



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**STUDIUM METABOLISMU BAKTERIÁLNÍCH BUNĚK
A VLIVU STRESU NA BIOSYNTÉZU PHA**

METABOLISM OF BACTERIAL CELLS AND THE EFFECT OF STRESS ON BIOSYNTHESIS OF PHA

AUTOREFERÁT DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Dan Kučera

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2019

Dizertační práce byla sepsána v rámci doktorského studijního programu na Vysokém učení technickém v Brně na Ústavu chemie potravin a biotechnologií v prezenční formě studia.

Uchazeč: Ing. Dan Kučera
Ústav chemie potravin a biotechnologií
FCH VUT v Brně

Školitel: doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
Ústav chemie potravin a biotechnologií
FCH VUT v Brně

Oponenti:

Autoreferát byl odeslán dne:

Obhajoba dizertační práce se koná dne v hodin před komisí pro obhajoby dizertačních prací v zasedací místnosti číslo na Fakultě chemické, Vysokého učení technického v Brně.

S dizertační prací je možné se obeznámit na děkanátu Fakulty chemické, Vysokého učení technického v Brně.

ABSTRAKT

Předložená dizertační práce se zabývá studiem biosyntézy polyhydroxyalkanoátů, jakožto mikrobiálního produktu s potenciálem nahradit současné konvenční plasty vyráběné z ropy. Dizertační práce je vypracovaná ve formě diskutovaného souboru již uveřejněných publikací, které jsou pak součástí práce ve formě příloh. Práce navazuje na poměrně rozsáhlé znalosti v oblasti produkce polyhydroxyalkanoátů a přináší nové skutečnosti a možné strategie. V rámci práce byly testovány rozličné možnosti analýzy polyhydroxyalkanoátů pomocí moderních metod, které přináší především rychlost, která může být klíčová při „real-time“ evaluaci produkčního biotechnologického procesu. Ramanova spektroskopie se ukázala jako velice perspektivní technika pro rychlou kvantifikaci PHA. Dále se práce zabývá valorizací odpadů potravinářského a zemědělského původu. Důraz je kladen především na metody detoxifikace hydrolyzátů lignocelulózy. V tomto kontextu byla poprvé využita adsorpce inhibitorů na lignin jako alternativa k dalším detoxifikačním technikám. Vybrané produkční kmeny *Burkholderia cepacia* a *B. sacchari* byly díky detoxifikaci schopné využít hydrolyzát měkkého dřeva pro produkci PHA. V další části práce byla testována také možnost využití kuřecího peří jako komplexního zdroje dusíku. V rámci práce bylo také využito evoluční inženýrství jako možná strategie pro eliminaci inhibičního účinku kyseliny levulové – mikrobiálního inhibitoru, který vzniká při hydrolýze lignocelulóзовých materiálů. Adaptačními experimenty byly z původního divokého kmene *C. necator* vyvinuty kmeny projevující se vyšší odolností ke kyselině levulové a schopné akumulovat kopolymer s vyšším zastoupením 3HV. Dalším slibným přístupem testovaným v rámci práce bylo využití extrémofilního mikrobiálního kmene, což vede ke snížení nákladů na biotechnologickou produkci. Vybrané druhy rodu *Halomonas* prokázaly vysoký potenciál jako halofilní producenti PHA. Závěrečná část práce se věnovala výběru produkčního kmene s ohledem na vlastnosti výsledného PHA. Kmen *Cupriavidus malaysiensis* byl vybrán za účelem produkce terpolymeru P(3HB-co-3HV-co-4HB) u kterého byly odhaleny značné rozdíly v materiálových vlastnostech oproti P3HB.

Klíčová slova:

Polyhydroxyalkanoáty, biopolymer, lignocelulóza, valorizace odpadu, evoluční inženýrství, extrémofilní mikroorganismy, Ramanova spektroskopie

OBSAH

OBSAH	4
1 TEORETICKÁ ČÁST	5
1.1 Polyhydroxyalkanoáty	5
1.1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti	5
1.2 Biosyntéza PHA	6
1.2.1 Regulace PHA biosyntetické dráhy	6
1.2.2 Biologická role PHA	7
1.2.3 Strategie zvyšující konkurenceschopnost PHA produkce	7
1.3 Zpracování rostlinné biomasy s ohledem na její využití v biotechnologickém procesu	8
1.3.1 Chemické složení rostlinné biomasy	8
1.4 Předúprava a hydrolýza lignocelulózových materiálů	8
1.4.1 Chemické předúpravy	9
1.4.1.1 Kyselá hydrolýza	9
1.4.1.2 Zásaditá hydrolýza	9
1.5 Produkty degradace lignocelózy	10
1.5.1 Aromatické látky	10
1.5.2 Alifatické kyseliny	10
1.5.3 Furanové sloučeniny	11
1.6 Detoxifikace	11
1.7 Využití lignocelulózových odpadů z agropotravinářského průmyslu	11
2 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	13
3 DISKUZE	14
3.1 Zefektivnění procesu kvantifikace PHA	14
3.2 Využití odpadů z potravinářských výrob k produkci polyhydroxyalkanoátů	19
3.2.1 Využití odpadních produktů jako zdroje dusíku	22
3.3 Aplikace evolučního inženýrství	24
3.4 Extrémofilní bakterie produkující PHA	26
3.5 Biotechnologická produkce terpolymeru poly(3-hydroxybutyrát- <i>co</i> -4-hydroxybutyrát- <i>co</i> -3-hydroxyvalerát)	32
4 ZÁVĚR	35
5 LITERATURA	37
6 ŽIVOTOPIS	43
7 PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORA	44

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou biopolymery neboli polymery přírodního původu. Jedná se o mikrobiální polyestery syntetizované a akumulované ve formě intracelulárních granulí řadou mikroorganismů z domén bakterie a archea. Všeobecně jsou považované za alternativu k petrochemickým syntetickým plastům. V porovnání s polypropylenem, který má podobné fyzikální a mechanické vlastnosti, jsou PHA biokompatibilní, biodegradovatelné a je možné k jejich produkci využít řadu obnovitelných zdrojů i odpadních materiálů (Flickinger a Drew, 1999).

1.1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Z chemického hlediska jsou PHA lineární polyestery hydroxyalkanových kyselin. Esterová vazba vzájemně spojuje jednotlivé hydroxyalkanové kyseliny a je tvořena kondenzační reakcí mezi hydroxylovou skupinou a karboxylovou skupinou sousedního monomeru. V této skupině polymerů lze kombinovat více než 150 různých monomerů a výsledné materiály mají výrazně odlišné vlastnosti. I přesto jsou některé vlastnosti společné, a to že se jedná se o elastomerní a termoplastické polymery, nerozpustné ve vodě a mají vysoký stupeň polymerizace. Ve všech PHA, které byly dosud charakterizovány, je atom uhlíku substituovaný hydroxyskupinou R-konfigurace v důsledku stereospecifity PHA biosyntetických enzymů (Muhammadi a kol., 2015).

Nejprostudovanějším a zároveň i prvním objeveným polyesterem ze skupiny polyhydroxyalkanoátů je poly(3-hydroxybutyrát) (P3HB). Už v roce 1926 Lemoigne izoloval a charakterizoval P3HB z bakteriálního kmene *Bacillus megaterium*. P3HB je homopolymer se všemi chirálními atomy uhlíku v R-konfiguraci, a je proto vysoce krystalický. Vysoká krystalinita (typicky 55-80 %) činí P3HB poměrně tuhé a křehké. Teplota skelného přechodu (T_g) P3HB leží mezi 5 a 9 °C a teplota tání (T_m) se nachází mezi 173 a 180 °C. Polymer P3HB se rozkládá přibližně při teplotě 200 °C, což je poměrně blízko jeho teplotě tání. Mechanické vlastnosti, jako je Youngův modul (3,5 GPa) a pevnost v tahu (43 MPa) materiálu P3HB, se blíží hodnotám izotaktického polypropylenu (PP). Hodnoty poměrného prodloužení při přetržení P3HB jsou 80krát nižší než dosažené hodnoty polypropylenu. Proto je P3HB ve srovnání s PP daleko tužší a křehčí materiál (Flickinger a Drew, 1999).

Jak již bylo zmíněno, mechanické vlastnosti jednotlivých PHA jsou velmi závislé od přítomných monomerních jednotek. Proto možným řešením při snaze zlepšit mechanické vlastnosti P3HB je inkorporace vhodných monomerních jednotek do jeho struktury. Při zabudování například 3-hydroxyvalerátových jednotek do polymeru dosáhneme výrazné změny ve flexibilitě materiálu. Výsledkem je snížení Youngova modulu pod 0,7 a snížení pevnosti v tahu pod 30 MPa. Teplota tání je v závislosti na obsahu 3-hydroxyvalerátu snížena až na 130 °C, což výrazně usnadňuje tepelné zpracování, jako je roztavení polymeru bez tepelné degradace materiálu. Výrazně se mění i možnosti elongace, které se zvyšují se zvyšováním frakce PHV (Sudesh a kol., 2000).

1.2 Biosyntéza PHA

Biosyntéza PHA je z biochemického hlediska velmi prostudovanou metabolickou dráhou (Sudesh a kol., 2000). Bakteriální kmen *Cupriavidus necator* H16 (v minulosti známý pod mnoha názvy jako *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha*, *Hydrogenomonas eutropha* nebo *Wautersia eutropha*) je považovaný za modelový organismus pro metabolismus scl-PHA. *C. necator* H16 tvoří P3HB třístupňovou enzymaticky katalyzovanou reakcí, která vychází z acetyl-CoA. Dvě molekuly acetyl-CoA se kondenzují na acetoacetyl-CoA pomocí 3-ketothiolázy (PhaA). Produkt následně podléhá redukci NADPH-dependentní reduktázou (PhaB), která produkuje (R)-3-hydroxybutyryl-CoA. Závěrečným krokem je pak polymerizace (R)-3-hydroxybutyryl-CoA monomerů za vzniku P3HB granulí za přítomnosti enzymu PHA syntázy (PhaC) (Volova, 2004).

Zdroj uhlíku zásadně určuje, který typ PHA bude daný bakteriální kmen produkovat. *C. necator* (a řada dalších bakteriálních kmenů) dokáže při použití směsného substrátu fruktózy a kyseliny propionové syntetizovat kopolymer 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu. Stejného efektu lze docílit i přidávkem kyseliny valerové jako přímého prekurzoru 3-hydroxyvalerové kyseliny. V případě použití propionátu je biochemická dráha v podstatě stejná jako při syntéze P3HB s tím rozdílem, že propionyl-CoA a acetyl-CoA jsou kondenzovány β -ketothiolázou za vzniku 3-ketovaleryl-CoA, což po redukci keto- skupiny patřičnou dehydrogenázou vede k začlenění monomerů 3-hydroxyvalerátu do polymeru. Kyseliny alkanové s lichým počtem uhlíků v řetězci mohou také sloužit jako zdroj pro syntézu kopolymeru. V tomto případě vzniká 3 hydroxyvalerát přímo z β oxidace těchto mastných kyselin (Sudesh a kol., 2000).

Nicméně, PHA složené z mcl (R)-3-hydroxy-mastných kyselin jsou syntetizované odkloněním meziproductů metabolismu mastných kyselin na (R)-3-hydroxyacyl-CoA a tedy k mcl-PHA. Pokud je zdroj uhlíku oxidován na acetyl-CoA, vyjma jeho tvorby cestou β -oxidace mastných kyselin, pak meziproducty biosyntézy mastných kyselin *de-novo* se stanou prekurzory pro biosyntézu mcl-PHA a jejichž konverze je katalyzována transacylázou PhaG (Sudesh a kol., 2000).

1.2.1 Regulace PHA biosyntetické dráhy

Účinek kultivačních podmínek na metabolismus PHA byl poprvé studován v roce 1958 pro nesporelující kmen *B. megaterium*. Bylo pozorováno, že množství akumulovaného PHA vzrostlo při navýšení poměru uhlíku k dusíku (Macrae a Wilkinson, 1958). Později bylo zjištěno, že bakterie produkují a akumulují PHA v podmínkách, kdy jim chybí kompletní rozsah živin potřebných pro buněčné dělení a zároveň mají nadbytek uhlíku. Bylo prokázáno, že biosyntéza PHA může být iniciována nedostatkem hořčíku, síry, dusíku, fosforu nebo kyslíku (Senior a kol., 1972). Právě tyto nevyrovnané podmínky růstu často vedou k pozitivnímu vlivu na regulaci na enzymatické úrovni.

Pro *C. necator* jako modelový bakteriální kmen je regulace podrobně popsána. Koncentrace acetyl-CoA a volného CoA jsou klíčovými faktory ovlivňujícími aktivitu 3-ketothiolázy, která katalyzuje první krok syntézy PHA. Dále bylo prokázáno, že biosyntéza P3HB je silně stimulována, jak vysokými intracelulárními koncentracemi NAD(P)H, tak

vysokými poměry NAD(P)H/NAD(P)⁺. Tyto podmínky vedou k významné inhibici citrát syntázy a citrát dehydrogenázy, což má za následek zvýšené zapojení acetyl-CoA do biosyntetické dráhy PHA namísto citrátového cyklu. Experiment, který provedl Park a Lee (1996), tuto hypotézu potvrdil. Ukázalo se, mutant *C. necator* s narušenou isocitrát dehydrogenázou, vykazoval výrazně nižší aktivitu citrátového cyklu a zároveň produkoval PHA rychleji než v případě nemutovaného kmene. Rychlost biosyntézy PHA je ovlivněn aktivitou enzymů β -ketothiolázou a acetoacetyl-CoA reduktázou, zatímco obsah PHB je řízen PHA syntázou (Jung a kol., 2000).

1.2.2 Biologická role PHA

PHA jako mikrobiální metabolit není bakteriemi v přírodě syntetizován zcela bezúčelně, ale naopak produkce těchto polymerních látek dodává jejich nositelům zjevnou strategickou výhodu. V minulosti byla produkce PHA spojována se sporulací bakterií, přičemž se mělo za to, že PHA vzniká před nástupem sporulace a rychlá utilizace polymeru předchází sporulaci (Slepecky a Law, 1961). Nicméně, později byly tyto představy vyvráceny, protože se ukázalo, že ne všechny sporulující bakterie dokážou produkovat PHA a zároveň se také ukázalo jaké nepřeborné množství různých nesporelujících druhů mikroorganismů je schopno PHA akumulovat (Emeruwa a Hawirko, 1973). Proto v současnosti je z fyziologického úhlu pohledu význam biosyntézy PHA spojován se schopností akumulovat polymerní látku, která při hladovění slouží jako zdroj uhlíku a energie. PHA představuje ideální materiál pro ukládání uhlíku a energie kvůli své nízké rozpustnosti a vysoké molekulové hmotnosti, která působí na bakteriální buňku zanedbatelným osmotickým tlakem (Dawes a Senior, 1973). Nicméně je pravděpodobné, že PHA hraje mnohem složitější roli ve stresové reakci bakterií. Ostatně bylo testováno, že expozice bakteriální kultury ke kontrolované stresové dávce může vést k navýšení produkce PHA. Podle těchto výsledků přidavek etanolu nebo peroxidu vodíku do kultivačních médií výrazně zvýšil akumulaci PHA v *Cupriavidus necator* H16, čímž došlo k významnému zlepšení procesu výroby PHA (Obruca a kol., 2010).

To, že PHA v buňkách má zásadnější význam než jen sloužit jako zásobní materiál, dokládá další studie, ve které za různých stresových faktorů byly porovnávány *Cupriavidus necator* H16 a mutantní kmen *Cupriavidus necator* H16/PHB-4 neschopný produkovat PHA. V těchto testech prokázal produkující kmen lepší schopnost odolávat zvýšené teplotě i oxidativnímu stresu (Obruca a kol., 2016). Producenti PHA jsou i hojně přítomni v prostředích, které jsou vystaveny nízkým teplotám. Například v antarktické sladké vodě byla identifikována řada PHA akumulujících bakterií (Ciesielski a kol., 2014).

1.2.3 Strategie zvyšující konkurenceschopnost PHA produkce

PHA se vyrábějí od 80. let minulého století s omezeným úspěchem na trhu. Mnoho výzev se týká omezené komercializace PHA, zejména vysokých výrobních nákladů a nestability termomechanických vlastností vyplývajících z nestabilních molekulových hmotností (M_w) a struktur, které jsou také spojeny s nestabilní aktivitou syntázy PHA a dodávkami monomerů.

Vysoké náklady jsou výsledkem vysoké energetické náročnosti spojené se složitou sterilizací a intenzivním provzdušňováním, nízkou přeměnou uhlíkových substrátů na PHA, pomalým růstem mikroorganismů, diskontinuálními procesy a drahým následným zpracováním atd. Použití extrémofilních bakterií v kombinaci s metabolickým inženýrstvím a syntetickou biologií by mohly tyto problémy plně vyřešit. Budoucí inženýrství na mikroorganismech produkujících PHA by se mělo zaměřit na bakterie odolné vůči kontaminaci, zejména extremofily, zvýšení konverze substrátu na PHA a kontrole Mw produkovaného PHA (Chen a Jiang, 2017).

1.3 Zpracování rostlinné biomasy s ohledem na její využití v biotechnologickém procesu

Ve své nejširší definici je biomasa popisována jako veškerý materiál, který byl nebo je částí živého organismu. Nicméně pro biomasu jako obnovitelný zdroj se definice obvykle zužuje na materiály rostlinného původu. Ty zahrnují zejména zemědělské zbytky (pšeničná a kukuřičná sláma), vedlejší produkty průmyslových procesů (dřevěné piliny, odpadní vlákna, mláto) nebo energetické plodiny (řepka olejka) (Pothiraj a kol., 2006).

1.3.1 Chemické složení rostlinné biomasy

Rostlinná biomasa může zaujímat mnoho podob, avšak skládá se ze stejných základních stavebních bloků. Základním blokem je lignocelulóza, která se skládá z ligninu, celulózy a hemicelulózy. Dalšími komponentami pak dále jsou extrahovatelné látky, proteiny a popel. Podíl jednotlivých komponent v biomase závisí v rámci rostliny na typu a stáří tkáně. U různých rostlin pak závisí na genetice a prostředí (Hames, 2009).

Lignocelulóza je hlavní strukturální složkou dřevin a bylin a představuje hlavní zdroj obnovitelné organické hmoty. Lignocelulóza se skládá z komplexní struktury biopolymerů zahrnující lignin, hemicelulózu a celulózu. Tyto tři základní složky jsou vzájemně propojeny a zasíťovány a výsledkem je velmi robustní struktura odolávající vnějším vlivům. Chemické vlastnosti jednotlivých komponent však dělají z lignocelulózy substrát s enormní biotechnologickou hodnotou (Pothiraj a kol., 2006).

1.4 Předúprava a hydrolýza lignocelulóзовých materiálů

Rozhodujícím krokem při zpracování lignocelulózové biomasy je předúprava, která umožňuje solubilizaci nebo separaci hlavních složek biomasy, čímž umožní fermentovatelnost lignocelulózového materiálu. Při volbě předúpravy by měla být zvážena celková kompatibilita výchozích surovin, enzymů a organismů, které mají být aplikovány. Tento krok není nákladný jen sám o sobě, ale zvyšuje náklady prakticky všech ostatních biologických procesů zpracování, včetně těch, které předcházejí předběžnému zpracování, tj. manipulaci s výsledným hydrolyzátem, zpracování pevného odpadu z předúpravy a detoxifikace potenciálních vedlejších produktů atd. (Menon a Rao, 2012).

Základním předpokladem je rozštěpení polysacharidů, celulózy a hemicelulózy, na fermentovatelné cukry (Wyman a kol., 2004). Kompozit vytvořený celulórou, hemicelulórou a ligninem je však zodpovědný za pozoruhodnou odolnost proti hydrolýze a enzymatickému napadení (Peters, 2006). Proto je cílem předúpravy alespoň částečné odstranění ligninu a hemicelulóz (delignifikace), snížení krystalinity celulózy a zvýšení porozity lignocelulózového materiálů (Obruča a kol., 2015).

Předúpravy lignocelulózové biomasy zahrnují biologické, mechanické, chemické metody a jejich různé kombinace. Výběr optimálního postupu předúpravy závisí na surovinách a jejich ekonomickém posouzení, ale také na vlivu na životní prostředí. Účinná předúprava je charakterizována několika kritérii: zachováním hemicelulózových frakcí, omezením tvorby inhibitorů v důsledku tvorby degradačních produktů, minimalizací nákladů a energetické spotřeby. Kromě těchto kritérií je třeba vzít v úvahu i několik dalších faktorů, včetně izolace a využití druhotných produktů s vysokou přidanou hodnotou (např. ligninu a proteinů), předúprava a recyklace katalyzátorů a zpracování odpadu (Banerjee a kol., 2010).

1.4.1 Chemické předúpravy

Chemické předúpravy byly původně vyvinuty a byly značně používány v papírenském průmyslu pro delignifikaci celulózových materiálů pro výrobu vysoce kvalitních papírových výrobků. O tyto techniky byl zvýšený zájem především díky efektivitě a nízkým nákladům na proces rozvláknování. Dosavadní chemické předúpravy měly primární cíl zlepšit biologickou rozložitelnost celulózy odstraněním ligninu a/nebo hemicelulózy a v menší míře ke snížení stupně polymerace a krystalinity celulózové složky. Tyto předúpravy jsou nejprostudovanějšími technikami předúprav a zahrnují působení kyselinami, zásadami a iontovými kapalinami (Menon a Rao, 2012).

1.4.1.1 Kyselá hydrolýza

Kyselá hydrolýza použití koncentrovaných, ale častěji zředěných kyselin k narušení tuhé struktury lignocelulózového materiálu. Nejčastěji používanou kyselinou je zředěná kyselina sírová, která je používána pro širokou škálu typů biomasy – proso (Digman a kol., 2010), kukuřičné klásky (Du a kol., 2010) nebo smrkové dřevo (Kucera a kol., 2017). Zředěná kyselina sírová se tradičně používá k výrobě furfuralu hydrolýzou hemicelulózy na jednoduché sacharidy, jako je xylóza, která se dále mění na furfural. Rovněž byly studovány jiné kyseliny, jako je kyselina chlorovodíková (Wang a kol., 2010), kyselina fosforečná (Zhang a kol., 2007) a kyselina dusičná (Himmel a kol., 1997).

1.4.1.2 Zásaditá hydrolýza

Alkalická předúprava lignocelulózy zahrnuje použití zásad, jako jsou hydroxid sodný, draselný, vápenatý a amonný. Působení hydroxidů způsobuje degradaci esterových a glykosidických vedlejších řetězců, což vede ke strukturální změně ligninu, částečné rozpouštění hemicelulózy, napučení celulózy, její částečnou dekrystalizaci (Cheng a kol., 2010). Hydroxid sodný má schopnost narušovat strukturu ligninu, čímž zvyšuje dostupnost enzymů k celulóze a hemicelulóze. Sun a jeho tým studoval účinnost různých alkalických roztoků analýzou míry delignifikace a rozpouštění hemicelulózy u slámy. Nejlepších výsledků bylo dosaženo použitím 1,5 % hydroxidu sodného po dobu 144 hodin při 20 °C s výsledkem

60 % rozloženého ligninu a 80 % rozložené hemicelulózy (Sun a kol., 1995). Podmínky alkalické předúpravy jsou obvykle méně striktní než jiné. Může se provádět za okolních podmínek, pak však vyžaduje delší dobu účinku než při zvýšené teplotě teplotách. Před enzymatickou hydrolýzou je nutný neutralizační krok pro odstranění ligninu a inhibitorů (solí, fenolových kyselin, furfuralu a aldehydů) (Menon a Rao, 2012).

1.5 Produkty degradace lignocelózy

Lignocelulóзовые materiály se hydrolýzou přeměňují na fermentovatelné cukry. Ty mohou následně být využity k produkci řady produktů (Chandel a kol., 2011). Celulóza může být hydrolyzována za vzniku molekul glukózy nebo celobiózy, zatímco hemicelulózy mohou být štěpena za vzniku molekul, jako jsou arabinóza, manóza, glukóza, galaktóza, xylóza nebo uronové kyseliny (Gibson, 2012; Wyman a kol., 2004). Právě tyto látky jsou požadovanými produkty hydrolýzy a jejich množství je klíčové při hodnocení využitelnosti získaného hydrolyzátu.

Chemická i enzymatická hydrolýza lignocelulóзовého materiálu však vede i k uvolnění řady rozkladných produktů, které se prokázaly jako škodlivé pro mikrobiální fermentaci. Kyselá hydrolýza lignocelulóзовých materiálů například produkuje několik sloučenin s inhibičními účinky, které ovlivňují specifické rychlosti růstu a tím výrazně snižují výtěžnost biotechnologického procesu. Produkty degradace lignocelulózy s inhibičními účinky bývají nejčastěji rozdělovány do tří základních skupin – alifatické kyseliny, aromatické látky a furanové sloučeniny (Jönsson a kol., 2013).

1.5.1 Aromatické látky

Velké množství různých fenolických sloučenin je tvořeno z ligninu během kyselého katalyzované hydrolýzy nebo předúpravy lignocelulózy. Karboxylové kyseliny vznikající při předúpravách přispívají k tvorbě kyselého prostředí. Fenolické sloučeniny a další aromatické látky se uvolňují během předúprav bez ohledu na to, zda byla využita kyselá katalýza (Martín a kol., 2002). Některé extrahovatelné látky jsou navíc také fenolické povahy (Rowell, 2013). Tvorba fenolických sloučenin ze sacharidů je další možností, i přesto, že význam této dráhy je stále předmětem mnoha studií (Popoff a kol., 1976).

Účinky fenolických sloučenin, které inhibují růst a tím i výtěžek produktu, jsou velmi variabilní a mohou být spojovány se specifickými funkčními skupinami (Ando a kol., 1986). V mnoha případech nebyl doposud mechanismus toxicity objasněn. Jeden z možných mechanismů spočívá v tom, že fenoly interferují s buněčnou membránou, a tím ovlivňují její funkci a mění svůj poměr proteinů a lipidů (Keweloh a kol., 1990). Fenolické sloučeniny jsou také zkoumány s ohledem na inhibici enzymatické hydrolýzy celulózy. Experimenty s fenoly naznačují, že jedním ze způsobů, jak ovlivňují aktivitu proteinů, je že vyvolávají jejich srážení (Kim a kol., 2011).

1.5.2 Alifatické kyseliny

Hydrolyzáty lignocelulózy obsahují alifatické kyseliny, jako jsou kyselina octová, kyselina mravenčí a kyselina levulová. Kyselina octová se vytváří primárně hydrolýzou acetyl skupin

hemicelulózy, zatímco kyselina mravenčí a kyselina levulová vznikají jako produkty kyselého katalyzované termochemické degradace polysacharidů. Kyselina mravenčí je produkt degradace furfuralu a HMF (5-hydroxymethylfurfuralu), zatímco kyselina levulová je tvořena degradací HMF (Ulbricht a kol., 1984).

Nedisociované kyseliny vstupují do buňky difúzí přes buněčnou membránu a poté se disociují kvůli neutrálnímu cytosolickému pH. Disociace kyseliny vede ke snížení intracelulárního pH, což může vést k smrti buněk (Pampulha a Loureiro-Dias, 1989).

1.5.3 Furanové sloučeniny

Furfural a HMF patří mezi nejběžněji se vyskytující furanové aldehydy v lignocelulóзовých hydrolyzátech. Furfural pochází z dehydratace pentóz a HMF dehydratací hexózových cukrů (Reginatto a Antônio, 2015). Tyto furanové aldehydy jsou známé jako nejúčinnější inhibitory růstu mikrobiálních buněk. V buňkách vyvolávají oxidační stres, indukují poškození DNA a inhibují řadu enzymů glykolýzy (Ask a kol., 2013). Pozornost je častěji věnována furfuralu, protože jej při předúpravě vzniká více než HMF a je více toxický pro průmyslovou katalýzu (Flores a kol., 2017).

1.6 Detoxifikace

Detoxifikace lignocelulóзовých hydrolyzátů a kalů je jedním z nejúčinnějších způsobů, jak potlačit problémy s inhibicí (Jönsson a kol., 2013). Tato strategie zahrnuje techniky, jako je použití chemických aditiv, např. alkálií, redukčních činidel a polymerů. Dalšími možnostmi jsou použití enzymatické úpravy, zahřívání a odpařování, extrakce kapalina-kapalina a extrakce kapalina-pevná látka. Extrakce kapalina-pevná zahrnuje techniky, jako je výměna iontů a adsorpce aktivním uhlím (Jönsson a Martín, 2016).

Nevýhodou metody detoxikace je nutnost zařazení samostatného kroku procesu, což má neblahý vliv na technicko-ekonomický aspekt. Zatímco existuje mnoho způsobů, jak provádět detoxikaci, jen málo z nich bylo předmětem technicko-ekonomických hodnocení, které se zabývají například procesními vstupy, energetickými nároky, investičním vybavením, účinností a příspěvkem na náklady technologie. Některé detoxifikační metody mají výhody, které při technicko-ekonomickém hodnocení nemohou být opomenuty, např. přidání redukčních činidel nebo adsorpce inhibitorů na PEI polymer je kompatibilní s kroky biokatalytické konverze. Další výhodou některých redukčních činidel, jako jsou síranové oxyaniony, sulfit a dithionit, je to, že zlepšují jak fermentovatelnost a enzymatické sacharifikaci celulózy (Cannella a kol., 2014).

1.7 Využití lignocelulóзовých odpadů z agropotravinářského průmyslu

Mikroorganismy jsou schopné produkovat PHA z různých zdrojů uhlíku a lignocelulóza nepatří mezi výjimky. Jak již bylo řečeno, lignocelulóza představuje vysoce bohatou, ale také poměrně univerzální skupinu materiálů. Vlastností a udržitelnost těchto materiálů, s ohledem na jejich využití pro biotechnologickou produkci PHA, stejně jako jeho hydrolyza a další

zpracování by měly být vždy prováděny s ohledem na konkrétní druh biomasy a proces fermentace (Obruča a kol., 2015).

Kromě volby a přípravy substrátu je obvykle klíčový výběr PHA produkujícího bakteriálního kmene. Obecně bylo mnoho bakterií testováno za účelem produkce PHA, nicméně jen málo z nich bylo považováno za vhodné kandidáty na produkci ve velkém měřítku. Vhodnost bakterie pro produkci PHA z takto komplexních a náročných substrátů závisí na mnoha různých faktorech, především: schopnost využívat fermentovatelné cukry přítomné v hydrolyzátech (včetně pentóz), schopnost tolerovat nebo dokonce eliminovat potenciální mikrobiální inhibitory, stabilita a nerizikovost organismu, růstové rychlosti a schopnost akumulace vysokého obsahu PHA v buňkách. Dále pak často opomíjená extrahovatelnost a molekulové hmotnosti naakumulovaného PHA (Kessler a Wilholt, 1999).

Kromě dřevní biomasy existuje řada dalších zdrojů materiálů založených na lignocelulóze, které lze použít jako zdroj pro výrobu PHA – odpady z agropotravinářského průmyslu. Tyto materiály se vyrábějí v obrovských množstvích při zpracování zemědělských rostlin. Navzdory tomu, že některé z těchto odpadů a vedlejší produkty mohou být použity k různým účelům, jako je krmení zvířat nebo hnojení, výroba PHA představuje velmi zajímavou a slibnou strategii pro jejich valorizaci, což přináší vysoce hodnotný produkt. Existuje tedy řada studií zabývajících se přeměnou těchto odpadů na PHA (Obruča a kol., 2015b).

Velmi slibným odpadním substrátem pro výrobu PHA je kávová sedlina. V roce 2010 celosvětová roční produkce kávových zrn překročila 8 milionů tun. Během přípravy kávového nápoje nebo při výrobě instantní kávy vzniká pevný podíl známý jako kávová sedlina. Ta obsahuje přibližně 15 % oleje, který lze jednoduše extrahovat a s využitím bakteriálního kmene *Cupriavidus necator* konvertovat na P3HB (Cruz a kol., 2014; Obruča a kol., 2015a). Po extrakci oleje vzniká zbytek s významným obsahem hemicelulóz a celulózy. Kyselou hydrolyzou lze tyto přírodní polymery převést na fermentovatelné sacharidy, které mohou být převedeny na PHA s použitím kmene *Burkholderia cepacia* (Obruča a kol., 2014).

Dalším slibným materiálem mohou být pšeničné otruby. Van-Thuoc s kolegy hydrolyzoval otruby směsí enzymů z *Aspergillus oryzae* NM1 za vzniku redukujících sacharidů složených zejména z glukózy, manózy, xylózy a arabinózy. K produkci P3HB byl následně použit bakteriální kmen *Halomonas boliviensis*, přičemž získaná koncentrace P3HB dosahovala 4 g/l a obsah P3HB v suché biomase byl přibližně 50 % (Van-Thuoc a kol., 2007).

Také hydrolyzát rýžové slámy získaný chemickou hydrolyzou s použitím zředěné kyseliny byl využit k produkci na PHA kmenem *Bacillus firmus*. Kyselé předupravené hydrolyzáty obsahovaly cukry, ale také jejich rozkladné produkty, jako jsou kyselina mravenčí, kyselina octová, furfural a HMF. Bakterie rostly v hydrolyzátovém médiu bez jakékoliv detoxikace za vzniku biomasy 1,8 g/l s 1,7 g/l akumulovaného P3HB a obsah P3HB v buňkách činil 89 % (Sindhu a kol., 2013).

Vláknitá hmota, která zůstává po vysušení šťávy z cukrové třtiny nebo čiroku, je další atraktivní surovinou. Zejména díky tomu, že se jedná o hojně dostupný odpadní materiál. Silva a kol. k tomuto záměru využili bakteriální kmeny *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari*. Pro zlepšení fermentovatelnosti hydrolyzátu byl použit třístupňový detoxikační proces (zakoncentrování ve vodní lázni, over-liming a sorpce aktivním uhlím). Po detoxifikaci byly nejvyšší výtěžky pozorovány u *B. sacchari*, a to 4,4 g/l biomasy a 2,7 g/l PHA (Silva a kol., 2004).

2 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

V průběhu práce byly řešeny následující dílčí úkoly:

1. Vývoj technik pro kvantifikaci PHA v bakteriálních buňkách.
2. Charakterizace a příprava hydrolyzátů užitelných pro biotechnologickou produkci
 - Hydrolýza vybraných materiálů
 - Charakterizace hydrolyzátů vhodnými analytickými metodami
 - Aplikace detoxifikačních metod za účelem snížení koncentrace inhibičních látek
3. Produkce polyhydroxyalkanoátů na hydrolyzáttech odpadních produktů potravinářského průmyslu
 - Screening a výběr vhodných přirozených mikrobiálních kmenů schopných užívat hydrolyzáty lignocelulózy
 - Aplikace evolučního inženýrství za účelem zvýšení produkce PHA
 - Studium vlivu stresových faktorů na schopnost akumulovat PHA
4. Studium produkce terpolymeru P(3HB-*co*-3HV-*co*-4HB)

3 DISKUZE

Tato kapitola je zamýšlena jako detailní diskuze k výsledkům, které již byly v průběhu doktorského studia publikovány. Všechny publikace a manuskripty jsou součástí práce jako přílohy a v průběhu diskuze jsou jednotlivé přílohy odkazovány. Samozřejmě součástí příložených publikací a manuskriptů je také detailní popis použitých metod a výsledků.

Předložená práce se zaměřuje na strategie vedoucí ke snížení nákladů na biotechnologickou produkci polyhydroxyalkanoátů. První část (kapitola 3.1) se zabývá možnostmi využití moderních technik při stanovení obsahů PHA v produkované biomase, přičemž nahrazení standardních časově náročných kvantitvních metod umožňuje výrazné zefektivnění monitoringu průběhu produkce. Další části se pak zabývají přímo produkcí PHA. Nejzásadnější pro snížení nákladů je použití levného zdroje, jako jsou například odpady z potravinářských výroby (kapitola 3.2). To však s sebou často nese řadu nevýhod, které mohou být do určité míry eliminovány použitím vhodného kmene. Takový vhodný kmen je možné získat pomocí evolučního inženýrství, kterému se věnuje kapitola 3.3. Tato cesta však bývá časově velmi náročná s nejasným výsledkem, proto je zde také alternativní strategie založená na využití extrémofilního bakteriálního kmene (kapitola 3.4). Extrémofilní mikroorganismy často dokážou přetavit úskalí biologického procesu ve strategickou výhodu. Kapitola 4.5 se pak zabývá produkcí terpolymeru PHA složeného z monomerů 3HB, 3HV a 4HB.

3.1 Zefektivnění procesu kvantifikace PHA

Nezbytnost identifikovat a kvantifikovat PHA se táhne celým vývojem biotechnologického procesu od izolace produkčního kmene až po určení čistoty ve výsledném produktu. Dostupných metod pro screening bakterií produkujících PHA, kvantifikaci a charakterizaci PHA existuje celá řada, která zahrnuje barvení pomocí více či méně selektivních barviv kultur, spektrofotometrické analýzy, infračervenou spektroskopii, vysoce účinnou kapalinovou chromatografii, průtokovou cytometrii, plynovou chromatografii a další (Koller a Rodríguez-Contreras, 2015).

Mezi tradiční metody detekce přítomnosti PHA granulí ve struktuře bakterií patří barvení buněk pomocí barviv Sudánská čerň nebo Nilská modř (Smibert a Krieg, 1979). Předností těchto metod je především jejich rychlost. S možností obarvení kolonií přímo na agarových plotnách během růstu přišel Spierkermann P. a kol. (1999), kdy byl flourofor Nilská čerň (NR) přidán přímo do agaru. NR však neposkytuje pozitivní fluorescenční reakci pouze s molekulami PHA, ale i ostatními zásobními látkami na bázi lipidů.

Pro identifikaci PHA v bakteriálních buňkách je možné aplikovat infračervenou spektroskopii, kde využíváme faktu, že molekuly mají silný absorpční pík při 1728 cm^{-1} v infračerveném spektru vyvolaný karbonylovou skupinou, získáváme spolehlivou metodu identifikace potenciálních producentů (Juttner a kol., 1975). Dokonce navíc lze ze spekter infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) určit, o který typ PHA z hlediska délky řetězce se jedná. V práci Honga K. a kolektivu (1999) se MCL-monomery jako jsou hydroxyoctanoát (HO) a hydroxydodecanoát (HH) se vyznačovaly píkem při 1740

cm⁻¹ a kopolymer obsahující SCL i MCL píkem při 1732 cm⁻¹. Dále je pomocí infračervené spektroskopie možné stanovit, je-li materiál amorfní či krystalický. Nicméně hlavní nevýhodou je, že při infračervené spektroskopii významně interferuje voda, která má široký absorpční pík zakrývající velkou část spektra. Proto je principiálně nutné vodu ze vzorků před samotnou analýzou buněk pomocí infračervené spektroskopie odstranit (Sedlacek a kol., 2019).

Když se však přesuneme ke kvantifikaci PHA, která je nutná při monitoringu biotechnologického procesu produkce PHA, objeví se nám zásadní problém v časové náročnosti jednotlivých metod. V minulosti byla kvantifikace prováděna přímou gravimetrickou analýzou PHA izolovaného po extrakci rozpouštědlem nebo spektrofotometrickou metodou. Tato metoda využívala degradace P(3HB) pomocí koncentrované kyseliny sírové za zvýšené teploty na kyselinu krotonovou, která se absorbuje UV záření s vlnovou délkou 235 nm (Law a Slepecky, 1961), nicméně obě metody jsou časově velice náročné.

V současné době se k analýze PHA využívá především plynová chromatografie (GC). Jako první stanovení publikoval G. Braunegg (1978), když použil mírnou kyselinu nebo zásadu k metanolýze P3HB přímo bez předchozí extrakce P3HB z buněk. Následně vznikla řada alternativních postupů založených na etanolýze případně propanolýze PHA v biomase. V této práci byla ke kvantifikaci PHA používána metoda podle Brandla a kolektivu (1988), kdy lyofilizované nebo vysušené buňky byly zpracovávány ve směsi chloroformu a 15% kyselině sírové v methanolu po dobu 3 hodin při teplotě 94 °C. Výsledné metylestery hydroxykyselin byly analyzovány pomocí GC s plamenově ionizačním detektorem (FID).

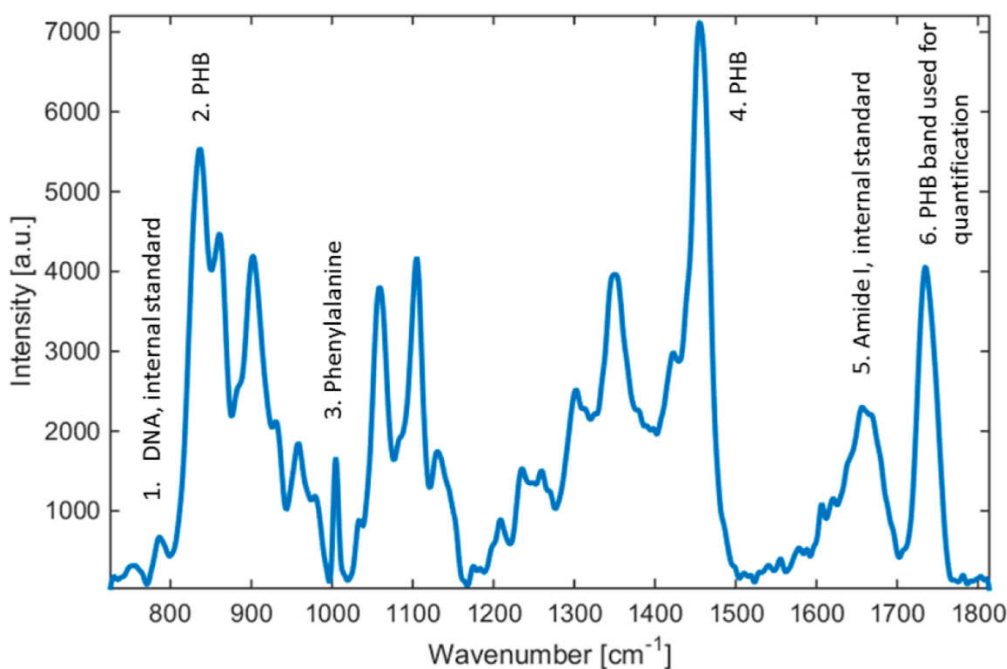
S ostatními metodami má tato metoda kromě jiného společnou především časovou náročnost. V našem případě je to přibližně asi 8 hodin od odběru vzorku po získání výsledků, což je doba, která by se dala výrazně snížit využitím spektrálních metod. Proto jsme se rozhodli ověřit možnosti kvantifikace pomocí Ramanovské spektroskopie a průtokové cytometrie. Pro experimenty byl zvolen kmen *Cupriavidus necator* H16 jakožto modelový bakteriální kmen pro produkci P3HB.

V první řadě jsme se zaměřili na využití průtokové cytometrie, přičemž jako fluorofor interagující s intracelulárními granulemi P3HB byla použita Nilská červeň. Kultura, u níž byl obsah P3HB paralelně stanoven pomocí plynové chromatografie, byla po fixaci a aplikaci nilské červěně měřena na průtokovém cytometru. Především jsme se zaměřovali na korelaci jednotlivých parametrů vůči obsahu P3HB. Nejslibnějšími parametry se zdály průměrná intenzita fluorescence, přímý rozptyl a boční rozptyl s korelačními koeficienty 0,961; 0,800 a 0,785. Tyto výsledky byly prezentovány na 4. mezinárodní chemicko technologické konferenci a plný text našeho příspěvku je v **Příloze I** (Kučera a kol., 2016). Nicméně je na místě poznamenat, že námi získané korelace nebyly nijak výrazně přesvědčivé. Tyo a kol. (2006) stanovovali P3HB v bakteriích *Escherichia coli* a *Synechocystis* sp. prakticky identickým postupem. V případě *E. coli* dosahovali koeficientu determinace 0,96 a u *Synechocystis* sp. 0,98. Získané korelace proto také mohou posloužit pouze k rychlému a orientačnímu stanovení obsahů. I Alvez a kol. (2017) postupovali velice podobně v případě stejného stanovení u bakterií *Herbaspirillum seropedicae* a *Azospirillum brasilense*. Pro práci však využili modernější vybavení v podobě průtokového cytometru BD Accuri C5® a v práci dali větší důraz na optimalizaci permeabilizace, čas vystavení Nilské

červeni a její koncentraci. U optimalizovaného postupu pak dosahovali koeficientu determinace vyššího než 0,99. Z výsledků se zdá, že optimální koncentrace NR se může mezi jednotlivými druhy lišit, a proto je nastavení koncentrace podle druhů kritickým krokem pro optimalizaci.

Protože je využití průtokové cytometrie za účelem kvantifikace PHA problematické a podle našich zkušeností je zatíženo celou řadou experimentálních artefaktů a vykazuje relativně nízkou opakovatelnost, zabývali jsme se dále využitím Ramanovské spektroskopie. Podobně jako s infračervenou spektroskopií (IČ) je tato technika založena na interakci elektromagnetických vln s fonony. Ramanova spektroskopie závisí na změně polarizovatelnosti molekuly, zatímco IČ spektroskopie závisí na změně dipólového momentu. Ramanova spektroskopie měří relativní frekvence, při kterých vzorek rozptyluje záření, na rozdíl od IČ spektroskopie, která měří absolutní frekvence, při kterých vzorek absorbuje záření. FTIR spektroskopie je citlivá na vibrace hetero-nukleárních funkčních skupin a polární vazby, zejména OH. To zásadně omezuje použití této techniky jen na vzorky, které vodu neobsahují. U Ramanovy spektroskopie toto omezení neplatí a s oblibou je v současné době používána pro analýzu biologických vzorků. V našem případě jsme s touto technikou od počátku dosahovali daleko vyšší míry korelace. Proto jsme se na tuto techniku později více zaměřili a výsledkem mohla být publikace v impaktovaném časopisu *Sensors* a je součástí této práce v **Příloze II** (Samek a kol., *SENSORS*, 2016, vol. 16, no. 11, p. 1-7.).

Na počátku bylo zapotřebí identifikovat Ramanova spektra P3HB u *Cupriavidus necator* H16. Pro získání spekter té samé bakterie, ale bez akumulovaného PHA jsme použili mutantní kmen *Cupriavidus necator* H16/PHB⁻⁴, neschopný akumulace PHA. Obrázek 1 ukazuje typické Ramanovo spektrum kmene *Cupriavidus necator* H16 kultivovaného přímo na Petriho misce. Je třeba zdůraznit, že v zájmu jednoduchosti lze vzorky analyzovat také přímo na Petriho miskách, na nichž byly bakterie pěstovány.

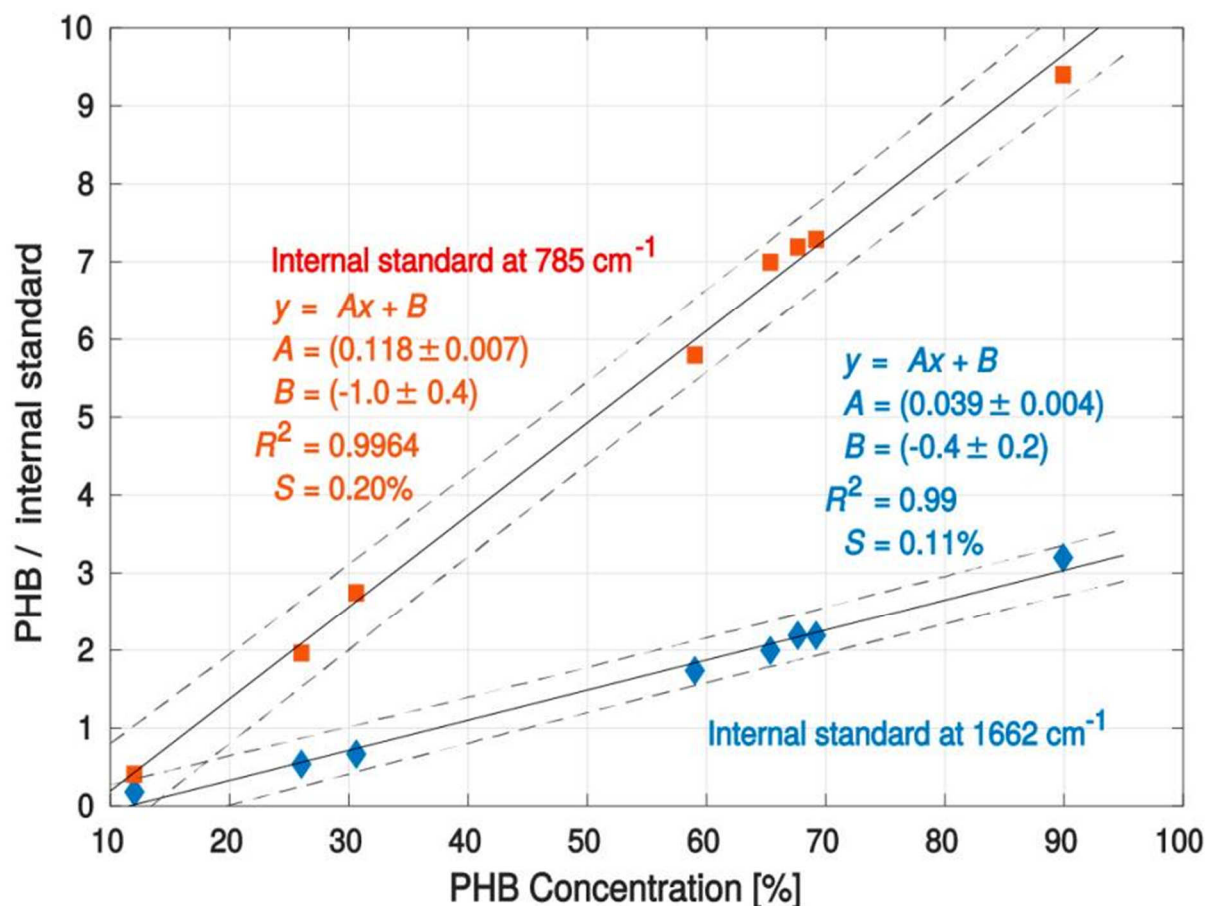


Obrázek 1 Ramanova spektra *Cupriavidus necator* H16. Vybrané emisní linie použité v naší studii jsou zvýrazněny. Píky 1, 5 a 6 byly použity pro analýzu P3HB ve vzorku bakterií (Samek a kol., 2016).

Abychom získali jednotlivé body kalibrace, bylo zapotřebí získat bakteriální buňky s různým obsahem P3HB. Toho jsme dosáhli aplikací různých kultivačních strategií využívajících předpokladu, že nejvyššího obsahu P3HB v biomase dosáhneme za podmínek vysokého poměru C/N. Pro dosažení nízkých hodnot P3HB jsme naopak použili kulturu rostoucí na komplexním mediu po dobu pouze 24 h. Přestože výše uvedené spektrum je získáno analýzou přímou z Petriho misky, jednotlivé body kalibrace byly získány kultivací v tekutých médiích, aby bylo možné získané kultury snadno analyzovat pomocí plynové chromatografie, a aby bylo možné je před Ramanovou analýzou promýt pro dosažené přesnějších hodnot. Samotná příprava vzorků na analýzu probíhala v následujících krocích. 1 ml kultury byl centrifugován (10 000 rpm, 2 min) a promyt 50% ethanolem. Přibližně 20 μ l suspenze bylo převedeno na CaF sklíčko a po usušení na vzduchu byla zaschlá suspenze analyzována Ramanovým spektrometrem.

Dalším řešným problémem byl výběr vhodného interního standardu. V prvotních experimentech, ve kterých jsme zjistili, že se spektrum β -karotenu nepřekrývá s píkem P3HB (pík č. 6 v Obrázku 1), jsme se rozhodli zařadit krok přidání konstantního množství β -karotenu k buněčné suspenzi před fixační fází při přípravě vzorku. Při analýze těchto vzorků se však ukázalo, že plocha píku β -karotenu, a tedy jeho koncentrace v buněčné suspenzi je více méně náhodná. Lze předpokládat, že lepšími výsledky bychom dosáhli, pokud bychom před analýzou naředili kulturu tak, aby byl obsah biomasy ve všech vzorcích stejný. To by však analýzu výrazně komplikovalo a její přesnost by poklesla.

Přišli jsme však s předpokladem, že intracelulární koncentrace proteinů a nukleových kyselin je do velké míry konstantní s proměnlivou koncentrací intracelulárního P3HB. Proto byly píky odpovídající DNA (787 cm^{-1} a proteinům, konkrétně Amid I (1662 cm^{-1})) navrženy jako vnitřní standardy pro kalibrační závislost. Výsledkem byly dvě kalibrační křivky znázorněné na Obrázek 2.



Obrázek 2 Kalibrační křivky pro P3HB u bakterie *Cupriavidus necator* v koncentračním rozmezí P3HB 12 % - 90 %. U horní kalibrační křivky (červené čtverečky) byla jako vnitřní standard použita emisní linie na 787 cm^{-1} (DNA) a u dolní kalibrační křivky byla zkonstruována s použitím linie při 1662 cm^{-1} (Amid I) jako vnitřního standardu. Čárkované křivky ukazují 95% pásmo spolehlivosti lineárního přizpůsobení. Parametry popisující kalibrační křivky jsou uvedeny na obrázku. R^2 je koeficient determinace a S je střední kvadratická chyba (Samek a kol., 2016).

Využitím Ramanovy spektroskopie pro kvalitativní analýzu PHA se zabývá celá řada publikací. Ramanovo spektrum u P3HB bylo stanoveno a interpretováno De Gelderem a kol. (2008) u *C. necator* DSM 428. Intenzita reprezentativního Ramanova pásma kolem 1734 cm^{-1} se ukázala být vhodná pro sledování syntézy P3HB a její spotřeby v biomase. A dále prokázali, že intenzity píku jsou lineárně úměrné koncentraci P3HB. Autoři navrhli Ramanovu spektroskopii jako rychlou neinvazivní techniku pro monitorování intracelulárního obsahu P3HB v biomase. V porovnání s naší prací však nepracovali s koncepcí využití interního standardu.

Zásadní výhodou Ramanovy spektroskopie oproti ostatním technikám, především GC, je významná úspora času. Technika má potenciální využití i pro *in-situ* real-time analýzu přímo ve fermentoru. Zároveň ji však lze uplatnit i při hledání nových potenciálních PHA producentů a v kombinaci s Ramanovskou pinzetou je možné tyto potenciální kmeny izolovat na úrovni jedné buňky. Nevýhodou této techniky při využití pro kvantitativní analýzu PHA je

fakt, že je nezbytné provést kalibraci pro každý mikrobiální kmen, protože obsahy DNA a proteinů se mohou značně lišit.

3.2 Využití odpadů z potravinářských výrob k produkci polyhydroxyalkanoátů

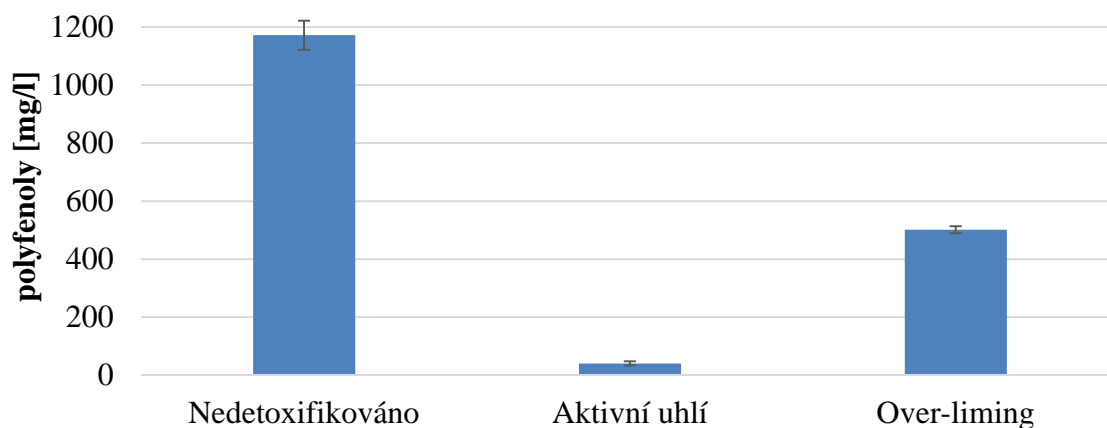
Naše další experimenty se zaměřovaly na možnosti utilizace lignocelulózových materiálů k biotechnologické produkci PHA. Celá řada odpadů z agropotravinářského komplexu má lignocelulózový základ, který může sloužit jako substrát při produkci PHA. V našich experimentech jsme se zaměřili na zapojení gramnegativních bakterií rodu *Burkholderia*, a to především z důvodu bohatých zkušeností s utilizací lignocelulózy pomocí kmene *Burkholderia cepacia*, nabitých při vypracovávání diplomové práce (Kučera, 2015).

Další vydaný článek připojený jako **Příloha III** (Kučera a kol., Bioengineering, 2017, vol. 4, no. 2, p. 1-9.), se zabývá porovnáním detoxifikačních metod aplikovaných na dřevní hydrolyzáty, které byly použity pro produkci PHA. Kromě běžných metod snižujících obsah inhibičně působících látek, jako jsou overliming nebo sorpce aktivním uhlím, byla testována aplikace lignitu jakožto ekonomicky zajímavého sorbentu, který může být využit k odstranění mikrobiálních inhibitorů z hydrolyzátů lignocelulózových materiálů.

Práce poukazuje na nezbytnost detoxifikačního kroku při snaze využít hydrolyzáty získané z lignocelulózových materiálů. Při hydrolýze vznikají inhibiční látky jako kyselina octová, furfural, 5-hydroxymetylfurfural, kyselina levulová a další, jejichž vznik je popsán v kapitole 1.5. Na směs měkkého dřeva jsme aplikovali hydrolýzu zředěnou kyselinou. Četnost výskytu této metody v literatuře svědčí o tom, že je to nejobvyklejší způsob zpracování lignocelulózových materiálů za účelem jejich následné valorizace pomocí mikrobiálních biotechnologií. Inhibiční látky vzniklé při této metodě jsou vždy obdobné a bez ohledu na to, zda je použito dřevo z borovice (Silva a kol., 2014), odpad z výroby třtinového cukru (Yu a Stahl, 2008) nebo dřevěné štěpky z javoru (Pan a kol., 2012). To, čím však materiály zásadně liší množství získaného utilizovatelného uhlíkatého zdroje. V případě borovicového dřeva obsahoval hydrolyzát celkově koncentraci cukrů 112,5 g/l (Silva a kol., 2014). Yu a Stahl použili bakteriální kmeny *Brevundimonas vesicularis* a *Sphingopyxis macrogoltabida* pro produkci terpolymeru poly(3-hydroxypropionát-co-3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) z odpadní cukrové třtiny. Jejich hydrolyzát celkově obsahoval 27,6 g/l cukrů v poměru 70 % xylózy, 6 % glukózy a 6 % arabinózy. Přehled využitelných lignocelulózových materiálů pro produkci PHA je přehledně zpracován v Tabulce 1. Obrázek 5 pak ukazuje jednotlivé biochemické dráhy, vycházející z monosacharidů vznikajících hydrolýzou lignocelulózového materiálu, až po žádaný produkt PHA.

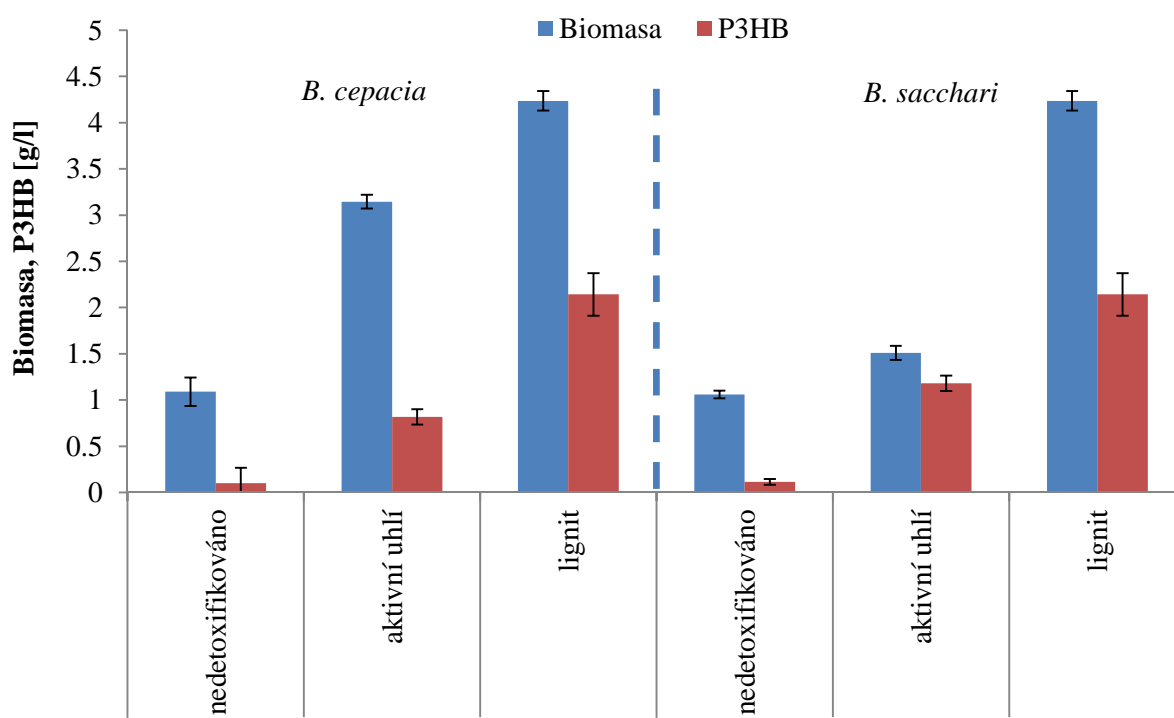
V našem případě byl celkový výtěžek cukrů při hydrolýze 14,9 g/l v poměru 70 % xylózy a 30 % glukózy. Při použití dřevěných pilin v koncentraci 50 g/l bylo tedy dosaženo téměř 30% konverze na fermentovatelné cukry. Pro produkci PHA byly použity kmeny *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari*, ale při přímém použití hydrolyzátů bez snahy eliminovat inhibiční látky, byl zaznamenán velmi nízký nárůst biomasy (1,0 – 1,5 g/l) a stejně tak byl nízký i výtěžek P3HB (0,1 g/l). Analýzy hydrolyzátů odhalily především značný obsah fenolických látek, jejich negativní dopad je popsán v kapitole 1.5.1. Pro eliminaci

mikrobiálních inhibitorů byly zvoleny a porovnány dvě tradiční metody – overliming, adsorpce na aktivní uhlí. Obrázek 3 porovnává schopnost eliminovat přítomnost polyfenolů v médiu.



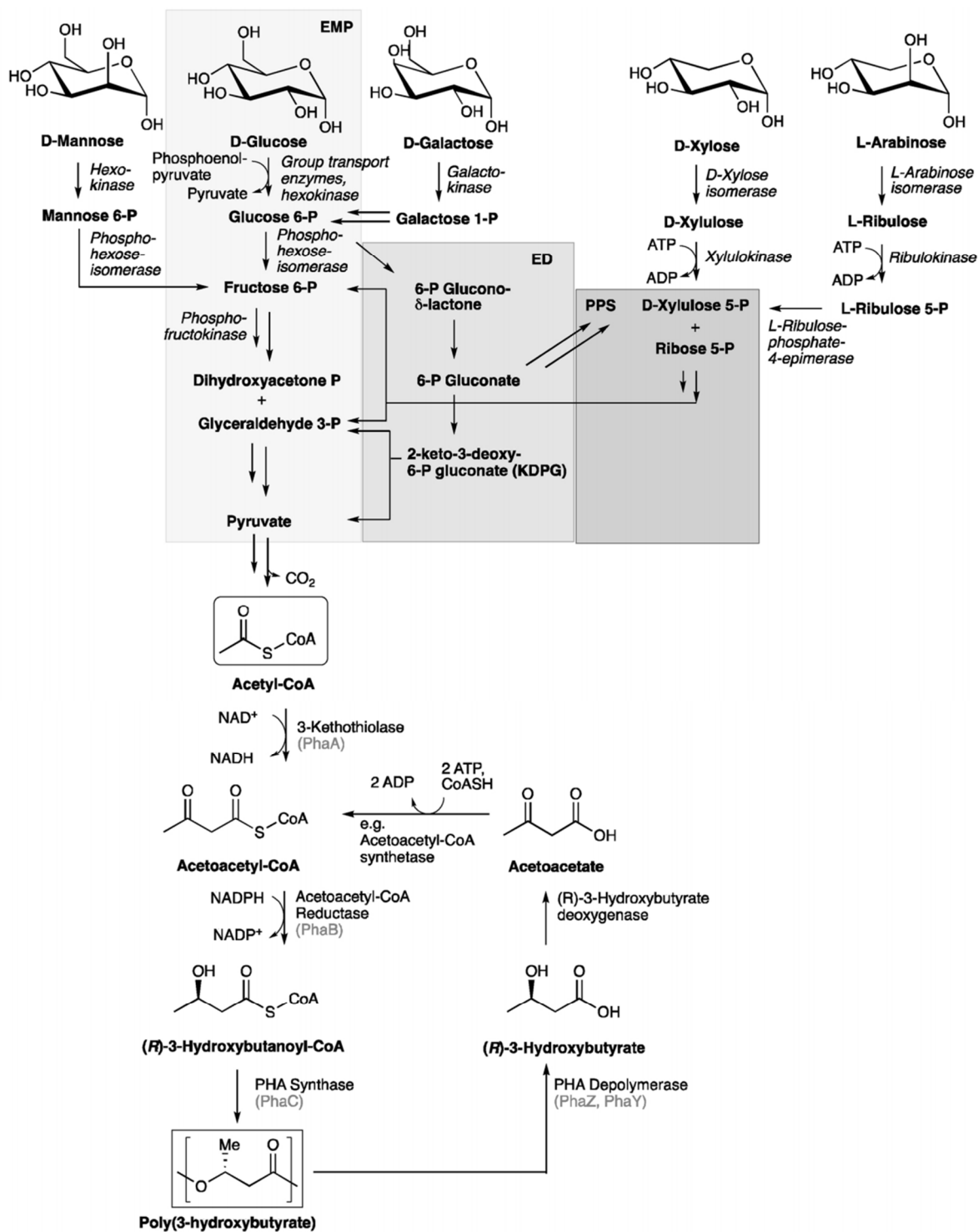
Obrázek 3 Porovnání tradičních detoxifikačních metod

V dalších experimentech byla navíc testována nová detoxifikační metoda, a to adsorpce na lignit. Lignit je nejmladší a nejméně karbonizované hnědé uhlí. Značnou výhodou oproti aktivnímu uhlí je především výrazně nižší cena. Nejvyšší efektivitu detoxifikace dosahovalo aktivní uhlí, které snížilo obsah polyfenolů o 90 % a produkci P3HB navýšilo 8 – 12krát. U lignitu i přesto, že jeho detoxifikační účinnost zdaleka nedosahovala takových hodnot, tak hydrolyzáty ošetřené touto metodou, byl bakteriemi výrazně lépe využíván, což mělo za následek nejvyšší dosažený nárůst biomasy (4 g/l) a produkce P3HB (přibližně 2 g/l). Výsledky jsou shrnuty na Obrázek 4.



Tabulka 1 Využitelné lignocelulózy materiály k produkci PHA (převzato z Obruča a kol., 2015 a aktualizováno)

Produkční kmen	Zdroj uhlíku	typ PHA	Kultivace	Biomasa [g/l]	PHA [%]	PHA [g/l]	Y_{PS}	Produktivita [g l ⁻¹ h ⁻¹]	Zdroj
<i>Burholderia cepacia</i>	xylóza	PHB	baňka, batch	2,6	60	1,6	0,11	n.a.	Ramsay a kol. (1995)
<i>Pseudomonas strains</i>	rostlinná biomasa	mcl-PHA	baňka, batch	0,9	33	0,3	n.a.	n.a.	Davis a kol. (2013)
<i>Azotobacter beijerinickii</i>	kokosové výlisky	PHB	baňka, batch	5,0	48	2,4	n.a.	n.a.	Prabu a Murugesan (2010)
<i>Burholderia sacchari</i>	hydrolyzát pšeničné slámy	PHB	fermentor, fed-batch	145,8	72	105,0	0,22	1,6	Cesario a kol. (2014)
recombinantní <i>E.coli</i>	xylan z bukového dřeva a xylóza	P(LA-co-3HB)	baňka, batch	8,9	40	3,6	n.a.	n.a.	Salamanca-Cardona a kol. (2014)
<i>Burholderia cepacia</i>	hydrolyzát dřeva	PHB	baňka, batch	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Pan a kol. (2012)
<i>Ralstonia eutropha</i>	lignocelulózy hydrolyzát	PHB	baňka, batch	11,1	57	6,3	n.a.	n.a.	Yu a Stahl (2008)
<i>Bacillus firmus</i>	hydrolyzát rýžové slámy	PHB	baňka, batch	1,9	89	1,7	n.a.	n.a.	Sindhu a kol. (2013)
<i>Burholderia cepacia</i>	hydrolyzát dřeva	P(3HB-co-3HV)	baňka, batch	n.a.	40	2,0	n.a.	n.a.	Keenan a kol. (2006)
Recombinant <i>E.coli</i>	hydrolyzát celulózy + propionát	P(3HB-co-3HV)	baňka, batch	4,2	50	2,1	n.a.	n.a.	Nduko a kol. (2012)
<i>Bacillus megaterium</i>	odpad ze zpracování palmového oleje	PHB	baňka, batch	24,2	52	12,5	0,23	0,26	Zhang a kol. (2013)
<i>Burholderia cepacia</i>	hydrolyzát dřeva	PHB	fermentor, fed-batch	16,9	51	8,7	0,19	0,091	Pan a kol. (2012)
<i>Sacharophagus degradans</i>	lignocelulózy odpad z Agáve	PHA	baňka, batch	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Munoz a kol. (2018)
<i>Burholderia cepacia</i>	lignocelulózy hydrolyzát	PHB	baňka, batch	4,4	53	2,3	0,29	0,09	Silva a kol. (2004)
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	borovice montereyská piliny	P(3HP-co-3HB-co-3HV)	baňka, batch	0,25	64	0,16	n.a.	n.a.	Silva a kol. (2007)
<i>Sphingopyxis macrogoltabida</i>	borovice montereyská piliny		baňka, batch	0,32	72	0,23	n.a.	n.a.	Silva a kol. (2007)
<i>Burholderia sacchari</i>	lignocelulózy hydrolyzát	PHB	baňka, batch	4,4	62	2,7	0,39	0,11	Silva a kol. (2004)
<i>Halomonas boliviensis</i>	pšeničné otruby	PHB	baňka, batch	8	50	4,0	0,2	n.a.	Van-Thuoc a kol. (2008)
<i>Ralstonia eutropha</i>	hydrolyzát vodního hyacintu	PHB	fermentor, batch	12	58	7,0	0,13	0,24	Radhika a Murugesan (2012)
<i>Burholderia sacchari</i>	xylóza	PHB	baňka, batch	5,5	58	3,2	0,26	0,07	Lopes a kol. (2009)
Mutant <i>Burholderia sacchari</i>	xylóza	PHB	baňka, batch	5,3	50	2,7	0,17	0,07	Lopes a kol. (2011)
<i>Ralstonia eutropha</i>	enzymaticky hydrolyzovaná buničina	PHB	baňka, batch	8,78	32	2,8	n.a.	n.a.	Zhang a kol. (2004)
<i>Sphingobium scionense</i>	enzym. hydrolyzované měkké dřevo	PHB	baňka, batch	1,23	32	0,4	0,22	n.a.	Bowers a kol. (2014)
<i>Burholderia cepacia</i>	hydrolyzovaná kávová sedlina	P(3HB-co-3HV)	baňka, batch	5,5	56	3,1	0,24	n.a.	Obruča a kol. (2014)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	lignocelulózy hydrolyzát	PHB	baňka, batch	10,6	40	4,2	n.a.	n.a.	Gowda a Shivakumar (2014)
<i>Bacillus spp.</i>	odpad z cukrové třtiny	P(3HB-co-3HV)	baňka, batch	2,89	8	0,2	0	n.a.	Moorkoth a kol. (2016)
rekomb. <i>Bacillus subtilis</i>	pomerančové slupky	PHB	baňka, batch	3,10	40	1,2	0,02	n.a.	Sukan a kol. (2014)



Obrázek 5 Přehled hlavních katabolických drah přeměňujících lignocelulóзовé cukry na P3HB. EMP: Embden-Meyerhof-Parnas, ED: Entner-Doudoroff, PPS: Pentose Phosphate Shunt (Dietrich a kol., 2019)

3.2.1 Využití odpadních produktů jako zdroje dusíku

Lignocelulóзовý materiál může celkem snadno posloužit jako zdroj uhlíku (Obrázek 5), ovšem z hlediska obsahu dalších makrogenerických prvků, jsou produkty hydrolyzy zcela nevhodné a je třeba tyto prvky dodávat v podobě anorganických solí, případně komplexních

kultivačních komponent, která jsou ale obvykle pro produkci PHA příliš drahá. Proto jsme se v další práci zaměřili na využití hydrolyzátu z kuřecího peří, které pro naše účely sloužilo jako cenově dostupný komplexní zdroj dusíku. Celý článek je v **Příloze IV** (Benešová a kol., Letters In Applied Microbiology, 2017, roč. 65, č. 2, s. 182-188.).

Celosvětový drůbeží průmysl ročně vygeneruje přibližně $7,7 \times 10^8$ kg peří, jehož převažující složkou (přes 90 %) jsou bílkoviny, především keratin. I přes nízké náklady a snadnou dostupnost je průmyslové použití peří omezeno a kuřecí peří je obvykle považováno za odpad (Taskin a kol., 2012). V naší práci jsme peří podrobili alkalické hydrolyze v kombinaci s mikrovlnným ohřevem. Následně byla testována možnost využít hydrolyzát z peří jako komplexní zdroj dusíku při biotechnologické produkci P3HB pomocí bakteriálního kmene *Cupriavidus necator* H16 (CCM 3726) s využitím odpadního fritovacího oleje jako jediného zdroje uhlíku. Optimalizována byla zejména koncentrace síranu amonného v minerálním médiu v kombinaci s 10 % hydrolyzátu peří a dále pak byla optimalizována koncentrace peří při přípravě hydrolyzátu. Výsledky kultivačních experimentů jsou ukázány v Tabulce 2. Obecně přítomnost hydrolyzátu peří zvýšila výtěžnost biomasy a PHA. Nejvyšších výtěžků PHA bylo dosaženo při přidavku 10 % hydrolyzátu peří, který byl připraven hydrolyzou 60 g peří na 1 l alkalického hořtoku, k minerálnímu médiu obsahujícímu 1 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. V tomto případě byly výtěžky PHA zvýšeny přibližně o 40 % ve srovnání s kontrolní kultivací. Kromě toho byly také pozorovány vysoké obsahy PHA v biomase, když byl $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zcela nahrazen hydrolyzátem. Zejména pokud byl jako jediný zdroj dusíku použit pouze hydrolyzát z 60 g/l peří, byly výtěžky PHA o 17% vyšší než v kontrolní kultivaci.

Tabulka 2 Výtěžky biomasy a PHA při použití různého obsahu hydrolyzátu peří v kombinaci s různým obsahem síranu amonného v minerálním médiu

	Hydrolyzát peří (g/l)	Biomasa (g/l)	PHA (%)	PHA (g/l)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 1 g/l	20	10,4 ± 1,0	86,2 ± 3,3	8,9 ± 0,2
	30	11,9 ± 1,3	84,4 ± 0,6	10,1 ± 0,1
	40	10,4 ± 0,9	80,1 ± 5,9	8,3 ± 0,4
	50	12,5 ± 1,5	80,3 ± 2,0	10,3 ± 0,2
	60	12,8 ± 0,9	85,1 ± 0,3	10,6 ± 0,1
	0	8,5 ± 0,9	90,7 ± 0,9	7,8 ± 0,1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0 g/l	20	5,9 ± 0,3	83,4 ± 6,2	4,9 ± 0,3
	30	6,4 ± 0,8	92,2 ± 1,5	5,9 ± 0,1
	40	8,3 ± 0,6	88,0 ± 0,3	7,3 ± 0,1
	50	7,0 ± 0,6	94,0 ± 5,4	6,6 ± 0,3
	60	9,5 ± 1,3	86,3 ± 0,9	8,2 ± 0,1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 3 g/l	0 (kontrola)	9,6 ± 0,9	71,8 ± 2,3	6,9 ± 0,2

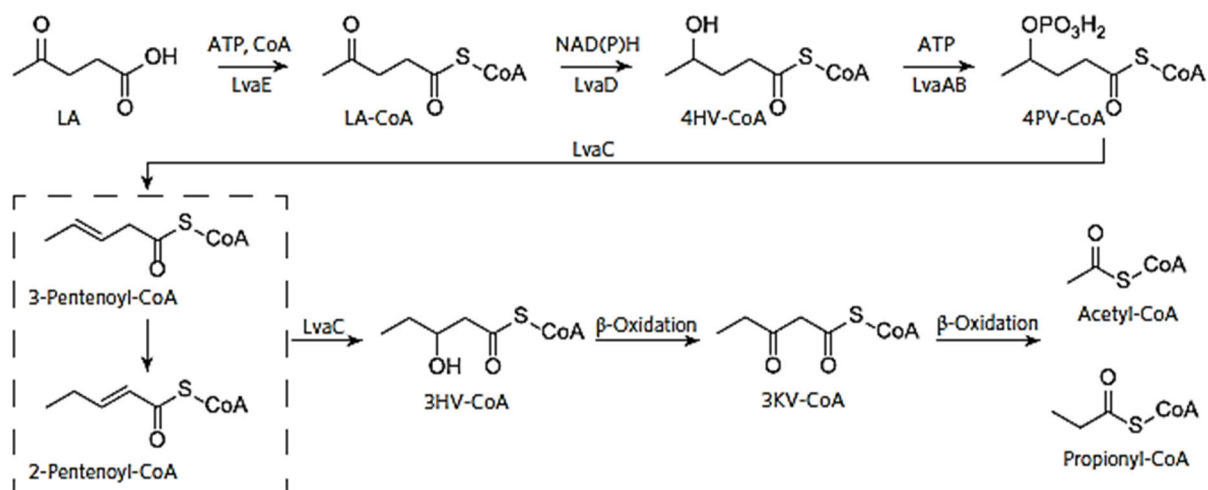
Snaha nahradit dusíkatý zdroj v produkčním médiu není nic neobvyklého a nezdědka je volen odpadní materiál bohatý na proteiny. Z tohoto hlediska se nejčastěji setkáváme se snahou o využití syrovátky, což je odpad z výroby sýrů, bohatý na laktózu a také na proteiny

(Oliveira a kol., 2018). Alternativní levné zdroje komplexního dusíku lze také hledat v zemědělství. Tým Martina Kollera (2005) přidával silážní šťávu a šťávu ze zelené trávy do kultivačního média s cílem prozkoumat její dopad na akumulaci PHA kmenem *Cupriavidus necator*. Vliv byl srovnáván s médiem suplementovaným dražšími aditivami jako jsou „corn steep liquor“ a casamino kyseliny.

Dalším potenciálním zdrojem komplexního dusíku uplatnitelného v biotechnologické výrobě může být odpad z jatek a zpracování živočišných produktů (Titz a kol., 2012). Avšak ekonomická hodnocení ukazují, že cesta využití odpadů poskytuje komplexní zdroj dusíku, který je podstatně dražší než zdroje minerálního dusíku, ale je levnější než srovnatelné jiné zdroje komplexního dusíku. Použití těchto materiálů je proto omezeno na poskytnutí nezbytných komplexních zdrojů dusíku pro fermentaci. Vzhledem k mikrobiálním požadavkům je použití anorganického dusíku stále nepostradatelné. Aplikace hydrolyzátů z odpadních zdrojů má na mikrobiální kultivaci pozitivní efekt, který se projevuje zkrácením lag fáze, ale však za výrazně vyšší náklady.

3.3 Aplikace evolučního inženýrství

Pro biosyntézu kopolymeru P(3HB-co-3HV) vyžaduje většina bakteriálních producentů PHA suplementaci vhodného prekursoru, který umožňuje tvorbu propionyl-CoA. Nejčastější to jsou soli kyseliny propionové, propanol nebo kyselina valerová a její soli. Nicméně vzhledem k tomu, že cena těchto prekursorů je vysoká, tak jejich aplikace snižuje ekonomickou kompetitivitu produkce PHA. Proto vznikla řada publikací zabývajících se využitím kyseliny levulové (4-oxopentanonové) jako levného alternativního prekursoru pro produkci P(3HB-co-3HV) z odpadních substrátů (Ashby, 2012; Keenan, 2004). Podle předpokládaného metabolismu (Obrázek 6) kyseliny levulové vzniká propionyl-CoA, jehož vstupem do biosyntetické dráhy PHA vzniká 3HV.



Obrázek 6 Předpokládaný metabolismus kyseliny levulové u *Pseudomonas putida* (Rand a kol., 2017)

Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.2, tak kyselina levulová vzniká jako nežádoucí vedlejší produkt při termické hydrolýze lignocelulózy za přítomnosti silných kyselin a společně s kyselinou octovou, felnolickými sloučeninami a furfuraly je považována za mikrobiální

inhibitor přítomný v médiích získaných z lignocelulózy. Díky jejímu snadnému vzniku však může být efektivně produkována s vysokými výtežky právě dehydratací biomasy nebo sacharidů pomocí kyselin a je proto také považována za zásadně potenciální „bio-based“ chemikálii (Morone a kol., 2015).

Použití kyseliny levulové jako prekurzoru 3HV je však velmi problematické kvůli toxicitě, která významně snižuje produktivitu celého procesu. Po zohlednění všech možných vztahů jsme se rozhodli využít přístupu EI, abychom odhalili mechanismus adaptace kmene *Cupriavidus necator* H16 ke kyselině levulové. Výsledky vlivu kyseliny levulové jako stresového faktoru byly prezentovány formou posteru na konferenci European Congress on Biotechnology a abstrakt našeho příspěvku je dodán jako **Příloha V** (Kučera a kol., New Biotech. 2018. s. 93). Poznatky byly rozšiřovány o testy, zda vybrané přístupy mohou být využity k získání kmenů adaptovaných na kyselinu levulovou, což by mělo velký význam pro produkci PHA s jejím využitím jako prekurzoru nebo pro produkci PHA ze substrátů odvozených od lignocelulózy. *C. necator* byl pro tyto experimenty zvolen nejen proto, že je považován za modelový bakteriální kmen v souvislosti s metabolismem PHA, ale také s ohledem na to, že se jedná o slibného průmyslového producenta PHA. Výsledky byly publikovány v časopisu a článek je přiložen jako **Příloha VI** (Nováčková a kol., Biochemical Engineering Journal 2019).

Aplikací EI přístupů na kmen *C. necator* jsme získali celkem 8 evolvovaných kmenů označených jako ALA01 - ALA08, které byly dále testovány na své schopnosti produkovat PHA v přítomnosti 3,5 g/l levulové kyseliny ve srovnání s původním kmenem. Kmeny *C. necator* ALA01, ALA02 a ALA03 byly klasifikovány jako první generace vyvinutých kmenů, kmen *C. necator* ALA04 představuje druhou generaci vyvinutých kmenů a *C. necator* ALA06 byl získán za přispění chemického mutagenu MMS. Z 8 evolučních kmenů 3 kmeny (ALA05, ALA07 a ALA08) při submerzním kultivaci v minerálním médiu vykazovaly jen velmi slabý růst a nebyly schopné akumulace PHA. Tyto bakteriální kultury byly proto vyloučeny z dalších experimentů a metabolické charakterizace. Naopak, jak se předpokládalo, adaptace kmenů podstatně zlepšila růstové vlastnosti v přítomnosti kyseliny levulové ve většině zbývajících kultur. Zejména zejména kmeny ALA01 a ALA02 dosáhly přibližně o 25% vyšší koncentrace buněk než kontrolní kultura divokého typu.

EI je důležitým nástrojem pro biotechnologie, jeho hlavní aplikací je zlepšení tolerance organismu ke konkrétní sledované sloučenině, ale také lze použít i ke studiu dynamiky antibiotické rezistence, která je důležitá pro klinický výzkum (Jansen a kol., 2013). V EI existují dva hlavní přístupy, vsádkové a kontinuální (chemostatové). Kritická proměnná je čas trvání experimentu, který je často velmi dlouhý, v řádu týdnů nebo měsíců. Příkladem je dlouhodobý evoluční experiment (LTEE), který začal v roce 1988 a pokračuje až do současnosti a který zahrnuje více než 60 000 generací bakterií. Experiment používá minimal salt médium s 25 µg/ml glukózy a každý den se populace převedena do čerstvého média (Lenski 2016).

Toxické sloučeniny v hydrolyzátu lignocelulózy mohou být eliminovány detoxifikačními metodami, například over-limingem. Tento proces však vyžaduje velké úsilí, vytváří odpad a může snížit koncentraci cukru. Vyvinutí mikroorganismů rezistentních vůči furanu by umožnilo tento proces vynechat. Vývoj kmene tolerantního k furfuralu a 5-HMF je obtížný, pokud se používají přímé genetické inženýrské přístupy kvůli nedostatečnému pochopení

jejich toxických molekulárních mechanismů. EI tedy představuje uskutečnitelnou strategii pro generování tolerantních kmenů, protože tato metoda umožňuje výběr neintuitivních pozitivních mutací, které se mohou vyskytovat v několika různých genech (Dragosits a Mattanovich, 2013).

3.4 Extrémofilní bakterie produkující PHA

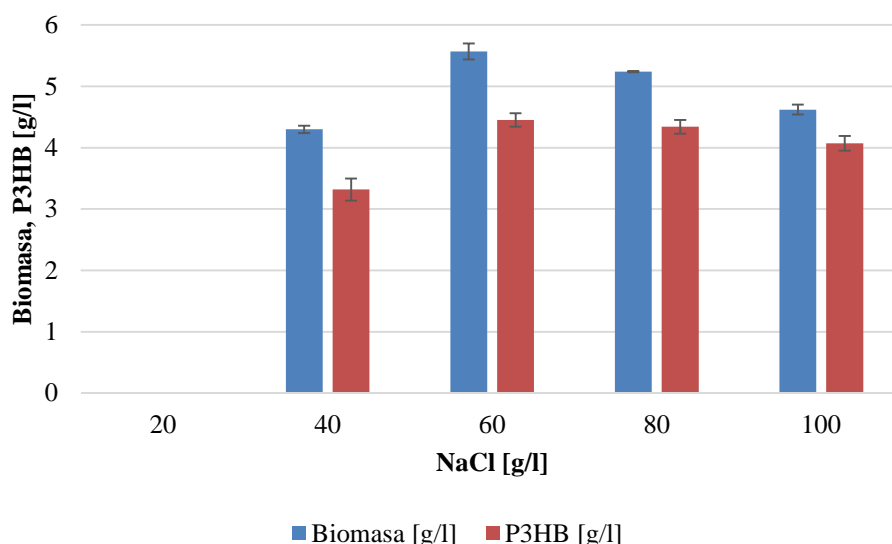
Dalším navazujícím logickým postupem bylo, zaměřit se na přirozené producenty PHA, které však dokážou snášet takové extrémní prostředí, které bývá navozeno použitím odpadních materiálů jako zdroje živin. Slibnou cestou může být implementace robustních producentů, kteří jsou buď pěstováni výhradně v ekologické nice charakterizované extrémní salinitou, teplotou, koncentrací substrátu nebo hodnotou pH prostředí nebo dokážou taková extrémní prostředí tolerovat bez vážných ztrát schopnosti růstu. Procesy založené na takových mikrobiálních producentech pak nevyžadují zásah genetického nebo evolučního inženýrství a často vykazují minimální nároky na sterilitu systému (Koller, 2015).

Vzhledem k faktu, že hydrolyzáty lignocelulózy vykazovaly, kvůli aplikaci minerální kyseliny a následné nezbytné neutralizaci vysokou iontovou sílu, tak jsme se mimo jiné zaměřili především na halofilní kmeny. Využitím PHA mikrobiálních producentů, schopných růst v prostředí s extrémním obsahem chloridu sodného, se v posledních letech začala zabývat celá řada výzkumných pracovišť po celém světě. Z tohoto hlediska bývá nejčastěji skloňována archea *Haloferax mediterranei*, která doáže růst až v koncentracích vyšších než 200 g/l NaCl. Díky schopnosti utilizace celé řady sacharidů včetně galaktózy a glukózy, nachází uplatnění při produkci PHA z hydrolyzátu syrovátky. Kromě už takto vynikajících vlastností je tato archea schopna syntetizovat kopolymer P(3HB-co-3HV) bez nutnosti přídavku prekurzorů (Pais a kol., 2016).

Po zkušenostech s tímto mikroorganismem, který jsme mimo jiné používali k i produkci extracelulárních polysacharidů (Chytilová, 2017), jsme se rozhodli vyzkoušet halofilní bakteriální kmeny, zejména jsme se zaměřili na rod *Halomonas*. Zástupci tohoto rodu jsou Gram negativní rovné nebo zakřivené tyčinkovité buňky, obvykle $0,6-0,8 \times 1,6-1,9 \mu\text{m}$. Jsou halotolerantní (také označované jako lehce až středně halofilní), schopné růst v koncentracích NaCl v rozmezí 0,1–32,5 % (Whitman a kol., 2015). U některých zástupců tohoto rodu byla schopnost produkce PHA již popsána a některé druhy jsou považovány za slibné producenty PHA (Martínez-Gutiérrez a kol., 2018). Otestovali jsme potenciál řady zástupců rodu *Halomonas* a například kmeny *Halomonas organivorans* CCM 7142T a *Halomonas salina* CCM 4361 se jeví být velice zajímavými producenty PHA (Vodička 2018; Kurzová 2018)

Porovnáním těchto kmenů ještě s kmenem *Halomonas halophila* vznikla publikace, jež je součástí **Přílohy VII** (Pernicova a kol., Materials Science Forum, 2019, roč. 955, s. 74-79). V této práci jsme mimo jiné využili multiplex PCR, pomocí které jsme zjistili, že všechny tři testované kmeny *Halomonas* (*Halomonas halophila*, *Halomonas organivorans* a *Halomonas salina*) obsahují gen *phaC*, zodpovědný za polymeraci (R)-3-hydroxybutyryl-CoA za vzniku P3HB. Tím jsme si u kmenů ověřili schopnost produkovat PHA. Následně jsme pak porovnávali schopnost utilizovat základní monosacharidy a zároveň akumulovat PHA. Dále jsme zkoumali vliv koncentrace NaCl v kultivačních médiích na produktivitu PHA, jakož i na molekulovou hmotnost a materiálové vlastnosti akumulovaného polymeru. Obrázek 7 shrnuje

výsledky. *H. organivorans* nebyl schopen růstu a biosyntézy P3HB v médiu s nízkou osmolaritou (20 g/l NaCl), ale rostl dobře v přítomnosti 40–100 g/l NaCl. Lze konstatovat, že čím vyšší osmolarita, tím vyšší obsah PHB v biomase byl dosažen; nicméně nejvyšší výtěžky PHB byly získány v koncentraci NaCl odpovídající 60 g/l, další zvýšení osmolarity mírně inhibovalo růst bakteriální kultury.



Obrázek 7 Vliv salinity prostředí na schopnost růstu kmene *Halomonas organivorans*

Rodríguez-Contreras a kol. (2016) zveřejnila studii zabývající se vlivem salinity na produkci PHA halofilní grampozitivní bakterií *Bacillus megaterium* uyuni S29. Použitím tohoto kmene byl získán nejvyšší výtěžek PHA (2,22 g/l), stejně jako procentuální obsah PHA v biomase při koncentraci NaCl 45 g/l, zatímco při nižší a vyšší koncentraci soli (5 a 100 g/l) byla produktivita PHA dramaticky nižší. Koncentrace NaCl je proto klíčovým parametrem ovlivňujícím produktivitu PHA při použití halofilních bakterií a musí být optimalizována pro každý nový produkční kmen PHA.

Z porovnání v **Příloze VII** vycházel kmen *Halomonas halophila* velmi slibně, a proto jsme se rozhodli věnovat se tomuto tématu komplexněji. Výsledky pak byly publikovány a jsou součástí **Přílohy VIII** (Kučera a kol., Bioresource Technology, 2018, roč. 256, č. 1, s. 552-556). Výhodnou vlastností *H. halophila* jako potenciálního producenta PHA je, že tato bakterie roste v levném minerálním médiu, aniž by vyžadovala nákladné, komplexní zdroje dusíku. Řada slibných halofilních producentů PHA totiž vyžaduje komplexní zdroje dusíku (Koller 2015).

Halomonas halophila, dříve *Deleya halophila*, je gramnegativní, striktně aerobní středně halofilní bakterie. Původně byla izolována poblíž Alicante v jihovýchodním Španělsku (Quesada a kol., 1984). Schopnost produkovat PHA byla u *H. halophila* nebyla až do naší publikace nikde publikována. Cílem této práce proto bylo prozkoumat biosyntézu PHA u této zajímavé halofilní bakterie a zhodnotit její potenciál pro biotechnologickou produkci PHA z různých levných substrátů.

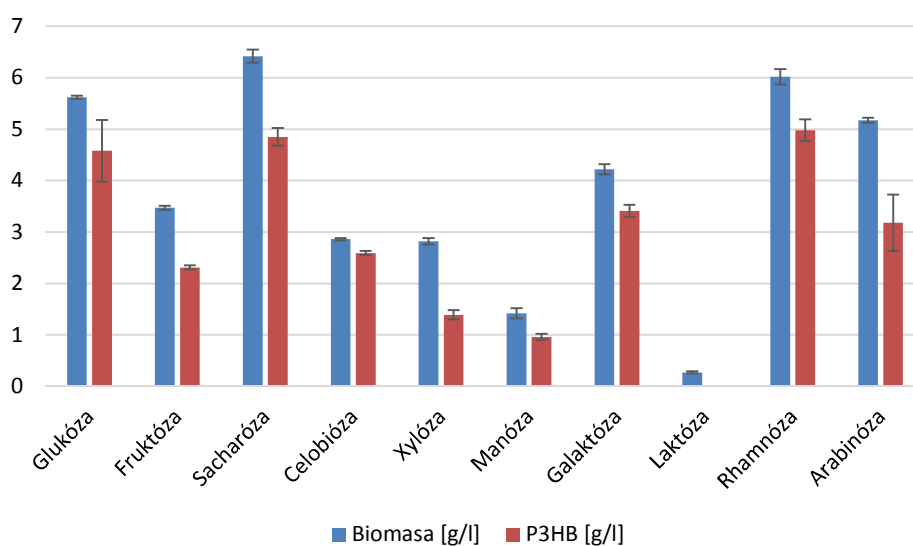
Podobně jako v předchozí publikaci, byl i u kmene *H. halophila* zkoumán vliv salinity prostředí na produkci PHA (Tabulka 3). V tomto případě jsme se však zaměřili i na

molekulovou váhu (Mw) polymeru a jeho distribuce. Při nízké koncentraci NaCl se vytvoří PHB s nižší hmotností, ale velmi úzkou distribucí Mw, se zvýšeným osmotickým tlakem v kultivačním médiu se zvyšuje také Mw, ale také PDI. Proto lze salinitu definovat jako parametr mechanické vlastnosti polymeru produkovaného kmenem *H. halophila*.

Tabulka 3 Vliv salinity prostředí na schopnost růstu kmene *Halomonas halophila*

NaCl (g/l)	biomasa (g/l)	PHB (hm.%)	PHB (g/l)	Mw (kDa)	PDI (-)
20	4,27 ± 0,01	47,57 ± 2,76	2,03 ± 0,12	473 ± 26	1,02
40	5,16 ± 0,11	51,96 ± 3,00	2,68 ± 0,17	722 ± 56	1,10
60	5,11 ± 0,11	72,01 ± 2,78	3,68 ± 0,16	793 ± 27	1,29
80	4,66 ± 0,12	58,34 ± 6,58	2,72 ± 0,31	797 ± 25	1,82
100	3,25 ± 0,36	45,43 ± 0,50	1,48 ± 0,16	810 ± 20	2,87

Kromě jiného jsme se v článku zaměřili na schopnost *H. halophila* přeměnit různé sacharidy na P3HB. S výjimkou laktózy byla bakteriální kultura schopna využít všechny testované sacharidy. Překvapivě nejvyšší výtěžky P3HB byly získány na rhamnose, následované sacharózou a glukózou, ale bakteriální kultura byla také schopna akumulovat PHA na jiných sacharidech, jako je cellobiosa, xylóza, manóza nebo galaktóza (viz Obrázek 8). Zjištění, že *H. halophila* je schopna využít široké spektrum sacharidů je důležité, protože to ukazuje, že kmen může být použit pro produkci PHA z řady levných substrátů, jako jsou lignocelulóza nebo melasa, potenciálně je schopna využít i odpadních substrátů bohatých na laktózu (např. syrovátka), nicméně laktóza musí být před samotnou kultivací enzymaticky nebo chemicky rozštěpena na galaktózu a glukózu.



Obrázek 8 Koncentrace biomasy a P3HB produkovaná *H. halophila* na různých čistých sacharidech po 72 h kultivaci v Erlenmeyerových baňkách.

S ohledem na účelné spektrum sacharidů využitelných *H. halophila*, byl kmen testován na produkci PHA na několika vybraných odpadních substrátech (Tabulka 4). Zpočátku byla kultivace prováděna na syrové syrovátce. Vzhledem k tomu, *H. halophila* nebyl schopen přímo využít laktózu, ale jen její monomery glukózu a galaktózu tak byla provedena hydrolyza pomocí HCl. Dalším testovaným zdrojem byla melasa, v tomto případě nebyla před kultivací nutná žádná hydrolyza, protože testovaný bakteriální kmen je schopný přímého využití sacharózy jako hlavní složky melasy. *H. halophila* byl také testován na hydrolyzáttech lignocelulózových materiálů, a to kávové sedliny (SCGH), pilin z měkkého dřeva (SWDH), kukuřičných stonků (CSH).

Tabulka 4 Koncentrace biomasy a P3HB produkovaná *H. halophila* na různých levných odpadních substrátech po 72 h kultivaci v Erlenmeyerových baňkách.

Levné odpadní substráty	Biomasa [g/l]	P3HB [hm. %]	P3HB [g/l]
Hydrolyzát syrovátky	8.50 ± 0.17	38.32 ± 2.21	3.26 ± 0.27
Melasa	4.05 ± 0.06	64.06 ± 1.13	2.57 ± 0.14
SCGH	3.51 ± 0.15	61.95 ± 1.34	2.17 ± 0.05
SCGH, 2x zředěno	1.80 ± 0.13	15.27 ± 0.90	0.27 ± 0.02
SWDH	2.14 ± 0.19	46.85 ± 4.29	1.00 ± 0.13
SWDH, 2x zředěno	1.35 ± 0.04	11.27 ± 0.23	0.15 ± 0.01
CSH	nedetekováno	nedetekováno	nedetekováno
CSH, 2x zředěno	2.12 ± 0.1	38.67 ± 0.65	0.82 ± 0.01

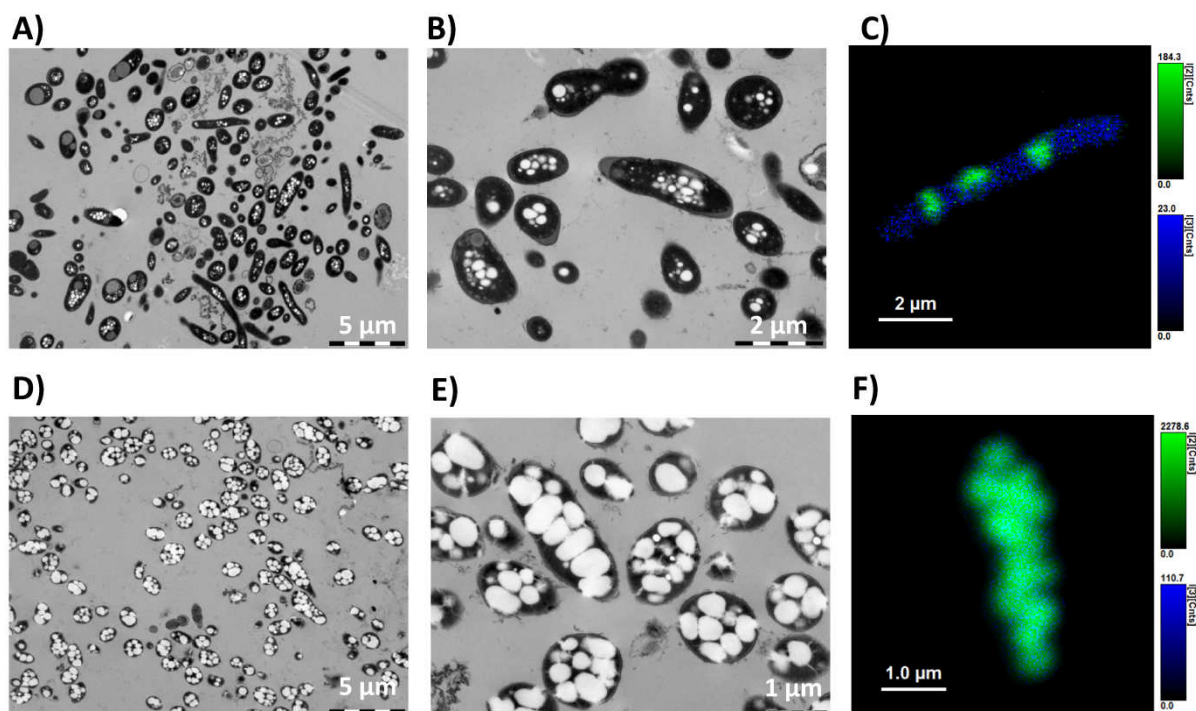
H. halophila se jeví jako robustní bakteriální kmen s pozitivními vyhlídkami pro potenciální průmyslovou aplikaci. Pravděpodobně v důsledku přítomnosti podstatné části pentózových cukrů, jejichž přeměna na PHA je metabolicky problematická a méně účinná ve srovnání s hexózy (Lopes a kol. 2009), jsou výtěžky PHA získané na SWDH a CSH nižší než výtěžky získané u hydrolyzáta kávové sedliny, který je bohatší na hexózy. Koncentrace sacharidů stanovené metodou HPLC u jednotlivých hydrolyzáta před (poč.) začátkem a po skončení (kon.) kultivace jsou zobrazeny v Tabulce 5.

Tabulka 5 Stanovené koncentrace sacharidů a inhibitorů u hydrolyzáta lignocelulózy.

	glukóza [g/l]		xylóza [g/l]		arabinóza [g/l]		galaktóza + manóza [g/l]	
	poč.	kon.	poč.	kon.	poč.	kon.	poč.	kon.
SCGH	1,48	0,98	0	0	1,70	0,60	15,98	8,78
SCGH, 2x zředěno	0,74	0,69	0	0	0,85	0	7,99	2,08
SWDH	1,74	1,73	6,61	1,78	0,88	0	0	0
SWDH, 2x zředěno	0,86	0	3,30	0	0,44	0	0	0
CSH, 2x zředěno	3,23	0	5,22	0	0,72	0	0	0

Publikace byla také rozšířena o snímky získané pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) a fluorescence-lifetime imaging mikroskopie (FLIM) (Obrázek 9). Obě tyto techniky umožnili vizualizovat granule PHA v buňkách. Kultura kultivovaná v médiu

bohatém na dusík obsahovala značně menší granule PHA oproti kultuře pěstované v prostředí s omezeným množstvím dusíku.



Obrázek 9 Mikrofotografie *H. halophila* kultivované na komplexním nutričně bohatém médiu (A, B – TEM, C – FLIM) a minerálním médiu s limitovaným obsahem dusíku (D, E – TEM, F - FLIM). Na obrázcích FLIM odpovídá zelená barva granulím PHB obarveným BODIPY 493/503 a modrá ukazuje zelenou autofluorescenci zbytku bakteriálních buněk.

Z důvodu slibných výsledků na SCGH v předchozí publikaci, jsme náš další zájem směřovali na valorizaci kávové sedliny (SCG) a výsledkem byla další publikace, která je součástí **Přílohy IX** (Kovalčík a kol., Journal of Environmental Chemical Engineering, 2018, roč. 6, č. 2, s. 3495-3501).

V této práci byla SCG předupravena před samotnou kyselou hydrolýzou různými metodami. Cílem bylo porovnat vliv těchto metod na složení získaných hydolyzátů, na produktivitu PHA a jeho materiálové vlastnosti. Z kávové sedliny byl před aplikací hydrolýzy odstraněn tuk extrakcí podle Soxhleta za použití směsi n-hexanu a isopropyl alkoholu (50:50). Další aplikovanou metodou byla pro přípravu předupraveného SCG bylo odstranění lipidů a následně extrakce polyfenolů pomocí ethanolu v Soxhletově extraktoru. Všechny získané hydolyzáty byly podrobeny HPLC analýze a výsledky jsou znázorněny v Tabulce 6. Zároveň postup kyselé hydrolýzy se značně odlišoval od postupu v **Příloze VIII** a proto nemohou být výsledky přímo srovnávány s předchozí publikací.

Nejnižší koncentrace celkových cukrů byla stanovena v hydrolyzátu z nepředupravené kávové sedliny. Extrakce oleje z SCG zvýšila obsah celkového cukru v SCGH přibližně o 20 %. V posledním SCGH s extrahovaným olejem a fenoly byl srovnatelný s nepředupraveným. Důvodem pro snížení obsahu cukru mohlo být částečné odstranění hemicelulóz během extrakce fenolů. Fenomén existence komplexů lignin-sacharidy ve dřevěných a rostlinných tkáních byl již dříve popsán (Koshijima a Watanabe, 2013).

Tabulka 6 Základní složení získaných hydrolyzátů. SCGH#1 je nepředupravené, SCGH#2 je z odtučněného SCG a SCGH#3 je z odtučněného SCG po extrakci fenolů

	SCGH#1	SCGH#2	SCGH#3
Celkové cukry [g/l]	64.4 ± 1.5	77.8 ± 1.1	65.8 ± 1.2
Kyselina octová [g/l]	0.42 ± 0.03	0.50 ± 0.03	0.32 ± 0.02
5-Hydroxymethyl furfural [g/l]	0.13 ± 0.003	0.17 ± 0.002	0.12 ± 0.002
Furfural [g/l]	0.02 ± 0.001	0.05 ± 0.001	0.06 ± 0.001
Celkové fenolické látky [g/l]	2.20 ± 0.13	2.89 ± 0.2	1.30 ± 0.04

Koncentrace inhibičních látek vzniklých degradací sacharidů (kyselina octová, 5-hydroxymethyl furfural a furfural) jsou uvedeny v tabulce 6. Stanovené hodnoty se liší podle použité metodiky produkce SCGH a korelují s nárůstem obsahu celkových cukrů. Nízké stanovené koncentrace furfuralu a 5-hydroxymethylfurfuralu ukazují, že podmínky hydrolýzy byly nastaveny správně, což zabránilo nežádoucí ztrátě cukrů a tvorbě těchto toxických sloučenin.

Za účelem produkovat PHA kmenem *H. halophila*, byly všechny hydrolyzáty zředěny na koncentraci 20 g/l celkových cukrů. Nicméně, SCG hydrolyzáty byly příliš toxické a zcela inhibovaly růst *H. halophila*. Proto byly všechny SCG hydrolyzáty detoxikovány adsorpcí na nepolárních pryskyřicích na bázi styren-divinylbenzenu (Amberlite XAD4). Výtěžky P3HB jsou v Tabulce 7. Nejvyšší produkce biomasy a P3HB byla získána použitím SCGH#2. Z hlediska koncepce biorafinérie však metoda získání SCGH#2 i SCGH#3 zajímavá pro dosažení ekonomické efektivity a udržitelného využívání kávové sedliny. Olej získaný z SCG před hydrolýzou lze použít v mnoha aplikacích s vysokou přidanou hodnotou. Například lze použít jako zdroj pro výrobu bionafty (Yordanov a kol. 2013), substrátu pro biotechnologickou výrobu PHA (Obruca a kol., 2014), nebo může být použit v kosmetice jako účinná látka v nové kosmetické formulaci se zlepšeným kožním mazem a hydratační vlastnosti (Ribeiro a kol., 2013).

Tabulka 7 Produkce P3HB a molekulová hmotnost produkovaného P3HB

	Biomasa [g/l]	P3HB [hm. %]	P3HB [g/l]	Mw (kDa)	PDI (-)
SCGH #1	2.14 ± 0.1	13.3 ± 0.5	0.28 ± 0.08	825 ± 8	1.26 ± 0.12
SCGH #2	3.52 ± 0.3	27.0 ± 1.2	0.95 ± 0.09	815 ± 12	1.09 ± 0.02
SCGH #3	2.18 ± 0.1	15.9 ± 0.5	0.35 ± 0.07	440 ± 2	1.44 ± 0.03

3.5 Biotechnologická produkce terpolymeru poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát)

Dále jsme upřeli pozornost na možnost ovlivnit složení výsledného polymeru, tak aby se svými materiálovými vlastnostmi lišil od P3HB, které má vysokou krystalinitu a nízké délkové prodloužení při protažení, což limituje jeho aplikační potenciál. Dalším nepříznivým parametrem je pak vysoká teplota tání, což komplikuje následné zpracování polymeru. Změna monomerního složení v PHA, například inkorporací 3HV nebo 4HB, má na tyto parametry zásadní vliv. Proto jsme se rozhodli, že zkusíme biotechnologicky produkovat terpolymer poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) (P(3HB-co-4HB-co-3HV)). Z bakteriálních kmenů, které jsou schopny akumulovat PHA s obsahem 4HB monomerů a které jsou dostupné ve sbírkách mikroorganismů, byl vybrán *Cupriavidus malaysiensis* DSMZ 19379, který je v literatuře často zmiňován (Ramachandran a kol, 2011). Výsledky této práce jsou obsaženy v manuskriptu, který je součástí této práce jako **Příloha X** (Kučera a kol., Bioengineering, 2019, roč. 6, s. 74).

Cupriavidus malaysiensis DSM 19379 při růstu v přítomnosti gama-butyrolaktonu (GBL), ϵ -kapolaktonu, 1,4-butandiolu a 1,6-hexandiolu dokázal syntetizovat polymer sestávajícího z monomerů 3HB a 4HB. Pro začlenění 3HV podjednotky do struktury polymeru byly použity jednostupňové a dvoustupňové strategie výroby terpolymeru. V jednostupňovém kultivačním režimu sloužil GBL nebo 1,4-butandiol jako primární substrát a zároveň prekurzor 4HB a kyselina propionová a valerová jako prekurzor 3HV.

Pro zvýšení produktivity PHA jsme provedli další experiment, ve kterém byla kultivace provedena ve dvou krocích. V prvním kroku jsme se zaměřili na kultivaci s maximálním výtěžkem biomasy za použití glycerolu (20 g/l) jako levného zdroje uhlíku. Podle našich výsledků glycerol stimuluje růst bakterie, ale nepřevádí se na P(3HB), což by se dalo považovat za výhodu, protože produkce terpolymeru s nízkou frakcí 3HB by mohla být dosažena ve druhém kroku. Kromě toho byl glycerol (12 g/l) také smíchán s 1,4-butandiolem (8 g/l) v paralelní sérii kultivací. Druhá fáze byla prováděna v kultivačním médiu s 1,4-butandiolem, kyselinou valerovou a limitovaným obsahem dusíku. 1,4-butandiol a kyselina valerová byly použity jako prekurzory 4HB a 3HV. Kyselina valerová byla vybrána jako prekurzor 3HV, protože byla identifikována jako nejlepší prekurzor 3HV pro zkoumanou kulturu. Všechny výsledky jsou uvedeny v Tabulce 8.

Z níže uvedených výsledků tohoto experimentu je patrné, že bakteriální kmen rostl nejlépe, když byl v prvním kroku použit glycerol v kombinaci s 1,4-butandiolem a ve druhém 1,4-butandiol s valerovou kyselinou. Zisk biomasy byl 5,94 g/l. Naopak nejmenší růst byl dosažen kultivací za použití glycerolu a následně 1,4-butandiolu, kde bylo získáno pouze 1,60 g/l biomasy.

Tabulka 8 Dvoustupňová produkce terpolymeru - 48 hodin v glycerolu nebo glycerolu a 1,4 butandiolu, poté převedena na médium s limitovaným obsahem dusíku s prekurzorem 3HV.

Primární substrát	Sekundární prekurzor	Biomasa (g/l)	PHA (g/l)	PHA (hm%)	3HB (mol%)	4HB (mol%)	3HV (mol%)
Glycerol	1,4-BD	1.60 ± 0.03	0.84 ± 0.02	52.3 ± 0.1	80.9 ± 0.7	18.1 ± 0.3	1.1 ± 0.4
	1,4-BD + k. valerová	2.73 ± 0.58	1.42 ± 0.25	52.1 ± 1.8	53.78 ± 0.6	16.8 ± 0.9	29.5 ± 0.3
Glycerol + 1,4-BD	1,4-BD	3.26 ± 0.11	2.09 ± 0.01	64.1 ± 2.4	77.9 ± 0.5	21.6 ± 0.5	0.5 ± 0.1
	1,4-BD + k. valerová	5.94 ± 0.14	4.14 ± 0.05	69.6 ± 0.7	65.7 ± 1.0	16.5 ± 1.3	17.9 ± 0.3

Z výsledků vyplývá, že *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379 může účinně syntetizovat požadovaný terpolymer P(3HB-co-3HV-co-4HB). Při využití dvoustupňové kultivační strategie byl obsah PHA v bakteriálních buňkách podstatně vyšší. Nejvyšší hmotnostní frakce, 69,64 hm%, jakož i nejvyššího zisku PHA 4,14 g/l, bylo dosaženo, při použití glycerolu společně s 1,4-butandiolem v prvním kroku a 1,4-butandiol s kyselinou valerovou ve druhém. Pokud jde o složení polymeru, dobrých výsledků bylo dosaženo, když byl 1,4-butandiol použit v kombinaci s kyselinou valerovou ve druhém kroku. Když byl v prvním kroku použit pouze glycerol, získali jsme terpolymer složený z 53,78 mol% 3HB, 16,76 mol% 4HB a 29,46 mol% 3HV. Za použití glycerolu společně s 1,4-butandiolem v prvním kroku byl následně získán terpolymer složený z 3HB 65,68 mol%, 4HB 16,46 mol%, 3HV 17,86 mol%. Zdá se, že kombinace glycerolu a 1,4-butandiolu v prvním kroku kultivace a 1,4-butandiolu a kyseliny valerové ve druhém stupni kultivace je velmi slibná strategie, která vede k vysokému obsahu PHA v buňkách a také k vysokým podílům 4HB a 3HV v terpolymerní struktuře.

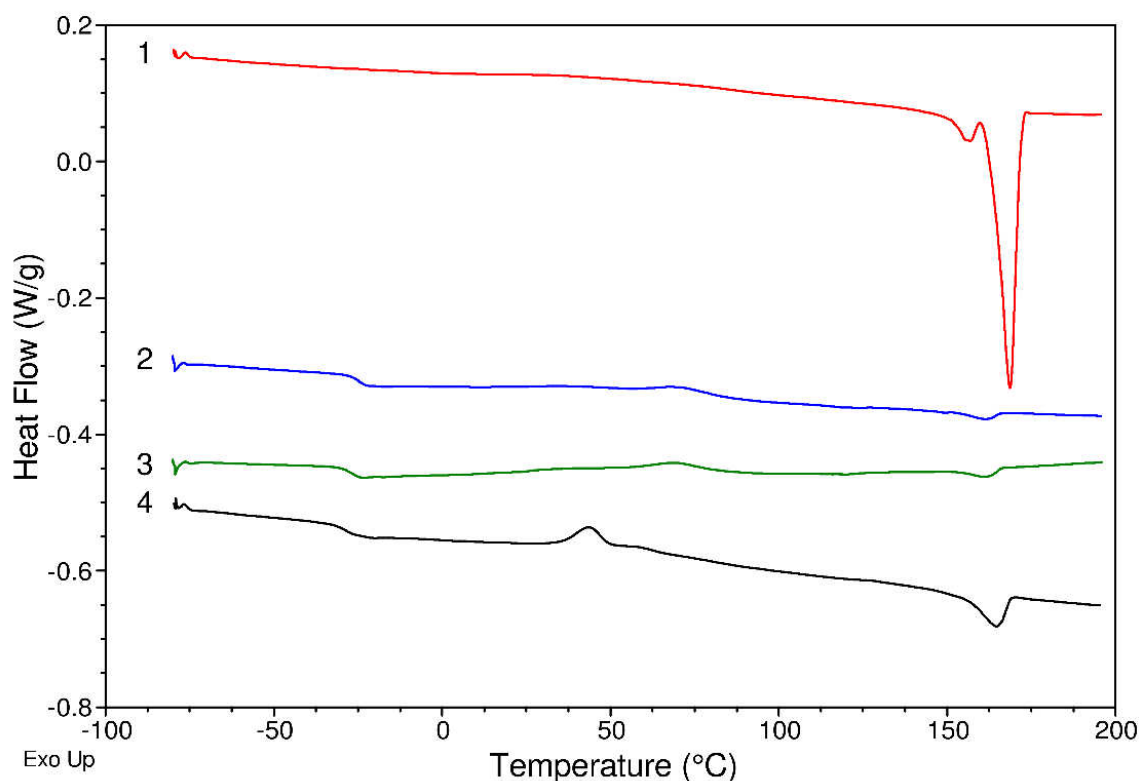
Vybrané získané polymery byly izolovány a charakterizovány z hlediska materiálových vlastností. Ke studiu tepelných vlastností polymerů byly vybrány techniky diferenciální skenovací kalorimetrie a termogravimetrie; K určení molekulové hmotnosti a indexu polydispersity polymerů pak byla použita vylučovací chromatografie. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 9. Vzorek č. 1 je kontrolní polymer obsahující téměř výhradně monomerní jednotky 3HB. Vzorek č. 2 byl odebrán kultivací za použití kombinace 1,4-butandiolu a kyseliny valerové, přičemž podíl 3-hydroxyvalerátu v tomto vzorku byl 14,7 mol%. Vzorek č. 3 byl získán kultivací za použití 1,4-butandiolu a propionátu sodného a koncentrace 3HV byla 8,3 mol%. Poslední vzorek byl izolován z buněčné suspenze kultivované za účelem produkce terpolymeru, za použití glycerolu a následně 1,4-butandiolu společně s kyselinou valerovou. V tomto vzorku byl molární poměr 3HV vůbec nejvyšší, konkrétně 29,4 mol%. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 9.

Z termogramů zaznamenaných diferenční skenovací kalorimetrií jsme stanovili teplotu skelného přechodu (T_g) a teplotu tání (T_m). Celkové teplo fúze ΔH bylo také stanoveno integrací endotermy tání. Pomocí termogravimetrie byla stanovena teplota počátku degradace ($T_{d_{onset}}$) a teplota, která odpovídá maximální rychlosti rozkladu vzorku ($T_{d_{max}}$).

Tabulka 9 Vlastnosti vybraných polymerů

Vzorek	3HB (mol%)	4HB (mol%)	3HV (mol%)	Mw (kDa)	PDI (-)	Tg (°C)	Tm (°C)	ΔH (J/g)	Td _{onset} (°C)	Td _{max} (°C)
1	99,3	0,7	0	156,0	1,04	-	155,8 168,7	4,7 64,9	271,9	287,9
2	60,6	24,7	14,7	258,7	1,02	24,8	161,3	2,8	271,5	293,5
3	63,8	27,9	8,3	314,6	1,01	26,2	161,7	3,0	275,2	300,8
4	53,8	16,8	29,4	137,9	1,17	29,0	164,6	12,7	271,4	295,5

Porovnání termogramů DSC čtyř izolovaných polymerů je znázorněno na Obrázek 10. Ve vzorku č. 1 je endoterma s ostrou teplotou tání, která se objevuje při asi 170 °C, což je typické pro P3HB. Plocha píku odpovídá teplu uvolněnému v tomto procesu. Velká oblast endotermy tání naznačuje, že jde o polymer s vysokým stupněm krystalinity. Vzorek je dále charakterizován dvojitým vrcholem v bodu tání, což ukazuje, že polymerní krystaly jsou přítomny ve dvou formách se zřetelnou tepelnou stabilitou. Na druhou stranu u všech vzorků terpolymeru (vzorky 2–4) je na první pohled vidět, že na křivkách je vidět mnohem méně intenzivní pík tání. Zdánlivý skelný přechod a studená krystalizace polymerních řetězců dohromady značně naznačují významně sníženou tendenci ke spontánní krystalizaci. Jinými slovy, zapojení dalšího monomeru do kopolymerní struktury vedlo k amorfní struktuře. Začlenění 3HV do polymerní struktury také způsobilo snížení teploty tání na přibližně 161 °C.



Obrázek 10 Výsledky DSC analýzy izolovaných polymerů jejichž materiálové vlastnosti jsou zobrazeny v Tabulce 9. Vzorek č. 1 je kontrolní polymer obsahující téměř výhradně monomerní jednotky 3HB. Vzorky 2-4 jsou terpolymery s různými pomery monomerů (Kučera a kol., 2019).

4 ZÁVĚR

Předložená dizertační práce se zabývá především využitím lignocelulózových materiálů k produkci polyhydroxyalkanoátů, ale záběr práce má daleko širší rozsah. Kromě možností kvantifikace PHA se práce zabývá i studiem aplikace evolučního inženýrství za účelem získat nové kmeny se schopností lépe odolávat nepříznivým vlivům vzniklých při hydrolýze lignocelulózy. Další část práce pak byla věnována přirozeným kmenům, které jsou schopny růstu pouze v extrémním prostředí a zároveň jsou schopny produkce PHA. Výsledky jsou prezentovány formou dizkuzie 10 publikovaných prací.

- Průtokovou cytometrii lze využít nejenom k určení přítomnosti PHA ve struktuře bakteriálních buněk, ale také pro kvantifikaci. Metoda spočívající ve fixaci buněk a následném obarvení niiskou červení však nedosahovala vysoké korelace a je vhodnější pro orientační posouzení obsahu PHA. V porovnání s Ramanovskou spektroskopií však tato metoda umožňuje analýzu buněk na úrovni jedné buňky, což umožňuje studovat distribuci PHA v jednotlivých populacích.
- Ramanova spektroskopie se ukázala jako snadno aplikovatelná technika umožňující kvalitativní a kvantitativní analýzu PHA. Metoda využívající pík DNA (787 cm^{-1}) nebo pík Amid I (1662 cm^{-1}) jako vnitřní standard dosahovala u bakteriálního kmene *Cupriavidus necator* H16 vysoké korelace. Tato technika je aplikovatelná pro *in-situ* monitoring P3HB produkce v reálném čase. Ramanova spektroskopie představuje řadu benefitů oproti současně využívaným metodám kvantifikace, jako je plynová chromatografie, především díky rychlosti a neinvazivitě.
- Hydrolyzát směsi měkkého dřeva získaný kyselou hydrolýzou není možno využít pro produkci PHA bez předcházející aplikace detoxifikační metody, protože při hydrolýze vzniká značné množství inhibičních látek jako jsou kyselina octová, HMF, furfural nebo polyfenoly.
- Detoxifikace hydrolyzátu dřeva aktivním uhlím a metodou „overliming“ vedla k odstranění značné části polyfenolických látek. Výrazně lepších výsledků dosahovala metoda využívající aktivní uhlí, která eliminovala více než 90 % polyfenolů. Detoxifikované hydrolyzáty byly použity pro produkci P3HB s využitím bakteriálních kmenů *Burkholderia cepacia* a *B. sacchari* a i z tohoto hlediska hydrolyzát po aplikaci aktivního uhlí dosahoval nejvyšší výsledky. Proto jeho účinnost byla porovnána s lignitem.
- Lignit lze použít jako sorbent k detoxifikaci hydrolyzátu dřeva a jeho účinnost je srovnatelná s běžně používaným aktivním uhlím. Tato detoxikační metoda byla hodnocena přímo při použití hydrolyzáatů dřeva pro produkci PHA pomocí bakteriálních kmenů *Burkholderia cepacia* a *B. sacchari*. Výsledky ukázaly, že použití hnědého uhlí výrazně zlepšilo fermentovatelnost hydrolyzáatů dřeva a zvýšilo výtěžky PHA.

- Alkalicky hydrolyzované kuřecí peří bylo testováno pro produkci PHA pomocí kmene *C. necator* jako komplexní zdroj dusíku. Jako substrát byl použit odpadní fritovací olej. Kombinací 1 g/l síranu amonného s přídatkem 10 obj. % hydrolyzátu peří došlo k nejvyššímu výtěžku biomasy a PHA. Dále byl zkoumán vliv peří na inkorporaci monomeru 3HV do PHA. Jako prekurzor 3HV byla použita kyselina valerová, propanol a propionát sodný. Vliv hydrolyzátu byl pozitivní, a to především v případě propionátu.
- Metodou evolučního inženýrství bylo z původního divokého kmene *C. necator* H16 získáno pět kmenů adaptovaných na kyselinu levulovou. Všechny získané kmeny vykazovaly lepší růst v přítomnosti inhibitoru LA, než bylo pozorováno u původního kmene, což byl jeden z hlavních parametrů potvrzujících úspěšný adaptační proces. Analýza PHA v biomase navíc ukázala vyšší obsah PHA v biomase a pro některé kmeny také vyšší obsah 3HV v kopolymeru P(3HB-co-3HV). Kmen *C. necator* ALA04 opakovaně uváděl nejvyšší hodnotu PHA a také obsah 3HV s více než 20 mol. %.
- *Halomonas halophila* dokáže využít širokou paletu sacharidů, což dává kmeni vysoký potenciál v utištění odpadních agro-industriálních substrátů. To také bylo testováno na hydrolyzované syrovátce, melase a hydrolyzátech vybraných lignocelulózových odpadů – kávová sedlina, dřevěné piliny, kukuřičná sláma. Kmen nedokázal z jednoduchých sacharidů využít laktózu, ale i přesto bylo možné produkovat PHA ze syrovátky, tím že jsme přiřadili krok kyselého hydrolyzy. Poté syrovátka vycházela ze všech testovaných odpadů nejlépe, zatímco s hydrolyzáty lignocelulózy měl kmen problémy. K nejlepší utištění docházelo v případě kávové sedliny.
- *H. halophila* v závislosti na salinitě prostředí vykazovala značně rozdílnou produktivitu PHA a také mechanické a termální vlastnosti produkovaného PHA se lišily. Produktivita PHA dosahovala maximálních hodnot v prostředí o koncentraci 60 g/l NaCl, při které byl i nejvyšší procentuální obsah PHA v biomase. Molekulová hmotnost získaného polymeru rostla i s narůstající salinitou prostředí až do koncentrace 60 g/l, přičemž při hodnotách 80 a 100 g/l se zásadně nelišila, ale došlo k nárůstu polydispersity. Nejvyšší termální stabilita byla zaznamenána u PHA produkovaného ve 20 g/l NaCl. Teplota tání polymeru byla u všech koncentrací stanovena okolo 180 °C.
- Vyvinuli jsme dvoustupňovou kultivační strategii, která je založena na aplikaci glycerolu a 1,4-butandiolu jako uhlíkových substrátů v první fázi kultivace, a poté se buňky přenesou do kultivačního média s limitovaným obsahem dusíku a 1,4-butandiol s kyselinou valerovou slouží jako substrát. Tato kultivační strategie poskytuje vysoký výtěžek PHA a obsah PHA v bakteriálních buňkách, což je velmi pozitivní. Kromě toho se získá terpolymer P(3HB-co-3HV-co-4HB) s nízkou frakcí 3HB a vysokým obsahem 3HV a 4HB s velmi zajímavými materiálovými vlastnostmi.

5 LITERATURA

- Ando, S., Arai, I., Kiyoto, K., Hanai, S., 1986. Identification of aromatic monomers in steam-exploded poplar and their influences on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation Technology* 64, 567-570.
- Ashby, R.D., Solaiman, D.K.Y., Strahan, G.D., Zhu, C., Tappel, R.C., Nomura, C.T., 2012. Glycerine and levulinic acid: Renewable co-substrates for the fermentative synthesis of short-chain poly(hydroxyalkanoate) biopolymers. *Bioresource Technology* 118, 272-280.
- Ask, M., Bettiga, M., Mapelli, V., Olsson, L., 2013. The influence of HMF and furfural on redox-balance and energy-state of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels* 6, 22-.
- Banerjee, S., Mudliar, S., Sen, R., Giri, B., Satpute, D., Chakrabarti, T., Pandey, R.A., 2010. Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 4, 77-93.
- Braunegg, G., Sonnleitner, B., Lafferty, R.M., 1978. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 6, 29-37.
- Brandl, H., Knee, E.J., Fuller, R.C., Gross, R.A., Lenz, R.W., 1989. Ability of the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum* to produce various poly (β -hydroxyalkanoates): Potential sources for biodegradable polyesters. *International Journal of Biological Macromolecules* 11, 49-55.
- Cannella, D., Sveding, P.V., Jørgensen, H., 2014. PEI detoxification of pretreated spruce for high solids ethanol fermentation. *Applied Energy* 132, 394-403.
- Ciesielski, S., Górnjak, D., Możejko, J., Świątecki, A., Grzesiak, J., Zdanowski, M., 2014. The Diversity of Bacteria Isolated from Antarctic Freshwater Reservoirs Possessing the Ability to Produce Polyhydroxyalkanoates. *Current Microbiology* 69, 594-603.
- Cruz, M.V., Paiva, A., Lisboa, P., Freitas, F., Alves, V.D., Simões, P., Barreiros, S., Reis, M.A.M., 2014. Production of polyhydroxyalkanoates from spent coffee grounds oil obtained by supercritical fluid extraction technology. *Biores. Technol.* 157, 360-363.
- Dawes, E.A., Senior, P.J., 1973. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. *Advances in Microbial Physiology* 10, 135-266.
- Dietrich, K., Dumont, M.-J., Del Rio, L.F., Orsat, V., 2019. Sustainable PHA production in integrated lignocellulose biorefineries. *New Biotechnology* 49, 161-168.
- Digman, M.F., Shinnars, K.J., Casler, M.D., Dien, B.S., Hatfield, R.D., Jung, H.-J.G., Muck, R.E., Weimer, P.J., 2010. Optimizing on-farm pretreatment of perennial grasses for fuel ethanol production. *Bioresource Technology* 101, 5305-5314.
- Dragosits, M., Mattanovich, D., 2013. Adaptive laboratory evolution – principles and applications for biotechnology. *Microbial Cell Factories* 12. doi:10.1186/1475-2859-12-64
- Du, B., Sharma, L.N., Becker, C., Chen, S.-F., Mowery, R.A., van Walsum, G.P., Chambliss, C.K., 2010. Effect of varying feedstock-pretreatment chemistry combinations on the formation and accumulation of potentially inhibitory degradation products in biomass hydrolysates. *Biotechnology and Bioengineering* 107, 430-440. doi:10.1002/bit.22829

- Emeruwa, A.C., Hawirko, R.Z., 1973. Poly- β -Hydroxybutyrate Metabolism During Growth and Sporulation of *Clostridium botulinum*. *Journal of Bacteriology* 116, 989-993.
- Flickinger, M.C., Drew, S.W., 1999. *Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation*. J. Wiley, New York.
- Flores, A.D., Kurgan, G.L., Wang, X., 2017. Engineering Bacterial Sugar Catabolism and Tolerance Toward Lignocellulose Conversion, in: *Engineering Of Microorganisms For The Production Of Chemicals And Biofuels From Renewable Resources*. Springer International Publishing, Cham, pp. 147-180. doi:10.1007/978-3-319-51729-2_6
- De Gelder, J., Willemsse-Erix, D., Scholtes, M.J., Sanchez, J.I., Maquelin, K., Vandenabeele, P., De Boever, P., Puppels, G.J., Moens, L., De Vos, P., 2008. Monitoring Poly(3-hydroxybutyrate) Production in *Cupriavidus necator* DSM 428 (H16) with Raman Spectroscopy. *Analytical Chemistry* 80, 2155-2160. doi:10.1021/ac702185d
- Gibson, L.J., 2012. The hierarchical structure and mechanics of plant materials. *Journal of The Royal Society Interface* 9, 2749-2766. doi:10.1098/rsif.2012.0341
- Hames, B.R., 2009. Biomass Compositional Analysis for Energy Applications, in: *Biofuels: Methods And Protocols*. Springer, New York, p. 145. doi:10.1007/978-1-60761-214-8_11
- Himmel, M.E., Adney, W.S., Baker, J.O., Elander, R., McMillan, J.D., Nieves, R.A., Sheehan, J.J., Thomas, S.R., Vinzant, T.B., Zhang, M., 1997. Advanced Bioethanol Production Technologies: A Perspective, in: *Fuels And Chemicals From Biomass*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 2-45. doi:10.1021/bk-1997-0666.ch001
- Hong, K., Sun, S., Tian, W., Chen, G.Q., Huang, W., 1999. A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51, 523-526. doi:10.1007/s002530051427
- Chandel, A.K., da Silva, S.S., Singh, O.V., 2011. Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysates for Improved Bioethanol Production, in: *Biofuel Production-Recent Developments And Prospects*. InTech, pp. 225-246. doi:10.5772/16454
- Chen, G.-Q., Jiang, X.-R., 2017. Engineering bacteria for enhanced polyhydroxyalkanoates (PHA) biosynthesis. *Synthetic and Systems Biotechnology* 2, 192-197.
- Cheng, Y.-S., Zheng, Y., Yu, C.W., Dooley, T.M., Jenkins, B.M., VanderGheynst, J.S., 2010. Evaluation of High Solids Alkaline Pretreatment of Rice Straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162, 1768-1784. doi:10.1007/s12010-010-8958-4
- Chytilová, A., Drábková, K., Strečanská, P., Enev, V., Kučera, D., Benešová, P., Obruča, S., 2017. Production and characterization of extracellular polysaccharide of extremely halophilic Archaea *Haloferax mediterranei*. 6th Central European Congress of Life Sciences Eurobiotech. Krakow, 156-157.
- Jansen, G., Barbosa, C., Schulenburg, H., 2013. Experimental evolution as an efficient tool to dissect adaptive paths to antibiotic resistance. *Drug Resistance Updates* 16, 96-107.
- Jönsson, L.J., Alriksson, B., Nilvebrant, N.-O., 2013. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels* 6, 16-.
- Jönsson, L.J., Martín, C., 2016. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Biores. Technol.* 199, 103-112.
- Jung, Y.-M., Park, J.-S., Lee, Y.-H., 2000. Metabolic engineering of *Alcaligenes eutrophus* through the transformation of cloned phbCAB genes for the investigation of the regulatory mechanism of polyhydroxyalkanoate biosynthesis. *Enzyme Microbial Technol.* 26, 201-8.

- Juttner, R.-R., Lafferty, R.M., Knackmuss, H.-J., 1975. A simple method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European Journal of Applied Microbiology* 1, 233-237.
- Keenan, T.M., Tanenbaum, S.W., Stipanovic, A.J., Nakas, J.P., 2004. Production and Characterization of Poly- β -hydroxyalkanoate Copolymers from *Burkholderia cepacia* Utilizing Xylose and Levulinic Acid. *Biotechnology Progress* 20, 1697-1704.
- Kessler, B., Wilholt, B., 1999. Poly(3-hydroxyalkanoates), in: *The Encyclopedia Of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, And Bioseparation*. Wiley, New York, pp. 2024-2040.
- Keweloh, H., Weyrauch, G., Rehm, H.-J., 1990. Phenol-induced membrane changes in free and immobilized *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 33, 66-71.
- Kim, Y., Ximenes, E., Mosier, N.S., Ladisch, M.R., 2011. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. *Enzyme Microbial Technol.* 48, 408-15.
- Koller, M., 2015. Recycling of Waste Streams of the Biotechnological Poly(hydroxyalkanoate) Production by *Haloferax mediterranei* on Whey. *Int. J. Polym. Sci.* 2015, Article ID 370164
- Koller, M., Bona, R., Hermann, C., Horvat, P., Martinz, J., Neto, J., Pereira, L., Varila, P., Braunegg, G., 2005. Biotechnological production of poly(3-hydroxybutyrate) with *Wautersia eutropha* by application of green grass juice and silage juice as additional complex substrates. *Biocatalysis and Biotransformation* 23, 329-337.
- Koller, M., Rodríguez-Contreras, A., 2015. Techniques for tracing PHA-producing organisms and for qualitative and quantitative analysis of intra- and extracellular PHA. *Engineering in Life Sciences* 15, 558-581.. doi:10.1002/elsc.201400228
- Koshijima, T., Watanabe, T., 2013. *Association Between Lignin and Carbohydrates in Wood and Other Plant Tissues*. Springer, Berlin Heidelberg.
- Kurzová, P., 2018. *Biotechnologická produkce PHA pomocí extremofilních mikroorganismů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
- Law, J. H., a Slepecky, R. A., 1961. Assay of poly-beta-hydroxybutyric acid. *Journal of bacteriology*, 82(1), 33–36.
- Lenski, R., 2016. The *E. coli* long-term experimental evolution project site. V: <http://myxo.css.msu.edu/ecoli>; <http://myxo.css.msu.edu/ecoli>. Datum přístupu 28.6.2019
- Lopes, M., Rocha, R., Zanotto, S., Gomez, J., Silva, L., 2009. Screening of bacteria to produce polyhydroxyalkanoates from xylose. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 1751-6.
- Macrae, R.M., Wilkinson, J.F., 1958. Poly- -hydroxybutyrate Metabolism in Washed Suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. *J. General Microbiol.* 19, 210-22.
- Martín, C., Galbe, M., Nilvebrant, N.O., Jönsson, L.J., 2002. Comparison of the fermentability of enzymatic hydrolyzates of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnating agents. *App. Biochem. Biotechnol.* 98-100, 699-16.
- Martínez-Gutiérrez, C.A., Latisnere-Barragán, H., García-Maldonado, J.Q., López-Cortés, A., 2018. Screening of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria and PhaC-encoding genes in two hypersaline microbial mats from Guerrero Negro, Baja California Sur, Mexico. *PeerJ*
- Menon, V., Rao, M., 2012. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science* 38, 522-50.

- Morone, A., Apte, M., Pandey, R.A., 2015. Levulinic acid production from renewable waste resources: Bottlenecks, potential remedies, advancements and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 51, 548-565. doi:10.1016/j.rser.2015.06.032
- Muhammadi, Shabina, Afzal, M., Hameed, S., 2015. Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. *Green Chemistry Letters and Reviews* 8, 56-77.
- Obruča, S., Benešová, P., Márová, I., 2015b. Use of Lignocellulosic Materials for PHA Production. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 29, 133-144.
- Obruca, S., Benesova, P., Petrik, S., Oborna, J., Prikryl, R., Marova, I., 2014. Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolysate of spent coffee grounds. *Process Biochemistry* 49, 1409-1414. doi:10.1016/j.procbio.2014.05.013
- Obruca, S., Marova, I., Svoboda, Z., Mikulikova, R., 2010. Use of controlled exogenous stress for improvement of poly(3-hydroxybutyrate) production in *Cupriavidus necator*. *Folia Microbiologica* 55, 17-22. doi:10.1007/s12223-010-0003-z
- Obruca, S., Sedlacek, P., Mravec, F., Samek, O., Marova, I., 2016. Evaluation of 3-hydroxybutyrate as an enzyme-protective agent against heating and oxidative damage and its potential role in stress response of poly(3-hydroxybutyrate) accumulating cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, 1365-1376. doi:10.1007/s00253-015-7162-4
- Oliveira, C., Silva, M., Silva, C.E., Carvalho, G., Reis, M.A.M., 2018. Assessment of Protein-Rich Cheese Whey Waste Stream as a Nutrients Source for Low-Cost Mixed Microbial PHA Production. *Applied Sciences* 8. doi:10.3390/app8101817
- Pais, J., Serafim, L.S., Freitas, F., Reis, M.A.M., 2016. Conversion of cheese whey into poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. *New Biotechnology* 33, 224-230. doi:10.1016/j.nbt.2015.06.001
- Pampulha, M.E., Loureiro-Dias, M.C., 1989. Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. *App. Microbiol. Biotechnol.* 31-31, 547-550.
- Pan, W., Perrotta, J.A., Stipanovic, A.J., Nomura, C.T., Nakas, J.P., 2012. Production of polyhydroxyalkanoates by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759 using a detoxified sugar maple hemicellulosic hydrolysate. *J. Industrial Microbiol. & Biotechnol.* 39, 459-469.
- Park, J.S., Lee, Y.H., 1996. Metabolite characteristics of isocitrate dehydrogenase-leaky mutant of *Alcaligenes eutrophus* and its utilization for poly-beta-hydroxybutyrate production. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 81, 197-205.
- Peters, D., 2006. Carbohydrates for fermentation. *Biotechnology Journal* 1, 806-814.
- Popoff, T., Theander, O., Rømming, C., Foltmann, B., Taticchi, A., Anthonsen, T., 1976. Formation of Aromatic Compounds from Carbohydrates. Reaction of D-Glucose and D-Fructose in Slightly Acidic, Aqueous Solution. *Acta Chemica Scandinavica* 30, 397-402.
- Pothiraj, C., Kanmani, P., Balaji, P., 2006. Bioconversion of Lignocellulose Materials. *Mycobiology* 34, 159-165. doi:10.4489/MYCO.2006.34.4.159
- Quesada, E., Ventosa, A., Ruiz-Berraquero, F., Ramos-Cormenzana, A., 1984. *Deleya halophila*, a New Species of Moderately Halophilic Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34, 287-292. doi:10.1099/00207713-34-3-287
- Ramachandran, H., Iqbal, N.M., Sipaut, C.S., Abdullah, A.A.A., 2011. Biosynthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate).

- Terpolymer with various monomer compositions by *Cupriavidus* sp. USMAA2-4. Applied biochemistry and biotechnology, 164, 867-877.
- Rand, J.M., Pisithkul, T., Clark, R.L., Thiede, J.M., Mehrer, C.R., Agnew, D.E., Campbell, C.E., Markley, A.L., Price, M.N., Ray, J., Wetmore, K.M., Suh, Y., Arkin, A.P., Deutschbauer, A.M., Amador-Noguez, D., Pflieger, B.F., 2017. A metabolic pathway for catabolizing levulinic acid in bacteria. Nature Microbiology 2, 1624-1634.
- Reginato, V., Antônio, R.V., 2015. Fermentative hydrogen production from agroindustrial lignocellulosic substrates. Brazilian Journal of Microbiology 46, 323-335.
- Ribeiro, H., Marto, J., Raposo, S., Agapito, M., Isaac, V., Chiari, B.G., Lisboa, P.F., Paiva, A., Barreiros, S., Simões, P., 2013. From coffee industry waste materials to skin-friendly products with improved skin fat levels. European Journal of Lipid Science and Technology 115, 330-336. doi:10.1002/ejlt.201200239
- Rodríguez-Contreras, A., Koller, M., Brauneegg, G., Marqués-Calvo, M.S., 2016. Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] production under different salinity conditions by a novel *Bacillus megaterium* strain. New Biotechnology 33, 73-77. doi:10.1016/j.nbt.2015.08.006
- Rowell, R.M. (Ed.), 2013. Handbook of wood chemistry and wood composites, 2nd ed. ed. CRC Press, Boca Raton.
- Sedlacek, P., Slaninova, E., Enev, V., Koller, M., Nebesarova, J., Marova, I., Hrubanova, K., Krzyzanek, V., Samek, O., Obruca, S., 2019. What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments. Applied Microbiology and Biotechnology 103, 1905-1917.. doi:10.1007/s00253-018-09584-z
- Senior, P.J., Beech, G.A., Ritchie, G.A.F., Dawes, E.A., 1972. The role of oxygen limitation in the formation of poly- β -hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. Biochemistry Journal 128, 1193-1201.
- Silva, L.F., Taciro, M.K., Michelin Ramos, M.E., Carter, J.M., Pradella, J.G.C., Gomez, J.G.C., 2004. Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 31, 245-254. doi:10.1007/s10295-004-0136-7
- Silva, L.F., Taciro, M.K., Raicher, G., Piccoli, R.A.M., Mendonça, T.T., Lopes, M.S.G., Gomez, J.G.C., 2014. Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in biorefineries associated with the production of sugar and ethanol. International Journal of Biological Macromolecules 71, 2-7. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.06.065
- Sindhu, R., Silviya, N., Binod, P., Pandey, A., 2013. Pentose-rich hydrolysate from acid pretreated rice straw as a carbon source for the production of poly-3-hydroxybutyrate. Biochemical Engineering Journal 78, 67-72. doi:10.1016/j.bej.2012.12.015
- Smibert, R.M. and Krieg, N.R. P. In Gerhardt, P. Murray, G.E. Costillows R.N. Nester, E.W. Wood, W.A. Kerieg, N.R. a Phillips, G.P., 1979. General characterization Manual of methods for general bacteriology. American society for microbiology, 409-443.
- Slepecky, R.A., Law, J.H., 1961. Synthesis and degradation of poly-beta-hydroxybutyric acid in connection with sporulation of *Bacillus megaterium*. J. Bacteriol. 82, 37-42.
- Sudesh, K., Abe, H., Doi, Y., 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. Progress in Polymer Science 25, 1503-1555.
- Sun, R., Lawther, J.M., Banks, W.B., 1995. Influence of alkaline pre-treatments on the cell wall components of wheat straw. Industrial Crops and Products 4, 127-145.

- Taskin, M., Esim, N., Ortucu, S., 2012. Efficient production of l-lactic acid from chicken feather protein hydrolysate and sugar beet molasses by the newly isolated *Rhizopus oryzae* TS-61. *Food and Bioprocess Technology* 90, 773-779. doi:10.1016/j.fbp.2012.05.003
- Titz, M., Kettl, K.-H., Shahzad, K., Koller, M., Schnitzer, H., Narodoslowsky, M., 2012. Process optimization for efficient biomediated PHA production from animal-based waste streams. *Clean Technologies and Environmental Policy* 14, 495-503.
- Tyo, K.E., Zhou, H., Stephanopoulos, G.N., 2006. High-Throughput Screen for Poly-3-Hydroxybutyrate in *Escherichia coli* and *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 3412-3417. doi:10.1128/AEM.72.5.3412-3417.2006
- Ulbricht, R.J., Northup, S.J., Thomas, J.A., 1984. A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. *Fundamental and Applied Toxicology* 4, 843-853.
- Van-Thuoc, D., Quillaguamán, J., Mamo, G., Mattiasson, B., 2007. Utilization of agricultural residues for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1. *Journal of Applied Microbiology* 071003000434003-??? doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03553.x
- Vodička, J., 2018. Polyhydroxyalkanoáty jako metabolity prokaryot adaptovaných na extrémní prostředí. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
- Volova, T.G., 2004. Polyhydroxyalkanoates--plastic materials of the 21st century: production, properties, applications, 1st ed. Nova Science Publishers, Hauppauge, N.Y.
- Wang, H., Wang, J., Fang, Z., Wang, X., Bu, H., 2010. Enhanced bio-hydrogen production by anaerobic fermentation of apple pomace with enzyme hydrolysis. *International Journal of Hydrogen Energy* 35, 8303-8309. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.12.012
- Whitman, W.B., Rainey, F., Kämpfer, P., Trujillo, M., Chun, J., DeVos, P., Hedlund, B., Dedysh, S. (Eds.), 2015. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley, Chichester, UK
- Wyman, C., Decker, S., Himmel, M., Brady, J., Skopec, C., Viikari, L., 2004. Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose, in: *Polysaccharides*. CRC Press, New York, pp. 995-1034.
- Yordanov, D. I., Tsonev, Z. B., Palichev, T. V., Mustafa, Z. A., 2013. A new approach for production of coffee oil from waste coffee residue as a feedstock for biodiesel. *Petroleum* 55, 74-81.
- Yu, J., Stahl, H., 2008. Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates. *Bioresource Technology* 99, 8042-8048. doi:10.1016/j.biortech.2008.03.071
- Zhang, Y.-H.P., Ding, S.-Y., Mielenz, J.R., Cui, J.-B., Elander, R.T., Laser, M., Himmel, M.E., McMillan, J.R., Lynd, L.R., 2007. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. *Biotechnology and Bioengineering* 97, 214-223. doi:10.1002/bit.21386

6 ŽIVOTOPIS

osobní údaje:

jméno a příjmení: Dan Kučera
místo narození: Brno
národnost: česká
e-mail: Dan.Kucera@VUT.cz
orcid id: <https://orcid.org/0000-0002-3750-5964>
linkedin <https://linkedin.com/in/dan-kučera-748b42b4/>

vzdělání:

2015 – současnost Doktorské studium – Potravinářská chemie
Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická
2013-2015 Magisterské studium – Potravinářská chemie a biotechnologie
Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická
2010-2013 Bakalářské studium – Biotechnologie
Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická
2006-2010 Střední průmyslová škola chemická Brno
obor: Analýza potravin

pracovní zkušenosti

2019 - SolarWinds – Associate Developer
2017 - VUT Brno, Fakulta chemická, Centrum materiálového výzkumu,
Vědecký pracovník
2015 – 2017 VUT Brno, Fakulta chemická, Centrum materiálového výzkumu,
technicko-hospodářský pracovník

zahraniční stáže

2017 Erasmus+ pracovní stáž – 2 měsíce
University of Natural Resources and Life Sciences, Vídeň, Rakousko
2015 Erasmus+ studijní pobyt za účelem zpracování diplomové práce
Lund University, Faculty of Engineering, Švédsko

pedagogická činnost

2017/2018, 2018/2019 zimní semestr – Praktikum z instrumentální a strukturní analýzy

úspěchy

2018 cena děkana za vynikající studijní výsledky a vynikající publikační výsledky výzkumu
2017 vítězství v posterové soutěži na konferenci 7th Central European Congress of Life
Sciences, Krakow, Polsko
2014 účast na studentské vědecké konferenci v Bratislavě, 2. místo v kategorii

7 PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORA

Publikace v recenzovaných časopisech s impaktovým faktorem:

NOVACKOVA, I.; KUCERA, D.; PORIZKA, J.; PERNICOVA, I.; SEDLACEK, P.; KOLLER, M.; KOVALCIK, A.; OBRUCA, S. Adaptation of *Cupriavidus necator* to levulinic acid for enhanced production of P(3HB-co-3HV) copolyesters. *Biochemical Engineering Journal*, 2019, roč. 151. doi:10.1016/j.bej.2019.107350

PERNICOVA, I.; KUCERA, D.; NEBESAROVA, J.; KALINA, M.; NOVACKOVA, I.; KOLLER, M.; OBRUCA, S. Production of polyhydroxyalkanoates on waste frying oil employing selected *Halomonas* strains. *Bioresource Technology*. 2019. doi:10.1016/j.biortech.2019.122028

KUČERA, D.; PERNICOVÁ, I.; KOVALČÍK, A.; KOLLER, M.; MÜLLEROVÁ, L.; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; NEBESÁŘOVÁ, J.; KALINA, M.; MÁROVÁ, I.; KRZYŽÁNEK, V.; OBRUČA, S. Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*. *Bioresource Technology*, 2018, roč. 256, č. 1, s. 552-556. ISSN: 0960-8524.

OBRUČA, S.; SEDLÁČEK, P.; KOLLER, M.; KUČERA, D.; PERNICOVÁ, I. Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. *Biotechnology Advances*, 2018, roč. 36, č. 3, s. 856-870. ISSN: 0734-9750.

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

OBRUČA, S.; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; KRZYZANEK, V.; NEBESAROVA, J.; SAMEK, O.; KUČERA, D.; BENEŠOVÁ, P.; HRUBANOVA, K.; MILÉŘOVÁ, M.; MÁROVÁ, I. The presence of PHB granules in cytoplasm protects non-halophilic bacterial cells against the harmful impact of hypertonic environments. *New Biotechnology*, 2017, roč. 39, č. A, s. 68-80. ISSN: 1871-6784.

BENEŠOVÁ, P.; KUČERA, D.; MÁROVÁ, I.; OBRUČA, S. Chicken feather hydrolysate as an inexpensive complex nitrogen source for PHA production by *Cupriavidus necator* on waste frying oils. *LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY*, 2017, roč. 65, č. 2, s. 182-188. ISSN: 0266-8254.

SAMEK, O.; OBRUČA, S.; ŠILER, M.; SEDLÁČEK, P.; BENEŠOVÁ, P.; KUČERA, D.; MÁROVÁ, I.; JEŽEK, J.; BERNATOVÁ, S.; ZEMÁNEK, P. Quantitative Raman Spectroscopy Analysis of Polyhydroxyalkanoates Produced by *Cupriavidus necator* H16. *SENSORS*, 2016, roč. 16, č. 11, s. 1-7. ISSN: 1424-8220.

OBRUČA, S.; SEDLÁČEK, P.; KRZYZANEK, V.; MRAVEC, F.; HRUBANOVA, K.; SAMEK, O.; KUČERA, D.; BENEŠOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. Accumulation of Poly(3-

hydroxybutyrate) Helps Bacterial Cells to Survive Freezing. PLOS ONE, 2016, roč. 11, č. 6, s. 1-16. ISSN: 1932-6203.

MRAVEC, F.; OBRUČA, S.; KRZYŽÁNEK, V.; SEDLÁČEK, P.; HRUBANOVÁ, K.; SAMEK, O.; **KUČERA, D.**; BENEŠOVÁ, P.; NEBESÁŘOVÁ, J. Accumulation of PHA granules in *Cupriavidus necator* as seen by confocal fluorescence microscopy. FEMS Microbiology Letters, 2016, roč. 363, č. 10, s. 1-6. ISSN: 0378-1097.

OBRUČA, S.; BENEŠOVÁ, P.; **KUČERA, D.**; PETRIK, S.; MÁROVÁ, I. Biotechnological conversion of spent coffee grounds into polyhydroxyalkanoates and carotenoids. New Biotechnology, 2015, roč. 32, č. 6, s. 569-574. ISSN: 1871-6784.

Publikace v recenzovaných časopisech zařazených do databáze Scopus:

KUČERA, D.; NOVÁČKOVÁ, I.; PERNICOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. Biotechnological Production of Poly(3-Hydroxybutyrate-*co*-4-Hydroxybutyrate-*co*-3-Hydroxyvalerate) Terpolymer by *Cupriavidus* sp. DSM 19379. Bioengineering, 2019, roč. 6, č. 3, s. 74-84. ISSN: 2306-5354.

PERNICOVA, I.; **KUCERA, D.**; NOVACKOVA, I.; VODICKA, J.; KOVALCIK, A.; OBRUCA, S. Extremophiles - Platform Strains for Sustainable Production of Polyhydroxyalkanoates. Materials Science Forum, 2019, roč. 955, s. 74-79. doi:10.4028/www.scientific.net/MSF.955.74

KOVALČÍK, A.; **KUČERA, D.**; MATOUŠKOVÁ, P.; PERNICOVÁ, I.; OBRUČA, S.; KALINA, M.; ENEV, V.; MÁROVÁ, I. Influence of removal of microbial inhibitors on PHA production from spent coffee grounds employing *Halomonas halophila*. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2018, roč. 6, č. 2, s. 3495-3501. ISSN: 2213-3437.

KUČERA, D.; BENEŠOVÁ, P.; LADICKÝ, P.; PEKAŘ, M.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. Production of Polyhydroxyalkanoates Using Hydrolyzates of Spruce Sawdust: Comparison of Hydrolyzates Detoxification by Application of Overliming, Active Carbon, and Lignite. Bioengineering, 2017, roč. 4, č. 2, s. 1-9. ISSN: 2306-5354.

OBRUČA, S.; DOSKOČIL, L.; KRZYŻANEK, V.; HRUBANOVA, K.; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; SAMEK, O.; **KUČERA, D.**; BENEŠOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. Polyhydroxyalkanoates in Bacterial Cells - More Than just Storage Materials. Materials Science Forum, 2016, č. 851, s. 20-25. ISSN: 0255-5476.

Sborníky s plným udedením textu:

KUČERA, D.; NOVÁČKOVÁ, I.; PERNICOVÁ, I.; OBRUČA, S. Adaptation of PHA producing bacteria to levulinic acid. In Proceedings of the 6th International Conference on Chemical Technology. International Conference on Chemical Technology. 1st edition. Prague: Czech Society of Industrial Chemistry, 2018. s. 74-77. ISBN: 978-80-86238-77-7. ISSN: 2336-8128.

KUČERA, D.; SAMEK, O.; MÜLLEROVÁ, L.; BENEŠOVÁ, P.; OBRUČA, S. Comparison of flow cytometry and Raman spectroscopy as methods for rapid determination of intracellular content of polyhydroxyalkanoates in bacterial cells. 4th International Conference on Chemical Technology ICCT 2016 Sborník příspěvků. 2016. ISBN: 978-80-86238-91- 3.

BENEŠOVÁ, P.; **KUČERA, D.;** OBRUČA, S.; MATOUŠKOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. USAGE OF WASTE MATERIALS AS THE POTENTIAL SUBSTRATE FOR PRODUCTION OF MICROBIAL BIOPOLYMERS. ICCT2016 Sborník abstraktů. Praha: 2016. s. 5-5. ISBN: 970-80-86238-91- 3.

OBRUČA, S.; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; SAMEK, O.; KRZYZANEK, V.; **KUČERA, D.;** BENEŠOVÁ, P.; DOSKOČIL, L.; MÁROVÁ, I. Polyhydroxyalkanoates in bacterial cells – more than just storage materials. Chemistry and Life 2015, Book of Abstracts. 1. Brno: Fakulta chemická VUT v Brně, 2015. s. 39-40. ISBN: 978-80-214-5228- 2.

OBRUČA, S.; **KUČERA, D.;** DINGOVÁ, T.; BENEŠOVÁ, P.; POŘÍZKA, J.; MÁROVÁ, I. Biotechnological production of polyhydroxyalkanoates on various lignocellulose-based agricultural wastes. Chemistry and Life 2015, Book of Abstracts. 1. Brno: Fakulta chemická VUT v Brně, 2015. s. 38-39. ISBN: 978-80-214-5228- 2.

Abstrakty mezinárodních konferencí:

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

KOVALČÍK, A.; MATOUŠKOVÁ, P.; **KUČERA, D.;** OBRUČA, S.; MÁROVÁ, I. Why Polyphenols Present In Spent Coffee Grounds Inhibit The Growth Of Bacteria Producing Polyhydroxyalkanoates?. In Papers of the 26th European Biomass Conference. Setting the course for a biobased economy. Extracted from the Proceedings of the International Conference held in Copenhagen, Denmark, 14 - 17 May 2018. European Biomass Conference And Exhibition Proceedings. Florence, Italy: ETA - Florence Renewable Energies, 2018. s. 960-964. ISSN: 2282-5819.

KOVALČÍK, A.; PERNICOVÁ, I.; **KUČERA, D.;** OBRUČA, S.; MATOUŠKOVÁ, P.; KUNDRÁT, V.; MÁROVÁ, I. Properties of biogenic PHA nanofibrous materials originated from strains *Burkholderia* species and *Pseudomonas* species using grape pomace medium. Program Agenda & Abstracts, 25th Annual Meeting of the BioEnvironmental Polymer Society, August 15-17, 2018, Rensselaer Polytechnic University, Troy, New York. Troy, New York, USA: Rensselaer Polytechnic University, 2018. s. 37-37.

CHYTILOVÁ, A.; DRÁBKOVÁ, K.; STREČANSKÁ, P.; ENEV, V.; **KUČERA, D.;** BENEŠOVÁ, P.; OBRUČA, S. Production and characterization of extracellular polysaccharide of extremely halophilic Archaea *Haloferax mediterranei*. 6th Central European Congress of Life Sciences Eurobiotech. Krakow: 2017. s. 156-157.

OBRUČA, S.; **KUČERA, D.;** PERNICOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; SAMEK, O.; KRZYZANEK, V.; NEBESAROVA, J.; MÜLLEROVÁ, L.; CHYTILOVÁ, A.;

SLANINOVÁ, E.; MÁROVÁ, I. Capability of polyhydroxyalkanoates accumulation enhances stress resistance and cell robustness of bacteria. Eurobiotech: Programme and Abstract Book. 1. Krakow: Targi w Krakowie, 2017. s. 154-154.

KUČERA, D.; BENEŠOVÁ, P.; KOVÁŘOVÁ, M.; OBRUČA, S. Strategies to improve the yield of PHAs produced from wood material. Eurobiotech - 6th Central European Congress Life Sciences. Krakov: 2017. s. 160-160.

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

KUČERA, D.; OBRUČA, S.; BENEŠOVÁ, P.; LADICKÝ, P.; MÁROVÁ, I. Utilization of sawdust hydrolysates for polyhydroxyalkanoate production by *Burkholderia* sp. RRB-12 The 12th International Conference on Renewable Resources & Biorefineries 2016.

KUČERA, D.; OBRUČA, S.; BENEŠOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. Možnosti znacení polyhydroxyalkanoátů a jejich produkce na odpadních substrátech. 16. slovenská studentská vedecká konferencia v odbore chémie a chemickej a potravinárskej technológie. Bratislava: FCHPT STU v Bratislave, 2014. s. 95-96. ISBN: 978-80-227-4268- 9.

Abstrakty národních konferencí:

NOVÁČKOVÁ, I.; **KUČERA, D.**; POŘÍZKA, J.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S.; PERNICOVÁ, I. Adaptation of selected PHA producing bacteria to biotechnologically relevant stressors. XXVIII: konference mladých mikrobiologů Tomáškovy dny 2019. Brno: Masarykova univerzita, 2019. s. 52-52. ISBN: 978-80-210-9296-9.

PERNICOVÁ, I.; KOUŘILOVÁ, X.; **KUČERA, D.**; NOVÁČKOVÁ, I.; OBRUČA, S. Screening of biotechnological potential in extremophilic bacteria. XIX. setkání biochemiků a molekulárních biologů Wimmerová, Michaela, Holková, Jitka, eds. Brno: 2018. s. 78-78. ISBN: 978-80-210-9069-9.

KOVALČÍK, A.; **KUČERA, D.**; OBRUČA, S.; HUDEČKOVÁ, H.; MÁROVÁ, I. Biological valorization strategy for converting spent coffee grounds into biopolymers and chemicals. 7th meeting on Chemistry & Life 2018, September 12-14 2018. 2018. s. 26-26. ISBN: 978-80-214-5488-0.

PERNICOVÁ, I.; KRATOCHVÍLOVÁ, O.; **KUČERA, D.**; OBRUČA, S. Screening produkce biosurfaktantů u vybraných bakterií produkující polyhydroxyalkanoáty. XXVII. konference mladých mikrobiologů Tomáškovy dny 2018. Brno: Masarykova univerzita, 2018. s. 75-75. ISBN: 978-80-210-8963-1.

PERNICOVÁ, I.; KRATOCHVÍLOVÁ, O.; **KUČERA, D.**; OBRUČA, S. Screening of biosurfactants excretion among selected bacteria. 7th Meeting on Chemistry and Life 2018.

Book of abstracts. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, 2018. s. 142-142. ISBN: 978-80-214-5488-0.

NOVÁČKOVÁ, I.; **KUČERA, D.**; POŘÍZKA, J.; PERNICOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. Adaptation of *Cupriavidus necator* H16 to levulinic acid for enhancement of 3-hydroxyvalerate content in copolymer P(3HB-co-3HV). XIX. setkání biochemiků a molekulárních biologů Wimmerová, Michaela, Holková, Jitka, eds. Brno: 2018. s. 76-76. ISBN: 978-80-210-9069-9.

KUČERA, D.; PERNICOVÁ, I.; KOVALČÍK, A.; OBRUČA, S. Accumulation of PHAs by halophilic strain *Halomonas halophila*. XVIII. setkání biochemiků a molekulárních biologů. Brno: Masarykova Univerzita, 2017. s. 75-75. ISBN: 978-80-210-8765-1.

OBRUČA, S.; **KUČERA, D.**; BENEŠOVÁ, P.; PERNICOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; SAMEK, O.; KRZYZANEK V.; MÁROVÁ, I. Integrating production of PHA into bio-refinery concept – shedding light also on specific consequences of non- optimal cultivation conditions. Biotech 2017 Book of Abstracts. 1. Praha: ICT Prague, 2017. s. 52-53. ISBN: 978-80-7080-989- 0.

KUČERA, D.; BENEŠOVÁ, P.; LADICKÝ, P.; OBRUČA, S. Production polyhydroxyalkanoates using hydrolysates of spruce sawdust. 5th International Conference on Chemical Technology ICCT 2016. 2017. ISBN: 978-80-86238-62-3.

PERNICOVÁ, I.; **KUČERA, D.**; VLASÁKOVÁ, T.; OBRUČA, S. Isolation and characterization of extremophiles for biotechnological production of polyhydroxyalkanoates. XVIII. Setkání biochemiků a molekulárních biochemiků. 1. Brno: Masarykova univerzita v Brně, 2017. s. 82-82. ISBN: 978-80-210-8765-1.

BENEŠOVÁ, P.; **KUČERA, D.**; OBRUČA, S.; MATOUŠKOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. Usage of waste materials as the potential substrate for production of microbial biopolymers. In Proceedings of the 4th International Conference on Chemical Technology. 1. Prague: Ocean Design, 2016. s. 483-487. ISBN: 978-80-86238-94- 4.

OBRUČA, S.; **KUČERA, D.**; DINGOVÁ, T.; BENEŠOVÁ, P.; POŘÍZKA, J.; MÁROVÁ, I. Biotechnological production of polyhydroxyalkanoates on various lignocellulose- based agricultural wastes. Czech Chemical Society Symposium Series, 2015, roč. 13, č. 2, s. 114-116. ISSN: 2336-7210.

OBRUČA, S.; BENEŠOVÁ, P.; PETRIK, S.; **KUČERA, D.**; EREMKA, L.; MÁROVÁ, I. Utilization of various waste substrates for biotechnological production of biopolymers and other high value products. BioTech 2014 & 6th Czech-Swiss Symposium: Book of Abstracts. 1. Praha: ICT Prague Press, 2014. s. 79-80. ISBN: 978-80-7080-887- 0.