VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM METABOLISMU POLYHYDROXYALKANOÁTŮ U VYBRANÝCH TERMOFILNÍCH BAKTERIÍ

STUDY ON METABOLISM OF POLYHYDROXYALKANOATES IN SELECTED THERMOPHILIC BACTERIA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE Bc. Nikola Reinohová

AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE Ing. Iva Pernicová, Ph.D.

SUPERVISOR

BRNO 2023

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ

Zadání diplomové práce

Číslo práce:	FCH-DIP1902/2022	Akademický rok: 2022/23
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Studentka:	**Bc. Nikola Reinohová**	
Studijní program:	Chemie pro medicínské aplikace	
Studijní obor:	Chemie bioaktivních látek	
Vedoucí práce:	**Ing. Iva Pernicová, Ph.D.**	

Název diplomové práce:

Studium metabolismu polyhydroxyalkanoátů u vybraných termofilních bakterií

Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše na téma i. biotechnologické využití extremofilních mikroorganismů ii. biotechnologická produkce PHA
2. Adaptace mikrobiálních kultur termofilních bakterií na neoptimální kultivační podmínky
3. Charakterizace získaných adaptovaných kmenů

Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

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

Bc. Nikola Reinohová studentka	Ing. Iva Pernicová, Ph.D. vedoucí práce	prof. RNDr. Ivana Márová, CSc. vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zaměřuje na adaptivní evoluční inženýrství u termofilní bakterie *Schlegelella thermodepolymerans* M15344. Teoretická část se zabývá extremofilními mikroorganismy, biotechnologickým využitím a taktéž polyhydroxyalkanoáty a evolučním inženýrstvím. V rámci této práce byla prováděna adaptace tohoto mikroorganismu na 40 °C a 60 °C s využitím substrátů glukózy a xylózy. Dále byla prováděna repeated-batch kultivace při 50 °C na glukóze a xylóze. V průběhu těchto experimentů byla stanovována koncentrace produkovaného PHA v biomase pomocí plynové chromatografie, dále byla stanovována koncentrace zbytkových sacharidů v médiu metodou využívající DNS. V neposlední řadě byla porovnána produkce polyhydroxyalkanoátů u adaptovaných kmenů z jednotlivých experimentů s neadaptovaným kmenem. Následně byly studovány produkované polyhydroxyalkanoáty jednotlivými bakteriemi pomocí metody SEC-MALS, kde byl pozorován vliv adaptace na molekulární hmotnost polymerů. Nejvíce produkující bakterií byla adaptovaná bakterie na 40 °C a substrátem glukózou. V tomto případě byla hodnota biomasy 6,74 g/l s procentuálním zastoupením PHA 56,5 hm.%. Taktéž se povedlo adaptovat bakterii na 60 °C, kde na rozdíl od originální bakterie byla schopna růstu i produkce.

ABSTRACT

This thesis is focused on adaptive evolutionary engineering in the thermophilic bacterium *Schlegelella thermodepolymerans* M15344. The theoretical part deals with extremophilic microorganisms, biotechnological applications as well as polyhydroxyalkanoates and evolutionary engineering. In this work, adaptation of this microorganism to 40 °C and 60 °C was carried out using glucose and xylose substrates. Furthermore, repeated-batch cultivation at 50 °C on glucose and xylose was performed. In these experiments, the concentration of PHA produced in the biomass was determined by gas chromatography, and the concentration of residual sugars in the medium was determined by a method using DNS. Production of polyhydroxyalkanoates in the adapted strains from each experiment was compared with the non-adapted strain. Subsequently, the PHA produced by individual bacteria was studied using the SEC-MALS method, where the effect of adaptation on molecular weight was observed. The highest producing bacteria was adapted to 40 °C and the substrate was glucose. In this case, the biomass value was 6,74 g/l with a PHA percentage of 56.5 wt%. The bacteria was also adapted to 60 °C where it was able to grow and produce unlike the original bacteria.

KLÍČOVÁ SLOVA

Polyhydroxyalkanoáty, extremofilní bakterie, *Schlegelella thermodepolymerans*, evoluční inženýrství

KEY WORDS

Polyhydroxyalkanoates, extremofilic bacteria, *Schlegelella thermodepolymerans,* evolution engineering

REINOHOVÁ, Nikola. Studium metabolismu polyhydroxyalkanoátů u vybraných termofilních bakterií. Brno, 2023. Dostupné také z: https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/148645. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Iva Pernicová.

Prohlášení

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

……

podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucí diplomové práce paní doktorce Ing. Ivě Pernicové, Ph.D., za pomoc při vytváření celé této práce, za vstřícný přístup a za věnovaný čas. Taktéž bych chtěla velice poděkovat za cenné rady při práci v laboratoři i při zpracování výsledků. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Xenii Kouřilové za pomoc v laboratoři, při zpracování této práce a taktéž za velice vstřícný přístup. Moje poděkování také patří všem v laboratoři za velice ochotnou pomoc.

Obsah

1. ÚVOD

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou biodegradabilní a biokompatibilní plasty, které v posledních letech získávají velkou pozornost kvůli svým mechanickým a chemickým vlastnostem. Díky jejich vlastnostem by mohly být využitelné v řadě oblastí od biotechnologie, přes medicínu, po průmysl. Taktéž by to do budoucna mohla být jedna z možností náhrady petrochemických plastů, které velice zatěžují planetu. Produkce těchto polymerů je bohužel pro využití v takto velkém měřítku velice finančně náročná. Proto se stále hledají způsoby, jak by se výroba PHA mohla zlevnit. Jednou z možností je využití extremofilních mikroorganismů, které prosperují v podmínkách s vysokou nebo naopak nízkou teplotou, vysokým nebo nízkým pH a vysokou salinitou. Díky svým podmínkám, ve kterých rostou a produkují, znemožňují růst běžným kontaminačním bakteriím. Využití odpadních substrátů by taktéž mohlo vést ke snížení ceny. Dalším možným způsobem, jak výrobu zlevnit je využití metod evolučního inženýrství.

Evoluční inženýrství neboli taktéž laboratorní evoluce je zrychlení evolučního vývoje mikroorganismů. Zabývá se především zlepšením vlastností některých biotechnologických produktů a taktéž zvýšením produkce mikroorganismů. K evoluci mikroorganismů dochází při aplikaci selekčního stresu, díky kterému se bakterie adaptují na tyto podmínky, aby přežily. V biotechnologických procesech se setkáváme často s inhibicí růstu a produkce bakterie následným produktem, které činí prostředí pro bakterie nepříznivým až toxickým. Evoluční inženýrství se tedy zabývá tím, že pomocí různých metod dochází k adaptaci mikroorganismů na tyto nepříznivé vlivy. V případě teplotní adaptace by se touto metodou mohla snížit cena PHA, kdy by adaptace mikroorganismu vedla k vyšší produkci, jelikož mikroorganismy produkují PHA jako zásobní látky a taktéž jako látky, které je chrání před určitým enviromentálním stresem. Teplotní stres může taktéž vést k produkci různých žádaných kopolymerů.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Extremofilní mikroorganismy

Extremofilní mikroorganismy jsou takové, které prosperují v podmínkách, které jsou pro nás nepříznivé. Těmi mohou být vysoká koncentrace soli, vysoká teplota, anebo naopak velice nízká teplota. Za normální podmínky můžeme považovat atmosférický tlak, teplotu okolo 20-40 °C a pH 7. Aby v těchto podmínkách prospívaly, mají vyvinuté určité mechanismy, které zabraňují denaturaci proteinů, popřípadě zabraňují průchodu nepříznivých vlivů do buněk. Díky adaptaci na tyto extrémní podmínky mohou produkovat různé enzymy a látky, které mají unikátní vlastnosti. Zajímavé látky, které produkují, jsou například polyhydroxyalkanoáty a extremozymy [1,2].

Rozdělení extremofilních mikroorganismů zobrazuje tabulka 1.

Tabulka 1. Rozdělení extremofilních mikroorganismů [2]

Enviromentální parametr	Typ	Podmínky
Teplota	Hypertermofilní Termofilní Psychrofilní	Růst >80 °C Růst 45-80 °C Růst <15 °C
Tlak	Piezofilní	Tlak >10 MPa
pH	Alkalofilní Acidofilní	pH >9 pH <3
Salinita	Halofilní	Koncentrace NaCl >0,2 M
Radiace	Radiorezistentní	Vysoká hodnota radiace

Termofilní mikroorganismy prosperují při teplotách vyšších než 45 °C. Mohou se vyskytovat v teplých půdách anebo taktéž v podmořských termálních průduších. V této skupině se vyskytuje vysoká variace druhů jak eukaryotických, tak prokaryotických organismů. Tyto mikroorganismy jsou vysoce adaptované jak na fyziologické, tak biochemické úrovni [2,3]. U gram negativních mezofilních bakterií bylo zaznamenáno, že při vystavení vysokým teplotám dochází k morfologické a strukturní změně v membráně, taktéž že mají snížené množství lipopolysacharidů ve vnější membráně [5]. Tyto změny v membráně mají za následek změnu propustnosti a zvýšenou citlivost na hydrofobní antibiotika. Pro správnou funkci membrán obsahují membránové lipidy více nasycených mastných kyselin, což zajišťuje správnou tekutost. Lipidy a proteiny taktéž brání cytoplasmu před vnějším prostředím. Termofilní bakterie se tedy adaptovaly tím, že změnily složení lipidů v membráně, která pro správnou funkčnost musí být krystalicky tekutá. Jedním z hlavních aspektů přežití ve vysokých podmínkách je stabilita proteinů. Ta je zajištěna molekulárními změnami, jako například větším množstvím vodíkových vazeb, zvýšením Van der Waalsových interakcí a zvýšením hydrofobicity. Zvýšení stability proteinů může být taktéž zajištěno chaperony, které napomáhají opravě denaturovaných proteinů. Na úrovni DNA zajišťující přežití bakterií ve vysokých teplotách je jejich DNA opravný systém, který udržuje genomovou stabilitu [5]. Bylo zjištěno, že některé geny hrají hlavní roli v adaptačním mechanismu, jelikož existuje

regulace na proteomické nebo transkriptomické úrovni. Tyto geny mají specifické funkce pouze při zvýšených teplotách. Důležitou roli hrají heat-shock proteiny vyskytující se u bakterií, které jsou regulovány při tepelném stresu a chrání buňku před poškozením. Nadšroubovicové vinutí DNA zvyšuje teplotu, kdy by mohlo dojít k denaturaci. Taktéž bylo zjištěno, že termofilní mikroorganismy obsahují vyšší koncentrace soli, které stabilizují dsDNA a proteiny [5]. U hypertermofilních mikroorganismů byly zaznamenány proteiny podobné histonům, které se vážou na DNA a tím ji chrání před denaturací. Dále produkují určité proteiny a enzymy, které pravděpodobně hrají roli při stabilizaci, pokud by mělo dojít k denaturaci [5,6].

Acidofilní mikroorganismy rostou v rozmezí pH 3-5, extrémně acidofilní při pH <3. Vyskytují se tak například v geotermálních pramenech a oblastech s vysokým obsahem síry. Prostředí v buňce si udržují při neutrální pH, a to pomocí velkého protonového gradientu, kdy pohyb protonů do buňky je minimalizován. Některé mikroorganismy produkují proteiny, které jsou stabilní při nízkém pH [4,7].

Alkalofilní mikroorganismy prosperují pří pH vyšším než 9, kdy optimální hodnota pH je okolo 10. Při takto vysokém pH je obvykle vyšší koncentrace soli, která se často vyskytuje v solných jezerech. Prosperují při pH vyšším než 9, kdy optimální hodnota pH je okolo 10. Tyto mikroorganismy si udržují neutrální až lehce zásaditou cytoplasmu, kde pH regulují pomocí přítomnosti sodných kationtů [2,4].

Halofilní mikroorganismy se vyskytují v jezerech s velice vysokou salinitou, kde koncentrace NaCl dosahuje hodnot nad 0,2 M. Tímto prostředím může být například Mrtvé moře. Aby v těchto podmínkách mohli přežít, jsou pro ně taktéž speciálně adaptovaní. Mají robustní buněčnou stěnu, která je schopná adaptovat vlastní hydrofobicitu na základě koncentrace NaCl v prostředí. Některé halofilní mikroorganismy zvyšují svoji osmolaritu akumulací draselných iontů v cytoplasmě. Další adaptací je akumulování kompatibilních solutů v buňce, kterými jsou například ectoin a hydroxyectoin [2,4].

2.1.1. *Schlegelella thermodepolymerans*

Schlegelella thermodepolymerans je gram negativní termofilní bakterie, která má buňky dlouhé 1,2–2,8 µm a 0,5-0,6 µm široké. Teplotní optimum je okolo 50 °C. Tvoří kolonie převážně bílé barvy. Produkuje PHA a jde o bakterii, která má schopnost rozkládat extracelulární 3-hydroxybutyrát. Tato bakterie přednostně utilizuje xylózu před ostatními cukry. Obsahuje tedy geny, které kódují enzymy umožňující utilizaci xylózy. Xylóza se odbourává dráhou xylózové izomerázy, která jde následně přes pentózový cyklus. V tomto ohledu má pravděpodobně xyl operon, který tuto utilizaci umožňuje. Tato bakterie je taktéž velice metabolicky flexibilní, což umožňuje produkci PHA na lignocelulózových substrátech a odpadních substrátech z potravinového průmyslu [8,9,10].

2.1.2. Biotechnologické uplatnění extremofilních mikroorganismů

Extremofilní mikroorganismy dostávají v posledních letech velkou pozornost pří zkoumání jejich využití v různých odvětví. Nacházejí širokou škálu uplatnění díky svým vlastnostem, které jim umožňují prosperovat v prostředích s vysokou koncentrací soli, vysokým

nebo nízkým pH a vysokou nebo nízkou teplotou. Produkují enzymy a extremolyty, což jsou biomolekuly chránící buňky před nepříznivými podmínkami, které umožňují mikroorganismům v extrémních podmínkách přežít. Díky svým enzymatickým vlastnostem, mohou být celé buňky použity při biokatalytických procesech pro výrobu biomolekul využitelných pro lékařské i průmyslové účely. Extremolyty jsou využívány v kosmetickém průmyslu a mají potenciální využití ve farmaceutickém průmyslu. Taktéž mohou být využity ke stabilizaci nukleových kyselin a proteinů. Dále jsou extremofilní mikroorganismy velice zajímavé díky možnosti snížení rizika mezofilní mikrobiální kontaminace v procesech, díky růstu v podmínkách, které jsou pro časté kontaminanty nepříznivé. Příklady využití extremofilních mikroorganismů a jejich enzymů v průmyslu zobrazuje tabulka 2 [3,11].

Tabulka 2. Využití extremofilních mikroorganismů v průmyslu [3]

Druh	**Zdroj**	**Enzym**	**Optimální reakční teplota [°C]**	**Využití**
Anoxybacillus sp. GXS-BL	Termální prameny	α-amylýza	60	Potravinářský a farmaceutický průmysl, detergent
Alteromonas sp. ML117	Moře	β-galactosidýza	10	Potravinářský průmysl
Bacillus tequilensis ARMATI	Hnůj	Termo-alkali stabilní xylanýza	60	Biorafinérie
Janibacter sp. R02	Antarktická půda	Termofilní a halofilní esteráza	80	Detergenty, farmaceutický a potravinářský průmysl
Anoxybacillus sp. HBB16	Termální prameny	Alkalická lipáza	50	Organické syntézy, detergent

Schopnost těchto mikroorganismů katalyzovat chemické reakce při různých podmínkách, kterými může být pro příklad vysoká koncentrace soli v prostředí, je zájmem zkoumání. Výzkumy se zabývají extremozymy, které vykazují zajímavé vlastnosti pro biotechnologické aplikace. Běžné enzymy, na rozdíl od extremozymů, podléhají denaturaci při vysokém či nízkém pH a vysoké teplotě. Enzymy produkovány psychrofilními mikroorganismy mají uplatnění díky své vysoké katalytické aktivitě při nízkých teplotách ve výrobě detergentů. Dalším biotechnologickým uplatněním je produkce polyhydroxyalkanoátů [3].

Důvodem tvorby PHA v buňce je především uhlíková a energetická zásoba mikroorganismů, dále také jako protektant vůči stresovým podmínkám. Využití extremofilních mikroorganismů, které produkují PHA, by mohlo vést ke snížení ceny procesu produkce, a to především díky tomu, že jsou schopny růst v podmínkách, kdy běžné mezofilní bakterie způsobující kontaminace nemohou přežít. Snižují se tedy náklady na udržení sterilního prostředí. Dále se mohou snížit náklady díky použití substrátu z odpadů různých biotechnologických procesů.

Bylo zjištěno, že některé extremofilní mikroorganismy produkující PHA jsou schopny degradovat barviva, aromatické sloučeniny a taktéž organický odpad z průmyslu. Například kontaminované oblasti olejem obsahují vysoký podíl uhlíku a nízký obsah dusíku, což vytváří ideální prostředí pro produkci PHA u bakterií jako *Pseudomonas* a *Cupravidius* [7,12].

Termofilní mikroorganismy produkují termostabilní enzymy, které jsou velice zajímavé pro průmyslové využití. Dále tyto enzymy odolávají vysokým teplotám, což lze využít při katalýze vysokoteplotních chemických reakcí [13]. Nejvíce úspěšným termostabilním enzymem je Taq polymeráza, která byla izolována z mikroorganismu *Thermus aquaticus*. Tento enzym se neinaktivuje teplotou a je tedy vhodný a využívaný pro PCR metodu. Dalším využívaným enzymem je například termolysin, který se používá k syntéze Pre Taq proteázy, která se využívá při přečištění DNA před PCR [11]. U mikroorganismů *Geobacillus* sp. byla prokázána produkce termostabilní α-amylázy, která se dá využít v biorafinérii. Tyto mikroorganismy by taktéž mohly být využity na výrobu lignocelulózového bioethanolu, jelikož bylo prokázáno, že produkují jak celulázy, tak hemicelulázy, které jsou zapotřebí pří štěpení celulózových a hemicelulózových polymerů v rostlinách. Tyto celulázy jsou taktéž vhodným katalyzátorem zvyšujícím rychlost hydrolýzy celulózy [14]. Některé termofilní bakterie, příkladem *Cyanobacterium sp.* jsou schopné produkce palmitové a stearové kyseliny, které mohou být použity k výrobě biodieselu [6,15].

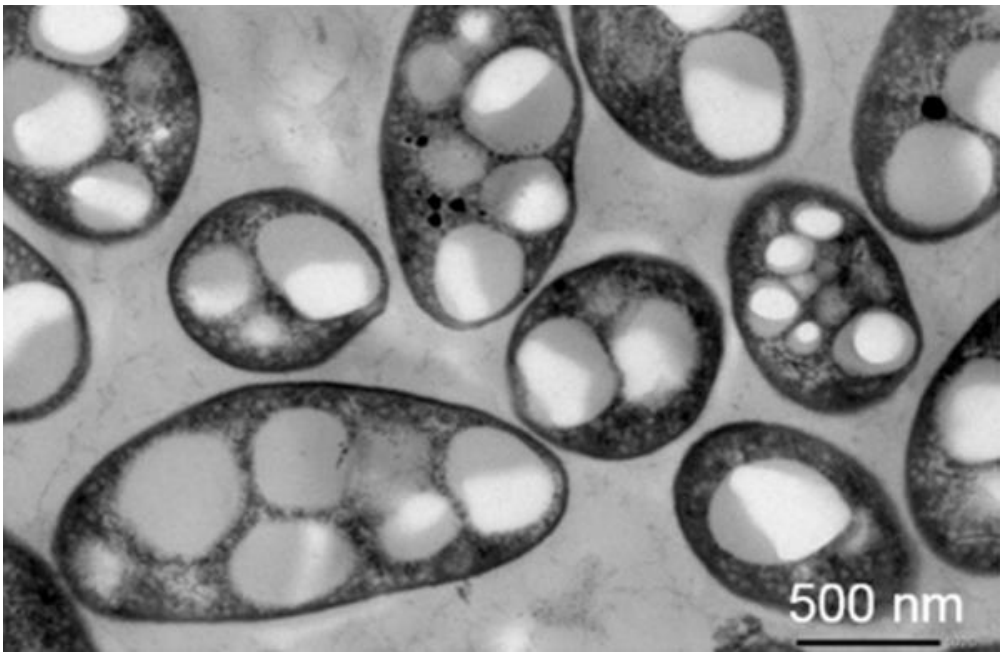
Hlavním využitím halofilních mikroorganismů je produkce ectoinu a hydroxyectoinu, což jsou kompatibilní soluty, které napomáhají buňkám přežít a prosperovat v prostředí s vysokou koncentrací soli. Tyto soluty stabilizují biomolekuly a celé buňky. Dále plní funkci také jako stresové protektanty v nepříznivých podmínkách. Tyto látky jsou využívány pro kosmetiku, do přípravků pro léčbu alergií, do krémů proti stárnutí a do hydratačních krémů. Hydratační krémy mají dlouhodobý efekt a zabraňují dehydrataci pokožky. Ectoin taktéž absorbuje UV záření a chrání tak DNA. Enzymy halofilních mikroorganismů jsou stabilní při vysokých koncentracích soli, nízké aktivitě vody, a dokonce při přítomnosti některých organických rozpouštědel. U celulázy produkované *Paenibacillus tarimensis*, bylo dokázáno, že je funkční při velké škále pH, vysokých teplotách a při vysoké koncentraci soli. Díky tomu by enzym této bakterie mohl být použit při výrobě detergentů a v papírenském průmyslu [2,11,16,17].

Acidofilní mikroorganismy mohou produkovat enzymy jako amylázy, proteázy, ligázy a celulázy, které jsou stabilní při nízkém pH. U některých mikroorganismů bylo objeveno, že mohou produkovat glukoamylázy, které jsou stabilní při nízkém pH a vysoké teplotě. Dále bylo zkoumáno zapojení termofilních acidofilů do produkce biopaliv z lignocelulózových substrátů [2,18].

Enzymy alkalofilních mikroorganismů vykazují termostabilitu, vysokou alkalickou aktivitu a substrátovou specifitu. Největší uplatnění enzymů je při využití jako komponentů pro ekologické prací prostředky. Některé další enzymy se mohou využívat ve farmacii a potravinářství [2].

2.2. Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty jsou biodegradabilní termoplastické alifatické polyestery, které jsou produkovány mikroorganismy ve formě granulí (obrázek 1) o velikosti přibližně 0,2-0,5 μm. Některé organismy produkují PHA při omezených a stresových podmínkách jako zásobní látky. Bakterie produkující PHA se dělí do dvou skupin. První skupina potřebuje limitující podmínky pro to, aby produkovala PHA, které akumulují ve stacionární fázi. Mezi takové mikroorganismy se řadí například *C. necator*. A druhá skupina, která produkuje PHA v průběhu růstu, a nepotřebuje žádné limitující podmínky kam se řadí například bakterie *A. latus*. Stresovými podmínkami mohou být limitace dusíkem, hořčíkem, nebo kyslíkem v přítomnosti uhlíkového zdroje. V buňce mohou polyhydroxyalkanoáty působit jako osmoprotektanty a taktéž mohou působit jako kryoprotektanty. Díky své biokompatibilitě a biodegradabilitě mají široký potenciál využití v průmyslu. Uplatnění mohou najít v tkáňovém inženýrství, jako nosiče léčiv a taktéž jako částečná náhrada petrochemických plastů. Ovšem hlavním omezením produkce PHA v průmyslovém měřítku je vysoká cena [1,19,20,21].

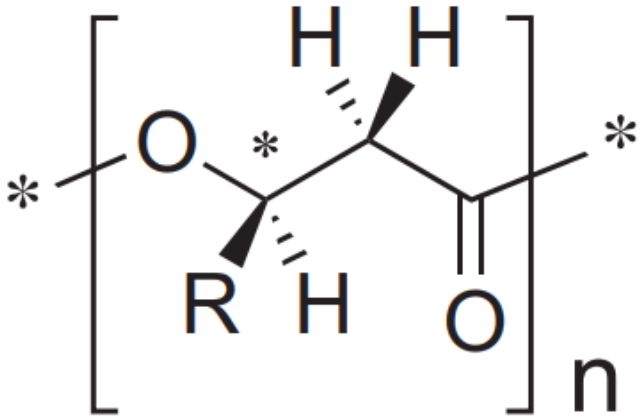


Obrázek 1. PHA granule u bakterie *Rhodovulum visakhapatnamense* [23]

2.2.1. Struktura

Polyhydroxyalkanoáty jsou většinou složeny z (*R*)-β-hydroxymastných kyselin. Obecnou strukturu zobrazuje obrázek 2. Dělí se podle délky řetězce na scl-PHA, které mají krátký řetězec s maximálně 5 uhlíky a obsahují především 3-hydroxybutyrát nebo 3-hydroxyvalerát. Jsou velice krystalické a mají nízkou teplotní stabilitu v průběhu skladování, což snižuje možnost jejich industriálního využití. Dále mají vyšší molekulovou hmotnost v porovnání s mcl-PHA [24-26]. Jsou produkovány řadou mikroorganismů, ale nejznámějším je *Cupravidius necator*. Mcl-PHA mají řetězec o délce 6-14 uhlíků a mohou být více žádanějšími než scl-PHA z důvodu vyšší elasticity, jsou méně krystalické a mají vyšší bod tání. Jsou syntetizovány hlavně kmeny *Pseudomonas*. Dále lcl-PHA, které mají řetězec delší než 14

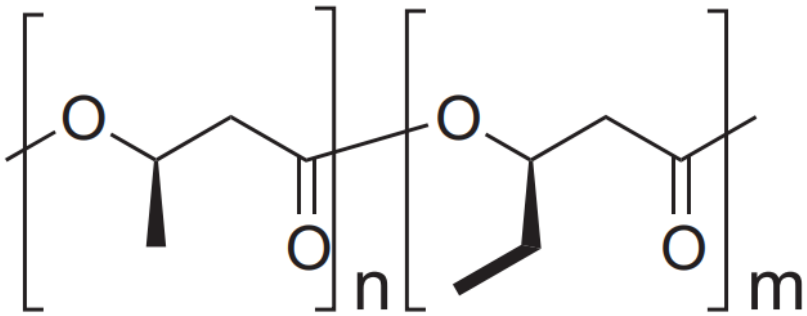
uhlíků. Mezi lcl-PHA patří poly(3-hydroxypentadecanoát), který je produkovaný bakterií *P. aeruginosa,* a to především ve formě scl-lcl-PHA kopolymerů. Který typ PHA bude produkován závisí hlavně na metabolické dráze a mikroorganismu. Dále také závisí na substrátu a prekurzorech [23,26,27,28].



Obrázek 2. Struktura PHA [24]

Nejtypičtějším a velice studovaným monomerem je 3-hydroxybutyrát, který tvoří PHB homopolymer. Tento polymer má podobné termické vlastnosti jako petrochemické plasty. Problémem je, že je vysoce krystalický kvůli své pravidelnosti, a je málo flexibilní. Dalším známým polymerem je 4-hydroxybutyrát. Jde o silný termoplastický materiál, který má pevnost v tahu srovnatelnou s polyethylenem [22,25].

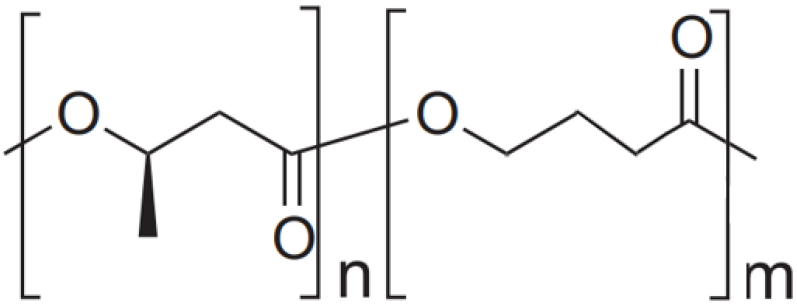
Lepší vlastnosti, jako větší flexibilitu, tažnost a měkkost, vykazují kopolymery. Mezi nejznámější a nejvíce prostudované kopolymery se řadí P(3-hydroxybutyrát-*co*-3-hydroxyvalerát) zobrazený na obrázku 3, který má vhodnější vlastnosti pro praktické využití. Těmi jsou například nižší teplota tání a vyšší flexibilita. Na tom, jaké bude mít kopolymer vlastnosti, záleží především procentuální zastoupení jednotlivých složek. Například vyšší koncentrace 3-hydroxyvalerátu snižuje bod tání kopolymeru [25,29,30].



Obrázek 3. Struktura kopolymeru P(3HB-co-3HV) [24]

Dalším známým kopolymerem je P(3-hydroxybutyrát-*co*-4-hydroxybutyrát). Struktura tohoto kopolymeru je uvedena na obrázku 4. Tento kopolymer vykazuje velice velkou škálu vlastností

v závislosti na molárním zastoupení 4-hydroxybutyrátu v kopolymeru. Při vysokém zastoupení 4HB (64-100 mol%) má tento kopolymer vlastnosti termoplastického elastomeru s vysokou pevností v tahu [31].

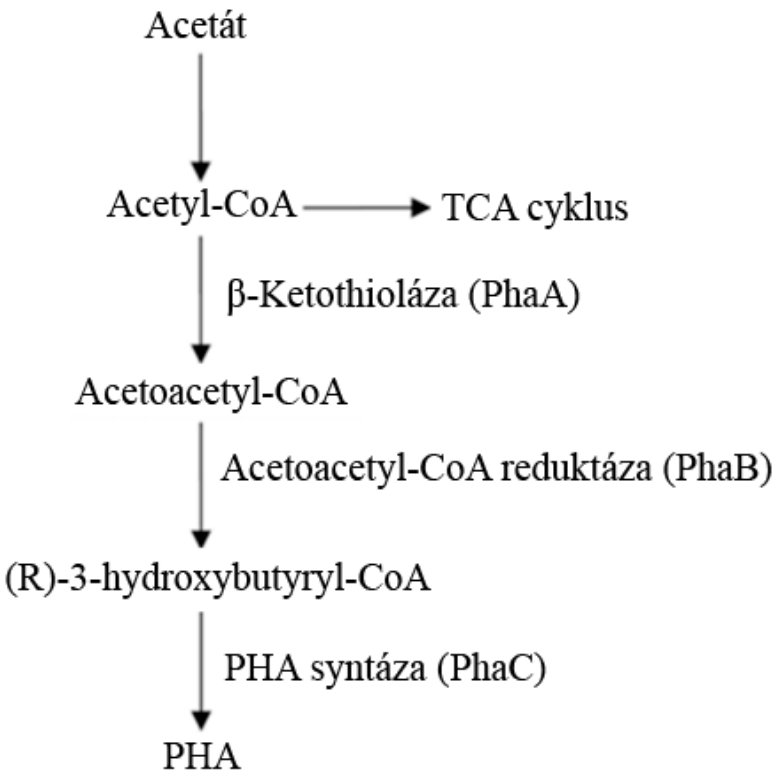


Obrázek 4. Struktura kopolymeru P(3HB-*co*-4HB) [32]

2.2.2. Biosyntéza

Některé mikroorganismy produkují PHA jako zásobní látky, které v případě vystavení enviromentálnímu stresu, kterým může být například nedostatek živin, slouží jako zásoba uhlíku a energie. Polyhydroxyalkanoáty jsou syntetizovány některými jak gram negativními, tak gram pozitivními bakteriemi. Polyhydroxyalkanoáty jsou produkovány řadou po sobě následujících enzymatických reakcí. Je pár nejznámějších biosyntetických drah. První drahou je dráha typická pro bakterii *C. necator*. U druhé dráhy je získáván substrát pro tvorbu PHA pomocí β-oxidace mastných kyselin. Touto dráhou tvoří PHA bakterie *Pseudomonas*. Při biosyntéze hraje důležitou roli substrát, který určuje, jaké vlastnosti vzniklé PHA bude mít [22,23,33,34].

Nejvíce prozkoumanou a nejběžnější biosyntetickou dráhou pro produkci scl-PHA, je dráha bakterie *Cupravidius necator*. Na obrázku 5 můžeme vidět dráhu produkce PHB. Tato dráha začíná kondenzací 2 molekul acetyl-CoA pomocí *phaA* (ketothioláza), která je regulována koenzymem A. Vznikne acetoacetyl-CoA, který dále pokračuje do dráhy, kde redukcí vzniká (*R*)-3-hydroxybutyryl-CoA. Tento izomer je následně pomocí *phaC* polymerizován do podoby PHB [29,35].



Obrázek 5. Dráha syntézy PHA pomocí *Cupravidius necator* [35]

Další možnost biosyntézy PHA vychází z β-oxidace mastných kyselin za použití substrátu, který má podobné složení jako monomerní jednotka. Jedná se o různé varianty mastných kyselin, které jsou v cyklu rozloženy na jednodušší produkty za tvorby energie. Tato dráha je u *Pseudomonas* důležitá pro produkci mcl-PHA. Při β-oxidaci dojde ke zkracování řetězce mastné kyseliny až na acetyl-CoA. Následně dojde k oxidaci a polymerizaci pomocí PhaC syntázy [34,36].

2.2.3. PHA syntáza

Vyskytuje se velká rozmanitost proteinů, které jsou potřeba pro biosyntetickou dráhu PHA a taktéž existuje několik druhů PHA syntáz, které hrají zásadní roli při tvorbě PHA. V biosyntetické dráze mají za úkol polymerizovat hydroxyalkanoáty na polyhydroxyalkanoáty. PHA syntázy se řadí do αβ-hydroláz a strukturně se podobají lipázám. Mezi geny kódující proteiny, které jsou potřeba při biosyntéze PHA, patří například *phaA* (ketothioláza), *phaB* (acetoacetyl-CoA reduktáza) a *phaC* (PHA syntáza) [25].

PHA syntázy se dělí do 4 tříd podle substrátové specifity a kompozice. Třídy I. a II. se skládají pouze z PhaC podjednotek a III. se IV. třídou z dalších podjednotek PhaE a PhaR. Syntáza I. třídy polymerizuje scl-monomery, které jsou produkovány například bakterií *C. necator*. U II. třídy se můžeme setkat s polymerizací mcl-monomerů, která je typická pro rod *Pseudomonas*. Podjednotky III. třídy (PhaC a PhaE) polymerizují scl-monomery. IV. třída je charakteristická pro rod *Bacillus*. U této třídy je, na rozdíl od III. třídy, důležitá malá podjednotka PhaR pro aktivitu PhaC [29,37].

2.2.4. Biodegradace

PHA mohou být biodegradovány řadou mikroorganismů, které se běžně vyskytují v prostředí, až na uhlík a vodu. Množství mikroorganismů v půdě a mořské vodě tvoří enzymy, které hydrolyzují PHA na ve vodě rozpustné monomery a oligomery, které následně využijí jako zdroj uhlíku [21,36].

Za biodegradaci PHA v prostředí jsou zodpovědné extracelulární PHA degradační enzymy. Míru degradace ovlivňuje spousta faktorů, jako velikost mikrobiální populace, teplota a vlastnosti materiálu, který degradují. Jelikož mají polyhydroxyalkanoáty vysokou molekulární hmotnost, není možné, aby byly transportovány přes mikrobiální membrány. Tyto extracelulární enzymy jsou rozdílné od intracelulárních depolymeráz. Intracelulární PHA jsou nekrystalické elastomery, které mohou být degradovány pouze intracelulárními depolymerázami. K intracelulární degradaci dochází v moment, kdy je bakterie ve stresových podmínkách z nedostatku uhlíku. Akumulované PHA jsou hydrolyzovány na uhlík a zdroj energie [21,29,38].

2.2.5. Využití

Polyhydroxyalkanoáty mají velkou škálu využití díky jejich biodegradabilním a biokompatibilním vlastnostem. Našly velkou řadu uplatnění v medicínské aplikaci, a to od hojení ran až k nosičům léčiv. Vlastnosti jako hydrofobicita, molekulová hmotnost, degradační rychlost a porozita, jsou důležité při výběru materiálu pro tkáňové implantáty a scaffoldy. Stimulují buněčnou proliferaci a regeneraci tkání. Probíhají výzkumy použití PHA pro tkáňové inženýrství srdečních chlopní, kůže, nervů i jater [1,22,39,40].

V medicínské oblasti by mohly být využity jako materiály pro kostní implantáty a pro tkáňové inženýrství. V případě kostních implantátů se ukázal PHB jako vhodný materiál díky tomu, že jsou krystalické, bioresorbovatelné a mají vyšší degradační dobu. Jejich piezoelektrické vlastnosti hrají zásadní roli při stimulování růstu kosti a regeneraci. U srdečního tkáňového inženýrství je PHB používáno jako scaffold pro srdeční tkáň, podporuje afinitu buněk, nevyvolává zánětlivé reakce a indukuje produkci cytokinů. Dále se mohou využívat v odvětví kožního tkáňového inženýrství, kdy PHB scaffold podporuje proliferaci buněk, ovšem problémem je jeho křehkost a hydrofobicita, kterým se dá předejít spojením s polymery jako například s polyvinylacetátem. Dále mohou být používány jako nosiče léčiv s kontrolovaným uvolňováním. Monomery 3HB jsou nápomocné při syntéze polymerů, příkladem dendrimery, které jsou díky svým vlastnostem, jako biodegradabilita a obsah povrchově funkčních částí, vhodné pro potencionální použití jako nosiče léčiv. PHA se používá taktéž při výrobě rekombinantních proteinů a vakcín. Hydrolýzou PHA vzniknou monomery, které jsou bohatým zdrojem pro syntézu chemických látek, jako třeba vitamíny a antibiotika. Taktéž díky svým vlastnostem by mohly být použity jako obalové materiály pro potraviny. Jelikož je cena PHA vysoká, není jejich využití v podobě obalových materiálů příliš rozšířené. Existuje několik možností, jak snížit cenu PHA. Těmi může být využití levných substrátů jako glukóza, lignin a odpadní materiály. Dále lze snížit cena například vývojem dané bakterie produkující PHA pomoc evolučního inženýrství, díky kterému by se získala bakterie s větší produkcí polyhydroxyalkanoátů [28,39-42].

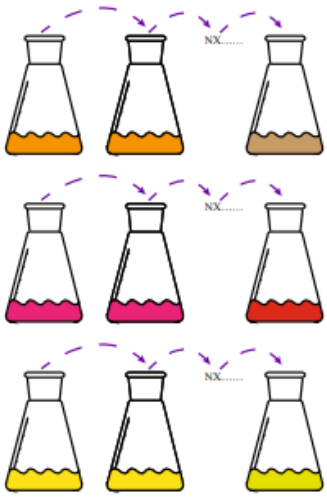
2.3. Evoluční inženýrství

V biotechnologických aplikacích hrají mikroorganismy velice důležitou roli. Jsou využívány ve velké škále produkcí od biopaliv až k produkcí farmaceutickým proteinům. Využití mikroorganismů v biologických fermentacích nabízí mnoho výhod, kterými mohou být například vysoká bezpečnost výroby a rozsáhlý zdroj surovin. Buňky jsou při těchto procesech zatíženy řadou stresových faktorů, jako jsou vysoké teploty a chemické vlivy jako zpětnovazebná inhibice, popřípadě toxicita produktů [43,44].

Evoluční inženýrství, známé také jako laboratorní evoluce, se zabývá výzkumem zlepšování vlastností biochemických produktů, kterými mohou být například zvyšování tolerance buněk k prostředí nebo zvýšení produkce. Jde o napodobení a zrychlení přirozené evoluce, se záměrem zlepšení požadovaných vlastností, kterými mohou být zvýšení produktivity, popřípadě produkce požadovaných látek [43-45].

2.3.1. Adaptační laboratorní evoluce

Adaptační laboratorní evoluce se zabývají především generováním náhodných mutací v mikrobiální kultuře. Jde o běžnou a důležitou metodou pro biotechnologie, kdy hlavním záměrem je tolerance mikroorganismů k určitým podmínkám v prostředí. Dále tato metoda může být využita pro zkoumání rezistence na antibiotika. Principem je dlouhodobá kultivace mikroorganismů (obrázek 6), kdy se časem objeví prospěšné mutace vedoucí k adaptaci [46].



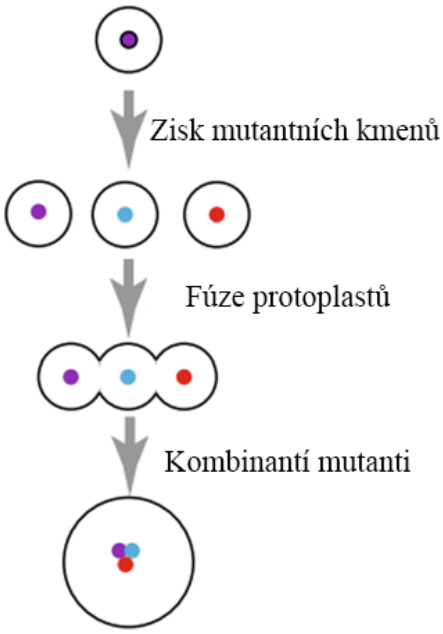
Obrázek 6. Sériová kultivace [43]

Důležitým faktorem pro experimenty pro zlepšení fenotypu mikroorganismů je volba vhodné délky. Běžné adaptační metody jsou prováděny přibližně po dobu 100 až 2000 generací a trvají týdny až měsíce. Stabilní fenotypové změny se ukáží poměrně rychle a vedou k populační heterogenitě. Vznik mutací je zapříčiněn genetickými změnami v důsledku selekce, které vedou k tomu, aby se mikroorganismy přizpůsobily prostředí. V adaptivních laboratorních experimentech byly objeveny různé druhy mutací. Velkou roli hraje také nutriční stres, který je důležitým aspektem pro biotechnologické použití. Díky těmto evolucím se může snížit cena nákladů na substráty a může se zvýšit hodnota biokonverze. Dalším možným způsobem adaptace je enviromentální stres [44] .

Při těchto experimentech jsou používány dvě metody kultivace, a to vsádková a kontinuální. Metody mají jak své výhody, tak i nevýhody. Kritickými body této metody jsou časová náročnost a množství buněk, které jsou přeneseny to dalšího cyklu. Při vsádkové kultivaci v baňkách jsou mikroorganismy po určité době přeočkovány do nového média. Jde o levnou a jednoduchou metodu. Má však své nevýhody, a to především kolísavou hustotu populace, nekonzistentní rychlost růstu a podmínky prostředí, které se postupně v médiu stávají pro bakterii nepříznivými. Druhou metodou je kontinuální kultivace v bioreaktorech. Hlavními výhodami je konstantní rychlost růstu a hustota populace. Dále je jednodušší kontrola množství živin a podmínek prostředí, jako je pH a množství kyslíku. Nevýhodou je vysoká cenová náročnost v porovnání se vsádkovou metodou [44,46].

2.3.2. Genomová evoluce

Dalším se způsobů evolučního inženýrství jsou genomové evoluce. Ta poslední dobou získala na poli výzkumu velkou pozornost, jelikož metoda posunu genomu, taktéž znám jako genome shuffling, (Obrázek 7) umožňuje evoluce mikrobiálních kultur na genomové úrovni. Jde o rychlou a efektivní metodu, u které je podstatou získání velké rozmanitosti mutací pomocí různých chemických či fyzikálních mutagenů. Dva různé kmeny mikroorganismů se mohou zkombinovat tak, že se vytvoří kombinovaný fenotyp dvou vlastností, kterými mohou být vyšší produktivita a tolerance k prostředí. Tato kombinace může být uskutečněna pomocí pohlavní rekombinace nebo fúze protoplastů, která je možná u téměř všech druhů. Při této metodě lze získat geneticky stabilní kmeny [43]. Genome shuffling je založený právě převážně na fúzi protoplastů, což je metoda, která je již dlouho známá a byla používána k modifikaci fenotypických znaků u prokaryotických a eukaryotických buněk [47].



Obrázek 7. Genome shuffling [43]

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Použité chemikálie

Seznam použitých chemikálií

Názvy chemikálii a výrobci
Citrát amonno-železitý (Fluka)
D-Glukóza monohydrát (Lach:Ner)
Dihydrogenfosforečnan draslený (Lach:Ner)
Glycerol (Lach:Ner)
Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (Lach:Ner)
Hydroxid sodný (Lach:Ner)
Chlorid amonný (Lach:Ner)
Chlorid vápenatý dihydrát (Lach:Ner)
Chlorid měďnatý dihydrát (Sigma-Aldrich)
Chlorid kobaltnatý hexahydrát (Sigma-Aldrich)
Chlorid manganatý hexahydrát (Sigma-Aldrich)
Chloroform p.a. (Lach:Ner)
Isopropylalkohol p.a. (Lach:Ner)
Kyselina 3,5-dinitrosalycilová (Lach:Ner)
Kvasničný extrakt (HiMedia)
LB medium (Serva)
Síran hořečnatý heptahydrát (Lach:Ner)
Vinan sodno-draslený (Lach:Ner)

3.2. Použité přístroje

Seznam použitých zařízení

Použité přístroje
Analytické váhy, Ohaus Pioneer PA224C
Centrifuga, HETTICH EBA200
Centrifuga, HETTICH EBA20
Nanofotometr, Implen
Termostat, BioTech IP60
Termostat, BioTech IP100U
pH metr, IX instruments
Třepačka LABWIT ZWYR D2401
Třepačka IKA KS4000
Třepačka Grant-bio ES-20
Plynový chromatograf s FID, Thermo Scientific Trace 1300
Termoblok, Bibby Scientific Stuart SBH 130
Váhy, Kern EW 620-3NM
Vortex, Benchmark BenchMixer
Magnetická míchačka Benchmark Scientific

3.3. Použité mikroorganismy

Použitým mikroorganismem v této práci byla bakterie *Schlegelella thermodepolymerans* M15344.

3.4. Kultivace mikroorganismů

3.4.1. Příprava inokula

Inokulum bylo připravené ve 100ml Erlenmeyrově baňce o obsahu 50 ml média. Použité médium LB bylo v koncentraci 20 g/l. Médium bylo vysterilizováno a po temperaci média na optimální teplotu bakterie do něj byla očkována bakterie *Schlegelella thermodepolymerans* M15344. Kultivace probíhala po dobu 24 h při 50 °C za konstantního míchání 170 rpm.

3.4.2. Příprava produkčního média

Produkční média byla připravena v objemu 100 ml ve 250ml Erlenmeyrově baňce. Jako médium bylo použito minerální médium o složení v tabulce 3 a 4. Jako zdroj uhlíku byla použita glukóza a xylóza v koncentraci 20 g/l.

Tabulka 3: Složení produkčního média

Složení [g/l]	
$Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$	9
KH_2PO_4	1,5
NH_4Cl	1
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,2
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	0,02
NH_4Fe^{III}citrát	0,001
Kvasničný extrakt	0,5
Po sterilizaci	
Uhlíkový zdroj	
TES II	1 ml/l

Tabulka 4. Složení TES II

Složení [g/l]	
EDTA	50
$FeCl_3$	8,3
$ZnCl_2$	0,84
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$	0,13
$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,1
$MnCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,016
H_3BO_3	0,1
Destilovaná voda	1000 ml

Takto připravené médium bylo následně vysterilizováno, vytemperováno na správnou teplotu, která byla v experimentu 40, 50 a 60 °C. Do média byl přidán uhlíkatý zdroj a TES II. Do takto připraveného média bylo zaočkováno 5 obj. % z inokula. Očkované kultury byly kultivovány po dobu 72 h při 40, 50 a 60 °C.

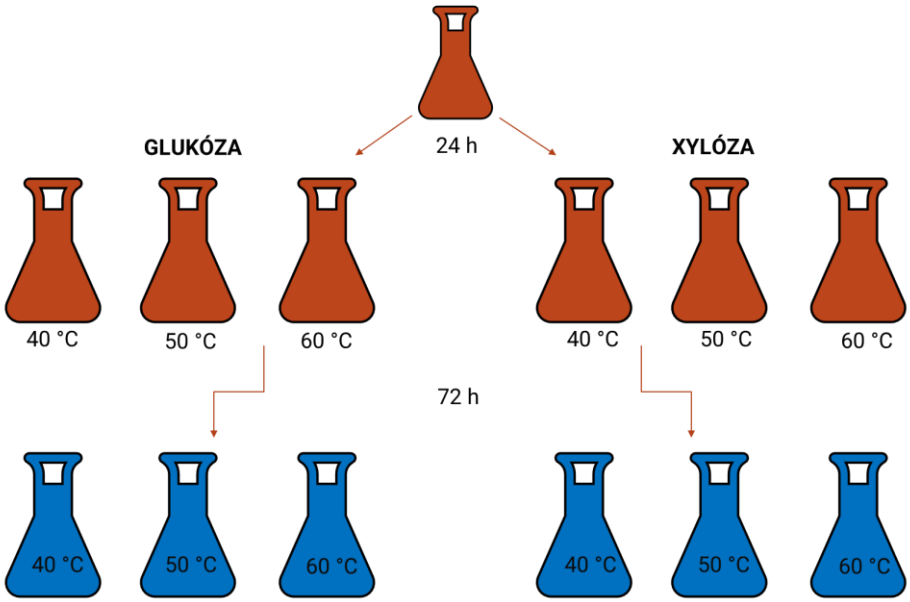
3.5. Uchovávání mikroorganismů

Mikroorganismy po kultivaci byly uchovávány v kryo zkumavkách při teplotě -80 °C. Do kryo zkumavek bylo připraveno 0,5 ml 30% glycerol. Následně byly kryo zkumavky vysterilizovány a do takto připravených byl převeden 1 ml kultury.

3.6. Evoluce

V rámci evolučního inženýrství probíhala adaptace bakterie *Schlegelella termodepolymerans* M15344 na různé teploty a různé zdroje cukrů. *Schlegelella termodepolymerans* má teplotní optimum při 50 °C. V našem experimentu probíhala adaptace na 40, 50 a 60 °C na xylóze a glukóze.

Nejdříve bylo připraveno inokulum s médiem LB o koncentraci 20 g/l. Do takto připraveného inokula byla očkována bakterie z kryo zkumavky. Takto připravená inokula byla kultivována při 50 °C po dobu 24 h. Po této době byly kultury přeočkovány do produkčního minerálního média (složení viz kapitola 3.4.2), kde jeden set probíhal na glukóze a druhý na xylóze. Následně byly kultivovány při teplotách 40, 50 a 60 °C. Po 72 h byly odebrány vzorky pro stanovení PHA, biomasy, zbytkového cukru a pH, a 5 % kultury bylo přeočkovány do nového média, kde byly dále kultivovány při stejných teplotních podmínkách se stejným substrátem. Tento proces byl opakován každých 72 h. Adaptace byly prováděny po dobu dvou měsíců. Schéma experimentu zobrazuje obrázek 8. Taktéž byly průběžně uchovávány vzorky kultur v kryo zkumavkách.



Obrázek 8. Schéma evolučního experimentu

3.7. Stanovení obsahu biomasy

Biomasa byla stanovována po 72 h hodinách kultivace v produkčním médiu. Stanovení probíhalo spektrofotometricky a gravimetricky.

3.7.1. Spektrofotometrické stanovení biomasy

Spektrofotometrické stanovení biomasy probíhalo na spektrofotometru při nastavené vlnové délce 600 nm. Měření probíhalo v kyvetě oproti destilované vodě. Vzorky kultur byly vhodně naředěny tak, aby absorbance byla v rozmezí 0,1-0,9.

3.7.2. Gravimetrické stanovení biomasy

Gravimetrické stanovení probíhalo tak, že bylo odebráno 2x 10 ml kultury z Erlenmeyerových baněk do centrifugačních zkumavek. Vzorky byly následně stočeny v centrifuze při 6000 otáčkách/min po dobu 5 minut. Supernatant byl slit a uchován pro další stanovení pH a zbytkového cukru v médiu. K sedimentu bylo přidáno 5 ml destilované vody a byl rozsuspendován. Poté byly vzorky opět vloženy do centrifugy a stáčeny při stejném nastavení

jako poprvé. Po tomto kroku byl supernatant slit a sediment byl umístěn do sušárny. Po vysušení do konstantní hmotnosti byla biomasa zvážena na analytických vahách.

3.8. Stanovení obsahu PHA v biomase pomocí plynové chromatografie

PHA bylo stanovováno z vysušené biomasy vzorků o hmotnosti přibližně 8-11 g. Tato biomasa byla převedena do krimplovacích vialek, do kterých byl následně přidán 1 ml chloroformu a 0,8 ml esterifikační směsi. Esterifikační směs se skládá z 15% H_2SO_4 v methanolu s vnitřním standardem 5 mg/ml kyseliny benzoové. Vialky byly následně uzavřeny a přemístěny do termobloku vyhřátého na 94 °C, kde probíhala esterifikace po dobu 3 hodin. Po třech hodinách byly vialky vychlazeny a obsah byl převrhnut do větších vialek s obsahem 0,5 ml 50 mM NaOH. Tato směs byla následně protřepaná a po rozdělení fází bylo 50 µl organické (spodní) fáze pipetováno do malých šroubovacích vialek s obsahem 0,9 ml isopropylalkoholu. Tyto vialky byly následně uzavřeny a vzorky byly analyzovány pomocí plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem.

3.9. Stanovení obsahu redukujících sacharidů pomocí DNS

Po kultivaci byl stanovován obsah zbytkových sacharidů v supernatantu pomocí DNS činidla. Činidlo bylo připraveno v objemu 200 ml. Navážka 2 g kyseliny 3,5–dinitrosalicylové byla rozpuštěna ve 100 ml vody, následně bylo přidáno 40 ml 2M NaOH. Po promíchání bylo přidáno 60 g vinanu sodno-draselného a roztok byl doplněn na objem 200 ml.

Dále byla sestavena kalibrační závislost pro glukózu a xylózu. Byly připraveny roztoky obou sacharidů o koncentraci 0,6; 1,2; 1,8; 2,4; 3 g/l. Do skleněné zkumavky bylo napipetováno 0,5 ml připraveného roztoku a přidáno 0,5 ml DNS. Pro blank byla místo vzorku sacharidu použita destilovaná voda. Zkumavky byly následně inkubovány ve vodní lázni při 70 °C po dobu 10 minut. Poté byly schlazeny na laboratorní teplotu a doplněny do objemu 10 ml. Následně probíhalo měření na spektrofotometru při vlnové délce 540 nm. Tímto způsobem byly měřeny i vzorky. Následně byla z koncentrační závislosti stanovena koncentrace sacharidů ve vzorku.

3.10. Porovnání produkce u adaptovaných a neadaptovaných kmenů

Pro porovnání produkce PHA u adaptovaných a neadaptovaných kmenů, byla prováděna kultivace v podmínkách jednotlivých experimentů, tedy při 40, 50 a 60 °C. Při 40 a 60 °C byla prováděna kultivace na glukóze a při 50 °C na xylóze. Nejdříve bylo zaočkováno inokulum s LB médiem z vybraných pasáží daného experimentu a neadaptovaný mikroorganismus. V případě kultivace při 60 °C bylo pro adaptovaný kmen připraveno inokulum z produkčního média, jelikož došlo k tomu, že tato bakterie v těchto podmínkách na LB médiu nerostla. Inokulum bylo následně po 24 hodinách přeočkováno do produkčního média, kde probíhala kultivace po dobu 72 hodin. Po této době byla stanovena produkce PHA pomocí plynové chromatografie a taktéž bylo PHA jednotlivých kmenů charakterizováno pomocí SEC-MALS.

3.11. Charakteristika PHA u adaptovaných kmenů

Charakterizace vlastností PHA u adaptovaných kmenů v porovnání s neadaptovanými, byla prováděna pomocí vylučovací chromatografie s detektorem měřící statický rozptyl světla ve více úhlech SEC-MALS.

Do šroubovacích vialek byla přichystána vysušená biomasa, ke které byl přidán chloroform. Takto připravené vialky byly zašroubovány a inkubovány v termobloku vyhřátém na 70 °C po dobu 12 hodin. Po ochlazení byly roztoky polymeru přefiltrovány na skleněnou misku, kde docházelo k odpaření chloroformu a tvorbě filmu. Následně byly odváženy 3 mg filmu do šroubovacích vialek, do kterých bylo přidáno 1,5 ml chloroformu. Vialky byly uzavřeny a byly inkubovány při 70 °C do úplného rozpuštění chloroformu. Roztok byl následně ochlazen a přefiltrován do malých šroubovacích vialek. Takto připravené vzorky byly následně analyzovány pomocí SEC-MALS.

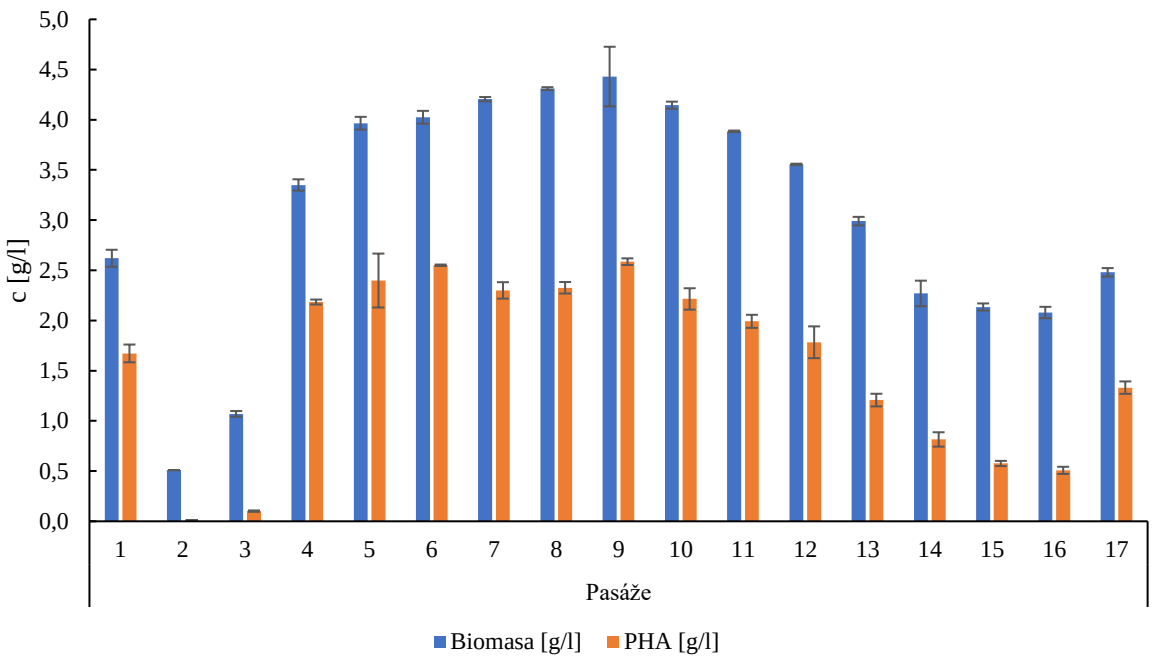
4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato práce se zabývala evolučním inženýrstvím u mikroorganismu *Schegelella thermodepolymerans* M15344. Byla prováděna adaptace na 40 °C a 60 °C na substrátech glukóza a xylóza. Taktéž byla prováděna repeated-batch kultivace při 50 °C na glukóze a xylóze. Po adaptaci i po repeated-batch kultivaci byl testován vliv adaptace na produkci.

4.1. Repeated-batch kultivace při 50 °C

V tomto experimentu byla prováděna repeated-batch kultivace mikroorganismu M15344 při 50 °C na glukóze a xylóze. Byla studována produkce PHA při jednotlivých pasážích, kdy z každé pasáže bylo po 72 h stanoveno množství biomasy, PHA, zbytkového cukru v médiu a pH.

Kultivace na xylóze probíhala po dobu 17 pasáží. Obrázek 9 zobrazuje vývoj kultivace a produkce PHA v jednotlivých pasážích. U první pasáže můžeme pozorovat koncentrace biomasy 2,62 g/l s procentuální zastoupením poly(3-hydroxybutyrátu) v biomase 63,8 hm.%. Následné dvě pasáže lze sledovat značný úpadek růstu a produkce. Ovšem od 4. pasáže došlo k nárůst biomasy i obsahu PHA. Do 11. pasáže docházelo ke konstantní růst i produkci, kdy se koncentrace biomasy pohybovala okolo 4 g/l a procentuální zastoupení PHA okolo 50 hm. %. Postupně začalo docházet k úpadku růstu mikroorganismu i produkce PHA, kde se procentuální zastoupení PHA dostávalo pouze k 40 hm. %. Toto mohlo být zapříčiněno stářím kultury po velice dlouhé kultivaci. Pro porovnání ze studie o produkci PHA u mikroorganismu *Schlegelella thermodepolymeran* DSM 15344, vycházela při kultivaci koncentrace biomasy 5,35 g/l s obsahem PHA 53,2 hm.% [9]. V našem případě při první pasáži, tedy neovlivněné dlouhodobou kultivací, byla koncentrace biomasy pouze 2,62 g/l s procentuálním zastoupení PHA 63,8 hm.%. nejvyšší koncentrace biomasy hodnoty 4,43 g/l s obsahem PHA 58,4 hm.%. Bakterie DSM 15344 je z německé sbírky, zatímco bakterie M15344 je původem z německé sbírky, ovšem byla znovu lyofilizována v Brně. Je tedy možné, že u bakterie došlo v průběhu lyofilizace k nějakým změnám, a díky tomu v průběhu všech experimentů docházelo k odchylkám od originální bakterie.



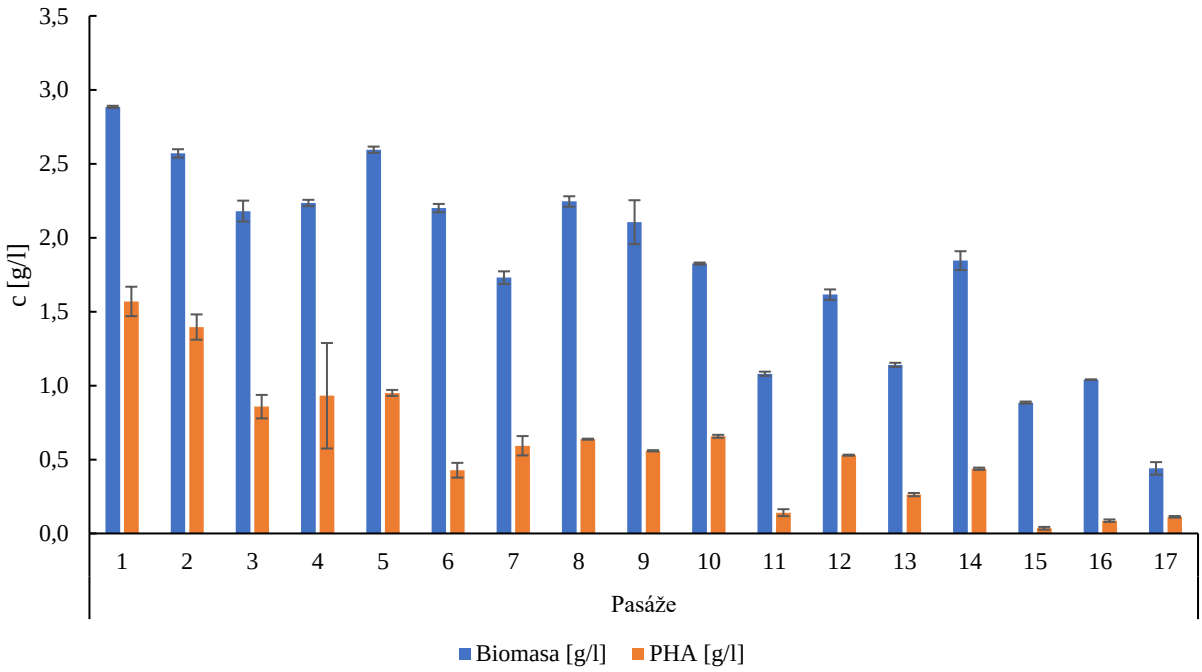
Obrázek 9. Kultivace mikroorganismu *Schegelella thermodepolymerans* M15344 na xylóze

Substrátem v médiu byla xylóza o koncentraci 20 g/l. Tabulka 5 vyobrazuje koncentraci cukru a pH po konci kultivace. U pasáže 2 můžeme vidět, že mikroorganismy nerostly, a i z koncentrace cukru v médiu na konci pasáže můžeme vyčíst, že většina cukru nebyla spotřebována. Dále lze pozorovat, že v případě, kdy mikroorganismy rostly i produkovaly, zůstávalo v médiu okolo 7 g/l cukru. V úpadku růstu při posledních pasážích bylo spotřebována pouze polovina substrátu z média. Lze tedy usoudit, že mikroorganismy již nebyly schopny růstu. Ve všech pasážích se hodnota pH pohybovala okolo 6, což značí aktivitu mikroorganismů, jelikož čisté médium má hodnotu pH okolo 7.

Tabulka 5. Koncentrace xylózy a pH v médiu po kultivaci při 50 °C

Pasáž	Biomasa [g/l]	Zbytkový cukr [g/l]	pH [-]
1	2,62 ± 0,08	9,95 ± 0,01	6,14
2	0,51 ± 0,00	16,61 ± 0,02	6,26
3	1,07 ± 0,03	10,74 ± 0,01	6,25
4	3,35 ± 0,06	10,26 ± 0,01	6,17
5	3,97 ± 0,06	2,11 ± 0,02	5,64
6	4,03 ± 0,06	7,73 ± 0,01	6,20
7	4,21 ± 0,06	6,91 ± 0,01	6,14
8	4,31 ± 0,02	7,05 ± 0,01	5,94
9	4,43 ± 0,01	7,06 ± 0,02	6,00
10	4,15 ± 0,30	7,23 ± 0,03	6,03
11	3,89 ± 0,04	6,37 ± 0,05	6,23
12	3,56 ± 0,01	8,25 ± 0,04	6,12
13	2,99 ± 0,01	12,91 ± 0,10	5,98
14	2,27 ± 0,04	10,04 ± 0,02	6,09
15	2,14 ± 0,04	8,11 ± 0,01	6,02
16	2,08 ± 0,04	10,13 ± 0,04	6,16
17	2,48 ± 0,04	11,47 ± 0,03	6,33

Při kultivaci na glukóze můžeme z obrázku 10 vyčíst, že v porovnání s kultivací na xylóze jsou hodnoty biomasy i PHA podstatně nižší. Tato kultivace byla taktéž prováděna po dobu 17 pasáží. Již na první pohled lze vidět, že se zde nevyskytuje žádný konstantní úsek. Nejvyšší hodnota jak biomasy, tak PHA, byla zpozorována u první pasáže, kdy koncentrace biomasy dosahovala 2,89 g/l a procentuální zastoupení PHA 54,39 hm. %. Podobný výsledek můžeme zaznamenat taktéž u druhé pasáže. Od druhé poloviny experimentu lze sledovat značný úpadek růstu i produkce PHA, kdy se v posledních třech pasážích hodnoty PHA pohybovaly okolo 0,1 g/l. V porovnání se studií zaměřující se na produkci PHA u mikroorganismu *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344, na glukóze byla koncentrace biomasy 3,34 g/l s procentuálním zastoupení PHA 37,15 hm. % [9]. V případě opakované kultivace byla hodnota biomasy v první pasáží o něco nižší, ovšem koncentrace PHA vyšší pouze o 0,3 g/l. U dalších pasáží se růst ani produkce k těmto hodnotám nedostaly.



Obrázek 10. Kultivace mikroorganismu *Schegelella thermodepolymerans* M15344 na glukóze

V tabulce 6 je vyobrazena koncentrace cukru a pH po konci daných pasáží. Počáteční koncentrace glukózy v médiu byla 20 g/l. Můžeme vidět, že v první polovině experimentu se koncentrace glukózy držela průměrně okolo 6 g/l. Od 11. pasáže můžeme sledovat jak úbytek růstu, tak úbytek zpracovaného cukru bakteriemi, což značí neschopnost růstu mikroorganismů po dlouhém období kultivace. V případě pH se opět pohybovalo okolo hodnoty 6, což značí určitou aktivitu mikroorganismů.

Tabulka 6. Koncentrace glukózy a pH v médiu po kultivaci při 50 °C

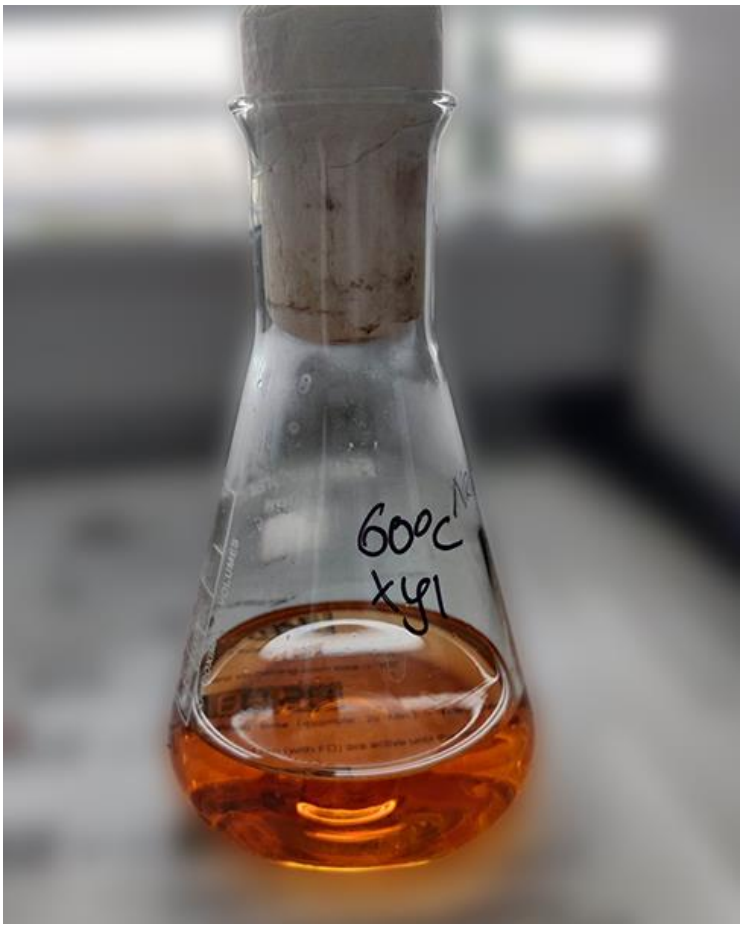
Pasáž	Biomasa [g/l]	Zbytkový cukr [g/l]	pH [-]
1	2,89 ± 0,01	5,17 ± 0,01	5,98
2	2,57 ± 0,03	5,78 ± 0,01	5,51
3	2,18 ± 0,07	5,69 ± 0,01	6,09
4	2,24 ± 0,02	5,89 ± 0,02	5,88
5	2,59 ± 0,02	8,32 ± 0,01	5,93
6	2,20 ± 0,03	6,50 ± 0,07	6,06
7	1,73 ± 0,04	6,51 ± 0,01	5,99
8	2,25 ± 0,04	4,39 ± 0,03	5,68
9	2,11 ± 0,15	6,80 ± 0,03	5,68
10	1,83 ± 0,01	7,83 ± 0,01	5,74
11	1,08 ± 0,01	13,13 ± 0,02	6,14
12	1,62 ± 0,04	10,43 ± 0,01	6,30
13	1,14 ± 0,01	12,13 ± 0,06	5,62
14	1,85 ± 0,06	8,24 ± 0,01	5,79
15	0,89 ± 0,01	9,47 ± 0,02	5,89
16	1,04 ± 0,01	16,71 ± 0,05	6,17
17	0,44 ± 0,04	11,93 ± 0,01	6,37

U této metody si můžeme povšimnout rozdílů u substrátů. Na xylóze došlo u druhé a třetí pasáže ke snížení růstu i produkce, od čtvrté pasáže se zvyšovaly jak hodnoty biomasy, tak procentuální zastoupení PHA. V porovnání s kultivací na glukóze, kde koncentrace biomasy a PHA byly téměř poloviční, lze pozorovat stálý úpadek růstu i produkce až k 17. pasáži. Lze tedy usoudit, že kontinuální a dlouhodobé kultivace nebudou příliš vhodné pro tuto bakterii, jelikož postupem času dochází jak ke snížení hodnot biomasy, tak produkovaného PHA.

4.2. Adaptivní evoluce na 60 °C

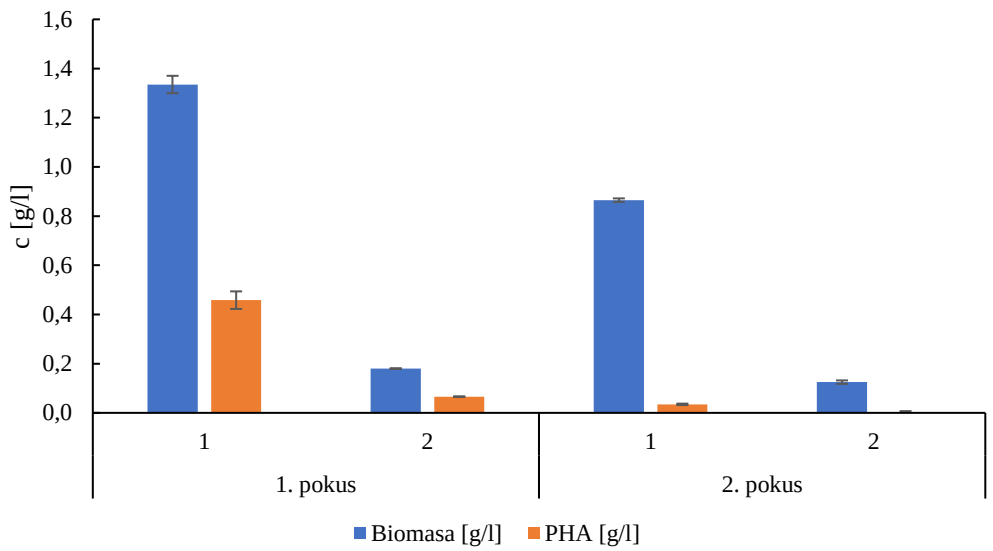
Při tomto experimentu bylo prováděno adaptování mikroorganismu *Schlegelella thermodepolymerans* M15344 na 60 °C. Pokus byl prováděn na glukóze a xylóze.

Při snaze adaptovat bakterii na 60 °C na xylóze byly provedeny bohužel pouze 2 pasáže. Důvodem byla degradace cukru při této teplotě, což zapříčinilo malý až téměř žádný růst mikroorganismu, kdy po dvou pasážích došlo k úplnému zastavení růstu. Byla provedena zkouška čistého média s xylózou po dobu 72 h při 60 °C. Na obrázku 11 lze pozorovat zabarvení, které u cukru nastalo. Z výzkumu M. del Pilar Buera [48] bylo zjištěno, že xylóza dosahuje karamelizačního zabarvení rychleji při teplotách nad 55 °C a při hodnotě pH 6 než glukóza, která je při vyšších teplotách stabilnější.



Obrázek 11. Zabarvení xylózy po 72 h inkubaci při 60 °C

Na obrázku 12 můžeme pozorovat, že maximální koncentrace biomasy v první pasáži dosahovala pouze 1,3 g/l s procentuálním zastoupení PHA 34 hm.%, u druhé pasáže došlo ke značnému úbytku jak biomasy, tak PHA. Tento samý proces nastal v případě druhého pokusu o kultivaci mikroorganismů při této teplotě a substrátu. V druhém případě byla již u první pasáže nižší koncentrace biomasy než u prvního pokusu. U druhé pasáže byla koncentrace biomasy pouze 0,13 g/l a zastoupení PHA téměř nulové.



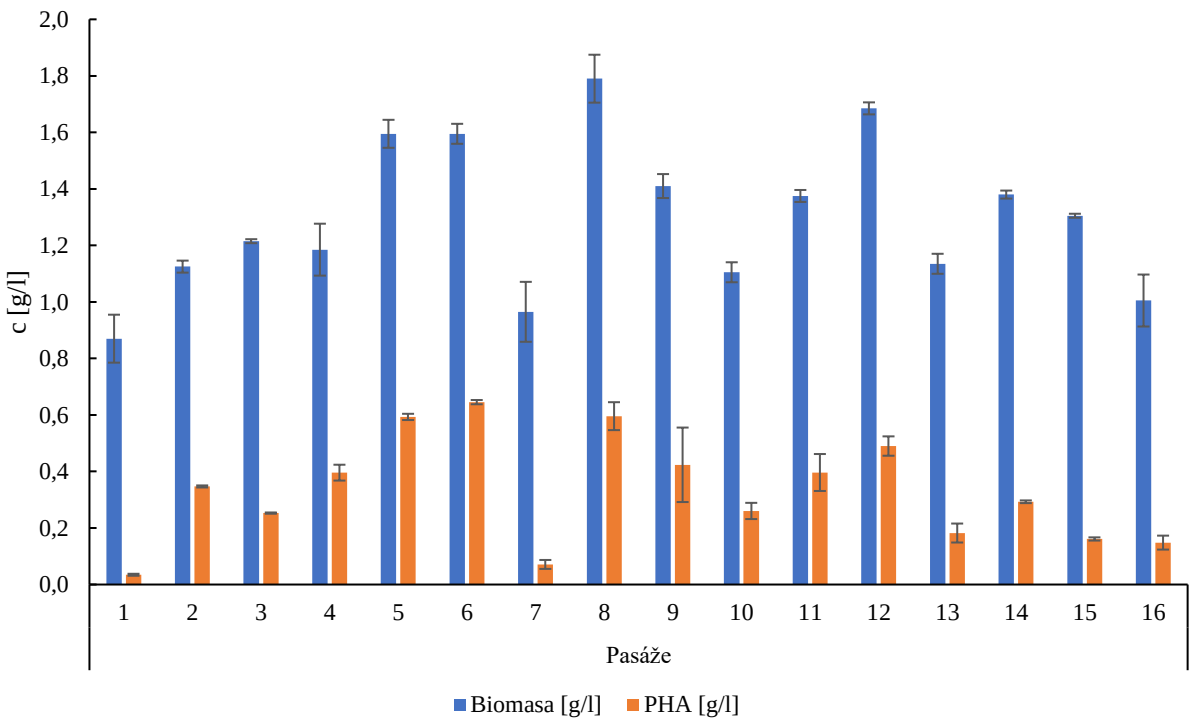
Obrázek 12. Dva pokusy o kultivaci mikroorganismu *Schegelella thermodepolymerans* při 60 °C na xylóze

V případě koncentrace cukru po jednotlivých pasážích, které lze vidět v tabulce 7, dosahovala koncentrace cukru počáteční koncentraci v médiu. Lze tedy říci, že mikroorganismy nebyly primárně schopny růstu v důsledku změn v médiu způsobené teplotou.

Tabulka 7. Koncentrace xylózy a hodnota pH jednotlivých pasáží při 60 °C u obou pokusů

Pokus	Pasáž	Biomasa [g/l]	Zbytkový cukr [g/l]	pH [-]
1.	**1**	1,34 ± 0,04	6,00 ± 0,01	6,32
	2	0,18 ± 0,01	16,27 ± 0,02	6,36
2.	**1**	0,87 ± 0,01	20,44 ± 0,01	6,04
	2	0,13 ± 0,01	22,60 ± 0,01	6,14

Na rozdíl od xylózy byly mikroorganismy na glukóze schopny růst i produkovat. V případě glukózy nedocházelo k degradaci uhlíkatého substrátu, kvůli které neměly mikroorganismy zdroj uhlíku, což zapříčinilo nemožnost jejich růstu. Hodnoty biomasy i PHA byly poměrně nízké a procentuální zastoupení PHA nepřevyšovalo 50 hm. %. Na Obrázek 13 můžeme sledovat, že u neadaptovaného kmenu v první pasáži byl minimální obsah PHA v biomase. V průběhu experimentu se začala zvyšovat koncentrace biomasy a taktéž koncentrace PHA. Tento nárůst PHA mohl být způsoben tím, že polyhydroxyalkanoáty můžou sloužit jako ochrana proti stresu [49], kterému byla vystavena tato bakterie. Jako nejlepší pasáž lze považovat 8., která dosahovala koncentrace biomasy až na 1,7 g/l s procentuálním zastoupení PHA 33 hm. %. Lze zde pozorovat kolísavý růst v průběhu jednotlivých pasáží. V případě posledních čtyřech pasážích můžeme opět pozorovat úbytek biomasy a PHA oproti předchozím pasážím.



Obrázek 13. Kultivace mikroorganismu *Schegelella thermodepolymerans* při 60 °C na glukóze

V tabulce 8 je vyobrazena koncentrace cukru v médiu po kultivaci. Můžeme pozorovat, že mikroorganismy využily pouze přibližně polovinu obsahu substrátu v médiu. V první pasáži u neadaptovaného kmene můžeme sledovat, že spotřeba substrátu byla na rozdíl od ostatních pasáží vyšší, ale s nejnižším obsahem biomasy. V průběhu adaptace se zvyšovala koncentrace biomasy, ale klesala spotřeba cukru. Výjimkou je čtvrtá pasáž, u které můžeme pozorovat nejvyšší spotřebu substrátu a taktéž nejnižší pH, které mělo hodnotu 5,09. V posledních pasážích dosahovala koncentrace substrátu na konci kultivace přes 18 g/l, což opět značí jako u předešlých kultivací neschopnost dalšího růstu mikroorganismů.

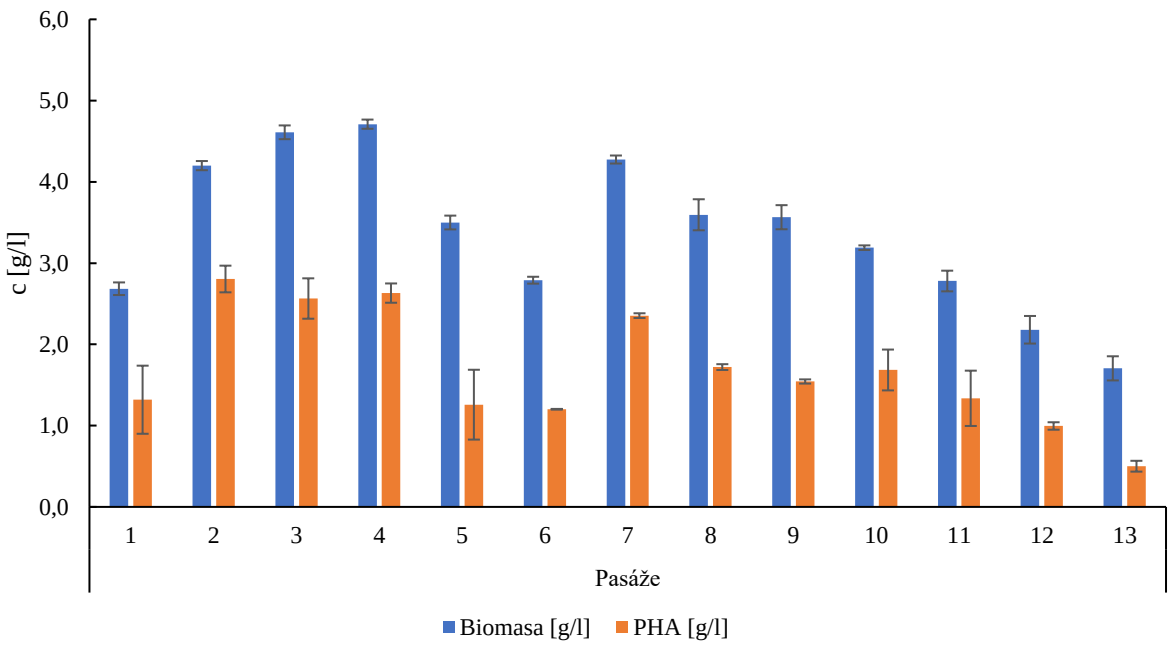
Tabulka 8. Koncentrace glukózy a hodnota pH jednotlivých pasáží při 60 °C

Pasáž	Biomasa [g/l]	Zbytkový cukr [g/l]	pH
1	0,87 ± 0,08	3,28 ± 0,01	6,40
2	1,13 ± 0,02	7,14 ± 0,01	6,05
3	1,22 ± 0,01	7,13 ± 0,01	6,14
4	1,19 ± 0,09	0,38 ± 0,00	5,09
5	1,60 ± 0,05	9,83 ± 0,03	5,66
6	1,60 ± 0,04	8,64 ± 0,01	6,02
7	0,97 ± 0,11	10,44 ± 0,01	6,10
8	1,79 ± 0,08	7,60 ± 0,01	5,92
9	1,41 ± 0,04	4,69 ± 0,03	5,99
10	1,11 ± 0,04	9,36 ± 0,05	5,93
11	1,38 ± 0,02	9,01 ± 0,02	6,01
12	1,69 ± 0,02	10,09 ± 0,09	6,30
13	1,14 ± 0,04	13,15 ± 0,02	6,18
14	1,38 ± 0,01	5,95 ± 0,03	6,23
15	1,31 ± 0,01	17,96 ± 0,01	6,34
16	1,01 ± 0,09	18,54 ± 0,02	6,19

4.3. Adaptivní evoluce na 40 °C

U tohoto experimentu byla prováděna adaptivní laboratorní evoluce mikroorganismu *Schlegelella thermodepolymerans* M15344 na 40 °C. Jako substráty byly použity glukóza a xylóza. Bylo prováděno stanovení koncentrace biomasy a PHA. Po každé pasáži byla stanovena koncentrace cukru v médiu a pH.

Na obrázku 14 je vyobrazena kultivace na xylóze. U tohoto experimentu bylo provedeno pouze 13 pasáží z důvodu následné kontaminace. Průměrně se hodnoty biomasy pohybovaly okolo 4 g/l s procentuálním zastoupením PHA okolo 50 hm. %. Nejlepší růstové i produkční pasáže se vyskytovaly na začátku experimentu, a to konkrétně druhá až čtvrtá, kdy hodnoty biomasy i PHA byly nejvyšší. Od 7. pasáže lze sledovat postupný úpadek jak růstu, tak produkce. U poslední pasáže spadla koncentrace biomasy až na 1,71 g/l s procentuálním zastoupením PHA pouze 29 hm. %.



Obrázek 14. Kultivace mikroorganismu *Schegelella thermodepolymerans* při 40 °C na xylóze

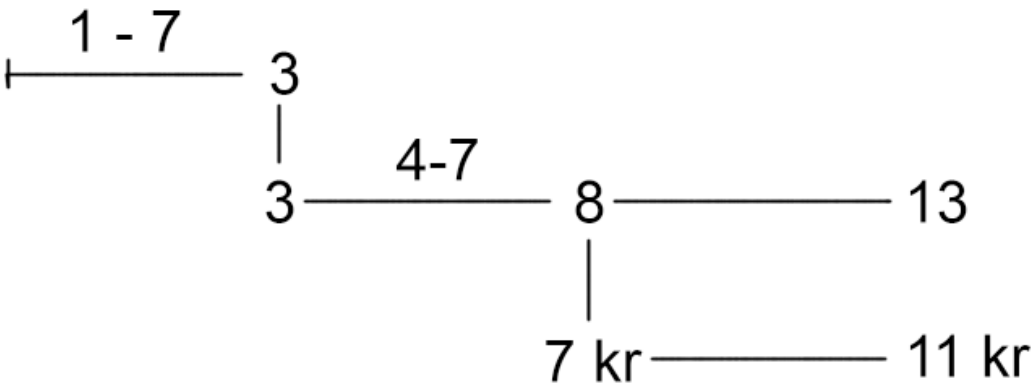
Co se týká spotřeby cukru při jednotlivých pasážích, můžeme v tabulce 9 pozorovat stejně jako u předchozích experimentů, že i po 72 h hodinách mikroorganismy nevyužily všechen substrát. Nejvyšší spotřeba substrátu byla zaznamenána u třetí pasáže, kde koncentrace byla 2,68 g/l. U posledních pasáže byl více než poloviční obsah cukru v médiu. Stejně jako u předchozích experimentů se pH pohybovalo okolo hodnoty 6.

Tabulka 9. Koncentrace xylózy a hodnota pH jednotlivých pasáží při 40 °C

Pasáže	Biomasa [g/l]	Zbytkový cukr [g/l]	pH
1	2,69 ± 0,08	6,86 ± 0,01	5,94
2	4,20 ± 0,06	8,09 ± 0,01	6,33
3	4,61 ± 0,08	2,68 ± 0,01	6,30
4	4,71 ± 0,06	5,76 ± 0,01	6,06
5	3,50 ± 0,08	5,91 ± 0,01	5,50
6	2,79 ± 0,04	10,63 ± 0,07	6,20
7	4,28 ± 0,05	6,78 ± 0,05	6,19
8	3,60 ± 0,19	8,80 ± 0,04	6,08
9	3,57 ± 0,15	8,79 ± 0,01	6,03
10	3,19 ± 0,03	10,66 ± 0,01	6,12
11	2,78 ± 0,13	11,03 ± 0,02	6,31
12	2,18 ± 0,17	8,79 ± 0,01	6,31
13	1,71 ± 0,15	13,19 ± 0,21	6,33

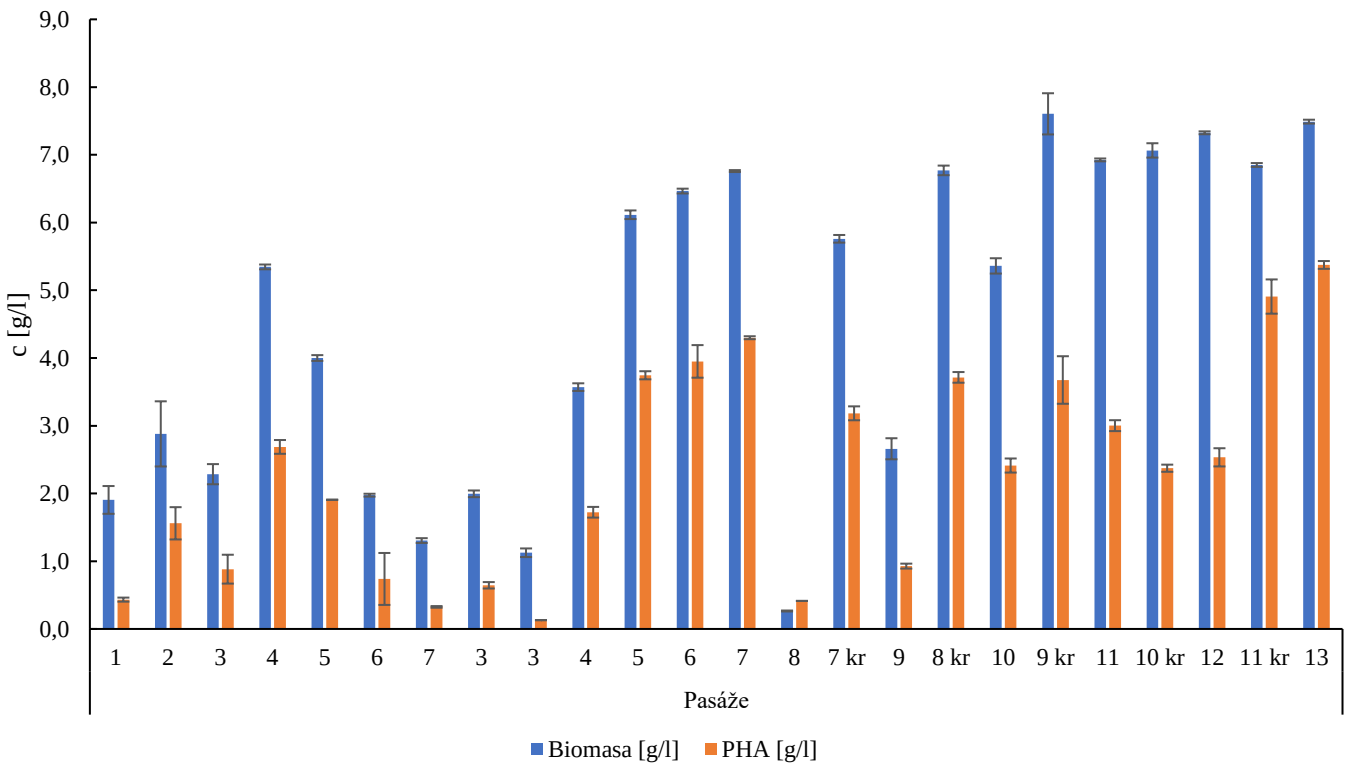
V případě kultivace na glukóze byl zaznamenán vyšší výskyt kontaminací. Tomuto bylo z důvodu, že glukóza na rozdíl od xylózy je běžný substrát pro většinu mikroorganismů. Dalším faktorem pro vyšší výskyt kontaminace byla nízká teplota. Při výskytu kontaminace bylo zaočkováno z kryo zkumavek z předešlých pasáží. Postup zobrazuje schéma na obrázek 15. U sedmé pasáže byl zaznamenán výskyt kontaminace, bylo tedy zaočkováno z kryo zkumavky,

které se připravovaly jednou za určitou pasáž, bylo tedy potřeba se vrátit až do třetí pasáže. Zde se opět vyskytla kontaminace, tudíž bylo opět zaočkováno ze třetí pasáže. U osmé pasáže došlo k velkému úpadku růstu, a bylo zaočkováno z kryo zkumavky ze sedmé pasáže. Ačkoli bylo zaočkováno z kryo zkumavky, paralelně byla dál prováděna kultivace od osmé pasáže.



Obrázek 15. Schéma pasáží při 40 °C na glukóze

Na obrázku 16 můžeme pozorovat, že do sedmé pasáže byly hodnoty velice kolísavé. Ačkoli u tohoto kroku mikroorganismy nerostly a koncentrace biomasy dosahovala pouze 2 g/l, v následných pasážích dosahovaly koncentrace biomasy až 4,5 g/l s procentuálním zastoupením PHA okolo 60 hm. %. U osmé pasáže došlo k úpadku růstu a následně byla prováděna paralelní kultivace sedmé pasáže z kryo zkumavky (označené „kr“) a osmé pasáže. Na rozdíl od předchozích experimentů, kde byl vidět okolo 10. pasáže značný úpadek růstu, v tomto případě docházelo k nárůstu koncentrace biomasy i PHA a u 13. pasáže dosahovala až 7,5 g/l s procentuálním zastoupením PHA 71,75 hm. %. Při této pasáži bylo tedy dosaženo vyšší koncentrace biomasy i PHA než při optimální kultivaci na xylóze při 50 °C.



Obrázek 16. Kultivace mikroorganismu *Schegelella thermodepolymerans* při 40 °C na glukóze

U stanovené koncentrace cukru v médiu po konci každé pasáže z tabulky 10 můžeme vyčíst, že v pasážích, kdy docházelo k vysokému nárůstu i produkce, se koncentrace zbytkového cukru v médiu pohybovala od 0,5 g/l do 2,5 g/l. Na rozdíl od ostatních experimentů, kdy se hodnoty cukru pohybovaly okolo 7 g/l, zde lze také sledovat, že mikroorganismy zpracovávaly většinu substrátu v médiu. U pasáží, kde byly stanoveny nízké hodnoty biomasy se koncentrace pohybuje okolo 10 g/l a docházelo tedy k polovičnímu zpracování substrátu. V porovnání s kultivací na xylóze, jde vidět, že glukóza byla zpracována téměř všechna, na rozdíl od xylózy, kde zůstávala značná část substrátu v médiu i po konci kultivace.

Tabulka 10. Koncentrace glukózy a hodnota pH jednotlivých pasáží při 40 °C

Pasáže	Biomasa [g/l]	Zbytkový cukr [g/l]	pH [-]
1	1,91 ± 0,21	8,33 ± 0,19	6,16
2	2,88 ± 0,48	0,38 ± 0,01	5,09
3	2,29 ± 0,15	6,59 ± 0,02	6,35
4	5,35 ± 0,04	0,98 ± 0,00	5,36
5	4,00 ± 0,04	6,23 ± 0,02	4,50
6	1,98 ± 0,02	10,83 ± 0,04	5,98
7	1,31 ± 0,04	10,56 ± 0,04	6,22
3	2,00 ± 0,05	10,97 ± 0,05	5,99
3	1,13 ± 0,06	15,13 ± 0,01	6,01
4	3,57 ± 0,06	7,55 ± 0,01	6,28
5	6,12 ± 0,06	3,01 ± 0,01	6,38
6	6,47 ± 0,04	2,50 ± 0,01	6,40
7	6,76 ± 0,01	2,03 ± 0,03	6,22
8	0,27 ± 0,01	17,23 ± 0,04	5,13
7 kr	5,76 ± 0,06	5,31 ± 0,01	6,18
9	2,66 ± 0,16	10,83 ± 0,04	5,98
8 kr	6,77 ± 0,07	2,81 ± 0,01	5,56
10	5,36 ± 0,11	3,98 ± 0,01	6,00
9 kr	7,61 ± 0,30	0,91 ± 0,01	6,06
11	6,93 ± 0,02	0,64 ± 0,00	5,74
10 kr	7,07 ± 0,11	1,93 ± 0,05	6,25
12	7,33 ± 0,02	0,78 ± 0,01	6,00
11 kr	6,85 ± 0,03	0,36 ± 0,01	6,42
13	7,49 ± 0,03	2,53 ± 0,01	6,16

4.4. Charakterizace PHA adaptovaných kmenů

V tomto experimentu bylo prováděno porovnání růstu a produkce PHA adaptovaných a neadaptovaných kmenů. Následně bylo prováděno testování vlivu adaptace jednotlivých mikroorganismů na molekulovou váhu výsledného polymeru pomocí SEC-MALS.

Bylo prováděno porovnání růstu a produkce PHA u původní bakterie s kmenem z 10. pasáže u repeated-batch experimentu. V tabulce 11 lze vidět, že u 10. pasáže byla hodnota biomasy o 2 g/l vyšší než u originálního kmene. Taktéž zastoupení PHA je u originálního kmene podstatně nižší než u 10. pasáže experimentu. V závislosti na růstu lze pozorovat, že ačkoli 10. pasáž obsahovala koncentraci biomasy 4,57 g/l, spotřeba substrátu v porovnání s kontrolou byla pouze o 2 g/l nižší. Co se týká molekulové hmotnosti (M_w), tak polymery dosahovaly podobných hodnot jak u kontrolní, tak u bakterie z 10. pasáže. Řetězce byly tedy podobně velké. U polydisperzity (PDI) si lze povšimnout opět podobných hodnot, které značí, že mají stejně heterogenní zastoupení hmotnosti polymerů.

Tabulka 11. Porovnání produkce a charakteristika PHA na xylózy při 50 °C

	Biomasa [g/l]	**PHA [g/l]**	**M_w [kDa]**	**PDI [-]**	**Zbytkový cukru [g/l]**	**pH [-]**
10. pasáž	4,57 ± 0,02	2,34 ± 0,05	303,72 ± 0,05	1,42 ± 0,02	7,33 ± 0,01	6,15
Kontrola	2,62 ± 0,06	0,78 ± 0,00	334,97 ± 0,05	1,45 ± 0,08	9,26 ± 0,01	5,62

U adaptivní evoluce při 40 °C na glukóze, byla vybrána jako zajímavá pasáž 13., z důvodu vysoké koncentrace biomasy a zastoupení PHA. Tabulka 12 zobrazuje stanovené hodnoty u kultivace. U 13. pasáže po adaptivní evoluci obsahovala vysokou koncentraci biomasy i PHA. U 13. pasáže byla koncentrace biomasy vyšší o 2,25 g/l a PHA dosahovalo zastoupení až 56,5 hm.% PHA, zatímco zastoupení PHA u kontroly bylo pouze 42,3 hm.% PHA. V případě koncentrace cukru v médiu po kultivaci lze pozorovat, že adaptovaný kmen spotřeboval téměř všechen cukru, na rozdíl od kontroly, u které byla spotřeba cukru poloviční z počáteční koncentrace 20 g/l. U molekulové hmotnosti PHA, stejně jako v předchozím případě, jsou hodnoty velice podobné. Taktéž hodnota polydisperzity se pohybuje okolo 1,4.

Tabulka 12. Porovnání produkce a charakteristika PHA na glukóze při 40 °C

	Biomasa [g/l]	**PHA [g/l]**	**M_w [kDa]**	**PDI [-]**	**Zbytkový cukr [g/l]**	**pH [-]**
13. pasáž	6,74 ± 0,03	3,80 ± 0,07	316,63 ± 0,55	1,43 ± 0,00	1,48 ± 0,01	6,24
Kontrola	4,49 ± 0,17	1,89 ± 0,18	326,55 ± 0,72	1,39 ± 0,06	9,67 ± 0,01	6,18

V případě adaptivní evoluce při 60 °C na glukóze byla vybrána 8. pasáž vhodná k porovnání s neadaptovaným kmenem. U adaptovaného kmenu jsme se setkali s problémem, že při kultivaci inokula na LB médiu, mikroorganismus nebyl schopný při 60 °C růst. Vyzkoušeli jsme tedy inokulum s produkčním médiem, jelikož mikroorganismus může být adaptovaný na konkrétní podmínky média při této teplotě. Při těchto podmínkách byl mikroorganismus schopen růstu a mohl být následně přeočkován do produkčního média. V tabulce 13 lze vidět značný rozdíl mezi adaptovaným kmenem a kontrolou. Kontrola nebyla schopna téměř žádného růstu ani produkce PHA při těchto podmínkách. Hodnoty se pohybovaly pouze v desetinných číslech. V případě adaptovaného kmene byla koncentrace podstatně vyšší a bylo taktéž stanoveno vyšší zastoupení PHA v biomase. Ve spotřebě cukru lze taktéž sledovat, že u kontroly byla spotřeba cukru značně nižší než u adaptovaného kmene a pH se pohybovalo okolo hodnoty 7, což značí minimální až žádnou aktivitu mikroorganismu. I u molekulové hmotnosti PHA lze pozorovat rozdíl mezi adaptovaným kmenem a kontrolou. Rozdíl v hmotnosti je přes 200 kDa, což může být způsobeno adaptací daného mikroorganismu na tuto teplotě, zatímco u kontroly byla hmotnost vysoká z důvodu vysokého stresu.

Tabulka 13. Porovnání produkce a charakteristika PHA na glukóze při 60 °C

	Biomasa [g/l]	**PHA [g/l]**	**M_w [kDa]**	**PDI [-]**	**Zbytkový cukr [g/l]**	**pH [-]**
8. pasáž	1,39 ± 0,07	0,47 ± 0,09	200,09 ± 1,28	1,42 ± 0,06	8,57 ± 0,01	6,00
Kontrola	0,22 ± 0,05	0,06 ± 0,01	419,47 ± 10,59	1,41 ± 0,06	14,92 ± 0,01	7,01

5. ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala studiem produkce PHA u bakterie *Schlegelella thermodepolymerans* M15344. Byla studována produkce u repeated-batch kultivace na glukóze a xylóze při 50 °C a taktéž byla prováděna adaptivní laboratorní evoluce pomocí teplotního stresu při 60 °C a 40 °C. V jednotlivých pasážích byla stanovena koncentrace biomasy, PHA, koncentrace zbytkového cukru a pH. Po konci adaptačních experimentů byla vybrána nejlepší pasáž, která byla porovnána s kontrolou. Následně u adaptovaných kmenů a kontroly byla provedena analýza SEC-MALS, kde byl pozorován vliv adaptace na molekulovou hmotnost daných produkovaných polymerů.

U repeated-batch kultivace bylo při 50 °C na xylóze zjištěno, že bakterie byla schopna vyšší produkce a růstu do 11. pasáže, po které začalo docházet ke značnému úpadku jak růstu, tak produkce. Značí to tedy, že by bakterie nebyla vhodná k dlouhodobější a kontinuální kultivaci. Nejvyšší zaznamenaná koncentrace PHA byla u 9. pasáže. Při porovnání s kontrolou a 10. pasáží byl pozorován značný rozdíl v růstu i produkci. Kdy u kontroly byly hodnoty PHA velice nízké, a to pouze 0,78 g/l, zatímco u 10. pasáže dosahovala koncentrace PHA 2,34 g/l. V případě repeated-batch kultivace na glukóze, což pro bakterii není optimální substrát, jsme se setkaly s velice nízkým růstem již od začátku experimentu s následným postupným úpadkem růstu k velice nízkým hodnotám.

Dále byla prováděna adaptace mikroorganismu M15344 na 60 °C. V případě xylózy nebylo možno pokračovat s experimentem z důvodu degradačních změn cukru v médiu při této teplotě. Tato změna v médiu způsobila, že mikroorganismus nebyl schopný růstu. U glukózy bylo provedeno 16 pasáží a ačkoli produkce PHA byla nižší, než u optimálních 50 °C, lze říci, že se bakterie na tuto teplotu byla schopna adaptovat. Při produkci 8. pasáže proti kontrole bylo dokázáno, že kontrolní mikroorganismus nebyl schopen velkého růstu ani produkce, narozdíl od adaptovaného kmene, který byl schopen růst i produkovat při těchto podmínkách.

U adaptace mikroorganismu na 40 °C, byl na xylóze pozorován růst k 5. pasáží a následně byl opět viděn úpadek růstu v průběhu experimentu až k poslední pasáži. Ačkoli by mělo být 50 °C pro tuto bakterii optimální, byly i při 40 °C pozorovány podobné hodnoty biomasy i PHA. V případě kultivace na glukóze bylo možné sledovat ke konci experimentu velice vysoké hodnoty biomasy i PHA, dokonce vyšší než při optimálních 50 °C. Adaptovaný kmen u 13. pasáže dosahoval koncentrace biomasy 7,49 g/l s procentuálním zastoupením PHA 71,75 hm.%. U porovnávací kultivace adaptovaného kmene z 13. pasáže a kontroly, bylo taktéž pozorování, že adaptovaný kmen dosahoval vyšších hodnot biomasy i PHA. Lze tedy říci, že se i v tomto případě podařilo adaptovat mikroorganismus na tuto teplotu s vyšší produkcí než při optimálních podmínkách.

Při analýze SEC-MALS izolovaného polymeru z biomasy adaptovaných mikroorganismů a kontroly byla stanovena molekulární hmotnost PHA daných bakterií a hodnota polydisperzity. Ve všech případech se hodnota polydisperzity pohybovala okolo 1,4 a molekulová hmotnost se pohybovala v rozmezí 300-340 kDa. Jediný značný rozdíl v hmotnosti lze zaznamenat při 60 °C, kdy u adaptovaného kmene byla hmotnost pouze 200

kDa a u kontroly dosahovala hodnoty 419 kDa. Takto velký rozdíl mohl být způsoben tím, že u kontroly bakterie docházelo k vysokému stresu kvůli teplotě.

6. ZDROJE

[1]OBULISAMY, Parthiba Karthikeyan a Sanjeet MEHARIYA. Polyhydroxyalkanoates from extremophiles: A review. *Bioresource Technology* [online]. 2021, **325.** ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2020.124653

[2]IRWIN, Jane A. Overview of extremophiles and their food and medical applications. *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles* [online]. Elsevier, 2020, 2020, s. 65-87. ISBN 9780128183229. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-818322-9.00006-X

[3]ZHU, Daochen, Wasiu Adewale ADEBISI, Fiaz AHMAD, Sivasamy SETHUPATHY, Blessing DANSO a Jianzhong SUN. Recent Development of Extremophilic Bacteria and Their Application in Biorefinery. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology [online]. 2020, 8. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2020.00483

[4]SATYANARAYANA, T. & RAGHUKUMAR, C & Shivaji, Sisinthy. (2005). Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. Current science. 89. 78-90.

[5]PATI, Swatilekha, Somok BANERJEE, Aveepsa SENGUPTA, Jayshree SARMA, Shakila SHAHEEN, Shivendra TENGURIA a Ashutosh KUMAR. Adaptation strategies of thermophilic microbes. In: Bacterial Survival in the Hostile Environment [online]. Elsevier, 2023, 2023, s. 231-249. ISBN 9780323918060. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-91806-0.00012-6

[6]VERMA, Digvijay, Vinay KUMAR a Tulasi SATYANARAYANA. Genomic attributes of thermophilic and hyperthermophilic bacteria and archaea. World Journal of Microbiology and Biotechnology [online]. 2022, 38(8). ISSN 0959-3993. Dostupné z: doi:10.1007/s11274-022-03327-z

[7]JOHNSON, D.B. Extremophiles: Acidic Environments. *Encyclopedia of Microbiology* [online]. Elsevier, 2009, 2009, s. 107-126. ISBN 9780123739445. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012373944-5.00278-9

[8]ELBANNA, Khaled, Tina LÜTKE-EVERSLOH, Stefanie VAN TRAPPEN, Joris MERGAERT, Jean SWINGS a Alexander STEINBÜCHEL. Schlegelella thermodepolymerans gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic bacterium that degrades poly(3-hydroxybutyrate-co-3-mercaptopropionate). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology [online]. 2003, 53(4), 1165-1168. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.02562-0

[9]KOURILOVA, Xenie, Iva PERNICOVA, Karel SEDLAR, Jana MUSILOVA, Petr SEDLACEK, Michal KALINA, Martin KOLLER a Stanislav OBRUCA. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a thermophilic strain of Schlegelella thermodepolymerans from xylose rich substrates. Bioresource Technology [online]. 2020, 315. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2020.123885

[10]MUSILOVA, Jana, Xenie KOURILOVA, Matej BEZDICEK, Martina LENGEROVA, Stanislav OBRUCA, Helena SKUTKOVA, Karel SEDLAR a Howard OCHMAN. First Complete Genome of the Thermophilic Polyhydroxyalkanoates-Producing Bacterium Schlegelella thermodepolymerans DSM 15344. Genome Biology and Evolution [online]. 2021, 13(4). ISSN 1759-6653. Dostupné z: doi:10.1093/gbe/evab007

[11] RADDADI, Noura, Ameur CHERIF, Daniele DAFFONCHIO, Mohamed NEIFAR a Fabio FAVA. Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. Applied Microbiology and Biotechnology [online]. 2015, 99(19), 7907-7913. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-015-6874-9

[12] SINGH SAHARAN, Baljeet, Anita GREWAL a Pardeep KUMAR. Biotechnological Production of Polyhydroxyalkanoates: A Review on Trends and Latest Developments. Chinese Journal of Biology [online]. 2014, 2014, 1-18. ISSN 2314-7474. Dostupné z: doi:10.1155/2014/802984

[13] SARMA, Jayshree, Aveepsa SENGUPTA, Mani Kankana LASKAR, Shatabdi SENGUPTA, Shivendra TENGURIA a Ashutosh KUMAR. Microbial adaptations in extreme environmental conditions. In: Bacterial Survival in the Hostile Environment [online]. Elsevier, 2023, 2023, s. 193-206. ISBN 9780323918060. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-91806-0.00007-2

[14] DI DONATO, Paola, Ilaria FINORE, Annarita POLI, Barbara NICOLAUS a Licia LAMA. The production of second generation bioethanol: The biotechnology potential of thermophilic bacteria. Journal of Cleaner Production [online]. 2019, 233, 1410-1417. ISSN 09596526. Dostupné z: doi:10.1016/j.jclepro.2019.06.152

[15] ECONOMOU, Ch.N., A. MAKRI, G. AGGELIS, S. PAVLOU a D.V. VAYENAS. Semi-solid state fermentation of sweet sorghum for the biotechnological production of single cell oil. Bioresource Technology [online]. 2010, 101(4), 1385-1388. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2009.09.028

[16] MARGESIN, Rosa a Franz SCHINNER. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. Extremophiles [online]. 2001, 5(2), 73-83. ISSN 1431-0651. Dostupné z: doi:10.1007/s007920100184

[17] BOWNIK, Adam a Zofia STĘPNIEWSKA. Ectoine as a promising protective agent in humans and animals. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology [online]. 2016, 67(4), 260-265. ISSN 0004-1254. Dostupné z: doi:10.1515/aiht-2016-67-2837

[18] CHEN, Guo-Qiang a Xiao-Ran JIANG. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. Current Opinion in Biotechnology [online]. 2018, 50, 94-100. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2017.11.016

[19] RAZA, Zulfiqar Ali, Sharjeel ABID a Ibrahim M. BANAT. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation* [online]. 2018, **126**, 45-56. ISSN 09648305. Dostupné z: doi:10.1016/j.ibiod.2017.10.001

[20] ZHENG, Yang, Jin-Chun CHEN, Yi-Ming MA a Guo-Qiang CHEN. Engineering biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) for diversity and cost reduction. Metabolic Engineering [online]. 2020, 58, 82-93.ISSN 10967176. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymben.2019.07.004

[21] LEE, Sang Yup. Bacterial polyhydroxyalkanoates. Biotechnology and Bioengineering [online]. 1996, 49(1), 1-14. ISSN 00063592. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19960105)49:11::AID-BIT13.0.CO;2-P

[22] ANJUM, Anbreen, Mohammad ZUBER, Khalid Mahmood ZIA, Aqdas NOREEN, Muhammad Naveed ANJUM a Shazia TABASUM. Microbial production of

polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. International Journal of Biological Macromolecules [online]. 2016, 89, 161-174. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069

[23] GIUBILINI, Alberto, Federica BONDIOLI, Massimo MESSORI, Gustav NYSTRÖM a Gilberto SIQUEIRA. Advantages of Additive Manufacturing for Biomedical Applications of Polyhydroxyalkanoates. Bioengineering [online]. 2021, 8(2). ISSN 2306-5354. Dostupné z: doi:10.3390/bioengineering8020029

[24] WINNACKER, Malte. Polyhydroxyalkanoates: Recent Advances in Their Synthesis and Applications. *European Journal of Lipid Science and Technology* [online]. 2019, **121**(11). ISSN 1438-7697. Dostupné z: doi:10.1002/ejlt.201900101

[25] PRIYADARSHI, Siddharth, Anubha SHUKLA a Babasaheb Bhaskarrao BORSE. Polyhydroxyalkanoates: Role of Ralstonia eutropha. *International Journal of Biomedical and Advance Research* [online]. 2014, **5**(2), 68-76. ISSN 2229-3809. Dostupné z: doi:10.7439/ijbar.v5i2.639

[26] SINGH, Akhilesh Kumar a Nirupama MALLICK. SCL-LCL-PHA copolymer production by a local isolate, Pseudomonas aeruginosa MTCC 7925. Biotechnology Journal [online]. 2009, 4(5), 703-711. ISSN 18606768. Dostupné z: doi:10.1002/biot.200800307

[27] MOZEJKO-CIESIELSKA, Justyna, Karolina SZACHERSKA a Paulina MARCINIAK. Pseudomonas Species as Producers of Eco-friendly Polyhydroxyalkanoates. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2019, **27**(6), 1151-1166. ISSN 1566-2543. Dostupné z: doi:10.1007/s10924-019-01422-1

[28] SHARMA, Vibhuti, Rutika SEHGAL a Reena GUPTA. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Properties and Modifications. Polymer [online]. 2021, 212. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2020.123161

[29] TAGUCHI, S., T. IWATA, H. ABE, Y. DOI a S.N. AQIDA. Poly(hydroxyalkanoate)s. In: *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering* [online]. Elsevier, 2016, 2016. ISBN 9780128035818. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-803581-8.09806-4

[30] TURCO, Rosa, Gabriella SANTAGATA, Iolanda CORRADO, Cinzia PEZZELLA a Martino DI SERIO. In vivo and Post-synthesis Strategies to Enhance the Properties of PHB-Based Materials: A Review. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology [online]. 2021, 8 ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2020.619266

[31] SAITO, Yuji, Shigeo NAKAMURA, Masaya HIRAMITSU a Yoshiharu DOI. Microbial Synthesis and Properties of Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). Polymer International [online]. 1996, 39(3), 169-174. ISSN 0959-8103. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1097-0126(199603)39:3169::AID-PI4533.0.CO;2-Z

[32] BAYARI, Sevgi a Feride SEVERCAN. FTIR study of biodegradable biopolymers: P(3HB), P(3HB-co-4HB) and P(3HB-co-3HV). Journal of Molecular Structure [online]. 2005, 744-747, 529-534. ISSN 00222860. Dostupné z: doi:10.1016/j.molstruc.2004.12.029

[33] CHEN, Guo-Qiang a Xiao-Ran JIANG. Engineering bacteria for enhanced polyhydroxyalkanoates (PHA) biosynthesis. *Synthetic and Systems*

Biotechnology [online]. 2017, **2**(3), 192-197. ISSN 2405805X. Dostupné z: doi:10.1016/j.synbio.2017.09.001

[34] LU, Jingnan, Ryan C. TAPPEL a Christopher T. NOMURA. Mini-Review: Biosynthesis of Poly(hydroxyalkanoates). Polymer Reviews [online]. 2009, 49(3), 226-248. ISSN 1558-3724. Dostupné z: doi:10.1080/15583720903048243 [13] doi:10.1155/2013/581684

[35] KUNASUNDARI, B. a K. SUDESH. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Express Polymer Letters* [online]. 2011, **5**(7), 620-634. ISSN 1788618X. Dostupné z: doi:10.3144/expresspolymlett.2011.60

[36] MEEREBOER, Kjeld W., Manjusri MISRA a Amar K. MOHANTY. Review of recent advances in the biodegradability of polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastics and their composites. Green Chemistry [online]. 2020, 22(17), 5519-5558. ISSN 1463-9262. Dostupné z: doi:10.1039/D0GC01647K

[37] JIA, Kaimin, Ruikai CAO, Duy H. HUA a Ping LI. Study of Class I and Class III Polyhydroxyalkanoate (PHA) Synthases with Substrates Containing a Modified Side Chain. Biomacromolecules [online]. 2016, 17(4), 1477-1485. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biomac.6b00082

[38] ONG, Su Yean, Jiun Yee CHEE a Kumar SUDESH. Degradation of Polyhydroxyalkanoate (PHA): a Review. Journal of Siberian Federal University. Biology. 2017, 10(2), 21-225. ISSN 19971389. Dostupné z: doi:10.17516/1997-1389-0024

[39] KOLLER, Martin, Anna SALERNO, Alexander MUHR, Angelika REITERER, Emo CHIELLINI, Sergio CASELLA, Predrag HORVAT a Gerhart BRAUNEGG. Whey Lactose as a Raw Material for Microbial Production of Biodegradable Polyesters. SALEH, Hosam El-Din, ed. Polyester [online]. InTech, 2012, 2012-09-26. ISBN 978-953-51-0770-5. Dostupné z: doi:10.5772/48737

[40] MASOOD, Farha, Tariq YASIN a Abdul HAMEED. Polyhydroxyalkanoates – what are the uses? Current challenges and perspectives. Critical Reviews in Biotechnology [online]. 2014, 35(4), 514-521. ISSN 0738-8551. Dostupné z: doi:10.3109/07388551.2014.913548

[41] DHANIA, Sunena, Manju BERNELA, Ruma RANI, Minakshi PARSAD, Sapna GREWAL, Santosh KUMARI a Rajesh THAKUR. Scaffolds the backbone of tissue engineering: Advancements in use of polyhydroxyalkanoates (PHA). International Journal of Biological Macromolecules [online]. 2022, 208, 243-259 [cit. 2023-04-10]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.03.030

[42] RAY, Subhasree a Vipin Chandra KALIA. Biomedical Applications of Polyhydroxyalkanoates. *Indian Journal of Microbiology* [online]. 2017, **57**(3), 261-269. ISSN 0046-8991. Dostupné z: doi:10.1007/s12088-017-0651-7

[43] ZHU, Zhengming, Juan ZHANG, Xiaomei JI, Zhen FANG, Zhimeng WU, Jian CHEN a Guocheng DU. Evolutionary engineering of industrial microorganisms-strategies and applications. Applied Microbiology and Biotechnology [online]. 2018, 102(11), 4615-4627. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-018-8937-1

[44] DRAGOSITS, Martin a Diethard MATTANOVICH. Adaptive laboratory evolution – principles and applications for biotechnology. *Microbial Cell Factories* [online]. 2013, **12**(1). ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/1475-2859-12-64

[45] CHAE, Tong Un, So Young CHOI, Je Woong KIM, Yoo-Sung KO a Sang Yup LEE. Recent advances in systems metabolic engineering tools and strategies. Current Opinion in Biotechnology [online]. 2017, 47, 67-82. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2017.06.007

[46] LASTIRI-PANCARDO, Gustavo M. a José UTRILLA. Evolutionary Engineering of Microorganisms to Overcome Toxicity During Lignocellulose Hydrolysates Utilization. In: GOSSET, Guillermo, ed. Engineering of Microorganisms for the Production of Chemicals and Biofuels from Renewable Resources [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017, 2017-01-28, s. 181-200. ISBN 978-3-319-51728-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-51729-2_7

[47] PETRI, R. Dealing with complexity: evolutionary engineering and genome shuffling. Current Opinion in Biotechnology [online]. 2004, 15(4), 298-304. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2004.05.005

[48] BUERA, M. del PILAR, JORGE CHIRIFE, SILVIA L. RESNIK a ROBERTO D. LOZANO. Nonenzymatic Browning in Liquid Model Systems of High Water Activity: Kinetics of Color Changes due to Caramelization of Various Single Sugars. Journal of Food Science [online]. 1987, 52(4), 1059-1062. ISSN 0022-1147. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2621.1987.tb14275.x

[49] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Eva SLANINOVA, Ines FRITZ, Christina DAFFERT, Katharina MEIXNER, Zuzana SEDRLOVA a Martin KOLLER. Novel unexpected functions of PHA granules. Applied Microbiology and Biotechnology [online]. 2020, 104(11), 4795-4810. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-020-10568-1

7. SEZNAM ZKRATEK

DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ds-DNA	Dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina
DNS	Dinitrosalicylová kyselina
PHA	Polyhydroxyalkanoáty
PHB	Poly-3-hydroxybutyrát
P(3HB-*co*-3HV)	Poly(3-hydroxybutyrát-*co*-3-hydroxyvalerát)
P(3HB-*co*-4HB)	Poly(3-hydroxybutyrát-*co*-4-hydroxybutyrát)
SEC-MALS	Vylučovací chromatografie s detektorem statického rozptylu světla ve všech úhlech