



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**VYUŽITÍ VYBRANÝCH EXTREMOFILNÍCH BAKTERIÍ
K PRODUKCI BIOPLASTŮ**

UTILIZATION OF SELECTED EXTREMOPHILIC BACTERIA FOR BIOPLASTIC PRODUCTION

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Michaela Vidláková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1594/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Michaela Vidláková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Využití vybraných extremofilních bakterií k produkci bioplastů

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Základní metabolická charakterizace mikrobiálních kultur *Tepidimonas fonticaldi*, *Tepidimonas taiwanensis* a *Tepidiphilus thermophilus*
3. Studium biotechnologického potenciálu vybraných kmenů

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2020:

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

Michaela Vidláková
student(ka)

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce je zaměřena na studium biotechnologického potenciálu termofilních bakterií *Tepidiphilus thermophilus*, *Tepidimonas taiwanensis* a *Tepidimonas fonticaldi*. Cílem práce bylo prozkoumat schopnost bakterií produkovat polyhydroxyalkanoáty (PHA). V teoretické části je zahrnuta charakteristika PHA a extremofilních bakterií. V experimentální části byly zkoumané bakterie testovány pomocí molekulárně biologické metody PCR na přítomnost genu *phaC* kódujícího PHA syntázu první třídy. Přítomnost genu *phaC* byla potvrzena u bakteriálních kmenů *Tepidiphilus thermophilus* a *Tepidimonas taiwanensis*. U všech vybraných mikroorganismů byla prověřována schopnost produkce PHA na různých zdrojích uhlíku, byly stanoveny optimální teploty pro kultivaci a přidavkem prekurzorů do produkčního média byla zjišťována schopnost syntézy kopolymerů. Nejintenzivnější produkce PHA byla zaznamenána u bakteriálního kmene *Tepidimonas taiwanensis*, avšak ostatní kmeny byly také schopny tvořit PHA. U některých kmenů byla prokázána i schopnost produkce kopolymerů P(3HB-co-3HV) nebo P(3HB-co-4HB). Významné množství P(3HB-co-3HV) bylo získáno při použití kmene *Tepidimonas taiwanensis*. U kmene *Tepidimonas taiwanensis* byla testována schopnost využití různých modelových hydrolyzátů k tvorbě PHA. K nejvyššímu zisku PHA došlo při použití modelového hydrolyzátu měkkého dřeva. Dále byla testována schopnost tvorby proteáz vybranými kmeny bakterií. Přítomnost těchto enzymů byla zjištěna u kmene *Tepidimonas taiwanensis*, u kterého následovalo stanovení teplotního optima proteáz, pH optima proteáz a jejich molekulové velikosti.

KLÍČOVÁ SLOVA

Polyhydroxyalkanoáty (PHA), termofilní mikroorganismy, *Tepidiphilus thermophilus*, *Tepidimonas taiwanensis*, *Tepidimonas fonticaldi*, alkalické proteázy

ABSTRACT

This bachelor thesis is focused on the study of the biotechnological potential of thermophilic bacteria *Tepidiphilus thermophilus*, *Tepidimonas taiwanensis* and *Tepidimonas fonticaldi*. The aim of this work was to investigate the ability of bacteria to produce polyhydroxyalkanoates (PHA). The theoretical part includes the characteristics of PHA and extremophilic bacteria. In the experimental part, the investigated bacteria were tested by molecular technique PCR for the presence of the *phaC* gene encoding for the first class PHA synthase. The presence of the *phaC* gene was confirmed in bacterial strains *Tepidiphilus thermophilus* and *Tepidimonas taiwanensis*. The ability of PHA production on various carbon sources was examined for all the selected microorganisms, optimal temperatures for cultivation were determined, and the ability to synthesize copolymers was investigated by adding suitable precursors to the production medium. The most intensive PHA production was recorded in the bacterial strain *Tepidimonas taiwanensis*, but other strains were also able to produce PHA. The ability to produce P(3HB-co-3HV) or P(3HB-co-4HB) copolymers has also been demonstrated in some strains. A significant amount of P(3HB-co-3HV) was obtained using the *Tepidimonas taiwanensis* strain. Moreover, *Tepidimonas taiwanensis* strain was also tested for its ability to use various model lignocellulose hydrolysates to form PHA. The highest PHA gain was obtained using model hydrolysate of softwood. Furthermore, the ability of proteases production by selected bacterial strains was tested. The presence of these enzymes was detected in the *Tepidimonas taiwanensis* strain, which was followed by determination of the temperature optima of the proteases, the pH optima of the proteases and also of their molecular weights.

KEY WORDS

Polyhydroxyalkanoate (PHA), thermophilic microorganisms, *Tepidiphilus thermophilus*, *Tepidimonas taiwanensis*, *Tepidimonas fonticaldi*, alkaline protease

VIDLÁKOVÁ, Michaela. *Využití vybraných extremofilních bakterií k produkci bioplastů*. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123989>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Stanislav Obruča.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a 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.

.....

podpis studenta

Poděkování

Děkuji vedoucímu bakalářské práce doc. Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D. za nasměrování práce, odborné vedení a cenné rady. Poděkování patří také konzultantce Ing. Xenii Kouřilové za ochotu, trpělivost a pomoc při řešení problémů jak v laboratoři, tak i při vypracovávání písemné části této práce.

Děkuji také mé rodině za veškerou podporu během studia.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Biologicky odbouratelné polymery	9
2.2	Polyhydroxyalkanoáty	9
2.2.1	Struktura PHA.....	10
2.2.2	Klasifikace PHA	10
2.2.3	Vlastnosti PHA	10
2.3	Organismy produkující PHA.....	11
2.3.1	Termofilní mikroorganismy.....	11
2.3.1.1	<i>Tepidiphilus thermophilus</i>	12
2.3.1.2	<i>Tepidimonas fonticaldi</i>	13
2.3.1.3	<i>Tepidimonas taiwanensis</i>	13
2.4	Biosyntéza PHA	14
2.4.1	Podmínky a substrát pro syntézu PHA	14
2.4.2	Metabolické dráhy biosyntézy PHA	14
2.4.3	PHA syntázy	16
2.5	Aplikace PHA.....	17
2.5.1	Aplikace v lékařském odvětví.....	17
2.5.2	Aplikace v průmyslovém odvětví	17
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	19
3.1	Použité mikroorganismy, chemikálie a přístroje	19
3.1.1	Použité mikroorganismy	19
3.1.2	Chemikálie použité pro kultivaci	19
3.1.3	Chemikálie použité pro screening uhlíkatých zdrojů	19
3.1.4	Komponenty použité k izolaci DNA, PCR a elektroforéze	20
3.1.5	Chemikálie použité pro screening proteáz.....	20
3.1.6	Použité přístroje	21
3.2	Uchovávání bakterií	21
3.3	Kultivace bakterií	21
3.3.1	Inokulační médium	21
3.3.2	Produkční médium	22
3.4	Optimalizace růstu bakterií a produkce PHA	22

3.4.1	Hledání vhodného zdroje uhlíku.....	22
3.4.2	Kultivace při různých teplotách.....	22
3.4.3	Kultivace s přidavkem prekurzorů.....	23
3.4.4	Kultivace na modelových hydrolyzátech.....	23
3.5	Screening produkce proteáz	23
3.6	Použité metody	24
3.6.1	Izolace bakteriální DNA pomocí tepelné lyze.....	24
3.6.2	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA.....	24
3.6.3	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	24
3.6.4	Elektroforéza na agarózovém gelu	25
3.6.5	Měření zákalu produkčního média po kultivaci	25
3.6.6	Gravimetrické stanovení obsahu biomasy	25
3.6.7	Analýza PHA pomocí plynové chromatografie.....	26
3.6.8	Stanovení redukujících sacharidů	26
3.6.9	Stanovení aktivity proteáz podle Ladd a Butler.....	26
3.6.9.1	Stanovení teplotního optima proteáz	27
3.6.9.2	Stanovení pH optima proteáz	27
3.6.9.3	Stanovení přibližné molekulární hmotnosti proteáz.....	27
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	28
4.1	Identifikace schopnosti akumulovat PHA	28
4.2	Optimalizace produkce PHA.....	29
4.2.1	Hledání vhodného zdroje uhlíku.....	29
4.2.2	Kultivace při různých teplotách.....	32
4.2.3	Kultivace s přidavkem prekurzorů.....	33
4.2.4	Kultivace na modelových hydrolyzátech.....	34
4.2.4.1	Stanovení redukujících sacharidů v médiu.....	35
4.3	Screening produkce proteáz	36
4.3.1	Stanovení teplotního optima proteáz	37
4.3.2	Stanovení pH optima proteáz.....	37
4.3.3	Stanovení velikosti proteáz	38
5	ZÁVĚR.....	40
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	42

1 ÚVOD

Během 19. století došlo k výraznému vývoji polymerů a plastů. Molekuly složené z opakujících se jednotek byly pojmenovány jako polymery. Mezi první objevené syntetické plastické hmoty jsou řazeny například polyvinylchlorid a bakelit. Díky své odolnosti a stálosti tyto hmoty našly uplatnění v širokém spektru aplikací a začaly nahrazovat dříve používané materiály (například sklo, dřevo, kovy). Předností plastických hmot je vysoká odolnost, ovšem jejich likvidace je stále problémem. Vlivem užívání velkého množství plastů dochází k jeho kumulaci v prostředí [1].

Cílem vývoje biodegradabilních materiálů je nahradit petrochemické plasty za materiály, které jim budou podobné vlastnostmi, ale bude možné je odbourávat. Proto je pro nás významné použití polymerů jako například polylaktidu, polysacharidů a polyhydroxyalkanoátů (PHA). Polyhydroxyalkanoáty jsou za přítomnosti vhodných mikroorganismů rozložitelné v krátkém časovém intervalu [2].

Přestože jsou PHA slibnou náhradou za petrochemické plasty, výrobní náklady omezují jejich použití v průmyslovém měřítku. K docílení větších výtěžků, vyšší čistoty a nižších nákladů na výrobu PHA je zkoumána široká škála zdrojů uhlíku, bakteriálních kmenů, podmínek fermentace a nových metod. Další snahou je zlepšovat fyzikální a chemické vlastnosti PHA například tepelnou stabilitu a další [3].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Biologicky odbouratelné polymery

Biopolymery se považují za biologicky odbouratelné, pokud jsou po době své životnosti za aerobních a anaerobních podmínek degradovány v přijatelném časovém intervalu na kompostovatelné produkty. Jejich rozklad je způsoben různými typy mikroorganismů např. bakteriemi, kvasinkami a dalšími mikroorganismy přítomnými v prostředí. Biodegradace těchto polymerů je nevratný proces, který způsobuje rozpad na malé částice, změny ve struktuře a ztrátu vlastností [4].

2.2 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) patří mezi biologicky rozložitelné polymery. Jsou významné díky obsahu různých strukturně odlišných monomerních složek, které zajišťují široký rozsah vlastností těchto materiálů. Chemické a fyzikální vlastnosti PHA se podobají vlastnostem petrochemických plastů. Například stupeň krystalinity, teplota tání a pevnost v tahu PHB jsou téměř totožné jako u konvenčních plastů [4].

PHA jsou produkovány převážně fermentací z obnovitelných zdrojů [4]. Mnoho druhů bakterií je přirozeně syntetizuje a akumuluje jako zásobu uhlíku sloužící jako zdroj energie. Produkce PHA v mikrobiálních buňkách probíhá za specifických podmínek, což může být způsobeno především limitací dusíku a fosforu, ale také síry, draslíku, zinku, železa, hořčíku nebo kyslíku. Aby mikroorganismy syntetizovaly PHA, musí být v prostředí nadbytek uhlíkatého substrátu [5, 6]. PHA se hromadí v cytoplazmě ve formě kulovitých zrněk, tzv. PHA granulí [5]. Mikrobiální organismy mohou akumulovat PHA až do 80 % své buněčné sušiny [4]. Při vyčerpání zdroje uhlíku dochází k rozkladu PHA za přítomnosti enzymu depolymerázy a uvolněný uhlík je využitý v metabolických drahách [6, 7].

Primární funkcí akumulace PHA mikroorganismy je úchova uhlíku jako zásoba energie. PHA slouží také ke zvýšení odolnosti mikroorganismů vůči nepříznivým podmínkám, kterými může být například vysoká teplota, UV záření a osmotický šok [6].

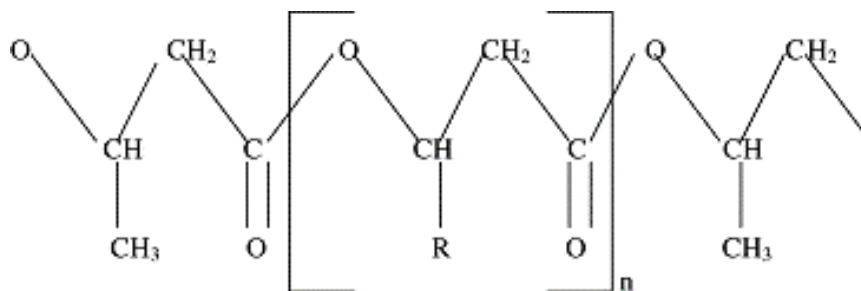
PHA ukládají mikroorganismy ve formě intracelulárních granulí v buněčné cytoplazmě [6, 8]. Průměrná velikost a počet granulí závisí na druhu mikroorganismu a kultivačních podmínkách [9]. Většinou se velikost pohybuje kolem 0,2–0,5 μm . Bakterie regulují syntézu PHA granulí i velikost buněk tak, aby nepřekročily hodnotu 40 % celkového objemu buněk [6].

Amorfní PHA granule tvoří hydrofobní jádro a k němu jsou připojeny proteiny. Tyto proteiny zahrnují PHA syntázy, PHA depolymerázy, strukturní proteiny PHA granulí a regulační proteiny [6]. PHA granule obsahují přibližně 97,5 % PHA, 2 % proteinů a 0,5 % lipidů [10].

PHA uložené ve formě intracelulárních granulí v nativním stavu se liší od PHA izolovaného z buňky. Zatímco nativní granule jsou tvořeny amorfním polymerem, při extrakci polymeru dochází k jeho rychlé krystalizaci [6, 11].

2.2.1 Struktura PHA

PHA se řadí mezi polyestery 3-, 4-, 5-, 6-hydroxyalkanových kyselin [12]. Opakující se jednotky jsou propojeny esterovou vazbou, kterou tvoří karboxylová skupina jednoho monomeru a hydroxylová skupina sousedního monomeru [13]. Struktura obecného vzorce je uvedena na obrázku 1.



Obrázek 1: Struktura PHA [11]

Existují různé typy PHA, mezi které patří například poly(3-hydroxybutyrát) (PHB), poly(4-hydroxybutyrát), poly(3-hydroxyhexanoát) (PHHx), a poly(3-hydroxyvalerát) (PHV) [4]. Polyhydroxybutyrát byl prvním identifikovaným druhem PHA [8]. Jeho hlavním producentem je *Cupriavidus necator*, dříve označovaný jako *Alcaligenes eutrophus* nebo *Ralstonia eutropha*, jež je schopen akumulovat PHB až do 80 % své buněčné sušiny [4, 14]. Nejběžnějším a zároveň nejlépe prostudovaným a charakterizovaným typem PHB je poly(3-hydroxybutyrát) [8, 15]. Začleněním jiných monomerů do polymerního řetězce P(3HB) vznikají kopolymery [8].

2.2.2 Klasifikace PHA

Podle počtu uhlíků v monomerních jednotkách jsou PHA rozděleny do tří skupin: PHA s krátkým řetězcem (scl), PHA se středně dlouhým řetězcem (mcl) a PHA s dlouhým řetězcem (lcl) [3, 12]. Scl-PHA obsahují ve svých opakujících se jednotkách tři až pět atomů uhlíku a patří mezi ně například poly(3-hydroxybutyrát) a poly(3-hydroxyvalerát). Mcl-PHA byly poprvé objeveny u *Pseudomonas oleovorans* v roce 1983, v monomerní jednotce mají šest až čtrnáct uhlíků a řadí se mezi ně například poly(3-hydroxydekanoát). Lcl-PHA obsahují čtrnáct a více atomů uhlíku, ale jsou spíše neobvyklé a méně studované [8, 12].

Další možné dělení je na homopolymery, které obsahují pouze jeden typ monomerních jednotek, a heteropolymery sestávající z více než jednoho typu monomerních jednotek [3].

2.2.3 Vlastnosti PHA

PHA se skládají z různých monomerů, proto se liší jejich fyzikální a chemické vlastnosti [12]. Na složení monomerů závisí řada jejich vlastností, například teplota tání, hydrofobnost polymeru, teplota skelného přechodu a stupeň krystalinity [8].

PHA jsou biologicky rozložitelné sloučeniny s vysokou molekulovou hmotností, které odolávají hydrolytickému štěpení a UV záření, jsou nerozpustné ve vodě, ale rozpouští se

v některých organických rozpouštědlech [4, 12]. Například PHB je rozpustný v chloroformu, ale nerozpouští se v acetonu [11]. Avšak aceton je vhodným rozpouštědlem pro mcl-PHA [12]. PHA jsou také biokompatibilní a netoxické, vykazují však nízkou odolnost vůči kyselinám a zásadám [4].

Biopolymery s krátkým řetězcem jsou tuhé, křehké a jejich stupeň krystalinity je vysoký (v rozmezí 60–80 %), zatímco PHA se středně dlouhým řetězcem tvoří pružné a elastické materiály s nízkou pevností v tahu, nízkou teplotou tání a nízkou hodnotou krystalinity (25 %). Teplota skelného přechodu PHA se středně dlouhým řetězcem je nižší než pokojová teplota [8].

Ke zlepšení vlastností PHA se využívá začlenění jiných monomerů do polymerního řetězce, a tím vznikají kopolymery. Například do řetězce poly(3-hydroxybutyrátu) je možné začlenit 3-hydroxyvalerát, 3-hydroxyhexanoát, 3-hydroxypropionát nebo 4-hydroxybutyrát. Nejznámějším kopolymerem je poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát), jehož tuhost, krystalinita a teplota tání je nižší než tyto vlastnosti poly(3-hydroxybutyrátu) [8].

2.3 Organismy produkující PHA

Polyhydroxyalkanoáty produkuje široké spektrum gram-pozitivních i gram-negativních bakterií a ukládá je ve formě buněčných inkluzí v cytoplazmě. U různých bakterií se typ produkovaných PHA liší [4]. Schopnost syntézy polyhydroxyalkanoátů byla prokázána i u cyanobakterií [16].

Bakterie, které se běžně používají k produkci PHA (například *Pseudomonas putida* nebo *Cupriavidus necator*), bývají často náchylné ke kontaminaci jinými mikroorganismy [3, 17]. Optimálními podmínkami pro jejich růst bývá teplota kolem 30–37 °C a slabě kyselé nebo neutrální pH. Při použití těchto organismů musí být výrobní zařízení uzavřené a zcela sterilní, čímž se stávají biotechnologické procesy složitějšími a dochází ke zvyšování výrobních nákladů [17]. Ke snížení výrobních nákladů je možné využít extremofilní organismy adaptované na přežití v „drsném“ prostředí, které je pro mezofilní mikroorganismy stresující nebo smrtelné [6, 17].

Extremofilní organismy jsou schopny života a růstu při vysoké salinitě, extrémně kyselých nebo bazických hodnotách pH, při nízkých nebo vysokých teplotách prostředí a při vysokém tlaku [6, 18]. Jejich habitatem bývají termální nebo kyselé prameny, dna oceánů, slaná jezera, horké a studené pouště a místa vysoce kontaminovaná jaderným odpadem nebo těžkými kovy [18, 19]. Místa s těmito podmínkami jsou považována za extrémní z lidského hlediska [20]. Skupina extremofilních organismů zahrnuje například psychrofilny, halofily, acidofily, alkalofily a termofily. Psychrofilní organismy jsou přizpůsobeny k životu v extrémně chladném prostředí, halofilové se typicky vyskytují v místech s vysokými koncentracemi solí. Na přežití v kyselém prostředí jsou adaptovány acidofilní organismy naopak alkalofilům prospívá zásadité prostředí. Termofilní organismy se nacházejí v místech s vysokými teplotami [19].

2.3.1 Termofilní mikroorganismy

Termofilní mikroorganismy objevil v 60. letech 20. století Thomas Brock v termálních pramenech Yellowstonského národního parku. Další různé druhy těchto mikroorganismů byly izolovány z hlubokomořských hydrotermálních průduchů, sopečných ostrovů, kompostů

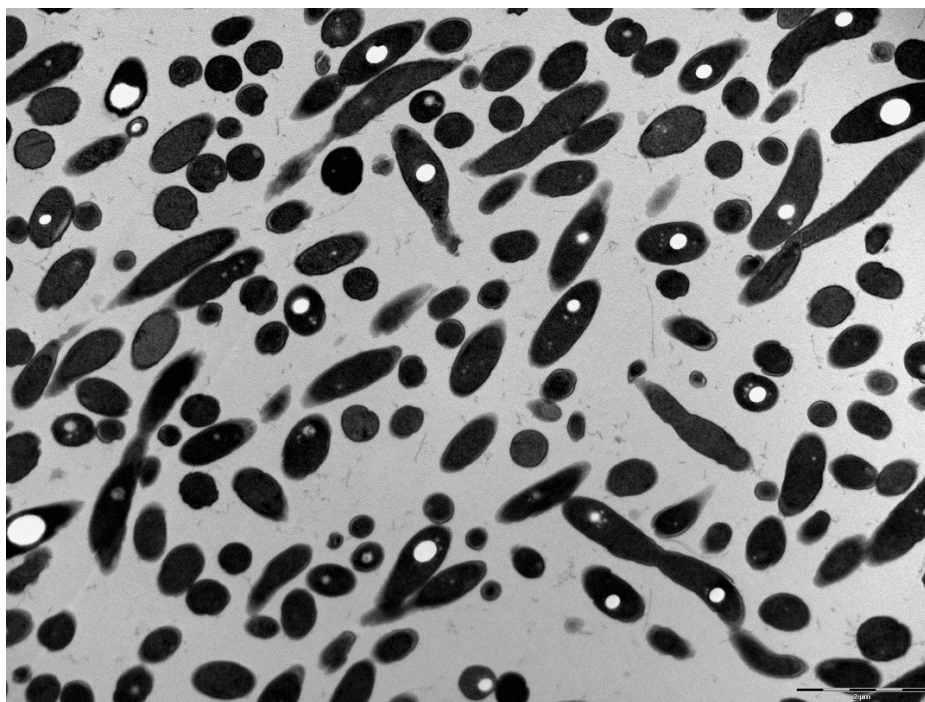
a pouští [20]. Podle optimálních teplot, při kterých dané druhy žijí a rostou, se dělí tyto mikroorganismy na termofilní a hypertermofilní. Termofilní mikroorganismy rostou nejlépe při teplotách nad 45 °C, hypertermofilní při teplotách nad 80 °C [20, 21].

Život v takovém teplotním rozmezí jim umožňuje speciálně přizpůsobené proteiny, lipidy a nukleové kyseliny. Například lipidové membrány termofilů obsahují více nasycených mastných kyselin s přímým řetězcem než membrány mezofilních mikroorganismů [18]. Enzymy produkované termofilními mikroorganismy se nazývají termozymy a mohou jimi být například celulózy, pektinázy, proteázy, lipázy a glykolytické izomerázy. Jedním z nejznámějších termofilních enzymů je DNA polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*. Tato DNA polymeráza byla prvním termostabilním enzymem použitým pro PCR a stala se tak důležitým nástrojem molekulární biologie [22].

Termofilní mikroorganismy bývají často vysoce odolné vůči chemickým denaturačním činidlům, přizpůsobují se širokému rozmezí pH a jsou rezistentní k nevodným rozpouštědlům [17]. Díky těmto specifickým vlastnostem jsou termofilní mikroorganismy významné pro biotechnologické aplikace [20]. Jejich použitím je možné dosáhnout snížení nákladů na výrobu PHA, protože nejsou tak náchylné na kontaminaci jinými především mezofilními mikroorganismy. Odpadají tedy náklady spojené s udržováním sterility, které jsou nutné během produkce PHA pomocí mezofilních mikroorganismů [6].

2.3.1.1 *Tepidiphilus thermophilus*

Bakterie *Tepidiphilus thermophilus* byla poprvé izolována z horkého pramene nacházejícího se v Jharkhandu v Indii. Je tvořena gramnegativními, tyčinkovitými a aerobními buňkami, které se pohybují za pomoci jednoho polárního bičíku. Šířka buněk se pohybuje kolem 0,6–0,65 µm a délka je 1,5–1,8 µm. Tyto bakterie rostou při teplotě 30–60 °C a pH 5,5–7,5. Optimálními podmínkami pro jejich růst je teplota 50–55 °C a pH 6,5–7 [23].



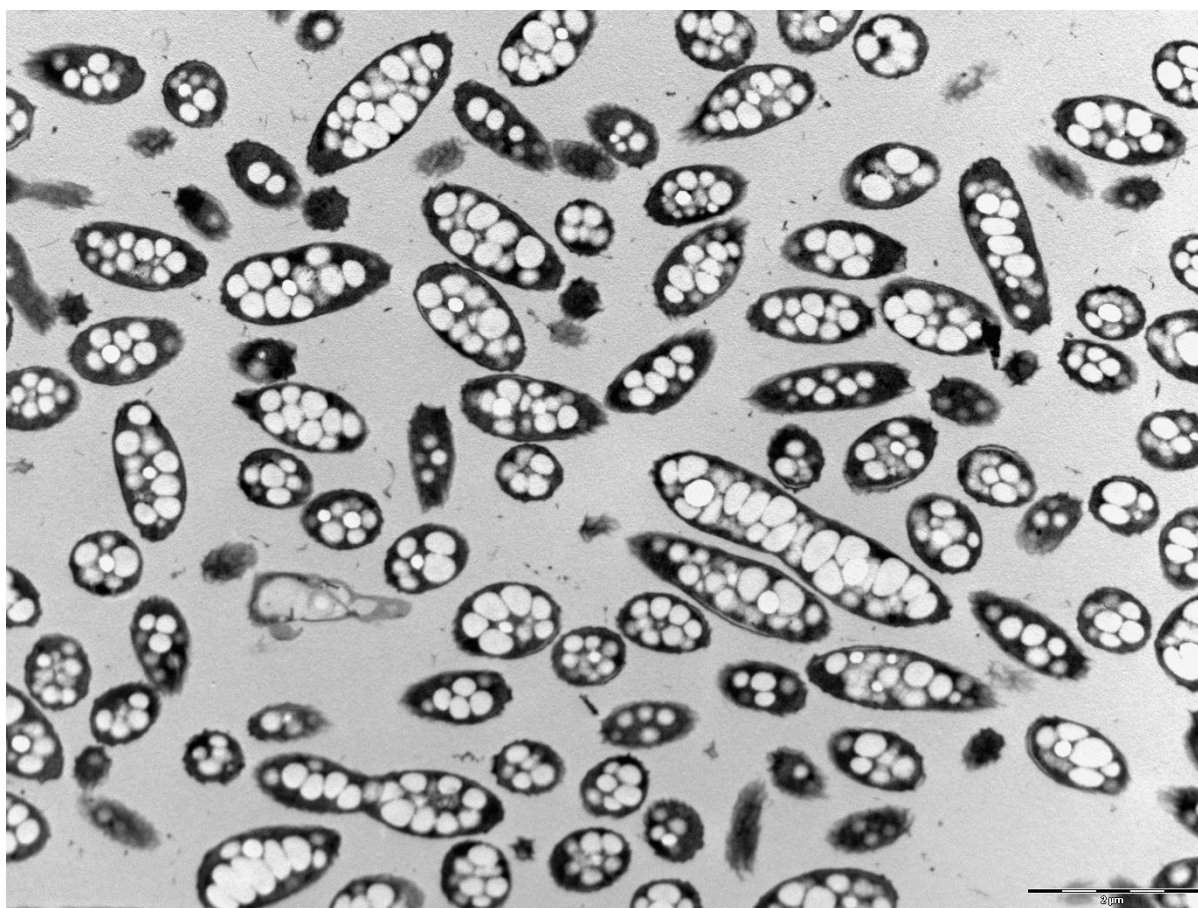
Obrázek 2: *Tepidiphilus thermophilus*, transmisní elektronový mikroskop

2.3.1.2 *Tepidimonas fonticaldi*

Tepidimonas fonticaldi jsou bakterie izolované na Tchaj-wanu z horkého pramene Antun. Jejich buňky jsou gramnegativní, tyčinkovité a aerobní. Šířka buněk je 0,3–0,5 μm a délka se pohybuje kolem 0,6–1,7 μm . Pohyb těchto bakterií je zajištěn pomocí jednoho polárního bičíku. *Tepidimonas fonticaldi* vytváří na agaru nepigmentované kolonie. Tyto bakterie rostou při teplotě 35–60 °C v prostředí s obsahem 0–1 % NaCl a pH 7–9. K optimálnímu růstu dochází při teplotě 55 °C v prostředí s 0,2 % NaCl a při pH 7 [24].

2.3.1.3 *Tepidimonas taiwanensis*

Bakterie *Tepidimonas taiwanensis* byly izolovány z horkého pramene Sih-Chong-Si lokalizovaného v oblasti Pingtung na Tchaj-wanu. Jejich buňky jsou gramnegativní, tyčinkovité a pohyblivé díky jednomu polárnímu bičíku. Šířka buněk je 0,4–0,5 μm a délka je 0,8–2 μm . Růst těchto bakterií je zřejmý při teplotě 35–60 °C a při pH 6–8. Optimální podmínky pro růst tvoří teplota 55 °C a pH 7. Jako rezervní materiál si ukládá *Tepidimonas taiwanensis* granule PHB. Výhodou tohoto bakteriálního kmene může být schopnost produkce alkalických proteáz, které jsou využitelné v různých průmyslových odvětvích [25].



Obrázek 3: *Tepidimonas taiwanensis*, transmisní elektronový mikroskop

2.4 Biosyntéza PHA

2.4.1 Podmínky a substrát pro syntézu PHA

Mikroorganismy ukládají PHA, pokud je v nadbytku přítomen uhlíkový substrát a současně mají nedostatek jiných živin, které tvoří základ jejich organismu [6]. Těmito živinami bývá především dusík a fosfor [5]. Při vyčerpání externích zdrojů uhlíku jsou PHA využity jako zdroj energie a uhlíku [6].

Ke zvýšení obsahu PHA a zlepšení rychlosti růstu bakterií slouží optimalizace teploty, pH, koncentrace živin a inhibice vedlejších produktů [3]. Na buněčný růst a akumulaci PHA má vliv i poměr uhlíku a dusíku. Při zvýšení poměru C/N dochází k posílení akumulace PHA, zatímco nižší poměr C/N podporuje růst buněk [12]. Poměr C/N má podle studie provedené roku 1999 na mikroorganismu *Pseudomonas nitroreducens* vědci z pekingské Tsinghua Univerzity také vliv na složení mcl-PHA [26].

Substrátem pro tvorbu PHA je především uhlík [11]. Zdroji uhlíku mohou být čisté a komerčně dostupné látky, odpadní materiály nebo plyny. Z plynů lze konkrétně využít oxid uhličitý nebo metan za pomoci methanotrofních mikroorganismů. Složení substrátu a kultivační podmínky mají vliv na složení vyrobených polymerů. Pomocí vhodného výběru těchto faktorů tedy může být zlepšena produktivita a selektivita syntetizovaných PHA, dochází ale ke zvyšování nákladů na substráty [3].

Zdroj uhlíku je hlavním důvodem vysokých výrobních nákladů, proto je snaha využívat levné zdroje uhlíku zahrnující odpadní materiály [3, 11]. Odpadní materiály vznikají ve velkém množství v potravinářském a zemědělském průmyslu, takže by jejich použitím docházelo nejen ke snížení nákladů na substráty, ale i k valorizaci odpadů [4]. Před použitím substrátu z odpadních materiálů jsou nutné předběžné úpravy substrátu a kultivačních podmínek a volba vhodného bakteriálního kmene. Například potravinové odpady jsou hydrolyzovány na prekurzory PHA, kterými jsou jednoduché cukry nebo mastné kyseliny [27].

2.4.2 Metabolické dráhy biosyntézy PHA

Biosyntetické dráhy PHA jsou přímo nebo nepřímo propojeny s centrálními metabolickými drahami, mezi které patří glykolýza, pentózový cyklus, Krebsův cyklus a dráhy biosyntézy a degradace aminokyselin a mastných kyselin [28].

První charakterizovanou a zároveň nejreprezentativnější biosyntetickou dráhou je dráha pro syntézu poly(3-hydroxybutyrátu), tedy scl-PHA [29]. Tato dráha byla studována v řadě různých mikroorganismů, ale její mechanismus je nejlépe prozkoumaný u bakterie *Cupriavidus necator*. Biosyntetická dráha poly(3-hydroxybutyrátu) se skládá ze tří hlavních reakčních kroků katalyzovaných enzymy acetyl-CoA acetyltransferázou (β -ketothioláza neboli *PhaA*), acetoacetyl-CoA reduktázou (*PhaB*) a PHA syntázou (*PhaC*) [28].

Základním prekurzorem pro biosyntézu různých druhů PHA je acetyl-CoA, který mohou bakterie produkovat z cukrů nebo jiných látek [3, 28]. V prvním kroku biosyntetické dráhy poly(3-hydroxybutyrátu) dochází ke kondenzaci dvou molekul acetyl-CoA a vzniká acetoacetyl-CoA. Tuto reakci katalyzuje enzym acetyl-CoA acetyltransferáza (*PhaA*). Ve druhém kroku je acetoacetyl-CoA redukován pomocí enzymu acetoacetyl-CoA reduktázy

(PhaB) na (*R*)-3-hydroxybutyryl-CoA za použití kofaktoru NADPH. Třetí krok je katalyzován enzymem PHA syntázou (*PhaC*) a dochází při něm ke spojování jednotek (*R*)-3-hydroxybutyrylu-CoA esterovými vazbami, čímž se prodlužuje řetězec poly(3-hydroxybutyrátu) [28].

Druhý způsob syntézy PHA je charakteristický pro většinu bakterií rodu *Pseudomonas* patřících do rRNA homologické skupiny I, například pro bakterie *Pseudomonas oleovorans* nebo *Pseudomonas putida*. Tato biosyntetická dráha je propojena s metabolismem mastných kyselin, konkrétně β -oxidací mastných kyselin a vede ke vzniku mcl-PHA [30, 31]. Zdroje uhlíku jsou oxidovány příslušnými enzymy až na mastné kyseliny. Tyto kyseliny jsou převedeny na odpovídající thioestery acyl-CoA, které se následně oxidují β -oxidací přes meziprodukty enoyl-CoA, (*S*)-3-hydroxyacyl-CoA a 3-ketoacyl-CoA až na konečný produkt této dráhy, acetyl-CoA. Při β -oxidaci mastných kyselin s lichým počtem uhlíků vznikají jako konečné produkty acetyl-CoA a propionyl-CoA [31].

Za podmínek vhodných pro syntézu PHA nedochází při β -oxidaci k úplné degradaci mastných kyselin až na acetyl-CoA, ale meziprodukty této metabolické dráhy jsou částečně nebo úplně převedeny na PHA. Nicméně ani jeden z těchto meziproduktů není vhodný jako substrát pro mcl-PHA syntázy, takže je nutná dráha, jež přeměňuje některý z meziproduktů na (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA. Tato dráha může být uskutečněna pomocí epimeráz přeměňujících (*S*)-izomer 3-hydroxyacyl-CoA na (*R*)-izomer, nebo pomocí hydratáz (*PhaJ*) převádějících enoyl-CoA na (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA, a nebo pomocí reduktáz (*FabG*), které jsou schopny redukovat 3-ketoacyl-CoA na (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA. (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA je základní jednotkou, jež je polymerizována mcl-PHA syntázami na mcl-PHA [31].

Třetím typem biosyntetické dráhy PHA je *de novo* syntéza mastných kyselin. Její přítomnost byla prokázána například u bakterií *Pseudomonas putida* nebo *Pseudomonas aeruginosa* [7]. Tyto bakterie jsou schopny k syntéze mcl-PHA využívat jako zdroje uhlíku například glukózu, glukonát nebo glycerol [7, 31]. Zdroje uhlíku jsou převedeny na acetyl-CoA, který je v dráze syntézy mastných kyselin postupně přeměňován až na meziprodukt (*R*)-3-hydroxyacyl-ACP. V dalším kroku je klíčovým enzymem hydroxyacyl-ACP-CoA transferáza (*PhaG*), která přeměňuje (*R*)-3-hydroxyacyl-ACP na (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA [7]. Vzniklý (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA je substrátem mcl-PHA syntáz, které zajistí polymeraci na mcl-PHA [31].

PHA syntázy třetí třídy vyžadují pro svoji celkovou aktivitu dvě podjednotky, PhaC a PhaE. Molekulová hmotnost každé z těchto podjednotek se pohybuje okolo 40 kDa [32]. PHA syntázy třetí třídy umožňují produkci scl-PHA z monomerů s řetězcem obsahujícím 3–5 atomů uhlíku [32, 33]. Vyskytují se například u bakterií *Allochromatium vinosum* [32].

PHA syntázy čtvrté třídy se skládají ze dvou podjednotek, PhaC a PhaR [33]. Katalyzují polymerizaci monomerů s krátkým řetězcem obsahujícím 3–5 atomů uhlíku za vzniku scl-PHA [32, 33]. První syntáza čtvrté třídy byla nalezena u bakterií *Bacillus megaterium*. Narozdíl od ostatních syntáz jsou PHA syntázy čtvrté třídy schopny pomocí podjednotky PhaR štěpit molekulu a na její karboxylový konec zařadit alkohol. Hlavním účelem této reakce je regulace molekulové hmotnosti syntetizovaných PHA [32].

2.5 Aplikace PHA

PHA je možné využívat v mnoha různých oblastech především díky tomu, že mají širokou škálu mechanických vlastností, jsou biologicky rozložitelné, biokompatibilní a netoxické [4, 11]. Uplatnění nachází ve hlavně ve dvou odvětvích, v odvětví lékařských aplikací a v odvětví průmyslových aplikací [34].

2.5.1 Aplikace v lékařském odvětví

PHA se využívají jako materiály v lékařství hlavně proto, že jsou netoxické a zároveň biokompatibilní s různými buňkami, například s buňkami kostní tkáně, epitelovými buňkami a chondrocyty. Tyto biopolymery mohou být použity jako náhrada za syntetické polymery, které způsobují v lidském těle vedlejší účinky. Hlavní monomerní jednotkou PHB je (R)-3-hydroxybutyrát, jež se přirozeně vyskytuje v krvi, proto je považován za vhodnou a bezpečnou náhradu syntetických polymerů v lékařských aplikacích [34].

Vysoce čisté PHA mohou být použity v tkáňovém inženýrství k výrobě cévních štěpů, srdečních chlopní nebo konstrukcí s vyšší mechanickou pevností, které poskytují buňkám výživu a tím podporují jejich růst a regeneraci tkání [35]. Mezi tyto pevné konstrukce patří například šrouby, stehy, kostní implantáty nebo materiály sloužící jako lešení pro opravu kloubní chrupavky [34, 35].

Dále mohou být PHA využity jako nosiče léků, které zajistí cílený transport a řízené uvolňování léčiv [34]. Použití PHA jako suroviny pro výrobu tablet je možné díky biologické odbouratelnosti těchto polymerů [35]. Například jako nosiče antibiotika rifampicin se osvědčily mikrokuličky PHB, které umožňují řízené a rychlé uvolňování léčiva [34, 35].

2.5.2 Aplikace v průmyslovém odvětví

Díky podobným vlastnostem PHA a petrochemických plastů je možné využít PHA jako materiál vhodný pro výrobu bioplastů [34]. Nicméně náklady na jejich výrobu jsou ve srovnání s výrobou petrochemických plastů vysoké, proto jsou zatím PHA využívány především ve vysoce specializovaných aplikacích a lékařství [36]. V průmyslovém odvětví nachází PHA uplatnění například jako stavební nebo obalové materiály, inteligentní gely, latex nebo lepidla citlivá na teplo [34]. Lze je využít také v zemědělství k řízenému uvolňování herbicidů [34, 36].

V potravinářském průmyslu mohou být PHA použity jako náhrada za obaly z nerozložitelných syntetických polymerů. Výhodou je nejen biodegradabilita, ale také vhodné mechanické a fyzikální vlastnosti tohoto materiálu, zejména nízká propustnost pro kyslík, oxid uhličitý a vodu [34]. Díky těmto vlastnostem je možné prodloužit trvanlivost potravin balených v PHA obalech [4].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité mikroorganismy, chemikálie a přístroje

3.1.1 Použité mikroorganismy

K provedení experimentální části práce byly použity celkem tři kmeny bakterií. Dva z nich pochází z belgické sbírky mikroorganismů Přírodovědecké fakulty gentské univerzity, *Tepidimonas taiwanensis* LMG 22826 a *Tepidimonas fonticaldi* LMG 26746. Třetí bakteriální kmen *Tepidiphilus thermophilus* DSM 27220 byl získán z německé sbírky mikroorganismů Leibniz Institut v Braunschweig.

Pro zjednodušení byly vzorky bakteriálních kmenů označeny zkratkami uvedenými v tabulce 1.

Tabulka 1: Použité bakteriální kmeny

Mikroorganismus	Sbírkové označení	Zkratka
<i>Tepidiphilus thermophilus</i>	DSM 27 220	M1
<i>Tepidimonas taiwanensis</i>	LMG 22 826	M2
<i>Tepidimonas fonticaldi</i>	LMG 26 746	M3

Kultury *Tepidiphilus thermophilus* a *Tepidimonas taiwanensis* byly odeslány do Biologického centra Akademie věd České republiky v Českých Budějovicích, kde byly vytvořeny jejich fotografie z transmisního elektronového mikroskopu.

3.1.2 Chemikálie použité pro kultivaci

- Nutrient broth (HiMedia, Indie)
- Agar powder (HiMedia, Indie)
- Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát, p.a. (LachNer, Česká republika)
- Dihydrogenfosforečnan draselný, p.a. (LachNer, Česká republika)
- Chlorid amonný (LachNer, Česká republika)
- Síran hořečnatý heptahydrát, p.a. (LachNer, Česká republika)
- Chlorid vápenatý dihydrát, p.a. (Lachema, Česká republika)
- Citronan amonno-železitý (Fluka, Švýcarsko)
- Yeast extrakt (HiMedia, Indie)
- Roztok stopových prvků (TES II) – složení: 50 [g/l] EDTA; 8,3 [g/l] FeCl₃; 0,84 [g/l] ZnCl₂; 0,1 [g/l] H₃BO₃; 0,13 [g/l] CuCl₂ · 2 H₂O; 0,1 [g/l] CoCl₂ · 6 H₂O; 0,016 [g/l] MnCl₂ · 6 H₂O)

3.1.3 Chemikálie použité pro screening uhlíkatých zdrojů

- Glycerol bezvodý, p.a. (LachNer, Česká republika)
- D-glukóza monohydrát p.a. (LachNer, Česká republika)
- D-fruktóza (LachNer, Česká republika)
- Galaktóza (LachNer, Česká republika)
- Manóza (Sigma-Aldrich, Německo)
- D-(+)-xylóza (HiMedia, Indie)

- Sacharóza (LachNer, Česká republika)
- Laktóza monohydrát (LachNer, Česká republika)
- Arabinóza (Sigma-Aldrich, Německo)
- Škrob rozpustný (Penta, Česká republika)
- Kyselina valerová (Sigma-Aldrich, Německo)
- Propionát sodný (Sigma-Aldrich, Německo)
- 1,4-butandiol (Fluka, Švýcarsko)
- γ -butyrolakton (Sigma-Aldrich, Německo)
- Chloroform (LachNer, Česká republika)
- Kyselina dinitrosalicylová (Sigma-Aldrich, Německo)
- Hydroxid sodný p.a. (LachNer, Česká republika)
- Vinan sodno-draselný p.a. (Lachema, Česká republika)

3.1.4 Komponenty použité k izolaci DNA, PCR a elektroforéze

- Tris-HCl pufr (5 mM, pH 8,5)
- Master mix OneTaq Hot Start (2x koncentrovaný) se standardním pufrům (New England Bio Labs, UK)
složení: 20 mM Tris-HCl; 1,8 mM MgCl₂; 22 mM NH₄Cl₂; 22 mM KCl; 0,2 mM dNTPs; 5% glycerol; 0,06% IGEPAL CA-630; 0,05% Tween 20; 25 jednotek/ml OneTaq Hot Start DNA polymeráza
- 25 mM MgCl₂ (ThermoScientific, Spojené státy americké)
- Primery – 16S-F, 16S-R, G-D, G1R (Generi Biotech, Česká republika)
- Sterilní voda Aqua pro injectione (B. Braun Medical, Německo)
- Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe, Německo)
- Agaróza (Sigma-Aldrich, Německo)
- DNA ladder – velikost fragmentů 3 000, 1 500, 1 000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp (Nippon Genetics Europe, Německo)
- TBE pufr (složení: 108 g tris(hydroxymethyl)aminomethan; 55 g H₃BO₃; 9,3 g EDTA; 1000 ml destilovaná voda)
- Nanášecí pufr (složení: 20 μ g Bromfenylová modř; 3 ml glycerol; 7 ml destilovaná voda)

3.1.5 Chemikálie použité pro screening proteáz

- Nutrient broth (HiMedia, Indie)
- Agar powder (HiMedia, Indie)
- Sušené odstředěné mléko (Bohemilk, Česká republika)
- Želatina (Carl Roth, Německo)
- Kaseinát sodný (Sigma-Aldrich, Německo)
- Yeast extrakt (HiMedia, Indie)
- Pepton from soya (HiMedia, Indie)
- Trypton (pepton from casein) (HiMedia, Indie)
- Kyselina trichloroctová (Sigma-Aldrich, Německo)
- Uhličitan sodný bezvodý p.a. (LachNer, Česká republika)
- Folin-Ciocalteu roztok (Penta, Česká republika)

3.1.6 Použité přístroje

- Laminární box Biohazard Airstream (ESCO)
- Blokový termostat Stuart SBH 200D – Bibby Scientific
- Centrifuga U-32R – Boeco (Německo)
- Thermal cycler MyCycler™ – BIO-RAD
- Duální vizualizační systém Ultra Viewer – Ultra Lum
- Transiluminátor TVR 3121 – Spectroline
- Váhy Kern EW 620-3NM (Německo)
- Magnetická míchačka, Kartell, TKO (Spojené státy americké)
- Temperovaná třepačka, Heidolph, Incubator 1000 (Česká republika)
- ELISA reader, BioTek, ELx808 (Německo)
- Centrifuga Sigma, Sartorius
- Vortex TK3S, techno Kartell
- Nanofotometr, Implen, P300 (UK)
- Analytické váhy PA224C – Pioneer (Švýcarsko)
- Plynový chromatograf s FID, Thermo Scientific, Trace 1300; kolona: Agilent J&W DB-WAX 30 m by 0,25 mm, Agilent Technologies
- Vyhodnocovací software Thermo Software Xcalibur
- Běžné laboratorní pomůcky a sklo

3.2 Uchovávání bakterií

Získané bakteriální kultury byly uchovávány v hlubokomrazicím boxu při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve formě kryozkumavek. K rozočkování kultur do nových kryozkumavek bylo použito inokulum, ze kterého bylo v laminárním boxu odebíráno po 1 ml bakteriální kultury do zkumavky obsahující 0,5 ml 30% sterilního glycerolu. Výsledná koncentrace glycerolu ve zkumavce byla tedy 10 %. Takto připravené kryozkumavky byly uchovávány v mrazicím boxu.

3.3 Kultivace bakterií

Kultivace mikroorganismů probíhala nejprve v inokulačních médiích bohatých na živiny a následně v minerálních médiích – produkčních.

3.3.1 Inokulační médium

Pro přípravu inokulačních médií byly použity Erlenmeyerovy baňky na 100 ml naplněné roztokem komplexního média Nutrient broth do objemu 50 ml. Kultivace probíhala 24 hodin při 170 ot/min na třepačce temperované na $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Při přípravě média na Petriho misky bylo k inokulačnímu mediu přidáno ještě 17 g/l agarů.

Inokulační médium Nutrient broth:

Nutrient broth	25 [g/l]
----------------	----------

3.3.2 Produkční médium

Produkční médium bylo připravováno do Erlenmeyerových baněk na 250 ml plněných médiem do objemu 100 ml. Zdroje uhlíku a TES II byly do média přidávány až po sterilaci. Po zaočkování tvořila inokulační kultura 10 % produkčního média. Kultivace trvala po dobu 72 hodin.

Složení produkčního média (minerální médium):

Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	9 [g/l]
KH ₂ PO ₄	1,5 [g/l]
NH ₄ Cl	1 [g/l]
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2 [g/l]
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,02 [g/l]
NH ₄ Fe ^{III} citrát	0,0012 [g/l]
Yeast extrakt*	0,5 [g/l]
Uhlíkatý zdroj**	20 [g/l]
TES II**	1 [ml/l]

* koncentrace Yeast extraktu v médiu pro *Tepidiphilus thermophilus* byla 3 [g/l]

** přidáno až po sterilaci média

3.4 Optimalizace růstu bakterií a produkce PHA

3.4.1 Hledání vhodného zdroje uhlíku

Screening utilizace uhlíkatých zdrojů byl proveden s bakteriálními kmeny *Tepidiphilus thermophilus* DSM 27220, *Tepidimonas taiwanensis* LMG 22826 a *Tepidimonas fonticaldi* LMG 26746. Do produkčního média byly přidány různé zdroje uhlíku za účelem nalezení nejvhodnějšího uhlíkatého substrátu. Z řady monosacharidů byla použita glukóza, fruktóza, galaktóza, manóza a xylóza, z řady disacharidů sacharóza a laktóza, dále byl využit škrob, jenž patří mezi polysacharidy. Jako nesacharidový zdroj uhlíku sloužil glycerol. Testování proběhlo na mikrotitrační destičce, do jejíž děr naplněných 75 µl minerálního média a 75 µl uhlíkatých zdrojů bylo pipetováno 20 µl kultury z inokula. Ke srovnání byla na destičku pipetována ještě negativní kontrola, která obsahovala médium a kulturu, ale nepřidával se zdroj uhlíku. Kultivace probíhala 72 hodin při teplotě 50 °C. V čase 0 h a v čase 72 hodin bylo provedeno měření zákalu přístrojem ELISA reader, čímž bylo možné zaznamenat nárůst kultury. Na základě výsledků z mikrotitrační destičky byly vybrány vhodné zdroje uhlíku pro následné submerzní kultivace.

3.4.2 Kultivace při různých teplotách

Růst kultury a produkce PHA byly pozorovány při různých teplotách kultivace. Produkční média bakterií *Tepidiphilus thermophilus* a *Tepidimonas taiwanensis* obsahovala jako zdroj uhlíku glukózu, médium bakterie *Tepidimonas fonticaldi* glycerol. Kultivace všech jmenovaných bakterií byly provedeny při teplotách 45, 50, 55 a 60 °C a doba kultivace byla 72 hodin.

3.4.3 Kultivace s přidavkem prekurzorů

Přidavkem prekurzorů do produkčního média byla sledována schopnost všech vybraných bakterií produkovat kromě 3HB i 4HB nebo 3HV. Jako prekurzory pro 4HB byly použity 1,4-butandiol a γ -butyrolakton. U těchto prekurzorů nebyl do produkčního média přidáván zdroj uhlíku ve formě glukózy nebo glycerolu a koncentrace prekurzorů v médiu byla 8 g/l. Prekurzory použitými pro syntézu 3HV byly propionát sodný a kyselina valerová. Kyselina valerová byla do média přidána až po sterilaci. Koncentrace těchto prekurzorů v produkčním médiu byla 2 g/l a zdroj uhlíku byl přidán v koncentraci 20 g/l. Zdroje uhlíku byly stejné jako při screeningu teplot. Kultivace takto připravených produkčních médií probíhala 72 hodin při teplotě 50 °C.

3.4.4 Kultivace na modelových hydrolyzátech

Na schopnost utilizace modelových hydrolyzátů byl testován bakteriální kmen *Tepidimonas taiwanensis*. Do produkčních médií byly před sterilací přidány modelové hydrolyzáty simulující měkké dřevo, tvrdé dřevo, rýžovou slámu, cukrovou třtinu, pšeničnou slámu a pšeničné otruby, celková koncentrace sacharidů v hydrolyzátech byla 20 g/l. Jejich sacharidové složení je uvedeno v tabulce 2. Jako kontrola bylo použito produkční médium s přidavkem 20 g/l glukózy. Kultivace bakterií probíhala 72 hodin v termostatu při 50 °C.

Tabulka 2: Složení modelových hydrolyzátů

Vzorek	Glukóza [g/l]	Xylóza [g/l]	Arabinóza [g/l]	Manóza [g/l]	Galaktóza [g/l]
Měkké dřevo	16,6	1	0,1	2	0,3
Tvrdé dřevo	3,2	12,4	1	1,8	1,6
Rýžová sláma	4,2	13,4	2,4		
Cukrová třtina	2,8	15	2,2		
Pšeničná sláma	11,2	7,2	0,9		0,7
Pšeničné otruby	0,8	12,4	6,8		

3.5 Screening produkce proteáz

K ověření schopnosti produkce proteáz byl kmen *Tepidimonas taiwanensis* LMG 22826 kultivován na Petriho miskách s pevným médiem obsahujícím 10 g/l sušeného odstředěného mléka, 8 g/l nutrient broth a 17 g/l agaru. Kultivace byla provedena v termostatu při teplotě 50 °C a probíhala 48 hodin. Přítomnost proteáz byla prokázána vývojem číré zóny obklopující bakteriální kolonie.

Dále byl bakteriální kmen *Tepidimonas taiwanensis* LMG 22826 podroben testu, při němž bylo hledáno vhodné produkční médium pro syntézu proteáz. První médium bylo připraveno podle návodu uvedeného v kapitole 3.3.2 a obsahovalo tedy 0,5 g/l yeast extraktu. Do ostatních produkčních médií tohoto typu byly přidány místo 0,5 g/l yeast extraktu pepton, kaseinát sodný, yeast extrakt, trypton a želatina v koncentraci 1 g/l. Další druhy produkčních médií byly složeny pouze ze dvou komponent. Jedno obsahovalo 8 g/l nutrient broth a 2 g/l želatiny, druhé 8 g/l nutrient broth a 2 g/l kaseinátu sodného a třetí 8 g/l nutrient broth a 10 g/l odstředěného

sušeného mléka. Poslední produkční médium bylo tvořeno pouze 25 g/l nutrient broth. Kultivace probíhala 48 hodin při teplotě 50 °C. Ke stanovení aktivity proteáz byl použit supernatant získaný centrifugací kultury v produkčním médiu po kultivaci.

3.6 Použité metody

3.6.1 Izolace bakteriální DNA pomocí tepelné lyze

Získání bakteriální DNA bylo nutné pro následně prováděné molekulárně biologické metody, PCR a elektroforézu. Sterilní zkumavka Eppendorf byla naplněna 100 µl lyzačního pufru (5 mM Tris-HCl, pH 8,5), do kterého byly následně bakteriologickou kličkou přeneseny buňky bakteriální kultury kultivované na Petriho miskách. Takto připravené zkumavky se vzorkem se obalily alobalem a vložily do blokového termostatu vyhřátého na 98 °C. V něm byly ponechány po dobu 10 minut a během této doby docházelo k tepelné lyzi buněk. Poté byl vzorek ve zkumavce centrifugován při 10 000 ot/min 10 minut. V laminárním boxu byl ze zkumavek odebrán roztok nad sedimentem do čistých zkumavek Eppendorf a tím byl připraven vzorek obsahující bakteriální dsDNA. Uchovávání vzorku probíhalo v mrazicím zařízení.

3.6.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Pro zjištění koncentrace a čistoty DNA získané tepelnou lyzí bylo provedeno spektrofotometrické měření na přístroji Nanofotometr, Implen, P300. Jako blank byl použit lyzační pufr. Koncentrace vzorku DNA v [ng/µl] byla odečtena přímo z přístroje, čistota DNA byla posuzována na základě poměru A260/A280. Pro čistou DNA by měla vyjít výsledná hodnota poměru okolo 1,8. Nižší hodnota tohoto poměru signalizuje kontaminaci proteiny, vyšší hodnota znečištění RNA.

3.6.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pomocí molekulárně biologické metody PCR multiplex bylo možné amplifikovat zároveň dva různé úseky DNA použitím dvou odlišných párů primerů. Prvním zkoumaným úsekem byl gen kódující 16S rRNA, jehož velikost je přibližně 1500 bp [37]. Tento gen je charakteristický pro všechny bakteriální druhy a k jeho vymezení byly použity primery 16S-F a 16S-R. Druhým úsekem amplifikovaným pomocí PCR multiplex byl gen *phaC*, který kóduje PHA syntázy I. třídy. Tento gen obsahuje 551 bp a byl vymezen primery G-D a G1-R.

Složení směsi pro PCR multiplex:

Master mix OneTaq Hot Start*	12,5 µl
Mg ²⁺	2,6 µl
Primer 16S-F	1,0 µl
Primer 16S-R	1,0 µl
Primer PhaC G-D	1,0 µl
Primer PhaC G1-R	1,0 µl
DNA	2,0 µl
PCR voda	3,9 µl

*(2x koncentrovaný) se standardním pufrem

Pro přípravu PCR směsí byly použity vzorky izolované DNA ze všech zkoumaných bakterií. Pro kontrolu správnosti průběhu reakce byla připravena pozitivní kontrola. Ta obsahovala stejné komponenty jako PCR směsi, ale byla v ní použita DNA z bakterie *Cupriavidus necator* (H16) u níž jsou hledané geny potvrzeny. Negativní kontrola soužila jako důkaz, který vyloučil možnost kontaminace použitých komponent PCR směsi. V PCR směsi pro negativní kontrolu byly nahrazeny 2 µl DNA 2 µl PCR vody.

Následně byla provedena amplifikace pomocí teplotního programu s annealingovou teplotou 55 °C.

Tabulka 3: Teplotní program PCR multiplex

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
1	94	30	1
2	94	30	30
	55	30	
	68	90	
3	68	300	1
	30	60	

3.6.4 Elektroforéza na agarózovém gelu

Gelová elektroforéza následovala po uskutečnění PCR a soužila k ověření přítomnosti ampliconů ve vzorcích. K jejímu provedení byl použit 2% agarózový gel s přídavkem 6 µl barviva Midori Green. Do jamek v gelu bylo nanášeno 10 µl směsi složené z 3 µl nanášecího pufu a 10 µl vzorku. Další jamky byly naplněny pozitivní kontrolou, negativní kontrolou a DNA žebříčkem, jež tvořil standard s definovanou velikostí fragmentů. Elektroforéza probíhala po dobu 30 minut při napětí 90 V. Po jejím ukončení byl pozorován výsledek prosvícením gelu pomocí UV transiluminátoru.

3.6.5 Měření zákalu produkčního média po kultivaci

Spektrofotometrické měření zákalu sloužilo k určení nárůstu mikroorganismů, k němuž došlo během kultivace. Po ukončení kultivace v produkčním médiu byly odebírány kultury do kyvety s délkou optické dráhy 1 cm a ředěny tak, aby jejich optická hustota spadala do rozmezí hodnot absorpance 0,1–1. Zákal byl měřen při vlnové délce 630 nm proti destilované vodě.

3.6.6 Gravimetrické stanovení obsahu biomasy

Biomasa byla získávána z produkčních médií. Po 72 hodinách kultivace byly odebírány kultury po 10 ml do centrifugačních zkumavek, v nichž došlo po 5 minutách centrifugování rychlostí 6000 ot/min k usazení biomasy na dně zkumavek. Supernatant byl odlit a k sedimentu bylo přidáno 5 ml destilované vody. Sediment byl rozsuspendován a následovalo opět 5minutové odstředění v centrifuze rychlostí 6000 ot/min. Přebytná voda byla slita a získaná biomasa se usušila v sušárně temperované na 70 °C a poté byla zvážena.

3.6.7 Analýza PHA pomocí plynové chromatografie

Identifikace a stanovení koncentrace PHA ve vzorcích byly provedeny pomocí plynové chromatografie s FID detekcí. Do krimpovacích vialek bylo naváženo 8–11 mg vysušené biomasy získané z produkčního média. K navážené biomase byl napipetován 1 ml chloroformu a následně ještě 0,8 ml roztoku 15% kyseliny sírové v methanolu s vnitřním standardem, jenž tvořila kyselina benzoová v koncentraci 5 mg/ml. Směs v uzavřených vialkách byla esterifikována po dobu 3 hodin v termostatu temperovaném na 94 °C. Esterifikace sloužila k převedení netěkavých PHA na těkavé methylestery použitelné k plynové chromatografii.

Po vychlazení byly vzorky promíchány s 0,5 ml 50 mM NaOH a bylo vyčkáno do oddělení organické a vodné fáze. Z organické fáze bylo odebráno 50 µl vzorku do čistých šroubovacích vialek předem naplněných 900 µl chloroformu. Následovala analýza takto připravených vzorků pomocí plynové chromatografie s FID detektorem.

Souběžně byla připravena také kalibrační přímka z komerčního polymeru 3HB, jehož čistota se pohybovala okolo 99,9 %.

3.6.8 Stanovení redukujících sacharidů

Koncentrace bakteriemi nevyužitých sacharidů v produkčním médiu byla stanovena pomocí kyseliny 3,5-dinitrosalicylové. Pro přípravu činidla byly rozpuštěny 2 g kyseliny 3,5-dinitrosalicylové zahřátím ve 100 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 40 ml 2M NaOH, 60 g vinanu sodno-draselného a odměrná baňka na 200 ml byla doplněna destilovanou vodou po rysku.

Při vlastním stanovení bylo pipetováno do zkumavky 0,5 ml vzorku zředěného v závislosti na nárůstu kultury a 0,5 ml činidla obsahujícího kyselinu 3,5-dinitrosalicylovou. Takto připravené vzorky byly ponechány 10 minut ve vodní lázni temperované na 70 °C. Po ochlazení v temnu následovalo doplnění zkumavek se vzorky destilovanou vodou na objem 10 ml a důkladné promíchání. Stejným způsobem probíhala i příprava blanku, při níž byl vynechán krok přidavku vzorku. Absorbance byla měřena při vlnové délce 540 nm.

K přípravě kalibrační křivky byly použity roztoky glukózy o různých koncentracích. Postup byl stejný jako při stanovení vzorků.

3.6.9 Stanovení aktivity proteáz podle Ladd a Butler

Při stanovování proteázové aktivity byl do zkumavky pipetován 1 ml vzorku a 5 ml 0,65% roztoku kaseinátu sodného ve vodě. Roztoky ve zkumavkách byly ponechány 30 minut ve vodní lázni temperované na 50 °C. Po inkubaci došlo k zastavení reakce přidavkem 110 mM roztoku kyseliny trichloroctové a k usazení vzniklé sraženiny bylo využito 10minutové centrifugace s 6000 ot/min. Ze supernatantu byly odpipetovány 2 ml vzorku, k nimž bylo přidáno 5 ml 0,5 M roztoku uhličitanu sodného a 1 ml Folin-Ciocalteuova činidla. Po 30 minutách stání při laboratorní teplotě byly vzorky promíchány a 5 minut centrifugovány při 6000 ot/min. Následovalo spektrofotometrické měření absorbance při 660 nm. Souběžně s přípravou vzorků probíhala také příprava blanku, která se lišila pouze tím, že před inkubací bylo do zkumavky pipetováno 5 ml 0,65% roztoku kaseinátu sodného a po inkubaci byl přidán 1 ml vzorku a 5 ml 110 mM roztoku kyseliny trichloroctové [38].

Kalibrační křivka byla připravena z roztoků tyrosinu o různých koncentracích. Ke 2 ml roztoku tyrosinu bylo přidáno 5 ml 0,5 M roztoku uhličitanu sodného a 1 ml Folin-Ciocalteuova činidla. Po 30 minutách stání při laboratorní teplotě byla měřena absorbance při 660 nm.

3.6.9.1 Stanovení teplotního optima proteáz

Teplotní optimum proteáz bylo stanoveno měřením proteázové aktivity pomocí mírně modifikované metody Ladd a Butler. Jako vzorek byl použit supernatant z produkčního média obsahujícího 25 g/l nutrient broth. Postup se od předchozího stanovení lišil pouze teplotami první inkubace, při níž docházelo ke štěpení kaseinu proteázami. Inkubace byla provedena při teplotách 30, 40, 50, 60 a 70 °C.

3.6.9.2 Stanovení pH optima proteáz

Ke stanovování pH optima proteáz bylo upraveno pH 0,65% roztoku kaseinátu sodného na různé hodnoty pomocí fosfátového a zásaditého glycinového pufru. Postup metody Ladd a Butler byl stejný jako při předchozím stanovování aktivity proteáz a vzorek byl použit totožný jako u stanovení teplotního optima. Stanovení proběhlo v rozmezí pH 7,25–9,85.

3.6.9.3 Stanovení přibližné molekulární hmotnosti proteáz

K určení velikosti proteáz byla provedena ultracentrifugace vzorků přes membránové filtry o velikostech 5, 10 a 30 kDa. Jako vzorek byl použit supernatant z produkčního média obsahujícího 25 g/l nutrient broth. Ultracentrifugace probíhala 40–120 minut v závislosti na velikosti filtru při 6000 ot/min. Vzorky koncentráту i ultrafiltrátu byly podrobeny stanovení proteázové aktivity mírně modifikovanou metodou Ladd a Butler. Pokud byla stanovena vyšší aktivita proteáz ve filtrátu, proteázy prošly filtrem a byly tedy menší než velikost pórů membránového filtru. V opačném případě byla naměřena vyšší aktivita ve zkumavce nad filtrem, takže proteázy neprošly přes membránový filtr a byly tedy větší než póry filtru.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Za účelem nalezení extremofilních mikroorganismů disponujících co nejlepšími vlastnostmi pro syntézu PHA byly vybrány 3 bakteriální kmeny *Tepidiphilus thermophilus*, *Tepidimonas taiwanensis* a *Tepidimonas fonticaldi*. Pomocí molekulárně biologických technik byla u těchto kmenů ověřována přítomnost *phaC* genu kódujícího PHA syntázu první třídy. Následně byly upravovány podmínky kultivace tak, aby byl výtěžek polyhydroxyalkanoátů co nejvyšší. U kmene *Tepidimonas taiwanensis* byl proveden screening produkce proteáz.

4.1 Identifikace schopnosti akumulovat PHA

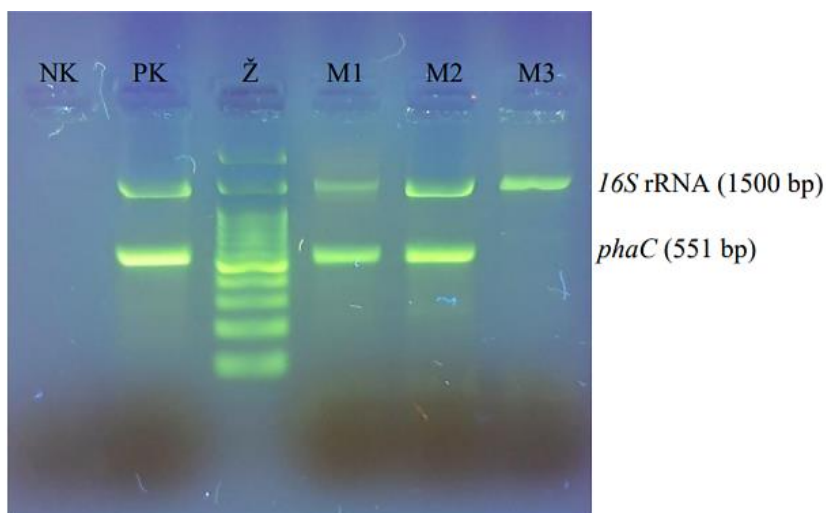
Metodou PCR multiplex byly amplifikovány dva různé úseky DNA za použití dvou sad primerů. Amplifikace probíhala při teplotním programu popsáném v tabulce 3. Vzorky DNA byly získány tepelnou lyzí bakteriálních buněk a spektrofotometricky byla ověřena jejich čistota a koncentrace, jež jsou uvedené v tabulce 4.

Tabulka 4: Koncentrace a čistota vzorků DNA

	A 260/280	c [ng/μl]
M1	1,340	195
M2	1,605	91,7
M3	1,574	53,6

Poměr absorbancí A 260/280 byl u všech vzorků nižší než hodnota 1,8. Z toho lze usuzovat, že všechny tři vzorky DNA byly znečištěny proteiny.

Přítomnost amplikonů byla ověřena pomocí gelové elektroforézy na agarózovém gelu. Jako standard byl použit žebříček, jenž obsahoval fragmenty DNA v rozmezí 100 až 3000 bp.



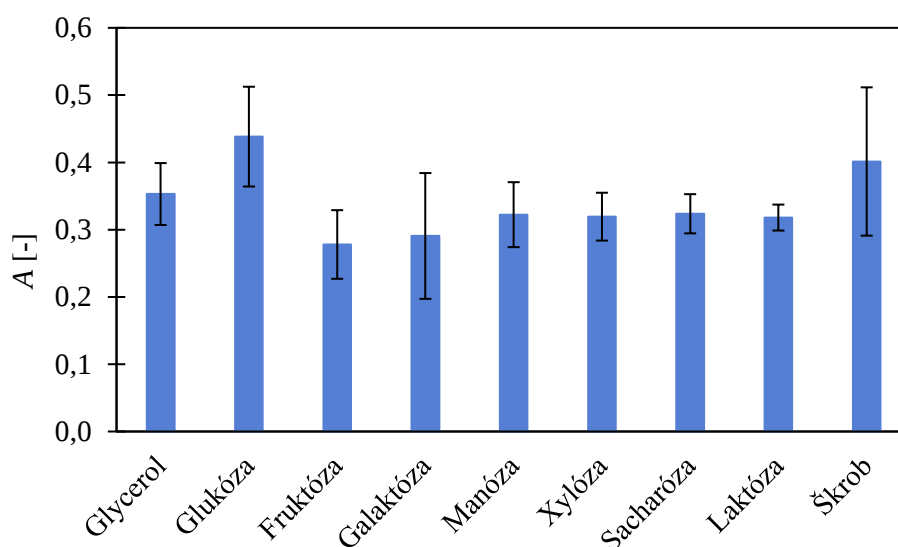
Obrázek 5: Gelová elektroforéza: NK – negativní kontrola, PK – pozitivní kontrola, Ž – žebříček, M1 – *Tepidiphilus thermophilus*, M2 – *Tepidimonas taiwanensis*, M3 – *Tepidimonas fonticaldi*

Na obrázku 5 je u všech vzorků (M1, M2, M3) patrná přítomnost genu 16S rRNA a u vzorků M1 a M2 byl prokázán i výskyt genu *phaC*. U bakteriálního kmene *Tepidiphilus thermophilus* nebyla ověřena přítomnost genu *phaC*, přestože by tento gen měl mít. Negativní výsledek mohl být způsoben chybou při pipetování primerů nebo znečištěním DNA proteiny.

4.2 Optimalizace produkce PHA

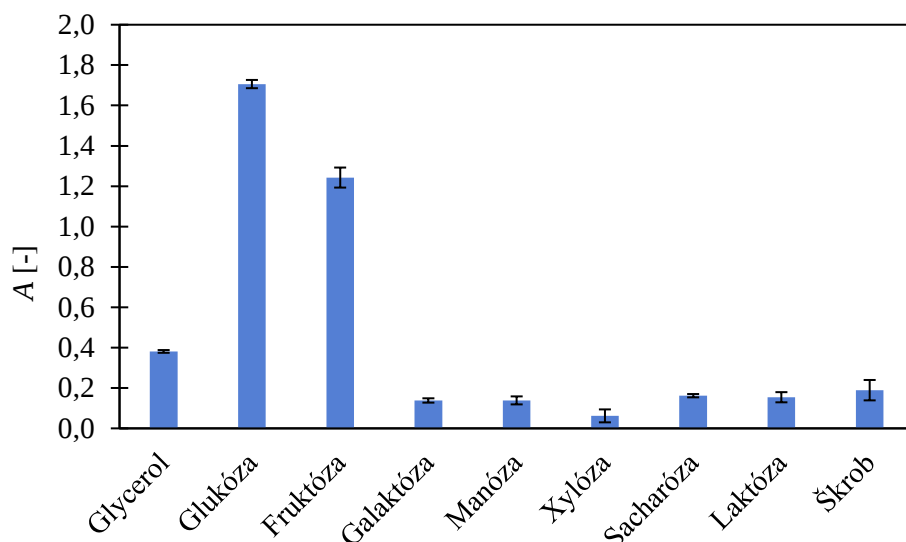
4.2.1 Hledání vhodného zdroje uhlíku

Pomocí tohoto experimentu byly hledány uhlíkaté zdroje vhodné jako substrát pro syntézu PHA vybranými bakteriálními kmeny. Testování proběhlo s 8 různými sacharidy a s glycerolem. Vyhodnocení bylo provedeno na základě spektrofotometrického měření zákalu, při němž zákal vzorků sloužil k porovnání nárůstu biomasy.



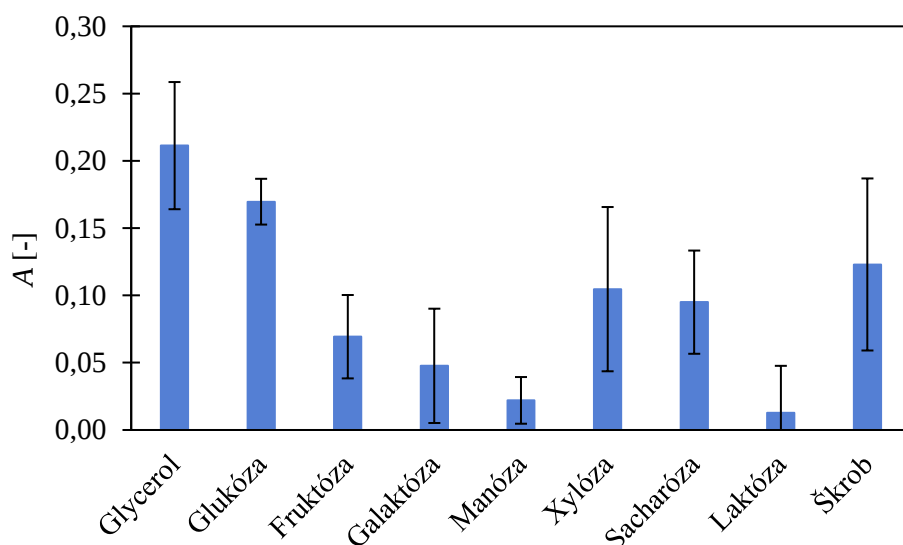
Obrázek 6: Utilizace zdrojů uhlíku kmenem *Tepidiphilus thermophilus*

Z obrázku 6 je zřejmé, že nejvhodnějšími zdroji uhlíku pro kmen *Tepidiphilus thermophilus* je glukóza a škrob. Při použití glukózy byla průměrná absorbance 0,438 a při použití škrobu 0,401. Naopak nejmenší nárůst kultury byl zaznamenán na fruktóze s průměrnou absorbancí 0,278. Tento bakteriální kmen sice nevykazoval příliš vysoký nárůst biomasy, ale byl schopen využít všechny testované zdroje uhlíku. Schopnost růstu mikroorganismů na mnoha druzích uhlíkatých zdrojů může být výhodou při zpracovávání různých vedlejších produktů z potravinářského nebo jiného průmyslového odvětví. Možnost využití těchto vedlejších produktů z průmyslové výroby jako uhlíkatý substrát přináší výhodu ve formě snížení nákladů na výrobu PHA.



Obrázek 7: Utilizace zdrojů uhlíku kmenem *Tepidimonas taiwanensis*

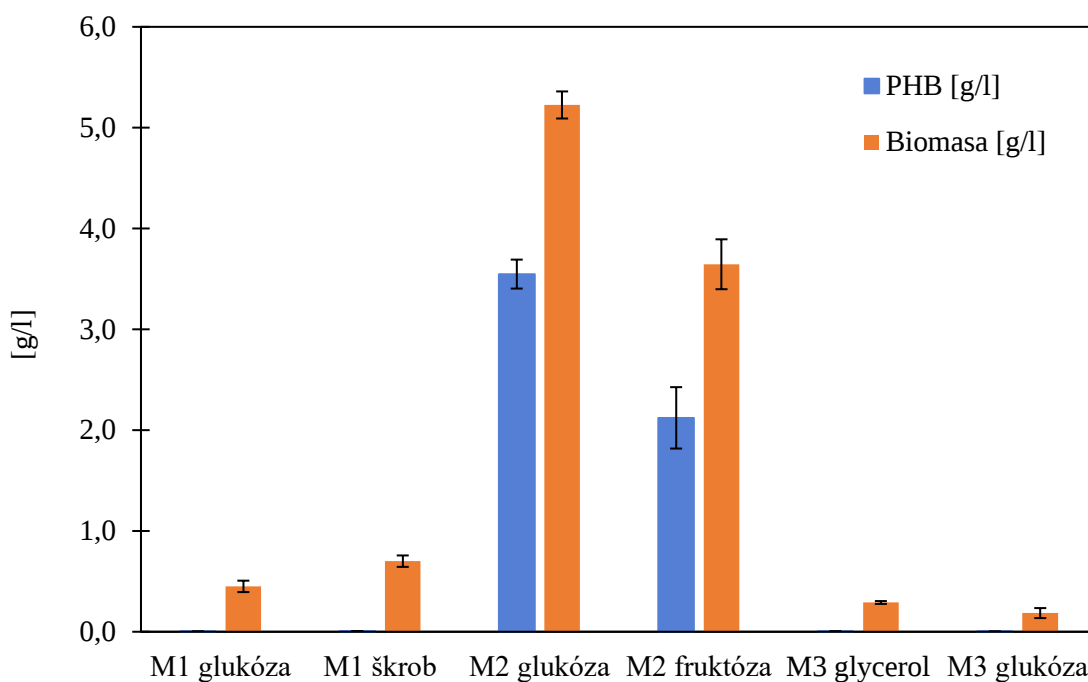
Kmen *Tepidimonas taiwanensis* byl schopen nejlépe využít glukózu a fruktózu, což je možné pozorovat na obrázku 7. Průměrná absorbance při využití glukózy jako substrátu byla 1,706 a při využití fruktózy 1,243. Nárůst kultury na ostatních zdrojích uhlíku nebyl příliš vysoký a ve srovnání s glukózou a fruktózou ho lze považovat za téměř zanedbatelný. Jako nejméně vhodný substrát se ukázala xylóza, s níž byla průměrná absorbance 0,062.



Obrázek 8: Utilizace zdrojů uhlíku kmenem *Tepidimonas fonticaldi*

Jak je možné vidět na obrázku 8, největší nárůst kultury *Tepidimonas fonticaldi* byl zaznamenán na glycerolu a glukóze. Průměrná absorbance při použití nejvhodnějšího zdroje uhlíku, glycerolu, byla 0,211. Glycerol může být levnějším kultivačním substrátem, protože je generován ve velkém množství jako vedlejší produkt při výrobě bionafty [39]. Nejméně vhodným substrátem pro růst *Tepidimonas fonticaldi* byla laktóza s průměrnou hodnotou absorbance 0,013.

Pro každý bakteriální kmen byly vybrány dva uhlíkaté substráty, které se jeví jako nejvhodnější pro růst kultury. S použitím těchto zdrojů uhlíku byly provedeny kultivace ve větším objemu produkčního média. Kultivace probíhala 72 hodin při teplotě 50 °C. Cílem experimentu bylo porovnání koncentrace vyprodukovaného PHB při použití různých zdrojů uhlíku. Nárůst biomasy byl stanoven pomocí gravimetrické metody. Množství PHB bylo zjištěno pomocí plynové chromatografie.



Obrázek 9: Porovnání biomasy a produkovaného PHB při použití různých zdrojů uhlíku

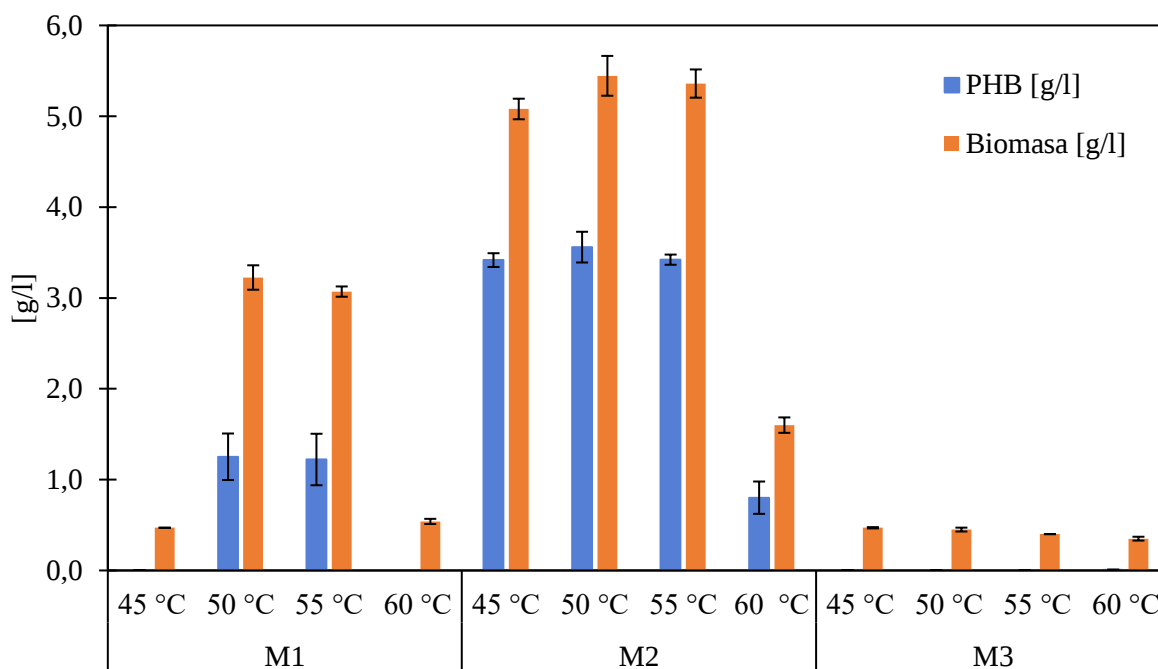
Nejlepší výsledky produkce PHA z vybraných zdrojů uhlíku byly zaznamenány u bakteriálního kmene *Tepidimonas taiwanensis*, což je patrné z obrázku 9. Při utilizaci glukózy tímto kmenem bylo dosaženo koncentrace biomasy 5,23 g/l a množství nasyntetizovaného PHB 3,55 g/l. Procentuální obsah PHB v biomase *Tepidimonas taiwanensis* byl tedy 67,9 %. Naopak u kmenů *Tepidiphilus thermophilus* a *Tepidimonas fonticaldi* došlo pouze k nízkému nárůstu biomasy a koncentrace vzniklého PHB byla zanedbatelná.

Na základě tohoto experimentu byl vybrán pro kultivaci každého bakteriálního kmene nejvhodnější zdroj uhlíku využívaný při následujících měřeních. Jako nejlepší substrát pro *Tepidimonas taiwanensis* byla zvolena glukóza a pro *Tepidimonas fonticaldi* glycerol, protože s jejich přidavkem došlo k vyššímu zisku biomasy i PHB než při použití druhého zkoumaného zdroje uhlíku. U *Tepidiphilus thermophilus* byl pozorován největší nárůst biomasy a PHB na škrobu. I přesto byla nakonec jako lepší substrát pro další kultivace zvolena glukóza. Škrob je špatně rozpustný ve vodě a často sedimentuje, což může vést ke zkreslení výsledků. Navíc ve stresovém prostředí nebo v kombinaci s prekurzory může být glukóza výhodou díky tomu, že je pro mikroorganismy snadněji utilizovatelná.

4.2.2 Kultivace při různých teplotách

Všechny zkoumané mikroorganismy patří mezi termofilní mikroorganismy a jsou schopny růst v rozmezí teplot 35–60 °C. Jejich teplotní optimum se pohybuje kolem 50–55 °C [23, 24, 25]. Tímto experimentem byl studován vliv teploty na produkci PHA.

Do produkčních médií kmenů *Tepidiphilus thermophilus* a *Tepidimonas taiwanensis* byla jako zdroj uhlíku přidána glukóza. U kmene *Tepidimonas fonticaldi* probíhala kultivace na glycerolu.



Obrázek 10: Porovnání biomasy a produkovaného PHB při různých teplotách

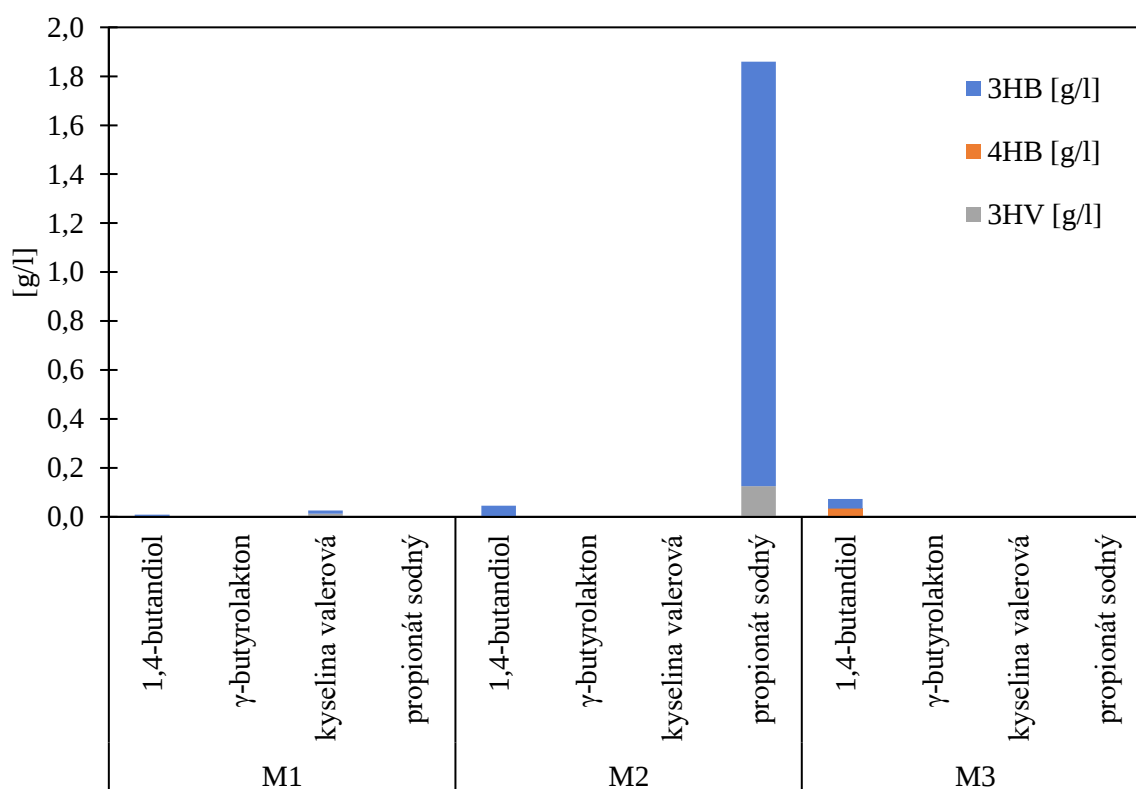
Z obrázku 10 je patrné, že nejintenzivnější nárůst kultur *Tepidiphilus thermophilus* a *Tepidimonas taiwanensis* nastal při 50–55 °C. Toto rozmezí teplot je definováno jako teplotní optimum pro růst studovaných bakterií [23, 24, 25]. Nejvyšší koncentrace biomasy i PHB u těchto dvou bakteriálních kmenů byla naměřena při 50 °C. U *Tepidiphilus thermophilus* bylo získáno 3,23 g/l biomasy a 1,25 g/l PHB, u *Tepidimonas taiwanensis* 5,45 g/l biomasy a 3,56 g/l PHB. Ovšem z hlediska procentuálního obsahu PHB v biomase bylo vyprodukováno bakterií *Tepidiphilus thermophilus* nejvíce polymeru při teplotě 55 °C (39,7 %) a bakterií *Tepidimonas taiwanensis* při teplotě 45 °C (67,3 %). Růst ani produkce PHB kulturou *Tepidimonas fonticaldi* se při různých teplotách téměř nelišily, ale dosahovaly pouze velice nízkých hodnot. Koncentrace biomasy v médiu se pohybovala v rozmezí 0,35–0,47 g/l a koncentrace polymeru byla 0,002–0,008 g/l.

4.2.3 Kultivace s přidavkem prekurzorů

Přídavkem prekurzorů do produkčního média byla testována schopnost zkoumaných bakterií produkovat kopolymery. Využitím prekurzorů pro tvorbu 4HB měla být vyvolána syntéza P(3HB-co-4HB) a prekurzory pro 3HV měly indukovat produkci P(3HB-co-3HV).

Tabulka 5: Nárůst kultur v médiích s prekurzory po 72 hodinách kultivace

Mikroorganismus	Prekurzor	Biomasa [g/l]
M1	1,4-butandiol	0,53 ± 0,06
	γ -butyrolakton	0,03 ± 0,04
	kyselina valerová	1,36 ± 0,07
	propionát sodný	1,04 ± 0,01
M2	1,4-butandiol	0,32 ± 0,03
	γ -butyrolakton	0,08 ± 0
	kyselina valerová	0,03 ± 0,04
	propionát sodný	4,16 ± 0,04
M3	1,4-butandiol	0,52 ± 0,05
	γ -butyrolakton	0 ± 0
	kyselina valerová	0 ± 0
	propionát sodný	0,69 ± 0,27



Obrázek 11: Porovnání produkováných kopolymerů při použití různých prekurzorů

Při kultivaci na různých prekurzorech bylo dosaženo nejvyššího nárůstu kultury a zároveň i zisku P(3HB-co-3HV) u kmene *Tepidimonas taiwanensis* s přidavkem propionátu sodného, což je zřejmé z obrázku 11. Koncentrace PHA dosáhla 1,86 g/l a obsah 3HV pak 7 mol. %. Kultura *Tepidiphilus thermophilus* rostla nejlépe na kyselině valerové a pouze s tímto prekurzorem došlo k produkci kopolymeru. PHA vznikl v koncentraci 0,025 g/l a obsah 3HV dosáhl 48 mol. %. Přestože byl získán P(3HB-co-3HV), jeho koncentrace dosahovala velice nízkých hodnot. Růst kmene *Tepidimonas fonticaldi* byl pozorován na 1,4-butandiolu a propionátu sodném, avšak k tvorbě kopolymeru došlo pouze při použití 1,4-butandiolu. Zastoupení jednotlivých monomerů ve vyprodukovaném P(3HB-co-4HB) bylo 0,039 g/l 3HB a 0,034 g/l 4HB.

4.2.4 Kultivace na modelových hydrolyzátech

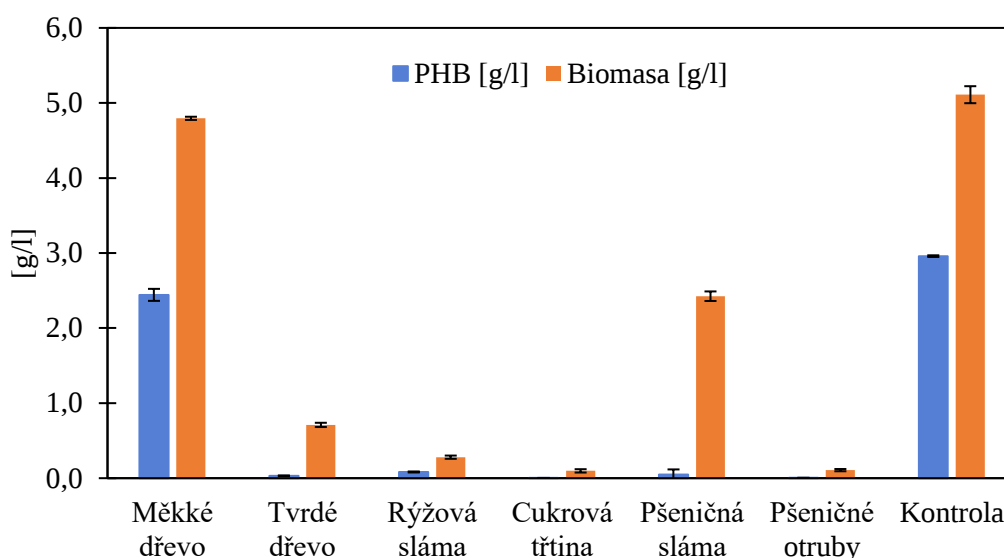
Lignocelulózové materiály mohou představovat levný, dostupný a udržitelný substrát pro výrobu PHA. Jsou jimi například zbytky dřeva, trávy nebo vedlejší zemědělské produkty. Hydrolyzou lignocelulózy vznikají fermentovatelné sacharidy, avšak tato předúprava je zatím poměrně obtížná [40].

Protože by využití lignocelulózových hydrolyzátů mohlo přispět ke snížení nákladů na produkci PHA, byly vytvořeny modelové podmínky pro utilizaci těchto materiálů. Tento experiment sloužil k ověření schopnosti bakterie *Tepidimonas taiwanensis* využívat jako substrát různé modelové hydrolyzáty a zároveň produkovat PHA. Při testování bylo použito 6 různých druhů hydrolyzátů, jejichž složení je uvedeno v tabulce 2. Po kultivaci bylo stanoveno množství zbytkových sacharidů v médiu.



Obrázek 12: Nárůst kultury *Tepidimonas taiwanensis* na modelových hydrolyzátech: 1 – Pšeničné otruby, 2 – Cukrová třtina, 3 – Rýžová sláma, 4 – Tvrdé dřevo, 5 – Pšeničná sláma, 6 – Měkké dřevo, 7 – Kontrola

Na obrázku 12 je možné pozorovat schopnost utilizace modelových hydrolyzátů kmenem *Tepidimonas taiwanensis*. Nejintenzivnější nárůst kultury byl zaznamenán na hydrolyzátech obsahujících vysoké množství glukózy, jimiž byly měkké dřevo a pšeničná sláma. Při použití měkkého dřeva jako substrátu bylo dosaženo koncentrace biomasy 4,8 g/l a při kultivaci na hydrolyzátu pšeničná sláma byla koncentrace biomasy 2,4 g/l. Malý nárůst kultury nastal ještě na tvrdém dřevě, při jehož použití bylo získáno 0,7 g/l biomasy. Ostatní hydrolyzáty se ukázaly jako nevhodný substrát pro kultivaci *Tepidimonas taiwanensis*.



Obrázek 13: Porovnání biomasy a produkovaného 3HB při použití různých modelových hydrolyzátů

Zisk PHB při kultivaci na modelových hydrolyzátech je znázorněn na obrázku 13. Nejintenzivnější produkce PHB bylo dosaženo při kultivaci na měkkém dřevě, s jehož použitím se výtěžek PHB pohyboval kolem 2,4 g/l. Množství získaného PHB na měkkém dřevě se přibližovalo hodnotě PHB v kontrolním vzorku, který obsahoval jako zdroj uhlíku pouze 20 g/l glukózy. Produkce PHB na ostatních hydrolyzátech byla téměř zanedbatelná.

4.2.4.1 Stanovení redukcujících sacharidů v médiu

V produkčních médiích s modelovými hydrolyzáty obsahujícími před kultivací 20 g/l redukcujících sacharidů byla po kultivaci stanovena koncentrace nevyužitých redukcujících sacharidů. Stanovené koncentrace zbytkových sacharidů jsou uvedené v tabulce 6.

Tabulka 6: Obsah redukcujících sacharidů v médiích s modelovými hydrolyzáty po kultivaci

Vzorek	Zbytkové sacharidy [g/l]	Spotřebované sacharidy [g/l]	$Y_{P/S}$
Měkké dřevo	$5,4 \pm 0,4$	$14,6 \pm 0,4$	0,167
Tvrdé dřevo	$19,2 \pm 1,8$	$0,8 \pm 1,8$	0,039
Rýžová sláma	$19,5 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,2$	0,166
Cukrová třtina	$19,3 \pm 1,3$	$0,7 \pm 1,3$	0,005
Pšeničná sláma	$10,7 \pm 1,6$	$9,3 \pm 1,6$	0,005
Pšeničné otruby	$19,7 \pm 0,6$	$0,3 \pm 0,6$	0,014
Kontrola	$2,9 \pm 0,7$	$17,1 \pm 0,7$	0,173

Spotřeba redukcujících sacharidů z produkčního média odpovídala nárůstu kultury na jednotlivých hydrolyzátech. Nejmenší množství zbytkových sacharidů bylo zaznamenáno v kontrolním vzorku a v médiu s měkkým dřevem. Naopak žádné nebo téměř žádné redukcující sacharidy nespotřeboval kmen *Tepidimonas taiwanensis* při použití pšeničných otrub, rýžové slámy, cukrové třtiny a tvrdého dřeva.

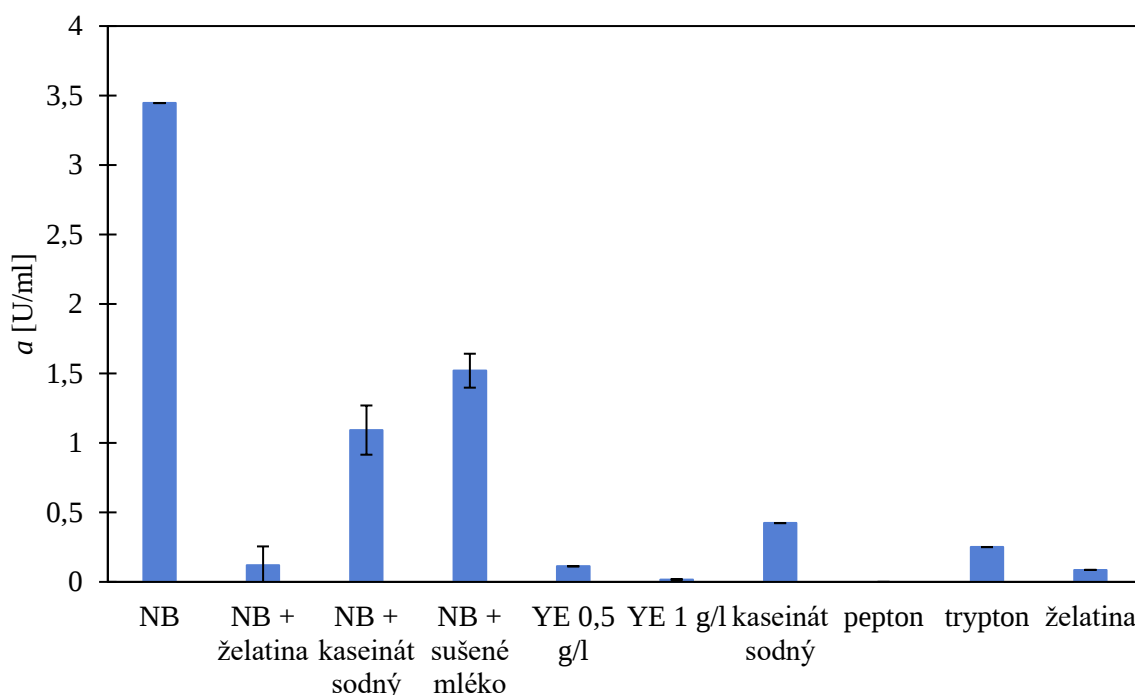
4.3 Screening produkce proteáz

Kultivací na Petriho miskách byla ověřena u bakteriálního kmene *Tepidimonas taiwanensis* schopnost produkce proteáz. Důkaz přítomnosti těchto enzymů lze pozorovat na obrázku 14 vznikem průhledných zón obklopujících kolonii bakterií. Tato čirá zóna je způsobena rozkladem kaseinu obsaženého v sušeném mléku.



Obrázek 14: Test produkce proteáz

K nalezení vhodného média pro syntézu proteáz byla provedena kultivace kmene *Tepidimonas taiwanensis* v 10 produkčních médiích o různém složení uvedeném v kapitole 3.5. Následné stanovení enzymové aktivity bylo provedeno pomocí mírně modifikované metody Ladd a Butler.



Obrázek 15: Aktivita proteáz při použití různých produkčních médií

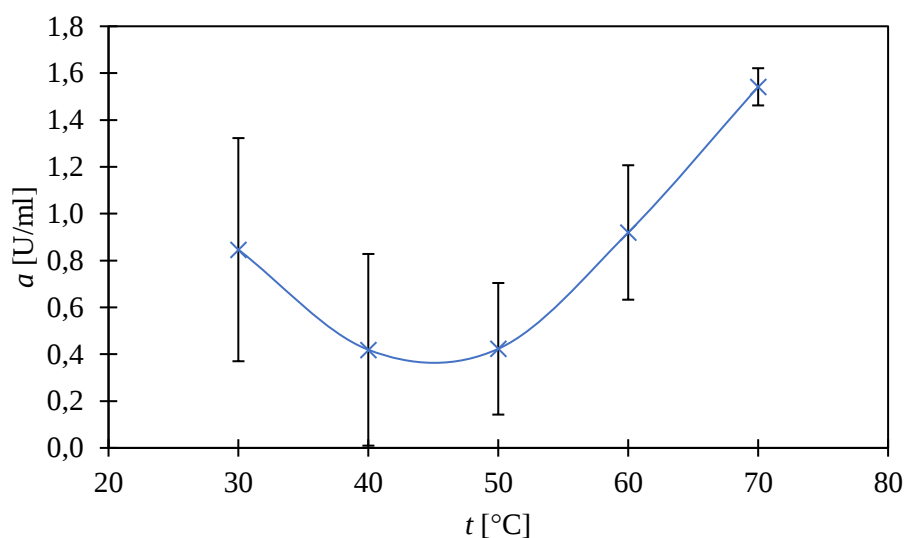
Z obrázku 15 je zřejmé, že nejvyšší proteázová aktivita byla naměřena při kultivaci *Tepidimonas taiwanensis* v médiu obsahujícím pouze 25 g/l nutrient broth. Při jeho použití byla stanovená aktivita proteáz 3,4 U/ml. Relativně dobrých výsledků bylo dosaženo také při kultivaci na směsi nutrient broth se sušeným mlékem (1,5 U/ml) a na směsi nutrient broth

s kaseinátem sodným (1,1 U/ml). Naopak žádnou proteázovou aktivitu nevykazovala kultura v produkčním médiu s přidavkem peptonu.

Na základě těchto výsledků bylo vybráno k dalším měřením pouze produkční médium s 25 g/l nutrient broth. Zároveň byl proveden test na přítomnost PHA v biomase z tohoto média, při kterém byla stanovena koncentrace PHB po 48hodinové kultivaci ($0,12 \pm 0,02$) g/l a koncentrace biomasy ($0,84 \pm 0,08$) g/l.

4.3.1 Stanovení teplotního optima proteáz

Alkalické proteázy se vyznačují svojí termostabilitou, díky které nachází široké uplatnění v průmyslových aplikacích. Používají se například v detergentech, potravinách nebo ve farmacii [25]. Pomocí mírně modifikované metody Ladd a Butler byla stanovena proteázová aktivita při různých teplotách a na základě výsledků bylo určeno teplotní optimum činnosti proteáz získaných z kmene *Tepidimonas taiwanensis*.

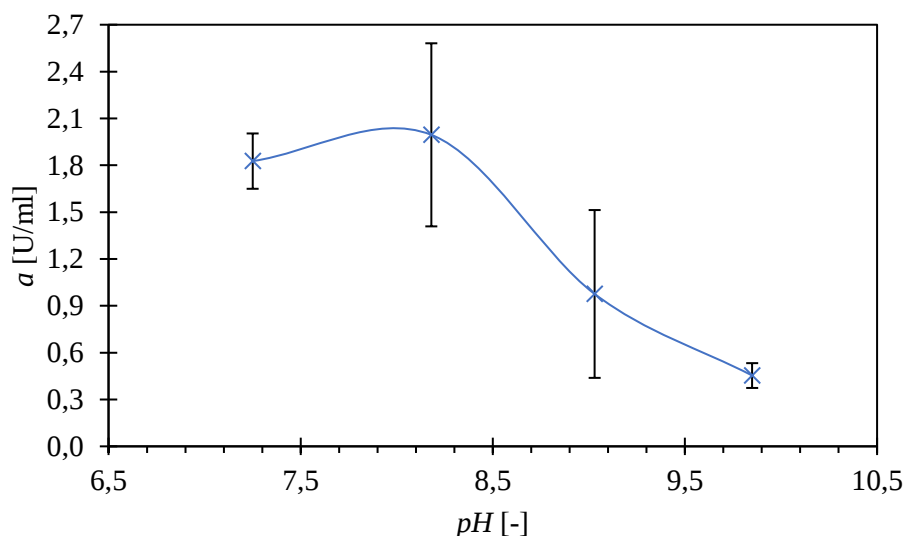


Obrázek 16: Teplotní optimum aktivity proteáz

Nejvyšší hodnota proteázové aktivity (1,5 U/ml) byla naměřena při teplotě 70 °C, jak je patrné z obrázku 16. Naopak při teplotách 40 a 50 °C dosáhl teplotní profil aktivity proteáz minima. Při měření byla pozorována malá opakovatelnost, která mohla být způsobena nízkou koncentrací enzymu ve vzorcích. Růst činnosti proteáz v rozmezí 60 až 70 °C může představovat výhodu při využití těchto enzymů v pracích prostředcích, ale závisí také na ovlivnění aktivity přítomností mýdel a alkálií [41].

4.3.2 Stanovení pH optima proteáz

Alkalické proteázy bývají stabilní i aktivní při vysokých hodnotách pH, což bývá společně s termostabilitou výhodou při použití v průmyslových aplikacích [25]. pH optimum bylo stanoveno na základě měření proteázové aktivity mírně modifikovanou metodou Ladd a Butler.

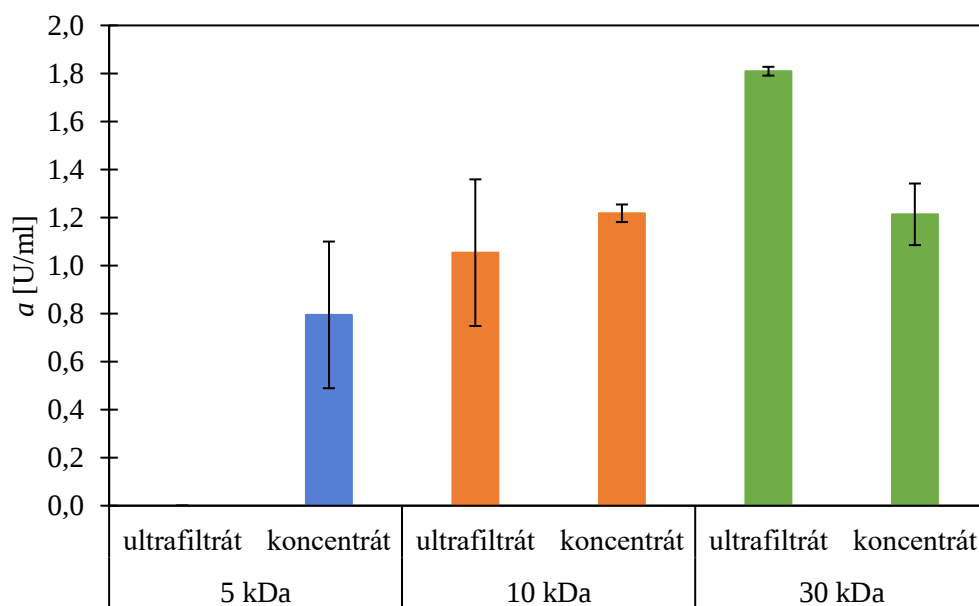


Obrázek 17: pH optimum aktivity proteáz

Z obrázku 17 je zřejmé, že proteáza produkovaná kmenem *Tepidimonas taiwanensis* vykazovala největší aktivitu při pH 8,2. Následným zvyšováním pH docházelo ke snižování proteázové aktivity. Pro využití alkalické proteázy jako přísady v pracích prostředcích je důležitá vysoká aktivita při hodnotě pH blízké 10, takže by proteáza z *Tepidimonas taiwanensis* nebyla příliš vhodná pro toto použití [41].

4.3.3 Stanovení velikosti proteáz

K určení přibližné velikosti proteáz byly vzorky podrobeny ultracentrifugaci přes membránové filtry o různé velikosti pórů. Na základě stanovení větší aktivity ve filtrátu nebo koncentrátu bylo prokázáno, zda proteázy prošly póry filtru nebo ne.



Obrázek 18: Stanovení velikosti proteáz

Na obrázku 18 znázorňuje sloupec s větší aktivitou vždy místo, kde se nacházely proteázy po ultracentrifugaci. Při použití membránového filtru o velikosti pórů 5 kDa nedošlo k průchodu proteáz do filtrátu. Naopak při použití filtru s póry velikými 30 kDa se proteázy do filtrátu dostaly. Lze tedy usuzovat, že velikost alkalických proteáz z kmene *Tepidimonas taiwanensis* se pohybuje v rozmezí 10 až 30 kDa.

5 ZÁVĚR

Výroba polymerních materiálů biotechnologickými procesy je nákladná a stále nedokáže konkurovat cenám petrochemických produktů. Biotechnologické zpracování může být zjednodušeno použitím termofilních mikroorganismů, které vlivem vyšší kultivační teploty odolávají kontaminaci mezofilními mikroorganismy. Některé termofilní mikroorganismy dokáží navíc produkovat termostabilní enzymy, které nachází široké uplatnění v průmyslových aplikacích jako biokatalyzátory pro vysokoteplotní procesy.

Cílem této práce bylo provedení základní metabolické charakterizace a studium biotechnologického potenciálu mikrobiálních kultur *Tepidiphilus thermophilus*, *Tepidimonas taiwanensis* a *Tepidimonas fonticaldi*. Hlavní náplní bylo testování schopnosti těchto mikroorganismů produkovat polyhydroxyalkanoáty.

U všech vybraných kultur byla provedena detekce genu *phaC* společně s genem 16S rRNA pomocí metody PCR. Přítomnosti genu *phaC* byla potvrzena u bakteriálních kmenů *Tepidiphilus thermophilus* a *Tepidimonas taiwanensis*. U kultury *Tepidimonas fonticaldi* se nepodařilo gen *phaC* detekovat, avšak tento kmen byl schopen produkovat PHA.

Ke stanovení vhodného zdroje uhlíku pro růst kultur a produkce PHA bylo využito 8 různých sacharidů a glycerol. Bakterie *Tepidiphilus thermophilus* a *Tepidimonas taiwanensis* byly schopny nejlépe utilizovat glukózu. Kmen *Tepidimonas fonticaldi* vykazoval nejlepší růst na glycerolu, takže by k jeho kultivaci mohl být využíván glycerol získávaný jako vedlejší produkt při výrobě bionafty. Vyhovujícím producentem PHA by mohl být *Tepidimonas taiwanensis*, který byl při použití glukózy jako substrátu schopen akumulovat polyhydroxyalkanoáty až do 67,9 % své buněčné sušiny. U ostatních zkoumaných kultur byla koncentrace syntetizovaných polyhydroxyalkanoátů minimální.

Optimální teplota růstu bakterií a produkce PHA byla stanovována v rozmezí 45–60 °C. Nejintenzivnější nárůst kultur *Tepidiphilus thermophilus* a *Tepidimonas taiwanensis* byl zaznamenán při teplotě 50 °C, při níž došlo i k nejvyššímu zisku PHA. Kmen *Tepidimonas fonticaldi* nevykazoval téměř žádné rozdíly při různých teplotách kultivace. Kultivaci při teplotě 50 °C dochází k zamezení kontaminace nežádoucími mezofilními mikroorganismy, což může zmenšit nároky na sterilizaci a práci za aseptických podmínek, a tím přispět ke snížení nákladů bioprodukce PHA.

Produkce kopolymerů byla iniciována přidavkem prekurzorů 3HV nebo 4HB. Ke vzniku většího množství kopolymeru, konkrétně P(3HB-co-3HV), došlo pouze u kmene *Tepidimonas taiwanensis* za pomoci propionátu sodného. Přidavkem 1,4-butandiolu do produkčního média kultury *Tepidimonas fonticaldi* byla vyvolána syntéza P(3HB-co-4HB), ale koncentrace získaného PHA byla velice nízká.

Dále byla zkoumána schopnost kmene *Tepidimonas taiwanensis* utilizovat různé modelové hydrolyzáty jako zdroj uhlíku a využívat je k syntéze PHA. Testování bylo provedeno s šesti druhy modelových hydrolyzátů. Největší množství biomasy i polyhydroxyalkanoátů bylo získáno kultivací na měkkém dřevě, avšak výtěžnost PHA byla o 17,4 % nižší než u kontrolního vzorku obsahujícího jako substrát pouze glukózu.

Bylo ověřeno, že kultura *Tepidimonas taiwanensis* je schopna produkovat proteázy. Z deseti testovaných produkčních médií bylo vybráno jako nejvhodnější pro syntézu proteáz médium s 25 g/l nutrient broth. Při jeho použití bylo získáno po 48 hodinách kultivace $(0,12 \pm 0,02)$ g/l PHB. Pomocí mírně modifikované metody Ladd a Butler bylo stanoveno teplotní optimum, pH optimum a velikost proteáz. Nejvyšší proteázová aktivita byla naměřena při teplotě 70 °C. Je možné, že při dalším zvyšování teploty dojde i k růstu aktivity proteáz. Do budoucna lze tedy rozšířit tento průzkum o měření aktivity při teplotách vyšších než 70 °C. Jako optimální pH pro činnost proteáz se jevílo pH 8,2 a velikost těchto enzymů byla stanovena v rozmezí 10 až 30 kDa.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] DUCHÁČEK, V. Polymery: výroba, vlastnosti, zpracování, použití. 2. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2006, s. 11-17. ISBN 80-7080-617-6.
- [2] VIJAYENDRA, S. V. N. a T. R. SHAMALA. Film forming microbial biopolymers for commercial applications—A review. *Critical Reviews in Biotechnology* [online]. 2013, 34(4), 338-357 [cit. 2020-04-06]. DOI: 10.3109/07388551.2013.798254. ISSN 0738-8551. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07388551.2013.798254>
- [3] KOSSEVA, Maria R. a Edy RUSBANDI. Trends in the biomanufacture of polyhydroxyalkanoates with focus on downstream processing. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2018, 107(February 2018), 762-778 [cit. 2020-02-21]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.09.054. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813017323140>
- [4] SATHYA, A. B., V. SIVASUBRAMANIAN, A. SANTHIAGU, Chitra SEBASTIAN a R. SIVASHANKAR. Production of Polyhydroxyalkanoates from Renewable Sources Using Bacteria. *Journal of Polymers and the Environment*. 2018, 26(9), 3995-4012. DOI: 10.1007/s10924-018-1259-7. ISSN 1566-2543. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10924-018-1259-7>
- [5] DOBROGOJSKI, Jędrzej, Maciej SPYCHALSKI, Robert LUCIŃSKI a Sławomir BOREK. Transgenic plants as a source of polyhydroxyalkanoates. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2018, 40(9), 1-3. DOI: 10.1007/s11738-018-2742-4. ISSN 0137-5881. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11738-018-2742-4>
- [6] 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*. 2018, 36(3), 856-870. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.12.006. ISSN 07349750. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975017301581>
- [7] 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. 2019-03-30]. DOI: 10.1016/S0079-6700(00)00035-6. ISSN 00796700. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670000000356>
- [8] 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(August 2016), 161-174 [cit. 2019-03-31]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813016303774>
- [9] JENDROSSEK, Dieter a Daniel PFEIFFER. New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). *Environmental Microbiology* [online]. 2014, 16(8), 2357-2373 [cit.

- 2019-04-21]. DOI: 10.1111/1462-2920.12356. ISSN 14622912. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1462-2920.12356>
- [10] PÖTTER, M. a A. STEINBÜCHEL. Poly(3-hydroxybutyrate) Granule-Associated Proteins: Impacts on Poly(3-hydroxybutyrate) Synthesis and Degradation. *Biomacromolecules* [online]. 2005, **6**(2), 552-560 [cit. 2019-04-21]. DOI: 10.1021/bm049401n. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm049401n>
- [11] KHANNA, Shilpi a Ashok K. SRIVASTAVA. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry* [online]. 2005, **40**(2), 607-619 [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.1016/j.procbio.2004.01.053. ISSN 13595113. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959204000949>
- [12] RAZA, Zulfiqar Ali, Sharjeel ABID a Ibrahim M. BANAT. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2018, **126**, 45-56. DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.10.001. ISSN 09648305. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830517300276>
- [13] MADISON, LARA L. a GJALT W. HUISMAN. Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS* [online]. 1999, **63**, 21-53 [cit. 2019-03-31]. Dostupné z: <https://mmbr.asm.org/content/63/1/21.long>
- [14] Taxonomy – *Cupriavidus necator* (*Alcaligenes eutrophus*) (*Ralstonia eutropha*). UniProt [online]. United Kingdom; Switzerland; United States of America: UniProt Consortium, 2020 [cit. 2020-03-17]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/taxonomy/106590>
- [15] PERRET, Edith, Felix A. REIFLER, Ali GOONEIE a Rudolf HUFENUS. Tensile study of melt-spun poly(3-hydroxybutyrate) P3HB fibers: Reversible transformation of a highly oriented phase. *Polymer* [online]. 2019, 180 [cit. 2019-11-18]. DOI: 10.1016/j.polymer.2019.121668. ISSN 00323861. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386119306597>
- [16] DROSG, B., I. FRITZ, F. GATTERMAYR a L. SILVESTRI. Photo-autotrophic Production of Poly(hydroxyalkanoates) in Cyanobacteria. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* [online]. 2015, **29**(2), 145-156 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.15255/CABEQ.2014.2254. ISSN 03529568. Dostupné z: http://pierre.fkit.hr/hdki/cabeq/pdf/29_2_2015/Cabeq_2015-02-web_Drosg.pdf
- [17] CHEN, Guo-Qiang a Xiao-Ran JIANG. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2018, 50, 94-100 [cit. 2019-11-19]. DOI: 10.1016/j.copbio.2017.11.016. ISSN 09581669. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166917301519>
- [18] SATYANARAYANA, T., Chandralata RAGHUKUMAR a S. SHIVAJI. Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *CURRENT SCIENCE* [online]. 2005, 89, 78-90 [cit. 2019-11-25]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/298223942_Extremophilic_microbes_Diversity_and_perspectives

- [19] RADDADI, Noura, Ameer CHERIF, Daniele DAFFONCHIO, Mohamed NEIFAR a Fabio FAVA. Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2015, 99(19), 7907-7913 [cit. 2019-11-26]. DOI: 10.1007/s00253-015-6874-9. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-015-6874-9>
- [20] ELLEUCHE, Skander, Christian SCHÄFERS, Saskia BLANK, Carola SCHRÖDER a Garabed ANTRANIKIAN. Exploration of extremophiles for high temperature biotechnological processes. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 2015, 25, 113-119 [cit. 2019-11-26]. DOI: 10.1016/j.mib.2015.05.011. ISSN 13695274. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527415000624>
- [21] SARALOV, A. I. Adaptivity of Archaeal and Bacterial Extremophiles. *Microbiology* [online]. 2019, 88(4), 379-401 [cit. 2019-11-27]. DOI: 10.1134/S0026261719040106. ISSN 0026-2617. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1134/S0026261719040106>
- [22] TERPE, Kay. Overview of thermostable DNA polymerases for classical PCR applications: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2013, 97(24), 10243-10254 [cit. 2020-04-06]. DOI: 10.1007/s00253-013-5290-2. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-013-5290-2>
- [23] PODDAR, A., R. T. LEPCHA a S. K. DAS. Taxonomic study of the genus *Tepidiphilus*: transfer of *Petrobacter succinatimandens* to the genus *Tepidiphilus* as *Tepidiphilus succinatimandens* comb. nov., emended description of the genus *Tepidiphilus* and description of *Tepidiphilus thermophilus* sp. nov., isolated from a terrestrial hot spring. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* [online]. 2014, 64(Pt 1), 228-235 [cit. 2019-12-02]. DOI: 10.1099/ij.s.0.056424-0. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ij.s.0.056424-0>
- [24] CHEN, W.-M., H.-W. HUANG, J.-S. CHANG, Y.-L. HAN, T.-R. GUO a S.-Y. SHEU. *Tepidimonas fonticaldi* sp. nov., a slightly thermophilic betaproteobacterium isolated from a hot spring. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* [online]. 2013, 63(Pt 5), 1810-1816 [cit. 2019-12-02]. DOI: 10.1099/ij.s.0.043729-0. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ij.s.0.043729-0>
- [25] CHEN, Tien-Lai, Yi-Ju CHOU, Wen-Ming CHEN, Bhagwath ARUN a Chiu-Chung YOUNG. *Tepidimonas taiwanensis* sp. nov., a novel alkaline-protease-producing bacterium isolated from a hot spring. *Extremophiles* [online]. 2006, 10(1), 35-40 [cit. 2019-12-02]. DOI: 10.1007/s00792-005-0469-9. ISSN 1431-0651. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00792-005-0469-9>
- [26] YAO, Jun, Guang ZHANG, Qiong WU, Guo-Qiang CHEN a Riqing ZHANG. Production of polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas nitroreducens*. *Antonie van Leeuwenhoek* [online]. 1999, 75(4), 345-349 [cit. 2020-04-06]. DOI: 10.1023/A:1002082303615. ISSN 00036072. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1002082303615>

- [27] NIELSEN, Chad, Asif RAHMAN, Asad Ur REHMAN, Marie K. WALSH a Charles D. MILLER. Food waste conversion to microbial polyhydroxyalkanoates. *Microbial Biotechnology* [online]. 2017, **10**(6), 1338-1352 [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.1111/1751-7915.12776. ISSN 17517915. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1751-7915.12776>
- [28] SAGONG, Hye-Young, Hyeoncheol Francis SON, So Young CHOI, Sang Yup LEE a Kyung-Jin KIM. Structural Insights into Polyhydroxyalkanoates Biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 2018, **43**(10), 790-805 [cit. 2020-02-21]. DOI: 10.1016/j.tibs.2018.08.005. ISSN 09680004. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000418301531>
- [29] SLATER, S C, W H VOIGE a D E DENNIS. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic pathway. *Journal of Bacteriology* [online]. 1988, **170**(10), 4431-4436 [cit. 2020-02-21]. DOI: 10.1128/JB.170.10.4431-4436.1988. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <https://JB.asm.org/content/170/10/4431>
- [30] NAIK, Surabhi, S. K. VENU GOPAL a Priti SOMAL. Bioproduction of polyhydroxyalkanoates from bacteria: a metabolic approach. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2008, **24**(10), 2307-2314 [cit. 2019-05-03]. DOI: 10.1007/s11274-008-9745-z. ISSN 0959-3993. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11274-008-9745-z>
- [31] STEINBÜCHEL, Alexander a Tina LÜTKE-EVERSLOH. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2003, **16**(2), 81-96 [cit. 2020-02-21]. DOI: 10.1016/S1369-703X(03)00036-6. ISSN 1369703X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X03000366>
- [32] ZOU, Huibin, Mengxun SHI, Tongtong ZHANG, Lei LI, Liangzhi LI a Mo XIAN. Natural and engineered polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase: key enzyme in biopolyester production. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2017, **101**(20), 7417-7426 [cit. 2020-02-21]. DOI: 10.1007/s00253-017-8485-0. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-017-8485-0>
- [33] CHEK, Min Fey, Sun-Yong KIM, Tomoyuki MORI, Hasni ARSAD, Mohammed Razip SAMIAN, Kumar SUDESH a Toshio HAKOSHIMA. Structure of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase PhaC from *Chromobacterium* sp. USM2, producing biodegradable plastics. *Scientific Reports* [online]. 2017, **7**(1) [cit. 2020-03-28]. DOI: 10.1038/s41598-017-05509-4. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-05509-4>
- [34] PAKALAPATI, Harshini, Chih-Kai CHANG, Pau Loke SHOW, Senthil Kumar ARUMUGASAMY a John Chi-Wei LAN. Development of polyhydroxyalkanoates production from waste feedstocks and applications. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. 2018, **126**(3), 282-292 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2018.03.016. ISSN 13891723. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172317311982>

- [35] RAY, Subhasree a Vipin Chandra KALIA. Biomedical Applications of Polyhydroxyalkanoates. *Indian Journal of Microbiology* [online]. 2017, 57(3), 261-269 [cit. 2019-05-03]. DOI: 10.1007/s12088-017-0651-7. ISSN 0046-8991. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12088-017-0651-7>
- [36] GUMEL, A. M., M. S. M. ANNUAR a Y. CHISTI. Recent Advances in the Production, Recovery and Applications of Polyhydroxyalkanoates. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2013, 21(2), 580-605 [cit. 2020-04-02]. DOI: 10.1007/s10924-012-0527-1. ISSN 1566-2543. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10924-012-0527-1>
- [37] SUNE, Dan, Helene RYDBERG, Åsa Nilsdotter AUGUSTINSSON, Lena SERRANDER a Malin Bergman JUNGSTRÖM. Optimization of 16S rRNA gene analysis for use in the diagnostic clinical microbiology service. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2020, 170 [cit. 2020-04-04]. DOI: 10.1016/j.mimet.2020.105854. ISSN 01677012. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701219310978>
- [38] LADD, J.N. a J.H.A. BUTLER. Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 1972, 4(1), 19-30 [cit. 2020-07-21]. DOI: 10.1016/0038-0717(72)90038-7. ISSN 00380717. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0038071772900387>
- [39] WEN, Qinxue, Baozhen LIU, Fang LI a Zhiqiang CHEN. Substrate strategy optimization for polyhydroxyalkanoates producing culture enrichment from crude glycerol. *Bioresource Technology* [online]. 2020, 311 [cit. 2020-06-26]. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.123516. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852420307884>
- [40] 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. 2020-07-13]. DOI: 10.1016/j.nbt.2018.11.004. ISSN 18716784. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678418302176>
- [41] BANIK, Rathindra Mohan a Monika PRAKASH. Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. *Microbiological Research* [online]. 2004, 159(2), 135-140 [cit. 2020-07-14]. DOI: 10.1016/j.micres.2004.01.002. ISSN 09445013. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944501304000047>