



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**VYUŽITÍ FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÝCH A
SPEKTROSKOPICKÝCH METOD PŘI STUDIU
EXTREMOFILNÍCH MIKROORGANISMŮ**

UTILIZATION OF PHYSICO-CHEMICAL AND SPECTROSCOPICAL METHODS IN STUDY ON MICROBIAL
EXTREMOFILES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kateřina Dobešová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1650/2021
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Kateřina Dobešová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**

Akademický rok: 2021/22

Název bakalářské práce:

Využití fyzikálně–chemických a spektroskopických metod při studiu extremofilních mikroorganismů

Zadání bakalářské práce:

1. Zpracovat literární rešerši na téma i. extremofilní producenti PHA a jejich využití v moderních biotechnologiích a ii. moderní trendy ve fyzikálně–chemických a spektroskopických analýzách mikroorganismů.
2. Realizovat sérii kultivačních experimentů s vybraným extremofilním producentem PHA.
3. Na základě literární rešerše navrhnout a otestovat soubor metod fyzikálně–chemické a spektroskopické analýzy získaných buněčných kultur.
4. Zhodnotit využitelnost a přínos testovaných technik v rámci biotechnologie extremofilních mikroorganismů.

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.

Kateřina Dobešová
studentka

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce je zaměřená na metody stanovení polyhydroxyalkanoátů v buňkách extremofilů, konkrétně bakterie *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15 344. Mezi metody, které byly použity, patří termogravimetrická analýza, infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací a Ramanova spektroskopie. Pomocí TGA byl stanoven obsah extracelulární a intracelulární vody ve vzorcích. Metoda FTIR byla použita nejen na sledování obsahu PHA, ale také na fyzikální vlastnosti polymeru ve vzorku. Konkrétně jestli byl polymer ve vzorku biomasy amorfni nebo krystalický. Ramanova spektroskopie byla použita na potvrzení přítomnosti PHA ve vzorcích. Výsledky jednotlivých metod byly porovnány s výsledky plynové chromatografie.

ABSTRACT

The aim of this bachelor thesis is the determination of polyhydroxyalkanoates in the cells of extremophile bacteria, performed by several methods. The chosen bacterium was *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15 344. Thermogravimetric analysis, infrared spectroscopy with Fourier transformation, and Raman spectroscopy were used in this thesis. The TGA method was used for the determination of extracellular and intracellular water in samples. The FTIR method was used in order to observe the amount of PHA, but also to observe the physical properties of the polymer in the sample, specifically to determine either amorphous or crystalline features of this polymer. Raman spectroscopy was used in order to confirm the presence of PHA in the samples. All results were compared with the results accomplished by gas chromatography.

KLÍČOVÁ SLOVA

Polyhydroxyalkanoát, extremofilové, *Schlegelella thermodepolymerans*, polyhydroxybutyrát, termogravimetrická analýza, FTIR, Ramanova spektroskopie

KEYWORDS

Polyhydroxyalkanoate, extremophiles, *Schlegelella thermodepolymerans*, polyhydroxybutyrate, thermogravimetric analysis, FTIR, Raman spectroscopy

DOBEŠOVÁ, Kateřina. *Využití fyzikálně-chemických a spektroskopických metod při studiu extremofilních mikroorganismů*. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139083>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Ing. Petr Sedláček PhD.

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.

.....

.

Kateřina Dobešová

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu své bakalářské práce Ing. Petrovi Sedláčkovi PhD., za odborné vedení práce, ochotu, cenné rady a především čas, který mi věnoval. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Xenii Kouřilové za pomoc a rady při kultivaci mikroorganismů. Děkuji také Ing. Evě Slaninové PhD. za pomoc při práci v laboratoři. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat paní Leoně Kubíkové, za změření vzorků na TGA.

OBSAH

1	ÚVOD	6
2	TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1	Extremofilní mikroorganismy	7
2.1.1	Charakteristika	7
2.1.2	Zařazení extremofilů	7
2.1.3	Aplikace extremofilů	7
2.1.4	Rozdělení extremofilů	7
2.1.5	Stresory ovlivňující život extremofilů	8
2.1.5.1	Teplota	8
2.1.5.2	Tlak	8
2.1.5.3	Kyselost a zásaditost prostředí	9
2.1.5.4	Salinita	10
2.2	Polyhydroxyalkanoáty	10
2.2.1	Charakteristika	10
2.2.2	Struktura	10
2.2.3	Vlastnosti polyhydroxyalkanoátů	10
2.2.4	Polyhydroxybutyrát	11
2.2.5	Biosyntéza	11
2.2.6	Využití a význam	13
2.2.6.1	Pro bakterie	13
2.2.6.2	Pro průmysl	13
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	14
3.1	Mikroorganismy produkující PHA	14
3.1.1	Mikroskopické řasy	14
3.1.2	Termofilní mikroorganismy	14
3.1.3	Halofilní mikroorganismy	15
3.1.4	Methanotrofní organismy	15
3.1.5	Mezofilní mikroorganismy	15
3.2	Moderní trendy ve fyzikálně-chemických a spektroskopických analýzách mikroorganismů	16
3.2.1	Plynová chromatografie	16
3.2.2	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací	16
3.2.3	Ramanova spektroskopie	17
3.2.4	Průtoková cytometrie	17
3.2.5	Termogravimetrická analýza	17

4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	18
4.1	Použité chemikálie a přístroje.....	18
4.1.1	Použitý mikroorganismus.....	18
4.1.2	Použité chemikálie	18
4.1.3	Použité přístroje.....	18
4.2	Kultivace mikroorganismů	19
4.2.1	Optimalizace kultivačních podmínek.....	19
4.2.1.1	První kultivace	19
4.2.1.2	Druhá kultivace.....	20
4.3	Příprava vzorků na analýzy	20
4.3.1	Odměr biomasy a stanovení podílu sušiny.....	20
4.3.2	Stanovení podílu PHA v biomase	20
4.3.3	Stanovení optické hustoty	21
4.3.4	Ramanova spektroskopie.....	21
4.3.5	Termogravimetrická analýza.....	21
4.4	Stresové experimenty	21
4.4.1	Optimalizace stresových podmínek	21
4.4.1.1	Příprava fosfátového pufru 50mM, pH = 7,4	21
4.4.1.2	Příprava KCl-HCl pufru a NaCl 200 g/l pufru	21
4.4.1.3	Teplota	22
4.4.1.4	Osmotický stres	22
4.4.1.5	pH = 1	22
4.4.2	Finální stresové experimenty	22
4.4.2.1	Různá teplota	23
4.4.2.2	Temperování pufru	23
4.4.2.3	Vysušení vzorků	23
5	VÝSLEDKY A DÍZKUZE.....	24
5.1	Optimalizace kultivačních podmínek	24
5.2	Termogravimetrická analýza	26
5.3	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací	28
5.3.1	Měření suché biomasy.....	29
5.4	Stresové experimenty	31
5.4.1	Optimalizace stresových podmínek	31
5.4.1.1	Teplota	31
5.4.1.2	Osmotický stres	32

5.4.1.3	Expozice kyselému prostředí	32
5.4.2	Finální stresové experimenty	33
5.4.2.1	Různá teplota	33
5.4.2.2	Temperování pufru	34
5.4.2.3	Vysušení vzorků	34
5.5	Ramanova spektroskopie	37
6	ZÁVĚR	38
7	POUŽITÉ ZDROJE	40
8	SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	47
8.1	Seznam zkratek	47
8.2	Seznam symbolů	48
9	SEZNAM PŘÍLOH	49

1 ÚVOD

V současné době jsou plasty stále více využívaným materiálem. Používají se díky svým chemickým a fyzikálním vlastnostem mimo jiné jako obalový materiál. S velkou produkcí plastů se pojí i jejich negativní dopad na životní prostředí. Vzhledem k tomu, že je nelze biologicky degradovat, hromadí se v přírodě, kde nepříznivě ovlivňují celý ekosystém. Z toho důvodu roste snaha nahrazovat syntetické plasty těmi, které budou biodegradabilní a biokompatibilní. Mezi tyto plasty patří například polyhydroxyalkanoáty (PHA).

Polyhydroxyalkanoáty jsou díky svým vlastnostem prakticky stále více používané a často nahrazují syntetické plasty jako například polypropylen či polyethylen. Jak bylo zmíněno výše, jsou biodegradabilní a v přírodě se ve vhodných podmínkách rozkládají na vodu a oxid uhličitý. PHA jsou zcela přírodní plasty, jsou produkovány mikroorganismy a v buňce jsou v cytoplazmě uchovávány ve formě granulí. Ty slouží především jako zásobárna energie a uhlíku. PHA jsou produkovány řadou mikroorganismů, od mikroskopických řas až po bakterie. Mezi nejznámější bakterie schopné produkovat PHA patří různé druhy rodu *Pseudomonas*, *Cupriavidus necator* a *Schlegelella thermodepolymerans*. Bakterie produkují PHA v závislosti na okolním prostředí. Produkce závisí převážně na dostatečné koncentraci cukru, správné koncentraci dusíku a stopových prvků.

Schlegelella thermodepolymerans patří mezi extremofilní organismy. Tyto organismy jsou schopné přežít v extrémních podmínkách, jako je vysoký či nízký tlak, salinita nebo teplota. *Schlegelella thermodepolymerans* je termofil, její teplotní optimum se pohybuje okolo 50 °C. Je schopna produkovat PHA.

Metody na zkoumání obsahu a vlastností vyprodukovaného PHA jsou různé. Mezi nejvíce využívanou techniku se řadí plynová chromatografie, která je však časově náročná na přípravu vzorků. Z tohoto důvodu je tato bakalářská práce zaměřená na vytipování dalších technik a ověření jejich použitelnosti na kvantitativní i kvalitativní stanovení PHA.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Extremofilní mikroorganismy

2.1.1 Charakteristika

Pro život organismů bylo stanoveno několik podmínek. Mezi tyto podmínky patří zdroje energie, dostupnost nezbytných chemických prekursorů, a hlavně kapalného rozpouštědla. Dostupnost kapalné vody je hlavní faktor, který vymezuje prostor pro život na Zemi. Kapalná voda působí jako rozpouštědlo i jako reaktant či produkt v biochemických reakcích [1; 2]. V podmínkách, kde je komfort života organismů jakkoliv omezen, se setkáváme s tzv. extremofily [1].

Extremofilové jsou schopni přežít při extrémních podmínkách nebo dokonce tyto podmínky ke svému životu vyžadují. Jedná se o extrémy jako jsou vysoké nebo naopak nízké teploty, nízké nebo vysoké hodnoty pH, tlaku nebo koncentrací soli. Může se jednat i o ionizující záření nebo o zvýšenou koncentraci těžkých kovů. Mikroorganismy, které jsou schopny tolerovat více než jednu extrémní podmínku se pak označují jako polyextremofilové [1; 3; 4]. Jako příklad lze uvést *Sulfolobus acidocaldarius*, který prospívá za nízkého pH a teplot okolo 80 °C. Extremofilové nemusí být extrémními celý život. Například bakterie *Deinococcus radiodurans*, která je známá díky své odolnosti vůči záření, má tuto schopnost pouze v případě rychlého růstu v médiu, které je bohaté na živiny. Mikroorganismy byly detekovány v různých extrémních prostředích [5].

2.1.2 Zařazení extremofilů

Extremofilní mikroorganismy jsou zastoupeny ve všech doménách, nicméně nejvyšší zastoupení mají prokaryota [1]. Prokaryota jsou jednobuněčné organismy, které nejsou schopny tvořit funkčně a morfologicky diferencované tkáně. Jedná se o velmi metabolicky různorodou doménu.

2.1.3 Aplikace extremofilů

Díky pochopení limitů života těchto mikroorganismů je můžeme využít v průmyslových procesech [1]. V důsledku jejich adaptace na extrémní prostředí jejich proteiny často obsahují unikátní sekvence aminokyselin. Z těchto aminokyselin bylo vyizolováno velké množství technologicky zajímavých enzymů. Extremofilové zároveň produkují speciální metabolity, čímž se stávají aplikačně ještě zajímavějšími. Vyizolované metabolity a enzymy mají velký potenciál využití v biotechnologických aplikacích a stávají se atraktivními pro využití v blízké budoucnosti.

2.1.4 Rozdělení extremofilů

Extremofilní organismy dělíme podle toho, v jakých podmínkách jsou schopni přežívat. Toto rozdělení je uvedeno v *Tab. 1* [5].

Tab. 1 Klasifikace a příklady extrémofilních organismů [5]

Extremní veličina	Typ	Definice	Příklady
Teplota	hypertermofily termofily mesofily psychrofilly	růst > 80 °C růst 60–80 °C 15–60 °C < 15 °C	<i>Pyrolobus fumarii</i> , 113 °C <i>Synechococcus lividis</i> <i>Homo sapiens</i> <i>Psychrobacter</i>
Radiace			<i>Deinococcus radiodurans</i>
Tlak	piezofily	vysoký tlak	
Vysychání	xerofily	tolerantní vůči nedostatku vody	<i>Arternia salina</i>
Salinita	halofily	vysoký obsah solí (2–5 M NaCl)	<i>Dunaliella salina</i>
pH	alkalofily acidofily	pH > 9 nízké pH	<i>Bacillus firmus</i> <i>Cyanidium caldarium</i>

2.1.5 Stresory ovlivňující život extrémofilů

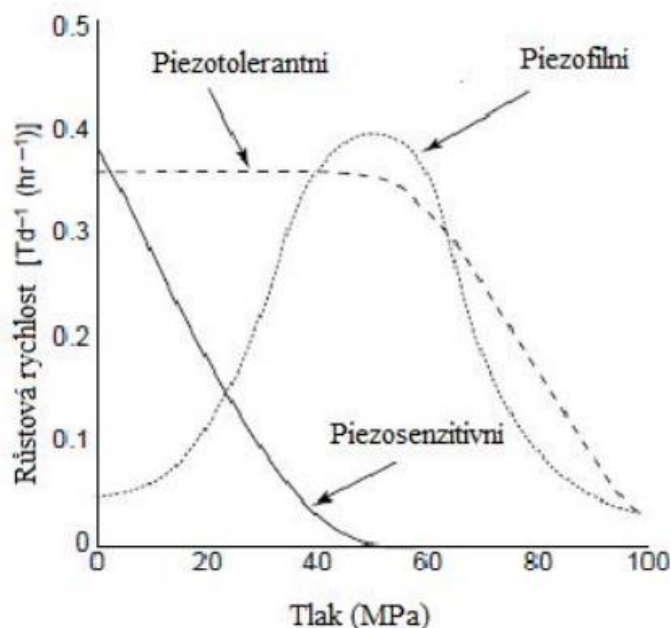
2.1.5.1 Teplota

Podle teploty dělíme organismy na hypertermofily, termofily, mesofily a psychrofilly [5]. Současná minimální teplota, kterou jsou mikroorganismy prokazatelně schopni přežít, je -25 °C u *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 a maximální 130 °C u „*Geogemma barossii*“ 121. U termofilů a psychrofilů se často vyskytují i podmínky teploty spojené s vysokým tlakem nebo koncentrací soli. Halopsychrofilové přežívají v prostředí s vysokým obsahem soli a při nízkých teplotách [2].

2.1.5.2 Tlak

Tlak ovlivňuje mikrobiální růst, a to zejména při extrémních teplotách. Na zemském povrchu se tlak pohybuje od 0,1 do 112 MPa. Vyšší tlaky jsou pozorovány v podpovrchovém prostředí [2]. Mikroorganismy, které upřednostňují život za vysokého tlaku se označují jako piezofily. Jejich optimální rychlost růstu se pohybuje při tlaku vyšším, než je tlak atmosférický. Citlivost na zvýšení tlaku vykazují piezosenzitivní mikroorganismy. Různé fyzikálně-chemické podmínky mohou ovlivnit účinek vysokého tlaku na mikrobiální růstovou rychlost. Příkladem je *Shewanella benthica*, která vykazuje piezotolerantní růst při teplotě 4 °C (stejná rychlost růstu v rozmezí od 0,1 MPa do 50 MPa), ale při její optimální růstové teplotě 10 °C se chová jako piezofilní mikroorganismus (optimální rychlosti růstu je dosaženo až při tlaku 70 MPa) [6]. Za extrémní prostředí s vysokým tlakem se považují hlubiny moří a oceánů. Oceány mají průměrnou hloubku 3800 m a tlak 38 MPa. Na dně Mariánského příkopu, nejhlubším známém místě oceánu, je tlak 110 MPa [6; 7]. Jako první byla z Mariánského příkopu izolována bakterie *Pseudomonas bathycetes* [8].

Schématické znázornění vztahu mezi mikrobiální rychlostí růstu a tlakem je uvedeno na Obrázek 1 [6].



Obrázek 1 Vlastnosti mikrobiálního růstu při zvyšování hydrostatického tlaku [6]

Hyperpiezofilové se přizpůsobily extrémním tlakům pomocí různých strategií. Buněčná membrána je naplněna více nenasycenými mastnými kyselinami. Díky tomu se zvýší tekutost membrány při vysokých tlacích [2].

2.1.5.3 Kyselost a zásaditost prostředí

Hodnota pH má významný vliv na mikroorganismy a jejich společenství. Všechny mikroorganismy si musí udržovat téměř neutrální pH, aby byl zachován metabolismus a tím zajištěno přežití buňky. Acidofilní bakterie mají cytoplasmatické pH v rozmezí 7,2-8,7. Bylo zjištěno, že mikroorganismy mohou výrazně měnit své pH intracelulárního prostředí v důsledku metabolických reakcí [2]. Nejextrémnější acidofil a alkalofil přežije při pH 0 a 12. Bylo pozorováno i pH -0,06 u dvou hyperacidofilních archae, známých jako *Picrophilus oshimae* a *Picrophilus torridus*. Tato archaea byla izolována ze solfatarického horkého pramene v Noboribetus (Hokkaido, Japonsko). Vydrží i vysoké teploty do 65 °C. Jedná se tedy o termoacidofily [2].

Acidofilní mikroorganismy prosperují za nízkého pH [9]. Extrémní acidofily mají optimální růstovou rychlost při pH 3 a nižším, mírní acidofily v rozmezí pH 3 až 5. Acidotolerantní jsou mikroorganismy s optimem pro růst při pH > 5, ale vykazující aktivitu i při nízkém pH [10].

Mikroorganismy, které mají optimální růstovou rychlost při vysokém pH, lze obecně nazývat alkalofily, nebo je možné je rozdělit na alkalofily a haloalkalofily. Alkalofily vyžadují pro svůj růst pH > 9, jejich optimální růst je při pH 10. Haloalkalofily kromě vysokého pH vyžadují rovněž vysokou salinitu (více jak 33 % hmot. NaCl). Alkalofilní mikroorganismy jsou zastoupeny u prokaryot i eukaryot. Nejvíce zástupců je mezi bakteriemi (*Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*), dále jsou to různé druhy mikroorganismů patřící mezi aktinomycety, plísně a kvasinky [11; 12].

2.1.5.4 Salinita

Salinita má významný dopad na složení mikrobiální komunity. Slaná prostředí sahají od mořského prostředí, horských pramenů až po jezera. Mikroorganismy, které přežívají při vysokých koncentracích soli, se označují jako halofilové. Halofilové se vyskytují ve třech doménách života, současné hyperhalofily zahrnují bakterie a archae. Ty mohou růst přes slanost přibližně 15 % hmot. NaCl [2]. Schopnost přežít v hypersalinním prostředí je dána schopností udržet osmotickou rovnováhu [13].

2.2 Polyhydroxyalkanoáty

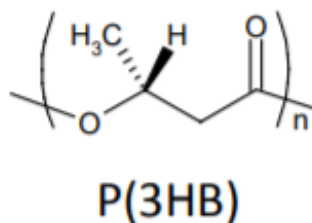
Jedná se o skupinu mikrobiálních biopolymerů s vysokým potenciálem využití v produkci bioplastů. Bioplastům je v posledních letech věnována obrovská pozornost kvůli jejich vysoké molekulové hmotnosti, termoplastickým/elastomerním vlastnostem, biologické rozložitelnosti, biokompatibilitě, netoxicitě a jejich výrobě z obnovitelných zdrojů uhlíku. [14]. V případě polyhydroxyalkanoátů se jedná o plně odbouratelné bioplasty. Dalšími zástupci tohoto typu materiálů jsou např. termoplastický škrob a polylaktidy [15]. Plně odbouratelné bioplasty se v ekosystému degradují na oxid uhličitý a vodu pomocí mikrobiální mineralizace [16].

2.2.1 Charakteristika

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou jednoduché makromolekuly syntetizované širokou škálou gram pozitivních a gram negativních bakterií [14]. K syntéze dochází, pokud se bakterie nachází v prostředí bohatém na uhlík a jsou ovlivňovány stresem (nejčastěji limitace dusíkem) [17; 18]. Svou strukturou spadají do skupiny polyesterů [19].

2.2.2 Struktura

Polymery se dělí podle délky svého řetězce. Běžně studované PHA jsou PHA s krátkým řetězcem (scl-PHA, z angl. *short chain length PHA*), které ve své struktuře obsahují 3 až 5 atomů uhlíku, dále PHA se středně dlouhým řetězcem (mcl-PHA, z angl. *medium chain length PHA*), ty ve své struktuře obsahují 6 až 14 atomů uhlíku a PHA s dlouhým řetězcem, které obsahují více než 14 atomů uhlíku. Příkladem PHA s krátkým řetězcem jsou poly(3 - hydroxybutyrát) P(3HB), poly(4-hydroxybutyrát) P(4HB) a poly(3 - hydroxyvalerát) P(3HV). Příkladem kopolymeru může být P(3HB-co-3HV). Nejběžnějším zástupcem PHA je 3- hydroxybutyrát (PHB nebo P(3HB)) [15].



Obrázek 2 Struktura monomerní jednotky PHB [20]

2.2.3 Vlastnosti polyhydroxyalkanoátů

PHA se liší svými fyzikálními a chemickými vlastnostmi v důsledku jejich různého obsahu monomerů. Mezi faktory ovlivňující obsah monomeru patří: typ mikroorganismů (např. gram-negativní nebo gram-pozitivní), složky média, podmínky fermentace, způsoby fermentace

(vsádková, kontinuální) a regenerace [21]. Vykazují podobné vlastnosti jako polymerní materiály, které mohou být krystalické pevné látky nebo elastické gumy. Tyto vlastnosti jsou ovlivněny vedlejším řetězcem a navázanou vedlejší funkční skupinou [22].

Typ a velikost postranního řetězce v PHA řídí krystalinitu těchto biopolymerů. Zvýšení délky postranních řetězců může inhibovat krystalizační schopnost. Stupeň krystalinity scl a mcl-PHA se tedy významně liší. Krystalické vlastnosti mcl jsou nižší než u scl - PHA. Scl- PHA má krystalinitu v rozmezí od 60 do 80 % Rychlost krystalizace v těchto polymerech je však relativně nízká ve srovnání se syntetickými polymery [23].

2.2.4 Polyhydroxybutyrát

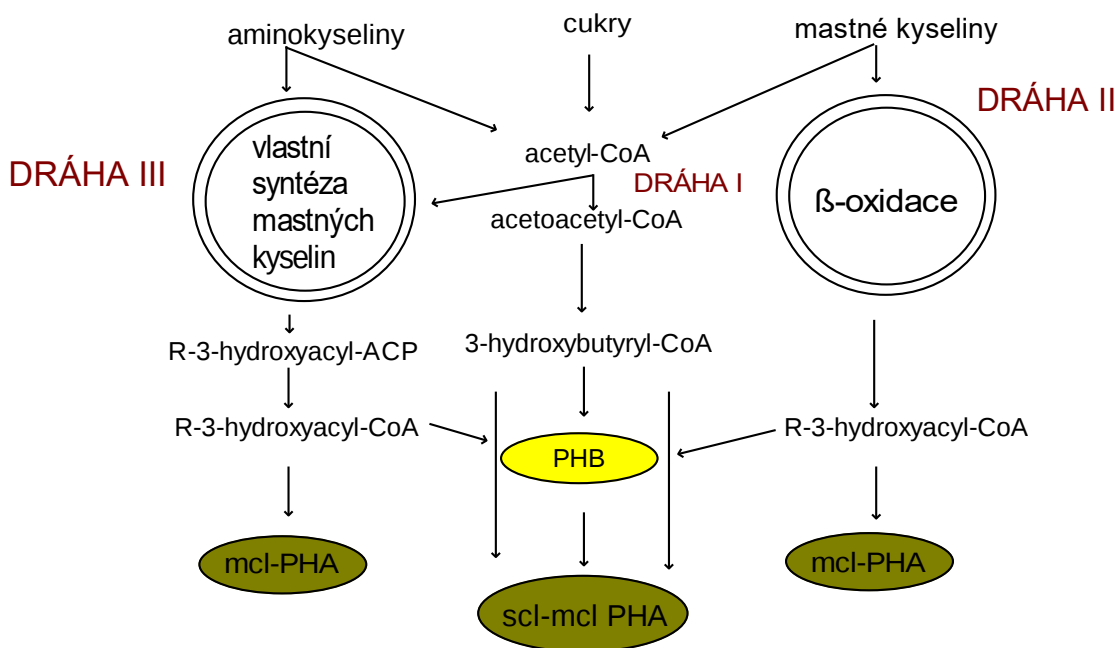
Jak bylo zmíněno výše, PHB je nejběžnější a v přírodě nejrozšířenější polyhydroxyalkanoát. Tento polyester má dokonale izotaktickou strukturu pouze s (*R*)-konfigurací. P(3HB) izolovaný z bakterií má 55- 80% krystalinitu, zatímco molekuly PHB v bakteriích jsou amorfní a v buněčném prostředí se vyskytují ve formě ve vodě nerozpustných buněčných inkluzí. Z kalorimetrické analýzy vychází, že teplota skelného přechodu P(3HB) se pohybuje okolo 4 °C a teplota tání se blíží 180 °C [24]. Bakterie produkují lineární a amorfní formu PHB [25].

PHB se v buňce vyskytuje jako vysokomolekulární homopolymer nebo jako hydroxybutyrátová rezidua. Homopolymer slouží jako zásoba energie pro mikroorganismy. Hydroxybutyrátová rezidua s nižší molekulovou hmotností (cyklické oligolidy a jejich deriváty) mohou tvořit komplexy s jinými biomolekulami (například kalcium polyfosfát). Tyto rezidua pak v buňce plní specifické funkce např. derivát slouží jako neurotransmitter a komplexy mají schopnost přenášet ionty [26].

2.2.5 Biosyntéza

Hlavní faktor, který ovlivňuje biosyntézu, jsou podmínky a typ mikroorganismu syntetizujícího PHA. Biosyntézy se účastní tyto enzymy: PHA-syntázy, acetoacetyl-CoA reduktáza nebo β - ketothioláza [27]. Byly popsány 3 hlavní mechanismy syntézy PHA viz. *Obrázek 3* [28].

Syntéza polymeru je zahájena, když je acetyl-CoA omezen ve vstupu do cyklu trikarboxylových kyselin kvůli omezení živin, přesouvá acetylové jednotky z Citrátového cyklu (TCA) do produkce polyhydroxybutyrátu (PHB), který je ideálním úložištěm uhlíku a energie. Biosyntéza PHB zahrnuje kondenzaci dvou molekul acetyl-CoA za vzniku acetoacetyl CoA, který se redukuje na (R)-3 hydroxybutyryl-CoA. Ten slouží jako substrát pro PHA syntázu a působí jako přímý prekurzor pro produkci PHA [14].



Obrázek 3 Metabolické dráhy syntézy PHA [28]

V první dráze, která je často označována jako metabolická dráha variabilních uhlíkových zdrojů [22], se uplatňují tři klíčové enzymy, kterými jsou β -ketothioláza, NADPH-dependentní acetyl-CoA-reduktáza a PHA-syntáza kódované geny *phaA*, *phaB* a *phaC* [23; 29; 30]. Acetyl-CoA je metabolicky tvořen ze sacharidů, mohou to být ale i mastné kyseliny nebo aminokyseliny [22; 31]. β -ketothioláza mění dva acetyl-CoA na acetoacetyl-CoA, který je transformován na hydroxybutyryl-CoA pomocí NADPH-dependentní acetyl-CoA-reduktázy. PHA-syntáza jej následně polymerizuje do struktury PHB [28]. Preferovaným zdrojem uhlíku pro tuto dráhu je glukóza, ze které jsou nejčastěji produkovány PHA s krátkým řetězcem (scl-PHA) [32]. Tuto dráhu k syntéze PHA používají zejména bakterie *Cupriavidus necator* [28].

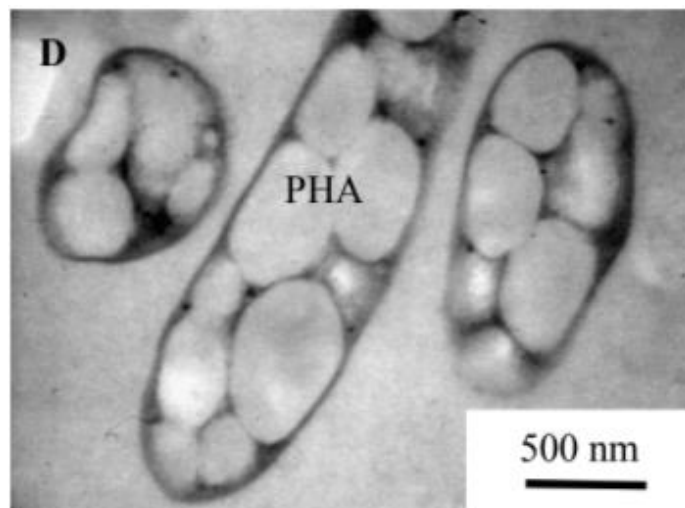
Druhá dráha je spojená s mikrobiálním příjmem mastných kyselin. Po β -oxidaci mastných kyselin vstupuje acetyl-CoA do procesu syntézy monomerů PHA [29]. Následně je enoyl-CoA vznikající v β -oxidaci převeden na R-3-hydroxyacyl-CoA pomocí enzymu R-3-hydroxyacyl-CoA-hydratázy. R-3-hydroxyacyl-CoA je pomocí prekurzoru polymerizace, kterým je mcl PHA-syntáza, přeměněn na mcl PHA [28]. Typickým zástupcem této dráhy jsou bakterie rodu *Pseudomonas* [33].

Klíčovým enzymem třetí dráhy je 3-hydroxyacyl-ACP-CoA-transferáza, která je schopna převést 3-hydroxyacyl-ACP zpět na 3-hydroxyacyl-CoA. Celá dráha vychází z *in situ* syntézy mastných kyselin. Ukázalo se, že vlastní syntéza mastných kyselin a β -oxidace mohou probíhat nezávisle na sobě k doplnění prekurzoru pro syntézu PHA [28].

2.2.6 Využití a význam

2.2.6.1 Pro bakterie

PHA se ukládají v buňkách bakterií ve formě kulovitých intracelulárních inkluzí tzv. granulí. U některých bakterií mohou dosáhnout až 90 % hmotnosti celé buňky. Fungují jako zásobní sloučeniny při mikrobiálně nevyváženém růstu. Při něm jsou základní živiny, jako je fosfor, dusík a kyslík omezeny a uhlík je v nadbytku [15]. Nedávné poznatky ovšem vedly k rozšíření představy o biologické úloze PHA. Vedle primární zásobní a metabolické úlohy PHA byla popsána také komplexní role, kterou tyto biopolymery hrají při expozici a adaptaci mikrobiálních buněk stresovým podmínkám [34].



Obrázek 4 PHA granule uvnitř mikrobiálních buněk zobrazené pomocí TEM [35]

2.2.6.2 Pro průmysl

Díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem našly PHA uplatnění v mnoha aplikacích. Příkladem mohou být obalové nádoby, lahve, sáčky, balicí fólie. Využívaly se jako biopaliva nebo přísady do paliv k vývoji HAME ke zvýšení spalovacího tepla ethanolu. Našly uplatnění i ve zdravotnictví jako chirurgické jehly, kostní šrouby a nosiče pro řízené podávání léků [15].

Mezi hlavní nevýhody PHA patří jejich vysoká cena v porovnání s plasty, které jsou vyrobené z ropy [15].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

V současné době jsou extremofilní organismy hojně využívány v potravinářském průmyslu, v oblasti molekulární biologie, ve farmacii a při čištění odpadních vod [36]. Aplikace termofilních, psychrofilních, acidofilních, alkalofilních a halofilních mikroorganismů v průmyslových procesech otevírá novou éru v oblasti biotechnologie. Každá skupina těchto mikroorganismů má jedinečné vlastnosti, které mohou být využity v biotechnologickém průmyslu. Hlavním důvodem pro izolaci enzymů právě z extremofilů je jejich vysoká stabilita a snížené riziko kontaminace. Od těchto enzymů s výjimečnými vlastnostmi se očekává, že zaplní mezeru mezi biologickými a chemickými procesy. Obchodní význam enzymů dokládá široké uplatnění DNA polymeras z *Thermus aquaticus* a *Pyrococcus furiosus* v řetězové polymerázové reakci (PCR). Tato reakce spočívá v rychlém a účinném namnožení specifických sekvencí DNA a je celosvětově využívána v kriminalistice, analýze potravin nebo v klinické medicíně [37].

3.1 Mikroorganismy produkující PHA

Produkce PHA z různých mikroorganismů je v dnešní době velmi rozšířená díky jejich biologické rozložitelnosti a nákladově efektivnímu výrobnímu procesu. Tyto bioplasty lze snadno vyrobit indukcí více enzymatických reakcí v mikrobech za použití různých surovin. Mezi hlavní producenty patří aktinomycety, řasy a bakterie [23].

3.1.1 Mikroskopické řasy

Mikroskopické řasy patří do heterogenní skupiny fotosyntetických, gramnegativních a (vzhledem k vysokému obsahu fotosyntetických pigmentů) barevných mikroorganismů. Mikrořasy mají schopnost se rychle vyvíjet za nepříznivých podmínek díky své jednoduché buněčné struktuře. Díky tomu jsou nadějným zdrojem biotechnologické produkce PHA [38]. PHA se hromadí v mikrořasách jako materiál pro ukládání energie a uhlíku [39]. Několik studií naznačuje, že mikrořasy lze využít k získání PHA s nižšími náklady. Je to díky malým nárokům na živiny pro růst.

Jedná se o fotoautotrofní mikroorganismy, jako zdroje energie využívají světlo a CO₂. Mikrořasy, které se také označují jako sinice, jsou součástí fytoplanktonu. Pro produkci PHA bylo dosud testováno více než 100 kmenů mikrořas. Kromě bioplastů obsahuje biomasa sinic i několik dalších biokompozitů, jako například antioxidanty, karotenoidy, polysacharidy a podobně. Mezi zástupce řadíme *Nostoc muscorum* a *Spirulina subsalsa* [38]. Mikrořasy byly rozsáhle studovány jako surovina pro výrobu bionafty [40]. Metabolismus PHB u sinic je nejlépe popsán během limitace dusíkem, které spouští proces zvaný chloróza [41].

3.1.2 Termofilní mikroorganismy

Teplota vnějšího prostředí je jedním z hlavních faktorů, které ovlivňují rychlost rozmnožování mikroorganismů i možnost jejich růst. Termofilní mikroorganismy mají optimální teplotu, při níž se rozmnožují největší rychlostí nad 45 °C a pro většinu je optimální teplota v rozmezí 50 až 60 °C. Některé mohou růst výjimečně i při teplotě až 80 °C (některé druhy *Bacillus stearothermophilus*) a extrémní termofily (některé druhy archaebakterií) i při teplotách nad 100 °C. Některé termofilní organismy se nerozmnožují při teplotách 28 až 30 °C dokonce některé ani při teplotách nižších než 40 °C. Jiné termofilní mikroorganismy se při teplotách

kolem 30 °C rozmnožují se zjistitelnou rychlostí [42]. Mikroorganismy, které optimálně rostou při teplotách vyšších než 80 °C se označují jako hypertermofily [43].

Termofilní bakterie jsou schopny v extrémních podmínkách produkovat řadu zajímavých sekundárních metabolitů. [44]. Termofilní mikroorganismy jsou zkoumány především jako zdroj termostabilních enzymů. Nedávno u nich byla objevena schopnost produkovat polyhydroxyalkanoáty (PHA). Díky tomu byly označeny jako slibné produkční jednotky v mikrobiální biotechnologii. [45].

Termofilní mikroorganismy se při kultivaci vyznačují řadou výhod. Díky optimální kultivační nad 45 °C, se značně eliminuje riziko kontaminace mezofilními mikroorganismy. Kultivace při vyšší teplotě je také ekonomicky výhodnější, protože kultivační proces je silně exotermní a v případě termofilních organismů se tudíž snižují náklady na chlazení reaktorů [45]. Mezi biotechnologicky zajímavé termofilní mikroorganismy patří například *Thermovorax subterraneus* [46] nebo *Schlegelella thermodopolymerans* [45].

3.1.3 Halofilní mikroorganismy

Halofily mohou růst v médiu obsahujícím vysokou koncentraci NaCl, což při jejich biotechnologické aplikaci umožňuje nesterilní fermentační podmínky s nižší energií a investicemi navíc k snadnému získávání PHA [47].

PHA granule jsou ve vodě nerozpustné a mají vysoký stupeň polymerace. Tyto granule nezvyšují intracelulární osmotický tlak. Díky tomu přítomnost PHA granulí v buňkách chrání halofily před hyperosmotickým šokem a zabráňuje poškození cytoplazmatické membrány, čímž podporuje udržení buněčné integrity za hyperosmotických podmínek [48]. Mezi velmi dobře prozkoumané halofily patří *Natronococcus occultus* a *Halobacterium noricense* [47]. Nový halotolerantní *Bacillus* sp. který může produkovat PHA za použití široké škály zdrojů uhlíku, byl izolován z mangrovů v Indii [49]. Několik druhů rodu *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Bacillus* a *Vibrio* bylo izolováno z mořského prostředí pro produkci PHA. Další mikroorganismy schopné produkovat PHA byly izolovány z mořského ledu a mořské vody [47].

3.1.4 Methanotrofní organismy

Tyto gramnegativní bakterie využívají methan jako jediný zdroj uhlíku a energie. Jsou přítomné v široké škále prostředí a hrají důležitou roli při oxidaci methanu v přírodě [50]. Methanotrofní producenti PHA jsou schopni syntetizovat polyhydroxyalkanoáty z methanu. Některé nedávné studie prokázaly schopnost *Methylocystis parvus* OBBP syntetizovat řadu PHA kopolymerů pomocí methanu nebo ethanu spolu s dalšími ko-substráty [47]. K přeměně uhlíku používají zřejmě dvě metabolické dráhy – serinovou a pentózofosfátovou. Ty bakterie, které používají serinovou dráhu, se ukázaly jako nejeфекtivnější producenti P(3HB) [51].

3.1.5 Mezofilní mikroorganismy

Mezofilní organismy prosperují při teplotách v rozmezí 20 až 45 °C. Díky své optimální aktivitě v úzkém rozmezí podmínek a nízké stabilitě při vysokých teplotách a extrémním pH obvykle nedosahují výkonnosti v průmyslových podmínkách. Mezi nejznámější zástupce těchto mikroorganismů patří *Cupriavidus necator*, který je schopen naakumulovat P(3HB) až

na 80 % hmotnosti buněčné biomasy [52]. Dalším zástupcem je *Burkholderia sacchari*, která je velmi slibným producentem PHA z lignocelulózových odpadních materiálů [53].

3.2 Moderní trendy ve fyzikálně-chemických a spektroskopických analýzách mikroorganismů

3.2.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie se používá pro kvantifikaci PHA uvnitř mikrobiálních buněk. Nejčastěji je využívána ve spojení s methanolýzou. Jedná se o transesterifikační reakci v methanolu, která je katalyzována pomocí H_2SO_4 . Získané methylestery PHA jsou extrahovány pomocí chlorovaných rozpouštědel jako je chloroform, a následně analyzovány plynovou chromatografií. Metoda poskytuje obsah PHA na základě hmotnosti bakteriální biomasy získané při kultivaci [54]. Metoda je velmi časově náročná z důvodu přípravy vzorků. Esterifikace trvá 3 hodiny, provádí se při teplotě 94 °C. Nejčastěji se používá plynový chromatograf s plamenovou ionizační technikou nebo v tandemovém spojení s hmotnostní spektrometrií [55].

3.2.2 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací, označována jako FTIR (z angl. *Fourier Transform Infrared*), je rychlá spolehlivá a nedestruktivní metoda [56]. Měří se infračervené záření, které je absorbované nebo rozptýlené vzorkem. Analýza využívá změnu rotačních a vibračních stavů molekul v závislosti na změnách dipólového momentu. Díky této metodě lze zjistit informace o funkčních skupinách přítomných v dané sloučenině. K získání spektra používá infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací interferometr. V něm dochází ke složení dvou paprsků do jednoho. Z něj se potom pomocí Fourierovy transformace získá spektrum [57]. Tato metoda je schopna identifikovat typ polymeru a odvodit chemické vlastnosti daného polymeru [58].

FTIR spektrum mikrobiální biomasy zobrazuje příspěvky všech biomakromolekul, které tvoří daný mikroorganismus. Zahrnuje tedy i lipidy, sacharidy DNA a proteiny. Spektrum je velice komplikované, ale určité charakteristické pásy z lipidů a proteinů mohou poskytnout důležité informace o složení biostruktury. Typické pásy, které obsahuje FTIR spektrum: v rozmezí 3000-2800 cm^{-1} , 1700-1500 cm^{-1} , 1500-1185 cm^{-1} a 1185-900 cm^{-1} se objevují pásy lipidů, proteinů, fosfolipidů, DNA, RNA a polysacharidů [59].

Infračervenou spektroskopii využili ve své studii z roku 2021 Akram R. Yasin a Ithar k. Al-Mayaly k identifikaci PHA izolovaných kmenem *Bacillus tequilensis*. Hlavní funkční skupiny extrahovaného PHA byly identifikovány pomocí disku s bromidem draselným na FTIR. Pro srovnání byl použit standardní PHA polymer. Výsledné spektrum ukázalo silný pík při 1726 cm^{-1} . Tento pík odpovídá valenční vibraci C=O úseku esterové vazby krystalické struktury. Píky v oblasti 1643 a 1278 cm^{-1} jsou způsobeny přítomností C=O a C-O skupin. Píky v rozmezí 1718 a 1735 cm^{-1} byly způsobeny natahováním esterových karbonylových skupin. Píky mezi 2962 a 2877 cm^{-1} reprezentují C-H vibraci z methylové a methylenové skupiny v polymeru. Vibrace při vlně 2933 cm^{-1} je charakteristická pro scl-PHA [60].

3.2.3 Ramanova spektroskopie

Jedná se o nedestruktivní a rychlou analytickou metodu, která není náročná na množství vzorku. Při této metodě nedochází k téměř žádné interferenci vody [61]. Vyžaduje vzorky vysoké čistoty, protože přítomnost pigmentů nebo aditiv ovlivňuje přesnost detekce [58]. Ramanova spektroskopie měří Ramanův rozptyl, což je nepružný rozptyl fotonů v důsledku jejich interakce s chemickými vazbami. Vykazuje vysokou specifitu [62].

Alternativním přístupem může být Ramanova spektroskopie s nízkým rozlišením (LRRS). Ta měří Ramanův rozptyl pro hromadné vzorky, díky tomu ji lze přizpůsobit rychlému sběru dat ze surových produktů nebo velkých objemů homogenních kapalin. Požadované spektrometry jsou levnější. Je vhodná pro analýzu mikrořas [62].

Ramanova spektroskopie s povrchovou úpravou (SERS, z angl. *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*) využívá zesíleného Ramanova rozptylu. K zesílení dochází díky molekulám adsorbovaným na kovovém povrchu nebo nanostrukturovaném povrchu [63] [64]. Díky tomu se fluorescenční složka jeví jako zhasená v důsledku přenosu energie, který snižuje Ramanovu emisi. Tato technika je schopna poskytnout informace na molekulární úrovni na rozhraní kapalina-pevná látka [64].

3.2.4 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie poskytuje rychlou analýzu jednotlivých buněk v roztoku. Tyto buňky jsou analyzovány pomocí laserů, kolem kterých protékají suspendované v pufrovaném roztoku na bázi soli. U každé buňky je analyzován rozptyl světla a jeden nebo více parametrů fluorescence. Rozptyl světla je měřen ve dvou směrech. V přímém směru získáme informace o velikosti buňky, v bočním směru o vnitřní složitosti buňky [65].

3.2.5 Termogravimetrická analýza

Spočívá v měření hmotnosti vzorku v průběhu určitého teplotního programu. Je vhodná pro analýzu syntetického, ale i přírodního materiálu. Při něm může teplota zahřívání dosahovat až teploty 1 000 °C [66]. Metoda je vhodná pro analýzu extracelulární a intracelulární vody. Je schopna měřit vlhkost, z níž může být voda pouze jednou složkou. Přesnost metody je omezena přesností váhy, která se k měření používá [67]. Představuje rychlejší a stejně spolehlivou alternativu plynové chromatografie pro kvantifikaci PHA v buňkách. Vyznačuje se vysokou spolehlivostí, proto lze použít k posouzení čistoty PHA až do 99 % [54].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie a přístroje

4.1.1 Použitý mikroorganismus

V experimentální části charakterizující produkci PHA pomocí extremofilního organismu byla jako modelový mikroorganismus vybrána *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15 344.

4.1.2 Použité chemikálie

• Nutrient Broth	Himedia, IND
• Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát	Lach-ner, ČR
• Dihydrogenfosforečnan draselný	Lach-ner, ČR
• Chlorid amonný	Lach-ner, ČR
• Síranu hořečnatý heptahydrát	Lach-ner, ČR
• Chlorid vápenatý bezvodý	Lach-ner, ČR
• Fe ^{III} NH ₄ citrát, green	Fluka, ČR
• Yeast extract	Himedia, IND
• Xylóza	
• Roztok stopových prvků TES II	
• Chloroform	Lach-ner, ČR
• Kyselina sírová	Sigma Aldrich
• Hydroxid sodný	Lach-ner, ČR
• Isopropylalkohol	Lach-ner, ČR
• Metanol	Sigma Aldrich
• Kyselina benzoová	Sigma Aldrich
• Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát	Lach-ner, ČR
• Hydrogenfosforečnan disodný	Merck
• Kyselina chlorovodíková	
• Chlorid draselný	Lach-ner, ČR
• Chlorid sodný	Lach-ner, ČR

Všechny použité chemikálie byly o čistotě p.a. a vyšší.

4.1.3 Použité přístroje

• Laminární box	Fatran LF
• Centrifuga AG 1-14	Sartorius
• Centrifuga Mikro 120	Hettich
• Centrifuga EBA 200	Hettich
• FT-IR spektrometr Nicolet iS50	Thermo Scientific Inc.
• FT-Ramanský modul k FT-IR spektrometru iS50	Thermo Scientific Inc.
• Laboratorní váha EW 620	KERN
• Vortex Mixer V2	Benchmark
• Inkubátor IP 60	LTE
• Blokový termostat Stuart SBH 200D	Bibby Scientific
• Nanofotometr Pearl	Implen
• Plynový chromatograf s FID detekcí, Trace 1300	Thermo Scientific Inc.
• Termogravimetrický analyzátor TGA 5500	TA Instruments

4.2 Kultivace mikroorganismů

Používané mikroorganismy byly uchovávány v hlubokomrazícím boxu v kryozkumavkách s 10% glycerolem jako kryoprotektantem. *Schlegelella thermodepolymerans* byla kultivována v inokulu Nutrient Broth při 50 °C po dobu 24 hodin. Následně byla přeočkována v laminárním boxu do vysterilizovaného minerálního média Chelatococ, byla přidána xylóza a roztok stopových prvků TES II.

Tab. 2 Složení inokula Nutrient Broth

Látka	Koncentrace [g/l]
Beef extract	1
Pepton	1
NaCl	0,5
Agar	0,2

Tab. 3 Složení minerálního média Chelatococ

Látka	Koncentrace [g/l]
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	9
KH ₂ PO ₄	1,5
NH ₄ Cl	1
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,02
NH ₄ Fe ^{III} citrát	0,0012
Yeast extract	0,5
TES II	1 ml/l

4.2.1 Optimalizace kultivačních podmínek

4.2.1.1 První kultivace

Jednotlivá média se lišila obsahem NH₄Cl a xylózy. Všechny kultivace byly prováděny v duplikátech.

Bylo připraveno inokulum Nutrient Broth navážením 2,5 g tohoto inokula a následným rozpuštěním ve 100 ml destilované vody. Inokulum bylo rozlito do dvou 100ml Erlenmayerových baněk. Každá banka obsahovala 50 ml tohoto inokula. Po sterilizaci bylo do každé banky zaočkováno 750 µl *Schlegelella thermodepolymerans* v laminárním boxu. Následovala kultivace po dobu 24 hodin při teplotě 50 °C. Poté bylo připraveno minerální medium Chelatococ.

Jednotlivé koncentrace látek pro přípravu minerálního média Chelatococ byly přepočteny na objem 600 ml destilované vody, následně byly látky přidávány postupně, kromě chloridu amonného a roztoku stopových prvků TES II. Takhle připravený roztok byl následně rozlit do 3 kádinek, každá kádinka obsahovala 200 ml tohoto roztoku. Do první kádinky bylo naváženo 0,6 g NH₄Cl, do druhé 0,3 g NH₄Cl a do třetí 0,2 g NH₄Cl. Po rozpuštění přidaného chloridu amonného byly roztoky přelity do Erlenmayerových baněk a byly sterilizovány po dobu 30 minut. Po sterilizaci bylo do každé Erlenmayerovy banky v laminárním boxu napipetováno 0,1 ml roztoku stopových prvků TES II. Následně byla napipetována xylóza podle koncentrace NH₄Cl.

Tab. 4 Potřebná koncentrace xylózy

Koncentrace NH ₄ Cl [g/l]	Koncentrace xylózy [g/l]
1	20
1,5	10
3	5

Po přidání xylózy bylo do každé Erlenmayerovy baňky přeočkováno 5 ml *Schlegelelly thermodepolymerans*. Následovala kultivace po dobu 72 hodin při teplotě 50 °C.

4.2.1.2 Druhá kultivace

Jednotlivé kultury se lišily médiem, ve kterém rostly a taky dobou kultivace. Všechny kultivace byly prováděny v duplikátech. Kultivace byly v tomto experimentu navrženy za tím účelem, aby se získané kultury lišily množstvím akumulovaného PHB.

Bylo připraveno a vysterilizováno inokulum Nutrient Broth stejně jako u předchozího experimentu (4.2.1.1). Poté bylo v laminárním boxu do obou baněk naočkováno 750 µl kultury *Schlegelelly thermodepolymerans* a baňky byly ponechány 24 hodin při 50 °C kultivovat.

Další den bylo připraveno inokulum NB navážením 5 g tohoto inokula a rozpuštěním ve 200 ml destilované vody. Inokulum bylo přelito do dvou 250ml Erlenmayerových baněk. Dále bylo připraveno 400 ml minerálního média Chelatococ do 4 Erlenmayerových baněk. Po sterilizaci byla do všech 6 baněk přeočkována *Schlegelella thermodepolymerans*. Do 4 baněk obsahující minerální médium Chelatococ bylo přeočkování provedeno za stejných podmínek jako při První kultivace. Do baněk obsahující inokulum NB bylo přeočkováno pouze 5 ml *Schlegelelly thermodepolymerans*, nebyla přidána xylóza ani roztok stopových prvků TES II. Následovala kultivace při 50 °C.

Jedna kultura, která rostla v inokulu Nutrient Broth byla zpracována po 24 hodinách, druhá po 48 hodinách. Jedna kultura z minerálního média byla zpracována po 72 hodinách, druhá po 144 hodinách.

Z výsledků (Tab. 7) je patrné, že v tomto experimentu bylo dosaženo kultur jak s nízkým, tak s vysokým obsahem PHA. Takto optimalizované kultivační postupy byly následně použity pro přípravu zbývajících kultur pro následné fyzikálně-chemické a spektroskopické analýzy. Celkem bylo realizováno 7 kultivací.

4.3 Příprava vzorků na analýzy

4.3.1 Odměr biomasy a stanovení podílu sušiny

Z kultury bylo po kultivaci odebráno 10 ml do centrifugačních zkumavek, které byly odstředěny na centrifuze rychlostí 6 000 rpm po dobu 5 minut. Supernatant byl slit, biomasa promyta 5 ml destilované vody a znovu odstředěna. Supernatant byl opět slit a biomasa byla uložena do sušárny s teplotou 70 °C. Po vysušení byla sušina zvážena na analytických vahách. Získaná hmotnost tvořila podíl buněčné sušiny v 10 ml kultury.

4.3.2 Stanovení podílu PHA v biomase

Celková koncentrace P(3HB) v sušině byla stanovena pomocí plynové chromatografie s FID detekcí. Do vialek bylo naváženo přibližně 8 až 11 mg biomasy s přesností na 0,1 mg. Ke vzorkům byl přidán 1 ml chloroformu a 0,8 ml 15% H₂SO₄ v methanolu a vnitřním

standardem kyselinou benzoovou o koncentraci 5 g/ml. Vialky byly uzavřeny a následně umístěny do termobloku, který byl vyhřátý na 94 °C. Zde byly podrobeny esterifikaci po dobu 3 hodin.

Po esterifikaci byly vzorky převedeny do vialek o vyšším objemu a byly zneutralizovány v 0,5 ml 0,05 M NaOH. Celý objem byl protřepán. Pro analýzu bylo odebráno 50 µl spodní chloroformové fáze. Ke každému vzorku bylo přidáno 900 µl isopropanolu a vzorky byly analyzovány pomocí plynové chromatografie s FID detekcí.

4.3.3 Stanovení optické hustoty

Z paralelních kultur byly odebrány vzorky, které byly 50krát zředěny destilovanou vodou. Následně byla změřena absorbance při vlnové délce 630 nm. Pomocí této spektrometrické metody byl měřen nárůst biomasy pro obě produkční média. Hodnoty získané z paralelních kultur byly následně zprůměrovány.

4.3.4 Ramanova spektroskopie

Vysušená biomasa optimalizačních kultur připravená podle kapitoly 4.3.1 byla změřena pomocí Ramanovy spektroskopie. Na destičku byl do každé pozice vložen vzorek suché biomasy a vzorky byly změřeny pomocí Ramanovy spektroskopie.

4.3.5 Termogravimetrická analýza

Z kultury byly odebrány 2 ml do zkumavek Eppendorf, které byly následně odstředěny na centrifuze rychlostí 6 000 rpm po dobu 5 minut. Supernatant byl slit, biomasa promyta 2 ml destilované vody a znovu stočena. Po slití supernatantu byly vzorky proměřeny na TGA. Vzorky byly naneseny na platinovou pánvičku v množství cca 5 mg a vloženy do pece přístroje.

4.4 Stresové experimenty

Podle výsledků plynové chromatografie (Tab. 7) bylo zjištěno, která kultura poskytuje nejmenší a která největší množství PHA. Kultury těchto kultur byly podrobeny stresovým experimentům a následně proměřeny na FTIR.

4.4.1 Optimalizace stresových podmínek

4.4.1.1 Příprava fosfátového pufru 50mM, pH = 7,4

Fosfátový pufr byl připraven navážením 1,761 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ a 6,89 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Obě látky byly rozpuštěny ve 400 ml destilované vody. Po rozpuštění byl roztok přelit do odměrné baňky o objemu 1 000 ml a baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou. Po promíchání byl roztok přelit do regenerační láhve se šroubovacím závitem o objemu 1 000 ml.

4.4.1.2 Příprava KCl-HCl pufru a NaCl 200 g/l pufru

Bylo naváženo 7,45 g KCl, toto množství bylo následně rozpuštěno ve 200 ml destilované vody. Pomocí 3M kyseliny chlorovodíkové bylo pH roztoku upraveno na pH = 1. Roztok byl následně přelit do odměrné baňky o objemu 1 000 ml, baňka byla po rysku doplněna destilovanou vodou. Po promíchání byl roztok přelit do regenerační láhve se šroubovacím závitem o objemu 1000 ml.

Na osmotický stres bylo z fosfátového pufru odebráno 100 ml. V tomto objemu bylo rozpuštěno 20 g NaCl. Pufr byl přelit do regenerační láhve se šroubovacím závitem o objemu 100 ml.

4.4.1.3 Teplota

Z kultury bylo odebráno dvakrát 10 ml do dvou centrifugačních zkumavek. Následovala centrifugace při rychlosti 5 000 rpm po dobu 5 minut. Supernatant byl slit, do zkumavek bylo přidáno 10 ml fosfátového pufru, obsah zkumavek byl zhomogenizován na Vortexu a zkumavky byly znovu odstředěny na centrifuze. Tento postup byl zopakován dvakrát. Po zhomogenizování vzorku na Vortexu byly do 4 zkumavek Eppendorf pipetovány 2 ml tohoto roztoku. Dvě zkumavky Eppendorf byly ponechány 1,5 hodiny ve vodní lázni vyhřáté na 50 °C a další dvě 1,5 hodiny ve vyhřáté lázni na 80 °C. Po 1,5 hodině byly vzorky odstředěny na centrifuze při rychlosti 5000 rpm po dobu 5 minut a proměřeny na FTIR.

4.4.1.4 Osmotický stres

Z kultury bylo odebráno dvakrát 10 ml do dvou centrifugačních zkumavek. Následovala centrifugace při rychlosti 5 000 rpm po dobu 5 minut. Supernatant byl slit, do zkumavek bylo přidáno 10 ml fosfátového pufru, obsah zkumavek byl zhomogenizován na Vortexu a zkumavky byly znovu odstředěny na centrifuze. Supernatant byl opět slit, do jedné zkumavky bylo přidáno 10 ml fosfátového pufru, do druhé 10 ml NaCl 200 g/l pufru. Vzorek promytý v 10 ml fosfátového pufru byl použit jako pozitivní kontrola. Obsah zkumavek byl zhomogenizován a následně přelit do dvou 50ml Erlenmayerových baněk. Baňky byly umístěny do termostatu na 50 °C na 2 hodiny. Po 2 hodinách bylo z každé baňky odebráno 5 ml do centrifugační zkumavky a následovala centrifugace při rychlosti 5 000 rpm po dobu 5 minut. Supernatant byl slit, biomasa byla promyta 5 ml fosfátového pufru. Po odstředění na centrifuze byly vzorky proměřeny na FTIR.

4.4.1.5 pH = 1

Z kultury bylo odebráno dvakrát 10 ml do dvou centrifugačních zkumavek. Následovala centrifugace při rychlosti 5 000 rpm po dobu 5 minut. Supernatant byl slit, do zkumavek bylo přidáno 10 ml fosfátového pufru, obsah zkumavek byl zhomogenizován na Vortexu a zkumavky byly znovu odstředěny na centrifuze. Supernatant byl opět slit, do jedné zkumavky bylo přidáno 10 ml fosfátového pufru, do druhé 10 ml HCl-KCl pufru. Vzorek promytý v 10 ml fosfátového pufru byl použit jako pozitivní kontrola. Obsah zkumavek byl zhomogenizován a následně přelit do dvou 50ml Erlenmayerových baněk. Baňky byly umístěny do termostatu na 50 °C na 2 hodiny. Po 2 hodinách bylo z každé baňky odebráno 5 ml do centrifugační zkumavky a následovala centrifugace při rychlosti 5 000 rpm po dobu 5 minut. Supernatant byl slit, biomasa byla promyta 5 ml fosfátového pufru. Po odstředění na centrifuze byly vzorky proměřeny na FTIR.

4.4.2 Finální stresové experimenty

Podle výsledků výše popsaných experimentů (výsledky uvedeny v kapitole 5.4.1) byl z testovaných faktorů pro podrobnější studium zvolen teplotní stres. Následně byly postupně upravovány dílčí experimentální podmínky tak, aby se prostudoval jejich vliv na krystalizaci PHB v biomase.

4.4.2.1 Různá teplota

Kultury obsahující vysoké množství PHB.

Z kultury bylo odebráno dvakrát 10 ml do dvou centrifugačních zkumavek. Následovala centrifugace při rychlosti 5 000 rpm po dobu 5 minut. Supernatant byl slit, do zkumavek bylo přidáno 10 ml fosfátového pufru. U páté a šesté kultivace byl pufr nahřát na 50 °C. Obsah zkumavek byl zhomogenizován na Vortexu a zkumavky byly znovu odstředěny na centrifuze. Tento postup byl zopakován dvakrát. Po zhomogenizování vzorku na Vortexu byly do 2 zkumavek Eppendorf pipetovány 2 ml tohoto roztoku. Zkumavky Eppendorf byly ponechány 1,5 hodiny ve vodní lázni vyhřáté na 50 °C. Po 1,5 hodině byly vzorky odstředěny na centrifuze při rychlosti 5000 rpm po dobu 5 minut a proměřeny na FTIR. Stejný způsob byl zopakován ještě třikrát, jen byla změněna teplota vodní lázně na 60; 70 a 80 °C.

4.4.2.2 Temperování pufru

Postup byl analogický s předešlou kapitolou 4.4.2.1, s tím rozdílem, že fosfátový pufr byl temperován na 50 °C.

4.4.2.3 Vysušení vzorků

Z kultury bylo odebráno dvakrát 10 ml do dvou centrifugačních zkumavek. Následovala centrifugace při rychlosti 5 000 rpm po dobu 5 minut. Supernatant byl slit, do jedné zkumavky bylo přidáno 10 ml vody, do druhé 10 ml fosfátového pufru. Obsah zkumavek byl zhomogenizován na Vortexu a zkumavky byly znovu odstředěny na centrifuze. Tento postup byl zopakován dvakrát. Po zhomogenizování vzorku na Vortexu byly do 2 zkumavek Eppendorf pipetovány 2 ml buněčné kultury rozsuspendované ve vodě, do dalších dvou suspendované ve fosfátovém pufru. Zkumavky Eppendorf byly ponechány 1,5 hodiny ve vodní lázni vyhřáté na 50 °C. Po 1,5 hodině byly vzorky odstředěny na centrifuze při rychlosti 5000 rpm po dobu 5 minut. Supernatant byl slit a usazená biomasa z jedné zkumavky byla sušena na laboratorním podložním sklíčku a druhá při 50 °C. Stejně bylo postupováno i s biomasou rozsuspendovanou ve vodě. Následně byly vzorky proměřeny na FTIR. Celý postup byl zopakován ještě třikrát, pouze byla změněna teplota vodní lázně na 60; 70 a 80 °C.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

Cílem bakalářské práce bylo na základě literární rešerše navrhnout a otestovat metody vhodné pro charakterizaci extrémofilních bakterií produkujících PHA, především vyzkoušet jejich využitelnost pro stanovení množství a chemické, respektive fyzikálně-chemické kvality PHA obsaženého v bakteriálních buňkách. Na základě literární rešerše byly vybrány 3 hlavní metody, a to termogravimetrická analýza (pro analýzu intracelulární vody), Ramanova spektroskopie a infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (pro analýzu akumulovaného PHA).

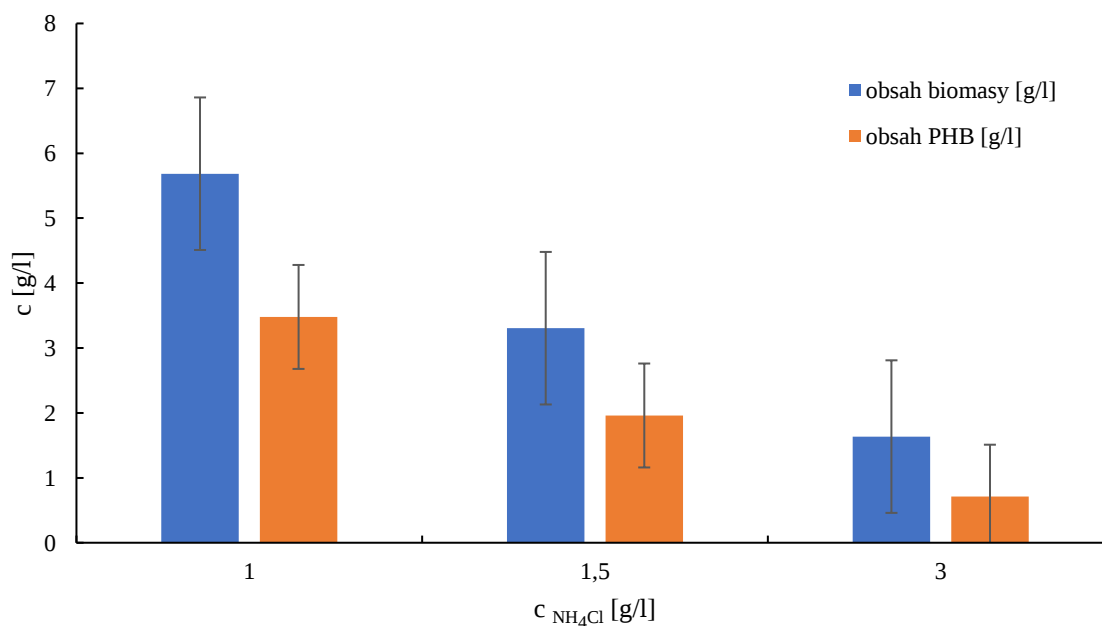
5.1 Optimalizace kultivačních podmínek

Schlegelella thermodepolymerans byla připravena při první kultivaci (experimentální podmínky popsány v kapitole 4.2.1.1) ve třech různých kultivačních médiích, která se lišila přidavkem xylózy a koncentrací NH_4Cl . Tabulka s těmito hodnotami je v kapitole 4.2.1.1. Rozdílné podmínky způsobily, že se bakterie lišily nejen v růstu, což dokazuje měření optické hustoty, ale i v množství vyprodukovaných PHB granulí.

Tab. 5 Optická hustota podle koncentrace NH_4Cl

Koncentrace NH_4Cl [g/l]	OD
1	$21,45 \pm 0,45$
1,5	$11,88 \pm 0,38$
3	$5,85 \pm 0,15$

Postup měření optické hustoty vzorků je uveden v kapitole 4.3.3. Po změření vzorků byly hodnoty absorbance upraveny na neředěný vzorek (vynásobení $50\times$) a byly zprůměrovány, byla vypočtena směrodatná odchylka. Jak je vidět v tabulce (Tab. 5), nejvyšší nárůst biomasy byl pozorován u kultivačního média, které obsahovalo 1 g/l chloridu amonného a nejvyšší koncentraci xylózy, tedy 20 g/l. Obsah PHA byl stanoven pomocí plynové chromatografie. Příprava vzorků na plynový chromatograf je popsána v kapitole 4.3.2.



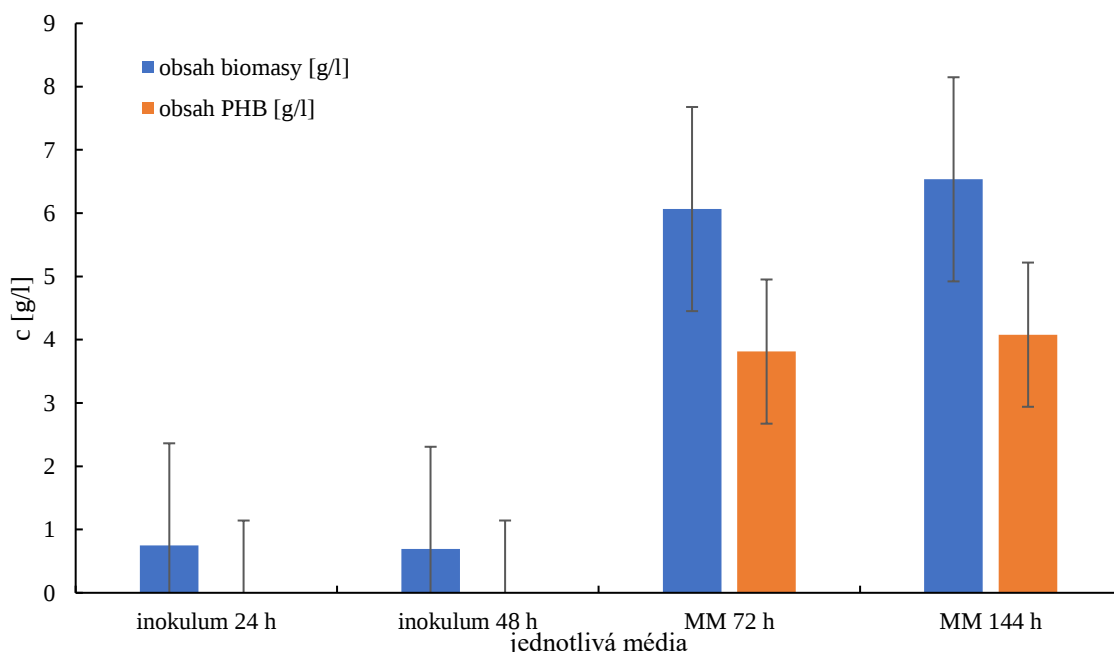
Graf 1 Obsah PHB v biomase podle koncentrace NH_4Cl

Tab. 6 Obsah biomasy a PHB v produkčních médiích první kultivace

	Obsah biomasy [g/l]	Obsah PHB [g/l]	Obsah PHB [%]
1 g/l NH ₄ Cl	5,7 ± 0,3	3,5 ± 0,2	59,9 ± 0,6
1,5 g/l NH ₄ Cl	3,3 ± 0,3	1,96 ± 0,04	61,2 ± 0,5
3 g/l NH ₄ Cl	1,64 ± 0,03	0,709 ± 0,002	43,4 ± 0,7

Výsledky plynové chromatografie potvrdily, že kultura obsahující 1 g/l chloridu amonného dosáhla nejvyššího nárůstu biomasy. Stejně tak měla i nejvyšší obsah PHB granulí. Pro další kultivace bylo tedy vybráno kultivační médium o koncentraci chloridu amonného 1 g/l a koncentraci xylózy 20 g/l.

Cílem druhé kultivace (postup popsán v kapitole 4.2.1.2) bylo připravit kulturu s vysokým, a naopak s nízkým obsahem PHB. Toho bylo docíleno pomocí 2 různých médií a taky různých časů zpracování kultury. U kultury s nízkým obsahem PHB byla *Schlegelella thermodepolymerans* zaočkována do inokula NB a po 24 hodinách přeočkována do dalšího inokula NB. Následně byla jedna kultura zpracována po 24 hodinách a druhá po 48 hodinách kultivace. U kultury s vysokým obsahem PHB byla *Schlegelella thermodepolymerans* zaočkována do inokula NB, po 24 hodinách byla přeočkována do minerálního média Chelatococ a bylo přidáno 5 ml xylózy a 0,1 ml roztoku stopových prvků TES II. Jedna kultura byla zpracována po 72 hodinách, druhá po 144 hodinách kultivace.



Graf 2 Obsah PHB v biomase podle média a času kultivace

Podle očekávání je obsah PHB u inokula NB téměř nulový. Je to z důvodu vysoké koncentrace dusíku a nepřítomnosti zdroje cukru. Stejně tak byl nízký obsah biomasy. Naopak kultura z minerálního média má vysoký obsah biomasy i PHB.

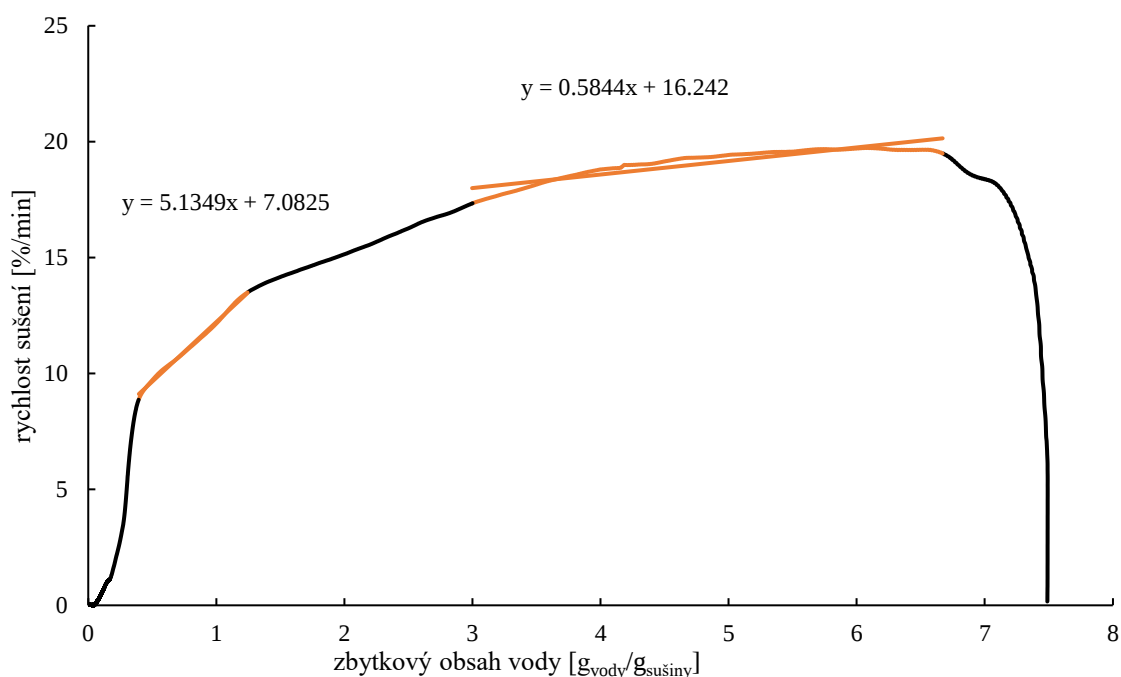
Tab. 7 Obsah biomasy a PHB v produkčních médiích

	Obsah biomasy [g/l]	Obsah PHB [g/l]	Obsah PHB [%]
inokulum NB 24 hodin	$0,75 \pm 0,00$	$0,0028 \pm 0,0003$	$0,368 \pm 0,003$
inokulum NB 48 hodin	$0,70 \pm 0,04$	$0,0032 \pm 0,0002$	$0,453 \pm 0,002$
minerální médium 72 hodin	$6,07 \pm 0,02$	$3,81 \pm 0,06$	$62,86 \pm 0,06$
minerální médium 144 hodin	$6,54 \pm 0,06$	$4,08 \pm 0,12$	$62,43 \pm 0,12$

Jak je vidět v tabulce (Tab. 7) pomocí optimalizace kultivačních podmínek byly připraveny kultury obsahující jak nízký, tak vysoký obsah PHB.

5.2 Termogravimetrická analýza

Měření TGA metodou probíhalo na termogravimetrickém analyzátoru TGA 5500 na platinových pánvičkách v inertním prostředí dusíku. Vzorky byly měřeny izotermicky při teplotě 70 °C po dobu 40 minut. V průběhu měření docházelo k úbytku hmotnosti způsobeného ztrátou vody. Po 40 minutách byla teplota zvýšena na 200 °C a měření probíhalo dalších 5 minut, aby byla zjištěna hmotnost sušiny biomasy. Z ní pak byla vypočtena celková hmotnost vody na začátku měření.

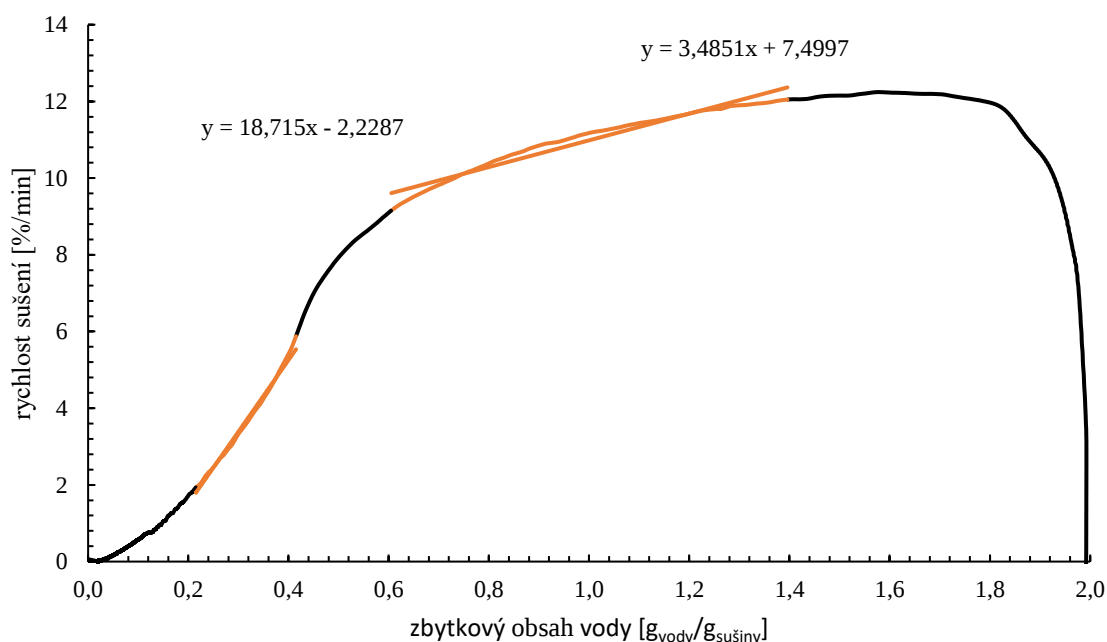


Graf 3 Závislost rychlosti sušení na zbytkovém obsahu vody u vzorku bez PHB

Graf 3 ukazuje průběh měření vzorku, který neobsahoval téměř žádné PHB. Sušící křivka je zobrazena jako závislost okamžité rychlosti sušení (časová derivace úbytku hmotnosti) na relativním obsahu vody ve vzorku (relativně v gramech vody na gram sušiny). Časový průběh

experimentu odpovídá směru interpretace křivky zprava doleva (ve směru poklesu relativního množství vody ve vzorku). První fáze poklesu hmotnosti nastává na začátku měření, kdy dochází k odpařování volné extracelulární vody, pokles se zdá být mírný. Druhý pokles hmotnosti je prudší, dochází k odpařování v buňkách vázané intracelulární vody.

Oba tyto poklesy byly ve vybraném reprezentativním úseku (odpovídajícím výše zmíněným dvěma fázím sušení vzorku) proloženy přímkou a z průsečíku regresních přímek byl vypočten obsah intracelulární vody na gram sušiny. Výsledky zobrazuje tabulka *Tab. 8*.

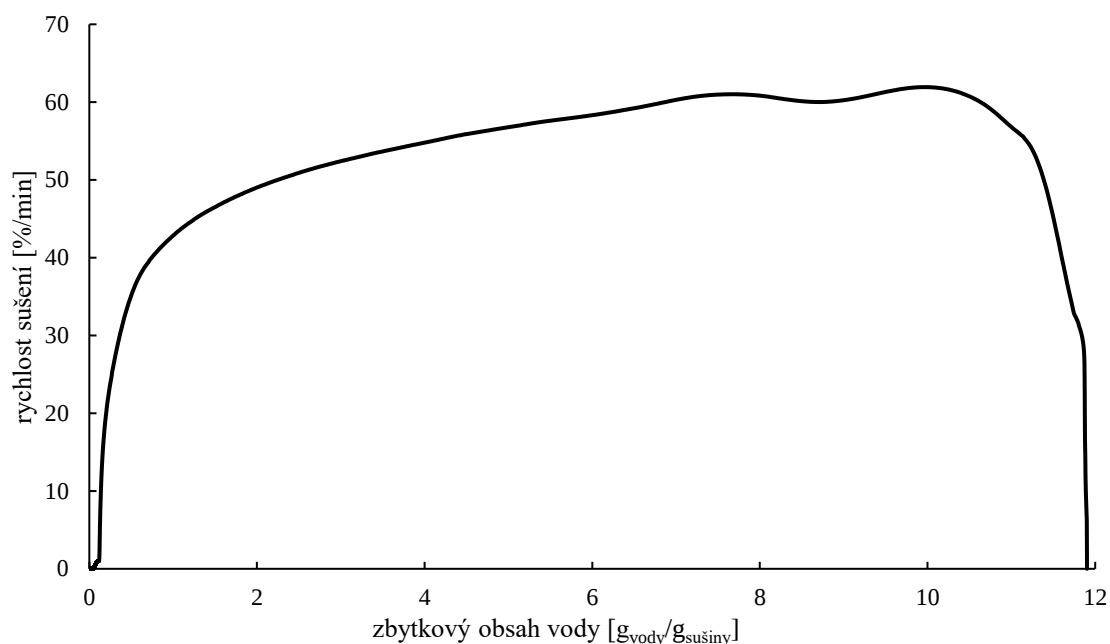


Graf 4 Závislost rychlosti sušení na zbytkovém obsahu vody u vzorku s PHB

V *Grafu 4* můžeme vidět průběh měření vzorku s PHB. Průběh se zdá být velmi podobný jako u vzorku bez PHB, avšak když se podíváme pozorněji, můžeme vidět rozdíl v hodnotě počátečního obsahu vody. Tento rozdíl je způsoben obsahem granulí PHB v buňkách bakterie. Ty způsobují, že buňka obsahuje menší množství vody. Oba poklesy hmotnosti byly opět proloženy přímkou a z průsečíku regresních přímek byl vypočten obsah intracelulární vody na gram sušiny.

Tab. 8 Výsledný obsah intracelulární vody na gram sušiny pro oba vzorky

Vzorek	Obsah vody [$\text{g}_{\text{vody}}/\text{g}_{\text{sušiny}}$]
bez PHB	2,013
s PHB	0,64



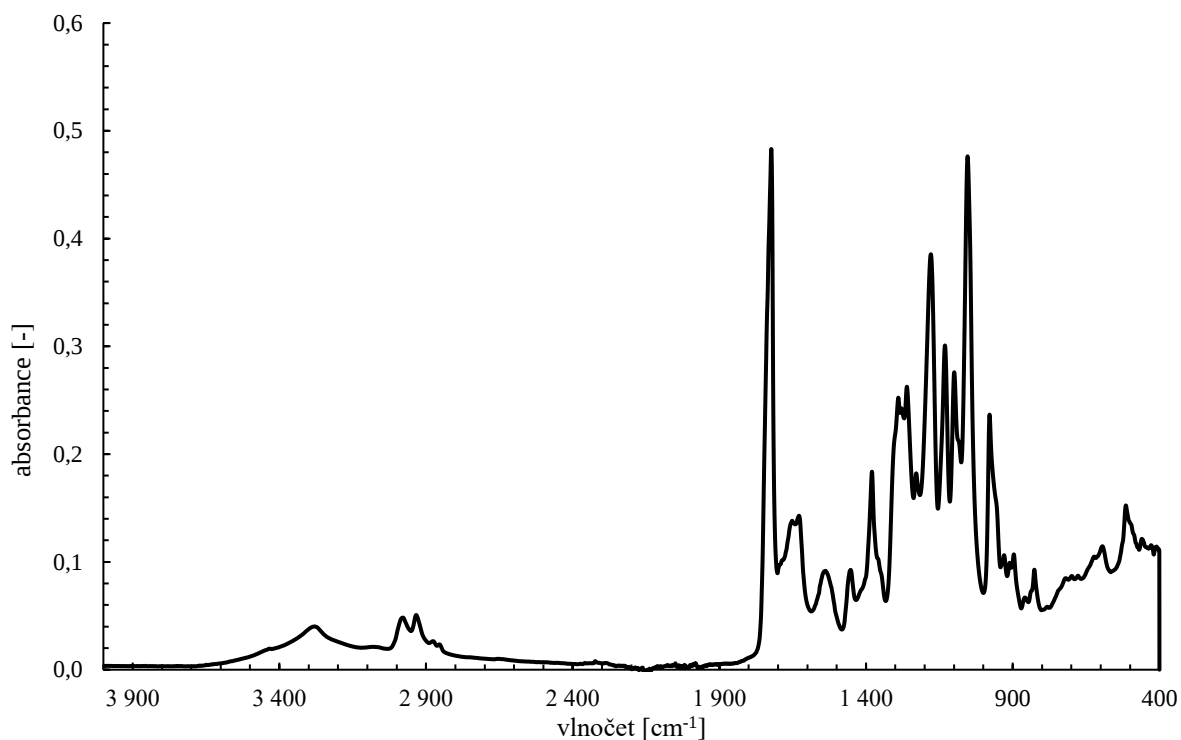
Graf 5 Závislost rychlosti sušení na zbytkovém obsahu vody u rozmraženého vzorku bez PHB

Graf 5 zobrazuje průběh měření vzorku bez PHB, který byl připraven podle postupu v kapitole 4.3.5 a následně byl zamražen. Před samotným termogravimetrickým měřením byl rozmražen a měřen na platinové pánvičce. Jak je vidět, nedochází zde ke dvěma typickým zlomům v průběhu měření, které jsou charakteristické pro odpařování volné extracelulární a vázané intracelulární vody. Už na počátku měření byl obsah vody ve vzorku velmi vysoký, zároveň i rychlost sušení byla v celém průběhu experimentu výrazně vyšší než u vzorků čerstvě připravených buněčných kultur. Zmražením vzorků se pravděpodobně porušila intaktnost membrány bakteriální buňky. Díky tomu není buňka schopna udržet si intracelulární vodu. Ta je pak odpařována ve formě vody extracelulární.

Termogravimetrie se ukázala jako použitelná metoda na stanovení obsahu intracelulární vody u analyzované termofilní bakterie, a to se zohledněním vlivu přítomnosti akumulovaného PHA. Jak se ukázalo, je ovšem nutno dbát na to, aby byla měřena čerstvá biomasa, nikoliv zamražená. Buňky pak ztrácí intaktnost membrány.

5.3 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

Touto metodou byly měřeny tři druhy vzorků. První byla měřena suchá biomasa, která byla připravena podle postupu v kapitole 4.3.1. Druhý typ vzorků byl měřen po odebrání z média a stresových experimentech a sušen přímo na ATR krystalu v průběhu měření. To mělo zabránit případné krystalizaci vzorku během sušení při vyšší teplotě. Jako třetí byly měřeny vzorky, které byly podrobeny teplotnímu stresu, vysušeny při laboratorní teplotě nebo teplotě 50 °C, a následně ve formě sušiny měřeny na ATR krystalu. Výsledná spektra jsou sestavena z hodnot v čase 90 minut (konec měření) pokud není uvedeno jinak.



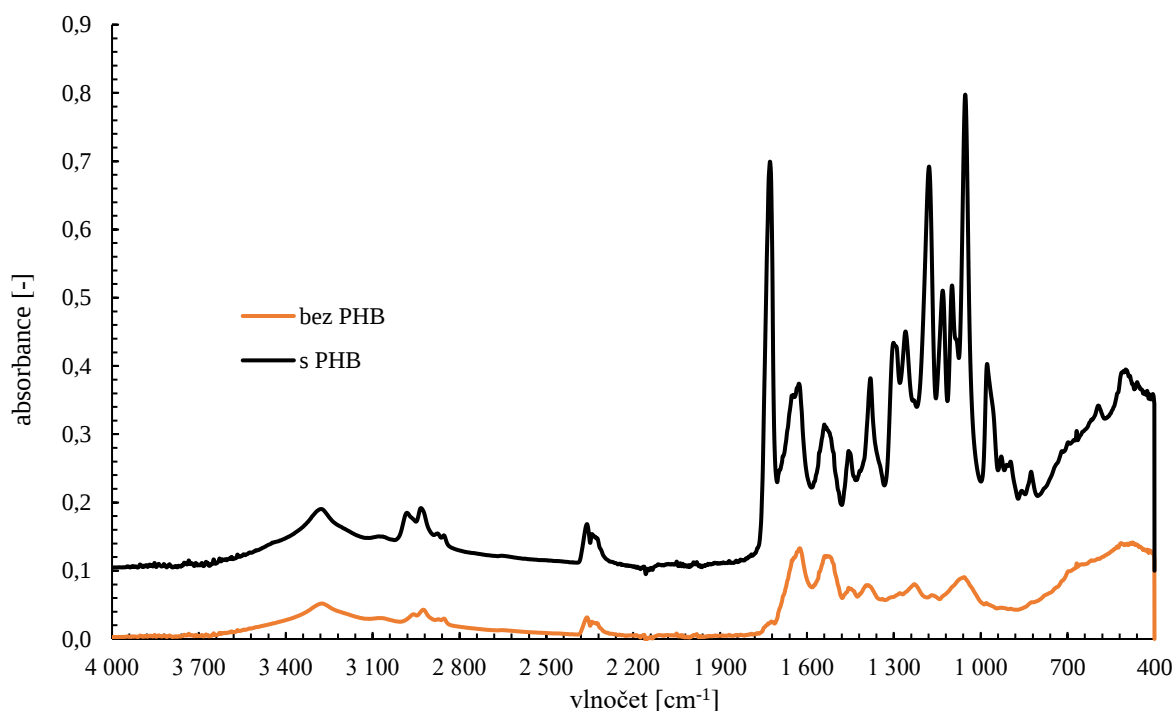
Graf 6 FTIR spektrum pro suchou biomasu s PHB

Graf 6 představuje FTIR spektrum vzorku suché biomasy. První absorpční pás při vlnočtu 3 400 až 3 200 cm^{-1} představuje valenční vibraci OH skupin s příspěvkem N-H valenční vibrace amidových skupin okolo 3 300 cm^{-1} . Charakteristické absorpční pásy PHB se soustředí okolo vlnočtů 1 800 a 1 200 cm^{-1} (valenční vibrace C=O při 1 740 – 1 720 cm^{-1} , valenční vibrace C - C-O a C-O-C při 1 227 resp. 1 180 cm^{-1} , deformační vibrace C-C-O při 1 278 cm^{-1}). Dvojice absorpčních píků při 1 640 a 1 540 cm^{-1} představuje amidové vazby proteinů (tzv. Amid I a Amid II pásy). Od vlnočtu 1 100 cm^{-1} se projevuje C-vazba. Jak je známo [68] FTIR signál PHA je citlivý ke změnám krystalinity polymeru (např. deformace tvaru pásu C=O valenční vibrace, specifické pásy krystalického PHA při 1 227 a 1 278 cm^{-1} , preferenční příspěvek amorfních PHA struktur k pásu při 1 180 cm^{-1}). FTIR je tedy metoda vhodná nejen pro identifikaci PHB v biomase a semikvantitativnímu určení jeho obsahu, ale také k posouzení, nakolik je vzorek amorfní či krystalický.

V případě spektra uvedeného v *Graf 6* si lze všimnout, že není pík v oblasti C=O valenční vibrace (1 740 – 1 720 cm^{-1}) zcela symetrický. Zároveň jsou přítomny pásy při 1 278 a 1 227 cm^{-1} . Vzorek je tedy krystalický.

5.3.1 Měření suché biomasy

Jako první byla měřena suchá biomasa první i druhé optimalizační kultivace. Vybraný kousek biomasy byl umístěn na ATR krystal a byl změřen pomocí spektrometru Nicolet iS50 v rozsahu spektra 400-4000 cm^{-1} . Každý vzorek byl změřen třikrát. Výsledná spektra byla použita pro sledování obsahu PHB v jednotlivých vzorcích ještě před tím, než byl znám výsledek plynové chromatografie.



Graf 7 FTIR spektrum pro suchou biomasu - srovnání vzorku bez PHB a s PHB

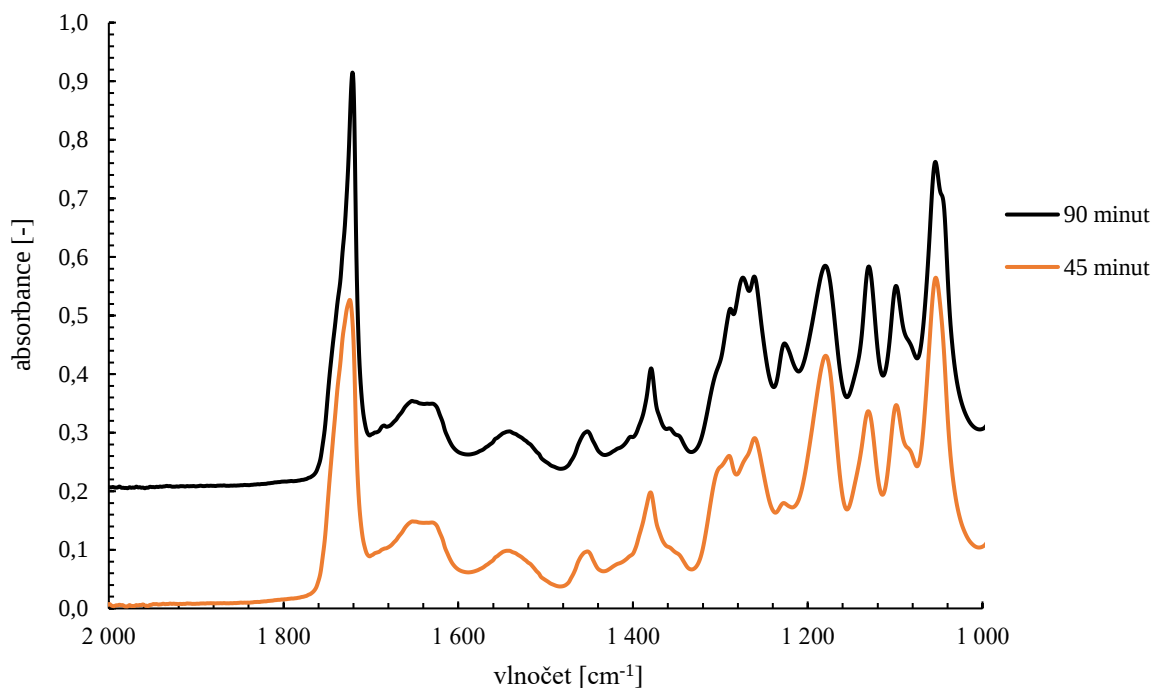
Při porovnání výsledných FTIR spekter obou vzorků (*Graf 7*) si lze všimnout, že v záznamu pro vzorek bez PHB chybí v oblasti $1\ 800$ a $1\ 180\text{ cm}^{-1}$ signál charakteristický pro PHB. Kultivace tedy byla úspěšná a kultura neobsahovala téměř žádné PHB. Pík charakterizující krystalinitu u vzorku s PHB není zcela symetrický, tudíž vzorek vykazuje mírnou krystalizaci. Suchá biomasa byla sušena v termostatu při teplotě 70 °C , což mohlo přispět ke krystaličnosti vzorků. Z toho důvodu bylo vyzkoušeno sušit vzorky při laboratorní teplotě přímo na ATR krystalu. Na obou spektrech je viditelný pík v oblasti od $2\ 400\text{ cm}^{-1}$. Ten je způsoben podmínkami laboratoře, konkrétně zvýšenou koncentrací oxidu uhličitého. FTIR metoda je tedy velmi citlivá i na prostředí, ve kterém je spektrum měřeno.

5.4 Stresové experimenty

Po změření suché biomasy byly provedeny stresové experimenty viz kapitola 4.4.

5.4.1 Optimalizace stresových podmínek

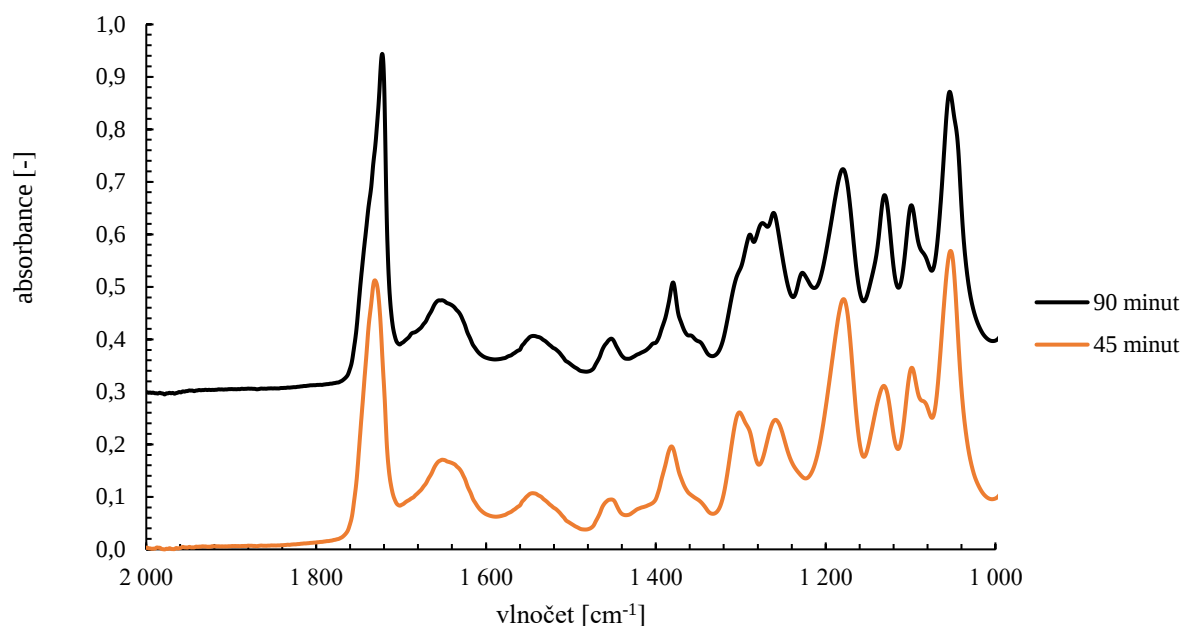
5.4.1.1 Teplota



Graf 8 FTIR spektrum pro měření teplotního stresu - dva různé časy

Graf 8 zobrazuje výsledná FTIR spektra pro vzorky, které byly podrobené teplotnímu stresu. Spektra byla pro přehlednost a možnost porovnávání posunutá po ose y. V grafu je také vidět pouze část spektra (2 000 až 1 000 cm^{-1}). V grafu jsou vyobrazena 2 spektra. První spektrum je v čase 45 minut, kdy byl vzorek již suchý a vykazoval pouze mírnou krystalizaci. Při pohledu na druhé spektru, které je v čase 90 minut (konec měření), lze říci, že byl vzorek již výrazně krystalický (viz deformace píku při 1720 cm^{-1} , zesílení signálu při 1 227 a 1 278 cm^{-1}).

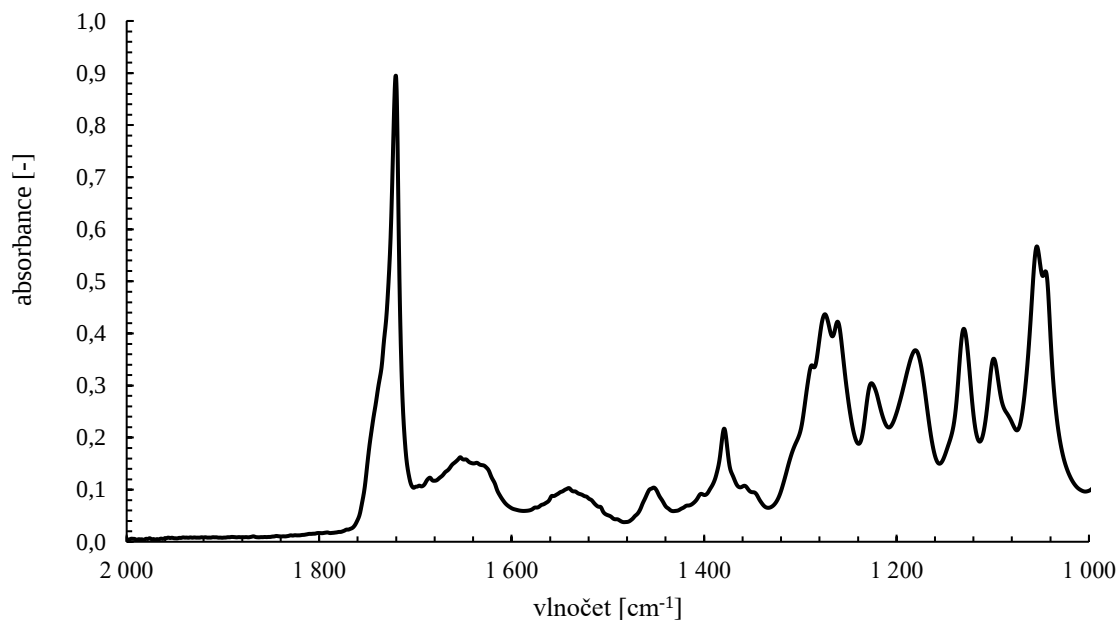
5.4.1.2 Osmotický stres



Graf 9 FTIR spektrum pro měření osmotického stresu - dva různé časy

V Grafu 9 je vidět velmi podobný výsledek. V čase 45 minut byl vzorek plně amorfní. V dalším průběhu měření však zkrystalizoval. To mohlo být způsobeno sušením vzorku na ATR krystalu při laboratorní teplotě. Struktura PHB v biomase je tedy citlivá také na zvýšenou koncentraci soli. V Graf 10 je výsledné spektrum pro stres pH = 1 v čase 90 minut. Vzorek byl krystalický.

5.4.1.3 Expozice kyselému prostředí



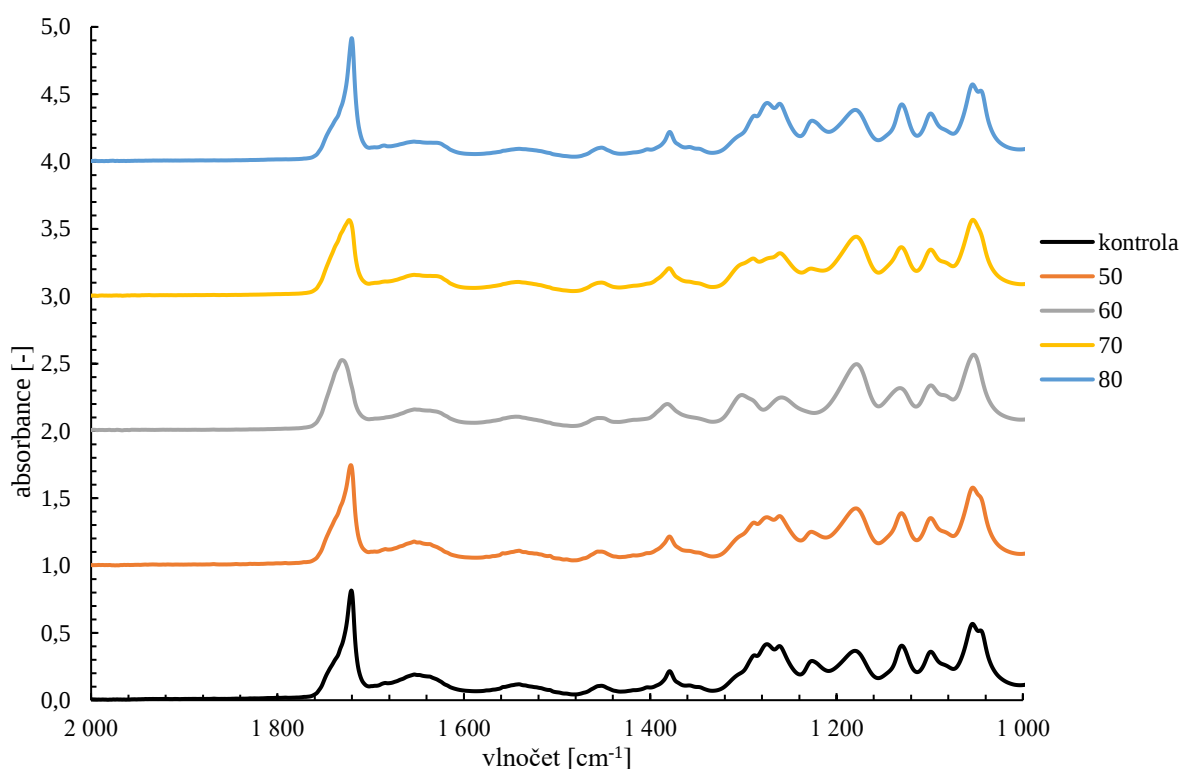
Graf 10 FTIR spektrum pro měření stresu pH = 1

5.4.2 Finální stresové experimenty

Vzhledem k povaze studované bakterie, která preferuje při svém růstu vyšší teploty, a také vzhledem k výsledkům optimalizačních stresových experimentů, kdy na konci měření byly všechny vzorky krystalické, bylo jako finální experiment navrženo podrobnější studium expozice vyšší teplotě.

5.4.2.1 Různá teplota

Postup přípravy vzorků je popsán v kapitole 4.4.2.1. Vzorky byly po temperaci pomocí kapátka umístěny na ATR krystal a bylo provedeno měření po dobu 90 minut. Vzorek byl sušen samovolně v průběhu měření. Měřený vzorek obsahoval vysoký obsah PHB.



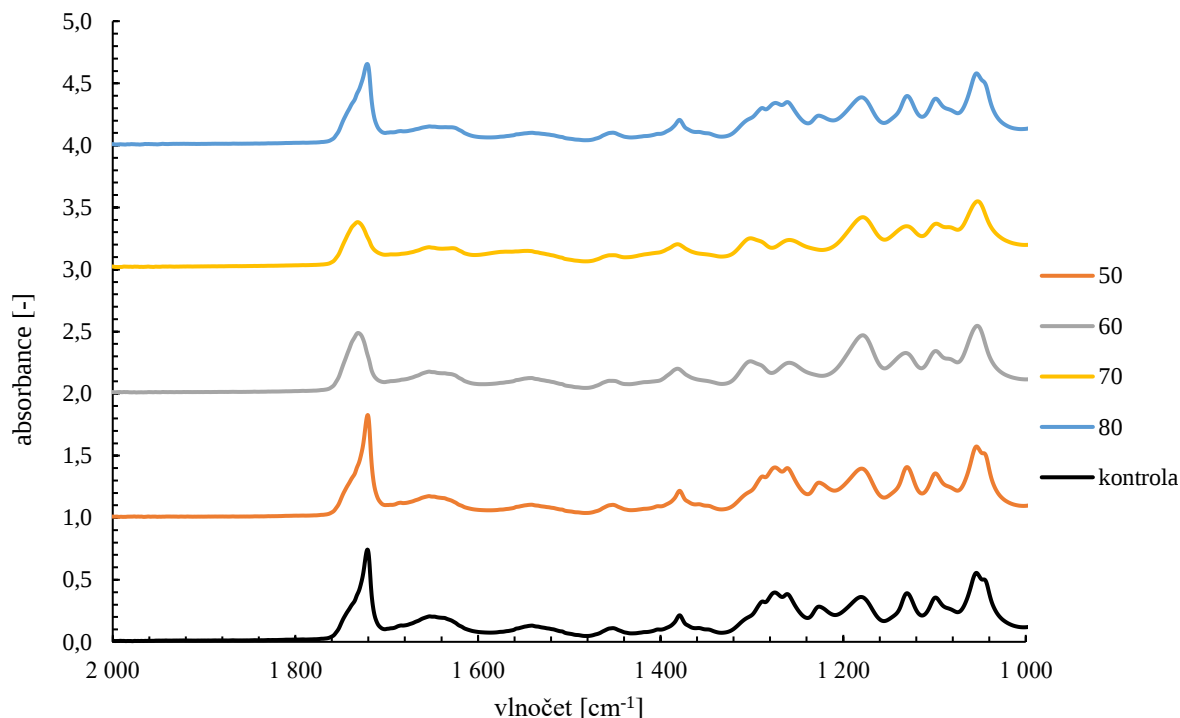
Graf 11 FTIR spektra pro vzorek s PHB - porovnání teplot

Graf 11 zobrazuje část jednotlivých FTIR spekter, která byla pro přehlednost a možnost porovnávání posunutá po ose y. V grafu je také vidět pouze část spektra (2 000 až 1 000 cm⁻¹). U spektra pro vzorek, který sloužil jako kontrola, která byla měřena hned po odstředění a nebyla nijak temperovaná, se projevila krystalizace. Stejně tak je tomu u vzorků, které byly temperované 1,5 hodiny ve vodní lázni na 50; 70 a 80 °C. Jediný vzorek, který nezkrytalizoval, byl vzorek temperovaný při 60 °C. U teploty 70 °C byly projevy krystalizace slabší než u 50 resp. 80 °C. Celá spektra se nachází v příloze (Obrázek 5).

Vzhledem ke zkrystalizování téměř všech vzorků, bylo vyzkoušeno temperování pufru na 50 °C v domněnku, že krystalizace mohla být způsobena vystavením termofilní buněčné kultury studenému pufru v průběhu přípravy vzorku pro analýzu. 50 °C je optimální kultivační teplota pro *Schlegelella thermodepolymerans*.

5.4.2.2 Temperování pufru

Postup přípravy vzorků je popsán v kapitole 4.4.2.2. Vzorek obsahoval vysoký obsah PHB.



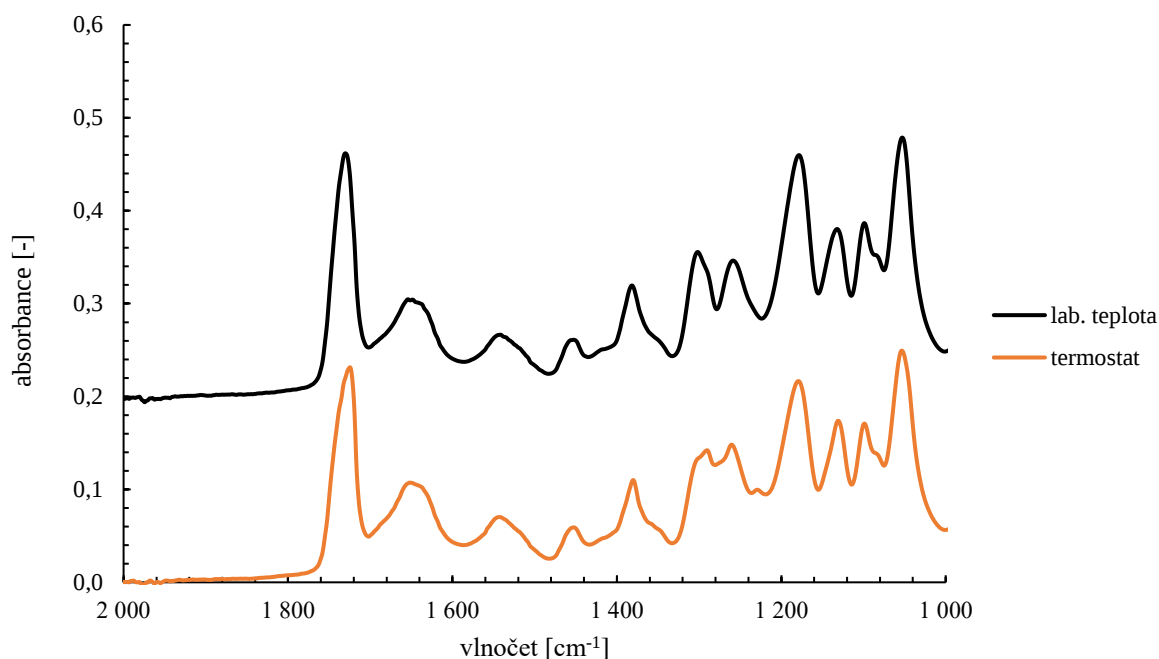
Graf 12 FTIR spektra pro vzorek s PHB při temperování pufru - porovnání teplot

V Graf 12 jsou vyobrazená FTIR spektra pro vzorky, které byly promývány fosfátovým pufrům temperovaným na 50 °C. Kontrola byla opět krystalická, stejně tak vzorek temperovaný ve vodní lázni vyhřáté na 50 a 80 °C. Změna nastává u vzorku temperovaného při 70 °C, kde nedochází ke krystalizaci. Stejně tak není krystalický ani vzorek temperovaný při 60 °C. Při bližším porovnání vzorku temperovaného při 50 °C a vzorku kontroly je vidět, že spektra jsou téměř shodná (Obrázek 7) v příloze. Podle spekter lze říci, že teplota pufru nemá na krystalizaci vzorků téměř žádný vliv. Na druhou stranu se i v tomto experimentu potvrdil velice zajímavý fenomén, kdy vliv teploty na krystalinitu PHB v biomase vykazoval charakter „U – závislosti“, nejnižší a nejvyšší testované teploty indukovaly krystalizaci PHB, zatímco střední testované teploty (60, 70 °C), které byly ovšem nad kultivačním optimem dané bakterie, zachovávaly PHB v nativní amorfní formě.

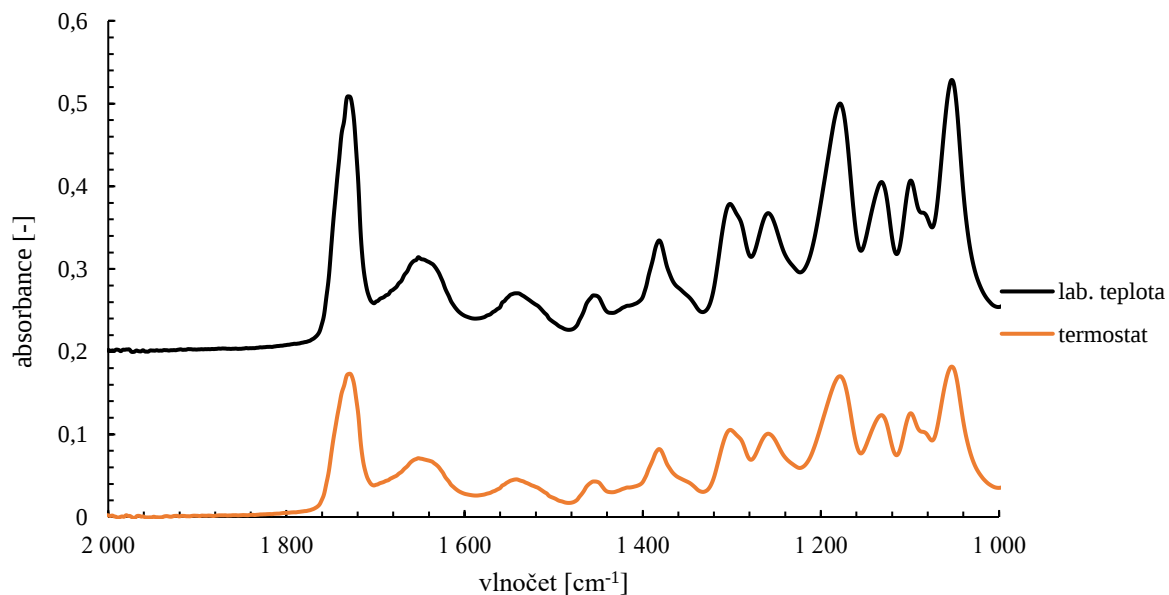
5.4.2.3 Vysušení vzorků

Poslední faktor, který by mohl ovlivňovat krystalizaci vzorků, bylo sušení na ATR krystalu při laboratorní teplotě. Jak bylo zmíněno výše, optimální teplota pro *Schlegelella thermodepolymerans* je 50 °C. Proto byla v posledním experimentu měřena suchá biomasa. Ta byla po odstředění na centrifuze a stresovém experimentu sušená v Petriho misce buď v termostatu vyhřátém na 50 °C, nebo při laboratorní teplotě. Taky byl vzorek promyt buď v destilované vodě, nebo ve fosfátovém pufru, a to z toho důvodu, aby byl vyloučen fosfátový pufr jako původce krystalizace.

Vzorek kontroly sušené při laboratorní teplotě (*Graf 13*) nejeví známky krystalizace, což vylučuje, že by laboratorní teplota při sušení na ATR krystalu způsobovala krystalizaci. Naopak vzorek sušený při 50 °C vykazuje známky krystalizace.



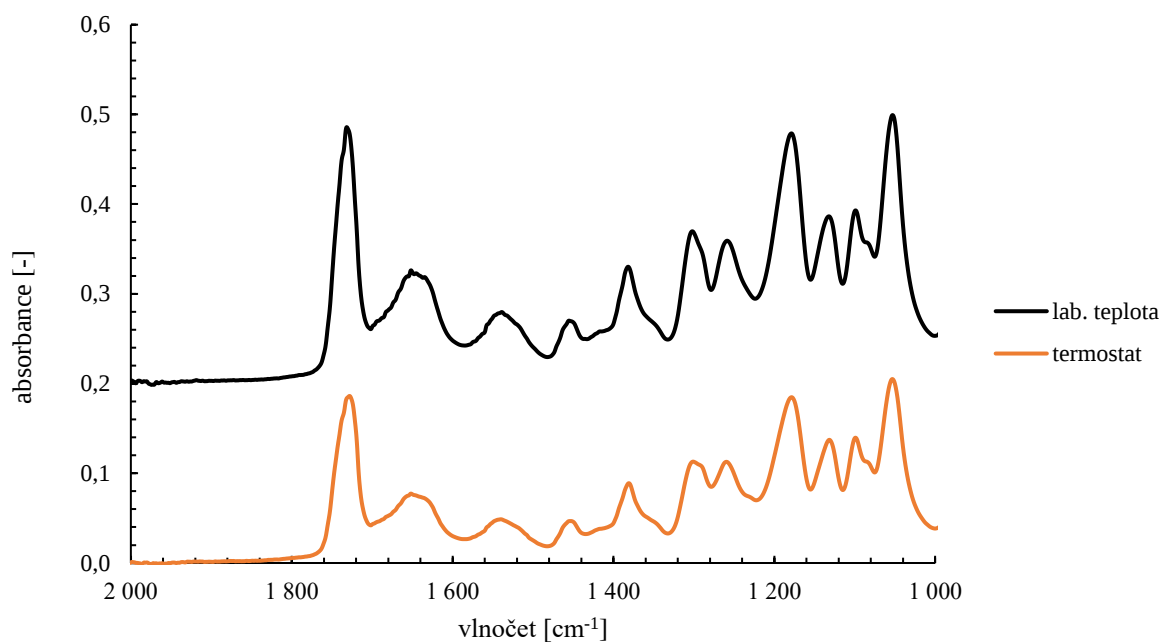
Graf 13 FTIR spektra pro kontrolu promývanou pufrem – sušení vzorků



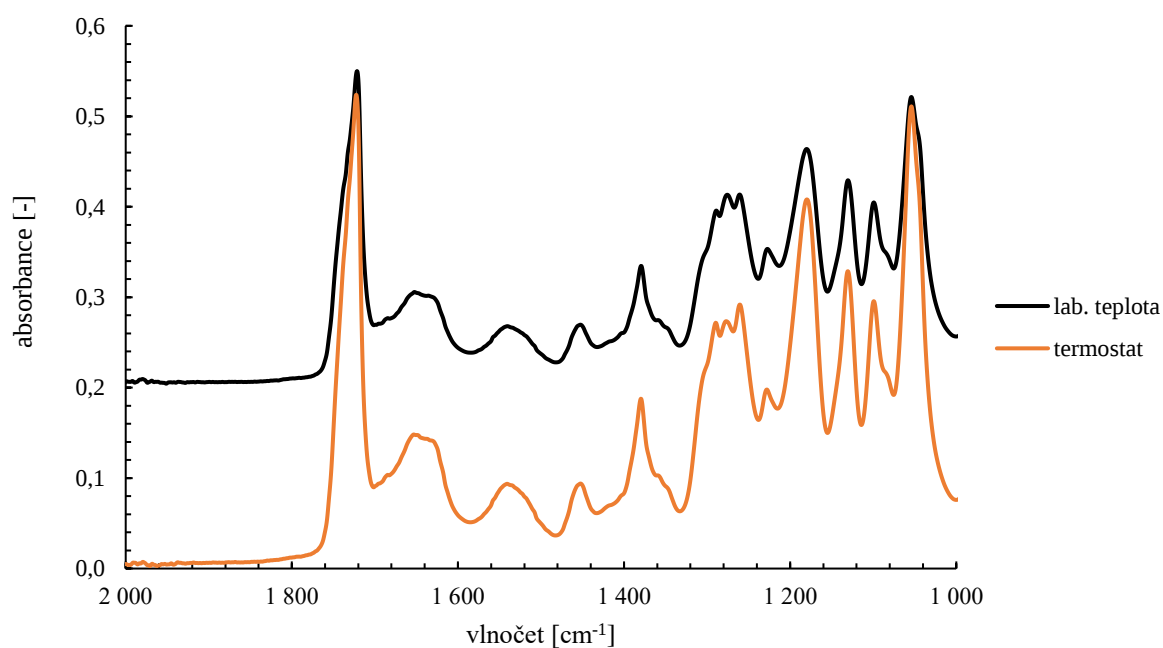
Graf 14 FTIR spektra pro 50 °C promývaný pufrem – sušení vzorků

U vzorku temperovaného ve vodní lázni vyhřáté na 50 °C (*Graf 14*) nejeví známky krystalizace ani jeden ze vzorků, jsou tedy amorfni. Stejně tak je tomu u vzorků temperovaných při 60 a 70 °C (*Obrázek 8* a *Obrázek 9* v příloze). U 80 °C (*Obrázek 10*) je to přesně naopak než v případě kontroly. Vzorek sušený při laboratorní teplotě je krystalický a vzorek sušený

v termostatu je amorfní. Spektra posledních tří teplot jsou v příloze. Ani pufr tedy nebyl původcem krystalizace vzorků.



Graf 15 FTIR spektra pro 50 °C promývaný vodou – sušení vzorků



Graf 16 FTIR spektra pro 60 °C promývaný vodou – sušení vzorků

To potvrdily i výsledky vzorků promývaných vodou. Vzorky temperované při 50 °C (Graf 15) je v obou případech amorfní. Amorfní byl i při promývání puforem.

Graf 16 představuje vzorek temperovaný při 60 °C. Oba způsoby sušení, jak při laboratorní teplotě, tak v termostatu, vykazují patrnou krystalinitu. Vzorek promývaný puforem,

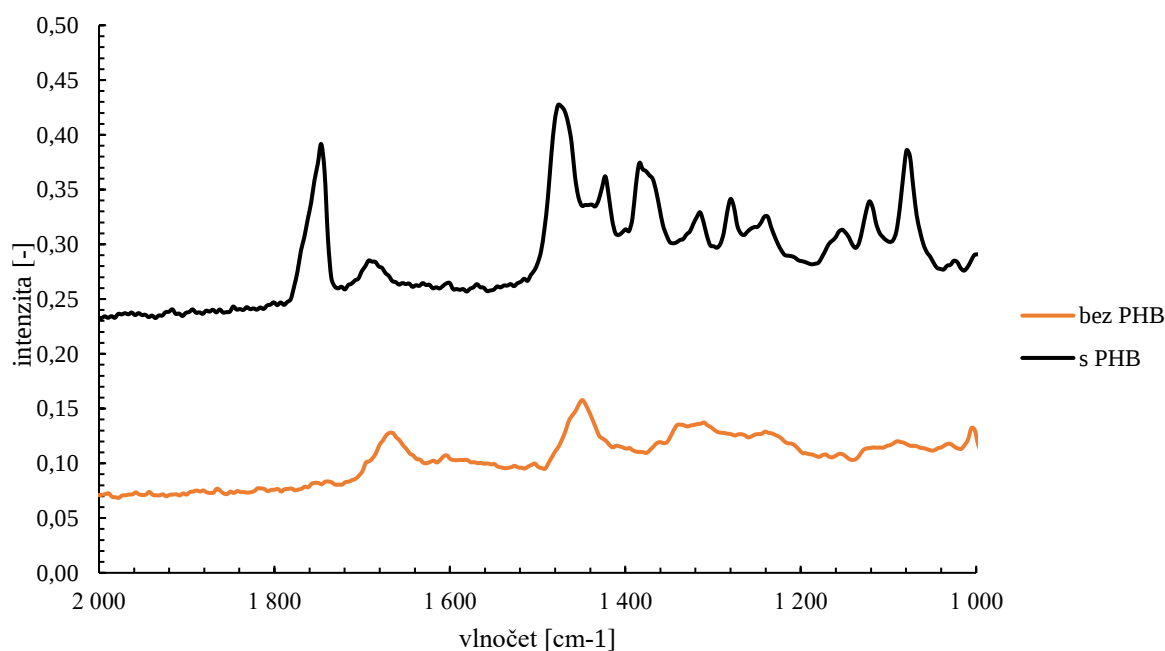
temperovaný na 60 °C a následně sušen, nevykazoval krystalinitu vůbec, ale voda způsobila krystalizaci vzorku. Stejně tak tomu bylo u vzorku temperovaného při 70 °C (Obrázek 11 v příloze). Voda způsobila krystalizaci, při promývání pufrům byl vzorek amorfni.

U vzorku temperovaného při 80 °C (Obrázek 12 příloha) voda způsobila, že byl vzorek amorfni při obou teplotách sušení. U vzorku promývaného pufrům byl ale při sušení při laboratorní teplotě vzorek krystalický.

Krystalinitu vzorků tedy nezpůsobuje ani studený pufr, ani samotný fosfátový pufr či voda a nelze najít ani žádné evidentní pravidlo pro teplotu sušení, podle kterého by se PHB produkované termofilní *Schlegelellou thermodepolymerans* řídilo. Nicméně se metoda FTIR ukázala jako metoda vhodná jak na identifikaci PHB v biomase, tak na pozorování případných změn v krystalinitě PHB. To se jeví jako cenné zjištění pro navazující studia termofilních bakteriálních producentů PHB.

5.5 Ramanova spektroskopie

Jedním z cílů této bakalářské práce bylo ověřit, zda je Ramanova spektroskopie vhodná metoda pro kvantitativní stanovení PHA. Pomocí této metody byla změřená suchá biomasa. Měření probíhalo na spektrofotometru Nicolet iS50 v rozsahu spektra 400-4000 cm⁻¹.



Graf 17 Ramanovo spektrum - porovnání vzorku s PHB a bez PHB

Graf 17 zobrazuje spektra Ramanovy spektroskopie pro vzorek s PHB a bez PHB. Spektra byla pro přehlednost a možnost porovnávání posunutá po ose y. V grafu je také vidět pouze část spektra (2 000 až 1 000 cm⁻¹).

Pík při vlnové délce 1750 cm⁻¹ zobrazuje charakteristický pík pro PHB (valenční vibrace C=O). Spektrum vzorku s PHB tento pík obsahuje, vzorek bez PHB nikoliv. Ramanova spektroskopie je tedy vhodná pro stanovení obsahu PHB ve vzorku. Celé spektrum je uvedeno v příloze (Obrázek 13).

6 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo posoudit využitelnost vybraných fyzikálně-chemických a spektroskopických metod při analýze bakteriálních buněk extremofilních producentů PHA. Metody, byly vybrány na základě literární rešerše.

Jako modelový mikroorganismus byla vybrána *Schlegelella thermodepolymerans*. Kultivace probíhala ve dvou různých médiích, které poskytly různý obsah PHB. Na základě výsledků optimalizace kultivačních podmínek bylo jako produkční médium pro kulturu s vysokým obsahem PHB vybráno minerální médium Chelatococ, které obsahovalo 1 g/l chloridu amonného. Jako produkční médium pro kulturu s nízkým obsahem PHB bylo vybráno inokulum Nutrient Broth. Obsah PHB byl stanoven pomocí plynové chromatografie. Jedná se o nejvíc využívanou metodu ke kvantifikaci PHA. Z literární rešerše pak byla vybrána termogravimetrická analýza, Ramanova spektroskopie a infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací.

Pomocí termogravimetrické analýzy byl stanoven obsah extracelulární a intracelulární vody ve vzorcích bakteriálních kultur bez resp. s obsahem PHB. Podle výsledků měření měly buňky s vysokým obsahem PHB podle očekávání nižší relativní obsah vody v buňce ve srovnání s kulturou obsahující nízký obsah PHB granulí. Pomocí TGA byl také změřen vzorek, který byl po přípravě zamražen a před samotným měřením rozmražen. Výsledný průběh měření však nezobrazoval dva typické zlomy, které jsou charakteristické pro odpařování volné extracelulární vody a vázané intracelulární vody. Zamražením vzorků byla porušena intaktnost membrány bakteriální buňky. Ta tak ztratila schopnost udržet si intracelulární vodu. Termogravimetrie se ukázala jako použitelná metoda na stanovení nejen obsahu vody, ale taky na s tím spojený obsah PHB. Je nutno dbát na to, aby byla měřena čerstvá biomasa, nikoliv zamražená. Buňky pak ztrácí intaktnost membrány.

Pomocí metody FTIR byla nejprve změřena suchá biomasa vzorků s i bez obsahu PHB, a jednotlivá spektra byla porovnána. Spektra ukázala rozdíl v obsahu PHB v jednotlivých vzorcích. Dále byla sledována krystaličnost či amorfnost vzorku, protože je známo, že zachování nativní amorfní struktury PHB je klíčové při udržení jeho biologické role v bakteriálních buňkách. Byla realizována řada dílčích experimentů ve snaze vyloučit faktor, který by v průběhu přípravy vzorků před analýzou způsoboval krystalizaci PHB. Podle výsledků však nelze najít žádné pravidlo, podle kterého by se PHB produkované termofilní *Schlegelellou thermodepolymerans* řídilo. Byla ovšem pozorována velmi zajímavá U-závislost u vzorků měřených při temperování pufru (výsledky v kapitole 4.4.2.2). Nejvyšší a nejnižší studovaná teplota způsobila krystalizaci PHB. Naopak střední teploty, pohybující se nad kultivačním optimem, zachovávaly PHB v amorfní formě. Tato skutečnost by mohla být předmětem dalšího navazujícího studia. Každopádně se metoda FTIR ukázala jako metoda vhodná jak na stanovení množství PHB, tak na případné změny v krystalinitě PHB.

Poslední metodou ověřenou v této bakalářské práci byla Ramanova spektroskopie, která vychází ze stejného principu jako FTIR. Ve výsledných spektrech lze vidět rozdíl v množství PHB ve vzorcích. Metodu lze tedy využít k identifikaci, případně ke stanovení obsahu PHB.

V rámci bakalářské práce bylo ověřeno, že všechny tři metody (FTIR, termogravimetrická analýza i Ramanova spektroskopie) jsou vhodné metody na stanovení obsahu PHA v termofilních bakteriálních buňkách a mohou tak doplnit výsledky plynové chromatografie. Na rozdíl od plynové chromatografie však není příprava vzorků k měření tak časově náročná (dají se tedy využít jako real-time monitoring např. při biotechnologickém procesu) a nepoužívají se nebezpečné látky.

7 POUŽITÉ ZDROJE

- [1] HARRISON, Jesse P., Nicolas GHEERAERT, Dmitry TSIGELNITSKIY a Charles S. COCKELL. The limits for life under multiple extremes. *Trends in Microbiology* [online]. 2013, **21**(4), 204-212 [cit. 2022-02-02]. ISSN 0966842X. Dostupné z: doi:10.1016/j.tim.2013.01.006
- [2] MERINO, Nancy, Heidi S. ARONSON, Diana P. BOJANOVA, Jayme FEYHL-BUSKA, Michael L. WONG, Shu ZHANG a Donato GIOVANNELLI. Living at the Extremes: Extremophiles and the Limits of Life in a Planetary Context. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2019, **10** [cit. 2022-02-02]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2019.00780
- [3] MESBAH, Noha M. a Juergen WIEGEL. Life at Extreme Limits. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 2008, **1125**(1), 44-57 [cit. 2022-02-02]. ISSN 00778923. Dostupné z: doi:10.1196/annals.1419.028
- [4] WAKAI, Satoshi. Biochemical and thermodynamic analyses of energy conversion in extremophiles. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* [online]. 2019, **83**(1), 49-64 [cit. 2022-02-02]. ISSN 0916-8451. Dostupné z: doi:10.1080/09168451.2018.1538769
- [5] ROTHSCILD, Lynn J. a Rocco L. MANCINELLI. Life in extreme environments. *Nature* [online]. 2001, **409**(6823), 1092-1101 [cit. 2022-02-02]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/35059215
- [6] ABE, Fumiyoshi a Koki HORIKOSHI. The biotechnological potential of piezophiles. *Trends in Biotechnology* [online]. 2001, **19**(3), 102-108 [cit. 2022-02-02]. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-7799(00)01539-0
- [7] KATO, Chiaki a Mohammad Hassan QURESHI. Pressure response in deep-sea piezophilic bacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 1999, **1**(1), 87-92.
- [8] KATO, Chiaki, Lina LI, Yuichi NOGI, Yuka NAKAMURA, Jin TAMAOKA a Koki HORIKOSHI. Extremely Barophilic Bacteria Isolated from the Mariana Trench, Challenger Deep, at a Depth of 11,000 Meters. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1998, **64**(4), 1510-1513 [cit. 2022-02-02]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.64.4.1510-1513.1998
- [9] PAKCHUNG, Amalie A. H., Philippa J. L. SIMPSON a Rachel CODD. Life on Earth. Extremophiles Continue to Move the Goal Posts. *Environmental Chemistry* [online]. 2006, **3**(2) [cit. 2022-02-02]. ISSN 1448-2517. Dostupné z: doi:10.1071/EN05093
- [10] JOHNSON, D.B. Biodiversity and interactions of acidophiles: Key to understanding and optimizing microbial processing of ores and concentrates. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* [online]. 2008, **18**(6), 1367-1373 [cit. 2022-02-02]. ISSN 10036326. Dostupné z: doi:10.1016/S1003-6326(09)60010-8
- [11] HORIKOSHI, Koki. Alkaliphiles. *Proceedings of the Japan Academy*. 2004, **80**(4), 166-178.
- [12] HORIKOSHI, Koki a William D. GRANT. *Extremophiles: Microbial Life in Extreme Environments*. 322.

- [13] VAN DEN BURG, Bertus. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 2003, **6**(3), 213-218 [cit. 2022-02-02]. ISSN 13695274. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-5274(03)00060-2
- [14] PRABHU, Nimali N., Maria Celisa SANTIMANO, Suneela MAVINKURVE, Saroj N. BHOSLE a Sandeep GARG. Native granule associated short chain length polyhydroxyalkanoate synthase from a marine derived *Bacillus* sp. NQ-11/A2. *Antonie van Leeuwenhoek* [online]. 2010, **97**(1), 41-50 [cit. 2022-02-05]. ISSN 0003-6072. Dostupné z: doi:10.1007/s10482-009-9386-8
- [15] LI, Mengxing a Mark R. WILKINS. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production: Feedstocks, strains and process developments. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, **156**, 691-703 [cit. 2022-02-05]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.04.082
- [16] KESHAVARZ, Tajalli a Ipsita ROY. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 2010, **13**(3), 321-326 [cit. 2022-02-05]. ISSN 13695274. Dostupné z: doi:10.1016/j.mib.2010.02.006
- [17] IBRAHIM, Mohammad I., Diya ALSAFADI, Khalid A. ALAMRY a Mahmoud A. HUSSEIN. Properties and Applications of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Biocomposites. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2021, **29**(4), 1010-1030 [cit. 2022-02-05]. ISSN 1566-2543. Dostupné z: doi:10.1007/s10924-020-01946-x
- [18] DIETRICH, Karolin, Marie-Josée DUMONT, Luis F. DEL RIO a Valérie ORSAT. Sustainable PHA production in integrated lignocellulose biorefineries. *New Biotechnology* [online]. 2019, **49**, 161-168 [cit. 2022-02-05]. ISSN 18716784. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbt.2018.11.004
- [19] 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. 2022-02-05]. ISSN 1438-1656. Dostupné z: doi:10.1002/adem.200500053
- [20] ISHII, Daisuke, Tang YING, Tetsuji YAMAOKA a Tadahisa IWATA. Characterization and Biocompatibility of Biopolyester Nanofibers. *Materials* [online]. 2009, **2**(4), 1520-1546 [cit. 2022-02-06]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma2041520
- [21] PHILIP, S., T. KESHAVARZ a I. ROY. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* [online]. 2007, **82**(3), 233-247 [cit. 2022-02-05]. ISSN 02682575. Dostupné z: doi:10.1002/jctb.1667
- [22] LU, Jingnan, Ryan C. TAPPEL a Christopher T. NOMURA. Mini-Review: Biosynthesis of Poly(hydroxyalkanoates). *Polymer Reviews* [online]. 2009, **49**(3), 226-248 [cit. 2022-02-05]. ISSN 1558-3724. Dostupné z: doi:10.1080/15583720903048243
- [23] BEHERA, Shivananda, Monika PRIYADARSHANEE, VANDANA a Surajit DAS. Polyhydroxyalkanoates, the bioplastics of microbial origin: Properties, biochemical synthesis, and their applications. *Chemosphere* [online]. 2022, **294** [cit. 2022-02-15]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2022.133723
- [24] SUDESH, K, H ABE a Y DOI. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science* [online]. 2000, **25**(10), 1503-1555 [cit. 2022-02-05]. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/S0079-6700(00)00035-6

- [25] RAZA, Zulfiqar Ali, Shahina RIAZ a Ibrahim M. BANAT. Polyhydroxyalkanoates: Properties and chemical modification approaches for their functionalization. *Biotechnology Progress* [online]. 2018, **34**(1), 29-41 [cit. 2022-02-07]. ISSN 87567938. Dostupné z: doi:10.1002/btpr.2565
- [26] SEEBACH, Dieter a Monica G. FRITZ. Detection, synthesis, structure, and function of oligo(3-hydroxyalkanoates): contributions by synthetic organic chemists. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 1999, **25**(1-3), 217-236 [cit. 2022-04-29]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/S0141-8130(99)00037-9
- [27] MORYA, Raj, Aditi SHARMA, Madan KUMAR, Bhawna TYAGI, Shashi Shekhar SINGH a Indu Shekhar THAKUR. Polyhydroxyalkanoate synthesis and characterization: A proteogenomic and process optimization study for biovalorization of industrial lignin. *Bioresource Technology* [online]. 2021, **320** [cit. 2022-02-05]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2020.124439
- [28] CHEN, Guo-Qiang, Ivan HAJNAL, Hong WU, Li LV a Jianwen YE. Engineering Biosynthesis Mechanisms for Diversifying Polyhydroxyalkanoates. *Trends in Biotechnology* [online]. 2015, **33**(10), 565-574 [cit. 2022-02-05]. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2015.07.007
- [29] CHEN, Guo-Qiang. Plastics Completely Synthesized by Bacteria: Polyhydroxyalkanoates. CHEN, George Guo-Qiang, ed. *Plastics from Bacteria* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010, s. 17-37 [cit. 2022-02-15]. Microbiology Monographs. ISBN 978-3-642-03286-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-03287-5_2
- [30] ANJUM, Anbreen, Mohammad ZUBER, Khalid Mahmood ZIA, Aqdas NOREEN, Muhammad Naveed ANJUM a Shazia TABASUM. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2016, **89**, 161-174 [cit. 2022-02-16]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069
- [31] SINDHU, Raveendran, Aravind MADHAVAN, K.B. ARUN et al. Metabolic circuits and gene regulators in polyhydroxyalkanoate producing organisms: Intervention strategies for enhanced production. *Bioresource Technology* [online]. 2021, **327** [cit. 2022-02-06]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2021.124791
- [32] MENG, De-Chuan, Rui SHEN, Hui YAO, Jin-Chun CHEN, Qiong WU a Guo-Qiang CHEN. Engineering the diversity of polyesters. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2014, **29**, 24-33 [cit. 2022-02-06]. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2014.02.013
- [33] TRIPATHI, Lakshmi, Lin-Ping WU, Meng DECHUAN, Jinchun CHEN, Qiong WU a Guo-Qiang CHEN. *Pseudomonas putida* KT2442 as a platform for the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates with adjustable monomer contents and compositions. *Bioresource Technology* [online]. 2013, **142**, 225-231 [cit. 2022-02-15]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2013.05.027
- [34] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Martin KOLLER, Dan KUCERA a Iva PERNICOVA. Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. *Biotechnology Advances* [online]. 2018, **36**(3), 856-870 [cit. 2022-05-23]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2017.12.006

- [35] LOO, C.-Y. a Kumar SUDESH. Polyhydroxyalkanoates: Bio-based microbial plastics and their properties. *Malaysian Polymer Journal*. 2007, **2**(2), 31-57.
- [36] SATYANARAYANA, Tulasi, Chandralata RAGHUKUMAR a Sisinthy S. SHIVAJI. Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current Science*. 2005, **89**(1), 78-90. ISSN 0011-3891.
- [37] AGUILAR, Alfredo. Extremophile research in the European Union: from fundamental aspects to industrial expectations. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 1996, **18**(2-3), 89-92 [cit. 2022-02-02]. ISSN 1574-6976. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6976.1996.tb00228.x
- [38] COSTA, Samantha Serra, Andréa Lobo MIRANDA, Michele Greque DE MORAIS, Jorge Alberto Vieira COSTA a Janice Izabel DRUZIAN. Microalgae as source of polyhydroxyalkanoates (PHAs) — A review. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2019, **131**, 536-547 [cit. 2022-02-15]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.03.099
- [39] GARCÍA, Gabriela, Juan Eduardo SOSA-HERNÁNDEZ, Laura Isabel RODAS-ZULUAGA, Carlos CASTILLO-ZACARÍAS, Hafiz IQBAL a Roberto PARRA-SALDÍVAR. Accumulation of PHA in the Microalgae *Scenedesmus* sp. under Nutrient-Deficient Conditions. *Polymers* [online]. 2021, **13**(1) [cit. 2022-02-15]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym13010131
- [40] RAHMAN, Asif, Renil J. ANTHONY, Ashik SATHISH, Ronald C. SIMS a Charles D. MILLER. Effects of wastewater microalgae harvesting methods on polyhydroxybutyrate production. *Bioresource Technology* [online]. 2014, **156**, 364-367 [cit. 2022-02-15]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2014.01.034
- [41] KOCH, Moritz a Karl FORCHHAMMER. Polyhydroxybutyrate: A Useful Product of Chlorotic Cyanobacteria. *Microbial Physiology* [online]. 2021, **31**(2), 67-77 [cit. 2022-02-15]. ISSN 2673-1665. Dostupné z: doi:10.1159/000515617
- [42] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [43] WANG, Quanhui, Zhen CEN a Jingjing ZHAO. The Survival Mechanisms of Thermophiles at High Temperatures: An Angle of Omics. *Physiology* [online]. 2015, **30**(2), 97-106 [cit. 2022-02-02]. ISSN 1548-9213. Dostupné z: doi:10.1152/physiol.00066.2013
- [44] OJHA, Purusottam, Narayani Prasad KAR, Shreenath NAYAK, Ashok Kumar PATRA a Khirod Kumar SAHOO. Isolation of a broad spectrum antimicrobial producing thermophilic *Bacillus* and characterization of its antimicrobial protein. *Archives of Microbiology* [online]. 2021, **203**(5), 2059-2073 [cit. 2022-02-02]. ISSN 0302-8933. Dostupné z: doi:10.1007/s00203-020-02162-w
- [45] KOURILOVA, Xenie, Iva PERNICOVA, Karel SEDLAR, Jana MUSILOVA, Petr SEDLACEK, Michal KALINA, Martin KOLLER a Stanislav OBRUCA. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a thermophilic strain of *Schlegelella thermodepolymerans* from xylose rich substrates. *Bioresource Technology* [online]. 2020, **315** [cit. 2022-02-02]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2020.123885

- [46] SLOBODKIN, A. I. a G. B. SLOBODKINA. Thermophilic prokaryotes from deep subterranean habitats. *Microbiology* [online]. 2014, **83**(3), 169-183 [cit. 2022-02-02]. ISSN 0026-2617. Dostupné z: doi:10.1134/S0026261714030151
- [47] 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. 2022-02-16]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.09.253
- [48] OBRUČA, Stanislav, Pavel DVOŘÁK, Petr SEDLÁČEK, Martin KOLLER, Karel SEDLÁŘ, Iva PERNICOVÁ a David ŠAFRÁNEK. Polyhydroxyalkanoates synthesis by halophiles and thermophiles: towards sustainable production of microbial bioplastics. *Biotechnology Advances* [online]. 2022 [cit. 2022-02-16]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2022.107906
- [49] MOORKOTH, Dhanya a Kesavan Madhavan NAMPOOTHIRI. Production and characterization of poly(3-hydroxy butyrate-co-3 hydroxyvalerate) (PHBV) by a novel halotolerant mangrove isolate. *Bioresource Technology* [online]. 2016, **201**, 253-260 [cit. 2022-02-16]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2015.11.046
- [50] JIANG, H., Y. CHEN, J.C. MURRELL, P. JIANG, C. ZHANG, X.-H. XING a T.J. SMITH. Methanotrophs. *Comprehensive Biotechnology* [online]. Elsevier, 2011, s. 249-262 [cit. 2022-02-16]. ISBN 9780080885049. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-088504-9.00374-3
- [51] ZHANG, Yingxin, Jiaying XIN, Linlin CHEN, Hao SONG a Chungu XIA. Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular weight by methanotroph from methane and methanol. *Journal of Natural Gas Chemistry* [online]. 2008, **17**(1), 103-109 [cit. 2022-02-16]. ISSN 10039953. Dostupné z: doi:10.1016/S1003-9953(08)60034-1
- [52] ATALAH, Joaquín, Paulina CÁCERES-MORENO, Giannina ESPINA a Jenny M. BLAMEY. Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts. *Bioresource Technology* [online]. 2019, **280**, 478-488 [cit. 2022-02-17]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2019.02.008
- [53] KOURILOVA, Xenie, Ivana NOVACKOVA, Martin KOLLER a Stanislav OBRUČA. Evaluation of mesophilic Burkholderia sacchari, thermophilic Schlegelella thermodepolymerans and halophilic Halomonas halophila for polyhydroxyalkanoates production on model media mimicking lignocellulose hydrolysates. *Bioresource Technology* [online]. 2021, **325** [cit. 2022-02-17]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2021.124704
- [54] PAGLIANO, Giorgia, Paola GALLETTI, Chiara SAMORì, Agnese ZAGHINI a Cristian TORRI. Recovery of Polyhydroxyalkanoates From Single and Mixed Microbial Cultures: A Review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. 2021, **9** [cit. 2022-02-22]. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2021.624021
- [55] HARRIS, Daniel C. *Quantitative chemical techniques*. 5th. United States: W. H. Freeman and Company, 1999. ISBN 9780716728818.
- [56] ESTHER ELIZABETH GRACE, C., M. BRIGET MARY, Seetharaman VAIDYANATHAN a S. SRISUDHA. Response to nutrient variation on lipid productivity in green microalgae captured using second derivative FTIR and Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A*:

- Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [online]. 2022, **270** [cit. 2022-02-21]. ISSN 13861425. Dostupné z: doi:10.1016/j.saa.2021.120830
- [57] HORÁK, Milan a Dušan PAPOUŠEK. *Infračervená spektra a struktura molekul: (použití vibrační spektroskopie při určování struktury molekul)*. Vyd. 1. Praha: Academia, 1976.
- [58] BAI, Cui-Lan, Liang-Ying LIU, Yi-Bin HU, Eddy Y. ZENG a Ying GUO. Microplastics: A review of analytical methods, occurrence and characteristics in food, and potential toxicities to biota. *Science of The Total Environment* [online]. 2022, **806** [cit. 2022-02-21]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2021.150263
- [59] YILMAZ, Hulya, Shyam S. MOHAPATRA a Mustafa CULHA. Surface-enhanced infrared absorption spectroscopy for microorganisms discrimination on silver nanoparticle substrates. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [online]. 2022, **268** [cit. 2022-02-22]. ISSN 13861425. Dostupné z: doi:10.1016/j.saa.2021.120699
- [60] YASIN, Akram R. a Ithar k. AL-MAYALY. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) by a newly isolated strain *Bacillus tequilensis* ARY86 using inexpensive carbon source. *Bioresource Technology Reports* [online]. 2021, **16** [cit. 2022-03-03]. ISSN 2589014X. Dostupné z: doi:10.1016/j.biteb.2021.100846
- [61] DE GELDER, Joke, Kris DE GUSSEM, Peter VANDENABEELE a Luc MOENS. Reference database of Raman spectra of biological molecules. *Journal of Raman Spectroscopy* [online]. 2007, **38**(9), 1133-1147 [cit. 2022-02-21]. ISSN 03770486. Dostupné z: doi:10.1002/jrs.1734
- [62] ADEJIMI, Olubunmi E., Timea IGNAT, Giji SADHASIVAM, Varda ZAKIN, Ze'ev SCHMILOVITCH a Orr H. SHAPIRO. Low-Resolution Raman Spectroscopy for the detection of contaminant species in algal bioreactors. *Science of The Total Environment* [online]. 2022, **809** [cit. 2022-02-21]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2021.151138
- [63] RHO, Eojin, Minjoon KIM, Seunghye H. CHO, Bongjae CHOI, Hyungjoon PARK, Hanhwi JANG, Yeon Sik JUNG a Sungho JO. Separation-free bacterial identification in arbitrary media via deep neural network-based SERS analysis. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2022, **202** [cit. 2022-02-21]. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2022.113991
- [64] PREMASIRI, W. R., D. T. MOIR, M. S. KLEMPNER, N. KRIEGER, G. JONES a L. D. ZIEGLER. Characterization of the Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) of Bacteria. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2005, **109**(1), 312-320 [cit. 2022-02-21]. ISSN 1520-6106. Dostupné z: doi:10.1021/jp040442n
- [65] MCKINNON, Katherine M. Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology* [online]. 2018, **120**(1) [cit. 2022-02-22]. ISSN 1934-3671. Dostupné z: doi:10.1002/cpim.40
- [66] HANYKÝŘ, V. Vliv keramických surovin na strukturu a vlastnosti pórovitého keramického střepu. *Zpravodaj STOP*. 2010, **12**(4), 4-11.
- [67] MARGOLIS, S.A., P.H. HUANG, N.G. HăDăRUGă a D.I. HăDăRUGă. Water Determination. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* [online]. Elsevier, 2018 [cit. 2022-04-25]. ISBN 9780124095472. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.14505-6

- [68] SEDLACEK, Petr, Eva SLANINOVA, Vojtech ENEV et al. What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2019, **103**(4), 1905-1917 [cit. 2022-05-23]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-018-09584-z

8 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

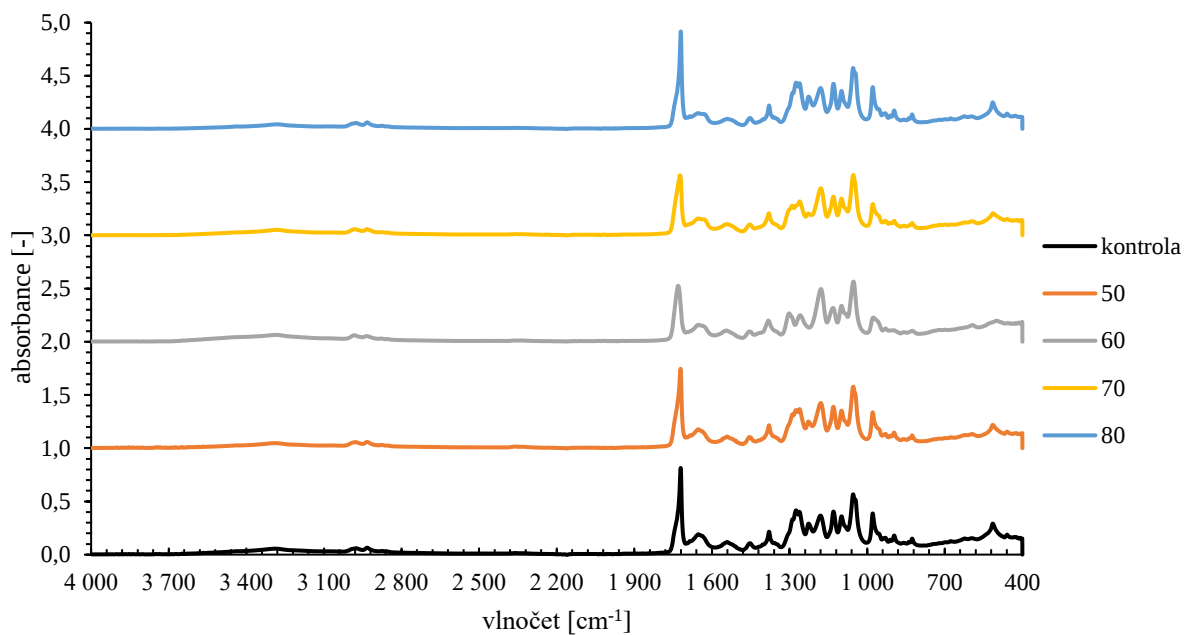
8.1 Seznam zkratek

Zkratka	Význam
PHA	polyhydroxyalkanoát
scl	krátký řetězec PHA
mcl	středně dlouhý řetězec PHA
PHB	polyhydroxybutyrát
P(3HB)	poly(3-hydroxybutyrát)
P(3HV)	poly(3-hydroxyvalerát)
P(4HB)	poly(4-hydroxybutyrát)
LRRS	ramanova spektroskopie s nízkým rozlišením
SERS	ramanova spektroskopie s povrchovou úpravou
CoA	koenzym A
DNA	deoxyribonukleová kyselina
H ₂ SO ₄	kyselina sírová
NaCl	chlorid sodný
NaOH	hydroxid sodný
HCl	kyselina chlorovodíková
CO ₂	oxid uhličitý
NH ₄ Cl	chlorid amonný
p.a.	pro analýzu
NB	Nutrient Broth
TES II	roztok stopových prvků
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
ATR	zeslabený úplný odraz
TGA	termogravimetrická analýza
GC	plynová chromatografie
FID	plamenový detektor

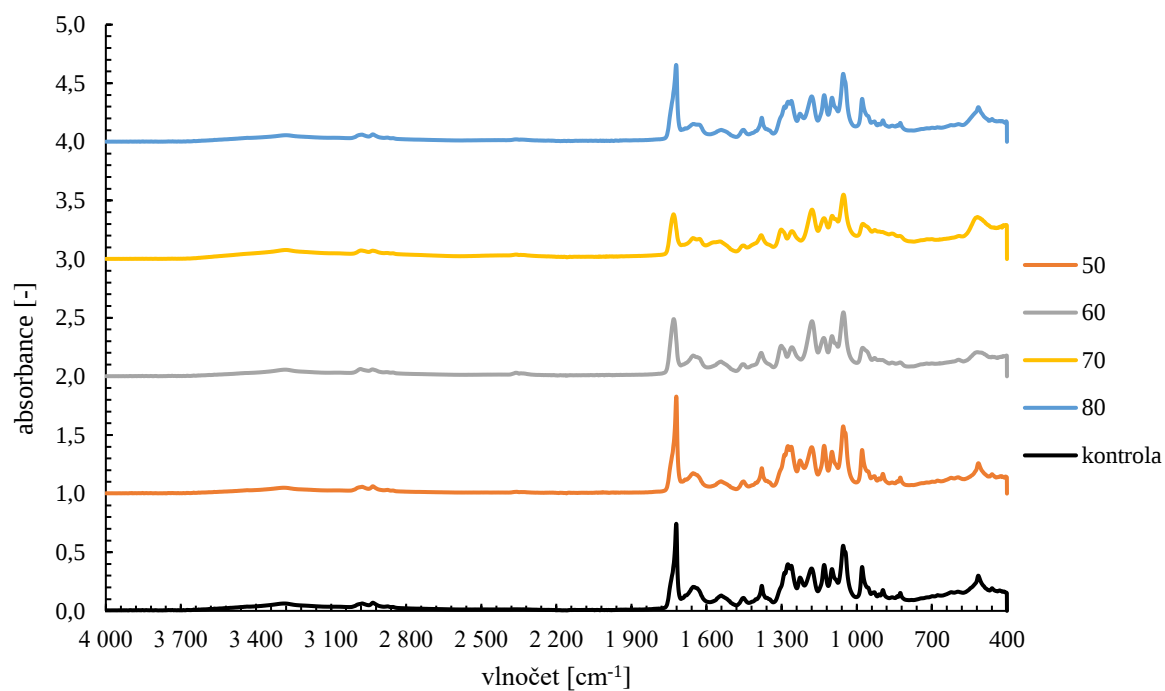
8.2 Seznam symbolů

Symbol	Význam
°C	stupeň Celsia
A	absorbance
M	molární koncentrace
cm	centimetr
nm	nanometr
μm	mikrometr
cm ⁻¹	reciproký centimetr
g	gram
mg	miligram
ml	mililitr
l	litr
h	hodina
Pa	pascal
MPa	megapascal
% hmot.	hmotnostní procenta
λ	vlnová délka
rpm	otáčky za minutu

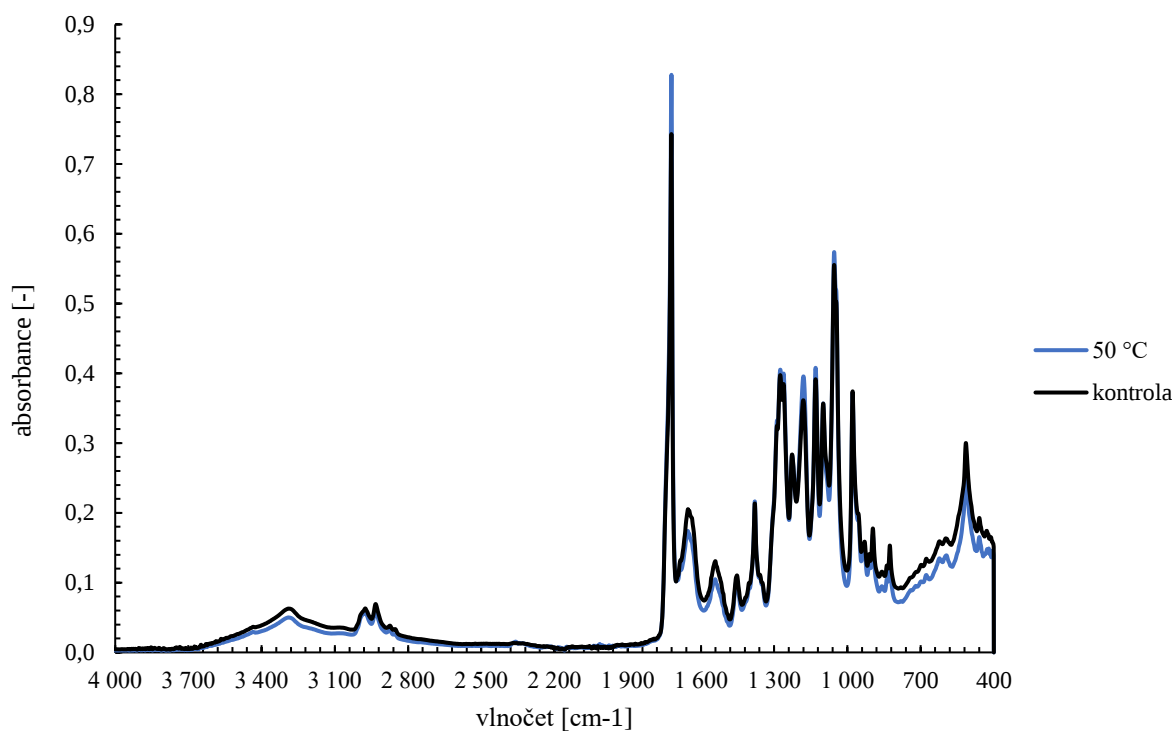
9 SEZNAM PŘÍLOH



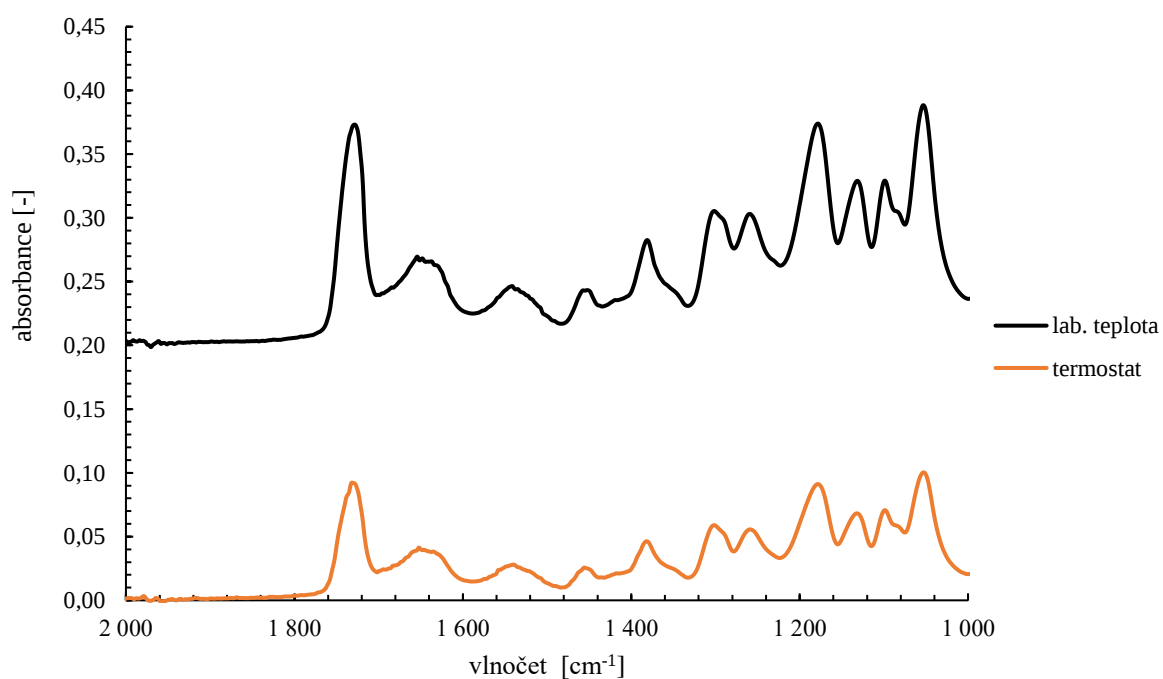
Obrázek 5 Celá FTIR spektra pro vzorek s PHB - porovnání teplot



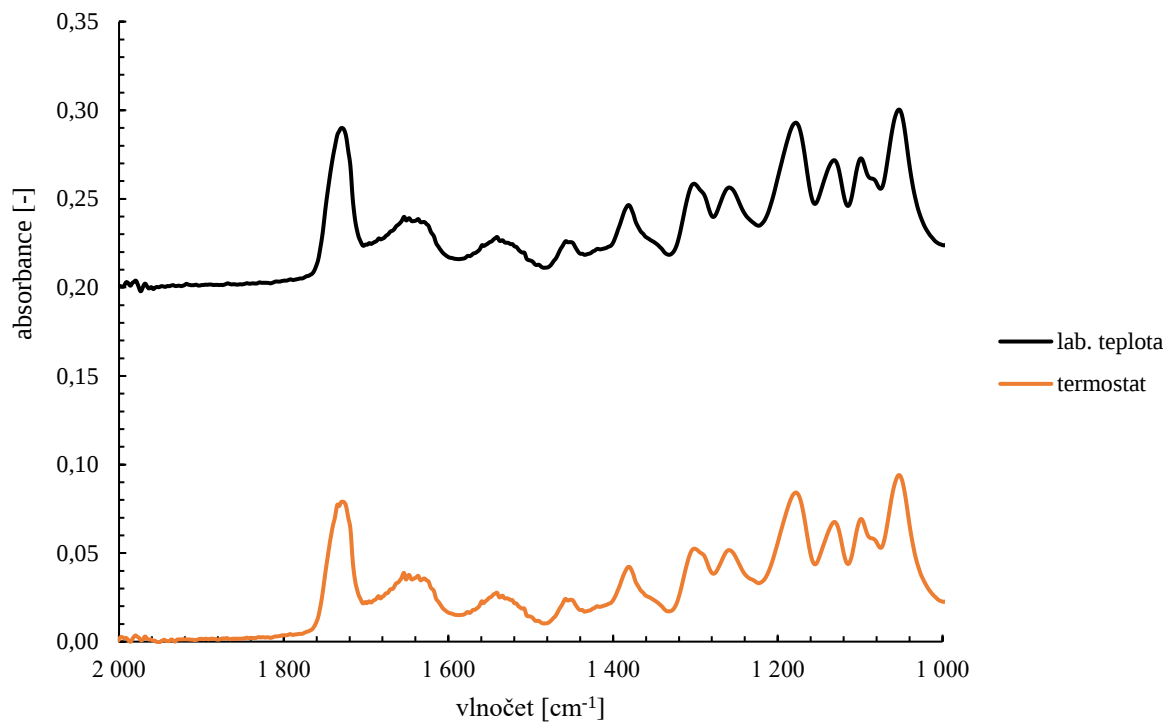
Obrázek 6 Celá FTIR spektra pro vzorek s PHB při temperování pufru - porovnání teplot



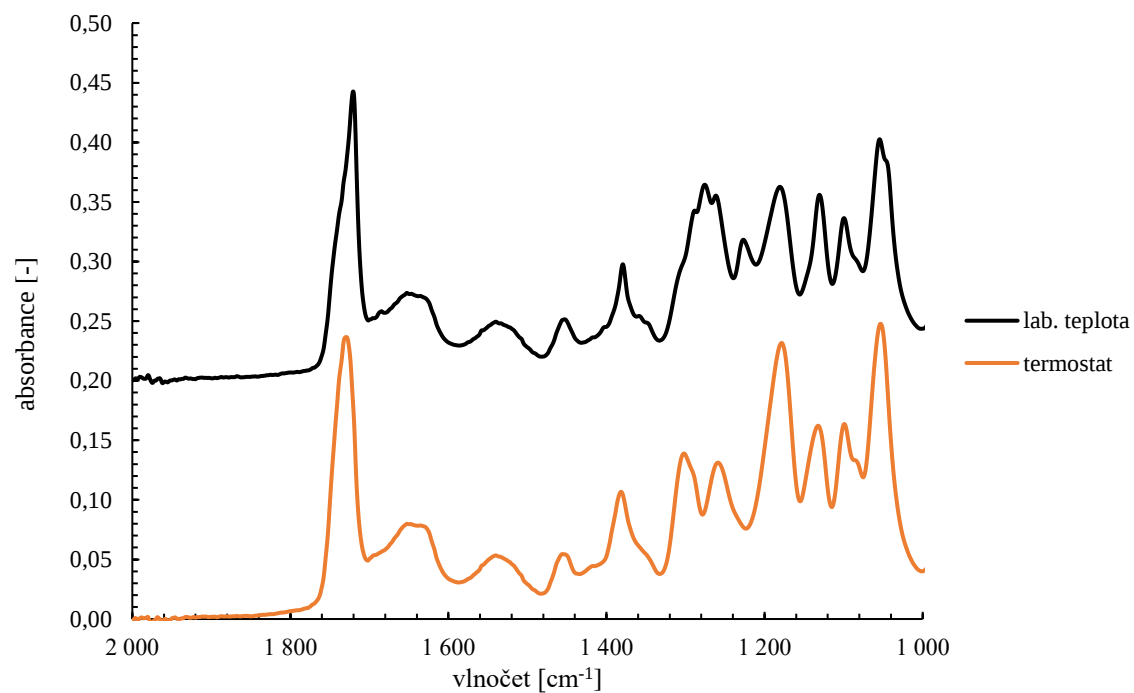
Obrázek 7 Celé FTIR spektrum pro vzorek s PHB při temperování pufre - srovnání kontroly a 50 °C



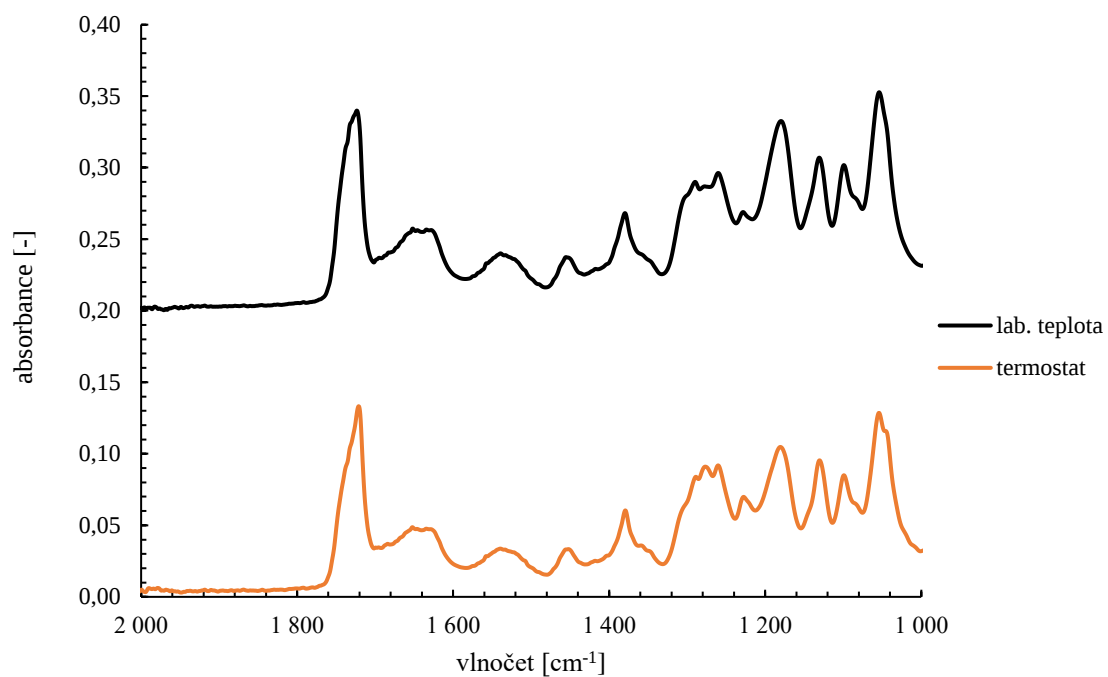
Obrázek 8 FTIR spektra pro 60 °C promývaný pufrem – sušení vzorků



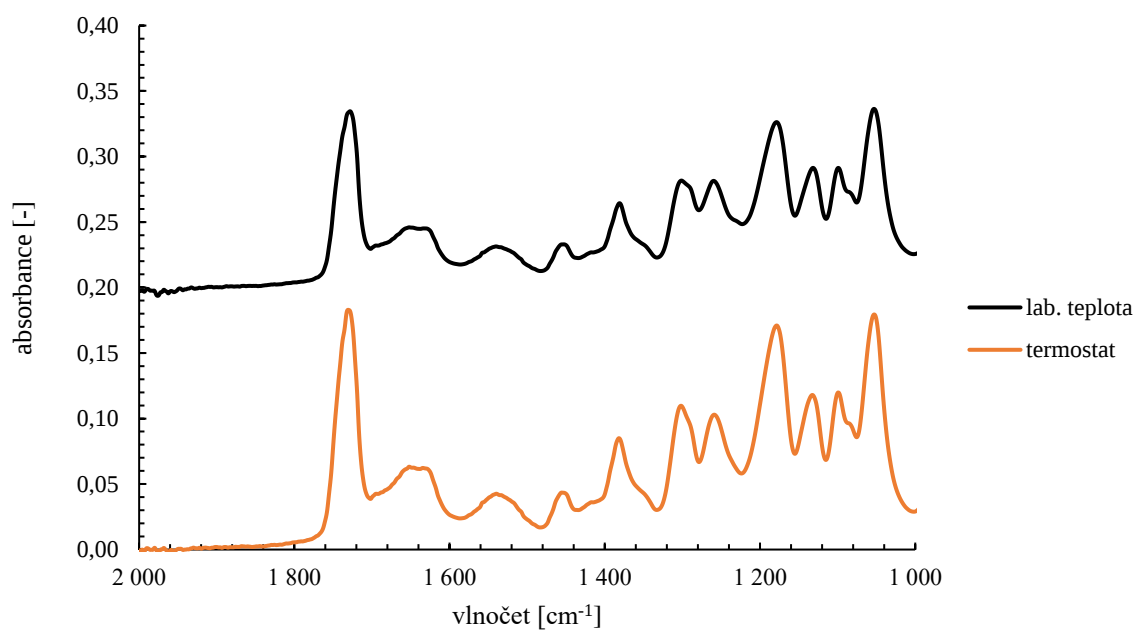
Obrázek 9 FTIR spektra pro 70 °C promývaný pufrem – sušení vzorků



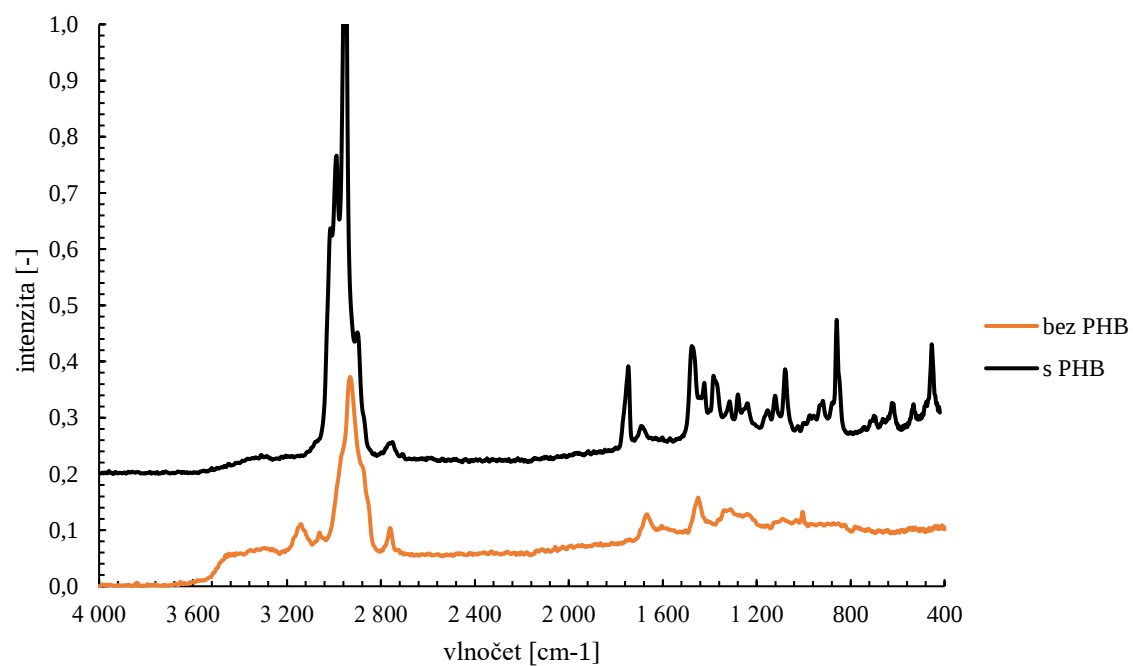
Obrázek 10 FTIR spektra pro 80 °C promývaný pufrem – sušení vzorků



Obrázek 11 FTIR spektra pro 70 °C promývaný vodou – sušení vzorků



Obrázek 12 FTIR spektra pro 80 °C promývaný vodou – sušení vzorků



Obrázek 13 Celé Ramanovo spektrum - porovnání vzorku s PHB a bez obsahu PHB