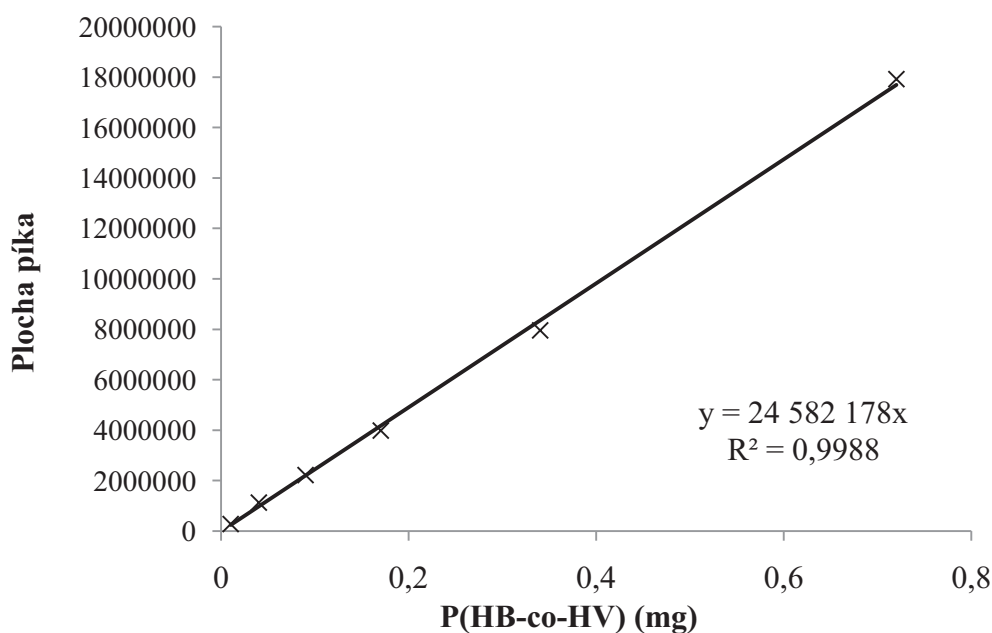
Graf 4: Kalibračná priamka závislosti plochy píku od obsahu metylesteru 3-hydroxybutyrovej kyseliny (GC analýza s FID detekciou).



Tab. 9: Hodnoty pre stanovenie kalibračnej závislosti plochy píku od množstva metylesteru 3-hydroxybutyrovej kyseliny.

PHB (mg)	Plocha píka
0,01	282606
0,04	1130425
0,09	2227907
0,17	3982366
0,34	7964732
0,72	17920647

Graf 5: Kalibračná priamka závislosti plochy píku od obsahu metylesteru 3-hydroxyvalerovej kyseliny (GC analýza s FID detekciou).



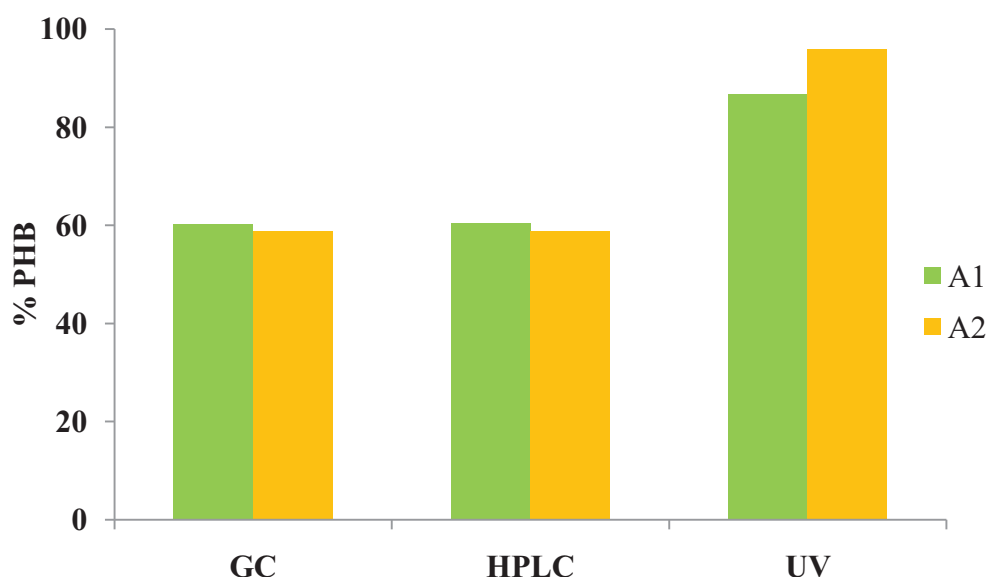
Tab. 10: Hodnoty absorbancie a výslednej koncentrácie PHB meraných vzoriek metódou GC analýzy s FID detekciou.

Vzorka	Navážka (mg)	PHB %
A1	10,1	60,24
A2	10,1	58,74

Tab. 11: Výsledné porovnanie analýzy PHB metódami GC, HPLC a spektrofotometricky v UV oblasti

Vzorka	PHB %		
	GC	HPLC	UV
A1	60,24	60,45	86,73
A2	58,74	58,79	95,82

Graf 6: Zrovnanie výsledkov jednotlivých analýz.



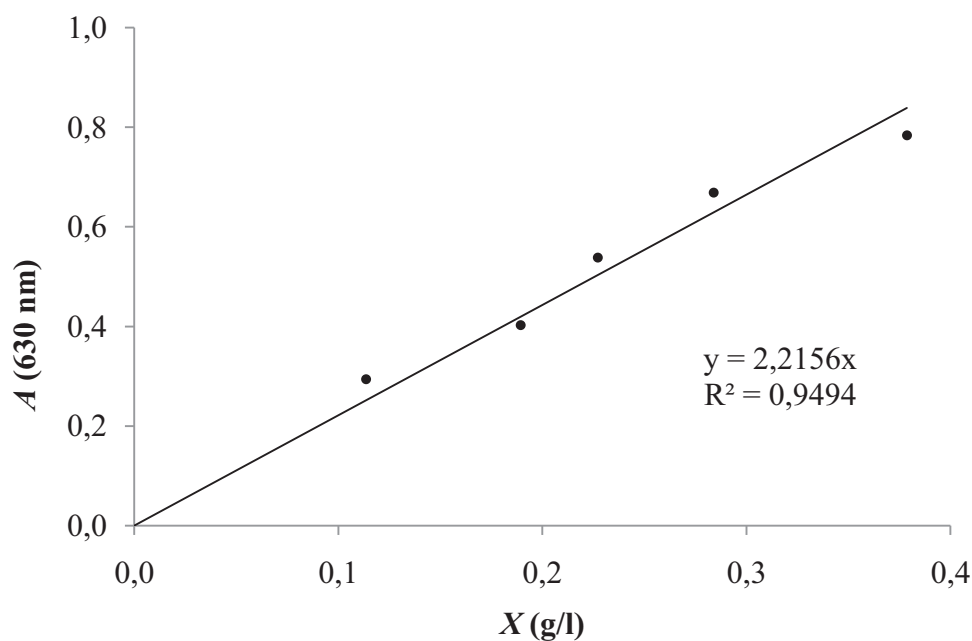
Plynovou chromatografiou bol stanovený obsah PHB vo vzorke biomasy *A.vinelandii* na 60 %. Aj keď sa výsledok zhoduje s HPLC metódou a priemerný čas na prípravu vzoriek je u GC analýzy o niečo dlhší, bola k ďalším analýzám zvolená práve posledná metóda plynovej chromatografie. Dôvodom bola možnosť využitia autosamplera v prístrojovej zostave GC FID, ktorý umožnil pripraviť naraz zostavu vzoriek a celkovo značne ušetril čas jednotlivých analýz. Navyše je GC analýza najčastejšie citovanou analytickou metódou stanovenia PHA v odbornej literatúre [17,20,26,27,28].

5.2. Kultivácia baktérie *Bacillus megaterium* CCM 2037

5.2.1. Rast a produkcia na BM médiu

Kalibračná priamka lineárnej závislosti absorbancie zákalu pri 630 nm na koncentrácii biomasy v médiu bola zostrojená optimálnym riedením kultúry s vázkovo stanovenou sušinou. Pred každým meraním absorbancie boli vzorky vhodne riedené. Jednotlivé výsledky boli vypočítané ako priemer dvoch paralelných meraní (graf 7).

Graf 7: Kalibračná závislosť – rast na BM médiu.

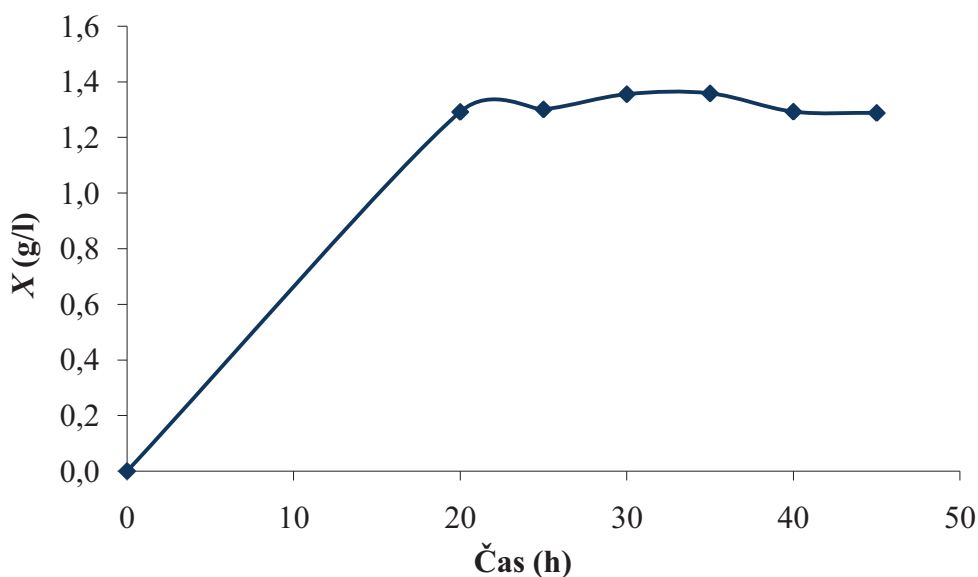


Každá kultivácii bola vykonaná vždy v 2 paralelných stanoveniach, pre stanovenie biomasy boli jednotlivé vzorky paralelných stanovení zmerané ešte trikrát a pre určenie koncentrácie PHB len dvakrát. Z nameraných hodnôt paralelných stanovení boli spočítané výsledné priemerné hodnoty a smerodajné odchýlky.

Tab. 12: Hodnoty rastovej krivky *B.megaterium* na BM médiu.

Čas (h)	X (g/l)
20	1,2916 ± 0,0006
25	1,3006 ± 0,0011
30	1,3552 ± 0,0006
35	1,3582 ± 0,0018
40	1,2924 ± 0,0014
45	1,2878 ± 0,0016

Graf 8: Priebek rastu *B.megaterium* na BM médiu po dobu 45 hodín



Z priebehu rastovej krivky na predchádzajúcom grafe je vidieť najmä rýchly priebeh nárastu kultúry *B.megaterium* z pozvoľným poklesom po 35. hodine. Keďže boli odbery robené až od 20. hodiny, nie je v grafe vidieť priebeh *lag* fázy, ktorá je u tohto mikroorganizmu pomerne krátka s rýchlym nástupom exponenciálnej fázy.

Tab. 13: Produkcia PHB počas rastu *B.megaterium* na BM médiu.

Čas (h)	PHB (%)	PHB (g/l)
20	9,1551 ± 0,0647	0,1160 ± 0,0008
25	0,8982 ± 0,0023	0,0065 ± 0,0027
30	0,1375 ± 0,0295	0,0036 ± 0,0004
35	0,0635 ± 0,0050	0,0009 ± 0,0001
40	0,0307 ± 0,0075	0,0003 ± 0,0001
45	0,0539 ± 0,0117	0,0007 ± 0,0001

Dosiahnutá produkcia PHB u *B.megaterium* na testovanom BM médiu bola veľmi nízka, maximum bolo dosiahnuté v 20. hodine rastu, a to len 9 % PHB z obsahu biomasy, čo nebolo k ďalším experimentom postačujúce, a preto boli testované iné média k dosiahnutiu vyššej produkcie PHB. Avšak kultivácia na BM médiu poslúžila k prvej predstave priebehu rastu a produkcie PHB baktériou *B.megaterium*.

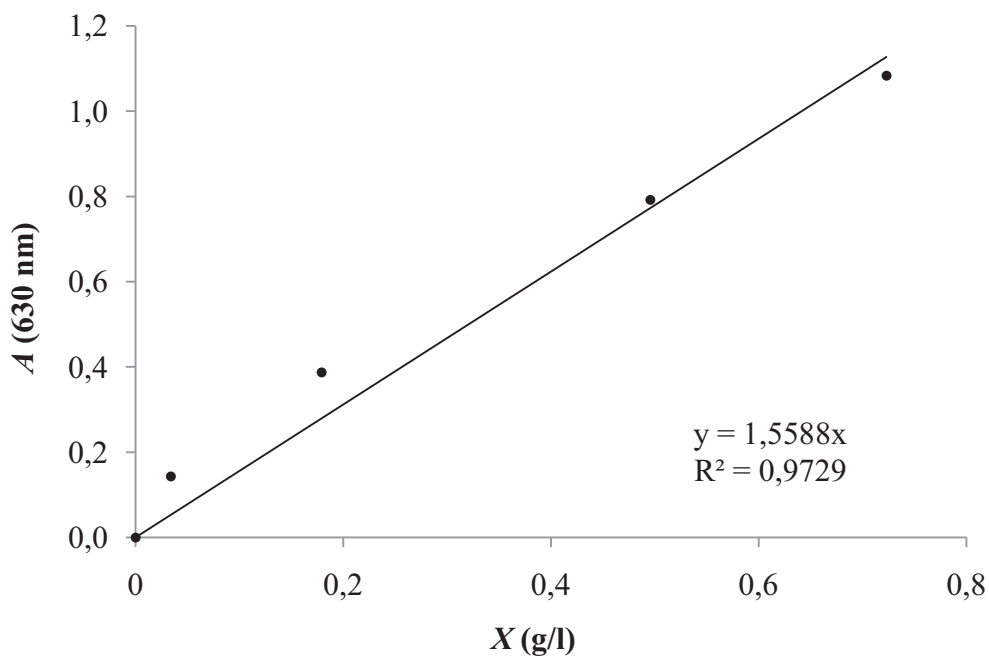
5.2.2. Rast a produkcia PHB baktériou *B. megaterium* na syntetickom médiu

5.2.2.1. Stanovenie rastovej krivky

Pred ďalšou kultiváciou bola zostrojená nová kalibračná rovnica pre syntetické médium (kap. 4.3.1.1.) na základe ktorej bol stanovený nárast biomasy počas 45 hodín kultivácie.

Rovnako ako pri odoberaní vzoriek na určenie zákalu, bola každú piatu hodinu odobraná aj vzorka na stanovenie produkcie PHB.

Graf 9: Kalibračná závislosť – rast na syntetickom médiu.



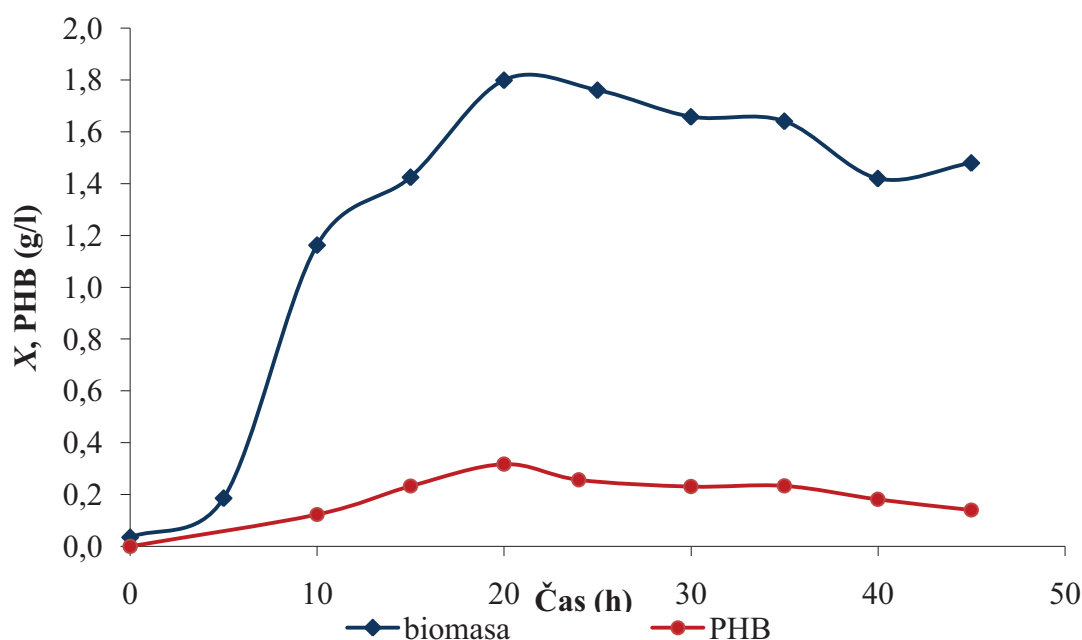
Tab. 14: Hodnoty rastovej krivky *B.megaterium* na syntetickom médiu.

Čas (h)	X (g/l)
5	0,1863 ± 0,0136
10	1,1622 ± 0,0387
15	1,4242 ± 0,0389
20	1,7984 ± 0,0408
25	1,7599 ± 0,1018
30	1,6573 ± 0,0432
35	1,6402 ± 0,0687
40	1,4194 ± 0,0453
45	1,4792 ± 0,0895

Tab. 15: Produkcia PHB počas rastu *B.megaterium* na syntetickom médiu.

Čas (h)	PHB (%)	PHB (g/l)
10	10,61 ± 1,27	0,1231 ± 0,0298
15	16,31 ± 0,57	0,2327 ± 0,0225
20	21,35 ± 0,18	0,3177 ± 0,0637
24	19,76 ± 1,71	0,2571 ± 0,0186
30	13,94 ± 1,23	0,2310 ± 0,0418
35	14,16 ± 1,25	0,2338 ± 0,0504
40	13,13 ± 0,23	0,1814 ± 0,0057
45	9,48 ± 0,59	0,1404 ± 0,0188

Graf 10: Priebeh rastu a produkcie PHB baktériou *B.megaterium* na syntetickom médiu.



Z priebehu rastu (graf 10) vidieť spomínanú krátku *lag* fázu prechádzajúcu do prudkej exponenciálnej fázy s maximom rastu *B.megaterium* v dvadsiatej hodine. Rovnako bol v 20. hodine dosiahnutý najvyšší obsah PHB - 0,32 g/l predstavujúci 21 % z obsahu biomasy. Syntéza PHB je voči celkovému obsahu biomasy stále nízka, avšak dvojnásobne vyššia ako pri kultivácii baktérie na BM médiu.

5.2.2.2. Rast na syntetickom médiu so zníženým obsahom dusíka a fosforu

Bakteriálny kmeň *B.megaterium* dokáže navýšiť produkciu PHB, pokiaľ je kultivovaný v médiu so zníženým obsahom pre rast dôležitých látok, ako je dusík alebo fosfor.

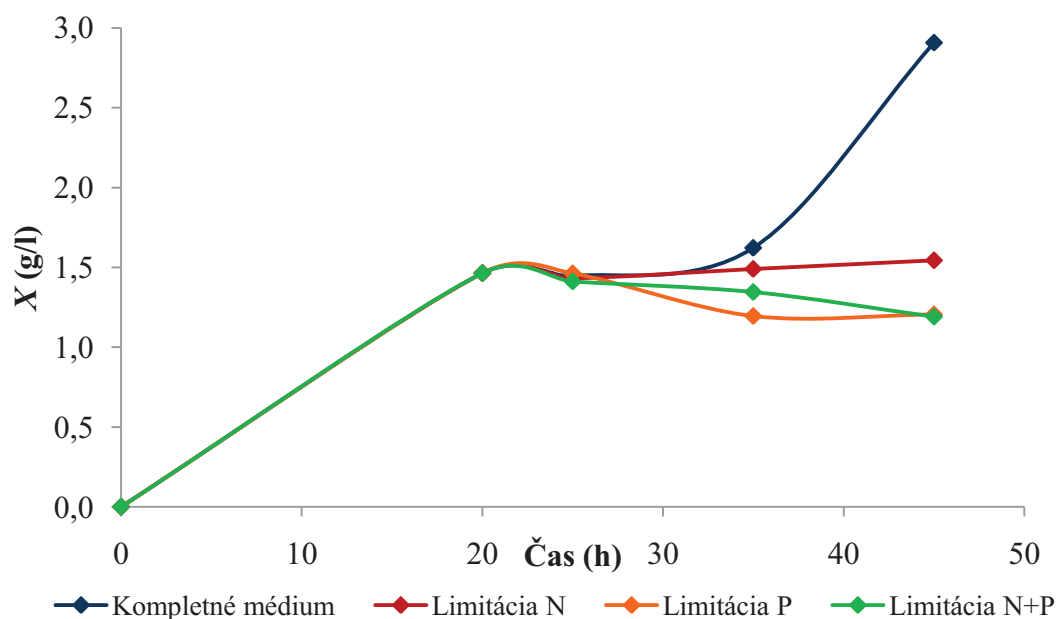
S rastom na kompletnom syntetickom médiu bol porovnaný rast a produkcia PHB na syntetickom médiu so zníženým obsahom dusíka, fosforu a oboch látok zároveň, do ktorého boli bunky sterilne prevedené v 20. hodine rastu. Čas aplikácie limitácie bol zvolený na základe znalosti rastovej krivky (5.2.2.1.) tak, aby boli bunky vystavené limitácii

v stacionárnej fáze rastu. Jednotlivé hodnoty koncentrácie biomasy a PHB v 20., 25., 35. a 45. hodine sú uvedené v tab. 16 a 17.

Tab. 16: Rast *B.megaterium* na syntetickom médiu so znížením obsahom N a P.

	Čas (h)	X (g/l)
Kompletné médium	20	1,4640 ± 0,0410
	25	1,4461 ± 0,0247
	35	1,6225 ± 0,0297
	45	2,9072 ± 0,0731
Limitácia N	20	1,4640 ± 0,0410
	25	1,4327 ± 0,0444
	35	1,4894 ± 0,0667
	45	1,5450 ± 0,1035
Limitácia P	20	1,4640 ± 0,0410
	25	1,4621 ± 0,0975
	35	1,1954 ± 0,0294
	45	1,2055 ± 0,0874
Limitácia N+P	20	1,4640 ± 0,0410
	25	1,4124 ± 0,0502
	35	1,3451 ± 0,0233
	45	1,1911 ± 0,0132

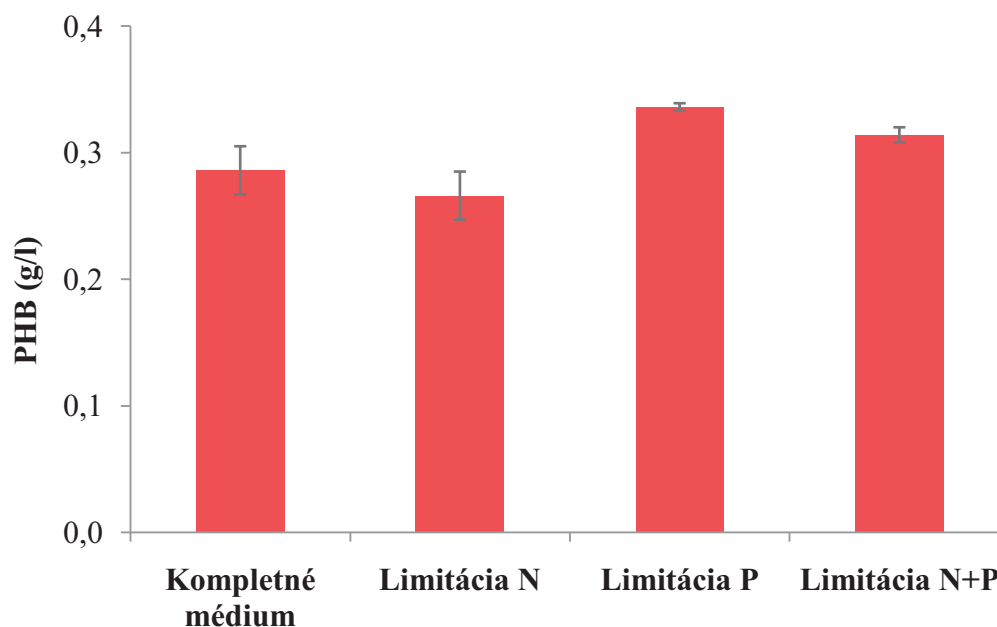
Graf 11: Priebeh rastu *B.megaterium* na syntetickom médiu s limitáciou N a P v porovnaní s kompletným médiom.



Tab. 17: Produkcia PHB počas rastu *B.megaterium* na syntetickom médiu s limitáciou.

	Čas (h)	PHB (%)	PHB (g/l)
Kompletné médium	20	21,35 ± 0,36	0,313 ± 0,064
	25	19,76 ± 3,50	0,286 ± 0,019
	35	14,16 ± 2,55	0,230 ± 0,050
	45	9,48 ± 1,20	0,276 ± 0,019
Limitácia N	20	20,62 ± 1,62	0,303 ± 0,027
	25	18,51 ± 1,20	0,266 ± 0,019
	35	24,04 ± 1,41	0,360 ± 0,029
	45	7,27 ± 0,47	0,113 ± 0,010
Limitácia P	20	20,62 ± 1,62	0,303 ± 0,027
	25	23,04 ± 0,41	0,336 ± 0,003
	35	14,86 ± 0,83	0,177 ± 0,009
	45	14,48 ± 0,49	0,174 ± 0,003
Limitácia N+P	20	20,62 ± 1,62	0,303 ± 0,027
	25	22,26 ± 0,38	0,314 ± 0,006
	35	17,65 ± 0,00	0,237 ± 0,001
	45	15,42 ± 0,95	0,184 ± 0,012

Graf 12: Zrovnanie obsahu PHB v 25.hodine rastu pri limitovanej kultivácii.



Vplyv limitácie je významný vo všetkých prípadoch, pokiaľ výsledky porovnávame s rastom na kompletnom médiu. Oproti ostatným limitáciám má najvýraznejší vplyv na rast limitácia fosforom, aj keď má iný priebeh ako limitácia dusíkom.

Produkcia PHB bola najvyššia v médiu s nízkym obsahom dusíka (24% z obsahu biomasy). Limitácia fosforom alebo kombinovaná limitácia dusíkom a fosforom nevedie k výraznému navýšeniu biosyntézy PHB, avšak vplyv na rast kultúry je značný.

5.2.2.3. Vplyv aplikácie stresových faktorov na rast a produkciu PHB

Podobne ako limitované médium môže pozitívne na syntézu PHB vplývať aj stres vyvolaný prídavkom rôznych faktorov do živného média. Vplyv aplikácie stresových podmienok na produkciu PHB je zatiaľ málo experimentálne preštudovaný jav. Podľa niektorých štúdií sú PHA zapojené do stresovej odpovede baktérii, mechanizmus však ešte nie je úplne objasnený. Cieľom tohto experimentu bolo overiť, či je možné využiť niektoré stresové faktory k zvýšeniu produkcie PHB u baktérie *Bacillus megaterium*.

Výsledky stanovenia koncentrácie biomasy a PHB v 20. a 24. hodine (fáza stacionárneho rastu *B.megaterium* – maximum rastu aj produkcie PHB) sú uvedené v tabuľke 18. Najväčší vplyv bol dosiahnutý aplikáciou etanolu do syntetického média pri výťažku 1,7 g/l biomasy s 20% obsahom PHB.

Tab. 18: Rast a produkcia *B.megaterium* na syntetickom médiu so stresovými faktormi.

	Čas (h)	Biomasa (g/l)	PHB (%)	PHB(g/l)
H₂O₂	20	0,047 ± 0,001	-	-
	24	0,042 ± 0,000	-	-
NaCl	20	0,134 ± 0,039	6,864 ± 0,082	0,016 ± 0,001
	24	0,430 ± 0,016	-	-
Etanol	20	1,693 ± 0,018	20,430 ± 0,483	0,346 ± 0,008
	24	1,812 ± 0,029	20,793 ± 0,358	0,377 ± 0,007
SO₃²⁻	20	1,744 ± 0,050	19,881 ± 0,612	0,345 ± 0,011
	24	1,733 ± 0,029	15,407 ± 0,265	0,267 ± 0,005
Citrát	20	1,563 ± 0,046	13,066 ± 0,128	0,204 ± 0,002
	24	1,739 ± 0,025	14,620 ± 0,054	0,254 ± 0,001
NiCl₂	20	0,053 ± 0,000	-	-
	24	0,055 ± 0,001	-	-
Kontrola	20	1,762 ± 0,009	17,030 ± 0,179	0,300 ± 0,003
	24	1,567 ± 0,009	17,768 ± 0,437	0,282 ± 0,007

Podľa týchto výsledkov je jasné, že aplikácia vhodného stresového faktoru môže efektívne navýšiť produkciu PHB. U etanolového stresu došlo k zvýšeniu produkcie PHB o 34 % (v 24. hodine kultivácie). Vyzerá to teda, že aplikácia stresového faktoru do kultivačného média môže byť vhodnou stratégiou, kedy jednoduchým prídavkom lacnej exogénnej stresovej látky do kultivačného média nastane významné navýšenie produkcie PHB ako stresového metabolitu. Ak je však koncentrácia stresového faktoru príliš vysoká, nie je bakteriálna kultúra schopná rásť a teda ani akumulovať PHB (H₂O₂, NaCl, NiCl₂).

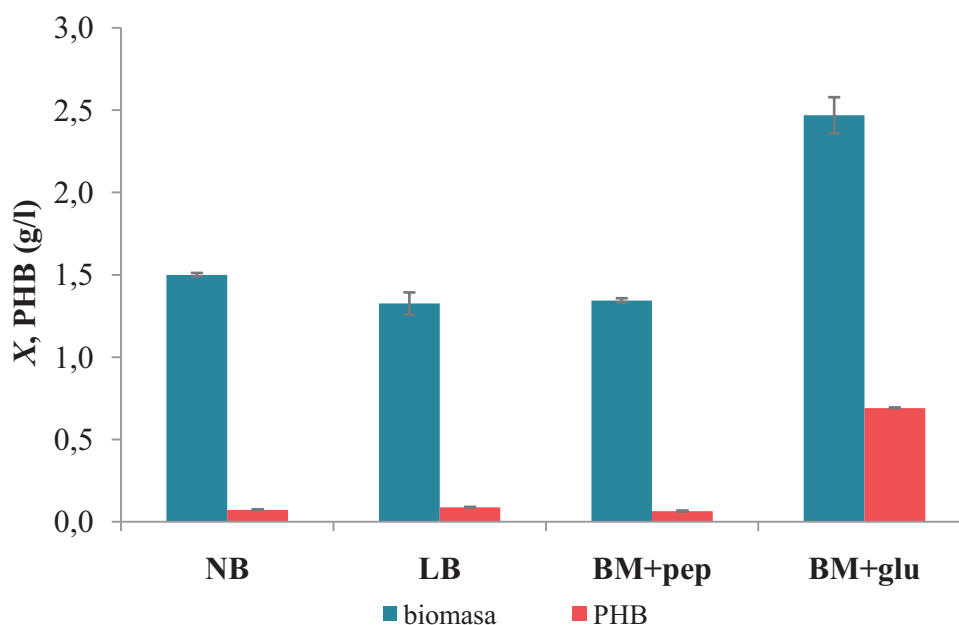
5.2.3. Rast baktérie *B. megaterium* na rôznych živných médiách

Otestovanie iných médií pre kultiváciu *B. megaterium* sa ukázalo ako vhodná cesta k dosiahnutiu vyhovujúceho pomeru rastu a syntézy PHB. Popri modifikovanom BM médiu boli odskúšané jednoduché komerčné médiá (LB a NB broth). Obsah biomasy a PHB v bunkách bol stanovené v troch časových intervaloch, aby bolo možné získať dostačujúci prehľad o priebehu rastu baktérie *B. megaterium*.

Tab. 19: Rast a produkcia PHB baktériou *B. megaterium* na rôznych médiách.

Médium	Čas (h)	Biomasa (g/l)	PHB (%) (g/g)	PHB (g/l)
NB	24	1,4793 ± 0,0133	-	-
	29	1,4996 ± 0,0070	4,7777 ± 0,1179	0,0717 ± 0,0018
	47	1,4323 ± 0,0133	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000
LB	24	1,2231 ± 0,0156	-	-
	29	1,3251 ± 0,0461	6,4867 ± 0,0094	0,0877 ± 0,0001
	47	0,9411 ± 0,1561	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000
BM + 5 g peptónu	24	1,3529 ± 0,0023	-	-
	29	1,3443 ± 0,0083	4,7568 ± 0,1554	0,0639 ± 0,0021
	47	1,6301 ± 0,1032	0,7474 ± 0,0283	0,0122 ± 0,0005
BM + 5 g glukózy	24	2,4553 ± 0,0954	-	-
	29	2,4685 ± 0,0753	27,9648 ± 0,0482	0,6903 ± 0,0012
	47	2,1747 ± 0,0641	18,4979 ± 0,0452	0,4023 ± 0,0010

Graf 13: Rast a produkcia PHB baktériou *B. megaterium* na rôznych médiách (29.hodina).



K posúdeniu vhodnosti média bola porovnaná koncentrácia biomasy a PHB v 29. hodine. Zloženie skúmaných médií ovplyvnilo kultiváciu baktérie *B.megaterium* tak, že čím viac komplexných zdrojov obsahovali (peptón, mäsový extrakt), tým horší bol rast a hlavne produkcia PHB. Prídavok glukózy ako zdroja uhlíka do pôvodného BM média podporil okrem rastu aj samotnú syntézu polyméru, preto je pravdepodobne významný vhodný pomer zložitého i jednoduchého zdroja uhlíka.

Ďalšie experimenty boli preto založené na modifikácii BM média s dostatočným prídavkom glukózy. Optimalizácii zloženia BM média je venovaná nasledujúca kapitola.

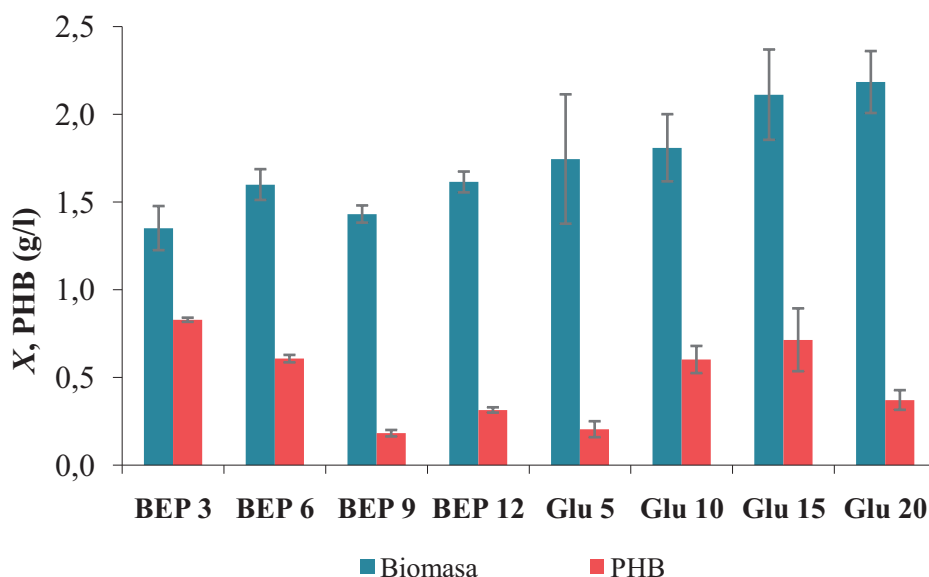
5.2.4. Optimalizácia zloženia BM média

Za účelom navýšenia výťažkov PHB bol vykonaný experiment, v ktorom bol optimalizovaný obsah BM média a glukózy. Zloženie BM média bolo modifikované rozdielnym obsahom BEP a glukózy – pri konštantnej koncentrácii glukózy (8 g/l) sa menil obsah BEP, a pri konštantnom obsahu BEP (8 g/l) sa menil obsah glukózy. Hodnoty nárastu biomasy a koncentrácie syntetizovaného PHB sú uvedené v tab. 20.

Tab. 20: Namerané hodnoty rastu a produkcie PHB.

Prídavok	c (g/l)	X (g/l)	PHB (g/l)	PHB (%)
BEP	3	1,351 ± 0,126	0,828 ± 0,012	61,29
	6	1,599 ± 0,088	0,607 ± 0,021	37,96
	9	1,431 ± 0,049	0,182 ± 0,018	12,72
	12	1,614 ± 0,059	0,314 ± 0,015	19,46
Glukóza	5	1,745 ± 0,369	0,204 ± 0,045	11,69
	10	1,809 ± 0,191	0,602 ± 0,077	33,28
	15	2,112 ± 0,258	0,714 ± 0,179	33,81
	20	2,184 ± 0,177	0,371 ± 0,056	16,99

Graf 14: Rast a produkcia PHB.



Porovnaním výsledkov z grafu bol dosiahnutý najvyšší pomer biomasy k PHB v médiách s koncentráciou BEP 3 g/l a glukózy 15 g/l. V závere bolo odskúšané modifikované médium a výsledky boli porovnané s kultiváciou na pôvodnom BM médiu (kap. 4.3.1.1.) obohatenom 8 g/l glukózy (tab.21). Aj keď bol dosiahnutý vyšší obsah polyméru v bunkách, celkový rast bol nižší oproti pôvodnému médiu, pravdepodobne v nedostatku rastových faktorov obsiahnutých v BEP.

Tab. 21: Rast a produkcia PHB na BM médiu s výsledným optimalizovaným pomerom BEP a glukózy.

médium	X (g/l)	PHB (%)	PHB (g/l)
BM	$2,8623 \pm 0,1019$	$22,04 \pm 1,85$	0,6309
BM opt	$1,5007 \pm 0,0366$	$27,70 \pm 2,34$	0,4157

Ďalšie experimenty boli teda vykonané na pôvodnom BM médiu (8 g/l BEP) modifikovaným 8 g/l glukózy, pretože na tomto médiu vykazovala kultúra najstabilnejšie rastové aj produkčné vlastnosti.

5.2.5. Rast na obohatenom BM médiu

Kultiváciou na pôvodnom BM médiu obohatenom o 8 g/l glukózy bola získaná rastová krivka a priebeh syntézy polyméru popri úbytku glukózy v médiu.

Tab. 22: Rast *B.megaterium* na obohatenom BM médiu.

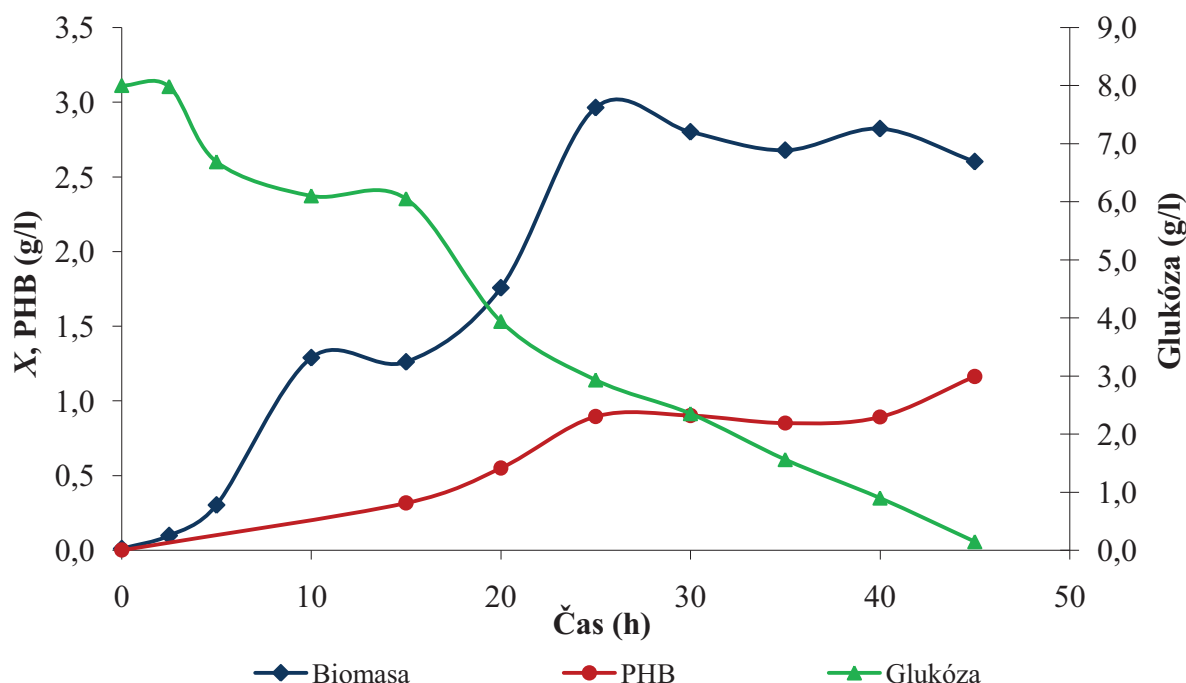
Čas (h)	Biomasa (g/l)	Glukóza (g/l)
0	$0,010 \pm 0,000$	8,00
2,5	$0,098 \pm 0,002$	7,98
5	$0,302 \pm 0,025$	6,69
10	$1,289 \pm 0,020$	6,10
15	$1,260 \pm 0,018$	6,05
20	$1,756 \pm 0,016$	3,94
25	$2,963 \pm 0,060$	2,93
30	$2,801 \pm 0,040$	2,35
35	$2,677 \pm 0,026$	1,56
40	$2,822 \pm 0,036$	0,90
45	$2,602 \pm 0,050$	0,15

Koncentrácia glukózy v médiu bola stanovená metódou Somogyi-Nelsona [22]. Po odstredení buniek pri stanovení PHB bolo zo supernatantu odobraných 100 μ l média a postupom uvedeným v kap. 4.3.6.1. bola z nameranej absorbancie pri 720 nm určený obsah glukózy.

Tab. 23: Produkcia PHB baktériou *B.megaterium* na obohatenom BM médiu.

Čas	PHB (%) (g/g)	PHB (g/l)
15	25,05 ± 0,42	0,3158 ± 0,0053
20	31,30 ± 0,35	0,5497 ± 0,0061
25	30,20 ± 0,35	0,8949 ± 0,0074
30	32,20 ± 1,50	0,9017 ± 0,0420
35	31,78 ± 0,70	0,8510 ± 0,0189
40	31,16 ± 1,04	0,8915 ± 0,0292
45	44,72 ± 3,29	1,1635 ± 0,0855

Graf 15: Rast a produkcia PHB na obohatenom BM médiu.



Rastová krivka ukazuje priebeh kultivácie bakteriálneho kmeňa *B.megaterium* na obohatenom BM médiu so syntézou polyhydroxybutyrátu. Mierny pokles nárastu kultúry v exponenciálnej fáze je spôsobený javom zvaným diauxia, kedy baktéria po vyčerpaní primárneho zdroja uhlíka prechádza na druhý, t.j. po spotrebovaní bielkovín obsiahnutých v BM médiu začína v cca 20. hodine využívať glukózu. Rovnako je tento jav vidieť aj na priebehu úbytku glukózy v médiu. Zaujímavý je aj stály nárast koncentrácie PHB v médiu v konečnej rastovej fáze s maximom na takmer 45% obsahu biomasy.

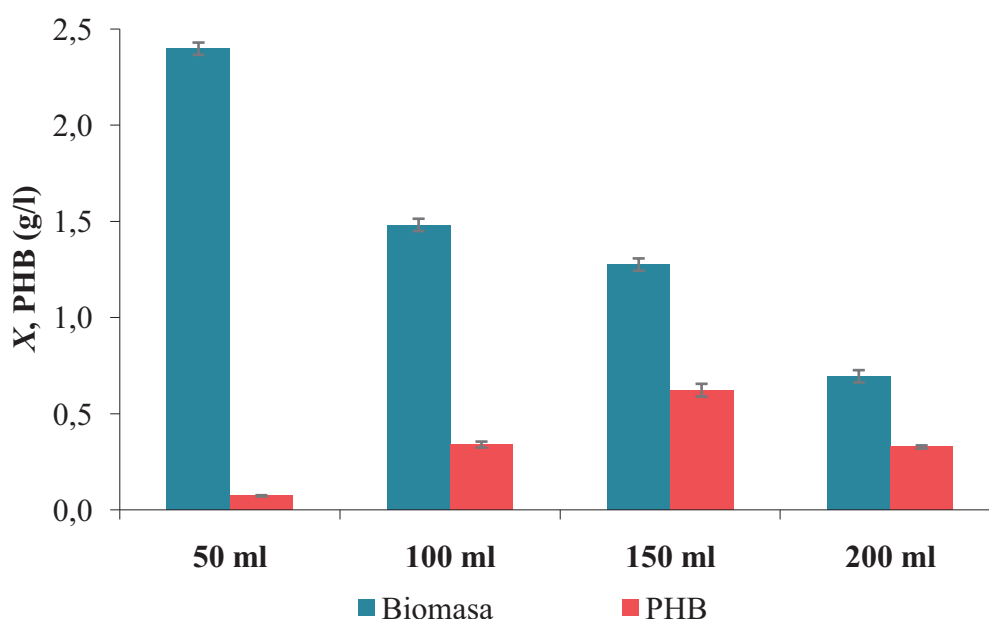
5.2.5.1. Vplyv limitácie kyslíkom v médiu na rast a produkciu PHB

Obmedzenie prísunu kyslíka do média aeróbnej baktérie môže vyvolať stres podporujúci syntézu PHB. Zníženie obsahu rozpustného kyslíka bolo dosiahnuté zvyšovaním objemu média v 250 ml Erlenmeyerovej banke.

Tab. 24: Namerané hodnoty rastu a produkcie PHB na obohatenom BM médiu s limitovaným obsahom rozpusteného kyslíka v médiu.

Objem média	X (g/l)	PHB (g/l)	PHB (%)
50 ml	2,398 ± 0,079	0,074 ± 0,003	3,09
100 ml	1,482 ± 0,031	0,340 ± 0,015	22,94
150 ml	1,276 ± 0,090	0,623 ± 0,033	48,82
200 ml	0,695 ± 0,034	0,328 ± 0,008	47,19

Graf 16: Rast a produkcia PHB na obohatenom BM médiu s limitovaným obsahom rozpusteného kyslíka v médiu.



Limitácia kyslíkom síce navýšila obsah polyméru v bunkách, ale zároveň výrazne ovplyvnila rast baktérie, čím výsledné percentá obsahu PHB strácajú na hodnote. Dostupnosť kyslíka je teda dôležitým regulačným faktorom. Aj keď limitácia kyslíkom podporuje akumuláciu PHB v bunkách, dochádza zároveň k dramatickej inhibícii rastu bakteriálnej kultúry, čo môže viesť k nižším celkovým výnosom polyméru.

5.2.6. Kultivácia *B.megaterium* na rôznych substrátoch

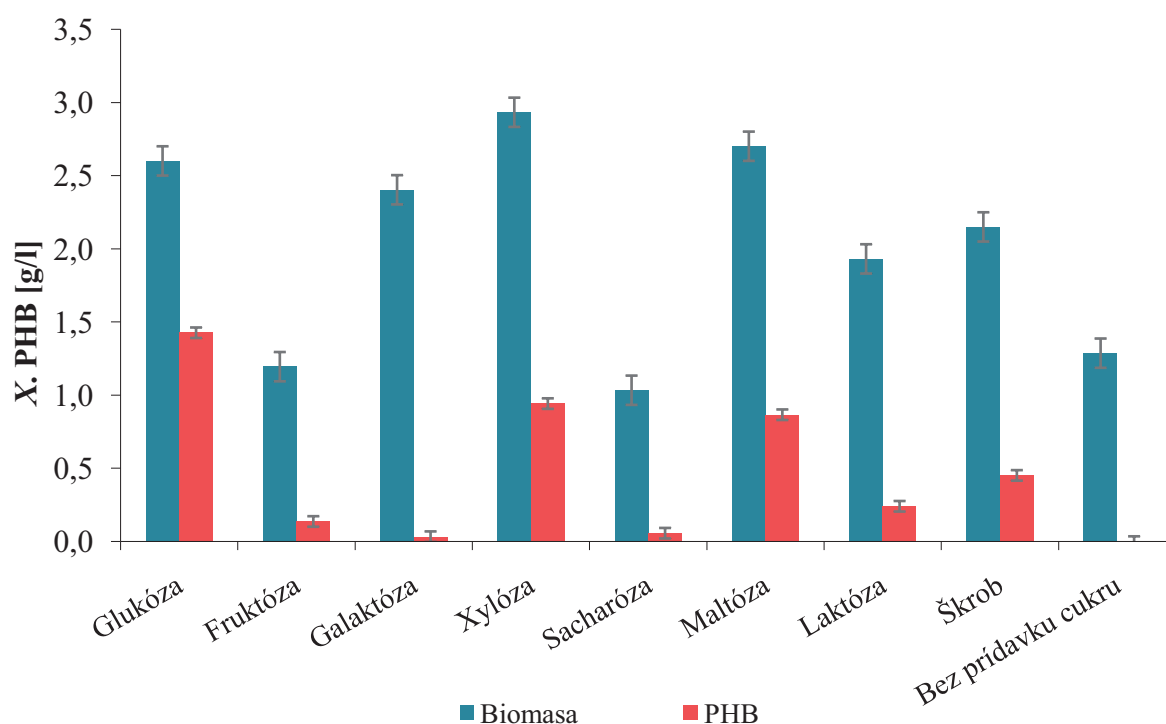
Dnešná produkcia PHB je ešte stále príliš nákladná aby boli ceny biodegradabilného polyméru ekvivalentné tým bežným ropným polymérom. Použitie priemyselného odpadného produktu ako suroviny na kultiváciu PHB-syntetizujúcich baktérii by však mohlo celkové náklady radikálne znížiť.

K tomu, aký substrát by bol pre kultúru *B.megaterium* najvhodnejší, bolo potrebné zistiť, aký zdroj uhlíka dokáže utilizovať. Okrem glukózy boli vybrané ďalšie monosacharidy, oligo- a polysacharidy pridané do BM média v rovnakej koncentrácii (8 g/l).

Tab. 25: Namerané hodnoty rastu a produkcie PHB baktériou *B.megaterium* na rôznych substrátoch.

Cukor	X (g/l)	PHB (%) (g/g)	PHB (g/l)
Glukóza	2,601 ± 0,039	54,87 ± 1,06	1,427 ± 0,028
Fruktóza	1,196 ± 0,130	11,55 ± 3,78	0,138 ± 0,045
Galaktóza	2,404 ± 0,121	1,42 ± 1,03	0,034 ± 0,025
Xylóza	2,933 ± 0,092	32,16 ± 3,11	0,943 ± 0,091
Sacharóza	1,034 ± 0,117	5,60 ± 0,47	0,058 ± 0,005
Maltóza	2,701 ± 0,193	32,11 ± 2,32	0,867 ± 0,063
Laktóza	1,932 ± 0,391	12,53 ± 0,42	0,242 ± 0,008
Škrob	2,150 ± 0,275	21,05 ± 1,45	0,453 ± 0,031
Bez cukru	1,288 ± 0,005	0,05 ± 0,00	0,001 ± 0,000

Graf 17: Rast a produkcia PHB na rôznych substrátoch.



Podľa predpokladu najviac PHB syntetizovala baktéria *B.megaterium* na glukóze (55 % PHB z obsahu biomasy), ale zaujímavý bol vysoký rast na xylóze – 2,9 g/l biomasy a maltóze – 2,7 g/l biomasy, s až 32 % obsahom polyméru v oboch prípadoch. Tieto výsledky predurčujú ku kultivácii odpadné produkty, ako sú napr. drevné zvyšky. Rovnako dobrý rast bol aj na galaktóze a laktóze, ale s malou produkciou PHB. Avšak vhodnou úpravou média a prípadným zavedením stresu by mohol byť ku kultivácii použitý aj odpadný substrát obsahujúci laktózu, napr. srvátka.

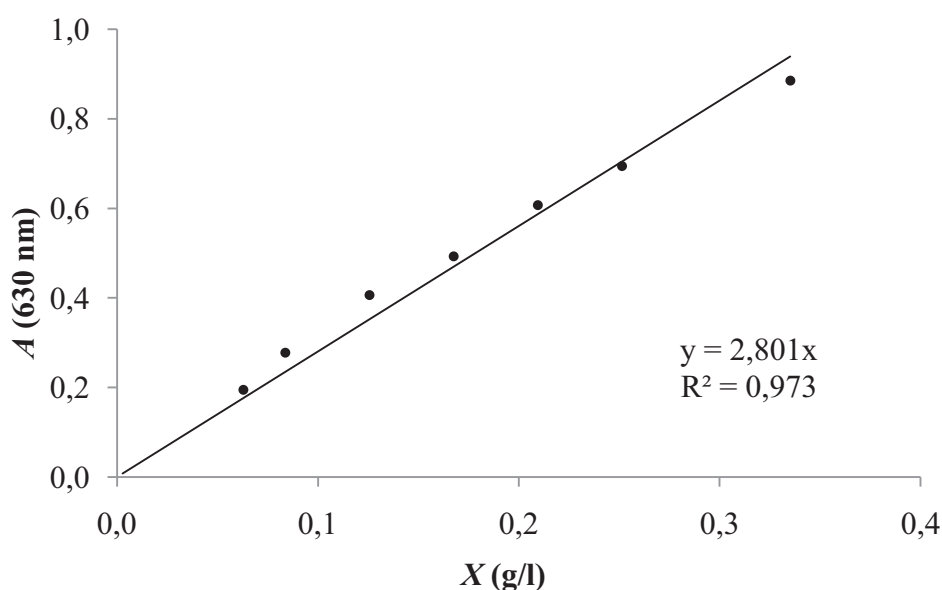
5.3. Kultivácia baktérie *Azotobacter vinelandii* CCM 289

5.3.1. Rast a produkcia P(HB-co-HV) baktériou *A.vinelandii* na rôznych médiách

5.3.1.1. Stanovenie kalibračnej závislosti nárastu biomasy

Kalibračná priamka lineárnej závislosti absorbancie zákalu pri 630 nm na koncentrácii biomasy v médiu bola zostrojená optimálnym riedením kultúry s vázkovo stanovenou sušinou. Pred každým meraním absorbancie boli vzorky vhodne riedené (kap. 4.3.2.1.).

Graf 18: Kalibračná závislosť (rast na Burkovom médiu)



5.3.1.2. Porovnanie rastu *A.vinelandii* na rôznych médiách

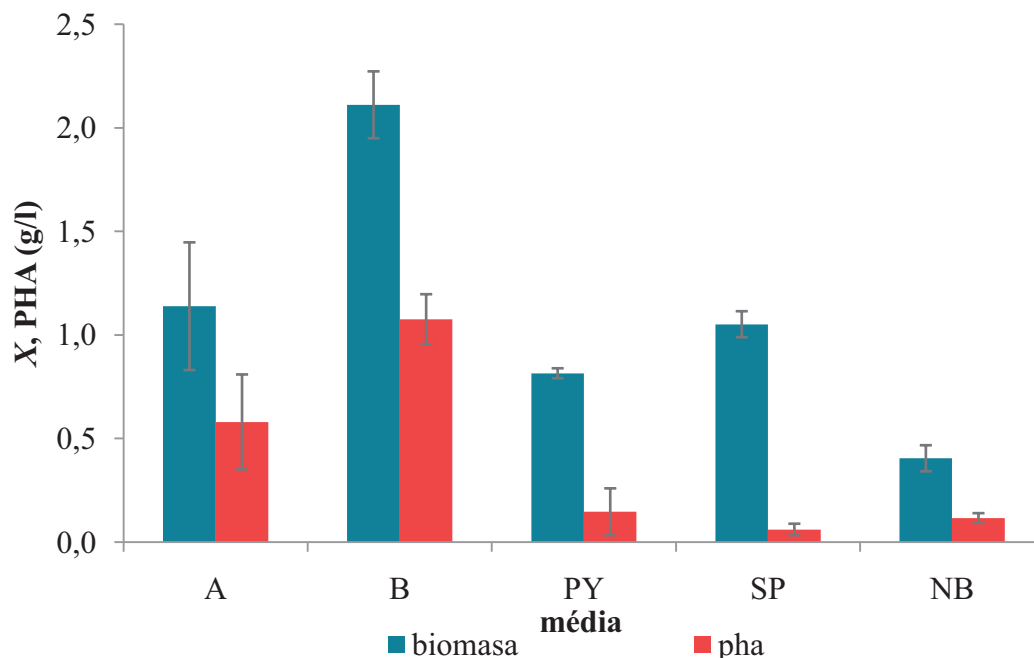
V prvej kultivácii *A.vinelandii* bolo vyskúšaných päť rôznych médií uvedených v kap. 4.4.1.1. Kultivácia prebehla v dvoch paralelných stanoveniach (s opakovaným premeraním stanovovanej hodnoty) pre každé médium pri štandardných podmienkach (kap. 4.4.1.2.).

Tab. 26: Stanovené hodnoty rastu a produkcie P(HB-co-HV) na rôznych médiách.

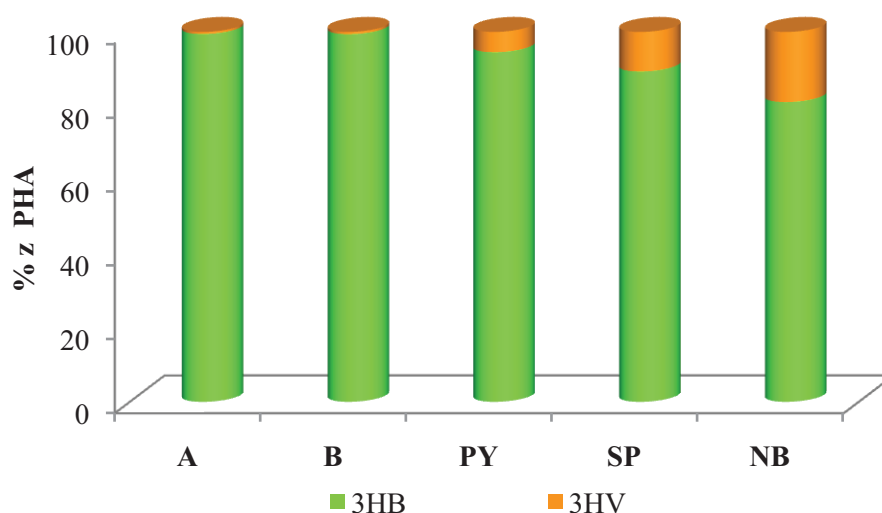
médium	X g/l	PHA (%)	PHA (g/l)	Y _{P/S}
A	1,138 ± 0,308	49,13 ± 6,93	0,580 ± 0,229	0,058
B	2,111 ± 0,161	50,85 ± 3,92	1,076 ± 0,121	0,108
PY	0,815 ± 0,024	18,23 ± 14,21	0,146 ± 0,113	0,015
SP	1,051 ± 0,063	5,72 ± 2,48	0,061 ± 0,027	0,006
NB	0,404 ± 0,063	28,96 ± 4,68	0,116 ± 0,023	0,012

Na Burkovom médiu [15] a médiu A (médiu uvádzané v zbierke CCM) boli namerané vysoké hodnoty koncentrácie P(HB-co-HV) v bunkách. O polovicu vyšší výťažostný koeficient $Y_{P/S}$ bol však dosiahnutý pri kultivácii v Burkovom médiu (0,108).

Graf 19: Pomer biomasy a produktu pri kultivácii *A. vinelandii* na rôznych médiách.



Graf 20: Pomer monoméru 3HV vo vyprodukovanom P(HB-co-HV) baktériou *A. vinelandii*.



V jednotlivých vzorkách polyméru bol stanovený pomer monoméru 3HV z celkového obsahu PHA v bunke. Takmer 20 % obsah 3HV bol zistený v bunkách kultivovaných na NB médiu, a keďže vysoký obsah valerátu v P(HB-co-HV) zlepšuje jeho vlastnosti, bolo by vhodné použiť NB médium pre ďalšie kultivácie zamerané na získavanie kopolyméru s optimálnymi vlastnosťami. Napriek tomu, celkové výťažky PHA na NB médiu veľmi nízke, vzhľadom k vysokej cene NB média (obsahuje drahé zložky ako pepton a kvasničný

autolyzát), nebolo toto médium v ďalších experimentoch použité. Naopak boli pre nasledujúcu prácu vybrané dve médiá – médium A a Burkovo médium.

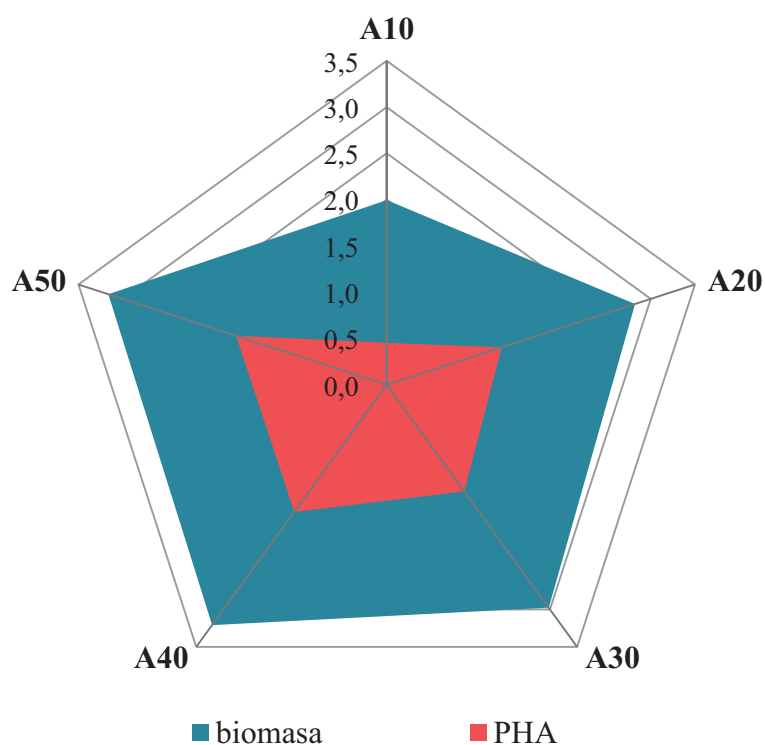
5.3.1.3. Výsledky optimalizácie obsahu glukózy v médiách

V nasledujúcom kroku bolo potrebné zistiť optimálnu koncentráciu glukózy v médiu A a v Burkovom médiu. Koncentrácia glukózy bola zvolená v rozmedzí 10 – 50 g/l. Po 70 hodinách kultivácie boli odobraté vzorky k stanoveniu obsahu biomasy a PHA, príslušné hodnoty sú uvedené v tabuľkách 27 a 28.

Tab. 27: Stanovené hodnoty rastu a produkcie P(HB-co-HV) na A médiu.

Glukóza (g/l)	X (g/l)	PHA (%)	PHA (g/l)	Y _{P/S}
10	1,994 ± 0,035	22,71 ± 1,32	0,452 ± 0,022	0,045
20	2,820 ± 0,284	46,10 ± 2,10	1,306 ± 0,189	0,065
30	2,977 ± 0,060	47,84 ± 1,15	1,424 ± 0,025	0,048
40	3,210 ± 0,046	52,23 ± 0,79	1,701 ± 0,026	0,043
50	3,163 ± 0,000	54,14 ± 0,60	1,713 ± 0,019	0,034

Graf 21: Rast a produkcia *A. vinelandii* na A médiu s rôznym obsahom glukózy.

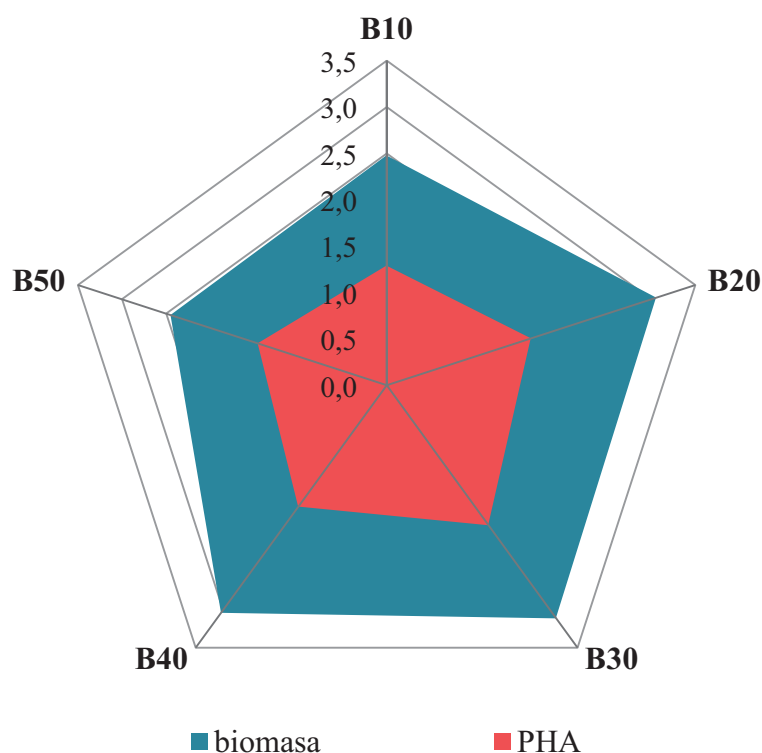


Vďaka použitiu lúčových grafov je vidieť vplyv zvyšujúcej sa koncentrácie glukózy v médiu na rast kultúry a syntézu polyméru. Na A médiu nie je poznať vplyv inhibície substrátom, ktorá je dobre viditeľná u Burkovho média (graf 22).

Tab. 28: Stanovené hodnoty rastu a produkcie P(HB-co-HV) na Burkovom médiu.

Glukóza (g/l)	X (g/l)	PHA (%)	PHA (g/l)	Y _{P/S}
10	2,477 ± 0,034	51,98 ± 4,43	1,289 ± 0,126	0,129
20	3,057 ± 0,041	53,56 ± 3,72	1,637 ± 0,107	0,082
30	3,108 ± 0,016	60,07 ± 3,97	1,867 ± 0,118	0,062
40	3,035 ± 0,024	53,20 ± 2,54	1,619 ± 0,078	0,041
50	2,448 ± 0,162	59,52 ± 1,71	1,460 ± 0,137	0,029

Graf 22: Rast a produkcia *A.vinelandii* na Burkovom médiu.



Väčší rast a aj vyššia produkcia boli získané pri kultivácii *A.vinelandii* na Burkovom médiu. Aj keď je výtťažostný koeficient $Y_{P/S} = 0,129$ najvyšší pri 10 g/l glukózy, celkový obsah PHA v bunkách v porovnaní s nárastom biomasy je výrazne vyšší pri kultivácii s 30 g/l glukózy v médiu – 60 % PHA z 3,1 g/l biomasy.

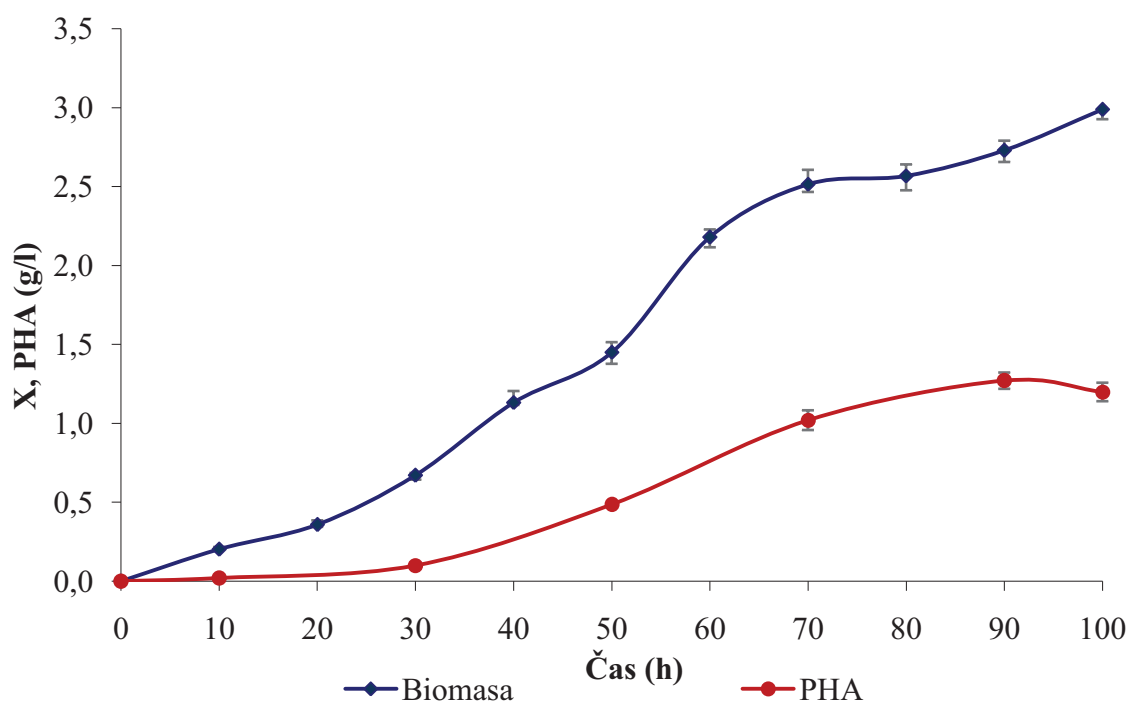
5.3.2. Rast a produkcia *A.vinelandii* na Burkovom médiu s 30 g/l glukózy

Pred stresovými kultiváciami bolo potrebné určiť priebeh rastu *A.vinelandii* spolu s produkciou kopolyméru P(HB-co-HV). Kultivácia prebiehala na Burkovom médiu s 30 g/l glukózy za štandardných kultivačných podmienok. Odbery k stanoveniu koncentrácie biomasy boli vykonané každú piatu hodinu a pre stanovenie obsahu PHA v bunkách každú desiatu hodinu.

Tab. 29: Rast a produkcia *A.vinelandii* na Burkovom médiu.

Čas (h)	<i>X</i> (g/l)	PHA (%)	PHA (g/l)	<i>Y</i> _{P/S}
10	0,204 ± 0,001	10,29 ± 1,67	0,021 ± 0,003	0,001
20	0,360 ± 0,014	14,47 ± 1,42	0,052 ± 0,005	0,002
30	0,671 ± 0,027	15,08 ± 0,96	0,101 ± 0,006	0,003
40	1,133 ± 0,015	29,40 ± 0,83	0,333 ± 0,009	0,011
50	1,451 ± 0,073	33,60 ± 0,67	0,488 ± 0,010	0,016
60	2,180 ± 0,064	37,44 ± 0,41	0,816 ± 0,009	0,027
70	2,516 ± 0,049	40,60 ± 2,49	1,021 ± 0,063	0,034
80	2,568 ± 0,091	33,60 ± 1,43	0,863 ± 0,037	0,029
90	2,729 ± 0,073	46,58 ± 1,89	1,271 ± 0,052	0,042
100	2,989 ± 0,062	40,14 ± 1,96	1,200 ± 0,059	0,040

Graf 23: Rast a produkcia PHA baktériou *A.vinelandii* na Burkovom médiu.



Rastová krivka *A.vinelandii* nemá v porovnaní s rastom *B.megaterium* typický sigmoidný priebeh. Pravdepodobne je to spôsobené neustálou limitáciou dusíkom, keďže v Burkovom médiu nie je obsiahnutý zdroj dusíka. Aj keď je baktéria *A.vinelandii* schopná fixovať vzdušný dusík a miešanie na temperovanej trepačke bolo rýchlejšie ako pri iných kultúrach, aj tak nebol pravdepodobne dosiahnutý optimálny prestup N₂ do média k bunkám.

Odlišná je aj doba rastu *A.vinelandii* – viac ako 100 hodín oproti 45 hodinám kultivácie *B.megaterium*. Počas celého rastu je stály nárast obsahu kopolyméru P(HB-co-HV). Maximum rastu bolo dosiahnuté až v 100. hodine (2,99 g/l biomasy), aj keď sa už syntéza kopolyméru zastavila a naopak mierne poklesla.

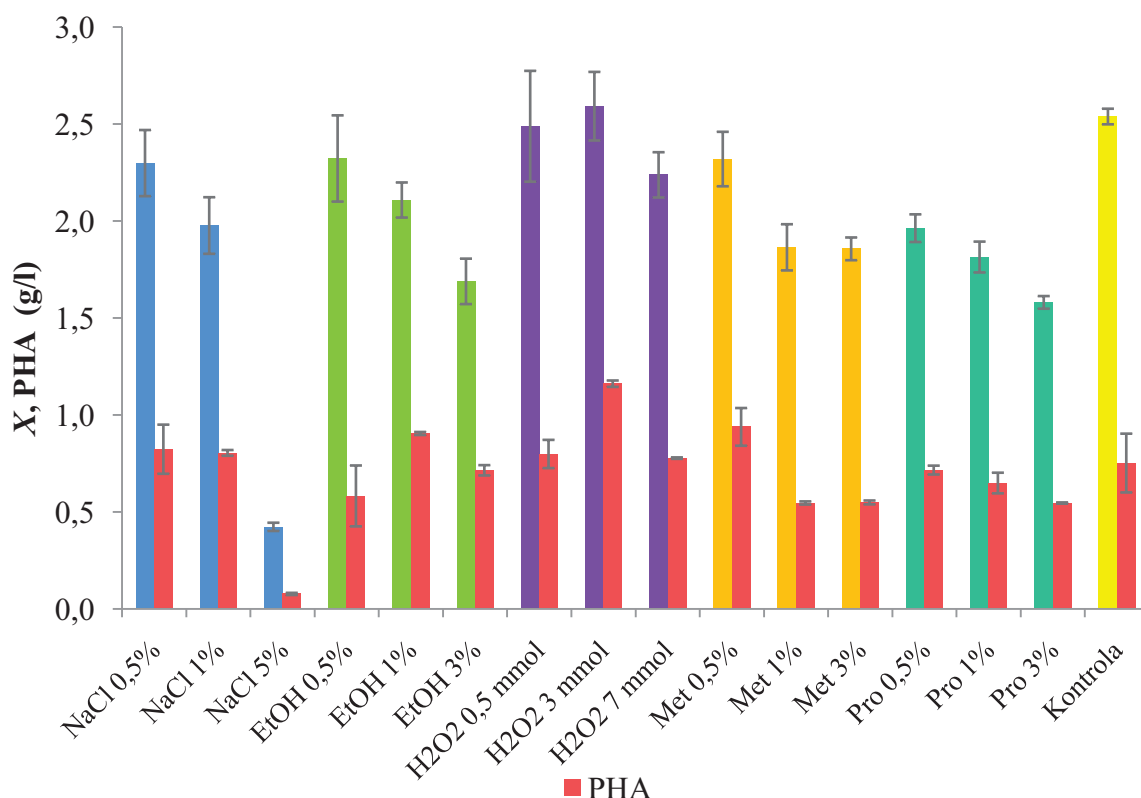
5.3.2.1. Vplyv aplikácie stresových faktorov

V 50. hodine kultivácie bakteriálneho kmeňa *A. vinelandii* boli aplikované stresové faktory (uvedené v tab. 30) v rôzne vysokých koncentráciách (kap. 4.4.1.1.). Po nasledujúcich dvadsiatich hodinách boli vykonané odbery a príslušné analýzy.

Tab. 30: Rast a produkcia PHA po aplikácii stresu do Burkovho média.

Stresový faktor	Množstvo	X g/l	PHA %	PHA g/l	Y _{P/S}
NaCl	0,5%	2,299 ± 0,170	35,82 ± 5,51	0,823 ± 0,127	0,027
	1%	1,977 ± 0,146	40,69 ± 0,75	0,804 ± 0,015	0,027
	5%	0,423 ± 0,021	18,23 ± 1,33	0,077 ± 0,006	0,003
Etanol	0,5%	2,322 ± 0,222	25,08 ± 6,76	0,583 ± 0,157	0,019
	1%	2,108 ± 0,090	42,90 ± 0,37	0,904 ± 0,008	0,030
	3%	1,680 ± 0,117	42,32 ± 1,57	0,715 ± 0,027	0,024
H₂O₂	0,5 mmol	2,488 ± 0,286	32,10 ± 2,93	0,799 ± 0,073	0,027
	3 mmol	2,592 ± 0,177	44,80 ± 0,64	1,161 ± 0,017	0,039
	7 mmol	2,238 ± 0,117	34,74 ± 0,18	0,777 ± 0,004	0,026
Metanol	0,5%	2,319 ± 0,119	40,46 ± 4,19	0,938 ± 0,097	0,031
	1%	1,864 ± 0,059	29,29 ± 0,43	0,546 ± 0,008	0,018
	3%	1,856 ± 0,071	29,57 ± 0,54	0,549 ± 0,010	0,018
Propanol	0,5%	1,963 ± 0,080	36,46 ± 1,16	0,716 ± 0,023	0,024
	1%	1,814 ± 0,033	35,77 ± 2,93	0,649 ± 0,053	0,022
	3%	1,580 ± 0,040	34,54 ± 0,20	0,546 ± 0,003	0,018
Kontrola		2,539 ± 0,339	29,36 ± 2,00	0,752 ± 0,152	0,025

Graf 24: Vplyv stresových faktorov na rast a produkciu P(HB-co-HV) *A.vinelandii*.



Zdá sa, že väčšina stresových faktorov má schopnosť navýšiť produkciu PHA u bakteriálneho kmeňa *A.vinelandii*. Avšak jedine peroxid vodíku vyzerá ako veľmi efektívny stimulačný faktor. Pravdepodobne zvyšuje intracelulárny pomer NADPH/NADP⁺, ktorý má pozitívny regulačný efekt na enzým acetoacetyl-CoA reduktázu (druhý krok syntézy PHA), čím dôjde k posilneniu PHA syntetickej dráhy.

Pozitívny vplyv na produkciu PHA majú taktiež alkoholové stresy, predovšetkým etanolový. Aj tu možno v priebehu odbúravania stresového faktoru dochádza k navýšeniu obsahu redukovaných koenzýmov, ktoré sú pravdepodobne baktériou čiastočne využité ako donor vodíka práve v PHA biosyntetickej dráhe. Navyše, výsledným produktom odbúravania etanolu je acetyl-CoA, teda substrát PHA biosyntézy [3,8].

Na základe týchto výsledkov by mohla byť aplikácia stresového faktoru pútavou stratégiou zefektívnenia výroby PHA a tým pádom aj zníženia ceny. Jednoduchá aplikácia lacného peroxidu vodíka navýšila produkciu PHB o 54 %.

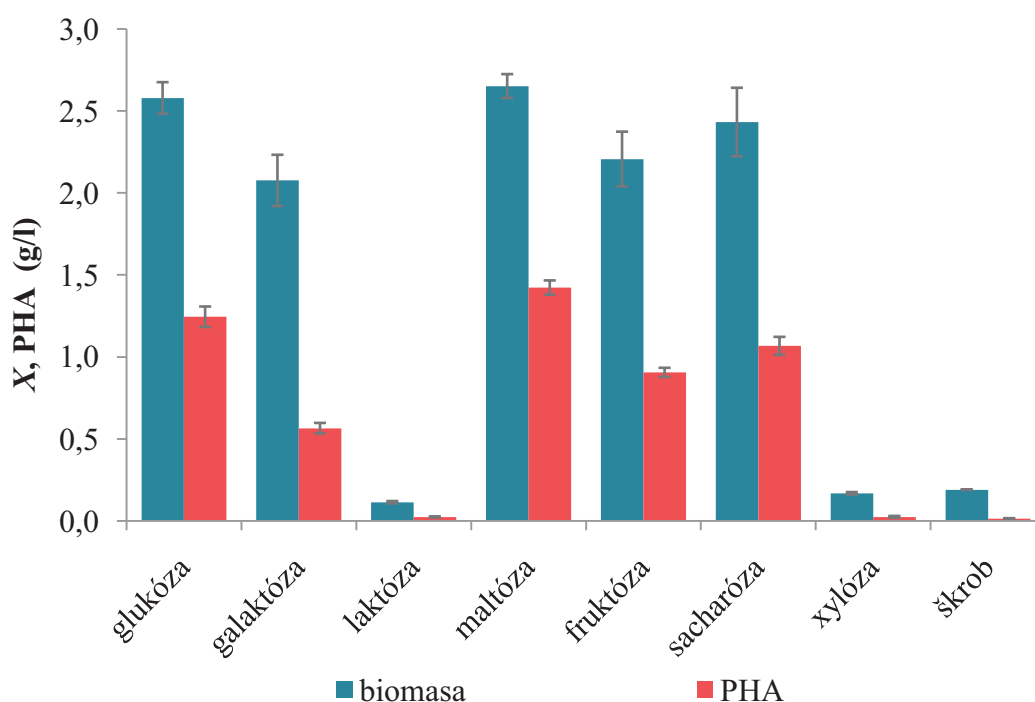
5.3.3. Rast *A.vinelandii* na rôznych substrátoch

Podobne ako pri kultivácii bakteriálneho kmeňa *B.megaterium* boli aj pre kultiváciu *A.vinelandii* otestované rôzne sacharidy a polysacharidy ako zdroj uhlíka.

Tab. 31: Rast *A.vinelandii* na Burkovom médiu s rôznymi substrátmi.

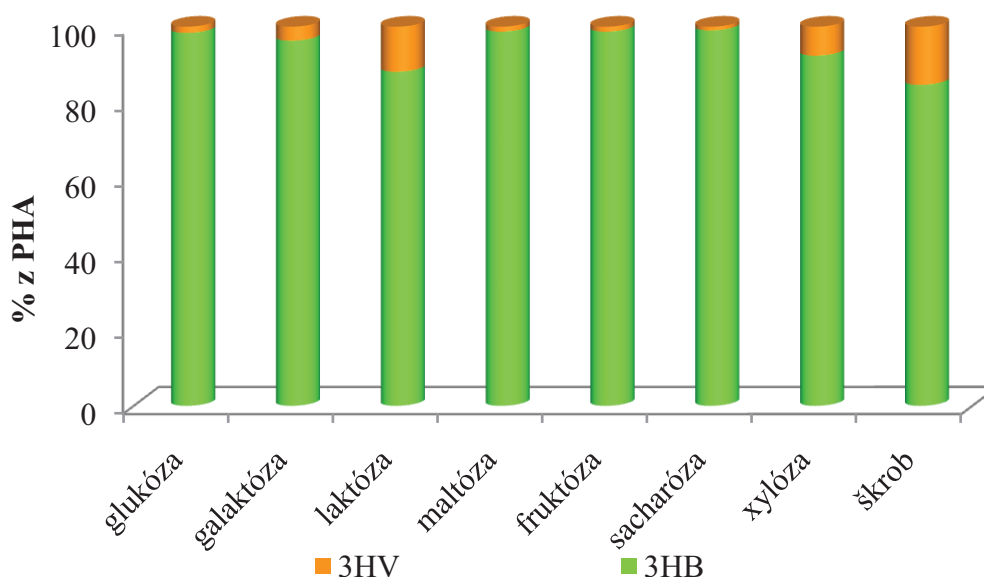
substrát	X (g/l)	PHA (%)	PHA (g/l)	Y _{P/S}
glukóza	2,579 ± 0,096	48,26 ± 0,92	1,244 ± 0,062	0,124
galaktóza	2,076 ± 0,156	27,21 ± 1,91	0,565 ± 0,032	0,056
laktóza	0,113 ± 0,007	20,66 ± 6,38	0,023 ± 0,003	0,002
maltóza	2,651 ± 0,073	53,65 ± 0,44	1,423 ± 0,043	0,142
fruktóza	2,206 ± 0,167	41,02 ± 0,29	0,905 ± 0,028	0,091
sacharóza	2,432 ± 0,209	43,87 ± 0,65	1,067 ± 0,055	0,107
xylóza	0,167 ± 0,008	14,38 ± 3,83	0,024 ± 0,006	0,002
škrob	0,189 ± 0,001	6,88 ± 0,41	0,013 ± 0,003	0,001

Graf 25: Porovnanie rastu a produkcie PHA baktériou *A.vinelandii* na rôznych substrátoch.



U baktérie *A.vinelandii* bol dosiahnutý najvyšší rast a produkcia na maltóze (54 % z 2,7 g/l biomasy). Podobne bola baktéria schopná utilizovať okrem glukózy aj fruktózu a sacharózu, preto by najvhodnejším odpadným priemyselným substrátom mohla byť práve melasa.

Graf 26: Pomer 3HV monoméru v celkovom obsahu P(HB-co-HV) syntetizovanom baktériou *A.vinelandii* na Burkovom médiu s rôznymi zdrojmi uhlíka.



Aj keď bola syntéza kopolyméru na laktóze a škrobe minimálna, takmer pätinu obsahu P(HB-co-HV) tvoril monomér 3HV.

5.4. Kultivácia bakteriálnych kmeňov na srvátke

5.4.1. Chemické zloženie upravenej srvátky

5.4.1.1. Stanovenie sušiny

Tab. 32: Obsah vody a sušiny v srvátke.

vzorky	m_m (g)	m_s (g)	m_{m+sus} (g)	m_{sus} (g)	m_v (g)	w_v (%)
1.	16,0210	5,1457	16,3318	0,3108	4,8349	93,96
2.	16,4112	5,1662	16,7228	0,3116	4,8546	93,97
3.	15,7509	5,2012	16,0641	0,3132	4,8880	93,98
Obsah v 5 ml:				0,3119	4,8592	93,97

Vážkovým stanovením obsahu sušiny vo vzorke bol stanovený predpokladaný vysoký obsah vody v srvátke na 94 % a koncentrácia sušiny na 60 g/l. Boli vykonané tri stanovenia z jednej vzorky srvátky (kap. 4.5.1.2.).

Analýza sušiny (a aj ostatných parametrov) srvátky bola vykonaná len raz, na jednej vzorke srvátky, ktorá bola použitá aj pre kultivačné experimenty. Tieto výsledky majú skôr informatívny charakter o približnom chemickom zložení srvátky, preto je k získaniu objektívnejších výsledkov potrebná opakovaná analýza viacerých vzoriek analýzy.

5.4.1.2. Stanovenie popola

Tab. 33: Namerané hodnoty obsahu popola v srvátke.

vzorka	m _k (g)	m _s (g)	m _{k+p} (g)	m _p (g)	w _p (%)
1.	44,0547	2,0552	44,1232	0,0685	3,33
2.	44,1794	2,0462	44,2350	0,0556	2,72
3.	44,1865	2,0446	44,2476	0,0611	2,99
Obsah v 2ml:				0,0617	3,01

Z jednej vzorky srvátky bol stanovený priemerný obsah popola (3 paralelne stanovenia) v srvátke na 31 g/l, čo je približne polovica obsahu celkovej sušiny (kap. 4.5.1.3.).

5.4.1.3. Biuretové stanovenie rozpustných bielkovín v srvátke

Biuretovou metódou (kap. 4.5.1.4.) sa určuje obsah rozpustných bielkovín vo vzorke. Pri meraní absorbancie boli jednotlivé koncentrácie albumínu premerané trikrát a rovnako aj každá vzorka srvátky. Výsledná koncentrácia bola spočítaná z kalibračnej závislosti $y = 0,221x$ ($R^2 = 0,993$).

Tab. 34: Kalibračná závislosť absorbancie pri 550 nm na obsahu bielkovín v srvátke.

albumín (mg/ml)	A _{550nm}
0,5	0,109 ± 0,001
1,0	0,246 ± 0,003
1,5	0,326 ± 0,002
2,0	0,435 ± 0,005
2,5	0,557 ± 0,004

Tab. 35: Stanovené hodnoty koncentrácie bielkovín v srvátke.

vzorka	albumín (mg/ml)
1	2,0860 ± 0,1476
2	2,0407 ± 0,1065
3	1,8733 ± 0,1491

V srvátke sú aj po úprave (kyslím zrážaním bielkovín) stále prítomné rozpustné bielkoviny v priemernej koncentrácii približne 2 g/l.

5.4.1.4. Stanovenie celkového obsahu fosforu v popole srvátky

Celkový obsah fosforu je počítaný pomocou kalibračnej rovnice získanej postupným riedením zásobného roztoku fosforečnanu (kap. 4.5.1.5). Pri stanovení kalibračnej závislosti boli jednotlivé koncentrácie premerané vždy trikrát, vzorky bola taktiež každá zmeraná trikrát. Výsledná koncentrácia bola spočítaná z kalibračnej závislosti $y = 0,008x - 0,041$ ($R^2 = 0,984$).

Tab. 36: Hodnoty kalibračnej závislosti absorbancie pri 610 nm oproti koncentrácii fosforu.

Fosfor (μg)	$A_{610\text{ nm}}$
5,0	$0,002 \pm 0,002$
7,5	$0,022 \pm 0,001$
10,0	$0,036 \pm 0,001$
12,5	$0,052 \pm 0,001$
15,0	$0,082 \pm 0,001$
17,5	$0,105 \pm 0,001$

Tab. 37: Stanovené hodnoty obsahu fosforu vo vzorkách popola srvátky.

vzorka	fosfor (μg)
1	$1,2271 \pm 0,0164$
2	$1,2604 \pm 0,0156$
3	$1,2729 \pm 0,0332$
Obsah v 0,1 ml:	1,2535

Po prepočítaní riedenia vzoriek bol stanovený celkový obsah fosforu v srvátke stanovený na 63 mg/l.

5.4.1.5. Stanovenie celkového dusíku podľa Kjeldahla

Stanovením jednotlivých parametrov rovnice bolo možné vypočítať obsah celkového dusíku – bielkovín a iných látok obsahujúcich dusík, z mineralizátu srvátky:

- mineralizácia 2 ml srvátky, navážka: $m_1 = 2,05\text{ g}$; $m_2 = 2,03\text{ g}$
- štandardizácia odm.roztoku NaOH k.šľavelovou : $c(\text{NaOH}) = 0,1093\text{ M}$
- štandardizácia odm.roztoku H_2SO_4 odm.roztokom NaOH: $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,0532\text{ M}$
- spotreba NaOH: $V(\text{NaOH})_1 = 22,95\text{ ml}$; $V(\text{NaOH})_2 = 22,95\text{ ml}$
- spotreba H_2SO_4 : $V_1 = V_2 = V(\text{H}_2\text{SO}_4) = 25\text{ ml}$

$$w_{N1} = \frac{2 \left(c_{\text{H}_2\text{SO}_4} \cdot V_{\text{H}_2\text{SO}_4} - \frac{c_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}}}{2} \right) \cdot M_N}{m_1}$$

$$w_{N1} = \frac{2 \left(0,0532 \cdot 0,025 - \frac{0,1093 \cdot 0,02295}{2} \right) \cdot 14,007}{2,05}$$

$$w_{N1} = 0,001036$$

$$w_{N2} = 0,001046$$

V upravenej srvátke (po vyzrážaní väčšiny bielkovín) sa nachádza 0,1041 % celkového dusíka. Po prepočítaní – vynásobením univerzálnym faktorom 6,25 bol spočítaný obsah hrubej bielkoviny na 0,6506 %.

5.4.1.6. *Spektrofotometrické stanovenie obsahu bielkovín Nesslerovým činidlom*

Jednoduchším stanovením celkového obsahu hrubej bielkoviny v srvátke je spektrofotometrická analýza pomocou Nesslerovho činidla.

K stanoveniu bol použitý mineralizát srvátky z predchádzajúcej úlohy upravený postupom uvedeným v kap. 4.5.1.7. Kalibračná závislosť absorbancie pri 450 nm na obsahu dusíka vo vzorke bola zostrojená riedením štandardného roztoku síranu amónneho. Výsledná koncentrácia bola spočítaná z kalibračnej závislosti $y = 0,137x$ ($R^2 = 0,971$).

Tab. 38: Hodnoty kalibračnej závislosti absorbancie pri 450 nm na koncentrácii dusíka.

N (µg/ml)	A _{450 nm}
0,4	0,055 ± 0,001
0,6	0,074 ± 0,000
0,8	0,099 ± 0,001
1,0	0,143 ± 0,001
1,2	0,172 ± 0,001

Tab. 39: Obsah dusíka vo vzorkách srvátky.

vzorky	m _N (mg/ml)
1	1,3869 ± 0,006
2	1,3479 ± 0,015

$$w_{N1} = \frac{2 \cdot m_{N1}}{m \cdot 1000} = \frac{2 \cdot 1,3869}{2,07 \cdot 1000} = 0,00134 \Rightarrow 0,134\%$$

$$w_{N2} = 0,00130 \Rightarrow 0,130\%$$

Analýzou bol spočítaný obsah celkového dusíka v srvátke na 0,132 % a teda celkový obsah hrubej bielkoviny na 0,825 %. Metóda stanovenia dusíka Nesslerovým činidlom dosť

nepresná, ale po zrovnaní výsledkov so stanovenia Kjeldahlovou metódou nie je vidieť príliš veľkú odchýlku.

5.4.1.7. HPLC analýza obsahu cukrov v srvátke

Analýza obsahu cukrov v srvátke bola vykonaná pomocou metódy popísanej v kap. 4.5.1.8. Kalibračné závislosti pre daný cukor sú uvedené v tabuľkách nameraných hodnôt (tab. 40, 41, 42).

Tab. 40: Hodnoty kalibračnej závislosti plochy pík od obsahu laktózy.

Laktóza (mg/ml)	Plocha píka
1,0	1369,66
2,5	2868,59
5,0	5374,88
7,5	8375,42
10,0	11767,89
$y = 1146,8x - 10,051$ ($R^2 = 0,997$)	

Tab. 41: Hodnoty kalibračnej závislosti plochy pík od obsahu glukózy.

Glukóza (mg/ml)	Plocha píka
0,5	329,78
1,0	1082,55
2,5	1918,56
5,0	3769,32
$y = 742,95x + 82,735$ ($R^2 = 0,990$)	

Tab. 42: Hodnoty kalibračnej závislosti plochy pík od obsahu galaktózy.

Galaktóza (mg/ml)	Plocha píka
0,5	189,51
1,0	730,86
2,5	1356,84
5,0	1906,80
$y = 381,63x + 149,87$ ($R^2 = 0,933$)	

Tab. 43: Výsledné hodnoty stanovenia obsahu cukru v srvátke.

Cukor	c (g/l)
Laktóza	39,60
Glukóza	0,35
Galaktóza	Nedetekovaná

Tab. 44: Výsledné hodnoty analýzy chemického zloženia srvátky.

Zložky	Množstvo
Voda	→ 94 %
Sušina	→ 60 g/l
Popoľ	→ 31 g/l
Laktóza	→ 40 g/l
Glukóza	→ 0,4 g/l
Fosfor	→ 63 mg/l
Rozpusťné bielkoviny	→ 2 g/l
Celkový dusík	→ 0,12 %

Pokiaľ porovnáme zloženie napr. BM média so stanoveným zložením srvátky – obsah bielkovín a dusíkatých látok, taktiež fosfor a vysoký obsah laktózy ako zdroja uhlíka, môže byť upravená srvátka použitá pre kultiváciu bakteriálnych kmeňov za účelom zefektívnenia produkcie PHA.

5.4.2. Rast a produkcia PHA vybraných bakteriálnych kmeňov kultivovaných na srvátke

Po základnej úprave srvátky (vyzrážanie bielkovín, odstredenie a úprava pH) bol odskúšaný prídavok solí do srvátkového médi, aby vyhovoval jednotlivým bakteriálnym kmeňom schopným produkovať PHA – *Azotobacter vinelandii*, *Azohydromonas lat*, *Bacillus megaterium* a *Wautersia eutropha*.

Neupravená srvátka je v tomto prípade srvátka po základnej úprave, ale bez prídavku pre rast dôležitých látok (kap. 4.5.2.). Kultivácia prebiehala za štandardných podmienok (30 °C, 150 rpm, 70 h), paralelne na neupravenej a upravenej srvátke so všetkými štyrmi baktériami.

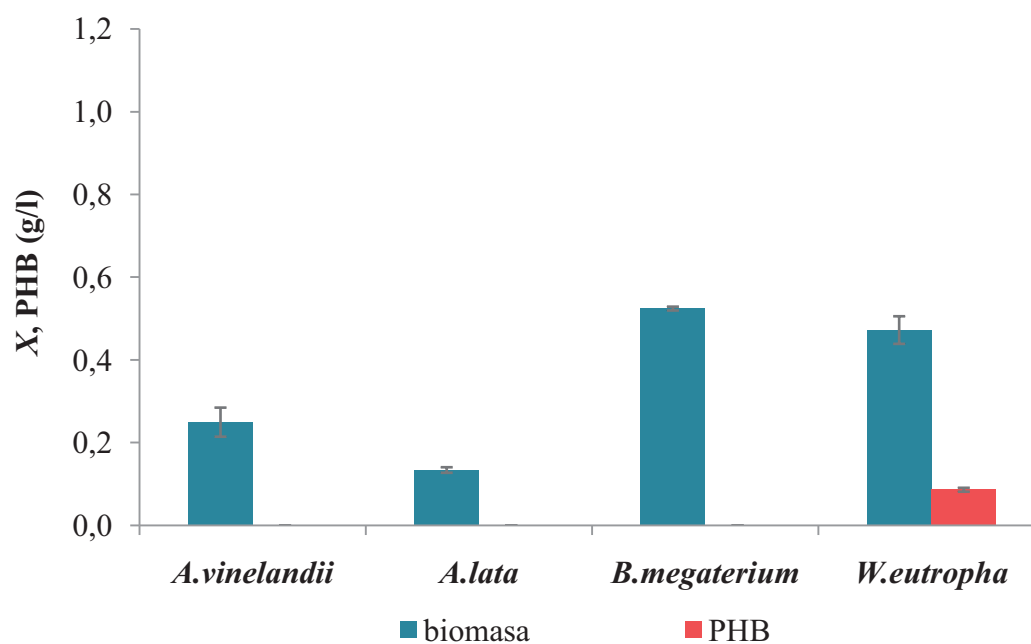
Tab. 45: Rast na neupravenej srvátke.

	X (g/l)	PHB (g/l)	PHB (%)
<i>A.vinelandii</i>	0,2499 ± 0,0351	–	–
<i>A.lata</i>	0,1342 ± 0,0067	–	–
<i>B.megaterium</i>	0,5242 ± 0,0046	–	–
<i>W.eutropha</i>	0,4723 ± 0,0333	0,0865 ± 0,0047	18,32

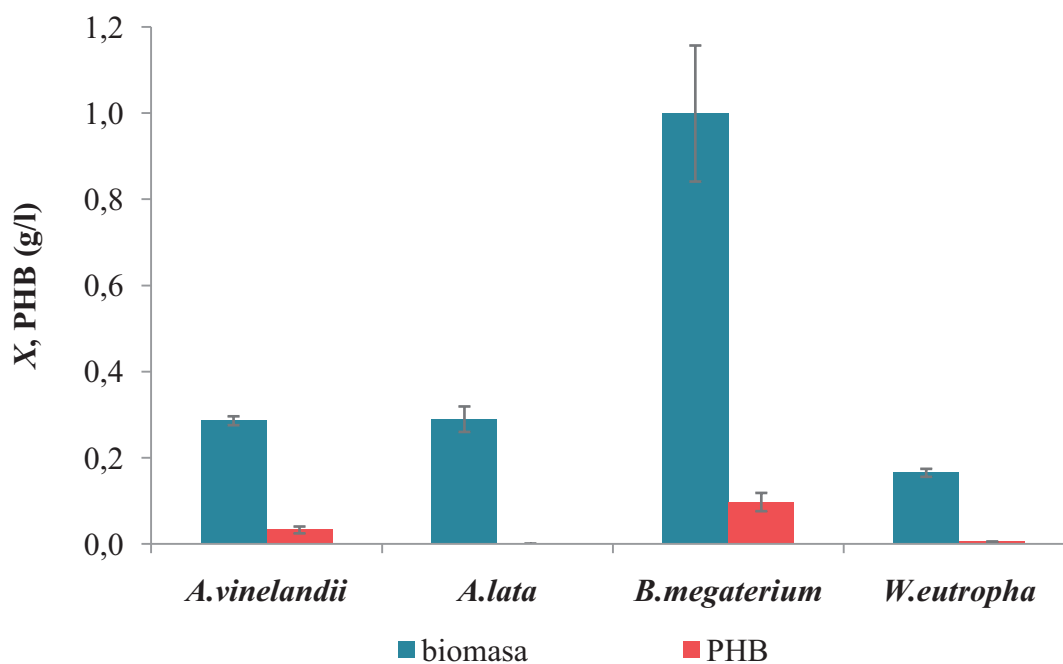
Tab. 46: Rast na upravenej srvátke.

	<i>X</i> (g/l)	PHB (g/l)	PHB (%)
<i>A.vinelandii</i>	0,2860 ± 0,0103	0,0325 ± 0,0079	11,37
<i>A.lata</i>	0,2897 ± 0,0296	—	—
<i>B.megaterium</i>	0,9995 ± 0,1580	0,0972 ± 0,0212	9,73
<i>W.eutropha</i>	0,1651 ± 0,0093	0,0047 ± 0,0010	2,84

Graf 27: Pomer rastu bakteriálnej kultúry k produkcii PHB na neupravenej srvátke.



Graf 28: Pomer rastu bakteriálnej kultúry k produkcii PHB na upravenej srvátke.



Rast baktérií na neupravenej a upravenej srvátke mal podobný efekt, aj keď výrazný rozdiel nastal v prípade *W.eutropha* kultivovanej na neupravenej srvátke, ktorá mala vyšší nárast biomasy (0,5 g/l) spojený s malou syntézou PHB (18 %), ako pri kultivácii na upravenej srvátke. Opačne, *B.megaterium* dokázal lepšie rásť na upravenej srvátke (1 g/l), ale produkcia PHB bola zrovnateľná s baktériou *W.eutropha*. Rozdiel v kultivácii *B.megaterium* spôsobil najmä prídavok MnSO_4 – nevyhnutného rastového faktoru pre túto bakteriálnu kultúru.

Ostatné baktérie nepreukázali schopnosť výraznejšieho rastu na srvátke, a to ani po prídavku solí, tento efekt je pravdepodobne spôsobený nedostatkom enzýmového vybavenia k štiepeniu laktózy. Vychádzajúc z týchto výsledkov, pre ďalšie optimalizácie kultivácie na srvátke bola vybraná baktéria *Bacillus megaterium*.

5.4.2.1. Utilizácia laktózy baktériami

Vzorka srvátky bola analyzovaná pred (kap. 5.4.1.7.) a po kultivácii vybraných bakteriálnych kmeňov (kap. 4.5.2.). Kultivácia prebiehala pri 30 °C, po dobu 70 hodín a 150 rpm. Pri analýze bolo sledované množstvo laktózy a glukózy v srvátke a úbytok laktózy po kultivácii.

Tab. 47: Obsah laktózy a glukózy v srvátke pred a po kultivácii s rôznymi baktériami.

cukor (g / l)	srvátka (pred)	<i>B.megaterium</i>	<i>A.lata</i>	<i>W.eutropha</i>
glukóza	0,35	2,04	0,85	2,27
laktóza	39,6	26,18	18,34	33,02

Bakteriálnu kultúru *Wautersia eutropha* nie je možné na základe získaných dát využiť k produkcii PHB z odpadnej srvátky. Spomenutá kultúra nedokáže laktózu dostatočne využívať. Baktéria *Azohydromonas lata* dokázala laktózu utilizovať, ale nárast biomasy bol veľmi nízky. Ako najvhodnejší bakteriálny kmeň pre produkciu PHB zo srvátky sa zdá byť *Bacillus megaterium*, ktorý dokázal srvátku najefektívnejšie využiť.

5.4.3. Rast baktérie *B.megaterium* na upravenej a neupravenej srvátke

Predchádzajúca kultivácia prebiehala dlhšiu dobu (70 hodín) ako je priebeh rastu bakteriálneho kmeňa *B.megaterium*. Rast bol teda sledovaný na neupravenej a upravenej srvátke po dobu 45 hodín, s troma odbermi k stanoveniu koncentrácie biomasy a PHB.

Tab. 48: Porovnanie rastu a produkcie PHB baktériou *B.megaterium* na srvátke.

	Čas	X (g/l)	PHB (g/l)	PHB (%)
Neupravená srvátka	25	0,389 ± 0,006	–	–
	30	0,422 ± 0,009	–	–
	45	0,389 ± 0,012	–	–
Upravená srvátka	25	1,427 ± 0,021	0,204 ± 0,004	14,29 ± 0,31
	30	1,222 ± 0,031	0,189 ± 0,005	15,46 ± 0,37
	45	1,612 ± 0,058	0,202 ± 0,004	12,51 ± 0,22

Predpokladaný vyšší rast bol na upravenej srvátke – s prídavkom solí, spolu s produkciou PHB až do 15 % biomasy. Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že bude potrebné upraviť pomer pridávaných solí k získaniu dostatočného rastu a produkcie polyméru.

5.4.4. Optimalizácia zloženie srvátky pomocou štatistickej metódy Plackett-Burman

Optimálne zloženie živného média pre dosiahnutia vysokého rastu biomasy a produkcie žiadaného polyméru nie je jednoduché stanoviť. Väčšinou sa jedná o testovanie prídavku jednej zložky v rôznych koncentráciách za predpokladu, že daná látka nie je ovplyvňovaná ostatnými zložkami média.

Urýchlením jednoduchého testovania je aplikácia štatistického modelu podľa Placketta a Burmana, ktorým sa po vyhodnotení menšej skupiny experimentov stanoví pozitívny alebo negatívny vplyv prídavku pre rast dôležitých látok. V tomto prípade bol hodnotený vplyv riedenia srvátky, prídavku dusičnanov a fosforečnanov, horčíka a kvasničného autolyzátu.

V pravej časti tabuľky sú vypísané zloženia média u jednotlivých experimentov, u ktorých bol stanovený rast aj koncentrácia PHB v bunkách (ľavá časť tab. 48). V pravej časti sú uvedené rastové a produkčné charakteristiky.

Tab. 49: Výsledné hodnoty rastu a produkcie PHB na jednotlivých upravených médiách.

	Srvátka	Dusík	Fosfor	Mg	YA	Biomasa	PHB (%)	PHB (g/l)
1	neriedená	1,00	5,00	0,04	0,10	0,895	2,058	0,018
2	neriedená	5,00	1,00	0,20	0,10	0,756	3,202	0,024
3	riedená	5,00	5,00	0,04	1,00	2,564	16,262	0,417
4	neriedená	1,00	5,00	0,20	0,10	0,921	1,901	0,018
5	neriedená	5,00	1,00	0,20	1,00	0,765	5,080	0,039
6	neriedená	5,00	5,00	0,04	1,00	0,751	1,954	0,015
7	riedená	5,00	5,00	0,20	0,10	2,401	27,355	0,657
8	riedená	1,00	5,00	0,20	1,00	2,016	12,723	0,257
9	riedená	1,00	1,00	0,20	1,00	1,949	13,512	0,263
10	neriedená	1,00	1,00	0,04	1,00	1,013	2,172	0,02
11	riedená	5,00	1,00	0,04	0,10	2,465	35,480	0,874
12	riedená	1,00	1,00	0,04	0,10	2,989	35,486	1,061

Podstatne vyššia koncentrácia buniek bola stanovená v médiách s riedenou srvátkou, takmer 3 g/l biomasy s 30 % obsahom PHB.

Tab. 50: Výsledky štatistického vyhodnotenia vplyvu skúmaných faktorov.

Parameter	Biomasa (g/l)		PHB (%)		PHB (g/l)	
	T value	P value	T value	P value	T value	P value
Srvátka	-11,46	0,000	-7,53	0,000	-6,40	0,001
Dusík	-0,10	0,923	1,30	0,241	0,73	0,493
Fosfor	-0,48	0,647	-1,98	0,095	-1,70	0,139
Horčík	-2,31	0,051	-1,79	0,123	-2,17	0,073
YA	-1,69	0,142	-3,26	0,017	-3,09	0,021

T hodnoty v tab. 51 hovoria o vplyve skúmaného parametra: záporná hodnota značí negatívny vplyv a súčasne P hodnota ($\leq 0,05$) udáva štatistickú významnosť zistených údajov T hodnôt [17].

Vyhodnotenie nameraných údajov jednotlivých médií v programe Minitab® dokázalo výrazný negatívny vplyv koncentrovanej srvátky na rast biomasy *B.megaterium* ako aj na produkciu PHB. Jedine u srvátky a kvasničného autolýzátu bola potvrdená štatistická významnosť stanovených T hodnôt. Kvasničný autolýzát mal prekvapivo negatívny vplyv na produkciu polyméru (pravdepodobne mala baktéria dostatočný prísun živín a nemala potrebu syntetizovať zásobný polymér – podobne ako to vyšlo v kap. 5.2.3. pri kultivácii *B.megaterium* na LB médiu).

U ostatných parametrov – prídavok dusičnanov, fosforečnanov a horčíka, nebol preukázaný významný vplyv na rast a produkciu.

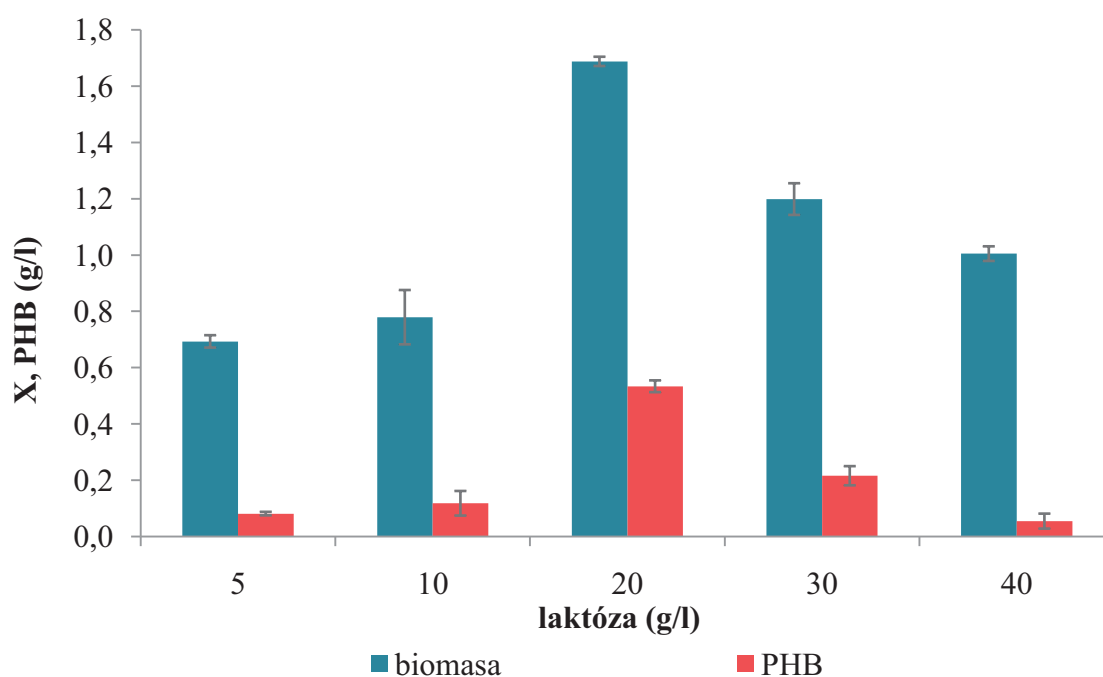
5.4.5. Optimalizácia riedenia srvátky

Na základe vyhodnotenia štatistického modelu Plackett-Burman sa otestovali rôzne riedenia srvátky založené na koncentrácii laktózy. Pôvodná koncentrácia bola stanovená na 40 g/l laktózy. Postupným riedením s destilovanou vodou sa získali koncentrácie 30, 20, 10 a 5 g/l. Kultivácia *B.megaterium* prebiehala za štandardných podmienok s prídavkom MnSO_4 .

Tab. 51: Rast a produkcia PHB baktériou *B.megaterium* na riedenej srvátke s odlišnou koncentraciou laktózy vo výslednom médiu.

Médium	Laktóza (g/l)	X (g/l)	PHB (g/l)	PHB (%)
1	5	$0,693 \pm 0,022$	$0,081 \pm 0,006$	11,71
2	10	$0,779 \pm 0,097$	$0,118 \pm 0,044$	15,12
3	20	$1,688 \pm 0,016$	$0,533 \pm 0,021$	31,60
4	30	$1,198 \pm 0,056$	$0,216 \pm 0,034$	18,00
5	40	$1,005 \pm 0,026$	$0,054 \pm 0,027$	5,41

Graf 29: Nárast biomasy a produkcia PHB na riedenej srvátke.



Maximálny rast biomasy bol stanovený na riedenej srvátke (50:50) s 20 g/l laktózy. Produkcia polyméru dosiahla 32 % z obsahu biomasy pri výťažku 1,7 g/l bunkovej hmoty.

6. ZÁVER

Predložená diplomová práca bola zameraná na štúdium produkcie polyhydroxybutyrátu u vybraných bakteriálnych kmeňov – *Bacillus megaterium*, *Azotobacter vinelandii*, *Wautersia eutropha* a *Azohydromonas lata*. Cieľom bolo vhodnou modifikáciou kultivačných podmienok dosiahnuť maximálny obsah PHB v bunkách.

V prvej časti boli porovnané možnosti analýzy PHB z dôvodu vhodného výberu metódy pre ďalšie experimenty. Značná miera nepresnosti bola zistená pri UV spektrofotometrii (stanovených 95 % PHB z biomasy), rýchlej a na zariadenia nenáročnej metódy. Príčina pramenila v interferencii ostatných zložiek biomasy, ktoré absorbovali pri rovnakej vlnovej dĺžke ako PHB. Tieto zložky je potrebné oddeliť od analytu, a to zaradením separačného kroku pred UV detekciou. Preto bola ďalej testovaná HPLC analýza PHB s UV detekciou, ktorou sa oddelil čistý analyt od absorbujúcich prímiesí a vo výsledku bol nameraný reálny obsah PHB predstavujúci 60 % z obsahu biomasy. Ako ďalšia možná metóda stanovenia PHA bola testovaná plynová chromatografia GC/FID, kde presnosť detekcie PHB bola porovnateľná s HPLC metódou. Aj keď príprava vzoriek pre analýzu GC vyžadovala derivatizáciu, bola nakoniec táto metóda používaná ku všetkým analýzám v predloženej práci. Jedná sa o najviac citovanú metódu stanovenia obsahu PHB v bunkách vo väčšine publikácií a navyše bolo možné využívať autosampler a tým ušetriť čas potrebný na analýzu.

V prvej časti experimentov bola sledovaná biosyntéza PHB v priebehu kultivácie bakteriálnej kultúry *Bacillus megaterium* na rôznych médiách. Na syntetickom médiu bol najvyšší rast dosiahnutý v 20. hodine – podiel PHB tvoril 21 % z 1,8 g/l biomasy. Zvýšenie produkcie nastalo prevedením buniek v stacionárnej fáze rastu do limitovaného média so zníženým obsahom dusíka (24 % z 1,5 g/l biomasy). Limitácia fosforom a kombinácia limitácie oboch faktorov len mierne zvýšila produkciu polyméru, a to na úkor rastu buniek. Vychádzajúc z domnienky, že baktérie reagujú na stres zvýšenou syntézou zásobných látok, boli do syntetického média pridané rôzne stresové faktory (peroxid vodíku, etanol, NaCl a i.). Jedine etanol stimuloval produkciu PHB, prekvapivo spojenú s nárastom biomasy (v porovnaní s kontrolnou kultiváciou bez stresu). Efekt etanolu bol pravdepodobne spôsobený pozitívnym vplyvom na reguláciu metabolickej dráhy syntézy PHB na enzýmovej úrovni.

V ďalšom kroku bolo pre kultiváciu *B. megaterium* testované BM médium obsahujúce mäsový extrakt a peptón. Prvotné kultivácie vykazovali pomerne nízke produkcie, ale po optimalizácii zloženia média spojenej s prídavkom jednoduchého zdroja uhlíka – glukózy, bol získaný 50 % nárast biomasy oproti syntetickému médiu s maximom rastu v 25. hodine. Výťažok PHB prekročil hodnotu 1 g/l. Testovaná limitácia kyslíkom v BM médiu predstavovala dôležitý regulačný parameter kultivácie aeróbnej baktérie *B. megaterium*. V závere bola sledovaná schopnosť baktérie utilizovať rôzne substráty. Významný nárast bol zaznamenaný na glukóze, xylóze a maltóze.

Druhým mikroorganizmom zvoleným pre kultivácie za účelom produkcie PHB bol bakteriálny kmeň *Azotobacter vinelandii* využívaný k priemyselnej produkcii alginátu a PHA. Táto baktéria je zaujímavá svojou schopnosťou syntetizovať kopolymér P(HB-co-HV). Syntéza kopolyméru bola sledovaná na Burkovom médiu s obsahom glukózy 30 g/l, vybranom po selektívnej kultivácii na rôznych médiách s optimalizáciou obsahu substrátu. Baktéria *A. vinelandii* je schopná viazať vzdušný dusík, preto sa v zložení Burkovho média žiaden nenachádzal a vývoj bol tak celú dobu kultivácie limitovaný obsahom dusíka vo

vzduchu nad médiom. Obsah biomasy sa zvyšoval až k 100. hodine rastu (3 g/l), oproti miernemu poklesu koncentrácie PHB – maximum 47 % v 90. hodine kultivácie.

Prídavok stresových faktorov (NaCl, etanol, H₂O₂) do média navýšil produkciu P(HB-co-HV) takmer o polovicu (54 % v prípade 3 mM H₂O₂) oproti nestresovanej kultivácii, a práve peroxid vodíka najviac ovplyvnil produkciu kopolyméru – 45 % z 2,6 g/l kultúry. To, že jednoduchá aplikácia lacného stresového faktora takto významne navýši produkciu PHB, môže byť základom vývoja novej fermentačnej stratégie, ktorá môže umožniť efektívnejšiu biosyntetickú výrobu PHA, čo by viedlo k poklesu ceny týchto materiálov. Rast *A.vinelandii* na rozdielnych substrátoch poukázal na možnosť využitia odpadných produktov obsahujúcich najmä maltózu, fruktózu či sacharózu (v porovnaní s kultiváciou na glukóze).

V poslednej etape experimentov bol na kultiváciu so zameraním na biosyntézu PHB testovaný odpadný produkt výroby syra – srvátka. Analýza zloženia potvrdila dostatočný obsah látok dôležitých pre rast baktérii (dusík 0,12 %, fosfor 63 mg/l, laktóza 40g/l). Porovnanie rastu a produkcie PHA u štyroch bakteriálnych kultúr na upravenej a neupravenej srvátke viedlo k zisteniu, že vhodným kmeňom schopným rásť na laktóze a dostatočne produkovať PHB je *Bacillus megaterium*. K navýšeniu produkcie polyméru bolo potrebné upraviť zloženie srvátkového média. Optimalizácia bola vykonaná pomocou štatistickej metódy Plackett-Burman [17]. Významný negatívny vplyv na rast aj produkciu mala vyššia koncentrácia srvátky. Posledným experimentom bolo teda optimalizované riedenie srvátky. Kultivácia *B.megaterium* na srvátke zriedenej destilovanou vodou 50:50 (laktóza 20 g/l) priniesla výťažok 31 % PHB z biomasy. Najvyšší výťažok dosiahnutý pri kultivácii na srvátke bol 1,061 g/l PHB (35 % z obsahu biomasy). Táto hodnota je porovnateľná s výťažkami dosiahnutými pri kultivácii na nepomerne drahšom BM médiu obohatenom o 8 g/l glukózy. Využitie odpadných substrátov tak môže výrazne prispieť k poklesu cien PHA.

Srvátka by v budúcnosti mohla zastúpiť drahé substráty používané na kultiváciu baktérií v priemyselnej produkcii polyhydroxybutyrátu. Vhodnou aplikáciou lacného stresového faktoru, napr. v prípade bakteriálnej kultúry *Bacillus megaterium* prídavok etanolu, by bolo možné stimulovať syntézu polyméru pri raste na srvátke, čím sa výsledné náklady opäť môžu znížiť a cena komerčného PHB by mohla byť postupne konkurencieschopná dnešným petrochemickým polymérom.

7. ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] Siracusa, V., Rocculi, P., Romani, S., Dalla Rosa, M.: Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 2008, vol. 19, no. 12, p. 634-643. ISSN 0924-2244.
- [2] Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M., Shah S.: Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants – A review. *Biotechnology Advances*, 2007, vol. 25, no. 2, p. 148-175. ISSN 0734-9750.
- [3] Flickinger, M. C., Drew, S. W.: *Encyclopedia of Bioprocess Technology – Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*. John Wiley & Sons, 1999, vol. 1-5, p. 2024-2133 s. ISBN 1-59124-457-9.
- [4] Philip, S., Keshavarz, T., Roy, I.: Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2007, vol. 82, p. 233-247. ISSN 0268-2575.
- [5] Khanna, S., Srivastava, A. K.: Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, 2005, vol. 40, p. 607-619. ISSN 0032-9592.
- [6] Choi, J., Lee, S. Y.: Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, vol. 51, p. 13-21. ISSN 0175-7598.
- [7] Sudech, K., Abe, H., Doi, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progres in Polymeric Science*, 2000, vol. 25, p. 1503-1555. ISSN 0079-6700.
- [8] Bastioli, C.: *Handbook of Biodegradable Polymers*. Smithers Rapra Technology, 2005, p. 219-256. ISBN 978-1-85957-389-1.
- [9] Jendrossek, D., Müller, B., Schlegel, H.: Cloning and characterization of the poly(hydroxyalkanoic acid)-depolymerase gene locus, pha Z1, of *Pseudomonas lemoignei* and its gene products. *European Journal of Biochemistry*, 1993, vol. 218, p. 701-710. ISSN 0014-2956.
- [10] Mukai, K., Yamada, K., Doi, Y.: Enzymatic degradation of poly(hydroxyalkanoates) by a marine bacterium. *Polymer Degradation and Stability*, 1993, vol. 41, p. 85-91. ISSN 0141-3910.
- [11] Ji-Dong Gu: Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent researches advances. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2003, vol. 52, p. 69-91. ISSN 0964-8305.
- [12] Tian, J., Sinskey, A.J., Stubbe, J.: Kinetic Studies of Polyhydroxybutyrate Granule Formation in *Wautersia eutropha* H16 by Transmission Electron Microscopy. *Journal of Bacteriology*, 2005, vol. 187, p. 3814-3824. ISSN 0021-9193.
- [13] McCool, G. J., Fernandez, T., Li, N., Cannon, M. C.: Polyhydroxyalkanoate inclusion-body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*. *FEMS Microbiology Letters*, 1996, vol. 138, p. 41-48. ISSN 0378-1097.
- [14] Todar, K.: *Todar's Online Textbook of Bacteriology* [online]. 2008, posledná revízia 5. 12. 2008 [cit. 13. 5. 2009].
Dostupné z: <<http://www.textbookofbacteriology.net/index.html>>

- [15] Galindo, E., Peña, C., Núñez, C., Segura, D., Espín, G.: Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polydihydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories* [online]. 2007, 6:7 [cit. 13. 5. 2009]. Dostupné na [www: http://www.microbialcellfactories.com/content/6/1/7](http://www.microbialcellfactories.com/content/6/1/7)
- [16] Castañeda, M., Guzmán, J., Moreno, S., Espín, G.: The GacS sensor kinase regulates alginate and poly- β -hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 2000, vol. 182, p. 2624-2628. ISSN 0021-9193.
- [17] Khanna, S., Srivastava, A. K.: Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry*, 2005, vol. 40, p. 2173-2182. ISSN 0032-9592.
- [18] Yilmaz, M., Soran. H., Beyatli, Y.: Determination of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production by some *Bacillus spp.* *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2005, vol. 21, p. 565-566. ISSN 1573-0972.
- [19] Zhang, S., Norrlöw, O., Wawrzynczyk, J., Dey, E. S.: Poly(3-hydroxybutyrate) biosynthesis in the biofilm of *Alcaligenes eutrophus*, using glucose enzymatically released from pulp fiber sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, vol. 70, p. 6776-6782. ISSN 0099-2240.
- [20] Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R. W., Fuller, R. C.: *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, vol. 54., p. 1977-1982. ISSN 0099-2240.
- [21] Deng, S.P., Tabatabai, M.A.: Colorimetric determination of reducing sugar in soils. *Soi. Biology and Biochemistry*, 1994, vol. 26, p. 473-477. ISSN 0038-0717.
- [22] Márová I., Vránová D.: Praktikum z biochemie, Ústav chemie potravin a biotechnologie, Chemická fakulta, Brno, 2002.
- [23] Hrstka, M., Vespalcová, M. Praktikum z analytické chemie potravin. Pracovní sešit, FCH VUT Brno, 2006.
- [24] Kimura, H., Ohura, T., Matsumoto, T., Ikaraski, T.: Effective biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) with high 4-hydroxybutyrate fractions by *Wautersia eutropha* in the presence of α -amino acids. *Polymer International*, 2008, vol. 57, p. 149-157. ISSN 0959-8103.
- [25] Grothe, E., Moo-Young, M., Chisti, Y.: Fermentation optimization for the production of poly(β -hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. *Enzyme and Microbial Technology*, 1999, vol. 25, p. 132-141. ISSN 0141-0229.
- [26] Kulpreecha, S., Boonruangthavoron, A., Meksiriporn, B., Thongchul, N.: Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2009, vol. 107, p. 240-245. ISSN 1389-1723.
- [27] Maragoni, C., Furigo: Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with propionic acid feeding. *Process Biochemistry*, 2002, vol. 38, p. 137-141. ISSN 0032-9592.
- [28] Koutinas, A. A., Xu, Y., Wang, R., Webb, C.: Polyhydroxybutyrate production from a novel feedstock derived from wheat-based biorefinery. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, vol. 40, p. 1035-1044. ISSN 0141-0229.
- [29] Wallen, L. L., Rohwedder, W. K.: Poly- β -hydroxyalkanoate from activated sludge. *Environmental Science & Technology*, 1974, vol. 8, p. 576-579. ISSN 0013-936X.

- [30] Jendrossek, D., Selchow, O., Hoppert, M.: Poly(3-hydroxybutyrate) granules at the early stages of formation are localized close to the cytoplasmic membrane in *Caryophanon latum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, vol. 73, p. 586-593. ISSN 0099-2240.

8. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

PHA	→	Polyhydroxyalkanoates (polyhydroxyalkanoáty)
PHB	→	Polyhydroxybutyrate (polyhydroxybutyrát)
P(HB-co-HV)	→	Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxybutyrate)
3HB	→	3-hydroxybutyrate
3HV	→	3-hydroxyvalerate
SCL PHB	→	Short-Chain-Lenght Polyhydroxybutyrate
MCL PHB	→	Medium-Chain-Lenght Polyhydroxybutyrate