



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**Metabolická a biofyzikální charakterizace
bakteriálních buněk schopných akumulace PHA**

Metabolic and biophysical characterization of bacterial cells capable
of PHA accumulation

DISERTAČNÍ PRÁCE

Doctoral thesis

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Eva Slaninová

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

ŠKOLITEL SPECIALISTA

Consultant

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2021

ABSTRAKT

Předložená disertační práce se zabývá charakterizací bakteriálních buněk schopných akumulace polyhydroxyalkanoátů (PHA). Disertační práce je vypracovaná formou komentované diskuse publikovaných prací, které jsou součástí příloh. Práce rozvíjí aktuální téma studia protektivních funkcí PHA a nově objasňuje některé protektivní mechanismy vůči vybraným stresorům. V rámci práce byly studovány protektivní účinky PHA granulí před UV zářením a osmotickým stresem, konkrétně hypotonickým prostředím. V případě expozice buněk UV zářením jsou buňky chráněny především díky rozptylu UV záření na granulích, které se vyskytují v těsné blízkosti nukleoidu. U osmotického stresu hraje klíčovou roli amorfni stav PHA granulí, který stabilizuje buněčné membrány při hypertonickém namáhání buněk, načež jsou bakteriální buňky lépe schopné odolávat přechodu do hypotonického prostředí a udržet si svoji buněčnou integritu. Obecně je možné konstatovat, že amorfni stav PHA granulí je klíčový pro zajištění správné biologické funkce PHA, ať už jako zásobního nebo protektivního polymeru. Proto jsme se v další části této práce věnovali objasnění podstaty stabilizačního mechanismu, který chrání nativní PHA granule před krystalizací a udržují tak intracelulární polymer v termodynamicky nevýhodném fázovém stavu. Na základě experimentálních poznatků, kde jsme aplikovali vybrané stresy, jsme navrhli nový model stabilizace amorfniho stavu PHA granulí *in vivo*. Jedná se o kombinaci dvou mechanismů, kdy je z důvodu malého objemu granulí snížena rychlost krystalizace a zároveň voda přítomná v granulích plní roli nízkomolekulárního plastifikátoru. Díky metabolickému aparátu buněk jsou PHA neustále syntetizovány a zároveň degradovány, což vede k navýšení intracelulární koncentrace monomerů, které rovněž figurují v protektivním efektu PHA. V tomto kontextu jsme se tedy zaměřili na popis mechanismu kryoprotektivního účinku 3-hydroxybutyrátu, monomeru nejrozšířenějšího zástupce PHA, poly(3-hydroxybutyrátu). Byl sestaven rovnovážný a nerovnovážný fázový diagram systému 3HB-voda, díky kterému je možné konstatovat, že 3HB představuje velice efektivní kryoprotektant, což má fundamentální význam pro pochopení protektivních vlastností PHA, ale tato skutečnost může být také aplikačně využita například při úchově biologických vzorků anebo v potravinářském průmyslu.

Klíčová slova:

Polyhydroxyalkanoáty; *Cupriavidus necator* H16; stresová odpověď bakterií; UV záření; osmotický stres; amorfni stav; kryoprotektivní účinek; fázový diagram.

ABSTRACT

This thesis deals with the characterization of bacterial cells capable of polyhydroxyalkanoates (PHA) accumulation. The dissertation thesis is written in the form of a discussed published publications which are attached to the thesis as appendixes. The work develops a study of the current topic of the protective functions of PHA and clarifies protective mechanisms against selected stressors. Firstly, we focused on the protective effects of PHA granules against UV radiation and osmotic stress, specifically hypotonic conditions. In the case of UV exposition, the cells protected themselves by scattering UV radiation on the intracellular granules protecting especially nucleoid. When exposed to osmotic stress, the amorphous state of PHA granules is very important since it is capable of stabilization of cell membranes under hypertonic stress, afterwards, bacterial cells can maintain their integrity during the subsequent hypotonic challenge. In general, the amorphous state of PHA granules is key to ensure the proper biological functions of PHA whether as storage or protective polymer. Therefore, in the next part of this work, we focused on the core of the stabilization mechanism that protects native PHA granules from crystallization and thus the intracellular polymer maintains in a thermodynamically unfavorable amorphous phase state. Based on experimental work, we applied selected stresses because we proposed a new model of stabilization of the amorphous state of PHA granules *in vivo*. It consists of two mechanisms, where small volumes of PHA granules reduce the rates of crystallization and at the same time the water present in the granules plays the role of a low molecular plasticizer. Due to the metabolic apparatus of bacterial cells, PHA are simultaneously synthesized and degraded which leads to an increment of intracellular concentration of monomers that also figure in the protective effect of PHA. In this context, we aimed at the description of the mechanism of cryoprotective effects of 3-hydroxybutyrate, the monomer of the most common of PHA, poly(3-hydroxybutyrate). Hence, we constructed an equilibrium and non-equilibrium phase diagram of the 3HB-water system to prove that 3HB is a very effective cryoprotectant. This fundamental understanding of the protective properties of PHA monomers could be also used in the food industry or cryopreservation of biological samples.

Keywords

Polyhydroxyalkanoates; *Cupriavidus necator* H16; bacterial stress response; UV radiation; osmotic stress; amorphous state; cryoprotective effect; phase diagram

SLANINOVÁ, Eva. *Metabolická a biofyzikální charakterizace bakteriálních buněk schopných akumulace PHA*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/134349>. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Stanislav Obruča.

Prohlášení

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



podpis studenta

Poděkování

Chtěla bych především poděkovat svému vedoucímu mé dizertační práce doc. Ing. Stanislavu Obručovi Ph.D. a školiteli specialistovi Ing. Petru Sedláčkovi Ph.D. za odborné vedení práce, podporu, čas a cenné rady potřebné pro vypracování dizertační práce. Další velké poděkování patří kolegům a spolužákům, jmenovitě bych chtěla poděkovat za velkou podporu kolegyni Ing. Ivaně Nováčkové. V poslední řadě bych také ráda poděkovala své rodině a přátelům.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Polyhydroxyalakanoáty	8
2.1.1	Obecná charakteristika PHA	8
2.1.2	Struktura PHA	9
2.1.3	Mechanické a chemické vlastnosti PHA	9
2.1.4	Charakterizace vybraných producentů PHA	11
2.2	Metabolismus a regulace PHA	14
2.2.1	PHA cyklus	14
2.2.2	Regulace metabolismu PHA	21
2.3	Fyziologie a biofyzikální vlastnosti PHA granulí	23
2.3.1	Struktura PHA granulí.....	23
2.3.2	Mechanismy vzniku PHA granulí.....	25
2.3.3	Amorfní charakter nativních PHA granulí.....	26
2.3.4	Protektivní vlastnosti PHA při stresové odpovědi bakterií	27
3	Výsledky a diskuze.....	34
3.1	Protektivní vliv PHA vůči stresům.....	34
3.1.1	Pozitivní vliv PHA granulí vůči UV záření	35
3.1.2	Osmoprotektivní efekt PHA granulí	44
3.2	Amorfní charakter PHA granulí <i>in vivo</i>	49
3.3	Objasnění protektivních vlastností monomerní jednotky PHB	55
3.4	Přínos disertační práce k současnému stavu problematiky	62
3.5	Budoucí perspektiva výzkumu	65
4	Literatura	68
5	Seznam příloh a podíl autorky na publikacích	80
6	Přílohy	82
6.1	Příloha I	82
6.2	Příloha II.....	92
6.3	Příloha III	97
6.4	Příloha IV	106
6.5	Příloha V.....	120
6.6	Příloha VI	136

7	Seznam zkratek	153
8	Publikační činnost autorky	154
9	Životopis.....	157

1 ÚVOD

Již v 19. století, jeden ze zakladatelů bakteriologie Louis Pasteur, francouzský chemik a všeobecně známý jako otec mikrobiologie pronesl: „A stejně jsou to mikrobi, kdo bude mít poslední slovo!“. A není divu. Bakterie jakožto mikroorganismy nám svojí všudypřítomností na planetě Zemi dokazují silnou schopnost adaptace, jelikož úspěšně přežívají v oblastech od polárního až k tropickému pásu, kde musí čelit různorodým nepříznivým podmínkám, v našich zeměpisných šířkách například i změnám ročních období. Jsou-li mikroorganismy déle exponovány určitému typu stresu nebo kombinaci více stresů, dochází u nich k rozvoji vlastního protektivního aparátu.

Jedny ze základních stresových faktorů jsou náhlé změny teplot, které mají dalekosáhlé následky projevující se ve struktuře a biologické aktivitě mikroorganismů, kdy extrémní teploty vzdálené od optimálních hodnot mají negativní až letální účinek. Vysoká teplota v první řadě povede k rozvolnění cytoplazmatické membrány či denaturaci proteinů, nízká teplota vyvolá mimo jiné i osmotický stres s ohledem na změnu skupenství jak intracelulární, tak extracelulární vody. Narušení osmotické rovnováhy souvisí s druhem mikroorganismu, který může disponovat libovolnou tolerancí ke koncentraci rozpuštěných látek. Dalším častým stresem je změna pH, která výrazně ovlivňuje mimo jiné i samotný metabolismus buněk prostřednictvím protonizace a deprotonizace ovlivňující uspořádání proteinů, a tudíž i jejich aktivitu. Mění se také membránový transport v důsledku odchýlení pH od optimální hodnoty. Mezi další univerzální stres, kterému se mikroorganismy ve volné přírodě jen těžko vyhnou, je expozice UV záření, které vyvolává mutagenní změny v DNA. Samotné přežití mikroorganismů při expozici rozličným stresům závisí často na schopnosti rychlé odpovědi ať už regulačním či protektivním mechanismem.

Jak už bylo výše uvedeno, mnohé mikroorganismy si prostřednictvím adaptace vytvořily rozličné protektanty a protektivní mechanismy, díky kterým jsou schopny přežít i obtížné podmínky, ať už náhlé či trvalé. Mezi hojně využívané protektivní látky, které jsou si některé mikroorganismy schopny nasyntetizovat patří takzvané nízkomolekulární kompatibilní látky. Tyto látky působí jednak jako osmoprotektanty a zároveň mají pozitivní vliv na životaschopnost buněk i při nízkých či vysokých teplotách, přičemž za účelem ochrany proteinů před denaturací jsou často využívány proteiny teplotního šoku. Také produkce pigmentů hraje zásadní roli s ohledem na míru expozice UV záření.

Jedním z nejdůležitějších zásobních polymerů u prokaryotických mikroorganismů jsou polyhydroxyalkanoáty (PHA), jejichž obsah v buněčné biomase může odpovídat až 90 % hmotnosti suché biomasy. Avšak bylo zjištěno, že akumulace PHA v bakteriálních buňkách z pohledu základních fyziologických a fyzikálně-chemických vlastností mikrobiálních buněk má velký vliv i na životaschopnost samotných buněk, a to především díky zapojení PHA do stresové odpovědi bakterií. Cílem této práce je charakterizace jednotlivých protektivních mechanismů nativních PHA vůči různým stresům aplikovaným na bakteriální buňky obsahující PHA inkluze. Dále je v této práci zkoumána podstata amorfního charakteru intracelulárních granulí a optimalizována izolace PHA za účelem jejich dalšího studia a také aplikací především v oblasti potravinářských obalů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Polyhydroxyalakanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou mikrobiální polyestery hydroxykyselin, které jsou syntetizované a akumulované celou řadou mikroorganismů z domén bakterie a archea, v nichž jsou tyto polymery přírodního původu akumulovány ve formě intracelulárních granulí. Svými vlastnostmi jako jsou biodegradabilita a kompatibility, se PHA řadí mezi významné alternativy ke klasickým plastům vyrobených z ropy s velkým aplikačním potenciálem, navíc je lze biotechnologicky produkovat z obnovitelných zdrojů (Philip a kol., 2007; K. Sudesh a kol., 2000).

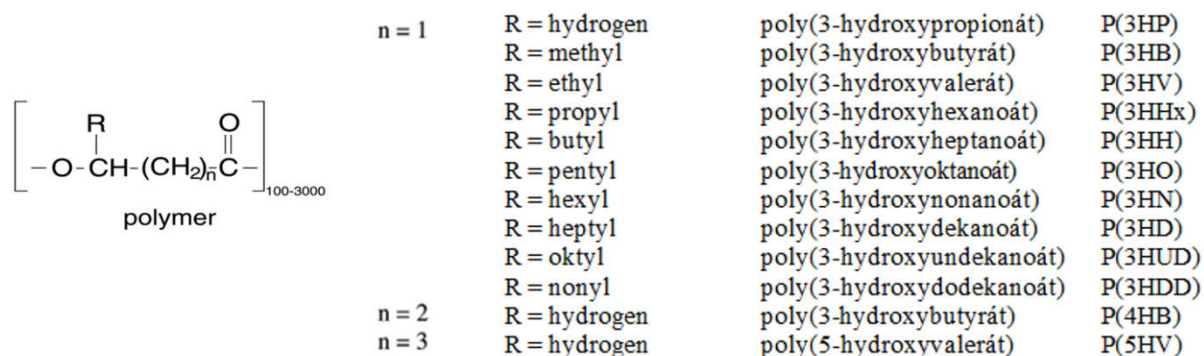
2.1.1 Obecná charakteristika PHA

Jak už bylo zmíněno výše, mnohé prokaryotické mikroorganismy jsou schopné syntetizovat a akumulovat rezervní materiál PHA ve formě intracelulárních granulí. PHA byly poprvé popsány už v roce 1926 francouzským vědcem Mauricem Lemoignem, který vyizoloval a charakterizoval poly(3-hydroxybutyrát) (P3HB) z bakteriálního kmene *Bacillus megaterium*. Schopnost produkce a akumulace PHA byla od té doby již potvrzena u více než 300 druhů bakterií, kdy obsah PHA v biomase se odvíjí od konkrétních producentů. Nicméně mikroorganismy obvykle syntetizují a akumulují PHA, nachází-li se v prostředí s nadbytkem zdroje uhlíku a zároveň jsou limitovány dusíkem, sírou, hořčíkem nebo dalšími prvky. Naopak v případě limitace uhlíkatým substrátem je tato rezerva využívána. Velký vliv na samotnou syntézu a akumulaci PHA má i poměr uhlíku vůči dusíku, kdy vyšší množství uhlíku podporuje vyšší produkci a akumulaci PHA na úkor proliferace. Také stáří bakteriálních buněk ovlivňuje množství intracelulární PHA, kdy buňka v exponenciální fázi využívá energii především k růstu a buněčnému dělení. Velikost nativních PHA granulí je rovněž ovlivněna více faktory, obecně ji lze popsat jako granuli kulovitěho tvaru o velikosti v průměru 0,2–0,5 µm tvořenou polyesterovým hydrofóbním jádrem obaleným vrstvou proteinů (viz kapitola 2.3.1) (Kaprálek, 1986; Sudesh a kol., 2000).

Tyto biopolymery patří mezi jedny z nejzkoumanějších materiálů 21. století, a to díky svým jedinečným vlastnostem jako jsou: biokompatibilita, fyzikálně-mechanické vlastnosti a v neposlední řadě biodegradabilita. Intenzivní výzkum, a především vylepšení mechanických vlastností otevírá širokou škálu využití v medicínských aplikacích (řízené uvolňování, chirurgické šití aj.), potravinářství (obalové materiály) a mnoha dalších odvětvích. Velká výhoda PHA oproti konvenčním plastům bezesporu spočívá v biologické rozložitelnosti PHA, přičemž míra degradace závisí na okolních podmínkách (teplota, pH, mikrobiální aktivita aj.). Jak bylo prokázáno, produkty PHA degradace nejsou nijak toxické či závadné a přirozeně se vyskytují i v lidském těle (Cheng a kol., 2003; Reddy a kol., 2003).

2.1.2 Struktura PHA

PHA jsou lineární polyester hydroxyalkanových kyselin, které je možné dělit na základě zastoupených typů monomerních jednotek na homopolymery, obsahující pouze jeden typ monomerní jednotky, a na heteropolymery se dvěma či více rozdílnými monomery. Je známo více než 150 druhů monomerních jednotek, které mohou být ve struktuře různě kombinovány a ovlivňují tak vlastnosti polymeru jako celku. Monomerní jednotky vytváří mezi sebou esterovou vazbu s hydroxylovou skupinou sousedního monomeru, jak je vidět na obr. 1 (Sudesh a kol., 2000).



Obr. 1 Obecná struktura PHA (Wu a kol., 2003).

Dále mohou být PHA rozděleny do tří skupin dle počtu atomů uhlíku v monomerních jednotkách. A to na PHA s krátkým řetězcem scl-PHA (short-chain-length), která se skládá z 3 až 5 atomů uhlíku a na PHA se středně dlouhým řetězcem mcl-PHA (medium-chain-length), u kterých je monomerní jednotka tvořena z 6 až 14 atomů uhlíků. Polymer obsahující monomerní jednotku delší než 14 atomů uhlíků spadá do skupiny PHA s dlouhým řetězcem lcl-PHA (long-chain-length), u kterých narozdíl od předešlých dvou skupin je syntéza pouze umělá nikoli mikrobiální. Monomerní jednotky ve všech PHA, které byly doposud charakterizované, se vyskytují v *R* konfiguraci důsledkem vysoké stereospecifity PHA syntázy. Tyto polymery jsou dále specifické svým vysokým stupněm polymerizace (přibližně 100–3 000), co se týče molekulové hmotnosti PHA, pohybuje se v rozmezí 200–3 000 kDa v závislosti na typu monomerní jednotky, mikroorganismu a podmínkách kultivace (Chen a kol., 2015; Muhammadi a kol., 2015).

2.1.3 Mechanické a chemické vlastnosti PHA

Z hlediska vlastností PHA, patří tyto ve vodě nerozpustné polymery mezi termoplasty a elastomery s ohledem na délku monomerních jednotek, kdy skupina scl-PHA vykazuje vysokou krystalinitu a svými dalšími vlastnostmi podobnými konvenčním termoplastům. Naopak skupina mcl-PHA vykazuje specifické vlastnosti elastomerů jako pružnost a nízká krystalinita. Avšak mechanické a chemické vlastnosti PHA se též mění v závislosti na daném složení homopolymeru či kopolymeru, konkrétně na zastoupení jednotlivých monomerních jednotek. Hodnoty jednotlivých charakteristik pro konkrétní složení polymerů jsou již definované pro vyizolované polymery (viz tab. 1) (Muhammadi a kol., 2015; Volova, 2004).

Tab. 1 Fyzikální vlastnosti poly(3-/4-hydroxyalkanoátů) a polypropylenu.

Polyester	T _m [°C]	T _g [°C]	Krystalinita [%]	Youngův modul [GPa]	Pevnost v tahu [MPa]	Prodloužení při přetřžení [%]	Reference
P3HB	180	4	50–80	3,5	40	5	Hazer a Steinbüchel, 2007
P3HV	110	−15	56				
P4HB	53	−40	34	149	104	1 000	
P(3HB- <i>co</i> -3HV)							
8 mol. % 3HV	164,3	−0,6	57,3	2,9	21,5	16	Savenkova a kol., 2000
20 mol. % 3HV	116,4	−6,3	30,9	0,8–1,2	15,6	182	
P(3HB- <i>co</i> -4HB)							
10 mol. % 4HB	128,4	−2,5	48,99		24	242	Wen a kol., 2012
20 mol. % 4HB	91,8	−8,1	26,32				
Polypropylen	176	−15	50	1,0–1,7	29,3–38,6	500–900	Sudesh a kol., 2000

Fyzikální vlastnosti jsou přímo závislé na konkrétním složení daného polymeru, kdy nejlépe prostudovaným PHA je bezesporu první objevený homopolymer P3HB ze skupiny scl-PHA. Jedná se o vysoce krystalický polymer (55–80 %) v důsledku *R* konfigurace všech chirálních atomů uhlíku ve své struktuře. P3HB je některými svými vlastnostmi velmi podobný polypropylenu, ať už Youngovým modulem o hodnotě 3,5 GPa či pevností v tahu 40 MPa. Na druhou stranu prodloužení neboli elongace činí u P3HB pouze 5 % kdežto u polypropylenu dosahuje elongace až 400 %, v důsledku čehož je P3HB tuhé a křehké. Teplota skelného přechodu P3HB nastává při 4 °C, přičemž teplota tání je velice blízká teplotě tepelného rozkladu, konkrétně hodnoty teploty tání polymeru P3HB odpovídají 173 až 180 °C a teplota rozkladu 200 °C (Hazer a Steinbüchel, 2007). Jak již bylo zmíněno výše, ke změně vlastností polymeru, především teplot tání a rozkladu lze docílit pomocí inkorporace více druhů monomerních jednotek, lze tak získat kopolymery s lepšími či výhodnějšími vlastnostmi. Zatímco samotný P3HB má teplotu tání okolo 180 °C, v kopolymery s 4-hydroxybutyrátem (4HB) se teplota sníží až na 91,8 °C či s 3-hydroxyvalerátem (3HV) na cca 116 °C, kdy míra změn vlastností kopolymerů je závislá na molárních poměrech monomerů (Savenkova a kol., 2000; Wen a kol., 2012). Ale ne vždy se jedná o antagonistické působení polymerů, příkladem synergického efektu je kopolymer P(3HB-co-3HV), kdy dochází k isodimorfismu, tj. kokrystalizaci dvou monomerních jednotek v krystalové mřížce obou homopolymerů, v závislosti, zdali množství (*R*)-3HV je více nebo méně než 40 mol. % (Sudesh a kol., 2000; Sudesh a kol., 2011).

Další výrazné zlepšení vlastností jinak krystalického a křehkého P3HB je zakomponování 4HB do struktury hlavního řetězce. Výsledkem kontrolovaného zvyšování molárního poměru jednotek 3HB a 4HB ve prospěch 4HB krystalinita klesá a zvyšuje se pevnost a prodloužení (viz tab. 2) (Saito a Doi, 1994).

Tab. 2 Vlastnosti kopolymeru *P(3HB-co-4HB)* filmů při 23 °C (Saito a Doi, 1994).

Vlastnosti	4HB frakce [mol%]								
	0	3	10	16	64	78	82	90	100
Krystalinita [%]	60	55	45	45	15	17	18	28	34
Youngův modul [MPa]	3 500				30	24	45	100	149
Pevnost v tahu [MPa]	43	28	24	26	17	42	58	65	104
Délkové prodloužení při přetržení [%]	5	45	242	444	591	1 120	1 320	1 080	1 000

V porovnání s scl-PHA, skupina mcl-PHA patří mezi elastomery, které se značí sice nízkou krystalinitou (25 %), avšak vysokou závislostí na tepelné historii polymeru. Mcl-PHA disponují narozdíl od scl-PHA nižšími teplotami tání 39 až 61 °C a teplotami skelného přechodu, který nastává v rozmezí od –43 do –25 °C (Flickinger a kol., 2002).

2.1.4 Charakterizace vybraných producentů PHA

Jak už bylo nastíněno v úvodu, široká škála mikroorganismů je schopna syntetizovat a akumulovat PHA ve formě buněčných inkluzí v cytoplasmě, kdy mikroorganismy neprodukují tento polymer pouze za účelem zásobním, ale rovněž jako obranu vůči nepříznivým podmínkám (teplota, osmotický stres, UV aj.) ve smyslu vzniklé adaptace. Proto není nijak překvapující, že skupina PHA produkujících mikroorganismů je velice široká a zahrnuje domény archea a bakterie jak grampozitivní, tak gramnegativní (Sudesh a kol., 2000).

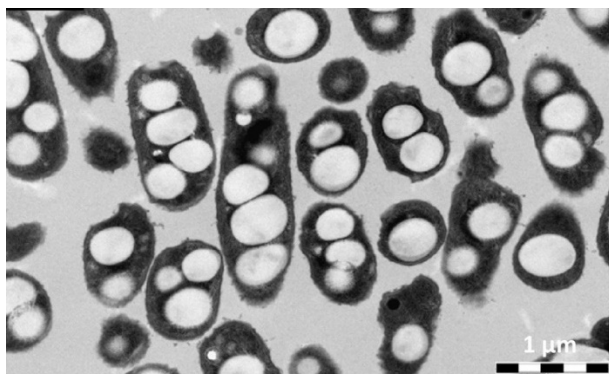
2.1.4.1 *Cupriavidus necator* H16

Bakteriální kmen *Cupriavidus necator* H16 patří bezesporu mezi nejvíce prostudované producenty PHA. Jedná se o gramnegativní, fakultativně chemolitotrofní bakterie, které jsou zařazeny mezi modelové mikroorganismy pro metabolismus PHA. Díky častým změnám v taxonomii lze tento bakterii v literatuře stále nalézt po názvem *Ralstonia eutropha* H16 z roku 1995, *Wautersia eutropha* nebo *Alcaligenes eutrophus* (Reinecke a Steinbüchel, 2008).

Bakterie *Cupriavidus necator* H16 se přirozeně vyskytuje se v půdních a sladkovodních biotopech. V nepřítomnosti organických sloučenin je tento bakteriální kmen schopen využívat H₂ a CO₂ jako zdroj uhlíku a energie prostřednictvím autotrofní fixace CO₂ Calvin-Benson-Basshamovým cyklem. V případě anoxie jsou tyto bakterie schopny přejít do denitrifikačního režimu, kde dusičnany slouží jako alternativní akceptor elektronů. Jako zdroj energie a organického uhlíku mohou být dále využity jak meziprodukty citrátového cyklu, tak cukerné či mastné kyseliny. Ze sacharidů je využití omezeno pouze na fruktózu, kyselinu glukonovou a N-acetylglukosamin. Díky nepřítomnosti klíčového enzymu fruktóza-1,6-bisfosfátaldolázy je fruktóza metabolizována prostřednictvím Entner-Doudorffovy dráhy pomocí enzymu 2-keto-3-deoxy-6-fosfoglukonát aldolázy. V současné době je též známá kompletní nukleotidová sekvence, přičemž genom se skládá ze tří replikonů: chromozon 1, chromozom 2 a megaplasmid pHG1 (Cramm, 2008; Pohlmann a kol., 2006).

Jak už bylo zmíněné výše, bakteriální kmen *Cupriavidus necator* H16 slouží jako modelový mikroorganismus pro metabolickou dráhu biosyntézy PHA, kdy syntéza PHB byla již detailně objasněna (viz kapitola 2.2). Tento bakteriální kmen je schopný syntetizovat a akumulovat PHB

v množství až 90 hm. % suché biomasy v závislosti na kultivačních podmínkách (viz obr. 2). Jelikož jsou bakterie schopny rovněž využít k produkci PHA řadu odpadních substrátů, řadí se *Cupriavidus necator* H16 k biotechnologicky slibným kmenům (Müller a kol., 2013).



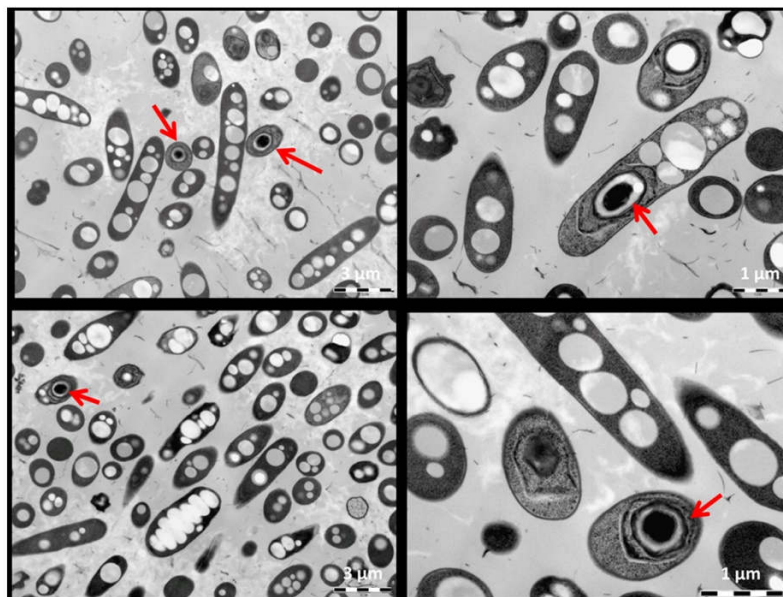
Obr.2 Transmisní elektronový mikroskopický (TEM) snímek buněk *Cupriavidus necator* H16 (Sedlacek a kol., 2019a).

2.1.4.2 Rod *Bacillus*

Grampozitivní rod *Bacillus* patří k významným producentům PHA, kdy už roku 1926 profesor Lemoigne objevil P3HB v bakteriálním kmeni *Bacillus megaterium*. Druhy rodu *Bacillus* jsou široce využívány i pro svoji genetickou stabilitu, kdy absence vnějších alkalických proteáz umožňuje produkci intaktních proteinů různými plasmidy (Vary a kol., 2007). Také je známo, že některé druhy *Bacillus* jsou schopné vysoké produkce a akumulace PHA (až 90 % PHA v biomase), kdy nepřítomnost vnější membránové vrstvy s lipopolysacharidy, která se vyskytuje u gramnegativních mikroorganismů, usnadňuje extrakci PHA. Kromě vyšší rychlosti růstu a schopnosti produkce kopolymerů PHA, rod *Bacillus* disponuje celou řadou hydrolytických enzymů, které napomáhají využití například zemědělských odpadů jako možných substrátů pro výrobu PHA, a tak snižují jeho poněkud drahou produkci v porovnání s konvenčními plasty (Mohapatra a kol., 2017). Nicméně využití druhů *Bacillus* pro produkci PHA skýtá velkou nevýhodu, a to je sporulace, která je důvodem nízké produkce P3HB, kdy tvorba spor a produkce PHA jsou vzájemně propojeny skrze podmínky podobné nutričnímu stresu. Tato nesnáze může být obejitá změnou pH či zabráněním nutričnímu stresu v závislosti na použití konkrétního kmene rodu *Bacillus* (Rodríguez-Contreras a kol., 2013).

Mezi méně známé producenty rodu *Bacillus* patří nově izolovaný kmen *Aneurinibacillus* sp. H1, který se řadí mezi slibné mírně termofilní producenty PHA (viz obr. 3): Jedná se o grampozitivní bakterii schopnou biosyntézy PHA, kdy zastoupení jednotlivých typů monomerních jednotek závisí na použitých substrátech. Bakteriální kmen *Aneurinibacillus* sp. H1 je specifický především pro svoji schopnost syntetizovat vysoké frakce 4-hydroxybutyrátu (4HB) a 3-hydroxyvalerátu (3HV) v kombinaci s 3HB. Vlastnosti těchto kopolymerů se výrazně liší od scl-PHA homopolymerů a otevírá tak širokou škálu možností, jak tyto materiály komerčně využít. Mezi další výhody využití *Aneurinibacillus* sp. H1 pro produkci PHA je teplotní optimum růstu bakterií, kdy 45–50 °C zabraňuje výraznější mikrobiální kontaminaci v průběhu biotechnologické produkce i bez přísného dodržování aseptičtí procesů. Jelikož se jedná o druh blízce příbuzný rodu *Bacillus*, tak i u tohoto kmene se projevuje mírná sporulace,

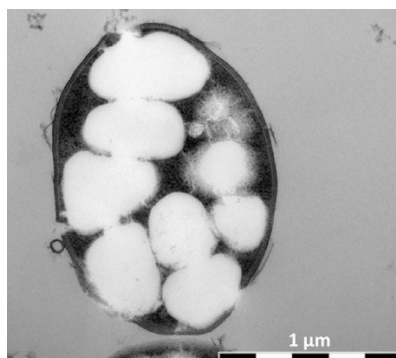
kteřou lze vidět na obr. 3, kde jsou spóry označeny červenými šipkami (Pernicova a kol., 2020; Sedlacek a kol., 2020).



Obr.3 TEM snímek buněk *Aneurinibacillus* sp. H1 (Pernicova a kol., 2020).

2.1.4.3 *Halomonas halophila*

Halomonas halophila dříve známá jako *Deleya halophila*, patří mezi gramnegativní, striktně aerobní nesporulující extremofilní bakterie, konkrétně mezi mírné halofily s optimální koncentrací chloridu sodného 7,5 % (hm./obj.). Tento kmen byl původně vyizolován v blízkosti Alicante ve Španělsku (Kucera a kol., 2018; Quesada a Proteose, 1984). *Halomonas halophila* je schopna akumulovat PHB až do 82 % suché hmotnosti buněk, kdy na rozdíl od mnoha jiných halofilů bakterie nevyžaduje drahé komplexní složky média. Další výhoda tohoto kmene vyplívá ze skutečnosti, že koncentrace NaCl v kultivačním médiu ovlivňuje nejen výtěžek PHB, ale i molekulovou hmotnost a polydisperzitu polymeru, což je možné technologicky využít k řízení vlastností získaného polymeru. Rovněž škála využitelných substrátů je z biotechnologického hlediska velmi zajímavá, jelikož bakterie je schopna metabolizovat různé sacharidy včetně cukrů nacházejících se v lignocelulózách a jiných levných substrátech (Kucera a kol., 2018).



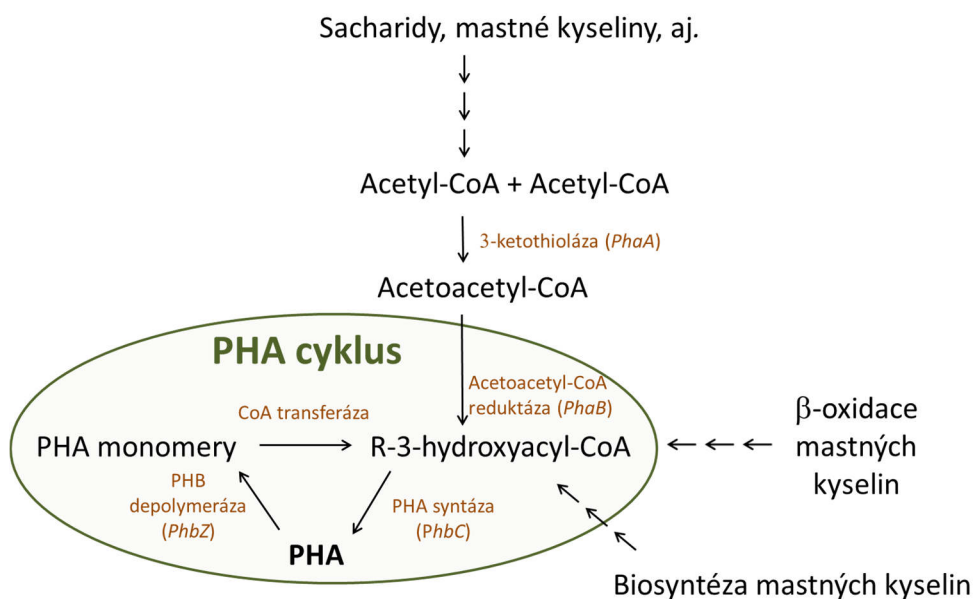
Obr.4 TEM snímek bakteriálních buněk *Halomonas halophila* (Sedlacek a kol., 2019a).

2.2 Metabolismus a regulace PHA

Struktura PHA je přímo závislá na druhu substrátu určujícího dráhu biosyntézy PHA, která bude tvořit specifické monomerní jednotky pro tuto dráhu, a tak i samotnou strukturu PHA. Substráty vhodné jako zdroje uhlíku mohou být rozděleny na strukturně podobné (mastné kyseliny, alkoholy) a substráty, které nijak svojí strukturou nesouvisejí se strukturou PHA (glukóza), přičemž nedílnou součástí metabolických drah PHA jsou regulační mechanismy (Chen a kol., 2015; Kessler a Witholt, 2001).

2.2.1 PHA cyklus

V rámci PHA metabolismu, biosyntéza a degradace PHA jsou navzájem úzce propojeny, které probíhají současně. I za příznivých podmínek, jako je například nadbytek zdroje uhlíku, jsou PHA depolymerázy aktivní a dochází k současné syntéze a degradaci polymeru, i když syntéza je výrazně významnější. Z tohoto důvodu se PHA metabolismus často nahrazuje pojmem PHA cyklus (viz obr. 5) pro zdůraznění svého cyklického charakteru (Kadouri a kol., 2005). Důsledkem tohoto metabolismu je vysoký intracelulární pool PHA monomerních jednotek v PHA akumulujících buňkách. Jelikož jsou monomery PHA, především pak 3HB, považovány za chemické chaperony chránící proteiny a další biomolekuly vůči řadě stresových faktorů, je vysoký intracelulární pool monomerů fyziologicky velice důležitý faktor (Obruca a kol. 2016a).

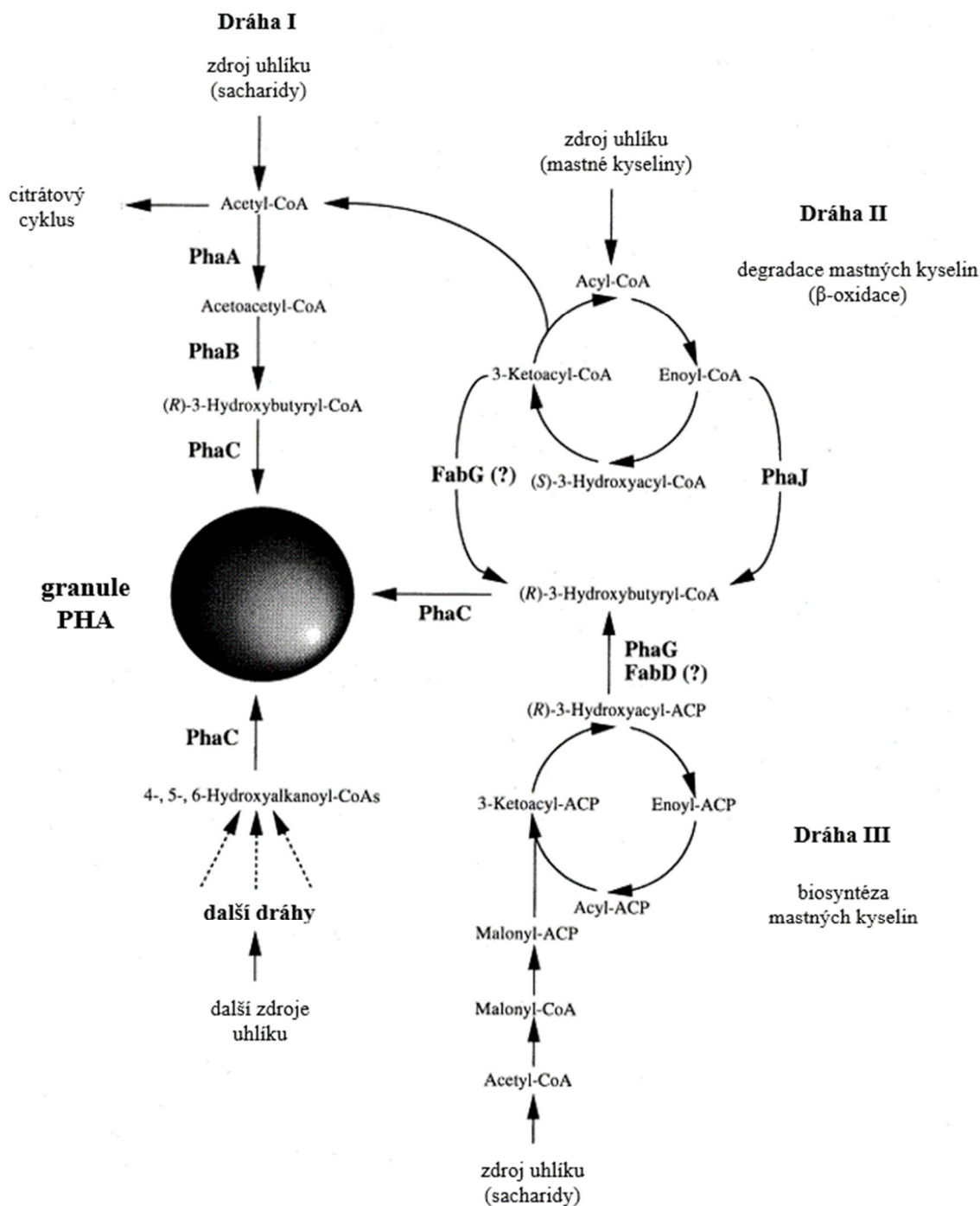


Obr.5 Metabolismus a cyklus PHA (Obruca a kol., 2020).

2.2.1.1 Biosyntéza PHA

Biosyntéza PHA patří k dobře prozkoumaným metabolickým drahám, je rozdělena do tří hlavních drah v závislosti na povaze uhlíkatého zdroje (viz obr. 6). Pro syntézu scl-PHA je specifická první dráha odpovídající produkci PHB u modelového mikroorganismu *Cupriavidus necator* H16, zatímco druhou metabolickou dráhu vedoucí k syntéze mcl-PHA zastupuje modelové mikroorganismy rod *Pseudomonas*. Poslední metabolická dráha vede také k syntéze mcl-PHA, kdy meziprodukty biosyntézy mastných kyselin se stanou prekuzory

pro biosyntézu mcl-PHA (Sudesh a kol., 2000). Tyto metabolické dráhy mohou být dále rozděleny do dalších minimálně 12 drah různých typů PHA. Všechny tyto dráhy jsou propojeny buď s nativními, nebo uměle vytvořenými metabolickými drahami, které společně vytváří různorodé PHA (Chen a kol., 2015).



Obr. 6: Schéma metabolických drah PHA (PhaA, β -ketothioláza; PhaB, NADPH-dependentní 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) (Sudesh a kol., 2000).

Jak už bylo zmíněno výše, za představitele první skupiny (scl-PHA) se nejčastěji uvádí metabolická dráha bakteriálního kmene *Cupriavidus necator* H16, který syntetizuje P3HB tříkrokovou enzymaticky katalyzovanou reakcí počínaje z acetyl-CoA. Nejprve dochází ke kondenzaci dvou molekul acetyl-CoA katalyzované pomocí 3-ketothiolázy (PhaA) na acetoacetyl-CoA. Tento produkt je poté stereoselektivně redukován NADPH-dependentní acetoacetyl-CoA reduktázou (PhaB) na (*R*)-3-hydroxybutyryl-CoA. Posledním krokem syntézy PHB, je samotná polymerizace (*R*)-3-hydroxybutyryl-CoA monomerů prostřednictvím enzymu PHA syntázy (PhaC) (viz obr. 6, dráha I). Až na drobné výjimky, například u bakteriálního kmene *Rhodospirillum rubrum*, kdy je (*S*)-3-hydroxybutyryl-CoA generován a převeden na (*R*) formu za přítomnosti dvou stereospecifických enoyl-CoA hydratáz (Kessler a Witholt, 2002). Jak už bylo několikrát zmíněno, zdroj uhlíku zásadně ovlivňuje produkci určitého typu PHA, který bude syntetizován daným bakteriálním kmenem. Jestliže se jako substrát použije směs substrátu glukózy a kyseliny propionové či jiný prekursor 3-hydroxyvalerátu, prochází tyto zdroje uhlíku podobnou metabolickou dráhou odpovídající dráze syntézy P3HB. Tudíž kondenzací propionyl-CoA a acetyl-CoA vzniká 3-ketovaleryl-CoA, který je následně redukován na 3-hydroxyvaleryl-CoA a následně PHA syntázou inkorporován do struktury polymeru, přičemž vzniká kopolymer P(3HB-*co*-3HV) (Kessler a Witholt, 2002; K. Sudesh a kol., 2000).

Oproti scl-PHA, mcl-PHA jsou prioritně syntetizovány z meziproductů metabolismu mastných kyselin. Při degradaci mastných kyselin se musí potřebný meziprodukt nejprve transformovat na konfiguraci *R*, konkrétně se jedná o přeměnu (*S*)-3-hydroxyacyl-CoA na (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA za přítomnosti enzymu (*R*)-enoyl-CoA hydratázy (viz obr. 6, dráha II). Jestliže dojde k oxidaci zdroje uhlíku prostřednictvím β -oxidace, enoyl-CoA bude enzymaticky katalyzován PhaJ (enoyl-CoA hydratázou) na (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA. Tento produkt je poté přímým prekurzorem PHA syntézy a substrátem pro PHA syntázu PhaC. Naopak při biosyntéze mastných kyselin je zdroj uhlíku ve formě jednoduchých sloučenin oxidován na acetyl-CoA (viz obr. 6, dráha III). Meziproducty oxidace mají roli prekurzorů biosyntézy mcl-PHA, které jsou včleněny do metabolické dráhy PHA za přítomnosti (*R*)-3-hydroxyacyl-ACP-CoA transferázy neboli PhaG pomocí příslušného thioesteru ACP (acyl carrier protein), kdy (*R*)-3-hydroxyacylová část je přenesena na CoA (Rehm, 2006; Sudesh a kol., 2000).

2.2.1.2 PHA syntázy

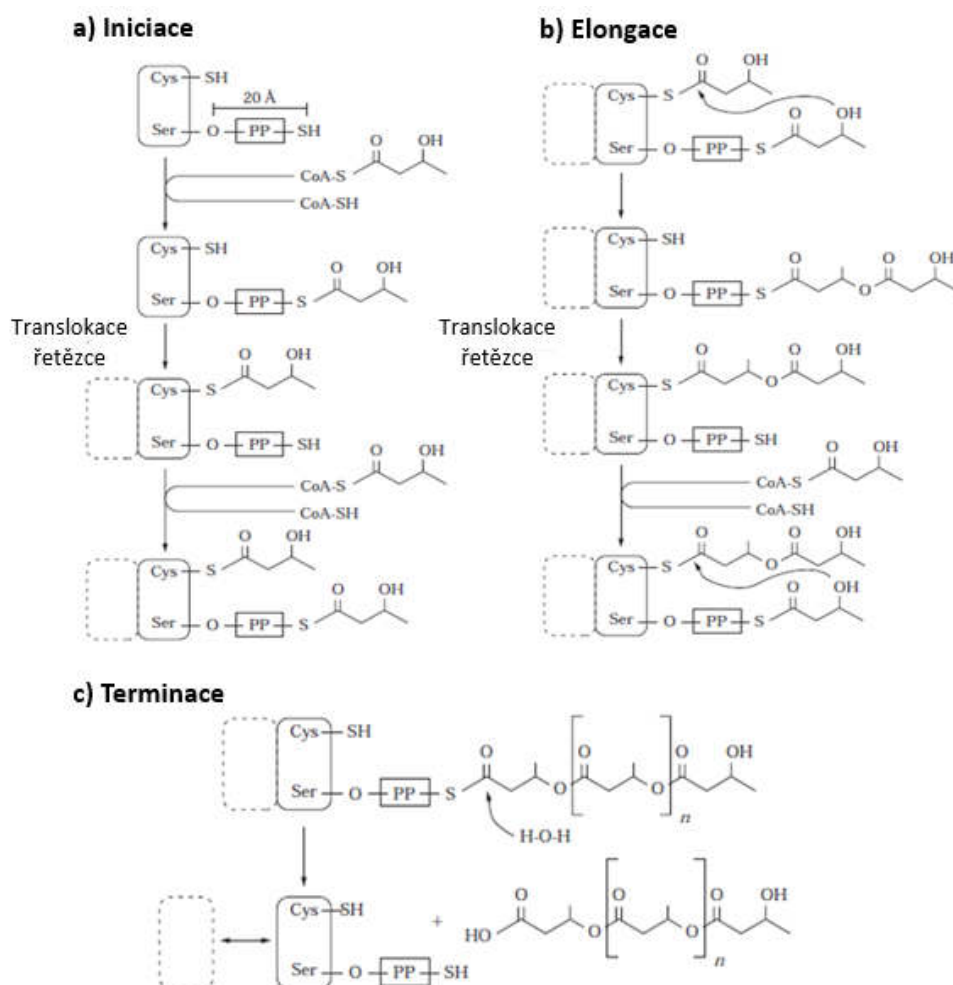
PHA syntázy patří ke klíčovým enzymům PHA biosyntézy (viz obr. 6), jedná se o velice rozmanitou skupinu enzymů. Na základě primární struktury je známo více než 59 různých PHA syntáz, které jsou rozděleny do 4 tříd s ohledem na povahu substrátu a podjednotky bílkoviny, jak můžete vidět v tabulce 3 (Rehm, 2003).

Tabulka 3: Charakteristika PHA syntáz (Rehm, 2003).

Třída	Podjednotky	Bakteriální kmen	Substráty
I.	PhaC (60–73 kDa)	<i>C. necator</i>	3HA _{SCL} -CoA, 4HA _{SCL} -CoA, 5HA _{SCL} -CoA, 3MA _{SCL} -CoA
II.	PhaC1, PhaC2 (60–65 kDa)	<i>P. aeruginosa</i>	3HA _{MCL} -CoA
III.	PhaC, PhaE (40 kDa, 40 kDa)	<i>A. vinosum</i>	3HA _{SCL} -CoA, 3HA _{MCL} -CoA, 4HA _{SCL} -CoA, 5HA _{SCL} -CoA,
IV.	PhaC, PhaR (40, 22 kDa)	<i>B. megaterium</i>	3HA _{SCL} -CoA

PHA syntázy třídy I a II tvoří jeden typ podjednotky, liší se ale od sebe substrátovou specificitou. Zatímco syntázy třídy I (*Cupriavidus necator* H16) preferují monomery o délce řetězce 3 až 5 atomů uhlíku, PHA syntázy třídy II (*Pseudomonas aeruginosa*) preferují délku monomerů 6 až 14 atomů uhlíku. Na rozdíl od syntáz I. a II. třídy, jsou syntázy III. (*Allochromatin vinosum*) a IV. třídy (*Bacillus megaterium*) tvořeny dvěma různými podjednotkami, kdy jedna z podjednotek syntázy třídy III se částečně podobá jednotce PhaC I. a II. třídy, alele druhá podjednotka PhaE, nemá žádnou shodnost s ostatními skupinami PHA syntáz. Tento typ syntáz též preferuje monomerní jednotky o délce 3 až 5 atomů uhlíku, ale v některých případech dovedou syntetizovat i mcl-PHA. Třída IV svým složením připomíná třídu III PHA syntáz s tím rozdílem, že podjednotka PhaE je nahrazena podjednotkou PhaR a jsou PHA syntázy IV třídy jsou výhradně zaměřeny na scl-PHA (Rehm, 2003; Sudesh a kol., 2000).

Model mechanismu polymerizace není stále jednoznačně popsán, v současné době je několik modelů, které nabízí hned několik možných reakčních mechanismů. Jeden z předpokládaných mechanismů polymerizace prostřednictvím PHA syntázy byl popsán u bakteriálního kmene *Cupriavidus necator* H16, jedná se tudíž o syntázu třídy I, kdy samotná polymerizace je rozdělena do tří částí: iniciace, elongace a terminace. Tento model je založen na podobnosti s velmi dobře prozkoumanou syntézou mastných kyselin. V mechanismu polymerizace prostřednictvím PHB syntázy hrají důležitou roli cystein a serin posttranslačně modifikovaný 4'-fosfopantothénovou prostetickou skupinou (PP), jelikož samotný proces polymerizace je závislý na přítomnosti dvou thiolových skupin (viz obr. 7) (Kessler a Witholt, 2002).



Obr. 7: Hypotetický model mechanismu polymerizace PHA syntázy (Kessler a Witholt, 2002).

Nejprve je 3-hydroxybutyryl-CoA přenesen PP na thiolovou skupinu modifikovaného serinu za uvolnění koenzymu A. Předpokládá se, že v dalším kroku dochází k transferu již navázaného 3-hydroxybutyrátu na thiolovou skupinu cysteinu a právě díky tomuto posunu dochází k dimerizaci syntáz, zatímco druhá 3-hydroxyacylová skupina je přenesena k thiolové skupině modifikovaného serinu pomocí PP za uvolnění dalšího koenzymu A. Během elongace řetězce se druhá 3-hydroxyacylová skupina přidá k thiolové skupině prvního monomeru navázaného na cysteinu v místě thiolesterové vazby za vzniku kovalentně vázaného dimeru/oligomeru. K ukončení elongace řetězce dochází hydrolytickým štěpením za přítomnosti molekuly vody během přenosu řetězce, díky čemuž se polymer odpojuje od enzymu. Nicméně tento model nepočítá s translokací polymerního řetězce z posttranslačně modifikovaného serinu na thiolovou skupinu cysteinu druhé jednotky, jak je tomu v případě *de novo* syntézy mastných kyselin (Kessler a Witholt, 2002).

2.2.1.3 Biodegradace PHA

Jak už bylo zmíněno v podkapitole 2.1.1, PHA patří mezi biodegradovatelné polymery. Tento ve vodě nerozpustný biopolymer je štěpen prostřednictvím enzymatické hydrolýzy esterové vazby na ve vodě rozpustné monomery/oligomery, které mohou být dále metabolizovány řadou mikroorganismů (Jendrosseck a Handrick, 2002; Sudesh a kol., 2000). PHA degradace se uskutečňuje v první řadě pomocí mikroorganismů produkujících intracelulární a extracelulární

depolymerázy, které se liší jak svojí molekulární strukturou, tak především svou substrátovou specifitou v závislosti na stavu PHA. Tyto karboxylesterázy spadají do skupiny α/β -hydroláz, kdy intracelulární PHA depolymeráza (i-PHA depolymeráza) je schopna aktivně hydrolyzovat amorfni neboli nativní PHA granule (nPHA). Zato extracelulární PHA depolymeráza (e-PHA depolymeráza) je schopna enzymaticky rozložit pouze krystalické PHA, často označované jako denaturované PHA (dPHA), které bylo uvolněno do prostředí následkem lyze buněk schopných akumulace PHA (Jendrosseck, 2007). Nicméně byla zjištěna výjimka, která nespadá do klasifikace depolymeráz dle formy PHA, a tou je extracelulární depolymeráza (PhaZ7) produkovaná bakterií *Paucimonas lemoignei*, která odbourává pouze nativní PHA granule (Handrick a kol., 2001). Další výjimku představuje depolymeráza (PhaZ1) bakterie *Rhodospirillum rubrum* lokalizována v periplazmatickém prostoru buněk, která se na jednu stranu velmi podobá sekvencí katalytické domény e-PHA depolymeráz, na druhou stranu je tato PhaZ1 aktivní vůči nPHB a jeho oligomerním jednotkám. Není úplně jasné opodstatnění výskytu depolymerázy v periplazmatickém prostoru, předpokládá se ale, že tato depolymeráza reprezentuje nový typ PHB depolymeráz (Handrick a kol., 2004).

Rychlost degradace PHA je rovněž ovlivněna podmínkami prostředí, jako je teplota, vlhkost, pH aj., z čehož vyplývá i časové rozmezí degradace materiálu v řádů týdnů až let. Při aerobní degradaci PHA vzniká až oxid uhličitý a voda, anaerobně vzniká také methan (Sudesh a kol., 2000).

2.2.1.4 Intracelulární degradace PHA

Jak už bylo nastíněno v kapitole 2.2.1, PHA syntéza a intracelulární degradace probíhá současně, i když rychlost jednotlivých procesů se odvíjí od množství dostupného zdroje uhlíku, energie a dusíku (Ong a kol., 2017). Intracelulární PHA depolymerázy (PhaZ) jsou schopny degradace PHA pouze v nativním amorfním stavu, díky čemuž udržují stálou dostupnost monomerních či oligomerních jednotek PHA. Bylo zjištěno, že v případě bakteriálního kmene *Cupriavidus necator* H16 byla 16,5krát vyšší koncentrace 3HB než u jeho mutantního kmene bez schopnosti syntézy a akumulace PHA (Obruca et al., 2016a). PhaZ lze dále rozdělit dle délky monomerní jednotky na nPHA_{MCL} a nPHA_{SCL} depolymerázy. Až na několik výjimek ve skupině nPHA_{SCL} mají všechny depolymerázy jak intracelulární, tak extracelulární katalytickou triádu (serin-histidin-aspartát) tvořící aktivní místo. U některých α/β -hydroláz bylo potvrzeno začlenění katalytického serinu v tzv. *lipase box* pod sekvencí Gly-Ser-Gly. Mezi další podobnosti mezi PHA depolymerázami a lipázami patří stabilizace přechodné konformace karbonylového uhlíku pomocí histidinu (nekatalytická forma), konkrétně prostřednictvím NH-skupin rovněž v aktivním místě enzymu (oxyaniontová díra) (Flickinger a kol., 2002; Jaeger a kol., 1995; Knoll a kol., 2009). Nicméně u intracelulárních nPHA depolymeráz nebyla potvrzena žádná substrátová vazebná doména. Rovněž *lipase box* se nevyskytuje u všech nPHA_{SCL} depolymeráz, které disponují na druhou stranu katalytickou triádou složenou z cysteinu, histidinu a aspartátu, jak je tomu například u již zmíněné bakterie *Cupriavidus necator* H16 (Behrends a kol., 1996; Knoll a kol., 2009).

Na základě úplné genomové sekvence *Cupriavidus necator* H16 se předpokládá, že tento bakteriální kmen je schopný syntézy až 9 nPHB_{SCL} depolymeráz s oligomerními hydrolázami, kde pět z nich představují PHB depolymerázy (PhaZa1-PhaZa5), 2 oligomerní hydrolázy

(PhaZb a PhaZc) a dva izoenzymy PHB depolymeráz (PhaZd1 a PhaZd2). PhaZa a PhaZd jsou obvykle navázány na nativních granulích a hydrolyzují polymerní řetězce P3HB na oligomerní jednotky 3HB. Zato druhá skupina enzymů, oligomerní hydrolázy PhaZb a PhaZc štěpí v cytoplasmatickém prostoru oligomery 3HB na monomery (Sugiyama a kol., 2004; Uchino a kol., 2008). Mezi další i-nPHA depolymerázu, která byla identifikována, patří PhaZ1. Tato depolymeráza vyskytující se u bakteriálního kmene *Bacillus mageterium* je specifická svojí vysokou afinitou, enzymatickou aktivitou vůči nativním PHA granulím a také schopností hydrolyzovat semi-krystalické PHB na rozdíl od jiných i-PHA_{SCL} depolymeráz (Chen a kol., 2009).

Jsou zkoumány také intracelulární PHA_{MCL} depolymerázy, například i-PHA_{MCL} depolymeráza izolována z bakterie *Pseudomonas putida*. Jedná se o intracelulární enzym navázaný na PHA granulích, který díky inhibičnímu vlivu fenylmethylsulfonylfluoridem (PMFS) či Tritonu X-100 připomíná serinové hydrolázy. PMFS nebo Triton X-100 interagují se serinovými zbytky v aktivním místě enzymu, a tudíž depolymeráza ztrácí svoji aktivitu (Eugenio a kol., 2007).

2.2.1.5 Extracelulární degradace PHA

Extracelulární PHA depolymerázy jsou až na výjimky schopny hydrolyzovat degradovaný krystalický polymer. Ve srovnání s intracelulárními depolymerázami, extracelulární depolymerázy patří k nejlépe probádaným depolymerázám, které jsou dále děleny na dPHA_{SCL} a dPHA_{MCL}. Tyto enzymy jsou charakteristické nízkou molekulovou hmotností (<70 kDa) a vysokou mírou stability v širokém rozmezí pH (optimální pH 7,5–9,8), teplot a iontové síly. Aktivita dPHA_{SCL} depolymeráz je až na výjimky inhibována redukčními činidly a inhibitory serinových hydroláz jako jsou například diisopropyl-fluorofosfát (DFP) nebo acylsulfonylderiváty. Rovněž bylo zjištěno, že většina PHA depolymeráz neinteraguje s pozitivně nabitými iontoměniči (například diethylaminoethyl celulóza) při neutrálním pH na rozdíl od hydrofóbních materiálů. Proto se v purifikačním protokolech hojně využívá chromatografie hydrofóbních interakcí (Jendrossek a Handrick, 2002). Izolované e-PHA depolymerázy se skládají z jediného polypeptidového řetězce s molekulovou hmotností 37–60 kDa, který je tvořen krátkým signálním peptidem (22–58 aminokyselin), N-terminální katalytickou doménou (*lipase box* a oxyaninotová díra), krátkou doménou linkeru a C-terminální nekatalytickou substrátovou vazebnou doménou, kdy v závislosti na poloze *lipase box* vůči oxyaninotové díře jsou rozlišovány dvě katalytické domény. Zatímco u dPHA_{MCL} depolymeráz není známo, zda disponují substrátovou vazebnou doménou, předpokládá se, že funkce C-terminální domény je nahrazena N-terminální katalytickou doménou (Knoll a kol., 2009; Sudesh a kol., 2000).

Mezi zástupce intenzivně zkoumaných bakterií v souvislosti s extracelulárními depolymerázami patří bezesporu bakterie *Paucimonas lemoignei* syntetizující nejméně sedm e-PHA depolymeráz, kdy šest (PhaZ1–PhaZ6) z nich je schopno hydrolyzovat dPHA. Sedmá depolymeráza (PhaZ7), jak už bylo zmíněno výše v podkapitole 2.2.1.3, patří sice do extracelulárních depolymeráz, ale odbourává pouze nPHA. Důvod přítomnosti tolika depolymeráz není ještě zcela objasněn, ale předpokládá se určitá kooperace depolymeráz s odlišnou aktivitou s ohledem na různou délku řetězce molekul v rámci hydrolýzy P3HB. Oproti většině dPHA depolymeráz, jsou dPHA depolymerázy *P. lemoignei* glykosylované, kdy

mechanismus glykosylace není znám. Význam glykosylace je přisuzován vyšší odolnosti vůči vyšší teplotě a hydrolytickému štěpení proteázami konkurenčních mikroorganismů, neboť přítomnost sacharidů není nezbytná pro samotnou aktivitu depolymeráz, jak bylo ověřeno u rekombinantních kmenů *Escherichia coli* a *Bacillus subtilis* (Briese a kol., 1994; Jendrossek a kol., 1995). Na druhé straně o dPHA_{MCL} toho tolik známo není. Je prokázána vysoká specifita dPHA depolymeráz na délku monomerní jednotky řetězce PHA, kdy u bakteriálního kmene *Streptomyces exfoliatus* K10 byla zjištěna schopnost degradace jak dP3HB, tak dPHO, i když disponuje pouze dP3HB depolymerázou specifickou pro dPHA_{SCL}, což naznačuje výskyt nejméně jedné další depolymerázy se specifitou pro dPHA_{MCL} (Klingbeil a kol., 1996). S podobnými výsledky vyšla aktivita dP3HB depolymerázy bakterie *Alcaligenes faecalis*, která nebyla schopna hydrolýzy esterových vazeb mezi kopolymerem P(3HB-co-3HHx) (Doi a kol., 1995). V rámci degradace dPHA bylo zjištěno, že několik lipáz je schopno hydrolyzovat esterové vazby PHA, jestliže se polymer skládá z ω -hydroxyalkanových kyselin (Jaeger a kol., 1995). S ohledem na podobnost dPHA depolymeráz s lipázami byla testována katalytická reakce PHB depolymeráz z *Pseudomonas lemoignei* v organických rozpouštědlech, kde byla za nepřítomnosti vody prokázána reverzní reakce, konkrétně syntéza esterů či transesterifikace (Kumar a kol., 2000).

2.2.2 Regulace metabolismu PHA

Regulační mechanismy jsou nedílnou součástí metabolických drah PHA, ať už z hlediska syntézy či degradace. Regulační procesy lze rozdělit dle úrovně, kde se odehrávají, konkrétně na regulaci prostřednictvím nutričních podmínek, regulaci na enzymatické úrovni a na regulaci PHA metabolismu na úrovni genové exprese.

2.2.2.1 Nutriční podmínky

Závislost syntézy PHA na kultivačních podmínkách bylo objeveno už v roce 1958 u nesporeujícího kmene *B. megaterium*. V dnešní době už je prokázána přímá závislost mezi účinností syntézy PHA při nadbytku uhlíku a zároveň nedostatku esenciálních prvků jako například dusíku, síry, hořčíku, fosforu nebo kyslíku potřebných pro buněčné dělení. Rovněž byl potvrzen i pozitivní vliv poměru množství mezi dusíkem a uhlíkem, kdy s větším poměrem ve prospěch uhlíku se zvýšilo i množství naakumulovaného PHA (Merrick a Doudoroff, 1964).

2.2.2.2 Regulace na enzymatické úrovni

Regulace na enzymatické úrovni se týká jak aktivace, tak inhibice PHA metabolických enzymů či jejich kombinace. Klíčové regulační body byly podrobně popsány u syntetické dráhy PHA bakteriálního kmene *Cupriavidus necator* H16 jako modelového organismu. Jedním z hlavních faktorů je intracelulární koncentrace acetyl-CoA a volného koenzymu A, které ovlivňují ve velké míře aktivitu enzymu 3-ketothiolázu, která katalyzuje první krok syntézy PHA. Rovněž vysoká koncentrace NAD(P)H a vysoké poměry NAD(P)H/NAD(P)⁺ mají významný vliv na syntézu PHA, kdy vysoká koncentrace již zmíněných koenzymů inhibuje citrátový cyklus, konkrétně dochází k inhibici citrát syntázy a citrát dehydrogenázy, čímž je posílen tok acetyl-CoA do syntézy PHB namísto citrátového cyklu (Kessler a Witholt, 2001). Tento typ regulace byl následně experimentálně potvrzen pomocí mutantního kmene *C. necator* H16 s narušenou isocitrát dehydrogenázou, díky čemuž výrazně klesla aktivita citrátového cyklu a zvýšila se

rychlost syntézy PHA. Právě aktivita enzymů 3-ketothiolázy a acetoacetyl-CoA reduktázy udává rychlost PHA syntézy, přičemž obsah PHB je řízen PHA syntázou (Jung a kol., 2000).

2.2.2.3 Regulace PHA metabolismu na úrovni genové exprese

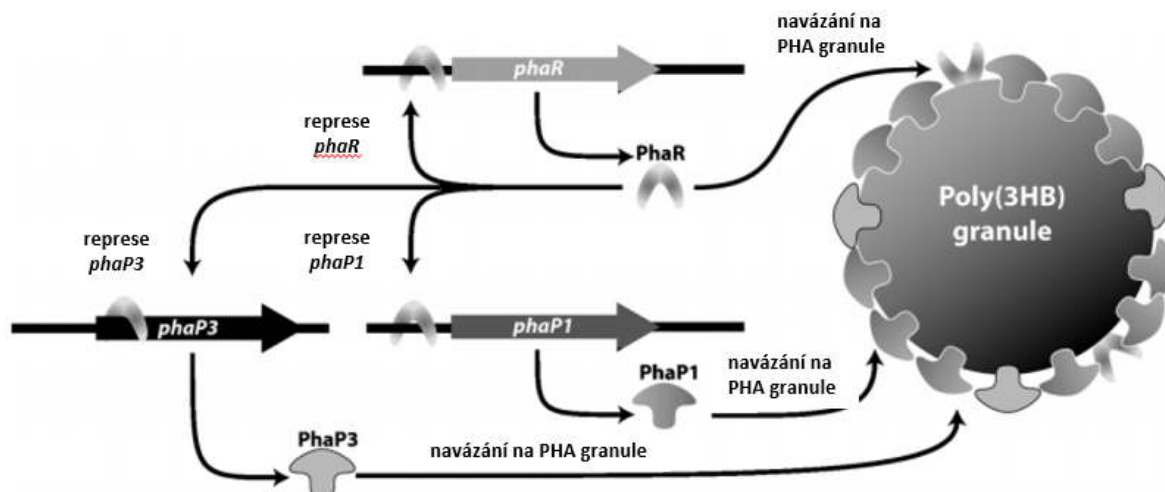
Regulace také probíhá na úrovni genové exprese, kde je zapojená celá řada regulačních proteinů v rámci regulace transkripce. Například regulační protein LuxR, který je znám kontrolou nad bioluminiscencí a nad PHA syntézou u bakteriálního kmene *Vibrio harvey*. Tento protein je aktivován vysokou koncentrací N-acylhomoserin-laktonu působícího jako autoinduktor ve stacionární fázi buněk. Naproti tomu mutantní kmen *Vibrio harvey* bez schopnosti exprese proteinu LuxR ztratil schopnost akumulace PHB (Miyamoto a kol., 1998).

Většina faktorů ovlivňující regulační mechanismy probíhající na transkripční úrovni byly pozorovány a popsány na příkladu bakteriálního rodu *Pseudomonas*. Například transkripční regulátor PhbR_{PS} u bakteriálního kmene *Pseudomonas* sp. 61-3, který je schopen jak syntézy homopolymeru PHB, tak náhodného kopolymeru obsahující monomerní jednotky o 4 až 12 atomů uhlíku. Přitom PhbR_{PS} je zapojený pouze v expresi genů, které jsou nezbytné pro syntézu homopolymeru PHB. Zajímavá je nezávislost transkripce genů *phb*_{PS} v rekombinantním mutantu *C. necator* H16 neprodukujícím PHB na genu kódujícím regulátor PhaR_{PS}, což naznačuje buď další funkční promotoru na horním konci kódující sekvence nebo regulátor *C. necator* H16, který může daný regulátor PhaR_{PS} nahradit (Matsusaki a kol., 1998). Jedním z dalších příkladů regulátorů je PhaS identifikovaný v *P. putida* KT2442, který ve své primární struktuře vykazuje homologii s částí senzoru u dvousložkového regulačního systému obsahující histidin-protein kinázu a regulační doménu (Madison a Huisman, 1999). Na základě těchto dat byla u bakterie *Azotobacter vinelandii* popsána GacS transmembránová sensorická kináza, která se svojí nukleotidovou sekvencí velmi podobá regulačnímu proteinu PhaS. Bylo potvrzeno, že tato transmembránová sensorická kináza GacS reguluje jak produkci alginátu, tak samotnou syntézu PHB (Castañeda a kol., 2000).

U bakteriálního kmene *Pseudomonas aeruginosa* PHA akumulace závisí na přítomnosti alternativního σ faktoru RpoN patřící do skupiny RNA polymeráz. K inhibici akumulace PHA dochází tedy pouze za nepřítomnosti RpoN, jestliže jsou buňky kultivovány na mastných kyselinách. Obecně se RpoN podílí na růstové fázi v závislosti na aktivaci *non-housekeeping* promotorů. Avšak stále není jasná podstata tohoto σ faktoru pro biosyntézu PHB z sacharidů prostřednictvím *de novo* syntézy mastných kyselin a nikoli skrz β -oxidaci mastných kyselin (Timm a Steinbüchel, 1992). Avšak RpoN není jediný σ faktor, který reguluje akumulaci PHA. Bylo zjištěno, že σ faktor RpoS u bakterie *Pseudomonas putida* řídí nejen expresi několika genů podílejících se na přežití za nepříznivých podmínek, ale také figuruje v regulaci genů kódujících PHA syntázu (*phaC*) a PHA depolymerázu (*phaZ*). Narozdíl od nepřítomnosti inhibitoru akumulace PHA RpoN, zvýšená exprese *phaC* a *phaZ* genů u mutantních kmenů naopak způsobila nižší obsah PHA v buňkách (Raiger-Iustman a Ruiz, 2008).

Mezi další důležité transkripční regulátory jsou PhaR (*phaR*), které ovlivňuje transkripci pomocí represe určitého úseku DNA, konkrétně oblast (*phaC-phaP* a *phaP-phaR*), která je zodpovědná za expresi phasinů (PhaP) a biosyntézu PHA (viz obr. 8). Jakmile nastanou nepříznivé podmínky pro syntézu PHA, PhaR se specificky naváže na *phaP* promotorovou

oblast, čímž dojde k inhibici transkripce PhaC. Tato inhibice trvá až do doby, dokud nenastanou příhodnější podmínky pro produkci PHA, kdy dochází k formaci granulí a PhaR se začne vázat na jejich povrch. Jedná se o nespecifickou vazbu založenou na hydrofobicitě povrchu granulí. Následně dojde k poklesu koncentrace PhaR v cytoplazmě a započne syntéza PhaP, které se hned váže na PHA granule. Jakmile granule dosáhne své maximální velikosti a její povrch je z většiny pokryt PhaP, PhaR je vytlačen zpět do cytoplazmy, čímž se tyto regulační proteiny naváží opět na příslušnou sekvenci DNA a dochází k represi transkripce *phaR* a *phaP*. Tímto regulačním mechanismem neboli autoregulací se tak buňka chrání před zbytečnou syntézou PHA, a tudíž i plýtváním energií (Grage a kol., 2009; Pötter a kol., 2002; York a kol., 2002).



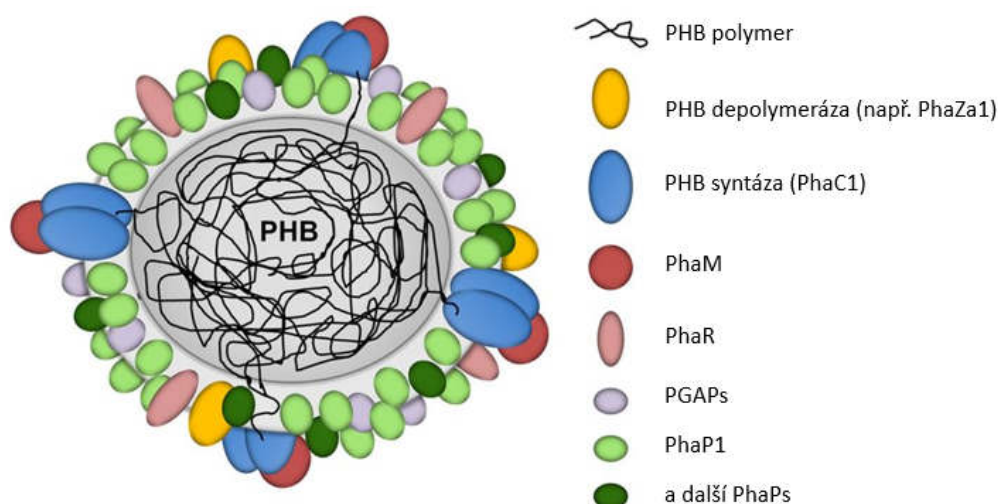
Obr. 8: Regulace na úrovni transkripce (Pötter a kol., 2005).

2.3 Fyziologie a biofyzikální vlastnosti PHA granulí

Jelikož intracelulární granule představují velký podíl bakteriálních buněk (až 90 % hmotnosti suché biomasy, maximálně cca 40 objemových % buňky), výrazně tak ovlivňují jejich fyzikálně chemické vlastnosti (Mravec et al., 2016).

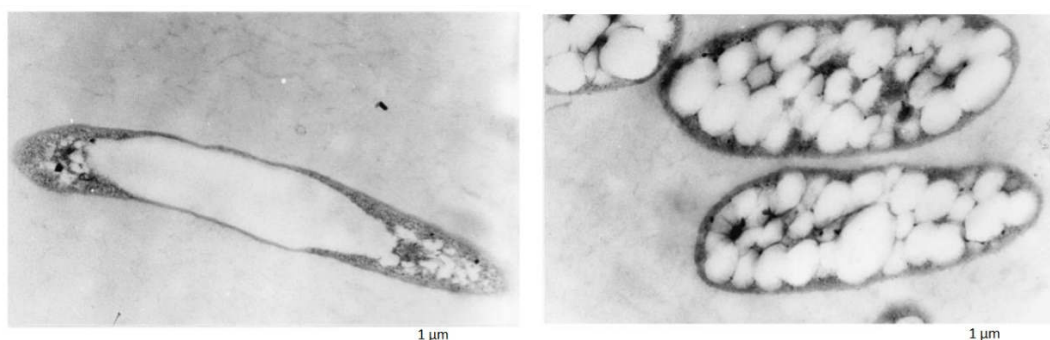
2.3.1 Struktura PHA granulí

Jak už bylo naznačeno v podkapitole 2.1.1, intracelulární PHA jsou akumulovány různými mikroorganismy ve formě amorfních granulí sférického tvaru tvořené hydrofobním PHA polymerním jádrem obklopeným vnější proteinovou vrstvou (tzv. strukturní PHA proteiny), která neobsahuje *in vivo* žádné fosfolipidy, jak bylo v nedávné době dokázáno u bakterie *Cupriavidus necator* H16 (viz obr. 9). Takto strukturované supramolekulární komplexy neboli karbonosomy dosahují velikostí 0,2 až 0,5 μm v průměru (Bresan a kol., 2016).



Obr. 9: Struktura PHA granule (Bresan a kol., 2016).

Doposud bylo identifikováno na devatenáct proteinů na povrchu PHB granulí u bakteriálního kmene *C. necator* H16: PHB syntáza (PhaC), sedm PHB depolymeráz (PhaZ1-PhaZ5, PhaZd1 a PhaZd2), dvě oligomerní hydrolázy PHB (PhaZb a PhaZc), sedm phasinů (PhaP1-PhaP7) a dva DNA a PHB vazné proteiny (PhaR a PhaM), přičemž phasiny pokrývají většinu povrchu PHB granulí (Jendrosseck a Pfeiffer, 2014). Jedná se o proteiny amfifilního charakteru s malou molekulovou hmotností (14–28 kDa) obsahující strukturní motiv leucinového zipu v sekvenci aminokyselin podporující domnělou oligomerizaci jako mechanismus formace těchto polypeptidů (Maestro a Sanz, 2017; Pötter a kol., 2005). Obecně phasiny hrají klíčovou roli nejen ve stabilizaci PHA granulí, ale také v samotné regulaci syntézy, distribuci během buněčného dělení a degradaci PHA granulí, důsledkem čehož je různá velikost a počet PHA granulí (Mezzina a Pettinari, 2016). Konkrétně u *Cupriavidus necator* H16 je povrch PHB granulí tvořen 27 až 54 % PhaP1, čímž dosahuje až 5 % celkové proteinové složky v buňce (Wieczorek a kol., 1995). Jestliže byla produkce PhaP1 omezena pomocí delece genů PhaP genu, docházelo k vytvoření jedné velké PHB granule v rámci buňky (viz obr. 10 vlevo) na rozdíl rekombinantních kmenů, kde byla naopak zvýšena produkce PhaP1, což vedlo k produkci velkého počtu malých PHB granulí. (viz obr. 10 napravo) (Pötter a kol., 2002; Wieczorek a kol., 1995).



Obr. 10: Mutantní kmeny *Cupriavidus necator* H16 (Bresan a kol., 2016).

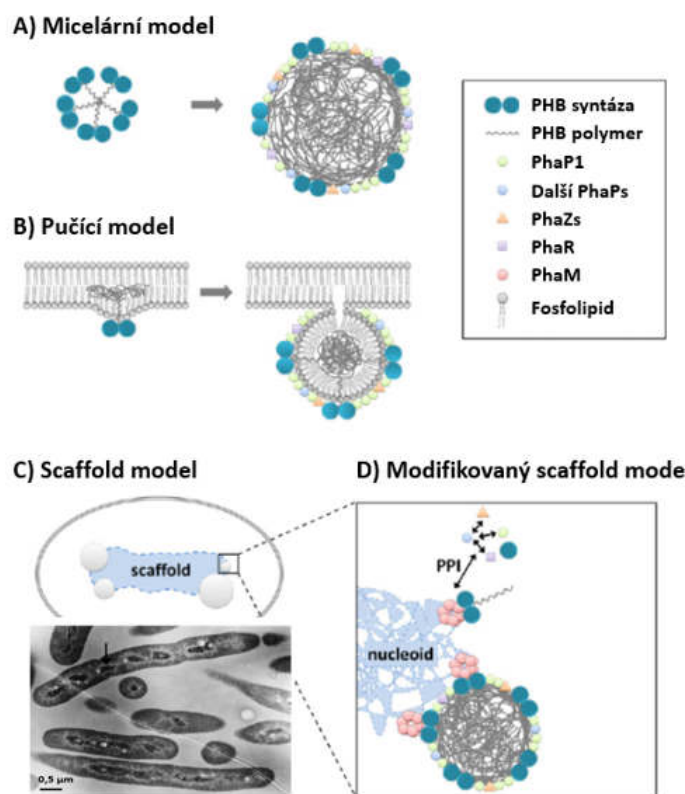
Předpokládá se, že PhaP1 je esenciální nejen pro stabilizaci PHB granulí, ale i pro samotnou degradaci, pro kterou je nezbytný, i když PhaP1 může být do jisté míry nahrazen dalšími typy phasinů (Maestro a Sanz, 2017). Jak už bylo popsáno v podkapitole 2.2.2.3, exprese PhaP1 je striktně regulována pomocí transkripčního regulátoru PhaR. Dále bylo zjištěno, že přídavek čisté formy PhaP1 prodlouží lag fázi syntázy PhaC oproti PhaM, který se váže na granuli PHB přes syntázu PhaC a zároveň je vázán s bakteriální DNA. Díky čemuž PhaM zajišťuje rozdělení PHB granulí z mateřské buňky do dvou dceřiných buněk během dělení. Nicméně bylo potvrzeno, že PhaM (32 kDa) je schopen přepnout neaktivní formu PhaC na aktivní, jejíž podíl byl podstatně vyšší než bez přítomnosti aktivátoru PhaM. Odhaduje se, že jedna molekula PhaM je dostatečná pro aktivaci přibližně 11 molekul PhaC (Cho a kol., 2012; Jendrossek, 2009; Jendrossek a Pfeiffer, 2014). Stejně jako u PhaP1 byla objevena závislost počtu a velikosti granulí PHB na množství PhaM, kdy s delecí genu *phaM* klesá počet granulí PHB až na jednu velkou oproti nadměrné expresi PhaM, kdy se naopak výrazně zvýší počet malých granulí PHB (Wahl a kol., 2012).

Zatímco u druhu *Pseudomonas* jsou mcl-PHA granule pokryty phasiny PhaF a PhaI, PhaC a PhaZ společně s acyl-CoA syntázou (ACS1), kde PhaF se vyskytuje v majoritním zastoupení. Tento phasin je velmi důkladně prozkoumán z hlediska jeho struktury vyznačující se PHA vazebným N-koncem a kladně nabitým C-koncem (histonová doména), který se nespecificky váže k DNA (Maestro a Sanz, 2017). V případě nedostatku PhaF dochází k úbytku celkového obsahu PHA výsledkem špatné segregace granulí do dceřiných buněk (Dinjaski a Prieto, 2013). Rovněž byl potvrzen regulační účinek u exprese genů *phaC1* a *phaI* (Galán a kol., 2011). Phasin PhaI je strukturně velmi podobný PhaF a společně s PhaF je zodpovědný za biosyntézu a akumulaci PHA u bakteriálního kmene *P. putida* KT2442. U bakterií akumulujících kopolymery PHA byly objeveny phasiny vyskytující se u bakterií s scl-PHA metabolismem, tzv. phasiny PhbP, ve formě klastrů (Hokamura a kol., 2015; Matsumoto a kol., 2002).

2.3.2 Mechanismy vzniku PHA granulí

Jelikož se dříve předpokládal výskyt fosfolipidů v povrchové vrstvě PHA granulí, byly první hypotézy, jak se tvoří PHA granule *in vivo*, již vyvráceny (viz obr. 11A, B). Jedná se o tzv. micelární a pučící model, kde první model byl založen na samouspořádání PHA granulí v cytoplazmě prostřednictvím ve vodě rozpustných PHB syntáz. Tyto PHB syntázy začnou syntetizovat hydrofobní polymer P3HB, jestliže koncentrace monomerních jednotek 3HB-CoA v cytoplazmatickém prostoru je dostatečně vysoká. Na základě hydrofobicity se poté řetězce samy formulují do náhodně umístěných micelárních struktur, ke kterým se připojují phasiny s dalšími proteiny. Zato druhý tzv. pučící model vychází z výskytu syntáz PHA v periferní oblasti, konkrétně připojených k plazmatické membráně. Nicméně bylo potvrzeno, že žádné PhaC ani phasiny se na cytoplazmatické membráně nenacházejí (Jendrossek a Pfeiffer, 2014; Singh a Chandel, 2018). Třetí model nazývaný „scaffold“ předpokládá (viz obr. 11C), že PHA granule jsou vytvářeny okolo nespecifikované struktury ve středu buněk, což znamená, že umístění PHA granulí není nahodilý proces. Tento model je založen na snímcích pořízených pomocí TEM, na kterém je šipkou označena neznámá scaffold oblast s PHA granulemi u bakteriálního kmene *Cupriavidus necator* H16, který byl kultivován při limitaci dusíkem (Tian a kol., 2005). Třetí model byl již modifikován na tzv. model buněčných pólů, a to z hlediska

umístění PHA granulí v buňkách, kdy už po 5-10 minutách byly pozorovatelné jedna až dvě P3HB granule, které byly vždy lokalizovány na opačných pólech buňky. Tento jev je přisuzován s největší pravděpodobností PhaM, který se váže jak na PhaC, tak na nukleoid, který by tak plnil funkci scaffoldu (viz obr. 11D) (Beeby a kol., 2012; Xiao a kol., 2015). Zatím ale není žádná hypotéza potvrzena do takové míry, aby se stala teorií obecně vysvětlující vznik intracelulární granule *in vivo*.

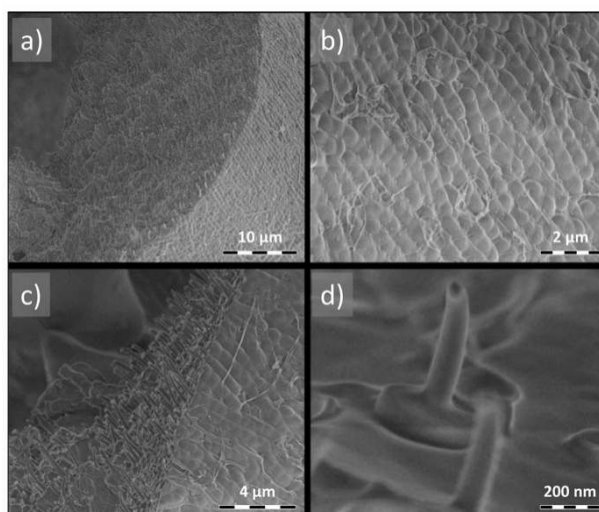


Obr. 11: Modely formování PHA granulí (Jendrossek a Pfeiffer, 2014; Tian a kol., 2005).

2.3.3 Amorfni charakter nativních PHA granulí

Jak bylo řečeno v předcházejících kapitolách, P3HB je ukládáno ve formě intracelulárních granulí v amorfním stavu. Jakmile jsou P3HB granule izolovány, dochází k alespoň částečné ztrátě amorfního charakteru a granule přechází do krystalického stavu s velmi odlišnými vlastnostmi. Amorfni P3HB granule jsou často na základě vlastností přirovnávány k podchlazené vodě, která si zachovává strukturu kapaliny při prudkém snížení rychlosti difúze a nárůstu viskozity. Především díky mechanickým vlastnostem se amorfni P3HB granule liší od ostatních komponent, které se vyskytují v bakteriálních buňkách (Bontrone a kol., 1992). Vliv amorficity P3HB je v současné době velmi zkoumaným tématem, mnohé studie prokázaly spojitost mezi výjimečným charakterem P3HB *in vivo* a protektivními mechanismy vůči různým stresovým faktorům jako je osmotický šok, nízká teplota, aj. (viz podkapitola 2.3.4). K překvapujícím zjištěním patří bezesporu udržení amorfního charakteru intracelulárních PHB granulí i za velmi nízkých teplot ($-140\text{ }^{\circ}\text{C}$), který byl prokázán díky snímkům z cryo-SEM (viz obr. 12) (Sedlacek a kol., 2019b).

Mechanismus uchování amorfního charakteru P3HB granulí *in vivo* namísto termodynamicky výhodnější krystalické formy není zcela objasněn, ačkoli je známo několik teorií, které se snaží vysvětlit nativní charakter intracelulárních P3HB granulí. Jedna z nich je založena na účasti tzv. plastifikátorů (nízkomolekulárních či makromolekulárních látek), ale nebyl prokázán žádný přímý vliv jednotlivých sloučenin. Mezi navrhovanými sloučeninami byla i voda, neboť je součástí nativních granulí, a to až z 10 hmotnostních % (Lauzier, Marchessault, a kol., 1992; Lauzier, Revol, a kol., 1992; Mas a kol., 1985). Předpokládá se, že voda stabilizuje β -konformaci syntetizovaných řetězců PHA uvnitř granulí prostřednictvím vodíkových vazeb, a tudíž znemožní jejich krystalizaci. Tato teorie však nebyla prozatím experimentálně dokázána. Druhá teorie o amorficitě P3HB granulí vychází z kinetického mechanismu, který zohledňuje pokles rychlosti krystalizace z důvodu nižší frekvence spontánních nukleací v tak malém objemu (Bonhronne a kol., 1992; de Koning a Lemstra, 1992). Později byl tento argument experimentálně vyvrácen vytvořením krystalického PHA za použití amorfních granulek o velikosti submikronu (Horowitz a Sanders, 1994). Mezi další stabilizační mechanismy, které mohou hrát důležitou roli v amorficitě PHA granulí, je považována samotná proteinová povrchová vrstva granulí, která chrání granule před případnou koalescencí (Pötter a kol., 2002). V nynější době se čím dál více přiklání ke kombinaci těchto tří modelů, které alespoň částečně vysvětlují mechanismus amorfního charakteru PHB (Obruca a kol., 2017). Nicméně je jasné, že daná problematika amorficity PHA granulí *in vivo* potřebuje více experimentálních dat k objasnění mechanismu její stabilizace.



Obr. 12: Amorfní PHB granule *C. necator* H16 na snímcích cryo-SEM (Sedlacek a kol., 2019b).

2.3.4 Protektivní vlastnosti PHA při stresové odpovědi bakterií

Většina mikroorganismů si vyvinula celou řadou protektivních mechanismů, aby dokázaly čelit různorodým podmínkám prostředí, v němž se vyskytují (dostupnost živin, změny teplot, pH, oxidace či různé koncentrace solí aj.). Schopnost bakterií přežít v některých případech až extrémní podmínky závisí především na rychlosti odezvy regulačních mechanismů a přizpůsobení metabolických drah mikroorganismů (změny v genové expresi, lokace) (Ron, 2013). Jedním z příkladů významných obranných nástrojů je i mimo jiných produkce a

akumulace PHA ve formě intracelulárních granulí, které neslouží pouze jako zdroj energie a uhlíku, ale hrají významnou protektivní roli u mnohých mikroorganismů vůči různým stresům, jak je shrnuto v tab. 4 (Obruca a kol., 2020). Nicméně role nativních PHA granulí je mnohem komplexnější, než by se mohlo zdát, neboť byl prokázán i protektivní efekt monomerních a oligomerních jednotek PHA v bakteriích, jsou přitom často přirovnávány k tzv. kompatibilním látkám, chrání bakterie při nízkých teplotách, osmotickém šoku, oxidačním stresu atd. (da Costa a kol., 1998; Obruca a kol., 2016a; Obruca a kol., 2016b).

2.3.4.1 Teplota

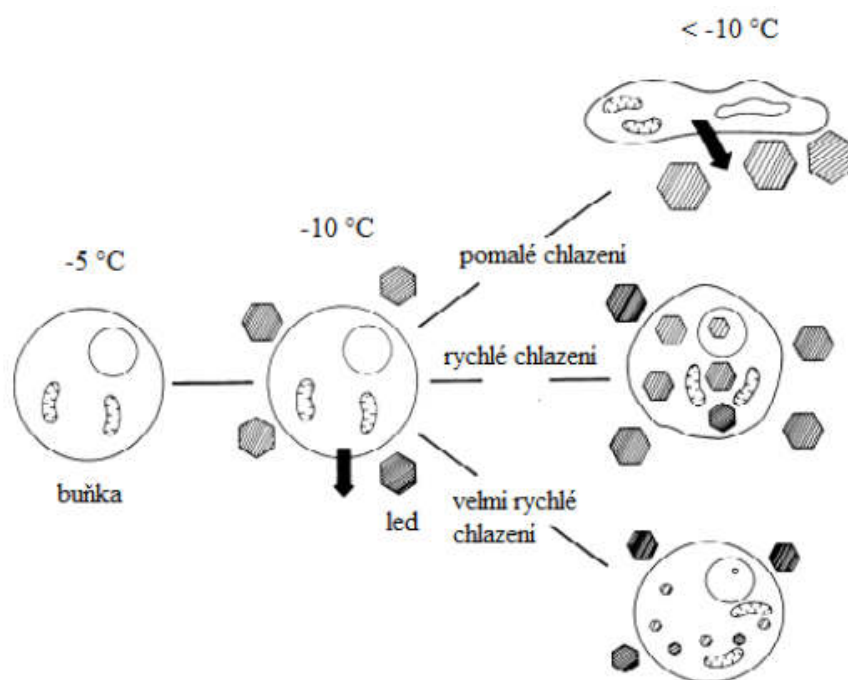
Bakterie schopné produkovat PHA vykazují různě široký rozsah optimálních teplot růstu. Obecně lze mikroorganismy dělit dle vhodné teploty do několika skupin: na psychrofilů (okolo 15 °C), psychrotrofy (20 až 30 °C), mezofily (okolo 37 °C), termofily (okolo 60 °C) a hypertermofily (80 °C a více) (Marles-Wright a Lewis, 2007). Nicméně obecně platí, že při prudkém navýšení teploty nad optimální kultivační teplotu daného mikroorganismu dochází k indukci metabolické odpovědi na tepelný šok (*heat shock response*), kdy dochází ke spuštění exprese proteinů teplotního šoku HSPs (*heat shock proteins*). Tato odezva slouží jako ochranný a zároveň homeostatický buněčný proces, který napomáhá termotoleranci. HSPs hrají důležitou roli v obnovení biologicky aktivní konformace proteinů a degradaci proteinů jak za stresových, tak i za normálních podmínek. HSPs skupina je složena z molekulárních chaperonů (DnaK, GroEL, GroES) a ATP dependentní proteázy (Lon, ClpP) (Ron, 2013).

V případě nízkých teplot mikroorganismy reagují prostřednictvím odpovědi na šok z chladu (*cold shock response*) produkcí specifické skupiny proteinů chladového šoku CSPs (*cold shock proteins*). Mechanismus odezvy mikroorganismů na vliv snížené teploty byl zkoumán na bakteriálním kmenu *Escherichia coli* s optimální růstovou teplotou 37 °C v exponenciální fázi, která byla skokově vystavena snížené teplotě 15 °C. Reakce bakterií na stres se skládá z několika fází. První fáze odpovídá aklimatizaci buněk po dobu 3 až 6 hodin, kdy v tomto intervalu je růst buněk zastaven. Po uplynutí lhůty nastává druhá fáze, kde růst buněk opět započne, ale v pomalejším tempu (Barria a kol., 2013).

Jak bylo zmíněno v předcházející kapitole, výskyt PHA v bakteriích má přímý vliv na jejich přežívání za nízkých teplot. Konkrétně byl tento efekt prokázán u bakteriálního kmene *Pseudomonas* vyskytujícího se v antarktických oblastech. Následující studie potvrdily větší odolnost bakterií produkujících P3HB vůči nízkým teplotám narozdíl od bakterií bez schopnosti syntézy P3HB (Ayub a kol., 2004). Rovněž bakteriální kmeny produkující kopolymery PHA byly srovnány s kmeny neprodukujícími. Například kmen *Aeromonas hydrophila* 4AK4 produkující kopolymer 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyhexanoátu a jako neprodukující byl vybrán kmen *Aeromona hydrofila* CQ4 s porušenou PhaC-syntázou. Výsledek nebyl pouze ve větší odolnosti *A. hydrophila* 4AK4 vůči teplotnímu šoku, ale také vůči UV záření a osmotickému tlaku (Zhao a kol., 2007).

Při působení nízké teploty na mikroorganismy hraje významnou roli také rychlost chlazení. Jestliže je rychlost chlazení dostatečně pomalá, dochází v důsledku rozdílu chemických potenciálů intracelulárního a extracelulárního prostředí k exosmóze (tok vody z buňky v důsledku větší koncentrace rozpuštěných látek v extracelulárním prostředí), a tím ke vzniku

krystalků ledu pouze v extracelulárním prostředí buněk (viz obr. 13). Dochází k dehydrataci buňky ve snaze vyrovnat či udržet rovnováhy chemických potenciálů a buňka se smršťuje. V kontrastu s pomalým chlazením, v průběhu rychlého chlazení nedochází k potřebné dehydrataci a vzniká intracelulární led, který může poničit vnitřní strukturu buňky. Nicméně při extrémně rychlém chlazení dochází k tzv. podchlazení intracelulární vody a tím i k redukci rozměrů intracelulárních krystalků ledu, které jsou pozorovatelné jen pomocí elektronové mikroskopie. Množství podchlazené buněčné vody lze vypočítat jako funkci rychlosti ochlazení za použití hodnot permeability buňky vůči vodě, aktivací energie, poměru objemu buněčné vody, velikosti povrchu buňky a počáteční koncentrace rozpuštěných látek v buňce. Množství buněčné vody lze potom vynést jako závislost relativního objemu buněčné vody vůči teplotě odpovídající izotonickému objemu buněčné vody. Dále lze tyto hodnoty využít i k odhadnutí pravděpodobnosti zmrznutí buněčné vody s ohledem na rychlost ochlazení. Rovněž byl experimentálně dokázán vztah mezi rychlostí chlazení a rychlosti zpětného ohřívání vztáhnutý na citlivost buněk. Buňky, které prošly procesem rychlého chlazení, prokazovaly větší citlivost vůči pomalému ohřevu, jelikož podchlazená voda podléhala zpětné krystalizaci. Naopak u buněk s historií pomalého chlazení nebyla zaznamenána žádná zvýšená citlivost vůči změně rychlosti ohřevu. Jediným negativem při použití pomalého chlazení je smrštění buňky důsledkem dehydratace a následné zvýšení koncentrace elektrolytů, která může mít až toxický vliv na buňku (P. Mazur, 1984).



Obr. 13: Důsledky různých rychlostí chlazení s ohledem na buňku dle (P. Mazur, 1984).

Kryoprotektivní role PHA je přirovnávána k účinku kryoprotektivních aditiv (*cryoprotective agents*, CPA). Mezi aditiva patří celá řada nízkomolekulární až vysokomolekulárních organických molekul (PEG, etanol, glycerol, trehalóza atd.). Velké využití těchto látek se využívá v molekulární biologii, moderní medicíně či při konzervaci živých buněk, kdy množství vitálních buněk je vyšší než za nepřítomnosti aditiv. CPA se dělí dle penetrační doby a schopnosti penetrace přes buněčnou stěnu a plazmatickou membránu (P. Mazur, 1984).

Předpokládá se, že PHA chrání buňky především díky své amorfnní struktuře, kterou si zachovává i za velmi nízkých teplot vlivem skelného přechodu. V důsledku amorfnního stavu a vysoké viskozity jsou tak buňky ochráněny před růstem intracelulárních ledových krystalů a tím před poškozením membrán. Zároveň je třeba zmínit, že monomer 3HB polymeru P3HB je velice efektivním kryoprotektantem, jak bylo experimentálně potvrzeno u zamrazovacích-rozmrazovacích cyklech enzymů (lipáza), kvasinek (*Saccharomyces cerevisiae*) a bakteriálních kmenů (*C. necator* H16) (Hubalek, 2003; Obruca a kol., 2016b). Další kryoprotektivní mechanismus je založen na systému membránových proteinů aquaporinů, který přímo reguluje tok vody do buňky a ven a předchází osmotickému šoku (Fuller, 2004).

Ačkoli nízké teploty způsobují zpomalení či úplné zastavení metabolických drah, zároveň mohou jiné biochemické reakce urychlit, jelikož při dehydrataci buňky se navýší koncentrace rozpuštěných látek účastnících se dané reakce. Příkladem je katalyzovaná oxidace lipidů mikroskopické frakce rybí svaloviny v přítomnosti NaCl (Apgar a Hultin, 1982).

2.3.4.2 Osmotický šok

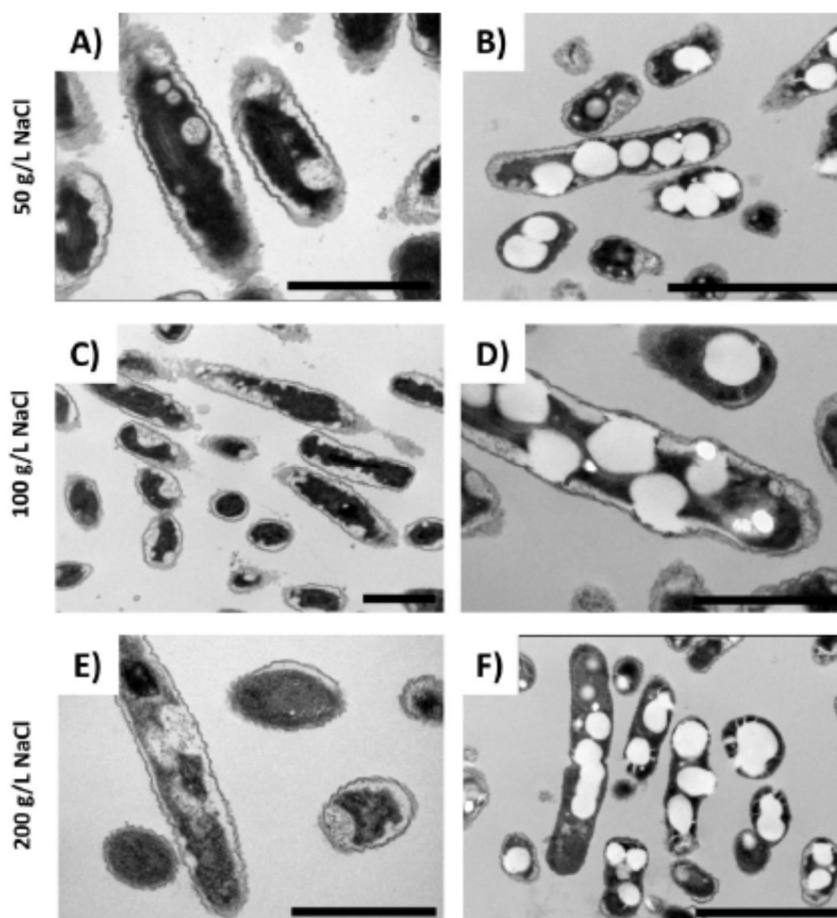
Osmotický stres má velký vliv na strukturu a fyzikálně-chemické vlastnosti bakteriálních buněk. V závislosti na osmotické toleranci daného mikroorganismu je ovlivněn růst, dělení a vůbec schopnost přežití. Mikroorganismy, které naopak vyžadují pro růst vyšší přítomnost NaCl, patří do skupiny halofilů, které se dále dělí dle tolerance NaCl. První skupina – mírní halofilové rostou při koncentraci rozpuštěných látek 2–5 % (Ollivier a kol., 1994).

Osmotický tlak, resp. osmolalita, závisí na celkové koncentraci rozpuštěných látek v roztoku za specifické teploty. Proto se osmolalita počítá mezi koligativní vlastnosti. Obecně je prostředí v přírodě charakterizováno z hlediska obsahu rozpuštěných látek v rozsahu od 0 do 16 mol/kg, kdy hlavní komponenty rozpuštěných látek představují cukry a soli (Ron, 2013). Díky semipermeabilitě cytoplazmatické membrány dochází k toku vody vně nebo dovnitř buněk v závislosti na rozdílných koncentracích rozpuštěných látek na základě osmózy (Storz a Hengge, 2011). Jestliže se koncentrace rozpuštěných látek v buňce a v daném prostředí neliší, jedná se o tzv. izotonické prostředí. V případě vyšší osmolality v prostředí (tzv. hypertonickém) dochází k dehydrataci buněk a nastává plazmolýza – plazmatická membrána se oddělí od buněčné stěny s následným smrštěním buňky. Intenzita a rychlost plazmolýzy záleží na velikosti koncentračního rozdílu mezi buňkou a prostředím. Jestliže je koncentrace rozpuštěných látek v prostředí nižší nežli v intracelulárním prostoru buňky, tedy v hypotonickém prostředí, je tok vody směřován do buňky na základě nižšího vnějšího osmotického tlaku. V tomto případě může s velkým množstvím absorbované vody nastat lyze buňky – tzv. osmolýza nebo také hypotonická lyze. Přes cytoplazmatickou membránu rovněž mohou procházet skrze kanály kompatibilní osmolyty (glycerol, ethanol, trehalóza), které chrání buňky před dopady osmotického stresu (Csonka, 1989; Wood, 2015).

Regulační mechanismy lze dělit do dvou základních strategií. První spočívá v aktivním průchodu iontů s kompatibilními osmolyty skrz buněčnou stěnu, zatímco druhá strategie je založena na syntéze osmoprotektantů a jejich akumulaci. Například *Escherichia coli* má schopnost akumulace betainu a prolinu prostřednictvím specifických transportérů či využívá exogenního cholinu k syntéze betainu (Chung a kol., 2006). Jako další ochranný mechanismus

při hyperosmotické expozici využívají buňky *E. coli* zvýšení koncentrace meziproductů metabolické dráhy ubichinonu 8 (Q8), který je rovněž akumulován ve výrazně zvýšeném množství (Sévin a Sauer, 2014).

Bylo prokázáno, že P3HB granule disponují též osmoprotektivním účinkem vůči plazmolýze u bakteriálního kmene *Cupriavidus necator* H16. Experimentálně bylo testováno několik koncentrací NaCl (50 g/L; 100 g/L; 200 g/L). Na obrázku 14 je zobrazen jak kmen *C. necator* H16 schopný syntézy a akumulace PHB (B; D; F), tak jeho mutantní kmen *C. necator* PHB⁻⁴, který slouží jako kontrolní vzorek (A; C; E). Jakmile byly kontrolní vzorky vystaveny jakékoli z vybraných koncentrací soli, došlo k masivní plazmolýze spojené s porušením cytoplazmatické membrány a uvolněním obsahu buňky do okolí. Oproti tomu, bakteriální kmen obsahující P3HB granule disponuje protektivními mechanismy, které redukuje míru plazmolýzy. PHA granule pravděpodobně fungují jako „scaffold“, který brání masivní deformaci buňky. Celkově tak došlo k menší dehydrataci a odchylce intracelulárního pH nežli u mutantního kmene PHB⁻⁴ bez schopnosti syntézy PHB. Druhý osmoprotektivní mechanismus PHA je založen na unikátních vlastnostech amorfních PHA granulí, které se podobají podchlazené kapalině. Jakmile došlo k porušení membrán, PHA granule vyplnily tyto malé trhliny a ochránily tak buňku před plazmolýzou (Obruca a kol., 2017).



Obr. 14: Morfologie buněk *C. necator* H16 v hypertonickém prostředí NaCl (Obruca a kol., 2017).

2.3.4.3 Neoptimální hodnoty pH

pH cytoplazmy je důležitým aspektem vitality bakteriálních buněk vycházející ze snahy o zachování optimálního pH daného mikroorganismu. Právě regulace pH cytoplazmy prostřednictvím iontových transportních systémů je klíčová, protože je založena na kontrole propustnosti protonů buněčnou membránou. Také v této kapitole je zapotřebí rozdělit mikroorganismy podle hodnot pH optima. Acidofilní mikroorganismy neboli acidofily preferují pH hodnoty od 3,0 do 6,5 zatímco neutrofily mají hodnoty pH 6,5 až 8,0 a alkalofily hodnoty pH 8,0 a více. Z rozdílných hodnot pH je zřejmé, že bakterie jsou schopny různě regulovat pH cytoplazmy, a disponují tedy i rozdílnými enzymatickými aparáty a různou tolerancí ke změnám pH. Mírné výkyvy pH cytoplazmy jsou u většiny bakterií způsobeny specifickým pohybem protonů přes cytoplazmatickou membránu pomocí membránově vázaných protonových čerpadel generující transmembránový elektrochemický gradient protonů. Nicméně biologické membrány vykazují nízkou propustnost vůči protonům, kdy permeabilita membrán je pouze 2krát až 3krát vyšší než propustnost čistého lipidického liposomu. Tudíž i velká fluktuace pH extracelulárního prostředí způsobuje obecně malé změny pH buňky. Také díky metabolismu alkalických a acidních látek v cytoplazmě kolísá pH cytoplazmy. Například růst *E. coli* na kyselých substrátech (např. na sukcinátu) vede k větší bazicitě média, což značí větší spotřebu protonů během metabolismu tohoto uhlíkatého zdroje. Bylo prokázáno, že pH růstového média přímo ovlivňuje metabolické vlastnosti bakterií, buňky na alkalických substrátech produkují kyselé produkty a buňky na kyselých substrátech produkují neutrální produkty. Například *Clostridium acetotobutylicum*, který vytváří butanol za přítomnosti butyrátu či *Klebsiella aerogenes* produkující butandiol z acetátu (Booth, 1985).

2.3.4.4 Expozice UV záření

Mezi další faktory ovlivňující životaschopnost a fyziologii buněk patří UV záření, které je součástí slunečního záření, kdy UV světlo ($\lambda < 390$ nm) je zastoupeno 3 % slunečního záření; viditelné světlo ($\lambda = 390\text{--}780$ nm) zahrnuje 37 % slunečního záření a infračervené světlo ($\lambda > 780$ nm) je součástí slunečního záření z 60 %. UV záření je dále rozděleno do tří regionů: ultrafialová A (UVA, 390–320 nm), ultrafialová B (UVB, 320–286 nm) a ultrafialová C (UVC, pod 286 nm). Expozice bakteriálních buněk UV záření způsobuje především poškození DNA, přičemž výši tolerance vůči DNA poškození zaštiťuje protein RecA, který je přímo zapojen v opravě poškozených úseků DNA důsledkem UV záření. Mutace DNA jsou paradoxně do jisté míry žádané, jelikož mohou být zdrojem selektivní výhody vůči ostatním mikroorganismům. I proto mikroorganismy nedisponují absolutním protektivním systémem vůči UV záření. U bakteriálního kmene *E. coli* vyvolává UV záření buněčný systém s funkcí SOS v závislosti na aktivitě genu *recA*. Gen *recA* kóduje produkci proteáz, které štěpí represory SOS systému (produkty genu *lexA*) (Gascón a kol., 1995).

Tabulka 4: Příklady protektivních účinků PHA v různých mikroorganismech vůči stresům (Obruca a kol., 2020).

Stres	Mikroorganismy	Reference
Nízká teplota a rozmrazování	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Zhao a kol., 2007
	<i>Pseudomonas extremaustralis</i>	Tribelli a López, 2011
	<i>Sphingopyrix chilensis</i>	Pavez a kol., 2009
	<i>Cupriavidus necator</i>	Obruca, a kol., 2016b Nowroth a kol., 2016
Teplotní šok	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Zhao a kol., 2007
	<i>Azospirillum brasilense</i>	Kadouri a kol., 2003a Kadouri a kol., 2003b
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Wu a kol., 2011
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pham a kol., 2004
	<i>Escherichia coli</i>	Wang a kol., 2009
Osmotický šok	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Zhao a kol., 2007
	<i>Azospirillum brasilense</i>	Kadouri a kol., 2003a Kadouri a kol., 2003b
	<i>Escherichia coli</i>	Wang a kol., 2009
	<i>Cupriavidus necator</i>	Obruca a kol., 2017 Sedlacek a kol., 2019b
	<i>Halomonas halophila</i>	Sedlacek a kol., 2019b
	<i>Rhizobium spp.</i>	Breedveld a kol., 1993
Oxidační stres	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Zhao a kol., 2007
	<i>Azospirillum brasilense</i>	Kadouri a kol., 2003a Kadouri a kol., 2003b
	<i>Pseudomonas extremaustralis</i>	Ayub a kol., 2009
	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Batista a kol., 2018
	<i>Delfia acidovorans</i>	Goh a kol., 2014
UV protektivita	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Zhao a kol., 2007
	<i>Azospirillum brasilense</i>	Kadouri a kol., 2003a Kadouri a kol., 2003b
		Tal a Okon, 1985
	<i>Cupriavidus necator</i>	Slaninova a kol., 2018
	<i>Escherichia coli</i>	Wang a kol., 2009
	<i>Pseudomonas extremaustralis</i>	Tribelli a kol., 2020

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

V rámci této kapitoly jsou shrnuty, komentovány a diskutovány experimentální výsledky shromážděné v průběhu doktorského studia, a to formou komentované kompilace článků, publikovaných nebo v současnosti podstupujících recenzní řízení v zahraničních odborných časopisech. Všechny komentované články jsou k této práci připojeny jako přílohy (viz kapitola 6), jejich seznam se stručným popisem autorského příspěvku autorky této práce je uveden v kapitole 5. Detailní popis použitých metodik a experimentálních postupů je buď součástí jednotlivých komentovaných publikací, nebo je v případě dosud nepublikovaných experimentů přiložen jako samostatná příloha (Příloha II).

Disertační práce je zaměřena na metabolickou a biofyzikální charakterizaci bakteriálních buněk schopných akumulace PHA, a to především v kontextu snahy o objasnění mechanismů v současnosti široce diskutovaných protektivních účinků P3HB granulí vůči stresovým podmínkám. Proto jsme se zaměřili na podrobné studium protektivních účinků P3HB granulí vůči vybraným environmentálně relevantním stresům (podkapitola 3.1). Zdá se, že amorfni charakter P3HB granulí může představovat klíčový faktor přispívajícím k jejich protektivní funkci. Proto jsme se v této práci věnovali také tomuto fenoménu, konkrétně jsme se zaměřili na jednotlivé stabilizační mechanismy přispívající ke stabilizaci termodynamicky nevýhodné amorfni formy P3HB v bakteriálních buňkách a na experimentální posouzení efektivity jejich účinku za stresových podmínek (podkapitola 3.2). V rámci posouzení metabolických důsledků přítomnosti P3HB v buňkách jsme se zaměřili na podstatu protektivních účinků monomerních jednotek 3HB, které jsou v bakteriích schopných akumulace P3HB ve vysoké míře katabolicky produkovány. Právě popis a objasnění bioprotektivních efektů 3HB představuje nejen originální a velice zajímavý příspěvek k pochopení komplexní biologické role PHA v buňkách, ale také otevírá celou řadu potenciálních aplikací především v oblasti kryobiologie či v potravinářském průmyslu (viz podkapitola 3.3). Aktualizovaná představa o klíčových mechanismech protektivních účinků intracelulárních granulí P3HB a 3HB, vytvořená na základě originálních poznatků získaných v rámci této doktorské práce, je shrnuta a okomentována v podkapitole 3.4. A konečně, protože každá odpověď generuje další otázky, kapitola 3.5 představuje další možné směřování výzkumu navazujícího na tuto doktorskou práci.

3.1 Protektivní vliv PHA vůči stresům

Na základě předešlého výzkumu realizovaného na pracovišti doktorandky bylo zjištěno, že intracelulární PHA neslouží bakteriím pouze jako zásobní zdroj energie a uhlíku, ale také se řadí svými jedinečnými vlastnostmi mezi významné protektanty před škodlivými vlivy jako je zamrazování, vysoká teplota aj. (viz podkapitola 2.3.4). Proto byla v rámci experimentální části práce nejprve věnována pozornost studiu odolnosti mikrobiálních buněk schopných produkce a akumulace PHA vůči dalším experimentálně relevantním stresům (UV záření, osmotický stres).

3.1.1 Pozitivní vliv PHA granulí vůči UV záření

V rámci řešení disertační práce jsme se nejprve zaměřili na jeden z nejběžnějších přirozeně se vyskytujících stresů, a to na expozici UV záření, které způsobuje fatální změny v molekulární struktuře DNA, RNA, proteinů a dalších buněčných komponent (Gabani a Singh, 2012). Nejškodlivější složka UV záření UV-C (100–295 nm) je efektivně absorbována ozónovou vrstvou na rozdíl od záření ve spektrální oblasti UV-B (295–320 nm), které prochází atmosférou a dopadá na zemský povrch. Hlavní negativní účinky této složky UV záření spočívají ve fotochemických změnách iniciovaných absorpcí tohoto záření molekulami DNA. Nejčastější poškození DNA UV zářením spočívá především v tvorbě pyrimidinových dimerů cyklobutanu a pyrimidinových dimerů kovalentně vázaných se dvěma sousedícími pyrimidiny. Další možné poškození u bází je nasycení dvojné vazby pyrimidinů, čímž vzniká hydrát cytosinu a thyminglykol (Goosen a Moolenaar, 2008). V důsledku expozice UV záření si mnohé mikroorganismy vyvinuly různé funkční fotoprotektivní mechanismy, který minimalizují jeho vliv a následky.

Obecně jsou mikroorganismy schopné přežít v extrémním prostředí nazývány extremofilové, v kontextu UV záření jsou konkrétně označovány jako UV rezistentní mikroorganismy (UVR mikroorganismy). Tuto skupinu lze dále dělit dle zvolené strategie obrany vůči UV záření na UVR mikroorganismy využívající produkci různých metabolitů (pigmenty, mykosporinu podobné aminokyseliny, melanin aj.) (Gabani a Singh, 2012; Koller a kol., 2014) či využívající reparačních drah již pozměněné DNA za pomoci například tzv. fotolyáz. Tyto enzymy jsou schopny štěpit kovalentní vazby mezi pyrimidinovými dimery v rámci procesu fotoreaktivace, který je aktivován zářením o vlnové délce 300–500 nm jakožto zdrojem energie. V důsledku této reparační dráhy tak vznikají původní pyrimidinové monomery (Takahashi a Ohnishi, 2009). Další enzymatická dráha nazývána excisní reparace bází (BER) je inicializována DNA glykosylázami, které rozpoznají a hydrolyzují glykosylovou vazbu mezi poškozenou bází a deoxyribózou. Mikroorganismy také často využívají při opravách DNA enzymy UV-endonukleázy, které rozpoznají a ihned vystříhnout příslušné fotoprodukty. Nicméně mezi nejčastěji využívanou reparační dráhu DNA patří dráha nukleotidové excisní reparace (NER), díky které dochází k úplnému odstranění poškozených oligonukleotidů (Ataian a Krebs, 2006; Goosen a Moolenaar, 2008).

Vlivem UV záření si řada mikroorganismů vyvinula alternativní strategie efektivní ochrany. Jednu z takovýchto strategií představuje také produkce a akumulace intracelulárních PHA granulí. Pozitivní vliv PHA granulí v mikrobiálních buňkách vůči UV-B záření byl již potvrzen v několika studiích. Například byl porovnáván protektivní efekt PHA u PHA produkujícího kmene *Azospirillum brasilense* oproti jeho mutantu s absencí PHA syntázy (Kadouri a kol., 2003a). Stejný pozitivní vliv PHA granulí byl pozorován při porovnání mutantního kmene *Azospirillum brasilense* neschopného degradace PHA s divokým kmenem (Kadouri a kol., 2003b). Podobného výsledku bylo dosaženo i při použití jiného mikroorganismu, konkrétně *Aeromonas hydrophila* a jeho mutantního kmene bez PHA syntázy (Zhao a kol., 2007).

Přestože byl takto opakovaně experimentálně potvrzen pozitivní vliv PHA granulí při ochraně buněk před UV-B zářením, nebylo zatím uvedeno žádné vysvětlení, ani navržen mechanismus

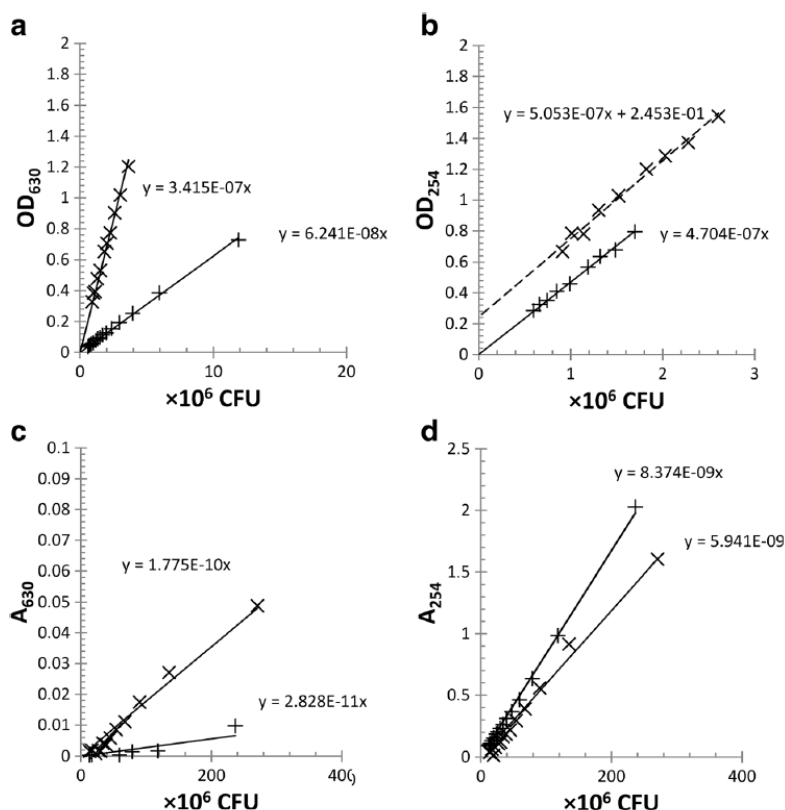
toho, jak jsou tyto buňky chráněny. Objasnění UV-fotoprotektivity PHA granulí by přitom mohlo mít v budoucnu velký význam, a to i vzhledem k ubývajícím ozónové vrstvě a coby primární environmentální bariéry proti UV záření. Předpokládá se, že na konci 21. století dojde k markantnímu navýšení intenzity UV-B záření, a to až o 5–15 % v mírných zeměpisných šířkách a až o 20 % v polárních oblastech. Význam UV záření jako stresoru (stresového faktoru) pro prokaryotické buňky tedy ještě naroste (Zepp a kol., 2011). Proto jsme se rozhodli blíže experimentálně prozkoumat mechanismus UV protekce mikroorganismů PHA granulemi, a to s využitím ne zcela rutinních spektroskopických přístupů.

Nejprve jsme se zaměřili na potvrzení pozitivního vlivu P3HB granulí vůči UV záření u modelového bakteriálního kmene *Cupriavidus necator* H16 (s obsahem 74 hm. % P3HB na suchou biomasu) oproti jeho mutantnímu kmenu *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ bez schopnosti produkce a akumulace P3HB. Obě kultury byly pro tento účel upraveny na stejnou koncentraci buněk (10^8 CFU/mL) a vystaveny expozici UV záření (UV-A lampa s přesahem do UV-B oblasti, emisní pás 400–300 nm, maximum emise 350 nm, sekundární emisní pás při 313 nm), kdy viabilita obou bakteriálních kmenů byla hodnocena po různé délce expozice UV záření. Výsledky této experimentální studie byly publikovány v časopise *Applied Microbiology and Biotechnology* v článku uvedeném v **Příloze I** této práce. Výsledky studie jednoznačně potvrzují podstatně vyšší odolnost kultury obsahující PHB vůči UV záření, přičemž pokles viability u referenčního vzorku, vystaveného stejné manipulaci pouze s absencí UV expozice, byla nižší než 5 %. Z tohoto důvodu není pochyb o tom, že letální efekty pozorované v tomto experimentu jsou správně přisuzovány vlivu expozice UV záření.

Abychom pochopili, jak intracelulární P3HB granule interagují se světelným zářením, byly buněčné suspenze obou kmenů podrobeny komplexní spektroskopické charakterizaci, a to jak v ultrafialové, tak také ve viditelné oblasti záření. Nejprve byla provedena standardní turbidimetrická analýza v transmisním módu na standardním dvoupaprskovém UV-Vis spektrofotometru. Na základě změřených transmitančních spekter byly pro analyzované buněčné suspenze (obě testované buněčné kultury v různých stupních zředění) vypočítány optické hustoty pro konkrétní vybrané vlnové délky (630 nm, 254 nm). Vyjma oblasti blízké vlnové délce 200 nm vykazovala buněčná suspenze P3HB akumulujícího kmene o mnoho vyšší optickou hustotu ve srovnání s neakumulujícím kmenem. Je třeba zdůraznit, že takto naměřená spektra a hodnoty optických hustot kultur nerozlišují absorpci a rozptyl záření. Jinými slovy, naměřená optická hustota reprezentuje souhrnný příspěvek záření blokováného v průchodu vzorkem jak v důsledku jeho absorpce jednotlivými komponentami vzorku, tak rovněž rozptylem záření buňkami, resp. jejich vnitřní strukturou. A právě pochopení, zda se jedná převážně o rozptyl či absorpci světla je klíčové k pochopení fotoprotektivního mechanismu P3HB granulí. Absorpce světla iniciuje různé fyzikální či fotochemické procesy, které mohou mít často škodlivé až fatální účinky na vitalitu buněk, zejména jedná-li se o záření v UV oblasti. Naproti tomu rozptyl světla je charakterizován převážně ochranným účinkem, tzv. rozptylové stínění snižuje lokální intenzitu dopadajícího záření, a chrání tak fotolabilní komponenty buňky (Paunescu a kol., 2014).

Jelikož klasická turbidimetrická analýza neposkytovala relevantní vysvětlení účinku záření na buňky obsahující P3HB, byla tato technika doplněna měřením difúzní transmitance buněčných suspenzí pomocí integrační koule. Tato technika je speciálně navržena pro analýzu absorpce záření zakalenými vzorky. Touto metodou bylo tedy možné minimalizovat signál odpovídající rozptylu světla, což bylo potvrzeno snížením vypočtených hodnot absorpce ve viditelné oblasti ve srovnání s hodnotami optické hustoty stanovené turbidimetricky o více než tři řády. Z tohoto důvodu lze přisoudit hodnotu optické hustoty naměřené pomocí klasické turbidimetrie téměř výhradně vlivu rozptylu světla. Jinými slovy vyšší hodnoty optických hustot u suspenzí bakteriálního kmene *Cupriavidus necator* H16 jsou evidentně způsobeny rozptylem světla na vnitřním upořádání buněk, konkrétně na granulích P3HB přítomných v cytoplazmatickém prostoru.

Za účelem spolehlivější interpretace výsledků jsme navrhli originální kvantitativní přístup založený na porovnání závislostí optické hustoty (turbidimetrie) a absorpce (difúzně-transmisní spektrometrie) na hustotě buněčných suspenzí (viz obr. 15). Zaměřili jsme se především na naměřená data u dvou konkrétních vlnových délek; vlnovou délku 254 nm jsme zvolili proto, že odpovídá maximu absorpce molekulami DNA, zatímco vlnová délka 630 nm se rutinně využívá při charakterizaci buněčné hustoty. Jak lze vyčíst z grafu (obr. 15a), závislost optické hustoty na buněčné hustotě suspenzí vykazuje prakticky lineární průběh u obou kmenů. Dále lze na základě velmi dobré lineární závislosti usoudit, že rozptyl světla u buněk obsahujících P3HB je kumulativního rázu na rozdíl od naměřených hodnot při vlnové délce 254 nm (viz obr. 15b), kde spojnice trendu neprotíná počátek souřadnic. Výsledky nám tak potvrzují předpoklad, že buňky obsahující intracelulární granule P3HB rozptylují dopadající světlo (viz. obr. 15d). Na základě porovnání směrnice spojnice trendu jsme byli schopni odvodit 30% relativní pokles absorpčního koeficientu jedné buňky obsahující P3HB oproti P3HB negativním buňkám při vlnové délce 254 nm. To potvrzuje protektivní efekt rozptylu světla na vnitřní struktuře buněk, který se projevuje snížením efektivity absorpce UV záření. Na obr. 15c je patrná „zbytková“ absorpce ve viditelné oblasti světla, kterou je možné přisoudit rozptýlenému záření nezachycenému detektorem integrační koule (např. zpětně rozptýlené záření). Tato závislost nepřímo charakterizuje míru nejistoty rozlišení rozptylové a absorpční komponenty optické hustoty pro jednotlivé buněčné suspenze při použití uvedené kombinace turbidimetrické a difúzně-transmitanční analýzy.



Obr. 15: Souhrn výsledků naměřených optických hustot a absorbancí buněčných suspenzí *C. necator* H16 produkující PHB (x) a *C. necator* PHB⁻⁴ (+). **a, b** Závislost optické hustoty při 630 a 254 nm na hustotě buněk. **c, d** Závislost absorpance na 630 a 254 nm na hustotě buněk.

Naše další experimenty se zaměřily na metodicky nezávislé ověření předpokladu, že rozdíl v hodnotách optické hustoty a absorpance suspenzí bakteriálních buněk skutečně odpovídá intenzitě rozptýleného světla. Jako vhodnou metodu jsme pro tento účel vybrali nefelometrii, která se zaměřuje na přímé měření intenzity rozptýleného záření. Jelikož jsme neměli k dispozici nefelometr (zařízení konstruované jednoúčelově pro měření rozptýleného záření pod fixním nebo proměnlivým úhlem), využili jsme pro tento účel standardní fluorimetr, jehož konstrukce umožňuje měření intenzity záření emitovaného nebo rozptýleného vzorkem pod úhlem 90°. Abychom potlačili vliv kolísání intenzity emise zdroje světla fluorimetrem (xenonová výbojka), byly intenzity rozptýleného světla buněčných suspenzí *C. necator* H16 a *C. necator* PHB⁻⁴ normalizovány na jednotku CFU a vyneseny ve vzájemném poměru v závislosti na vlnové délce záření. Takto upravená spektra získaná prostřednictvím základních nefelometrických testů potvrdila, že intenzita rozptýleného záření u buněk obsahující P3HB granule je výrazně vyšší v UV oblasti ve srovnání s mutantním kmenem *C. necator* PHB⁻⁴. Lze tedy konstatovat, že nefelometrie nám potvrdila naše závěry z předchozích spektroskopických metod.

Jak už bylo popsáno na začátku této podkapitoly, UV záření neindukuje pouze strukturní změny DNA a dalších buněčných komponent, ale indukuje také oxidativní stres za vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS) v mikrobiálních buňkách. Z toho důvodu jsme zkoumali, jestli fotoprotektivní účinek P3HB granulí, který spočívá v rozptylu UV světla, ovlivňuje intracelulární koncentraci ROS. Ke stanovení množství intracelulárních ROS před, resp. po UV

expozici jsme využili průtokovou cytometrii v kombinaci s fluorescenční sondou CM-H2CFDA, u které je zelená fluorescence přímo aktivována reakcí s ROS (Dong a kol., 2015). Tímto způsobem jsme analyzovali oba bakteriální kmeny před a po UV expozici jak obarvené, tak i neobarvené. Z naměřených fluorescenčních intenzit byl patrný pouze mírný nárůst signálu u bakteriálních buněk obsahující P3HB po expozici UV (přibližně 10 %). Oproti tomu u kultury neobsahující granule P3HB, která byla vystavena UV záření, vzrostla intenzita zelené fluorescence až 3,6krát. Tím jsme potvrdili, že rozptýl P3HB granulí chrání bakteriální buňky před samotnou tvorbou ROS a následnými fotochemickými reakcemi.

Při diskusi efektu P3HB na produkci ROS v buňce je třeba podotknout, že pozitivní vliv vůči účinkům ROS byl v předchozí studii na pracovišti doktorandky potvrzen i u monomerních jednotek 3HB, které se vyskytují až v 16,5krát vyšší koncentraci v mikrobiálních buňkách schopných akumulace PHA než u mutanta téhož bakteriálního kmene bez schopnosti produkce a akumulace PHA (Obruca a kol., 2016a). Vysvětlení takto vysoké koncentrace intracelulárního 3HB spočívá v cyklické povaze PHA metabolismu, kdy jsou řetězce PHA na jednu stranu syntetizovány a zároveň degradovány právě na monomerní jednotky např. 3HB (viz kapitola 2.2.1). Omezení produkce 3HB, tedy jinými slovy omezení či delece intracelulárních depolymeráz, jak tomu bylo u mutantního kmene *Azospirillum brasilense*, prokázalo vyšší citlivost vůči UV záření nežli jeho divoký kmen (Kadouri a kol., 2003b).

Výsledky naší experimentální studie potvrdily předpoklad, že fotoprotektivní role P3HB granulí je úzce spjata s ochranou molekul DNA před expozicí vysoké intenzitě záření ve spektrální oblasti UV-B. Z tohoto pohledu je klíčovým faktorem vzájemná lokalizace P3HB granulí a DNA v intracelulárním prostoru. Na rozdíl od monomerních 3HB, které se volně vyskytují v cytoplazmatickém prostoru, intracelulární granule P3HB jsou v bakteriálních buňkách vázány k DNA skrze protein PhaM podobný phasinům, který je schopen se navázat jak na DNA, tak na PHA syntázu. Díky této vazebné schopnosti je PhaM zapojen hned v několika procesech, mimo jiných i v distribuci P3HB granulí do dceřiných buněk během buněčného dělení u bakteriálního kmene *C. necator* H16 (Jendrosseck a Pfeiffer, 2014).

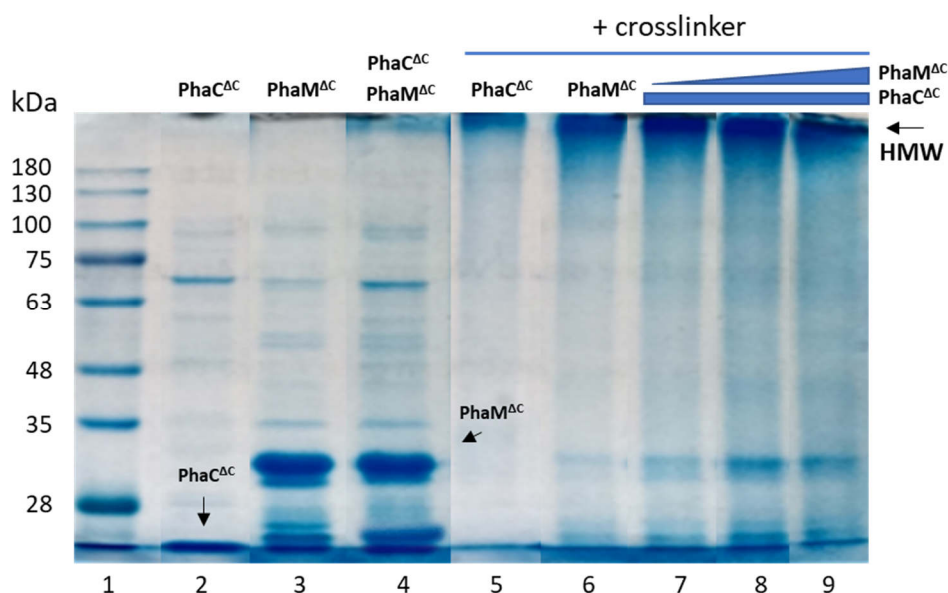
Vazba mezi granulí P3HB a nukleoidem je naprosto klíčová v rámci platných teorií zabývajících se tvorbou PHA granulí *in vivo* (viz podkapitola 2.3.2). Konkrétně tzv. model buněčných pólů (nazývaný „scaffold“) je založen na navázání granulí P3HB na tmavé mediační prvky, které byly pozorovatelné pomocí TEM u bakterií *C. necator* H16. Nicméně tyto bakteriální buňky byly před analýzou krátce kultivovány v produkčním médiu s omezeným obsahem dusíku. Je tedy pravděpodobné, že limitace mohla zastavit jak dělení buněk, tak i replikaci samotné DNA, což by znamenalo, že mediační prvky, které studie uvádí, představují právě oblast nukleoidu (Pfeiffer a kol., 2011; Tian a kol., 2005). Proto se současné představy o vzniku P3HB granulí nejčastěji přiklání ke čtvrtému modelu, tzv. modelu buněčných pólů. Ten je založen na experimentech, ve kterých byly buňky *C. necator* H16 v rané stacionární fázi přeneseny do čerstvého média, díky čemuž nedošlo k žádnému omezení replikace nukleoidu či tvorby granulí. Ukázalo se, že nukleoid v tomto případě plní funkci scaffoldu, na který se vážou P3HB granule prostřednictvím vazby PhaM a PhaC (Pfeiffer a kol., 2011). Obdobu proteinu PhaM můžeme najít i u mcl-PHA produkujících bakterií, kde úlohu distribuovat PHA granule

u *Pseudomonas putida* přebírá protein PhaF (Moldes a kol., 2004). Také intracelulární koncentrace PhaM má významný vliv na P3HB granule, konkrétně na jejich počet a velikost. Bylo experimentálně prokázáno, že při nadměrné produkci PhaM se tvoří velké množství malých granulí, které jsou také všechny navázané prostřednictvím PhaM na DNA. Oproti tomu u buněk *C. necator* H16 neschopných exprese PhaM dochází k vytvoření jedné velké P3HB granule (Jendrossek a Pfeiffer, 2014). Vazbě PhaM a PhaC může být však zabráněno při nadměrné expresi phasinu PhaP5, který se kompetitivně váže rovněž s PhaM a ostatními phasiny (Wahl a kol., 2012).

Je velmi pravděpodobné, že blízkost navázaných P3HB granulí k bakteriální DNA vysvětluje, proč je rozptyl UV záření PHA granulí tak efektivním protektivním prostředkem. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli blíže prozkoumat vazbu mezi PhaC a PhaM, tedy proteinů, které se přímo podílejí na vazbě mezi nukleoidem a P3HB granulemi. Je-li hypotéza o klíčové roli lokalizace P3HB granulí a DNA správná, pak právě vazba mezi PhaC a PhaM je stěžejní z hlediska fotoprotektivního efektu P3HB granulí vůči UV záření, jelikož právě ona udržuje P3HB granule v dostatečné blízkosti DNA, čímž tak stíní DNA před dopady škodlivého záření. Experimentální studie této problematiky byla realizována v rámci zahraniční stáže autorky na University of Stuttgart v Německu pod odborným vedením profesora Jendrosska, který se problematice struktury P3HB granulí a výzkumu P3HB-asociovaných proteinů zabývá po většinu své bohaté vědecké kariéry. Cílem této experimentální studie bylo ověření klíčové role struktury N-konců obou proteinů při jejich vzájemné vazbě. Za tímto účelem jsme oba proteiny podrobili delecím, konkrétně byly tyto proteiny zkráceny o C-konec. Poté jsme tyto proteiny, ať už zkrácené či původní, zkoumali v rámci jejich schopnosti tvořit *in vitro* vzájemné komplexy v různých kombinacích.

Dosud publikované informace o struktuře obou studovaných proteinů vedly k předpokladu, že v případě PhaM odpovídá C-konec doméně zodpovědné za specifické navázání tohoto proteinu na DNA. Tato doména obsahuje vysoký počet prolinů, alaninů, a především kladně nabitých zbytků lysinů vytvářejících dva PAKKA motivy a další dva jim podobné, díky kterým připomínají strukturu histonů. Oproti tomu druhá transmembránová doména (tj. N-konec) PhaM je zodpovědná za propojení DNA a hydrofobních P3HB granulí prostřednictvím vazby s N-koncem syntázy P3HB (Bresan a Jendrossek, 2017). Naproti tomu P3HB syntázy PhaC bakteriálního kmene *C. necator* H16 (viz podkapitola 2.2.1.2) obsahují C-konec odpovídající katalytické doméně polymerizující P3HB a N-konec, který hraje důležitou roli při lokalizaci syntázy na P3HB granulích a zároveň stabilizuje rostoucí řetězec polymeru P3HB u aktivního místa C-konce. Jak už bylo zmíněno v kapitole 2.3.1, bylo prokázáno, že PhaM má pozitivní vliv na samotnou polymerizaci (zkracuje lag fázi polymerizace). Předpokládá se, že zkrácení lag fáze proteinem PhaM je způsobeno jeho vazbou s nekatalytickým N-koncem PhaC, což vede ke zvýšené vazebné afinitě N-konce syntázy k narůstajícímu řetězci P3HB. Zbylá doba lag fáze by tak odpovídala pouze dimerizaci syntázy PhaC, která je aktivována navázáním substrátu, a také dosažení dostatečné délky rostoucího řetězce P3HB pro interakci s N-koncem PHA syntázy (Kim a kol., 2017).

Pro navrženou experimentální studii bylo nejprve třeba zkonstruovat originální deletovaný protein PhaC^{ΔC}. Za tímto účelem byly navrženy a syntetizovány dva potřebné plazmidy pro zkrácenou verzi PhaC s chybějícím C-koncem. Každý plazmid umožňující posílenou expresi proteinu PhaC^{ΔC} tak obsahoval příslušný gen zkráceného proteinu PhaC lišící se pouze v umístění genu pro strep-tag, který byl inkorporován z důvodů souvisejících s následnou izolací proteinu. Tyto plazmidy byly v dalším kroku transformovány do klonovacích kmenů *E. coli* TOP10, přičemž podrobný experimentální protokol je uveden v **Příloze II**. Během exprese deletovaných proteinů se prokázala jejich jistá nestabilita, tudíž bylo důležité optimalizovat dobu a podmínky produkce, kdy je koncentrace produkováných proteinů nejvyšší. V případě dalších proteinů využitých ve studiu jejich vzájemných interakcí byly využity sbírkové kmeny daného pracoviště, které již byly připraveny v rámci předchozích disertačních prací. Díky sbírkovým kmenům jsem byla schopná izolovat zkrácenou verzi PhaM^{ΔC} a originální formy PhaM a PhaC s his-tagem, který byl klíčový jak pro izolační postup daných proteinů, tak pro realizaci experimentů v rámci metody biometrické interferometrie (BLI) za použití systému oktet K2. Pro lepší přehlednost v textu byly strep a his-tagy vynechány, podrobnější informace jsou blíže popsány v Příloze II. Nejprve jsme se tedy ujistili, zda zkrácené PhaC^{ΔC} (22,2 kDa) a zkrácené PhaM^{ΔC} (24,1 kDa) tvoří komplex prostřednictvím experimentu cross-linking za přítomnosti glutaraldehydu jako „crosslinkeru“ (viz obr. 16).

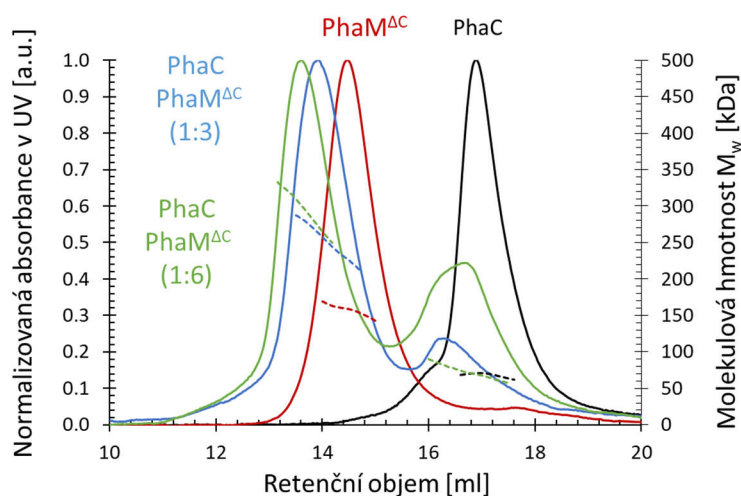


Obr. 16: SDS-PAGE PhaC^{ΔC} a PhaM^{ΔC} a jejich kombinace. (1) Markerové proteiny molekulových hmotností, (2-4) proteiny PhaC^{ΔC} a PhaM^{ΔC} a jejich kombinace bez přítomnosti glutaraldehydu, (5-9) proteiny PhaC^{ΔC} a PhaM^{ΔC} a jejich kombinace se zvyšující se koncentrací PhaM^{ΔC} (1:1; 1:2; 1:3) bez přítomnosti glutaraldehydu. Koncentrace obou proteinů činila 10 μM.

Velikost takto glutaraldehydem zesíťovaných proteinů přesahovala 180 kDa (viz obr. 16), a to jak v případě samostatných proteinů, tak i jejich kombinací, a nebylo tak možné odečíst konkrétní molekulovou hmotnost pomocí SDS-PAGE. Nicméně zvýšená intenzita HWM (z angl. *high molecular weight*, vysoká molekulová hmotnost) pásu u kombinací proteinů PhaC^{ΔC} a PhaM^{ΔC} (úměrná zvyšující se koncentraci PhaM^{ΔC}, viz obr. 16, sloupec 7–9), naznačuje, že oba proteiny spolu skutečně vzájemně interagují za vzniku vysokomolekulárních komplexů.

Z tohoto důvodu jsme se následně rozhodli využít metodu SEC-MALS (vylučovací chromatografie v kombinaci s detekcí rozptylu světla ve více úhlech), která umožňuje určit molekulovou hmotnost a relativní zastoupení jednotlivých proteinů v daných komplexech.

Z výsledků analýzy SEC-MALS je možné určit molekulovou hmotnost a na základě toho odhadnout kvartérní strukturu proteinů a jejich vzájemných komplexů. Výsledky analýzy jsou uvedeny na obr. 17, přičemž v případě PHA syntázy výsledky zobrazují pouze PhaC formu (bez delece) protože přečištěný deletovaný protein PhaC^{ΔC} nebylo možné získat v koncentraci potřebné pro tento typ analýzy. Jak už bylo naznačeno výše, metoda SEC-MALS disponuje vyšším rozlišením vysokomolekulárních látek nežli SDS-PAGE, a proto jsme byli schopni stanovit molekulovou hmotnost čistého PhaM^{ΔC} na 154 kDa, která odpovídá zhruba 6,4 násobku molekulové hmotnosti monomeru (monomer = 24,1 kDa). Distribuce signálu v rámci molekulové hmotnosti byla však relativně široká, konkrétně od 142 do 163 kDa, přesto se dá předpokládat, že PhaM^{ΔC} *in vitro* preferuje tvorbu hexamerů. Oproti tomu v případě PHA syntázy PhaC odpovídalo maximum v chromatogramu molekulové hmotnosti 71 kDa, což prakticky odpovídá monomerní jednotce (66,5 kDa), a přidružený pík při nižším elučním čase odpovídá tvorbě dimeru (111 kDa). Přítomnost dimerů PhaC *in vitro* není ničím překvapující, jelikož doprovázení monomerních jednotek PhaC právě dimery bylo již experimentálně prokázáno v předešlých studiích (Gerngross a kol., 1994; Stubbe a kol., 2005).

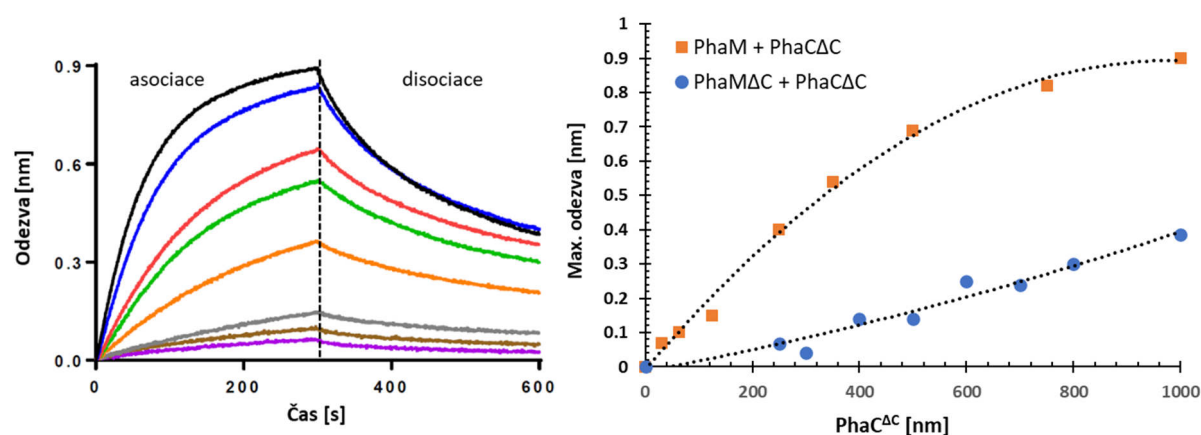


Obr. 17: Charakterizace PhaC a PhaM^{ΔC} a jejich komplexu pomocí SEC-MALS.

V případě experimentů týkajících se komplexů PhaC a PhaM^{ΔC} jsme studovali několik vzájemných poměrů, přičemž vždy převažoval protein PhaM^{ΔC}. Při poměru obou proteinů 1:3 odpovídá majoritní zastoupení částic v systému molekulové hmotnosti 264 kDa, což odpovídá 5,6 monomerům PhaM^{ΔC} připadajícím na jeden dimer PhaC. Oproti tomu v případě poměru proteinů 1:6 je molekulová hmotnost hlavního píku rovna 274 kDa, tudíž počet monomerních jednotek PhaM^{ΔC} ku dimerům PhaC je roven 6,1. Velmi zajímavým výsledkem je změna relativní intenzity sekundárních píků, které velikostí odpovídají monomerním jednotkám PhaC. Je zřejmé, že intenzita píků a tudíž i relativní zastoupení monomerů PhaC v systému se zvýšilo při přidavku většího množství His₆-PhaM^{ΔC} ke stejnému množství PhaC. Toto chování je nejpravděpodobněji zapříčiněno agregačním chováním His₆-PhaM^{ΔC}, které při dostatečném

množství (1:6) preferují tvorbu hexamerů s dimery PhaC, díky čemuž jsou ve směsi ve větší míře přítomné volné PhaC jednotky. Z hlediska struktury komplexů jsme se dále zaměřili na jejich krystalizaci, díky které bychom mohli lépe porozumět prostorové orientaci PhaM ku PhaC, nicméně krystalizační experiment stále probíhá.

Dále byla komplexace obou proteinů studována také z hlediska energie jejich vzájemné vazby, kdy byla porovnávána síla interakcí mezi deletovanou syntázou (PhaC^{ΔC}) a oběma variantami PhaM (PhaM, PhaM^{ΔC}). Tato *in vitro* analýza byla realizována s využitím biometrické interferometrie (BLI) za použití systému oktet K2. Tato metoda studia biomolekulárních interakcí patří mezi optické analytické metody, kdy je analyzován interferenční obrazec bílého světla odraženého od dvou povrchů (Kaisermann, 2020). V našem případě se bílé světlo odrazí od vrstvy imobilizovaného his-tag proteinu PhaM nebo PhaM^{ΔC} na špičce biosenzoru (Ni-NTA) a od vnitřní referenční vrstvy. Naváže-li se na imobilizovaný protein PhaC^{ΔC}, změní se tak počet molekul navázaných na špičce senzoru a dojde tak k posunu vlnové délky, která je měřena v reálném čase. Na základě této metody byl vytvořen profil odezvy, díky kterému lze určit vazebnou specifitu, míru asociace a disociace (viz obr. 18 nalevo – odezva interakcí mezi PhaC^{ΔC} a PhaM). Jak je patrné na obr. 18 napravo, PhaC^{ΔC} interaguje s oběma formami PhaM avšak s nezkrácenou verzí PhaM je signál reprezentující míru interakce přibližně dvojnásobně vyšší než u PhaM^{ΔC}.



Obr. 18: (nalevo) Naměřená odezva interakcí mezi PhaC^{ΔC} a PhaM metodou BLI. (napravo) Rozdíl intenzity interakcí v závislosti na proteinu délce His₆-PhaM.

Na základě výše uvedených experimentálních výsledků je možné konstatovat, že delece C-konce u proteinu PhaM má sice negativní vliv na vazbu takto modifikovaného proteinu s PHA syntázou, nicméně interakce mezi oběma proteiny i v tomto případě stále probíhá. Proto jsme se dále soustředili na bodově zaměřenou mutagenezi PhaM proteinu, abychom ověřili, nakolik je vazba mezi PhaM a PhaC závislá na sekundární struktuře N-koncové domény PhaM. Za tímto účelem jsme zvolili 11 různých kombinací mutací na krátkém úseku na N-konci PhaM, ve kterém jsme nahradili jednu či více aminokyselinových zbytků především kyseliny asparagové za alanin a dvě obměny isoleucinu a alaninu za prolin, abychom docílili zhroucení struktury α -helix. Tato studie v současnosti stále probíhá, zkonstruované bakteriální kmeny *E. coli* BL21 DE3 pLys obsahující jednotlivé plazmidy s danými mutacemi jsou dále zkoumány na univerzitě ve Stuttgartu.

Biomolekulární studie realizované v rámci pětiměsíční zahraniční stáže tak potvrzují hypotézu, že C-konec u PhaM proteinu není až tak zásadní pro samotnou vazbu se syntázou PhaC. Uvedená experimentální studie tak přispěla svým dílem k objasnění strukturních a energetických aspektů vazby DNA a P3HB granulí, která, jak naznačují výsledky experimentů zaměřených na expozici P3HB produkujících bakterií UV záření, hraje klíčovou úlohu v rámci fotoprotektivního mechanismu těchto granulí *in vivo*.

3.1.2 Osmoprotektivní efekt PHA granulí

Další z podrobněji studovaných stresových faktorů – osmotická dysbalance – byl zvolen především na základě předešlé studie realizované na pracovišti autorky předložené práce (Obruca a kol., 2017). Tato studie se zabývala osmoprotektivním účinkem P3HB granulí v hypertonickém prostředí. Další motivací byl fakt, že se opět jedná o velice častý stres v přirozeném prostředí mikroorganismů, jelikož mikrobiální buňky se v přírodě musejí potýkat s opakovanými osmotickými výkyvy. Při hypertonických podmínkách způsobených vysokou extracelulární koncentrací rozpuštěných látek (především solí) dochází k rychlé dehydrataci cytoplazmy. Důsledkem intenzivního toku vody směrem ven z buňky dochází ke smrštění cytoplazmatické membrány a zmenšení celkového objemu buněk, což může vést až k oddělení vnějších buněčných obalů od cytoplazmatické membrány, tzv. plazmolýze. Poněvadž plazmatická membrána není schopna se smrstit o více než 2–5 %, intenzivní plazmolýza často způsobí narušení strukturního uspořádání či dokonce úplnou ztrátu integrity membrány (Schwarz a Koch, 1995). Rychlost i míra dehydratace bývá přímo úměrná osmotickému gradientu napříč plazmatickou membránou, přechod vody je ovšem rovněž limitován vlastní permeabilitou membrány (souvisí se složením a morfologií membrány), která je rovněž ovlivněna teplotou prostředí. Opačný případ nastává, jestliže se mikroorganismy ocitnou v hypotonickém prostředí, kde dochází naopak k přítoku vody do buňky. Při výraznějším porušení integrity cytoplazmatické membrány za těchto podmínek hrozí prasknutí, tzv. hypotonická lyze (Brown a Audet, 2008). Molekuly vody se mohou do buňky a ven dostávat dvěma způsoby. Prvním z nich je využití specifických membránových kanálků, tvořených transmembránovými proteiny, tzv. aquaporiny. Druhou možností je difúze přes lipidickou dvojvrstvu (Mazur, 2004), která je z kinetického hlediska výrazně bržděna energetickými bariérami spojenými se vstupem vody do silně nepolárního intramembránového prostředí.

Mnohé mikroorganismy si vyvinuly v závislosti na jejich optimální koncentraci rozpuštěných látek v prostředí celou řadu důmyslných protektivních mechanismů vůči osmotickým šokům. Jedním ze stěžejních ochranných mechanismů je bezesporu zapojení mechano-senzitivních kanálů a osmotických přenašečů, díky kterým jsou buňky schopné rozpoznat či detekovat osmotické změny ve vnějším prostředí. Další obrannou strategií bakterií je syntéza osmolytů, často také nazývaných jako kompatibilní soluty. Tyto malé organické molekuly (trehalóza, ektoiny a jiné) jsou velmi prospěšné při hypertonickém stresu, kdy vyrovnávají extracelulární osmotický tlak (Roberts, 2005). Naopak u hypotonického stresu buňky „pumpují“ vodu a kompatibilní látky pomocí mechano-senzitivních kanálů do vnějšího prostředí tak, aby předešly hypotonické lyzi buňky (Kouwen a kol., 2009).

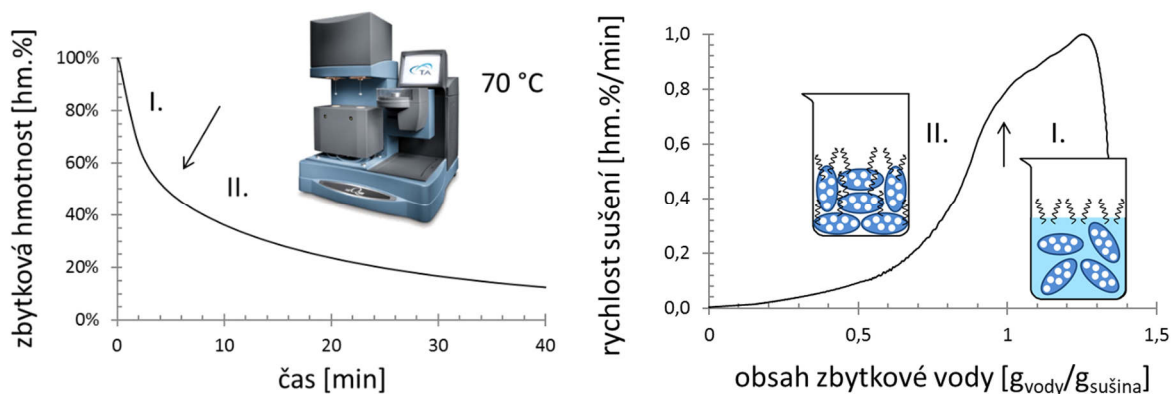
V posledních letech výsledky celé řady experimentálních studií naznačovaly, že svoji podstatnou roli v rámci osmoprotektivity hrají i granule PHA. Např. bakteriální kmen *Aeromonas hydrophila* akumulující PHA prokázal vyšší rezistenci vůči osmotickému stresu nežli jeho mutantní kmen neschopný syntézy PHA (Zhao a kol., 2007). Podobných výsledků bylo dosaženo také u bakteriálního kmene *Azospirillum brasilense* v porovnání s jeho mutanty s delecí PHA syntázy a PHA depolymerázy (Kadouri a kol., 2003a, 2003b). Pozitivní vliv PHA granulí vůči osmotickému stresu byl taktéž potvrzen u transgenní *E. coli* schopné syntézy a případně i degradace PHA narozdíl od divokého kmene, který není schopen akumulace PHA (Wang a kol., 2009). Osmoprotektivní účinek PHA byl tedy pozorován u mnohých mikroorganismů, avšak po dlouhou dobu nebyl znám mechanismus, jakým PHA granule přispívají k navýšení rezistence buněk vůči osmotickému stresu. Na základě posledních studií se funkce PHA jeví velmi komplexně, a to i v závislosti na konkrétním bakteriálním kmenu. Například kmeny *Rhizobium leguminosarum* TA-1 a *Rhizobium meliloti* SU-47 se brání vůči osmotickému up-šoku hydrolýzou PHA za vzniku monomerních jednotek a energie, kterou využívají pro syntézu kompatibilních látek, konkrétně trehalózy (Breedveld a kol., 1993). Při degradaci P3HB tak vzniká potřebná energie pro syntézu dalších kompatibilních látek a zároveň si prostřednictvím degradace zvyšují koncentraci 3HB, které též patří mezi kompatibilní látky (Obruca, a kol., 2016). Nicméně u modelového kmene schopného produkce a akumulace P3HB *Cupriavidus necator* H16 byla možná strategie spjatá s degradací P3HB při expozici hypertonickému prostředí vyvrácena v rámci experimentální studie, na níž předložená disertační práce navazuje (Obruca a kol., 2017). V té bylo zjištěno, že expozice buněk *C. necator* H16 hypertonickému prostředí zapříčinila částečnou krystalizaci PHA granulí, kterou již nebylo možné degradovat prostřednictvím intracelulárních depolymeráz, což bylo patrné z Ramanovských spekter mikrobiálních buněk. PHA granule si přesto zachovaly natolik svůj unikátní plastický charakter, že byly schopny vyplnit malé mezery v membráně, které vznikly v důsledku plazmolýzy. I proto docházelo k menší dehydrataci buněk ve srovnání s mutantním kmenem *C. necator* PHB⁻⁴. Dále tato studie naznačila, že přítomnost P3HB granulí v mikrobiálních buňkách snižuje plazmolýzu osmoticky namáhaných buněk, a to pravděpodobně proto, že PHA plní funkci scaffoldu, a brání tak výrazné deformaci buňky.

Na základě zajímavých výsledků a závěrů z předešlých studií věnovaných především odpovědi mikrobiálních buněk na hypertonický stres jsme se rozhodli experimentálně ověřit, zda je možné osmoprotektivní účinek PHA granulí rozšířit také na podmínky, při nichž jsou bakterie vystaveny náhlému hypotonickému šoku. Pro experimentální studii, která je v podobě publikace v časopise *New Biotechnology* prezentována v **Příloze III**, jsme vybrali jak halofilní P3HB produkující kmen *Halomonas halophila*, tak také mezofilní bakteriální kmen *C. necator* H16. Důvodem pro zařazení halofilní kultury do naší studie byla skutečnost, že mnohé halofilní i extrémně halofilní bakterie a archea akumulují nemalé množství PHA, což opět podporuje hypotézu, že PHA granule neslouží pouze jako zásobní materiál, ale i jako osmoprotektant. Jak bylo popsáno výše, u bakteriálního kmene *C. necator* H16, který nepatří mezi halofilní mikroorganismy, je známo, že při hyperosmotickém šoku P3HB granule poskytují ochrannou funkci (Obruca a kol., 2017), a zároveň byl pozorován pozitivní vliv mírného osmotického tlaku (10 g/L NaCl) na biosyntézu P3HB (Obruca a kol., 2010). Jako referenční bakteriální kmen bez přítomnosti P3HB granulí byl opět využit mutantní kmen *C. necator* PHB⁻⁴ a taktéž

C. necator H16 kultivovaný s nadbytkem dusíku, čímž byl obsah P3HB v buňkách minimalizován.

Nejprve jsme se zaměřili na viabilitu buněk vystavených hypertonickým podmínkám (200g/L NaCl) a následně výměně prostředí za deionizovanou vodu. Nejvyšší robustnost mikrobiálních buněk vůči takto intenzivnímu osmotickému namáhání jsme pozorovali u bakteriálního kmene *C. necator* H16 s nevyšším obsahem P3HB (74 % P3HB na suchou biomasu). Z výsledků je dále patrné, že i malý obsah P3HB v buňkách *C. necator* H16 (1,6 % PHB na suchou biomasu při kultivaci na komplexním médiu) pozitivně ovlivňuje schopnost bakteriální kultury udržet si při osmotickém namáhání integritu buněk. Rozpad buněk byl zřetelný mj. v úbytku celkového počtu naměřených stresovaných buněk oproti buněčným suspenzím, které nebyly vystaveny žádným osmotickým šokům. Naopak výrazná hypotonická lyze buněk i nejvyšší pokles buněčné viability byl pozorován u mikrobiální kultury neschopné syntézy a akumulace P3HB.

Pro bližší prozkoumání buněčné integrity jsme využili izotermální termogravimetrickou analýzu (iTGA), díky které jsme byli schopni monitorovat změny v množství intracelulární vody u jednotlivých vzorků bakteriálních kmenů. Metoda je založena na odlišení extracelulární a intracelulární vody ve vzorku prostřednictvím rozdílné rychlosti sušení. Zatímco v první fázi sušení je ze vzorku uvolňována téměř výhradně extracelulární voda, a to prakticky konstantní rychlostí, v druhé fázi sušení jsou buňky zbavovány intracelulární vody, přičemž rychlost jejího úbytku postupně klesá. Hranice mezi oběma fázemi, která se určuje jako průsečík závislostí rychlosti sušení v jednotlivých fázích, a která reprezentuje přibližný obsah intracelulární vody ve vzorku, je označována jako tzv. kritický obsah vody. Schéma metody je ilustrováno na obr. 19.

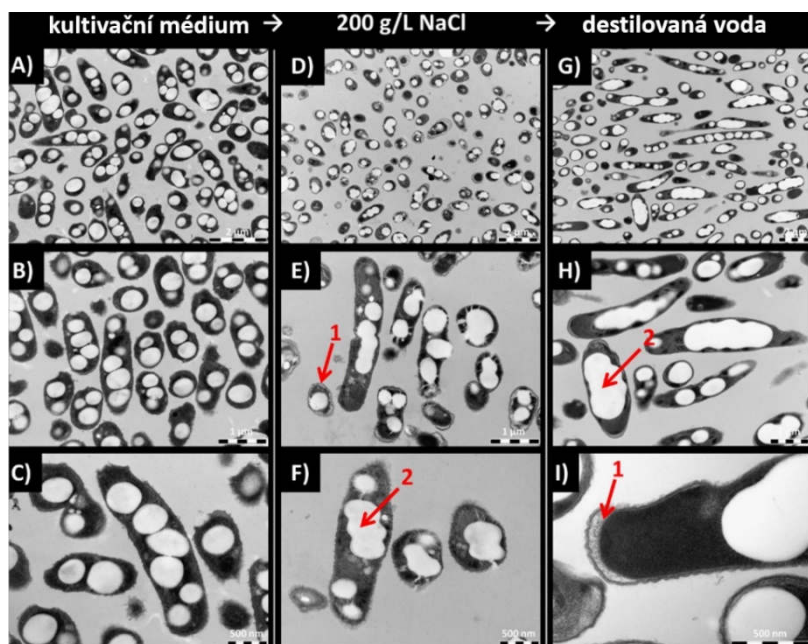


Obr. 19: Princip stanovení množství intracelulární vody pomocí izotermální termogravimetrie. (**nalevo**) Časová závislost zbytkové relativní hmotnosti vzorku při sušení při 70°C. (**napravo**) Termogram upravený do podoby závislosti rychlosti úbytku hmotnosti na zbytkové vodě ve vzorku. (I) První fáze sušení, kdy je uvolňována ze vzorku extracelulární voda. (II) Druhá fáze sušení, kdy buňky přicházejí o intracelulární vodu. Šipka označuje hranici mezi oběma fázemi, tzv. kritický obsah vody.

Tato metoda nám mimo jiné potvrdila, že buňky neakumulující P3HB (či akumulující P3HB jen v malé míře) obsahují skoro dvojnásobné množství intracelulární vody v cytoplasmě vztaheno na suchou hmotnost buněk. Při hyperosmotickém šoku vykazovaly vzorky pokles relativního množství intracelulární vody (známka osmotického vysoušení buněk). U všech

vzorků bez ohledu na obsah P3HB byl u buněk vystavených hyperosmotickému a následně hypoosmotickému prostředí pozorován posun kritického bodu k vyšším hodnotám. Jinými slovy, buňky obsahovaly po fluktuaci osmotických prostředí více intracelulární vody nežli před expozicí osmotickým stresům, což může být zapříčiněno strukturními změnami v cytoplazmatické membráně po již prodělaném hyperosmotickém šoku. Nicméně, v případě buněk s nízkým nebo žádným obsahem P3HB bylo po prodělaném hypoosmotickém šoku obtížné – případně zcela nemožné – určit kritický obsah vody. To naznačuje ztrátu integrity buněčné stěny a s tím spojené mazání rozdílů v rychlostech sušení intra- resp. extracelulární vody. Negativní dopady hypotonického šoku na bakteriální buňky s nízkým obsahem P3HB či bez přítomnosti intracelulárních P3HB granulí byly navíc závislé na intenzitě předešlého hypertonického stresu, kde bylo testováno hned několik koncentrací (50, 100 a 200 g/L NaCl).

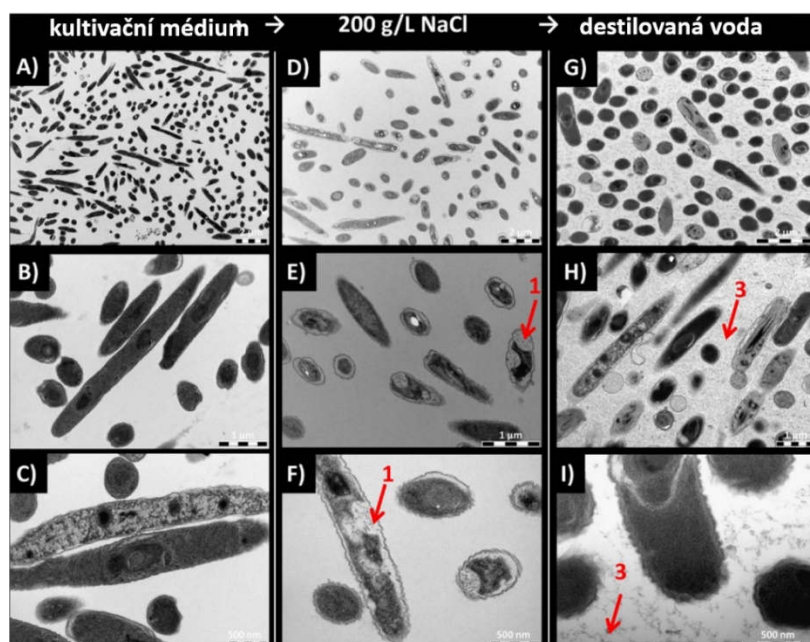
Abychom si byli naprosto jistí, co se v průběhu osmotického namáhání s bakteriálními buňkami skutečně děje, doplnili jsme diskutovanou studii také o morfologickou analýzu buněk v jednotlivých stádiích jejich stresové expozice. Tato analýza, realizována prostřednictvím transmisní elektronové mikroskopie (TEM), potvrdila naše předešlé závěry vyvozené z výsledků dosažených průtokovou cytometrií a izotermální TGA. Přítomnost P3HB granulí má jednoznačně pozitivní vliv na zachování integrity buněk při osmotickém namáhání. Výrazné rozdíly byly pozorovány u kmene *C. necator* H16 s vysokým obsahem P3HB (viz obr. 20) a jeho mutantního kmene *C. necator* PHB⁻⁴ bez schopnosti akumulace P3HB (viz obr. 21).



Obr. 20: TEM snímky buněčných suspenzí *C. necator* H16 produkující P3HB, (A–C) po kultivaci v minerálním médiu, (D–F) po hyperosmotickém stresu (200 g/L NaCl), (G–I) po hypoosmotickém stresu, (1) mírná plazmolýza, (2) koalescence granulí.

Na TEM snímcích uvedených na obr. 20 d–f jsou vyobrazeny buňky *C. necator* H16 akumulující P3HB po hyperosmotickém šoku. U těchto buněk je pozorovatelná mírná plazmolýza a koagulace P3HB granulí, která je nejspíše zapříčiněna dehydratací v průběhu stresu a poškozením povrchové proteinové vrstvy, která agregaci granulí za fyziologických

podmínek zabraňuje. Tento shluk granulí v jednu velkou granuli byl pozorován již dříve ve studii Obruča a kol. (2017). Zatímco v buňkách s vysokým obsahem P3HB se projevila symetrická plazmolýza, u buněk bez P3HB (viz obr. 21) se plazmolytická deformace buněk projevila několika způsoby. Nejčastější variantou plazmolytické deformace cytoplazmatické membrány u gram-negativních bakteriálních buněk je její odpojení od buněčné stěny a vnější membrány. V důsledku zmenšení intracelulárního objemu hypertonicky namáhaných buněk dochází k mechanické deformaci cytoplazmatické membrány, což vede k jejímu poškození a vzniku některých deformací jako jsou endo/exocytotické váčky či tvorba tubulárních nebo Scheieho struktur (blíže Koch, 1995). Pokud byly tímto způsobem buňky poškozeny při hypertonickém stresu, docházelo v případě buněk neobsahujících P3HB po následné expozici hypotonickému prostředí k masivní lyzi buněk a uvolnění cytoplazmy do extracelulárního prostředí. Oproti tomu, u buněk s vysokým obsahem P3HB byl negativní efekt komplexního osmotického namáhání minimální a buňky byly schopny uchovat svou integritu a celistvost.



Obr. 21: TEM snímky buněčných suspenzí *C. necator* PHB⁴ bez produkce P3HB, (A–C) po kultivaci v minerálním médiu, (D–F) po hyperosmotickém stresu (200 g/L NaCl), (G–I) po hypoosmotickém stresu (deionizovaná voda), (1) plazmolýza, (3) vylití cytoplazmatického obsahu.

Jak už bylo řečeno na začátku této podkapitoly, rozhodli jsme se prozkoumat vliv P3HB granulí také u halofilních kmenů, konkrétně u *Halomonas halophila*, které jsme kultivovali jak v minerálním (tato kultura obsahovala 82 hm.% PHB na suchou biomasu), tak v komplexním médiu (4 hm.% PHB na suchou biomasu). Hlavní motivací pro zařazení halofilní bakterie bylo eliminovat vliv hypertonického namáhání buněk a posoudit ochranný vliv P3HB granulí pouze z pohledu hypotonického stresu. I v případě halofilního bakteriálního kmene byl potvrzen pozitivní vliv P3HB granulí na buňky vystavené hypotonickému šoku (deionizovaná voda) přímo po kultivaci v minerálním médiu obsahující vysokou koncentraci soli (66 g/L). Naměřená viabilita buněk prokázala stejný protektivní účinek P3HB granulí jako u mezofilního kmene *C. necator* H16, i když metoda ke stanovení viability buněk (průtoková cytometrie) zde

musela být nahrazena počítáním kolonií na miskách, jelikož vysoký obsah soli v referenčním vzorku vedl ke zhášení fluorescence viabilitní sondy.

Výstupy z iTGA a TEM potvrdily závažné poškození integrity buněk *H. halophila* kultivované v komplexním médiu oproti halofilním buňkám s vysokým obsahem P3HB. Vzhledem k halofilnímu charakteru *H. halophila* se dá předpokládat odlišný ochranný mechanismus P3HB granulí než u bakteriálního kmene *C. necator* H16. *H. halophila* patří mezi mírné halofily schopné akumulace značného množství osmolytů, které využívají k vyrovnávání osmotického gradientu. Vyskytnou-li se tyto halofilní buňky v hypotonickém prostředí, stanou se však nashromážděné osmolyty spíše nevýhodou. P3HB granule zaujímají významnou část intracelulárního prostoru buněk, což snižuje množství osmolytů nezbytné pro kompenzaci osmotického tlaku. A právě přítomnost P3HB granulí může být významným faktorem navyšujícím robustnost PHA akumulujících buněk vůči hypotonickému šoku.

Prokázaný protektivní vliv PHB granulí v bakteriálních buňkách vůči osmotickým změnám představuje významný poznatek také v kontextu potenciálního využití v biotechnologickém průmyslu. A to jak při bioremediačních procesech (Obruca a kol., 2018), kde jsou využity i další protektivní účinky PHB granulí (odolnost vůči výkyvům pH, těžkým kovům, organickým látkám aj.), tak i v rámci průmyslové produkce PHA. V této oblasti by halofilní kmeny mohly najít široké uplatnění, jelikož kultivační podmínky by snižovaly jak pravděpodobnost kontaminace (Koller, 2015), tak i náklady na proces samotný za předpokladu využití levné mořské vody pro přípravu kultivačního média (Takahashi a kol., 2017).

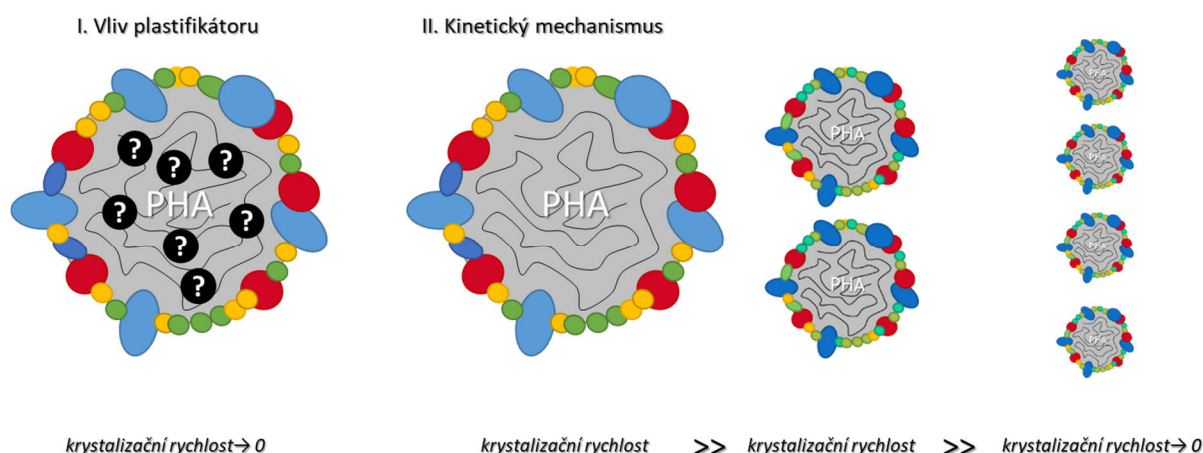
3.2 Amorfni charakter PHA granulí *in vivo*

Jak již bylo prokázáno, PHA granule nejsou pouze zdrojem uhlíku a energie, ale disponují celou řadou biologických a biofyzikálních specifíků, díky kterým zvyšují robustnost a rezistenci buněk vůči působení různých stresů (UV záření, osmotický stres, nízká teplota a jiné, viz kapitola 2.3.4). Na rozdíl od izolovaného P3HB, který je charakteristický svou vysokou krystalinitou, intracelulární neboli nativní granule P3HB se vyskytují v buňkách v amorfni formě (Jendrosseck, 2007 a další viz kapitola 2.3.3). Tento termodynamicky nevýhodný stav nativních granulí má však své opodstatnění nejen z hlediska jejich protektivního účinku, ale i z hlediska metabolismu. Udržování narůstajícího řetězce polymeru v amorfni podobě je pravděpodobně nezbytně nutné již v okamžiku jeho syntézy, kdy je řetězec spolu s připojovaným monomerem (ve formě 3-hydroxyacyl-CoA) vázán v aktivním místě PHA syntázy PhaC. Jakmile amorfni polymer dosáhne dostatečné délky, naváže se na N-konec PhaC, a tím urychlí polymerizační proces, jelikož se stále nachází v blízkosti aktivního místa a je tak dostupnější pro reakci (Kim a kol., 2017). Rovněž aktivita P3HB intracelulárních depolymeráz je přímo podmíněna amorfni stavem polymeru v nativních granulích, jelikož vlivem svojí struktury a substrátové specifity nejsou schopné hydrolyzovat krystalické (tzv. „denaturované“) P3HB granule (Uchino a kol., 2008). Krystalizace intracelulárních granulí tak znemožňuje využití PHA jako zdroje uhlíku a energie v době hladovění a snižuje efektivitu protektivních mechanismů vůči stresovým podmínkám vázaných na plastickou povahu amorfniho polymeru (např. výše zmíněné efekty při expozici hyperosmotickému prostředí, viz kap. 3.1.2). V neposlední řadě je krystalizací P3HB blokováno také jeho zapojení do PHA cyklu, a tudíž i produkce

monomerních jednotek 3HB jako tzv. potenciálních chemických chaperonů, které chrání enzymy a další biomolekuly před vysokou teplotou a oxidativním stresem (Obruca a kol., 2016a).

Ke krystalizaci polymeru běžně dochází v průběhu izolace granulí z buněk, kdy v důsledku fyzikálních nebo chemických účinků izolačních podmínek dochází k narušení jejich nativní struktury (Porter a Yu, 2011). Naproti tomu bylo zjištěno, že granule intaktních bakteriálních buněk zůstávají v nativní amorfní formě i při extrémně nízkých teplotách (např. při zpracování pro kryoSEM zobrazování při teplotách kolem $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$), kdy si zachovávají nejen vysokou flexibilitu, ale i elasticitu. Hodnota prodloužení při přetržení pozorovaná u P3HB granulí v takto kryogenicky zpracovaných buňkách je více než 100 %, což je v silném kontrastu k izolovanému polymeru P3HB, u kterého hodnota kritické deformace činí běžně pouze okolo 4 % (Obruca a kol., 2016b).

Ačkoli amorfní stav P3HB granulí a jeho vliv na buňky během stresových podmínek je v současnosti široce diskutovaným tématem, doposud nebyl jednoznačně objasněn mechanismus stabilizace P3HB v amorfní podobě *in vivo*. Jak bylo uvedeno v teoretické části této práce, je známo několik teorií, které se snaží vysvětlit podstatu plastifikace P3HB v nativních intracelulárních granulích. První teorie se zakládá na přítomnosti specifických plastifikátorů v prostředí nativní granulí. Tyto plastifikační účinky byly přisuzovány například molekulám vody či některým nízkomolekulárním látkám (Ceccorulli a kol., 1992; Choi a Park, 2004). Alternativní teorie vychází čistě z chemicko-kinetického mechanismu, který vysvětluje extrémně nízkou rychlost krystalizace *in vivo* pouze na základě malého objemu P3HB granulí (Bontrone a kol., 1992; de Koning a Lemstra, 1992), přičemž důležitá role při zamezení agregace granulí a s tím spojeným nárůstem jejich objemu se přisuzuje proteinové povrchové vrstvě granulí (Bresan a kol., 2016) (více v podkapitole 2.3.1). Nicméně ani jedna z těchto teorií (viz obr. 22) není považována za definitivní a uspokojivě vysvětlující všechna dosud popsaná experimentální pozorování.



Obr. 22: Stabilizační hypotézy amorficity PHB granulí. (I.) Hypotéza založená na přítomnosti plastifikátoru v PHA granuli. (II.) Stabilizace PHA granule na základě malého objemu PHA granule s nízkou krystalizační rychlostí.

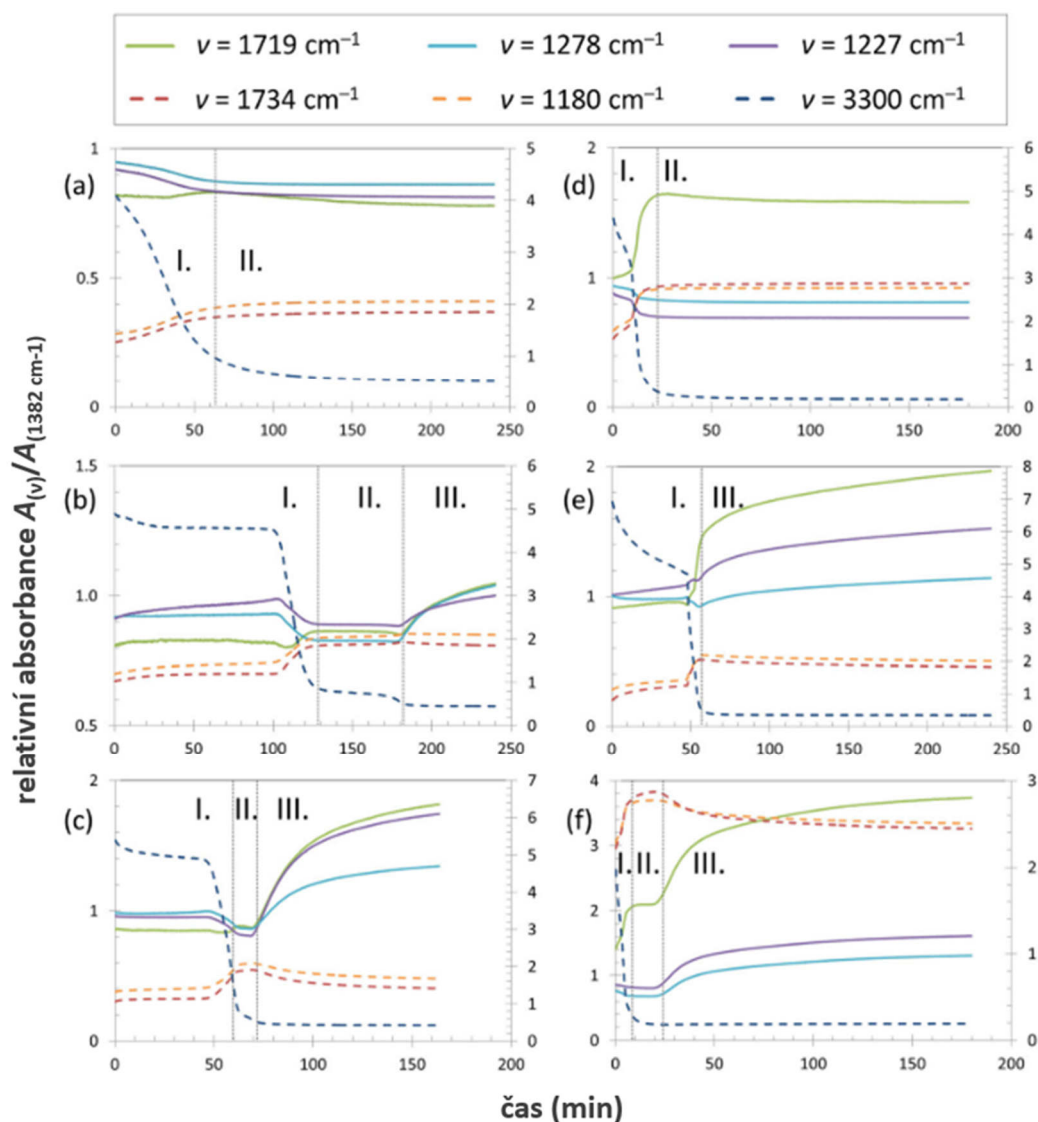
Další experimentální studie realizovaná v rámci předložené disertační práce byla proto navržena s cílem posoudit stabilizační mechanismy udržující intracelulární P3HB v amorfní formě, a to s ohledem na tematické zaměření práce opět v kontextu expozice buněk různým stresovým faktorům. Metodologicky studie vycházela z publikovaných prací týmu Portera a Yu (2011a), kteří úspěšně otestovali techniku infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) za účelem rozlišení krystalické a amorfní formy P3HB ve vzorcích celých buněk a korelovali kvantitativní výstupy této techniky s výsledky ze standardně využívané DSC metody. Stejní autoři následně využili tuto spektroskopickou techniku při pozorování kinetiky krystalizace P3HB v buňkách *C. necator* H16, které nejdříve ošetřili velmi nízkým pH (0,2 M kyselina sírová), aby zastavili případnou biologickou aktivitu. V průběhu měření vzorků byla zaznamenávána spektra dokládající různou míru krystalizace P3HB v čase v průběhu volného vysoušení vzorku (Porter a Yu, 2011b). V rámci experimentů byla také zpozorovaná jistá souvislost mezi rychlostí krystalizace P3HB granulí v buňkách a dalším ošetřením buněk (vysoká teplota, úprava pH). Jelikož pozorování rychlosti krystalizace nativních P3HB granulí pomocí FTIR bylo realizováno u buněk, které byly nejprve vystaveny nízkému pH, zůstávalo otázkou, zdali průběh krystalizace nebyl pouhým důsledkem fyziologických a morfologických změn buněk právě v důsledku jejich reakce na tento stres. Autory studie také nebyl navržen žádný konkrétní destabilizační mechanismus, kterým by vysvětlovali přechod amorfních granulí do krystalického stavu v průběhu prezentovaných experimentů. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli systematicky prozkoumat tuto problematiku se zvláštní pozorností věnovanou vlivu stresové expozice na míru a rychlost následné krystalizace P3HB *in vivo*. Výsledky této studie byly publikovány v časopise *Applied Microbiology and Biotechnology*, přičemž příslušná publikace je přiložena k této disertační práci v podobě **Přílohy IV**.

V rámci této studie bylo experimentálně prokázáno, že u bakteriálních buněk *C. necator* H16 nenastala v průběhu sušení ani po něm krystalizace P3HB granulí, pokud buňky nebyly nejprve vystaveny stresovým podmínkám. Bylo také dokázáno, že ne všechny testované stresy (vysoká teplota, osmotický tlak, rozmrazovací a zmrazovací cykly a nízké pH) musí nutně vést k iniciaci krystalizace amorfních granulí (viz obr 23). Krystalizaci iniciovala expozice buněk vysoké teplotě (50, 80°C), nízkému pH (pH = 1 nebo 2) a hyperosmotickému prostředí (200 g/L NaCl). Oproti tomu cyklické mražení a rozmrazování buněk, stejně jako expozice mírně kyselému prostředí (pH = 3 a 4) nevedly k pozorovatelné krystalizaci P3HB granulí *in vivo*. Abychom více porozuměli tomu, zda a jak spolu souvisí morfologické změny buněk způsobené jednotlivými testovanými stresy a míra krystalizace granulí P3HB daným stresem iniciovaná, vzorky buněk exponovaných jednotlivým stresům byly opět zobrazeny technikou TEM (viz obr. 24). Kombinací morfologické mikroskopické analýzy s FTIR analýzou krystalizace P3HB bylo zjištěno, že krystalizace nastává pouze u buněk, u kterých došlo v důsledku aplikace stresových podmínek ke koagulaci P3HB granulí. Míra obou projevů (koagulace granulí a krystalizace polymeru) je přitom závislá na intenzitě aplikovaného stresu (např. konkrétní teplota, hodnota pH).

Uvedená zjištění podporují argumentaci chemicko-kinetického modelu krystalizace, který je založen na nízké pravděpodobnosti spontánní nukleace a z toho plynoucí extrémně malé rychlosti krystalizace polymeru v submikronovém objemu granule (Bonthrone a kol., 1992).

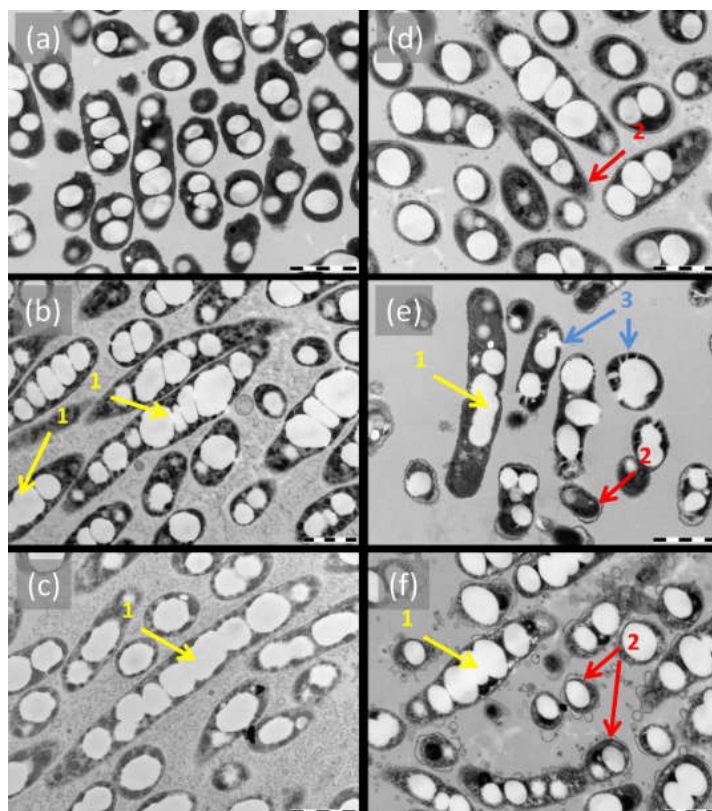
Jak už bylo zmíněno výše, koagulace P3HB granulí je nejspíše způsobena denaturací proteinů povrchové vrstvy P3HB granulí, která byla také zřetelně pozorovatelná ve FTIR spektrech vzorků, které vykazovaly jak koagulaci granulí, tak rovněž krystalizaci P3HB. Ačkoliv tato spektra pochopitelně nezaznamenávají denaturaci pouze proteinů navázaných na P3HB granule, ale všech proteinů vyskytujících se v buňkách, dá se přesto předpokládat, že denaturace proteinů a koagulace nativních P3HB granulí spolu úzce souvisí. Povrch P3HB granulí *C. necator* H16 pokrývá z 27–54 % phasin P1 (24 kDa), který svojí četností dosahuje až 5 % celkové proteinové složky v buňce (Wieczorek a kol., 1995). Proto by i částečná denaturace povrchových proteinů znamenala ztrátu jejich schopnosti plnit úlohu surfaktantů oddělujících od sebe hydrofobní jádra P3HB granulí a hydrofilní prostředí buněčné cytoplazmy. Tato domněnka byla rovněž experimentálně podložena, kdy jsme vycházeli ze zmrazovacích rozmrazovacích cyklů, při kterých se pomocí FTIR (prostřednictvím dekonvoluce amidového pásu) denaturace buněčných proteinů neprokázala a zároveň nebyla pomocí TEM pozorována koagulace P3HB granulí.

Další důležitý poznatek získaný pomocí FTIR spočíval ve zjištění, že krystalizace P3HB granulí nastává vždy až následně po dehydrataci vzorku. Na obrázku 23 si navíc lze povšimnout, že s výjimkou osmotického stres (obr. 24e) se všude vyskytuje časová prodleva mezi dehydratací a počátkem krystalizace. Tento jev poukazuje na fakt, že koagulace nativních P3HB granulí jako taková nestačí k iniciaci krystalizace (morfologické TEM analýze byly podrobeny plně hydratované vzorky), ale musí být vždy spojena s dehydratací buněk. Toto zjištění naopak podporuje hypotézu plastifikačního účinku intragranulární vody (Lauzier a kol., 1992a,b). Výskyt vody v PHA granulích byl již dříve experimentálně ověřen, přičemž bylo zjištěno, že nativní PHA granule obsahují až 10 hm. % vody (Mas a kol., 1985). Jak už bylo nastíněno v teoretické části práce (podkapitola 2.3.3), voda hypoteticky stabilizuje β -konformaci syntetizovaných řetězců PHA uvnitř granulí prostřednictvím vodíkových vazeb, a tudíž znemožní jejich krystalizaci. Tato teorie však nebyla prozatím experimentálně dokázána, jelikož se ještě nepodařilo vytvořit umělé amorfní P3HB granule stabilizované pouze pomocí vody. Výsledky naší experimentální studie ovšem naznačují, že právě voda doplňuje svými plastifikačními účinky kinetické efekty malého objemu nativních granulí, a přispívá tak ke stabilizaci amorfní stavu intracelulárního P3HB.



Obr. 23: Časový vývoj absorbancí při frekvencích souvisejících s dehydratací vzorku ($3\ 300\text{ cm}^{-1}$) a krystalizací P3HB (1734 cm^{-1} , $1\ 278\text{ cm}^{-1}$, $1\ 227\text{ cm}^{-1}$, respektive $1\ 180\text{ cm}^{-1}$). Všechny sledované absorbance byly škálovány pomocí absorbance retenčního píku při $1\ 382\text{ cm}^{-1}$. Srovnání výsledků kultury *C. necator* H16: (a) kontrola, (b) při $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, (c) $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, (d) $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, (e) 200 g/L NaCl a hodnota $\text{pH}=1$ (f). (I.) dehydratační fáze vzorku, (II.) dehydratované buňky s amorfními P3HB, (III.) krystalizační fáze. Přerušované křivky přísluší vedlejší ose podřadnic.

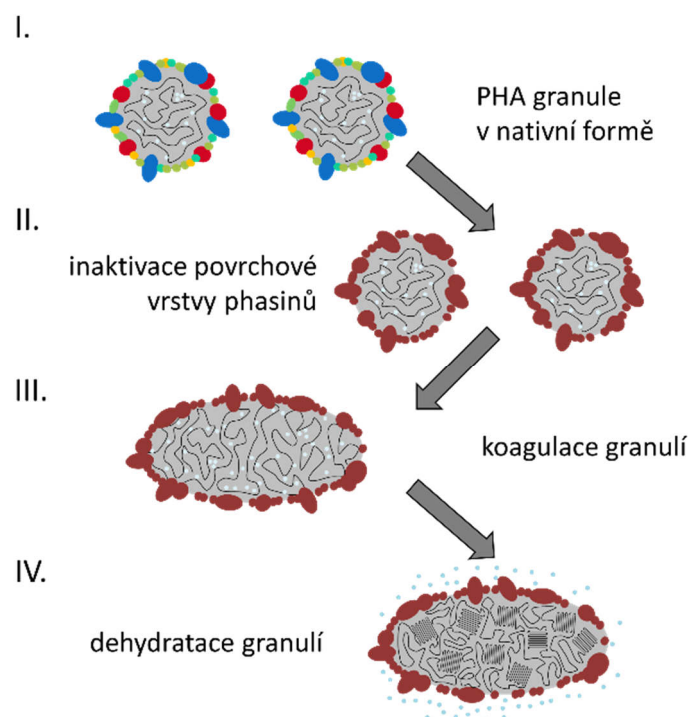
Jak lze vidět na obr. 23, časová prodleva (II.) mezi dehydratací a krystalizací amorfních P3HB granulí odpovídá s největší pravděpodobností době, která je nutná k dehydrataci intracelulární vody z nativních P3HB granulí. Mohlo by se zdát, že tato prodleva nutná k dehydrataci nativních granulí by měla být patrná u všech stresem indukovaných krystalizací. U vzorku exponovaného hypertonickému prostředí však tato časová prodleva chybí (viz obr. 23e). Tato odlišnost je důsledkem velmi rychlé ztráty intracelulární vody, kterou můžeme pozorovat jak na prudce klesající absorbanci při frekvenci související s dehydratací vzorku, tak také na pořízených TEM snímcích, kde je možné pozorovat poškození integrity nativních P3HB granulí, následkem čehož se obsah granule rozlévá do cytoplazmy. Takto poškozené amorfní granule P3HB tak významně urychlují samotnou dehydrataci granulí (viz obr. 24e).



Obr. 24: TEM snímky *C. necator* H16: (a) kontrola, (b) při 50 °C, (c) 80 °C, (d) –30 °C, (e) 200 g/L NaCl a hodnota pH=1 (f). (1.) koagulace P3HB granulí, (2.) plazmolýza, (3.) zhroucení integrity granulí. Měřítka = 1μm.

Mezi další zajímavé výsledky zajisté patří i umístění agregovaných P3HB granulí, a to především v centrálních částech buněk., kde se obvykle iniciuje a probíhá buněčné dělení (Dvorak a kol., 2015). Je pravděpodobné, že agregace P3HB granulí má neblahý vliv na reprodukci bakteriálních buněk. Tento předpoklad byl v rámci prezentované studie experimentálně potvrzen provedením kultivačních viabilitních experimentů, které prokázaly, že schopnost reprodukce byla nejvíce ovlivněna právě u těch vzorků, které byly vystaveny stresům vyvolávajícím agregaci P3HB granulí (tj. vysoká teplota, nízké pH).

Na základě našich experimentů je tedy možné konstatovat, že obě původní hypotézy ve skutečnosti vysvětlují pouze část skutečného mechanismu plastifikace. Představa o tomto mechanismu, aktualizovaná na základě prezentované experimentální studie, uvažuje amorfni stav P3HB granulí v buňkách stabilizovaný jak kineticky v důsledku malé velikosti P3HB granulí, tak i prostřednictvím plastifikátoru, kde tuto roli s největší pravděpodobností plní intracelulární voda. Náš revidovaný mechanismus stabilizace P3HB granulí je obsahem obrázku 25.



Obr. 25: Destabilizace přirozeného plastifikačního mechanismu a krystalizace P3HB granulí in vivo (viz Příloha VI).

3.3 Objasnění protektivních vlastností monomerní jednotky PHB

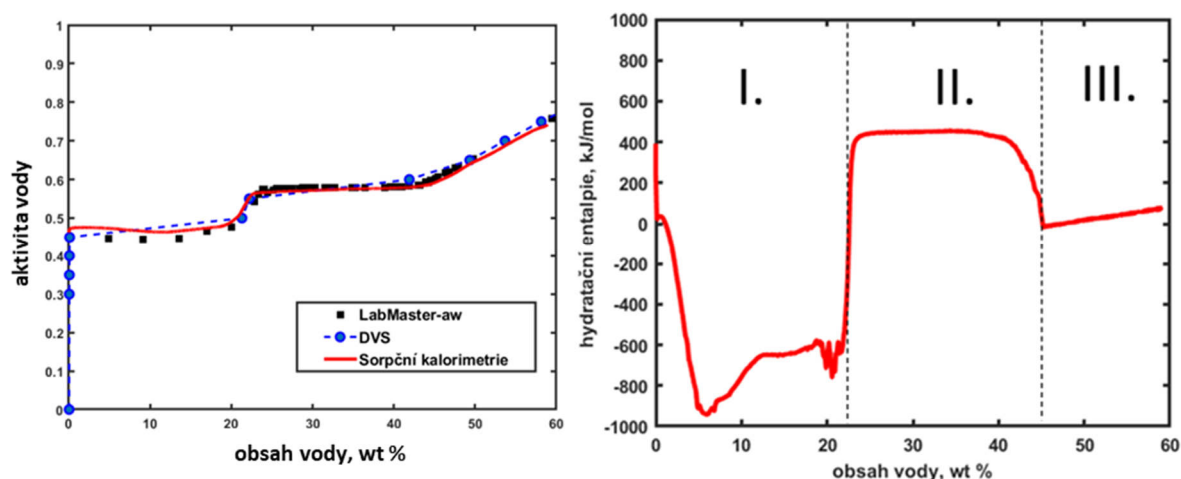
Významná role monomerních jednotek 3HB v mikrobiálních buňkách byla předmětem již několika studií, v nichž byly prokázány jejich překvapivé protektivní vlastnosti. Přítomnost monomerů v buňkách je zajištěn vlivem P3HB cyklu, kdy jsou granule P3HB současně syntetizovány a degradovány (Kadouri a kol., 2005). V posledním desetiletí bylo zjištěno, že monomery 3HB vykazují vlastnosti jak kompatibilních látek chránících bakterie před vysokým osmotickým tlakem prostředí (Soto a kol., 2012), tak chemických chaperonů chránících enzymy (lysozym, lipáza) před vysokou teplotou a oxidačním stresem (Obruca a kol., 2016b). Rovněž bylo potvrzeno, že 3HB slouží i jako potenciální kryoprotektant pro enzymy (lipáza), kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) a bakteriální buňky (*Cupriavidus necator* H16) (Obruca, a kol., 2016a). Nepřímým důkazem významu metabolismu P3HB pro adaptaci prokaryot vůči chladu a mrazení je také skutečnost, že mnoho producentů P3HB bylo identifikováno ve vzorcích exponovaných velmi nízkým teplotám jako je například arktická voda nebo permafrost (Ciesielski a kol., 2012; Goh a Tan, 2012).

Jak už bylo zmíněno výše, stabilizační efekt 3HB v P3HB akumulujících bakteriálních buňkách se uplatňuje při různých stresových podmínkách. Je tedy zřejmé, že protektivní mechanismus 3HB a P3HB je velice komplexní a zahrnuje řadu mechanismů a zároveň je třeba mít na mysli, že protektivní funkci plní v buňkách celá řada dalších metabolitů a molekul. Pro lepší pochopení protektivního účinku 3HB jsme se zaměřili na interakce této molekuly s vodou. Pochopení tohoto fundamentálního vztahu nám může pomoci objasnit vliv 3HB na vlastnosti a chování intracelulární vody. V bakteriálních buňkách jsou proteiny a další buněčné komponenty stabilizovány a chráněny prostřednictvím tzv. kompatibilních látek, které ovlivňují

hydrataci jednotlivých buněčných komponent (da Costa a kol., 1998; Jain a Roy, 2009). Zmíněná stabilizace je rovněž známá pod názvem preferenční stabilizační efekt, který je založen na poklesu aktivity vody v roztoku v důsledku preferenčního navázání právě ke kompatibilním látkám či na povrch proteinu, čímž dochází k exkluzi molekul kompatibilních látek z hydratační vrstvy proteinů (da Costa a kol., 1998). Na základě preferencí vody se tak často setkáváme v buňkách s rozlišením na „nizkohustotní“ a „vysokohustotní“ (Wiggins, 1990). A právě hodnota aktivity vody nám udává, v jaké formě se voda v daném systému nachází. Mohlo by se zdát, že termodynamický stav vody v buňce je stěžejní u dehydratace buněk především v kontextu s osmotickým stresem, avšak dehydratace buňky často nastává i v průběhu pomalého zmrazování, kdy v extracelulárním prostředí vznikají krystalky ledu a odstraňováním kapalné vody tak dochází ke zvyšování koncentrace rozpuštěných látek, což vede ke zvýšení gradientu chemických potenciálů vody v intracelulárním a extracelulárním prostředí (viz podkapitola 2.3.4.1 obr. 13). U vyšších rychlostí zamrazování se v závislosti na aktivitě vody v buňce tvoří krystalky ledu přímo v intracelulárním prostředí, kde poté fatálně ovlivňují fyziologický stav buňky. Je tedy zřejmé, že dostatečné množství intracelulární vody je stěžejní pro děje zajišťující viabilitu buňky (elektronový transfer systémů, metabolická aktivita enzymů aj.) (Mittler, 2002).

Abychom porozuměli tak komplexní problematice, jakou je stabilizační efekt monomerních jednotek 3HB, rozhodli jsme se v této práci podrobně prozkoumat termodynamiku a fázové chování binárního systému 3-hydroxybutyrátu sodného (Na_3HB) s vodou. Jinými slovy jsme se zaměřili na podstatu interakcí monomerních jednotek 3HB a vody a určení hydratační a kryoprotektivní účinnosti 3HB. Kromě vysvětlení přirozených stabilizačních efektů monomerní jednotky v P3HB produkujících buňkách tato studie cílí navíc také na posouzení potenciálu využití 3HB jako alternativního (kryo)protektantu v různých aplikacích. Manuskript článku (v současnosti podléhá recenznímu řízení v časopise *Biomolecules*), který shrnuje tuto experimentální práci je uveden v **Příloze V**. Uvedené výsledky byly získány v rámci pětíměsíční zahraniční stáže pod vedením pana prof. Kocherbitova na univerzitě v Malmö ve Švédsku.

Nejprve jsme se v rámci experimentů zaměřili na posouzení hygroskopičnosti systémů 3HB/voda stanovením sorpční izotermy pro sorpci vodních par na 3HB. Pro tento účel jsme využili hned několik metod, dynamickou sorpční analýzu par (DVS), hygrometr LabMaster-aw (Novasina) a sorpční kalorimetrii. Všechny tyto tři metody jsou založeny na odlišném principu, kdy DVS patří ke gravimetrické metodě měřící rovnovážnou hmotnost vzorku při kontrolované relativní vlhkosti, zatímco vlhkoměr LabMaster-aw, často využívaný v potravinářských oborech, měří aktivitu vody u vzorků s konkrétním množstvím vody. Poslední zvolená technika, sorpční kalorimetrie, je kombinací předchozích dvou metod (měří aktivitu vodních par i její množství nasorbované vzorkem), a navíc nám udává při měření diferenciální adsorpční entalpii. Na základě experimentů při teplotě 25 °C jsme získali sorpční izotermy pro vodní páru, a právě tvar izoterem nám odhalil jednak sorpční afinitu vody na 3HB, jednak přítomnost několika fázových přechodů (viz obr. 26).

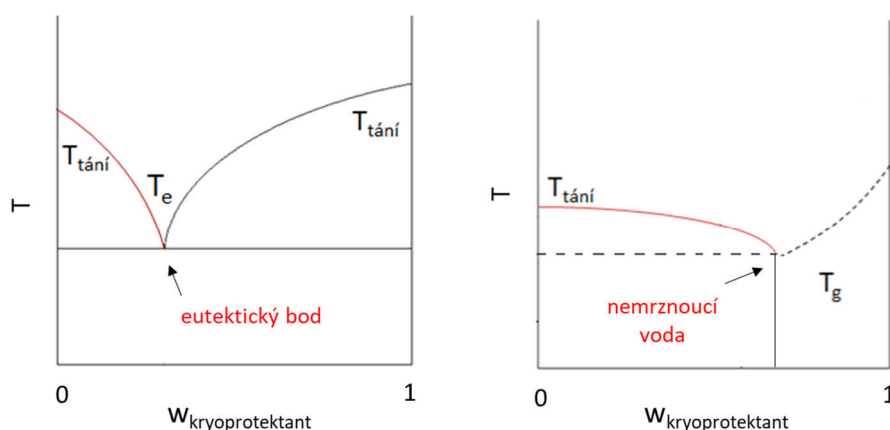


Obr. 26: (nalevo) Sorpční izotermy vodní páry u Na3HB při 25 °C získané pomocí DVS, LabMaster-aw Novasina, a sorpční kalorimetrií. (napravo) Entalpie hydratace Na3HB naměřená sorpčním kalorimetrem při 25 °C.

Ze sorpční izotermy uvedené na obr. 26 je patrné, že krystalický bezvodý Na3HB neabsorbuje žádnou vodu, dokud relativní vlhkost (RH) nepřekročí kritickou hodnotu cca 48,55 hm. %. Toto chování je typické pro krystalické látky a liší se od chování amorfních kryoprotektantů. Takto např. u amorfni trehalózy (běžně využívaná kryoprotektivní látka) nasorbované množství vody roste prakticky lineárně se zvyšující se RH (Roe a Labuza, 2005), zatímco u krystalické α,α -trehalózy (protihrudkující aditivum) činí hodnota kritické RH hranice skoro dvojnásobek oproti 3HB (95 % RH) (Lammert a kol., 1998). Další změna tvaru sorpční izotermy nastává, jakmile je Na3HB z 22,5 hm. % hydratován. To odpovídá přechodu 3HB z bezvodé krystalické formy do formy krystalického dihydrátu. Konkrétní stechiometrie hydrátu (dvě molekuly vody na jednu molekulu Na3HB) byla určena právě z hraniční hmotnostní koncentrace v sorpční izotermě. Další fázová změna nastává při 45,2 hm. % vody ve směsi s Na3HB, kdy je již veškerý krystalický dihydrát rozpuštěn do podoby nasyceného vodného roztoku. Pro vyšší RH je již 3HB pouze ve formě vodného roztoku. Z poměru rovnovážné aktivity a molárního zlomku vody v roztoku je možné pro touto oblast určit aktivitní koeficient vody, resp. jeho závislost na složení roztoku. Hodnota aktivitního koeficientu je v celém rozsahu koncentrací výrazně menší než 1 (v rozsahu od 0,7 do 0,9), což potvrzuje, že Na3HB se ve vodném roztoku chová jako silně hydrofilní látka.

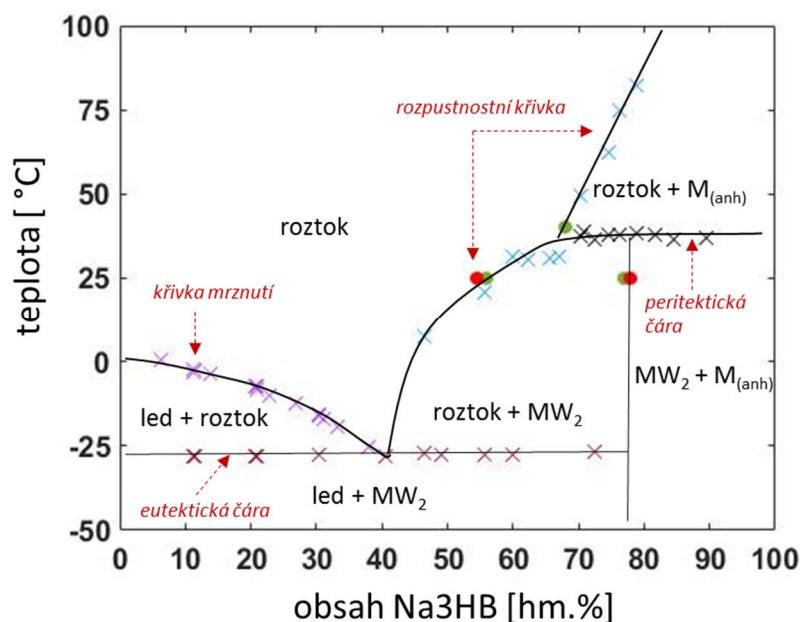
Kromě studia systému Na3HB-voda při laboratorní teplotě jsme se dále zaměřili na kryoprotektivní efekt Na3HB. V tomto případě jsme využili kalorimetrickou analýzu binárních směsí Na3HB/voda o různém složení, která nám umožnila konstruovat binární rovnovážný a nerovnovážný fázový diagram systému a porozumět tak chování různě hydratovaného Na3HB v širokém rozpětí teplot. Při diskusi kryoprotektivních vlastností 3HB je u rovnovážného fázového diagramu pro nás nejvíce podstatná teplota, při které dochází k tání ledu, jinými slovy, jaký efekt má Na3HB na snížení rovnovážné teploty mrznutí vody. Kryoprotektivní účinky za rovnovážných podmínek se projevují snížením teploty tuhnutí vody, které lze vyčíst z křivky tání ledu, kdy strmost křivky (pokles teplot tání ledu) nám udává kryoprotektivní efektivitu dané látky (viz obr. 27 nalevo). Také pozice eutektického bodu, který odpovídá nejnižší teplotě,

při které voda ve dvousložkovém systému mrzne, nám vypovídá o účinnosti kryoprotektantu z hlediska nejnižší možné koncentrace, která s klesajícím zastoupením kryoprotektantu v systému roste. Zato kryoprotektivní účinky za nerovnovážných podmínek se projevují jak množstvím nemrznoucí vody v systému, tak mírou amorfní fáze. Kryoprotektivní účinek látky je opět silnější, pokud zlom, kde již nedochází k tuhnutí vody, se nachází v co nejnižší koncentraci daného kryoprotektantu (viz obr. 27 napravo).



Obr. 27: Schematické fázové diagramy zobrazující kryoprotektivní účinky, (**nalevo**) rovnovážný fázový diagram kompatibilních látek s kryoprotektivním efektem vyjádřeným posunem bodu mrznutí vody a pozicí eutektického bodu (červená křivka), (**napravo**) zjednodušený nerovnovážný fázový diagram kryoprotektivní látky, kryoprotektivní účinky jsou reprezentovány posunem bodu mrznutí vody a množstvím nemrznoucí vody. T_e = eutektický bod, T_g = teplota skelného přechodu.

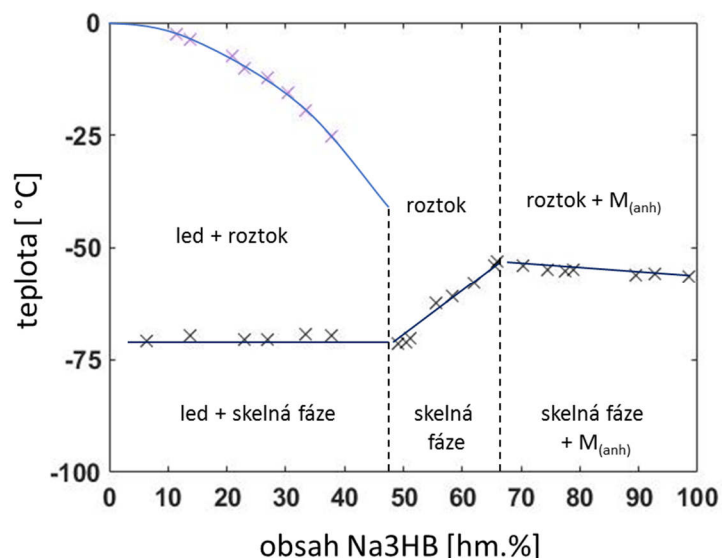
Z naměřených výsledků je patrné, že právě křivka diagramu oddělující pevnou fázi a kapalnou fázi vody má strmě klesající trend oproti známým kryoprotektantům a eutektický bod se nachází při 40,5 % Na₃HB a –28,1 °C (viz obr. 28). To také znamená, že u vyšších koncentrací Na₃HB už v uvedeném dvojsložkovém systému nedochází k tvorbě ledu. Zároveň tento bod představuje maximální posun teploty mrznutí vody způsobený přítomností Na₃HB. Při porovnání s fázovými diagramy běžně využívaných kryoprotektantů, jakým je například trehalóza (Chen a kol., 2000), sacharóza (Mathlouthi a Reiser, 1995) či glycerol (Nakagawa a Oyama, 2019) je posun bodu bod mrznutí vody u systému Na₃HB-voda minimálně porovnatelný či ve většině případů dokonce větší, což je možné považovat za jednu z příčin popsané vysoké kryoprotektivní účinnosti Na₃HB.



Obr. 28: Rovnovážný fázový diagram systému Na₃HB-voda, DSC (×); sorpční kalorimetrie (●), DVS (●).

Pro lepší představu, konkrétní hodnoty eutektického bodu u trehalózy jsou v rozsahu od 2,5 do 18,8 °C (Miller a kol., 1997) a sacharózy –8,5 až 13,95 °C (Young a Jones, 1949). I když je bod tuhnutí vody v přítomnosti glycerolu snížen až na –45 °C, tak koncentrace glycerolu nutná k tomuto snížení činí 65 %. Použijeme-li stejné množství glycerolu jako u eutektického bodu Na₃HB, tzn. okolo 40%, teplota bodu tuhnutí vody se zvýší až na –15,4 °C (Lane, 1925). Z tohoto porovnání vyplývá, že Na₃HB ovlivňuje aktivitu vody přinejmenším stejně efektivně jako známé kompatibilní látky s kryoprotektivním účinkem. Další závěr, který byl potvrzen jak v sorpční analýze, tak na základě skenovací kalorimetrie, je tvorba dihydrátů Na₃HB.

Jak už bylo zmíněno výše, nejen množství, ale i termodynamický stav intracelulární vody je stěžejní pro zachování funkcí buňky při jejím ochlazení pod bod mrazu. Mobilita intracelulární vody je přímo závislá na jejím stavu, při prudkém podchlazení se mobilita molekul vody rapidně sníží, a proto je buňka méně náchylná k dehydrataci mrazem. Snížená mobilita molekul při prudkém ochlazení také znemožňuje systému zaujmout svoji termodynamicky nejvýhodnější podobu, a systém tak setrvává v kineticky stabilizovaném nerovnovážném stavu. Typickým případem takového stavu je stav skelný. Z toho důvodu jsme svoji pozornost upřeli také na skelné přechody dvousložkového systému Na₃HB-voda, jejichž kalorimetrická analýza nám umožnila zkonstruovat fázový diagram systému v nerovnovážném stavu (viz. obr.29).



Obr. 29: Nerovnovážný fázový diagram systému Na3HB-voda stanovený technikou DSC.

Z naměřených výsledků je zřejmé, že skelné přechody v celém rozsahu koncentrací Na3HB lze rozdělit do tří oblastí v závislosti na tepelných kapacitách vzorků, které se zvyšují s obsahem amorfnní fáze. Je zajímavé, že dvě oblasti, v nichž se nachází vždy dvě fáze, konkrétně amorfnní stav společně s ledem a amorfnní stav s krystalickým Na3HB (tudiž na opačných stranách fázového diagramu), se liší ve stechiometrickém poměru vody a Na3HB. Při nižší koncentraci Na3HB (hraniční koncentrace 50 hm. %) připadá 7 molekul vody na jednu molekulu Na3HB, zatímco u vyšší (> 68 hm. %) se počet molekul vody sníží na 3, což opětovně dokazuje vysokou míru hydrofility Na3HB v porovnání například s amorfnní trehalózou, která je schopna pojmout 2 molekuly vody na jednu molekulu (Green a Angell, 1989). Naproti tomu, střední část fázového diagramu je charakterizovaná vcelku konstantní tepelnou kapacitou, která poukazuje na fakt, že veškerý obsah vzorků se nachází v amorfnním stavu. Toto tvrzení je podpořeno i absencí jakýkoliv naměřených endotermních píků odpovídající tání ledu v termogramu. V porovnání s trehalózou (cca 25 °C, 50 hm. %) je teplota skelných přechodů ve střední části diagramu výrazně nižší (Olgenblum a kol., 2020). Nicméně v případě trehalózy to není žádné velké překvapení, protože její vliv na skelný přechod vody je vskutku mimořádný. Porovnáme-li ale 3HB s dalšími kompatibilními látkami jako je sacharóza nebo fruktóza, jsou teploty skelných přechodů vody srovnatelné (Goff a Sahagian, 1996). Na rozdíl od rovnovážného fázového diagramu, ve fázovém diagramu zkonstruovaném na základě nerovnovážných měření není možné přímo určit konkrétní složení směsi Na3HB-voda, při kterém kapalná voda přestává mrznout. Proto jsme využili stanovené hodnoty entalpií tání ledu (vypočtené jako plochy odpovídajících endotermních píků tání ledu) a vynesli je v závislosti na obsahu vody ve vzorku. Extrapolací lineární regrese této závislosti na nulovou entalpii bylo poté stanoveno množství tzv. nemrzoucí vody, která odpovídá přibližně 1,35 g vody na g Na3HB (0,57 g vody na g vzorku). Toto množství nemrzoucí vody je bezkonkurenční v rámci ostatních popsanych biokompatibilních látek, konkrétně při porovnání s fruktózou (0,21 g vody/g), sacharózou (0,26 g vody/g) a trehalózou (0,31 g vody /g) (Xu a kol., 2017).

Naše výsledky ukazují, že protektivní efekt 3HB v biologických systémech je možné přisuzovat jeho unikátnímu fázovému chování ve vztahu k vodě. Biologické konsekvence tohoto zjištění jsou neoddiskutovatelné, 3HB se nevyskytuje pouze v mikroorganismech, jedná se o široce rozšířenou biomolekulu, kterou můžeme najít i v lidském těle, kde je syntetizována v játrech, a tudíž cirkuluje tělem v rámci krevního oběhu. Koncentrace 3HB v krvi u dospělých pohybuje od 5 až 335 $\mu\text{mol/L}$, v případě ketózy mohou koncentrace dosahovat až hodnot 1 mmol/L, za účelem poskytování potřebné energie buňkám při nedostatku glukózy. Zato výskyt 3HB u prokaryotických organismů přímo souvisí se schopností buněk akumulovat P3HB, kdy je tento polymer v buňkách zároveň syntetizován a degradován právě na monomerní jednotky 3HB (více v podkapitole 2.2.1). Z tohoto důvodu je u PHA produkujících mikroorganismů intracelulární koncentrace 3HB až 16,5krát vyšší (100 mmol/L) než u mikrobiálních buněk neschopných syntézy a akumulace P3HB. Nízkomolekulární 3HB se tedy nepochybá kompatibilním látkám pouze vlastnostmi, ale také koncentrací v buňkách.

Potvrzený kryoprotektivní efekt otevírá aplikační škálu například v rámci kryobiologie, kde by se Na3HB dal využít ke stabilizaci různých biologických preparátů, jako jsou například mikrobiální a buněčné kultury, nukleové kyseliny a jiné biologicky aktivní látky za nízkých teplot. Jako další možnost se jeví oblast vymrazování, a to v roli lyoprotektantu. Přirozený výskyt Na3HB v lidském těle i jeho netoxičita rovněž umožňují použít tuto látku v potravinářském průmyslu jako další kryoprotektanty, které se běžně aplikují pro zachování textury, chuti a dalších aspektů po zmrazení a následném rozmrazení (MacDonald a Lanier, 1997). Na3HB je zároveň senzorycky neutrální látka, která neovlivňuje ani chuť či přírodní/přirozené aroma potravin. Velká výhoda Na3HB spočívá v možnostech produkce, jelikož může být produkován jak biotechnologickou, tak syntetickou cestou nebo enzymatickou hydrolýzou P3HB, tudíž by mohl s ohledem na cenu snadněji konkurovat již zavedeným kryokonzervačním látkám (Tokiwa a Ugwu, 2007; Uefuji a kol., 1997)

3.4 Přínos disertační práce k současnému stavu problematiky

Cílem předložené disertační práce je rozšířit současný stav poznání v oblasti biologické role PHA granulí v prokaryotických buňkách. Především jsme se zaměřili na protektivní roli PHA vůči environmentálně významným stresorům a také na pochopení protektivních mechanismů PHA, které nebyly doposud popsány. Obecně je možné konstatovat, že protektivní funkce PHA se na počátku 21. století stala široce diskutovaným tématem, viz. například review Kadouri a kol. 2003. Práce v těchto letech nastínily význam PHA v kontextu stresové odolnosti bakterií, nicméně protektivní mechanismus PHA granulí obvykle nebyl detailně studován. V posledních letech význam PHA v kontextu stresové robustnosti prokaryotických buněk zůstává stále aktuálním, jak dokládá řada publikací, které se protektivní funkci PHA také věnují. Za všechny je možné jmenovat například přehledový článek Müller-Santos a kol., 2020, který byl nedávno publikován prestižním časopise FEMS Microbiology Reviews. Tento článek v řadě aspektů navazuje a dále rozvíjí výsledky a myšlenky publikované výzkumným týmem školitele autorky.

V předložené disertační práci jsme se konkrétně zaměřili na studium protektivních účinků P3HB před UV zářením a osmotickým stresem, v případě druhého stresového faktoru především z hlediska expozice bakterií hypotonickému protředím. Abychom porozuměli jednotlivým protektivním mechanismům vůči daným stresům, zaměřili jsme se jednak na biofyzikální projevy přítomnosti P3HB granulí *in vivo*, ale také na metabolické důsledky spojené s produkcí monomerní jednotky 3HB v rámci metabolické dráhy zvané PHA cyklus. Konkrétní protektivní mechanismus P3HB granulí pochopitelně závisel na konkrétním stresovém faktoru.

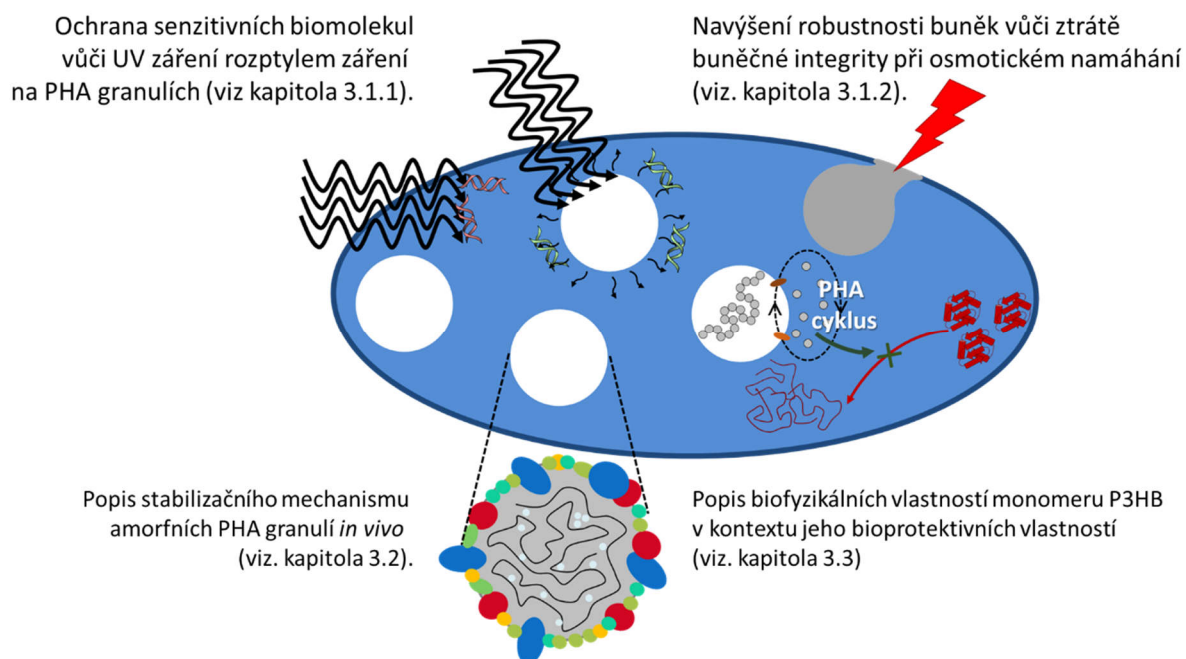
Na základě našich výsledků je možné konstatovat, že v případě expozice buněk UV záření jsou buňky chráněny především díky rozptylu UV záření na P3HB granulích, které snižuje absorpci záření fotolabilními buněčnými komponentami lokalizovanými v jejich těsné blízkosti, konkrétně především molekulami DNA. Rozptyl záření také snižuje intracelulární koncentraci ROS specií, což přispívá k fotoprotektivnímu efektu potlačením sekundárního oxidativního stresu. Studie věnovaná protektivnímu účinku P3HB granulí byla publikována v časopise *Applied Microbiology and Biotechnology* (viz **Příloha I**) a poster věnující se této tématice byl oceněn odbornou komisí vítězstvím v soutěži pořádané v rámci posterové sekce na zahraniční konferenci 10th European Symposium on Biopolymers, která se konala v roce 2019 v německém Straubingu.

Naše práce také prokázala, že při expozici osmotickému stresu se na ochraně buňky podílí amorfni charakter P3HB granulí, který stabilizuje buněčné membrány hypertonicky namáhaných buněk. Při následném hypotonickém šoku jsou pak PHA granule obsahující buňky díky výrazně menší míře poškození cytoplazmatické membrány významně méně náchylné vůči hypotonické lyzi a jsou si schopny lépe udržet svou buněčnou integritu. Zároveň schopnost akumulace PHA snižuje náchylnost halofilních buněk vůči hypotonické lyzi, což může být jedním z důvodů, proč je schopnost akumulace PHA mezi halofilními prokaryoty široce rozšířená. Výsledky této studie byly publikovány v časopise *New Biotechnology* (viz **Příloha III**).

Amorfní stav nativních granulí hraje důležitou roli nejen v rámci jejich protektivních účinků, ale i z hlediska metabolické role P3HB v bakteriálních buňkách, protože buňky jsou schopné využít P3HB granule pouze v jejich nativním amorfním stavu. Z tohoto důvodu jsme se zabývali také stabilizačními mechanismy, které brání P3HB granulím v krystalizaci a udržují tak intracelulární polymer v termodynamicky nevýhodném, ale biologicky nepostradatelném amorfním stavu. Za tímto účelem jsme aplikovali několik vybraných stresů (vysoká teplota, vysoká salinita, nízké pH aj.) a studovali kinetiku krystalizace P3HB *in vivo* v průběhu dehydratace buněk. Na základě výsledků těchto experimentů jsme zjistili, že P3HB granule přechází do krystalické formy pouze, jestliže dojde k agregaci nativních granulí, které jsou následně dehydratovány. To nás vedlo k návrhu nového modelu stabilizace amorfní formy P3HB *in vivo*, který je založen na kombinaci dvou simultánních stabilizačních mechanismů, kdy k plastifikačnímu účinku přispívá jednak malý objem granulí a s tím spojená nízká frekvence nukleace, ale vedle toho také přítomnost vody v granulích, která přispívá k amorfní formě granulí v roli nízkomolekulárního plastifikátoru. Výsledky této studie byly publikovány v časopise *Applied Microbiology and Biotechnology* (viz **příloha IV**). Poznatky o stresem indukované krystalitaci P3HB *in vivo* mají také jednoznačný přesah do oblasti biotechnologické produkce tohoto polymeru. Ukazuje se, že vystavení buněk subletálními dávkami stresu, přestože se nemusí okamžitě fatálně projevit na množství životaschopných buněk, může indukovat změnu biofyzikálního stavu granulí, což ve svém důsledku vede nejen k poklesu produkce z důvodu omezení dělení buněk, ale krystalizace polymeru v buňkách může také negativně ovlivnit jeho rozpustnost a tím i účinnost následného izolačního procesu.

V další práci jsme se zaměřili na studium termodynamických parametrů a fázového chování monomeru P3HB ve vodných směsích. Díky unikátnímu charakteru metabolismu P3HB obsahují buňky schopné syntézy a degradace P3HB granulí významnou intracelulární koncentraci 3HB a i tato molekula přispívá k protektivnímu efektu P3HB granulí, protože 3HB se projevuje jako efektivní chemický chaperon a kryoprotektant. Abychom lépe porozumněli protektivním účinkům 3HB věnovala autorka disertační práce v rámci stáže u prof. Kocherbitova na univerzitě v Malmö studium interakcí 3HB s vodou a vytvoření rovnovážného a nerovnovážného fázového diagramu systému Na3HB-voda. Získaná data potvrzují, že 3HB představuje velice účinný kryoprotektant, který svou účinností může konkurovat například trehalóze nebo glycerolu. Kromě fundamentálního významu v kontextu biologické role P3HB granulí u prokaryot mohou mít tyto výsledky aplikační potenciál například v oblasti úchovy biologických vzorků nebo potravin. Manuskript věnující se této tematice je obsahem **přílohy V** a v současné době podléhá recenznímu řízení.

Klíčové originální poznatky, které předložená disertační práce přináší v kontextu protektivních mechanismů a efektů P3HB v bakteriálních buňkách jsou shrnuty na obrázku 30.



Obr. 30: Souhrn protektivních mechanismů P3HB granulí a jeho monomerní jednotky 3HB.

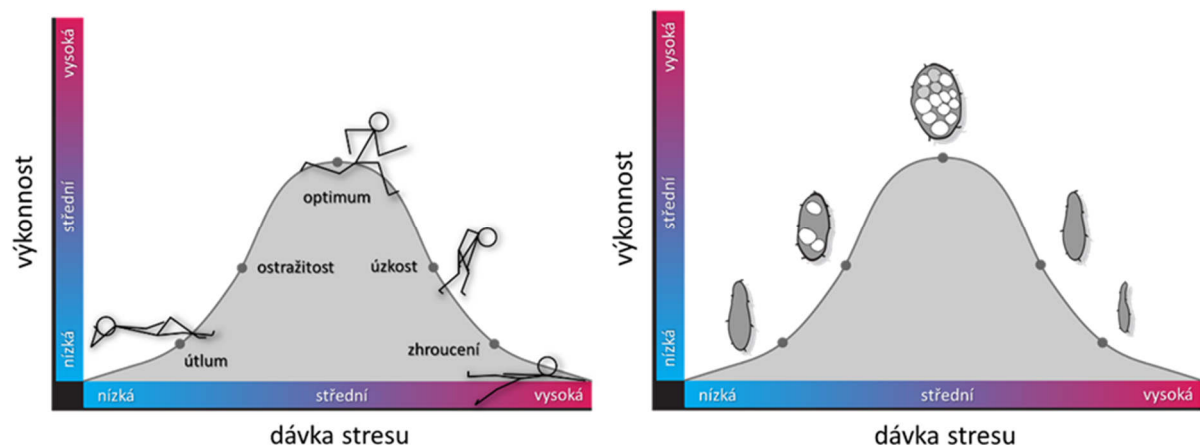
Výsledky výše uvedených prací byly popsány nejen v původních vědeckých článcích uvedených výše, ale také v přehledovém článku, který byl publikován na základě pozvání od šéf-editora časopisu profesora Steinbuchela v časopise *Applied Microbiology and Biotechnology*. V tomto přehledovém článku jsme shrnuli současný stav poznání a především jsme se zaměřili na popis unikátních biofyzikálních a biochemických vlastností PHA granulí, které vycházejí z jejich nativní amorfní povahy. Zároveň jsme se v přehledovém článku dále věnovali mechanismům stabilizujících amorfní stav granulí a představili jsme náš originální koncept, který synergicky propojuje obě stávající navržené teorie tzn. stabilizaci pomocí plastifikátoru a vliv malého objemu granulí na kinetiku krystalizace granulí. Přehledový článek je obsahem **přílohy VI**.

Předložená disertační práce též přispěla v rámci rozvoje celé řady instrumentálních technik a metodik, které nepatří mezi standartně využívané metody v oblasti mikrobiologie, ale ukázaly se jako velmi užitečné při objasnění jak protektivních účinků P3HB, tak stabilizačního mechanismu amorfních P3HB granulí. Jedná se například o kombinaci turbidimetrie s difúzně transmittanční spektroskopií, díky které jsme byli schopni rozlišit mezi absorpcí a rozptylem světla u buněčných suspenzí. Tato technika, kterou jsme za uvedeným účelem doporučili v publikaci z roku 2018 (viz Příloha I), našla v poslední době své uplatnění třeba v práci Tribelli a kol. 2020, která se také věnovala studiu UV protektivní funkce P3HB u antarktické bakterie *Pseudomonas extremaustralis*. Další zajímavou nestandardní technikou použitou v této práci je izotermální termogravimetrie, která byla velmi prospěšná při stanovení množství intracelulární vody a také při analýze integrity buněk. Jako další spektroskopickou metodu, přitahující v poslední době rostoucí pozornost v oblasti charakterizace PHA produkujících bakterií, je možné vyzdvihnout infračervenou spektroskopii, díky které jsme byli v naší práci schopni určit míru krystalinity P3HB *in vivo* měřenou v reálném čase. Na základě právě této

metody jsme byli schopni porozumět podstatě stabilizačního mechanismu amorfních P3HB granulí.

3.5 Budoucí perspektiva výzkumu

Současný stav poznání úlohy P3HB granulí v mikrobiálních buňkách doplněný o originální poznatky, které přinesla tato disertační práce, poukazuje na velmi komplexní roli těchto buněčných útvarů. Širší pohled na rozličné dosud prokázané pozitivní efekty, které schopnost produkce a akumulace PHA granulí buňkám přináší, naznačuje, že tato schopnost představuje určitou evoluční výhodu oproti ostatním mikroorganismům. PHA granule neslouží pouze jako zdroj energie a uhlíku, ale také se podílejí společně s dalšími protektivními mechanismy buňky na ochraně buněk. Buňky jsou díky neustálým fluktuacím environmentálních vlivů v podstatě nepřetržitě exponovány stresu, v důsledku čehož jsou nuceny si vyvinout či zefektivnit již vytvořený obranný mechanismus. Pochopíme-li, jak budou mikroorganismy reagovat na příslušnou intenzitu stresu, budeme s největší pravděpodobností tento poznatek moci využít také technologicky, ať už v rámci predikce chování systému nebo navýšení výkonu daného mikroorganismu (Calabrese, 2014). Zvolená strategie se nemusí týkat pouze okamžité schopnosti organismu přežít drastické dávky stresového faktoru, ale také dlouhodobé adaptace organismu na nízkých dávkách konkrétního stresu či kombinace více stresů. Klíčový parametr v rámci popisu chování organismu (nejen mikroorganismu, ale třeba i lidského jedince) za stresových podmínek představuje vždy konkrétní síla stresu, jíž je organismus vystaven. Jak je známo, vystavení (mikro)organismu mírným stresům způsobí jistou stimulaci obecných ochranných mechanismů, které si tím zvýší schopnost sebeobrany vůči škodlivým podmínkám (Calabrese a Blain, 2011). Tento efekt, výstižně vyjádřený rčením „Co tě nezabije, to tě posílí“, se v rámci evoluční biologie označuje jako *hormeze*. Výsledky předložené disertační práce společně s řadou dalších obecně známých souvislostí mezi expozicí mikroorganismů stresu a jejich schopností produkce PHA (např. široce popsaná schopnost stimulace produkce PHA vhodnou dávkou chemického nebo fyzikálního stresu, (Obruca a kol, 2021) společně vedou k závěru, že produkce PHA ve skutečnosti představuje dosud nepopsaný, i když široce rozšířený, mechanismus hormetické obrany organismu (viz obr. 31). Z biologického hlediska by tento poznatek mohl vést nejen ke zcela nové perspektivě chápání biologické role PHA, ale také ke zvýšení efektivity a ekonomické konkurenceschopnosti biotechnologické výroby PHA. Cílená a kontrolovaná aplikace vybraného stresového faktoru by totiž mohla být využita jako jednoduchý a ekonomicky nenáročný postup pro navýšení akumulace PHA v bakteriálních buňkách během jejich biotechnologické produkce. Právě zapojení PHA do fenoménu hormeze a jeho biotechnologické využití je velice zajímavým a perspektivním směrem dalšího výzkumu v oblasti PHA.



Obr. 31: Produkce a akumulace PHA mikroorganismy jako jeden z projevů hormeze. Společné rysy stresových odpovědí organismů při různých typech stresu: **(vlevo)** Yerkes-Dodsonova křivka používaná psychology pro popis vztahu mezi lidským výkonem a dávkou stresu. **(vpravo)** Stresová robustnost PHA produkujících mikroorganismů.

Nicméně dobře zvolená dávka konkrétního stresu nemusí být využita pouze v rámci zvýšení produkce PHA, ale může ovlivňovat i kvalitu produkovaného materiálu. To se jednoznačně ukazuje například v aktuálně probíhající studii věnované využití extremofilních bakterií při produkci PHA, na které se autorka této práce podílí (výsledky nejsou součástí předložené disertační práce). Využití extremofilních producentů PHA představuje nový a velmi nadějný biotechnologický směr, především z hlediska robustnosti procesů využívajících extremofilní mikroorganismy vůči mikrobiální kontaminaci ubikvitní mezofilní mikroflórou. Ukazuje se navíc, že některé tyto mikroorganismy jsou metabolicky velice flexibilní a jsou schopni při výběru vhodných substrátů měnit v širokém rozsahu monomerní složení produkovaných PHA, a tudíž i jeho výsledné užité vlastnosti (Sedláček a kol., 2020). Takto připravené materiály byly izolovány a ověřovala se jejich použitelnost z hlediska aplikací v potravinářském průmyslu jakožto obalových materiálů. Výsledky těchto dosud nepublikovaných experimentů např. ukazují, že při použití jednoho extremofilního producenta je možné řízením biotechnologického procesu připravit polymerní materiály, u nichž lze na základě manipulace s monomerním složením v širokém rozsahu měnit jejich fyzikální a morfologickou strukturu (krystalinitu), mechanické vlastnosti, bariérové vlastnosti (permeabilitu pro vodní páru nebo kyslík), ale také schopnost inkorporovat aktivní složky a řídit kinetiku jejich následného uvolňování. Podrobný navazující výzkum této problematiky by mohl výrazně zvýšit konkurenceschopnost bakteriálně produkovaných PHA materiálů v oblasti potravinářských aplikací a v moderních směrech průmyslu obalových materiálů (např. produkce tzv. aktivních obalů).

Významný aplikační potenciál se rovněž týká nízkomolekulárních biomolekul Na_3HB , které vykazují velmi silné kryoprotektivní účinky. Tyto látky se běžně vyskytují jak v prokaryotických buňkách, tak i v lidském těle, díky čemuž se otevírá celá škála aplikací, jak lze tento kryoprotektant využít. Jednou z aplikačních možností Na_3HB je v oblasti kryobiologie, kdy lze Na_3HB aplikovat při kryokonzervaci či lyofilizaci různých nestabilních biologických materiálů jako jsou například buněčné kultury, proteiny, nukleové kyseliny,

protilátky a další biologicky aktivní peptidy, vakcíny atd. Další významné uplatnění Na₃HB může být v potravinářském průmyslu, zejména k ochraně potravin před nežádoucími změnami, ať už v rámci struktury či chuti v důsledku zamrazení a následném rozmrazení. Na₃HB se řadí mezi neutrální sensorické látky, čímž je aplikační potenciál rozšířen o použití Na₃HB jako aditivum do mražených potravin, přídavek Na₃HB nebude nijak sensoricky narušovat přirozený sensorický charakter stabilizované potraviny. Také tento aplikační směr je velice zajímavý a jistě by bylo vhodné jej dále experimentálně rozvíjet.

4 LITERATURA

- Apgar, M. E., a Hultin, H. O. (1982). Lipid peroxidation in fish muscle microsomes in the frozen state. *Cryobiology*, 19(2), 154–162. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(82\)90136-5](https://doi.org/10.1016/0011-2240(82)90136-5)
- Ataian, Y., a Krebs, J. E. (2006). Five repair pathways in one context: Chromatin modification during DNA repair. *Biochemistry and Cell Biology*, 84(4), 490–504. <https://doi.org/10.1139/O06-075>
- Ayub, N. D., Pettinari, M. J., Ruiz, J. A., a López, N. I. (2004). A polyhydroxybutyrate-producing *Pseudomonas* sp. isolated from antarctic environments with high stress resistance. *Current Microbiology*, 49(3), 170–174. <https://doi.org/10.1007/s00284-004-4254-2>
- Ayub, N. D., Tribelli, P. M., a López, N. I. (2009). Polyhydroxyalkanoates are essential for maintenance of redox state in the Antarctic bacterium *Pseudomonas* sp. 14-3 during low temperature adaptation. *Extremophiles*, 13(1), 59–66. <https://doi.org/10.1007/s00792-008-0197-z>
- Barria, C., Malecki, M., a Arraiano, C. M. (2013). Bacterial adaptation to cold. *Microbiology (United Kingdom)*, 159(PART 12), 2437–2443. <https://doi.org/10.1099/mic.0.052209-0>
- Batista, M. B., Teixeira, C. S., Sfeir, M. Z. T., Alves, L. P. S., Valdameri, G., Pedrosa, F. D. O., Sasaki, G. L., Steffens, M. B. R., de Souza, E. M., Dixon, R., a Müller-Santos, M. (2018). PHB biosynthesis counteracts redox stress in *Herbaspirillum seropedicae*. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00472>
- Beeby, M., Cho, M., Stubbe, J., a Jensen, G. J. (2012). Growth and localization of polyhydroxybutyrate granules in *Ralstonia eutropha*. *Journal of Bacteriology*, 194(5), 1092–1099. <https://doi.org/10.1128/JB.06125-11>
- Behrends, A., Klingbeil, B., a Jendrossek, D. (1996). Poly(3-hydroxybutyrate) depolymerases bind to their substrate by a C-terminal located substrate binding site. *FEMS Microbiology Letters*, 143(2–3), 191–194. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(96\)00305-9](https://doi.org/10.1016/0378-1097(96)00305-9)
- Bon throne, K. M., Clauss, J., Horowitz, D. M., Hunter, B. K., a Sanders, J. K. M. (1992). The biological and physical chemistry of polyhydroxyalkanoates as seen by NMR spectroscopy. *FEMS Microbiology Letters*, 103(2–4), 269–277. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90320-N](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90320-N)
- Booth, I. R. (1985). Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiological Reviews*, 49(4), 359–378. <https://doi.org/10.1128/mmbr.49.4.359-378.1985>
- Breedveld, M. W., Dijkema, C., Zevenhuizen, L. P. T. M., a Zehnder, A. J. B. (1993). Response of intracellular carbohydrates to a NaCl shock in *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii TA-1 and *Rhizobium meliloti* SU-47. *Journal of General Microbiology*, 139(12), 3157–3163. <https://doi.org/10.1099/00221287-139-12-3157>
- Bresan, S., a Jendrossek, D. (2017). New insights into PhaM-PhaC-mediated localization of polyhydroxybutyrate granules in *Ralstonia eutropha* H16. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(12), 1–14. <https://doi.org/10.1128/AEM.00505-17>
- Bresan, S., Sznajder, A., Hauf, W., Forchhammer, K., Pfeiffer, D., a Jendrossek, D. (2016). Polyhydroxyalkanoate (PHA) granules have no phospholipids. *Scientific Reports*, 6(May), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep26612>
- Briese, B. H., Schmidt, B., a Jendrossek, D. (1994). *Pseudomonas lemoignei* has five poly(hydroxyalkanoic acid) (PHA) depolymerase genes: A comparative study of bacterial and eukaryotic PHA depolymerases. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 2(2), 75–87. <https://doi.org/10.1007/BF02074776>
- Brown, R. B., a Audet, J. (2008). Current techniques for single-cell lysis. *Journal of the Royal Society Interface*, 5(SUPPL.2). <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0009.focus>

- Calabrese, E. J. (2014). In a nutshell Hormesis: a fundamental concept in biology. *OPEN ACCESS | Wwww.Microbialcell.Com* 145 *Microbial Cell*, 1(5). <https://doi.org/10.15698/mic2014.05.145>
- Calabrese, E. J., a Blain, R. B. (2011). The hormesis database: The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 61(1), 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2011.06.003>
- Castañeda, M., Guzmán, J., Moreno, S., a Espín, G. (2000). The GacS sensor kinase regulates alginate and poly- β -hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 182(9), 2624–2628. <https://doi.org/10.1128/JB.182.9.2624-2628.2000>
- Ceccorulli, G., Pizzoli, M., a Scandola, M. (1992). Plasticization of Bacterial Poly(3-hydroxybutyrate). *Macromolecules*, 25(12), 3304–3306. <https://doi.org/10.1021/ma00038a045>
- Chen, G. Q., Hajnal, I., Wu, H., Lv, L., a Ye, J. (2015). Engineering Biosynthesis Mechanisms for Diversifying Polyhydroxyalkanoates. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 33, Issue 10, pp. 565–574). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.07.007>
- Chen, H.-J., Pan, S.-C., a Shaw, G.-C. (2009). Identification and Characterization of a Novel Intracellular Poly(3-Hydroxybutyrate) Depolymerase from *Bacillus megaterium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(16), 5290 LP – 5299. <https://doi.org/10.1128/AEM.00621-09>
- Chen, T., Fowler, A., a Toner, M. (2000). Literature review: Supplemented phase diagram of the trehalose-water binary mixture. *Cryobiology*, 40(3), 277–282. <https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2244>
- Cheng, G., Cai, Z., a Wang, L. (2003). Biocompatibility and biodegradation of poly(hydroxybutyrate)/poly(ethylene glycol) blend films. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 14(12), 1073–1078. <https://doi.org/10.1023/B:JMSM.00000004004.37103.f4>
- Cho, M., Brigham, C. J., Sinskey, A. J., a Stubbe, J. (2012). Purification of polyhydroxybutyrate synthase from its native organism, *Ralstonia eutropha*: Implications for the initiation and elongation of polymer formation in vivo. *Biochemistry*, 51(11), 2276–2288. <https://doi.org/10.1021/bi2013596>
- Choi, J. S., a Park, W. H. (2004). Effect of biodegradable plasticizers on thermal and mechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate). *Polymer Testing*, 23(4), 455–460. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2003.09.005>
- Chung, H. J., Bang, W., a Drake, M. A. (2006). Comprehensive Stress Response of Reviews *Escherichia coli* in Food Science and Food Safety. *Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety*, 5, 52–64.
- Ciesielski, S., Górniak, D., Moć, J., Aleksander, •, Wiaćtecki •, S. ´, Grzesiak, J., a Zdanowski, M. (2012). The Diversity of Bacteria Isolated from Antarctic Freshwater Reservoirs Possessing the Ability to Produce Polyhydroxyalkanoates. *Current Microbiology*, 69, 594–603. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0629-1>
- Cramm, R. (2008). Genomic view of energy metabolism in *Ralstonia eutropha* H16. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 16(1–2), 38–52. <https://doi.org/10.1159/000142893>
- Csonka, L. N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological Reviews*, 53(1), 121–147. <https://doi.org/10.1128/mmbr.53.1.121-147.1989>
- da Costa, M. S., Santos, H., a Galinski, E. A. (1998). An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 61, 117–153. <https://doi.org/10.1007/bfb0102291>
- de Koning, G. J. M., a Lemstra, P. J. (1992). The amorphous state of bacterial poly[(R)-3-

- hydroxyalkanoate]in vivo. *Polymer*, 33(15), 3292–3294. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(92\)90249-V](https://doi.org/10.1016/0032-3861(92)90249-V)
- Dinjaski, N., a Prieto, M. A. (2013). Swapping of phasin modules to optimize the in vivo immobilization of proteins to medium-chain-length polyhydroxyalkanoate granules in *pseudomonas putida*. *Biomacromolecules*, 14(9), 3285–3293. <https://doi.org/10.1021/bm4008937>
- Doi, Y., Kitamura, S., a Abe, H. (1995). Microbial Synthesis and Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules*, 28(14), 4822–4828. <https://doi.org/10.1021/ma00118a007>
- Dong, T. G., Dong, S., Catalano, C., Moore, R., Liang, X., a Mekalanos, J. J. (2015). Generation of reactive oxygen species by lethal attacks from competing microbes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(7), 2181–2186. <https://doi.org/10.1073/pnas.1425007112>
- Dvorak, P., Chrast, L., Nikel, P. I., Fedr, R., Soucek, K., Sedlackova, M., Chaloupkova, R., Lorenzo, V., Prokop, Z., a Damborsky, J. (2015). Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in *Escherichia coli* BL21(DE3) carrying a synthetic metabolic pathway. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0393-3>
- Flickinger, M. C., Drew, S. W., a Wiley, J. (2002). Encyclopedia of Bioprocess Technology. In *Encyclopedia of Bioprocess Technology*. <https://doi.org/10.1002/0471250589>
- Fuller, B. J. (2004). Cryoprotectants: The essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo-Letters*, 25(6), 375–388.
- Gabani, P., a Singh, O. V. (2012). Radiation-resistant extremophiles and their potential in biotechnology and therapeutics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 993–1004. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4642-7>
- Galán, B., Dinjaski, N., Maestro, B., De Eugenio, L. I., Escapa, I. F., Sanz, J. M., García, J. L., a Prieto, M. A. (2011). Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas putida* KT2442. *Molecular Microbiology*, 79(2), 402–418. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07450.x>
- Gascón, J., Oubiña, A., Pérez-Lezaun, A., a Urmeneta, J. (1995). Sensitivity of selected bacterial species to UV radiation. *Current Microbiology*, 30(3), 177–182. <https://doi.org/10.1007/BF00296205>
- Gerngross, T. U., Snell, K. D., Peoples, O. P., Sinskey, A. J., Csuhai, E., Masamune, S., a Stubbe, J. (1994). Overexpression and Purification of the Soluble Polyhydroxyalkanoate Synthase from *Alcaligenes eutrophus*: Evidence for a Required Posttranslational Modification for Catalytic Activity. *Biochemistry*, 33(31), 9311–9320. <https://doi.org/10.1021/bi00197a035>
- Goff, H. D., a Sahagian, M. E. (1996). Glass transitions in aqueous carbohydrate solutions and their relevance to frozen food stability. *Thermochimica Acta*, 280–281(SPEC. ISS.), 449–464. [https://doi.org/10.1016/0040-6031\(95\)02656-8](https://doi.org/10.1016/0040-6031(95)02656-8)
- Goh, L. K., Purama, R. K., a Sudesh, K. (2014). Enhancement of stress tolerance in the polyhydroxyalkanoate producers without mobilization of the accumulated granules. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(3), 1585–1598. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0634-z>
- Goh, Y. S., a Tan, I. K. P. (2012). Polyhydroxyalkanoate production by antarctic soil bacteria isolated from Casey Station and Signy Island. *Microbiological Research*, 167(4), 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.08.002>
- Goosen, N., a Moolenaar, G. F. (2008). Repair of UV damage in bacteria. In *DNA Repair* (Vol. 7, Issue 3, pp. 353–379). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.09.002>
- Grage, K., Jahns, A. C., Parlane, N., Palanisamy, R., Rasiah, I. A., Atwood, J. A., a Rehm, B.

- H. A. (2009). Bacterial polyhydroxyalkanoate granules: Biogenesis, structure, and potential use as nano-/micro-beads in biotechnological and biomedical applications. *Biomacromolecules*, 10(4), 660–669. <https://doi.org/10.1021/bm801394s>
- Green, J. L., a Angell, C. A. (1989). Phase relations and vitrification in saccharide-water solutions and the trehalose anomaly. *Journal of Physical Chemistry*, 93(8), 2880–2882. <https://doi.org/10.1021/j100345a006>
- Handrick, R., Reinhardt, S., Focarete, M. L., Scandola, M., Adamus, G., Kowalczyk, M., a Jendrossek, D. (2001). A New Type of Thermoalkalophilic Hydrolase of *Paucimonas lemoignei* with High Specificity for Amorphous Polyesters of Short Chain-length Hydroxyalkanoic Acids. *Journal of Biological Chemistry*, 276(39), 36215–36224. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101106200>
- Handrick, R., Reinhardt, S., Kimmig, P., a Jendrossek, D. (2004). The “Intracellular” Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) Depolymerase of *Rhodospirillum rubrum*; Is a Periplasm-Located Protein with Specificity for Native PHB and with Structural Similarity to Extracellular PHB Depolymerases. *Journal of Bacteriology*, 186(21), 7243 LP – 7253. <https://doi.org/10.1128/JB.186.21.7243-7253.2004>
- Hazer, B., a Steinbüchel, A. (2007). Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0732-8>
- Hokamura, A., Fujino, K., Isoda, Y., Arizono, K., Shiratsuchi, H., a Matsusaki, H. (2015). Characterization and identification of the proteins bound to two types of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas* SP. 61-3. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 79(8), 1369–1377. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1023250>
- Horowitz, D. M., a Sanders, J. K. M. (1994). *Amorphous, Biomimetic Granules of PHB*. 116(7).
- Hubálek, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. In *Cryobiology* (Vol. 46, Issue 3, pp. 205–229). Academic Press Inc. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00046-4](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00046-4)
- Jaeger, K. E., Steinbuchel, A., a Jendrossek, D. (1995). Substrate specificities of bacterial polyhydroxyalkanoate depolymerases and lipases: Bacterial lipases hydrolyze poly(ω -hydroxyalkanoates). *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8), 3113–3118. <https://doi.org/10.1128/aem.61.8.3113-3118.1995>
- Jain, N. K., a Roy, I. (2009). Effect of trehalose on protein structure. *Protein Science*, 18(1), 24–36. <https://doi.org/10.1002/pro.3>
- Jendrossek, D., Frisse, A., Behrends, A., Andermann, M., Kratzin, H. D., Stanislawski, T., a Schlegel, H. G. (1995). Biochemical and molecular characterization of the *Pseudomonas lemoignei* polyhydroxyalkanoate depolymerase system. *Journal of Bacteriology*, 177(3), 596–607. <https://doi.org/10.1128/jb.177.3.596-607.1995>
- Jendrossek, Dieter. (2007). Peculiarities of PHA granules preparation and PHA depolymerase activity determination. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(6), 1186–1196. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0860-9>
- Jendrossek, Dieter. (2009). Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). *Journal of Bacteriology*, 191(10), 3195–3202. <https://doi.org/10.1128/JB.01723-08>
- Jendrossek, Dieter, a Handrick, R. (2002). Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annual Review of Microbiology*, 56, 403–432. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160838>
- Jendrossek, Dieter, a Pfeiffer, D. (2014). New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). *Environmental Microbiology*, 16(8), 2357–2373. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12356>

- Jung, Y. M., Park, J. S., a Lee, Y. H. (2000). Metabolic engineering of *Alcaligenes eutrophus* through the transformation of cloned *phbCAB* genes for the investigation of the regulatory mechanism of polyhydroxyalkanoate biosynthesis. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2–4), 201–208. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00156-8](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00156-8)
- Kadouri, D., Jurkevitch, E., a Okon, Y. (2003a). Involvement of the reserve material poly- β -hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* stress endurance and root colonization. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3244–3250. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3244-3250.2003>
- Kadouri, D., Jurkevitch, E., a Okon, Y. (2003b). Poly β -hydroxybutyrate depolymerase (PhaZ) in *Azospirillum brasilense* and characterization of a *phaZ* mutant. *Archives of Microbiology*, 180(5), 309–318. <https://doi.org/10.1007/s00203-003-0590-z>
- Kadouri, D., Jurkevitch, E., Okon, Y., a Castro-Sowinski, S. (2005). Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Critical Reviews in Microbiology*, 31(2), 55–67. <https://doi.org/10.1080/10408410590899228>
- Kaisermann, J. (2020). *Nástroje molekulární biologie I*. Cambridge Stanford Books. <https://books.google.cz/books?id=1qP5DwAAQBAJ>
- Kaprálék, F. (1986). *Fyziologie bakterií*. Státní pedagogické nakladatelství.
- Kessler, B., a Witholt, B. (2001). Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *Journal of Biotechnology*, 86(2), 97–104. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00404-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00404-1)
- Kessler, B., a Witholt, B. (2002). Poly(3-Hydroxyalkanoates). In *Encyclopedia of Bioprocess Technology*. American Cancer Society. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/0471250589.ebt168>
- Kim, J., Kim, Y. J., Choi, S. Y., Lee, S. Y., a Kim, K. J. (2017). Crystal structure of *Ralstonia eutropha* polyhydroxyalkanoate synthase C-terminal domain and reaction mechanisms. *Biotechnology Journal*, 12(1). <https://doi.org/10.1002/biot.201600648>
- Kim, Y. J., Choi, S. Y., Kim, J., Jin, K. S., Lee, S. Y., a Kim, K. J. (2017). Structure and function of the N-terminal domain of *Ralstonia eutropha* polyhydroxyalkanoate synthase, and the proposed structure and mechanisms of the whole enzyme. *Biotechnology Journal*, 12(1). <https://doi.org/10.1002/biot.201600649>
- Klingbeil, B., Kroppenstedt, R. M., a Jendrossek, D. (1996). Taxonomic identification of *Streptomyces exfoliatus* K10 and characterization of its poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase gene. *FEMS Microbiology Letters*, 142(2–3), 215–221. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(96\)00271-6](https://doi.org/10.1016/0378-1097(96)00271-6)
- Knoll, M., Hamm, T. M., Wagner, F., Martinez, V., a Pleiss, J. (2009). The PHA Depolymerase Engineering Database: A systematic analysis tool for the diverse family of polyhydroxyalkanoate (PHA) depolymerases. *BMC Bioinformatics*, 10, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-89>
- Koch, A. L. (1995). The geometry and osmotic relations of plasmolysis spaces in bacteria and the role of endocytosis, tubular structures and scheie structures in their formation. In *Journal of Theoretical Biology* (Vol. 176, Issue 4, pp. 471–492). [https://doi.org/10.1006/S0022-5193\(85\)90300-5](https://doi.org/10.1006/S0022-5193(85)90300-5)
- Koller, M. (2015). Recycling of waste streams of the biotechnological poly(hydroxyalkanoate) production by *Haloferax mediterranei* on whey. *International Journal of Polymer Science*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/370164>
- Koller, M., Muhr, A., a Braunnegg, G. (2014). Microalgae as versatile cellular factories for valued products. In *Algal Research* (Vol. 6, Issue PA, pp. 52–63). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.09.002>
- Kouwen, R. H. M., Antelmann, H., Van Ploeg, R. Der, Denham, E. L., Hecker, M., a Van Dijl, J. M. (2009). MscL of *Bacillus subtilis* prevents selective release of cytoplasmic proteins

- in a hypotonic environment. *Proteomics*, 9(4), 1033–1043. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800483>
- Kucera, D., Pernicová, I., Kovalcik, A., Koller, M., Mullerova, L., Sedlacek, P., Mravec, F., Nebesarova, J., Kalina, M., Marova, I., Krzyzanek, V., a Obruca, S. (2018). Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*. *Bioresource Technology*, 256, 552–556. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.062>
- Kumar, A., A. Gross, R., a Jendrosseck, D. (2000). Poly(3-hydroxybutyrate)-depolymerase from *Pseudomonas lemoignei*: Catalysis of Esterifications in Organic Media. *The Journal of Organic Chemistry*, 65(23), 7800–7806. <https://doi.org/10.1021/jo000814y>
- Lammert, A. M., Schmidt, S. J., a Day, G. A. (1998). Water activity and solubility of trehalose. *Food Chemistry*, 61(1–2), 139–144. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00132-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00132-5)
- Lane, L. B. (1925). Freezing Points of Glycerol and its Aqueous Solutions. *Industrial and Engineering Chemistry*, 17(9), 924. <https://doi.org/10.1021/ie50189a017>
- Lauzier, C., Marchessault, R. H., Smith, P., a Chanzy, H. (1992). Structural study of isolated poly(β -hydroxybutyrate) granules. *Polymer*, 33(4), 823–827. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(92\)90343-U](https://doi.org/10.1016/0032-3861(92)90343-U)
- Lauzier, C., Revol, J. F., a Marchessault, R. H. (1992). Topotactic crystallization of isolated poly(β -hydroxybutyrate) granules from *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiology Letters*, 103(2–4), 299–310. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90323-G](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90323-G)
- MacDonald, G. A., a Lanier, T. C. (1997). Cryoprotectants for Improving Frozen-Food Quality. *Quality in Frozen Foods*, 197–232. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5975-7_11
- Madison, L. L., a Huisman, G. W. (1999). Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), 21–53. <https://doi.org/10.1128/mmbr.63.1.21-53.1999>
- Maestro, B., a Sanz, J. M. (2017). Polyhydroxyalkanoate-associated phasins as phylogenetically heterogeneous, multipurpose proteins. *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1323–1337. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12718>
- Marles-Wright, J., a Lewis, R. J. (2007). Stress responses of bacteria. In *Current Opinion in Structural Biology* (Vol. 17, Issue 6, pp. 755–760). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2007.08.004>
- Mas, J., Pedrós-Alió, C., a Guerrero, R. (1985). Mathematical model for determining the effects of intracytoplasmic inclusions on volume and density of microorganisms. *Journal of Bacteriology*, 164(2), 749–756. <https://doi.org/10.1128/JB.164.2.749-756.1985>
- Mathlouthi, M., Reiser, P. (1995). *Sucrose: properties and applications*. Springer Science a Business Media.
- Matsumoto, K., Matsusaki, H., Taguchi, K., Seki, M., a Doi, Y. (2002). Isolation and characterization of polyhydroxyalkanoates inclusions and their associated proteins in *Pseudomonas* sp. 61-3. *Biomacromolecules*, 3(4), 787–792. <https://doi.org/10.1021/bm025516k>
- Matsusaki, H., Manji, S., Taguchi, K., Kato, M., Fukui, T., a Doi, Y. (1998). Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) biosynthesis genes in *Pseudomonas* sp. strain 61-3. *Journal of Bacteriology*, 180(24), 6459–6467. <https://doi.org/10.1128/jb.180.24.6459-6467.1998>
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *The American Journal of Physiology*, 247(3 Pt 1), 0–4. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125>
- Mazur, Peter. (2004). Principles Of Cryobiology. In *Life in the Frozen State*. <https://doi.org/10.1201/9780203647073.ch1>
- Merrick, J. M., a Doudoroff, M. (1964). Depolymerization of poly-beta-hydroxybutyrate by an intracellular enzyme system. *Journal of Bacteriology*, 88(1), 60–71.

- Mezzina, M. P., a Pettinari, M. J. (2016). Phasins, multifaceted polyhydroxyalkanoate granule-associated proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(17), 5060–5067. <https://doi.org/10.1128/AEM.01161-16>
- Miller, D. P., de Pablo, J. J., a Corti, H. (1997). Thermophysical Properties of Trehalose and Its Concentrated Aqueous Solutions. *Pharmaceutical Research*, 14.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405–410. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)
- Miyamoto, C. M., Sun, W., a Meighen, E. A. (1998). The LuxR regulator protein controls synthesis of polyhydroxybutyrate in *Vibrio harveyi*. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1384(2), 356–364. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(98\)00028-4](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(98)00028-4)
- Mohapatra, S., Maity, S., Dash, H. R., Das, S., Pattnaik, S., Rath, C. C., a Samantaray, D. (2017). Bacillus and biopolymer: Prospects and challenges. In *Biochemistry and Biophysics Reports* (Vol. 12, pp. 206–213). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.10.001>
- Moldes, C., García, P., García, J. L., a Prieto, M. A. (2004). In vivo immobilization of fusion proteins on bioplastics by the novel tag BioF. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3205–3212. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3205-3212.2004>
- Mravec, F., Obruca, S., Krzyzanek, V., Sedlacek, P., Hrubanova, K., Samek, O., Kucera, D., Benesova, P., a Nebesarova, J. (2016). Accumulation of PHA granules in *Cupriavidus necator* as seen by confocal fluorescence microscopy. *FEMS Microbiology Letters*, 363(10), 1–7. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw094>
- Muhammadi, Shabina, Afzal, M., a Hameed, S. (2015). Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 8(3–4), 56–77. <https://doi.org/10.1080/17518253.2015.1109715>
- Müller, J., MacEachran, D., Burd, H., Sathitsuksanoh, N., Bi, C., Yeh, Y. C., Lee, T. S., Hillson, N. J., Chhabra, S. R., Singer, S. W., a Beller, H. R. (2013). Engineering of *Ralstonia eutropha* H16 for autotrophic and heterotrophic production of methyl ketones. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(14), 4433–4439. <https://doi.org/10.1128/AEM.00973-13>
- Nakagawa, H., a Oyama, T. (2019). Molecular Basis of Water Activity in Glycerol–Water Mixtures. *Frontiers in Chemistry*, 7(November), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00731>
- Nowroth, V., Marquart, L., a Jendrossek, D. (2016). Low temperature-induced viable but not culturable state of *Ralstonia eutropha* and its relationship to accumulated polyhydroxybutyrate. *FEMS Microbiology Letters*, 363(23), 1–8. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw249>
- Obruca, S., Marova, I., Svoboda, Z., a Mikulikova, R. (2010). Use of controlled exogenous stress for improvement of poly(3-hydroxybutyrate) production in *Cupriavidus necator*. *Folia Microbiologica*, 55(1), 17–22. <https://doi.org/10.1007/s12223-010-0003-z>
- Obruca, Stanislav, Sedlacek, P., a Koller, M. (2021). The underexplored role of diverse stress factors in microbial biopolymer synthesis. *Bioresource Technology*, 124767. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124767>
- Obruca, Stanislav, Sedlacek, P., Koller, M., Kucera, D., a Pernicova, I. (2018). Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. In *Biotechnology Advances* (Vol. 36, Issue 3, pp. 856–870). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.006>
- Obruca, Stanislav, Sedlacek, P., Krzyzanek, V., Mravec, F., Hrubanova, K., Samek, O., Kucera, D., Benesova, P., a Marova, I. (2016). Accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) helps

- bacterial cells to survive freezing. *PLoS ONE*, 11(6), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157778>
- Obruca, Stanislav, Sedlacek, P., Mravec, F., Krzyzanek, V., Nebesarova, J., Samek, O., Kucera, D., Benesova, P., Hrubanova, K., Milerova, M., a Marova, I. (2017). The presence of PHB granules in cytoplasm protects non-halophilic bacterial cells against the harmful impact of hypertonic environments. *New Biotechnology*, 39, 68–80. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.07.008>
- Obruca, Stanislav, Sedlacek, P., Mravec, F., Samek, O., a Marova, I. (2016). Evaluation of 3-hydroxybutyrate as an enzyme-protective agent against heating and oxidative damage and its potential role in stress response of poly(3-hydroxybutyrate) accumulating cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(3), 1365–1376. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7162-4>
- Obruca, Stanislav, Sedlacek, P., Slaninova, E., Fritz, I., Daffert, C., Meixner, K., Sedrlova, Z., a Koller, M. (2020). Novel unexpected functions of PHA granules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(11), 4795–4810. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10568-1>
- Olgenblum, G. I., Sapir, L., a Harries, D. (2020). Properties of Aqueous Trehalose Mixtures: Glass Transition and Hydrogen Bonding. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 16(2), 1249–1262. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.9b01071>
- Ollivier, B., Caumette, P., Garcia, J. L., a Mah, R. A. (1994). Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiological Reviews*, 58(1), 27–38. <https://doi.org/10.1128/membr.58.1.27-38.1994>
- Ong, S. Y., Chee, J. Y., a Sudesh, K. (2017). Degradation of Polyhydroxyalkanoate (PHA): a Review. *Journal of Siberian Federal University. Biology*, 10(2), 21–225. <https://doi.org/10.17516/1997-1389-0024>
- Paunescu, D., Mora, C. A., Puddu, M., Krumeich, F., a Grass, R. N. (2014). DNA protection against ultraviolet irradiation by encapsulation in a multilayered SiO₂/TiO₂ assembly. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(48), 8504–8509. <https://doi.org/10.1039/c4tb01552e>
- Pavez, P., Castillo, J. L., González, C., a Martínez, M. (2009). Poly-β-hydroxyalkanoate exert a protective effect against carbon starvation and frozen conditions in *Sphingopyxis chilensis*. *Current Microbiology*, 59(6), 636–640. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9485-9>
- Pernicova, I., Novackova, I., Sedlacek, P., Kourilova, X., Kalina, M., Kovalcik, A., Koller, M., Nebesarova, J., Krzyzanek, V., Hrubanova, K., Masilko, J., Slaninova, E., a Obruca, S. (2020). Introducing the newly isolated bacterium *aneurinibacillus* sp. H1 as an auspicious thermophilic producer of various polyhydroxyalkanoates (PHA) copolymers-1. isolation and characterization of the bacterium. *Polymers*, 12(6), 1–13. <https://doi.org/10.3390/POLYM12061235>
- Pfeiffer, D., Wahl, A., a Jendrossek, D. (2011). Identification of a multifunctional protein, PhaM, that determines number, surface to volume ratio, subcellular localization and distribution to daughter cells of poly(3-hydroxybutyrate), PHB, granules in *Ralstonia eutropha* H16. *Molecular Microbiology*, 82(4), 936–951. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07869.x>
- Pham, T. H., Webb, J. S., a Rehm, B. H. A. (2004). The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. *Microbiology*, 150(10), 3405–3413. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27357-0>
- Philip, S., Keshavarz, T., a Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology a Biotechnology*, 82(3), 233–247. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jctb.1667>
- Pohlmann, A., Fricke, W. F., Reinecke, F., Kusian, B., Liesegang, H., Cramm, R., Eitinger, T.,

- Ewering, C., Pötter, M., Schwartz, E., Strittmatter, A., Voß, I., Gottschalk, G., Steinbüchel, A., Friedrich, B., a Bowien, B. (2006). Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nature Biotechnology*, 24(10), 1257–1262. <https://doi.org/10.1038/nbt1244>
- Porter, M., a Yu, J. (2011). Crystallization Kinetics of Poly(3-hydroxybutyrate) Granules in Different Environmental Conditions. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 02(03), 301–310. <https://doi.org/10.4236/jbnnb.2011.23037>
- Pötter, M., Madkour, M. H., Mayer, F., a Steinbüchel, A. (2002). Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology*, 148(8), 2413–2426. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-8-2413>
- Pötter, M., Müller, H., a Steinbüchel, A. (2005). Influence of homologous phasins (PhaP) on PHA accumulation and regulation of their expression by the transcriptional repressor PhaR in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology*, 151(3), 825–833. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27613-0>
- Quesada, E., a Proteose, D. (1984). *Deleya halophila*,. July, 287–292.
- Raiger-Iustman, L. J., a Ruiz, J. A. (2008). The alternative sigma factor, σ S, affects polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiology Letters*, 284(2), 218–224. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01203.x>
- Reddy, C. S. K., Ghai, R., Rashmi, a Kalia, V. C. (2003). Polyhydroxyalkanoates: An overview. In *Bioresource Technology* (Vol. 87, Issue 2, pp. 137–146). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00212-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00212-2)
- Rehm, B. H. A. (2003). Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochemical Journal*, 376(1), 15–33. <https://doi.org/10.1042/bj20031254>
- Rehm, B. H. A. (2006). Genetics and biochemistry of polyhydroxyalkanoate granule self-assembly: The key role of polyester synthases. *Biotechnology Letters*, 28(4), 207–213. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-5521-4>
- Reinecke, F., a Steinbüchel, A. (2008). *Ralstonia eutropha* strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 16(1–2), 91–108. <https://doi.org/10.1159/000142897>
- Roberts, M. (2005). Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems*, 1(1), 1–30. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-1-5>
- Rodríguez-Contreras, A., Koller, M., Miranda-de Sousa Dias, M., Calafell-Monfort, M., Braunegg, G., a Marqués-Calvo, M. S. (2013). High production of poly(3-hydroxybutyrate) from a wild *Bacillus megaterium* Bolivian strain. *Journal of Applied Microbiology*, 114(5), 1378–1387. <https://doi.org/10.1111/jam.12151>
- Roe, K. D., a Labuza, T. P. (2005). Glass transition and crystallization of amorphous trehalose-sucrose mixtures. *International Journal of Food Properties*, 8(3), 559–574. <https://doi.org/10.1080/10942910500269824>
- Ron, E. Z. (2013). Bacterial Stress Response. In *The Prokaryotes* (pp. 589–603). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30141-4_79
- Saito, Y., a Doi, Y. (1994). Microbial synthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in *Comamonas acidovorans*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 16(2), 99–104. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(94\)90022-1](https://doi.org/10.1016/0141-8130(94)90022-1)
- Savenkova, L., Gercberga, Z., Bibers, I., a Kalnin, M. (2000). Effect of 3-hydroxy valerate content on some physical and mechanical properties of polyhydroxyalkanoates produced by *Azotobacter chroococcum*. *Process Biochemistry*, 36(5), 445–450. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00235-1)
- Schwarz, H., a Koch, A. L. (1995). Phase and electron microscopic observations of osmotically induced wrinkling and the role of endocytotic vesicles in the plasmolysis of the Gram-

- negative cell wall. *Microbiology*, 141(12), 3161–3170. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-12-3161>
- Sedlacek, P., Pernicova, I., Novackova, I., Kourilova, X., Kalina, M., Kovalcik, A., Koller, M., Nebesarova, J., Krzyzanek, V., Hrubanova, K., Masilko, J., Slaninova, E., Trudicova, M., a Obruca, S. (2020). Introducing the newly isolated bacterium *Aneurinibacillus* sp. H1 as an auspicious thermophilic producer of various polyhydroxyalkanoates (PHA) copolymers-2. Material study on the produced copolymers. *Polymers*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/POLYM12061298>
- Sedlacek, P., Slaninova, E., Enev, V., Koller, M., Nebesarova, J., Marova, I., Hrubanova, K., Krzyzanek, V., Samek, O., a Obruca, S. (2019). What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(4), 1905–1917. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-09584-z>
- Sedlacek, P., Slaninova, E., Koller, M., Nebesarova, J., Marova, I., Krzyzanek, V., a Obruca, S. (2019). PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances. *New Biotechnology*, 49, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.10.005>
- Sévin, D. C., a Sauer, U. (2014). Ubiquinone accumulation improves osmotic-stress tolerance in *Escherichia coli*. *Nature Chemical Biology*, 10(4), 266–272. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1437>
- Singh, O. V., a Chandel, A. K. (2018). Sustainable biotechnology-enzymatic resources of renewable energy. In *Sustainable Biotechnology- Enzymatic Resources of Renewable Energy*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-95480-6>
- Slaninova, E., Sedlacek, P., Mravec, F., Mullerova, L., Samek, O., Koller, M., Hesko, O., Kucera, D., Marova, I., a Obruca, S. (2018). Light scattering on PHA granules protects bacterial cells against the harmful effects of UV radiation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(4), 1923–1931. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8760-8>
- Soto, G., Setten, L., Lisi, C., Maurelis, C., Mozzicafreddo, M., Cuccioloni, M., Angeletti, M., a Ayub, N. D. (2012). Hydroxybutyrate prevents protein aggregation in the halotolerant bacterium *Pseudomonas* sp. CT13 under abiotic stress. *Extremophiles*, 16(3), 455–462. <https://doi.org/10.1007/s00792-012-0445-0>
- Storz, G., a Hengge, R. (Eds.). (2011). *Bacterial stress responses* (second). ASM Press.
- Stubbe, J. A., Tian, J., He, A., Sinskey, A. J., Lawrence, A. G., a Liu, P. (2005). Nontemplate-dependent polymerization processes: Polyhydroxyalkanoate synthases as a paradigm. *Annual Review of Biochemistry*, 74, 433–480. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133013>
- Sudesh, K., Abe, H., a Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. In *Progress in Polymer Science (Oxford)* (Vol. 25, Issue 10, pp. 1503–1555). Elsevier Science Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(00\)00035-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(00)00035-6)
- Sudesh, Kumar, Bhubalan, K., Chuah, J. A., Kek, Y. K., Kamilah, H., Sridewi, N., a Lee, Y. F. (2011). Synthesis of polyhydroxyalkanoate from palm oil and some new applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5), 1373–1386. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3098-5>
- Sugiyama, A., Kobayashi, T., Shiraki, M., a Saito, T. (2004). Roles of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase and 3HB-oligomer hydrolase in bacterial PHB metabolism. *Current Microbiology*, 48(6), 424–427. <https://doi.org/10.1007/s00284-003-4227-x>
- Takahashi, A., a Ohnishi, T. (2009). Molecular mechanisms involved in adaptive responses to radiation, UV light, and Heat. *Journal of Radiation Research*, 50(5), 385–393. <https://doi.org/10.1269/jrr.09048S>

- Takahashi, R. Y. U., Castilho, N. A. S., da Silva, M. A. C., Miotto, M. C., a Lima, A. O. de S. (2017). Prospecting for marine bacteria for polyhydroxyalkanoate production on low-cost substrates. *Bioengineering*, 4(3). <https://doi.org/10.3390/bioengineering4030060>
- Tal, S., a Okon, Y. (1985). Production of the reserve material poly- β -hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. *Canadian Journal of Microbiology*, 31(7), 608–613. <https://doi.org/10.1139/m85-115>
- Tian, J., Sinskey, A. J., a Stubbe, J. A. (2005). Kinetic studies of polyhydroxybutyrate granule formation in *Wautersia eutropha* H16 by transmission electron microscopy. *Journal of Bacteriology*, 187(11), 3814–3824. <https://doi.org/10.1128/JB.187.11.3814-3824.2005>
- Timm, A., a Steinbuchel, A. (1992). Cloning and molecular analysis of the poly(3- β -hydroxyalkanoic acid) gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *European Journal of Biochemistry*, 209(1), 15–30. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17256.x>
- Tokiwa, Y., a Ugwu, C. U. (2007). Biotechnological production of (R)-3-hydroxybutyric acid monomer. In *Journal of Biotechnology* (Vol. 132, Issue 3, pp. 264–272). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.03.015>
- Tribelli, P. M., a López, N. I. (2011). Poly(3-hydroxybutyrate) influences biofilm formation and motility in the novel Antarctic species *Pseudomonas extremaustralis* under cold conditions. *Extremophiles*, 15(5), 541–547. <https://doi.org/10.1007/s00792-011-0384-1>
- Tribelli, P. M., Pezzoni, M., Brito, M. G., Montesinos, N. V., Costa, C. S., a López, N. I. (2020). Response to lethal UVA radiation in the Antarctic bacterium *Pseudomonas extremaustralis*: polyhydroxybutyrate and cold adaptation as protective factors. *Extremophiles*, 24(2), 265–275. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01152-1>
- Uchino, K., Saito, T., a Jendrossek, D. (2008). Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase PhaZa1 is involved in mobilization of accumulated PHB in *Ralstonia eutropha* H16. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(4), 1057–1063. <https://doi.org/10.1128/AEM.02342-07>
- Uefuji, M., Kasuya, K. I., a Doi, Y. (1997). Enzymatic degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate]: Secretion and properties of PHB depolymerase from *Pseudomonas stutzeri*. *Polymer Degradation and Stability*, 58(3), 275–281. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(97\)00058-X](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(97)00058-X)
- Vary, P. S., Biedendieck, R., Fuerch, T., Meinhardt, F., Rohde, M., Deckwer, W. D., a Jahn, D. (2007). *Bacillus megaterium*-from simple soil bacterium to industrial protein production host. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(5), 957–967. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1089-3>
- Volova, T. G. (2004). *Polyhydroxyalkanoates--plastic materials of the 21st century: production, properties, applications*. Nova publishers.
- Wahl, A., Schuth, N., Pfeiffer, D., Nussberger, S., a Jendrossek, D. (2012). PHB granules are attached to the nucleoid via PhaM in *Ralstonia eutropha*. *BMC Microbiology*, 12(iv). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-262>
- Wang, Q., Yu, H., Xia, Y., Kang, Z., a Qi, Q. (2009). Complete PHB mobilization in *Escherichia coli* enhances the stress tolerance: A potential biotechnological application. *Microbial Cell Factories*, 8, 47. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-47>
- Wen, X., Lu, X., Peng, Q., Zhu, F., a Zheng, N. (2012). Crystallization behaviors and morphology of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 109(2), 959–966. <https://doi.org/10.1007/s10973-011-1768-2>
- Wieczorek, R., Pries, A., Steinbuchel, A., a Mayer, F. (1995). Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Bacteriology*, 177(9), 2425–2435. <https://doi.org/10.1128/jb.177.9.2425-2435.1995>

- Wiggins, P. M. (1990). Role of water in some biological processes. *Microbiological Reviews*, 54(4), 432–449. <https://doi.org/10.1128/mmbr.54.4.432-449.1990>
- Wood, J. M. (2015). Bacterial responses to osmotic challenges. *Journal of General Physiology*, 145(5), 381–388. <https://doi.org/10.1085/jgp.201411296>
- Wu, D., He, J., Gong, Y., Chen, D., Zhu, X., Qiu, N., Sun, M., Li, M., a Yu, Z. (2011). Proteomic analysis reveals the strategies of *Bacillus thuringiensis* YBT-1520 for survival under long-term heat stress. *Proteomics*, 11(13), 2580–2591. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000392>
- Wu, H. A., Sheu, D. S., a Lee, C. Y. (2003). Rapid differentiation between short-chain-length and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria with spectrofluorometry. *Journal of Microbiological Methods*, 53(1), 131–135. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00232-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00232-4)
- Xiao, N., Jiao, N., a Liu, Y. (2015). In vivo and in vitro observations of polyhydroxybutyrate granules formed by *Dinoroseobacter* sp. JL 1447. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 467–475. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.11.045>
- Xu, M., Chen, G., Zhang, C., a Zhang, S. (2017). Study on the Unfrozen Water Quantity of Maximally Freeze-Concentrated Solutions for Multicomponent Lyoprotectants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106(1), 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.05.007>
- York, G. M., Stubbe, J., a Sinskeyl, A. J. (2002). The *ralstonia eutropha* PhaR protein couples synthesis of the PhaP phasin to the presence of polyhydroxybutyrate in cells and promotes polyhydroxybutyrate production. *Journal of Bacteriology*, 184(1), 59–66. <https://doi.org/10.1128/JB.184.1.59-66.2002>
- Young, F. E., a Jones, F. T. (1949). Sucrose hydrates: The sucrose-water phase diagram. *Journal of Physical a Colloid Chemistry*, 53(9), 1334–1350. <https://doi.org/10.1021/j150474a004>
- Zepp, R. G., Erickson III, D. J., Paul, N. D., a Sulzberger, B. (2011). Effects of solar UV radiation and climate change on biogeochemical cycling: interactions and feedbacks. *Photochemical a Photobiological Sciences*, 10(2), 261. <https://doi.org/10.1039/c0pp90037k>
- Zhao, Y. H., Li, H. M., Qin, L. F., Wang, H. H., a Chen, G. Q. (2007). Disruption of the polyhydroxyalkanoate synthase gene in *Aeromonas hydrophila* reduces its survival ability under stress conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 276(1), 34–41. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00904.x>

5 SEZNAM PŘÍLOH A PODÍL AUTORKY NA PUBLIKACÍCH

Příloha I

SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; MÜLLEROVÁ, L.; SAMEK, O.; KOLLER, M.; HESKO, O.; KUČERA, D.; MÁROVÁ, I.; OBRUČA, S. Light scattering on PHA granules protects bacterial cells against the harmful effects of UV radiation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, roč. 102, č. 4, s. 1923-1931. ISSN: 1432-0614.

Eva Slaninová prováděla velkou část experimentální práce – kultivaci mikrobiálních kultur, posouzení vliv UV záření na viabilitu mikrobiálních kultur, zároveň navrhovala a realizovala experimenty využívající UV-VIS spektrofotometrii. Dále se studentka zapojila do vyhodnocení a zpracování dat a také se autorsky spolupodílela na přípravě manuskriptu. Podle systému Apollo jí v autorském kolektivu přísluší autorský podíl 20 %.

Příloha II

Experimentální protokoly dosud nepublikované studie, zaměřené na vazebné interakce proteinu PhaM a syntázy PhaC a jejich zkrácených forem v rámci zahraniční stáže na University of Stuttgart v Německu pod odborným vedením profesora Jendrosska.

Příloha III

SEDLÁČEK, P.; SLANINOVÁ, E.; KOLLER, M.; NEBESAROVA, J.; MÁROVÁ, I.; KRZYZANEK, L.; OBRUČA, S. PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances. *New Biotechnology*, 2019, roč. 49, č. 3, s. 129-136. ISSN: 1871-6784.

Eva Slaninová byla zodpovědná za realizaci kultivačních experimentů, prováděla měření viability a stanovení počtu mikrobiálních buněk pomocí průtokové cytometrie i pomocí stanovení počtu CFU. Dále se spolupodílela na analýzách mikrobiálních buněk pomocí TGA i TEM. Také se zapojila do zpracování a interpretace dat a autorsky se spolupodílela na přípravě experimentální a výsledkové části manuskriptu. Podle systému Apollo jí v autorském kolektivu přísluší autorský podíl 25 %.

Příloha IV:

SEDLÁČEK, P.; SLANINOVÁ, E.; ENEV, V.; KOLLER, M.; NEBESAROVA, J.; KRZYZANEK, V.; SAMEK, O.; MÁROVÁ, I.; OBRUČA, S. What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, roč. 103, č. 4, s. 1905-1917. ISSN: 0175-7598.

*Stejně jako v předchozích případech byla Eva Slaninová zodpovědná za veškeré kultivační a stresové experimenty, aktivně se spolupodílela na designu experimentů a výběru vhodných stresových faktorů, provedla testy stanovení viability buněčné kultury *C. necator* H16 po vystavení vybraným stresovým faktorům a zároveň připravovala vzorky pro TEM a cryo-SEM*

analýzu. Studentka se opět podílela na vyhodnocení dat a formulaci závěrů a aktivně se spolupodílela na přípravě manuskriptu. Podle systému Apollo jí v autorském kolektivu patří autorský podíl 25 %.

Příloha V

SLANINOVÁ, E.; OBRUČA, S.; KORCHEBITOV, V.; SEDLÁČEK, P. On the bioprotective effects of sodium 3-hydroxybutyrate: thermodynamic study of binary Na3HB-water systems. V recenzním řízení v časopise *Biomolecules*.

Eva Slaninová prováděla veškerou experimentální práci v rámci pětiměsíční zahraniční stáže – stanovení sorpční izoterm pro sorpci vodních par na 3HB, posouzení hygroskopičnosti systémů 3HB/voda a realizovala měření využívající kalorimetrickou analýzu, díky které bylo možné konstruovat binární rovnovážný a nerovnovážný fázový diagram systému Na3HB/voda a stanovit tak kryoprotektivní účinek 3HB. Dále se studentka zapojila do vyhodnocení a zpracování dat a také se autorsky podílela na přípravě manuskriptu.

Příloha VI

OBRUČA, S.; SEDLÁČEK, P.; SLANINOVÁ, E.; FRITZ, I.; DAFFERT, C.; MEIXNER, K.; ŠEDRLOVÁ, Z.; KOLLER, M. Novel unexpected functions of PHA granules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, roč. 104, č. 11, s. 4795-4810. ISSN: 0175-7598.

Při přípravě tohoto zvaného přehledového článku byla Eva Slaninová zodpovědná především za pasáž věnující se struktuře PHA granulí a také proteinům vázajících se na granule. Dále se studentka aktivně podílela na konceptu celého review a při finalizaci článku byla zodpovědná za naplnění všech formálních požadavků časopisu. Podle systému Apollo jí v autorském kolektivu náleží autorský podíl 10 %.

6 PŘÍLOHY

6.1 Příloha I

SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; MÜLLEROVÁ, L.; SAMEK, O.; KOLLER, M.; HESKO, O.; KUČERA, D.; MÁROVÁ, I.; OBRUČA, S. Light scattering on PHA granules protects bacterial cells against the harmful effects of UV radiation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, roč. 102, č. 4, s. 1923-1931. ISSN: 1432-0614.



Light scattering on PHA granules protects bacterial cells against the harmful effects of UV radiation

Eva Slaninova¹ · Petr Sedlacek¹ · Filip Mravec¹ · Lucie Mullerova¹ · Ota Samek² · Martin Koller^{3,4} · Ondrej Hesko¹ · Dan Kucera¹ · Ivana Marova¹ · Stanislav Obruca¹

Received: 12 September 2017 / Revised: 3 January 2018 / Accepted: 4 January 2018 / Published online: 19 January 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Numerous prokaryotes accumulate polyhydroxyalkanoates (PHA) in the form of intracellular granules. The primary function of PHA is the storage of carbon and energy. Nevertheless, there are numerous reports that the presence of PHA granules in microbial cells enhances their stress resistance and fitness when exposed to various stress factors. In this work, we studied the protective mechanism of PHA granules against UV irradiation employing *Cupriavidus necator* as a model bacterial strain. The PHA-accumulating wild type strain showed substantially higher UV radiation resistance than the PHA non-accumulating mutant. Furthermore, the differences in UV-Vis radiation interactions with both cell types were studied using various spectroscopic approaches (turbidimetry, absorption spectroscopy, and nephelometry). Our results clearly demonstrate that intracellular PHA granules efficiently scatter UV radiation, which provides a substantial UV-protective effect for bacterial cells and, moreover, decreases the intracellular level of reactive oxygen species in UV-challenged cells. The protective properties of the PHA granules are enhanced by the fact that granules specifically bind to DNA, which in turn provides shield-like protection of DNA as the most UV-sensitive molecule. To conclude, the UV-protective action of PHA granules adds considerable value to their primary storage function, which can be beneficial in numerous environments.

Keywords Polyhydroxyalkanoates · *Cupriavidus necator* · UV radiation · Turbidity · Integrating sphere · Nephelometry

Introduction

Bacteria are fascinating organisms due to their capability to cope with widely fluctuating environmental conditions such as changes in nutrient availability, temperature, pH value, or osmolarity. In addition, also radiation, which can be defined as energy manifested in the form of electromagnetic waves, can be considered an important stress factor and occurs in

numerous ecological niches. UV radiation in sunlight is among the most common stressors and has many harmful impacts on living cells such as induction of oxidative pressure or the inducing of fatal changes to the molecular structure mainly of DNA, but also of RNA, lipids, and proteins (Gabani and Singh 2013). Generally, UV radiation is considered to be one of the most detrimental abiotic factors influencing microorganisms at both the community and single-cell level, thus severely affecting the diversity and dynamics of microbial communities. Moreover, it is expected that by the end of the twenty-first century, the intensity of UV radiation at the Earth's surface will increase by approximately 5–10% in temperate latitudes and by about 20% in high latitudes (Pérez et al. 2017). It can therefore be expected that the evolutionary significance of UV radiation and ability to face this stressor may even increase.

To cope with UV radiation, bacteria—and among them especially extremophiles inhabiting harsh environments exposed to harmful solar radiation—have evolved various strategies mainly based on efficient DNA repair mechanisms and active defense against UV-induced oxidative stress. Moreover,

✉ Stanislav Obruca
Stana.O@seznam.cz

¹ Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkynova 118, 612 00 Brno, Czech Republic

² Institute of Scientific Instruments, Academy of Sciences of The Czech Republic, Vvi, Kralovopolska 147, 612 64 Brno, Czech Republic

³ Institute of Chemistry, NAWI Graz, University of Graz, Heinrichstrasse 28/III, 8010 Graz, Austria

⁴ ARENA Arbeitsgemeinschaft für Ressourcenschonende und Nachhaltige Technologien, Inffeldgasse 21b, 8010 Graz, Austria

many pro- and eukaryotic microorganisms also rely on production of UV-protective metabolites such as pigments, mycosporine-like amino acids, scytonemin, ectoines, bacterioruberin, sphaerophorin, pannarin, or melanin (Koller et al. 2014; Singh and Gabani 2011).

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polyesters accumulated by numerous prokaryotes in the form of intracellular granules (Tan et al. 2014). The number of granules can reach up to 10–15 granules per cell and their average diameter is about 200–400 nm, though individual values particularly depend upon the specific microorganism and the physiological state of the bacterial culture (Vadlja et al. 2016). The weight content of PHA in bacterial cells can reach up to 90% of cell dry weight, though bacteria regulate their diameters to confine the volumetric content of PHA granules at a level below 40 vol% (Mravec et al. 2016). The PHA polymer itself represents the hydrophobic core of the granules which is covered by numerous specific proteins with various functions. These proteins include PHA synthase, PHA depolymerases, regulatory proteins, and various PHA granule structural proteins which create a functional interface between the hydrophobic polymer and water-containing cytoplasm. These proteins are also responsible for intracellular localization of granules within bacterial cells. To emphasize their complexity and multifunctionality as de facto organelles, these granules are also referred to as “carbonosomes” (Jendrossek 2009).

The primary function of PHAs is the storage of carbon and energy. However, recent research has shown that the biological function of PHAs is much more complex and that the capability to accumulate PHA has many biochemical and biophysical consequences, enhancing the survival and fitness of bacterial cells when exposed to numerous stress factors including but not limited to high temperature (Pham 2004; Wu et al. 2011), low temperature (Tribelli and Lopez 2011), freezing (Obruca et al. 2016a; Pavez et al. 2009), or osmotic up-shock (Obruca et al. 2017).

Moreover, there are reports stating that the presence of PHA granules in microbial cells also protects bacteria against UV radiation. For instance, a protective effect of PHA granules in bacterial cells against UV irradiation was observed in *Azospirillum brasilense* when PHA-rich (about 40 wt.% of PHA in cell dry weight) and PHA-poor cells (about 5 wt.% of PHA in cell dry weight) were compared (Tal and Okon 1985). The importance of PHA for the UV-radiation survival of *A. brasilense* was confirmed in following studies by Kadouri et al., who observed that the wild type was more resistant to numerous stressors, including UV radiation, than the PHA synthase deletion mutant incapable of accumulating PHA (Kadouri et al. 2003a). It was also more resistant than the PHA depolymerase deletion mutant, which was not capable of PHA hydrolysis (Kadouri et al. 2003b). Similarly, Zhao

et al. (2007) compared the stress resistance of the wild type of *Aeromonas hydrophila* and its PHA synthase negative mutant incapable of PHA synthesis. As the major outcome, the wild type was substantially more resistant to several stress factors, including UV irradiation. Furthermore, the UV-radiation protective capacity of PHA granules was also confirmed with genetically modified *Escherichia coli* which harbored genes enabling either PHA biosynthesis or both PHA biosynthesis and hydrolysis. Both transgenic strains were more resistant to UV radiation and other stress factors than the PHA non-producing wild type (Wang et al. 2009).

Nevertheless, despite the fact that numerous studies have reported that the presence of PHA granules in microbial cells provides protection against UV radiation; to our best knowledge, there are no studies exploring the potential mechanism of the protective action. Therefore, we experimentally confirmed the UV-protecting effect of PHA granules for *Cupriavidus necator*, a soil bacterium which is considered the most important model strain for PHA metabolism. Subsequently, various spectroscopic approaches were employed to shed light on the interaction of PHA granules in bacterial cells with UV radiation and to provide an explanation for their UV-protective mechanism.

Materials and methods

Microorganisms and cultivation

The PHA-producing strain *Cupriavidus necator* H16 (CCM 3726) was obtained from the Czech Collection of Microorganisms, Brno, Czech Republic, and its PHA non-producing mutant strain *Cupriavidus necator* PHB⁻ (DSM-541) was purchased from the Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures, Braunschweig, Germany.

Cultivations were performed in Erlenmeyer flasks (volume 250 mL) containing 100 mL of mineral salt (MS) medium. The composition of the MS medium was 20 g fructose, 1 g (NH₄)₂SO₄, 1 g KH₂PO₄, 11.1 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O, 0.2 g MgSO₄ · 7 H₂O, 1 mL of microelement solution, and 1 L of distilled water; the microelement solution in turn was composed of 9.7 g FeCl₃, 7.8 g CaCl₂, 0.156 g CuSO₄ · 5 H₂O, 0.119 g CoCl₂, and 0.118 g NiCl₂ in 1 L of 0.1 M HCl. The flasks were inoculated with 5 mL of an overnight culture of a particular strain of *C. necator* grown in Nutrient Broth medium consisting of 10 g peptone, 10 g beef extract, and 5 g NaCl in 1 L of distilled water. The cells were cultivated for 72 h. The PHA content in microbial cells was determined by gas chromatography as described previously (Obruca et al. 2014).

UV challenge of bacterial strains *C. necator* H16 and *C. necator* PHB⁻⁴

The suspension of bacterial cells cultivated for 72 h as described above was first diluted 30 times. Thereafter, the suspension of bacterial cells of *Cupriavidus necator* H16 was diluted to reach the cell density of the suspension of its mutant strain *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴. The solutions thus prepared were further diluted into approx. 10^8 CFU and 3 mL of the cell suspension was placed on a sterile Petri dish to form a thin layer (approx. 1 mm). After this, cells were exposed to UV radiation emitted by an UVA lamp (400–320 nm, height 25 cm) and samples were taken at regular intervals (15, 30, 45 min). From these samples, the number of viable cells was determined as CFU by plating of appropriately diluted cell suspensions on NB agars.

UV-Vis spectroscopy and nephelometry of bacterial cells

For UV-Vis spectroscopy characterization, the same cultivation suspension as described above was used. Firstly, both the suspension of bacterial cells of *C. necator* H16 and the suspension of its mutant bacterial strain were diluted step by step five times. The dilution process was repeated until the final solutions were diluted by a factor of 100. All solutions prepared this way were analyzed by UV-Vis absorption spectrophotometry (in a U-3900H, Hitachi) both in a regular transmission measurement mode and also in a spatially integrating mode (integration sphere attachment 60mmDIA for Hitachi U-3900H spectrophotometer). Simultaneously with the preparation of samples for UV-Vis spectroscopy, the number of viable cells was determined as described above.

Similarly, diluted bacterial suspensions of defined cell concentration were also investigated by means of nephelometry. As a simple nephelometer, we used a fluorometer (AMINCO-Bowman Series 2 luminescence spectrometer, Thermo Inc.) which was employed to detect scattered light at a fixed scattering angle of 90° to the incidental beam. Furthermore, this device offers the advantageous possibility of using different wavelengths ranging from 250 nm (ozone-free xenon lamps lowest wavelength) to approximately 850 nm (highest range of PMT detectors). To suppress detection of fluorescence or phosphorescence, which is common for biological samples at different excitation wavelengths (~340 nm for NADH, ~470 nm for flavonoids, etc.) a synchronous scan method was applied, where excitation and emission monochromators were set to the zero wavelength difference during scanning. In order to obtain more accurate results and also to protect the detector, slits were set to the minimum (1 nm bandpass). To compensate for the non-flat intensity profile of the

excitation source (a 150-W xenon lamp), intensity was detected relative to the diode. The scan rate was set to $5 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$ and spectra were collected with a 1-nm resolution in the range 250–700 nm.

Analysis of intracellular ROS by flow cytometry

Determination of the intracellular level of reactive oxygen species (ROS) in bacterial cells of *C. necator* H16 and *C. necator* PHB⁻⁴ before and after 15 min exposition to UV irradiation (in details described above) was performed by flow cytometry employing CM-H2CFDA (Thermo Fisher Scientific), a fluorescent stain used as general oxidative stress indicator. Suspensions of cells with cell density of approx. 10^6 cells per mL were washed twice with PBS buffer; after that, 5 µL of CM-H2CFDA dissolved in HPLC-grade DMSO (the final concentration of the stain in 1 mL of the sample was 5 µM) was added to the suspensions, and the cells were then left to incubate in the dark at laboratory temperature for 10 min. After that, the fluorescence of stained as well as non-stained cells was immediately measured at single-cell level using the green fluorescence collecting channel ($535 \pm 35 \text{ nm}$) of the used flow cytometer (Apogee A50, ApogeeFlow Systems).

Results

UV exposure of *C. necator* cells

In the first experiment, cells of the PHA-accumulating strain *C. necator* H16 (the PHA content in microbial cells was 74% of cell dry weight as determined by gas chromatography) and its mutant strain which is not capable of accumulating PHA due to a mutation of the PHA synthase (Raberg et al. 2014) were exposed to a UV challenge. The viability of both bacterial strains was assessed during their exposition to UV irradiation in regular intervals; the results, expressed as the percentage of viable cells, are shown in Fig. 1. Generally, the PHA-containing culture demonstrated substantially higher resistance to UV radiation during the entire period of UV exposure, thus confirming the UV-protective effect of PHA granules which has been reported also for other microbial strains (Kadouri et al. 2003a, b; Tal and Okon 1985; Wang et al. 2009; Zhao et al. 2007). The decrease in viability of reference samples of both cultures, which were exposed to the same conditions but without being UV irradiated, was negligible (<5%). Therefore, it can be stated that accumulation of PHA granules in cytoplasm represents a potent and generally observed strategy which protects bacterial cells from the harmful effects of UV irradiation.

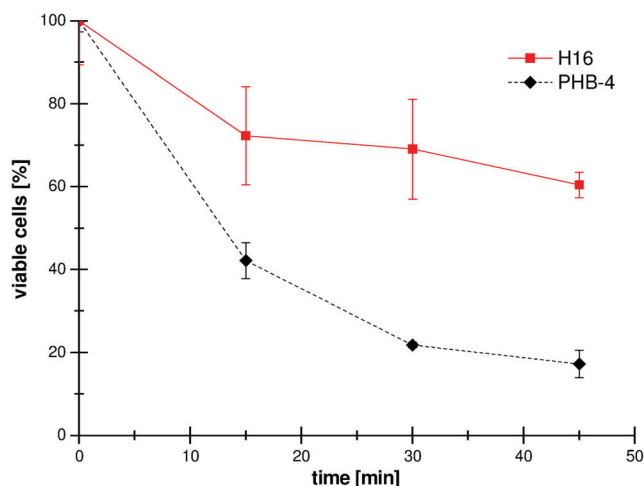


Fig. 1 Survival of both strains of *C. necator* during their exposition to UV irradiation

UV-Vis spectroscopy of bacterial cells

In order to understand how intracellular PHA granules interact with light, complex spectroscopic characterizations of the cell dispersions in the ultraviolet and the visible region were performed both for the PHA-accumulating strain (*C. necator* H16) and the non-accumulating mutant (*C. necator* PHB⁻⁴). Three different optical arrangements were used for this purpose.

Firstly, turbidity measurements were performed using a standard UV-Vis spectrometer, where the intensity of the transmitted light is measured and optical density is calculated for the particular wavelength of the incident light. As the wavelengths are altered to cover the whole UV-Vis region, spectra such as those shown in Fig. 2a are collected. It is evident that except for the shortest measured wavelengths (close to 200 nm), the PHA-accumulating strain shows a significantly higher optical density of the cell dispersion with comparable cell density compared to the non-accumulating strain. It should be emphasized that the optical density measured this way comprises two individual contributions. On the one hand, the intensity of the transmitted light is decreased via absorption of the specific wavelengths by the photoactive cell components. Absorption of the radiant energy then initiates diverse photophysical (e.g., light emission in the form of fluorescence) or photochemical processes, where the latter ones may often (mainly in the case of light in the UV spectral region) have harmful or even fatal effects on the cell fitness. The other contribution to the optical density is represented by the light scattered away from the direction of the incident beam. Unlike the light absorption, light scattering is rarely damaging. On the contrary, it can even have a protective “shielding” effect on the photo-labile cell components caused by attenuation of the local intensity of the incident light in the cell, which might reduce the level of cell damage (Paunescu

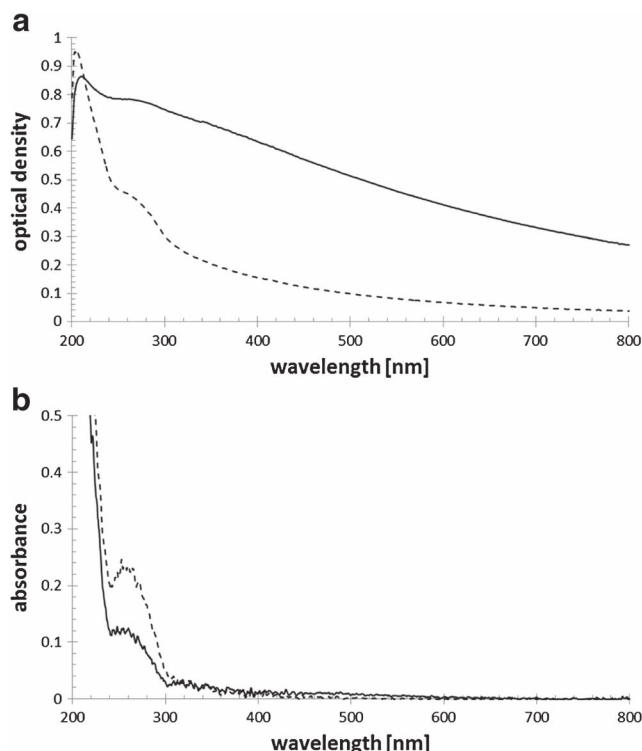


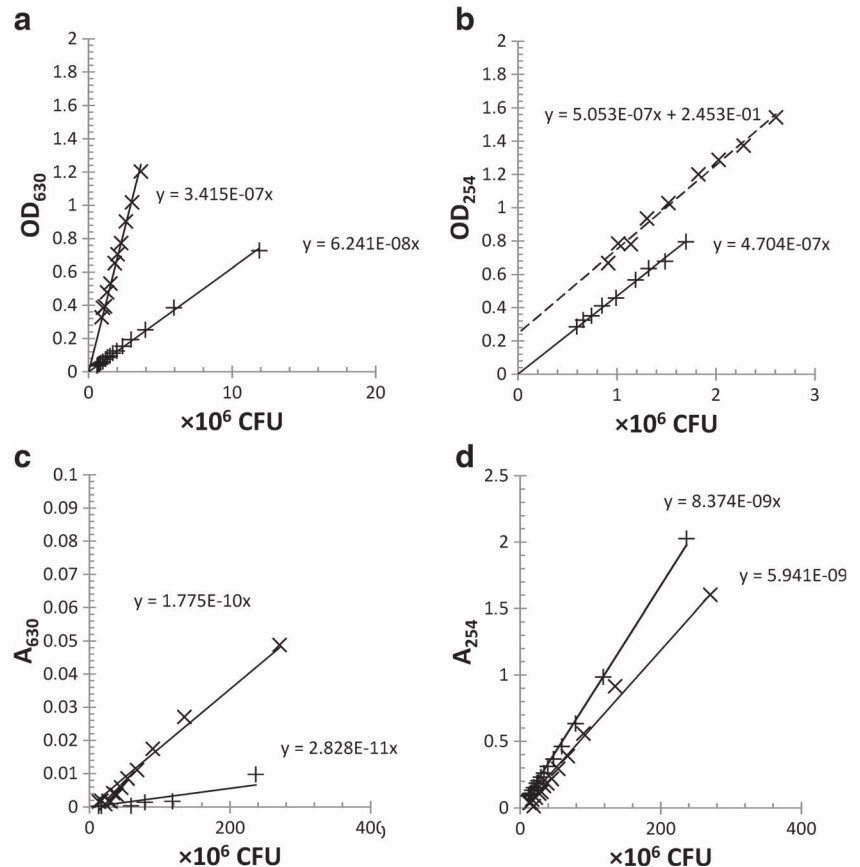
Fig. 2 Example of typical UV-Vis spectra of *C. necator* H16 (full line) and *C. necator* PHB⁻⁴ (dashed line). **a** Turbidity measurement of dispersions with cell density 1×10^6 CFU. **b** Absorbance measurement of dispersions with cell density 1×10^6 CFU

et al. 2014). Therefore, turbidity measurements such as those described above do not provide a relevant explanation of a harmful effect of light on the cells with light because they provide no direct information about the relative involvement of the light absorption and light scattering, respectively, in the interaction of the cells and their constituent with light.

With respect to this, we further measured the spectra of cell dispersions using the same UV-Vis spectrometer equipped with an integrating sphere accessory, specially designed for the absorbance measurement of turbid samples. Examples of the collected spectra are shown in Fig. 2b. In these spectra, effective suppression of the light-scattering artifacts can be clearly seen. No significant light absorption was found in the Vis region, which confirms the assumption that in this wavelength region, the optical density of the sample can be interpreted solely as a consequence of light scattering. With respect to this finding, additional interesting outcomes can further be deduced from the previously described differences in the turbidity spectra of dispersions of PHA-accumulating and non-accumulating strains with the same cell density. Generally, a significant increase in light scattering in the case of the PHA-accumulating cells of the *C. necator* H16 strain is evidently caused by light scattering on the cell ultrastructure, namely on the PHA granules present in the cell cytoplasm.

Figure 3 presents results from both types of spectroscopic assays in a more quantitative way. Fig. 3a shows very good

Fig. 3 Summarized results from UV-Vis turbidimetry and absorbance assays of cell suspensions of PHA-accumulating *C. necator* H16 strain (×) and PHA non-accumulating *C. necator* PHB⁻⁴ strain (+), respectively. **a, b** Dependency of optical density at 630 and 254 nm on cell density. **c, d** Dependency of absorbance at 630 and 254 nm on cell density



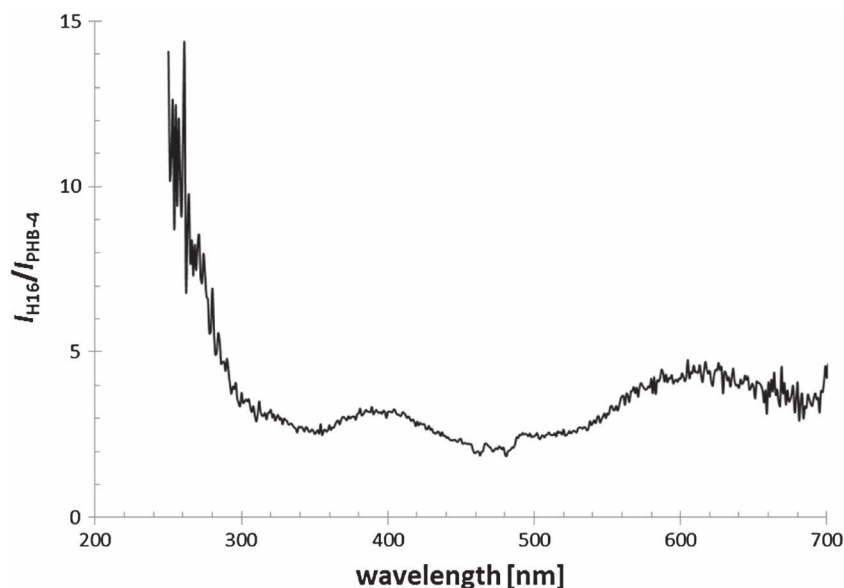
linearity of the dependency of optical density at 630 nm on the cell density for both strains. Evidently, light-scattering effects are cumulative regardless of a contribution of the light scattered by PHA granules. OD_{630} appears to represent a robust parameter suitable for quantification of cell density. Nevertheless, careful calibration is needed wherever intracellular light scatters occur, as is the case when PHA granules or other cell inclusions occur. However, it is evident from Fig. 3b that in the case of *C. necator* H16 strain, contributions of light scattering and light absorption in UV wavelength region are no longer cumulative (the dashed fitting line does not cross the origin of coordinates). Nevertheless, in this region, the crucial results are shown in Fig. 3d where a relative decrease of around 30% in the single cell absorption coefficient at 254 nm can be deduced. Finally, Fig. 3c is shown in order to illustrate the negligible residual apparent absorbance of the cell suspensions in the VIS region. This apparent absorbance represents an experimental artifact coming from the scattered light which does not reach the aperture of the integrating sphere.

In order to provide an experimental verification of the assumption that the difference between the optical density and absorbance of the cell suspensions is correctly assigned to the intensity of scattered light, we performed also a basic nephelometry assay of the same samples. Measurement was done

with the synchronous scan method as was described above. We focused on monitoring the changes in scattered light intensity between the PHA-accumulating and non-accumulating strain suspension of the same cell density, where a high sensitivity of the fluorimeter photomultiplier and its strong light source provide an undisputed instrumental advantage. Figure 4 shows the ratio of the intensities of scattered light normalized per unit CFU for *C. necator* H16 and *C. necator* PHB⁻⁴, respectively, vs. the wavelength. We use this means of data demonstration in order to suppress experimental artifacts coming from uneven light intensity emitted from the xenon lamp of the fluorimeter at different wavelengths (we assume that the results for both strains will be affected equally).

From the spectrum, it is evident that the nephelometry experiments confirmed the higher intensity of scattered light for the PHA-accumulating strain in the whole tested optical region. Furthermore, the relative efficiency of light scattering by the PHA producer as compared to the mutant strain increases significantly in the UV-region, where the light absorbance measurement revealed the most profound differences in intensity in the light absorption of the two strains. This finding was reproducible as far as similar results were found regardless of the particular suspension cell density. Therefore, it can be summarized that nephelometry confirmed the conclusions of the previous two spectroscopic assays.

Fig. 4 Ratio of the intensities of single-cell scattered light for *C. necator* H16 strain and PHA non-accumulating *C. necator* PHB⁻⁴ strain at 90° as determined by nephelometry



ROS analysis by flow cytometry

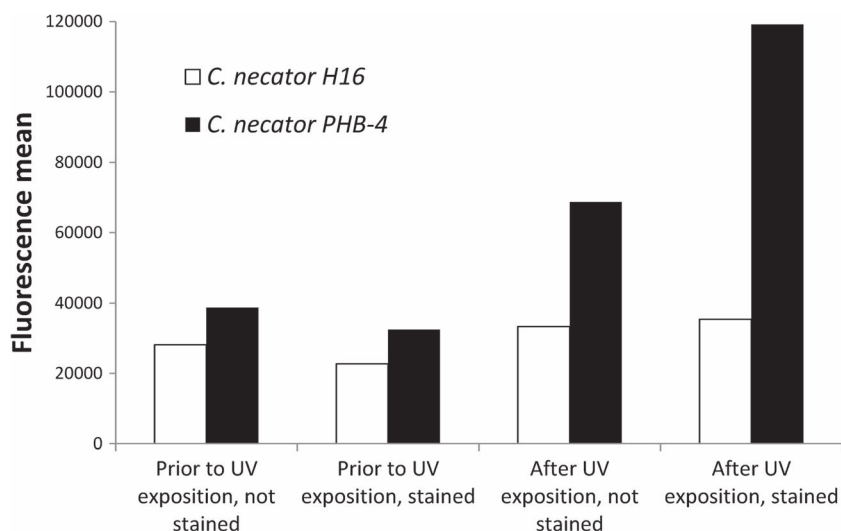
To investigate whether scattering of UV irradiation on PHA granules influences the intracellular level of ROS in UV-challenged cells, the amount of ROS before and after UV exposition was analyzed by flow cytometry employing fluorescent stress indicator CM-H2CFDA. Green fluorescence of this stain is activated by its reaction with ROS (Dong et al. 2015). Hence, at single-cell level, we analyzed intensity of green fluorescence of both bacterial cultures prior and after their exposition to UV irradiation in stained as well as non-stained bacterial cells; the results are demonstrated in Fig. 5. The mean value of intensity of green fluorescence of PHA granules containing bacterial was only slightly (approx. 10%) increased after exposition of the cells to UV irradiation. On the contrary, when the culture of cells not containing PHA granules was exposed to UV irradiation, green autofluorescence of

non-stained cells increased about 1.8-fold and, moreover, green fluorescence of CM-H2CFDA stained cells raised 3.6-fold. This clearly indicates that UV irradiation induces formation of substantially higher amount of ROS in PHA negative cells than in PHA-rich cells.

Discussion

Solar UV radiation on Earth can be considered an important stress factor which influences numerous living systems. Therefore, the influence of UV radiation on whole ecosystems has been studied for various aquatic environments (Häder et al. 2007), or high-altitude regions (Fariás et al. 2009; Pérez et al. 2017). Moreover, UV-radiation resistance is also an important topic for astrobiology (Khodadad et al. 2017). The harmful effect of UV radiation is complex and it includes

Fig. 5 Mean intensity of green fluorescence of stained and non-stained cells of *C. necator* H16 and *C. necator* PHB⁻⁴ prior and after UV exposition as determined by flow cytometry



numerous cell-damaging mechanisms. First and foremost, UV radiation is known for its mutagenic potential because DNA directly absorbs UVB radiation and this radiation induces numerous grave changes in DNA structure, among which the formation of dimeric pyrimidines, photo-adducts, and DNA–protein cross-links are considered the most important (Ravanat et al. 2001). Furthermore, despite the fact that DNA does not absorb UVA radiation, UVA can be absorbed by endogenous photosensitizers which may damage DNA throughout subsequent reactions (Ravanat et al. 2001). Apart from DNA, also other photosensitive biomolecules such as RNA, proteins, or lipids can be damaged by direct or indirect absorption of UV radiation, though changes in these molecules' structure do not have such fatal consequences as is the case for DNA due to their quick turnover. In addition, UV radiation induces the formation of reactive oxygen species (ROS) which may further damage crucial cell components such as DNA, RNA, proteins, and lipids (Kim et al. 2015).

There are numerous reports that the capability to accumulate PHA enhances the stress resistance of bacteria against various stressors (Ayub et al. 2009; Kadouri et al. 2003a, b; Obruca et al. 2016a, b, 2017; Tal and Okon 1985; Wang et al. 2009; Zhao et al. 2007). This can be considered an important “added value” to their primary biological function—storage of carbon, energy, and also reduction power. Generally, it has been observed that the presence of PHA granules influences the overall biophysical properties of bacterial cells, which further increases stress survival when they are exposed to various stress factors. For instance, the presence of PHA granules enhanced the rate of water transport out of the cells during freezing, which subsequently protected bacterial cells from formation of intracellular ice; this substantially contributes to PHA's cryo-protective effect (Obruca et al. 2016a). Moreover, PHA polymers in native intracellular granules represent a unique amorphous form of matter which resembles “super-cooled” liquid in its properties (Bontrone et al. 1992). The liquid-like properties of PHA granules seem to play a crucial role in the protective mechanism of PHA against osmotic up-shock, since the presence of PHA granules turned out to reduce the level of plasmolysis in challenged cells and, moreover, according to the results of transmission electron microscopy analysis, PHA granules were even capable of stabilizing membranes of bacterial cells by closing the holes in the cytoplasmic membrane (Obruca et al. 2017). Therefore, even the simple presence of PHA granules in cytoplasm can be beneficial for bacterial cells when exposed to stress conditions.

Moreover, the enhancement of the UV resistance of PHA-accumulating bacteria which was reported in this work (Fig. 1), as well as by other authors (Kadouri et al. 2003a; Tal and Okon 1985; Wang et al. 2009; Zhao et al. 2007), is most likely primarily based on the biophysical consequence of the presence of PHA granules in cells. According to our results, PHA granules do not considerably absorb UV radiation but they are

capable of efficient scattering of UV radiation as was indicated in the present study by the comparison of turbidity (Fig. 2a) and absorbance measurement (Fig. 2b) of the cells of PHA-accumulating *C. necator* and its PHA negative mutant. Furthermore, the fact that PHA granules efficiently scatter UV radiation was also confirmed by nephelometry measurement (Fig. 4). Because no considerable changes in cell dimensions were found for both strains in our previous work (Mravec et al. 2016), the significant increase in the light scattering of the *C. necator* H16 strain can be ascribed to the fraction of light scattered on the cell ultrastructure, namely on the PHA granules in the cell cytoplasm. This finding is in fact not surprising; a similar observation of an increase of the single cell light turbidity as a result of light scattering on inclusion bodies has previously been reported, e.g., for *E. coli* W3110 (Hwang and Feldberg 1990). Nevertheless, to the best of our knowledge, our results represent the first convincing experimental confirmation that intracellular PHA granules serve as effective in situ light-scatterers. Furthermore, according to the results presented in Fig. 2b, it is evident that UV radiation is absorbed by the bacterial cells quite effectively. The absorption band centered around 254 nm can be assigned to nucleic acid, especially to DNA. Nevertheless, from the comparison of the absorption spectra of cell suspensions with the same cell density, it can be seen that UV-radiation absorption in this wavelength region is considerably suppressed in the case of the PHA-accumulating strain. Bearing in mind that there is no significant difference in the cellular content of DNA for the two strains, this result supports the assumption of “shielding” effects of PHA granules resulting from their great light-scattering ability. Moreover, it can be stated that, apart from protecting DNA as the most sensitive molecule, scattering of UV irradiation on PHA granules also reduces level of intracellular ROS (see Fig. 5) generated by UV radiation. This new finding very likely substantially contributes to complex UV-protective function of PHA granules.

It should be pointed out that in natural producers, PHA granules are not randomly distributed in bacterial cells, but they are specifically attached to DNA. In *C. necator*, the attachment is performed via the protein PhaM which simultaneously binds to DNA and the PHA associated-protein PhaP5 (Wahl et al. 2012). Similarly, in *Pseudomonas putida*, the binding of PHA granules to DNA is enabled by the protein PhaF. This protein serves as a transcriptional regulator of PHA metabolism but it is also responsible for proper segregation of granules during cell division and ensures, under balanced conditions, equal distribution of granules between daughter cells. PhaF directs the PHA granules to the center of the cells, forming a characteristic needle array in the close vicinity of DNA (Galan et al. 2011). This might substantially contribute to a UV-protective effect since PHA granules represent a “shield” attached to the nucleoid which scatters UVB radiation away from the most sensitive molecule—DNA. Here, it

has to be emphasized that very recent findings by Karmann et al. (2017) show that, under carbon-limited conditions, the distribution of granules to daughter cells in statu nascendi occurs in an asymmetric way; the culture segregates into a PHA-rich and a PHA-poor subculture, thus displaying a “bistable behavior.” Future investigations might provide insights if the PHA-rich subculture is definitely better protected when challenged by UV irradiation.

PHA metabolism reveals a cyclic nature, the so called PHA cycle, since in microbial cells the polymer is simultaneously synthesized and degraded (Kadouri et al. 2005). According to the results of Kadouri et al. (2003b), also the capability of intracellular PHA degradation is an important factor enhancing the UV-protective effect of PHA, since a PHA depolymerase deletion mutant strain of *Azospirillum brasilense* incapable of PHA degradation was shown to be more sensitive to UV irradiation than the wild type strain. The explanation can be that, due to the cyclic nature of PHA metabolism and activity of PHA depolymerase, a substantial amount of PHA monomers is present in bacterial cells. For instance, the intracellular concentration of 3-hydroxybutyrate (3HB) in the wild type strain of *C. necator* is 16.5-fold higher than in its PHA non-accumulating mutant. This is important since 3HB constitutes a potent chemical chaperone capable of preventing a model enzyme, lipase, against denaturation caused by high temperature or oxidative damage (Obruca et al. 2016b). Therefore, it is likely that the complete PHA cycle might in this way also prevent bacterial cells against oxidative pressure generated by UV radiation. Moreover, Ayub et al. (2009) suggested that PHA metabolism is essential for the maintenance of the redox state in *Pseudomonas* sp. 14-3 during oxidative pressure induced by exposure of bacterial cells to low temperatures.

In summary, the presence of PHA granules in bacterial cells has numerous biophysical and metabolic consequences, which alter the stress survival capacity of bacterial cells during their exposition to various stress factors. Their UV-protective action might be explained by their efficient UV-radiation scattering properties with high scattering efficiency in the wavelengths close to the DNA absorption maxima. Furthermore, presence of PHA granules in bacterial cells also protects them from ROS generated by UV irradiation since scattering of UV radiation on granules decreases levels of generated ROS and, moreover, PHA metabolism also provides efficient protection against oxidative stress induced by UV irradiation.

Funding This study was funded by the project “Materials Research Centre at FCH BUT-Sustainability and Development” No. LO1211 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic and by the project GP15-20645S of the Czech Science Foundation (GACR).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

- Ayub ND, Tribelli PM, López NI (2009) Polyhydroxyalkanoates are essential for maintenance of redox state in the Antarctic bacterium *Pseudomonas* sp. 14-3 during low temperature adaptation. *Extremophiles* 13(1):59–66. <https://doi.org/10.1007/s00792-008-0197-z>
- Bonthrone KM, Clauss J, Horowitz DM, Hunter BK, Sanders JKM (1992) The biological and physical chemistry of polyhydroxyalkanoates as seen by NMR spectroscopy. *FEMS Microbiol Lett* 103(2–4):269–277. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05848.x>
- Dong TG, Dong S, Catalano C, Moore R, Liang X, Mekalanos JJ (2015) Generation of reactive oxygen species by lethal attacks from competing microbes. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(7):2181–2186. <https://doi.org/10.1073/pnas.1425007112>
- Fariás ME, Fernández-Zenoff V, Flores R, Ordóñez O, Estévez C (2009) Impact of solar radiation on bacterioplankton in Laguna Vilama, a hypersaline Andean lake (4650 m). *J Geophys Res Biogeosci* 114: G00D04
- Gabani P, Singh OV (2013) Radiation-resistant extremophiles and their potential in biotechnology and therapeutics. *Appl Microbiol Biotechnol* 97(3):993–1004. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4642-7>
- Galan B, Dinjaski N, Maestro B, de Eugenio LI, Escapa IF, Sanz JM, Garcia JL and Prieto MA (2011) Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas putida* KT2442. *Mol Microbiol* 79:402–418. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07450.x>
- Häder DP, Kumar HD, Smith RC, Worrest RC (2007) Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochem Photobiol Sci* 6(3):267–285. <https://doi.org/10.1039/B700020K>
- Hwang SO, Feldberg R (1990) Effect of inclusion body production on culture turbidity and cell dry-weight in growing bacterial cultures. *Biotechnol Prog* 6(1):48–50. <https://doi.org/10.1021/bp00001a007>
- Jendrossek D (2009) Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (Carbonosomes). *J Bacteriol* 191(10):3195–3202. <https://doi.org/10.1128/JB.01723-08>
- Kadouri D, Jurkevitch E, Okon Y (2003a) Involvement of the reserve material poly- β -hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* stress endurance and root colonization. *Appl Environ Microbiol* 69(6):3244–3250. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3244-3250.2003>
- Kadouri D, Jurkevitch E, Okon Y (2003b) Poly β -hydroxybutyrate depolymerase (PhaZ) in *Azospirillum brasilense* and characterization of a *phaZ* mutant. *Arch Microbiol* 180(5):309–318. <https://doi.org/10.1007/s00203-003-0590-z>
- Kadouri D, Jurkevitch E, Okon Y, Castro-Sowinski S (2005) Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Crit Rev Microbiol* 31(2):55–67. <https://doi.org/10.1080/10408410590899228>
- Karmann S, Panke S, Zinn M (2017) The bistable behaviour of *Pseudomonas putida* KT2440 during PHA depolymerization under carbon limitation. *Bioengineering* 4(2):58. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4020058>
- Khodadad CL, Wong GM, James LM, Thakrar PJ, Lane MA, Catechis JA, Smith DJ (2017) Stratosphere conditions inactivate bacterial endospores from a Mars spacecraft assembly facility. *Astrobiology* 17(4):337–350. <https://doi.org/10.1089/ast.2016.1549>

- Kim BM, Rhee JS, Lee KW, Kim MJ, Shin KH, Lee SJ, Lee YM, Lee JS (2015) UV-B radiation-induced oxidative stress and p38 signaling pathway involvement in the benthic copepod *Tigriopus japonicus*. *Comp Biochem Physiol C* 167:15–23
- Koller M, Muhr A, BrauneGG G (2014) Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Res* 6:52–63. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.09.002>
- Mravec F, Obruca S, Krzyzanek V, Sedlacek P, Hrubanova K, Samek O, Kucera D, Benesova P, Nebesarova J (2016) Accumulation of PHA granules in *Cupriavidus necator* as seen by confocal fluorescence microscopy. *FEMS Microbiol Lett* 363:fnw094
- Obruca S, Benesova P, Oborna J, Marova I (2014) Application of protease-hydrolyzed whey as a complex nitrogen source to increase poly(3-hydroxybutyrate) production from oils by *Cupriavidus necator*. *Biotechnol Lett* 36(4):775–781. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1407-z>
- Obruca S, Sedlacek P, Krzyzanek V, Mravec F, Hrubanova K, Samek O, Kucera D, Benesova P, Marova I (2016a) Accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) helps bacterial cells to survive freezing. *PLoS One* 11(6):e0157778. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157778>
- Obruca S, Sedlacek P, Mravec F, Samek O, Marova I (2016b) Evaluation of 3-hydroxybutyrate as an enzyme-protective agent against heating and oxidative damage and its potential role in stress response of poly(3-hydroxybutyrate) accumulating cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 100(3):1365–1376. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7162-4>
- Obruca S, Sedlacek P, Mravec F, Krzyzanek V, Nebesarova J, Samek O, Kucera D, Benesova P, Hrubanova K, Milerova M, Marova I (2017) The presence of PHB granules in cytoplasm protects non-halophilic bacterial cells against the harmful impact of hypertonic environments. *New Biotechnol* 39(Pt A):68–80. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.07.008>
- Paunescu D, Mora CA, Puudu M, Krumeich F, Grass RN (2014) DNA protection against ultraviolet irradiation by encapsulation in a multilayered SiO₂/TiO₂ assembly. *J Mater Chem B* 2(48):8504–8509. <https://doi.org/10.1039/C4TB01552E>
- Pavez P, Castillo JL, González C, Martínez M (2009) Poly-β-hydroxyalkanoate exert a protective effect against carbon starvation and frozen conditions in *Sphingopyxis chilensis*. *Curr Microbiol* 59(6):636–640. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9485-9>
- Pérez V, Hengst M, Kurte L, Dorador C, Jeffrey WH, Wattiez R, Molina V, Matallana-Surget S (2017) Bacterial survival under extreme UV radiation: a comparative proteomics study of *Rhodobacter* sp., isolated from high altitude wetlands in Chile. *Front Microbiol* 8:1173. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01173>
- Pham TH (2004) The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. *Microbiology* 150(10):3405–3413. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27357-0>
- Raberg M, Voigt B, Hecker M, Steinbuechel A (2014) A closer look on the polyhydroxybutyrate- (PHB-) negative phenotype of *Ralstonia eutropha* PHB-4. *PLoS One* 9(5):e95907. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095907>
- Ravanat JL, Douki T, Cadet J (2001) Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its component. *J Photochem Photobiol B* 63(1-3):88–102. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(01\)00206-8](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(01)00206-8)
- Singh OV, Gabani P (2011) Extremophiles: radiation resistance microbial reserves and therapeutic implications. *J Appl Microbiol* 110(4):851–861. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04971.x>
- Tal S, Okon Y (1985) Production of the reserve material poly-β-hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* cd. *Can J Microbiol* 31(7):608–613. <https://doi.org/10.1139/m85-115>
- Tan GYA, Chen CL, Li L, Ge L, Wang L, Razaad IMN, Li Y, Zhao L, Wang JY (2014) Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): a review. *Polymers* 6(3):706–754. <https://doi.org/10.3390/polym6030706>
- Tribelli PM, López NI (2011) Poly(3-hydroxybutyrate) influences biofilm formation and motility in the novel Antarctic species *Pseudomonas extremaustralis* under cold conditions. *Extremophiles* 15(5):541–547. <https://doi.org/10.1007/s00792-011-0384-1>
- Vadlja D, Koller M, Novak M, Braunegg G, Horvat P (2016) Footprint area analysis of binary imaged *Cupriavidus necator* cells to study PHB production at balanced, transient, and limited growth conditions in a cascade process. *Appl Microbiol Biotechnol* 100(23):10065–10080. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7844-6>
- Wahl A, Schuth N, Pfeiffer D, Nussberger S, Jendrosseck D (2012) PHB granules are attached to the nucleoid via PhaM in *Ralstonia eutropha*. *BMC Microbiol* 12(1):262. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-262>
- Wang Q, Yu H, Xia Y, Kang Z, Qi Q (2009) Complete PHB mobilization in *Escherichia coli* enhances the stress tolerance: a potential biotechnological application. *Microb Cell Factories* 8(1):47. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-47>
- Wu D, He J, Gong Y, Chen D, Zhu X, Qiu N, Sun M, Li M, Yu Z (2011) Proteomic analysis reveals the strategies of *Bacillus thuringiensis* YBT-1520 for survival under long-term heat stress. *Proteomics* 11(13):2580–2591. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000392>
- Zhao YH, Li HM, Qin LF, Wang HH, Chen GQ (2007) Disruption of the polyhydroxyalkanoate synthase gene in *Aeromonas hydrophila* reduces its survival ability under stress conditions. *FEMS Microbiol Lett* 276(1):34–41. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00904.x>

6.2 Příloha II

Internship at the University of Stuttgart

Material and methods

Bacterial strains, plasmids, and primers

All used bacterial strains, plasmids and a primer in this study are listed in **tables 1 and 2**. *E. coli* JM109 and *E. coli* DH5 α were used for cloning procedures. Recombinant proteins were expressed in *E. coli* BL21(DE3)/pLys, All *E. coli* strains were grown on lysogeny broth (LB) medium supplemented with the appropriate antibiotics depending on the strain and plasmid at 30°C.

Table 1: List of bacterial strains and plasmids

Bacterial strain/plasmid	Characteristic	Source/reference
<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pLys	Expression strain, Cm ^r	Novagen, 4512
<i>E. coli</i> JM109	For cloning and plasmid storage, Km ^r	DSMZ 3423
<i>E. coli</i> DH5 α	For site directed mutagenesis, Km ^r	Stratagene, 4505
<i>E. coli</i> TOP10	For cloning and plasmid storage, Km ^r	Beyer a kol., 2015
pET28a	His tag expression vector, Km ^r	Novagen
pET28a_his ₆ _PhaC	plasmid for expression of his ₆ _PhaC	Bresan a kol.,2017
pET28a_his ₆ _PhaM	plasmid for expression of his ₆ _PhaM	Bresan a kol.,2017
pET28a_his ₆ _PhaM ^{ΔC}	plasmid for expression of his ₆ _PhaM ^{ΔC}	Bresan a kol.,2017
p4782.1	Strep tag expression vector under rhamnose promoter control, Km ^r	J.Altenbuchner
p4782.1_strep_PhaC ^{ΔC}	plasmid for expression of strep_PhaC ^{ΔC}	This study
p4782.1_PhaC ^{ΔC} _strep	plasmid for expression of PhaC ^{ΔC} _strep	This study

Km^r, kanamycin resistance; Cm^r chloramfenikol resistance

Construction of plasmids

Firstly, the strep-*phaC*^{ΔC} gene and *phaC*^{ΔC}-strep gene were amplified by DNA using the primers (Table 2). The PCR products were separated by agarose electrophoresis and subsequently purified by extraction kit (Nucleospin Extract) according to the manufacturer's instructions. Then PCR products and digested plasmid p4782.1 were ligated with 10x T4 Ligase buffer and T4 Ligase overnight at 16°C. Obtained vectors were chemically transformed into competent strain *E. coli* TOP10. Thereafter, we send our isolated plasmids with corresponding primers to DNA sequencing (LGC genomics) to verify the correctness of our constructs, we also performed a digestion test. Finally, the verified DNA vectors were transformed into express strain *E. coli* BL21(DE3)/pLys.

In the case of site-directed mutagenesis of his₆-PhaM in pET28, the desired base substitutions in PhaM were inserted by site-directed mutagenesis PCR with corresponding primers. Then

PCR products were incubated with restrictase DpnI (degrades only methylated DNA) and transformed into *E. coli* DH5 α . The insertion of the mutation was verified by DNA sequencing. All verified the constructs were subsequently transformed into expressing strain *E. coli* BL21 DE3 pLys, pET28a and stored as glycerol stocks at -70°C.

Table 2: Primers

Primer name	Primer sequence
strep-PhaC ^{ΔC} _fwd	ggaattccatatgtgtcacatccgcagtttgaaaaaggatcagcaatggcgac cggcaaag
strep-PhaC ^{ΔC} _rev	cccaagcttttagcgtgtcaggtcttccatcatg
PhaC ^{ΔC} -strep_fwd	ggaattccatatggcgaccggcaaaggcgcggcag
PhaC ^{ΔC} -strep_rev	cccaagctttatttttcaaactgcggatgtgaccatgctgatccgcgtgtcaggt cttc
1_PhaM_D41A_fwd	ggtcgtcgaggggccatcggcggc
1_PhaM_D41A_rev	gccgccgatggccctcgacgacc
2_PhaM_D43A_fwd	cttctcgaggtcggcgaggtccatcgg
2_PhaM_D43A_rev	ccgatggacctcgccgacctcgacaag
3_PhaM_D44A_fwd	gcgcttctcgagggcgtcgaggtccat
3_PhaM_D44A_rev	atggacctcgacgccctcgacaagcgc
4_PhaM_D46A_fwd	ggcaatgcgcttggcgaggtcgtcgag
4_PhaM_D46A_rev	ctcgacgacctcgccaagcgattgcc
5_PhaM_D51A_fwd	aagcgattgccgccctgaaggccgtg
5_PhaM_D51A_rev	cacggccttcaggggcgcaatgcgctt
6_PhaM_D43A, D44A_fwd	gcgcttctcgaggggcgaggtccatcgg
6_PhaM_D43A, D44A_rev	ccgatggacctcgccgccctcgacaagcgc
7_PhaM_D44A, D46A_fwd	gcaatgcgcttggcgaggggcgaggtcca
7_PhaM_D44A, D46A_rev	tggacctcgacgccctcgccaagcgattgc
8_PhaM_D41A, D43A, D44A, fwd	gcttctcgaggggcgagggccatcggcggc
8_PhaM_D41A, D43A, D44A, rev	gccgccgatggccctcgccgccctcgacaagc
9_PhaM_D41A, D43A, D44A, D46A_fwd	caatgcgcttggcgaggggcgagggccatcggcggc
9_PhaM_D41A, D43A, D44A, D46A_rev	gccgccgatggccctcgccgccctcgccaagcgattg
10_PhaM_A50P_fwd	cgacctcgacaagcgattcccgcactgaa
10_PhaM_A50P_rev	ttcagtcgggaatgcgcttctcgaggtcg
11_PhaM_I70P_fwd	ttcaggccctgggggggtgtgcgcagc
11_PhaM_I70P_rev	gctgcgcaccacccccagggcctggaa

Overexpression and purification

Each culture was cultivated with respect to the required conditions of specific overexpression strain *E. coli*. Expression of His-tagged proteins was induced by the addition of 0.1 mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) at an OD₆₀₀= 0.6 for overnight at 26 °C and 150 rpm in contrast with strep-tagged proteins expression of which was induced by 0.1 % (wt/vol) rhamnose directly after 1 to 20 inoculation of the main culture for overnight expression at 26 °C

and 150 rpm, except overexpression strain *E. coli* BL21(DE3) p 4782.1 strep-PhaC-N terminus which was induced for 5 hours at 30 °C.

After cultivation, bacterial cells were harvested by centrifugation and disrupted by French press (3 passages). Subsequently, bacterial suspension was ultracentrifuged (35 000 rpm, 45 min, 4 °C). His-tag PhaC, his-tag PhaM and his-tag PhaM^{ΔC} were purified on Ni-NTA agarose column with a bed volume of 4 mL that was equilibrated with 10mL of buffer A with 20mM imidazole. Then, each solution of buffer was loaded on the column and eluted by mobile phase containing a gradient of imidazole described in Table 3.

Table 3: Required volumes of buffer A (with imidazole for protein purification.

Step	Concentration imidazole in buffer A*	Volume [mL]
1	20 mM	15
2	50 mM	10
3	100 mM	2
4	200 mM	2
5	250 mM	4
6	400 mM	4

*Buffer A: 55 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8.0

After all, all parts of different fractions were mixed with denaturation buffer (5 min/95 °C), cooled down on the ice for 2min and loaded into wells of SDS polyacrylamide gel (12 %) and run on SDS-PAGE electrophoresis at 25 mA. All SDS-PAGE gels were stained with Colloidal Coomassie Blue G-250 (see Fig. 1).

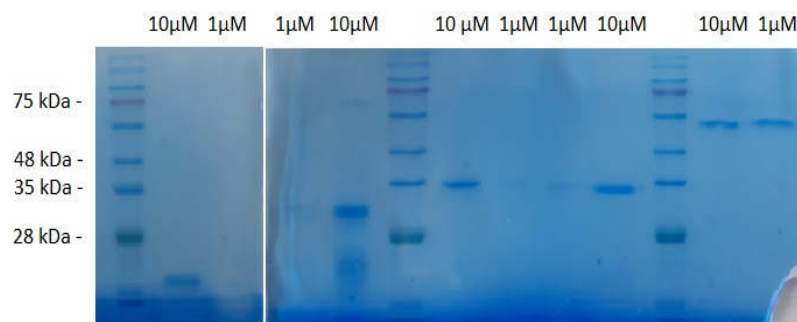


Figure 1: SDS-PAGE of the purified proteins strepPhaC^{ΔC}, His₆-PhaC, His₆-PhaM, strep-PhaM and His₆-PhaC^{ΔC} loaded in two concentrations 1 and 10 μM.

Whereas, Strep-tagged proteins, such as strep-PhaM and strep-PhaC^{ΔC} were purified by 0.2 mL strep-Tactin gravity flow column that was equilibrated with two CVs (column bed volumes) and washed five times with 1 CV each time of buffer W (100 mM TRis/HCl, 150 mM NaCl, pH= 8.0, 1 mM EDTA). Subsequently, Strep-PhaC^{ΔC} was eluted with 3 applications (1 CV each) of elution buffer (100 mM biotin). Then, part of each fraction was also mixed with denaturation buffer (5 min/95 °C), cooled down on the ice for 2 min and loaded into wells of SDS polyacrylamide gel (12%) and separated by SDS-PAGE electrophoresis at 25 mA. All SDS-PAGE gels were stained with Colloidal Coomassie Blue G-250 (see Fig. 1).

Subsequently, proteins were purified from imidazole and other low-molecular weight molecules by size exclusion chromatography (120 mL bed volume, Superdex 200) and exchanged against 10 mM Tris/HCl (pH=8), 250 mM NaCl buffer. Purified proteins were concentrated via ultrafiltration and then used directly for subsequent analyses.

Cross-linking

For in vitro cross-linking studies different mixtures of Strep_PhaC^{ΔC} (10 μM) and His₆_PhaM^{ΔC} (10 μM) were prepared in 20 mM potassium phosphate buffer with 5% glycerol (pH = 7.5) and incubated on ice for 30 min. Then, 0.5 μL of a freshly prepared glutaraldehyde solution was added. Thereafter, the samples were incubated at 37 °C. After 5 min, the reactions were stopped by addition of 1 μL of 1M Tris/HCl buffer (pH = 8). SDS denaturation buffer was added to each elution and analysed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and stained by colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250.

Size exclusion chromatography and multi light-scattering (SEC-MALS)

Analytical size exclusion chromatography (SEC) coupled to multi angle light-scattering technique (MALS, Wyatt Technology Corp.) was used to determine the molecular masses of His₆_PhaM, His₆_PhaM^{ΔC}, His₆_PhaC and its complexes of these proteins. The measurements were done on a micro-Akta chromatography system (GE Healthcare) at laboratory temperature with a flow of 0,5 mL/min in buffer composed of 10 mM Tris-HCl (pH=8.0), 250 mM NaCl. MALS analysis were achieved by SEC Superose 6 Increase column (10/300 GL, GE Healthcare, Solingen, Germany) which was calibrated using the gel filtration calibration kit LMW and HMW (GE Healthcare, Solingen, Germany) according to manufacturer's instructions. Fractions (0.5 mL) were collected manually and controlled by SDS-PAGE. To analyze the molecular weight, micro-Akta was connected to downstream MALS using miniDawn Treos system (Wyatt) combined with an Optilab T-rEX, (Wyatt, Dernbach, Germany) refractometer. The molecular masses were calculated by software ASTRA 7 (Wyatt Technology, Dernbach, Germany).

Bio-layer interferometry

The determination of interaction between His₆_PhaM (26.5 kDa) and strep_PhaC^{ΔC} (22.2 kDa) and between His₆_PhaM^{ΔC} (24.1 kDa) and strep_PhaC^{ΔC} was performed employing Bio-layer Interferometry (BLI) using an Octet K2 system (Fortébio Molecular Devices (UK) Limited, Wokingham, United Kingdom). All the experiments were performed in buffer 10 mM Tris-HCl (pH=8.0), 250 mM NaCl. The association reactions were performed with various Strep-PhaC^{ΔC} (0.008–1 μM) while His₆_PhaM (11.1 μM) or His₆_PhaM^{ΔC} (24.5 μM) was used as ligand and bound to Ni-NTA sensor tips (Fortébio Molecular Devices (UK) Limited, Wokingham, United Kingdom) followed by a 60s baseline measurement. Subsequently, the tip was incubated for 180 sec in the Strep-PhaC^{ΔC} analyte solution to observe the association and in the buffer to record dissociation. To prevent false-positive results, sensor tips, which were not loaded with His₆_PhaM were also used in the measurement. The assay was terminated by dissociation step, which took place 300 s. After each use, the biosensors were regenerated by 10 mM glycine

(pH = 1.7) and 10 mM NiCl₂ as manufactures recommendations proposed. The response in equilibrium (R_{eq}) was calculated using the Data Analysis Software of the Octet System.

Crystallization of strep-tag PhaC^{ΔC} and His-tag PhaM^{ΔC} proteins and its complex

Crystallization of the purified proteins strep-tag PhaC^{ΔC}, His-tag PhaM^{ΔC} and its complex was performed with commercially available crystallization screens Structure Screen 1 and 2 (Molecular Dimensions) using the hanging drop vapor-diffusion method at laboratory temperature. The most important was purity and high concentration, in the case of strep PhaC^{ΔC}, we could not achieve a higher concentration than 3 mg/mL because of spontaneous precipitation. In the case of his PhaM^{ΔC}, the used concentration was 8,8 mg/mL. Crystallization of complex was performed in the protein to one ratio. Each experiment consisted of mixing 1 μL of protein solution (10 mM Tris-HCl, pH = 8, 250 mM NaCl) with 1 μL of reservoir solution and then equilibrating the mixture against 0.5 mL of the reservoir solution. The experiments are still running and observed every week till now.

6.3 Příloha III

SEDLÁČEK, P.; SLANINOVÁ, E.; KOLLER, M.; NEBESAROVA, J; MÁROVÁ, I.; KRZYZANEK, L.; OBRUČA, S. PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances. *New Biotechnology*, 2019, roč. 49, č. 3, s. 129-136. ISSN: 1871-6784.



Contents lists available at ScienceDirect

New BIOTECHNOLOGY

journal homepage: www.elsevier.com/locate/nbt

Full length article

PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances

Petr Sedlacek^a, Eva Slaninova^a, Martin Koller^{b,c}, Jana Nebesarova^{d,e}, Ivana Marova^a, Vladislav Krzyzanek^f, Stanislav Obruca^{a,*}^a Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkynova 118, 612 00, Brno, Czech Republic^b Institute of Chemistry, NAWI Graz, University of Graz, Heinrichstrasse 28/III, 8010, Graz, Austria^c ARENA Arbeitsgemeinschaft für Ressourcenschonende & Nachhaltige Technologien, Inffeldgasse 21b, 8010, Graz, Austria^d The Czech Academy of Sciences, Biology Centre, v.v.i., Branisovska 31, 370 05, Ceske Budejovice, Czech Republic^e University of South Bohemia, Faculty of Science, Branisovska 31, 370 05, Ceske Budejovice, Czech Republic^f The Czech Academy of Sciences, Institute of Scientific Instruments, v.v.i., Kralovopolska 147, 612 64, Brno, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:

Polyhydroxyalkanoates

Osmotic imbalance

Hypotonic lysis

*Cupriavidus necator**Halomonas halophila*

Halophiles

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are microbial polyesters which accumulate as intracellular granules in numerous prokaryotes and mainly serve as storage materials; beyond this primary function, PHA also enhance the robustness of bacteria against various stress factors. We have observed that the presence of PHA in bacterial cells substantially enhances their ability to maintain cell integrity when suddenly exposed to osmotic imbalances. In the case of the non-halophilic bacterium *Cupriavidus necator*, the presence of PHA decreased plasmolysis-induced cytoplasmic membrane damage during osmotic up-shock, which subsequently enabled the cells to withstand subsequent osmotic downshock. In contrast, sudden induction of osmotic up- and subsequent down-shock resulted in massive hypotonic lysis of non-PHA containing cells as determined by Transmission Electron Microscopy and Thermogravimetric Analysis. Furthermore, a protective effect of PHA against hypotonic lysis was also observed in the case of the halophilic bacterium *Halomonas halophila*; here, challenged PHA-rich cells were capable of retaining cell integrity more effectively than their PHA-poor counterparts. Hence, it appears that the fact that PHA granules, as an added value to their primary storage function, protect halophiles from the harmful effect of osmotic down-shock might explain why PHA accumulation is such a common feature among halophilic prokaryotes. The results of this study, apart from their fundamental importance, are also of practical biotechnological significance: because PHA-rich bacterial cells are resistant to osmotic imbalances, they could be utilized in *in-situ* bioremediation technologies or during enrichment of mixed microbial consortia in PHA producers under conditions of fluctuating salinity.

Introduction

The osmotic strength of the environment is one of the crucial physical parameters which determine the capability of bacteria to survive and grow in a given habitat. Increase in extracellular osmolarity induces transport of water from the bacterial cells, which results in dehydration of cytoplasm and damage to the plasma membrane when massive plasmolysis occurs [1]. Sudden subsequent exposure of osmotically challenged cells to a hypotonic environment induces rapid transport of water into the cells, accompanied by an increase in their volume. Since the plasma membrane of the bacterial cells is at least

partially damaged by plasmolysis, sudden hypotonic shock usually results in so called hypotonic lysis, which is accompanied by destruction of the structure of the challenged microbial cell [1,2]. Rapid fluctuations in extracellular osmolarity is a common feature of numerous environments, and bacteria have developed various strategies how to cope with hypertonic and hypotonic conditions [3]. The most common strategy is biosynthesis or accumulation of osmolytes under hypertonic conditions and their subsequent release under hypotonic conditions [4,5]. Under the latter, osmolytes as well as other intracellular solutes and water are released by so called “mechanosensitive channels”, which are, to some extent, able to protect bacterial cells from losing their

Abbreviations: CDM, cell dry mass; CFU, colony forming units; GC-FID, gas chromatography equipped with flame ionization detector; PHA, polyhydroxyalkanoates; MS, mineral salt medium; PBS, phosphate buffer saline; TEM, transmission electron microscopy; TGA, thermogravimetric analyzer

* Corresponding author.

E-mail address: Stana.O@seznam.cz (S. Obruca).

<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.10.005>

Received 25 May 2018; Received in revised form 29 October 2018; Accepted 29 October 2018

Available online 31 October 2018

1871-6784/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

integrity under osmotic down-shock [6,7].

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are microbial polyesters, which accumulate as intracellular granules in numerous prokaryotes [8]. These materials serve primarily for internal storage of carbon and energy, but their biological function is far more comprehensive; it has been recently summarized that PHA enhance cell robustness and resistance of bacteria against various stress factors [9]. For example, the presence of PHA in bacterial cells influences water efflux from bacterial cells, which protects them against damage caused by intracellular ice formation during freezing [10]. Moreover, PHA monomers generated by the PHA metabolism are potent chemical chaperones, which protect enzymes and other biological molecules from the harmful effects of oxidative pressure and high temperature [5]. In addition, PHA also scatters UV irradiation, thus providing UV-protective function [11]. Finally, we have recently reported that PHA protect non-halophilic bacteria against adverse effects of osmotic up-shock by reducing the level of plasmolysis and membrane damage in challenged cells [12]. Moreover, a potential complex osmo-protective effect of PHA is indirectly evidenced by the fact that numerous halophiles including extremely halophilic Archaea such as *Haloflex mediterranei* [13], *Halogeometricum borinquense* [14], or *Natrinema ajiuensis* [15], which are capable of accumulation of substantial amounts of PHA [16]. Here we aimed at evaluating a potential protective effect of PHA for both non-halophilic and halophilic bacterial cells when exposed to sudden osmotic down-shock.

Materials and methods

Microorganisms

The PHA-producing bacterial strains *Cupriavidus necator* H16 (CCM 3726) and *Halomonas halophila* CCM 3662 were obtained from the Czech Collection of Microorganisms, Brno, Czech Republic. The PHA non-producing mutant strain *Cupriavidus necator* PHB-4 (DMS-541) was obtained from the Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures, Braunschweig, Germany.

Cultivations, hyperosmotic and hypo osmotic challenges

The cultivations were performed in Erlenmeyer flasks (volume 250 mL) containing 100 mL of particular cultivation media. To obtain PHA-rich phenotypes of the tested PHA accumulating strains, nitrogen-limited Mineral Salt (MS) cultivation medium supporting PHA accumulation was used [17]. Composition of MS medium for *C. necator* is described elsewhere [12]. For *H. halophila*, fructose was replaced by glucose in the MS medium, and 66 g NaCl per 1 L was added to induce hyperosmotic conditions required by this strain. When low intracellular PHA content was required, complex nitrogen-rich media were used. In this case, *C. necator* was cultivated in complex Nutrient Broth medium (10 g peptone, 10 g beef extract, 5 g NaCl per 1 L of distilled water). The composition of complex medium used for *Halomonas halophila* was: 15 g peptone, 3 g yeast extract, 66 g NaCl, and 1 g glucose in 1 L of distilled water.

The flasks were inoculated with 5 mL of the overnight culture of the individual strain grown in particular complex media. The cultivations were performed for 72 h at 30 °C under constant shaking (180 rpm) in a rotary incubator. When the cultivation was completed, the biomass concentration was measured gravimetrically and the PHA content in cell biomass was analyzed by GC-FID as reported previously [18]; subsequently, the cells were exposed to osmotic challenges.

Cells of *C. necator* H16 and *C. necator* PHB-4 were harvested by centrifugation (5000 × g, 5 min), washed with phosphate buffer saline (PBS; pH 7.4, 50 mM), centrifuged again and exposed to various concentrations of NaCl - 0, 50, 100 and 200 g/L of phosphate buffer. After exposure to hyperosmotic conditions (2 h at 30 °C), the cells were separated by centrifugation and exposed to subsequent osmotic down-shock induced by re-suspension in deionized water, and incubation

under permanent shaking for 1 h at 30 °C. Osmotic down-shock challenge exerted on *H. halophila* cells consisted of separation of the cells from cultivation media by centrifugation (5000 × g, 5 min) and subsequent replacement of cultivation media by deionized water. Thereafter, the prepared cells were subjected to analysis as described below.

Determination of cell viability

Cell viability of *C. necator* cultures after osmotic challenge was assessed by flow cytometry (Apogee A50, Apogee, GB) using a membrane integrity assay employing propidium iodide staining. The protocol described in [19] was employed.

The number of viable cells (CFU per mL) for *H. halophila* before and after osmotic down-shock challenge was determined by standard dilution plating assay on Petri dishes with complex medium agar, where the colonies were counted after 48 h of incubation in thermostat at 30 °C (three replicates).

Thermogravimetric and Transmission electron microscopy (TEM) analysis of bacterial cells

For qualitative and quantitative analysis of the dehydration of bacterial cells after cultivation and/or osmotic challenge, a thermogravimetric (TGA) analyzer Q5000 (TA Instruments) was used. Prior to the TGA analysis, the dispersion of the bacterial culture was centrifuged (5 min, 14,800 rpm) and the supernatant was discarded. Approximately 15 mg of the remaining cell suspension was weighed on the aluminium TGA pan. In the TGA analyzer, the pan with sample was heated instantaneously to 70 °C and the weight of the sample was continuously recorded at this temperature for 40 min. After that, the temperature was further raised to 200 °C and the sample was held at this temperature for another 10 min to determine its dry mass. Every sample was measured in at least three replicates; for each measurement, a fresh bacterial culture was prepared. In order to determine critical water contents, analyses of thermograms were performed according to [20]. In this experimental approach, the loss of water is attributed to the specific intracellular or extracellular region. More details on the data analysis approach are presented in the Results section.

Samples of the challenged and non-challenged bacterial cultures were visualized using Transmission Electron Microscope JEOL 1010 following the protocol described in our previous reports [12,17].

Results

Viability assay of osmotically challenged cells of *C. necator*

Various cultures of *C. necator* with different PHA content were exposed to osmotic up-shock induced by 200 g/L NaCl followed by sudden subsequent osmotic down-shock by replacement of NaCl-rich buffer by deionized water. After this substantial osmotic imbalance challenge, the total number of bacterial cells as well as the ratio of viable/dead cells was determined by flow cytometry and compared with non-challenged cultures. The results are demonstrated in Fig. 1.

The highest overall mortality, accompanied by considerable decrease of cell numbers caused by massive hypotonic lysis of the cells, was observed for the PHA-free culture of *C. necator* PHB-4. In this case, only 2% of the cells of the original population were capable of maintaining cell integrity when exposed to subsequent osmotic up- and down-shock. Among these non-disrupted cells, 20% were evaluated as non-viable. A very similar effect of osmotic challenge was observed in *C. necator* H16 cultivated in nitrogen-rich medium, which resulted in a PHA content of 1.6% of cell dry mass. In this case, the total number of cells after complete osmotic challenge (up- and down-shock) fell to 7.5% of its original value, and the proportion of non-viable cells in the challenged culture was about 43%. In contrast, when PHA-rich cells of

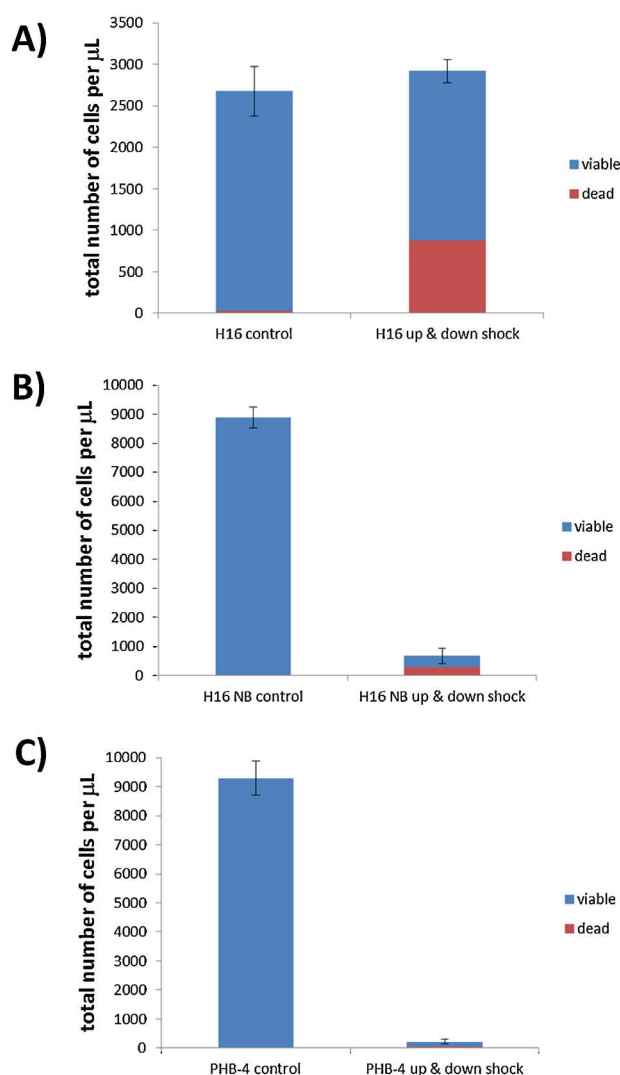


Fig. 1. Results of viability assay performed by flow cytometry. Comparison of number of detected cells (viable vs. dead) in 1 µL for the control and osmotically challenged (up & down shocked) cells of *C. necator* H16 cultivated in mineral medium (A), *C. necator* H16 cultivated in nutrient broth medium (B) and for *C. necator* PHB-4 cultivated in mineral medium (C).

C. necator H16 cultivated in nitrogen limited medium (PHA content of 74% of cell dry mass) were exposed to rapid and massive changes in external osmolarity, no decrease in cell counts caused by hypotonic cell disruption was observed, and the proportion of dead cells was about 30%. These data indicate that the presence of intracellular PHA granules protected bacterial cells from adverse effect of rapid fluctuations in external osmolarity.

Thermal analysis of challenged bacterial cells of *C. necator*

Isothermal thermogravimetry was used primarily to monitor osmotically induced changes in intracellular water content and to reveal possible effects of altered cell integrity of the osmotically challenged cells on the rate of transmembrane movement of intracellular water during the drying process. The method of determination of intracellular water content based on the isothermal TGA was originally designed by Uribe-larrea et al. [20], who proposed that in the drying rate curve, when plotted as a function of the residual mass of the cells (or residual

water content), individual stages of the drying process (i.e., drying of extracellular and intracellular water, respectively) can be distinguished as they are represented by respective curve sections with different curve trends. Thus, the critical water content, i.e., the water content at which the drying rate curve suddenly changes its course, represents the moment when a change in the mechanism of the drying process occurs.

The results of isothermal drying TGA analysis performed for all tested *C. necator* species at 70 °C are shown in Fig. 2. In Fig. 2a, an example of a raw thermogram (residual mass of the sample as a function of time) is shown for *C. necator* H16 cultivated in mineral (i.e., nitrogen limited) medium. In all drying rate curves (shown in Fig. 2b–d), residual water content is represented as g of water per g of cell dry mass (determined as residual mass reached during the post-drying step at 200 °C). Fig. 2b shows the drying kinetics of *C. necator* H16 cultivated in nitrogen limited medium (black curve) at different stages of the osmotic challenge. The drying rate curve shown for the osmotically non-challenged cells (black) displays the typical three-stage dependency described and explained in [20,21]. The first stage (I.– II.) is characterized by a sudden increase in the drying rate as the sample equilibrates at the drying temperature in TGA analyzer. The next stage (II. – III.) represents evaporation of extracellular water. The drying rate (water loss per time) during this stage is almost constant as the process reflects loss of free (i.e., unbound) water from surface. At the critical water content, represented by point III. in the drying rate curve, the drying rate begins to decrease rapidly as the more tightly bound surface water and the intracellular water begins to evaporate. This critical water content represents the main quantitative outcome of the isothermal TGA drying analysis.

From the comparison of drying rate curves of reference *C. necator* H16 strain with the osmotically up-shocked sample, it is evident that the cell dehydration, induced by the hyperosmotic conditions, manifests itself in significant decrease of the critical water content in the drying rate curve. Similar shifts in the critical water content at hyperosmotic conditions were found also in the case of *C. necator* strains with minor content of PHA, i.e., for *C. necator* H16 strain cultivated in nitrogen-rich medium and also for the PHA-free mutant strain *C. necator* PHB-4 (see Fig. 2c, d). It is evident that for both strains the absolute value of critical water content is significantly higher compared to PHA accumulating strain H16. This applies for the unchallenged as well as for the osmotically up-shocked cells, and is clearly attributed to great increase in cell dry mass caused by accumulated PHA in *C. necator* H16 cultivated in nitrogen-poor medium.

The most interesting differences between the three tested *C. necator* cultivation setups were found when the bacteria were first subjected to osmotic up-shock in NaCl-rich medium and then transferred to deionized water. This sudden hypoosmotic shock resulted in strongly different behavior of PHA containing cells compared to cells with minor or no PHA content. *C. necator* H16 strain with a high content of PHA in the cells hydrated to some extent as it is represented by a shift of critical water content to a higher value. The critical water content of the osmotically challenged PHA containing cells was always lower compared to the reference (unchallenged cells). This could indicate a change in barrier properties of the cell membranes or in cell ultrastructure, but the actual reason of this irreversibility of hyper/hypo osmotic challenge in the behavior of PHA accumulating cells cannot be revealed without further experimental study. Completely different drying rate curves were measured for PHA-free cells. It is evident that the drying rate curve of *C. necator* PHB-4 after the osmotic up- and down-shock lost the typical three-stage shape. There was no critical water content where a sudden change in the drying kinetics could be observed. This indicates that there is no barrier effect remaining which would make a difference between the rate of loss of water from inside and outside the cells. However, it is very likely that this change in the shape of the drying rate curve is a consequence of osmotically induced membrane damage and loss of cell integrity. A similar, though less profound, trend was found also for low PHA content in *C. necator* H16 cells (see Fig. 2c). In contrast

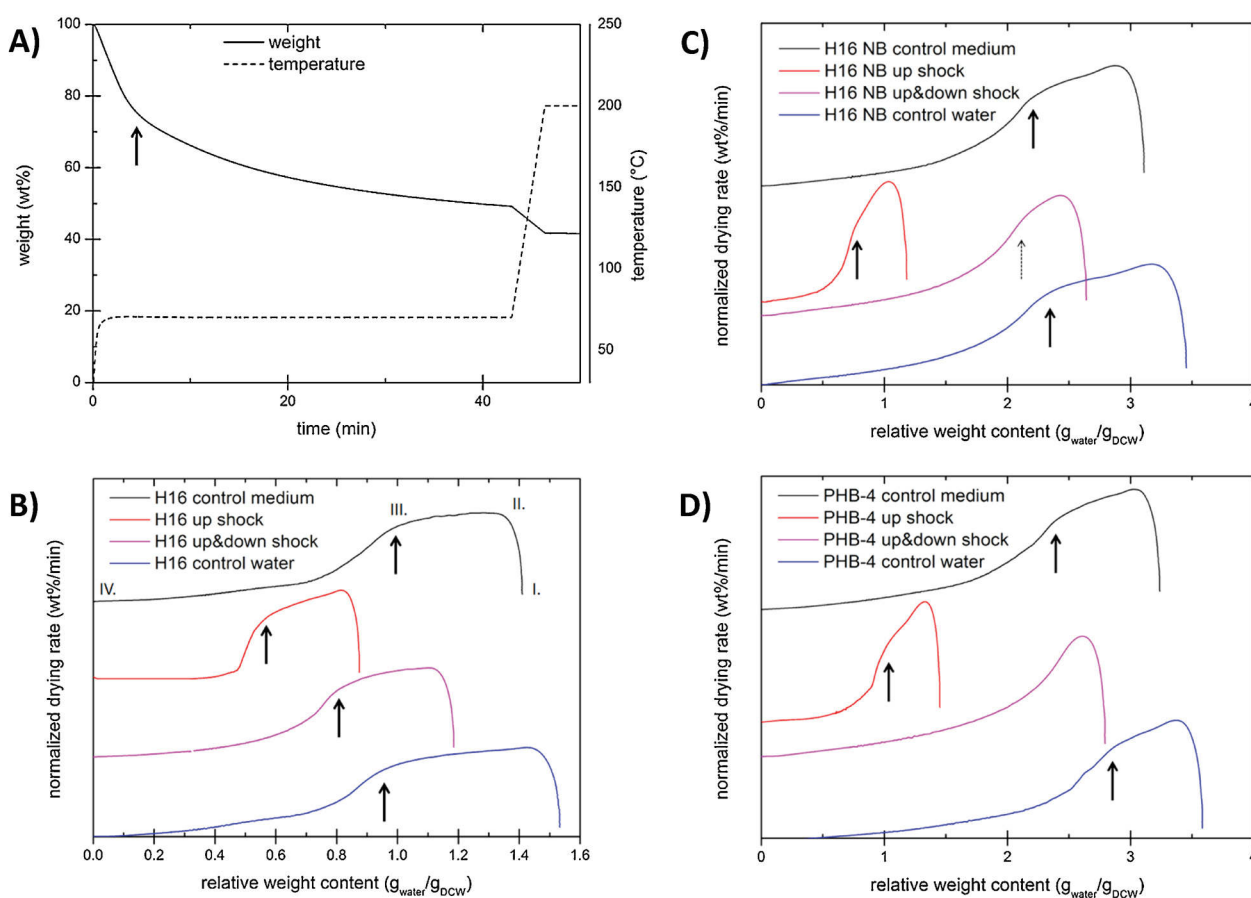


Fig. 2. Results of isothermal thermogravimetry presented as an example of raw thermogram for *C. necator* H16 after cultivation in mineral medium (A) and as individual series of drying rate curves for *C. necator* H16 cultivated in mineral medium (B), *C. necator* H16 cultivated in nutrient broth medium (C) and *C. necator* PHB-4 cultivated in mineral medium (D), respectively. In graphs (B) – (D), drying rate curves are shown for fresh cells after cultivation (black), for cells after hyperosmotic treatment in 200 g/L NaCl (red) and after additional hypoosmotic treatment in deionized water (violet). For comparison, drying rate curve for hypoosmotically challenged cells without previous hyperosmotic step are also shown (blue). Drying rate curves are offset for clarity.

to the PHA-free *C. necator* PHB-4 strain, the drying rate curve of this low PHA content strain maintained the concave shape. Nevertheless, it can be seen that the critical water content disappeared as the initially rather detached drying of intracellular and extracellular water are overlapping. For greater clarity of the changes in the drying curve induced by the osmotic up- and down-shocks, the results are shown also in the normalized form in supplementary material (see Figure S1a–c). Beyond the results shown in Fig. 2, an influence of the extent of hyperosmotic challenge was also tested. For this purpose, the osmotic up-shock of the *C. necator* cultures was performed with differently concentrated NaCl solutions (50, 100 and 200 g/L NaCl, respectively). The results show that the higher the NaCl concentration during the hyperosmotic treatment, the more pronounced were the negative impacts on the drying rate curves of *C. necator* cultures with low or no PHA content after their subsequent hypoosmotic treatment in deionized water (see Figure S1 d–f).

Transmission electron microscopy (TEM) of osmotically challenged cells of *C. necator*

In order to explain the changes in water transport (drying) behavior of osmotically challenged cells revealed by thermogravimetry, morphological changes induced by individual steps of the osmotic challenge were observed by TEM for all tested *C. necator* cultures (see Figs. 3 and 4 and Fig. S2 in supplementary material). As can be seen in Fig. 3, no

lethal changes in cell morphology were found for PHA accumulating cells; osmotic up-shock caused only mild plasmolysis in these cells. Furthermore, significant coalescence of PHA granules resulting from the high osmolality was also confirmed, which may indicate a negative effect of the osmotic up-shock on the physiological state of the granule bound proteins. As demonstrated for the first time by the present study, no additional negative impacts on cell morphology of previously up-shocked PHA containing cells were revealed after the subsequent hypoosmotic challenge. On the contrary, severe harmful effects caused by the osmotic imbalances were observed in cells of non-PHA accumulating *C. necator* cultures. As can be seen in Fig. 4, osmotic up-shock of *C. necator* PHB-4 resulted in massive plasmolysis. Furthermore, as previously discussed [12], not only the total extent but also some interesting qualitative differences were found for the plasmolysis of up-shocked PHA accumulating and non-accumulating cells, respectively. Contrary to the symmetrical plasmolysis observed for PHA containing cells, both cultures cultivated with no or low content of PHA showed highly asymmetric formation of periplasmic space accompanied by the formation of endocytotic vesicles in some bacterial cells and the formation of tubular structures and Scheie structures as described by [22]. In some cells, “hole-like” structures (reminiscent of incompletely formed endocytotic vesicles) randomly distributed in the outer volume of bacterial cell cytoplasm were observed. This asymmetric plasmolysis caused severe damage to the cytoplasmic membrane, as it was further confirmed by the subsequent osmotic down-shock of the cells. It can be

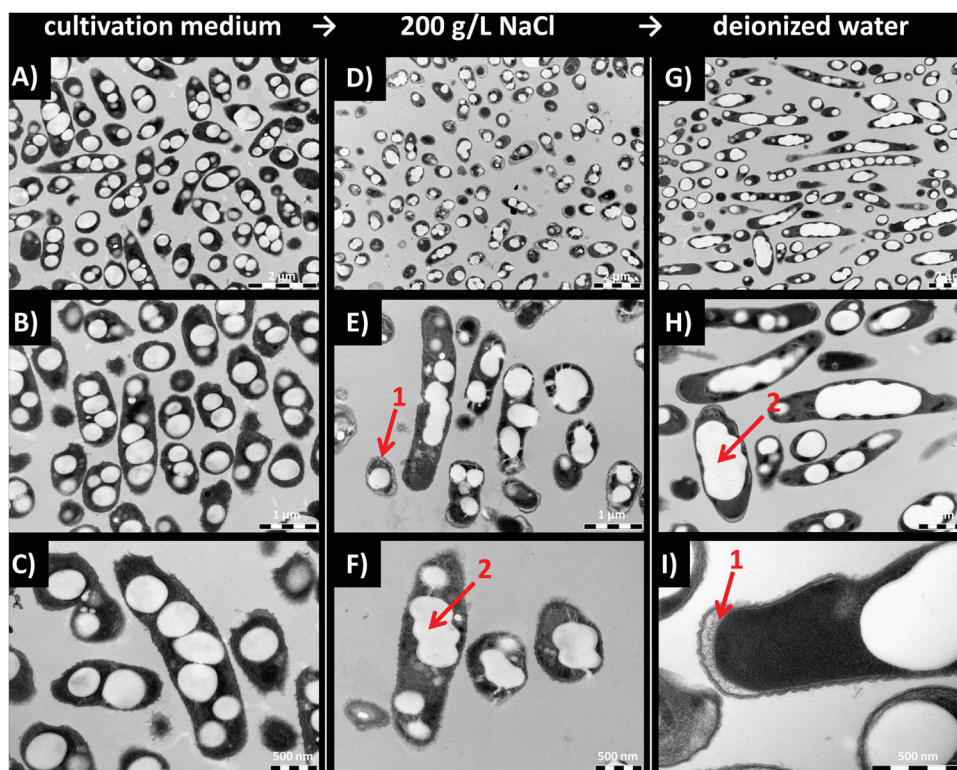


Fig. 3. TEM micrographs of *C. necator* H16 observed under different magnifications after cultivation in mineral medium (A – C), after hyperosmotic treatment in 200 g/L NaCl (D–F) and after additional hypoosmotic treatment in deionized water (G–I). Mild plasmolysis (1) and coalescence of PHB granules (2) is labeled in the pictures.

seen in Fig. 4 and S2 that PHA non-accumulating cells, after combined subsequent osmotic up- and down-shock, showed numerous aspects of cell damage. First, massive leakage of the cytoplasm was confirmed for PHA non-containing cells after their exposure to osmotic down-shock. Numerous cells were observed only as depletive cell envelopes. In the other cells, massive plasmolysis was maintained and the compact, but seriously deformed cytoplasmic space was observed. In case of *C. necator* H16 culture cultivated in nitrogen-rich medium (see Figure S2), even in this medium some of the cells accumulated a significant amount of PHA. In agreement with general comparison of PHA accumulating and non-accumulating cultures exposed to suddenly induced hypotonic conditions, these individual PHA containing cells revealed much less intense negative impacts of fluctuation of osmolality on the cell morphology. The results of TEM confirmed conclusively that the different drying behavior of PHA accumulating and non-accumulating cells is a result of damage of the cell membrane caused by the fluctuation in osmolality. When the osmolality is suddenly increased and decreased, PHA containing cells are able to maintain cell integrity to a much greater extent compared to cells without PHA.

The effect of osmotic down-shock on the halophilic bacterium Halomonas halophila

In previous experiments, it was confirmed that for the non-halophilic bacterium *C. necator*, presence of PHA in the cells provides a protective effect against the harmful impacts of sudden osmotic imbalances. To test whether this protective effect can be observed also for halophilic bacteria, the above introduced methodology was used in the study of hypoosmotic challenge of *Halomonas halophila*. Previously, this halophile was proposed as a promising candidate for biotechnological production of PHA [17]. To be able to reveal an influence of the PHA

presence, *H. halophila* was cultivated in parallel in mineral and in complex cultivation media. In mineral medium, a high intracellular content of PHA was accumulated (up to 82%, see [17]), while in complex medium, only a low amount of PHA was detected (approx. 4%).

The hypoosmotic challenge of the PHA accumulating and non-accumulating cells was introduced by transferring them from their optimal osmolality (provided by 66 g/L NaCl to deionized water. The initial focus was on viability of the cells after the down-shock. Flow cytometry was found to be inappropriate for the determination of cell viability/mortality, because it was experimentally confirmed that the staining of the cells with propidium iodide is not efficient under the conditions of high salinity necessary for the tested bacteria. As an alternative experimental approach, analysis of colony forming units (CFU/mL) was employed. By this technique, a far higher mortality was revealed for osmotically down-shocked culture with low PHA content than for the PHA accumulating organisms. While for the PHA accumulating culture CFU decreased by one order of magnitude (from 10^9 in control to 10^8 in down-shocked sample), the decrease in CFU was several times higher for the non-accumulating culture (from 10^9 in control to 10^4).

Again, the results of thermal analysis confirmed the differences in drying behavior of *H. halophila* cultures with high and low PHA content, respectively. In Fig. 5 it can be seen that the cultures from mineral medium (high PHA content) maintained the typical profile even after osmotic down-shock. On the other hand, it can be seen that the drying rate curve for the down-shocked bacteria cultivated in complex medium (low PHA content) appears different. First, even if the sampling was similar to other cultures, it can be seen that the drying rate curves started at much higher relative weight content of water (see the inset in Fig. 5). This is because the sediment obtained by centrifugation of the

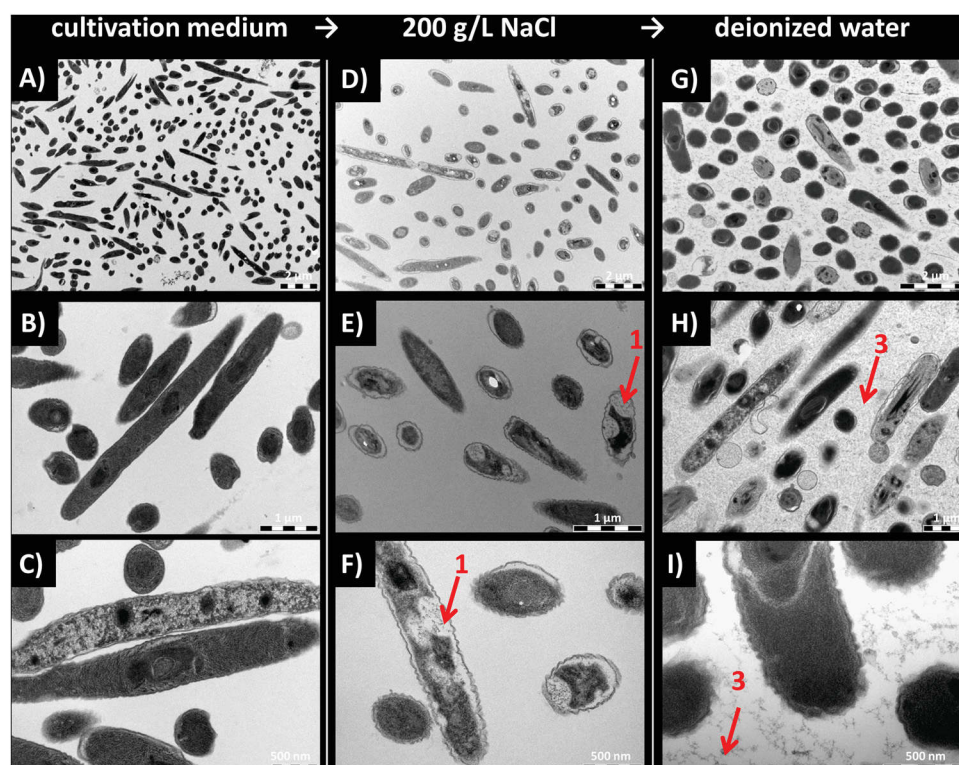


Fig. 4. TEM micrographs of *C. necator* PHB-4 observed under different magnifications after cultivation in mineral medium (A – C), after hyperosmotic treatment in 200 g/L NaCl (D–F) and after additional hypoosmotic treatment in deionized water (G–I). Severe plasmolysis (1) and leakage of the cytoplasmic content (3) is labeled in the pictures.

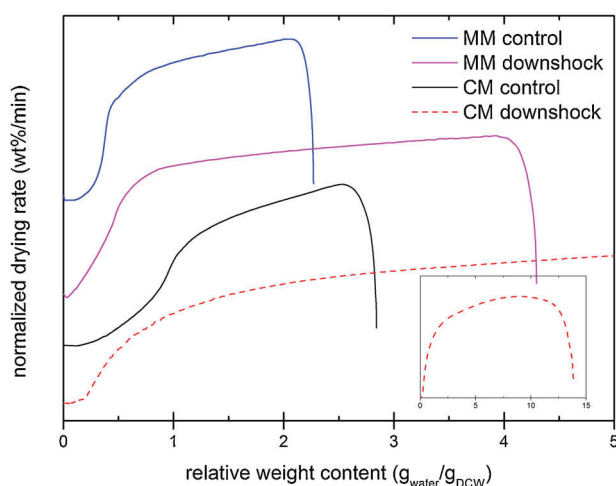


Fig. 5. Isothermal drying curves for *H. halophila* cultivated in mineral medium (blue: control, violet: osmotic down shock provided by treatment in deionized water) and in complex medium (black: control, dashed red: osmotic down shock provided by treatment in deionized water).

down-shocked culture with low PHA content contained significantly lower dry mass compared to all other tested samples (about 5 wt. % compared to at least 20 wt. % for all other *C. necator* and *H. halophila* samples). Furthermore, the drying rate remained similar and incomparably high (5–10 times, not seen in the normalized curves shown in Fig. 5) almost all along the drying process. This indicates that *H.*

halophila cells with low PHA content may be substantially damaged by the hypoosmotic challenge and that the drying process therefore occurs without any observable effect of the cell residues on the rate of the water loss. This assumption was further confirmed by TEM results, where the severe damage of the *H. halophila* cells cultivated in complex medium can be clearly observed (see Fig. 6). Similar to down-shocked PHA-free *C. necator* cells, a high number of hypoosmotically challenged *H. halophila* cells are observed as empty cell envelopes, which indicates fatal damage of the plasma membrane. Again, a higher presence of PHA granules in the cells provided significant protection against this morphological harm.

Discussion

Prokaryotes are known to have extreme adaptability to various stress conditions. Fluctuations in external osmolarity belong among very common environmental stress factors associated with numerous habitats. For instance, during dry or rainy periods, soil bacteria are repeatedly exposed to osmotic up- and down-shocks [1]. Further, some microorganisms are also capable of adapting to constant high salt concentrations. So called “halophiles” inhabit naturally salty environments, extremely halotolerant microorganisms are even able to survive and prosper at NaCl concentrations reaching values of saturated salt solution [23].

Apart from well described protective strategies to cope with osmotic imbalances (such as an accumulation or excretion of compatible solutes), which are exhaustively reviewed for instance by [1,23], there are reports that accumulation of intracellular PHA granules also substantially increases survival rate of bacteria when exposed to osmotic up-shock challenges [24–26]. We have recently investigated the protective effect of PHA granules for the non-halophilic bacterium *C.*

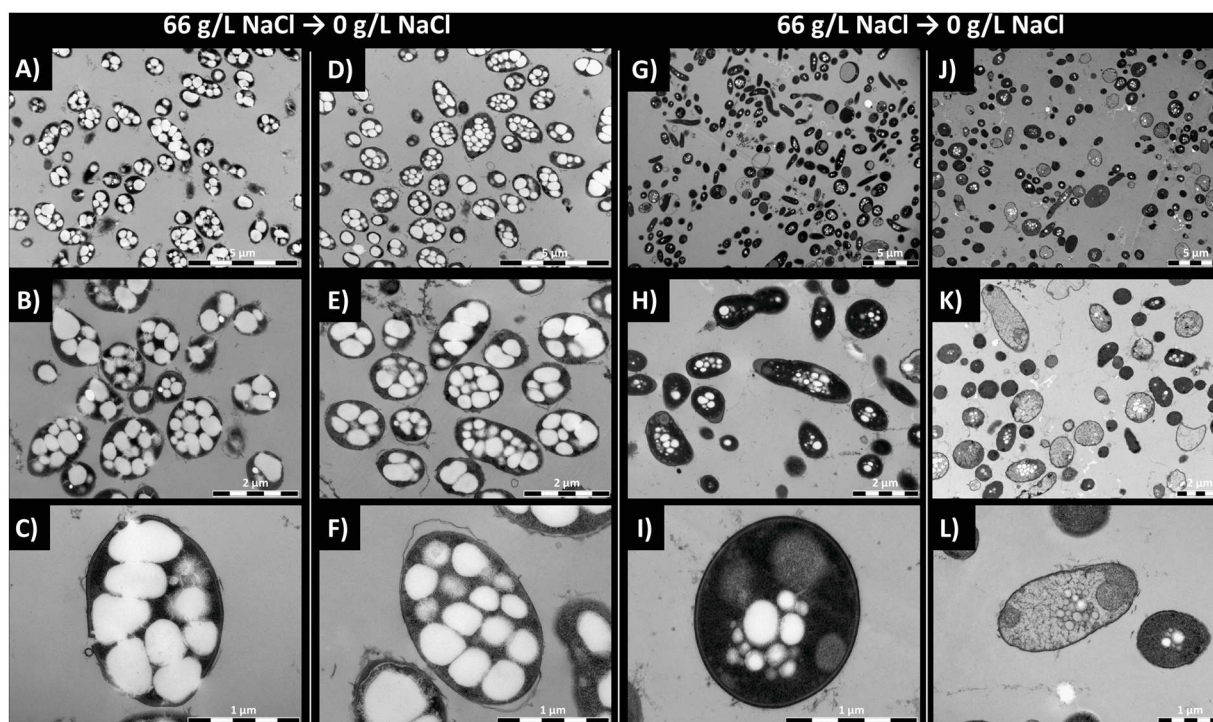


Fig. 6. TEM micrographs of the halophilic bacterial strain *H. halophila* cells after cultivation in mineral medium (A–C) and complex medium (G–I), respectively. Both cultures were kept at optimal osmolality provided by 66 g/L NaCl solution. Same cultures after hypoosmotic shock provided by treatment with deionized water (G–I and J–L for *H. halophila* cultivated in mineral and complex media, respectively).

necator when exposed to osmotic up-shock. Surprisingly, osmotic up-shock induced by NaCl did not initiate PHA hydrolysis to provide carbon and energy covering expenses of stress response [12]. Nevertheless, since PHA represent about 30 vol. % of bacterial cells cytoplasm [27], almost water-free PHA granules act as hydrophobic scaffolds which substantially reduce level of cytoplasm shrinkage as a consequence of cell dehydration, which caused substantially lower degree of plasmolysis. Moreover, PHA granules as a result of their “liquid-like” properties probably partially repair and stabilize cell membranes by plugging small gaps formed by plasmolysis. Therefore, PHA rich cells demonstrated a considerably lower level of cytoplasmic membrane damage than PHA non-accumulating mutant cells when exposed to hyperosmotic conditions [12]. Hence, it seems that PHA represents an important metabolite, which significantly contributes to robustness of bacterial cells against osmotic up-shock.

To complete knowledge on PHA’s role in protective effect against osmotic fluctuations, this work aimed at evaluating their protective function under subsequently applied hypotonic conditions. The results clearly indicate that a capability of PHA accumulation and intracellular PHA content are important parameters protecting non-halophilic bacteria exposed to hypotonic shock. Survival rate of PHA-rich *C. necator* H16 (PHA content of 74% of CDM) exposed to osmotic challenge was much higher than that of PHA non-accumulating mutant *C. necator* PHB-4 or PHA-poor *C. necator* H16 cells cultivated in complex medium (PHA content about 1.6 wt. % of CDM) (see Fig. 1). Moreover, results obtained by TGA (Fig. 2) and TEM analysis (Figs. 3,4,5) demonstrated that the presence of PHA granules in bacteria is essential for them to maintain cell integrity when suddenly confronted with hypotonic conditions. In other words, presence of PHA granules in non-halophilic bacterial cells considerably decreases their susceptibility to hypotonic lysis. The main reason could be a much lower level of cytoplasm membrane damage in PHA-rich cells caused during the first step of complex osmotic challenge - osmotic up-shock. When cells are

subsequently suddenly exposed to hypotonic conditions, PHA-rich cells with less or even non-damaged cytoplasmic membranes are capable of maintaining cell integrity via the action of appropriate pumps and mechanosensitive channels. In contrast, PHA-free cells or cells with low PHA content are unable, due to plasmolysis induced membrane damage, to compensate/control water influx and inevitably lose their cell integrity. As far as we are aware, this is the first report describing and explaining the protective role of PHA in non-halophilic bacterial cells facing hypotonic shock, since all previous works focused on exposure of mesophilic bacterial cells to hypertonic conditions [12,24–26].

Furthermore, using *H. halophila* as model halophilic strain, it was also demonstrated that the presence of PHA granules has beneficial consequences for the tested halophilic strain when exposed to sudden and massive osmotic down-shock. Generally, halophiles are microorganisms adapted to high salt concentration, therefore, in case of halophiles, hyperosmotic conditions do not induce plasmolysis, hence, they do not cause any harm to the cells. In particular, *H. halophila* belongs to the moderate halophiles, which are known to accumulate organic osmolytes to compensate osmotic imbalance in extracellular and intracellular space under hyperosmotic conditions. Intracellular concentration of these solutes can reach up to several moles per liter [28]. As a consequence of high intracellular concentration of osmolytes, halophiles are much more prone to a hypo-osmotic damage as compared with non-halophilic microorganisms. Since hydrophobic PHA granules represent a substantial portion of the intracellular volume, the total amount of osmolytes per cell will be considerably lower in PHA-rich cells. Furthermore, it is very likely that presence of PHA granules, due to their capability to protect bacterial cells from massive plasmolysis, reduces intracellular concentration of osmolytes. Therefore, we hypothesize that the protective effect of PHA for halophilic bacteria is a result of decreased amount of osmolytes in PHA-rich bacteria; nevertheless, we are aware of the fact that this hypothesis needs further experimental verification.

Regardless of the actual protective mechanisms, the results clearly indicate that presence of PHA granules helps cells when suddenly exposed to hypoosmotic conditions. It should be noted that the experiment in which halophiles were quickly transferred from high salinity conditions to deionized water does not correspond to the real environmental situation, since the sudden and massive changes in osmolarity are uncommon for most habitats. Nevertheless, less dramatic but still very important and frequent changes in osmolarity are common features of many ecological niches [23]. Therefore, it seems that the fact that PHA granules, as an added value to their primary storage function, protects halophiles from harm effect of osmotic down-shock might be the reason why PHA accumulation capability is such a common feature among halophilic prokaryotes.

The fact that PHA-rich cells are more resistant to osmotic fluctuations than their PHA-poor or non-accumulating counterparts is not only of scientific interest, but may also have practical biotechnological significance. Naturally PHA accumulating bacteria such as members of the genera *Pseudomonas* or *Cupriavidus* are frequently used in *in-situ* bioremediation technologies [29–32]. The fact that presence of PHA in bacteria enhances their robustness not only against osmotic imbalances but also other common stress factors could be considered during inoculum preparation, which could be operated to reach desired high amounts of PHA in bacterial biomass. Moreover, consideration of the fact that PHA-rich cells are more resistant to osmotic imbalances could be used when enriching microbial consortia in PHA accumulating strains. Thus, when PHA are produced by mixed microbial consortia, enrichment processes based on application of “feast-famine” cycles are usually employed. This strategy is based on the assumption that PHA accumulating cells are capable to survive famine periods better than bacteria unable of PHA accumulation [33,34]. Therefore, based on our experimental experience and observation, we suggest that application of subsequent series of osmotic up- and down-shock could be used as alternative or additional strategy to enrich mixed consortia in PHA accumulating strains.

Acknowledgments

This study was funded by the project “Materials Research Centre at FCH BUT - Sustainability and Development” No. LO1211 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic and by the project GP15-20645S of the Czech Science Foundation (GACR). Authors kindly thank Leona Kubikova for all the help with TGA measurement.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.10.005>.

References

- Wood JM. Bacterial responses to osmotic challenges. *J Gen Physiol* 2015;145:381–8.
- Morbach S, Kramer R. Body shaping under water stress: osmosensing and osmoregulation of solute transport in bacteria. *ChemBioChem* 2002;3:384–97.
- Guan N, Li J, Shin HD, Du G, Chen J, Liu L. Microbial response to environmental stresses: from fundamental mechanisms to practical applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2017;101:3991–4008.
- Krüger BA, Schäfers C, Schröder C, Antranikian G. Towards a sustainable biobased industry – highlighting the impact of extremophiles. *New Biotechnol* 2018;40:144–53.
- Obruca S, Sedlacek P, Mravec F, Samek O, Marova I. Evaluation of 3-hydroxybutyrate as an enzyme-protective agent against heating and oxidative damage and its potential role in stress response of poly(3-hydroxybutyrate) accumulating cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016;100(3):1365–76.
- Kouwen TR, Antelmann H, van der Ploeg R, Denham EL, Hecker M, et al. *MscL of Bacillus subtilis* prevents selective release of cytoplasmic proteins in a hypotonic environment. *Proteomics* 2009;9(4):1033–43.
- Bialecka-Fornal M, Lee HJ, Phillips R. The rate of osmotic downshock determines the survival probability of bacteria mechanosensitive channel mutants. *J Bacteriol* 2015;197(1):231–7.
- Koller M, Maršálek L, Miranda de Sousa Dias M, Braunneg G. Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. *New Biotechnol* 2017;37(A):24–38.
- Obruca S, Sedlacek P, Koller M, Kucera D, Pernicova I. Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: biotechnological consequences and applications. *Biotechnol Adv* 2018;36:856–70.
- Obruca S, Sedlacek P, Krzyzanek V, Mravec F, Hrubanova K, Samek O, et al. Accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) helps bacterial cells to survive freezing. *PLoS ONE* 2016;11(6):e0157778.
- Slaninova E, Sedlacek P, Mravec F, Mullerova L, Samek O, Koller M, et al. Light scattering on PHA granules protects bacterial cells against the harmful effects of UV radiation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2018;102(4):1923–31.
- Obruca S, Sedlacek P, Mravec F, Krzyzanek V, Nebesarova J, Samek O, et al. The presence of PHB granules in cytoplasm protects non-halophilic bacterial cells against the harmful impact of hypertonic environments. *New Biotechnol* 2017;39:68–80.
- Mahler N, Tschirren S, Pflügl S, Herwig C. Optimized bioreactor setup for scale-up studies of extreme halophilic cultures. *Biochem Eng J* 2018;130:39–46.
- Salgaonkar BB, Bragança JM. Utilization of sugarcane bagasse by *Halogeometricum boringense* strain E3 for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Bioengineering* 2017;4(2):50.
- Mahansaria R, Dhara A, Saha A, Haldar S, Mukherjee J. Production enhancement and characterization of the polyhydroxyalkanoate produced by *Natrinema ajinwensis* (as synonym) = *Natrinema altunense* strain RM-G10. *Int J Biol Macromol* 2018;107:1480–90.
- Koller M. Production of polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters by extremophiles. *MOJ Poly Sci* 2017;1(2):00011.
- Kucera D, Pernicová I, Kovalčík A, Koller M, Mullerova L, Sedlacek P, et al. Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*. *Bioresour Technol* 2018;256:552–6.
- Obruca S, Snajdar O, Svoboda Z, Marova I. Application of random mutagenesis to enhance the production of polyhydroxyalkanoates by *Cupriavidus necator* H16 on waste frying oil. *World J Microbiol Biotechnol* 2013;29(12):2417–28.
- Coder DM. Assessment of cell viability. In: Robinson JP, editor. *Current protocols in cytometry*. New York: John Wiley & Sons Inc.; 1997. p. 9.2.1–9.2.14.
- Uribelarra JL, Pacaud S, Goma G. New method for measuring the cell water content by thermogravimetry. *Biotechnol Lett* 1985;7(2):75–80.
- Alcázar E, Rocha-Leão M, Dweck J. Yeast intracellular water determination by thermogravimetry. *J Therm Anal Calorim* 2000;59(3):643–8.
- Koch AL. The geometry and osmotic relations of plasmolysis spaces in bacteria and the role of endocytosis, tubular structures and Scheie structures in their formation. *J Theor Biol* 1995;176:471–92.
- Oren A. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems* 2008;4(1):2.
- Zhao YH, Li HM, Qin LF, Wang HH, Chen GQ. Disruption of the polyhydroxyalkanoate synthase gene in *Aeromonas hydrophila* reduces its survival ability under stress conditions. *FEMS Microbiol Lett* 2007;276:34–41.
- Breedveld MW, Dijkema C, LPTM Zevenhuizen, Zehner AJB. Response of intracellular carbohydrates to NaCl shock in *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii TA-1 and *Rhizobium meliloti* SU-47. *J Gen Microbiol* 1993;139:3157–63.
- Wang Q, Yu H, Xia Y, Kang Z, Qi Q. Complete PHB mobilization in *Escherichia coli* enhances the stress tolerance: a potential biotechnological application. *Microb Cell Fact* 2009;8:47.
- Mravec F, Obruca S, Krzyzanek V, Sedlacek P, Hrubanova K, Samek O, et al. Accumulation of PHA granules in *Cupriavidus necator* as seen by confocal fluorescence microscopy. *FEMS Microbiol Lett* 2016;363(10):fnw094.
- Roberts MF. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems* 2005;1:5.
- Berezina N, Yada B, Lefebvre R. From organic pollutants to bioplastics: insights into the bioremediation of aromatic compounds by *Cupriavidus necator*. *New Biotechnol* 2015;32:47–53.
- Teng Y, Wang X, Zhu Y, Chen W, Christie P, Li Z, et al. Biodegradation of pentachloronitrobenzene by *Cupriavidus* sp. YNS-85 and its potential for remediation of contaminated soils. *Environ Sci Pollut Res* 2017;24:9538–47.
- Arora PK, Srivastava A, Singh VP. Bacterial degradation of nitrophenols and their derivatives. *J Hazard Mater* 2014;266:42–59.
- Safiyani I, Abdulwahid Isah A, Abubakar US, Rita Singh M. Review on comparative study on bioremediation for oil spills using microbes. *Res J Pharm Biol Chem Sci* 2015;6:783.
- Oliveira CSS, Silva CE, Carvalho G, Reis MAM. Strategies for efficiently selecting PHA producing mixed microbial cultures using complex feedstocks: feast and famine regime and uncoupled carbon and nitrogen availabilities. *New Biotechnology* 2017;37:69–79.
- Valentino F, Morgan-Sagastume F, Campanari S, Villano M, Werker A, et al. Carbon recovery from wastewater through bioconversion into biodegradable polymers. *New Biotechnol* 2017;37(A):9–23.

6.4 Příloha IV

SEDLÁČEK, P.; SLANINOVÁ, E.; ENEV, V.; KOLLER, M.; NEBESAROVA, J.; KRZYZANEK, V.; SAMEK, O.; MÁROVÁ, I.; OBRUČA, S. What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, roč. 103, č. 4, s. 1905-1917. ISSN: 0175-7598.



What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments

Petr Sedlacek¹ · Eva Slaninova¹ · Vojtech Enev¹ · Martin Koller^{2,3} · Jana Nebesarova^{4,5} · Ivana Marova¹ · Kamila Hrubanova⁶ · Vladislav Krzyzanek⁶ · Ota Samek⁶ · Stanislav Obruca¹ 

Received: 18 September 2018 / Revised: 11 December 2018 / Accepted: 12 December 2018 / Published online: 8 January 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are storage polymers accumulated by numerous prokaryotes in form of intracellular granules. Native PHA granules are formed by amorphous polymer which reveals considerably higher elasticity and flexibility as compared to crystalline pure PHA polymers. The fact that bacteria store PHA in amorphous state has great biological consequences. It is not clear which mechanisms protect amorphous polymer in native granules from transition into thermodynamically favorable crystalline state. Here, we demonstrate that exposition of bacterial cells to particular stressors induces granules aggregation, which is the first but not sufficient condition for PHA crystallization. Crystallization of the polymer occurs only when the stressed bacterial cells are subsequently dried. The fact that both granules aggregation and cell drying must occur to induce crystallization of PHA indicates that both previously suggested hypotheses about mechanisms of stabilization of amorphous state of native PHA are valid and, in fact, both effects participate synergistically. It seems that the amorphous state of the polymer is stabilized kinetically by the low rate of crystallization in limited volume in small PHA granules and, moreover, water present in PHA granules seems to function as plasticizer protecting the polymer from crystallization, as confirmed experimentally for the first time by the present work.

Keywords Polyhydroxyalkanoates crystallization · Intracellular granules · Stress conditions

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00253-018-09584-z>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Stanislav Obruca
obruca@fch.vut.cz

¹ Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkynova 118, 612 00 Brno, Czech Republic

² Institute of Chemistry, NAWI Graz, University of Graz, Heinrichstrasse 28/III, 8010 Graz, Austria

³ ARENA Arbeitsgemeinschaft für Ressourcenschonende & Nachhaltige Technologien, Inffeldgasse 21b, 8010 Graz, Austria

⁴ Biology Centre, The Czech Academy of Sciences, v.v.i., Branisovska 31, 370 05 Ceske Budejovice, Czech Republic

⁵ Faculty of Science, University of South Bohemia, Branisovska 31, 370 05 Ceske Budejovice, Czech Republic

⁶ Institute of Scientific Instruments, The Czech Academy of Sciences, v.v.i., Kralovopolska 147, 612 64 Brno, Czech Republic

Introduction

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are polyesters produced and accumulated by numerous microbial strains in the form of granular cell inclusions. Although it is generally accepted that PHA serve primarily as a carbon and energy storage materials, it was reported repeatedly that presence of intracellular PHA provides a variety of additional beneficial functions when a microorganism faces adverse conditions; in this context, numerous experimental reports have demonstrated that the capability for PHA biosynthesis and degradation also substantially enhances the survival of bacteria when exposed to various physical stress conditions including high temperature (Wang et al. 2009; Zhao et al. 2007), freezing and thawing cycles (Obruca et al. 2016a; Pavez et al. 2009), low temperatures (Nowroth et al. 2016), osmotic up-shock (Obruca et al. 2017), oxidative pressure (Kadouri et al. 2003; Obruca et al. 2016b; Koskimäki et al. 2016), or exposure to UV irradiation (Slaninova et al. 2018). The unexpected universality of the protective effects of PHA, either from the viewpoint of a wide range of different applied stress factors or from the perspective of a vast variety of microbial genera for which the protective effect of PHA against these

stressors was confirmed, led to the currently recognized opinion that the presence of PHA granules has numerous biological and biophysical consequences, which, in a synergistic way, enhance the overall fitness and robustness of PHA-containing cells. Even more interestingly, it was demonstrated by several authors that some of these protective effects are not associated with mobilization of PHA, but simply with the presence of PHA granules in the cells per se (Obruca et al. 2018).

From the material point of view, PHA chains are of highly hydrophobic nature. Therefore, the granular PHA inclusions need to be separated from the surrounding aqueous cytoplasm by the action of cellular constituents with a surfactant-like behavior. For a long time, this role had been attributed to phospholipids, which were considered being arranged in a monolayer on the surface of the granules (Beeby et al. 2012). Nevertheless, it was revealed more recently that the granular surface is free of phospholipids and consists only of proteins, among which the surfactant function is provided mainly by a special family of granule-associated structural proteins generally called phasins (Bresan et al. 2016).

The specific molecular structure of PHA also results in a high degree of crystallinity of the pure polymer at ambient conditions. However, the intracellularly stored PHA reveal totally different material properties. The intracellular polymer is amorphous, and therefore, the polymer chains retain some mobility and flexibility. The amorphous state of the polymer is not only of crucial metabolic importance since crystalline PHA are not catabolized by intracellular PHA depolymerases (Jendrossek 2007); beyond that, our recent work indicates that amorphous polymer, which is resembling super-cooled liquids in its mechanical properties, is also directly employed in some protective effects of PHA granules against various stressors. For instance, it is likely that amorphous PHA granules protect bacteria from damage by extracellular ice during freezing (Obruca et al. 2016a); moreover, we have observed that amorphous polymer might stabilize cytoplasmic membranes stressed by osmotically induced plasmolysis (Obruca et al. 2017). Furthermore, we observed that exposition of PHA-positive microbial cells to some particular stressors induces crystallization of the intracellular polymer. Therefore, we decided to utilize a combination of spectroscopic, morphological, and biophysical analyses to investigate stress-induced crystallization of intracellular granules. Surprisingly, apart from stress response-related aspects of PHA crystallization, our results also shed light on mechanisms keeping native intracellular granules in thermodynamically non-stable amorphous state.

Materials and methods

Materials and microorganisms

The PHA-producing bacterial strain *Cupriavidus necator* H16 (CCM 3726) was purchased from the Czech Collection of

Microorganisms, Brno, Czech Republic; the PHA negative mutant *Cupriavidus necator* PHB^{−4} (DMS-541) was obtained from the Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures, Braunschweig, Germany. Cultivation was performed in nitrogen-limited Mineral Salt (MS) medium, which supports PHA accumulation. The particular composition of MS medium was as follows: 1 g (NH₄)₂SO₄, 1 g KH₂PO₄, 11.1 g Na₂HPO₄·12H₂O, 0.2 g MgSO₄·7H₂O, 20 g fructose, 1 mL of microelement solution, and 1 L of distilled water. The composition of microelement solution was as follows: 9.7 g FeCl₃, 7.8 g CaCl₂, 0.156 g CuSO₄·5H₂O, 0.119 g CoCl₂, and 0.118 g NiCl₂ in 1 L of 0.1 M HCl. Erlenmeyer flasks (total volume 250 mL) containing 100 mL of MS medium were inoculated with 5 mL of an overnight culture of *C. necator* H16 grown in complex Nutrient Broth medium (10 g peptone, 10 g beef extract, 5 g NaCl per 1 L of distilled water). The cultivations were performed for 72 h at 30 °C under constant shaking (180 rpm) in a rotary incubator. After 72 h, the cultivation was finished, and biomass was harvested by centrifugation (5000×g, 5 min, the same condition were kept for all following centrifugation steps), washed with phosphate buffered saline (PBS; pH 7.4, 50 mM), and centrifuged again. The biomass concentration was measured gravimetrically and the PHA content of cell biomass was analyzed by GC-FID as reported previously (Obruca et al. 2013). The average content of PHA in the biomass after 72 h of cultivation was 74% of cell dry mass (CDM).

Exposure of the bacteria to various stress factors

The fresh cell cultures were exposed to various adverse environmental conditions as follows:

i. Effect of elevated temperature: Centrifuged washed cells were re-dispersed in phosphate buffer (pH 7.4, 50 mM) in microcentrifuge tubes (total volume of 2 mL, the same tubes were used also for all following experiments). The individual microcentrifuge tubes were then incubated in a water bath conditioned at 25 °C (control), 50 °C, and 80 °C, respectively. After 90 min, the tubes were removed from the bath and allowed to cool down to ambient temperature. Prior to further analyses, cells were centrifuged again. For each tested temperature, three separate samples were prepared in this way.

ii. Effect of high osmolarity: Centrifuged washed cells were re-dispersed in NaCl solution (200 g/L) in microcentrifuge tubes. After exposure to hyperosmotic conditions (2 h at 25 °C), the cells were separated by centrifugation, washed with phosphate buffer (pH 7.4, 50 mM), and centrifuged again. Again, the sample was prepared in triplicate.

iii. Effect of freezing/thawing: Centrifuged washed cells were re-dispersed in phosphate buffer (same as above) in microcentrifuge tubes. The cell dispersion was then frozen by incubation at −30 °C for 2 h and subsequently thawed at 25 °C. Individual samples were prepared (in triplicates) for

one, two, three, and four repeated freezing/thawing cycles (at $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$) and also for five cycles with freezing temperature of the final cycle changed to $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

iv. Effect of pH value: Centrifuged washed cells were re-dispersed in a solution with pH value adjusted to 1, 2, 3, and 4, respectively. For the pH adjustment, standard hydrochloric acid–potassium chloride buffer solutions (0.1 M, pH = 1 and 2) and acetate buffer solutions (0.1 M pH = 3 and 4) were used. Samples for individual pH values were prepared in triplicate. After exposure to acidic conditions (2 h at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$), the cells were separated by centrifugation.

For all prepared samples (control sample and the samples exposed to different environmental challenges), the number of viable cells (CFU per mL) was determined by standard dilution plating assay on Petri dishes with complex medium agar, where the colonies were counted after 48 h of incubation in thermostat at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (three replicates per setup).

Infrared spectroscopy-assisted analysis of the cell drying

The infrared spectra of the cell dispersions were recorded with a Nicolet iS50 FTIR spectrometer (Thermo Scientific). All measurements were taken at ambient temperature (in air-conditioned room) on the built-in single-reflection diamond attenuated total reflectance (ATR) crystal. For time-resolved measurement, a small drop (approximately $5\text{ }\mu\text{L}$) of the centrifuged cell dispersion was placed directly on the surface of the ATR crystal and the data collection using Omnic Series data collection software was started. While the water was freely evaporating from the cell dispersion, the FTIR spectra were collected in regular time intervals. The individual absorption spectrum was collected every 10 s as an average of 8 scans with resolution 1 cm^{-1} over the duration of the data collection (at least 150 min). For the time monitoring of water content and crystallinity of PHA, raw absorption spectra were evaluated without any correction. For investigation of structural changes in cell proteins, the envelope Amide I absorption band was further evaluated by deconvolution into individual overlapping component bands attributed to particular structural motifs. Positions of the overlapping bands were determined by second derivative methods. The deconvolution of the sharp band assigned to C=O and C–N stretching in Amide I region ($1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$) was made by fitting the experimental envelope band by the summation of seven calculated Gaussian components using non-linear fitting tools of the Origin 8.1 software.

Transmission electron microscopy of the bacterial cells

Samples of the control and challenged bacterial cultures were visualized using the Transmission Electron Microscope (TEM) JEOL 1010. Individual samples (approximately

$0.2\text{ }\mu\text{L}$) in a special carrier were frozen in a high-pressure freezer (Leica EM Pact II) and transferred under liquid nitrogen into a freeze substitution unit (Leica EM AFS) with 2% osmium tetroxide in water-free acetone used as a substitution solution. The substitution protocol was as follows: first, samples were kept at $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 96 h. Then, the samples were slowly warmed up to $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ at a heating rate $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ per hour. At this elevated temperature, the samples were kept for 24 h, before the temperature was further increased to $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ with a heating rate $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ per hour. The samples were kept for 18 h at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ before being finally warmed to room temperature. Subsequently, the samples were washed three times in anhydrous acetone (exposure time 15 min) and then infiltrated and embedded with Polybed resin (SPI). Three different acetone-to-resin mixtures (volume ratios 2:1, 1:1, and 1:2) were used sequentially; each setup was embedded for 1 h and then dried overnight in pure embedding media in desiccator evacuated by connection to the water pump. Polymerization was initiated by heating to $62\text{ }^{\circ}\text{C}$ and proceeded for 48 h. Ultrathin sections were cut using an Ultracut UCT ultramicrotome (Leica) with a diamond knife (Diatome, cutting angle of 45°). Sections were transferred onto 300 Mesh copper grids and stained with uranyl acetate and lead citrate solutions.

Results

FTIR analysis of sample dehydration

Figure 1a shows the temporal development of FTIR spectra of the centrifuged dispersion of the control sample, i.e., of the intact (non-stressed) *C. necator* H16 cells. In the spectra, drying of the sample is connected with decreasing intensity of the characteristic vibration bands of water molecules, in particular in the spectral regions centered at around 3300 cm^{-1} (stretching modes, depicted as 1 in Fig. 1), 1640 cm^{-1} (bending modes, marked with arrow *ibid*), and at the spectral edge below 1000 cm^{-1} (rocking band, marked with arrow *ibid*). In Fig. 1b, it can be seen that the dehydration of the sample can be clearly monitored and the completion of the dehydration is easily identified in time-resolved 2D ATR-FTIR spectrum. Therefore, any structural changes in the cell which are observable in the spectrum (such as the crystallization of PHA) can be chronologically related to the dehydration process (whether it precedes, accompanies or follows on the dehydration).

FTIR analysis of stress-induced PHA crystallization

The same method of ATR-FTIR analysis was applied also for the cell cultures exposed to various stress factors. In all cases, the main aim of the experiment was to evaluate the effect of the stress factor on the susceptibility of originally amorphous intracellular PHA to crystallize in situ. For the evaluation

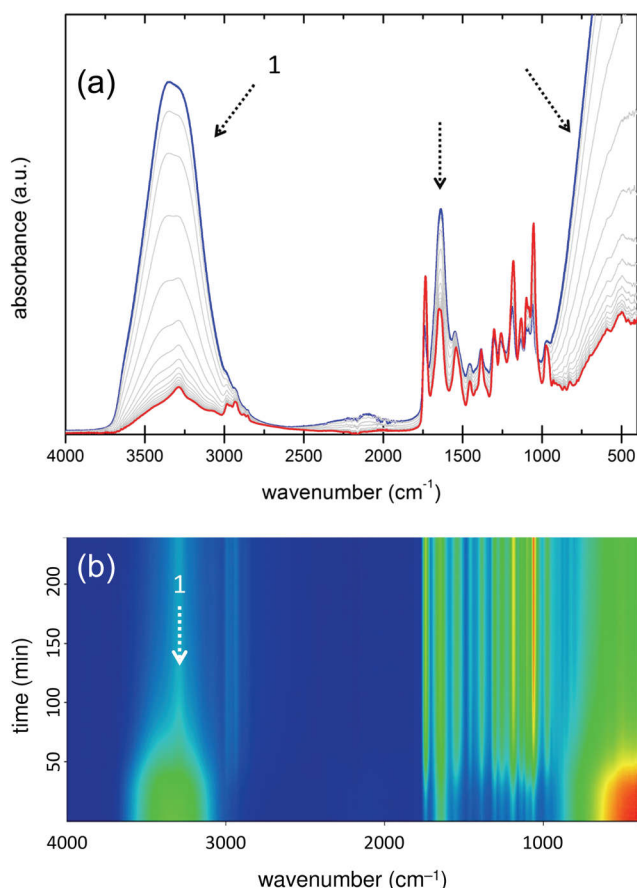


Fig. 1 Results of the ATR-FTIR analysis of the free drying of control *C. necator* H16 sample. **(a)** Time development of the ATR-FTIR spectra collected from the start of the experiment ($t=0$, blue curve) in 10 min intervals ($t=10$ to 150 min, grey spectra) till the last shown spectra collected at $t=160$ min (red curve). Characteristic vibration bands for water are marked with arrows. **(b)** 2D time-resolved ATR-FTIR spectrum clearly illustrated the time needed for the completion of the dehydration of the sample (approx. 65 min)

purposes, several characteristic vibration bands were selected according to the previously published reports on phase transition of PHA (Porter and Yu 2011a; Hu et al. 2007) involving also one vibration band representing the content of water in the sample and also the Amide I band, which enables observing the structural changes in proteins. The selected bands are summarized in Table 1.

Crystallization of PHA imprints mainly in the spectral region which is shown in detail in Fig. 2. In this figure, a comparison of time-resolved FTIR spectra collected after dehydration of the sample is shown for the control culture (non-stressed *C. necator* culture, Fig. 2a) and for the cell suspension incubated at 80 °C for 90 min prior to ATR-FTIR measurement (Fig. 2b). While for the control sample the characteristic bands of PHA in the region 1000–1800 cm^{-1} do not show any significant changes in the course of the experiment (only the further dehydration of the sample is visible), changes in spectra of the heated sample can decidedly be attributed to the

partial crystallization of PHA. First of all, the originally symmetrical vibration band characteristic for carbonyl stretching in polyesters deforms with a significant red shift in its maximum (see the peaks marked 2 and 3 in Fig. 2 and Table 1). Furthermore, new vibration peaks appear at about 1278 and 1227 cm^{-1} as a result of crystallization (marked 6 and 7 *ibid.*). Finally, intensity of C–O–C stretching band at 1180 cm^{-1} (marked 8 in Fig. 2 and Table 1) drops as the content of amorphous PHA decreases. Among the vibration bands related to PHA, symmetric deformation of methyl groups is not affected by the crystallization process; therefore, the peak centered at 1382 cm^{-1} (marked 5 *ibid.*) was used as an internal reference to scale the spectra before the further analysis.

The results of the FTIR-assisted drying of stressed *C. necator* H16 cultures are summarized in Fig. 3. In this figure, the scaled absorbance values (relative to the absorbance at frequency of the reference peak) versus time are shown for all the above discussed characteristic vibration frequencies of PHA and also for the frequency 3300 cm^{-1} (water in sample). In Fig. 3a, it is shown that for the control sample the relative absorbance at all the PHA-related characteristic frequencies remains almost constant after the sample is completely dehydrated (depicted as stage II. in the figure). On the contrary, the results of drying of samples incubated at 50 °C and 80 °C (see Fig. 3b, c) show completely different time courses. It can be clearly seen that for both the samples, after the dehydration step (stage I.), PHA in the sample remains amorphous for a certain time period (stage II.) and, after this time lag, the crystallization occurs (stage III.). Moreover, it can be seen that the impact of crystallization on the spectra is more pronounced when a higher incubation temperature is used and that among the selected vibration bands, those at frequencies 1719 and 1227 cm^{-1} seem to be the most sensitive, while those at 1734 and 1180 cm^{-1} are least sensitive to the crystallization process.

The same evaluation method was utilized also for other types of stresses exerted on the *C. necator* H16 culture. In Fig. 3d, it can be seen that freezing of the sample exposed to –30 °C followed by thawing and heated to the ambient temperature did not show any observable signs of PHA crystallization. Moreover, similar results were obtained also when the culture was subjected to the freezing and thawing repeatedly (up to 4 repetitions) and when the freezing temperature was lowered from –30 to –70 °C (data not shown). According to these results, neither repeated freezing nor thawing provides any negative effects on the intracellular state of PHA.

On the contrary, osmotically up-shocked *C. necator* H16 cells (the culture exposed to 200 g/L NaCl, see Fig. 3e) show significant spectral signs of PHA crystallization. Interestingly, contrary to the samples exposed to elevated temperature, the osmotically induced crystallization process begins immediately after the sample dehydration without any observable lag period. Again, PHA crystallization manifests mainly via

Table 1 Characteristic vibration frequencies selected for further analysis

Peak no.	Wavenumber	Assignment	Purpose
1	3300 cm^{-1}	Water (O–H stretching)	Monitoring of the sample dehydration
2	1734 cm^{-1}	Amorphous PHA (C=O stretching)	Detection of the PHA crystallization
3	1719 cm^{-1}	Crystalline PHA (C=O stretching)	Detection of the PHA crystallization
4	1700–1600 cm^{-1}	Amide I (amide C=O stretching)	Protein denaturation study
5	1382 cm^{-1}	CH ₃ symmetric deformation	Reference peak (spectra scaling)
6	1278 cm^{-1}	Crystalline PHA (–CH ₂ wagging in C–C–O backbone)	Detection of the PHA crystallization
7	1227 cm^{-1}	Crystalline PHA (asymmetric C–C–O stretching in helical chains)	Detection of the PHA crystallization
8	1180 cm^{-1}	Amorphous PHA (asymmetric C–O–C stretching)	Detection of the PHA crystallization

increase in the newly emerging peaks at 1278 and 1227 cm^{-1} and by the red shift of the carbonyl vibration peak to about 1719 cm^{-1} .

The last tested stress factor applied on the *C. necator* H16 culture was the acidic pH value induced by acetate buffer (pH = 3 and 4) or by hydrochloric acid (pH = 1 and 2), respectively. In general, no effect on the state of intracellular PHA was found for acetate buffer induced pH = 3 and 4. In Fig. 3f, results of the time-resolved FTIR show obvious crystallization at pH = 1. In this case, the time lag typical for the

crystallization induced by the elevated temperature is seen again. For pH = 2, similar trends with just less intensive signs of crystallization were obtained (data not shown).

To properly understand the results of the time-resolved FTIR experiments (results provided in Figs. 1, 2, and 3), it is important to realize that at the beginning of the experiment, when the cells are still suspended in the residual water, the infrared signal is predominated by the water (as can be clearly seen in Fig. 1). Then, in the early stage of the experiment, two processes take place simultaneously: (i.) PHA-containing cells

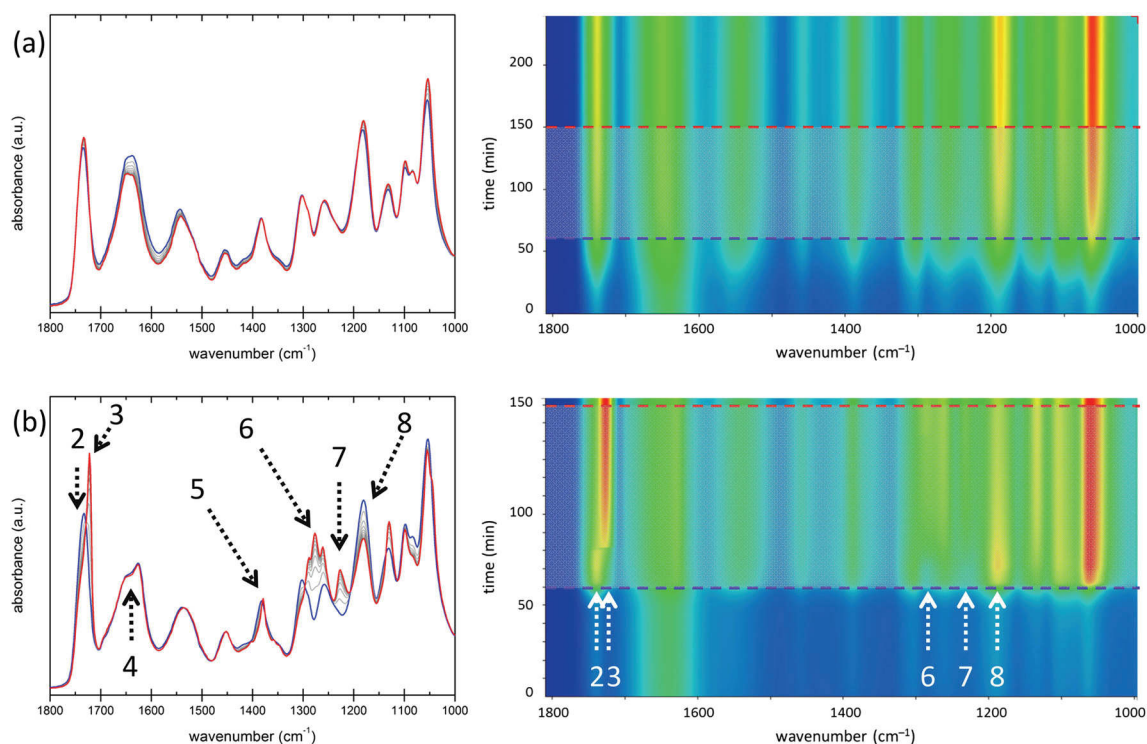
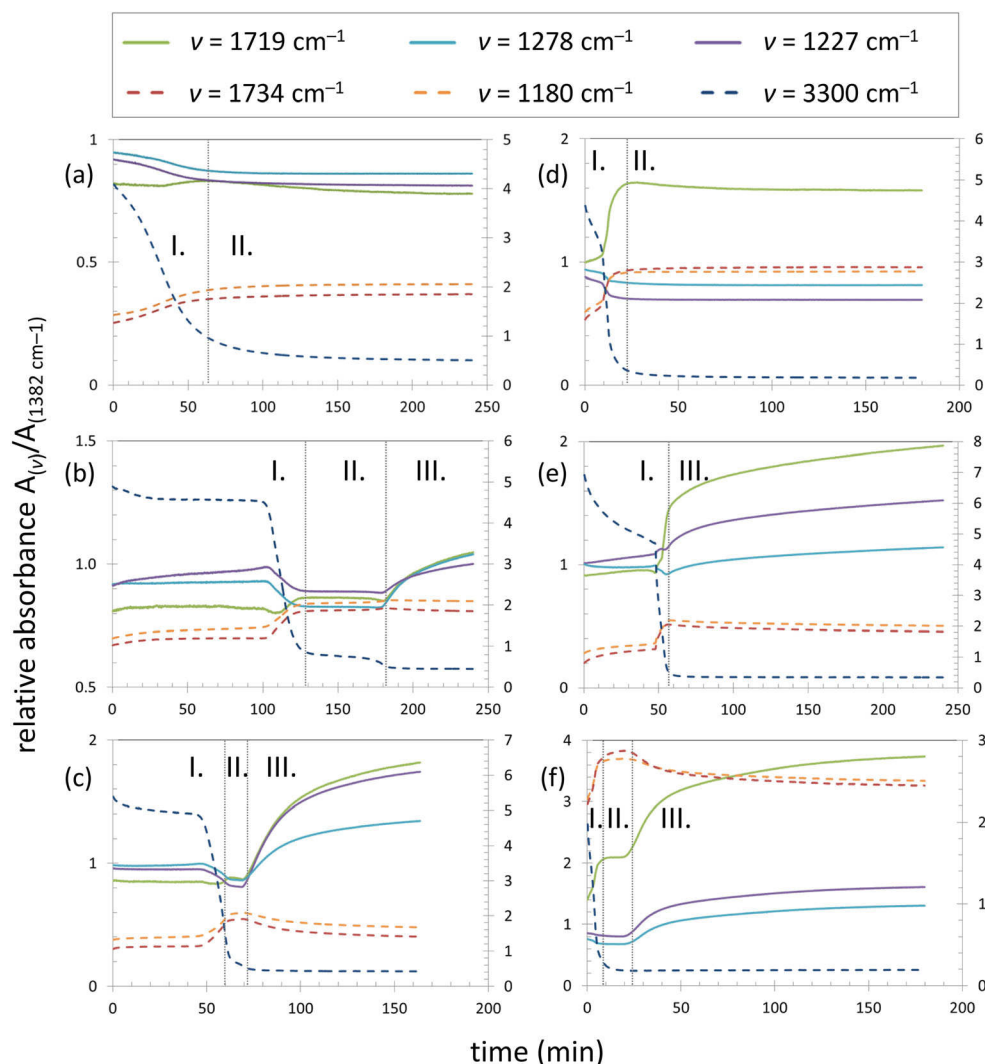


Fig. 2 In situ detection (time-resolved ATR-FTIR spectroscopy) of changes in PHA crystallinity in the cells after dehydration of the sample. Detail on spectral region with characteristic PHA vibration bands (1800–1000 cm^{-1}). Blue curve represents spectra collected at $t = 60$ (blue dashed line in the 2D spectrum), red curves stands for $t = 150$ min (red dashed line in the 2D spectrum), gray curves show time development of spectra

between 60 and 150 min in 10-min intervals. (a) Drying of the control (non-stressed) culture of *C. necator* H16. No significant changes in characteristic vibration bands of PHA are observed. (b) Drying of the *C. necator* H16 culture previously incubated at 80 °C for 90 min. Main changes in spectra related to PHA crystallization are marked with arrows

Fig. 3 Time development of absorbances at frequencies relevant to the sample dehydration (3300 cm^{-1}) and crystallization of PHA (1734 cm^{-1} , 1719 cm^{-1} , 1278 cm^{-1} , 1227 cm^{-1} , and 1180 cm^{-1}), respectively. All the monitored absorbances were scaled using absorbance of the reference peak at 1382 cm^{-1} . Comparison of the results for the *C. necator* H16 control culture (a) and cultures incubated at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (b), $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (c), $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (d), 200 g/L NaCl (e), and $\text{pH} = 1$ (f), respectively. In the results, sample dehydration stage (I.), presence of dehydrated cells with amorphous PHA (II.) and the crystallization stage (III.) can be clearly distinguished. Dashed curves belong to the secondary axis



settle down onto the ATR crystal and (ii.) the residual free water in the sample evaporates. Both processes, proceeding with different rates, imprint in the collected infrared spectra. As the more biomass gradually settle on the ATR crystal, intensities of the corresponding infrared bands increase. On the other hand, as the free water evaporates from the surface of ATR crystal, the background absorption of water (with the highest absorption intensity centered at around 3300 cm^{-1} , 1600 cm^{-1} and below 1000 cm^{-1}) decreases. Therefore, in the early stage of the measurement when the free water is still present in the sample, the infrared signal of the biomass is influenced by this changing background absorption of water. Furthermore, different absorption bands of the biomass are affected to the different extent because of the dissimilar overlapping with the water absorption signal. It is also evident from Fig. 3 that the time dependence of the changes in the PHA-related bands follows the changes in absorption of water at 3300 cm^{-1} . To summarize, changing intensity of the scaled (relative to absorbance at 1382 cm^{-1}) absorption bands of

PHA in the drying period does not stand for changes in the PHA crystallinity. Rather, they represent inevitable spectral artifacts related to the sample drying.

Apart from PHA-accumulating strain *C. necator* H16, we have performed the same set of experiments also with its PHA negative mutant *C. necator* PHB⁻⁴; the results are demonstrated in Supplementary Materials as Fig. S1 – Fig. S6.

In addition, time-resolved ATR experiment with the isolated granules was also performed and the results are shown in Supplementary Materials (see the results shown in Fig. S7 – Fig. S9). It is evident that the spectral changes assigned to the crystallization of PHA in the cells are present as well when the isolated granules are used. But unlike in the intact PHA-containing cells, in the case of the isolated granules, polyester crystallizes already during (not after) the drying step. This confirms that the isolation procedure may significantly influence the mechanisms of stabilization of the polymer against crystallization and therefore, it is not possible to compare stability of the granule in in vivo and ex vivo state.

Protein denaturation assay by deconvolution of Amide I band

It is well documented in published reports (Arrondo et al. 1993; Byler and Susi 1986) that the Amide I vibration band centered at about 1650 cm^{-1} is sensitive to changes in secondary and tertiary structure of proteins. Therefore, the Amide I band was further analyzed in order to reveal any observable effects of applied stress factors on the structure of bacterial proteins. For this purpose, deconvolution of the spectra of individual dehydrated samples was performed in the wavenumber range $1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$. First of all, frequencies of individual overlapping components were determined via Fourier self-deconvolution method. Subsequently, the spectrum was fitted by the cumulative function consisting of the respective Gaussian component peaks. Figure 4 shows three examples of the deconvolution results: non-stressed control sample (Fig. 4a) and samples exposed to elevated temperature ($80\text{ }^{\circ}\text{C}$, Fig. 4b) and high osmolarity (200 g/L NaCl , Fig. 4c), respectively.

From the rough comparison, the differences in the overall shape as well as in the composition of the Amide I band are obvious. In the next step, basic motifs of protein secondary

structure were assigned to particular fitting components according to the table shown in Fig. 4d (Goormaghtigh et al. 1990; Susi and Byler 1986). In this way, the representative changes in the secondary structures of cellular proteins induced by particular stress conditions were revealed. Results of this protein structure assay are shown in Fig. 5. The provided data represent results of deconvolution of the last collected spectra from the particular drying experiments presented in Fig. 3. It can be seen that, related to the control sample, all the stress-exposed cultures show decrease in overall proportional representation of ordered structures (α -helices and β -sheets), whereas the content of partially (turns and bands) or totally disordered structures increases. In particular, for the sample incubated at $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, the content of unordered protein chains emerged most significantly at the expense of destroying mainly the α -helical polypeptide motifs. On the other hand, for osmotically and acidically challenged samples, the decrease in ordered motifs was balanced by structures more equally distributed between turns and bands and the unordered ones. Finally, for the repeatedly frozen and thawed samples (only the result for 4th cycle of freezing/thawing is shown), the representation of ordered and disordered structures were similar as with the control sample.

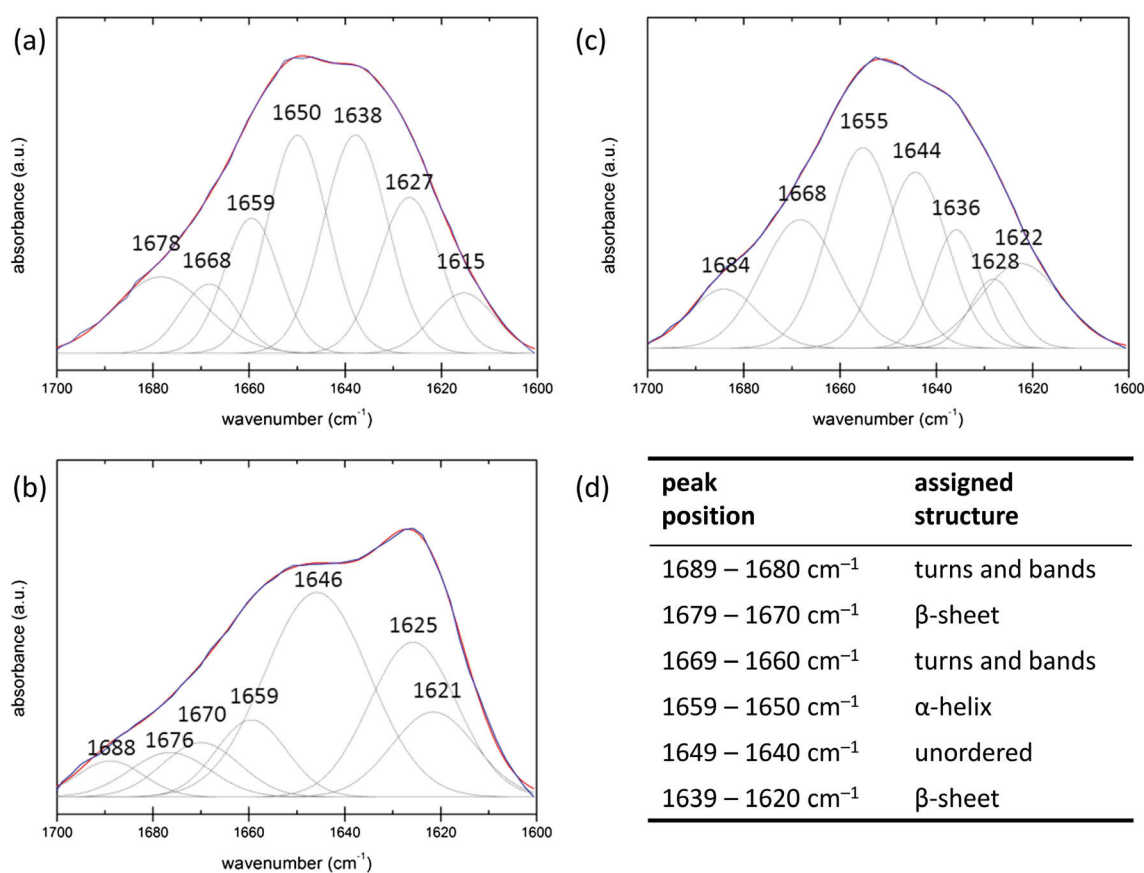


Fig. 4 Example of deconvolution of Amide I band in *C. necator* H16 (blue: measured spectrum, grey: deconvolution components, red: cumulative fitting spectrum) for (a) control sample, (b) sample

incubated in 200 g/L NaCl solution, and (c) sample incubated at $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Assignment of individual components to various protein secondary structures is described in table (d)

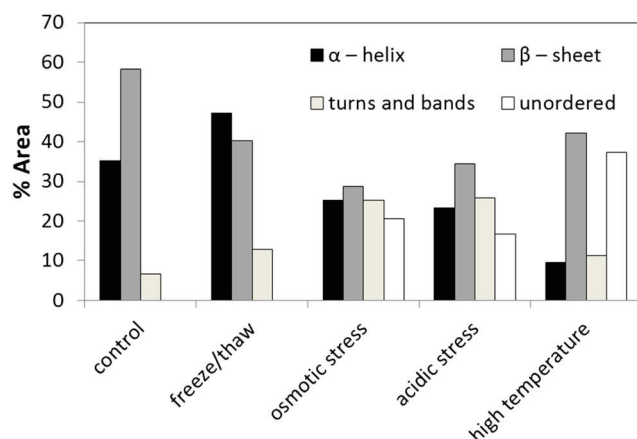


Fig. 5 Proportional representation (in % of peak area) of various secondary structures in *C. necator* H16 proteins according to deconvolution of Amide I band. (freeze/thaw: culture exposed to 4 cycles of freezing and thawing; osmotic stress: culture incubated in 200 g/L NaCl solution; acidic stress: culture incubated at pH = 1; high temperature: culture incubated at 80 °C)

Viability of cells after the stress exposure

Cell viability was assayed by comparing the numbers of cultivable cells (CFU/mL) in samples prior to (control sample) and after the exposure to the applied stress factors. Results are shown in Fig. 6. It is evident that among the selected stress factors, elevated temperature (80 °C) and strongly acidic conditions (pH = 1) show the most fatal effect on cell viability (CFU drops by more than five orders of magnitude). Only the results for extreme values of these two stress factors are shown; nevertheless, it was confirmed that the adverse effect decreased with decreasing the stress dose (the lower temperature, i.e., 50 °C and the less acidic pH, i.e., 2–4, was applied, the higher cell survival was detected; data not shown). On the

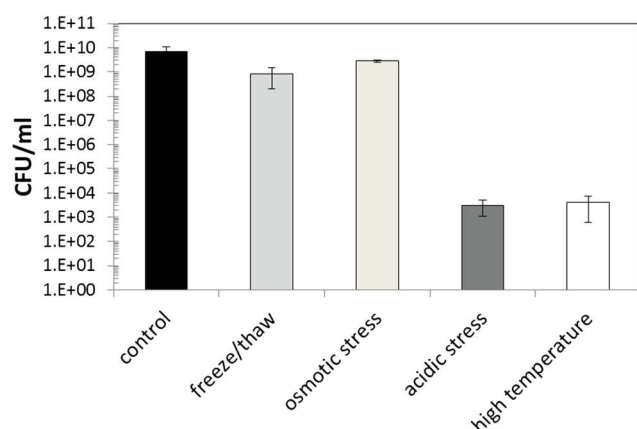


Fig. 6 Survival (plating viability test) of non-stressed *C. necator* H16 cells (control) and of the cells exposed to different stress factors. (freeze/thaw: culture exposed to 4 cycles of freezing and thawing; osmotic stress: culture incubated in 200 g/L NaCl solution; acidic stress: culture incubated at pH = 1; high temperature: culture incubated at 80 °C). Error bars represent standard deviation of the 5 parallel samples

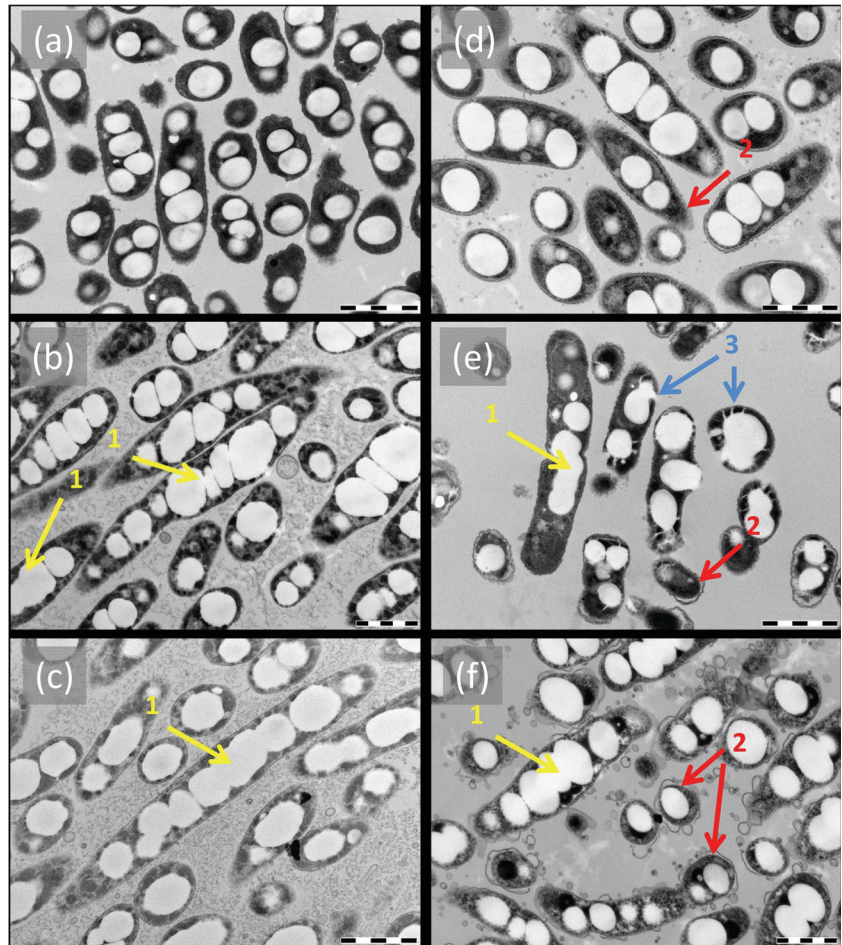
other hand, the cell survival was significantly higher for samples exposed to repeated freezing and thawing and also to high osmolarity (results of viability assay for the osmotically upshocked *C. necator* H16 are in good agreement with our previously published data (Obruca et al. 2017)).

Cell morphology assay using TEM

As was reported in our previous works (Obruca et al. 2017), stress challenge of *C. necator* cells is often accompanied by significant changes in cell morphology. In order to reveal morphological changes induced by particular involved stress factors, TEM analysis of the control sample and the challenged cells was involved in the study (results are shown in Fig. 7). The assay confirmed some of the morphological consequences of the stress experiments, which were already described. For example, osmotic challenge resulted in wrinkling of the outer layer of the cell envelope and plasmolysis as was reported previously (Obruca et al. 2017). Similar changes in cell surface were found also for frozen cells and for those subjected to acidic pH values (plasmolysis is depicted as 2 in Fig. 7). Furthermore, hyperosmotically challenged cells also show extraordinary granules-associated behavior, where the liquid-like state of PHA results in the leakage of PHA into the cytoplasm (depicted as 3 in Fig. 7). It was hypothesized that this phenomenon could play an important role in protecting the cells from the harmful impacts of hypertonic environment (Obruca et al. 2017).

Nevertheless, the most important outcome of the morphological assay is represented by the finding that all the stress factors except for freezing (see Fig. 7d) of the sample resulted in more or less pronounced coagulation of initially separated PHA granules (depicted as 1 in Fig. 7). This seems to be a general stress-induced phenomenon. Furthermore, as can be seen from comparison of cultures exposed to elevated temperature (50 °C and 80 °C), it is likely that the extent of the coagulation is affected by the dose of the stress factor. Whereas the cells exposed to 50 °C preserve some of the granules separated, in case of exposure to 80 °C, the granules in the cells form nearly single aggregates occupying almost the entire cell volume. Data dealing with image analysis of the TEM results and distribution of the granule sizes in non-stressed and challenged bacterial cells are provided in Supplementary Materials as Fig. S10 and Fig. S11. It is noticeable that the extent to which the coagulation of the granules was observed is striking in accordance with the signs of crystallization of PHA as well as with the imprints of protein structural changes in FTIR spectra. For example, in the case of (repeated) freezing and thawing of the cells, little effect on protein structure and cell morphology was found (with no granule coagulation). At the same time, FTIR measurement revealed no signs of the PHA crystallization after the sample dehydration.

Fig. 7 Results of TEM analysis of *C. necator* H16 control culture (a) and cultures incubated at 50 °C (b), 80 °C (c), −30 °C (d), 200 g/L NaCl (e), and pH = 1 (f), respectively (scale bar = 1 μm). In the micrographs, coagulation of PHA granules (depicted as 1), cell plasmolysis (depicted as 2) and special PHA structures related to granule leakage into cytoplasm reported in (Obruca et al. 2017) (depicted as 3) are marked with arrows



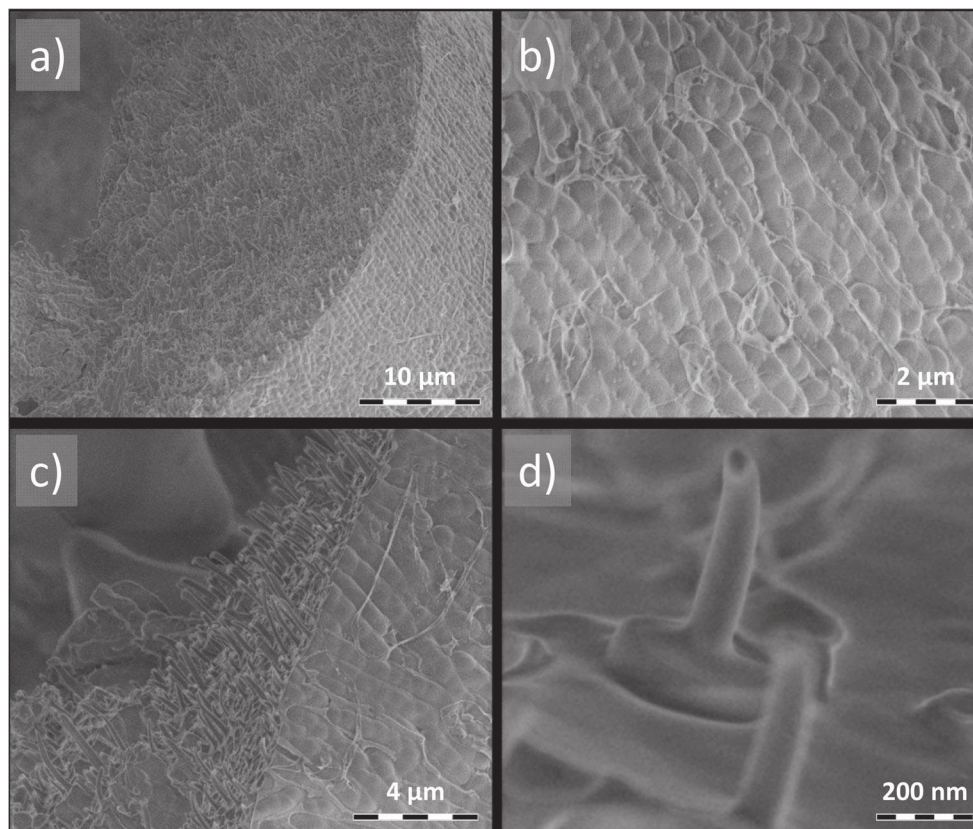
Discussion

The surprising fact that native intracellular PHA granules are formed in a thermodynamically unfavorable amorphous form of the polymer was discovered in 1986 by NMR study on the methanol utilizing *Methylobacterium* AM1 (Bonthrone et al. 1992). It should be noted that amorphous PHA reveals completely different mechanical properties as compared to its crystalline form. For instance, when poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) is extracted from bacterial cells, it quickly crystallizes, which substantially reduces its flexibility. Extracted and purified PHB possesses an elongation to break of about 4% (Sudesh et al. 2000). On the contrary, native amorphous intracellular granules reveal behavior of super-cooled liquids, which can be best demonstrated by Cryo-SEM pictures of freeze-fractured PHB rich bacterial cells (Fig. 8). Despite the fact that the bacterial cells were frozen and fractured at very low temperature (−140 °C), the PHA granules retained high flexibility and formed so called needle-like plastic deformations demonstrating elongation to break of more than 100%.

Unique material properties of native amorphous PHA granules are not only of scientific interest but have also great

biological impact. At first, intracellular polymer synthesis is catalyzed by PHA synthase (PhaC) which accepts two substrates into its enzyme pocket: the monomer (3-hydroxyacyl-CoA) and the growing polymeric chain (Wittenborn et al. 2016, Kim et al. 2017a). The substrates demonstrate binding affinity to PHA synthase via its N-terminal region (Kim et al. 2017b). It is very likely that amorphous state of the polymer chain is required for its binding into active site of the PHA synthase. Furthermore, since PHA serves primarily as a storage polymer, bacterial cells possess a sophisticated system of enzymes, so called PHA depolymerases (also designated as PhaZ proteins) catalyzing mobilization of the storage polymer predominantly when external carbon source is depleted. Intracellular PHA depolymerases are specific only to the amorphous form of the polymer and are not capable to cleave crystalline PHA (Jendrossek 2007; Uchino et al. 2008; York et al. 2003). Hence, it can be expected that crystallization of PHA granules prevents their utilization when bacterial cells are starving and, therefore, depreciates their storage function. Moreover, the final products of PHA mobilization were recently identified as very potent chemical chaperons protecting enzymes and other biomolecules from high temperature of oxidative pressure (Obruca et al. 2016b; Soto et al. 2012).

Fig. 8 Cryo-SEM images of *C. necator* H16 cells suspension quickly frozen and freeze-fractured at $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$. **(a)** Overall image of fractured tubular sample. Details on **(b)** intact cell surfaces, **(c)** freeze-fracture area with characteristic needle-type plastic deformation of PHA granules and on **(d)** single deformed PHA granule. Method used for cryo-SEM analysis is described in our previous work (Obruca et al. 2016a).



Hence, impairment of PHA mobilization can have complex biological consequences. In addition, there are also reports that liquid-like properties of native amorphous PHA granules are directly involved in their protective function against various stressors. For instance, it was recently hypothesized that amorphous PHA granules protect bacterial cells from damage by ice crystals during freezing (Obruca et al. 2016a), or that liquid-like amorphous PHA granules stabilize cytoplasmic membranes of bacterial cells exposed to suddenly induced hypertonic (Obruca et al. 2017) and hypotonic (Sedlacek et al. 2018) conditions.

Although the origin and importance of the amorphous character of native PHA granules has been debated extensively in the literature, the exact mechanism by which the polymer is protected from spontaneous crystallization *in vivo* is not yet completely understood. Two main explanations were proposed: (i) an involvement of intragranular plasticizers such as water or other low-molecular solutes (Ceccorulli et al. 1992; Choi and Park 2004) and (ii) a chemical-kinetic mechanism based on a low rate of crystallization in limited volume of sub-micron sized PHA granules (Bonthrone et al. 1992; De Koning and Lemstra 1992). Nevertheless, none of the two methods provides a consistent agreement with all available experimental reports.

It is already well evidenced that Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy represents an advantageous analytical

tool for an investigation of PHA crystallinity. Porter and Yu correlated the values of polymer crystallinity determined by standard DSC technique with those determined by attenuated total reflectance FTIR spectroscopy (Porter and Yu 2011a) and then successfully adopted this spectroscopic technique in the *in situ* investigation of crystallization kinetics of PHA in *C. necator* H16 (formerly known as *Ralstonia eutropha*) cells biologically inactivated by storing at highly acidic conditions (0.2 M sulfuric acid) (Porter and Yu 2011a, b). For all the samples treated in this way, significant spectral manifestations of the crystallization were recorded during the sample drying. The authors also showed that the crystallization kinetics was altered when the primary acidic slurry was further treated by heating or pH adjustment. However, as these authors monitored the PHA crystallization only in the cells with the physiological and probably also the morphological state strongly affected by the applied acidic conditions, it led us to the question how the type and extent of the initial stress, adopted on the cells, influence an initialization and course of the crystallization process.

Our FTIR study indicated that *C. necator* H16 cells do not show any PHA crystallization when the non-stressed culture is dehydrated under ambient conditions. In other words, to induce the crystallization process, the cell culture must be first subjected to adverse conditions. On the other hand, not all of the tested stress factors resulted in the crystallization of PHA.

Combination of the crystallization assay with morphological study revealed that only the stress factors that had led to the coalescence of PHA granules induced crystallization of the polymer. Furthermore, for these stress factors, higher stress doses (e.g., higher temperature, lower pH) always led to the more pronounced manifestation of both the coagulation of granules and the PHA crystallinity. This finding is in very good agreement with the crystallization model proposed by De Koning and Lemstra and Bonthron (Bonthron et al. 1992; De Koning and Lemstra 1992). According to this model, the exceptionally low bulk crystallization rate in the sub-micron-sized granules of a PHA carbonosome results from the low frequency of spontaneous nucleation in such a limited volume. Coagulation of the granules enlarges the volume of the single polymer phase and increases the probability of spontaneous nucleation. The probable explanation of the granule coagulation may also be derived from the results of FTIR assay discussed above. It can be seen that for all the stress factors, which caused coagulation of granules and crystallization of PHA, significant signs of denaturation of proteins can be observed. Of course, the protein denaturation assay shown here cannot distinguish the signal of granule-associated proteins from that of residual cell proteins (it was estimated that the 24 kDa granule-associated phasin represents one of the predominant proteins in *C. necator* and accounts for approx. 5% of the total cell protein fraction (Wieczorek et al. 1995)); nevertheless, the agreement between the extent of granule coagulation and the loss of overall ordered structure in the cell proteins does not seem to be coincidental. In the prospective of the currently acknowledged assumption of the surface of granules being formed by proteins with no phospholipid content, these results let us suppose that stress-induced structural changes in phasins suppress their ability to serve as a surfactant, which separates the individual hydrophobic surfaces of the granules in the hydrophilic cytoplasm, thus preventing their contact and association. The crucial role of native protein structure in preventing granules aggregation can be illustrated by comparison of the results obtained for frozen/thawed cells as compared to all the other tested stress factors. Repeating freezing and thawing did not result in detectable changes in protein structure (Fig. 5) nor in a noticeable aggregation of the granules (Fig. 7 and Fig. S11).

Nevertheless, another important finding of the FTIR assay is that the crystallization process has always followed after the sample dehydration (see Fig. 3). Except for the osmotically stressed cells, the time lag was usually observed between the dehydration and crystallization step. This indicates that the granule coagulation itself is not sufficient for the crystallization to proceed. This in turn supports the active role of intragranular water in plasticizing PHA. It has been experimentally confirmed that the native PHA granules have a residual water content up to 10% by mass (Mas et al. 1985), and the plasticizing effect of water on polymers, even those

structurally similar such as poly(vinyl acetate) (Bair et al. 1981), is well known. Lauzier et al. (1992a, b) proposed a hypothesis that chains of newly biosynthesized PHA, located in the granule's interior, are stabilized in the extended β -conformation by hydrogen-bonded water, resulting in a mobile amorphous form of PHA incapable of crystallization. This hypothesis has not been experimentally confirmed yet because no artificial amorphous form of PHA stabilized only by complexation with water had been prepared so far. Nevertheless, our results indicate that the plasticizing role of water represents not the exclusive, but the necessary additional effect which, in combination with low volume of the native intracellular granules, stabilizes PHA in the mobile amorphous form.

The lag time between the loss of the majority of cytoplasmic water and the crystallization process could then represent the time needed by the intragranular water to leave the granule. This may also explain the unique behavior of osmotically challenged cells where no such lag time was observed. From the morphological analysis (see Fig. 7e), it was found that in the osmotically up-shocked cells, integrity of the granule surface is disturbed and, consequently, the PHA polymer “leaks” from the granules to the cytoplasm. It is likely that, in a similar way, the rate of passage of water from inside to outside the granule is increased under this condition.

Furthermore, it should be noted that the fact that exposure to some stress factors stimulates aggregation of PHA granules might affect reproduction of the bacterial cells. Since aggregates are usually situated in the central part of the cells, aggregation might complicate division of the bacterial cells. Actually, in our stress challenge experiment (Fig. 6), we observed the lowest number of cultivable cells in bacterial cultures exposed to stressors, which strongly induced PHA granules aggregation, such as high temperature or strongly acidic conditions.

To conclude, the fact that intracellular PHA polymer in native intracellular granules occurs in a metastable amorphous form is not only of specific interest from the prospective of material or polymer science, but it has also numerous important biological consequences. We have demonstrated that exposure of bacterial cells to some of the tested stressors induces granules aggregation and subsequent crystallization of the polymer when the bacterial cells are dried. Actually, the fact that both granules aggregation and cell drying must occur to induce crystallization of PHA indicates that both previously suggested hypotheses about mechanisms of stabilization of amorphous state of native PHA are valid and in fact both effects participate synergistically. The amorphous state of the polymer is stabilized kinetically by the low rate of crystallization in limited volume in small PHA granules; moreover, intragranular water seems to function as plasticizer protecting polymer from crystallization. Nevertheless, it is expectable that some other important contributors to this complex phenomenon are still to be revealed. For example, the importance of granule-associated proteins in maintaining the granule

integrity was evidenced by our results, nevertheless, detailed analysis of the specific structural changes during the stress exposure should be provided. Moreover, the significance of the content of monomer units of PHA in PHA-accumulating cells together with its important biological activity was discussed in our previous work (Obruca et al. 2016b). However, no information is yet available on the concentration of the monomer and/or oligomers in the granules nor on their effect on phase transition of the polymer form. Therefore, and taking into account its widely discussed biological importance, there remains a lot to be elucidated before finding a complete answer to the question raised in the title of this paper.

Acknowledgements We acknowledge the program for large research infrastructures of the Ministry of Education, Youth and Sports within the project “National Infrastructure for Biological and Medicinal Imaging (Czech-Biolmaging LM2015062).

Funding This study was funded by the projects “Materials Research Centre at FCH BUT - Sustainability and Development” No. LO1211 and “National Infrastructure for Biological and Medicinal Imaging” (Czech-Biolmaging LM2015062) of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic and by the project GP19-20697S of the Czech Science Foundation (GACR).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

- Arrondo JLR, Muga A, Castresana J, Goni FM (1993) Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared-spectroscopy. *Prog Biophys Mol Biol* 59(1):23–56. [https://doi.org/10.1016/0079-6107\(93\)90006-6](https://doi.org/10.1016/0079-6107(93)90006-6)
- Bair HE, Johnson GE, Anderson EW, Matsuoka S (1981) Non equilibrium annealing behavior of poly(vinyl acetate): phase diagram, thermal and crystallization behavior. *Polym Eng Sci* 21:930–935. <https://doi.org/10.1002/pen.760211410>
- Beeby M, Cho M, Stubbe JA, Jensen GJ (2012) Growth and localization of polyhydroxybutyrate granules in *Ralstonia eutropha*. *J Bacteriol* 194(5):1092–1099. <https://doi.org/10.1128/JB.06125-11>
- Bonthrone KM, Clauss J, Horowitz DM, Hunter BK, Sanders JKM (1992) The biological and physical-chemistry of Polyhydroxyalkanoates as seen by NMR-spectroscopy. *FEMS Microbiol Lett* 103(2-4):269–277. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05848.x>
- Bresan S, Sznajder A, Hauf W, Forchhammer K, Pfeiffer D, Jendrosseck D (2016) Polyhydroxyalkanoate (PHA) granules have no phospholipids. *Sci Rep* 6:26612. <https://doi.org/10.1038/srep26612>
- Byler DM, Susi H (1986) Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved Ftr spectra. *Biopolymers* 25(3):469–487. <https://doi.org/10.1002/bip.360250307>
- Ceccorulli G, Pizzoli M, Scandola M (1992) Plasticization of bacterial poly(3-Hydroxybutyrate). *Macromolecules* 25:3304–3306. <https://doi.org/10.1021/ma00038a045>
- Choi JS, Park WH (2004) Effect of biodegradable plasticizers on thermal and mechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate). *Polym Test* 23:455–460. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2003.09.005>
- De Koning GJM, Lemstra PJ (1992) The amorphous state of bacterial poly[(R)-3-hydroxyalkanoate] in vivo. *Polymer* 33:3292–3294. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(92\)90249-V](https://doi.org/10.1016/0032-3861(92)90249-V)
- Goormaghtigh E, Cabiaux V, Ruyschaert JM (1990) Secondary structure and dosage of soluble and membrane proteins by attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy on hydrated films. *Eur J Biochem* 193(2):409–420. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb19354.x>
- Hu Y, Zhang J, Sato H, Noda I, Ozaki Y (2007) Multiple melting behavior of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) investigated by differential scanning calorimetry and infrared spectroscopy. *Polymer* 48:4777–4785. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2007.06.016>
- Jendrosseck D (2007) Peculiarities of PHA granules preparation and PHA depolymerase activity determination. *Appl Microbiol Biotechnol* 74(6):1186–1196. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0860-9>
- Kadouri D, Jurchevitch E, Okon Y (2003) Involvement of the reserve material poly-β-hydroxybutyrate in *Azospirillum brasiliense* stress endurance and root colonization. *Appl Environ Microbiol* 69(6):3244–3250. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3244-3250.2003>
- Kim J, Kim YJ, Choi SY, Lee SY, Kim KJ (2017a) Crystal structure of *Ralstonia eutropha* polyhydroxyalkanoate synthase C-terminal domain and reaction mechanisms. *Biotechnol J* 12(1):1600648. <https://doi.org/10.1002/biot.201600648>
- Kim YJ, Choi SY, Kim J, Jin KS, Lee SY, Kim KJ (2017b) Structure and function of the N-terminal domain of *Ralstonia eutropha* polyhydroxyalkanoate synthase, and the proposed structure and mechanisms of the whole enzyme. *Biotechnol J* 12(1):1600649. <https://doi.org/10.1002/biot.201600649>
- Koskimäki JJ, Kajula M, Hokkanen J, Ihtola EL, Kim JH, Hautajärvi H, Hankala E, Suokas M, Pohjanen J, Podolich O, Kozyrovska N, Turpeinen A, Pääkkönen M, Mattila S, Campbell BC, Pirttilä AM (2016) Methyl-esterified 3-hydroxybutyrate oligomers protect bacteria from hydroxyl radicals. *Nat Chem Biol* 12(5):332–338. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2043>
- Lauzier C, Marchessault RH, Smith P, Chanzy H (1992a) Structural study of isolated poly(β-hydroxybutyrate) granules. *Polymer* 33:823–827. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(92\)90343-U](https://doi.org/10.1016/0032-3861(92)90343-U)
- Lauzier C, Revol JF, Marchessault RH (1992b) Topotactic crystallization of isolated poly(beta-hydroxybutyrate) granules from *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol Lett* 103:299–310. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05851.x>
- Mas J, Pedros-Alio C, Guerrero R (1985) Mathematical-model for determining the effects of intracytoplasmic inclusions on volume and density of microorganisms. *J Bacteriol* 164:749–756
- Nowroth V, Marquar L, Jendrosseck D (2016) Low temperature-induced viable but not culturable state of *Ralstonia eutropha* and its relationship to accumulated polyhydroxybutyrate. *FEMS Microbiol Lett* 363(23):fnw249. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw249>
- Obruca S, Sznajdar O, Svoboda Z, Marova I (2013) Application of random mutagenesis to enhance the production of polyhydroxyalkanoates by *Cupriavidus necator* H16 on waste frying oil. *World J Microbiol Biotechnol* 29(12):2417–2428. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1410-5>
- Obruca S, Sedláček P, Krzyzanek V, Mravec F, Hrubanova K, Samek O, Kucera D, Benesova P, Marova I (2016a) Accumulation of Poly(3-hydroxybutyrate) helps bacterial cells to survive freezing. *PLoS One* 11:e0157778. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157778>
- Obruca S, Sedláček P, Mravec F, Samek O, Marova I (2016b) Evaluation of 3-hydroxybutyrate as an enzyme-protective agent against heating

- and oxidative damage and its potential role in stress response of poly(3-hydroxybutyrate) accumulating cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:1365–1376. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7162-4>
- Obruca S, Sedlacek P, Mravec F, Krzyzanek V, Nebesarova J, Samek O, Kucera D, Benesova P, Hrubanova K, Milerova M, Marova I (2017) The presence of PHB granules in cytoplasm protects non-halophilic bacterial cells against the harmful impact of hypertonic environments. *New Biotechnol* 39:68–80. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.07.008>
- Obruca S, Sedlacek P, Koller M, Kucera D, Pernicova I (2018) Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: biotechnological consequences and applications. *Biotechnol Adv* 36(3):856–870. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.006>
- Pavez P, Castillo JL, Gonzalez C, Martinez M (2009) Poly- β -hydroxyalkanoate exert a protective effect against carbon starvation and frozen conditions in *Sphingopyxis chilensis*. *Curr Microbiol* 59: 636–640. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9485-9>
- Porter M, Yu J (2011a) Monitoring the in situ crystallization of native biopolyester granules in *Ralstonia eutropha* via infrared spectroscopy. *J Microbiol Methods* 87(1):49–55. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.07.009>
- Porter M, Yu J (2011b) Crystallization kinetics of poly(3-hydroxybutyrate) granules in different environmental conditions. *J Biomater Nanobiotechnol* 2:301–310. <https://doi.org/10.4236/jbmb.2011.23037>
- Sedlacek P, Slaninova E, Koller M, Nebesarova J, Marova I, Krzyzanek V, Obruca S (2018) PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances. *New Biotechnol*. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.10.005>
- Slaninova E, Sedlacek P, Mravec F, Mullerova L, Samek O, Koller M, Hesko O, Kucera D, Marova I, Obruca S (2018) Light scattering on PHA granules protects bacterial cells against the harmful effects of UV. *Appl Microbiol Biotechnol* 102(4):1923–1931. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8760-8>
- Soto G, Setten L, Lisi C, Maurelis C, Mozzicafreddo M, Cuccioloni M, Angeletti M, Ayub ND (2012) Hydroxybutyrate prevents protein aggregation in the halotolerant bacterium *Pseudomonas* sp. CT13 under abiotic stress. *Extremophiles* 16:455–462. <https://doi.org/10.1007/s00792-012-0445-0>
- Sudesh K, Abe H, Doi Y (2000) Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog Polym Sci* 25: 1503–1555. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(00\)00035-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(00)00035-6)
- Susi H, Byler DM (1986) Resolution-enhanced fourier transform infrared. *Methods Enzymol* 130:290–311. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(86\)30015-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(86)30015-6)
- Uchino K, Saito T, Jendrosseck D (2008) Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase PhaZa1 is involved in mobilization of accumulated PHB in *Ralstonia eutropha* H16. *Appl Environ Microbiol* 74(4): 1057–1063. <https://doi.org/10.1128/AEM.02342-07>
- Wang Q, Yu H, Xia Y, Kang Z, Qi Q (2009) Complete PHB mobilization in *Escherichia coli* enhances the stress tolerance: a potential biotechnological application. *Microb Cell Factories* 8:47. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-47>
- Wieczorek R, Pries A, Steinbuechel A, Mayer F (1995) Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* 177:2425–2435. <https://doi.org/10.1128/jb.177.9.2425-2435.1995>
- Wittenborn EC, Jost M, Wei Y, Stubbe J, Drennan CL (2016) Structure of the catalytic domain of the class I polyhydroxybutyrate synthase from *Cupriavidus necator*. *J Biol Chem* 291:25264–25277. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.756833>
- York GM, Lupberger J, Tian J, Lawrence AG, Stubbe JA, Sinskey AJ (2003) *Ralstonia eutropha* H16 encodes two and possibly three intracellular poly[D-(–)-3-hydroxybutyrate] depolymerase genes. *J Bacteriol* 185(13):3788–3794. <https://doi.org/10.1128/JB.185.13.3788-3794.2003>
- Zhao YH, Li HM, Qin LF, Wang HH, Chen GQ (2007) Disruption of the polyhydroxyalkanoate synthase gene in *Aeromonas hydrophila* reduces its survival ability under stress conditions. *FEMS Microbiol Lett* 276:34–41. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00904.x>

6.5 Příloha V

SLANINOVÁ, E.; OBRUČA, S.; KORCHEBITOV, V.; SEDLÁČEK, P. On the bioprotective effects of sodium 3-hydroxybutyrate: thermodynamic study of binary Na3HB-water systems. V recenzním řízení v časopise *Biomolecules*.

Article

On the bioprotective effects of sodium 3-hydroxybutyrate: thermodynamic study of binary Na3HB-water systems.

Eva Slaninova¹, Stanislav Obruca¹, Vitaly Kocherbitov^{2,*} and Petr Sedlacek^{1,*}

¹ Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkynova 118, 612 00 Brno, Czech Republic.

² Biomedical Science, Faculty of Health & Society, Malmö University, SE-20506 Malmö, Sweden

* Correspondence: vitaly.kocherbitov@mau.se [VK], sedlacek-p@fch.vut.cz; Tel.: +420 541 149 486 [PS]

Abstract: Microorganisms have to face to various inconvenient conditions; therefore, they developed several protective approaches how to protect themselves such as compatible solutes, osmolytes etc. It was already proved that monomer units 3HB which are present in sufficient concentration in PHA accumulating cells, serve as a chemical chaperones protecting enzymes against heat and oxidative stress and also as cryoprotectant for enzymes, bacterial cells and yeast. However, the ability of cells to protect themselves is also strongly dependent on behavior and state of intracellular water, especially during stress exposure. For better understanding of protective mechanism and effect of strongly hydrophilic 3HB in solutions at wide range of temperatures, binary phase diagram of system Na3HB-water in equilibrium and non-equilibrium were constructed. To investigate activity of water in various compositions of Na3HB-water, three analytical techniques has been used (dynamic water sorption analysis, LabMaster-aw and sorption calorimetry). Firstly, 3HB proved its great hydrophilic nature even better than known compatible solutes (trehalose). In combination with data from differential scanning calorimetry, phase diagrams demonstrated 3HB as highly effective to depress freezing point making the large amount of non-frozen water (1.35 g water per g of Na3HB). Therefore, Na3HB represents very effective cryoprotectant which can be widely used for numerous applications.

Keywords: cryoprotectant; 3-hydroxybutyrate; sorption isotherm; phase diagram; compatible solutes; differential scanning calorimetry; glass transition; non-frozen water

1. Introduction

Natural cryoprotectants (or cryo-protective agents, CPA) have been known since the 19th century when the earliest concepts of cryoprotection were established. Nowadays, cryobiology belongs to the essential field with high application in biotechnology and modern medicine where macromolecules, cell components and cells are protected against freezing and/or desiccation by cryoprotective additives. The presence of CPA stabilizes the activity of enzymes and enhances glassy state during freezing which is crucial for the viability of cells. CPA are generally classified as i. penetrating CPA (capable of diffusing through the plasma membrane) revealing common properties such as low molecular weight, high solubility, nontoxicity, etc., and ii. non-penetrating CPA which are generally long-chain polymers, also soluble in water with high osmotic coefficients. This division of CPA is closely related to the course of freezing, the penetrating CPA which are known as compatible solutes (e.g. glucose, sucrose, trehalose, glycerol etc.) are efficient for protection against slow freezing because of their great ability to mitigate damage considering osmotic changes. On the contrary, non-penetrating CPA (poly(vinyl alcohol), polyethylene glycol etc.) are suitable for protection against rapid freezing, they act as dehydrogenation agents for reduction of an amount of intracellular water before cooling. Thus, the extent of the freeze-induced damage is dependent both on the rate of cooling

and on concentrations of the intracellular and the extracellular solution, respectively. Generally, the dependence between the cooling rate and the cell survival is often expressed as an inverse-U function where the maximum cell survival at optimal cooling rate sharply falls down on both directions (Figure 1) [1-5]. Furthermore, many of the penetrating CPA (e.g. trehalose, ectoin, betaine) often combine the cryoprotection with a shielding of labile cellular components against other environmental stress factors, including high temperature [6], oxidative damage [7] and/or extreme pH [8]. The mechanism of the universal protective performance of these compounds – often referred to as compatible solutes or chemical chaperones – is not clearly understood, nevertheless, it is believed that they are able to stabilize labile biopolymers (e.g. proteins) by affecting their hydration in the cell [9, 10]. Therefore, revealing how a biomolecule affects activity of water in aqueous solutions seems to represent an essential step to evaluate or understand its bioprotective potential.

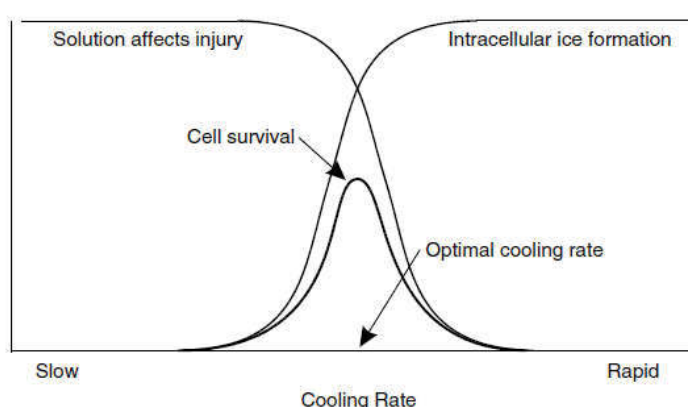


Figure 1. Overlap of the two principal freeze-injury mechanisms [4].

Microorganisms employ several approaches on how to protect themselves against various factors in the environment such as freezing and thawing, starvation, fluctuations in temperatures, UV exposure etc. One of the protective mechanisms which numerous strains of bacteria and *Archae* can use is capability of production and accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) in a form of intracellular granules [11]. These PHB granules had been considered primarily as storage of energy and carbon (from 25 up to 91 % of cell dry weight), however, nowadays PHB granules belong to the highly investigated protectants against various stressors such as high temperature, osmotic shock, UV exposure or oxidative pressure etc. [12-14]. Nevertheless, the principle of such a wide range of protectivity of these compounds is based both on PHB metabolism and unique structural and physicochemical properties. In numerous cases, PHB monomer 3-hydroxybutyrate (3HB) plays its role. PHB granules are simultaneously biosynthesized and degraded, therefore, the metabolism of PHB is called PHB cycle. As a consequence of the PHB cycle, PHB accumulating microorganisms possess a high intracellular pool of 3HB monomers [15]. It was found that 3HB serves as a compatible solute protecting bacteria against the high salinity of the environment [16]. Moreover, it was also observed that 3HB serves as a chemical chaperone protecting lysozyme and lipase (representing model enzymes) against heat and oxidative stress [17]. In another report, 3HB was identified as a potential cryoprotectant for enzymes (lipase), yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and bacterial cells (*Cupriavidus necator*) [18]. From the fact that PHB and 3HB might be involved in adaptation of prokaryotes is also indirectly suggested by the fact that numerous PHB producers were isolated from cold environments such as Antarctic freshwater [19], Antarctic soil [20], the Baltic Sea [21] or Pangi-Chamba trans-Himalayan region [22] or other polar regions [23].

Hence, in the present work, we aim at investigating the interactions of sodium 3-hydroxybutyrate (Na3HB), PHB monomer, with water especially at low and subzero temperatures. Understanding of behavior of Na3HB in water solutions is essential not only

for revealing of its cryoprotective potential, it might also contribute understanding of its general protective action for various biomolecules and cells. Apart from its fundamental biological importance, this highly hydrophilic compound offers wide application potential in cryobiology, freeze-preservation of food and other biological materials etc. For the purpose of in-depth analysis of the protective mechanism of Na3HB we decided to construct a phase diagram in equilibrium and non-equilibrium of Na3HB-water system. Data were obtained by several techniques such as isothermal sorption calorimetry, differential calorimetry scanning (DSC), dynamic vapor sorption analysis, and resistive and electrolytic humidity measurement (Novasina water activity meter).

2. Materials and Methods

2.1. Preparation of samples

Sodium 3-hydroxybutyrate (Na3HB) was obtained by Sigma-Aldrich with purity $\geq 99.0\%$ (NT), CAS Number 150-83-4. Before all hydration experiments, Na3HB was dried in the vacuum in contact with 3 Å molecular sieves at least 24 hours at room temperature. Samples of various ratios of Na3HB and water were obtained either direct pipetting of water to dried Na3HB or hydrate0d at a controlled relative humidity (RH) in desiccators with saturated salt solution from several minutes to hours at 25 °C; used salts: K₂SO₄ (97.3% RH), KCl (84.34% RH), NaCl (75.29% RH), Mg(NO₃)₂ (52.89% RH), MgCl₂ (32.78% RH).

2.2. Determination of water activity

2.2.1. Dynamic vapor sorption

For vapor sorption analysis was used dynamic vapor sorption Q5000 SA (TA Instruments, the United States). Dried Na3HB was post-dried for 60 min at 60 °C and isothermally equilibrated 60 min at specific relative humidity and temperature (10; 15; 25; 40 °C). Then, method of moisture sorption and desorption was run with 0.5 -5 % of humidity rate.

2.2.2. LabMaster-aw

The next instrument which measure activity of water is **LabMaster-aw** (Novasina, Switzerland). Firstly, the machine was calibrated by commercial reusable SAL-T calibration standards. Every value of the activity of water was measured by each sample of Na3HB-water at 25 °C.

2.2.3. Sorption calorimetry

In the sorption calorimetry experiments, dried samples of Na3HB were loaded into 28 mm two-chamber calorimetric cell inserted in a double-twin calorimeter, respectively dried sample was placed in the upper chamber called sorption chamber. The lower chamber was filled in pure water and all measurements were performed at 25 °C. This method provides to the determination of water activity and the partial molar enthalpy of mixing of water.

2.3. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Experiments with Na3HB containing different amounts of water were performed by differential scanning calorimeter (DSC 1 Mettler Toledo, the United States). For calibration of heat flow and temperature, hermetically sealed indium in aluminum pan (mp 156.6 °C; $\Delta H = 28.45$ J/g) and an empty sealed aluminum pan as a reference were used. As purge gas a dry nitrogen with gas flow 80 mL/min was used.

Firstly, samples were loaded into aluminum pan, hermetically sealed and cooled down (10 °C/min) to low temperature depending on which phase transitions we wanted to. In case of measurements related to phase diagram in equilibrium, we set the lowest temperature (-70 °C) in method above phase temperature of glass transition due to

previous optimization in contrast with set up for phase diagram in no-equilibrium, where the lowest temperature was equal to -90°C . For instance, the method proceeded as follows from 25°C into -90°C and held for equilibration time 5 min, after then heated up to 100°C and cooled down back to low temperature and once more held at this temperature for 5 min. The whole method ran with a scan rate $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, however other scan rates (1, 2 and $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) were used for samples to extrapolate the endset of melting of ice and melting of anhydrous Na3HB to zero scan rate. To get phase transitions from 42 to 65 wt% of Na3HB for phase diagram in equilibrium, scan rate was decreased into limit of device to $0.2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and equilibration time was half of the hour when temperatures were chosen above glass transition temperature. For evaluation, we used only second scans except measurements with scan rate $0.2^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

3. Results and Discussion

It is very unlikely that the recently revealed stabilizing effect of 3HB for biological samples under such fundamentally distinct stress conditions as cryo- and high temperatures, or in an oxidative environment, respectively, could be attributed to a single physical or chemical mechanism of protection. On the other hand, it is indisputable that the state of intracellular water plays an essential role under all of these circumstances. Protein stabilization by compatible solutes has most often been ascribed to so-called preferential hydration phenomenon [1], which combines general colligative decrease of water activity in a solution with a solute-specific preferential binding or exclusion of the solute molecules from the immediate surface of the protein. Thermodynamic model of the preferential exclusion of stabilizing solutes from the protein hydration layer was elaborated [24] and, furthermore, a structural concept was proposed which explains the phenomenon based on the structural distinction and different solvent properties of the hydration ("high-density") and the bulk ("low-density") water, respectively [25]. The role of water activity is even more obvious wherever the exposure to harmful conditions results in cell desiccation. This is provided not only by a high osmolality of the environment, but it also represents a severe harmful consequence of cell freezing under a slow cooling rate, where the formation of extracellular ice concentrates the solutes outside the cells which result in so-called "freeze-dehydration". On the other hand, cell freezing under higher cooling rates most often results in a cell injury *via* intracellular ice formation, once again strongly dependant on the thermodynamic state of the cellular water. Last but not least, a decrease in water availability is known to be accompanied by disruption of electron transfer systems and with an increased generation of reactive oxygen species resulting in oxidative stress manifestations such as metabolic enzyme inactivation and damage to membrane lipids and/or nucleic acids [26]. Bearing this essential role of water in mind, we decided to perform a complex study on the thermodynamics of 3HB/water system as an inevitable first step to a better understanding of stabilizing effects provided by 3HB. Two distinct experimental strategies were used for this purpose: first, hydration of 3HB was studied using a combination of three different methods of sorption analysis, second, phase transitions in aqueous solutions of 3HB were studied *via* DSC under equilibrium and non-equilibrium conditions, respectively.

2.1. Water sorption on 3-hydroxybutyrate

Sorption analysis was performed to evaluate the hygroscopicity of 3HB at different hydration levels. Sorption isotherms (water activity as a function of water content in binary 3HB/water systems), determined by three independent analytical techniques at 25°C , are shown in Fig. 2a. Dynamic water sorption analysis (DVS) is a gravimetry technique based on determining the sample weight after its equilibration at a specific level of relative humidity (RH) of the controlled measuring atmosphere. Hereby, a corresponding equilibrium water contents in the sample are determined for different values of water activity (numerically equals to the relative humidity in % RH divided by 100). The second applied

experimental technique uses an opposite principle, i.e. the values of water activity were determined using commercial electric hygrometer LabMaster-aw (Novasina) for samples prepared with controlled content of 3HB and water, respectively. And finally, the sorption microcalorimetry technique, whose instrumentation and methodology is described in details elsewhere [27], enables simultaneous measurement of both the water activity (relative humidity) and the sample moisture content. Furthermore, as modified calorimetry, this method also provides differential sorption enthalpy as an additional valuable parameter characterizing the water sorption process.

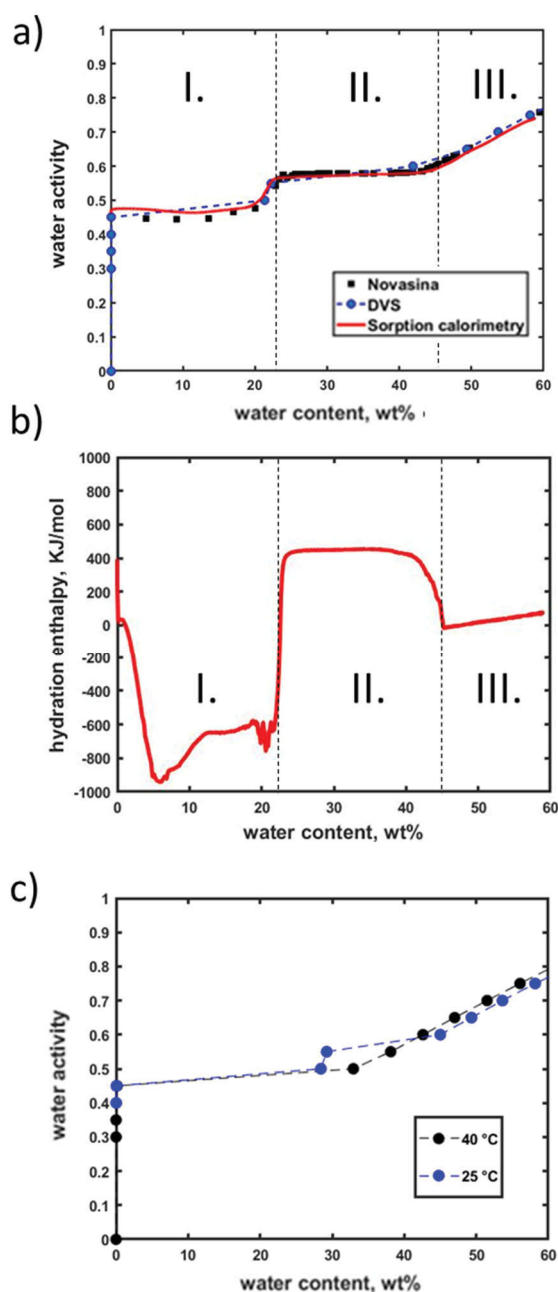


Figure 2. (a) Sorption isotherms for water vapor sorption on 3HB at 25°C determined by Novasina LabMaster, DVS, and Sorption calorimetry respectively. (b) Enthalpy of hydration of Na₃HB as a function of water content as measured by sorption calorimetry at 25 °C. (c) Comparison of water vapor sorption isotherms measured by DVS at 25 °C and 40 °C, respectively.

Evidently, results of all the three methods are in a great agreement indicating good reproducibility of the water sorption process and they also provide several interesting findings regarding phase behavior in the 3HB/water system. Primarily, the step-wise shape of the isotherm indicates a complex phase behavior with several phase transitions occurring at specific levels of 3HB hydration. Starting from the lowest water content, it can be seen that the dry crystalline 3HB does not uptake any water until the relative humidity exceeds a critical level (about 48.5% RH). The low water absorbency of the crystalline forms of cryoprotectants is neither unexpected nor unique. For instance, while the amount of water absorbed by the amorphous form of trehalose (routinely used cryoprotective agent) increases almost linearly with RH of the atmosphere [28], the α , α -trehalose starts to absorb a significant amount of water only at RH above 95%. [29]. When exceeding the required limit of water activity, the amount of sorbed water molecules increases to 22.5 wt.%. (region I. in Fig. 2a). This particular content of water corresponds to two water molecules per one 3HB, the step in the sorption isotherm, therefore, represents the change of crystal form of solid 3HB from anhydrous to dihydrate. Results of sorption calorimetry show that this transition is exothermic (see Fig. 2b). The next region of constant water activity (region II. in Fig. 2a) represents the coexistence of solid 3HB dihydrate and its saturated solution. From the border concentration of this region (about 45.2 wt.% of water), the solubility of 3HB dihydrate can be determined (54.8 wt.% of 3HB, equivalent to ca 120 g 3HB per 100 g water). The solubility is well comparable with those of α , α -trehalose (109.6 g per 100 g water at 30°C, [29]). Furthermore, it can be seen in Fig. 2b that the dissolution of dihydrate is endothermic. The final step of the sorption isotherm (region III., above 60% RH) represents water uptake by 3HB solution. In this region, water activity increases with the water content in solution, whereby the activity coefficient (calculated as a ratio of water activity and molar percentage of water in solution) increases from 0.7 to 0.9. The value of the activity coefficient lower than 1 confirms the hydrophilic nature of 3HB in its aqueous solution. Moreover, the determined water activities are significantly lower than those published for aqueous solutions of other compatible solutes, e.g. trehalose or sucrose [30].

To check the effect of temperature on the vapor sorption on 3HB, DVS analysis was repeated also at 40°C. It can be seen in Fig. 2c that the sorption isotherm shows some similar features but also significant differences as compared to that determined at 25°C. Again, a negligible water uptake on dry crystalline 3HB was observed below 50 %RH (this phenomenon proved to be general as far as we observed it also at temperatures below 25°C, data not shown). Furthermore, also the vapor sorption by 3HB solution does not significantly differ, showing only slightly lower hydrophilicity of 3HB (represented by moderately higher activity coefficient of water). On the other hand, only one step change is found in the isotherm suggesting that no transition between different crystal modifications occurs at the higher temperature. Last but not least, the solubility of crystalline 3HB at 40°C increases to 67.1 wt.% of 3HB (167 g 3HB per 100 g water) which is again higher as compared to trehalose (148 g per 100 g water, [29]).

To sum up the results of this experimental part, results of the vapor sorption analyses proved the hydrophilic nature of 3HB in the aqueous solution which is at least comparable to, but in some perspectives (solubility, water activity decrease in solution) even better than some well recognized compatible solutes such as trehalose. This represents an original and important finding which may motivate further research of 3HB as a chemical chaperon and bioprotective molecule, not only with respect to its possible stabilizing role in various biological systems (e.g. in PHB accumulating microorganisms) but also from the view of its potential application in the fields in which stabilization of biological molecules is required e.g. cryopreservation of biological samples, food preservation, cosmetics, etc. Apart from this, the study also revealed that 3HB can form, depending on the conditions (temperature, relative humidity), at least two different crystalline forms – anhydrous crystal and crystalline dihydrates, respectively.

2.2. Phase diagram of 3HB/water in equilibrium

The vapor sorption analysis describes the thermodynamics of 3HB – water systems at temperatures close to physiological optima. Nevertheless, when discussing the actual bioprotective effects (in particular the cryoprotective ones) it is necessary to analyze thermodynamics of 3HB - water binary systems over a much wider range of temperatures. For this purpose, we performed a DSC analysis of the phase transitions occurring during controlled freezing and thawing of various 3HB-water mixtures. Examples of recorded DSC thermograms and the illustration of their evaluation are shown in Supplementary materials. As the result of this evaluation, onset, peak and endset temperatures were obtained as well as the integral heat of the transition (see the example of ice melting peak evaluation in Figure S1a). For samples with a concentration of Na3HB ranging from 6.3 to 37.8 wt%, two separate endotherm peaks were observed in the thermograms below 0 °C upon heating (Figure S1b). In this case, the first endothermic peaks belong to the eutectic line where the crystalline hydrates of Na3HB melt, while the second peaks correspond to the melting of ice. On the other hand, thermograms of the samples with a high content of Na3HB (from 72.4 to 81.6 wt%, Figure S1c) are featureless until about 30°C where they show a dominant peak corresponding to melting of solid 3HB hydrates and a minor peak shifted to a higher temperature attributed to melting of anhydrous Na3HB (marked with the red arrow in Figure S1d).

To provide a complete overview of the equilibrium phase behavior of binary 3HB-water systems, results of DSC and the vapor sorption analysis were combined to construct the phase diagram, shown in Figure 3. To construct the eutectic and peritectic lines, respectively, onset temperatures of the corresponding endothermic peaks were used, while for the solubility and the ice melting curves, endset temperatures were utilized. To minimize effects of the scan rate on the determined values of the ice melting point and solubility, respectively, DSC measurements were performed at three scan rates (1, 2 and 5 °C/min, see Figure S2) and the endset temperatures were extrapolated to zero scan rate. From the methodological point of view, it was also quite tricky to get any results for samples with the content of Na3HB ranging from 42 to 65 wt%. because the peak corresponding to the eutectic line was hardly detectable for these samples. The reason is that as far as the second melting scans were analyzed for all the samples (see Materials and Methods), which means that the liquid sample coming from the first scan was cooled down to crystallize, samples of this compositions showed a high tendency to adopt the glassy state preventing the sample from crystallization. Actually, the ability to keep the amorphous glassy state at the temperature as low as in this case represents a highly required property of cryoprotectants. Eventually, these experimental difficulties have been overcome by equilibrating the sample for half an hour to be above the glass transition point (supporting sample crystallization) and also by decreasing the scan rate to the limit of the device (0.2 °C/min).

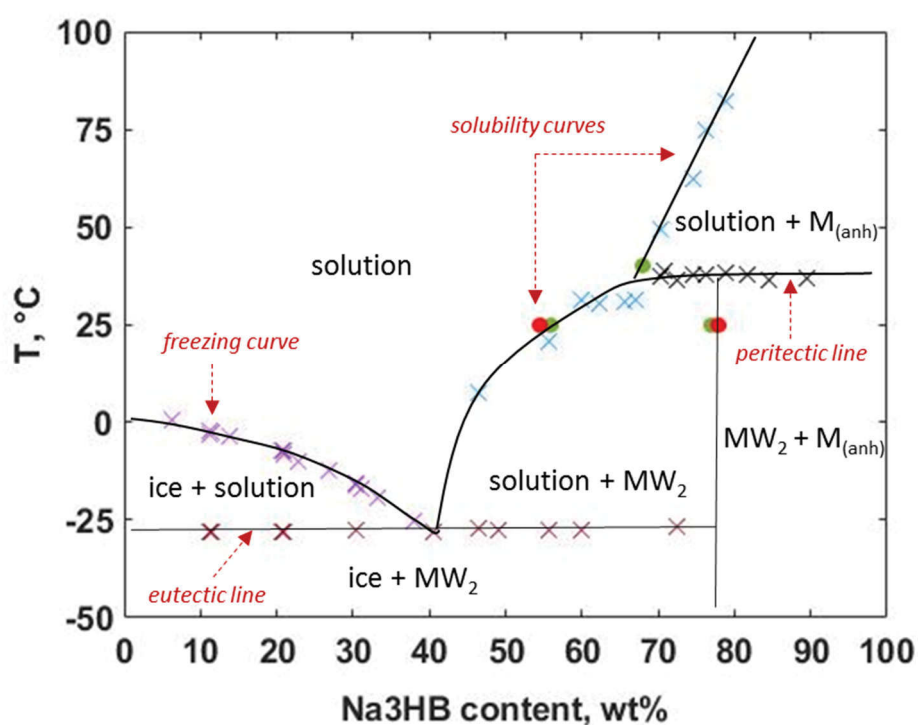


Figure 3. Phase diagram in the equilibrium of Na3HB-water complex using DSC (x); sorption calorimetry (●) and DVS (●). All lines are drawn as a guide for eye to follow the respective phase boundaries.

In the equilibrium phase diagram, the freezing curve represents the most important phase boundary as far as a cryoprotective effect of 3HB is concerned. This curve illustrates the depression of the water freezing point in aqueous 3HB solutions. The curve ends in the eutectic point that occurs at 3HB content of 40.5 wt.% and temperature -28.1 °C. This means that no ice is formed in solutions above this 3HB content. Furthermore, it also indicates the lowest temperature to which the water freezing point can be depressed by a presence of 3HB. Similar complete or partial phase diagrams have already been published for some compatible solutes and routinely used cryoprotectants such as trehalose [31, 32], sucrose [33] or glycerol [34]. Comparing to these compounds, the effect of 3HB on the freezing point depression is again either comparable or even more pronounced. For instance, published values of eutectic points of trehalose range from -2.5 °C to -18.8 °C [35–37] and for sucrose from -8.5 °C to -13.95 °C [38]. Glycerol can decrease the water freezing point up to -45 °C (eutectic point), nevertheless, significantly higher glycerol content is needed (about 65 wt.%, [39]), while the similar weight content of glycerol (40 wt.%) decrease water freezing less than 3HB (only to -15.4 °C, [39]). Similarly to the results of vapor sorption analysis, 3HB thus proved to affect water activity in the binary systems at least comparably to the well recognized compatible solutes.

Based on the DSC data, it was also further confirmed that 3HB in the solid-state really does form the crystalline dihydrates. For this purpose, the enthalpies of the melting endothermic peak that corresponds to the peritectic line in the phase diagram in Figure 3 (the thermograms are shown in Figure S1c) were plotted as a function of Na3HB content. As can be seen in Figure 4, the melting enthalpy increases as the relative content of this hydrated crystalline form in the sample increases at the expense of the solution (lower 3HB contents) and anhydrous 3HB (higher contents), respectively. The intersection point of the two linear parts of this dependency occurs at the content of 3HB equal to 77.5 wt%. Once again, this relative weight content corresponds to the presence of two water molecules per

one molecule of 3HB in the crystalline hydrate. (Figure 2b). The chemical structure of this crystalline form was hence confirmed by two independent experimental approaches.

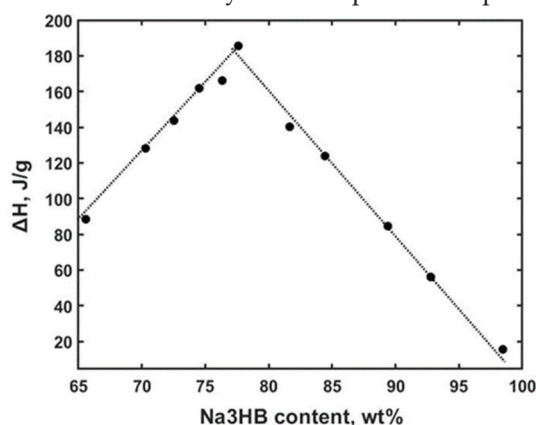


Figure 4. The dependence of different concentrations on the enthalpy of melting dihydrates of Na3HB.

2.3. Phase diagram in non-equilibrium

The previous section describes the effect of 3HB from the viewpoint of equilibrium freezing. On the other hand, freezing of the living organisms is usually occurring far from equilibrium, with a great influence on the freezing dynamics. As already noted, when determining the equilibrium phase diagram, the most crucial experimental condition was represented by preventing the sample to become into a glassy state. In contrast, the bio-protective effects of compatible solutes during freezing or desiccation of an organism are often attributed exactly to this tendency to maintain an amorphous form with water molecules kinetically trapped inside [40, 41]. Therefore, we have complemented the study with the DSC analysis focused on the phase transition in 3HB-water systems out of equilibrium.

From the experimental point of view, the main difference lies in cooling the sample to a temperature well below the glass point prior to the evaluated heating DSC scan. Hereby, efficient conversion of the sample to the glassy or semi-glassy state phase is assured. The obtained DSC thermograms including an example of the evaluation of the glass transition are shown in Supplementary material (Figure S3). The composition of the samples influenced significantly their ability to transform into glass and semi-glass state, respectively. For example, samples with Na3HB concentrations from 6.3 to 37.9 wt% showed both the glass transition step and the ice melting peak (Figure S3b). In the zoomed glass transition steps of these thermograms (Figure S3c-e), it can better be seen that the glass transition varies in temperature and the heat capacity change. Both parameters of the glass transition are plotted against 3HB content in Figure 5.

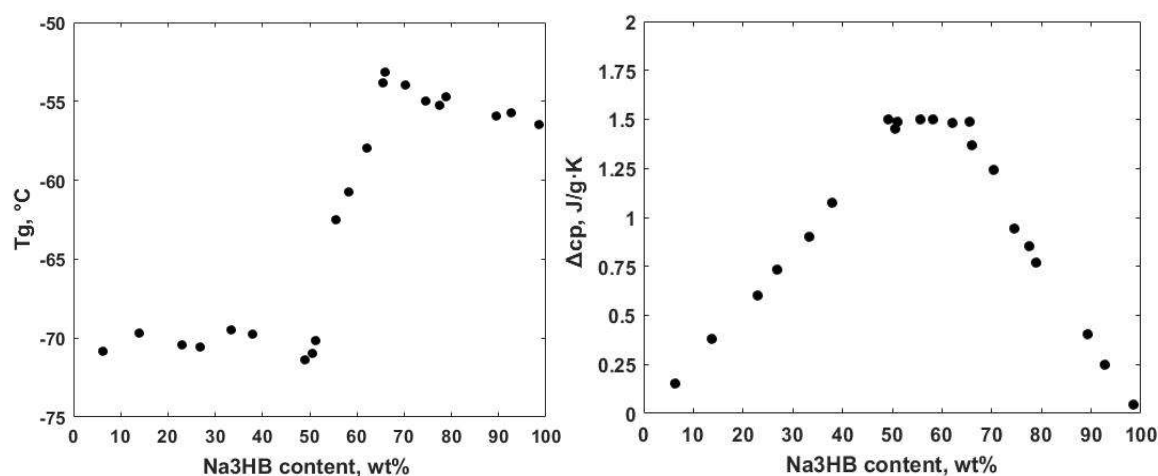


Figure 5. Glass transitions obtained by DSC data: (left) temperature dependence and independence of glass transition on water content; (right) heat capacity of glass transitions.

Evidently, three distinct concentration regions can be distinguished in both plots shown in Figure 5. First, samples with 3HB content below 50 wt.% show the semi-glassy state where the glassy state coexists with ice. The stoichiometric ratio of water and 3HB in the glassy state does not change over this region as indicated by the constant glass transition temperature, while the relative content of the glassy state increases with total 3HB content in the sample as confirmed by increasing heat capacity change. Similarly, also the samples rich in 3HB (above 68 wt.%) represents semi-glassy state, in this case represented by the coexistence of glassy 3HB-water and crystalline 3HB components. Interestingly, it can be seen that the stoichiometry of the glassy phases of the two regions differs. As can be derived from the border concentration of the two regions (50 wt% and 68 wt.%, respectively). While the glassy state in the low-3HB region contains 7 water molecules per one molecule of 3HB, in the high-3HB region this drops to about 3 water molecules per one 3HB molecule. This again confirms the extraordinary hydrophilicity of 3HB, for instance, glassy trehalose is known to contain about one water molecule per glucose ring (i.e. two per one molecule) [40].

In contrast, the region of medium concentrations (50 – 68 wt.% 3HB) differs from the neighboring ones in that the glass temperature increases with 3HB content while the heat capacity change remains constant. This indicates that these samples are fully converted into a glassy state. This was confirmed also by that no ice melting was detected in this concentration region. All the water in the sample is restricted in its motion by locking up in the amorphous 3HB matrix. The disordered state of the 3HB-water system is prevented from any ordering by too high energetic barriers of molecular motion which is hence slowed down below the timescale of the experiment. The range of glass transition temperatures of 3HB-water mixtures in this region is still significantly lower as compared to trehalose (about -25°C for 50 wt% of trehalose, [42]), nevertheless, trehalose is well known for its extraordinary ability to increase the glass point in the water. From this viewpoint, 3HB is superior to carbohydrate-based compatible solutes such as sucrose or fructose, which in their aqueous mixtures show glass transition temperatures close to -50 °C [43].

The results for DSC analysis were again used to construct phase diagram of the 3HB-water binary systems, in this case out of the equilibrium conditions. The diagram is shown in Fig. 6. Similarly to the equilibrium phase diagram, the cryoprotective effect of 3HB can be seen in several features of the diagram. Water freezing is reduced partially (below 3HB content of 40-50 wt.%) or completely (above this 3HB content). Furthermore, in the region where the water freezes a significant freezing temperature depression is found again.

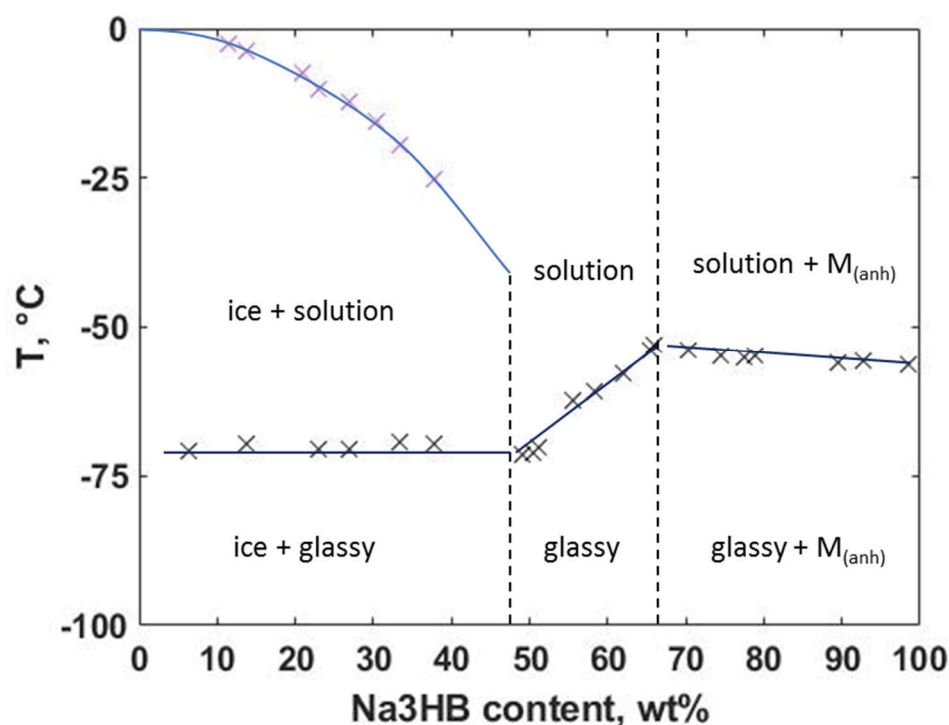


Figure 6. Phase diagram in non-equilibrium of Na3HB-water complex using DSC data from second scans represented by stars (x). All lines are drawn as a guide for eye to follow the respective phase boundaries.

From the non-equilibrium phase diagram shown in Figure 6, it is hardly possible to determine more precisely the limiting composition of 3HB-water mixtures at which the water in the sample stops freezing. For that purpose, the total enthalpies, determined from the corresponding ice melting endotherms (shown in Figure S3b), were plotted against the water content in the sample (Figure 7). From the linear regression and extrapolation to zero enthalpy, the amount of nonfrozen water was determined to be approximately 1.35 g water per g of Na3HB (or 0.57 g water per g of sample). Once again, this illustrates the outstanding position of 3HB among the recognized compatible solutes. For instance, published values of non-freezing water for sugars range from 0.21 g water per g of fructose, through 0.26 g water per g sucrose, to 0.31 g water per g trehalose [44].

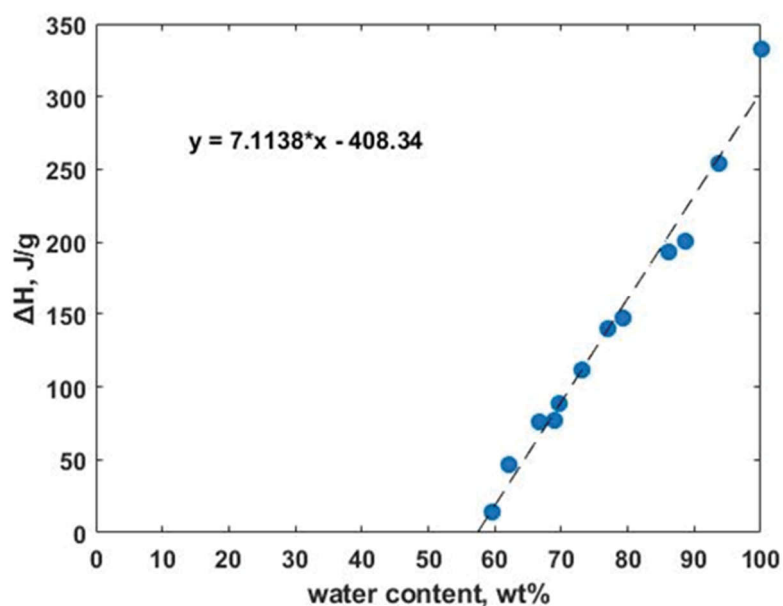


Figure 7. Amount of nonfreezing water per gram of Na3HB obtained by DSC data as a function of water content on enthalpy of melting of water.

2.3. Biological implications

Generally, 3HB is a very important biomolecule that can be found in numerous biological systems fulfilling various functions. 3HB is an intermediate precursor of various metabolite pathways such as the metabolism of leucine in humans. More importantly, in humans and other higher organisms, 3HB is synthesized in the liver, circulates in the blood, and along with glucose and other ketone bodies it serves as an energy fuel for cells. The concentration of 3HB in the blood of adults varies between 5–335 $\mu\text{mol/l}$ notably higher concentrations (1–2 mmol/l) occur in individuals experiencing ketosis [45]. A substantially higher concentration of 3HB can be found in prokaryotes capable of PHB accumulation. Since the PHB metabolism constitutes of simultaneous synthesis and hydrolysis of PHB granules by the action of PHB granules associated enzymes PHB synthase and PHB depolymerase, the intracellular concentration of 3HB reaches about 100 mmol/l [16, 17], which is about 16.5 fold higher than 3HB concentration in PHB non-accumulating mutant bacterial strain [17]. Therefore, based on its relatively high intracellular concentration 3HB represent a very important low-molecular solute which can be, in terms of concentration, compared to compatible solutes such as glycerol, trehalose or ectoines which are under stress conditions accumulated in similar amounts. Therefore, even 3HB is sometimes classified among compatible solutes [46].

Similarly to other compatible solutes, also 3HB reveals a general protective function, it is capable of shielding biomolecules from denaturation induced by high temperature or oxidation [17]. Based on our results, 3HB is very efficient to hydrate by water, which supposes an important role for stabilization of structure of biomolecules or provides the desired environment for chemical and enzymatic reactions. Moreover, it was also observed that Na3HB acts as a potent cryoprotectant that was capable of protecting various biological systems when exposed to repeated freezing and thawing. When Na3HB was applied at the concentration of 100 mmol/l it protected the model enzyme from losing activity during 7 subsequent freezing/thawing cycles, its protective effect was even slightly higher than that observed in trehalose. Similarly, when Na3HB was added to a final concentration of 100 mmol/l to the suspension of yeast *Saccharomyces cerevisiae*, it also protected the cells against repeated freezing and thawing even more efficiently than trehalose, ectoine,

or glycerol – well-known cryoprotectants [18]. Also, the results obtained in this study confirmed the high cryoprotective potential of Na3HB, where the already position of the eutectic point which corresponds to the lowest possible melting temperature shows the high potential of Na3HB. Even ice melting temperatures indicate a presumable cryoprotective effect of low concentrations of Na3HB in comparison with conventional cryoprotectants such as sucrose [28] and trehalose [32, 43]. Nevertheless, the unique and unexpected results of glass transitions of Na3HB-water system and then the determined amount of non-frozen water prove that Na3HB corresponds to a strong cryoprotective function.

The fact that Na3HB represents a very potent cryoprotectant is not only of fundamental interest with respect to its biological importance especially in PHB accumulating prokaryotes but it might have also numerous applications. For instance, trehalose or glycerol are frequently used as protectants for cryopreservation of various biological samples e.g. viable microbial or cellular cultures, proteins, nucleic acids, antibodies and other biologically active substances [47]. Our results suggest that Na3HB could be advantageously used in the same manner. Moreover, since numerous cryoprotectants are also used to maintain the activity of various biological samples during and after freeze-drying, it would be also interesting to test the protective potential of Na3HB with this respect. Considering all the fundamental physicochemical properties of Na3HB determined in this work, it seems that Na3HB possesses all the prerequisites to be used also as lyoprotectant in freeze-drying. Further, various cryoprotectants are widely used in food preservation to protect food from undesirable changes in texture, taste and overall acceptability upon freezing, frozen storage and subsequent thawing [48, 49]. Considering all the qualities of Na3HB described in this work and also the facts that Na3HB is a safe substance naturally present in the human body in high concentrations and that it is sensorically neutral substance (e.g. not influencing natural flavor and taste of foods), it could be used as a food additive to improve the quality and stability of frozen foodstuffs. Last but not least, Na3HB can be relatively simply produced biotechnologically or by chemical or enzymatical hydrolysis of PHB [50, 51]; therefore, it could be easily available and relatively cheap substance able to compete with well-established cryopreservatives.

5. Conclusions

<not mandatory>

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, **Figure S1:** DSC thermograms of mixtures of Na3HB and water in different proportions: (a) example of evaluation of ice melting, Na3HB concentration 30.3 wt%; (b) endotherms at -27.5 °C corresponding eutectic points and second endotherms corresponding of ice melting, low Na3HB concentrations from 11.3 to 40.5 wt%; (c) endotherms, melting of dihydrates and melting of crystalline Na3HB, high Na3HB concentrations from 72.4 to 81.6 wt%; (d) magnified endotherms of crystalline Na3HB highlighted by red arrow. Scanning rates were 10 °C·min⁻¹. **Figure S2:** DSC thermograms measured by different scan rates for extrapolations to zero scan rate. **Figure S3:** DSC thermograms of Na3HB and water in different proportions: (a) example of glass transition, Na3HB concentration 67.0 wt%; (b) observed scans with glass transitions and melting of ice, Na3HB concentrations from 6.3 to 37.9 wt%; (c) glass transitions with low concentrations of Na3HB; (d) glass transitions, Na3HB concentrations from 48 to 68 wt%; (e) glass transitions, Na3HB concentrations from 68 to 98 wt%. Scanning rates were 10 °C min⁻¹.

Abbreviations

CPA	Cryoprotectants
PHB	Poly(3-hydroxybutyrate)
3HB	3-hydroxybutyrate
Na3HB	Sodium 3-hydroxybutyrate
DSC	Differential calorimetry scanning
DVS	Vapor sorption analysis

References

1. Da Costa, M.S.; Santos, H.; Galinski E.A. An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. In *Biotechnology of extremophiles*; Scheper, T., Antranikian (eds); Publisher: Springer, Berlin, Heidelberg, 1998; Volume 61, pp. 117-153.
2. Fuller, B.J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *CryoLetters* **2004**, Volume 25, 375-388.
3. Cleland, D.; Krader, P.; McCree, C.; Tang, J.; Emerson, D. Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes. *J. Microbiol. Methods* **2004**, Volume 58, 31-38.
4. Muldrew, K.; Acker, J.P.; Elliott, J.A.W.; McGann, L.E. The water to ice transition: Implications for living cells. In *Life in the frozen state*; 1st ed.; Fuller, B.J., Lane, N., Benson, E.E., Boca Raton, 2004, pp. 67-108.
5. Hubalek, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* **2003** Volume 46, 205-229.
6. Göller, K., Galinski, E.A. Protection of a model enzyme (lactate dehydrogenase) against heat, urea and freeze-thaw treatment by compatible solute additives." *J. Mol. Catal. B Enzym.* **1999**, Volume 7, 37-45.
7. Andersson, M. M.; Breccia, J.D; Hatti-Kaul, R. Stabilizing effect of chemical additives against oxidation of lactate dehydrogenase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2000**, Volume 32, 145-153.
8. Van-Thuoc, D.; Hashim, S. O.; Hatti-Kaul, R.; Mamo, G. Ectoine-mediated protection of enzyme from the effect of pH and temperature stress: a study using *Bacillus halodurans* xylanase as a model. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **2013**, Volume 97, 6271-6278.
9. Da Costa, M.S.; Santos, H.; Galinski E.A. An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. In *Biotechnology of extremophiles*; Scheper, T., Antranikian (eds); Publisher: Springer, Berlin, Heidelberg, 1998; Volume 61, 117-153.
10. Jain, N. K.; Roy, I. Effect of trehalose on protein structure. *Protein Sci.* **2009**, Volume 18, 24-36.
11. Obruca, S., Sedlacek, P., Slaninova, E., Fritz, I., Daffert, C., Meixner, K., Sedrlova, Z., Koller, M. Novel unexpected functions of PHA granules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, Volume 104, 4795-4810.
12. Wu, D.; He, J.; Gong, Y.; Chen, D.; Zhu, X.; Qiu, N.; Sun, M.; Li, M.; Ziniu, Y. Proteomic analysis reveals the strategies of *Bacillus thuringiensis* YBT – for survival under long term heat stress. *Proteomics* **2011**, Volume 11, 2580-2591.
13. Sedlacek, P.; Slaninova, E.; Koller, M.; Nebesarova, J.; Marova, I.; Krzyzanek, V.; Obruca, S. PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances. *New Biotechnol.* **2019** Volume 49, 129-136.
14. Slaninova, E.; Sedlacek, P.; Mravec, F.; Mullerova, L.; Samek, O.; Koller, M.; Hesko, O.; Kucera, D.; Marova, I.; Obruca, S. Light Scattering on PHA granules protects bacterial cells against the harmful effects of UV radiation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018** Volume 102, 1923-1931.
15. Kadouri, D.; Jurkevitch, E.; Okon, Y.; Castro-Sowinski, S. Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Crit. Rev. Microbiol.* **2005** Volume 31, 55-67.
16. Soto, G.; Setten, L.; Lisi, C.; Maurelis, C.; Mozzincafreddo, M.; Cuccioloni, M.; Angeletti, M.; Ayub, N.D. Hydroxybutyrate prevents protein aggregation in the halotolerant bacterium *Pseudomonas* sp. CT13 under abiotic stress. *Extremophiles* **2012** Volume 16, 455-462.
17. Obruca, S.; Sedlacek, P.; Mravec, F.; Samek, O.; Marova, I. Evaluation of 3-hydroxybutyrate as an enzyme-protective agent against heating and oxidative damage and its potential role in stress response of poly (3-hydroxybutyrate) accumulating cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, Volume 100, 1365-1376.
18. Obruca, S.; Sedlacek, P.; Krzyzanek, V.; Mravec, F.; Hrubanova, K.; Samek, O.; Kucera, D.; Benesova, P.; Marova, I. Accumulation of poly (3-hydroxybutyrate) helps bacterial cells to survive freezing. *PloS one* **2016**, Volume 11, e0157778.
19. Cielski, S.; Gorniak, D.; Mozejko, J.; Swiatecky, A.; Grzesiak, J.; Zdanowski, M. The diversity of bacteria isolated from Antarctic freshwater reservoirs possessing the ability to produce polyhydroxyalkanoates. *Curr. Microbiol.* **2014**, Volume 69, 594-603.
20. Goh, Y.S.; Tan, I.L.P. Polyhydroxyalkanoate production by Antarctic soil bacteria isolated from Casey Station and Signy Island. *Microbiol. Res.* **2012**, Volume 167, 211-219.
21. Pämänen, K.; Karkman, A.; Virta, M.; Eronen-Rasimus, E.; Kaartokallio, H. Discovery of bacterial polyhydroxyalkanoate synthase (PhaC) encoding genes from seasonal Baltic Sea ice and cold estuarine waters. *Extremophiles* **2015**, Volume 19, 197-206.
22. Kumar, V.; Thakur, V.A.; Kumar, S.; Singh, D. Bioplastic reservoir of diverse bacterial communities revealed along altitude gradient of Pangi-Chamba trans-Himalayan region. *FEMS Microbiol. Lett.* **2018**, Volume 365.
23. Rogala, M.M.; Gawor, J.; Gromadka, R.; Kowalczyk, M.; Grzesiak, J. Biodiversity and habitats of polar region polyhydroxyalkanoic acid producing bacteria: Bioprotection by popular screening methods. *Genes* **2020**, Volume 11.
24. Timasheff, S. N. Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, Volume 99, 9721-9726.
25. Wiggins, P. M. Role of water in some biological processes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1990**, Volume 54, 432-449.
26. Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* **2002**, Volume 7, 405-410.

27. Carlstedt, J.; Wojtasz, J.; Fyhr, P.; Kocherbitov, V. Hydration and the phase diagram of acid hydrolyzed potato starch. *Carbohydrate Polym.* **2014**, Volume 112, 569-577.
28. Roe, K. D.; Labuza, T. P. Glass transition and crystallization of amorphous trehalose-sucrose mixtures. *Int. J. Food Prop.* **2005**, Volume 8, 559-574.
29. Lammert, A. M.; Schmidt, S. J.; Day, G. A. Water activity and solubility of trehalose. *Food Chem.* **1998**, Volume 61, 139-144.
30. Galmarini, M. V.; Chirife, J.; Zamora, M. C.; Pérez, A. Determination and correlation of the water activity of unsaturated, supersaturated and saturated trehalose solutions. *LWT-Food Sci. Technol.* **2008**, Volume 41, 628-631.
31. Roberts, C. J.; Franks, F. Crystalline and amorphous phases in the binary system water- β , β -trehalose. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1996**, Volume 92, 1337-1343.
32. Chen, T.; Fowler, A.; Toner, M. Literature review: supplemented phase diagram of the trehalose-water binary mixture. *Cryobiol.* **2000**, Volume 40, 277-282.
33. Mathlouthi, M., & Reiser, P. (Eds.). (1995). *Sucrose: properties and applications*. Springer Science & Business Media.
34. Nakagawa, H., & Oyama, T. (2019). Molecular Basis of Water Activity in Glycerol-Water Mixtures. *Frontiers in chemistry*, 7, 731.
35. Green, J.L.; Angel, C.A. Phase relation and vitrification of saccharide-water solution and the trehalose anomaly. *J Phy Chem.* **1989**, Volume 93, 2880-2882.
36. Miller, D.P.; de Pablo J.J., Corti, H. Thermophysical properties of trehalose and its concentrated aqueous solutions. *Pharm Res.* **1997**, Volume 14, 578-590.
37. Nicolajsen, H.; Hvidt, A. Phase behaviour of the system trehalose-NaCl-water. *Cryobiol.* **1994**, Volume 31, 199-205.
38. Young, F. E.; Jones, F. T. Sucrose Hydrates. The Sucrose-Water Phase Diagram. *J. Phys. Chem.* **1949**, Volume 53, 1334-1350.
39. Lane, L. B. Freezing Points of Glycerol and Its Aqueous Solutions. *Ind. Eng. Chem.* **1925**, Volume 17, 924-924.
40. Green, J. L.; Angell, C. A. Phase relations and vitrification in saccharide-water solutions and the trehalose anomaly. *J. Phys. Chem.* **1989**, Volume 93, 2880-2882.
41. Elbein, A. D.; Pan, Y. T.; Pastuszak, I.; Carroll, D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiol.* **2003**, Volume 13, 17R-27R.
42. Olgenblum, G. I.; Sapir, L.; Harries, D. (2020). Properties of aqueous trehalose mixtures: Glass transition and hydrogen bonding. *J. Chem. Theory Comput.* **2020**, Volume 16, 1249-1262.
43. Goff, H. D.; Sahagian, M. E. Glass transitions in aqueous carbohydrate solutions and their relevance to frozen food stability. *Thermochimica Acta* **1996**, Volume 280, 449-464.
44. Xu, M.; Chen, G.; Zhang, C.; Zhang, S. Study on the Unfrozen Water Quantity of Maximally Freeze-Concentrated Solutions for Multicomponent Lyoprotectants. *J. Pharm. Sci.* **2017**, Volume 106, 83-91.
45. McNeil, C.A.; Pramfalk, C.; Humphreys, S.M.; Hodson, L. The storage stability and concentration of acetoacetate differs between blood fractions. *Clin. Chim. Acta* **2014**, Volume 433, 278-283.
46. Roberts, M.F. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Syst.* **2005**, Volume 1.
47. Hubálek, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiol.* **2003**, Volume 46, 205-229.
48. MacDonald G.A., Lanier T.C. (1997) Cryoprotectants for Improving Frozen-Food Quality. In: Erickson M.C., Hung YC. (eds) *Quality in Frozen Food*. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5975-7_11
49. Maity, T.; Saxena, A.; Raju, P.S. Use of hydrocolloids as cryoprotectant for frozen foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2018**, Volume 58, 420-435.
50. Tokiwa, Y., Ugwu, C.U. Biotechnological production of (R)-3-hydroxybutyric acid monomer. *J. Biotechnol.* **2007**, Volume 132, 264-272.
51. Uefuji, M.; Kasuya, K.-I.; Doi, Y. Enzymatic degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate]: Secretion and properties of PHB depolymerase from *Pseudomonas stutzeri*. *Polym. Degr. Stab.* **1997**, Volume 58, 275-281.

6.6 Příloha VI

OBRUČA, S.; SEDLÁČEK, P.; **SLANINOVÁ, E.**; FRITZ, I.; DAFFERT, C.; MEIXNER, K.; ŠEDRLOVÁ, Z.; KOLLER, M. Novel unexpected functions of PHA granules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, roč. 104, č. 11, s. 4795-4810. ISSN: 0175-7598.



Novel unexpected functions of PHA granules

Stanislav Obruca¹ · Petr Sedlacek¹ · Eva Slaninova¹ · Ines Fritz² · Christina Daffert² · Katharina Meixner² · Zuzana Sedrlova¹ · Martin Koller^{3,4}

Received: 6 February 2020 / Revised: 10 March 2020 / Accepted: 20 March 2020 / Published online: 17 April 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

Polyhydroxyalkanoates (PHA), polyesters accumulated by numerous prokaryotes in the form of intracellular granules, have been for decades considered being predominantly storage molecules. However, numerous recent discoveries revealed and emphasized their complex biological role for microbial cells. Most of all, it was repeatedly reported and confirmed that the presence of PHA granules in prokaryotic cells enhances stress resistance and robustness of microbes against various environmental stress factors such as high or low temperature, freezing, oxidative, and osmotic pressure. It seems that protective mechanisms of PHA granules are associated with their extraordinary architecture and biophysical properties as well as with the complex and deeply interconnected nature of PHA metabolism. Therefore, this review aims at describing novel and unexpected properties of PHA granules with respect to their contribution to stress tolerance of various prokaryotes including common mesophilic heterotrophic bacteria, but also extremophiles or photo-autotrophic cyanobacteria.

Key points

- PHA granules present in bacterial cells reveal unique properties and functions.
- PHA enhances stress robustness of bacterial cells.

Keywords Bacteria · Polyhydroxyalkanoates · PHA granules · Stress robustness · *Cupriavidus necator* · Extremophiles · Cyanobacteria

Introduction

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are microbial polyesters accumulated by numerous prokaryotes in the form of intracellular granules. For decades, PHA were considered being predominantly storage materials which are accumulated in excess of

external carbon source and degraded to fuel metabolism of bacterial cells when external carbon source is exhausted (Sudesh et al. 2000a). Nevertheless, in course of time, numerous evidences suggesting more complex biological role of PHA appeared. It was observed that PHA are involved in maintenance of anoxic photosynthesis and sulfur cycle in microbial mats dependent on photosynthetic carbon fixation (Rothermic et al. 2000; Urmeneta et al. 1995), triggering sporulation in Bacilli (Slepecky and Law 1961), supporting the prolongation of nitrogen fixation by diazotrophs in the dark (Bergersen et al. 1991), or maintaining energy production and NADH oxidation to NAD⁺ by nitrogen fixing bacteria (Encarnación et al. 2002). Further, experiments with promoting bacteria plant growth, which can be employed as agricultural inoculants such as *Azospirillum brasilense*, substantiated the importance of PHA for stress robustness of bacteria. The first work systematically studying the influence of PHA content in bacterial cells with respect to survival rate under stress conditions was published in 1985 by Tal and Okon; these authors observed that PHA-rich cells of *Azospirillum*

Stanislav Obruca and Petr Sedlacek contributed equally.

✉ Stanislav Obruca
Stana.O@seznam.cz

¹ Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkynova 118, 612 00 Brno, Czech Republic

² University for Natural Resources and Life Sciences, IFA-Tulln, Konrad Lorenz Str. 20, 3430 Tulln, Austria

³ Institute of Chemistry, NAWI Graz, University of Graz, Heinrichstrasse 28/VI, 8010 Graz, Austria

⁴ ARENA Arbeitsgemeinschaft für Ressourcenschonende & Nachhaltige Technologien, Inffeldgasse 21b, 8010 Graz, Austria

brasilense were much less prone to the harmful effects of UV radiation, desiccation, and osmotic challenge than PHA-poor cells (Tal and Okon 1985). These preliminary observations were lately confirmed by numerous studies resorting to deletion mutants of *Azospirillum brasilense* in which the *phaC* gene was deleted, thus resulting in hampered PHA biosynthesis (Kadouri et al. 2002; Kadouri et al. 2003a), or by deletion of the *phaZ* gene, which disabled the bacterium to utilize stored PHA (Kadouri et al. 2003b). In all these cases, deletion mutants revealed substantially higher sensitivity to various stress conditions than wild-type strain. Very similar phenomena were also observed in other bacteria such as *Aeromonas hydrophila* (Zhao et al. 2007), *Pseudomonas oleovorans* (Ruiz et al. 2001), *Pseudomonas extremaustralis* (Tribelli et al. 2019), *Pseudomonas aeruginosa* (Pham 2004), or *Escherichia coli* (Wang et al. 2009). This confirms the fact that PHA are very complex metabolites and, apart from their primary storage function, they provide bacterial cells also with very important “secondary benefits” such as enhancement of robustness and survival rate when exposed to various environmentally relevant stress conditions. Table 1 summarizes microorganisms and stress factors in which protective function of PHA was described. Protective function of PHA granules is most likely the consequence of both PHA metabolism and its interconnection with other metabolic routes; however, it seems that unique biophysical properties of PHA intracellular granules are equally important. This review summarizes the recent understanding of protective mechanisms of PHA granules.

PHA metabolism and its impact on stress robustness of bacteria

In principle, there are three main metabolic pathways of PHA biosynthesis. So-called short chain length PHA (*scl*-PHA), comprising 4–5 carbon atoms per monomer subunit, such as poly(3-hydroxybutyrate) (P(3HB)), the homopolymer of 3-hydroxybutyrate (3HB), are synthesized via a metabolic pathway consisting of three enzymatically catalyzed reactions. At first, two acetyl-CoA molecules are condensed by the action of 3-ketothiolase (PhaA) resulting in formation of acetoacetyl-CoA, which is subsequently stereospecifically reduced by acetoacetyl-CoA reductase (PhaB) to *R*-3-hydroxybutyryl-CoA; this step regenerates the oxidized form of redox equivalents and therefore is often referred to as “pseudo fermentation.” Finally, PHA synthase (PhaC) catalyzes incorporation of *R*-3-hydroxybutyryl-CoA into the long linear polyester chain of P(3HB) (Kessler and Witholt 2001). When PHA consisting of medium-chain-length monomers (*mcl*-PHA; 6–14 carbon atoms per monomer units) are synthesized, desired substrates for particular PHA synthase, namely diverse *R*-3-hydroxyacyl-CoA molecules, can be obtained either from β -

oxidation of fatty acids or from de novo fatty acids synthesis (Kim et al. 2007).

Mobilization of PHA granules is catabolized by a cocktail of intracellular PHA depolymerases (PhaZ), which are able to hydrolyze amorphous native PHA granules yielding PHA monomers as final products (Jendrossek 2007). The battery of PHA depolymerases and related enzymes is well described for *Cupriavidus necator*; it consists of seven PHA depolymerases (PhaZ1–PhaZ7) and two oligomer hydrolases (PhaY1 and PhaY2), which further cleavage products of PhaZ to provide PHA monomers (Peplinski et al. 2010).

It should be pointed out that biosynthesis and degradation of PHA are interconnected processes which are occurring in the cells simultaneously. Therefore, even during PHA biosynthesis favoring conditions (excess of carbon substrate, etc.), PHA depolymerases are active to a certain extent. Hence, PHA metabolism is sometimes termed “PHA cycle” in order to stress out its cyclic character (Kadouri et al. 2005). Proper function of the PHA cycle is essential for bacterial cells since it ensures balanced flow of carbon to the transient demand for metabolic intermediates to balance the storage and use of carbon and energy; moreover, the PHA cycle also influences the number and size of PHA granules in bacterial cells (Prieto et al. 2016).

Bacterial cells possessing a functional PHA cycle feature a high intracellular pool of PHA monomers. For instance, it was demonstrated that P(3HB) accumulating cells of *Cupriavidus necator* have 16.5 higher intracellular concentration of 3HB than its PHA non-accumulating mutants (Obruca et al. 2016a). It should be noted that it was repeatedly demonstrated that 3HB constitutes a very potent chemical chaperone, which is capable of protecting biomolecules from denaturation under stress conditions. Soto et al. (2012) observed that 3HB was used as compatible solute by the halotolerant bacterium *Pseudomonas* sp. CT13 to cope with high salinity of cultivation media. Moreover, 3HB accumulation was also associated with the prevention of protein aggregation under combined salt, and thermal stresses in vivo and in vitro studies demonstrated that physiologically relevant concentrations of 3HB protected citrate synthase as a model enzyme from denaturation by high temperature. Moreover, Obruca et al. (2016a) studied the protective function of 3HB against heat and oxidative degradation of lysozyme and lipase as model enzymes and observed that chaperoning efficiency of 3HB is more than comparable to that of well-known chemical chaperones such as trehalose or hydroxyectoine. These observations might explain why bacterial strain capable of PHA synthesis but unable of PHA degradation to monomers revealed higher sensitivity to numerous stress factors (Kadouri et al. 2003b; Ruiz et al. 2001; Wang et al. 2009) which again underlies the importance of a functional PHA cycle for stress robustness of bacteria.

Table 1 Summary of stressors and microorganisms in which protective function of PHA was described

Stressor	Microorganism	Reference
Low temperature and freezing	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Zhao et al. 2007
	<i>Pseudomonas extremaustralis</i>	Tribelli and López 2011
	<i>Sphingopyxis chilensis</i>	Pavez et al. 2009
	<i>Cupriavidus necator</i>	Obruca et al. 2016b Nowroth et al. 2016
Heat shock	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Zhao et al. 2007
	<i>Azospirillum brasilense</i>	Kadouri et al. 2003a Kadouri et al. 2003b
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Wu et al. 2011
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pham 2004
	<i>Escherichia coli</i>	Wang et al. 2009
Osmotic shock	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Zhao et al. 2007
	<i>Azospirillum brasilense</i>	Kadouri et al. 2003a Kadouri et al. 2003b
	<i>Escherichia coli</i>	Wang et al. 2009
	<i>Cupriavidus necator</i>	Obruca et al. 2017
		Sedlacek et al. 2019b
	<i>Halomonas halophila</i>	Sedlacek et al. 2019b
	<i>Rhizobium</i> spp.	Breedveld et al. 1993
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Zhao et al. 2007
	<i>Azospirillum brasilense</i>	Kadouri et al. 2003a Kadouri et al. 2003b
	<i>Pseudomonas extremaustralis</i>	Ayub et al. 2009
Oxidative pressure	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Batista et al. 2018
	<i>Delftia acidovorans</i>	Goh et al. 2014
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Zhao et al. 2007
	<i>Azospirillum brasilense</i>	Kadouri et al. 2003a Kadouri et al. 2003b
		Tal and Okon 1985
	<i>Cupriavidus necator</i>	Slaninova et al. 2018
	<i>Escherichia coli</i>	Wang et al. 2009
	<i>Pseudomonas extremaustralis</i>	Tribelli et al. 2019
	<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	Chien et al. 2014
	<i>Azospirillum brasilense</i>	Kamnev et al. 2005
UV protection		
Heavy metals		

In addition, Ruiz et al. (2001) demonstrated that intensive degradation of stored PHA is associated not only with expected increase in intracellular levels of ATP, but it also enhances intracellular concentration of guanosine tetraphosphate (ppGpp) in *Pseudomonas oleovorans*. It is known that ppGpp serves as cell alarmone causing upregulation of many genes involved in stress response, including *rpoS* gene encoding for alternative sigma factor of RNA polymerase. RPOs proteins further control the expression of numerous genes involved in stress response of bacteria. This might be

additional very important factors supporting stress robustness of bacteria possessing functional PHA cycle.

Furthermore, Koskimäki et al. 2016 investigated PHA metabolism of the pine endophyte *Methylobacterium extorquens* and observed that the strain is during mobilization of PHA capable of producing methyl-esterified dimers and trimers of 3HB which revealed very strong antioxidant properties. Authors compared their antioxidant capacity to well-known cellular antioxidants and reported that they reveal 3-fold higher hydroxyl radical-scavenging activity than glutathione

and 11-fold greater activity than ascorbic acid (vitamin C). The authors suggested that the PHA reserves are mobilized for the synthesis of methyl-esterified 3HB oligomers in bacterial cells to eliminate hydroxyl radical stress introduced by infected plants.

The fact that PHA can be hydrolyzed under stress conditions to serve as substrate for synthesis of metabolites providing desirable shielding effect was also demonstrated by Breedveld et al. (1993), who observed that exposition of *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium meliloti* to hypertonic pressure resulted in hydrolysis of PHA storage which fueled biosynthesis of trehalose as a compatible solute compensating increase in osmotic pressure.

Hence, numerous protective mechanisms and functions of PHA are related to their unique metabolism called PHA cycle. Table 2 summarizes studies in which direct protective function of PHA monomers or oligomers was suggested; the most important features of PHA metabolism and its impacts on stress resistance and robustness of bacteria are demonstrated in Fig. 1.

Structure of PHA granules and granule-associated proteins

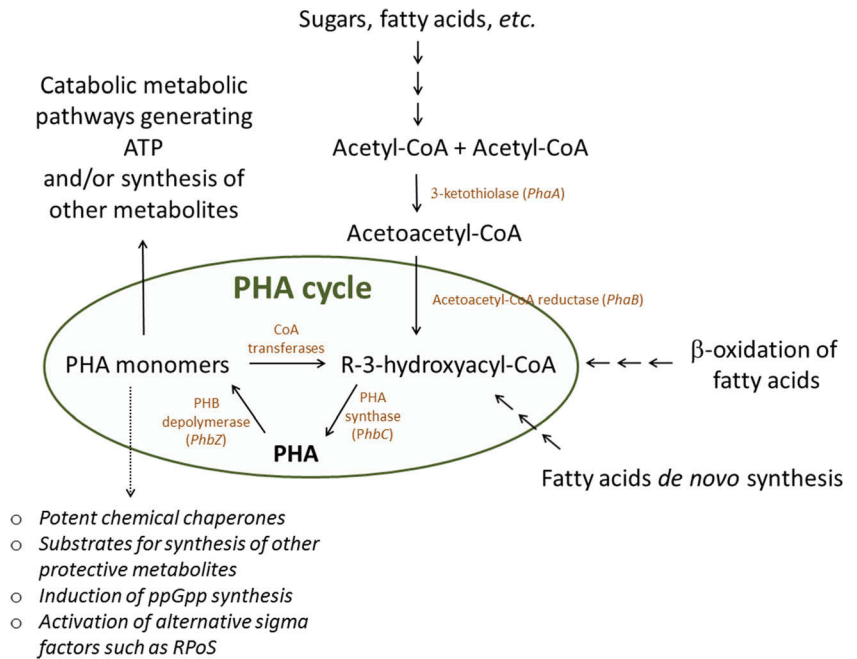
In addition to their metabolism, numerous protective functions of PHA can be attributed to the structural and biophysical features related to a specific way how the PHA chains are stored inside the cell. Bioaccumulated PHA chains are stored in the form of granules, often designated as carbonosomes (Jendrossek 2009). The size and properties of PHA granules are already described in detail. Intracellular PHA granules are typically 0.2–0.5 µm in diameter (Sudesh et al. 2000a). These PHA inclusions consist of hydrophobic polyester core surrounded by an amphiphilic layer that provides solubilization of the water-insoluble polymer in the aqueous cytoplasmic environment. Although it had been originally accepted that phospholipids form the main structural and solubilizing component of this layer (Pötter and Steinbüchel 2006), it was later revealed that the lipids detected in the isolated granules in fact represent an artifact of the isolation procedure; actually,

the granules are covered by so-called PHA granule-associated proteins (PGAPs), which include PHA synthase (PhaC), PHA depolymerase (PhaZ), surface proteins so-called phasins (PhaP), and regulatory proteins (PhaR) (De Koning and Lemstra 1992) (see Fig. 2).

Localization of PHA granules in the cell's interior is closely connected with mechanisms of PHA granules formation. Up to now, four model mechanisms of the granule formation were proposed: (i) the micelle model, (ii) the budding model, (iii) the scaffold model, and (iv) the cell pole model (Jendrossek and Pfeiffer 2014; Rehm and Steinbüchel 1999). Originally, the micelle model had assumed that localization of PHA synthesis in the cell is conditioned only by a sufficiently high concentration of the substrate (3-hydroxybutyryl-CoA) and that the nascent water-insoluble chains of PHA consequently form micelle-like aggregates localized more or less randomly throughout the cell. Nevertheless, follow-up studies revealed that PHA granules are often localized in close vicinity of cytoplasmic membrane, which gave the rise of budding theory (Stubbe and Tian 2003) according to which PHA synthases, attached to the cytoplasmic membrane, liberate the growing PHA chains into the bilayer of the membrane forming an integral PHA blob which is subsequently detached from the membrane after it reaches a specific size. However, the budding model was later challenged by the results of a study performed by Jendrossek et al. (2007), which revealed that formation of intracellular PHA granules at the early stages of their synthesis in *Caryophanon latum* was localized close to membrane but without any attachment to it. Furthermore, numerous studies have confirmed that the PHA granule formation can be initiated at positions distant from cytoplasmic membrane. Consequently, the scaffold model proposed utilization of mediation elements at the center of the cells as nucleation sites for granules initiation, which was observed by transmission electron microscopy (TEM) in *Cupriavidus necator* H16 (Tian et al. 2005). This mechanism was further supported by studies on *Comamonas* sp. EB172 (Mumtaz et al. 2011). Additionally, the cell pole model describes an initiation of formation of PHA granules at the cell poles.

Table 2 Summary of direct protective function of PHA monomers and oligomers

Microorganism	PHA-related metabolite	Protective function	Reference
<i>Pseudomonas</i> sp. CT13	3HB monomer	3HB serves as compatible solute and prevent protein aggregation under stress conditions.	Soto et al. 2012
<i>Cupriavidus necator</i>	3HB monomer	3HB reveals chaperoning activity and protects enzyme from denaturation by heating and oxidation	Obruca et al. 2016a
<i>Cupriavidus necator</i>	3HB monomer	3HB is very potent cryo-protectant	Obruca et al. 2016b
<i>Photobacterium profundum</i>	3HB monomer and oligomers	Monomer and oligomers serve as osmolyte protecting cells from hydrodynamic pressure	Martin et al. 2002
<i>Methylobacterium extorquens</i>	Methyl-esters of 3HB and 3HB oligomers	Protection against oxidative pressure caused by hydroxyl radicals	Koskimäki et al. 2016

Fig. 1 PHA metabolism and PHA cycle

This mechanism is supported by several fluorescence microscopy studies on various microorganism such as *Rhodospirillum rubrum*, *Cupriavidus necator* H16, *Escherichia coli* (Jendrossek 2005), or by structural assays of *Dinoroseobacter* sp. JL 1447 obtained by TEM and AFM microscopy (Xiao et al. 2015).

As already emphasized, the surface layer of PHA granules is formed by granule-associated proteins. Among these, stereo-selective PHA synthases (PhaC) play the key role in PHA anabolism. Based on their structure, number of subunits, and substrate specificity, PHA synthases are classified into 4 types (Rehm 2003). Similarly, also intracellular PHA depolymerases (PhaZ), essential for PHA mobilization, form the integral part of the proteinaceous surface layer of the granules (Stuart et al. 1996) as well as the group of low-molecular-weight proteins with no catalytic activity generally called phasins (PhaP) (Sudesh et al. 2000a; Wieczorek et al. 1995; Zhao et al. 2016). Although phasins are not directly involved in PHA formation, it was experimentally confirmed that these proteins are expressed in the cells under PHA-accumulating conditions (York et al. 2001a) and that they play a fundamental role in PHA accumulation via regulating the ratio of surface area to volume of P(3HB) granules (Wieczorek et al. 1995) and also via a conformation change of PHA synthase as a result of its specific interactions with PhaP (York et al. 2001b). The last described granule-associated protein is PhaM, which is the physiological activator of PHA production. The mechanism of PhaC activation by PhaM was described in detail for *Cupriavidus necator* H16, where it reduces the lag phase of PhaC via inducing its transition from an inactive monomeric form into the active dimeric form (Pfeiffer and Jendrossek 2014). Mezzina et al. (2017) further

revealed that phasins may serve as chaperones during exposition to organic solvents providing higher resistance for PhaP overexpressing in PHA not producing *E. coli* in comparison with the wild-type strain. Likewise, cells with overproduction of PhaP are able to grow much better at high temperature where expression of the main regulator sigma factor RpoH is reduced (Mezzina et al. 2017). Production of phasins and biosynthesis of PHA granules is also efficiently regulated by transcriptional regulators PhaR, which inhibit transcription of PhaP under PHA biosynthesis unfavorable conditions (Kessler and Witholt 2001; York et al. 2002).

Unique structure and properties of PHA in granules

As it is obvious from the previous text focused on the protein shell of the intracellular PHA inclusions, a native PHA granule represents a fascinating supramolecular assembly, well-designed to provide multiple functionalities including compatibilization of the hydrophobic polymer inside the aqueous cytoplasmic environment and its deposition in a form capable of further metabolic utilization. Furthermore, it should also be emphasized that in the core of the granule interesting and not fully elucidated structural features can be found. Primarily, it has been repeatedly reported that inside the granule the polymer occurs in a physical state far different from the thermodynamically favorable one. Isolated *scl*-PHA (such as P(3HB) as the most common representative) are highly crystalline brittle polymers and it was initially believed that this intrinsic tendency to crystallize spontaneously is retained also in vivo (Ellar et al. 1968). Nevertheless, this view was soon challenged by the pioneer structural studies involving intact cells of PHA-producing bacteria. Already in the 1960s, freeze-

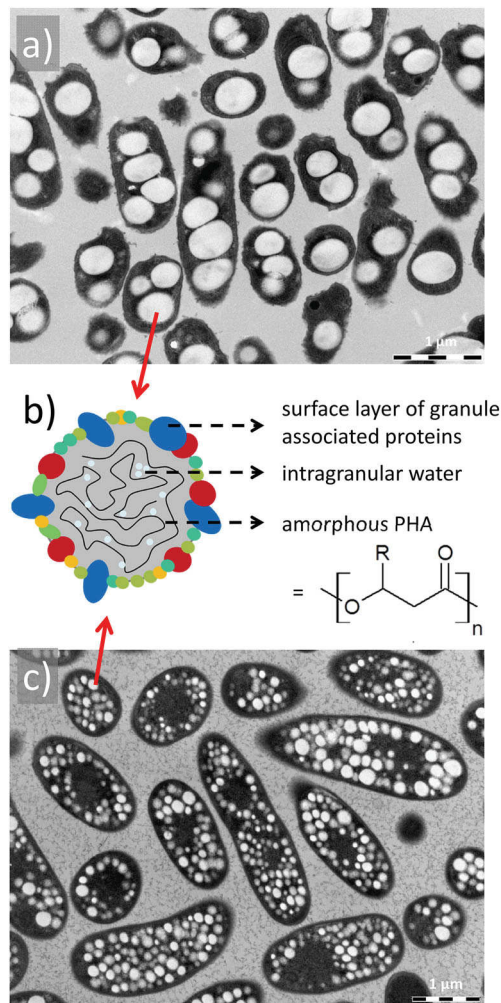


Fig. 2 Morphology of PHA granules in PHA-producing bacteria. **a** PHA granules in the cells of the mesophilic PHA producer *Cupriavidus necator* H16. **b** Schematic representation of fundamental structural features of PHA granules. **c** PHA granules in the cells of the halophilic PHA producer *Halomonas hydrothermalis*

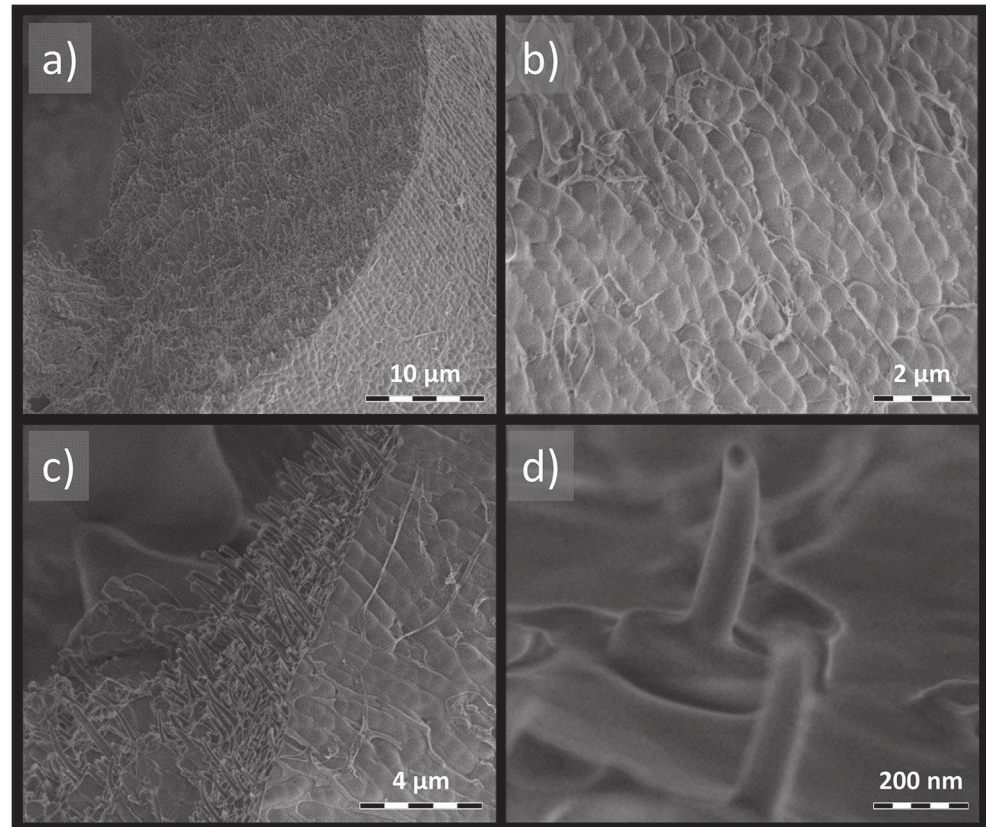
fracture cryo-scanning electron microscopy (cryo-SEM), as the newly developed technique for imaging biological specimens, was utilized to investigate an ultrastructure of PHA-accumulating bacterial cells (van Gool et al. 1969; Remsen 1966). In these works, surprising imaging artifacts related to intracellular PHA granules were first described. In spite of the fact that the sample fracturing is performed at very low temperatures (below $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$), PHA granules exhibited plastic deformation with the polymer elongation substantially higher than 100% (compare with the elongation at break of isolated P(3HB) at about 5% (Doi et al. 1995) leading to formation of characteristic needle-type deformation artifacts (for the more recent example of these deformation, see Fig. 3), which were later repeatedly confirmed by cryo-SEM imaging of a variety of PHA-containing species (Fuller et al. 1992). Nevertheless, the main concern of these cryo-SEM investigations was focused rather on the detailed description of how fracturing

conditions affect the physical features of these deformations (Sudesh et al. 2000b) than on the remarkable discrepancy of the general deformation behavior of intracellular PHA with its contemporary notion of a brittle crystalline material consisting of non-mobile polymer chains.

The idea of the crystalline state of PHA in native granules was finally disproved by the works of Sanders's research group in the late 1980s (Barnard and Sanders 1988). The authors used ^{13}C NMR to analyze intact cells of several PHA-producing bacteria and noticed a surprising resolution of the PHA signal in the spectra, which would be unattainable if the material was crystalline. The authors later conceded that their experiments were successful mainly because they ignored the conventional wisdom which was prejudging NMR to fail in analyzing cellular PHA (Bontrone et al. 1992). Instead of that, they proved that the polymer in the cell actually behaves like an elastomer with the mobility of chain segments on the timescale of 10^{-7} s (Barnard and Sanders 1989). Furthermore, the authors supported their conclusion also by X-ray diffraction analysis of PHA-producing bacteria, which demonstrated an absence of a significant amount of crystalline polymer in the cells (Amor et al. 1991).

These results immediately raised the question how the crystallization of PHA is prevented in the cell granules. The soon revealed fact that a transfer of genes related to PHA synthase enables formation of apparently fully functional PHA granules in *E. coli* (Schubert et al. 1988) or even in green plants (Poirier et al. 1992) supported the suggestion that the mechanism of the PHA plasticization in vivo must be simple and universal. Since the beginning of this debate, the potential plasticizing role of water was considered. The presence of residual water inside the PHA granules was confirmed experimentally already in the original works of Sanders' group (Barnard and Sanders 1989). Furthermore, Lauzier et al. showed that the content of water in the native granules is at about 5–10% by mass (Lauzier et al. 1992a). At that time, the plasticizing effect of water had already been described for polymers such as nylon (Smith 1976) or poly(vinyl acetate) (Bair et al. 1981). Hence, Barnard and Sanders proposed that hydrogen bonding or dipole-dipole interactions between individual water molecules or localized pockets of water and the ester groups at PHA are responsible for inhibiting chain-chain proximity necessary for the crystallization to occur (Barnard and Sanders 1989). The idea was further elaborated by Lauzier who hypothesized that hydrogen-bonded water stabilizes newly biosynthesized PHA in extended conformation incapable of crystallization in the granule interior (Lauzier et al. 1992a; Lauzier et al. 1992b). Nevertheless, to our best knowledge, no report on stabilization of PHA in amorphous form solely on the basis of its water binding has been published. Furthermore, a simple experimental study on PHA plasticization by di-n-butylphthalate demonstrated that the effect of low-molecular plasticizing agent on crystallization

Fig. 3 Cryo-SEM images of *C. necator* H16 cells suspension quickly frozen and freeze-fractured at -140°C . **a** Overall image of fractured tubular sample. Details on **b** intact cell surfaces, **c** freeze-fracture area with characteristic needle-type plastic deformation of PHA granules and on **d** single deformed PHA granule. Reprinted with permission from Sedlacek et al. (2019a)



temperature is limited and that plasticization by water or by other cellular material can partially contribute to PHA mobility in vivo, but that also other mechanisms need to come into play to explain the prevention of PHA crystallization (Ceccorulli et al. 1992).

Alternative mechanism of protection of native form of PHA against crystallization was consequently proposed by Sanders' group (Bontrone et al. 1992) and also by de Koning and Lemstra (1992). In this case, the mobility of PHA in vivo is explained solely on the basis of crystallization kinetics. According to this explanation, crystallization of native PHA, biosynthesized in the amorphous form, is restricted by the low (sub-micron) volume of the polymer granule where the frequency of nucleation as the rate determining step of the crystallization process is extremely low. Horowitz et al. showed that for the polymer crystallizing at the timescale of few minutes in the bulk melt, the crystallization half-life in the $0.25\text{ }\mu\text{m}$ granule will increase to more than 1000 years in the absence of heterogeneous nucleation (Horowitz et al. 1993). This straightforward physicochemical explanation was further experimentally supported by crystallization studies performed with artificial PHA granules (Horowitz and Sanders 1994; Horowitz and Sanders 1995). Nevertheless, the kinetic explanation is not fully consistent with some aspects of PHA crystallization in vivo such as with the observation of crystalline-shell/amorphous-core PHA granules described by Lauzier and

colleagues (Lauzier et al. 1992a) or acknowledgement of the cell dehydration as the necessary crystallization-inducing condition reported by Sedlacek et al. (2019a).

Already since the early studies on amorphous state of PHA in vivo, it has been repeatedly confirmed that the native structure of PHA in the granules can be altered as a result of certain physical or chemical treatment. Merrick and colleagues described the morphological changes (Merrick et al. 1965) and the consequent loss of biological activity of PHA (Merrick and Doudoroff 1964) as a result of various treatments including freezing and thawing, prolonged storage at 4°C , centrifugation, or extraction with hypochlorite. Barnard and Sanders (1989) later linked this biological inactivation to crystallization of PHA and described similar changes in granules isolated from *Methylobacterium* AM1 after their exposure to low temperature (4°C or freezing) and to aqueous solutions of acetone. Harrison et al. (1992) attributed a similar effect also to centrifugal force and to selected enzymatic treatments. Two decades later, Porter and Jian in their in situ study on the PHA crystallization kinetics used strongly acidic slurry in order to induce nucleation of PHA in the cells (Porter and Jian 2011a; Porter and Jian 2011b). Following these observations, Sedlacek et al. performed the systematic investigation of the effect of exposure of PHA-producing cells (*C. necator* H16) to various physical stressors (elevated temperature, high osmolarity, freezing/thawing cycles, acidic pH value) on the

PHA crystallization *in vivo* (Sedlacek et al. 2019a). Using ATR-FTIR spectroscopy for the monitoring of the free dehydration of the cells at ambient conditions, the authors experimentally confirmed that dehydration was followed by crystallization of intracellular PHA only when the cells were previously stressed; nevertheless, not all the tested stress factors induced this *in vivo* crystallization. In accordance with the concept of suppressed crystallization rate in limited volume, the crystallization occurred only in those cells where the exposition to the stressor resulted in significant coalescence of the granules as revealed by TEM analysis. On the other hand, a time lag was observed between the dehydration step and subsequent PHA crystallization, which supports the idea of additional plasticizing effect of water. Finally, spectroscopic evidence was provided by the authors that the stress factors active in changes in morphology and crystallinity of the granules were the same ones that caused the most pronounced denaturation of intracellular proteins. These results thus provided an updated idea of stabilization of metastable amorphous form of PHA in the cells by a well-tuned interplay of kinetic effects resulting from sub-micron volume of the granules and the plasticizing effect of residual intra-granular water. In accordance with the current view on the surface structure of the granules (Bresan et al. 2016), the authors propose that

granule-associated proteins play an essential role in keeping both stabilization factors working (see Fig. 4). This conception is supported by several works reporting a strong influence of phasins on stabilization effect of PhaP against coalescence of separated PHA granules (Pötter et al. 2002; Wieczorek et al. 1995).

Biological and biophysical consequences of the presence of PHA granules in bacterial cells

Aside from the mechanical and physicochemical consequences of the elastomeric nature of PHA, numerous reports have stressed also the biological importance of the physical state of PHA *in vivo*. First of all, it was described long time ago that PHA depolymerases, which catalyze mobilization of PHA in the cells, are specific only to amorphous PHA with no ability to cleave crystalline PHA (Ellar et al. 1968; Merrick et al. 1999). This well-known fact restricts the capability to fill the primary role of a storage material exclusively to amorphous polymer and gives the reason for terms “native” and “denatured” PHA commonly used currently as synonyms for amorphous and crystalline PHA, respectively (Gebauer and Jendrossek 2006).

Nevertheless, recent studies show that the biological impact of the unique physical state of native PHA is in fact more general than previously considered. It was proposed by Obruca et al. that the flexibility of the PHA chains in its native intra-granular state may help bacterial cells to endure shearing deformations associated with growth of extracellular ice crystals during freezing (Obruca et al. 2016b) as well as during cell dehydration caused by a hyperosmotic environment (Obruca et al. 2017). Furthermore, the results of a detailed morphological study performed by the same research group also indicated that the liquid-like behavior supports and partially repairs the integrity of cytoplasmic membranes of bacterial cells exposed to suddenly induced hypertonic (Obruca et al. 2017) and hypotonic (Sedlacek et al. 2019b) conditions. The biological relevance of the native PHA state was also emphasized by the results of cell viability tests involved by Sedlacek et al. in their stress-induced crystallization study (Sedlacek et al. 2019a). In this study, the lowest number of cultivable cells was reported for bacterial cultures exposed to stressors, which strongly induced PHA granules aggregation, such as high temperature or strongly acidic conditions. The authors proposed that aggregation and crystallization of the granules may impede division of the bacterial cells. It can hence be seen from the previous text that even the morphology and physicochemical state of the PHA chains in the granules must be considered as an important piece of the puzzle representing the complete view on the biological role of PHA.

Aside from the role of the physical state of the polymer, the above referenced studies also described how the general changes in cell morphology and biophysics, caused by the

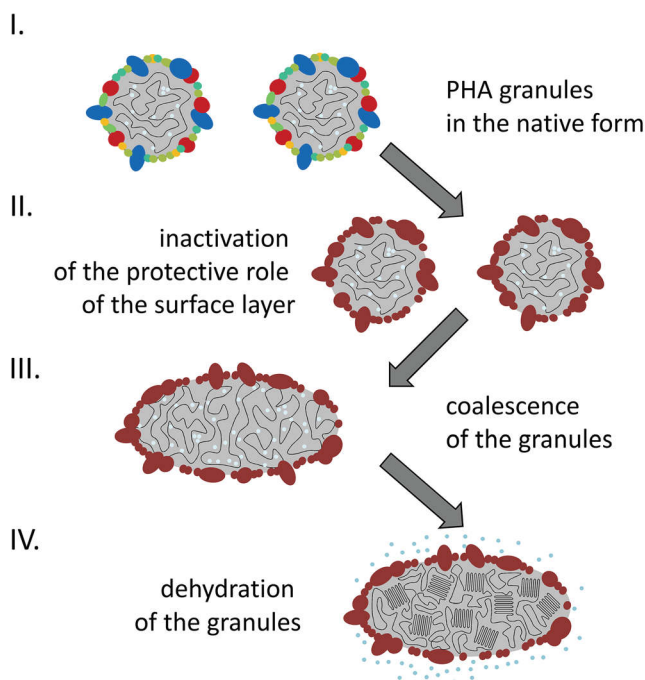


Fig. 4 Updated view of the mechanism protecting amorphous form of PHA *in vivo* (according to Sedlacek et al. (2019a)). Crystallization of PHA in the cells occurs in the system where the exposure of the cells to a physical or chemical stressor induces inactivation of the protective function of granule-assisted proteins in the surface layer of PHA granules (step II), after the coalescence of the granules increases the effective volume of PHA (step III) if the cells are dried and the residual water is excluded from the granule with the subsequent loss of its plasticizing effect (step IV)

presence of PHA granules therein, are involved in protection of the cells against various types of adverse conditions. For instance, it was demonstrated that PHA protects non-halophilic bacteria against precarious osmotic up-shock; PHA-rich *C. necator* cells were expediently resistant to hypertonic challenge and revealed less plasmolysis when exposed to hypertonic media; in contrast, massive plasmolysis destroyed the cytoplasmic membrane and resulted in leakage of the cytoplasm of PHA-negative mutants of the same species. When present, PHA granules mechanistically serve as “internal scaffolds,” which prevent bacteria from such detrimental plasmolysis (Obruca et al. 2017). In addition to osmotic up-shock, it was shown that PHA granules protect also against osmotic down-shock in hypotonic media, as described both for the halophilic bacterium *Halomonas halophila* and for the non-halophile *C. necator*. For both strains, capability to keep cell integrity when suddenly exposed to osmotic down-shock was substantially enhanced when PHA granules were stored in cells. The protective function of PHA granules in *C. necator* during osmotic up-shock was probably associated with less cytoplasm membrane damage caused by plasmolysis, which in turn harnished these cells with a survival advantage during a subsequent osmotic up-shock. In contrast, PHA-free cells suffered from massive hypotonic lysis when osmotic up- and subsequent down-shock were suddenly induced.

Furthermore, mechanistic description of the cryo-protective effect of P(3HB) in survival ability of bacteria under freezing conditions was accomplished by Obruca et al. by cryo-SEM, which allows studying the impact of PHA granules on the cells’ mechanical properties, on solutes’ mobility in the cytoplasm, and the cellular response to sudden temperature changes such as drying, freezing, or thawing. During freezing-and-thawing cycles, 3HB, the monomer from which the homopolyester P(3HB) is built up, acts as a strong cryoprotectant for enzymes, yeasts, and the PHA producer *C. necator*. For PHA-positive cultures, the survival rates after freezing were significantly higher than for PHA-negative mutants. High levels of 3HB in *C. necator* cells, which simultaneously produce and degrade P(3HB), were proposed by the authors to predominantly (but not exclusively!) cause this protective effect. Nevertheless, the reported results actually indicate that some biophysical mechanisms of the protection are involved as well. Cryo-SEM observations also showed that PHA granules maintain their expedient flexibility even at extremely low temperature, suggesting that these inclusions also prevent massive cellular damage resulting from the adverse effect of intracellular ice crystals; these effects encompass generation of gas bubbles, physical membrane damage, or even detriments of organelles. The presence of PHA granules covered with a surface layer of hydrated proteins probably changes the adhesion forces between water molecules and cellular components, resulting in a higher rate of water transport through membranes. This causes a faster discharge of

water from cells harboring PHA granules during drying or freezing, which keeps intracellular formation of ice crystals to a minimum (Obruca et al. 2016a).

Last but not least, it was experimentally confirmed that the presence of PHA granules helps to protect cells against UV radiation. In a study by Slaninova et al. (2018), it was described that PHA granules efficiently scatter UV radiation, which provides a substantial UV-protective effect for bacterial cells and, moreover, decreases the intracellular level of reactive oxygen species in UV-challenged cells. In this study, *Cupriavidus necator* H16 producing PHA granules has much higher resistance to UV exposition than its non-accumulating mutant *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴. The protective properties of the PHA granules are enhanced by the fact that granules specifically bind to DNA, which in turn provides shield-like protection of DNA as the most UV-sensitive molecule. Similar findings were recently reported by Tribelli et al. for the psychrophilic bacterium *Pseudomonas extremaustralis* (Tribelli et al. 2019).

PHA in phototrophic prokaryotes

In several aspects, cyanobacteria are an extremely important group of organisms: in paleo-biology, as they were the first massive oxygen producers (Stanley 1999); in ecology, as they are responsible for 20–30% of the global photosynthetic synthesis of organic carbon (McArthur 2006; Stal 2012); in terms of evolutionary adaptation, as they have multiple photosynthetically active pigments while able to fix nitrogen (Mitsui et al. 1986) and can withstand drought, UV radiation, and extreme temperatures (Bhaya et al. 2000); and in biotechnology, as they can be grown strictly photo-autotrophically while producing different lipids, amino acids, fatty acids, some vitamins, and bioactive components (including, but not only toxins) for feed, food, and pharmaceutical applications (Masojidek and Prasil 2010; Meixner 2018).

Similar to heterotrophic bacteria, numerous cyanobacterial strains accumulate PHA, preferably the homopolyester P(3HB), in their cells in the form of granules (Ansari and Fatma 2016; Asada et al. 1999). As mentioned before, the primary role of P(3HB) is the storage of carbon and energy (Sudesh et al. 2001). Similar to other prokaryotes, cyanobacterial P(3HB) synthesis is stimulated by unfavorable environmental conditions, such as nitrogen or phosphorous starvation, but requiring a surplus of energy and a carbon source (Panda et al. 2005). With emphasis on cyanobacteria-specific characteristics to morphology and to their extraordinary metabolic flexibility (photosynthesis, nitrogen fixation), the role of P(3HB) is expected to be highly complex. In contrast to most PHA-producing heterotrophs, cyanobacteria accumulate glycogen, lipids, and proteins besides P(3HB) in amounts and in relations to each other which substantially depend on the species and on the cultivation conditions

(Koch et al. 2019). At heterotrophic growth, for example, the P(3HB) content in cyanobacteria can reach similar values as in other bacteria, while at photo-autotrophic growth typically 10–15 but rarely ever more than 25% P(3HB) in the biomass is reached (Troschl et al. 2017).

While the cyanobacterial P(3HB) synthesis pathway does not differ from other heterotrophic bacteria, the involved enzymes and their respective genes are different in number, types, and location in the genome (Taroncher-Oldenburg et al. 2000) (see Fig. 5). Considering the sheer number of cyanobacteria species that can produce P(3HB) (Ansari and Fatma 2016), the knowledge about P(3HB) synthesis kinetics for each of them is far less profound than it is, for example, for *C. necator* (Haas et al. 2017; Yamane 1993).

While cyanobacteria genera such as *Synechocystis*, *Synechococcus*, and *Gloeotheca* are spherical and single cellular, others such as *Anabaena*, *Calothrix*, *Chlorogloeopsis*, or *Nostoc* grow in irregular or filamentous aggregates, making the first group the preferred targets for deeper investigations, simply by allowing to take a representative sample from a bigger culture volume for analysis. Example images provided in Fig. 6 may give an impression about why it is almost impossible to accurately monitor the growth and development of aggregate forming cyanobacteria. From our own observations in *Synechocystis* sp. cultures (unpublished data), we experienced a wide variety of physiological stages of cells simultaneously present in each culture, e.g., containing no, a single or multiple P(3HB) granules. While growth and P(3HB) synthesis can be measured from a culture over time, the development of individual cells remains widely unclear.

It is expected that intracellular P(3HB) has more roles for cyanobacteria than just carbon and energy storage (Obruca et al. 2017; Pavez et al. 2009), but this is currently not proven. With respect to physiological differences, such as the lower P(3HB) content and its relation to glycogen and with respect to morphological differences, such as the required space for thylakoids, the total effect of P(3HB) may be weaker in cyanobacteria than it is in high accumulating heterotrophic bacteria. An example of the cellular distribution of P(3HB) granules in 8 weeks long cultivated *Synechocystis* culture

(not exceeding 20% P(3HB) in the biomass) is shown in Fig. 7. The granules are unevenly located in a small part of the cells, suggesting the occupation of a certain cell volume by other components.

Exploitation of cyanobacterial P(3HB) production is currently not done on industrial scale, not only for lack of knowledge about biochemical details, but for reasons of comparably slower growth and lower P(3HB) content per cell mass, resulting in an unacceptable high product price (Panuschka et al. 2019). Research activities, therefore, focus on either increased cellular P(3HB) synthesis and accumulation rates (Khetkorn et al. 2016), on increased overall biomass growth by optimization of media and reactor designs (Pulz 2001), or on utilization of production residues and waste streams as inexpensive nutrient resources (Meixner et al. 2016). Finally, a holistic approach is needed, taking ecological, economical, technical, and ethical aspects into account to best possible support a sustainable living (Koller et al. 2017). Undoubtedly, within those aspects, a better understanding of the evolution of prokaryotic PHA synthesis and of its ecological role in cyanobacteria is the key.

The importance of PHA granules for extremophiles

The specific role of PHA in survival and adaptation of microorganisms to adverse conditions is further illustrated by the well-known fact that a plethora of microbes adapted to life in various extreme environments like hot springs, bio-trickling filters, glaciers, salterns, or chemically polluted habitats have shown potential for PHA biosynthesis. A growing number of studies accomplished during the last couple of years suggest a unique evolutionary role of PHA biosynthesis in that adaptation to extreme environments (Koller et al. 2018).

Among different types of extremophiles, many representatives of extremely halophiles are readily studied PHA producers. Generally, PHA accumulation seems to be a widespread feature among different prokaryotic strains thriving in highly saline environments, including both extremely halophilic eubacteria and haloarchaea. This suggests that PHA accumulation plays a vital role in osmotic adaptation of microorganisms. Sedlacek et al. (2019b), studying the halophilic strain *H. halophila*, reported that hypo-osmotically burdened PHA-rich cells better maintained cell integrity compared to PHA-poor cells. Under hypertonic conditions, this moderately halophile *H. halophila* accumulates high quantities of organic osmolytes to compensate osmotic imbalance. When suddenly exposed to osmotic down-shock, halophiles are much more sensitive to a hypo-osmotic damage and hypotonic lysis than non-halophiles. Since hydrophobic PHA granules represent a substantial portion of the intracellular volume, the total amount of osmolytes per cell will be significantly lower in PHA-rich cells, which facilitates the quick adaptation from hyper- to hypotonic conditions. These findings substantiated

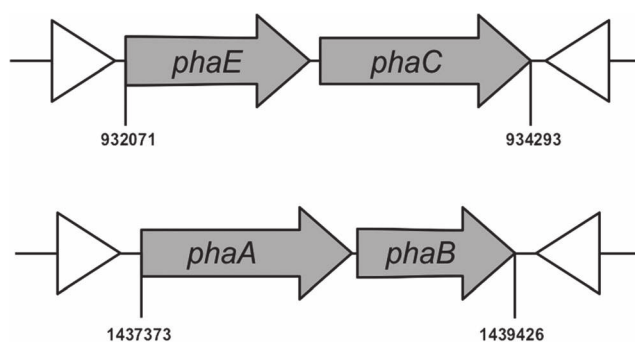


Fig. 5 Location of the four P(3HB) synthesis genes in *Synechocystis* PCC6803, reproduced from Silvestrini et al. (2016)

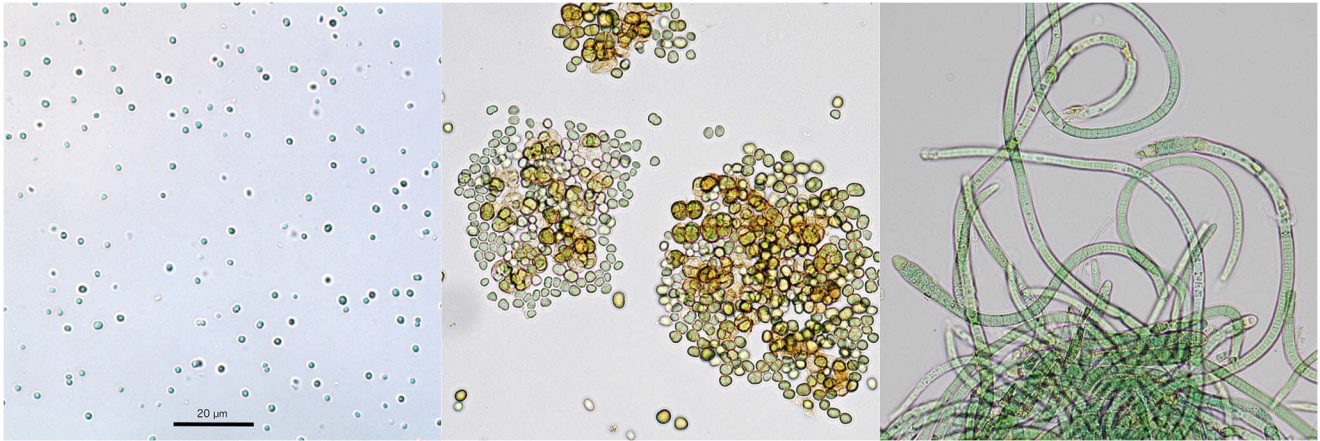


Fig. 6 Morphology of three selected cyanobacteria genera which are able to accumulate P(3HB) while growing under non-sterile conditions in bench-scale photobioreactors. All photos are in the same scale, from left to right: *Synechocystis*, *Chlorogloeopsis*, *Calothrix*

previous reports for the extremely halophilic archaeon *Haloquadratum walsbyi*, cells of which immediately lyse in distilled water and require a minimum of about 140 g/L salts for growth. This flat square-shaped haloarchaeon was grown aerobically under illumination on a medium containing about 200 g/L NaCl; detailed studies of cellular morphology via atomic force microscopy showed strong corrugation of the cellular surface due to the presence of tightly packed PHA granules. Already in this study, it was supposed that the primary function of these PHA granules was to reduce the cytosol volume to minimize the energy demand of cells for osmotic homeostasis; hence, they display an essential function for the cells to manage high salinity (Saponetti et al. 2011).

As an example for cryophilic (psychrophilic) PHA-producing strains, *Pseudomonas* sp. 14-3, isolated from samples taken in the Antarctic region, was investigated by Ayub et al. It was shown that the *phaRBAC* genes of this strain, responsible for PHA biosynthesis, are located on the same isolated gene region where also those genes presumably contributing to its high adaptability to low temperature are placed. To study the impact of PHA biosynthesis on the strain's

adaptability to low temperature, its wild-type and PHA-negative mutant (deletion of the PHA synthase encoding gene) were compared. The PHA-negative mutant strain was more prone to freezing than the PHA-accumulating wild-type organisms; the mutant did not grow at all at 10 °C. It was suggested that the presence of PHA granules was essential for the strain to adequately respond to the oxidative stress caused by the low temperature. Importantly, for the mutant, sudden cold shock resulted in prompt decrease of the intracellular NADPH content and NADH/NAD⁺ ratio, while sudden cold shock of the PHA-positive wild-type initiated sudden PHA degradation, but no tremendous loss of reduction equivalents due to regeneration of reducing power by PHA degradation. As a consequence, lipid peroxidation at low temperature was 25 times higher in the mutant strain than in the wild type. Hence, oxidative stress related to low temperature is relieved by degrading PHA due to generation of the needed reduction potential (Ayub et al. 2009). The importance of PHA for bacteria inhabiting cold environments was also confirmed by numerous studies dealing with composition of microflora occurring in niches constantly exposed to low and

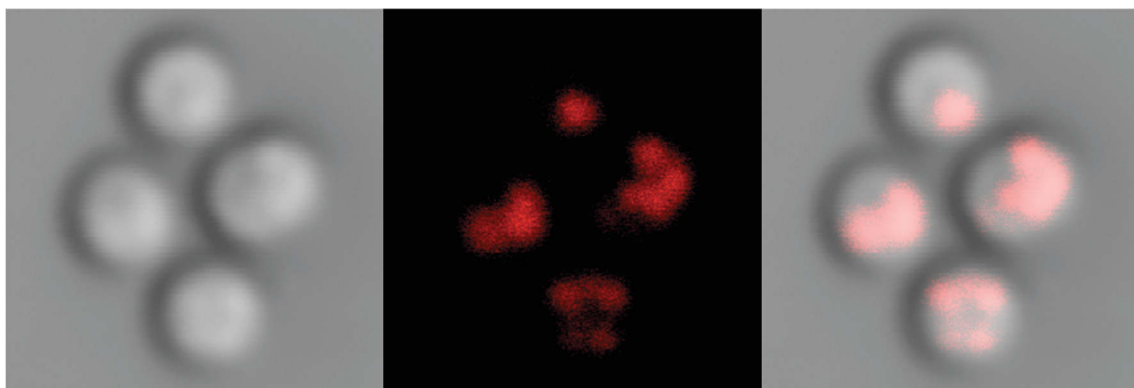


Fig. 7 Microscopy images of *Synechocystis* in bright field mode (left), in fluorescence mode after Nile Red staining (middle) and an overlay of both (right). $\times 1000$ magnification, cell size is ca. 3.5–4 μm

even sub-zero temperatures. Numerous PHA producers were detected in Antarctic soil (Goh and Tan 2012), subarctic sea ice in Greenland (Kaartokallio et al. 2013), Antarctic freshwater (Ciesielski et al. 2014), the Baltic Sea (Pärnänen et al. 2015), or Pangi-Chamba trans-Himalayan region (Kumar et al. 2018).

At the first sight, biotechnological implementation of thermophilic production strains seems to be impractical because of technological issues associated with high temperature cultivations, e.g., reduced oxygen solubility at elevated temperatures and high energy required to maintain high cultivation temperature. Surprisingly, when thermophiles are used in bioreactor cultivations, these processes often are of considerable energy efficiency, mainly due to reduced energy-demanding cooling requirements. Additionally, cultivations of thermophiles are considered “self-heating systems” because heat energy is generated by their metabolism; this phenomenon is especially observed for large-scale cultivations with high cell density. Further, also the bioreactor stirring system produces heat energy, which additionally contributes to the heat energy supply to the cultivation. Combination of all these effects reduces both heating and cooling costs. As a further advantage, also energy-demanding sterility precautions (sterilization of equipment and media components) can be reduced to a minimum when working with thermophilic organisms (Ibrahim et al. 2010); this benefit is analogous to the reduced energy costs for sterilization when using extremely halophiles like, e.g., *Haloferax mediterranei* (Hermann-Krauss et al. 2013). Among the potential thermophilic producers for biotechnological production of PHA, *Chelatococcus daeguensis* TAD1 can be considered an auspicious candidate for PHA production from abundantly available inexpensive raw materials on an industrial scale. Improved productivity of this thermophilic strain, isolated from bio-layers of a bio-trickling NO_x removal filter, as compared to its mesophilic relative *Chelatococcus* sp. strain MW10 was reported (Ibrahim and Steinbüchel 2010; Xu et al. 2014). However, as compared to halophiles or psychrophiles, PHA biosynthesis was not reported for many thermophiles, which indicates either that PHA biosynthesis is not very common among thermophiles or that thermophilic PHA biosynthesis is underinvestigated. To isolate novel promising thermophilic PHA producers, Pernicova et al. (2020) developed a novel isolation approach. Since conventional colony-Nile Red staining provided false positive signals in thermophiles, a mixed consortium was enriched by PHA-producing thermophiles by application of osmotic challenge relying on the osmoprotective function of PHA granules. PHA-positive colonies were subsequently identified by fast and reliable ATR-FTIR analysis. In this work, several potentially promising thermophilic PHA producers belonging to genus *Bacillus*, *Aneurinibacillus*, and *Chelatococcus* were gained.

Conclusions

As was shown in this review, the biological role of PHA is very complex and universal among diverse genera of prokaryotes, as can be illustrated by the fact that PHA production is common for such fundamentally different groups of microorganisms as heterotrophs and autotrophs on the one hand, or mesophiles and extremophiles on the other hand. Aside from the generally accepted storage function, recent experimental studies have decidedly elucidated that accumulation of PHA in the cells provides microorganisms with higher stress survival and robustness. Mechanisms involved in the PHA protective role combine various factors including unique cyclic character of PHA metabolism and its interconnection with other crucial metabolic pathways, multiple biological functions of PHA granules associated proteins and remarkable morphological and biophysical properties of native PHA granules. The understanding of the particular contributions of the individual mechanisms in the PHA stress-shielding is of the great interest not only from the fundamental scientific point of view, but it has also very promising potential in improving sustainability and comprehensibility of various biotechnological processes including, but not limited to, PHA production.

Author contributions SO, PS, ES, IF, CD, KM, ZS, and MK performed literature review and wrote the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

Funding information This study was partly funded by the project GA19-19-29651L of the Czech Science Foundation (GACR) and also partly funded by the Austrian Science Fund (FWF), project I 4082-B25. Further, Zuzana Sedrlova is Brno Ph.D. Talent Scholarship Holder – funded by the Brno City Municipality.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

- Amor SR, Rayment T, Sanders JKM (1991) Poly (hydroxybutyrate) *in vivo*: NMR and x-ray characterization of the elastomeric state. *Macromolecules* 24(16):4583–4588. <https://doi.org/10.1021/ma00016a017>
- Ansari S, Fatma T (2016) Cyanobacterial polyhydroxybutyrate (PHB): screening, optimization and characterization. *PLoS One* 11(6):1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158168>
- Asada Y, Miyake M, Miyake J, Kurane R, Tokiwa Y (1999) Photosynthetic accumulation of poly-(hydroxybutyrate) by cyanobacteria—the metabolism and potential for CO₂ recycling. *Int J Biol Macromol* 25:37–42. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(99\)00013-6](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(99)00013-6)

- Ayub ND, Tribelli PM, López NI (2009) Polyhydroxyalkanoates are essential for maintenance of redox state in the Antarctic bacterium *Pseudomonas* sp. 14-3 during low temperature adaptation. *Extremophiles* 13(1):59–66. <https://doi.org/10.1007/s00792-008-0197-z>
- Bair HE, Johnson GE, Anderson EW, Matsuoka S (1981) Non equilibrium annealing behavior of poly (vinyl acetate). *Polym Eng Sci* 21(14):930–935. <https://doi.org/10.1002/pen.760211410>
- Barnard GN, Sanders JKM (1988) Observation of mobile poly (β -hydroxybutyrate) in the storage granules of *Methylobacterium* AM1 by in vivo ^{13}C -NMR spectroscopy. *FEBS Lett* 231(1):16–18. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)80693-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)80693-8)
- Barnard GN, Sanders JKM (1989) The poly- β -hydroxybutyrate granule in vivo. A new insight based on NMR spectroscopy of whole cells. *J Biol Chem* 264(6):3286–3291
- Batista MB, Teixeira CS, Sfeir MZT, Alves LPS, Valdameri G, Pedrosa FO, Sasaki GL, Steffens MBR, de Souza EM, Dixon R, Müller-Santos M (2018) PHB biosynthesis counteracts redox stress in *Herbaspirillum seropedicae*. *Front Microbiol* 9:472. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00472>
- Bergersen FJ, Peoples MB, Turner GL (1991) A role for poly-(β -hydroxybutyrate) in bacteroids of soybean root nodules. *Proc R Soc London B* 245:59–64. <https://doi.org/10.1098/rspb.1991.0088>
- Bhaya D, Schwarz R, Grossman AR (2000) Molecular responses to environmental stress. In: Whitton BA, Potts MK (eds) *The ecology of Cyanobacteria: their diversity in time and space*. Academic Publishers, New York. <https://doi.org/10.1007/0-306-46855-7>
- Bonthrone KM, Clauss J, Horowitz DM, Hunter BK, Sanders JKM (1992) The biological and physical chemistry of polyhydroxyalkanoates as seen by NMR spectroscopy. *FEMS Microbiol Rev* 9(2–4):269–277. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90320-N](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90320-N)
- Breedveld MW, Dijkema C, Zevenhuizen LPTM, Zehnder AJB (1993) Response of intracellular carbohydrates to a NaCl shock in *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii TA-1 and *Rhizobium meliloti* SU-47. *J Gen Microbiol* 139:3157–3163. <https://doi.org/10.1099/00221287-139-12-3157>
- Bresan S, Sznajder A, Hauf W, Forchhammer K, Pfeiffer D, Jendrossek D (2016) Polyhydroxyalkanoate (PHA) granules have no phospholipids. *Sci Rep* 6:26612. <https://doi.org/10.1038/srep26612>
- Cecorulli G, Pizzoli M, Scandola M (1992) Plasticization of bacterial poly (3-hydroxybutyrate). *Macromolecules* 25(12):3304–3306. <https://doi.org/10.1021/ma00038a045>
- Chien C-C, Wang L-J, Lin W-R (2014) Polyhydroxybutyrate accumulation by a cadmium-resistant strain of *Cupriavidus taiwanensis*. *J Taiwan Instit Chem Eng* 45:1164–1169. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2014.02.004>
- Ciesielski S, Górniak D, Możejko J, Świątecki A, Grzesiak J, Zdanowski M (2014) The diversity of bacteria isolated from Antarctic freshwater reservoirs possessing the ability to produce Polyhydroxyalkanoates. *Curr Microbiol* 69:594–603. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0629-1>
- De Koning GJM, Lemstra PJ (1992) The amorphous state of bacterial poly [(R)-3-hydroxyalkanoate] in vivo. *Polymer* 33(15):3292–3294. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(92\)90249-V](https://doi.org/10.1016/0032-3861(92)90249-V)
- Doi Y, Shiro K, Hideki A (1995) Microbial synthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules* 28(14):4822–4828. <https://doi.org/10.1021/ma00118a007>
- Ellar D, Lundgren DG, Okamura K, Marchessault RH (1968) Morphology of poly- β -hydroxybutyrate granules. *J Mol Biol* 35(3):489–502. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(68\)80009-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(68)80009-9)
- Encarnación S, del Carmen VM, Dunn MF, Dávalos A, Mendoza G, Mora Y, Mora J (2002) AniA regulates reserve polymer accumulation and global protein expression in *Rhizobium etli*. *J Bacteriol* 184:2287–2295. <https://doi.org/10.1128/jb.184.8.2287-2295.2002>
- Fuller CR, O'Donnell JP, Saulnier J, Redlinger TE, Foster J, Lenz RW (1992) The supramolecular architecture of the polyhydroxyalkanoate inclusions in *Pseudomonas oleovorans*. *FEMS Microbiol Rev* 9(2–4):279–288. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90321-E](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90321-E)
- Gebauer B, Jendrossek D (2006) Assay of poly (3-hydroxybutyrate) depolymerase activity and product determination. *Appl Environ Microbiol* 72(9):6094–6100. <https://doi.org/10.1128/AEM.01184-06>
- Goh YS, Tan IKP (2012) Polyhydroxyalkanoate production by antarctic soil bacteria isolated from Casey Station and Signy Island. *Microbiol Res* 167:211–219. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.08.002>
- Goh L-K, Purama RK, Sudesh K (2014) Enhancement of stress tolerance in the polyhydroxyalkanoate producers without mobilization of the accumulated granules. *Appl Biochem Biotechnol* 172:1585–1598. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0634-z>
- Haas C, El-Najjar T, Virgolini N, Smerilli M, Neureiter M (2017) High cell-density production of poly(3-hydroxybutyrate) in a membrane bioreactor. *New Biotechnol* 37:117–122. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.06.1461>
- Harrison STL, Chase HA, Amor SR, Bonthrone KM, Sanders JKM (1992) Plasticization of poly (hydroxybutyrate) in vivo. *Int J Biol Macromol* 14(1):50–56. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(05\)80020-0](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(05)80020-0)
- Hermann-Krauss C, Koller M, Muhr A, Fasl H, Stelzer F, Braunegg G (2013, 2013) Archaeal production of polyhydroxyalkanoate (PHA) co-and terpolyesters from biodiesel industry-derived by-products. *Archaea*. <https://doi.org/10.1155/2013/129268>
- Horowitz DM, Sanders JKM (1994) Amorphous, biomimetic granules of polyhydroxybutyrate: preparation, characterization, and biological implications. *J Am Chem Soc* 116(7):2695–2702. <https://doi.org/10.1021/ja00086a001>
- Horowitz DM, Sanders JKM (1995) Biomimetic, amorphous granules of polyhydroxyalkanoates: composition, mobility, and stabilization in vitro by proteins. *Can J Microbiol* 41(13):115–123. <https://doi.org/10.1139/m95-177>
- Horowitz DM, Clauss J, Hunter BK, Sanders JKM (1993) Amorphous polymer granules. *Nature* 363:23–23. <https://doi.org/10.1038/363023a0>
- Ibrahim MH, Steinbüchel A (2010) High-cell-density cyclic fed-batch fermentation of a poly (3-hydroxybutyrate)-accumulating thermophile, *Chelatococcus* sp. strain MW10. *Appl Environ Microbiol* 76(23):7890–7895. <https://doi.org/10.1128/AEM.01488-10>
- Ibrahim MHA, Willems A, Steinbüchel A (2010) Isolation and characterization of new poly(3HB)-accumulating star-shaped cell-aggregates-forming thermophilic bacteria. *J Appl Microbiol* 109(5):1579–1590. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04786.x>
- Jendrossek D (2005) Fluorescence microscopical investigation of poly (3-hydroxybutyrate) granule formation in bacteria. *Biomacromolecules* 6(2):598–603. <https://doi.org/10.1021/bm049441r>
- Jendrossek D (2007) Peculiarities of PHA granules preparation and PHA depolymerase activity determination. *Appl Microbiol Biotechnol* 74(6):1186–1196. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0860-9>
- Jendrossek D (2009) Polyhydroxyalkanoate granules are complex sub-cellular organelles (carbonosomes). *J Bacteriol* 191(10):3195–3202. <https://doi.org/10.1128/JB.01723-08>
- Jendrossek D, Pfeiffer D (2014) New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly (3-hydroxybutyrate). *Environ Microbiol* 16(8):2357–2373. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12356>
- Jendrossek D, Selchow O, Hoppert M (2007) Poly (3-hydroxybutyrate) granules at the early stages of formation are localized close to the cytoplasmic membrane in *Caryophanon latum*. *Appl Environ Microbiol* 73(2):586–593. <https://doi.org/10.1128/AEM.01839-06>

- Kaartokallio H, Sogaard DH, Norman L, Rysgaard S, Tison JL, Delille B, Thomas DN (2013) Short-term variability in bacterial abundance, cell properties, and incorporation of leucine and thymidine in sub-arctic sea ice. *Aquat Microb Ecol* 71:57–73. <https://doi.org/10.3354/ame01667>
- Kadouri D, Burdman S, Jurkevitch E, Okon Y (2002) Identification and isolation of genes involved in poly(β -hydroxybutyrate) biosynthesis in *Azospirillum brasilense* and characterization of a phbC mutant. *Appl Environ Microbiol* 68:2943–2949. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.2943-2949.2002>
- Kadouri D, Jurkevitch E, Okon Y (2003a) Involvement of the reserve material poly-beta-hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* stress endurance and root colonization. *Appl Environ Microbiol* 69:3244–3250. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3244-3250.2003>
- Kadouri D, Jurkevitch E, Okon Y (2003b) Poly beta-hydroxybutyrate depolymerase (PhaZ) in *Azospirillum brasilense* and characterization of a phaZ mutant. *Arch Microbiol* 180:309–318. <https://doi.org/10.1007/s00203-003-0590-z>
- Kadouri D, Jurkevitch E, Okon Y, Castro-Sowinski (2005) Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Crit Rev Microbiol* 31(2):55–67. <https://doi.org/10.1080/10408410590899228>
- Kamnev AA, Tugarova AV, Antonyuk LP, Tarantilis PA, Polissiou, Gardiner PHE (2005) Effects of heavy metals on plant-associated rhizobacteria: Comparison of endophytic and non-endophytic strains of *Azospirillum brasilense*. *J Trace Elem Med Biol* 19:91–95. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.03.002>
- Kessler B, Witholt B (2001) Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *J Biotechnol* 86(2):97–104. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00404-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00404-1)
- Khetkom W, Incharoensakdi A, Lindblad P (2016) Enhancement of poly-3-hydroxybutyrate production in *Synechocystis* sp. PCC 6803 by overexpression of its native biosynthetic genes. *Bioresour Technol* 214:761–768. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.014>
- Kim DY, Hyung WK, Moon GC, Young HR (2007) Biosynthesis, modification, and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. *J Microbiol* 45(2):87–97
- Koch M, Doello S, Gutekunst K, Forchhammer K (2019) PHB is produced from glycogen turn-over during nitrogen starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Int J Mol Sci* 20(8):1942. <https://doi.org/10.3390/ijms20081942>
- Koller M, Marsalek L, de Sousa Dias MM, BrauneGG G (2017) Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyester in a sustainable manner. *New Biotechnol* 37:24–38. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.05.001>
- Koller M, Obruca S, Pernicova I, BrauneGG G (2018) Physiological, kinetic, and process engineering aspects of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by extremophiles. In: Williams H, Kelly P (eds) *Polyhydroxyalkanoates: Biosynthesis, Chemical Structures and Applications*. Nova Science Publishers Inc., pp 1–70
- Koskimäki JJ, Kajula M, Hokkanen J, Ihantola EL, Kim JH, Hautajärvi H, Hankala E, Soukas M, Pohjanen J, Podolich O, Kozyrovska N, Turpeinen A, Pääkkönen M, Mattila S, Campbell BC, Pirttilä AM (2016) Methyl-esterified 3-hydroxybutyrate oligomers protect bacteria from hydroxyl radicals. *Nat Chem Biol* 12(5):332–338. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2043>
- Kumar V, Thakur VA, Kumar S, Singh D (2018) Bioplastic reservoir of diverse bacterial communities revealed along altitude gradient of Pangi-Chamba trans-Himalayan region. *FEMS Microbiol Lett* 365:14, art. no. fny144. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny144>
- Lauzier C, Revol J-F, Marchessault RH (1992a) Topotactic crystallization of isolated poly (β -hydroxybutyrate) granules from *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol Rev* 9(2–4):299–310. <https://doi.org/10.1016/0378-1097>
- Lauzier C, Marchessault RH, Smith P, Chanzy H (1992b) Structural study of isolated poly (β -hydroxybutyrate) granules. *Polymer* 33(4):823–827. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(92\)90343-U](https://doi.org/10.1016/0032-3861(92)90343-U)
- Martin DD, Bartlett DH, Roberts MF (2002) Solute accumulation in the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum*. *Extremophiles* 6: 507–514. <https://doi.org/10.1007/s00792-002-0288-1>
- Masojidek J, Prasil O (2010) The development of microalgal biotechnology in the Czech Republic. *J Ind Microbiol Biotechnol* 37(12): 1307–1317. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0802-x>
- McArthur JV (2006) *Microbial ecology: an evolutionary approach*. Elsevier Acad Press, Amsterdam. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbl013>
- Meixner K (2018) Integrating cyanobacterial poly(3-hydroxybutyrate) production into biorefinery concepts. Dissertation, University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna
- Meixner K, Fritz I, Daffert C, Markl K, Fuchs W, Drosch B (2016) Processing recommendations for using low-solids digestate as nutrient solution for poly- β -hydroxybutyrate production with *Synechocystis salina*. *J Biotechnol* 240:61–67. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.10.023>
- Merrick JM, Doudoroff M (1964) Depolymerization of poly- β -hydroxybutyrate by an intracellular enzyme system. *J Bacteriol* 88(1):60–71
- Merrick JM, Lundgren DG, Pfister RM (1965) Morphological changes in poly- β -hydroxybutyrate granules associated with decreased susceptibility to enzymatic hydrolysis. *J Bacteriol* 89(1):234–239
- Merrick JM, Steger R, Dombroski D (1999) Hydrolysis of native poly (hydroxybutyrate) granules (PHB), crystalline PHB, and artificial amorphous PHB granules by intracellular and extracellular depolymerases. *Int J Biol Macromol* 25(1–3):129–134. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(99\)00026-4](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(99)00026-4)
- Mezzina MP, Álvarez DS, Egoiburo DE, Peña RD, Nikel PI, Pettinari MJ (2017) A new player in the biorefineries field: phasin PhaP enhances tolerance to solvents and boosts ethanol and 1, 3-propanediol synthesis in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 83(14):e00662–e00667. <https://doi.org/10.1128/AEM.00662-17>
- Mitsui A, Kumazawa S, Takahashi A, Ikemoto HH, Cao S, Arai T (1986) Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically. *Nature* 323:720–722. <https://doi.org/10.1038/323720a0>
- Mumtaz T, Suraini AA, Rahman NAA, Yee PL, Wasoh H, Shirai Y, Hassan MA (2011) Visualization of core-shell PHBV granules of wild type *Comamonas* sp. EB172 in vivo under transmission electron microscope. *Int J Polym Anal Charact* 16(4):228–238. <https://doi.org/10.1080/1023666X.2011.569990>
- Nowroth V, Marquart L, Jendrosseck D (2016) Low temperature-induced viable but not culturable state of *Ralstonia eutropha* and its relationship to accumulated polyhydroxybutyrate. *FEMS Microbiol Lett* 363:fny249. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny249>
- Obruca S, Sedlacek P, Mravec F, Samek O, Marova I (2016a) Evaluation of 3-hydroxybutyrate as an enzyme-protective agent against heating and oxidative damage and its potential role in stress response of poly(3-hydroxybutyrate) accumulating cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 100(3):1365–1376. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7162-4>
- Obruca S, Sedlacek P, Krzyzanek V, Mravec F, Hrubanova K, Samek O, Kucera D, Benesova P, Marova I (2016b) Accumulation of poly (3-hydroxybutyrate) helps bacterial cells to survive freezing. *PLoS One* 11(6):e0157778. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157778>
- Obruca S, Sedlacek P, Mravec F, Krzyzanek V, Nebesarova J, Samek O, Kucera D, Benesova P, Hrubakova K, Milerova M, Marova I (2017) The presence of PHB granules in cytoplasm protects non-halophilic bacterial cells against the harmful impact of hypertonic environments. *New Biotechnol* 39:68–80. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.07.008>

- Panda B, Sharma L, Mallick N (2005) Poly- β -hydroxybutyrate accumulation in *Nostoc muscorum* and *Spirulina platensis* under phosphate limitation. *J Plant Physiol* 162(12):1376–1379. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.05.002>
- Panuschka S, Drosch B, Ellersdorfer M, Meixner K, Fritz I (2019) Photoautotrophic production of poly-hydroxybutyrate – first detailed cost estimations. *Algal Res* 41:101558. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101558>
- Pärnänen K, Karkman A, Virta M, Eronen-Rasimus E, Kaartokallio H (2015) Discovery of bacterial polyhydroxyalkanoate synthase (PhaC)-encoding genes from seasonal Baltic Sea ice and cold estuarine waters. *Extremophiles* 19:197–206. <https://doi.org/10.1007/s00792-014-0699-9>
- Pavez P, Castillo JL, González C, Martínez M (2009) Poly- β -hydroxyalkanoate exert a protective effect against carbon starvation and frozen conditions in *Sphingopyxis chilensis*. *Curr Microbiol* 59: 636–640. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9485-9>
- Peplinski K, Ehrenreich A, Doring C, Bomeke M, Reinecke F, Huttmacher C, Steinbüchel A (2010) Genome-wide transcriptome analyses of the “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16 with regard to polyhydroxyalkanoate metabolism. *Microbiol* 156(7): 2136–2152. <https://doi.org/10.1099/mic.0.038380-0>
- Pernicova I, Novackova I, Sedlacek P, Kourilova X, Koller M, Obruca S (2020) Application of osmotic challenge for enrichment of microbial consortia in polyhydroxyalkanoates producing thermophilic and thermotolerant bacteria and their subsequent isolation. *Int J Biol Macromol* 144:698–704. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.128>
- Pfeiffer D, Jendrosseck D (2014) PhaM is the physiological activator of poly (3-hydroxybutyrate)(PHB) synthase (PhaC1) in *Ralstonia eutropha*. *Appl Environ Microbiol* 80(2):555–563. <https://doi.org/10.1128/AEM.02935-13>
- Pham TH (2004) The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. *Microbiology* 150:3405–3413. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27357-0>
- Poirier Y, Dennis DE, Klomparens K, Somerville C (1992) Polyhydroxybutyrate, a biodegradable thermoplastic, produced in transgenic plants. *Science* 256(5056):520–523. <https://doi.org/10.1126/science.256.5056.520>
- Porter M, Jian Y (2011a) Crystallization kinetics of poly (3-hydroxybutyrate) granules in different environmental conditions. *J Biomat Nanobiotechnol* 2(03):301. <https://doi.org/10.4236/jbnt.2011.23037>
- Porter M, Jian Y (2011b) Monitoring the *in situ* crystallization of native biopolyester granules in *Ralstonia eutropha* via infrared spectroscopy. *J Microbiol Methods* 87(1):49–55. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.07.009>
- Pötter M, Steinbüchel A (2006) Biogenesis and structure of polyhydroxyalkanoate granules. In: Shively JM (ed) Inclusions in prokaryotes. Microbiology Monographs vol 1. Springer, Berlin. https://doi.org/10.1007/3-540-33774-1_5
- Pötter M, Madkour MH, Mayer F, Steinbüchel A (2002) Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology* 148(8):2413–2426. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-8-2413>
- Prieto A, Escapa IF, Martínez V, Dinjaski N, Herencias C, de la Peña F, Tarazona N, Revelles O (2016) A holistic view of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* 18(2):341–357. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12760>
- Pulz O (2001) Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 57(3):287–293. <https://doi.org/10.1007/s002530100702>
- Rehm BH (2003) Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochem J* 376(1):15–33. <https://doi.org/10.1042/bj20031254>
- Rehm BH, Steinbüchel A (1999) Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *Int J Biol Macromol* 25(1–3):3–19. [https://doi.org/10.1016/s0141-8130\(99\)00010-0](https://doi.org/10.1016/s0141-8130(99)00010-0)
- Remsen CC (1966) The fine structure of frozen-etched *Bacillus cereus* spores. *Arch Mikrobiol* 54(3):266–275. <https://doi.org/10.1007/BF00408999>
- Rothermic MM, Guerrero R, Lenz RW, Goodwin S (2000) Characterization, seasonal occurrence, and diel fluctuation of poly(hydroxyalkanoate) in photosynthetic microbial mats. *Appl Environ Microbiol* 66:4279–4291. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4279-4291.2000>
- Ruiz JA, Lopez NI, Fernandez RO, Mendez BS (2001) Polyhydroxyalkanoate degradation is associated with nucleotide accumulation and enhances stress resistance and survival of *Pseudomonas oleovorans* in natural water microcosms. *Appl Environ Microbiol* 67:225–230. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.225-230.2001>
- Saponetti MS, Bobba F, Salerno G, Scarfato A, Corcelli A, Cucoclo A (2011) Morphological and structural aspects of the extremely halophilic archaeon *Haloquadratum walsbyi*. *PLoS One* 6(4):e18653. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018653>
- Schubert P, Steinbüchel A, Schlegel HG (1988) Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly-beta-hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 170(12):5837–5847. <https://doi.org/10.1128/jb.170.12.5837-5847.1988>
- Sedlacek P, Slaninova E, Enev V, Koller M, Nebesarova J, Marova I, Hrubanova K, Krzyzanek V, Samek O, Obruca S (2019a) What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments. *Appl Microbiol Biotechnol* 103(4):1905–1917. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-09584-z>
- Sedlacek P, Slaninova E, Koller M, Nebesarova J, Marova I, Krzyzanek V, Obruca S (2019b) PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances. *New Biotechnol* 49:129–136. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.10.005>
- Silvestrini L, Drosch B, Fritz I (2016) Identification of four polyhydroxyalkanoate structural genes in *Synechocystis cf. salina* PCC6909: *in silico* evidences. *J Proteomics Bioinform* 9(2):28–37. <https://doi.org/10.4172/jpb.1000386>
- Slaninova E, Sedlacek P, Mravec F, Mullerova L, Samek O, Koller M, Hesko O, Kucera D, Marova I, Obruca S (2018) Light scattering on PHA granules protects bacterial cells against the harmful effects of UV radiation. *Appl Microbiol Biotechnol* 102(4):1923–1931. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8760-8>
- Slepecky RA, Law JH (1961) Synthesis and degradation of poly- β -hydroxybutyric acid in connection with sporulation of *Bacillus megaterium*. *J Bacteriol* 82:37–42. <https://doi.org/10.1128/JB.82.1.37-42.1961>
- Smith EG (1976) Pulsed NMR studies of molecular motion in wet nylon-6, 6 fibres. *Polymer* 17(9):761–767. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(76\)90030-6](https://doi.org/10.1016/0032-3861(76)90030-6)
- Soto G, Setten L, Lisi C, Maurelis C, Mozzicafreddo M, Cuccioloni M, Angeletti M, Ayub ND (2012) Hydroxybutyrate prevents protein aggregation in the halotolerant bacterium *Pseudomonas* sp. CT13 under abiotic stress. *Extremophiles* 16:455–462. <https://doi.org/10.1007/s00792-012-0445-0>
- Stal LJ (2012) Cyanobacterial mats and stromatolites. In: Whitton BA (ed) Ecology of cyanobacteria II. Springer, Dordrecht, pp 65–125
- Stanley SM (1999) Earth system history. Freeman, New York
- Stuart ES, Foster LJR, Lenz RW, Fuller RC (1996) Intracellular depolymerase functionality and location in *Pseudomonas oleovorans* inclusions containing polyhydroxyoctanoate. *Int J Biol Macromol* 19:171–176. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(96\)01124-5](https://doi.org/10.1016/0141-8130(96)01124-5)

- Stubbe JA, Tian J (2003) Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis: the role of the PHA synthase. *Nat Prod Rep* 20(5):445–457. <https://doi.org/10.1039/B209687K>
- Sudesh K, Abe H, Doi Y (2000a) Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog Polym Sci (Oxford)* 25(10):1503–1555. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(00\)00035-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(00)00035-6)
- Sudesh K, Fukui T, Iwata T, Doi Y (2000b) Factors affecting the freeze-fracture morphology of *in vivo* polyhydroxyalkanoate granules. *Can J Microbiol* 46(4):304–311. <https://doi.org/10.1139/w99-150>
- Sudesh K, Taguchi K, Doi Y (2001) Can cyanobacteria be a potential PHA producer? *RIKEN Review* 42:75–76
- Tal S, Okon Y (1985) Production of the reserve material poly- β -hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. *Can J Microbiol* 31:608–613. <https://doi.org/10.1139/m85-115>
- Taroncher-Oldenburg G, Nishina K, Stephanopoulos G (2000) Identification and analysis of the polyhydroxyalkanoate-specific β -ketothiolase and acetoacetyl coenzymeA reductase genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Appl Environ Microbiol* 66(10):4440–4448. <https://doi.org/10.1128/aem.66.10.4440-4448.2000>
- Tian J, Sinskey AJ, Stubbe J (2005) Kinetic studies of polyhydroxybutyrate granule formation in *Wautersia eutropha* H16 by transmission electron microscopy. *J Bacteriol* 187(11):3814–3824. <https://doi.org/10.1128/JB.187.11.3814-3824.2005>
- Tribelli PM, López NI (2011) Poly(3-hydroxybutyrate) influences biofilm formation and motility in the novel Antarctic species *Pseudomonas extremaustralis* under cold conditions. *Extremophiles* 15:541–547. <https://doi.org/10.1007/s00792-011-0384-1>
- Tribelli PM, Pezzoni M, Brito MG, Montesinos NV, Costa CS, Lopez NI (2019) Response to lethal UVA radiation in the Antarctic bacterium *Pseudomonas extremaustralis*: polyhydroxybutyrate and cold adaptation as protective factors. *Extremophiles* 24:1–11. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01152-1>
- Troschl C, Meixner K, Drosch B (2017) Cyanobacterial PHA production—review of recent advances and a summary of three years’ working experience running a pilot plant. *Bioengineering (Basel)* 4(2):26. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4020026>
- Umeneta J, Mas-Castella J, Guerrero R (1995) Biodegradation of poly-(beta)-hydroxyalkanoates in a lake sediment sample increases bacterial sulfate reduction. *Appl Environ Microb* 61:2046–2048. <https://doi.org/10.1128/AEM.61.5.2046-2048.1995>
- van Gool AP, Lambert R, Laudelout H (1969) The fine structure of frozen etched Nitrobacter cells. *Arch Microbiol* 69(4):281–293. <https://doi.org/10.1007/BF00408570>
- Wang Q, Yu H, Xia Y, Kang Z, Qi Q (2009) Complete PHB mobilization in *Escherichia coli* enhances the stress tolerance: a potential biotechnological application. *Microb Cell Factories* 8:47. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-47>
- Wieczorek R, Pries A, Steinbüchel A, Mayer F (1995) Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* 177(9):2425–2435
- Wu D, He J, Gong Y, Chen D, Zhu X, Qiu N, Sun M, Li M, Yu Z (2011) Proteomic analysis reveals the strategies of *Bacillus thuringiensis* YBT-1520 for survival under long-term heat stress. *Proteomics* 11:2580–2591. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000392>
- Xiao N, Jiao N, Liu Y (2015) *In vivo* and *in vitro* observations of polyhydroxybutyrate granules formed by *Dinoroseobacter* sp. JL 1447. *Int J Biol Macromol* 74:467–475. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.11.045>
- Xu F, Huang S, Liu Y, Zhang Y, Chen S (2014) Comparative study on the production of poly(3-hydroxybutyrate) by thermophilic *Chelatococcus daeguensis* TAD1: a good candidate for large-scale production. *Appl Microbiol Biotechnol* 98(9):3965–3974. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5524-y>
- Yamane T (1993) Yield of poly-D(-)-3-hydroxybutyrate from various carbon sources: a theoretical study. *Biotechnol Bioeng* 41:165–170. <https://doi.org/10.1002/bit.260410122>
- York GM, Junker BH, Stubbe JA, Sinskey AJ (2001a) Accumulation of the PhaP phasin of *Ralstonia eutropha* is dependent on production of polyhydroxybutyrate in cells. *J Bacteriol* 183(14):4217–4226. <https://doi.org/10.1128/JB.183.14.4217-4226.2001>
- York GM, Stubbe J, Sinskey AJ (2001b) New insight into the role of the PhaP phasin of *Ralstonia eutropha* in promoting synthesis of polyhydroxybutyrate. *J Bacteriol* 183(7):2394–2397. <https://doi.org/10.1128/JB.183.7.2394-2397.2001>
- York GM, Stubbe J, Sinskey AJ (2002) The *Ralstonia eutropha* PhaR protein couples synthesis of the PhaP phasin to the presence of polyhydroxybutyrate in cells and promotes polyhydroxybutyrate production. *J Bacteriol* 184(1):59–66
- Zhao YH, Li HM, Qin LF, Wang HH, Chen G-Q (2007) Disruption of the polyhydroxyalkanoate synthase gene in *Aeromonas hydrophila* reduces its survival ability under stress conditions. *FEMS Microbiol Lett* 276:34–41. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00904.x>
- Zhao H, Wei H, Liu X, Yao Z, Xu M, Wei D, Wang J, Wang X, Chen G-Q (2016) Structural insights on PHA binding protein PhaP from *Aeromonas hydrophila*. *Sci Rep* 6:39424. <https://doi.org/10.1038/srep39424>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

7 SEZNAM ZKRATEK

3HB	3-hydroxybutyrát
3HV	3-hydroxyvalerát
4HB	4-hydroxybutyrát
BER	excisní reparace bází
CoA	koenzym A
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dPHA	denaturované PHA
DSC	diferenciální skenovací kalorimetrie
DVS	dynamická sorpční analýza par
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
i-nPHA	intracelulární nativní PHA
iTGA	izotermální termogravimetrická analýza
kryoSEM	kryo skenovací elektronová mikroskopie
lcl-PHA	long-chain-length
mcl-PHA	medium-chain-length
NER	nukleotidová excisní reparace
nPHA	nativní PHA
P3HB	poly(3-hydroxybutyrát)
PHA	polyhydroxyalkanoáty
RH	relativní vlhkost
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
scl-PHA	short-chain-length
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
T _g	teplota skelného přechodu
T _m	teplota tání
UV	ultrafialové záření
UVR	UV rezistence

8 PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORKY

a) Publikace v recenzovaných časopisech s impaktovaným faktorem

SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; MÜLLEROVÁ, L.; SAMEK, O.; KOLLER, M.; HESKO, O.; KUČERA, D.; MÁROVÁ, I.; OBRUČA, S. Light scattering on PHA granules protects bacterial cells against the harmful effects of UV radiation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, roč. 102, č. 4, s. 1923-1931. ISSN: 1432-0614. 33

SEDLÁČEK, P.; SLANINOVÁ, E.; ENEV, V.; KOLLER, M.; NEBESAROVA, J.; KRZYZANEK, V.; SAMEK, O.; MÁROVÁ, I.; OBRUČA, S. What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 2019, roč. 103, č. 4, s. 1905-1917. ISSN: 0175-7598.

SEDLÁČEK, P.; SLANINOVÁ, E.; KOLLER, M.; NEBESAROVA, J.; MÁROVÁ, I.; KRZYZANEK, L.; OBRUČA, S. PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances. *New Biotechnology*, 2019, roč. 49, č. 3, s. 129-136. ISSN: 1871-6784.

PERNICOVÁ, I.; NOVÁČKOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; KOUŘILOVÁ, X.; KALINA, M.; KOVALČÍK, A.; KOLLER, M.; NEBESAROVA, J.; KRZYZANEK, V.; HRUBANOVA, K.; MÁŠILKO, J.; SLANINOVÁ, E.; OBRUČA, S. Introducing the Newly Isolated Bacterium *Aneurinibacillus* sp. H1 as an Auspicious Thermophilic Producer of Various Polyhydroxyalkanoates (PHA) Copolymers-1. Isolation and Characterization of the Bacterium. *Polymers*, 2020, roč. 12, č. 6, s. 1-13. ISSN: 2073-4360.

SEDLÁČEK, P.; PERNICOVÁ, I.; NOVÁČKOVÁ, I.; KOUŘILOVÁ, X.; KALINA, M.; KOVALČÍK, A.; KOLLER, M.; NEBESAROVA, J.; KRZYZANEK, V.; HRUBANOVA, K.; MÁŠILKO, J.; SLANINOVÁ, E.; TRUDIČOVÁ, M.; OBRUČA, S. Introducing the Newly Isolated Bacterium *Aneurinibacillus* sp. H1 as an Auspicious Thermophilic Producer of Various Polyhydroxyalkanoates (PHA) Copolymers-2. Material Study on the Produced Copolymers. *Polymers*, 2020, roč. 12, č. 6, s. 1-18. ISSN: 2073-4360.

OBRUČA, S.; SEDLÁČEK, P.; SLANINOVÁ, E.; FRITZ, I.; DAFFERT, C.; MEIXNER, K.; ŠEDRLOVÁ, Z.; KOLLER, M. Novel unexpected functions of PHA granules. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 2020, roč. 104, č. 11, s. 4795-4810. ISSN: 0175-7598.

b) Konferenční příspěvky

SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; HESKO, O.; MÜLLEROVÁ, L.; OBRUČA, S. Accumulation of PHA granules protects bacterial cells from adverse effect of UV-irradiation. 6th Central European Congress of life Sciences Eurobiotech. Krakow: 2017. s. 166-166.

OBRUČA, S.; RUCKÁ, M.; MRÁZOVÁ, K.; **SLANINOVÁ, E.**; SAMEK, O.; KROUSKÁ, J.; KRZYZANEK, V. Role of polyhydroxyalkanoates in biofilm formation of *Burholderia cepacia* and *Burholderia sacchari*. EUROBIOTECH 6th Central European Congress of Life Sciences Eurobiotech: Programme and abstract book. 1. Krakow: Targi w Krakowie, 2017. s. 163-163.

OBRUČA, S.; KUČERA, D.; PERNICOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; SAMEK, O.; KRZYZANEK, V.; NEBESAROVA, J.; MÜLLEROVÁ, L.; CHYTILOVÁ, A.; **SLANINOVÁ, E.**; MÁROVÁ, I. Capability of polyhydroxyalkanoates accumulation enhances stress resistance and cell robustness of bacteria. Eurobiotech: Programme and Abstract Book. 1. Krakow: Targi w Krakowie, 2017. s. 154-154.

SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; NEBESÁŘOVÁ, J.; KRZYŤÁNEK, V.; OBRUČA, S. Utilization of TEM to observe morphological changes of bacterial cells containing PHA granules which were exposed to various stress factors. XVIII. setkání biochemiků a molekulárních biologů. Brno: Masarykova univerzita, 2017. s. 86-86. ISBN: 978-80-210- 8765-1.

OBRUČA, S.; KUČERA, D.; BENEŠOVÁ, P.; PERNICOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; SAMEK, O.; KRZYZANEK, V.; MÜLLEROVÁ, L.; CHYTILOVÁ, A.; **SLANINOVÁ, E.** *Integrating production of PHA into bio-refinery concept: considering the impact of non-optimal cultivation conditions*. 9th European Symposium on Biopolymers: Book of Abstracts. 1. Toulouse, Francie: 2017. s. 28-29.

SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. Mysterious Amorphous State of Native Granules of Polyhydroxyalkanoates and Its Transitions Into Crystalline State. 2018. ISBN: 978-80-86238-83-8.

SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. Polyhydroxyalkanoates – microbial polyesters with multiple protective functions for bacterial cells. Czech chemical society symposium series. Hradec Králové: Česká společnost chemická, 2018. s. 1-48. ISSN: 2336-7202.

FRYŠOVÁ, E.; ČERNÁ, K.; **SLANINOVÁ, E.**; CHYTILOVÁ, A.; OBRUČA, S. Studium adsorpčních vlastností vybraných probiotických bakterií. Tomáškovy dny 2018 XXVII. konference mladých mikrobiologů. 2018. s. 74-74. ISBN: 978-80-210-8963-1.

SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S.; KOCHERBITOV, V. *Effects of hydration of sodium 3-hydroxybutyrate on phase transitions connected to cryoprotectivity of microorganisms*. 7th Meeting on Chemistry and Life 2018. Book of abstracts. Purkyňova 464/118, 612 00 Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. s. 85-85. ISBN: 978-80-214-5488-0.

FRYŠOVÁ, E.; ČERNÁ, K.; **SLANINOVÁ, E.**; CHYTILOVÁ, A.; OBRUČA, S. *Characterization of adsorption properties of probiotic bacteria*. 7th Meeting on Chemistry and Life 2018. Book of abstract. 2018. s. 135-135. ISBN: 978-80-214-5488-0.

SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. *Polyhydroxyalkanoates –microbial polyesters with a complex protective effect against diverse stress factors*. XIX. setkání biochemiků a molekulárních biologů. Trnkova 119, 628 00 Brno-Líšeň: Tiskárna Didot, spol. s. r. o., 2018. s. 44-44. ISBN: 978-80-210-9069-9.

SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; HESKO, O.; MÜLLEROVÁ, L.; OBRUČA, S. *Protective effect of PHA granules in bacterial cells against UV-irradiation investigated by various spectral techniques*. Straubing: C.A.R.M.E.V. e.V., 2019. s. 88-88.

SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. Causes and consequences of unique amorphous state of native granules of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its transitions into crystalline state. The Biomania Student scientific meeting - Eusynbios symposium 2019. 1th. 2019. s. 116-117. ISBN: 9788021093737.

NOVÁČKOVÁ, I.; CHATRNÁ, V.; SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; SAMEK, O.; OBRUČA, S. *Approaches of evolutionary engineering for adaptation of Cupriavidus necator H16 to biotechnologically relevant stressors*. XXIX. konference mladých mikrobiologů TOMÁŠKOVY DNY 2020. 1. Brno: Masarykova univerzita, 2020. s. 45-45. ISBN: 978-80-210-9611-0.

ŠEDRLOVÁ, Z.; SLANINOVÁ, E.; FRITZ, I.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. *Mixotrophic growth and increased salinity – possible tools for increasing the PHB production in cyanobacteria?*. Studentská odborná konference CHEMIE JE ŽIVOT 2020. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, 2020. s. 134-135. ISBN: 978-80-214-592.

SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; ČERNAYOVÁ, D.; ŠEDRLOVÁ, Z.; OBRUČA, S.; KRZYŽÁNEK, V.; NEBESÁŘOVÁ, J. *Production and Characterization of Polyhydroxybutyrate in Cyanobacteria*. Tomáškovy dny 2020XXIX. konference mladých mikrobiologů. 1. Brno: Masarykova Univerzita, 2020. s. 51-51. ISBN: 978-80-210-9611-0.

ŠEDRLOVÁ, Z.; SLANINOVÁ, E.; DRINKA, J.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. *Cyanobakterie produkující PHA aneb může „zasolení“ zvýšit produkci PHA?*. XXIX. konference mladých mikrobiologů Tomáškovy dny 2020. 1. Brno: Masarykova univerzita, 2020. s. 53-53. ISBN: 978-80-210-9611-0.

c) Závěrečné práce:

SLANINOVÁ, E. Studium struktury a vlastností vody v blízkosti hydrofilních povrchů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 43 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

SLANINOVÁ, E. Využití fyzikálně-chemických analýz při studiu stresových odpovědí mikroorganismů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 73 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.



EVA SLANINOVÁ

KONTAKTNÍ INFORMACE

Mobil: +420 724514123
Email: xcslaninovae@vutbr.cz
Adresa: Doubravník 77, 592 61

JAZYKY

Angličtina (aktivní znalost)
Španělština (mírně pokročilá)
Čeština (rodilý mluvčí)

SCHOPNOSTI

Software: MS Office, Matlab, Origin
Řidičský průkaz skupiny B
Prezentace
Čestné a kolegiální vystupování
Schopnost týmové práce
Samostatnost
Schopnost vedení lidí

ZÁJMY

plavání
běh
četba
horolezectví

PROFIL

Jsem studentkou doktorského programu chemie a technologie potravin na Vysokém učení technickém v Brně a můj výzkum se soustředí na fyzikálně-chemické vlastnosti bakteriálních polymerů polyhydroxyalkanoátů a jejich vlivu na produkující buňky. Během studia jsem získala pokročilé znalosti v oblasti analytické chemie, fyzikální chemie a biochemie.

VZDĚLÁNÍ

Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně

Doktorský studijní obor: Potravinářská chemie
Téma dizertační práce: Metabolická a biofyzikální charakterizace bakteriálních buněk schopných akumulace PHA 2016-současnost

Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně

Magisterský navazující program: Chemie pro medicínské aplikace
Téma diplomové práce: Využití fyzikálně-chemických analýz při studiu stresových odpovědí mikroorganismů 2014-2016

Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně

Bakalářský program: Chemie pro medicínské aplikace
Téma bakalářské práce: Studium struktury a vlastností vody v blízkosti hydrofilních povrchů 2011-2014

VĚDECKÁ PRAXE A ZAHRANIČNÍ STÁŽE

Centrum materiálového výzkumu

Výzkumný pracovník, 2015 - současnost
Zapojení PHA do stresové odpovědi mikrobiálních buněk

University of Stuttgart, Německo

Stáž, Březen - Srpen 2019
- molekulární biologie

Malmö University, Švédsko

Stáž, Únor - Červen 2017
- pokročilé metody termické analýzy (DSC, DVS, sorpční kalorimetrie)

NTNU University, Norsko

Erasmus+, Srpen 2014 - Červen 2015
- mikrobiophysikální analýzy

OCENĚNÍ

cena děkana za vynikající studijní výsledky

2018

oceněný poster

konferenci 10th European Symposium on Biopolymers 2019, Straubing, Německo