



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

**STUDIUM METABOLISMU POLYHYDROXYALKANOÁTŮ U
BAKTERIE RHODOSPIRILLUM RUBRUM**

STUDY ON METABOLISM OF POLYHYDROXYALKANOATES IN RHODOSPIRILLUM RUBRUM

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Blanka Rubanová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Eva Slaninová, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1737/2021

Akademický rok: 2021/22

Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií

Studentka: **Blanka Rubanová**

Studijní program: Chemie a technologie potravin

Studijní obor: Biochemická technologie

Vedoucí práce: **Ing. Eva Slaninová, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Studium metabolismu polyhydroxyalkanoátů u bakterie *Rhodospirillum rubrum*

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na zadané téma.
2. Kultivace bakteriální kultury *Rhodospirillum rubrum* za vybraných kultivačních podmínek.
3. Charakterizace získaných vzorků biomasy – analýza obsahu PHA, pigmentů, morfologie, FTIR, Ramanova spektroskopie.
4. Isolace a charakterizace získaných PHA materiálů – monomerní složení, molekulová hmotnost atd.
5. Posouzení významu PHA metabolismu za různých kultivačních podmínek – interpretace a diskuze získaných výsledků.

Termín odevzdání bakalářské práce: 27.5.2022:

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

Blanka Rubanová
studentka

Ing. Eva Slaninová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá studiem metabolismu polyhydroxyalkanoátů (PHA) u bakterie *Rhodospirillum rubrum* za odlišných podmínek kultivace. Podmínky se lišily v míře aerace (aerobní, anaerobní, mikroaerobní) a v přítomnosti světelného zdroje (světelná kultivace, temnostní kultivace). Nejprve byly navrženy a otestovány různé objemy média pro nejrychlejší a nejvhodnější kultivaci inokula. Následně byly porovnávány kultivace *Rhodospirillum rubrum* za různých podmínek z hlediska obsahu PHA pomocí plynové chromatografie. Pro lepší charakterizaci růstu a metabolismu bakterií byly kromě plynové chromatografie použity další doplňkové metody, jako například průtoková cytometrie, UV-VIS spektroskopie (transmisní a difúzně transmisní mód). Z hlediska morfologie buněk byla využita fluorescenční mikroskopie a kryo-skenovací elektronová mikroskopie. Dále byla zkoumána schopnost bakterií syntetizovat barevné pigmenty (karotenoidy a bakteriochlorofyl *a*). Bakterie byly kultivovány na odlišných typech média (tekuté, pevné), barevné pigmenty byly následně extrahovány a byly vypočtena jejich koncentrace. Pro měření barevných pigmentů byla dále použita UV-VIS spektroskopie, Ramanova spektroskopie a infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR).

Abstract

This bachelor thesis deals with the study of polyhydroxyalkanoate (PHA) metabolism in *Rhodospirillum rubrum* under different cultivation conditions. The conditions differed in the aeration rate (aerobic, anaerobic, microaerobic) and in the presence of a light source (light cultivation, dark cultivation). First, different volumes of medium were suggested and tested for the fastest and the most suitable inoculum cultivation. Subsequently, cultures of *Rhodospirillum rubrum* under different conditions in terms of PHA content were compared by gas chromatography. In addition to gas chromatography, other complementary methods were used for better characterization of bacterial growth and metabolism, such as flow cytometry, UV-VIS spectroscopy (transmission and diffusion transmission modes). Fluorescence microscopy and cryo-scanning electron microscopy were used in terms of cell morphology. Furthermore, the ability of bacteria to synthesize color pigments (carotenoids and bacteriochlorophyll *a*) was investigated. The bacteria were cultivated on different types of media (liquid, solid), the color pigments were subsequently extracted, and their concentrations were calculated. UV-VIS spectroscopy, Raman spectroscopy and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) were also used to measure color pigments.

Klíčová slova

Polyhydroxyalkanoáty (PHA), polyhydroxybutyrát, *Rhodospirillum rubrum*, aerobní podmínky, anaerobní podmínky, mikroaerobní podmínky, plynová chromatografie, UV-VIS

Keywords

Polyhydroxyalkanoates (PHA), polyhydroxybutyrate, *Rhodospirillum rubrum*, aerobic conditions, anaerobic conditions, microaerobic conditions, gas chromatography, UV-VIS

RUBANOVÁ, Blanka. *Studium metabolismu polyhydroxyalkanoátů u bakterie Rhodospirillum rubrum* [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-05-25]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/138823>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Eva Slaninová.

Prohlášení

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

.....
Blanka Rubanová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své vedoucí bakalářské práce Ing. Evě Slaninové, Ph.D. za odborné vedení práce a za konzultace při plánování a vyhodnocování experimentů. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Dianě Černayové za pomoc při měření výsledků své bakalářské práce.

Obsah

1	Úvod	8
2	Teoretická část	9
2.1	Polyhydroxyalkanoáty	9
2.1.1	Struktura	9
2.1.2	Klasifikace polyhydroxyalkanoátů	9
2.1.3	Fyzikální a chemické vlastnosti	9
2.1.4	Biologická rozložitelnost (Biodegradabilita)	10
2.2	Biomasa: substrát pro produkci polyhydroxyalkanoátů	10
2.3	Biosyntéza polyhydroxyalkanoátů	11
2.3.1	Dráha I	11
2.3.2	Dráha II	11
2.3.3	Dráha III	12
2.4	Syntéza polyhydroxyalkanoátů pomocí bakteriálních kultur	12
2.4.1	Smíšené mikrobiální kultury	12
2.4.2	Extrémofilní bakterie	13
2.4.3	Purpurové nesulfurové bakterie	13
2.5	Využití polyhydroxyalkanoátů	13
2.5.1	Aplikace polyhydroxyalkanoátů v zemědělství	13
2.5.2	Lékařské aplikace	14
2.5.3	Polyhydroxyalkanoáty jako zdroj biopaliv	14
2.6	Bakterie <i>Rhodospirillum rubrum</i>	14
2.6.1	Fyziologie	14
2.6.2	Metabolické dráhy zapojené do produkce polyhydroxyalkanoátů	17
2.6.3	Faktory ovlivňující produkci polyhydroxyalkanoátů	18
2.6.4	Izolování polyhydroxyalkanoátů	20
2.6.5	Vedlejší produkty syntézy polyhydroxyalkanoátů	22
3	Experimentální část	23
3.1	Použité bakterie, chemikálie a přístroje	23
3.1.1	Použité bakterie	23
3.1.2	Seznam použitých chemikálií	23
3.1.3	Seznam použitých přístrojů	24
3.2	Kultivace	24
3.2.1	Příprava inokula	24
3.2.2	Příprava produkčních médií	25
3.2.3	Podmínky kultivace	26
3.2.4	Příprava fosfátového pufru	26

3.3	Příprava vzorků na analýzy a použité metody	26
3.3.1	Příprava sušené biomasy	26
3.3.2	Extrakce barevných pigmentů	27
3.3.3	Plynová chromatografie	27
3.3.4	Průtoková cytometrie	27
3.3.5	Ramanova spektroskopie	27
3.3.6	UV-VIS spektroskopie	27
3.3.7	Fluorescenční mikroskopie	27
3.3.8	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací	28
3.3.9	Kryo–skenovací elektronová mikroskopie	28
4	Výsledky a diskuze	29
4.1	Optimalizace kultivačních podmínek inokula	29
4.2	Kultivace bakterií za různých podmínek	29
4.2.1	Základní charakteristika	30
4.2.2	Stanovení obsahu polyhydroxyalkanoátů	33
4.2.3	Morfologie bakteriálních buněk	35
4.2.4	Produkce barevných pigmentů <i>Rhodospirillum rubrum</i> s ohledem na aeraci	37
4.3	Syntéza barevných pigmentů u bakterie <i>Rhodospirillum rubrum</i>	39
5	Závěr	47
6	Literatura	48
7	Seznam zkratk a symbolů	53
8	Přílohy	54

1 Úvod

Plasty jsou díky své chemické a fyzikální odolnosti nejpoužívanějšími syntetickými polymery v dnešním světě. Odolnost plastů vůči degradaci přispěla k jednomu z nejzávažnějších problémů 21. století, znečištění životního prostředí plasty [1]. Předpokládá se, že ročně se do oceánu z pevniny dostane 4,8 až 12,7 milionu tun plastu ve formě plastového odpadu. Očekává se, že do roku 2025 dojde k dalšímu nárůstu znečištění, pokud nebude zlepšeno nakládání s odpady [2]. Biopolymery byly navrženy jako možné řešení tohoto problému, musí však splňovat následující kritéria: vysoká kvalita a trvanlivost během používání, ale také vysoká biodegradabilita na konci jejich životnosti, díky které mohou být biopolymery v přírodě rozloženy pomocí mikroorganismů na oxid uhličitý a vodu. [1; 3]

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) patří do skupiny biopolymerů, které díky svým vlastnostem, jako jsou biologická rozložitelnost a biokompatibilita, mohou účinně nahradit tradiční petrochemické plasty (např. polypropylen, polystyren, polyethyltereftalát a polyvinylchlorid), které jsou využívány pro výrobu spotřebního zboží. Vývoj PHA jako náhražek syntetických plastů přispívá k dosažení cílů udržitelného rozvoje (SDGs) 6, 9 a 12, pokud jde o hygienu vody, inovace (ke splnění environmentálních cílů) a odpovědnou výrobu [1; 4].

Velkovýrobě PHA v současné době brání vysoké výrobní náklady, které jsou způsobeny použitím čistých a upravených bakteriálních kultur pro výrobu PHA, což vyžaduje plně sterilní provozní podmínky, použití drahých substrátů jako zdroje uhlíku a použití drahých extrakčních a čisticích procesů (extrakce rozpouštědlem, destilace) k získání konečného produktu PHA [1]. Cena PHA se v závislosti na složení polymeru pohybuje v rozmezí 2,2 do 5,0 EUR / kg, což je nejméně třikrát více, než u nejpoužívanější polymerů na petrochemické bázi, které stojí méně než 1,0 EUR / kg [2].

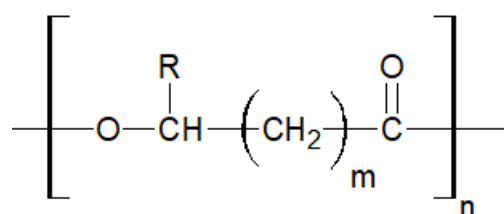
2 Teoretická část

2.1 Polyhydroxyalkanoáty

K dnešnímu dni bylo identifikováno přibližně 90 druhů mikroorganismů, které mohou akumulovat intracelulární PHA za aerobních a anaerobních podmínek. Tyto organismy produkují více než 150 typů PHA s lineárními, rozvětvenými, nasycenými, nenasycenými a aromatickými strukturami, které poskytují různé fyzikální a chemické vlastnosti např. teplota tání, teplota skelného přechodu a biodegradabilita [5].

2.1.1 Struktura

Strukturálně jsou PHA lineární polymery hydroxykyselin [5]. Molekula PHA se skládá z monomerních jednotek (R)-hydroxy-mastných kyselin. Základní struktura PHA je uvedena na Obr. 1. Monomerní jednotky jsou navzájem spojeny esterovou vazbou. Každá monomerní jednotka má postranní řetězec R, kterým může být například nasycená nebo nenasycená alkylová skupina, substituovaná alkylová skupina a rozvětvená alkylová skupina [6].



Obr. 1 Základní struktura PHA

2.1.2 Klasifikace polyhydroxyalkanoátů

Na základě délky strukturního řetězce lze PHA rozdělit do tří základních skupin [6].

PHA s krátkým řetězcem (SCL-PHA) se skládají z monomerních stavebních bloků o délce 3–5 atomů uhlíku, například: poly(3-hydroxyvalerát) (P3HV), poly(3-hydroxybutyrát) (P3HB). PHA s krátkým řetězcem jsou příliš tuhé, křehké a postrádají klíčové mechanické vlastnosti, které jsou potřebné pro aplikaci v biomedicínských a balicích fóliích [6].

PHA se středně dlouhým řetězcem (MCL-PHA) se skládají z monomerních jednotek o délce 6–14 atomů uhlíku, například: poly(3-hydroxyoktanoát) (P3HO). PHA se středně dlouhým řetězcem jsou elastomerní, ale mají velmi nízkou mechanickou pevnost, což omezuje využití těchto PHA [6].

PHA s dlouhým řetězcem (LCL-PHA) se skládají z monomerních stavebních bloků o délce 15 a více atomů uhlíku [6]. PHA s dlouhým řetězcem jsou v bioplastickém průmyslu neobvyklé a méně používané [5].

2.1.3 Fyzikální a chemické vlastnosti

PHA obecně vykazují podobné vlastnosti jako polymery na bázi ropy. Fyzikální vlastnosti PHA zahrnují nerozpustnost ve vodě, dobrou odolnost proti UV záření, tuhost, vysoký stupeň polymerace, biologickou rozložitelnost, termoplasticitu atd. [6].

Typ získaného PHA a jeho molekulová hmotnost závisí na typu mikroorganismu, substrátu, podmínkách růstu a procesu extrakce. PHA zůstávají v buňce v amorfním stavu, ale během procesu extrakce rychle přechází do krystalického stavu. Fyzikální vlastnosti polymerů (teplota tání, teplota skelného přechodu a krystalinita) jsou ovlivněny délkou postranního řetězce a funkčními skupinami [5; 7].

Homopolymery SCL-PHA, jako je izolovaný polyhydroxybutyrát (PHB), jsou krystalické, tuhé a křehké, mají nízkou mechanickou pevnost, nízkou teplotu skelného přechodu a vysoké teploty tání, což omezuje jejich použití. Naproti tomu MCL-PHA jsou materiály s pružnějšími vlastnostmi, vysokým prodloužením při přetržení, nízkou krystalinitou a teplotou skelného přechodu, menší mechanickou odolností a nízkými teplotami tání, jsou to tedy univerzálnější materiály [5; 8].

PHA se mohou vyskytovat také ve formě kopolymerů [např. poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) (PHBV), poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát) (P3HB4HB)], jejichž vlastnosti jsou podobné vlastnostem MCL-PHA, ale s více žádoucími vlastnostmi pro průmyslové aplikace pro výrobu materiálů. Mechanické a tepelné vlastnosti PHA mohou být upraveny reakcí s jinými biopolymery (např. lignin, škrob a deriváty celulózy) enzymatickou nebo chemickou modifikací [5; 9].

2.1.4 Biologická rozložitelnost (Biodegradabilita)

Biologická rozložitelnost patří mezi nejzajímavější vlastnosti PHA. Mikroorganismy v přírodě jsou schopné degradovat PHA pomocí PHA-depolymerázy. Degradující mikroorganismy pomocí extracelulární PHA-depolymerázy převádějí polyesteru na rozpustné oligomery a monomery, které organismy používají jako zdroj uhlíku. Jsou-li přítomny v ekosystémech, jako je půda, odpadní voda a mořská a jezerní voda, PHA mohou být degradovány širokou škálou mikroorganismů na vodu a oxid uhličitý (nebo metan za anaerobních podmínek) [10].

Biologická rozložitelnost PHA je ovlivněna nejen jejich vlastnostmi, jako je stereoregularita, krystalinita, složení a přístupnost jejich povrchu k depolymerizujícím enzymům, ale také podmínkami prostředí, jako je teplota, úroveň vlhkosti, pH a přísun živin. V prostředí jezer se PHA degradují během 254 dnů při teplotách pod 6 °C [10]. Míra degradace části PHB je typicky v řádu několika měsíců (v anaerobních splašcích) až let (v mořské vodě) [11].

Bylo prokázáno, že PHA jsou biokompatibilní, což znamená, že nemají toxické účinky na živé organismy. U savců je polymer hydrolyzován pomalu. Na myším modelu byla ztráta hmotnosti PHA po šesti měsících od implantace menší než 1,6 % [11].

2.2 Biomasa: substrát pro produkci polyhydroxyalkanoátů

Byla zkoumána široká škála substrátů pro výrobu PHA, jejich kopolymerů a terpolymerů, včetně průmyslových vedlejších produktů, tuků a olejů, lignocelulózových surovin, zemědělských a domácích odpadních materiálů, glycerolu, cukrů a odpadních vod [12].

Jako zdroje uhlíku pro výzkum a komerční syntézu PHA se používá spektrum materiálů. Některé z těchto materiálů jsou:

- i) Melasa: Cukrová řepa, třtinový cukr a sójová melasa
- ii) Syrovátka a syrovátkové hydrolyzáty: Hydrolyzovaná sója a slad, hydrolyzovaná syrovátka a syrovátka
- iii) Lignocelulózové suroviny: Dřevo, xylóza, hydrolyzáty hemicelulózy, pšeničné otruby atd.,
- iv) Tuky, rostlinné oleje a odpadní oleje na vaření: olivový olej, kokosový olej, sójový olej, palmový olej atd.
- v) Glycerol
- vi) Odpadní voda: Alpechin (odpady z olivových mlýnů), odpadní voda z pivovaru, odpadní vody z mlýnů na palmový olej (POME) [12]

Biomasa je klasifikována do tří generací:

- i) První generace: Biomasy pocházející z potravinářských plodin, jako je cukr, škrobové plodiny, rostlinný olej nebo živočišný tuk
- ii) Druhá generace: Tyto biomasy jsou nepotravinářské plodiny, jako je organický odpad, odpad z potravinářských plodin a specifické plodiny z biomasy
- iii) Třetí generace biomasy pochází z řas [12]

Poptávka po biopolymerech, mezi něž patří PHA, vyvolala velké obavy, jelikož většina PHA se vyrábí z potravinářských plodin, což by mohlo vyvolat potravinovou krizi. Z tohoto důvodu se začaly zkoumat odpadní produkty při zpracování/výrobě potravin jako zdroje uhlíku pro výrobu PHA. Některé nedávné studie (Tran Thi Loan/2022 [13], Daegeun Cha/2020 [14]) se proto věnovaly využití biomasy založené na druhé generaci [12].

2.3 Biosyntéza polyhydroxyalkanoátů

Katalytický mechanismus produkce PHA mikroorganismy zahrnuje různé dráhy, které jsou spojeny s různými metabolickými cestami mikroorganismů, jako je glykolýza, β -oxidace atd. Zdroje uhlíku dodávané pro syntézu PHA mají hlavní roli ve struktuře akumulovaných PHA. Vlastnosti polymeru jsou tedy určeny biosyntetickými dráhami, kterými byl PHA syntetizován. Obecně platí, že v bakteriích existují tři přirozeně se vyskytující biosyntetické dráhy PHA [6; 12]. Tyto dráhy jsou uvedeny na Obr. 2.

2.3.1 Dráha I

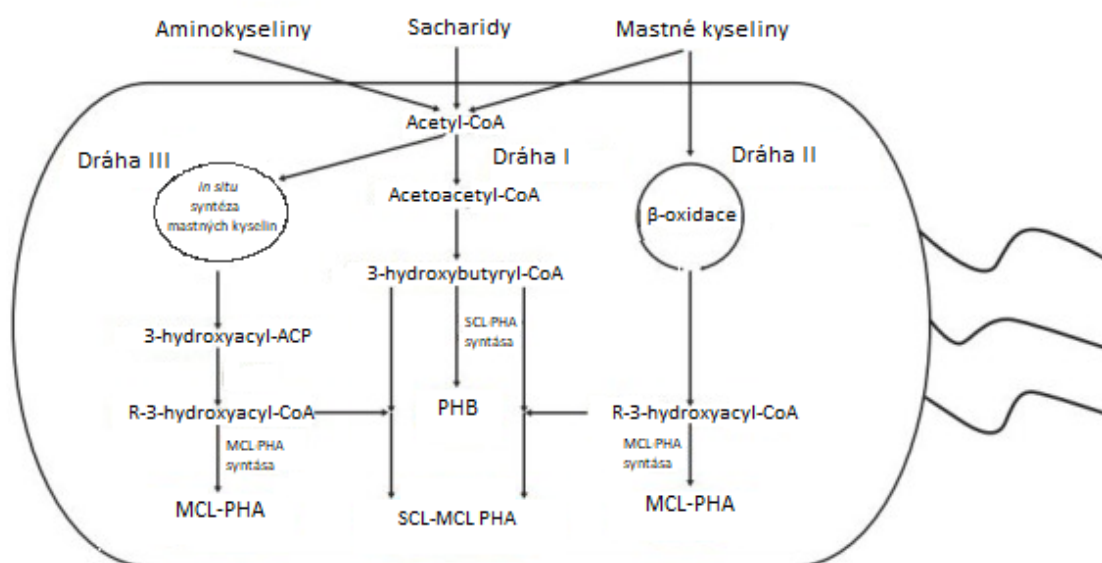
Jedná se o klasický mechanismus syntézy SCL-PHA, využívající acetyl-CoA produkovaný z cukrů, mastných kyselin nebo aminokyselin. V této cestě jsou dvě molekuly acetyl-CoA (z cyklu kyselin trikarboxylových) kondenzovány na molekulu acetoacetyl-CoA pomocí enzymu β -ketothiolázy. Acetoacetyl-CoA se poté převede na 3-hydroxybutyryl-CoA pomocí enzymu NADPH-acetoacetyl-CoA reduktázy. Následuje působení PHA syntázy, která katalyzuje tvorbu esterové vazby v 3-hydroxybutyryl-CoA za vzniku poly-3-hydroxybutyrátu. Bakterie *Cupriavidus necator* je typickým zástupcem využívající tuto dráhu s SCL-PHA syntázou (PhaCSCL), která využívá pro syntézu substráty o délce 3-5 atomů uhlíku [6; 12].

2.3.2 Dráha II

Tato dráha je typická pro syntézu MCL-PHA a využívá meziprodukty získané z β -oxidace mastných kyselin, protože mastné kyseliny jsou vhodným zdrojem uhlíku pro produkci PHA. V β -oxidaci se mastné kyseliny nejprve převádějí na enoyl-Co, který je následně hydratázou převede na R-3-hydroxyacyl-CoA, který je prekurzorem MCL-PHA polymerace. Poté enzym, PHA syntáza katalyzuje polymeraci R-3-hydroxyacylCoA. Bakterie využívající tuto dráhu jsou *Pseudomonas putida*, *P. oleovorans* a *P. aeruginosa* [6; 12].

2.3.3 Dráha III

Tato cesta zahrnuje *in situ* cyklus syntézy mastných kyselin, který poskytuje R-3-hydroxyacyl-ACP pro syntézu PHA. Klíčovým enzymem pro tuto cestu je R-3-hydroxydecanoyl-ACP: CoA transacyláza (PhaG), který převádí 3-hydroxyacyl-ACP na 3-hydroxyacyl-CoA. Metabolické dráhy, které dodávají prekuzory pro syntézu PHA, β -oxidace mastných kyselin a syntéza mastných kyselin *in situ*, mohou v bakteriích probíhat současně. Pomocí metabolického inženýrství byla biosyntetická dráha MCL-PHA s využitím PhaG upravena, což vedlo k syntéze několik bio-polyesterů s definovanými vlastnostmi. Kromě těchto tří mohou být zavedeny nové dráhy pro biosyntézu PHA prostřednictvím metabolického inženýrství [6; 12].



Obr. 2 Dráhy syntézy PHA. Převzato z [12]

2.4 Syntéza polyhydroxyalkanoátů pomocí bakteriálních kultur

Schopnost mikroorganismů produkovat PHA je známá od roku 1925. Intracelulární (PHA) a extracelulární (polysacharidy, proteiny) biopolymery, mohou být produkovány mikroorganismy při růstu mikroorganismu, ve stacionární fázi růstu nebo jako zdroj energie a ochrana před stresovými faktory (nedostatek živin, záření) [5]. Akumulace PHA se spouští, když mikroorganismy prožívají metabolický stres, jako omezení základních živin (např. dusík, fosfor a kyslík) v nadbytku vhodného zdroje uhlíku [15]. Mikroorganismy, jako jsou bakterie *E. coli*, *Clostridium acetobutylicum* nebo *C. eutropha* H16, produkují PHA fermentací různých zdrojů uhlíku (glycerol, karboxylové kyseliny) a tím poskytují biopolymery s různými chemicko-fyzikálními vlastnostmi [1; 16].

2.4.1 Smíšené mikrobiální kultury

Smíšené mikrobiální kultury (MMC) byly navrženy jako finančně efektivní metoda pro výrobu biopolymerů z obnovitelných zdrojů, díky upraveným podmínkám bioproduktu byl fenotyp PHA uchovávaných mikroorganismů přirozeně obohacen, čímž je proces efektivnější a levnější. Použití MMC jako alternativy čisté kultury je slibné, protože MMC mají širší metabolický potenciál než jediný kmen, což pomáhá snížit náklady pro výrobu PHA. To MMC umožňuje využívat mnohem levnější substráty, jako jsou průmyslové / zemědělské odpady (melasa, syrovátka, glycerol). Výroba PHA pomocí MMC se může stát ekonomicky životaschopnou a ekologicky udržitelnou alternativou k současným průmyslovým výrobním procesům PHA [2; 12].

2.4.2 Extrémofilní bakterie

Extrémofilní bakterie jsou vysoce přizpůsobivé a metabolicky aktivní za neobvyklých podmínek prostředí. Jejich biologické adaptace jim nejen umožňují růst nebo přežití v extrémních podmínkách (vysoký tlak, teplota, pH, záření), ale také podporují produkci jedinečných látek (Ectoine, PHA atd.). Specifická role PHA v extrémofilních bakteriích je hlavně jako uhlíková a energetická rezerva, přičemž se také předpokládá, že působí jako ochranný prostředek před oxidačním stresem nebo solným / teplotním stresem [17].

2.4.2.1 Halofily

Halofily jsou skupina mikroskopických organismů, které mohou růst a vyvíjet se v oblastech s vysokou koncentrací soli (NaCl). Obvykle jsou kategorizovány jako mírné, střední nebo extrémní podle rozsahu jejich halotolerance (adaptace živých organismů na podmínky vysoké salinity) [18; 19]. Použití halofilů pro výrobu PHA může snížit náklady na fermentační a obnovovací procesy z následujících důvodů:

- i) vysoká koncentrace soli brání kontaminaci jinými mikroorganismy, a tím snižuje náklady, energii a složitost procesu sterilizace
- ii) mořskou vodu lze použít jako médium obsahující sůl, čímž se sníží spotřeba čerstvé vody,
- iii) účinnost dlouhodobého a kontinuálního procesu je mnohem vyšší než u dávkového
- iv) u některých halofilů (*Halomonas campaniensis* LS21) lze použít levné substráty včetně směsných substrátů z kuchyňského odpadu a / nebo celulózy pro snížení nákladů na substrát
- v) u některých halofilů (*Haloferax mediterranei*) lze náklady na získání PHA snížit pomocí buněčné lýzy působením hypoosmotického šoku [20; 21; 22]

2.4.2.2 Termofily

Termofilům se daří ve vysokoteplotních prostředích, jako jsou geotermální a vulkanické oblasti, horké prameny a hlubinné hydrotermální průduchy. Termofily jsou využívány pro odstraňování těžkých kovů (měď, zinek, nikl) z odpadů nebo pro průmyslové procesy výroby chemikálií (CH₄, H₂), enzymů (celuláza, xyláza) [23; 24].

2.4.3 Purpurové nesulfurové bakterie

Produkce PHA pomocí purpurových nesulfurových bakterií (PNSB) závisí na mikrobiální kultuře, zdroji uhlíku, poměru uhlíku k dusíku, koncentraci fosforu a síry, mikroživinách, pH, režimu krmení a světelných podmínkách. PNSB mohou akumulovat PHA za aerobních nebo anaerobních podmínek. U obou podmínek začíná syntéza PHA tvorbou acetyl-CoA, který se kondenzuje na acetoacetyl-CoA. Za aerobních podmínek PNSB asimilují uhlohydráty prostřednictvím Embden-Meyerhof-Parnasovy a Entner-Duodoroffovy dráhy za účelem získání acetyl-CoA, také těkavé mastné kyseliny (TMK) lze za těchto podmínek asimilovat pro výrobu PHA [5].

2.5 Využití polyhydroxialkanoátů

Biologicky odbouratelná povaha a další vlastnosti PHA, jako je vysoká teplotní stabilita, nízký stupeň povrchové pórovitosti, pružnost atd., má za následek jejich použití v různých oblastech, jako je lékařství, zemědělství atd. [6].

2.5.1 Aplikace polyhydroxialkanoátů v zemědělství

PHA má mnoho aplikací v oblasti zemědělství. Jednou ze specializovaných aplikací P3HB v zemědělství je řízené uvolňování pesticidů a insekticidů. Tyčinky hnojiv zalité v plastu mohou být použity na plantážích palmy olejné jako hnojiva s řízeným uvolňováním živin díky rychlé degradaci (období 0,5–2 roku). Další potenciální aplikace PHA v zemědělství zahrnují: biologicky odbouratelné plastové fólie pro ochranu plodin, zapouzdření semen atd. [6].

2.5.2 Lékařské aplikace

PHA mají na jedné straně velmi podobné vlastnosti jako syntetické plasty, na straně druhé se od nich odlišují například biologickou rozložitelností, biokompatibilitou a netoxicitou. Díky těmto vlastnostem jsou PHA žádoucími materiály pro biomedicínské aplikace popsané níže [6].

2.5.2.1 Dodávka léčiv

Technika pro podávání léků je interdisciplinární věda zaměřená na zlepšení zdraví člověka. Hlavním cílem systému pro dodávání léčiv je, aby byly léky dodávány kontrolovaně a cíleně, za účelem zlepšení jejich účinnosti. PHA se díky svým vlastnostem používá jako surovina pro výrobu tablet a nanočástic. Příklady využití jsou PHB, PHBV a jejich kopolymery, které se používají pro dodávání antibiotik [6].

2.5.2.2 Tkáňové inženýrství

V tkáňovém inženýrství se využívají málo modifikované PHA. PHA lze použít k výrobě podkladů, které podporují růst buněk dodáváním výživy a zvyšují mechanickou pevnost. Tyto podklady existují ve formě špendlíků, filmů, stehů atd. Například: 3D podklad vyvinutý pomocí nanovláken PHA se používá k opravě chrupavky [6].

2.5.2.3 Obvazy

Zakrytí ran se provádí pomocí fólií vytvořených z PHA. Tyto materiály vytvoří přes ránu tenkou vrstvu a zbrání tak kontaminaci. Krytí na bázi netkaného vláknitého materiálu P3HB lze použít jako tyčinky (tampony), rouno, plátno atd. [6].

2.5.3 Polyhydroxialkanoáty jako zdroj biopaliv

Aplikace PHA jako zdroje biopaliva se jeví velmi slibně, jelikož nevyžaduje vysoce vyčištěné PHA, a proto je možné jej získat z aktivovaného kalu nebo odpadních vod bohatých na živiny, které nekonkurují potravě pro lidi ani zvířata, což vede ke snížení nákladů na výrobu [25].

2.6 Bakterie *Rhodospirillum rubrum*

Rhodospirillum rubrum (*R. rubrum*) patří do rodu *Rhodospirillum*, spadající do čeledi *Rhodospirillaceae*, třídy *Alphaproteobacteria*. *R. rubrum* patří do skupiny PNSB. Jedná se o anoxygenní fototrofy, kteří při získávání světla produkují extracelulární elementární síru (místo kyslíku) [26; 27].

2.6.1 Fyziologie

2.6.1.1 Fotoheterotrofie

Za fototrofních podmínek může *R. rubrum* růst fotoautotrofně, jako donory elektronů pro fotosyntézu využívá H_2 nebo nízkou hladinu S^{2-} . Většinou *R. rubrum* roste fotoheterotrofně v médiích obsahujících snadno využitelnou organickou sloučeninu, jako je malát nebo pyruvát, zdrojem dusíku je NH_3 [27].

Běžným doplňkem médií, které jsou používány pro *R. rubrum*, je kvasnicový extrakt, který je zdrojem vitamínů B. Většina druhů PNSB vyžaduje jeden nebo více vitamínů B. Nejčastěji požadují thiamin, kyselinu nikotinovou, biotin, a kyselinu β -aminobenzoovou. Nad rámec role zdroje vitamínů, kvasnicový extrakt také stimuluje růst *R. rubrum*, díky svému sortimentu organických sloučenin, které mohou podpořit fotoheterotrofní růst [27].

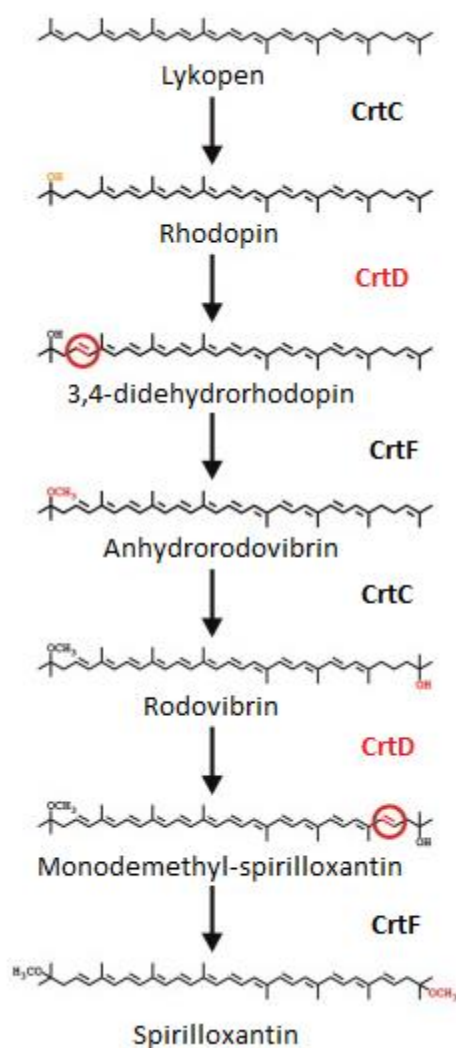
Fotoheterotrofní růst *R. rubrum* podporuje několik organických sloučenin, jako jsou organické kyseliny, aminokyseliny, mastné kyseliny, alkoholy, sacharidy. Meziprodukty cyklu trikarboxylových kyselin (malát, sukcinát, a fumarát) jsou, až na malé výjimky, univerzálně používány, stejně jako pyruvát a acetát. Mnoho druhů PNSB také používá ethanol, laktát, a propionát. Některé PNSB fotoasimilují

aromatické sloučeniny, jako je benzoát a jeho hydroxyderiváty. Růst PNSB na alifatických uhlovodících nebyl zatím popsán [27].

2.6.1.2 Pigmenty

Většina druhů PNSB má dva různé druhy světlosběrných pigment-protein anténních komplexů: periferní komplexy LH2 a jádrové komplexy LH1. *Rhodospirillum rubrum* syntetizuje pouze jádrový komplex LH1. LH1 komplex je složen z dimeru bakteriochlorofylu *a* (Bchl), ve formě dimeru, a jedné molekuly karotenoidu, tyto molekuly jsou vloženy mezi α - a β -polypeptidy [28; 29].

PNSB bakterie přirozeně produkují karotenoidy ve vysokém množství a začleňují je do svého fotosyntetického aparátu (LH1 + reakční centrum). Biosyntéza karotenoidů u PNSB byla nedávno rozdělena do dvou hlavních tříd: „normální“ dráha spirilloxanthinového typu a „neobvyklá“ dráha spirilloxanthinu. Bakterie *Rhodospirillum rubrum* syntetizuje karotenoidy pomocí „normální“ dráhy spirilloxanthinu, tato dráha začíná postupnou denaturací centrálních 24 uhlíků fytoenu jediným enzymem, fytoendesaturázou, za vzniku karotenoidu lykopenu, kde 3,4- a 3'4'-uhlíky zůstávají nasycené. Následuje hydratace, desaturace a methylace na každém konci za vzniku symetrického karotenoidu, spirilloxanthinu (Obr. 3.) [30].



Obr. 3 Syntéza Spirilloxanthinu. Převzato z [30]

U fotosyntetických bakterií mají karotenoidy dvě hlavní funkce:

- i) zachycení světelné energie, která není účinně absorbována BChl
- ii) ochrana BChl před degradací v přítomnosti světla a kyslíku [29].

2.6.1.3 Kultivace ve tmě

Velké množství organických sloučenin, které *R. rubrum* využívá jako fotoasimilátory, lze také použít jako donory elektronů a zdroje uhlíku v temnostním respiračním růstu. *R. rubrum* využívá ke svému růstu za anoxických temnostních podmínek, fermentaci nebo anaerobní dýchání. Fermentační růst *R. rubrum* podporují například pyruvát a některé cukry (fruktóza) [27].

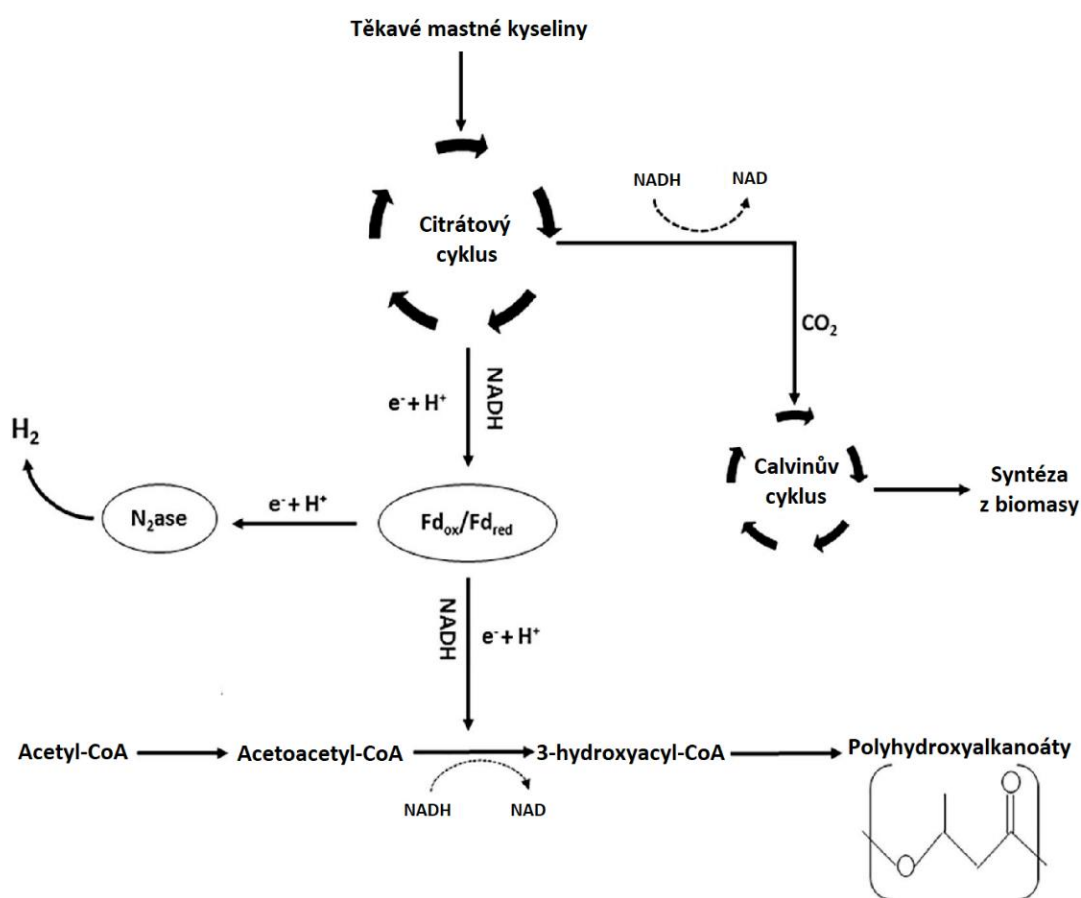
Temnostní chemolitotrofní růst určitých druhů PNSB je možný s pomocí H_2 nebo $S_2O_3^{2-}$ jako donorů elektronů. Zda je chemolitotrofie dobrou strategií pro růst PNSB v přírodě není známo, ale je pravděpodobné, že schopnost šetření energie oxidací anorganických donorů elektronů dává fialovým bakteriím významnou evoluční výhodu v soutěži s nefototrofními bakteriemi [27].

2.6.1.4 Fixace dusíku

R. rubrum může fixovat dusík ze vzduchu dle sumární reakce: $N_2 + 8H \rightarrow 2NH_3 + H_2$. Tato schopnost diazotrofie poskytuje významnou konkurenční výhodu v anoxickém prostředí s omezeným množstvím dusíku [27].

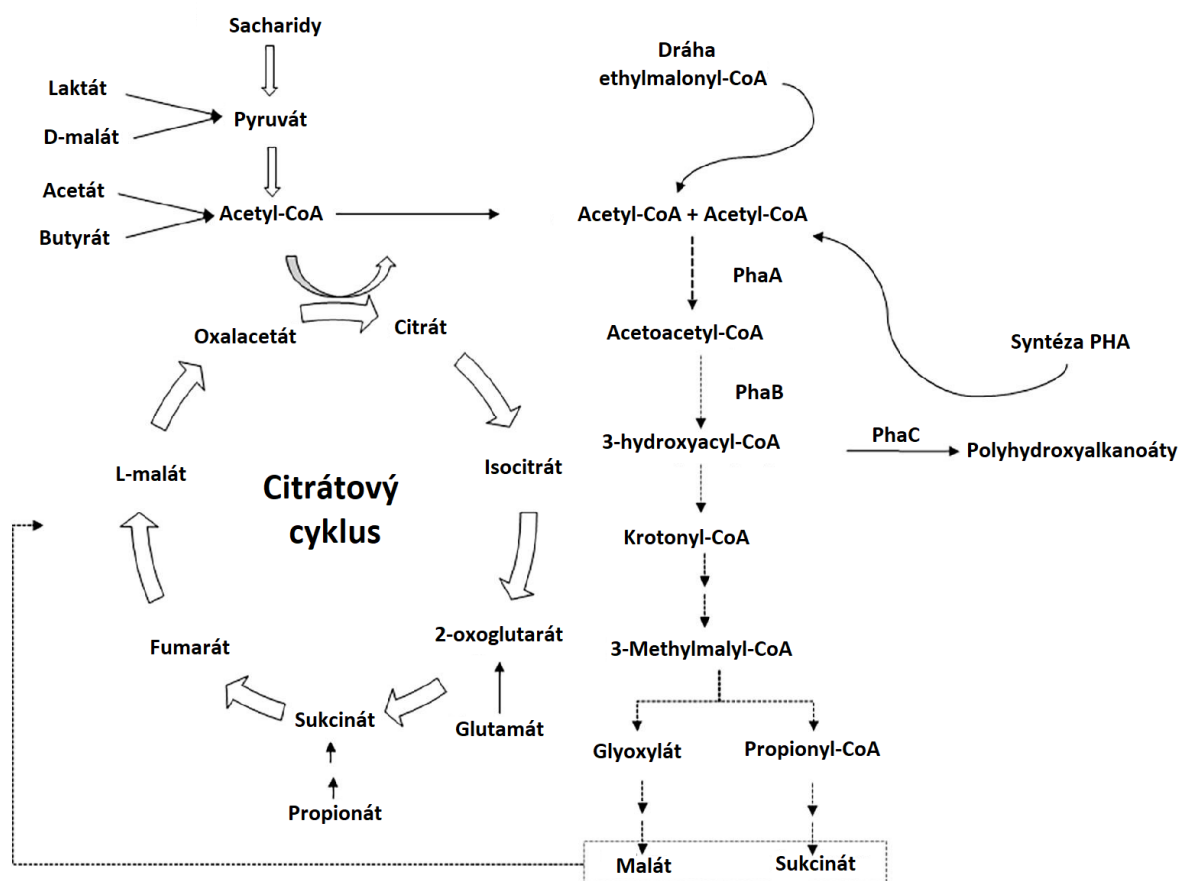
2.6.2 Metabolické dráhy zapojené do produkce polyhydroxyalkanoátů

Produkce PHA je jedním z mnoha způsobů, jak se mikroorganismy mohou zbavit přebytečných redukčních ekvivalentů a dosáhnout redoxní rovnováhy. Prostřednictvím fotoheterotrofního růstového režimu a nepatrného omezení přístupu dusíku (vysoký poměr uhlík/dusík) mohou tyto bakterie současně produkovat PHA a H_2 . PNSB mohou absorbovat světelnou energii (fotony) prostřednictvím svého fotosystému a ukládat ji jako chemickou energii (ATP), která je nutná pro růst a funkci buněk. TMK patří mezi nejsnadněji asimilovatelné substráty PNSB. TMK jsou disociovány (oxidovány) na CO_2 , H^+ a elektrony prostřednictvím cyklu trikarboxylových kyselin (citrátový cyklus). Pokud je k dispozici omezené množství dusíku a produkce pomocí biomasy není možná (fixací CO_2 prostřednictvím Calvinova cyklu), tyto bakterie využijí přebytečné elektrony k produkci PHA a H_2 , jak je ukázáno na Obr. 4 [5; 31].



Obr. 4 Schéma metabolických drah zapojených do produkce PHA, biomasy a H_2 pomocí PNSB. Převzato z [5]

Substráty, jako jsou acetát a butyrát, využívají anaplerotické dráhy, ve kterých jsou syntetizovány C4 kyseliny, jako jsou malát a sukcinát, které po oxidaci na pyruvát vstupují do cyklu trikarboxylových kyselin [32]. TMK, které jsou asimilovány cestou ethylmalonyl-CoA, se pravděpodobně využijí pro syntézu PHA [5]. Syntéza se skládá ze tří hlavních kroků: první krok zahrnuje kondenzaci dvou molekul acetyl-CoA, vzniklých z ethylmalonyl-CoA, za vzniku acetoacetyl-CoA v přítomnosti β -ketothiolázy (PhaA). Druhý krok zahrnuje redukci acetoacetyl-CoA za vzniku 3-hydroxyacyl-CoA katalyzovanou acetoacetyl-CoA reduktázou (PhaB) v přítomnosti NADPH. Posledním krokem, který je katalyzován PHA syntázou (PhaC), je polymerace hydroxyacyl-CoA (Obr. 5) [33].



Obr. 5. Metabolismus uhlíku a syntéza PHA pomocí PNSB. Převzato z [5]

2.6.3 Faktory ovlivňující produkci polyhydroxyalkanoátů

Produkce PHA pomocí PNSB závisí na zdroji uhlíku, poměru uhlík/dusík, koncentraci fosforu a síry, mikroživinách, pH, kultivaci a světelných podmínkách. Některé z těchto faktorů také ovlivňují produkci pigmentu, koenzym Q10 (CoQ10), kyseliny 5-aminilevulinové (5-ALA) a H_2 , proto je nutné pečlivě zvolit provozní podmínky [5].

2.6.3.1 Substrát

PNSB mohou pro výrobu PHA využívat širokou škálu zdrojů uhlíku: aceton, malát, acetát, propionát, butyrát, valerát, kaproát, heptanoát, glycerol, glukózu a další uhlovodíky, CO, jejichž zdroji jsou odpadní vody z fermentace lignocelulóзовých hydrolyzátů a dalších organické odpady. PNSB používají různé metabolické cesty k asimilaci dodaných substrátů. Acetát a butyrát patří k nejhojnějším TMK, které se produkují během fermentační biodegradace organických odpadů. Asimilace butyrátu bakterií *R. rubrum* probíhá prostřednictvím drah ethylmalonyl-CoA a methylbutanoyl-CoA. Dráhu

methylobutanoyl-CoA používá *R. rubrum* také k asimilaci valerátu za fotoheterotrofních podmínek. U většiny studií, ve kterých byly fermentované tmavé odpadní vody použity jako substráty pro výrobu PHA, se jako hlavní produkt uvádí hlavně PHB [5; 34].

PNSB mohou produkovat kopolymery nebo homopolymery se střední délkou řetězce. Výběrem prekurzorů lze tedy měnit složení a vlastnosti PHA [5]. Brandl a kol. (1989) získali polyhydroxyheptanoát (PHHp) z *R. rubrum* přidáním heptanoátu do média [35]. Liu a kol. (2019) získali přidáním fruktózy a valerátu do růstového média *R. rubrum* kopolymer PHBV [36].

Ke snížení výrobních nákladů je možné využít komplexních zbytkových substrátů, jako jsou acidogenní odpady z temností fermentace organických zbytků. Tyto odpadní vody jsou bohaté na mastné kyseliny s krátkým řetězcem, mohou také obsahovat mastné kyseliny se středním řetězcem, které PNSB spotřebují k syntéze SCL-PHA a MCL-PHA [5; 33].

2.6.3.2 Kultivace

Nutriční nerovnováha způsobená odlišnou dostupností živin vede v heterotrofních mikroorganismech k produkci PHA. PHA se proto běžně vyrábějí v režimu přísun živin/hladovění, který zahrnuje dvě fáze. V první fázi je poskytován bohatý zdroj uhlíku, který podporuje produkci biomasy, ve druhé fázi je zdroj uhlíku omezen, čímž dojde ke stimulaci akumulace PHA. Tento provozní režim však není praktický, ani ekonomicky výhodný [5].

Účinek živin na produkci PHA se může lišit v závislosti na růstových podmínkách. Například omezení příjmu dusíku, případně dalších mikroživin, jako jsou fosfor, síra a hořčík, stimuluje konkrétně produkci PHB [5].

2.6.3.3 Anaerobní a aerobní podmínky

Vysoká metabolická flexibilita PNSB umožňuje jejich růst za anaerobních podmínek díky získávání velké části energie ze světla. PNSB však mohou také růst za aerobních podmínek a získat dostatečné množství ATP pro syntézu PHA prostřednictvím oxidační fosforylace. Za aerobních podmínek mohou PNSB také akumulovat kopolymery, jako je PHBV, pokud se jako substráty přidají propionát a valerát [5].

Produktivita PHA je vyšší za aerobně-temnostních než za anaerobně-světelných podmínek, nicméně je také nutné zvážit kultivaci ve dvou fázích (přísun živin/hladovění) a energetické požadavky na provzdušňování. Při kultivaci anaerobně-světelné jsou náklady na osvětlení vysoké a mohou přesáhnout náklady na provzdušňování. Řízení kultivace anaerobně-světelné za slunečního osvětlení je tedy zásadní pro snížení nákladů např. na kultivaci [5; 37].

Dále je nutné vzít v úvahu účinky aerobních a anaerobních podmínek na koprodukcí dalších cenných vedlejších produktů spolu s PHA. PNSB uvolňují více 5-ALA do prostředí za podmínek mikroaerobně-světelných než za aerobně-temnostních podmínek [38]. CoQ10 se obvykle generuje kultivací v aerobním temnu [5].

2.6.3.4 *Intenzita světla a cykly světlo/tma*

Produkce PHA za anaerobně-světelných podmínek je silně ovlivněna intenzitou světla a světelnou stopou. Při vysoké intenzitě světla rozptýlí PNSB přebytečnou energii, za účelem ochrany buněk před fotooxidačním stresem, pomocí syntézy PHA, při které dojde ke spotřebě elektronů [5; 39].

Vysoká intenzita světla má vliv na produkty, jako je 5-ALA a H₂. Produkce 5-ALA a H₂ jsou procesy rozptylování nadbytečné energie, proto se jejich produkce zvyšuje při vysoké intenzitě světla. Lui a kol. (2019) uvedli, že produkce bakteriochlorofylů a karotenoidů se zvyšuje v cyklech světlo / tma [36].

Cykly světlo/tma také hrají zásadní roli ve výrobě PHB. Podmínky, jako je intenzita světla, vlnová délka a režim osvětlení, jsou pro PNSB kritické [5].

2.6.4 *Izolování polyhydroxyalkanoátů*

Biomasa se obvykle oddělí od vodné matrice odstředěním, filtrací nebo sedimentací, je nutné odstranit buněčnou hmotu neobsahující PHA (NPCM), která zahrnuje polypeptidy, fosfolipidy, DNA, RNA a peptidoglykany, následně se izoluje PHA. Nejpoužívanější metody pro izolování PHA, lze rozdělit do tří kategorií:

- i) extrakce rozpouštědlem
- ii) trávení NPCM
- iii) mechanické narušení

Všechny metody v zásadě fungují na roztržení bakteriální buňky a odstranění proteinové vrstvy, která obaluje granule PHA, nebo na selektivním rozpuštění PHA ve vhodném rozpouštědle, které je schopné projít přes buněčnou membránu. Výběr metody extrakce závisí na několika faktorech:

- i) pevnost a struktura buněčné stěny
- ii) typ a vyrobené množství PHA (vysoké množství intracelulárních PHA může usnadnit uvolňování biopolymerních granulí v důsledku zvýšené křehkosti buněk)
- iii) typ PHA (SCL-PHA nebo MCL-PHA), požadovaná čistota (v závislosti na konečné aplikaci biopolymeru)
- iv) dopad metody na konečnou molekulovou hmotnost PHA [1; 40]

Procesy následující po získání polymerů z buněk patří mezi nejdůležitější faktory ovlivňující celkové výrobní náklady PHA. V současnosti nejpoužívanější metodou získání v průmyslovém měřítku je extrakce PHA pomocí organických rozpouštědel (chloroform, tetrachlormetan, popř. propylenkarbonát nebo ethylenkarbonát), která jsou velmi účinná u čistých kultur, nicméně není šetrná k životnímu prostředí kvůli jejich toxicitě [40].

2.6.4.1 *Extrakce rozpouštědlem*

SCL-PHA i MCL-PHA jsou nerozpustné ve vodě, ale při pokojové teplotě jsou rozpustné, v některých organických rozpouštědlech, jako je chloroform, 1,2-dichlormethan a methylchlorid, propylen a ethen, a v některých azeotropických směsích, jako je trichlorethan s vodou nebo chloroform, buď s ethanolem, methanolem, hexanem nebo acetonem. Většina MCL-PHA je rozpustná také v hexanu, etheru a acetonu [27]. Rozpouštědla působí ve dvou fázích:

- i) modifikují propustnost buněčné membrány rozpuštěním lipidové části NPCM,
- ii) umožňují solubilizaci a následnou extrakci PHA.

Při extrakci SCL-PHA se běžně používají metody zahrnující látky, ve kterých se PHA nerozpouští (aceton a alkoholy) pro extrakci lipidů a taky vzpomínaná rozpouštědla PHA (chloroform) pro následnou extrakci polymeru [40; 41].

Po extrakci se rozpuštěný biopolymer oddělí odpařením nebo vysrážením pomocí přidavku antirozpouštědla, obvykle nízkomolekulárního alkoholu (ethanolu nebo methanolu) nebo vody, ve kterých nejsou PHA rozpustní. Pro SCL-PHA lze jako antirozpouštědlo použít také ether, aceton a hexan. Vysrážený biopolymer se potom oddělí ze směsi odstředěním nebo filtrací. Srážení lze také vyvolat změnou teploty nebo pH na rozmezí, kdy polymer již není rozpustný ve specifickém rozpouštědle [40; 42; 43].

Extrakce rozpouštědlem má oproti jiným metodám extrakce PHA výhody v účinnosti, vyšší čistotě a minimální degradaci biopolymeru, který si zachovává svoji vysokou molekulovou hmotnost a původní složení. Kromě toho lze touto metodou odstranit bakteriální endotoxiny, což umožňuje použití extrahovaného polymeru v lékařských aplikacích [40].

Nevýhodou extrakce organickým rozpouštědlem je to, že se jedná o neekologickou metodu. Škodlivé vlastnosti nejpoužívanějších rozpouštědel, zejména chlorovaných, jako je chloroform, jsou hlavní nevýhodou této metody extrakce, protože představují nebezpečí pro životní prostředí a pro obsluhu. Alternativou je použití recyklovatelných a ekologicky nezávadných rozpouštědel, jako je dimethylkarbonát [25]. Proces vyžaduje obrovské množství extrakčních rozpouštědel, a to až dvacetinásobek hmotnosti biomasy obsahující PHA. Pro vysrážení biopolymerů musí být přidáno antirozpouštědlo v poměru 10:1 vzhledem k objemu roztoku PHA [42]. Odstranění rozpouštědla, které zbylo po kroku srážení je velmi energeticky náročný úkol, obvykle dosažený destilací. Proces extrakce rozpouštědlem má proto vysoké provozní a investiční náklady kvůli vysokému množství použitých rozpouštědel a energie a častým požadavkům na sušení biomasy před extrakcí. Dalším problémem je, že viskozita roztoku PHA může interferovat s odstraňováním buněčných zbytků, což vede k obtížnému a nákladnému procesu separace [25; 43].

2.6.4.2 Trávení NCPM

Mikroorganismy produkující PHA mohou tyto polymery akumulovat ve značném množství buněčné váhy, odstranění malé části buněčné hmoty obklopující granule PHA se zdá jako rozumné řešení, spíše než extrahovat PHA solubilizací ve vhodném rozpouštědle. Proto byly vyvinuty různé metody, za účelem uvolnění PHA granulí solubilizací okolní buněčné hmoty. K tomuto účelu lze použít chemické sloučeniny různých druhů: chlornan sodný, povrchově aktivní látky, kyselé a alkalické sloučeniny. Všechny tyto chemikálie lze použít ve vodné fázi, čímž se zabrání spotřebě energie potřebné k sušení biomasy při použití extrakce rozpouštědlem [25; 42].

Pokud při použití oxidantů a alkálií nejsou chemická koncentrace a jiné podmínky izolace dobře regulovány, použité chemikálie rozpustí nejen NPCM, ale také intracelulární polymer, což vede k degradaci PHA a nižší výtěžnosti. Granule PHA uvolňované z buněk jsou obvykle obklopeny membránou, která do určité míry chrání PHA před chemickým útokem, výsledkem je, že za vhodných podmínek odolává PHA degradaci a udržuje si vysokou molární hmotnost [25].

Jelikož aplikované chemikálie převádějí složky buněčné hmoty na látky rozpustné ve vodě, uvolněné granule PHA lze snadno oddělit odstředěním, filtrací nebo flotací [42].

2.6.4.3 Mechanické narušení

Nejpoužívanějšími mechanickými metodami pro rozrušení buněk jsou vysokotlaká homogenizace a kuličkové mletí. Obecně se dává přednost mechanickému narušení díky malému poškození produktů a znečištění životního prostředí, protože nezahrnuje použití žádných chemikálií. Nevýhody této metody jsou: dlouhá doba zpracování, vysoké investiční náklady na kapitál a obtíže při rozšiřování.

K uvolňování granulí PHA z bakteriálních buněk se v laboratorním měřítku často používají metody mechanického rozrušení buněk. Tyto metody se však méně používají pro průmyslovou velkovýrobu PHA [25; 43].

Během procesu izolace při použití kuličkového mlýna a homogenizátoru se vytváří teplo, proto je nutné chlazení při průběhu tohoto procesu. Výkon homogenizátoru je lepší než výkon mlýnu, pokud jsou buňky vysoce koncentrované, zatímco při nízké koncentraci biomasy mlýn funguje lépe [41].

Mechanické narušení buněk lze také kombinovat s jinými způsoby ošetření pomocí rozpouštědel, povrchově aktivních látek nebo chemikálií [25].

2.6.5 Vedlejší produkty syntézy polyhydroxialkanoátů

Aby byl zajištěn ekonomicky výnosný systém, je v biorafinačním schématu nutná současná výroba PHA s dalšími produkty (kyselina 5-ALA, H_2 , CoQ10). PNSB jsou ideálními kandidáty díky své vysoké metabolické flexibilitě, která jim umožňuje růst v různých prostředích a používat širokou škálu substrátů. PNSB rostou buď za aerobních podmínek s využitím organického uhlíku, nebo anaerobně za temnostních i světlých podmínek, a za využití zdrojů organického nebo anorganického uhlíku. Ve všech režimech růstu mohou PNSB vyrábět PHA a další látky s aplikačním potenciálem ve farmacii, nutraceutice, kosmetice, zemědělství a obnovitelných zdrojích energie [5].

2.6.5.1 Kyselina 5-aminolevulinová

5-ALA je metabolit využívaný pro syntézu tetrapyrrolových barviv, jako je hemoglobin a chlorofyl, a vitamínu B12 u zvířat, rostlin, řas a bakterií [44]. 5-ALA má využití v zemědělství jako netoxický biologicky odbouratelný herbicid, insekticid a faktor podporující růst. Rovněž může rostlinám propůjčit toleranci vůči soli a nízké teplotě. 5-ALA je přírodní fotodynamická sloučenina, která se v lékařství používá jako protinádorové činidlo a při fotodynamické diagnostice. Díky svým mnoha funkcím v zemědělském a lékařském průmyslu má 5-ALA vysokou poptávku a tržní cenu [5].

2.6.5.2 Koenzym Q10

CoQ10 je součástí dýchacího řetězce ve všech aerobních organismech. CoQ10 je nutraceutický antioxidant, který vykazuje vynikající schopnost předcházet srdečním chorobám, Parkinsonově a Alzheimerově chorobě, také usnadňuje léčbu nádorů, zvyšuje imunitu a zmírňuje únavu. CoQ10 je navíc využíván v kosmetice ke snížení tvorby vrásek. PNSB mohou produkovat CoQ10 za aerobních/anaerobních a světlých/temnostních podmínek. Manipulací s koncentrací fosfátu a procentem rozpuštěného kyslíku lze zvýšit produkci CoQ10 [5; 45].

2.6.5.3 Vodík

H_2 je jedním z nejslibnějších alternativních zdrojů energie pro budoucnost díky vysokému energetickému obsahu na jednotku hmotnosti a šetrnosti k životnímu prostředí. V této oblasti byly PNSB široce zkoumány kvůli jejich foto-fermentativní schopnosti transformovat TMK na H_2 s účinností blízkou stechiometrickým hodnotám [5]. Spojení foto-fermentativního procesu s temnostní fermentací, je proveditelnou alternativou pro podstatné zvýšení produkce H_2 [46].

3 Experimentální část

3.1 Použité bakterie, chemikálie a přístroje

3.1.1 Použité bakterie

V experimentální části byly použity kultury bakteriálního kmene *Rhodospirillum rubrum* DSM 467, získané z německé sbírky mikroorganismů.

3.1.2 Seznam použitých chemikálií

- LB Broth (Sigma Aldrich Inc.)
- Agar powder (HIMEDIA)
- Biotin (Sigma Aldrich Inc.)
- BODIPY 439/503, (Thermo Fisher Scientific)
- D-fruktóza (Lach-Ner, ČR)
- Dihydrogenfosforečnan draselný, KH_2PO_4 (Lach-Ner, ČR)
- Disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové, Na_2EDTA (Lach-Ner, ČR)
- Heptahydrát síranu hořečnatého, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Lach-Ner, ČR)
- Hydrogenfosforečnan disodný, Na_2HPO_4 (Lach-Ner)
- Hydrogenfosforečnan draselný, K_2HPO_4 (Lach-Ner, ČR)
- Hydroxid sodný, NaOH (Lach-Ner, ČR)
- Chlorid amonný, NH_4Cl (Lach-Ner, ČR)
- Chlorid draselný, KCl (Lach-Ner, ČR)
- Chlorid nikelnatý, NiCl_2 (Lach-Ner, ČR)
- Chlorid sodný, NaCl (Lach-Ner, ČR)
- Chlorid vápenatý, CaCl_2 (Lach-Ner, ČR)
- Kvasniční extrakt (HIMEDIA)
- Kyselina boritá, H_3BO_3 (Lachema, ČR)
- Molybdenan sodný, Na_2MoO_4 (Lach-Ner, ČR)
- MOPS (Sigma Aldrich Inc.)
- Síran železnatý, FeSO_4 (Lach-Ner, ČR)
- Trihydrát octanu sodného, $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Penta)

3.1.3 Seznam použitých přístrojů

- Anaerostat, Schuett-biotec GmbH
- Analytické váhy, Ohaus Pioneer PA224C
- Centrifuga, Hettich EBA 200
- Centrifuga, Hettich EBA Hettich
- Centrifuga, Sartorius Sigma 1-15
- FT-IR spektrometer Nicolet iS50, Thermo Fisher Scientific Inc.
- Inkubátor, Binder Avantgarde
- Laminární box, Euroclone BioAir Auro mini
- Magnetická míchačka, Biosan MMS-3000
- Nanofotometr, PEARL
- pH metr, Thermo Scientific pHTestr 30
- Plynový chromatograf s FID, Thermo Scientific Trace 1300
- Průtokový cytometer, Cytex® Aurora, NL 2 000
- Skenovací elektronový mikroskop
- Temperovaná třepačka, Heidolph Unimax 1010, Heidolph Instruments
- Temperovaná třepačka, IKA KS4000i control
- Termostat, LS-35
- Transmisní elektronový mikroskop
- UV-VIS spektrofotometer, Hitachi U-3900H
- Váhy, Kern EW 620-3NM
- Vortex, Benchmark BenchMixe

3.2 Kultivace

3.2.1 Příprava inokula

Byly připraveny 2 typy inokula, které se lišily v objemu a použitém laboratorním skle.

Inokulum č.1:

- zkumavky o objemu 19 ml
- 5 ml LB Broth
- po sterilizaci zaočkováno 286 μ l kultury z kryozkumavek

Inokulum č.2

- 500ml Erlenmayerové baňky
- 100 ml LB Broth
- po sterilizaci zaočkováno pomocí bakteriologické kličky z agarové plotny

Celkový objem připravovaného inokula č.1 se lišil v závislosti na celkovém množství produkčního média. Objem inokula č.2 činil 300 ml.

Po zaočkování byla inokula vložena na třepačku vytemperovanou na 30 °C, frekvence třepání byla nastavena na 170 rpm. Inokulum č.1 bylo na třepačce dobu 24 hodin a inokulum č.3 po dobu 72 hodin, přičemž inokulum č.3 bylo kultivováno ve tmě.

3.2.2 Příprava produkčních médií

Byly připraveny 2 typy médií, submerzní médium SYN+FAY a pevné agarové médium LB Broth. Obě média byla použita pro kultivaci bakterií *Rhodospirillum rubrum*.

Složení LB Broth:

Trypton	10 g
Kvasniční extrakt	5 g
NaCl	5 g
Agar	20 g
Destilovaná voda	1000 ml

Složení submerzního produkčního média pro kultivaci bakterií *Rhodospirillum rubrum*:

SYN salts (5x) (viz níže)	200 ml
K ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄ (191 mM, pH 7,0)	0,5 ml
Biotin (20 mg/l, po sterilizaci)	0,1 ml
Roztok fruktosy (1,5 M)	10 ml
Roztok octanu sodného (1 M)	10 ml
Roztok kvasničného extraktu (50 g/l)	20 ml
Destilovaná voda	1000 ml

SYN salts (5x):

MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,25 g
MOPS	10,5 g
NH ₄ Cl	5 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,66 g
Roztok NiCl ₂ (20 mM)	5 ml
Chelatovaný roztok FeMo (viz níže)	50 ml
Destilovaná voda	1000 ml

Výsledné pH roztoku SYN salts (5x) bylo upraveno pomocí NaOH na 7,1.

Chelatovaný roztok FeMo:

H ₃ BO ₃	0,28 g
Na ₂ EDTA	2 g
FeSO ₄	0,4 g
Na ₂ MoO ₄	0,1 g
Destilovaná voda	1000 ml

Bakterie *Rhodospirillum rubrum* byly kultivovány za různých podmínek (viz níže), od kterých se odvíjelo množství produkčního média. Inokulum bylo přidáno do produkčního média v takovém množství, aby hodnota absorbance produkčního média při vlnové délce 660 nm činila po zaočkování 0,02. Při kultivaci na pevném LB Broth médiu bylo použito 100 µl inokula č.2, které bylo na Petriho miskách rozetřeno hokejkou.

3.2.3 Podmínky kultivace

Bakterie byly kultivovány v aerobních podmínkách, v 250ml Erlenmayerových baňkách s 100 ml SYN+FAY média. Aerobní kultivace probíhala při světle (sluneční záření jako zdroj světla), tak i ve tmě. Stejně probíhala i kultivace mikroaerobní s rozdílným objemem SYN+FAY média – 200 ml v 250ml Erlenmayerových baňkách. Při anaerobní kultivaci bylo použito 150 ml SYN+FAY média v 250ml Erlenmayerových baňkách, tato kultivace probíhala pouze ve tmě v anaerostatu při -0,5 bar. Kultury kultivované na světle byly dány do vytemperované třepačky na 170 rpm, kultury kultivované ve tmě byly dány do termostatu (bez třepání). Kultivace při všech podmínkách probíhala při 30 °C po dobu 72 hodin, odběr vzorků probíhal po 12 hodinách. Pro kultivace bylo využito inokulum č.1.

Pro syntézu barevných pigmentů byly bakterie kultivovány ve dvou typech média, tekutém SYN+FAY mediu a pevném LB Broth mediu. Při kultivaci v SYN+FAY mediu byl přidán takový objem inokula, aby počáteční absorpance byla přibližně 0,02 při vlnové délce 660 nm. Do 50ml zkumavek bylo poté odměřeno 15, 25, 35 a 45 ml média s bakteriemi, zkumavky byly pevně uzavřeny (pseudo-anaerobní podmínky) a dány do termostatu vytemperovaného na 30 °C. Zkumavky byly otevřeny až při ukončení kultivace. U bakterií kultivovaných ve 45 ml média došlo k nerychlejšímu a nejintenzivnějšímu zabarvení. Objem 45 ml média byl vyhodnocen jako nejvhodnější pro další experimenty a dále se pracovalo pouze s ním.

Kultivace na pevném LB Broth mediu, na kterém bylo pomocí hokejky rozetřeno 200 µl inokula, probíhala ve tmě ve termostatu při 30 °C. U obou médií bylo použito inokulum č.2 a doba trvání kultivací byla 72, 120 a 168 hodin. Po ukončení kultivace byly bakterie z misek pomocí očkovací kličky setřeny a rozmíchány v 10 ml PBS pufru pro další měření.

3.2.4 Příprava fosfátového pufru

Látky použité na přípravu fosfátového pufru (PBS) byly smíchané v destilované vodě. Hmotnosti látek jsou následující:

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Destilovaná voda	1000 ml

Výsledné pH bylo upraveno na 7,5.

3.3 Příprava vzorků na analýzy a použité metody

3.3.1 Příprava sušené biomasy

Z kultur bylo pipetou do plastových zkumavek odebráno 10 ml. Plastové zkumavky byly následně odstředěny na centrifuze při 5000 rpm po dobu 5 minut. Supernatant byl po centrifugaci slit, k usazené biomase bylo přidáno 5 ml PBS a obsah zkumavky byl promíchán na vortexu. Následně byla směs opět odstředěna při stejných podmínkách. Po odstředění byl supernatant opět slit a zkumavka s biomasou byla dána do termostatu při teplotě 70 °C. Sušení biomasy probíhalo nejméně 48 hodin, po vysušení byla biomasa použita pro měření plynovou chromatografií a infračervenou spektroskopií (FTIR), které jsou popsány v následujících kapitolách.

3.3.2 Extrakce barevných pigmentů

Pro extrakci byl použit protokol od Zavřel et al, 2015 [47]. Extrakce barevných pigmentů probíhala za co nejmenšího přístupu světla, aby se zabránilo degradaci extrahovaných pigmentů. Pro extrakci pigmentů byl z kultur pipetou odebrán 1 ml vzorku, který byl odstředěn na centrifuze při $15\,000 \times g$ po dobu 7 minut. Po odstředění byl supernatant slit a k biomase byl přidán 1 ml methanolu, který byl vychlazen na 4 °C. Směs byla zhomogenizovaná na vortexu, zabalena do hliníkové fólie a inkubována při 4 °C minimálně 20 minut. Poté byla směs odstředěna při stejných podmínkách. Koncentrace pigmentů byla měřena na spektrofotometru při vlnových délkách 470 nm, 665 nm a 720 nm. Jako blank byl použit methanol.

3.3.3 Plynová chromatografie

Vzorky usušené biomasy (příprava popsána v předcházející kapitole 3.3.1) o hmotnosti 8-11 mg byly rozpuštěny v 1 ml chloroformu, následně bylo přidáno 0,8 ml 5 % kyseliny sírové v methanolu s 5 mg/ml kyseliny benzoové. Vzorky byly připraveny ve vialkách, které byly následně hermeticky uzavřeny a dány esterifikovat. Esterifikace probíhala po dobu 3 hodin při 94°C.

Po ukončení esterifikace byly vzorky přelity do 0,5 ml hydroxidu sodného (0,05 M) a obsah vialek byl protřepán. Po vytvoření dvou fází bylo ze spodní fáze odebráno 50 µl, ke kterým bylo přidáno 0,9 ml izopropanolu. Analýza připravených vzorků probíhala na přístroji s FID detektorem.

3.3.4 Průtoková cytometrie

Pro cytometrické stanovení bylo z kultur odebráno po 1 ml vzorku. Vzorky byly zředěny pomocí PBS na požadovaný počet buněk ($1 \cdot 10^6$ – $1 \cdot 10^7$ v 1 ml). Narostlé a více zakalené kultury byly zředěny 100×, méně narostlé a zakalené kultury byly zředěny 10×. Po zředění bylo ke vzorkům přidáno po 1 µl fluorescenční sondy BODIPY 439/503 (koncentrace 1 mg/ml v DMSO) a následovala inkubace ve tmě po dobu 5 minut. Počet analyzovaných buněk byl nastaven na 10 000.

3.3.5 Ramanova spektroskopie

Ramanovou spektroskopií byly měřeny 2 typy vzorků. První vzorky byly připraveny odebráním 2 ml z produkčních médií a následnou centrifugací (5000 rpm, 5 minut). Druhé vzorky byly odebrány pipetou z extraktů (připravených postupem 3.3.2). Buňky byly analyzovány pomocí systému Renishaw InVia (Renishaw inVia Raman spektrometr) s 785 nm diodovým laserem. Laserový paprsek byl zaostřen na vzorek pomocí objektivu mikroskopu (50x, NA 0,5, Leica, Wetzlar, Německo). Spektra byla naměřená v rozmezí 500-2000 cm^{-1} .

3.3.6 UV-VIS spektroskopie

Na měření rozptylu bylo odebráno po 2 ml z každé kultury. Vzorky byly měřeny na UV-VIS spektrofotometru v rozsahu vlnových délek 900–350 nm s krokem 1 nm. Vzorky byly měřeny, jak v transmisním módu, tak v režimu rozptýleného odrazu za použití integrační koule.

3.3.7 Fluorescenční mikroskopie

Pro fluorescenční mikroskopii byly z produkčních médií odebrány 2 ml, ke kterým byla přidána fluorescenční sonda BODIPY 439/503. K měření metody FLIM (fluorescence lifetime imaging microscopy) byl využit fluorescenční konfokální mikroskop MicroTime 200. Mikroskop se skládá z objektivu s vodní imerzí Olympus IX71. Pro měření daných vzorků byl využit laser o vlnové délce 470 nm, dichroické zrcadlo 470/635, emisní filtr 488LP a detektor SPAD 2 (Single Photon Avalanche Diodes).

3.3.8 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

Pro infračervenou spektroskopii s Fourierovou transformací byla využita sušená biomasa (postup přípravy popsán v kapitole 3.3.1). Pro infračervenou spektroskopii s Fourierovou transformací byla využita vysušená biomasa (postup přípravy popsán v kapitole 3.3.1). Jednotlivé vzorky byly proměřeny pomocí ATR-FTIR (Nicolet iS50, Thermo Scientific, Watham) s vestavěným jednodrazovým diamantem. Každé spektrum bylo naměřeno v rozsahu $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ jako průměr 16 skenů s rozlišením 4 cm^{-1} . Jako další metoda byl využit FT-Ramanský modul k spektrometru Nicolet iS50 při excitační vlnové délce 1064 nm , rovněž v rozsahu $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ jako průměr 16 skenů s rozlišením 4 cm^{-1} .

3.3.9 Kryo–skenovací elektronová mikroskopie

Mikrobiální kultury byly centrifugovány 4000 rpm po dobu 4 minut. Koncentrovaný pelet buněk byl napipetován na 6 mm hliníkový carrier typ A a uzavřen plochou stranou carrieru typu B. Vzorek byl následně fixován technikou high-pressure freezing (high-pressure freezer EM ICE, Leica Microsystems). Zamražený vzorek byl přenesen pod tekutým dusíkem do kryo-vakuové přípravné komory (EM ACE600, Leica Microsystems), kde prošel mrazovým lámáním a následně sublimací ($-95\text{ °C}/7\text{ min}$). Takto připravený vzorek byl přenesen do skenovacího elektronového mikroskopu (Magellan 400/L, FEI) a pozorován při teplotě -120 °C za použití elektronového svazku o energii $1\text{--}2\text{ keV}$.

4 Výsledky a diskuze

Práce je zaměřená na porovnání kultivačních podmínek bakteriálního kmene *Rhodospirillum rubrum*, především na vliv aerobních, mikroaerobních a anaerobních podmínek. V práci byly bakterie kultivovány, jak na světle, tak ve tmě. Kultivační podmínky byly porovnány na základě rychlosti růstu bakterií, obsahu biomasy a jeho charakterizace skrz obsah PHA. Zároveň byla u jednotlivých bakteriálních vzorků zkoumána morfologie buněk prostřednictvím fluorescenční a elektronové mikroskopie. Také byla část experimentální práce zaměřena na schopnost *Rhodospirillum rubrum* syntézy barevných pigmentů (bakteriochlorofyl a karotenoidy) v pseudo-anaerobních podmínkách.

4.1 Optimalizace kultivačních podmínek inokula

Bakterie byly kultivovány ve zkumavkách při různých poměrech objemu média LB/objemu přidávané kultury bakterií z kryozkumavek o známé optické hustotě (OD). Rozdílné objemy média způsobily odlišnou rychlost růstu bakterií. Všechna inokula byla kultivována při 30 °C a 170 rpm (viz kapitola 3.2.1).

Nejprve bylo potřeba určit nejvýhodnější poměr objemu LB/objemu bakterií tak, aby absorbance inokula, při vlnové délce 660 nm (při této vlnové délce nevykazuje žádný pigment emisní záření), byla po 24 hodinách v rozmezí od 0,7 do 1,1. Jako první byl zvolen poměr 5 ml/100 µl. Po 24 hodinách kultivace byla absorbance příliš nízká (0,414), inokulum bylo proto dáno zpět do termostatu na dalších 24 hodin. Hodnota absorbance po 48 hodinách byla vyšší než hodnota 1,1 (viz Tabulka 1), poměr 5 ml/100 µl byl kvůli nízké hodnotě absorbance po 24 hodinách vyhodnocen jako nevhodný a dále již nebyl použit.

Jako další poměr byl zvolen 3,5 ml/150 µl. Absorbance inokula, kultivovaného s použitím tohoto poměru, byla po 24 hodinách přibližně 0,6 (viz. Tabulka 1). Rychlost růstu bakterií by při poměru 3,5 ml/150 µl mohla být dostačující, avšak při kultivaci muselo být použito minimálně 26 zkumavek z důvodu potřeby celkového objemu inokula pro další zaočkování. Poměr 3,5 ml/150 µl byl z důvodů těžké manipulace a nízké absorbance vyhodnocen jako nevhodný pro další použití.

Pro další optimalizaci byl zvolen objem 5 ml/286 µl, jehož absorbance po 24 hodinách je vypsána v tabulce 1. Tento poměr byl z praktických důvodů (na kultivaci bylo použito 10 zkumavek) a dostačující hodnoty absorbance, vyhodnocen jako nejvýhodnější a byl v této práci dále používán pro kultivaci inokula.

Tabulka 1. Objem LB, objem kultury v inokulu, jejich doba kultivace a absorbance

Objem LB [ml]	Objem kultury [µl]	Doba kultivace [h]	A ₆₆₀ [-]
5	100	48	1,349 ± 0,13
3,5	150	24	0,590 ± 0,30
5	286	24	0,766 ± 0,03

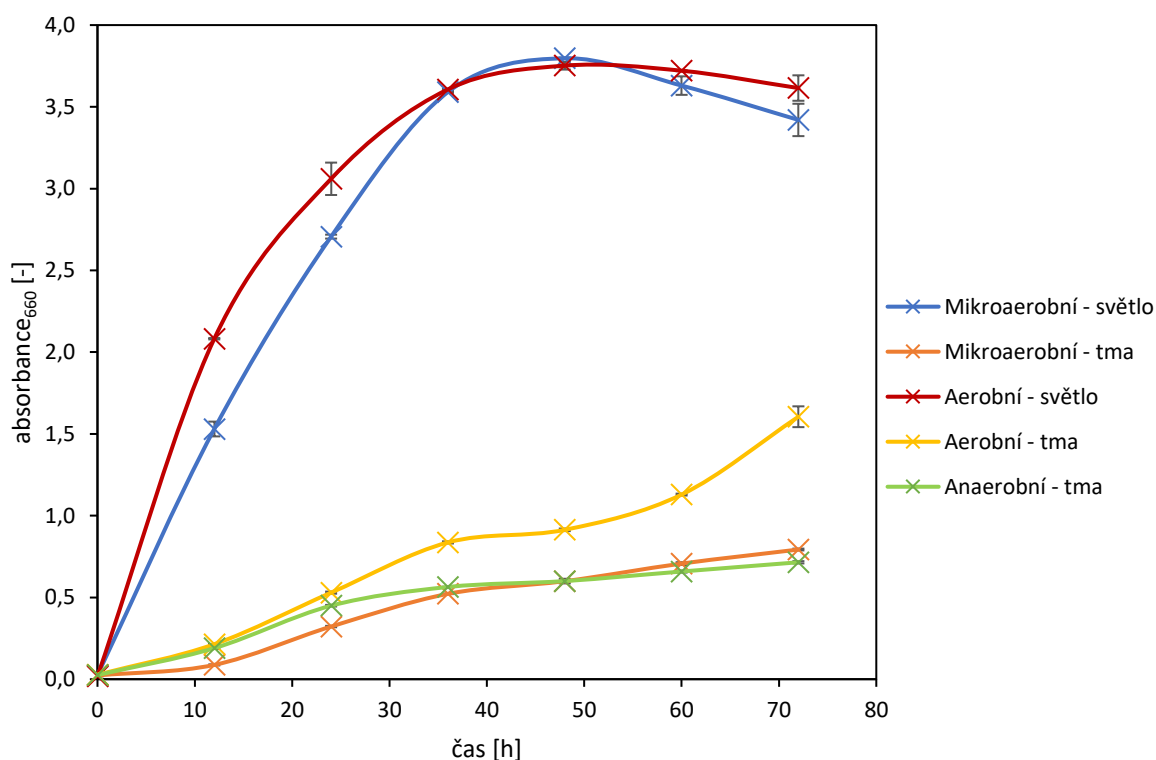
4.2 Kultivace bakterií za různých podmínek

Bakterie *Rhodospirillum rubrum* vykazují velkou metabolickou adaptibilitu, mohou růst aerobně, mikroaerobně i anaerobně (viz 2.6.3.3), a to jak za heterotrofních, tak autotrofních podmínek. Bakterie jsou také fakultativně fototrofní jak za autotrofních, tak heterotrofních podmínek (viz. 2.6.1.1), mohou však růst i při kultivaci za tmy (viz. 2.6.1.3).

Z důvodu metabolické adaptability těchto bakterií bylo vybráno široké spektrum kultivačních podmínek, kterým budou věnované následující kapitoly. Různé aerační a světelné podmínky kultivace způsobily odlišnou rychlost růstu bakterií a rozdílný obsah PHA granulí. Pro kultivace bylo použito inokulum č.1 (viz kapitola 3.2.1).

4.2.1 Základní charakteristika

Pro charakterizaci růstu bakterií při různých podmínkách bylo využito měření OD při vlnové délce 660 nm. Vzorky pro měření OD byly odebírány v intervalu 12 hodin po celou dobu kultivace, pokud bylo potřeba byly vzorky zředěny PBS pufrem. Hodnoty naměřených OD jsou vyneseny v grafu na Obr. 6.



Obr. 6 Růstová křivka kultivací za různých podmínek

Z grafu (Obr. 6) můžeme usuzovat, že pro růst bakterií *R. rubrum* je nejprůzračnější kultivace na světle, jak kultivace mikroaerobní (modrá křivka) tak aerobní kultivace (červená křivka), především v rámci exponenciální fáze. Avšak po 48 hodinách kultivace se bakterie nacházely ve stacionární fázi a po 72 hodinách vstoupily bakterie do fáze odumírání, pravděpodobně v důsledku spotřeby většiny živin.

Zatímco za temnostních podmínek kultivace nebyl pozorován rychlý růst bakterií. Nejpomaleji bakterie rostly při anaerobních a mikroaerobních podmínkách. Z kultivací ve tmě se jako nejvýhodnější jeví aerobní kultivace (žlutá křivka).

Jako doplňková metoda k výsledkům optické hustoty jednotlivých kultivací byla využita průtoková cytometrie, a to za účelem zjištění počtu buněk během růstu. Postup přípravy vzorků byl popsán v kapitole 3.3.4. Na základě výsledku měření rozptylu světla byl vyhodnocen počet buněk v médiích. Výsledky jsou zapsány v tabulce 2 a tabulce 3.

Tabulka 2. Hodnoty OD a CFU pro kultivace na světle

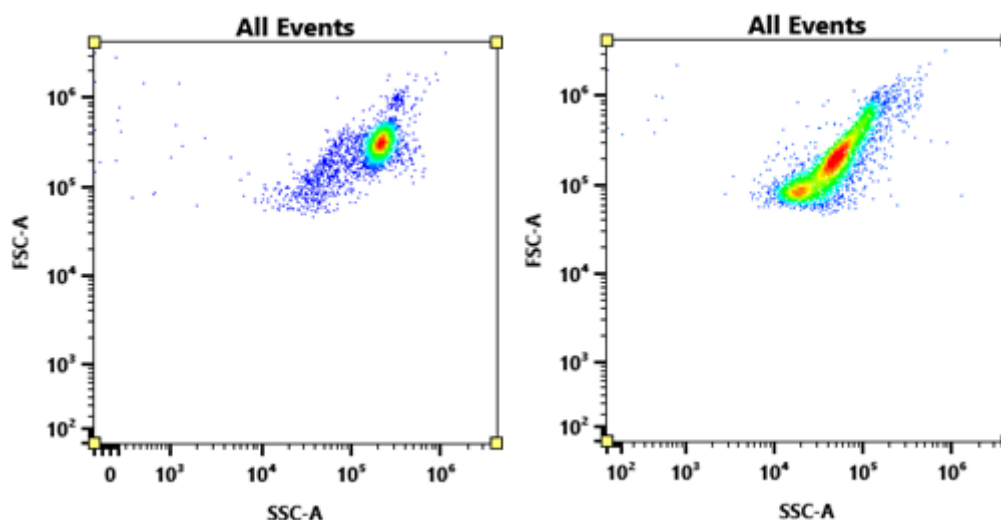
aerace	čas [h]	OD ₆₆₀	Počet buněk [10 ⁸ /ml]
mikroaerobní	24	2,71 ± 0,01	3,03 ± 0,10
	48	3,80 ± 0,00	4,04 ± 0,16
	72	3,42 ± 0,10	3,84 ± 0,09
aerobní	24	3,06 ± 0,10	3,85 ± 0,11
	48	3,75 ± 0,02	4,87 ± 0,12
	72	3,62 ± 0,08	4,63 ± 0,09

Tabulka 3. Hodnoty OD a CFU pro kultivace ve tmě

aerace	čas [h]	OD ₆₆₀	Počet buněk [10 ⁸ /ml]
mikroaerobní	24	0,32 ± 0,00	0,45 ± 0,02
	48	0,60 ± 0,00	1,41 ± 0,01
	72	0,79 ± 0,01	1,74 ± 0,07
aerobní	24	0,53 ± 0,01	2,17 ± 0,07
	48	0,91 ± 0,01	2,94 ± 0,12
	72	1,61 ± 0,06	3,48 ± 0,19
anaerobní	24	0,45 ± 0,01	0,19 ± 0,01
	48	0,60 ± 0,01	0,28 ± 0,02
	72	0,72 ± 0,01	1,53 ± 0,02

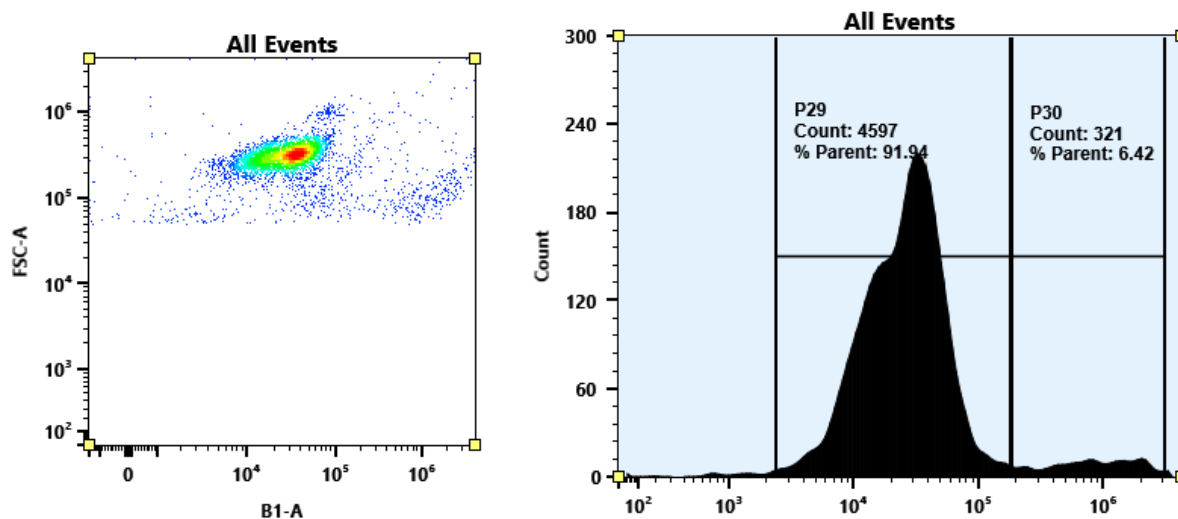
Z dat naměřených průtokovou cytometrií, stejně jako z naměřených hodnot OD vyplývá, že nejvhodnější podmínky pro růst bakterií *R. rubrum* jsou mikroaerobní a aerobní, při kultivaci na světle.

Na Obr. 7 je ukázka cytogramů pro aerobní kultivaci na světle (vlevo) a kultivaci za tmy (vpravo). Bakterie kultivované na světle vytvořily více uniformní populaci, než bakterie kultivované ve tmě (dvě subpopulace). Velikost bakterií, zjištěná pomocí rozptylu světla v přímém směru (FSC), a granularita, měřená pomocí rozptylu světla v bočním směru (SSC), se u temnostní kultivace pohybovaly ve větším intervalu hodnot, než u světelné kultivace (cytogramy z dalších kultivací se nacházejí v Příloze 8). Z těchto cytogramů však nelze zjistit, zda bakterie obsahují PHA, popřípadě množství PHA v bakteriích.

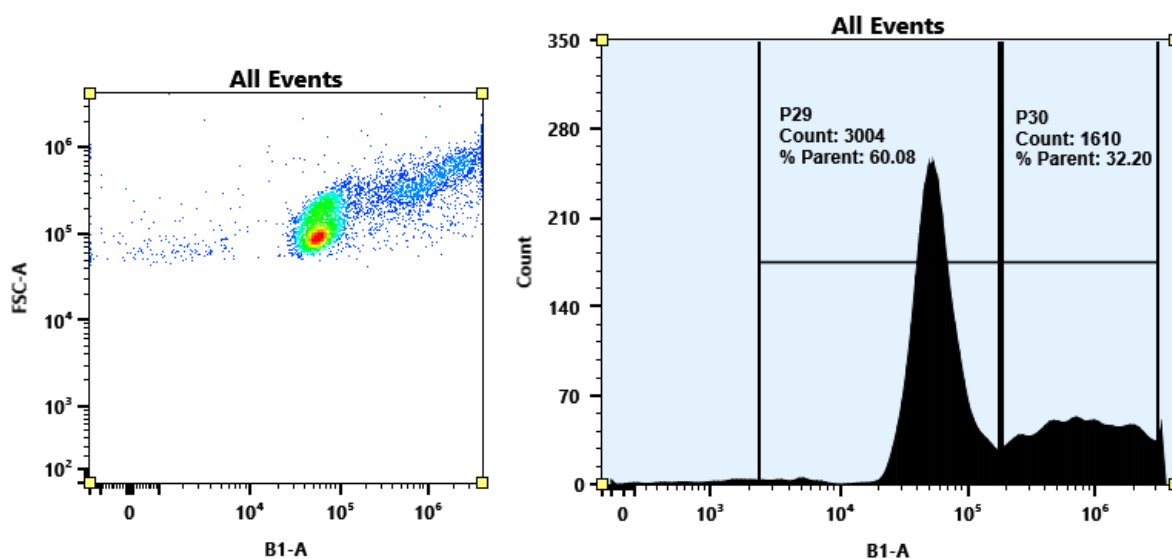


Obr. 7 Cytogramy aerobních kultivace na světle (vlevo) a ve tmě (vpravo)

Z důvodů zmíněných výše byly pro podrobnější analýzu obsahu PHA buňky analyzovány pomocí přídavku fluorescenční sondy BODIPY 439/503. Tato sonda je hydrofobní, váže se na lipofilní části buněk, jako jsou např. granule PHA či cytoplazmatická membrána. Sonda se vyznačuje zelenou fluorescencí, která se nachází v emisní/excitační oblasti 493/503. Předpokládáme, že čím vyšší bude intenzita záření tím více PHA buňky obsahují.



Obr. 8 Cytogram (vlevo) a histogram (vpravo) pro aerobní kultivaci na světle při použití fluorescenční sondy BODIPY



Obr. 9 Cytogram (vlevo) a histogram (vpravo) pro aerobní kultivaci ve tmě při použití fluorescenční sondy BODIPY

Z cytogramů i histogramů vyplývá, že při aerobní kultivaci ve tmě (Obr. 9) bylo množství buněk vykazující vyšší intenzitu záření vyšší než u aerobní kultivace na světle (Obr. 8). Počet buněk s vyšší intenzitou byl u kultivace ve tmě přibližně pětkrát vyšší, než počet buněk se stejnou intenzitou u kultivace na světle (cytogramy z dalších kultivací se nacházejí v Příloze 8). Předpokládáme tedy vyšší obsah PHA u bakterií kultivovaných ve tmě, avšak fluorescenční sonda BODIPY 493/503 se mohla navázat na jiné lipofilní části a způsobit tak falešně pozitivní výsledky. Výsledky byly proto porovnány s plynovou chromatografií.

4.2.2 Stanovení obsahu polyhydroxyalkanoátů

Obsah PHA v produkčních médiích jednotlivých kultur *R. rubrum* byl stanoven plynovou chromatografií. Postup přípravy vzorků na plynovou chromatografii byl popsán v kapitole 3.3.3.

Kalibrační křivka byla sestavena ředěním standardu PHB v různých poměrech a následnou analýzou plynovou chromatografií s FID. Regresní rovnice byla sestavena ze závislosti poměrů ploch pík analytu a kyseliny benzoové na koncentraci PHB. Koncentrace PHB v analyzovaných vzorcích byla vypočtena z výsledné rovnice.

Vypočtené obsahy PHB v produkčních médiích jsou zapsány v následující tabulkách (Tabulka 4, Tabulka 5)

Tabulka 4. Obsah PHB pro kultivace na světle

podmínky	čas [h]	C_{biomasa} [g/l]	PHB [%]	PHB [g/l]
mikroaerobní	24	$0,19 \pm 0,14$	–	–
	48	$0,49 \pm 0,06$	–	–
	72	$0,63 \pm 0,11$	$6,80 \pm 1,01$	$0,0429 \pm 0,0113$
aerobní	24	$0,64 \pm 0,21$	1,98	0,0155
	48	$0,82 \pm 0,18$	$1,71 \pm 0,33$	$0,0136 \pm 0,0003$
	72	$0,64 \pm 0,03$	$1,33 \pm 0,15$	$0,0087 \pm 0,0009$

Tabulka 5. Obsah PHB pro kultivace ve tmě

podmínky	čas [h]	C_{biomasa} [g/l]	PHB [%]	PHB [g/l]
mikroaerobní	24	–	–	–
	48	$0,18 \pm 0,01$	–	–
	72	$0,21 \pm 0,00$	$1,04 \pm 0,29$	$0,0022 \pm 0,0006$
aerobní	24	–	–	–
	48	$0,36 \pm 0,07$	–	–
	72	$0,38 \pm 0,07$	$7,87 \pm 0,46$	$0,0297 \pm 0,0034$
anaerobní	24	–	–	–
	48	$0,14 \pm 0,01$	–	–
	72	$0,23 \pm 0,01$	$3,58 \pm 0,07$	$0,0083 \pm 0,0007$

Obsah PHB v buňkách bakterií se pohyboval v rozsahu od 1,04 % do 7,87 % a koncentrace v rozmezí od 0,0022 g/l do 0,0429 g/l. Nejnížší obsah PHB vykazovaly bakterie kultivované ve tmě při mikroaerobních podmínkách.

Při kultivaci na světle za aerobních podmínek se procentuální obsah PHB pohybuje v rozmezí od 1 % do 2 %, avšak z důvodu vysoké koncentrace biomasy je koncentrace PHB po 24 a 48 hodinách kultivace vysoká. Hodnoty koncentrací PHB a hodnoty procentuálního obsahu PHB se s prodlužující dobou kultivace snižují, toto snížení bylo pravděpodobně způsobeno spotřebováním všech živin v médiu. Jak bylo zmíněno v kapitole 4.2.1, po 48 hodinách kultivace vstoupily bakterie do stacionární fáze a po 72 hodinách se bakterie nacházely ve fázi odumírání (Obr. 6, červená křivka). Pravděpodobně někdy mezi 36. a 48. hodinou kultivace došlo ke spotřebování většiny živin v médiu a bakterie začaly pro výrobu energie využívat akumulované zásoby granulí PHB a tím došlo ke snížení obsahu PHB v bakteriích.

Při anaerobní kultivaci ve tmě byl procentuální obsah PHB 3,58 %, ale koncentrace PHB byla z důvodu nízké koncentrace biomasy malá, stejně jako při mikroaerobní kultivaci ve tmě. Anaerobní kultivace za světla nebyla z logistických důvodů provedena, obsah PHB při těchto podmínkách by však měl být nižší než za aerobně-světelných podmínek (viz kapitola 2.6.3.3).

Nejvyšší procentuální obsah a koncentrace PHB byly naměřeny při mikroaerobní kultivaci na světle a při aerobní kultivaci ve tmě. U aerobní kultivace ve tmě je procentuální obsah PHB přibližně o 1 % vyšší než u kultivace mikroaerobní na světle, ale z důvodu nižší koncentrace biomasy u aerobní kultivace je koncentrace PHB u mikroaerobní kultivace vyšší (aerobní kultivace 0,0297 g/l, mikroaerobní kultivace 0,0429 g/l). Při mikroaerobní kultivaci ovšem mohlo dojít ke snížení obsahu PHB díky nedostatku živin, stejně jako u aerobní kultivace na světle. Růstové křivky při kultivaci za těchto podmínek jsou velmi podobné (Obr. 6, červená křivka – aerobní, modrá křivka – mikroaerobní) a využití zásob PHB pro výrobu energie je při mikroaerobní kultivaci na světle tedy pravděpodobné.

Z naměřených dat byly jako nejvýhodnější podmínky kultivace *R. rubrum* pro syntézu PHA vyhodnoceny mikroaerobní-světelné a aerobní-temnotní podmínky. Jako nejméně výhodné podmínky byly určeny mikroaerobní-temnotní podmínky.

Výsledky stanovení obsahu PHA v bakteriích získané plynovou chromatografií koreluje s výsledky, které byly získány pomocí průtokového cytometru, což je patrné při porovnání s Obr. 8 a Obr. 9. Obr. 9, kdy obsah PHB u aerobní kultivaci na světle je 1,33 % a u aerobní kultivace ve tmě je obsah PHB 7,87 %. Tyto výsledky nám podporují hypotézu z naměřeného vyššího signálu fluorescenční sondy BODIPY 439/503 u jednotlivých cytogramů/histogramů (viz Obr. 8 a Obr. 9).

Obsah PHA v biomase byl rovněž stanoven při zkoumání produkce barevných pigmentů (bakteriochlorofyl, karotenoidy) u bakterie (viz níže). Pro syntézu barevných pigmentů byly bakterie kultivovány v tekutém médiu SYN+FAY a na pevném LB Broth médiu. Vypočtené obsahy PHB jsou zapsány v tabulce 6.

Tabulka 6. Obsah PHB pro kultivaci v tekutém a na pevném médiu

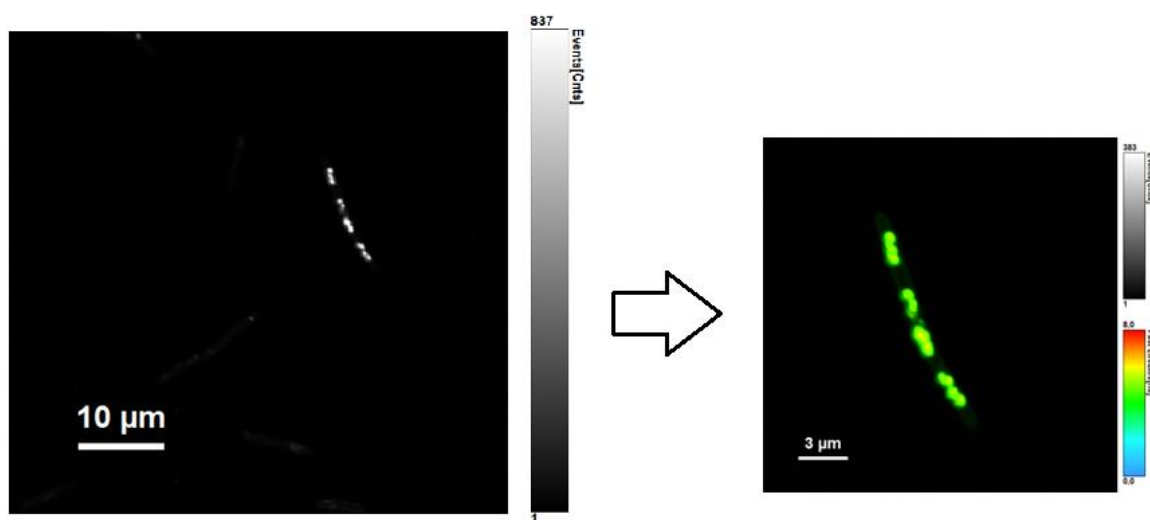
médium	čas [h]	PHB [%]
tekuté	72	nedetekováno
	120	0,23
	168	0,72
pevné	72	nedetekováno
	120	nedetekováno
	168	0,20

Procentuální obsah PHB byl jak u tekutého, tak u pevného média minimální. Při měření vzorků z některých hodin kultivace (72 hodin pro obě média a 120 hodin pro pevné médium) nebyla detekována přítomnost PHB. V intervalech byl obsah PHB příliš malý na detekci nebo bakterie neobsahovaly žádné PHB. Místo syntézy PHB bakterie pravděpodobně syntetizovaly barevné pigmenty, je také možné že část PHB byla využita jako zdroj energie při nedostatku živin v médiu.

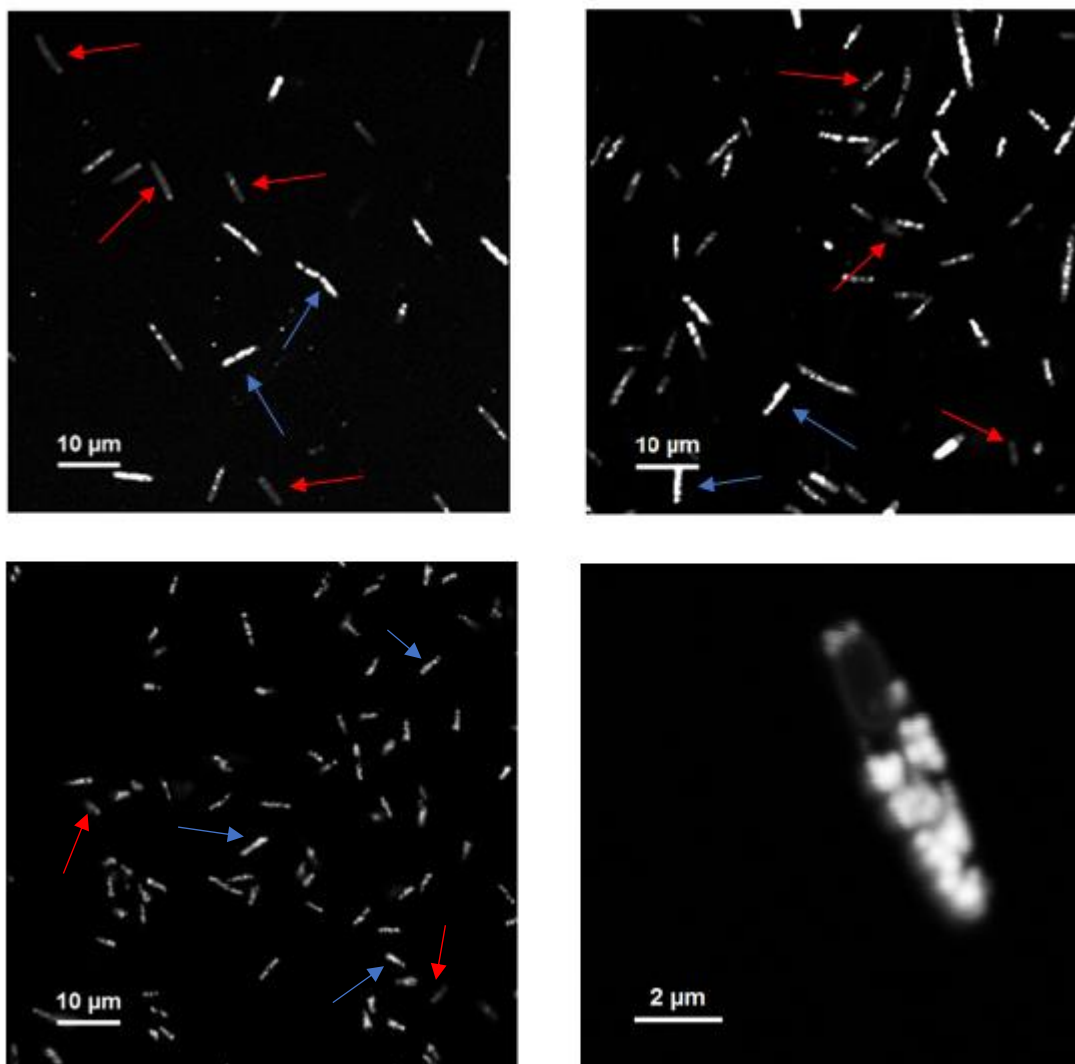
4.2.3 Morfologie bakteriálních buněk

Pro charakterizaci morfologie bakterií *R. rubrum*, které byly kultivovány při různých podmínkách (viz podkapitola 3.2.3) byly bakterie zkoumány pomocí mikroskopických metod, konkrétně fluorescenční a elektronové mikroskopie.

Jak už bylo zmíněno výše, fluorescenční mikroskopie byla vybrána jako jedna z metod pro charakterizaci morfologie bakterií. Pro tuto metodu byla jako fluorescenční sonda použita sonda BODIPY 439/503. Postup přípravy vzorků pro fluorescenční mikroskop byl popsán v kapitole 3.3.7. Jak již bylo zmíněno výše, sonda BODIPY439/503 se inkorporuje do lipofilní části buněk, jako jsou granule s PHA, a vyznačuje se zelenou fluorescencí (Obr. 10)



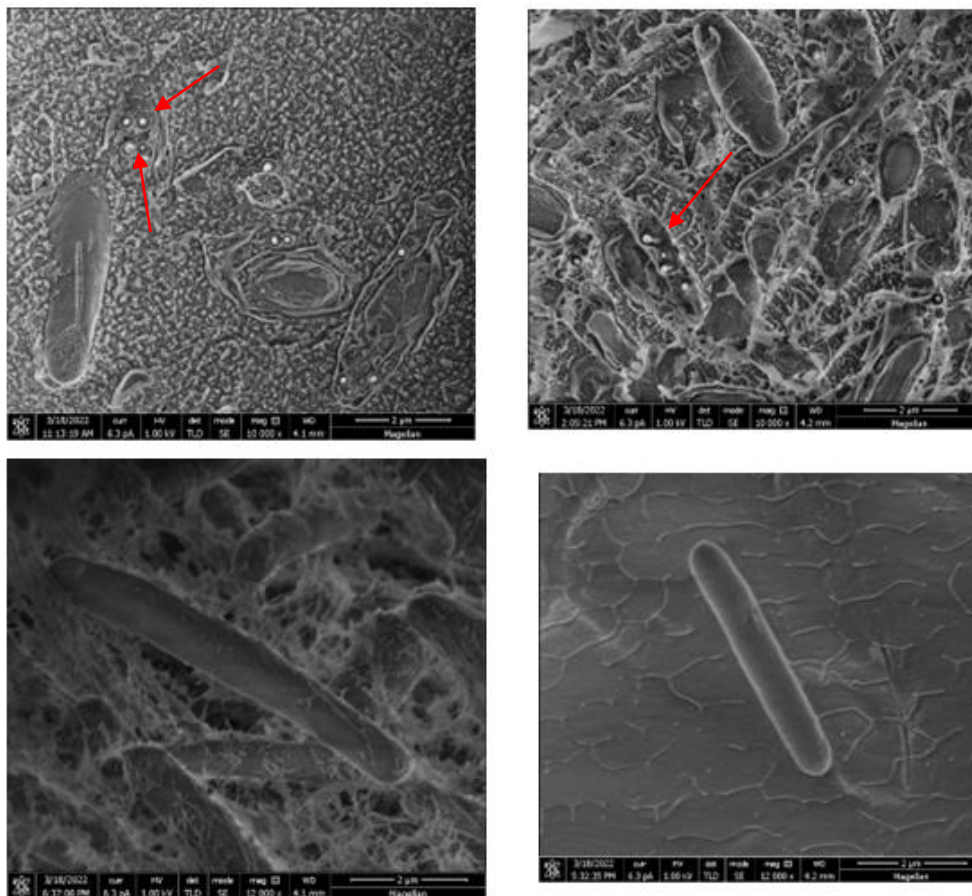
Obr. 10 Snímky z fluorescenčního mikroskopu pro mikroaerobní kultivaci ve tmě



Obr. 11 Snímky z fluorescenčního mikroskopu pro mikroaerobní kultivace ve tmě (vlevo nahoře), aerobní kultivace ve tmě (vpravo nahoře), mikroaerobní kultivace za světla (vlevo dole) a anaerobní kultivace ve tmě (vpravo dole)

Na Obr. 11 lze pozorovat bakterie s výraznou fluorescencí, a tedy s vysokým obsahem PHA granulí (modré šipky) a bakterie, u kterých fluorescence byla nevýrazná (červené šipky). Bakterie s malou fluorescencí obsahují pouze malé množství PHA granulí. Aerobní kultivace ve tmě (vpravo nahoře) oproti mikroaerobní kultivaci za tmy (vlevo nahoře) obsahuje větší počet bakterií s vyšší fluorescencí, a tudíž obsahuje i více PHA což koreluje s výsledky z plynové chromatografie. Při obou kultivacích ve tmě je možné pozorovat rozdíly ve velikosti i obsahu PHA (granule PHA mohou způsobovat vyšší granularitu bakterií), což má za následek vytvoření více populací znázorněných na cytogramu (Obr. 7). Dále je možné pozorovat spíše nepravidelný tvar PHA granulí, které se mohou vyskytovat po celé délce bakteriální tyčinky.

Druhou mikroskopickou metodou byla kryo–skenovací elektronová mikroskopie, která poskytuje zobrazení struktury vzorků v zmrazeném stavu. Při této metodě je možné pozorovat i morfologii PHA granulí.



Obr. 12 Snímky s kryo–skenovací elektronové mikroskopie pro mikroaerobní kultivaci na světle (nahore), aerobní kultivace ve tmě (vlevo dole) a mikroaerobní kultivace ve tmě (vpravo dole)

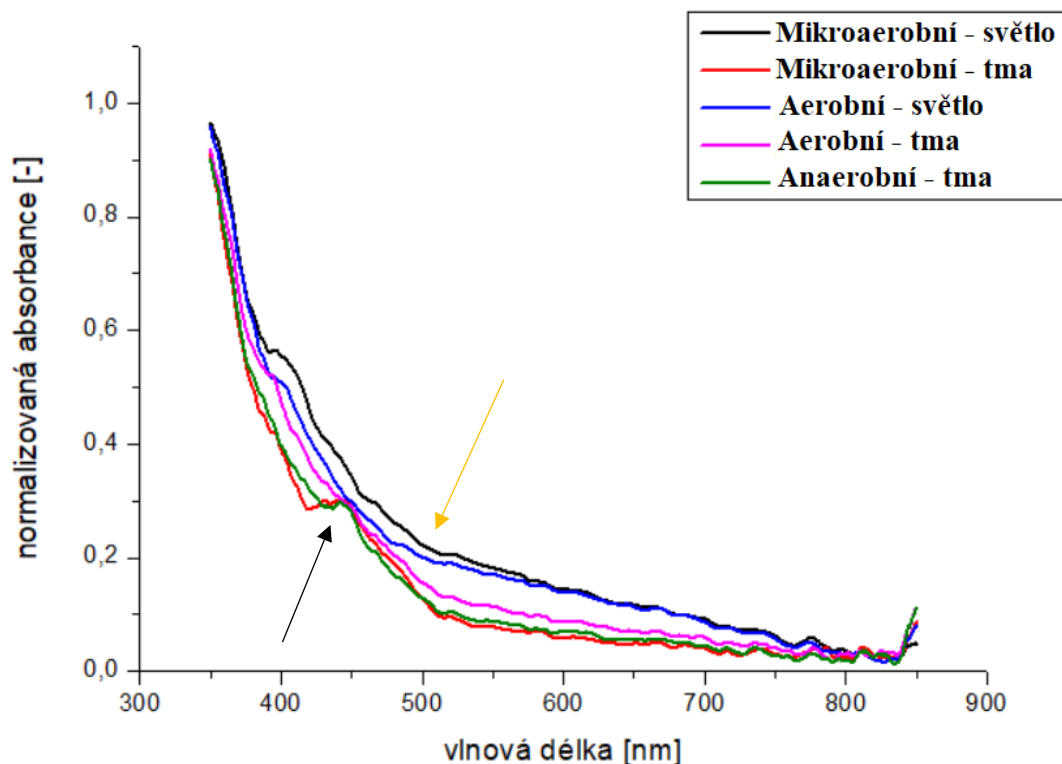
Na Obr. 12 lze vidět granule PHA (červené šipky) u mikroaerobní kultivace na světle, avšak u většiny bakterií nejsou příliš viditelné. U aerobní kultivace ve tmě (vlevo dole) by bakterie měly obsahovat větší množství PHA granulí (Obr. 11), což na snímku není příliš patrné. Na snímcích vespod lze však vidět tvar bakterie, který je tyčinkovitý.

Na základě výstupů naměřených pomocí mikroskopických metod lze konstatovat, že pro samotnou vizualizaci PHA granulí se jako lepší metoda jeví fluorescenční mikroskopie. Tato mikroskopická metoda nám poskytla nástin v rámci nejednotné distribuce obsahu granulí PHA v buňkách kultivovaných za tmy a tím nám potvrdila výskyt více populací v kultuře (viz Obr. 7). Nicméně, technikou kryo–skenovací elektronové mikroskopie lze sledovat samotnou morfologii buněk s vyšší kvalitou, než je tomu u fluorescenční mikroskopie

4.2.4 Produkce barevných pigmentů *Rhodospirillum rubrum* s ohledem na aeraci

Bakterie *R. rubrum* jsou schopny syntézy barevných pigmentů, jako jsou bakteriochlorofyl a karotenoidy, které bakterie poté využívá pro fotosyntézu (viz kapitola 2.6.1.2).

Kultury byly měřeny pomocí spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti (UV-VIS) se zapojením integrační koule (difúzně transmisní mód). Měření v tomto módu minimalizuje vliv rozptylu světla a zvyšuje tím citlivost fotometrického stanovení částí buněk, které absorbují záření v analyzované oblasti.



Obr. 13 Absorpční spektrum po 72 hodinách kultivace se zapojením integrační koule

Na Obr. 13 je znázorněno absorpční spektrum pro všechny podmínky kultivace. U všech podmínek byl zaznamenán nárůst absorbance při vlnové délce přibližně 490 nm (žlutá šipka). Charakteristické vlnové délky pro karotenoidy se pohybují v této oblasti, lze tedy předpokládat že u bakterií došlo k syntéze karotenoidů při všech stupních aerace, a to jak na světle, tak v menší míře i ve tmě.

U anaerobní a mikroaerobní kultivace ve tmě došlo k vytvoření píku v oblasti vlnové délky 445 nm (černá šipka), tato vlnová délka je velmi blízká charakteristické vlnové délce bakteriochlorofylu (440 nm), můžeme tedy předpokládat přítomnost bakteriochlorofylu v bakteriích.

Koncentrace barevných pigmentů však nebyla vysoká, jelikož nebyla zaznamenána barevná změna produkčních médií (Obr. 14, Obr. 15). Rozdíly ve zbarvení mezi kultivacemi na světle a ve tmě byly zanedbatelné.



Obr. 14 Fotky produkčních médií pro mikroaerobní (vlevo) a aerobní (vpravo) kultivace na světle po 72 hodinách



Obr. 15 Fotky produkčních médií pro mikroaerobní (vlevo), anaerobní (vprostřed) a aerobní (vpravo) kultivace ve tmě po 72 hodinách

Bakterie však dokáže syntetizovat barevné pigmenty ve větším množství, kdy dojde i k pozorovatelnému zabarvení, a to za mikroaerobních až anaerobních podmínek za světla. Jelikož při námi provedených kultivacích nedošlo k výraznému zbarvení byla schopnost syntézy barevných pigmentů podrobněji zkoumána v další části práce.

4.3 Syntéza barevných pigmentů u bakterie *Rhodospirillum rubrum*

Bakterie *R. rubrum* jsou schopny růst fototrofně, syntetizují komplex LH1, který se skládá se dvou molekul bakteriochlorofylu *a* (Bchl) a jedné molekuly karotenoidu (viz. Kapitola 2.6.1.2). Postup přípravy médií byl popsán v kapitole 3.2.3.

Barevné pigmenty byly extrahovány pomocí extrakčního protokolu (Zavřel et al, 2015 [47]) z obou typů médií (dále extrakty). U média SYN+FAY byla změřena optická hustota, měření průtokovou cytometrií bylo provedeno u obou typů médií, Výsledky měření jsou zapsány v následující tabulce.

Tabulka 7. Hodnoty OD a CFU pro pevné a tekuté médium

médium	čas [h]	OD ₆₆₀	Počet buněk [10 ⁸ /ml]
tekuté (SYN + FAY)	72	0,43 ± 0,01	0,65 ± 0,10
	120	0,93 ± 0,01	1,75 ± 0,11
	168	0,86 ± 0,10	3,09 ± 0,05
pevné (LB)	72	–	8,81 ± 0,15
	120	–	11,02 ± 0,12
	168	–	17,54 ± 0,08

Pro výpočet koncentrace barevných pigmentů byla změřena absorbance extraktů při vlnových délkách 470, 665 a 720 nm. Koncentrace pigmentů byla vypočtena pomocí následujících vzorců:

$$\text{Chl}_a [\mu\text{g/ml}] = 12,9447 \cdot (A_{665} - A_{720}) [47] \quad (1)$$

$$\text{Karotenoidy} [\mu\text{g/ml}] = \frac{[1,000 \cdot (A_{470} - A_{720}) - 2,86 \cdot (\text{Chl}_a [\mu\text{g/ml}])]}{221} [47] \quad (2)$$

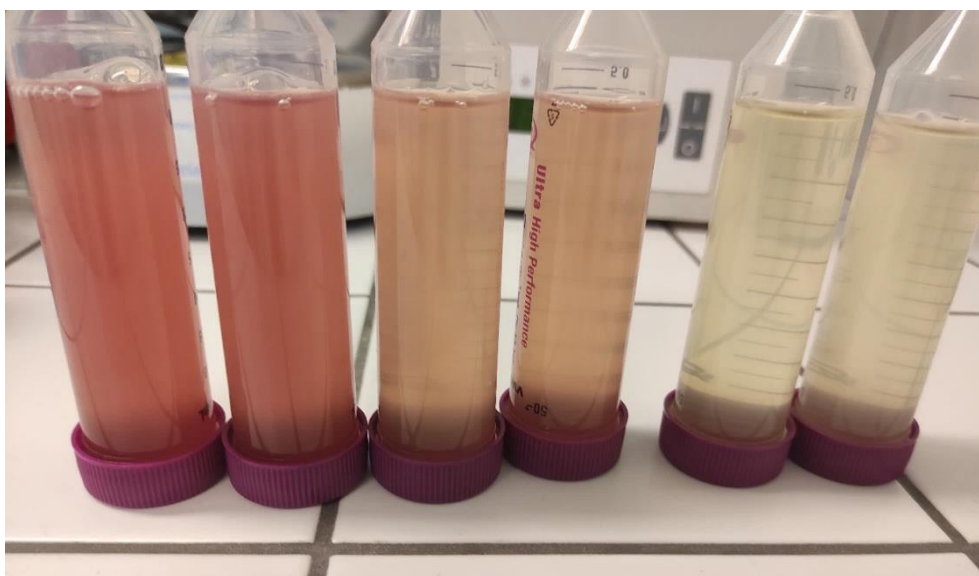
Vypočtené koncentrace jsou zapsány v následující tabulce.

Tabulka 8. Koncentrace karotenoidů a bakteriochlorofylu a v médiích

médium	čas [h]	$C_{\text{bakteriochlorofyl a}} [\mu\text{g/ml}]$	$C_{\text{karotenoidy}} [\mu\text{g/ml}]$
tekuté (SYN + FAY)	72	$(1,94 \pm 0,15) \cdot 10^{-2}$	$(4,05 \pm 0,15) \cdot 10^{-4}$
	120	$(5,18 \pm 0,18) \cdot 10^{-2}$	$(10,72 \pm 0,15) \cdot 10^{-4}$
	168	$(11,02 \pm 0,11) \cdot 10^{-2}$	$(20,41 \pm 0,15) \cdot 10^{-4}$
pevné (LB)	72	$(6,47 \pm 0,12) \cdot 10^{-2}$	$(1,56 \pm 0,15) \cdot 10^{-4}$
	120	$(1,94 \pm 0,13) \cdot 10^{-2}$	$(1,15 \pm 0,15) \cdot 10^{-4}$
	168	$(14,94 \pm 0,09) \cdot 10^{-2}$	$(2,39 \pm 0,15) \cdot 10^{-4}$

U média SYN+FAY (tekuté médium) byla koncentrace barevných pigmentů (Bchl a karotenoidy) nejvyšší po 168 hodinách kultivace, u obou barevných pigmentů došlo ke zdvojnásobení koncentrace oproti koncentraci po 120 hodinám. Lze tedy usuzovat, že bakterie začíná syntetizovat barevné pigmenty až po delší době. Při kultivaci v médiu SYN+FAY (tekuté médium) syntetizovaly bakterie více karotenoidů než Bchl, zatímco u média LB (pevné médium) bakterie syntetizovaly více Bchl.

Při kultivaci v médiu SYN+FAY došlo ke zbarvení média do červena, na rozdíl od kultivací pro syntézu PHA (kapitola 4.2.4). Intenzita zbarvení odpovídá vypočteným hodnotám koncentrací karotenoidů a změřeným absorpčním spektrům. Nejintenzivnější zbarvení měla kultura po 168 hodinách (Obr. 16, vlevo), nejméně zbarvená byla kultura po 72 hodinách (Obr. 16, vpravo).

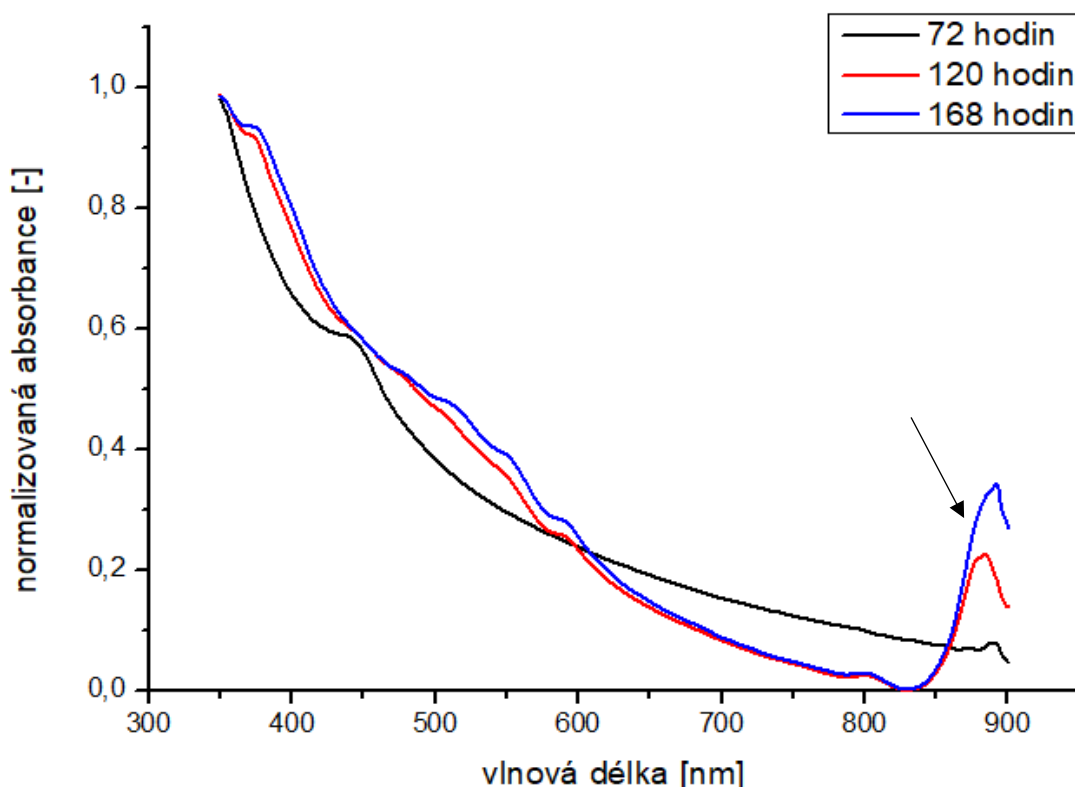


Obr. 16 Fotka tekutých médií při ukončení kultivace, zleva 168 hodin, 120 hodin, 72 hodin

Ve studii Fiedor et al, 2004 byl charakterizován komplex LH1 u bakterie *R. rubrum* metodou UV spektroskopie, poměrně dostupné techniky, z těchto důvodů jsme pro charakterizaci barevných pigmentů zvolili právě tuto metodu [48]. Absorpční spektra, jak pro vzorky suspenzí bakterií, tak pro extrakty byla zkoumána pomocí spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti (UV-VIS) a to za použití transmisního (turbidimetrie) a difúzně transmisního módu (zapojení integrační koule). Při transmisním módu je měřena intenzita světla procházející vzorkem pouze ve směru šíření původního paprsku světla. Zatímco při měření UV-VIS se zapojením integrační koule dojde k minimalizaci vlivu rozptylu světla, tím se zvýší citlivost fotometrického stanovení částí buněk, které absorbují záření v analyzované oblasti, pro nás hlavně barevné pigmenty.

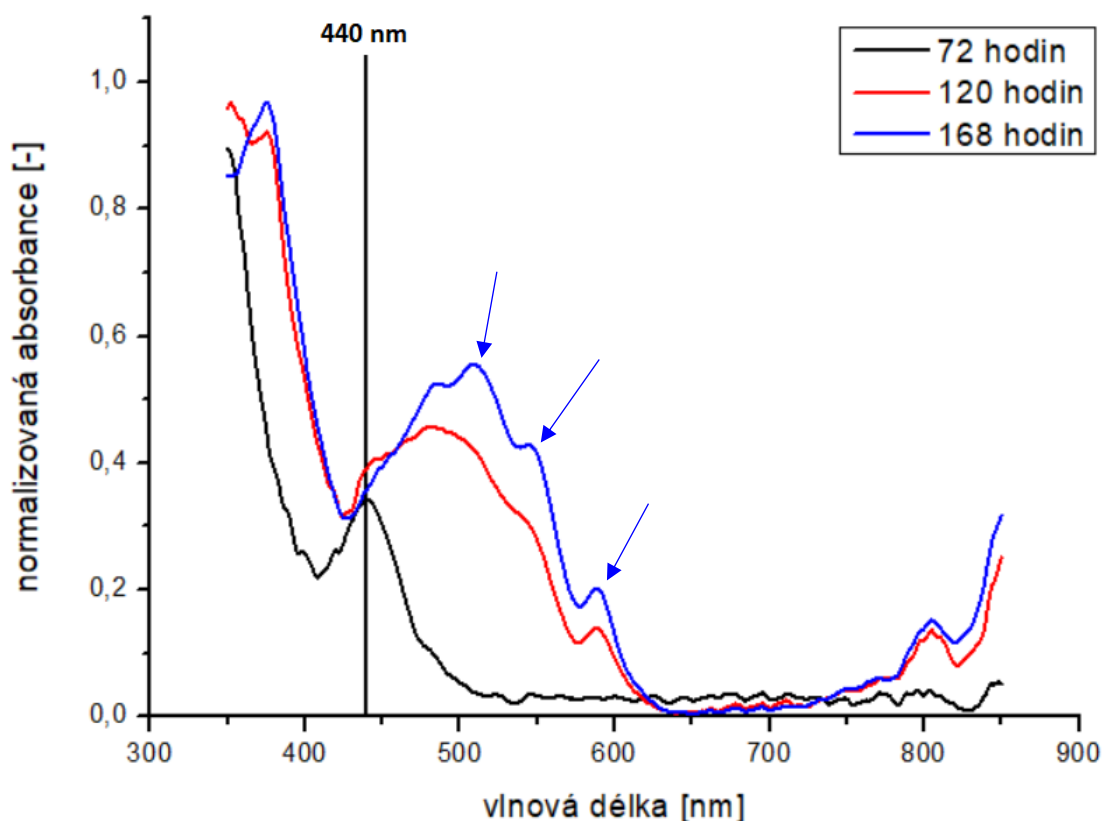
Pro měření suspenze bakterií byly využity oba módy, transmisní i difúzně transmisní. Transmisní mód je nejběžněji používaný pro měření barevných pigmentů, při použití tohoto módu se však měří, jak rozptýl světla, tak absorbance.

Při měření v transmisním módu (Obr. 17) suspenze bakterií, které byly kultivovány v tekutém médiu, neobsahovaly jasně viditelný trojpík, u 120 a 168 hodin byl pouze lehce naznačen, avšak došlo k vytvoření píku v oblasti infračerveného záření, přibližně při 880 nm (černá šipka). Suspenze bakterií, které byly kultivovány na pevném médiu, v rozsahu 400-600 nm nevykazovaly žádnou výraznou absorbanci, jedinou výjimkou je pík při 880 nm u křivky pro 120 hodin, tento pík je pravděpodobně způsoben přítomností bakteriochlorofyl Q_{L} , jehož charakteristická vlnová délka je přibližně 880 nm (absorpční spektra pro vzorky bakterií z pevného média jsou umístěna v Příloze).



Obr. 17 Absorpční spektrum pro tekuté médium při použití transmisního módu

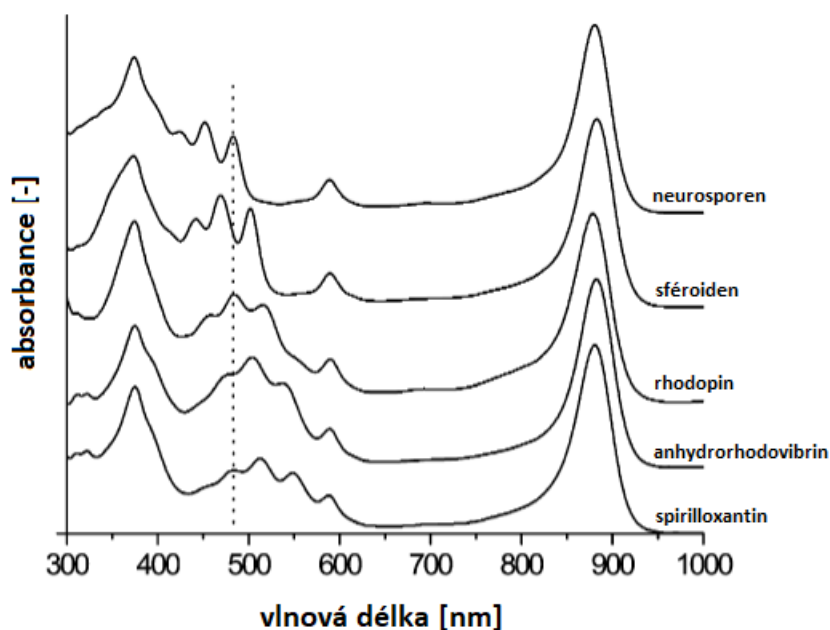
Absorpční spektrum pro tekuté médium při zapojení integrační koule (difúzně transmisní mód) je znázorněno na obrázku Obr. 18.



Obr. 18. Absorpční spektrum pro tekuté médium při použití difúzně transmisního módu

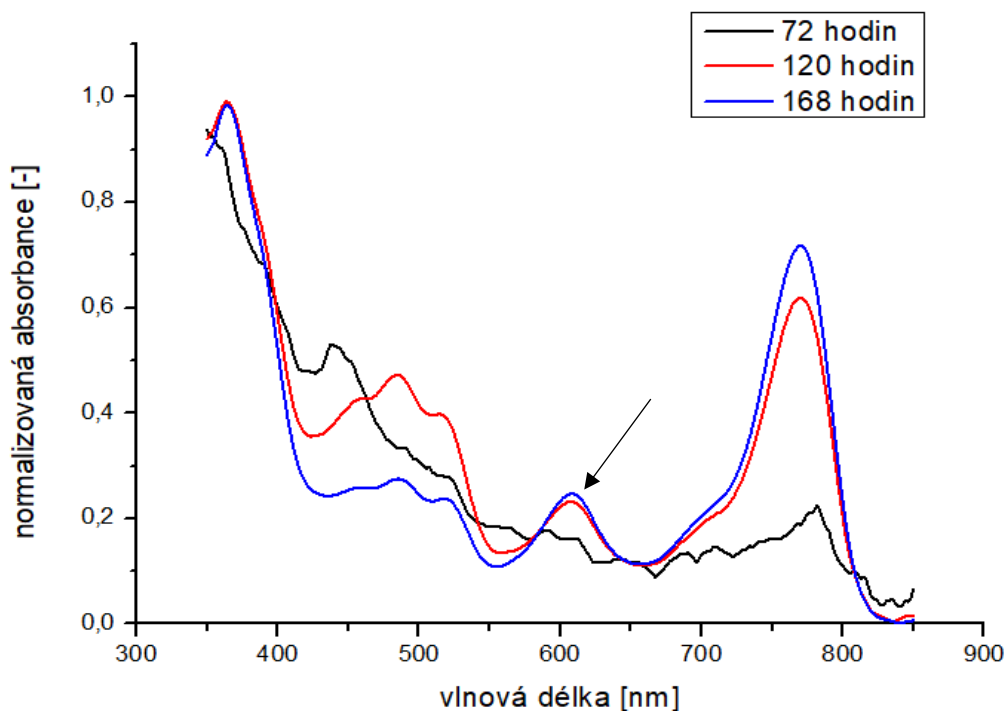
Křivka absorpčního spektra pro 72 hodin (černá křivka) obsahuje pík při vlnové délce 440 nm, což je charakteristická vlnová délka bakteriochlorofylu *a*. U černé křivky došlo v oblasti vlnové délky 490 nm ke zvýšení absorpce, které bylo způsobeno přítomností karotenoidů.

Absorpční křivky pro 120 a 168 hodin jsou si podobné, ale křivka pro 168 hodin (modrá křivka) má lépe viditelnou trojici píků v oblasti vlnové délky 500–600 nm (znázorněny modrými šipkami). Tento trojpík značí přítomnost bakteriochlorofylu, bakterie po 168 hodinách obsahovaly více barevných pigmentů a píky jsou proto ostřejší než u 120 hodin. Bakterie *R. rubrum* syntetizuje LH1 komplex se spirilloxantinem (viz kapitola 2.6.1.2). Při porovnání námi změřené absorpční křivky po 168 hodinách kultivace s absorpčními křivkami LH1 komplexů s různými karotenoidy (Obr. 19) byla nalezena shoda pro LH1 komplex s anhydrorhodovibrinem a se spirilloxantinem. Absorpční spektrum změřené v difúzně transmisním módu nám koreluje s vypočtenými koncentracemi barevných pigmentů (Tabulka 8). Nejvyšší koncentrace pigmentů měli bakterie po 168 hodinách kultivace, což odpovídá naměřené absorpční křivce.



Obr. 19 Absorpční spektra komplexů LHI s různými karotenoidy. Převzato z [48]

Pro změření absorpčních spekter extraktů, získaných z bakterií kultivovaných v tekutém médiu, byl použit transmisní mód. Absorpční spektrum pro extrakty z tekutého média je zobrazeno na Obr. 20. Absorpční křivka pro 168 hodin (modrá křivka) je velmi podobná s absorpční křivkou se spirilloxanthin na Obr. 19, avšak píky v námi změřeném spektru jsou méně ostré. Křivka pro 120 hodin (červená křivka) je více shodná s křivkou s anhydorhodovibrinem. Obě křivky obsahují pík v oblasti infračerveného záření (770 nm), způsobený přítomností bakteriochlorofylu. V obou křivkách se rovněž nachází pík při 605 nm (černá šipka), pravděpodobně se jedná o bakteriochlorofyl Q_x, jehož charakteristická vlnová délka je přibližně 590 nm.

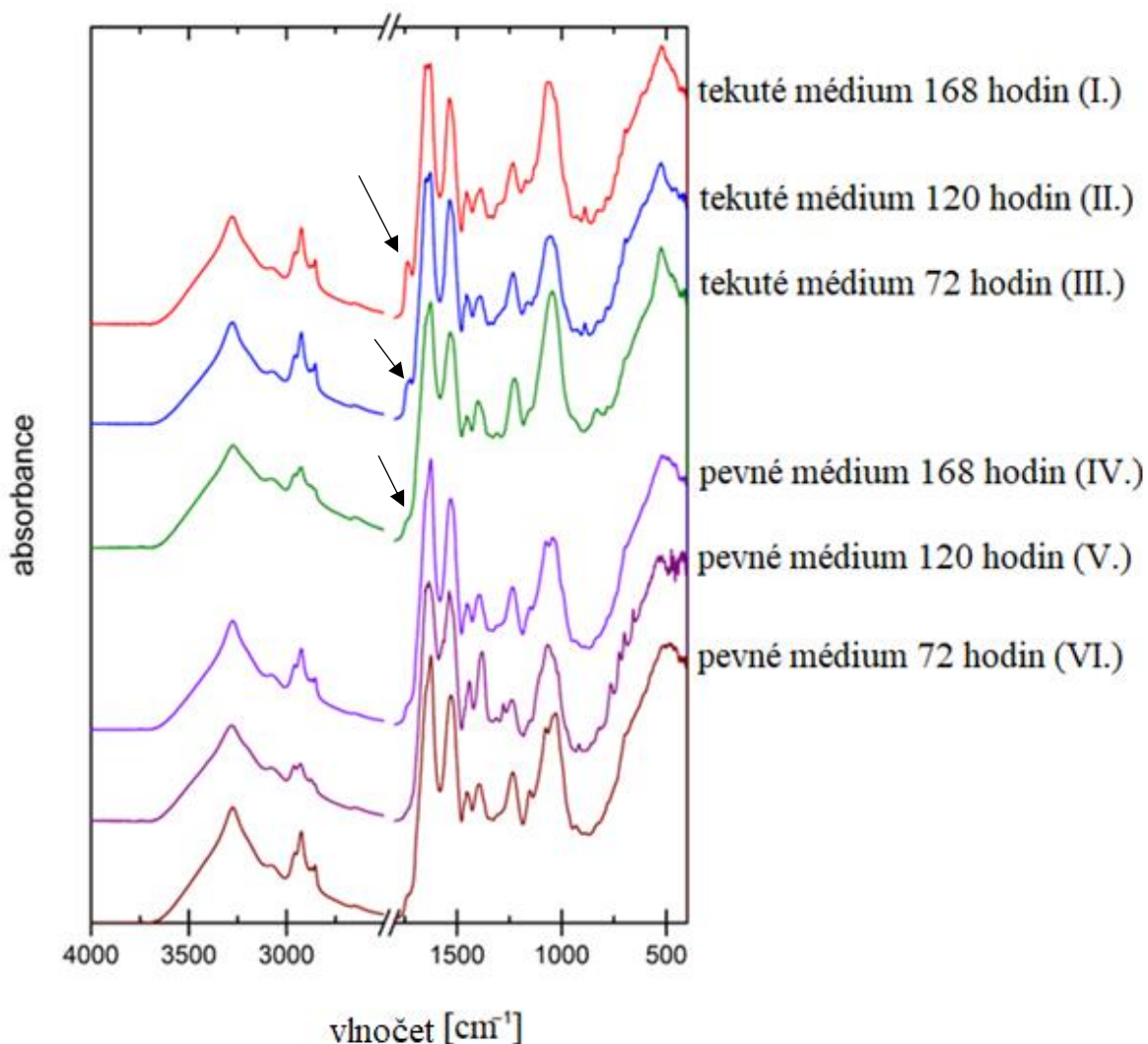


Obr. 20 Absorpční spektrum pro extrakty získané při kultivaci v tekutém médiu při použití transmisního módu

Pro měření absorpčních spekter barevných pigmentů se použité metody vybírají s ohledem na vzorek, který máme k dispozici. V případě bakteriálních suspenzí je vhodnou metodou UV-VIS měření v difúzně transmisním módu. Absorpční spektrum změřené v tomto módu obsahuje dobře viditelné charakteristické píky, na rozdíl od transmisního módu, kde jsou píky viditelné minimálně. Pro extrakty je lepší použít UV-VIS měření v transmisním módu píky jsou dobře viditelné i v infračervené oblasti. Samotná extrakce je však náročný proces, při kterém může dojít k degradaci barevných pigmentů, a tedy ke ztrátě vzorku. S ohledem na časovou náročnost a možnost zničení vzorku při procesu extrakce se jako nejvhodnější metoda pro charakterizaci barevných pigmentů jeví UV-VIS při použití difúzně transmisního módu pro vzorky suspenze bakterií.

Jako doplňková metoda pro charakterizaci barevných pigmentů byla použita infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) a Ramanova spektroskopie.

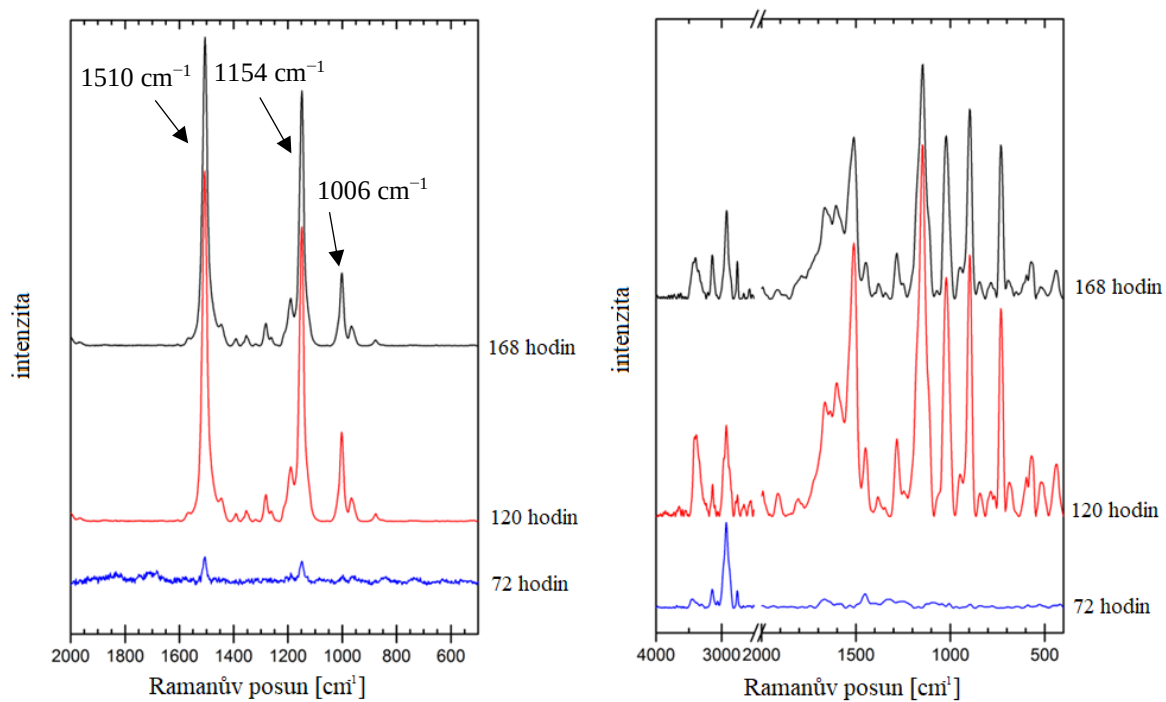
Metodou FTIR byly analyzovány vzorky vysušené biomasy (postup přípravy 3.3.1). Ze spektra získaného pomocí FTIR metody (Obr. 21) lze vyčíst absorpční pás 3300 cm^{-1} odpovídající amidům (N-H), 3000 cm^{-1} (O-H), 1720 cm^{-1} (C-O-C, esterové vazby), 1640 cm^{-1} (C=O) a 1540 cm^{-1} (N-H) jsou specifické vlnočty pro amidy. Dále lze na spektru vidět výrazný pík při 1000 cm^{-1} (C-O) odpovídající nejspíše polysacharidům [49]. Na základě výsledků získaných pomocí plynové chromatografie lze usoudit, že malé píky v oblasti 1720 cm^{-1} by mohly odpovídat PHB nežli lipidům, jelikož vidíme korelaci mezi obsahy PHB a tímto specifickým píkem. Jinými slovy, vzorky s menším obsahem PHB vykazovaly menší nárůst píku, nejlépe jde tato korelace vidět u tekutého média. U spektra pro 168 hodin je pík při 1720 cm^{-1} (Obr. , černá šipka) dobře viditelný, na rozdíl od spekter pro 120 hodin (pík je lehce viditelný) a 72 hodin (pík téměř chybí). Při stanovení obsahu PHB pomocí plynové chromatografie obsahovali nejvíce PHB bakterie po 168 hodinách kultivace (0,72 %), u bakterií kultivovaných po dobu 72 hodin nebylo detekováno žádné PHB, což vysvětluje absenci píku při 1720 cm^{-1} . Charakteristické píky pro karotenoidy nejsou z důvodu překrývání z píky jiných metabolitů (proteiny, PHB, lipidy atd.) dobře viditelné, metoda FTIR není tedy vhodná pro podrobnější zkoumání barevných pigmentů obsažených v biomase.



Obr. 21 Spektrum závislosti absorbance na vlnové délce získané metodou FTIR pro tekuté a pevné médium

Dále byly vzorky z tekutého média změřeny pomocí Ramanovy spektroskopie při excitační vlnové délce 532 nm. Na výsledném spektru (Obr. 22, vlevo), lze vidět 3 ostré píky, a to při vlnových délkách 1006, 1154, a 1510 cm^{-1} . Tyto píky jsou charakteristické pro karotenoidy s trans konfigurací konjugovaného C=C řetězce [50]. Hodnoty intenzity nám korelují s hodnotami koncentrací karotenoidů (Tabulka 8). Bakterie kultivované po dobu 168 hodin obsahovaly nejvíce karotenoidů ($20,41 \cdot 10^{-4} \mu\text{g/ml}$) a intenzita je tak u 168 hodin nejvyšší. Zatímco po 72 hodinách kultivace obsahovaly bakterie malé množství karotenoidů ($4,05 \cdot 10^{-4} \mu\text{g/ml}$), píky jsou tak minimální a u vlnové délky 1006 cm^{-1} téměř chybí.

Jako další metoda byl využit FT-Ramanský modul k spektrometru při excitační vlnové délce 1064 nm. Při použití vyšší excitační délky se sníží energie, na výsledném spektru (Obr. 22, vpravo) je tak možné vidět píky dalších metabolitů které biomasa obsahovala (proteiny, polysacharidy atd.). Píky další metabolitů stejně jako u metody FTIR, překrývají píky pro karotenoidy.



Obr. 22 Spektrum závislosti intenzity na vlnové délce získané pomocí Ramanovy spektroskopie při exc. 532 nm (vlevo) a při využití FT-Ramanského modulu k spektrometru exc. 1064 nm (vpravo) pro tekuté médium

5 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo stanovení nejvhodnějších podmínek kultivace pro syntézu granulí PHA u bakterie *Rhodospirillum rubrum*.

Pro sledování produkce PHA se podmínky kultivace od sebe lišily stupněm aerace, bakterie byly kultivovány v aerobních, mikroaerobních a anaerobních podmínkách. Dalším faktorem byla přítomnost světelného zdroje, kultivace probíhaly za světla nebo za tmy. Rozdílné podmínky měly vliv na růst bakterií a množství produkovaného PHA. Všechny kultivace probíhaly v médiu SYN+FAY. Obsah PHA byl sledován pomocí plynové chromatografie, přičemž nejvyšší procentuální obsah PHB byl získán při aerobní kultivaci ve tmě, zatímco nejvyšší koncentrace byla získána při kultivaci na světle za mikroaerobních podmínek.

Pro podrobnější charakterizaci růstu bakterií a obsahu PHA byly vybrány další metody, jejichž výsledky byly porovnány s plynovou chromatografií jako referenční technikou. Celkem byly použity čtyři metody – průtoková cytometrie, UV-VIS spektrometrie, fluorescenční mikroskopie a kryo–skenovací elektronová mikroskopie.

Kromě stanovení nejvhodnějších podmínek kultivace bakterie *R. rubrum* pro syntézu PHA, jako nejvhodnější byly stanoveny podmínky aerobně-temnotní (koncentrace PHB 0,0297 g/l) a mikroaerobně-světelné (koncentrace PHB 0,0429 g/l), byla u bakterií také zkoumána produkce barevných pigmentů, především bakteriochlorofylu a karotenoidů. Byly použity dva typy médií, tekuté médium SYN+FAY a pevné médium LB Broth. Absorbance extraktů byla změřena při předem definovaných vlnových délkách pomocí UV-VIS, koncentrace pigmentů byly poté vypočtena z této absorbance. Při kultivaci v tekutém médiu byla vyšší koncentrace karotenoidů než bakteriochlorofylu. U kultivace na pevném médiu tomu bylo naopak, koncentrace bakteriochlorofylu byla větší než karotenoidů.

Pro podrobnější charakterizaci barevných pigmentů byly vybrány doplňkové metody, UV-VIS v transmisním a difúzně transmisním módu, infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) a Ramanova spektroskopie. Ze všech metod byla nejefektivnější UV-VIS při použití difúzně transmisního módu, při které nemusí dojít k úpravě vzorků a další metabolity neovlivňují výsledky měření.

V bakalářské práci byly stanoveny vhodné podmínky pro kultivaci *R. rubrum* za účelem syntézy granulí PHA, čehož může být využito pro další výzkum bakterie *R. rubrum* nebo v rámci navazující diplomové práce. Mezi nejvhodnější podmínky patřily aerobní kultivace za tmy, s nejvyšším procentuálním obsahem PHB, a mikroaerobní kultivace za světla, s nejvyšší koncentrací PHB.

6 Literatura

- [1] DE DONNO NOVELLI, Laura, Sarah MORENO SAYAVEDRA a Eldon RENE. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production via resource recovery from industrial waste streams: A review of techniques and perspectives. *Bioresource Technology* [online]. 2021, **331** [cit. 2021-11-29]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2021.124985
- [2] SABAPATHY, Poorna, Sabarinathan DEVARAJ, Katharina MEIXNER, Parthiban ANBURAJAN, Preethi KATHIRVEL, Yuvaraj RAVIKUMAR, Hossain ZABED a Xianghui QI. Recent developments in Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production – A review. *Bioresource Technology* [online]. 2020, **306** [cit. 2021-11-29]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2020.123132
- [3] GUO, Wenbin, Jian TAO, Chao YANG et al. Introduction of Environmentally Degradable Parameters to Evaluate the Biodegradability of Biodegradable Polymers. *PLoS ONE* [online]. 2012, **7**(5) [cit. 2022-02-20]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0038341
- [4] PIETRINI, Matteo, Lex ROES, Martin PATEL a Emo CHIELLINI. Comparative Life Cycle Studies on Poly(3-hydroxybutyrate)-Based Composites as Potential Replacement for Conventional Petrochemical Plastics. *Biomacromolecules* [online]. 2007, **8**(7), 2210-2218 [cit. 2022-02-20]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm0700892
- [5] MONTIEL-CORONA, Virginia a Germán BUITRÓN. Polyhydroxyalkanoates from organic waste streams using purple non-sulfur bacteria. *Bioresource Technology* [online]. 2021, **323** [cit. 2021-11-29]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2020.124610
- [6] SHARMA, Vibhuti, Rutika SEHGAL a Reena GUPTA. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Properties and Modifications. *Polymer* [online]. 2021, **212** [cit. 2021-11-29]. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2020.123161
- [7] AKARAONYE, Everest, Tajalli KESHAVARZ a Ipsita ROY. *Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice* [online]. 2010, **85**(6), 732-743 [cit. 2021-11-29]. ISSN 02682575. Dostupné z: doi:10.1002/jctb.2392
- [8] SHAHID, Salma, Sadia RAZZAQ, Robina FAROOQ a Zill-i-Huma NAZLI. Polyhydroxyalkanoates: Next generation natural biomolecules and a solution for the world's future economy. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2021, **166**, 297-321 [cit. 2021-11-29]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.10.187
- [9] KUMAR, Vasant, Rutika SEHGAL a Reena GUPTA. Blends and composites of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and their applications. *European Polymer Journal* [online]. 2021, **161** [cit. 2022-02-20]. ISSN 00143057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2021.110824
- [10] CASTILHO, Leda, David MITCHELL a Denise FREIRE. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. *Bioresource Technology* [online]. 2009, **100**(23), 5996-6009 [cit. 2021-11-29]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2009.03.088
- [11] VERLINDEN, R.A.J., D.J. HILL, M.A. KENWARD, C.D. WILLIAMS a I. RADECKA. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*

- [online]. 2007, **102**(6), 1437-1449 [cit. 2021-11-29]. ISSN 1364-5072. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x
- [12] ADELEYE, Aderemi, Chuks ODOH, Obieze ENUDI, Oluwakemi BANJOKO, Osigbeminiyi OSIBOYE, Emmanuel TOLUWALOPE ODEDIRAN a Hitler LOUIS. Sustainable synthesis and applications of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from biomass. *Process Biochemistry* [online]. 2020, **96**, 174-193 [cit. 2021-11-29]. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2020.05.032
- [13] LOAN, Tran Thi, Dao Thi Quynh TRANG, Pham Quang HUY, Pham Xuan NINH a Doan VAN THUOC. A fermentation process for the production of poly(3-hydroxybutyrate) using waste cooking oil or waste fish oil as inexpensive carbon substrate. *Biotechnology Reports* [online]. 2022, **33** [cit. 2022-05-16]. ISSN 2215017X. Dostupné z: doi:10.1016/j.btre.2022.e00700
- [14] CHA, Daeyeun, Hyo Seok HA a Sung Kuk LEE. Metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for the production of various types of short-chain-length polyhydroxyalkanoates from levulinic acid. *Bioresource Technology* [online]. 2020, **309** [cit. 2022-05-16]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2020.123332
- [15] ZINN, M. a R. HANY. Tailored Material Properties of Polyhydroxyalkanoates through Biosynthesis and Chemical Modification. *Advanced Engineering Materials* [online]. 2005, **7**(5), 408-411 [cit. 2021-11-29]. ISSN 1438-1656. Dostupné z: doi:10.1002/adem.200500053
- [16] ANDREEßEN, Christina a Alexander STEINBÜCHEL. Recent developments in non-biodegradable biopolymers: Precursors, production processes, and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2019, **103**(1), 143-157 [cit. 2022-02-20]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-018-9483-6
- [17] OBULISAMY, Parthiba a Sanjeet MEHARIYA. Polyhydroxyalkanoates from extremophiles: A review. *Bioresource Technology* [online]. 2021, **325** [cit. 2021-11-29]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2020.124653
- [18] LARCHER, Walter. *Physiological Plant Ecology: Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups*. 4th ed. Germany: Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. KG, 2003. ISBN 3-540-43516-6.
- [19] LIU, Changli, Dennis BAFFOE, Yuanlong ZHAN, Mengying ZHANG, Yahui LI a Guocai ZHANG. Halophile, an essential platform for bioproduction. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2019, **166** [cit. 2021-11-29]. ISSN 01677012. Dostupné z: doi:10.1016/j.mimet.2019.105704
- [20] YIN, Jin, Jin-Chun CHEN, Qiong WU a Guo-Qiang CHEN. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Biotechnology Advances* [online]. 2015, **33**(7), 1433-1442 [cit. 2021-11-29]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2014.10.008
- [21] YUE, Haitao, Chen LING, Tao YANG et al. A seawater-based open and continuous process for polyhydroxyalkanoates production by recombinant *Halomonas campaniensis* LS21 grown in mixed substrates. *Biotechnology for Biofuels* [online]. 2014, **7**(1) [cit. 2022-02-20]. ISSN 1754-6834. Dostupné z: doi:10.1186/1754-6834-7-108
- [22] QUILLAGUAMÁN, Jorge, Héctor GUZMÁN, Doan VAN-THUOC a Rajni HATTI-KAUL. Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future

- prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2010, **85**(6), 1687-1696 [cit. 2022-02-20]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-009-2397-6
- [23] KUMAR, Vijay, Sanjay KUMAR a Dharam SINGH. Microbial polyhydroxyalkanoates from extreme niches: Bioprospection status, opportunities and challenges. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, **147**, 1255-1267 [cit. 2021-11-29]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.09.253
- [24] URBIETA, M., Edgardo DONATI, Kok-Gan CHAN, Saleha SHAHAR, Lee SIN a Kian GOH. Thermophiles in the genomic era: Biodiversity, science, and applications. *Biotechnology Advances* [online]. 2015, **33**(6), 633-647 [cit. 2022-03-07]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2015.04.007
- [25] GAO, Xue, Jin-Chun CHEN, Qiong WU a Guo-Qiang CHEN. Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2011, **22**(6), 768-774 [cit. 2021-11-29]. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2011.06.005
- [26] JAIME-PÉREZ, Noelia, David KAFTAN, David BÍNA, Syed BOKHARI, Sowmya SHREEDHAR a Hendrik KÜPPER. Mechanisms of sublethal copper toxicity damage to the photosynthetic apparatus of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* [online]. 2019, **1860**(8), 640-650 [cit. 2021-11-29]. ISSN 00052728. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbabi.2019.06.004
- [27] MADIGAN, Michael a Deborah JUNG. An Overview of Purple Bacteria: Systematics, Physiology, and Habitats. *The Purple Phototrophic Bacteria* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009, 1-15 [cit. 2021-11-29]. Advances in Photosynthesis and Respiration. ISBN 978-1-4020-8814-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4020-8815-5_1
- [28] URAGAMI, Chiasa, Hiroki SATO, Nao YUKIHIRA, Masazumi FUJIWARA, Daisuke KOSUMI, Alastair GARDINER, Richard COGDELL a Hideki HASHIMOTO. Photoprotective mechanisms in the core LH1 antenna pigment-protein complex from the purple photosynthetic bacterium, *Rhodospirillum rubrum*. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* [online]. 2020, **400** [cit. 2022-04-10]. ISSN 10106030. Dostupné z: doi:10.1016/j.jphotochem.2020.112628
- [29] DAVIS, Christine, Peggy BUSTAMANTE a Paul LOACH. Reconstitution of the Bacterial Core Light-harvesting Complexes of *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodospirillum rubrum* with Isolated α - and β -Polypeptides, Bacteriochlorophyll a, and Carotenoid. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1995, **270**(11), 5793-5804 [cit. 2022-04-10]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.270.11.5793
- [30] AUTENRIETH, Caroline, Robin GHOSH a Paul LOACH. Random mutagenesis and overexpression of rhodopin-3,4-desaturase allows the production of highly conjugated carotenoids in *Rhodospirillum rubrum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 2015, **572**(11), 134-141 [cit. 2022-04-10]. ISSN 00039861. Dostupné z: doi:10.1016/j.abb.2015.01.023
- [31] MONROY, Isaac a Germán BUITRÓN. Production of polyhydroxybutyrate by pure and mixed cultures of purple non-sulfur bacteria: A review. *Journal of Biotechnology* [online]. 2020, **317**, 39-47 [cit. 2021-11-29]. ISSN 01681656. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiotec.2020.04.012
- [32] KARS, Gökhan a Ufuk GÜNDÜZ. Towards a super H₂ producer: Improvements in photofermentative biohydrogen production by genetic manipulations. *International Journal of*

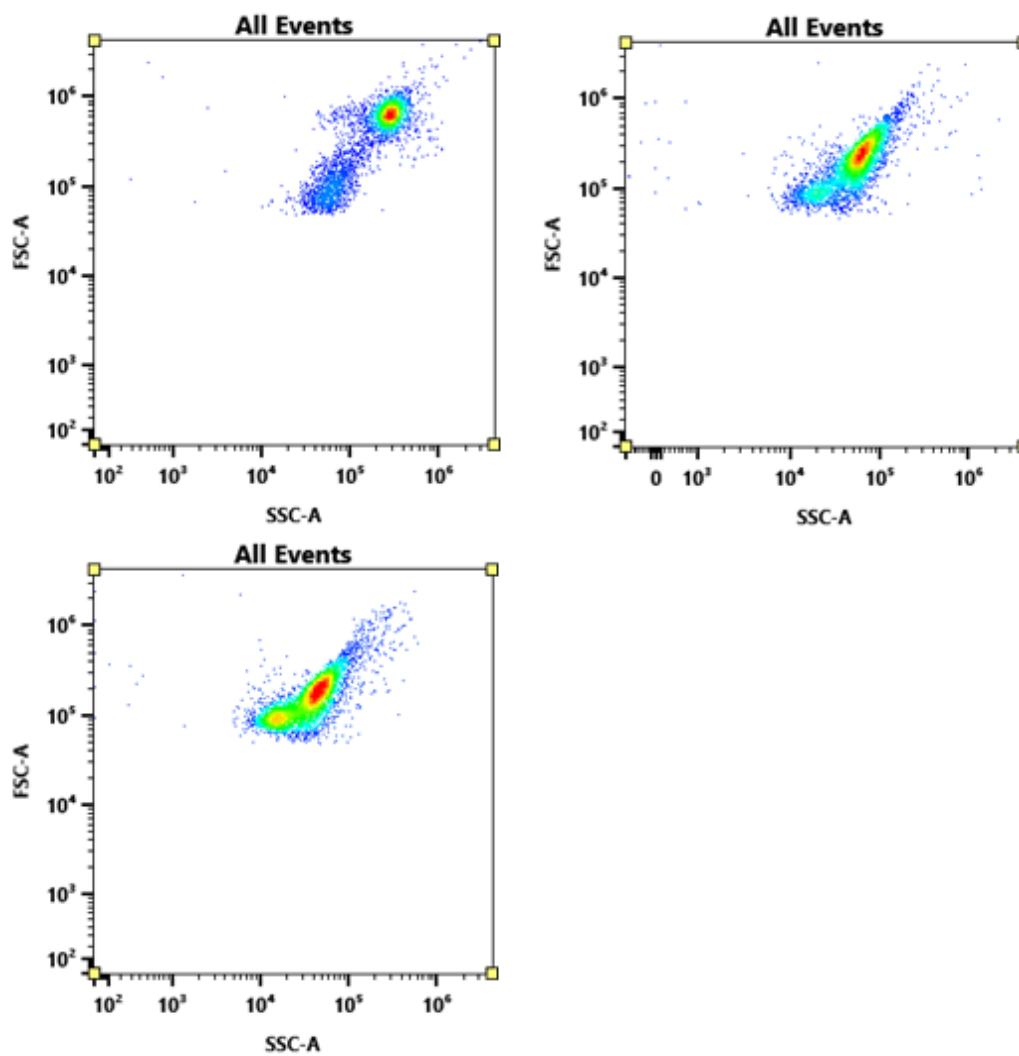
- Hydrogen Energy* [online]. 2010, **35**(13), 6646-6656 [cit. 2021-11-29]. ISSN 03603199. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijhydene.2010.04.037
- [33] KUMAR, Gopalakrishnan, Vinoth PONNUSAMY, Rahul BHOSALE, Sutha SHOBANA, Jeong-Jun YOON, Shashi BHATIA, J. RAJESH BANU a Sang-Hyoun KIM. A review on the conversion of volatile fatty acids to polyhydroxyalkanoates using dark fermentative effluents from hydrogen production. *Bioresource Technology* [online]. 2019, **287** [cit. 2021-11-29]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2019.121427
- [34] DE MEUR, Quentin, Adam DEUTSCHBAUER, Matthias KOCH, Guillaume BAYON-VICENTE, Paloma CABECAS SEGURA, Ruddy WATTIEZ a Baptiste LEROY. New perspectives on butyrate assimilation in *Rhodospirillum rubrum* S1H under photoheterotrophic conditions. *BMC Microbiology* [online]. 2020, **20**(1) [cit. 2021-11-29]. ISSN 1471-2180. Dostupné z: doi:10.1186/s12866-020-01814-7
- [35] BRANDL, Helmut, Edward KNEE, R. Clinton FULLER, Richard GROSS a Robert LENZ. Ability of the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum* to produce various poly (β -hydroxyalkanoates): Potential sources for biodegradable polyesters. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 1989, **11**(1), 49-55 [cit. 2021-11-29]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/0141-8130(89)90040-8
- [36] LIU, Jia, Hexiang YAN, Ziyuan LIAO, Kui ZHANG, Arthur SCHMIDT a Tao TAO. Laboratory analysis on the surface runoff pollution reduction performance of permeable pavements. *Science of The Total Environment* [online]. 2019, **691**, 1-8 [cit. 2021-11-29]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2019.07.028
- [37] CAPSON-TOJO, Gabriel, Damien BATSTONE, María GRASSINO et al. Purple phototrophic bacteria for resource recovery: Challenges and opportunities. *Biotechnology Advances* [online]. 2020, **43** [cit. 2021-11-29]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2020.107567
- [38] NUNKAEW, Tomorn, Duangporn KANTACHOTE, Teruhiko NITODA a Hiroshi KANZAKI. Selection of salt tolerant purple nonsulfur bacteria producing 5-aminolevulinic acid (ALA) and reducing methane emissions from microbial rice straw degradation. *Applied Soil Ecology* [online]. 2015, **86**, 113-120 [cit. 2021-11-29]. ISSN 09291393. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsoil.2014.10.005
- [39] LICHT, Mathieu, Aaron NUSS, Marcel VOLK, Anne KONZER, Michael BECKSTETTE, Bork BERGHOFF a Gabriele KLUG. Adaptation to Photooxidative Stress: Common and Special Strategies of the Alphaproteobacteria *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodobacter capsulatus*. *Microorganisms* [online]. 2020, **8**(2) [cit. 2021-11-29]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms8020283
- [40] MANNINA, Giorgio, Dario PRESTI, Gabriela MONTIEL-JARILLO, Julián CARRERA a María SUÁREZ-OJEDA. Recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from wastewater: A review. *Bioresource Technology* [online]. 2020, **297** [cit. 2022-03-07]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2019.122478
- [41] JACQUEL, Nicolas, Chi-Wei LO, Yu-Hong WEI, Ho-Shing WU a Shaw WANG. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2008, **39**(1), 15-27 [cit. 2021-11-29]. ISSN 1369703X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2007.11.029
- [42] KOLLER, Martin, Horst NIEBELSCHÜTZ a Gerhart BRAUNEGG. Strategies for recovery and purification of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] (PHA) biopolyesters from surrounding biomass.

- Engineering in Life Sciences* [online]. 2013, **13**(6), 549-562 [cit. 2021-11-29]. ISSN 16180240. Dostupné z: doi:10.1002/elsc.201300021
- [43] MADKOUR, Mohamed, Daniel HEINRICH, Mansour ALGHAMDI, Ibraheem SHABBAJ a Alexander STEINBÜCHEL. PHA Recovery from Biomass. *Biomacromolecules* [online]. 2013, **14**(9), 2963-2972 [cit. 2021-11-29]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm4010244
- [44] CHOORIT, Wanna, Angkana SAIKEUR, Pichit CHODOK, Poonsuk PRASERTSAN a Duangporn KANTACHOTE. Production of biomass and extracellular 5-aminolevulinic acid by *Rhodopseudomonas palustris* KG31 under light and dark conditions using volatile fatty acid. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. 2011, **111**(6), 658-664 [cit. 2021-11-29]. ISSN 13891723. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiosc.2011.01.014
- [45] YEN, Hong-Wei a Chia-Hung CHIU. The influences of aerobic-dark and anaerobic-light cultivation on CoQ10 production by *Rhodobacter sphaeroides* in the submerged fermenter. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2007, **41**(5), 600-604 [cit. 2021-11-29]. ISSN 01410229. Dostupné z: doi:10.1016/j.enzmictec.2007.05.005
- [46] DAHIYA, Shikha, Sulogna CHATTERJEE, Omprakash SARKAR a S. MOHAN. Renewable hydrogen production by dark-fermentation: Current status, challenges and perspectives. *Bioresource Technology* [online]. 2021, **321** [cit. 2021-11-29]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2020.124354
- [47] ZAVŘEL, Tomáš, Maria SINETOVA a Jan ČERVENÝ. Measurement of Chlorophyll a and Carotenoids Concentration in Cyanobacteria. *BIO-PROTOCOL* [online]. 2015, **5**(9) [cit. 2022-05-13]. ISSN 2331-8325. Dostupné z: doi:10.21769/BioProtoc.1467
- [48] FIEDOR, Leszek, Junji AKAHANE a Yasushi KOYAMA. Carotenoid-Induced Cooperative Formation of Bacterial Photosynthetic LH1 Complex. *Biochemistry* [online]. 2004, **43**(51), 16487-16496 [cit. 2022-05-15]. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi0481287
- [49] NOVACKOVA, Ivana, Xenie KOURILOVA, Katerina MRAZOVA, Petr SEDLACEK, Michal KALINA, Vladislav KRZYZANEK, Martin KOLLER a Stanislav OBRUCA. Combination of Hypotonic Lysis and Application of Detergent for Isolation of Polyhydroxyalkanoates from Extremophiles. *Polymers* [online]. 2022, **14**(9) [cit. 2022-05-24]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym14091761
- [50] HORIUE, Hiroto, Mai SASAKI, Yuki YOSHIKAWA, Masanori TOYOFUKU a Shinsuke SHIGETO. Raman spectroscopic signatures of carotenoids and polyenes enable label-free visualization of microbial distributions within pink biofilms. *Scientific Reports* [online]. 2020, **10**(1) [cit. 2022-05-24]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-64737-3

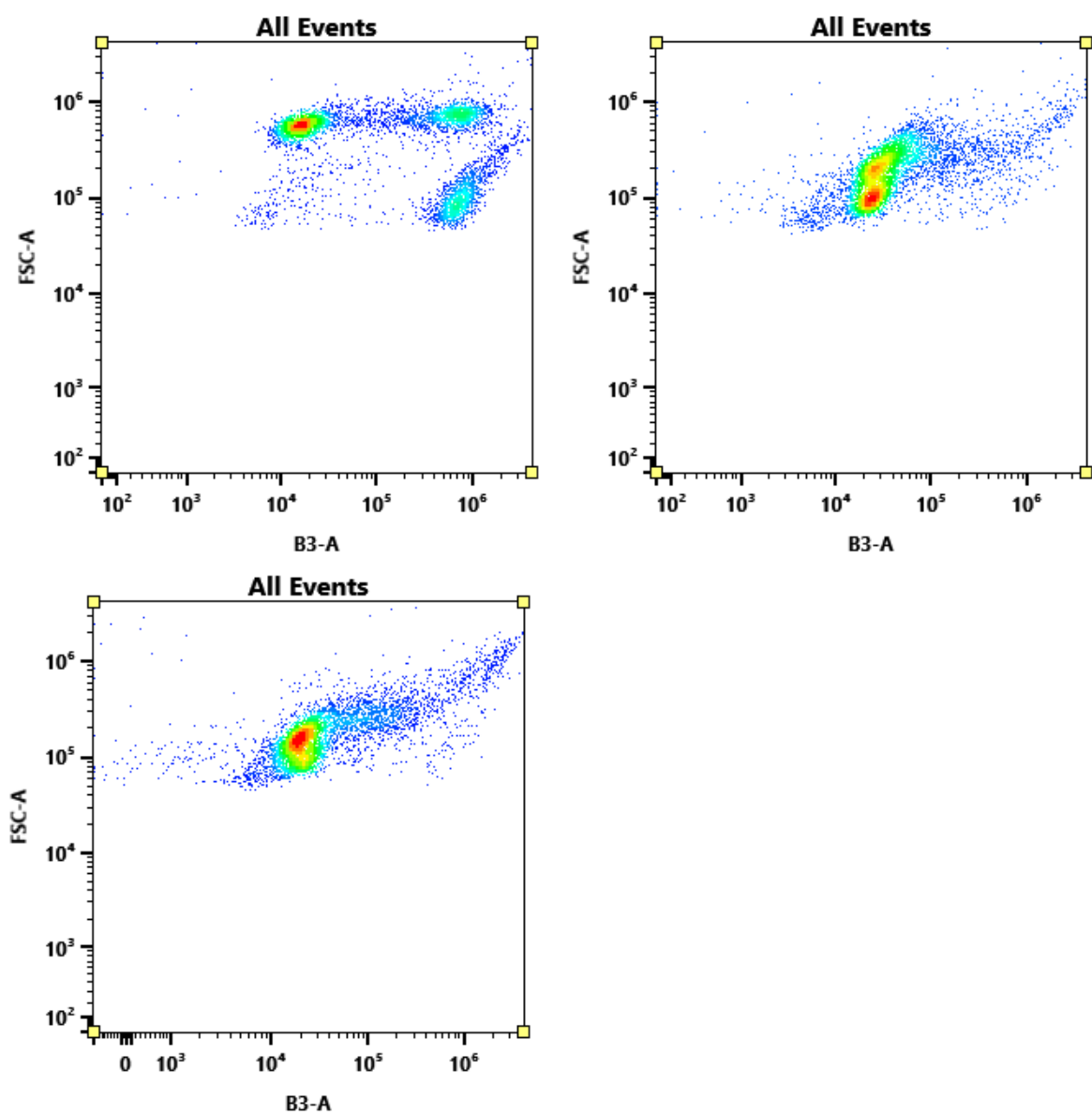
7 Seznam zkratek a symbolů

°C	stupeň Celsia
5-ALA	kyselina 5-aminilevulinová
A	absorbance
ATP	adenosintrifosfát
Bchl	bakteriochlorofyl <i>a</i>
c	koncentrace
CoA	koenzym A
CoQ10	koenzym Q10
DMSO	dimethylsulfoxid
FID	plamenový ionizační detektor
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
h	hodina
LB	Lysogeny broth
LCL	dlouhá délka řetězce (long-chain-length)
MCL	středně dlouhá délka řetězce (medium-chain-length)
nm	nanometr
NPCM	buněčná hmota neobsahující PHA
OD	optická hustota
P3HB4HB	poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát)
PBS	fosfátový pufr
PHA	polyhydroxyalkanoát
PHB	polyhydroxybutyrát
PHBV	poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát)
PNSB	purpurové nesulfurové bakterie
rpm	otáčky za minutu
SCL	krátká délka řetězce (short-chain-length)
TMK	těkavé mastné kyseliny
UV-VIS	ultrafialová a viditelná oblast světla

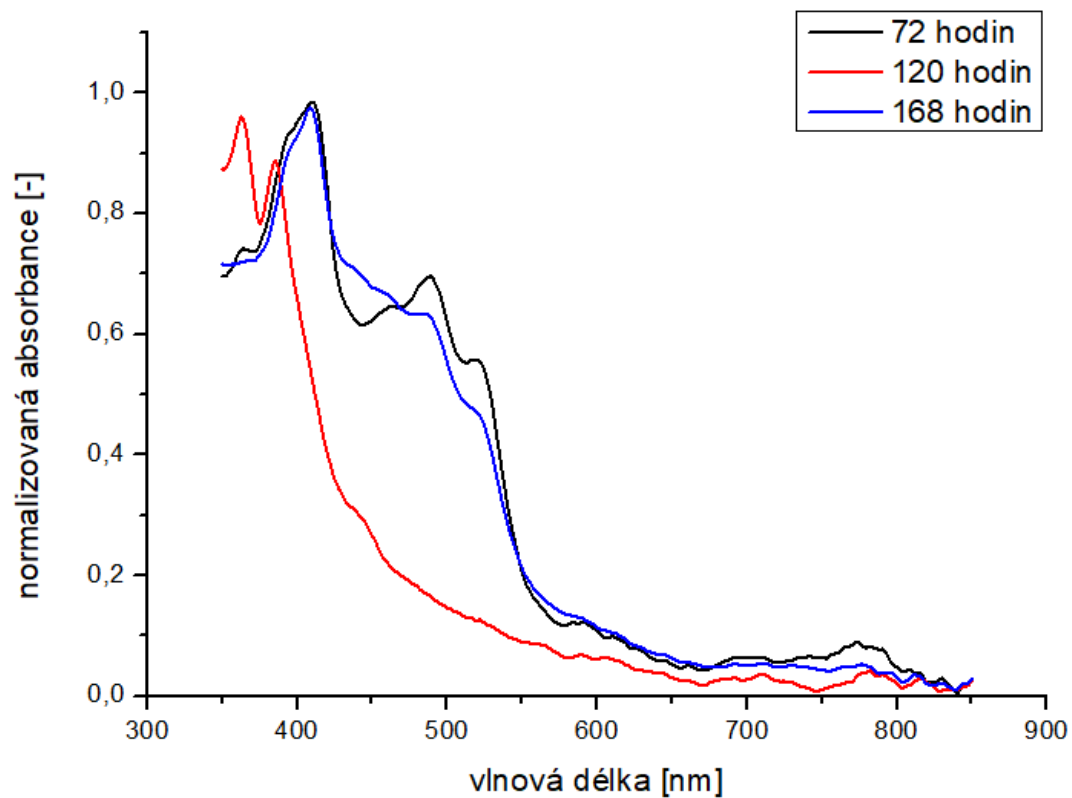
8 Přílohy



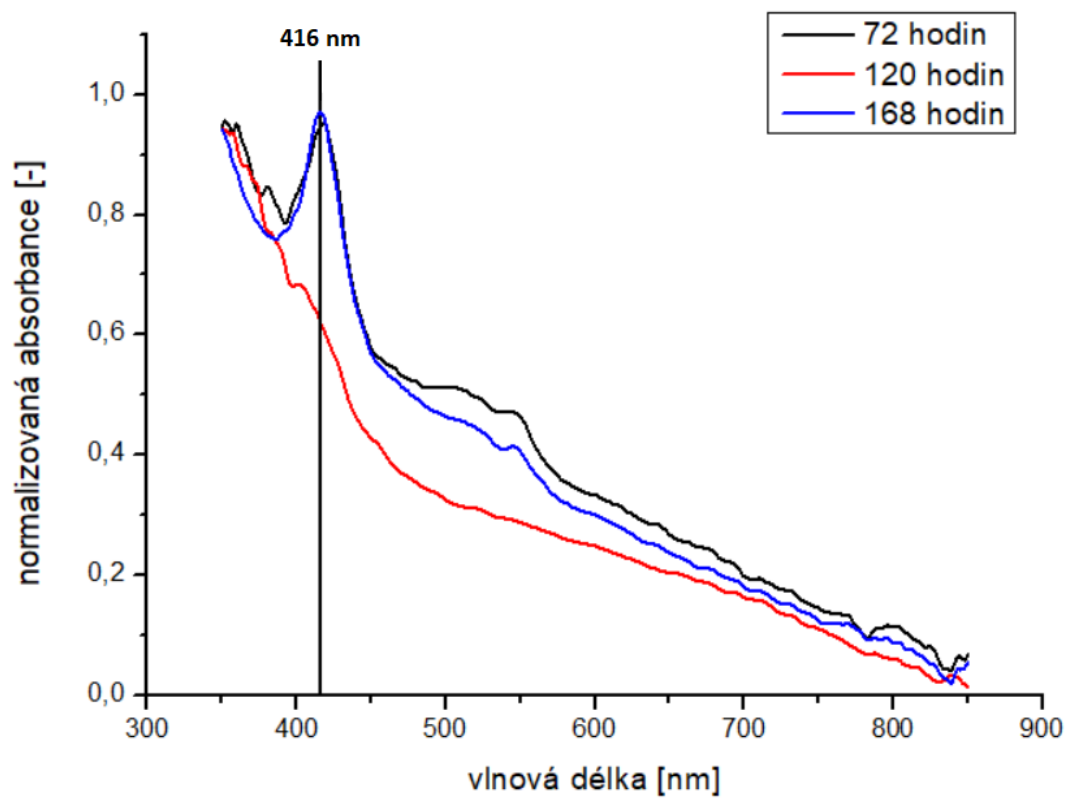
Obr. 23 Cytogramy pro mikroaerobní kultivaci na světle (vlevo nahoře) a ve tmě (vpravo nahoře) a pro anaerobní kultivaci ve tmě (vlevo dole)



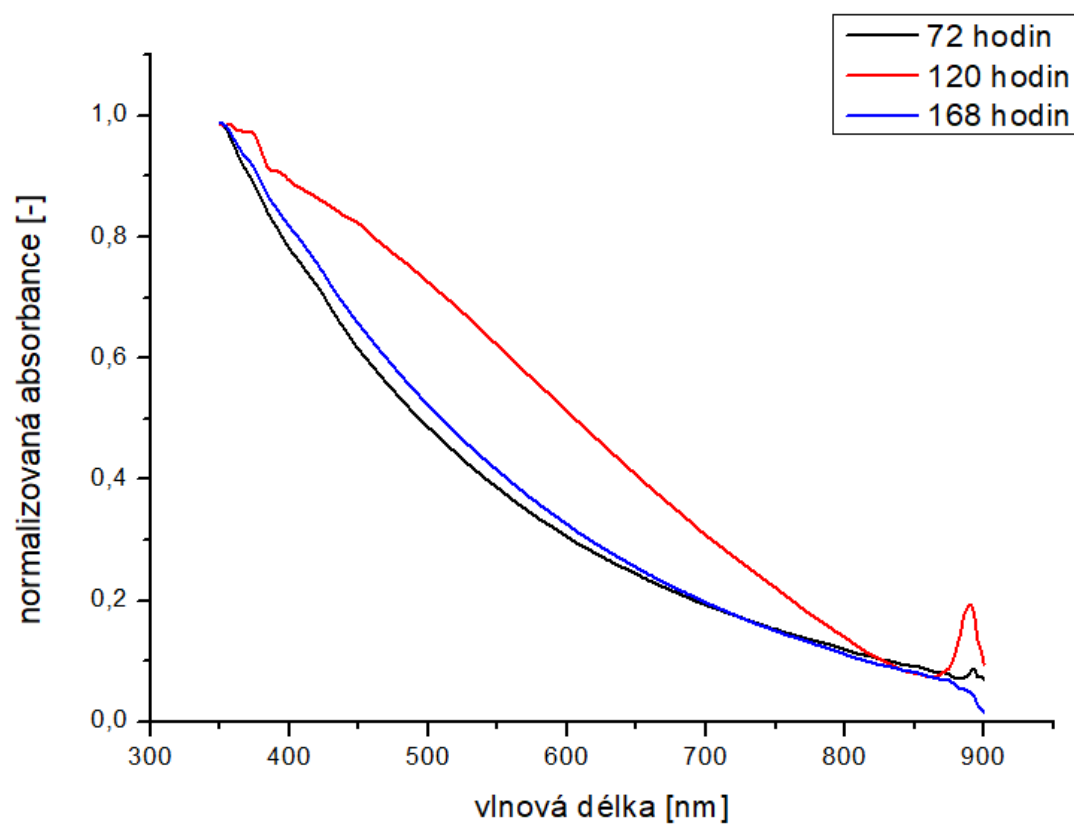
Obr. 24 Cytogramy při použití fluorescenční sondy BODIPY 439/503 pro mikroaerobní kultivaci na světle (vlevo nahoře) a ve tmě (vpravo nahoře) a pro anaerobní kultivaci ve tmě (vlevo dole)



Obr. 25 Absorpční spektrum pro extrakty získané při kultivaci na pevném médiu LB v transmisním módu



Obr. 26 Absorpční spektrum pro pevné médium LB při použití difúzně transmisního módu



Obr. 27 Absorpční spektrum pro pevné médium LB při použití transmisního módu