



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

**IDENTIFIKACE A IZOLACE PHA PRODUKUJÍCÍCH
BAKTERIÍ**

IDENTIFICATION AND ISOLATION OF PHA PRODUCING BACTERIA

TEZE

THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Iva Pernicová

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2021

Abstrakt

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou mikrobiální zásobní polyestery, které mohou představovat obnovitelnou a ekologicky šetrnou alternativu k petrochemickým plastům. Jejich výroba a využití jsou do velké míry znevýhodněny vysokou produkční cenou. Jednou z možností, jak snížit cenu produkce PHA, je využití extrémofilních PHA producentů, které s sebou přináší především výhody vyplývající z vysoké robustnosti procesu vůči mikrobiální kontaminaci. V předložené práci byla pozornost zaměřena na studium produkce PHA pomocí vybraných halofilních a termofilních mikroorganismů. Z halofilních mikroorganismů byly testovány především vybraní sbírkoví zástupci rodu *Halomonas*, a to vzhledem k jejich možnému využití k produkci PHA z levného odpadního fritovacího oleje. Byli identifikováni dva slibní PHA producenti, a to konkrétně *Halomonas hydrothermalis* a *Halomonas neptunia*. Oba kmeny dosahovaly v rámci baňkových experimentů solidních výtěžků PHA a při přidavku vhodných strukturních prekurzorů byly také schopny produkce kopolymerů se zajímavými materiálovými vlastnostmi. Hlavní důraz byl však v práci kladen na studium produkce PHA pomocí termofilních mikroorganismů. V rámci práce byla provedena izolace termofilních PHA producentů z různých termofilních konsorcií (aktivní kal, kompost atd.). V průběhu izolačních experimentů byl navržen originální izolační postup využívající změny osmotického tlaku tzv. osmoselektce. Touto originální cestou bylo získáno několik desítek slibných termofilních producentů PHA, kteří byli taxonomicky zařazeni pomocí sekvenace genu *16S rRNA* a byl u nich testován PHA produkční potenciál. Nejslibnějším PHA producentem byl izolát klasifikovaný jako *Aneurinibacillus* sp. H1. K produkci PHA pomocí *Aneurinibacillus* sp. H1 lze využít řadu substrátů včetně odpadního glycerolu. Ještě významnější je schopnost syntetizovat kopolymery s vysokým obsahem 4-hydroxybutyrátu. Monomerní složení PHA kopolymeru, a tím i materiálové vlastnosti připraveného kopolymeru, je možné kontrolovat vhodným nastavením kultivačních podmínek. Připravený kopolymer P(3HB-co-4HB) má unikátní vlastnosti a velký aplikační potenciál v řadě high-end aplikací například v oblasti péče o zdraví, potravinářství nebo kosmetice.

Klíčová slova

Polyhydroxyalkanoáty, extrémofilní mikroorganismy, termofilní bakterie, izolace bakterií

Abstract

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are microbial storage polyesters that represent a renewable and environmentally friendly alternative to petrochemical plastics. However, their production and use are severely disadvantaged by the high production cost. The use of extremophilic PHA producers is one of the ways to reduce the cost of PHA production. Extremophiles bring numerous advantages resulting from the high robustness of the process against microbial contamination. In this doctoral thesis, attention was focused on the study of PHA production using selected halophilic and thermophilic microorganisms. Representatives of the genus *Halomonas* were mainly from public collections of microorganisms. Two promising PHA producers on waste frying oil were identified, namely *Halomonas hydrothermalis* and *Halomonas neptunia*. Both strains achieved good PHA yields in flask experiments. With the addition of suitable structural precursors, they were also able to produce copolymers with interesting material properties. However, in the proposed thesis, the main emphasis was placed on the study of PHA production using thermophilic microorganisms. As a part of the work, the isolation of thermophilic PHA producers from various thermophilic consortia (active sludge, compost, etc.) was performed. During isolations experiments, an original isolation procedure was designed using changes in osmotic pressure, the so-called osmoselection. Dozens of promising thermophilic PHA producers were obtained thanks to this original approach. They were taxonomically classified using *16S rRNA* and tested for production potential. The most promising PHA producer was the isolate which was classified as *Aneurinibacillus* sp. H1. This bacterium is able to utilize a variety of substrates, including waste glycerol, to produce PHA. Even more important is the capability of synthesizing copolymers with a high content of 4-hydroxybutyrate. The monomer composition of the PHA copolymer and thus the material properties of the prepared copolymer can be controlled by suitable adjustment of the cultivation conditions. The prepared copolymer P(3HB-co-4HB) has unique properties and the great application potential in numerous high-end applications, for example in the field of health care, food industry or cosmetics.

Keywords

Polyhydroxyalkanoates, extremophilic microorganism, thermophilic bacteria, isolation of bacteria

OBSAH

1.	ÚVOD.....	5
2.	TEORETICKÁ ČÁST.....	6
2.1.	POLYHYDROXYALKANOÁTY.....	6
2.1.1.	PHA syntázy.....	6
2.2.	ZPŮSOBY IDENTIFIKACE PHA U BAKTERIÍ.....	7
2.2.1.	Infračervená spektrometrie.....	7
2.2.2.	Molekulární techniky.....	8
2.3.	EXTRÉMOFILNÍ MIKROORGANISMY.....	8
3.	NEJVÝZNAMNĚJŠÍ VÝSLEDKY A JEJICH DISKUSE	11
3.1.	PRODUKCE PHA NA ODPADNÍM FRITOVACÍM OLEJI POMOCÍ VYBRANÝCH ZÁSTUPCŮ RODU <i>HALOMONAS</i>	11
3.2.	IZOLACE TERMOFILNÍCH PRODUCENTŮ POLYHYDROXYALKANOÁTŮ Z PŘÍRODNÍCH VZORKŮ.....	13
3.2.1.	Aerobní dynamické krmení.....	14
3.2.2.	Izolace pomocí změn osmotického tlaku.....	16
3.2.3.	Testování produkce PHA u vybraných izolátů.....	19
3.3.	CHARAKTERISTIKA A SCREENING PRODUKCE PHA IZOLÁTŮ S OZNAČENÍM H1, H2 A K2.....	21
3.3.1.	Produkce kopolymerů PHA pomocí izolátů K2, H1 a H2.....	22
3.3.2.	Optimalizace produkce a produkční potenciál izolátu H1.....	23
4.	ZÁVĚR	30
5.	LITERATURA	32
6.	ŽIVOTOPIS.....	40
7.	SEZNAM PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI	41

1. ÚVOD

Znečištění životního prostředí plasty je jedním z nejnaléhavějších problémů této doby. Nejenže, celosvětově stoupá výroba plastů, ale stoupá také procento odpadu, které končí právě v životním prostředí, kde dochází k jeho akumulaci. Značnou část tohoto odpadu tvoří plasty a výrobky na jedno použití. Jejich aktivní použití trvá většinou několik minut, nicméně v životním prostředí setrvávají až stovky let. Přitom lze toto znehodnocování přírody omezit, ne-li zastavit úplně, pomocí snížení výroby a použití rezistentních syntetických plastů a/nebo nahrazením těchto materiálů ekologicky šetrnějšími alternativami. Ovšem plasty lze nahradit i jinými polymery, které mají podobné mechanické či fyzikální vlastnosti, ale jsou v přírodě rozložitelné a kompostovatelné. Jedná se o přírodní polymery. Mezi tyto alternativy k petrochemicky vyráběným polymerům patří také polyhydroxyalkanoáty (PHA). Jedná se o mikrobiální polyestery, které jsou plně biodegradabilní. Jsou produkovány širokým spektrem bakterií, kterým PHA slouží jako zásobní zdroj uhlíku a energie. Nicméně díky svým vlastnostem mohou být biotechnologicky vyrobené PHA slibnou alternativou k syntetickým polymerům, která má široké uplatnění v řadě odvětví. Své uplatnění nachází jednak jako obalový materiál, který je vhodný i pro potravinářské účely, ale především v medicíně, farmacii či kosmetickém průmyslu.

Nicméně produkce PHA je omezena konkurenceschopností výrobního procesu. Cenu produktu ovlivňuje mnoho parametrů. Mezi hlavní z nich patří náročnost na sterilitu biotechnologického procesu, cena zdroje uhlíku či produktivita daného použitého bakteriálního kmene. Jednou ze strategií, jak snížit cenu procesu, je použití levných uhlíkatých substrátů. Většinou se jedná o odpadní substráty z některého z agropotravinářského komplexu. Možností je opravdu mnoho a stačí jen nalézt vhodnou variantu pro daný proces. Jako substráty lze například využít odpadní rostlinné oleje, odpadní glycerol, syrovátku, melasu, ale i odpadní slámu či stébla kukuřice, otruby nebo kávovou sedlinu. Dalším důležitým parametrem je také použitý mikroorganismus, jeho produktivita, kultivační podmínky a metabolické nároky. Kromě běžně „dostupných“ kultur, které se často používají pro biotechnologické procesy, se v poslední době dostaly do středu zájmu také extrémofilní mikroorganismy. Díky svým unikátním schopnostem jsou schopny nejen přežít, ale také růst a prosperovat v extrémních podmínkách. Z hlediska biotechnologického procesu ovšem přinášejí ještě jednu nespornou výhodu, a tím je snížení nákladů na sterilitu procesu. Díky tomu, že prosperují v extrémních podmínkách, nejsou procesy založené na extrémofilech ohroženy běžnou kontaminací, která v těchto podmínkách nemá šanci přežít. Proto je možné vést biotechnologické procesy v semi-sterilních nebo dokonce v nesterilních podmínkách.

Přesto však nejsou extrémofily, především v kontextu produkce PHA, dostatečně prozkoumány. Proto se tato práce zaměřuje na studium produkce PHA pomocí vybraných sbírkových halofilních mikroorganismů, ale také na izolaci termofilních producentů PHA z přírodních konsorcií.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou biodegradabilní a biokompatibilní polymery, které jsou syntetizovány ve formě intracelulárních granulí širokým spektrem bakterií a některými zástupci archea [1; 2]. Mikroorganismům granule PHA slouží jako zásobní zdroj uhlíku a energie a také navyšují robustnost bakteriálních buněk vůči řadě stresových faktorů [3]. PHA nezatěžují životní prostředí, navíc je lze považovat za alternativu k některým plastům vyráběných z ropy, protože mají vhodné chemické i fyzikální vlastnosti. Další výhodou PHA je výroba z obnovitelných, případně i odpadních surovin nebo vedlejších produktů. PHA lze využít na výrobu nádob, lahví a jiných obalů [4]. Díky jejich biologické rozložitelnosti je lze použít také v medicíně jako vstřebatelné chirurgické nitě či ve farmaceutickém průmyslu jako nosiče aktivních látek nebo hormonů v léčivech [5]. Právě biodegradabilita je jejich největší výhodou, která by mohla snížit znečištění a akumulaci odpadů vyrobených z nerozložitelných plastů [6].

Dnes známe asi 150 různých typů monomerů, které mohou být inkorporovány do struktury PHA [7]. Z chemického hlediska se jedná o lineární polyestery hydroxykyselin. PHA můžeme rozdělit podle počtu uhlíku v monomerní jednotce. První skupinou jsou takzvané scl-PHA (short chain length) neboli PHA s krátkým řetězcem, které mají v monomeru 3 až 5 uhlíků a jedním ze zástupců je například poly(3-hydroxybutyrát), který je nejvíce rozšířeným a nejznámějším zástupcem z PHA polymerů. Druhá skupina PHA obsahuje v monomerní jednotce 6 až 14 uhlíků v monomeru a nazývá se mcl-PHA (medium chain length) neboli PHA se středně dlouhým řetězcem, mezi zástupce této skupiny patří například homopolymery poly(3-hydroxyhexanoát), poly(3-hydroxyoktanoát) a heteropolymer poly(3-hydroxyhexanoát-co-3-hydroxyoktanoát) [8]. Obě skupiny se liší svými vlastnostmi. Scl-PHA mají obecně vysoký stupeň krystalinity, a tudíž jsou tuhé a křehké, zatímco mcl-PHA mají nízký stupeň krystalinity a jedná se o elastické materiály. Liší se také teplotou tání, která je obecně u mcl-PHA výrazně nižší než u scl-PHA. Obecně je vysoká teplota tání většiny scl-PHA považována za technologickou nevýhodu, protože teplotní okno pro tavení materiálu bez jeho degradace je velice úzké. Například homopolymer 3-hydroxybutyrátu má teplotu tání okolo 170 °C a jeho degradace začíná okolo 200 °C [9; 10]. Další skupinou jsou takzvané lcl-PHA, tedy polyhydroxyalkanoáty s dlouhým řetězcem. Monomer má více než 14 uhlíků, avšak tento typ je neobvyklý a málo prostudovaný [11].

2.1.1. PHA syntázy

PHA syntázy (PhaC) jsou klíčové enzymy při syntéze polyhydroxyalkanoátů. Zprostředkovávají polykondenzaci hydroxyalkanových monomerů do polymeru. PHA syntázy se mohou dělit na základě jejich podjednotkové kompozice, substrátové specifity, primární struktury a na základě kinetiky a mechanismu katalýzy do čtyř tříd [12].

PHA syntázy první třídy jsou reprezentovány charakteristickou PHA syntázou modelové bakterie *Cupriavidus necator* (dříve známá také jako *Ralstonia eutropha*, *Wautersia eutropha*

a *Alcaligenes eutrophus*). Tato třída enzymů má pouze jednu podjednotku, avšak je katalyticky aktivnější ve formě dimeru. Jedna podjednotka má molekulovou hmotnost od 60 do 73 kDa a je specifická pro biosyntézu scl-PHA. Z toho důvodu jsou jeho cílovým monomerním 3–5 uhlíku dlouhé 3-, 4- nebo 5-hydroxyalkanoáty. Nicméně i některé PHA syntázy třídy I mohou katalyzovat inkorporaci 3-hydroxyhexanoátu do struktury polymeru (např. *Rhodospirillum rubrum* či *Aeromonas caviae*) [13; 14].

PHA syntázy třídy II také obsahují jednu podjednotku o velikosti 60–65 kDa (kódovaná geny *phaC1*, *phaC2*), která polymeruje monomery za vzniku mcl-PHA. Tento typ PHA syntázy je charakteristický pro bakterie rodu *Pseudomonas* (např. *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas oleovorans*) [13; 15–17].

Enzymy třídy III jsou tvořeny dvěma podjednotkami (podjednotka C = PhaC a podjednotka E = PhaE) o molekulové hmotnosti přibližně 40 kDa. Podjednotka PhaC má podobné aminokyselinové složení jako PHA syntázy třídy I a II. PhaE nevykazuje žádnou sekvenční podobnost s ostatními PHA syntázami. Touto třídou enzymů jsou tvořeny polyhydroxyalkanoáty o velikosti 3 až 5 uhlíků (scl-PHA). Třetí třída byla objevena u halofilní bakterie *Allochromatium vinosum*, vyskytuje se však také u sinic či halofilních archeí jako jsou například archea rodu *Haloferax* či *Haloarcula* [14; 16; 18].

PHA syntázy třídy IV jsou charakteristické pro kmeny *Bacillus* sp. a tvoří je dvě různé podjednotky PhaC a PhaR. Liší se i molekulárními hmotnostmi, kdy PhaC podjednotka má 40 kDa, zatím co PhaR je poloviční (20 kDa). PHA syntázy čtvrté třídy jsou velmi rozmanité a lze je rozdělit do několika podskupin. Nejčastěji dochází k syntéze PHA s krátkým řetězcem [14; 18–20].

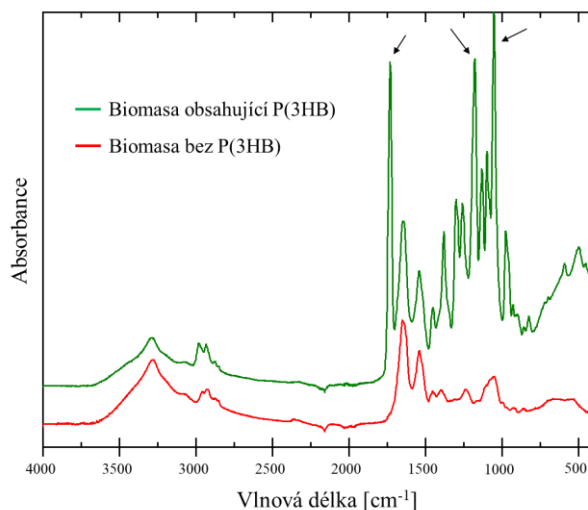
2.2. Způsoby identifikace PHA u bakterií

Při hledání nových producentů PHA, což byla jedna z klíčových aktivit této disertační práce, je důležitá identifikace PHA pozitivních buněk nebo kolonií, převážně pak ve směsných bakteriálních kulturách a konsorciích. Důležitým faktorem je potom rychlá a snadná identifikace dané kolonie, která produkuje PHA. Existuje několik způsobů identifikace PHA přímo v buňce bakterie bez nutnosti extrakce polymeru z bakteriální biomasy [12].

2.2.1. Infračervená spektrometrie

Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR) je rychlá metoda sloužící k identifikaci a případně také kvantifikaci PHA nejen ve směsných kulturách. Oproti klasickému stanovení PHA pomocí plynové chromatografie se jedná o rychlou metodu. Mezi její další výhody patří malé množství vzorku či absence jakýchkoli rozpouštědel [21]. Avšak její nevýhodou je citlivost metody k vodě, která vykazuje široký absorpční pás. Proto ve spektrech interferuje s řadou látek včetně PHA. Z toho důvodu je nutné vzorek před analýzou vysušit a tím dojde i k usmrcení bakterií.

Při analýze PHA dochází k intenzivnímu vstřebávání v pásech okolo 1724 cm^{-1} , kde dochází k absorpci C=O skupinami, které jsou pro PHA charakteristické. Doprovodné pásy jsou umístěny v blízkosti 1280 a 1165 cm^{-1} , kde se jedná o esterové vazby [22]. Porovnání spekter bakteriální biomasy, ve které je nebo není přítomen polyester P(3HB), je zobrazeno na obrázku 1. Černé šipky ukazují na charakteristické pásy pro identifikaci PHA v bakteriální biomase.



Obrázek 1: Porovnání spekter bakteriální biomasy naměřené pomocí FTIR. Zelená linka ukazuje spektrum bakteriální biomasy obsahující P(3HB), červená pak spektrum pro bakteriální biomasu bez P(3HB). Černé šipky ukazují na charakteristické pásy pro stanovení PHA v bakteriální biomase.

2.2.2. Molekulární techniky

Pomocí molekulárních technik lze zjistit na úrovni genotypu, zda daný mikroorganismus má potenciál produkovat PHA. Neberou však v potaz, zda je daný gen aktivní či nikoli nebo v jakém množství a za jakých kultivačních podmínek bude PHA syntetizováno. Pomocí molekulárních technik se nejčastěji stanovují či hledají geny kódující klíčové enzymy biosyntézy PHA, především pak PHA syntázy. Kvantifikace exprese genů zapojených do biosyntézy PHA lze realizovat pomocí polymerázové řetězové reakce s reverzní transkripcí (RT-qPCR) [23]. Mezi nejčastější molekulární metody patří Southernův přenos, fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) či PCR metoda.

2.3. Extrémofilní mikroorganismy

Extrémofilní mikroorganismy jsou organismy, které žijí v extrémních podmínkách prostředí. Jedná se o horké prameny, sopečné povrchy, podmořské průduchy, zasolená jezera či půdy a podobně. Některé mikroorganismy jsou dokonce schopny snášet více těchto extrémů, potom o nich hovoříme jako o polyextrémofilních mikroorganismech [24–26]. Rozdělení extrémofilních mikroorganismů zobrazuje tabulka 1.

Tabulka 1: Rozdělení extrémofilních mikroorganismů [24–26]

Extrémní podmínky	Označení	Optimum	Příklad
Teplota	hypertermofilní	> 80 °C	<i>Pyrolobus fumarii</i> (113 °C)
	termofilní	45/55/60 až 80 °C	<i>Synechococcus lividis</i>
	psychrofilní	<15 °C	rod <i>Micrococcus</i>
Salinita	halofilní	2–5 M NaCl	rod <i>Halomonas</i>
pH	alkalifilní	> 9	rod <i>Spirulina</i>
	acidofilní	<2–3	<i>Cyanidium caldarium</i>
Tlak	piezofilní/ barofilní	> 0,1 MPa	<i>Shewanella benthica</i>
Vysušení	xerofilní	bezvodé	<i>Artemia salina</i>
Chemické extrémy	kapnofilní	čistý CO ₂	<i>Cyanidium caldarium</i>
	metalofilní	(Zn, Co, Cd, Hg, Pb)	rody <i>Ralstonia</i> , <i>Cupriavidus</i>
Radiace	radiorezistentní		<i>Deinococcus radiodurans</i>

Extrémofilní mikroorganismy mají široké využití. Nejčastěji se používají k produkci enzymů – extrémozymů, které mají požadované vlastnosti a stabilitu i při vysoké teplotě či velmi nízkém pH apod. Například použití termostabilní DNA polymerázy z bakterie *Thermus aquaticus* umožnilo rozvoj polymerázové řetězové reakce a molekulárních technologií [24].

Použití extrémofilů má také výhody s ohledem na samotný biotechnologický proces. Díky extrémním podmínkám kultivace se snižuje riziko kontaminace mezofilními kmeny a nároky na sterilizaci systémů, což má pozitivní dopad na snížení nákladů výroby. Vzhledem ke sníženému riziku kontaminace je možné využít výhodné kontinuální nebo semi-kontinuální kultivační strategie [24–26]. Při biotechnologickém využití termofilů se navíc snižují náklady na chlazení a jejich vyšší teplota kultivace pozitivně ovlivňuje rozpustnost produktů a substrátu. Při použití termofilů například k výrobě ethanolu, se snižují náklady na získávání produktu, protože již při kultivaci okolo 70 °C dochází k těkání produktu, který je následně možné kontinuálně jímat v kondenzátorech. Výrazně se tak snižuje toxický efekt produktu během fermentace [27; 28]. Mezi extrémofilními organismy se také objevují producenti PHA. Největší

potenciál produkce PHA extrémofilními mikroorganismy mají halofilní bakterie či archea nebo termofilní bakterie [29; 30].

Průmyslová biotechnologie příští generace (NGIB z anglického Next Generation Industrial Biotechnology) je založena na bioprodukcí s nižšími náklady a tím i vyšší konkurenceschopností. Snížení nákladů umožňuje právě použití extrémofilů, protože mimo jiné lze produkce provádět v otevřených nesterilních podmínkách. NGIB také zahrnuje snížení spotřeby pitné vody či energie, upřednostňuje kontinuální výrobní procesy a využívá levné odpadní zdroje uhlíku [31; 32]. Obohacení směsných bakteriálních kultur o bakterie produkující PHA

Existuje mnoho rodů bakterií, které jsou schopny syntetizovat PHA a které jsou uchovány jako čisté izoláty. Tyto čisté kultury se používají pro průmyslovou výrobu PHA. Kromě čistých kultur se pro výrobu také používají rekombinantní bakterie, které poskytují určité výhody jako je vysoká hustota buněk, rychlý růst či nadprodukce PHA. Jako rekombinantní bakterie pro výrobu PHA se používají například *Escherichia coli* nebo *Cupriavidus necator* [33–35]. Avšak i genetické vylepšení bakteriálního kmene, nese s sebou jisté nevýhody. Výhodnější potřeby na krmení či snížení ekonomických nákladů snížením sterilizace zařízení poskytuje použití smíšené bakteriální kultury [34].

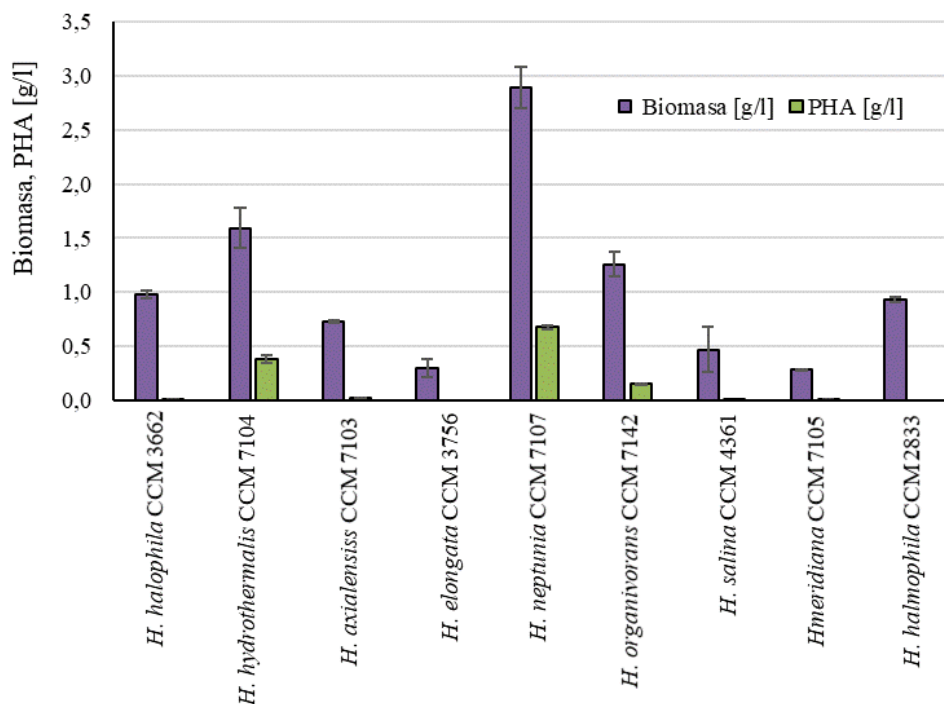
V posledních letech roste zájem o použití směsných kultur pro výrobu PHA. Jako vhodné směsné kultury jsou označovány směsná mikrobiální konsorcia, která jsou schopna významné akumulace PHA, přičemž se využívají speciální kultivační postupy, které favorizují růst PHA produkujících bakterií a akumulaci PHA. Pro využití směsných kultur pro výrobu PHA se nejdříve provádí jejich obohacení o bakterie produkující PHA[35].

3. NEJVÝZNAMNĚJŠÍ VÝSLEDKY A JEJICH DISKUSE

3.1. Produkce PHA na odpadním fritovacím oleji pomocí vybraných zástupců rodu *Halomonas*

Prvními extrémofilními mikroorganismy, u nichž byla v rámci této disertační práce studována produkce PHA byly halofilní mikroorganismy. Jedná se o mikroorganismy, které se adaptovaly na vyšší osmotický tlak prostředí. Celkové využití halofilních bakterií v biotechnologickém průmyslu nese řadu výhod, mezi které patří především snížení nákladů biotechnologického procesu díky možnosti využití mořské vody, snížení rizika kontaminace či koprodukce další využitelných metabolitů. Některé halofilní prokaryotní mikroorganismy jsou schopny produkce polyhydroxyalkanoátů [36]. Podle některých studií se zdá, že schopnost produkce PHA je dokonce jednou ze strategií buněk, jak se vyrovnat s osmotickým tlakem prostředí a je tedy součástí adaptační strategie některých halofilů [30; 37]. Využití halofilních bakterií k produkci intracelulárního produktu, jako jsou právě PHA, nese i řadu výhod spojených například s izolací finálních produktů – bakteriální buňky je možné snadno dezintegrovat s využitím hypotonické lyze. Mezi halofilními mikroorganismy existuje celá řada producentů PHA, jako je například *Haloferax mediterranei* [38–40], *Halogeometricum borinquense* [41], *Yangia* sp. ND199 [42] nebo také halofilní *Bacillus megaterium* H16 [43]. Mezi další halofilní producenty PHA patří také bakterie rodu *Halomonas* [44–46]. Produkce PHA byla například popsána pro *Halomonas halophila* [47], *Halomonas bluephagenesis* [48; 49], *Halomonas boliviensis* [44; 50], *Halomonas campisalis* [51] či *Halomonas nitroreducens* [52]. Ve většině případů byl jako zdroj uhlíku pro produkci využit cukernatý substrát. Žádná práce se systematicky nevěnovala využití halofilních mikroorganismů k produkci PHA z odpadních olejů případně jiných lipidických substrátů. Přitom právě odpadní fritovací oleje a další levné/odpadní lipidické substráty jsou obecně považovány za velice slibné suroviny pro výrobu PHA [53]. Odpadní fritovací olej je vhodnou surovinou k produkci PHA například pomocí mezofilní bakterie *Cupriavidus necator* H16 [54].

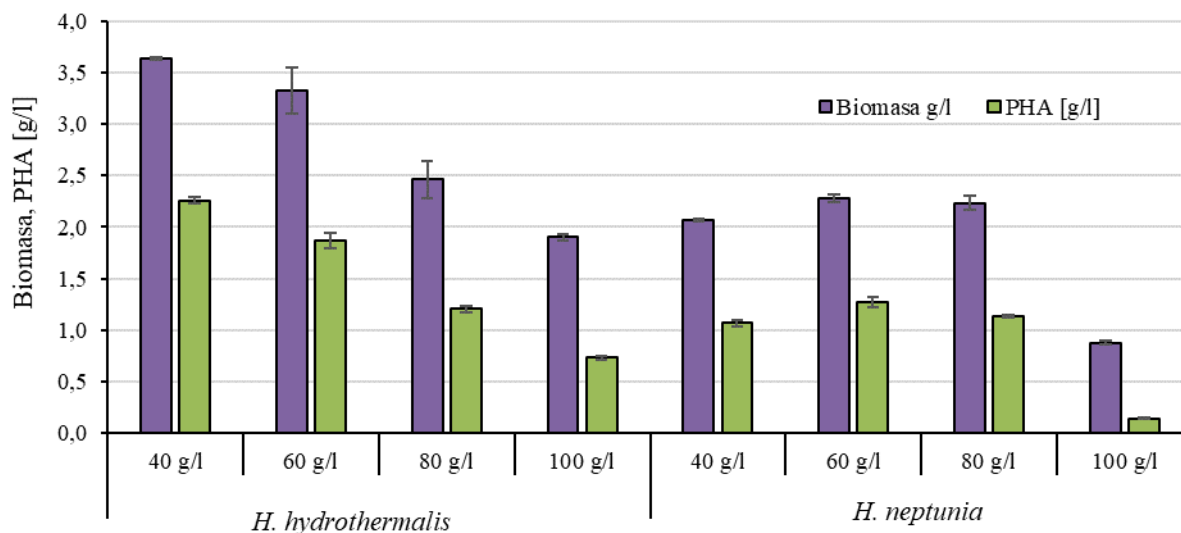
Z české sbírky mikroorganismů bylo vybráno 9 druhů rodu *Halomonas* a to *H. halophila* CCM 3662, *H. hydrothermalis* CCM 7104, *H. axialensis* CCM 7103, *H. elongata* CCM 3756, *H. neptunia* CCM 7107, *H. organivorans* CCM 7142, *H. salina* CCM 4361, *H. meridiana* CCM 7105 a *H. halmophila* CCM 2833. U bakterie *H. halophila* CCM 3662 byla již produkce PHA popsána [47], avšak její produkce PHA na oleji nebyla dosud studována. Vybrané druhy rodu *Halomonas* byly nejprve v rámci standardní baňkové kultivace testovány, zda jsou schopny využít olej a současně produkovat PHA (Obrázek 2).



Obrázek 2: Screening vybraných druhů rodu *Halomonas* při kultivaci na oleji. Koncentrace biomasy a PHA uvedena v g/l v závislosti na jednotlivém rodu bakterie. Výsledky kultivace jsou brány po 72 hodinách kultivace v produkčním médiu s 20 g/l oleje, chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku paralelních měření.

Z testovaných druhů byly schopny utilizace oleje a nárůstu biomasy na oleji jako jediném zdroji uhlíku všechny testované druhy. Avšak významnější produkce PHA na tomto zdroji uhlíku vykazovaly pouze tři, a to *H. hydrothermalis*, *H. neptunia* a *H. organivorans*. Obsahu PHA nad 20 % hmotnosti suché biomasy dosáhly pouze *H. hydrothermalis* (23,8 % PHA) a *H. neptunia* (23,4 % PHA). Tyto bakterie se na základě prvního screeningového experimentu jeví jako vhodní kandidáti na produkci PHA na oleji, proto u nich byla produkce PHA na odpadním fritovacím oleji dále studována a optimalizována.

Nejdříve vzhledem k jejich halofilnímu charakteru byla optimalizována koncentrace soli v minerálním médiu. Množství soli ovlivňuje nejen růst biomasy, ale také množství PHA. Testované koncentrace chloridu sodného byly 40, 60, 80 a 100 g/l, výsledky experimentu jsou prezentovány na obrázku 3.



Obrázek 3: Vliv koncentrace soli na růst a produkci *H. hydrothermalis* a *H. neptunia*. Graf závislosti biomasy a PHA uvedené v g/l na jednotlivých koncentracích chloridu sodného pro testované bakterie. Výsledky kultivace jsou brány po 72 hodinách kultivace v produkčním médiu s 20 g/l oleje, chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku paralelních měření.

Při počátečním screeningu produkčního potenciálu halofilních bakterií, byla koncentrace chloridu sodného pro oba vybrané producenty shodná a to 81 g/l. Tuto koncentraci soli uváděla jako optimální Česká sbírka mikroorganismů (CCM), ze které byly bakterie pořízeny. Vliv koncentrace soli na nárůst biomasy a PHA je zřejmý u obou producentů. *H. hydrothermalis* dosahuje nejvyššího výtěžku biomasy i PHA u koncentrace soli 40 g/l (Obrázek 3), kdy PHA dosahovaly téměř 62 % hmotnosti suché biomasy. Bakterie *H. neptunia* dosahovala podobných nárůstů biomasy a výtěžků PHA při koncentracích 40, 60 a 80 g/l. Nejvyššího zastoupení PHA v biomase dosáhla při koncentraci chloridu sodného 60 g/l v minerálním médiu a to 55 % PHA hmotnosti suché biomasy. Pro další experimenty byly používány již koncentrace chloridu sodného 40 g/l pro *H. hydrothermalis* a 60 g/l pro *H. neptunii*¹.

3.2. Izolace termofilních producentů polyhydroxyalkanoátů z přírodních vzorků

Další slibnou skupinou extrémofilů jsou termofilní mikroorganismy. Jedná se o organismy, které přežívají, žijí a prosperují ve vyšších teplotách. Přirozených míst, kde se termofily vyskytují, je mnoho. Jedná se především o různé geotermální průduchy, horké prameny a podobně [24]. Tyto organismy skrývají velký biotechnologický potenciál. Díky životu v extrémních podmínkách jsou například jejich proteiny a enzymy adaptovány k vysokým teplotám, proto mají široké uplatnění jako termostabilní látky [55]. Průmyslovou biotechnologii založenou na extrémofilních mikroorganismech, která je schopna konkurovat běžné výrobě, označil profesor Chen a jeho tým za průmyslové biotechnologie nové generace. Tyto

¹ PERNICOVA, I., D. KUCERA, J. NEBESAROVA, M. KALINA, I. NOVACKOVA, M. KOLLER a S. OBRUCA. Production of polyhydroxyalkanoates on waste frying oil employing selected *Halomonas* strains. Bioresource Technology [online]. 2019, 292. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2019.122028

biotechnologické procesy nové generace využívají například termofilní bakterie. Díky extrémním podmínkám dochází ke snížení rizika kontaminace, a tím může být snížena cena biotechnologického procesu a zvýšena konkurenceschopnost produktu [31].

Polyhydroxyalkanoáty jsou nadějným polymerem, který je biokompatibilní a v přírodě rozložitelný. Jejich výroba je navíc založena na obnovitelných zdrojích [56]. Avšak jejich produkce u termofilních mikroorganismů není příliš popsána. Produkce PHA u termofilů je velmi málo prozkoumána a byla potvrzena jen v několika případech, například u bakterie *Chelatococcus* sp. MW10 [57], *Caldimonas taiwanensis* [58], *Thermus thermophilus* [59] či *Bacillus shackletonii* K5 [60]. Proto jsme se zaměřili na izolaci nových termofilních producentů PHA z přírodních vzorků pomocí několika izolačních technik.

3.2.1. Aerobní dynamické krmení

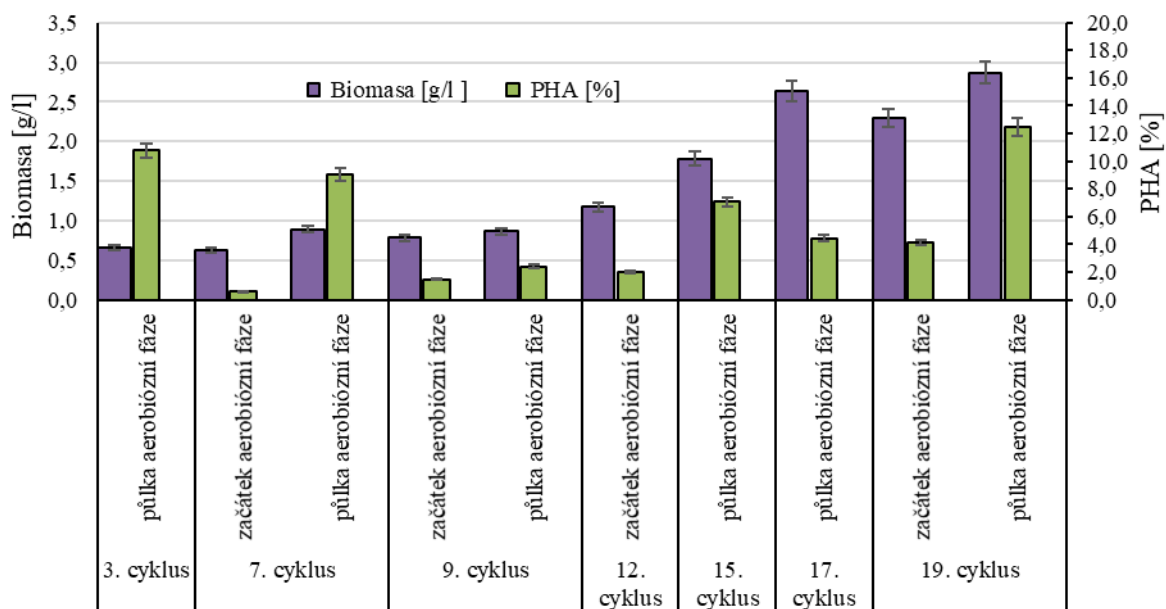
Aerobní dynamické krmení (ADK) je bioinženýrská strategie řízení směsných mikrobiálních konsorcií, jehož cílem je obohacení konsorcia o producenty PHA. Aerobní dynamické krmení je cyklicky se opakující kultivace, kde dochází ke střídání fáze bohaté na živiny (feast) a fáze limitace živinami (famine). ADK nachází především uplatnění při nesterilní produkci PHA z různých odpadních surovin pomocí směsných bakteriálních kultur PHA [61; 62]. Nicméně lze principiálně tento postup využít také k izolaci PHA producentů.

Z tohoto důvodu bylo ADK v práci použito pro izolaci PHA produkujících termofilních bakterií ze vzorků aktivovaného kalu. Aktivovaný kal byl poskytnut ČOV v Bystřici pod Hostýnem, která je v rámci ČR unikátním provozem využívajícím termofilní biologické čištění odpadních vod. Kal je zde aktivován při teplotách 50 až 60 °C, a proto lze předpokládat, že obsahuje vysoký podíl termofilních a termotolerantních mikroorganismů. Jako zdroj uhlíku byl v našem experimentu použit acetát sodný, jedná se o relativně snadno utilizovatelný zdroj uhlíku, který vedl při použití v rámci ADK ve směsných mezofilních kulturách až k produkci 65 % P(3HB) [35]. Dále byly vyzkoušeny i náročnější zdroje uhlíku jako xylóza, laktóza či kyselina palmitová. Motivací zařazení těchto substrátů bylo vyizolovat PHA produkující termofilní bakterie schopné konverze těchto substrátů na PHA. Avšak již v 9. cyklu se ukázalo, že tyto složitější zdroje uhlíku nejsou vhodným zdrojem uhlíku pro ADK. Biomasa se ve třetím cyklu pro laktózu a kyselinu palmitovou pohybovala okolo 0,35 g/l, pro xylózu jen okolo 0,14 g/l. Při použití laktózy byly ve třetím cyklu naměřeny necelé 3 % P(3HB). U xylózy a kyseliny palmitové nebylo detekováno žádné množství P(3HB). Při využití složitějšího zdroje uhlíku nebyla již po 9. cyklu detekována biomasa, a proto byl pokus ukončen.

Selekce PHA produkujících bakterií za využití acetátu sodného však byla úspěšnější (Obrázek 4). Biomasa již ve třetím cyklu stoupla na 0,5 g/l a naměřené množství PHA bylo okolo 10 % ze suché hmoty biomasy. Množství biomasy víceméně rostlo až do ukončení pokusu. Množství PHA bylo proměnlivé a bylo ovlivněno především časem odběru v cyklu aerobního dynamického krmení. PHA slouží jako zdroj uhlíku a energie a jsou produkovány při nadbytku uhlíku [63] a limitaci například fosforu či dusíku. Proto například v 7. a 19. cyklu, kdy byl odběr udělán dvakrát během jednoho cyklu, a to na začátku a v půlce první fáze v době dostatku živin, je množství PHA odlišné. Při prvním odběru, který byl proveden po fázi

sedimentace a 12 hodin od přidání zdroje uhlíku, bylo detekováno pouze nízké množství PHA. Ve druhém odběru, který již byl po přidání zdroje uhlíku, což v aerobní fázi cyklu vede k navýšení množství PHA v buňce, bylo opravdu zaznamenáno vyšší množství PHA. PHA poté slouží jako zdroj uhlíku a energie v době chudé na živiny, popřípadě v sedimentační fázi chudé i na kyslík. Pokus byl ukončen po 19. cyklu aerobního dynamického krmení, kdy biomasa dosahovala téměř 3 g/l a množství PHA bylo okolo 12 %. Veškeré detekované PHA byly tvořeny pouze polymerem složeným z 3HB.

V literatuře je popsáno, že při práci v sekvenčním vsádkovém reaktoru s mezofilními smíšenými kulturami lze dosáhnout stabilní produkce až 53 % P(3HB) za využití acetátu sodného jako zdroje uhlíku při aerobním dynamickém krmení po dobu 30 dní. Při prodloužení celkové doby na dva měsíce produkce stoupla až na 79 % P(3HB), což vede k zefektivnění pro komerční procesy [64]. Použití ADK v sekvenčních reaktorech po dobu jednoho roku vedlo také k navýšení množství P(3HB) u smíšených kultur téměř na 74 %. Takto vysoké množství polymeru je srovnatelné s produkcí pomocí čistých bakteriálních kultur [61].



Obrázek 4: Aerobní dynamické krmení termofilní smíšené kultury – zdroj uhlíku acetát sodný.

Graf závislosti biomasy v g/l a množství PHA v % na fázi a počtu cyklu aerobního dynamického krmení, teplota kultivace 60 °C. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku.

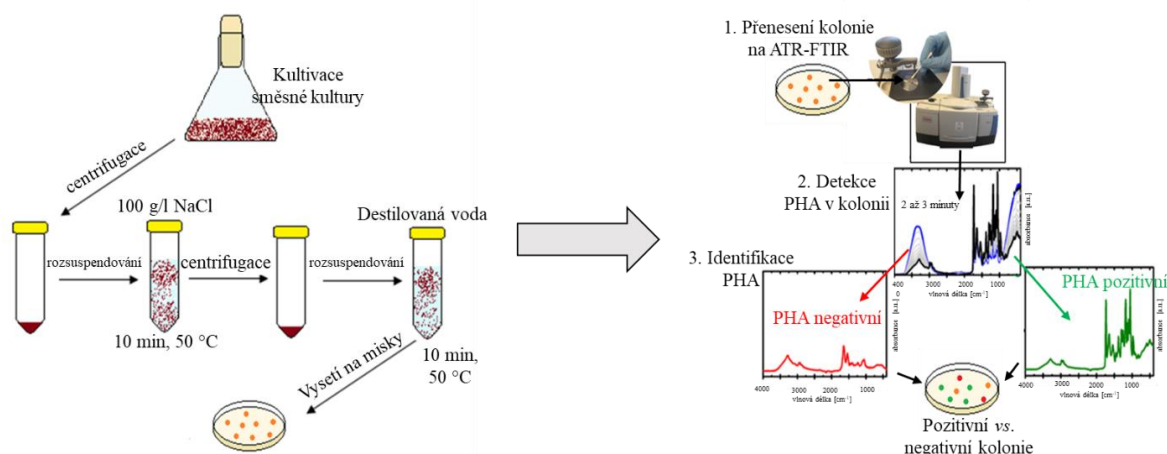
ADK je tedy velice efektivním nástrojem umožňujícím obohacení smíšeného mezofilního bakteriálního konsorcia o PHA producenty, nicméně u termofilního konsorcia je podle našich výsledků a zkušeností situace výrazně složitější. Bakteriální kultura po ukončení 19. cyklu (kdy obsah PHA v biomase dosáhl svého maxima) byla rozetřena na agarovou plotnu a vybrané kolonie byly pomocí sekvenace *16S rRNA* přibližně taxonomicky zařazeny. Většina kolonií byla určena jako polymikrobiální, i když na agarové plotně se jevíly jako čisté kolonie. Izolát ADK 3 byl určen jako *Tepidiphilus* sp. s podobností 81,80 %. Tato bakterie se řadí do kmene *Proteobacteria* a třídy *Hydrogenophilalia*. Johnson a kolektiv při sekvenaci izolátu z ADK v sekvenčním reaktoru zařadily izoláty do stejného kmene, avšak třídy *Gammaroteobacteria* [64].

Rod *Tepidiphilus* je gram negativní nesporulující bakterie. Jedná se o termofilní rod s optimální teplotou růstu okolo 50 °C. Je aerobní, avšak je schopen anaerobního růstu v přítomnosti dusičnanů [65; 66]. Produkce PHA u tohoto rodu nebyla doposud příliš popsána. Bohužel viabilitu izolátu ADK 3 se nepodařilo udržet, a proto nebylo možné podrobně prostudovat jeho PHA produkční potenciál. Na základě bioinformačních údajů bylo zjištěno, že zástupce tohoto rodu bakterie *Tepidiphilus thermophilus* DSM 27220 obsahuje PHA syntázu [67]. Proto byla schopnost produkovat PHA u rodu *Tepidiphilus* zkoumána právě pomocí bakterie *Tepidiphilus thermophilus* DSM 27220. Celkově je možné konstatovat, že schopnost produkovat PHA byla potvrzena jak na úrovni genotypu, tak fenotypu. Avšak produkce PHA se nezdá být z biotechnologického hlediska příliš atraktivní. Celkově bakterie vykazovala velice malé výtěžky biomasy i PHA (obsah PHA do cca 10 % hmotnosti suché biomasy) a další slabinou této bakterie je velice omezené spektrum substrátů, které dokáže využít. Jedná se především o krátké organické kyseliny (acetát, propionát atd.), naopak sacharidy ani lipidy nedokáže tato bakterie prakticky vůbec využít ke svému růstu. Proto nebyla této bakterii věnována další pozornost.

3.2.2. Izolace pomocí změn osmotického tlaku

Lze tedy předpokládat, že aerobní dynamické krmení není vhodné jako izolační metoda vedoucí k získání termofilních producentů schopných produkce PHA. Proto byla zvolena alternativní originální strategie pro izolaci termofilních producentů PHA.

Je známo, že přítomnost PHA granulí v buňkách pomáhá zvyšovat míru přežití bakterií při vystavení osmotickému stresu, ať už navýšení osmotického tlaku v hypertonickém prostředí [68] či nižšímu tlaku v hypotonickém prostředí [37]. Na základě této osmoprotektivní funkce PHA byla navržena nová izolační metoda. Přírodní vzorek (kompost, kal) byl smíchán s minerálním médiem a daným zdrojem uhlíku a byla provedena kultivace tak, aby došlo k maximální možné akumulaci PHA u přítomných producentů. Poté následoval selekční krok využívající osmotickou změnu tlaku znázorněnou na obrázku 5. Kultura byla nejprve vystavena hypertonickému prostředí, které představoval roztok chloridu sodného o koncentraci 100 g/l. Následným promytím v destilované vodě byly buňky vystaveny hypotonickému prostředí. Na závěr byly vysety na agarové plotny. Pro eliminaci náhodného výběru pozitivních kolonií byl zařazen další krok, a to detekce PHA pomocí ATR-FTIR, kdy část narostlé kolonie byla nanášena na krystal ATR-FTIR a bylo detekováno PHA.



Obrázek 5: Schéma selekce PHA produkujících bakterií pomocí změn osmotického tlaku

Po vysušení a změření vzorku, které trvalo 2 až 3 minuty, bylo možné detekovat charakteristické absorpční pásy polyesterů při $1\,734\text{ cm}^{-1}$ (C=O vazby) a $1\,180\text{ cm}^{-1}$ (C-O-C vazby) a zvýšené absorpce v oblasti $1\,050\text{ cm}^{-1}$ (C-C-O) [69]. Při pozitivní odezvě byla kolonie nanášena na novou agarovou plotnu a po nárůstu byla převedena do submerzního média a poté uchována ve formě kryozkumavky v 10% glycerolu při -80 °C .

Při testování této metody byl počet životaschopných kolonií před osmoselekcí u vzorku aktivovaného kalu z čistírny odpadních vod Brno-Modřice za využití glycerolu jako zdroje uhlíku $1,29 \cdot 10^{10}$ na ml. Po osmoselekcí klesl počet životaschopných kolonií na $6,6 \cdot 10^8$ na ml. Zato se však zvýšil poměr PHA pozitivních kolonií ku negativním, a to z 1:14 na 8:7. Takže pravděpodobnost výběru PHA pozitivní kolonie se znásobila téměř 8krát. Tzv. osmoselekcce tedy sloužila k selekci a obohacení konsorcia o producenty PHA, pomocí rychlé a snadné detekce díky ATR-FTIR bylo možné určit PHA pozitivní kolonie². Přehled účinnosti osmoselekcční metody znázorňuje tabulka 2.

Tabulka 2: Porovnání účinnosti osmoselekcční metody k izolaci PHA produkujících termofilních bakterií

	Před osmoselekcí	Po osmoselekcí
CFU na ml	$1,29 \cdot 10^{10}$	$6,6 \cdot 10^8$
PHA pozitivní kolonie : PHA negativní kolonie	1:14	8:7
% pozitivních kolonií ze všech testovaných kolonií	7	53

² PERNICOVA, I., I. NOVACKOVA, P. SEDLACEK, X. KOURILOVA, M. KOLLER a S. OBRUCA. Application of osmotic challenge for enrichment of microbial consortia in polyhydroxyalkanoates producing thermophilic and thermotolerant bacteria and their subsequent isolation. International Journal of Biological Macromolecules [online]. 2020, 144, 698-704. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.12.128

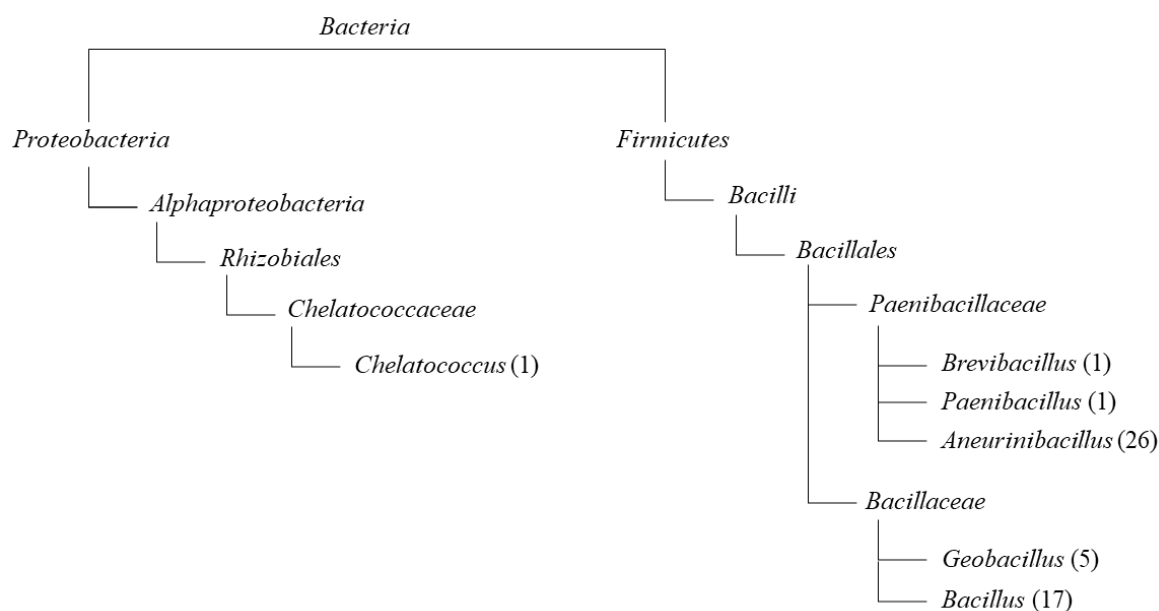
Navržený izolační protokol byl použit na selekci PHA pozitivních kolonií ze vzorku aktivovaného kalu z čistírny odpadních vod Brno-Modřice a kompostu z centrální kompostárny Brno. První selekce bakterií byla provedena na různých zdrojích uhlíku. Jednalo se o glukózu, glycerol, kyselinu levulovou a γ -butyrolakton. Teplota kultivace i izolace byla 50 °C. Avšak v případě kyseliny levulové a γ -butyrolakton nebyly nalezeny žádné PHA pozitivní kolonie ani u jednoho ze vzorků kompostu nebo kalu. Celkový nárůst biomasy byl před „osmoselekcí“ malý a obsah PHA se pohyboval do 2 % hmotnosti suché biomasy. Zato glukóza a glycerol v případě aktivovaného kalu se ukázaly jako vhodné zdroje uhlíku pro selekci PHA produkujících bakterií. Před osmoselekcí bylo ve vzorku s glukózou naměřeno kolem 8 % PHA a ve vzorku s glycerolem dokonce 16 % PHA na suchou hmotu biomasy. Jednalo se výhradně o P(3HB). Ze vzorku aktivovaného kalu bylo celkově vyizolováno přibližně 40 PHA pozitivních kolonií, které byly číselně označeny. Izoláty s označením 1 až 28 byly vyizolovány za využití glukózy a izoláty získané za použití glycerolu byly označeny 29 až 40. V případě vzorků z kompostu byly celkové PHA před osmoselekcí, za využití glukózy jako zdroje uhlíku, velmi nízké, nedosahovaly ani 2 %, zato u vzorků kompostu na glycerolu jako zdroje uhlíku byl obsah PHA před osmoselekcí 17 % hmotnosti suché biomasy. I přesto bylo ze vzorku kompostu na glycerolu vyizolováno pouze 5 pozitivních kolonií. Izoláty nesly označení H1, H2, H3 a K1 a K2. Všechny izoláty byly přesazeny na nové misky. Některé z izolátů ani po 48 hodinách kultivace při 50 °C na minerálním médiu a daným zdrojem uhlíku, na kterém byly izolovány, nenarostly. Kolonie, které narostly, byly přeočkovány do submerzního média a byly uchovány ve formě kryozkumavek.

Selekce PHA produkujících bakterií pomocí osmoselekcce byla využita i při izolaci bakterií z dalších vzorků kompostu z kompostárny Brno a kompostárny Blansko, a také z aktivovaného kalu z čistíren odpadních vod Brno-Modřice a Bystřice pod Hostýnem odebíraných na podzim roku 2019. Jako zdroje uhlíku pro selekci byla vybrána glukóza o koncentraci 20 g/l, glycerol 20 g/l a γ -butyrolakton 8 g/l. Na základě předchozích výsledků byl glycerol vyhodnocen jako vhodný zdroj uhlíku pro selekci PHA produkujících bakterií. Proto ve snaze najít polyextrémního producenta PHA, který by byl halofilní termofil, bylo také použito jako zdroj uhlíku 20 g/l glycerolu s 40 g/l NaCl. Současně byly testovány i tři různé teploty kultivace a to 50, 60 a 70 °C. Těchto 48 kombinací bylo podrobena osmoselekcí a následné detekci PHA produkujících bakterií pomocí ATR-FTIR.

3.2.2.1 *Taxonomická charakterizace izolátů*

Jednotlivé izoláty byly taxonomicky zařazeny na základě sekvence genu *16S rRNA*. Díky znalosti sekvence malé ribozomální podjednotky (pro prokaryota *16S rRNA*) lze daný organismus přibližně identifikovat a klasifikovat [70]. Sekvence genu se následně porovnají s databází mikroorganismů (například blast.ncbi.nlm.nih.gov) a daný izolát se taxonomicky zařadí. Se shodou nad 97 % lze daný organismus zařadit na rodové i druhové úrovni [71], v rozmezí pod 95 % do 80 % na úrovni rodu, pokud je shoda nižší, lze daný organismu zařadit pouze na úrovni čeledi či pouze řádu [72; 73]. K úplnému korektnímu taxonomickému zařazení je však potřeba využití více metod a kombinace genotypických a fenotypických přístupů [74; 75].

Mezi izolovanými bakteriemi se vyskytovaly jak gram negativní, tak gram pozitivní bakterie. Z taxonomického hlediska lze dané izoláty rozdělit do dvou kmenů či oddělení, a to kmen *Proteobacteria*, který je zastoupen pouze minimálně, a *Firmicutes*, kde všechny ostatní izoláty patří do třídy *Bacilli*. Schéma taxonomického zařazení izolátů zobrazuje obrázek 6. *Proteobacteria* jsou gram negativní bakterie, které zahrnují jak fototrofy, heterotrofy i chemolitotrofy. Tento kmen také zahrnuje mnoho známých lidských, živočišných i rostlinných patogenů [76]. Izolát s označením 34 byl klasifikován jako *Chelatococcus composti*. Produkce polyhydroxyalkanoátů pomocí bakterií *Chelatococcus* již byla popsána u příbuzných termofilních bakterií *Chelatococcus daeguensis* [77] či *Chelatococcus* sp. MW10 [78].



Obrázek 6: Schéma taxonomického zařazení izolátů získaných pomocí osmoselekcce, v závorce je uveden počet izolátů spadající do konkrétního rodu.

3.2.3. Testování produkce PHA u vybraných izolátů

Potenciál produkce PHA byl testován u všech izolátů získaných pomocí osmoselekcce. Testování probíhalo ve více experimentech. Nejprve byla schopnost produkovat PHA ověřena na substrátech použitých pro izolaci jednotlivých kmenů za standardních podmínek. Teplota kultivace byla 50 a 60 °C, pouze izoláty, které byly izolovány při 70 °C, byly kultivovány při 60 a 70 °C. Izoláty izolované z odběrů v roce 2019 byly testovány i na více zdrojích uhlíku, jako byl například glycerol, olej či také byla testována schopnost produkce kopolymeru na 1,4-butandiolu.

Izoláty, které byly izolovány v roce 2018, měly obecně vyšší výtěžky biomasy, což mohlo být způsobeno tím, že produkce probíhala 72 h, zatímco izoláty z roku 2019 byly kultivovány pouze 48 h. Avšak pro prvotní screening schopnosti akumulace PHA vliv o něco delší kultivační doby zanedbatelný. Produkce PHA byla potvrzena u všech izolátů z roku 2018 při

kultivační teplotě 50 °C, kromě izolátu označeného jako 28. Izolát 28 byl pomocí sekvenace genu *16S rRNA* klasifikován jako polymikrobiální, takže PHA producenta mohla „přerůst“ mikrobiální kultura, která není schopna produkce PHA. Izoláty 4, 25 a 31 patří do rodu *Bacillus*, pro které je produkce PHA charakteristická a hojně popsána [79–81], avšak nebyly schopny produkce PHA při vyšší kultivační teplotě. I nárůst biomasy byl znatelně nižší. Jejich optimální teplota růstu se bude nejspíše pohybovat okolo nebo pod 50 °C, a bude se spíše jednat o termotolerantní bakterie nežli o pravé termofily. Izolát 34 byl schopen produkce PHA na glycerolu u obou kultivačních teplot. Jedná se o izolát určený jako *Chelatococcus composti*. U jeho příbuzných kmenů byla produkce PHA již dříve popsána. Například bakterie *Chelatococcus dauguensis* TAD1 byla schopna produkovat okolo 2 g/l P(3HB) na glycerolu při 50 °C [77]. Také *Chelatococcus* sp. MW10 byl schopen produkovat P(3HB) [78]. Izoláty 29, 30, 32, 34 a 35 byly schopny produkce PHA také v obou testovaných teplotách. Ve všech případech se jedná o izoláty zařazené pod rod *Aneurinibacillus*, u kterého byla popsána produkce PHA pouze v rámci publikace Z. Y. Xiao a kolektivu [82].

Všechny izoláty z roku 2019, které patří do rodu *Aneurinibacillus* (A4a, A6, A7, A8, A9, A21, A22, A23, A25, A26, A27, A28, AFn2, AH24, AH30, F109, F110, M3 a M6), byly schopny produkce PHA při 50 °C. Nejvyšších hodnot produkce dosahovaly izoláty A27 s produkcí 0,78 g/l P(3HB), M3 s produkcí P(3HB) 0,81 g/l a izolát AFn2 s produkcí 1,09 g/l P(3HB). Jednalo se o produkci na glukóze jako jediném zdroji uhlíku. Izolát *Aneurinibacillus* sp. XH1 izolovaný z ropného pole byl schopen produkce P(3HB) pouze okolo 0,1 g/l [82]. Oproti izolátům zařazených do rodu *Aneurinibacillus* z roku 2018, byly schopny produkce PHA při 60 °C pouze některé izoláty, a to izoláty s označením A22, A25, A27 a AH30, kdy však jejich produkce PHA rapidně klesla.

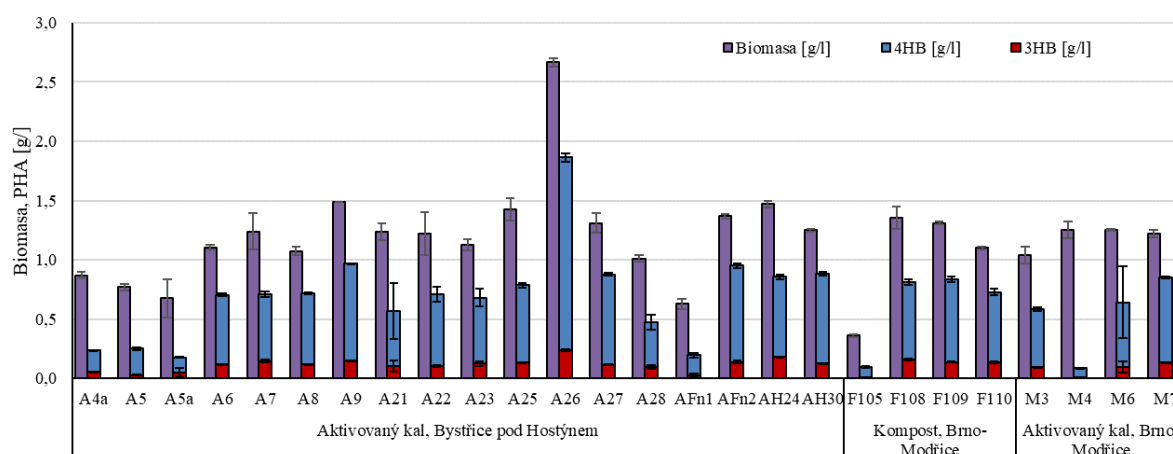
Produkce PHA při 60 °C byla také zaznamenána u izolátů označených jako A5, tento vzorek byl vyhodnocen jako polymikrobiální, ale produkoval P(3HB) v malé míře právě i za zvýšené teploty. Izoláty F107 a M4 byly taxonomicky zařazeny jako *Bacillus piscis*, tyto izoláty byly také schopny produkce P(3HB) při obou teplotách. U tohoto druhu ještě nebyla popsána produkce PHA.

Izoláty označené jako M1 a M2, které jsou taxonomicky zařazeny jako *Bacillus subtilis*, nebyly schopny téměř žádné produkce PHA, přitom právě produkce biopolymeru PHA je u tohoto druhu hojně popsána a zkoumána [83].

Izoláty z roku 2019 byly podrobeny detailnějšímu screeningu biotechnologického potenciálu produkce PHA. Dalším testovaným zdrojem uhlíku byl glycerol, který byl použit jako jediný zdroj uhlíku v koncentraci 20 g/l u všech izolátů bez ohledu na to z jakého uhlíkatého zdroje byly získány. Glycerol je hlavním vedlejším produktem při výrobě bionafty. Tím, jak roste spotřeba bionafty, tím víc vzniká odpadního glycerolu. Čištění odpadního glycerolu je však velmi drahé, proto se hledají alternativní způsoby využití. Jednou z nich je například získávání mono, di či triacylglycerolů [84]. Dále je možné využít odpadní glycerol do dřevěných pelet [85] nebo může sloužit jako vstupní surovina pro produkci polyhydroxyalkanoátů [86; 87].

V rámci screeningu produkce PHA u termofilních izolátů byla také ověřena schopnost produkovat kopolymer P(3HB-co-4HB) nebo dokonce samotný P(4HB). Jako zdroj uhlíku a zároveň strukturní prekurzor 4HB byl použit 1,4-butandiol v koncentraci 4 g/l. Inkorporace

4HB do polymeru vede ke změnám fyzikálních i mechanických vlastností kopolymeru. Kopolymery se 4HB jsou výrazně méně krystalické, mají nižší teplotu tání a jsou značně flexibilnější než ostatní zástupci scl-PHA. Proto mají vysoký aplikační potenciál v řadě oblastí. Za zmínku stojí například využití v oblasti biomedicínských aplikací [8; 88]. Izoláty označené jako A2, F103 a F104 nebyly schopny utilizace 1,4-butandiolu. Zato izoláty A1, A3, A3a, F106, F107, M1, M2 a M5 byly schopny tento substrát využít. Jejich bakteriální nárůst se pohyboval do 0,5 g/l, avšak nebyly schopny produkovat žádné PHA. Izolát označený jako Bz byl schopen vyššího bakteriálního nárůstu okolo 1,3 g/l, ale také nebyl schopen produkce PHA. Tyto izoláty pro přehlednost nejsou uvedeny na obrázku 7, který znázorňuje výsledky screeningu schopnosti produkovat kopolymer na 1,4-butandiolu jako jediném zdroji uhlíku. Na základě naměřených dat lze konstatovat, že rod *Aneurinibacillus* je dobrým producentem kopolymeru P(3HB-co-4HB). Průměrně je kopolymer složený z více jak 80 mol.% z monomeru 4HB. Nejlepších výsledků dosáhl izolát označený jako A26, kdy jeho produkce kopolymeru bez jakékoliv optimalizace dosahovala téměř 2 g/l s 87 mol. % 4HB. Tento izolát byl klasifikován jako *Aneurinibacillus thermoaerophilus*. Izolát F105, klasifikován jako *Bacillus haynesii*, a izolát M4 (*Bacillus piscis*) byly schopny produkce kopolymeru se zastoupením 4HB vyšších než 90 mol. %. Dalším slibným producentem, u kterého dosahovalo množství PHA až 70 % hmotnosti suché biomasy, byl izolát M7 taxonomicky zařazen jako *Bacillus shackletonii*. Kopolymer zahrnoval více než 80 mol. % monomeru 4HB.



Obrázek 7: Testování potenciálu tvořit kopolymer P(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát).

Kultivace probíhala 48 h při 50 °C na 4 g/l 1,4-butandiolu jako jediném zdroji uhlíku u vybraných izolátů. Chybová úsečka zobrazuje směrodatnou odchylku.

3.3. Charakteristika a screening produkce PHA izolátů s označením H1, H2 a K2

Izoláty s označením H1, H2 a K2, které byly vyizolované z kompostu z kompostárny Brno (2018) pomocí osmoselekce, byly taxonomicky zařazeny pod rod *Aneurinibacillus*. Jelikož se jednalo o rod, u kterého byla pouze minimálně popsána produkce PHA [82], byly tyto izoláty detailněji podrobeny studiu produkce PHA.

Kvůli komplexnějšímu taxonomickému zařazení byly izoláty identifikovány také fenotypově Českou sbírkou mikroorganismů v Brně. Izoláty byly taxonomicky zařazeny nejen

díky sekvenci genu *16S rRNA*, ale také na základě fenotypové identifikace. Všechny tři izoláty byly stanoveny jako sporulující gram pozitivní tyčinky patřící do rodu *Aneurinibacillus*. Izoláty se původně barvily negativně, ale KOH test potvrdil gram pozitivní buněčnou stěnu. Pomocí fenotypické identifikaci a komerční analýzy metodou Biolog byly izoláty vyhodnoceny následovně: izolát H1 nebylo možné určit na úrovni druhu a byl zařazen pouze jako *Aneurinibacillus* sp., izoláty H2 a K2 byly zařazeny jako *Aneurinibacillus migulans*.

Izoláty byly také testovány na přítomnost PHA syntázy. Protože se jedná o rod *Aneurinibacillus*, byly použity speciálně navržené primery právě pro tento rod. Všechny tři izoláty mají PHA syntázu třídy IV typickou pro rod *Aneurinibacillus*. Byla také provedena PCR reakce pro ostatní skupiny třídy IV a pro PHA syntázu první třídy. V těchto případech však byly výsledky negativní.

3.3.1. Produkce kopolymerů PHA pomocí izolátů K2, H1 a H2

Po optimalizaci kultivačních podmínek byla testována také schopnost produkovat kopolymery PHA, a to jak kopolymer P(3HB-*co*-3HV) tak P(3HB-*co*-4HB). Pro produkci kopolymerů bylo nejprve nutné určit vhodné prekurzory, ale také to, jestli je daný izolát vůbec schopen produkce kopolymeru. Pro testování schopnosti produkovat kopolymer s 3-hydroxyvalerátem, byly použity prekurzory kyselina levulová, propionát sodný, propan-1-ol a kyselina valerová. Prekurzory byly přidány do média na začátku kultivace o koncentraci 2 g/l. Kromě prekurzoru byl v médiu také obsažen uhlíkatý zdroj a to 20 g/l glycerolu. Byla také provedena kontrola, která neobsahovala žádný prekurzor.

I když byl izolát H2 a K2 určen jako stejný druh, již předchozí výsledky ukázaly, že se tyto dva izoláty od sebe velmi liší. Stejně je to i v případě schopnosti produkovat kopolymer s 3-hydroxyvalerátem (3HV). Izolát K2 nebyl schopen s žádným testovaným prekurzorem tvořit kopolymer. Se všemi testovanými prekurzory došlo pouze ke zvýšení množství biomasy, ale pouze s kyselinou levulovou a propan-1-olem byla jeho produkce P(3HB) vyšší oproti kontrole. Avšak izoláty H1 a H2 byly schopny s některými prekurzory tvořit kopolymer P(3HB-*co*-3HV). Izolát H2 byl schopen inkorporovat 3-hydroxyvalerát do polymeru v případě využití propionátu sodného a kyseliny valerové. V případě použití propionátu sodného klesla produkce PHA téměř na polovinu oproti kontrole, pouze na 0,38 g/l ale se zastoupením 32 mol. % 3HV. V případě kyseliny valerové stoupla biomasa na 2,12 g/l a produkce PHA byla 0,74 g/l se zastoupením okolo 66 mol. % 3HV. Je zajímavé, že nejvyšší produkce PHA dosáhl izolát H2 za použití propan-1-olu, kdy biomasa i PHA byla vyšší než v kontrolní kultivaci. Koncentrace PHA pak dosahovala téměř 1 g/l, ale zastoupen byl pouze 3HB.

Také izolát H1 byl schopen inkorporace 3HV, a to za použití prekurzorů propionátu sodného, propan-1-olu a kyseliny valerové. V případě použití propionátu sodného dosahovala produkce PHA pouze 0,3 g/l s 32 mol. % 3HV. Za přítomnosti propan-1-olu v médiu byla produkce PHA téměř dvojnásobná a to okolo 0,66 g/l, ale zastoupení 3HV kleslo na necelá 4 mol. %. Jako nejvhodnější zdroj pro akumulaci kopolymeru P(3HB-*co*-3HV) se ukázala kyselina valerová, kde se nárůst biomasy pohyboval okolo 1,9 g/l s 0,7 g/l PHA. Kopolymer obsahoval i nejvyšší množství 3HV a to téměř 67 mol. %. Izoláty H1 a H2 se ukázaly jako

vhodné pro produkci polymeru s 3HV především za využití kyseliny valerové. Také je zajímavé vysoké zastoupení 3-hydroxyvalerátu v kopolymeru. Většina bakterií produkuje P(3HB-co-3HV) spíše do 30 až 50 mol. % koncentrace 3HV [89–93]. Využití kopolymeru P(3HB-co-3HV) je široké. Díky začlenění 3HV do řetězce dochází ke zlepšení mechanických a technologických vlastností materiálu [94]. Díky jeho biokompatibilitě a biologické rozložitelnosti je tento materiál vhodný pro lékařské účely a jeho využití lze například najít v chirurgických nitích, při uvolňování léků, tkáňových náplastech a podobně [95–98]. Svoji roli také hraje míra zastoupení 3HV v polymeru, protože s rostoucím obsahem 3HV klesá krystalinita a také teplota tání [99].

Mezi dalšími testovanými schopnostmi izolátů byla schopnost tvořit kopolymer P(3HB-co-4HB) za přítomnosti vhodných strukturních prekurzorů. Použité prekurzory byly 1,6-hexandiol, γ -butyrolakton a 1,4-butandiol o koncentraci 8 g/l. Prekurzory byly přidány na počátku kultivace a sloužily zároveň jako jediný zdroj uhlíku. Všechny tři izoláty byly schopny produkce kopolymeru P(3HB-co-4HB) na dvou z testovaných prekurzorů, a to na γ -butyrolaktonu a 1,4-butandiolu. Produkce kopolymeru u izolátu K2 na γ -butyrolaktonu se pohybovala okolo 0,18 g/l s necelými 64 mol. % 4HB a na 1,4-butandiolu byla jeho produkce okolo 0,5 g/l s frakcí 4HB okolo 80 mol. %. Izoláty H1 a H2 produkovaly polymer s vyšším zastoupením 4HB, a to konkrétně produkce kopolymeru u H1 na γ -butyrolaktonu dosahovala 0,45 g/l s 84 mol. % 4HB a na 1,4-butandiolu byla produkce kopolymeru PHA 0,77 g/l s 88 mol.% 4HB. U izolátu H2 byla produkce velmi podobná.

Všechny tři izoláty jsou schopny produkce kopolymeru P(3HB-co-4HB). Nejslibnějším producentem se zdá být izolát H1. Je na místě poznamenat, že kopolymer P(3HB-co-4HB) má v rámci skupiny PHA materiálů unikátní mechanické vlastnosti (nízká krystalinita, vysoká elasticita, nízká teplota tání) [100] a má velice široký aplikační potenciál [101]. Izoláty K2, H1 a H2 jsou extrémně zajímavými producenty P(3HB-co-4HB), protože jsou schopny produkce kopolymerů s opravdu vysokými obsahy 4HB.

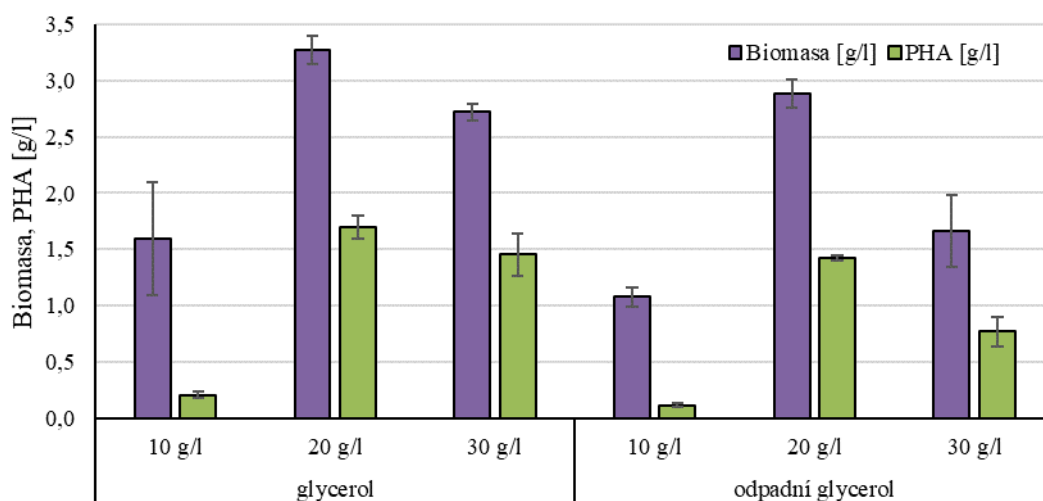
3.3.2. Optimalizace produkce a produkční potenciál izolátu H1

Na základě předchozích výsledků byl izolát s označením H1 vybrán jako nejslibnější z testovaných izolátů pro podrobnější studium produkce PHA. Prvním z testovaných parametrů byla schopnost utilizace různých zdrojů uhlíku. Mezi testovanými sacharidy byla sacharóza, manóza, galaktóza, glukóza, fruktóza a laktóza. Testovaný izolát byl schopen růstu na všech zmíněných uhlíkatých zdrojích. Nicméně významnějšího růstu dosáhl pouze na glukóze, kdy výtěžek biomasy byl okolo 2 g/l s 0,5 g/l P(3HB). Při kultivaci na glycerolu dosahovala kultura koncentrace biomasy přes 3,5 g/l a produkce P(3HB) mírně přesahovala 2 g/l. Glycerol se tedy ukázal jako nejlepší zdroj uhlíku pro kultivaci izolátu H1.

Produkce PHA na glycerolu nese jistá pozitiva. Se zvýšenou spotřebou bionafty vzniká odpadní glycerol, pro který se hledá další využití, které nevyžaduje složitou rafinaci. Jedním z možných použití odpadního glycerolu je například výroba hluboce eutektických rozpouštědel [102]. Bohužel znečištění odpadního glycerolu, který obsahuje mimo jiné například i methanol, zbytkové katalyzátory, anorganické a organické soli a další

kontaminanty [103], není vhodné pro lékařské, farmaceutické či kosmetické použití. I přes kontaminanty, které mohou působit inhibičně, je možné využití odpadního glycerolu jako suroviny v biotechnologickém průmyslu. Jsou popsány procesy využívající odpadní glycerol jako surovinu pro produkci PHA, například pomocí bakterie *Cupriavidus eutrophus* [104] či termofilní bakterie *Caldimonas manganoxidans* [105].

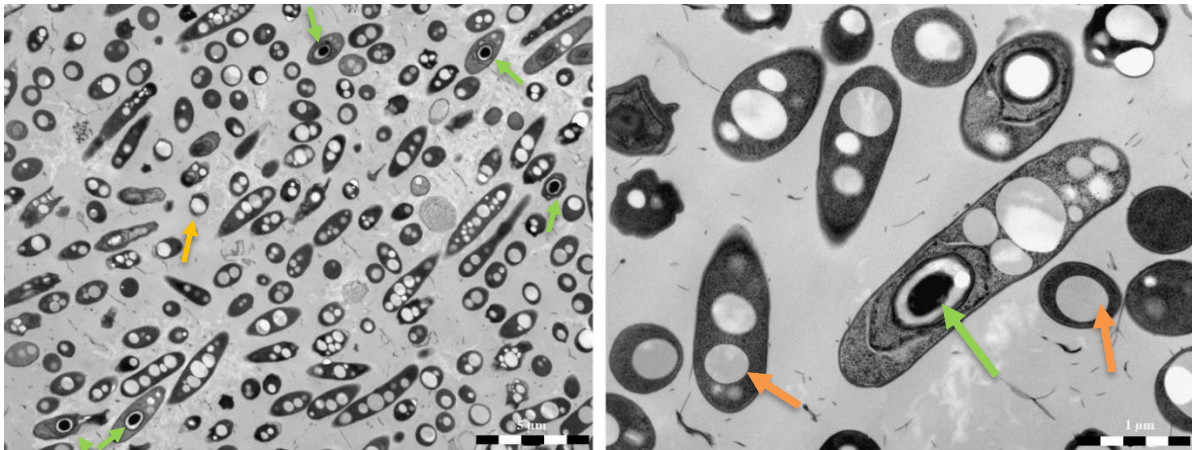
Srovnání produkce na čistém a odpadním glycerolu pomocí izolátu H1 zobrazuje obrázek 8. Byly testovány tři různé koncentrace glycerolu a to 10, 20 a 30 g/l. Izolát *Aneurinibacillus* sp. H1 byl schopen růstu na odpadním glycerolu bez jakékoli úpravy odpadního glycerolu. Jeho produkce na odpadním glycerolu je téměř srovnatelná s produkcí na čistém glycerolu. Jako nejméně vhodná koncentrace bylo 10 g/l glycerolu, kdy byla kultura očividně limitovaná zdrojem uhlíku. Použití 30 g/l glycerolu působilo spíše inhibičně. V odpadním glycerolu byla hodnota biomasy téměř poloviční ve srovnání s použitím pouze 20 g/l. Nejvhodnější koncentrace u obou typů glycerolu byla hodnota 20 g/l. Je tedy možné konstatovat, že izolát *Aneurinibacillus* sp. H1 je vhodný pro produkci P(3HB) z odpadního glycerolu.



Obrázek 8: Testování produkce PHA na čistém a odpadním glycerolu pomocí izolátu H1.

Kultivace probíhala na minerálním médiu M2, 72 hodin při teplotě 45 °C. Výsledné hodnoty představují průměr naměřených hodnot a chybová úsečka udává směrodatnou odchylku měření.

Morfologie PHA granulí v buňce rostoucí na glycerolu byla zkoumána pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM). Snímek morfologie buněk s vnitřními endospory a granulemi PHA zobrazuje obrázek 9. Jednotlivé buňky obsahují v průměru 3 až 15 granulí PHA, které jsou rozprostřeny po buňce. Mimo granulí PHA jsou v některých buňkách také obsaženy endospory, které většinou nejsou vítány během biotechnologického procesu nebo při akumulaci PHA. Studie u rodu *Bacillus* ukazují, že sporulace souvisí s metabolismem PHA, kdy vede ke snížení PHA v buňkách [106–108]. Avšak v případě izolátu H1 je i po 72 hodinách kultivace pouze malé množství bakterií ve sporulujícím stavu (pod 10 %). I v buňkách, kde se nachází endospora, se stále vyskytují granule PHA, takže ani sporulace by neměla být překážkou v zavedení izolátu *Aneurinibacillus* sp. H1 do průmyslové výroby.



Obrázek 9: TEM snímek izolátu *Aneurinibacillus* sp. H1 po kultivaci na 20 g/l glycerolu, 72 hodin, 45 °C. Zelené šipky ukazují na endospory v bakteriální buňce, oranžové pak ukazují na příklad granule PHA v buňce.

3.3.2.1 Studium produkce kopolymeru P(3HB-co-4HB)

Kopolymer P(3HB-co-4HB) má široké potenciální uplatnění v medicíně, farmacii či kosmetickém průmyslu, navíc zvýšením množstvím monomeru 4HB má lepší biokompatibilitu a mechanické vlastnosti [109; 110]. Proto bylo provedeno studium produkce kopolymeru P(3HB-co-4HB) pomocí izolátu *Aneurinibacillus* sp. H1. Jako zdroj uhlíku a zároveň jako prekurzor pro tvorbu 4HB byl použit 1,4-butandiol.

Obecně nižší molekulová hmotnost polymeru v přítomnosti 1,4-butandiolu může být také dána unikátními vlastnostmi PHA syntázy třídy IV. Tyto syntázy nejenže katalyzují polymeraci PHA, ale dochází také k alkoholytickému štěpení řetězců PHA, pokud je v médiu přítomen alkohol. Tato vlastnost může být vhodná pro regulaci molekulové hmotnosti PHA, ale také může vést k modifikaci karboxylových konců PHA [111]. Tato alkoholytická aktivita může být příčinou, proč s rostoucí koncentrací 1,4-butandiolu v médiu tak dramaticky klesá molekulová hmotnost výsledného polymeru.

I při opakování experimentu dosahovalo vyšších výtěžků minerální médium M2, proto bylo vybráno jako vhodnější produkční médium pro akumulaci P(3HB-co-4HB) i při dalších experimentech. Ještě jednou byla zopakována optimalizace koncentrace 1,4-butandiolu, kdy byly použité koncentrace nižší, a to 3, 4, 5, 6, 7 a 8 g/l, vzhledem k předchozím výsledkům. Nejvyšší produkce kopolymeru P(3HB-co-4HB) bylo dosaženo na koncentracích 4 a 6 g/l 1,4-butandiolu (Tabulka 3). Molekulová hmotnost polymeru byla také téměř stejná při těchto dvou koncentracích substrátu a to 128 kDa pro 4 g/l a 130 kDa pro 6 g/l. Molární frakce 4HB v kopolymeru je pro všechny testované koncentrace 1,4-butandiolu srovnatelná a obecně velice vysoká – 88 až 92 mol. %. V dalších experimentech byla počáteční koncentrace 1,4-butandiolu 4 g/l.

Tabulka 3: Podrobnější optimalizace koncentrace 1,4-butandiolu v produkčním médiu pro tvorbu P(3HB-co-4HB) pouze v minerálním médiu M2. Mw – molekulová hmotnost polymeru, Đ – polydisperzita.

1,4-butandiol	Biomasa [g/l]	PHA [g/l]	3HB [mol. %]	4HB [mol. %]	Mw [kDa]	Đ
3 g/l	1,22 ± 0,11	0,61 ± 0,05	9,4	90,6	115,61 ± 7,58	1,05
4 g/l	1,67 ± 0,02	0,91 ± 0,03	9,1	90,9	128,97 ± 3,85	1,12
5 g/l	1,24 ± 0,23	0,57 ± 0,01	11,7	88,3	101,13 ± 6,68	1,16
6 g/l	1,60 ± 0,15	0,89 ± 0,01	7,2	92,8	130,69 ± 2,32	1,13
7 g/l	1,13 ± 0,01	0,58 ± 0,01	12,0	88,0	120,81 ± 17,9	1,26
8 g/l	0,96 ± 0,01	0,42 ± 0,04	13,1	86,9	30,69 ± 0,46	1,56

Izolát H1 tedy disponuje unikátní schopností produkce kopolymeru P(3HB-co-4HB) s velice vysokým podílem 4HB. Nicméně při použití 1,4-butandiolu jakožto jediného substrátu jsou výtěžky biomasy i polymeru obecně nízké. Proto bylo v rámci dalších experimentů testováno využití kombinace 1,4-butandiolu a glycerolu, přičemž by glycerol plnil především funkci substrátu podporujícího růst mikrobiální kultury a 1,4-butandiol představoval především strukturální prekurzor 4HB. Koncentrace 1,4-butandiolu byla vybrána na základě předchozích experimentů, a to 4 g/l. Koncentrace glycerolu byla testována v koncentracích 2, 4, 6, 8 a 20 g/l.

Při použití směsi 1,4-butandiolu a glycerolu došlo ke zvýšení koncentrace biomasy, a to ve všech případech přes 2 g/l. Také došlo ke zvýšení produkce kopolymeru P(3HB-co-4HB). Poměr složek ve směsi zdrojů uhlíku se odrazil ve složení kopolymeru (Tabulka 4). V případě použití pouze 2 g/l glycerolu bylo zastoupení 3HB pouze okolo 16 mol. % a se zvyšující se koncentrací glycerolu se zvyšuje i zastoupení 3HB, kdy v případě použití 20 g/l glycerolu bylo zastoupení 3HB 95 mol. %. Jak již bylo zmíněno, množství 4HB v kopolymeru ovlivňuje jeho mechanické i technologické vlastnosti, tudíž podle požadovaných vlastností lze jednoduše úpravou kultivačních podmínek řídit zastoupení 4HB v kopolymeru. Nejvyšší produkce pak bylo dosaženo při použití koncentrací glycerolu 2 a 4 g/l, kdy koncentrace PHA dosahovala v obou případech přes 1,8 g/l. Avšak při použití 2 g/l glycerolu bylo zastoupení 4HB vyšší a molekulová hmotnost polymeru dosáhla hodnoty 120 kDa. Pokud byla použita vyšší koncentrace glycerolu, molekulová hmotnost klesla na 86 kDa.

Tabulka 4: Produkce P(3HB-co-4HB) v kombinaci 1,4-butandiolu s glycerolem jako zdrojem uhlíku v minerálním médiu M2. Mw – molekulová hmotnost polymeru, Đ – polydisperzita.

1,4-butandiol + glycerol	Biomasa [g/l]	PHA [g/l]	3HB [mol. %]	4HB [mol. %]	Mw [kDa]	Đ
4 g/l + 2 g/l	2,69 ± 0,15	1,83 ± 0,02	16,4	83,6	120,03 ± 2,06	1,27
4 g/l + 4 g/l	2,79 ± 0,03	1,82 ± 0,10	25,6	74,4	86,01 ± 1,66	1,32
4 g/l + 6 g/l	2,28 ± 0,26	1,15 ± 0,03	57,5	42,5	76,05 ± 1,38	1,78
4 g/l + 8 g/l	2,43 ± 0,01	0,99 ± 0,12	63,6	36,4	66,28 ± 1,22	1,59
4 g/l + 20 g/l	2,56 ± 0,11	1,14 ± 0,05	95,4	4,6	9,61 ± 0,59	1,03

V rámci testování produkčního potenciálu bakterie *Aneurinibacillus* sp. H1 byla také zkoumána možnost produkce terpolymeru P(3HB-co-3HV-co-4HB). Jednotky 3HV a 4HB v terpolyesteru zlepšují mechanické a fyzikální vlastnosti materiálu, který má široké uplatnění, například v lékařských či farmaceutických aplikacích [112]. Schopnost produkce terpolymeru P(3HB-co-3HV-co-4HB) byla již dříve u některých mikroorganismů popsána [113], ale jednalo se spíše o mezofilní druhy. Produkce terpolymeru je například zaznamenána u bakterie *Cupriavidus necator*, kdy byla schopna produkce P(3HB-co-3HV-co-4HB) na glukóze, kyselině propionové a za použití prekurzoru 4HB buď γ -butyrolaktonu nebo kyseliny 4-hydroxybutanové. Největší frakci ve výsledném terpolymeru ale stále zaujímal 3HB [114]. Vyššího obsahu 4HB v terpolymeru bylo dosaženo u bakterie *Alcaligenes* sp. A-04, avšak dvojestupňovým procesem [115]. Schopnost tvořit terpolymer byla také zaznamenána u archeae *Haloferax mediterranei* avšak opět s minimálním zastoupením 4HB [116].

Při produkci terpolymeru P(3HB-co-3HV-co-4HB) byly vyzkoušeny dvě varianty aplikace zdroje uhlíku. První variantou byla směs 1,4-butandiolu a glycerolu, oba o koncentraci 4 g/l, kdy glycerol sloužil především pro podpoření tvorby biomasy a 1,4-butandiol sloužil jako prekurzor tvorby 4HB. Druhá varianta obsahovala pouze 1,4-butandiol o koncentraci 4 g/l jako zdroj uhlíku a zároveň jako prekurzor 4HB jednotek. V obou případech byla přidána kyselina valerová o koncentraci 2 g/l jako prekurzor 3HV. Kyselina valerová byla přidána ve dvou časech kultivace, do první sady vzorků byla přidána hned na počátku kultivace, do druhé sady byla přidána po 24 hodinách kultivace. Výsledky experimentu zobrazuje tabulka 5.

Tabulka 5: Tvorba terpolymeru P(3HB-co-3HV-co-4HB) za využití různých substrátů. Jako zdroj uhlíku byl použit samotný 1,4-butandiol o koncentraci 4 g/l a směs 4 g/l 1,4-butandiolu (1,4-BD) a 4 g/l glycerolu, do obou variant zdroje uhlíku byly přidány 2 g/l kyseliny valerové, a to buď v čase kultivace 0 h nebo 24 h. Kultivace probíhala 72 hodin při 45 °C. Mw – molekulová hmotnost polymeru, Đ – polydisperzita.

Zdroj uhlíku	Přídavek kyseliny valerové	Biomasa [g/l]	PHA [g/l]	3HB [mol. %]	4HB [mol. %]	3HV [mol. %]	Mw [kDa]	Đ
1,4-BD + glycerol	0 h	0,71 ± 0,35	0,16 ± 0,01	52,0	0,0	48,0	117,91 ± 2,95	2,14
	24 h	1,41 ± 0,15	0,51 ± 0,05	94,6	3,5	1,8	77,86 ± 1,19	2,18
1,4-BD	0 h	1,44 ± 0,06	0,58 ± 0,03	12,7	54,2	33,1	117,84 ± 0,72	1,55
	24 h	0,84 ± 0,03	0,30 ± 0,01	29,3	69,8	0,9	192,00 ± 5,19	1,61

Z tabulky 5 je patrné, že izolát *Aneurinibacillus* sp. H1 je schopen produkce terpolymeru P(3HB-co-3HV-co-4HB). Zastoupení monomerních jednotek se liší v závislosti na použitém zdroji uhlíku a na čase přídavku kyseliny valerové. V případě směsi 1,4-butandiolu a glycerolu nebyl při přídavku kyseliny valerové v čase 0 tvořen terpolymer, ale pouze kopolymer P(3HB-co-3HV), kdy zastoupení monomeru 3HV bylo 48 mol. % a celková produkce PHA byla 0,16 g/l. Pokud se kyselina valerová přidala do směsi 1,4-butandiolu a glycerolu až po 24 hodinách kultivace biomasa vzrostla na 1,41 g/l s obsahem 0,51 g/l terpolymeru P(3HB-co-3HV-co-4HB), kdy byl převážně zastoupen monomer 3HB a to v 94,6 mol.%, 3,5 mol. % zaujímal monomer 4HB a necelé 2 mol. % tvořila jednotka 3HV. V případě použití pouze 1,4-butandiolu jako zdroje uhlíku bylo zastoupení 4HB vyšší. Při přídavku kyseliny valerové po 24 hodinách kultivace byla biomasa nižší a to 0,84 g/l. Terpolymer pak obsahoval nejvíce 4HB a to téměř 70 mol.%, dále byl tvořen přibližně z 29 mol. % 3HB a necelé 1 mol. % zaujímal 3HV. Molekulová hmotnost takto tvořeného terpolyesteru byla 192 kDa, což byla nejvyšší naměřená molekulová hmotnost PHA ve srovnání s ostatními hodnotami. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití samotného 1,4-butandiolu jako zdroje uhlíku s přídavkem kyseliny valerové hned na počátku kultivace. Biomasa byla 1,44 g/l s 40 % PHA na suchou biomasu. Všechny monomerní jednotky byly zastoupeny ve vyšších koncentracích. Nejvyšší podíl zastoupení měl 4HB a to 54,2 mol. %, poté byl nejvíce zastoupen 3HV 33,1 mol. % a nejmenší zastoupení měla jednotka 3HB s 12,7 mol. %. Molekulová hmotnost tohoto terpolymeru se pohybovala okolo 117 kDa s indexem polydisperzity 1,55. Na základě dostupné literatury neexistují zmínky o termofilním producentovi terpolymeru P(3HB-co-3HV-co-4HB) s vyšším zastoupením 4HB, proto se izolát *Aneurinibacillus* sp. H1 jeví jako vhodný kandidát pro průmyslovou tvorbu terpolymeru s vysokým zastoupením 4HB, protože právě monomer 4HB dává materiálu vhodné mechanické a technologické vlastnosti. Navíc je jeho výroba pouze jednostupňová a nevyžaduje drahé prekurzory jako je například kyselina 4-hydroxybutanová [88].

Izolát *Aneurinibacillus* sp. H1 prokázal velký biotechnologický potenciál, co se týká produkce PHA. Tato termofilní bakterie je schopna produkce PHA nejen na čistém glycerolu, ale také na odpadním glycerolu, a navíc bez jakékoliv další úpravy. Kromě polymeru P(3HB) je také schopna tvořit kopolymer P(3HB-co-3HV) se zastoupením až 66 mol. % 3HV. Kromě toho je také schopna za přídavku prekurzoru 1,4-butandiolu tvořit kopolymer P(3HB-co-4HB), který má široké uplatnění v medicíně či farmacii. Obsah monomeru 4HB závisí na použitém zdroji uhlíku, popřípadě poměru glycerolu a 1,4-butandiolu, kde se podíl zastoupení 4HB jednotky pohybuje od 4 do 95 mol. %. Tato skutečnost přispívá ke konkurenceschopnosti biotechnologického potenciálu daného izolátu, kdy v rámci úpravy vstupního zdroje lze upravit poměr jednotek v polymeru dle požadované aplikace. Mimo již zmíněných kopolymerů je také schopna produkce terpolymeru P(3HB-co-3HV-co-4HB). Na základě úpravy kultivačních podmínek lze opět připravit terpolymer o různém zastoupení monomerních jednotek. Díky těmto vlastnostem byla bakterie uložena v České sbírce mikroorganismů v Brně jako patentová kultura³ pod číslem CCM 8960. Výsledky shrnující optimalizaci produkce a produkci kopolymeru P(3HB-co-4HB) pomocí izolátu *Aneurinibacillus* sp. H1 byly také publikovány formou článku v impaktovaném časopise⁴. Materiálová charakterizace polymerů připravených pomocí bakterie *Aneurinibacillus* sp. H1 je shrnuta v článku Sedláček a kolektiv [117].

³ OBRUČA, S.; PERNICOVÁ, I.; KUČERA, D.; NOVÁČKOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; Vysoké učení technické v Brně, Brno, CZ: Způsob výroby polyhydroxyalkanoátů pomocí izolátu termofilního bakteriálního kmene *Aneurinibacillus* sp. H1. 308626, patent. (2021)

⁴ PERNICOVA, I., I. NOVACKOVA, P. SEDLACEK, et al. 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* [online]. 2020, 12(6). ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym12061235

4. ZÁVĚR

Jedním z cílů předložené disertační práce bylo otestovat vybrané procesy a postupy, které by mohly výrazně snížit produkční cenu PHA. Takovou možností je využití extrémofilních producentů PHA. Mezi první testované extrémofily v této práci patřily halofilní bakterie. Produkce u halofilních bakterií je již částečně popsána, avšak žádná dosavadní literatura se přímo nevěnuje využití halofilních mikroorganismů k produkci PHA s využitím odpadního oleje jako substrátu. Za tímto účelem bylo otestováno devět sbírkových druhů halofilní bakterie rodu *Halomonas*. Avšak významnější produkce PHA na oleji jako jediném zdroji uhlíku byly schopny pouze dvě a to *H. hydrothermalis* a *H. neptunia*. Protože tyto bakterie nejsou dostatečně prostudovány, byly optimalizovány vybrané kultivační/produkční parametry.

Významná část práce se zabývala studiem produkce PHA pomocí termofilních organismů. Produkce PHA u termofilních bakterií je jen zřídka popsána, proto jsme se zaměřili na izolaci nových termofilních producentů z přírodních vzorků jako je kompost či aktivovaný kal. Izolace termofilních producentů PHA probíhala několika způsoby. Prvním izolačním postupem bylo aerobní dynamické krmení. Z ADK byl získán izolát, který byl po sekvenaci malé ribozomální podjednotky 16S rRNA klasifikován jako *Tepidiphilus* sp. Avšak podle našich výsledků se nezdá, že by zástupci rodu *Tepidiphilus* byly biotechnologicky zajímavými producenty PHA.

V rámci práce pak byl vyvinut původní postup pro izolaci termofilních producentů PHA ze směsných mikrobiálních konsorcií. Je známo, že PHA granule pomáhají zvyšovat robustnost bakterií vůči osmotickému stresu. Tento fakt byl využit k návrhu izolační metody využívající právě změny v osmotickém tlaku. Vzorek kompostu či kalu byl smíchán s produkčním médiem. Po následné kultivaci byla kultura vystavena nejdříve hypertonickému prostředí představující roztok 100 g/l NaCl a následně byla promyta destilovanou vodou. Poté byla kultura vyseta na agarové misky PHA a pozitivní kolonie byly identifikovány pomocí ATR-FTIR. Pomocí tohoto izolačního postupu došlo k výraznému zvýšení úspěšnosti v izolaci termofilních producentů PHA. Pomocí této metody bylo z různých vhodných konsorcií získáno několik desítek izolátů, které byly následně studovány ve smyslu jejich taxonomické klasifikace i schopnosti produkce PHA s využitím různých substrátů.

Izoláty, které byly schopny opětovného růstu, byly taxonomicky zařazeny pomocí sekvenace genu *16S rRNA*. Mezi izoláty se vyskytovaly jak gram negativní, tak gram pozitivní bakterie. Také byly zastoupeny dva kmeny, a to *Proteobacteria* a ve větší míře kmen *Firmicutes*, především však třída *Bacili*. Mezi izoláty jsou v menší míře přítomni zástupci rodu *Chelatococcus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus* nebo *Geobacillus*. Ve větším zastoupení jsou poté izoláty patřící do rodu *Bacillus* a více než polovinu všech izolátů představují zástupci rodu *Aneurinibacillus*.

U izolátů byla provedena detekce přítomnosti PHA syntázy pomocí PCR. PHA syntáza je klíčový enzym v metabolismu PHA a dělí se do čtyř tříd. Čtvrtá třída PHA syntáz je charakteristická pro bakterie patřící do rodu *Bacillus*. Avšak tato třída syntáz se dělí do několika podskupin a jejich molekulární detekce s využitím PCR není díky jejich heterogenitě snadná. Proto byla navržena nová sada primerů pro detekci PHA syntázy přímo pro rod *Aneurinibacillus*. U většiny izolátů se podařilo detekovat alespoň jednu PHA syntázu.

Tři izoláty s označením H1, H2 a K2 byly studovány podrobněji. Taxonomicky byly zařazeny k rodu *Aneurinibacillus*. Kvůli komplexnějšímu zařazení byly izoláty zaslány do České sbírky mikroorganismů v Brně, kdy byly zařazeny i na základě fenotypových vlastností. Bylo zjištěno, že se jedná o sporulující gram pozitivní bakterie. Izolát H1 byl identifikován jako *Aneurinibacillus* sp., zbylé dva izoláty H2 a K2 byly zařazeny jako *Aneurinibacillus migulans*. U všech tří izolátů byla potvrzena PHA syntáza třídy IV, pomocí primerů navržených přímo pro rod *Aneurinibacillus*.

Pro zvýšení produkce PHA u těchto tří izolátů byly optimalizovány kultivační podmínky a produkční médium. Mezi optimalizované parametry patřily zdroje dusíku, komplexní zdroje, jejich koncentrace a kultivační teplota. Optimální teplota kultivace se pohybuje okolo 45 °C, proto se jedná spíše o mírné termofily až termotolerantní bakterie.

Také byla testována schopnost tvořit PHA kopolymery. Pro tvorbu kopolymeru s 3HV byly testovány následující prekurzory – kyselina levulová, propionát sodný, propan-1-ol a kyselina valerová. Izolát H1 byl schopen produkce kopolymeru P(3HB-co-3HV) s propionátem sodným a kyselinou valerovou. Výsledný kopolymer při použití propionátu sodného jako prekurzoru obsahoval 32 mol. % monomeru 3HV, zato při použití kyseliny valerové obsahoval téměř 67 mol. % 3HV. Schopnost tvořit kopolymer P(3HB-co-4HB) byla testována za využití 1,6-hexandiolu, γ -butyrolaktonu a 1,4-butandiolu jako prekurzoru, které také sloužily jako jediný zdroj uhlíku. Všechny tři izoláty byly schopny produkce žádaného kopolymeru. Nejvyšší produkce pak dosahoval izolát H1.

Na základě průběžných výsledků se izolát *Aneurinibacillus* sp. H1 jevil jako neslibnější producent PHA, proto byl u něj dále testován a rozvíjen potenciál produkce PHA. Byl proveden screening produkce PHA na různých zdrojích uhlíku, kde nejlepších výsledků dosahoval glycerol. Také byla testována vhodná koncentrace glycerolu a zároveň byl jako substrát testován i odpadní glycerol, který vzniká při výrobě bionafty a jedná se tak o levný odpadní zdroj uhlíku.

Dále také bylo u izolátu H1 rozvíjeno studium produkce materiálůvě zajímavého kopolymeru P(3HB-co-4HB). Jako nejvhodnější zdroj uhlíku pro produkci kopolymeru P(3HB-co-4HB) se ukázala směs glycerolu a 1,4-butandiolu. Jejich vzájemné koncentrační poměry ovlivňují složení výsledného kopolymeru, kdy v závislosti na obsahu 1,4-butandiolu v médiu lze kontrolovat obsah 4HB v rozmezí 4 až 95 mol. %. Tento fakt přispívá ke zvýšení konkurenceschopnosti výroby PHA pomocí izolátu H1, kdy pouhou úpravou kultivačních podmínek je možné připravovat kopolymery s různým složením monomerů, a tedy různými mechanickými vlastnostmi.

Předložená práce potvrzuje, že mezi extrémofilními mikroorganismy se vyskytuje celá řada zajímavých producentů PHA. Někteří zástupci jsou vhodnými kandidáty pro další studium případně i pro průmyslovou produkci PHA. Izolát *Aneurinibacillus* sp. H1 je podle našich výsledků slibný producent PHA kopolymerů, proto byl uložen v České sbírce mikroorganismů jako patentová kultura *Aneurinibacillus* sp. H1 CCM 8960 a produkce PHA pomocí tohoto izolátu byla patentově chráněna patentem číslo 308626.

5. LITERATURA

- [1] SUDESH, K. Bio-Based and Biodegradable Polymers. *Polyhydroxyalkanoates from Palm Oil: Biodegradable Plastics* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013, , 3-36. SpringerBriefs in Microbiology. ISBN 978-3-642-33538-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-33539-6_2
- [2] MUHAMMADI, S., M. AFZAL a S. HAMEED. Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. *Green Chemistry Letters and Reviews* [online]. 2015, **8**(3-4), 56-77. ISSN 1751-8253. Dostupné z: doi:10.1080/17518253.2015.1109715
- [3] KUMAR, V., S. KUMAR a D. SINGH. Microbial polyhydroxyalkanoates from extreme niches: Bioprospection status, opportunities and challenges. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, **147**, 1255-1267. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.09.253
- [4] ADELEYE, A. T., Ch. K. ODOH, O. Ch. ENUDI, O. O. BANJOKO, O. O. OSIBOYE, E. TOLUWALOPE ODEDIRAN a H. LOUIS. Sustainable synthesis and applications of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from biomass. *Process Biochemistry* [online]. 2020, **96**, 174-193. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2020.05.032
- [5] ALI, I. a N. JAMIL. Polyhydroxyalkanoates: Current applications in the medical field. *Frontiers in Biology* [online]. 2016, **11**(1), 19-27. ISSN 1674-7984. Dostupné z: doi:10.1007/s11515-016-1389-z
- [6] KRUEGER, C. L., C. M. RADETSKI, A. G. BENDIA, I. M. OLIVEIRA, M. A. CASTRO-SILVA, C. R. RAMBO, R. V. ANTONIO a A. O.S. LIMA. Bioconversion of cassava starch by-product into Bacillus and related bacteria polyhydroxyalkanoates. *Electronic Journal of Biotechnology* [online]. 2012, **15**(3). ISSN 0717-3458. Dostupné z: doi:10.2225/vol15-issue3-fulltext-6
- [7] LI, Z., J. YANG a X. J. LOH. Polyhydroxyalkanoates: opening doors for a sustainable future. *NPG Asia Materials* [online]. 2016, **8**(4), 265-265. ISSN 1884-4049. Dostupné z: doi:10.1038/am.2016.48
- [8] LOO, Ch.Y. a K. SUDESH. Polyhydroxyalkanoates: Bio-based microbial plastics and their properties. *Malaysian Polymer Journal* [online]. 2007, **2**(2), 31-57.
- [9] OBRUCA, S., I. MAROVA, Z. SVOBODA a R. MIKULIKOVA. Use of controlled exogenous stress for improvement of poly(3-hydroxybutyrate) production in *Cupriavidus necator*. *Folia Microbiologica* [online]. 2010, **55**(1), 17-22. ISSN 0015-5632. Dostupné z: doi:10.1007/s12223-010-0003-z
- [10] OJUMU, T.V., J. YU a B.O. SOLOMON. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology* [online]. 2004, **3**(1), 18-24. ISSN 1684-5315. Dostupné také z: <https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/3487/1/jb04003.pdf>
- [11] KUNASUNDARI, B. a K. SUDESH. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Express Polymer Letters* [online]. 2011, **5**(7), 620-634. ISSN 1788618X. Dostupné z: doi:10.3144/expresspolymlett.2011.60
- [12] MEZZOLLA, V., O. D'URSO a P. POLTRONIERI. Role of PhaC Type I and Type II Enzymes during PHA Biosynthesis. *Polymers* [online]. 2018, **10**(8). ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym10080910
- [13] SUDESH, K, H ABE a Y DOI. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science* [online]. 2000, **25**(10), 1503-1555 [cit. 2020-09-18]. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/S0079-6700(00)00035-6
- [14] HONG, S.H. a S.Y. LEE, S.J. PARK, ed. Polymerization of Building Blocks to Macromolecules: Polyhydroxyalkanoates as an Example. SMOLKE, Christina. *The Metabolic Pathway Engineering Handbook: Fundamentals*. 1st Edition. USA: CRC Press, 2009, 4.1-4.20. ISBN 9781439802960.
- [15] REHM, B. H.A. a A. STEINBÜCHEL. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 1999, **25**(1-3), 3-19. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/S0141-8130(99)00010-0
- [16] CHEK, M. F., S.Y. KIM, T. MORI, H. ARSAD, M. R. SAMIAN, K. SUDESH a T. HAKOSHIMA. Structure of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase PhaC from *Chromobacterium* sp. USM2, producing biodegradable plastics. *Scientific Reports* [online]. 2017, **7**(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-05509-4
- [17] GUO, W., J. DUAN, W. GENG, J. FENG, S. WANG a C. SONG. Comparison of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates synthases from *Pseudomonas mendocina* NK-01 with the same substrate

- specificity. *Microbiological Research* [online]. 2013, **168**(4), 231-237. ISSN 09445013. Dostupné z: doi:10.1016/j.micres.2012.11.003
- [18] ZOU, H., M. SHI, T. ZHANG, L. LI, L. LI a M. XIAN. Natural and engineered polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase: key enzyme in biopolyester production. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2017, **101**(20), 7417-7426. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-017-8485-0
- [19] CHEN, G.Q., I. HAJNAL, H. WU, L. LV a J. YE. Engineering Biosynthesis Mechanisms for Diversifying Polyhydroxyalkanoates. *Trends in Biotechnology* [online]. 2015, **33**(10), 565-574. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2015.07.007
- [20] NAYAK, P. K., A. K. MOHANTY, T. GAONKAR, A. KUMAR, S. N. BHOSLE a S. GARG. Rapid Identification of Polyhydroxyalkanoate Accumulating Members of Bacillales Using Internal Primers for phaC Gene of Bacillus megaterium. *ISRN Bacteriology* [online]. 2013, **2013**, 1-12. ISSN 2314-6273. Dostupné z: doi:10.1155/2013/562014
- [21] ARCOS-HERNANDEZ, M. V., N. GURIEFF, S. PRATT, P. MAGNUSSON, A. WERKER, A. VARGAS a P. LANT. Rapid quantification of intracellular PHA using infrared spectroscopy: An application in mixed cultures. *Journal of Biotechnology* [online]. 2010, **150**(3), 372-379. ISSN 01681656. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiotec.2010.09.939
- [22] SHAMALA, T. R., M. S. DIVYASHREE, R. DAVIS, K. S. L. KUMARI, S. V. N. VIJAYENDRA a B. RAJ. Production and characterization of bacterial polyhydroxyalkanoate copolymers and evaluation of their blends by fourier transform infrared spectroscopy and scanning electron microscopy. *Indian Journal of Microbiology* [online]. 2009, **49**(3), 251-258. ISSN 0046-8991. Dostupné z: doi:10.1007/s12088-009-0031-z
- [23] KOLLER, M. a A. RODRÍGUEZ-CONTRERAS. Techniques for tracing PHA-producing organisms and for qualitative and quantitative analysis of intra- and extracellular PHA. *Engineering in Life Sciences* [online]. 2015, **15**(6), 558-581. ISSN 16180240. Dostupné z: doi:10.1002/elsc.201400228
- [24] ROTHSCHILD, L. J. a R. L. MANCINELLI. Life in extreme environments. *Nature* [online]. 2001, **409**(6823), 1092-1101. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/35059215
- [25] PERSIDIS, Aris. Extremophiles. *Nature Biotechnology* [online]. 1998, **16**(6), 593-594 [cit. 2020-10-19]. ISSN 1087-0156. Dostupné z: doi:10.1038/nbt0698-593
- [26] NEE, S. Introducing the extremophiles. *Nature* [online]. 2007, **448**(7152), 413-414. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/448413a
- [27] BOSMA, E.F. Isolation and screening of thermophilic bacilli from compost for electrotransformation and fermentation: Characterization of Bacillus smithii ET 138 as a new biocatalyst. *Isolation, characterization and engineering of Bacillus smithii : a novel thermophilic platform organism for green chemical production*. 1st Edition. 2015: Wageningen University, 2015, s. 57-84. ISBN 9789462575073 - 220.
- [28] TAYLOR, M. P., L. VAN ZYL, M. TUFFIN a D. COWAN. Extremophiles and Biotechnology: How Far Have We Come?. *Extremophiles: Microbiology and Biotechnology*. 1. USA: Caister Academic Press, 2012, s. 1-24. ISBN 978-1-912530-54-0.
- [29] COKER, J. A. Extremophiles and biotechnology: current uses and prospects. *F1000Research* [online]. 2016, **5**. ISSN 2046-1402. Dostupné z: doi:10.12688/f1000research.7432.1
- [30] OBRUCA, S., P. SEDLACEK, M. KOLLER, D. KUCERA a I. PERNICOVA. Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. *Biotechnology Advances* [online]. 2018, **36**(3), 856-870. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2017.12.006
- [31] CHEN, G.Q. a X.R. JIANG. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2018, **50**, 94-100. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2017.11.016
- [32] CHEN, G.Q. a X.R. JIANG. Engineering bacteria for enhanced polyhydroxyalkanoates (PHA) biosynthesis. *Synthetic and Systems Biotechnology* [online]. 2017, **2**(3), 192-197. ISSN 2405805X. Dostupné z: doi:10.1016/j.synbio.2017.09.001
- [33] SAMROT, A., M. BHAKYALAKSHMI, K. L. VENKATRAMAN, K. SAHITI, S.A. PHILIP, T. JAHNAVI a P. SENTHILKUMAR. Optimization and Characterization of Poly[R]hydroxyalkanoates of Pseudomonas aeruginosa. *Biosciences, Biotechnology Research Asia* [online]. 2015, **12**(3), 2133-2138. ISSN 09731245. Dostupné z: doi:10.13005/bbra/1883

- [34] SATOH, H., Y. IWAMOTO, T. MINO a T. MATSUO. Activated sludge as a possible source of biodegradable plastic. *Water Science and Technology* [online]. 1998, **38**(2), 103-109. ISSN 0273-1223. Dostupné z: doi:10.1016/S0273-1223(98)00435-1
- [35] DIAS, J. M. L., P. C. LEMOS, L. S. SERAFIM et al. Recent Advances in Polyhydroxyalkanoate Production by Mixed Aerobic Cultures: From the Substrate to the Final Product. *Macromolecular Bioscience* [online]. 2006, **6**(11), 885-906. ISSN 16165187. Dostupné z: doi:10.1002/mabi.200600112
- [36] QUILLAGUAMÁN, J., H. GUZMÁN, D. VAN-THUOC a R. HATTI-KAUL. Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2010, **85**(6), 1687-1696. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-009-2397-6
- [37] SEDLACEK, P., E. SLANINOVA, M. KOLLER, J. NEBESAROVA, I. MAROVA, V. KRZYZANEK a S. OBRUCA. PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances. *New Biotechnology* [online]. 2019, **49**, 129-136. ISSN 18716784. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbt.2018.10.005
- [38] ALSAFADI, D. a O. AL-MASHAQBEH. A one-stage cultivation process for the production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) from olive mill wastewater by *Haloferax mediterranei*. *New Biotechnology* [online]. 2017, **34**, 47-53. ISSN 18716784. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbt.2016.05.003
- [39] CHEN, C. W., T.M. DON a H.F. YEN. Enzymatic extruded starch as a carbon source for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. *Process Biochemistry* [online]. 2006, **41**(11), 2289-2296. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2006.05.026
- [40] HUANG, T.Y., K.J. DUAN, S.Y. HUANG a C. W. CHEN. Production of polyhydroxyalkanoates from inexpensive extruded rice bran and starch by *Haloferax mediterranei*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [online]. 2006, **33**(8), 701-706. ISSN 1367-5435. Dostupné z: doi:10.1007/s10295-006-0098-z
- [41] SALGAONKAR, B. B. a J. M. BRAGANÇA. Utilization of Sugarcane Bagasse by *Halogeometricum borinquense* Strain E3 for Biosynthesis of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Bioengineering* [online]. 2017, **4**(4), 1-18. ISSN 2306-5354. Dostupné z: doi:10.3390/bioengineering4020050
- [42] HUU PHONG, T., D. VAN THUOC a K. SUDESH. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymers by *Yangia* sp. ND199 from different carbon sources. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2016, **84**, 361-366 [cit. 2020-10-22]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.12.037
- [43] SALGAONKAR, B.B., K. MANI a J.M. BRAGANCA. Characterization of polyhydroxyalkanoates accumulated by a moderately halophilic salt pan isolate *Bacillus megaterium* strain H16. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2013, **114**(5), 1347-1356. ISSN 13645072. Dostupné z: doi:10.1111/jam.12135
- [44] GUZMÁN, H., D. VAN-THUOC, J. MARTÍN, R. HATTI-KAUL a J. QUILLAGUAMÁN. A process for the production of ectoine and poly(3-hydroxybutyrate) by *Halomonas boliviensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2009, **84**(6), 1069-1077. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-009-2036-2
- [45] TAN, D., Q. WU, J.Ch. CHEN a G.Q. CHEN. Engineering *Halomonas* TD01 for the low-cost production of polyhydroxyalkanoates. *Metabolic Engineering* [online]. 2014, **26**, 34-47. ISSN 10967176. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymben.2014.09.001
- [46] SIMON-COLIN, C., G. RAGUÉNÈS, J. COZIEN a J.G. GUEZENNEC. *Halomonas profundus* sp. nov., a new PHA-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent shrimp. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2008, **104**(5), 1425-1432. ISSN 1364-5072. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03667.x
- [47] KUCERA, D., I. PERNICOVÁ, A. KOVALCIK et al. Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*. *Bioresource Technology* [online]. 2018, **256**, 552-556. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2018.02.062
- [48] REN, Y., Ch. LING, I. HAJNAL, Q. WU a G.Q. CHEN. Construction of *Halomonas bluephagenesis* capable of high cell density growth for efficient PHA production. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2018, **102**(10), 4499-4510. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-018-8931-7
- [49] SHEN, R., Z.Y. NING, Y.X. LAN, J.Ch. CHEN a G.Q. CHEN. Manipulation of polyhydroxyalkanoate granular sizes in *Halomonas bluephagenesis*. *Metabolic Engineering* [online]. 2019, **54**, 117-126. ISSN 10967176. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymben.2019.03.011

- [50] RIVERA-TERCEROS, P., E. TITO-CLAROS, S. TORRICO, S. CARBALLO, D. VAN-THUOC a J. QUILLAGUAMÁN. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by *Halomonas boliviensis* in an air-lift reactor. *Journal of Biological Research-Thessaloniki* [online]. 2015, **22**(1). ISSN 2241-5793. Dostupné z: doi:10.1186/s40709-015-0031-6
- [51] KULKARNI, S.O., P.P. KANEKAR, S.S. NILEGAONKAR, S.S. SARNAIK a J.P. JOG. Production and characterization of a biodegradable poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHB-co-PHV) copolymer by moderately haloalkalitolerant *Halomonas campisalis* MCM B-1027 isolated from Lonar Lake, India. *Bioresource Technology* [online]. 2010, **101**(24), 9765-9771. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2010.07.089
- [52] CERVANTES-UC, J.M., J. CATZIN, I. VARGAS, W. HERRERA-KAO, F. MOGUEL, E. RAMIREZ, S. RINCÓN-ARRIAGA a G. LIZAMA-UC. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates produced by an extreme halophilic bacterium, *Halomonas nitroreducens*, isolated from hypersaline ponds. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2014, **117**(4), 1056-1065. ISSN 13645072. Dostupné z: doi:10.1111/jam.12605
- [53] CIESIELSKI, S., J. MOŻEJKO a N. PISUTPAISAL. Plant oils as promising substrates for polyhydroxyalkanoates production. *Journal of Cleaner Production* [online]. 2015, **106**, 408-421. ISSN 09596526. Dostupné z: doi:10.1016/j.jclepro.2014.09.040
- [54] OBRUCA, S., O. SNAJDAR, Z. SVOBODA a I. MAROVA. Application of random mutagenesis to enhance the production of polyhydroxyalkanoates by *Cupriavidus necator* H16 on waste frying oil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2013, **29**(12), 2417-2428. ISSN 0959-3993. Dostupné z: doi:10.1007/s11274-013-1410-5
- [55] ARORA, N. K. a H. PANOSYAN. Extremophiles: applications and roles in environmental sustainability. *Environmental Sustainability* [online]. 2019, **2**(3), 217-218. ISSN 2523-8922. Dostupné z: doi:10.1007/s42398-019-00082-0
- [56] PÉREZ-ARAUZ, A.O., A.E. AGUILAR-RABIELA, A. VARGAS-TORRES, A.-I. RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, N. CHAVARRÍA-HERNÁNDEZ, B. VERGARA-PORRAS a M.R. LÓPEZ-CUELLAR. Production and characterization of biodegradable films of a novel polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesized from peanut oil. *Food Packaging and Shelf Life* [online]. 2019, **20**. ISSN 22142894. Dostupné z: doi:10.1016/j.fpsl.2019.01.001
- [57] IBRAHIM, M.H.A., A. WILLEMS a A. STEINBÜCHEL. Isolation and characterization of new poly(3HB)-accumulating star-shaped cell-aggregates-forming thermophilic bacteria. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2010, **5**(109), 1579-1590. ISSN 13645072. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04786.x
- [58] SHEU, D.S., W.M. CHEN, J.Y. YANG a R.Ch. CHANG. Thermophilic bacterium *Caldimonas taiwanensis* produces poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from starch and valerate as carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2009, **44**(5), 289-294. ISSN 01410229. Dostupné z: doi:10.1016/j.enzmictec.2009.01.004
- [59] PANTAZAKI, A. A., M. G. TAMBAKA, V. LANGLOIS, P. GUERIN a D. A. KYRIAKIDIS. Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis in *Thermus thermophilus*: Purification and biochemical properties of PHA synthase. *Molecular and Cellular Biochemistry* [online]. 2003, **254**(12), 173-183. ISSN 03008177. Dostupné z: doi:10.1023/A:1027373100955
- [60] LIU, Y., S. HUANG, Y. ZHANG a F. XU. Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus shackletonii* K5 from a biotrickling filter for the production of polyhydroxybutyrate. *Journal of Environmental Sciences* [online]. 2014, **26**(7), 1453-1462. ISSN 10010742. Dostupné z: doi:10.1016/j.jes.2014.05.011
- [61] SERAFIM, L. S., P. C. LEMOS, R. OLIVEIRA a M. A.M. REIS. Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 2004, **87**(2), 145-160. ISSN 0006-3592. Dostupné z: doi:10.1002/bit.20085
- [62] VALENTINO, F., F. MORGAN-SAGASTUME, S. CAMPANARI, M. VILLANO, A. WERKER a M. MAJONE. Carbon recovery from wastewater through bioconversion into biodegradable polymers. *New Biotechnology* [online]. 2017, **37**, 9-23. ISSN 18716784. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbt.2016.05.007
- [63] MADKOUR, M. H., D. HEINRICH, M.A. ALGHAMDI, I. I. SHABBAJ a A. STEINBÜCHEL. PHA Recovery from Biomass. *Biomacromolecules* [online]. 2013, **14**(9), 2963-2972. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm4010244

- [64] JOHNSON, K., Y. JIANG, R. KLEEREBEZEM, G. MUYZER a M. C. M. VAN LOOSDRECHT. Enrichment of a Mixed Bacterial Culture with a High Polyhydroxyalkanoate Storage Capacity. *Biomacromolecules* [online]. 2009, **10**(4), 670-676. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm8013796
- [65] MANAIA, C. M., B. NOGALES a O. C. NUNES. Tepidiphilus margaritifera gen. nov., sp. nov., isolated from a thermophilic aerobic digester. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2003, **53**(5), 1405-1410. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.02538-0
- [66] PODDAR, A., R. T. LEPCHA a S. K. DAS. Taxonomic study of the genus Tepidiphilus: transfer of Petrobacter succinatimandens to the genus Tepidiphilus as Tepidiphilus succinatimandens comb. nov., emended description of the genus Tepidiphilus and description of Tepidiphilus thermophilus sp. nov., isolated from a terrestrial hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2014, **64**(1), 228-235. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.056424-0
- [67] UniProtKB - A0A0K6ITG6: (A0A0K6ITG6_9PROT). *UniProtKB* [online]. 2015. Dostupné také z: <https://www.uniprot.org/uniprot/A0A0K6ITG6>
- [68] OBRUCA, S., P. SEDLACEK, F. MRAVEC et al. The presence of PHB granules in cytoplasm protects non-halophilic bacterial cells against the harmful impact of hypertonic environments. *New Biotechnology* [online]. 2017, **39**, 68-80. ISSN 18716784. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbt.2017.07.008
- [69] SEDLACEK, P., E. SLANINOVA, V. ENEV et al. What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2019, **103**(4), 1905-1917. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-018-09584-z
- [70] KIM, M. a J. CHUN. 16S rRNA Gene-Based Identification of Bacteria and Archaea using the EzTaxon Server. *New Approaches to Prokaryotic Systematics* [online]. Elsevier, 2014, , 61-74. Methods in Microbiology. ISBN 9780128001769. Dostupné z: doi:10.1016/bs.mim.2014.08.001
- [71] JOHNSON, J. S., D. J. SPAKOWICZ, B.Y. HONG et al. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications* [online]. 2019, **10**(1). ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-019-13036-1
- [72] JANDA, J. M. a S. L. ABBOTT. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2007, **45**(9), 2761-2764. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.01228-07
- [73] KIM, M., H.S. OH, S.Ch. PARK a J. CHUN. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2014, **64**(2), 346-351. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.059774-0
- [74] MIZRAHI-MAN, O., E. R. DAVENPORT, Y. GILAD a B. A. WHITE. Taxonomic Classification of Bacterial 16S rRNA Genes Using Short Sequencing Reads: Evaluation of Effective Study Designs. *PLoS ONE* [online]. 2013, **8**(1). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0053608
- [75] WANG, X., I. K. JORDAN a L.W. MAYER. A Phylogenetic Perspective on Molecular Epidemiology. *Molecular Medical Microbiology* [online]. Elsevier, 2015, , 517-536. ISBN 9780123971692. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-397169-2.00029-9
- [76] GUPTA, R. The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. **24**(4), 367-402. ISSN 01686445. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-6445(00)00031-0
- [77] CUI, B., S. HUANG, F. XU, R. ZHANG a Y. ZHANG. Improved productivity of poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) in thermophilic Chelatococcus daeguensis TAD1 using glycerol as the growth substrate in a fed-batch culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2015, **99**(14), 6009-6019. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-015-6489-1
- [78] IBRAHIM, M. H. A. a A. STEINBUHEL. High-Cell-Density Cyclic Fed-Batch Fermentation of a Poly(3-Hydroxybutyrate)-Accumulating Thermophile, Chelatococcus sp. Strain MW10. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2010, **76**(23), 7890-7895. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.01488-10
- [79] SINGH, G., A. KUMARI, A. MITTAL, A. YADAV a N. K. AGGARWAL. Poly β -Hydroxybutyrate Production by Bacillus subtilis NG220 Using Sugar Industry Waste Water. *BioMed Research International* [online]. 2013, **2013**, 1-10. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2013/952641
- [80] ANJALI, M., C. SUKUMAR, A. KANAKALAKSHMI a K. SHANTHI. Enhancement of growth and production of polyhydroxyalkanoates by Bacillus subtilis from agro-industrial waste as carbon substrates.

- Composite Interfaces* [online]. 2013, **21**(2), 111-119. ISSN 0927-6440. Dostupné z: doi:10.1080/15685543.2013.834200
- [81] SANGKHARAK, K. a P. PRASERTSAN. Municipal Wastes Treatment and Production of Polyhydroxyalkanoate by Modified Two-Stage Batch Reactor. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2013, **21**(4), 1009-1015. ISSN 1566-2543. Dostupné z: doi:10.1007/s10924-013-0597-8
- [82] XIAO, Z., Y. ZHANG, L. XI, F. HUO, J. ZHAO a J. LI. Thermophilic production of polyhydroxyalkanoates by a novel *Aneurinibacillus* strain isolated from Gudao oilfield, China. *Journal of Basic Microbiology* [online]. 2015, **55**(9), 1125-1133. ISSN 0233111X. Dostupné z: doi:10.1002/jobm.201400843
- [83] SINGH, M., S. K.S. PATEL a V. C. KALIA. *Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates. *Microbial Cell Factories* [online]. 2009, **8**(1). ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/1475-2859-8-38
- [84] BINHAYEEDING, N., S. KLOMKLAO a K. SANGKHARAK. Utilization of Waste Glycerol from Biodiesel Process as a Substrate for Mono-, Di-, and Triacylglycerol Production. *Energy Procedia* [online]. 2017, **138**, 895-900. ISSN 18766102. Dostupné z: doi:10.1016/j.egypro.2017.10.130
- [85] BALA-LITWINIĄK, A. a H. RADOMIAK. Possibility of the Utilization of Waste Glycerol as an Addition to Wood Pellets. *Waste and Biomass Valorization* [online]. 2019, **10**(8), 2193-2199. ISSN 1877-2641. Dostupné z: doi:10.1007/s12649-018-0260-7
- [86] DE PAULA, F. C., S. KAKAZU, C. B. Ch. DE PAULA, J. G. C. GOMEZ a J. CONTIERO. Polyhydroxyalkanoate production from crude glycerol by newly isolated *Pandoraea* sp. *Journal of King Saud University - Science* [online]. 2017, **29**(2), 166-173. ISSN 10183647. Dostupné z: doi:10.1016/j.jksus.2016.07.002
- [87] KOLLER, M. a L. MARSALEK. Principles of Glycerol-Based Polyhydroxyalkanoate Production. *Applied Food Biotechnology* [online]. 2015, **2**(4), 3-10. ISSN 2423-4214. Dostupné z: doi:10.22037/afb.v2i4.8270
- [88] MARTIN, D.P. a S. F. WILLIAMS. Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2003, **16**(2), 97-105. ISSN 1369703X. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-703X(03)00040-8
- [89] BIERNACKI, M., M. MARZEC, T. ROICK, R. PÄTZ, K. BARONIAN, R. BODE a G. KUNZE. Enhancement of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) accumulation in *Arxula adeninivorans* by stabilization of production. *Microbial Cell Factories* [online]. 2017, **16**(1). ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/s12934-017-0751-4
- [90] NOVACKOVA, I., D. KUCERA, J. PORIZKA, I. PERNICOVA, P. SEDLACEK, M. KOLLER, A. KOVALCIK a S. OBRUCA. Adaptation of *Cupriavidus necator* to levulinic acid for enhanced production of P(3HB-co-3HV) copolyesters. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2019, **151**. ISSN 1369703X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2019.107350
- [91] LIU, J., Y. ZHAO, M. DIAO et al. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Production by *Rhodospirillum rubrum* Using a Two-Step Culture Strategy. *Journal of Chemistry* [online]. 2019, **2019**, 1-8. ISSN 2090-9063. Dostupné z: doi:10.1155/2019/8369179
- [92] CHEN, Q., Q. WANG, G. WEI, Q. LIANG a Q. QI. Production in *Escherichia coli* of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) with Differing Monomer Compositions from Unrelated Carbon Sources. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2011, **77**(14), 4886-4893. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.00091-11
- [93] SRIRANGAN, K., X. LIU, T. T. TRAN, T.C. CHARLES, M. MOO-YOUNG a C. P. CHOU. Engineering of *Escherichia coli* for direct and modulated biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer using unrelated carbon sources. *Scientific Reports* [online]. 2016, **6**(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep36470
- [94] GÜNGÖRMEDI, G., M. DEMIRBILEK, M. B. MUTLU, E. B. DENKBAŞ a A. ÇABUK. Polyhydroxybutyrate and hydroxyvalerate production by *Bacillus megaterium* strain A1 isolated from hydrocarbon-contaminated soil. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2014, **131**(15), -. ISSN 00218995. Dostupné z: doi:10.1002/app.40530
- [95] SMITH, J. R. a D. A. LAMPROU. Polymer coatings for biomedical applications: a review. *Transactions of the IMF* [online]. 2014, **92**(1), 9-19. ISSN 0020-2967. Dostupné z: doi:10.1179/0020296713Z.000000000157

- [96] WU, J., K. XUE, H. LI, J. SUN, K. LIU a M. A. BARBOSA. Improvement of PHBV Scaffolds with Bioglass for Cartilage Tissue Engineering. *PLoS ONE* [online]. 2013, **8**(8). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0071563
- [97] RIEKES, M., L. R. JUNIOR, R. PEREIRA, P. BORBA, D. FERNANDES a H. STULZER. Development and Evaluation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and Polycaprolactone Microparticles of Nimodipine. *Current Pharmaceutical Design* [online]. 2013, **19**(41), 7264-7270. ISSN 13816128. Dostupné z: doi:10.2174/138161281941131219125657
- [98] CHEN, Y., Y.H. TSAI, I.N. CHOU, S.H. TSENG a H.S. WU. Application of Biodegradable Polyhydroxyalkanoates as Surgical Films for Ventral Hernia Repair in Mice. *International Journal of Polymer Science* [online]. 2014, **2014**, 1-11. ISSN 1687-9422. Dostupné z: doi:10.1155/2014/789681
- [99] RIVERA-BRISO, A. a Á. SERRANO-AROCA. Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate): Enhancement Strategies for Advanced Applications. *Polymers* [online]. 2018, **10**(7). ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym10070732
- [100] KIM, J. S., B.H. LEE a B.S. KIM. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Ralstonia eutropha*. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2005, **23**(2), 169-174. ISSN 1369703X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2005.01.016
- [101] BONARTSEV, A. P., G. A. BONARTSEVA, I. V. RESHETOV, K. V. SHAITAN a M. P. KIRPICHNIKOV. Application of Polyhydroxyalkanoates in Medicine and the Biological Activity of Natural Poly(3-Hydroxybutyrate). *Acta Naturae* [online]. 2019, **11**(2), 4-16. ISSN 2075-8251. Dostupné z: doi:10.32607/20758251-2019-11-2-4-16
- [102] BEWLEY, B. R., A. BERKALIEV, H. HENRIKSEN, D.B. BALL a L. S. OTT. Waste glycerol from biodiesel synthesis as a component in deep eutectic solvents. *Fuel Processing Technology* [online]. 2015, **138**, 419-423. ISSN 03783820. Dostupné z: doi:10.1016/j.fuproc.2015.05.025
- [103] HUNSOM, M. a Ch. AUTTHANIT. Adsorptive purification of crude glycerol by sewage sludge-derived activated carbon prepared by chemical activation with H₃PO₄, K₂CO₃ and KOH. *Chemical Engineering Journal* [online]. 2013, **229**, 334-343. ISSN 13858947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2013.05.120
- [104] VOLOVA, T., A. DEMIDENKO, E. KISELEV, S. BARANOVSKIY, E. SHISHATSKAYA a N. ZHILA. Polyhydroxyalkanoate synthesis based on glycerol and implementation of the process under conditions of pilot production. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2019, **103**(1), 225-237. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-018-9460-0
- [105] HSIAO, L.J., M.Ch. LEE, P.J. CHUANG, Y.Y. KUO, J.H. LIN, T.M. WU a S.Y. LI. The production of poly(3-hydroxybutyrate) by thermophilic *Caldimonas manganoxidans* from glycerol. *Journal of Polymer Research* [online]. 2018, **25**(4). ISSN 1022-9760. Dostupné z: doi:10.1007/s10965-018-1486-6
- [106] SADYKOV, M. R., J.S. AHN, T.J. WIDHELM et al. Poly(3-hydroxybutyrate) fuels the tricarboxylic acid cycle and de novo lipid biosynthesis during *Bacillus anthracis* sporulation. *Molecular Microbiology* [online]. 2017, **104**(5), 793-803. ISSN 0950382X. Dostupné z: doi:10.1111/mmi.13665
- [107] CHEN, H.J., T.K. TSAI, S.Ch. PAN, J.S. LIN, Ch.L. TSENG a G.Ch. SHAW. The master transcription factor Spo0A is required for poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) accumulation and expression of genes involved in PHB biosynthesis in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2010, **304**(1), 74-81. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01888.x
- [108] WU, Q., H. HUANG, G. HU, J. CHEN, K.P. HO a G.Q. CHEN. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media. *Antonie van Leeuwenhoek* [online]. **80**(2), 111-118. ISSN 00036072. Dostupné z: doi:10.1023/A:1012222625201
- [109] NORHAFINI, H., L. THINAGARAN, K. SHANTINI, K.H. HUONG, I. M. SYAFIQ, K. BHUBALAN a A. A. AMIRUL. Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) with high 4HB composition and PHA content using 1,4-butanediol and 1,6-hexanediol for medical application. *Journal of Polymer Research* [online]. 2017, **24**(11). ISSN 1022-9760. Dostupné z: doi:10.1007/s10965-017-1345-x
- [110] LI, Z.J., Z.Y. SHI, J. JIAN, Y.Y. GUO, Q. WU a G.Q. CHEN. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from unrelated carbon sources by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering* [online]. 2010, **12**(4), 352-359. ISSN 10967176. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymben.2010.03.003
- [111] TSUGE, T., M. HYAKUTAKE a K. MIZUNO. Class IV polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases and PHA-producing *Bacillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2015, **99**(15), 6231-6240. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-015-6777-9

- [112] AZIZ, N. A., C. S. SIPAUT a A.A.A. ABDULLAH. *Improvement of the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) terpolyester by manipulating the culture condition* [online]. 2012, **87**(11), 1607-1614. ISSN 02682575. Dostupné z: doi:10.1002/jctb.3817
- [113] KUCERA, D., I. NOVACKOVA, I. PERNICOVA, P. SEDLACEK a S. OBRUCA. Biotechnological Production of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-4-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) Terpolymer by *Cupriavidus* sp. DSM 19379. *Bioengineering* [online]. 2019, **6**(3). ISSN 2306-5354. Dostupné z: doi:10.3390/bioengineering6030074
- [114] MADDEN, L.A., A.J. ANDERSON, J. ASRAR, P. BERGER a P. GARRETT. Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Ralstonia eutropha* in fed-batch cultures. *Polymer* [online]. 2000, **41**(10), 3499-3505. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/S0032-3861(99)00611-4
- [115] CHANPRATEEP, S. a S. KULPREECHA. Production and characterization of biodegradable terpolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) by *Alcaligenes* sp. A-04. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. 2006, **101**(1), 51-56. ISSN 13891723. Dostupné z: doi:10.1263/jbb.101.51
- [116] HERMANN-KRAUSS, C., M. KOLLER, A. MUHR, H. FASL, F. STELZER a G. BRAUNEGG. Archaeal Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Co- and Terpolyesters from Biodiesel Industry-Derived By-Products. *Archaea* [online]. 2013, **2013**, 1-10. ISSN 1472-3646. Dostupné z: doi:10.1155/2013/129268
- [117] SEDLACEK, P., I. PERNICOVA, I. NOVACKOVA et al. 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* [online]. 2020, **12**(6). ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym12061298

6. ŽIVOTOPIS

Jméno a příjmení: Ing. Iva Pernicová

Datum narození: 27. září 1991

E-mail: xcpernicovai@fch.vut.cz

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9528-5445>

Vzdělání

- **2016- současnost:** Doktorské studium – Potravinářská chemie, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně (VUT), Česká republika

Cena děkana za vynikající studijní výsledky, Cena rektora

- **2014-2016:** Magisterské studium – Potravinářská chemie a biotechnologie, Fakulta chemická, VUT v Brně,

Absolvování s vyznamenáním, Cena děkana za vynikající studijní úspěchy

- **2011-2014:** Bakalářské studium – Potravinářská chemie, Fakulta chemická, VUT v Brně

Absolvování s vyznamenáním

- **2007-2011:** Gymnázium, Třebíč; Maturitní zkouška s vyznamenáním

Certifikovaná školení

- **2016:** Interní auditor systému managementu kvality dle ISO 9001

Interní auditor systému HACCP

Interní auditor normy IFS FOOD verze 6

Absolvované stáže

- **2019 únor–květen:** Odborná zahraniční stáž ve národním výzkumném centru v Madridu, Španělsko (Biological Research Center (CIB-CSIC)) na téma stanovení genové exprese.
- **2015 říjen–2016 duben:** Odborná stáž – vypracování diplomové práce ve společnosti Biovendor, a.s., na téma Stanovení biologické aktivity rekombinantního proteinu adiponektin pomocí buněčné kultury
- **2016 červenec–srpen:** Odborná stáž na Chemickém ústavu SAV v Bratislavě, téma Biotypizace bazidomycetních kvasinek pomocí MALDI-TOF, skrining pro produkci polygalaktouronáz, testování vlivu kultivačních podmínek na produkci povrchové alfa-galaktosidázy *Cryptococcus flavescens*
- **2013 únor–duben:** Odborná stáž na Veterinární a farmaceutické univerzitě v Brně v rámci BiochemNetu na téma Ověřování stability přírodních látek pomocí HPLC

Pracovní zkušenost

- **2016-současnost:** Technický pracovník pro vývoj biotechnologie, Centrum materiálového výzkumu, Fakulta chemická, VUT v Brně

7. SEZNAM PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI

Články v časopisech s impakt faktorem (J_{imp})

- **PERNICOVÁ, I.**; NOVÁČKOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; KOUŘILOVÁ, X.; KOLLER, M.; OBRUČA, S. Application of osmotic challenge for enrichment of microbial consortia in polyhydroxyalkanoates producing thermophilic and thermotolerant bacteria and their subsequent isolation. INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES, 2020, roč. 144, č. 2, s. 698-704. ISSN: 0141-8130.
- 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.
- **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.
- KOVALČÍK, A.; **PERNICOVÁ, I.**; OBRUČA, S.; SZOTKOWSKI, M.; ENEV, V.; KALINA, M.; MÁROVÁ, I. Grape winery waste as a promising feedstock for the production of polyhydroxyalkanoates and other value-added products. FOOD AND BIOPRODUCTS PROCESSING, 2020, roč. 124, č. 1, s. 1-10. ISSN: 0960-3085.
- KOUŘILOVÁ, X.; **PERNICOVÁ, I.**; SEDLÁŘ, K.; MUSILOVÁ, J.; SEDLÁČEK, P.; KALINA, M.; KOLLER, M.; OBRUČA, S. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a thermophilic strain of Schlegelella thermodepolymerans from xylose rich substrates. BIORESOURCE TECHNOLOGY, 2020, roč. 315, č. 8, s. 1-7. ISSN: 0960-8524.
- **PERNICOVÁ, I.**; KUČERA, D.; NEBESÁŘOVÁ, J.; KALINA, M.; NOVÁČKOVÁ, I.; KOLLER, M.; OBRUČA, S. Production of polyhydroxyalkanoates on waste frying oil employing selected Halomonas strains. BIORESOURCE TECHNOLOGY, 2019, roč. 292, č. 11, s. 1-4. ISSN: 0960-8524.
- NOVÁČKOVÁ, I.; KUČERA, D.; POŘÍZKA, J.; **PERNICOVÁ, I.**; SEDLÁČEK, P.; KOLLER, M.; KOVALČÍK, A.; OBRUČA, S. Adaptation of cupriavidus necator to levulinic acid for enhanced production of P(3HB-co-3HV) copolyesters. BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL, 2019, roč. 151, č. 11, s. 1-10. ISSN: 1369-703X.
- OBRUČA, S.; SEDLÁČEK, P.; KOLLER, M.; KUČERA, D.; **PERNICOVÁ, I.** Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. BIOTECHNOLOGY ADVANCES, 2018, roč. 36, č. 3, s. 856-870. ISSN: 0734-9750.
- KUČERA, D.; **PERNICOVÁ, I.**; KOVALČÍK, A.; KOLLER, M.; MÜLLEROVÁ, L.; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; NEBESAROVA, J.; KALINA, M.; MÁROVÁ, I.; KRZYŽÁNEK, V.; OBRUČA, S. Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium Halomonas halophila. BIORESOURCE TECHNOLOGY, 2018, roč. 256, č. 1, s. 552-556. ISSN: 0960-8524.

- KUČERA, D.; NOVÁČKOVÁ, I.; **PERNICOVÁ, I.**; OBRUČA, S. Evolutionary engineering of *Cupriavidus necator* for improved utilization levulinic acid. Abstracts of the 18th European Congress on Biotechnology. New Biotechnology. 2018. s. 93-93. ISSN: 1871-6784.

Články v časopisech zařazených v databázi Scopus

- **PERNICOVÁ, I.**; ENEV, V.; MÁROVÁ, I.; OBRUČA, S. Interconnection of Waste Chicken Feather Biodegradation and Keratinase and mcl-PHA Production Employing *Pseudomonas putida* KT2440. APPLIED FOOD BIOTECHNOLOGY, 2019, roč. 6, č. 2345-5357, s. 83-90. ISSN: 2345-5357.
- KUČERA, D.; NOVÁČKOVÁ, I.; **PERNICOVÁ, I.**; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. Biotechnological Production of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-4-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) Terpolymer by *Cupriavidus* sp. DSM 19379. Bioengineering, 2019, roč. 6, č. 3, s. 74-84. ISSN: 2306-5354.
- KOVALČÍK, A.; KUČERA, D.; MATOUŠKOVÁ, P.; **PERNICOVÁ, I.**; OBRUČA, S.; KALINA, M.; ENEV, V.; MÁROVÁ, I. Influence of removal of microbial inhibitors on PHA production from spent coffee grounds employing *Halomonas halophila*. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2018, roč. 6, č. 2, s. 3495-3501. ISSN: 2213-3437.
- **PERNICOVÁ, I.**; KUCERA, D.; NOVACKOVA, I.; VODICKA, J.; KOVALCIK, A.; OBRUCA, S. Extremophiles - Platform Strains for Sustainable Production of Polyhydroxyalkanoates. Materials Science Forum. 2019, roč. 955, s. 74-79. ISSN 1662-9752.

Kapitoly v knihách

- KOLLER, M., S. OBRUČA, **I. PERNICOVÁ** a G. BRAUNEGG. Physiological, kinetic, and process engineering aspects of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by extremophiles. WILLIAMS, H. a P. KELLY, ed. Polyhydroxyalkanoates:: Biosynthesis, Chemical Structures and Applications. Nova Science Publishers, 2018, s. 1-70. ISBN 978-1-53613-439-1.
- OBRUCA, S.; SEDLACEK, P.; **PERNICOVA, I.**; KOVALCIK, A.; NOVACKOVA, I.; SLANINOVA, E.; MAROVA, I. Interconnection between PHA and Stress Robustness of Bacteria. The Handbook of Polyhydroxyalkanoates. CRC Press, 2020, 2020-9-23, , 107-132. ISBN 9780429296635.

Patenty

- OBRUČA, S.; **PERNICOVÁ, I.**; KUČERA, D.; NOVÁČKOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; Vysoké učení technické v Brně, Brno, CZ: Způsob výroby polyhydroxyalkanoátů pomocí izolátu termofilního bakteriálního kmene *Aneurinibacillus* sp. H1. 308626, patent. (2021)

Konferenční příspěvky

- **PERNICOVÁ, I.**; KOUŘILOVÁ, X.; NOVÁČKOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. Izolace termofilních bakterií schopných produkce polyhydroxyalkanoátů. XXIX. konference mladých mikrobiologů Tomáškovy dny 2020. 1. Brno: Masarykova universita, 2020. s. 46-46. ISBN: 978-80-210-9611-0.
- KOUŘILOVÁ, X.; MUSILOVÁ, J.; SEDLÁŘ, K.; BEDNÁROVÁ, K.; **PERNICOVÁ, I.**; OBRUČA, S. Thermophilic Bacterium *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344 as a Producer of Polyhydroxyalkanoates. Studentská odborná konference CHEMIE JE ŽIVOT 2020.

Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2020. s. 90-91. ISBN: 978-80-214-5920-0.

- KOUŘILOVÁ, X.; **PERNICOVÁ, I.**; NOVÁČKOVÁ, I.; OBRUČA, S. Bakterie rodu *Caldimonas* jako termofilní producenti polyhydroxyalkanoátů. XXIX. konference mladých mikrobiologů Tomáškovy dny 2020. 1. Brno: Masarykova univerzita, 2020. s. 44-44. ISBN: 978-80-210-9611-0.
- NOVÁČKOVÁ, I.; KUČERA, D.; POŘÍZKA, J.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S.; **PERNICOVÁ, I.** Adaptation of selected PHA producing bacteria to biotechnologically relevant stressors. XXVIII: konference mladých mikrobiologů Tomáškovy dny 2019. Brno: Masarykova univerzita, 2019. s. 52-52. ISBN: 978-80-210-9296-9.
- **PERNICOVÁ, I.**; NOVÁČKOVÁ, I.; KOUŘILOVÁ, X.; OBRUČA, S. Isolace extremofilních bakterií produkující polyhydroxyalkanoáty z přírodních vzorků. XXVIII. konference mladých mikrobiologů Tomáškovy dny 2019. Brno: Masarykova univerzita, 2019. s. 24-24. ISBN: 978-80-210-9296-9
- NOVÁČKOVÁ, I.; KUČERA, D.; POŘÍZKA, J.; SEDLÁČEK, P.; **PERNICOVÁ, I.**; OBRUČA, S. Evolutionary engineering approach for enhancement of growth characteristics and producing capacity of selected PHA producing microorganisms. Studentská odborná konference Chemie je život 2019 - Sborník abstraktů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019. s. 58-58. ISBN: 978-80-214-5807-9.
- KOUŘILOVÁ, X.; **PERNICOVÁ, I.**; OBRUČA, S. Screening biotechnologického potenciálu vybraných zástupců rodu *Geobacillus*. XXVIII. konference mladých mikrobiologů Tomáškovy dny 2019. 2019. s. 48-48. ISBN: 978-80-210-9296-9.
- **PERNICOVÁ, I.**; NOVÁČKOVÁ, I.; KOUŘILOVÁ, X.; KUČERA, D.; OBRUČA, S. Isolation extremophilic bacteria producing polyhydroxyalkanoate from natural sample. The biomania student scientific meeting and eusynbios symposium 2019 Book of abstracts. Brno, Czech Republic: Masaryk University Press, 2019. s. 114-114. ISBN: 978-80-210-9373-7.
- KOUŘILOVÁ, X.; **PERNICOVÁ, I.**; NOVÁČKOVÁ, I.; OBRUČA, S. Thermophilic Bacteria of the Genus *Caldimonas* as Polyhydroxyalkanoate Producers. The Biomania Student Scientific Meeting & Eusynbios Symposium 2019 Book of Abstracts. Brno: Masaryk University Press, 2019. s. 112-112. ISBN: 978-80-210-9379-7.
- **PERNICOVÁ, I.**; NOVÁČKOVÁ, I.; KOUŘILOVÁ, X.; HERNÁNDEZ, N.; PRIETO, M.A.; OBRUČA, S. Thermophilic bacteria isolated from compost as producers of polyhydroxyalkanoates. 10th European Symposium on Biopolymers. Straubing, Germany: C.A.R.M.E.N.e.V., 2019. s. 72-72.
- NOVÁČKOVÁ, I.; KUČERA, D.; POŘÍZKA, J.; **PERNICOVÁ, I.**; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. Application of evolutionary engineering for enhancement of robustness and producing capacity of selected microbial PHA producers. The Biomania student scientific meeting and Eusynbios symposium 2019 - Book of Abstracts. 1. 2019. s. 120-120. ISBN: 978-80-210-9373-7
- NOVÁČKOVÁ, I.; KUČERA, D.; OBRUČA, S.; SEDLÁČEK, P.; POŘÍZKA, J.; **PERNICOVÁ, I.** Adaptation of PHA producing bacteria *Cupriavidus necator* H16 and *Halomonas halophila* to biotechnologically relevant stressors. 10th European Symposium on Biopolymers - Program. 2019. s. 70-70.

- **PERNICOVÁ, I.**; KRATOCHVÍLOVÁ, O.; KUČERA, D.; OBRUČA, S. SCREENING OF PRODUCTION OF BIOSURFACTANTS IN SELECTED BACTERIA. In International Conference on Chemical Technology. International Conference on Chemical Technology. Praha: 2018. s. 70-73. ISSN: 2336-8128.
- **PERNICOVÁ, I.**; KRATOCHVÍLOVÁ, O.; KUČERA, D.; OBRUČA, S. Screening of biosurfactants excretion among selected bacteria. 7th Meeting on Chemistry and Life 2018. Book of abstracts. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, 2018. s. 142-142. ISBN: 978-80-214-5488-0
- NOVÁČKOVÁ, I.; KUČERA, D.; POŘÍZKA, J.; **PERNICOVÁ, I.**; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. Adaptation of *Cupriavidus necator* H16 to levulinic acid for enhancement of 3-hydroxyvalerate content in copolymer P(3HB-co-3HV). XIX. setkání biochemiků a molekulárních biologů Wimmerová, Michaela, Holková, Jitka, eds. Brno: 2018. s. 76-76. ISBN: 978-80-210-9069-9.
- **PERNICOVÁ, I.**; KOUŘILOVÁ, X.; KUČERA, D.; NOVÁČKOVÁ, I.; OBRUČA, S. Screening of biotechnological potential in extremophilic bacteria. XIX. setkání biochemiků a molekulárních biologů Wimmerová, Michaela, Holková, Jitka, eds. Brno: 2018. s. 78-78. ISBN: 978-80-210-9069-9.
- KUČERA, D.; NOVÁČKOVÁ, I.; **PERNICOVÁ, I.**; OBRUČA, S. Adaptation of PHA producing bacteria to levulinic acid. In Proceedings of the 6th International Conference on Chemical Technology. International Conference on Chemical Technology. 1st edition. Prague: Czech Society of Industrial Chemistry, 2018. s. 74-77. ISBN: 978-80-86238-77-7. ISSN: 2336-8128.
- KOVALČÍK, A.; **PERNICOVÁ, I.**; KUČERA, D.; OBRUČA, S.; MATOUŠKOVÁ, P.; KUNDRÁT, V.; MÁROVÁ, I. Properties of biogenic PHA nanofibrous materials originated from strains *Burkholderia* species and *Pseudomonas* species using grape pomace medium. Program Agenda & Abstracts, 25th Annual Meeting of the BioEnvironmental Polymer Society, August 15-17, 2018, Rensselaer Polytechnic University, Troy, New York. Troy, New York, USA: Rensselaer Polytechnic University, 2018. s. 37-37.
- KUČERA, D.; NOVÁČKOVÁ, I.; **PERNICOVÁ, I.**; OBRUČA, S. Adaptation of PHA Producing Bacteria to Levulinic Acid. 6th International Conference on Chemical Technology. 2018. ISBN: 978-80-86238-83-8.
- **PERNICOVÁ, I.**; KRATOCHVÍLOVÁ, O.; KUČERA, D.; OBRUČA, S. Screening of Production of Biosurfactants in Selected Bacteria. 2018. ISBN: 978-80-86238-83-8.
- **PERNICOVÁ, I.**; KRATOCHVÍLOVÁ, O.; KUČERA, D.; OBRUČA, S. Screening produkce biosurfaktantů u vybraných bakterií produkující polyhydroxyalkanoáty. XXVII. konference mladých mikrobiologů Tomáškovy dny 2018. Brno: Masarykova univerzita, 2018. s. 75-75. ISBN: 978-80-210-8963-1.
- KRATOCHVÍLOVÁ, O.; **PERNICOVÁ, I.**; OBRUČA, S. Microbial production of biosurfactants by selected bacterial strains. XIX. setkání biochemiků a molekulárních biologů. Brno: Masarykova univerzita, 2018. s. 66-66. ISBN: 978-80-210-9069-9.
- **PERNICOVÁ, I.**; KRATOCHVÍLOVÁ, O.; KUČERA, D.; OBRUČA, S. Screening of production of biosurfactants in selected bacteria. In PROCEEDINGS OF THE 6TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON CHEMICAL TECHNOLOGY. CZECH SOC INDUSTRIAL CHEMISTRY, 2018. s. 70-73. ISBN: 978-80-86238-77-7

- **PERNICOVÁ, I.**; KUČERA, D.; VLASÁKOVÁ, T.; OBRUČA, S. Isolation and characterization of extremophiles for biotechnological production of polyhydroxyalkanoates. XVIII. Setkání biochemiků a molekulárních biochemiků. 1. Brno: Masarykova univerzita v Brně, 2017. s. 82-82. ISBN: 978-80-210-8765-1.
- OBRUČA, S.; KUČERA, D.; BENEŠOVÁ, P.; **PERNICOVÁ, I.**; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; SAMEK, O.; KRZYZANEK V.; MÁROVÁ, I. Integrating production of PHA into bio-refinery concept – shedding light also on specific consequences of non- optimal cultivation conditions. Biotech 2017 Book od Abstracts. 1. Praha: ICT Prague, 2017. s. 52-53. ISBN: 978-80-7080-989-0.
- **PERNICOVÁ, I.**; ŠURÁŇOVÁ, Z.; INNEMANOVÁ, P.; OBRUČA, S. Interconnection of microbial degradation of chicken feather and polyhydroxyalkanoates production employing selected pseudomonas strains. EUROBIOTECH 6th Central European Congress of Life Sciences. Krakow: 2017. s. 164-164.
- KUČERA, D.; **PERNICOVÁ, I.**; KOVALČÍK, A.; OBRUČA, S. Accumulation of PHAs by halophilic strain Halomonas halophila. XVIII.setkání biochemiků a molekulárních biologů. Brno: Masarykova Univerzita, 2017. s. 75-75. ISBN: 978-80-210-8765-1.
- 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.
- **PERNICOVÁ, I.**; ŠURÁŇOVÁ, Z.; OBRUČA, S.; Innemanova P. BIODEGRADATION OF CHICKEN FEATHER BY POLYHYDROXYALKANOATES ACCUMULATING BACTERIA. 2017. ISBN: 978-80-86238-62-3.
- 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.
- **PERNICOVÁ, I.**; ŠURÁŇOVÁ, Z.; INNEMANOVÁ, P.; OBRUČA, S. BIODEGRADATION OF CHICKEN FEATHER BY POLYHYDROXYALKANOATES ACCUMULATING BACTERIA. In Proceedings of the 5th International Conference on Chemical Technology. 1. Praha: Czech Society of Industrial Chemistry, 2017. s. 67-71. ISBN: 978-80-86238-62-3.
- STRATILOVÁ, B.; **PERNICOVÁ, I.**; PAVLATOVSKÁ, B.; MÁROVÁ, I.; VADKERTIOVÁ, R.; STRATILOVÁ E.; Polygalacturonases of yeasts associated with natural environments. 2017.