



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

PRODUKCE POLYHYDROXYALKANOÁTŮ S VYUŽITÍM ODPADNÍCH SUBSTRÁTŮ A JEJICH NÁSLEDNÁ IZOLACE

PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATES FROM WASTE SUBSTRATES AND THEIR
ISOLATION

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. MARIE STAŇKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2011



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0538/2010	Akademický rok: 2010/2011
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Marie Staňková	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.	
Konzultanti:	Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.	

Název diplomové práce:

Produkce polyhydroxyalkanoátů s využitím odpadních substrátů a jejich následná izolace

Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše využití odpadních substrátů k produkci polyhydroxyalkanoátů (PHA) a srovnání možných strategií izolace PHA z bakteriálních buněk.
2. Screening možných odpadních substrátů pro produkci PHA s využitím bakteriálního kmene *Cupriavidus necator* H16, případně dalších bakterií.
3. Optimalizace produkční strategie s cílem dosažení vysokých výtěžků a inkorporace vybraných monomerů do struktury PHA.
4. Aplikace vybraných enzymů k izolaci PHA z bakteriálních buněk.

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2011

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Marie Staňková
Student(ka)

doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2011

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Cílem práce je studium možností mikrobiální produkce polyhydroxyalkanoátů (PHA) na různých odpadních substrátech. Polyhydroxyalkanoáty nacházejí uplatnění jako biodegradabilní materiály. Pro laboratorní práci byla využita průmyslově užívaná bakterie *Cupriavidus necator*, jež byla kultivována s prekurzory různých monomerních jednotek s cílem produkce kopolymerů 3HB s 3HV a 4HB. Bakterie byla dále kultivována na různých odpadních substrátech, především olejnatých, s cílem dosáhnout co nejvyšší produkce polymeru. Další velkou část práce tvoří studium izolačních strategií PHA s využitím enzymů. Komerčně využívané protéazy – alkaláza a pankreatin – jsou účinnými enzymy pro rozklad bakteriální buňky. Řada optimalizačních experimentů ukázala, že při použití enzymu můžeme získat až o 13 % čistší polymer. Vzrůst čistoty PHA až nad 90% hranici byl docílen přidávkem povrchově aktivní látky, která podporuje rozpustnost buněčných komponent netvořících polymer a může zvýšit čistotu až o 20 % vůči kontrolní kultivaci. Část práce se zabývá i využitím enzymového preparátu izolovaného z bakterie *Bacillus subtilis*. Jeho aplikace na bakteriální kultury vedla k zisku polymeru s čistotou přesahující 95% hranici. Tyto výsledky by mohly být základem nové izolační strategie, která povede k efektivnějšímu zisku PHA z biomasy.

ABSTRACT

The aim of this work is to study the possibility of microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHA). PHA can be used as biodegradable materials. Bacterial strain *Cupriavidus necator* was used for laboratory production of PHA. This bacterium was cultivated in medium with various precursors to produce copolymers of 3HB with 3HV or 4HB. Another part of the work was aimed at cultivation of *C. necator* on different waste substrates, especially oils, with the aim to achieve the highest production of polymer. Another large part of the thesis is dedicated to isolation strategies of PHA using enzymes. Commercially used proteases – alcalase and pancreatin – can be used with advantages for digestion of bacterial cells. A number of optimization experiments showed that application of proteases leads to enhancement of PHA purity to about 13%. Purity increase up to 90 % was achieved by adding a surfactant, which promotes the solubility of non-PHA forming polymer. This surfactant increases the purity of 20 % when compared to control. The last part of presented work deals with the use of enzyme solution isolated from *Bacillus subtilis* medium. Its application to *C. necator* culture led to the yield of polymer at a purity exceeding 95 %. These results could represent the basis for new isolation strategies, which can lead to more efficient yield of PHA.

KLÍČOVÁ SLOVA

Polyhydroalkanoáty (PHA), Polyhydroxybutyrát (PHB), *Cupriavidus necator*, purifikace, enzymy, SDS, oleje.

KEY WORDS

Polyhydroxyalkanoate (PHA), Polyhydroxybutyrate (PHB), *Cupriavidus necator*, purification, enzyme, SDS, oils.

STAŇKOVÁ, M. *Produkce polyhydroxyalkanoátů s využitím odpadních substrátů a jejich následná izolace*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 100 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc..

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 diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis diplomanta

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D. za cenné rady a pomoc při vypracování diplomové práce. Poděkování patří také doc. RNDr. Ivaně Márové, Csc.

Předložená práce byla finančně podpořena z prostředků projektu CZ.1.05/2.1.00/01.0012/ERDF.

1. OBSAH

1. OBSAH	5
2. ÚVOD	8
3. TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1. Historie	9
3.2. Obecný popis PHA	9
3.2.1. SCL PHA	10
3.2.2. MCL PHA	11
3.2.3. Syntéza a struktura granulí.....	11
3.2.3.1. PHA syntáza (PhaC).....	12
3.2.3.2. PHA depolymeráza (PhaZi).....	14
3.2.3.3. Phasiny (PhaP).....	14
3.2.3.4. Regulační proteiny exprese phasinů (PhaR).....	15
3.2.4. Fyzikálně chemické vlastnosti	16
3.3. Biosyntéza PHA	17
3.3.1. Popis metabolismu	17
3.3.2. Enzymové vybavení buňky pro syntézu PHA	20
3.3.3. Regulace produkce PHA.....	21
3.3.3.1. Regulace na enzymové úrovni.....	21
3.3.3.2. Regulace na genové úrovni	22
3.4. Bakteriální producenti PHA	22
3.4.1. Bakterie <i>Cupriavidus necator</i> H16	23
3.5. Využití odpadních substrátů k produkci PHA.....	24
3.5.1. Využití odpadních substrátů obsahujících sacharidy	24
3.5.2. Využití odpadních substrátů na bázi olejů	26
3.5.3. Využití odpadních substrátů na bázi organických kyselin.....	27
3.5.4. Využití odpadních substrátů obsahujících alkoholy	27
3.6. Produkce PHA s využitím prekurzorů	27
3.7. Srovnání možných strategií izolace PHA.....	28
3.7.1. Předčištění vzorků.....	28
3.7.2. Extrakční metody	29
3.7.2.1. Metody využívající rozpustnosti PHA	29
3.7.2.2. Metody založené na rozpouštění dalších buněčných komponent.....	29
3.7.3. Purifikační metody.....	31
4. PRAKTICKÁ ČÁST	32
4.1. Použité chemikálie, materiál a přístroje	32
4.1.1. Bakteriální kmeny	32
4.1.2. Chemikálie pro kultivaci mikroorganismů	32
4.1.3. Ostatní chemikálie	32
4.1.4. Přístroje	32
4.2. Kultivace bakterií <i>Cupriavidus necator</i> a <i>Bacillus subtilis</i>	32
4.2.1. Uchování kultury a příprava inokula	32
4.2.2. Živná média pro <i>Cupriavidus necator</i> H16	33
4.2.3. Živná média pro <i>Bacillus subtilis</i>	33

4.3.	Stanovení koncentrace biomasy v jednotlivých kultivacích	33
4.3.1.	Stanovení kalibrační křivky	33
4.3.2.	Stanovení koncentrace biomasy	34
4.4.	Analýza PHB	34
4.4.1.	Stanovení PHB plynovou chromatografií s FID detekcí	34
4.4.1.1.	Stanovení kalibrační křivky 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu ...	34
4.4.1.2.	Stanovení kalibrační křivky 4-hydroxybutyrátu	35
4.4.1.3.	Stanovení PHA v biomase	35
4.4.1.4.	Stanovení kalibrační křivky kyseliny mléčné	36
4.5.	Kalibrace spektrofotometrického stanovení redukujících cukrů	36
4.6.	Kalibrace spektrofotometrického stanovení <i>p</i> -nitrofenolu	36
4.7.	Inkorporace vybraných monomerů do struktury PHA	36
4.7.1.	Srovnání produkce PHA na olejových substrátech a fruktóze	36
4.7.2.	Prekurzory 3-hydroxyvalerátu	37
4.7.3.	Prekurzory 4-hydroxybutyrátu	37
4.8.	Použití komerčně dostupných enzymů k izolaci PHA	37
4.8.1.	Screening lytického potenciálu vybraných enzymů	37
4.8.2.	Optimalizace koncentrace enzymů	38
4.8.3.	Optimalizace koncentrace SDS	38
4.8.4.	Vliv různých koncentrací SDS na proteolytickou aktivitu alkalasy a pankreatinu	38
4.8.4.1.	Stanovení proteolytické aktivity enzymů	38
4.8.4.2.	Stanovení lipázové aktivity enzymů	39
4.8.4.3.	Stanovení amylázové a celulázové aktivity enzymů	39
4.8.5.	Aplikace kombinací enzymů	40
4.9.	Izolace PHA z buněčné kultury s využitím enzymového roztoku po kultivaci bakterie <i>Bacillus subtilis</i>	41
4.9.1.	Stanovení koncentrace PHA po lytickém působení enzymů na biomasu získanou z kultivace na řepkovém oleji a fruktóze	41
4.9.2.	Příprava a charakterizace enzymového roztoku z kultivace bakterie <i>Bacillus subtilis</i>	41
4.9.3.	Izolace PHA pomocí enzymového roztoku po kultivaci <i>Bacillus subtilis</i> ..	42
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE	43
5.1.	Kalibrace spektrofotometrického stanovení biomasy	43
5.2.	Stanovení PHA plynovou chromatografií s FID detekcí	44
5.2.1.	Stanovení kalibračních křivek 3HB, 3HV a 4HB	44
5.2.2.	GC chromatogramy	46
5.3.	Stanovení koncentrace kyseliny mléčné pomocí GC s FID detekcí	47
5.4.	Kalibrace spektrofotometrického stanovení redukujících cukrů	48
5.5.	Kalibrace spektrofotometrického stanovení <i>p</i> -nitrofenolu	49
5.6.	Inkorporace vybraných monomerů do struktury PHA	50
5.6.1.	Srovnání produkce PHA na olejových substrátech a fruktóze	50
5.6.2.	Inkorporace prekurzorů 3-hydroxyvalerátu do struktury PHA	53
5.6.2.1.	Využití tříuhlíkatých prekurzorů pro syntézu P(3HB-co-3HV)	53
5.6.2.2.	Tok tříuhlíkatých prekurzorů P(3HB-co-3HV) metabolismem bakterie <i>Cupriavidus necator</i>	55

5.6.2.3.	Využití pětiuhlíkatých prekurzorů pro syntézu P(3HB-co-3HV).....	57
5.6.2.4.	Tok pětiuhlíkatých prekurzorů P(3HB-co-3HV) metabolismem bakterie <i>Cupriavidus necator</i>	59
5.6.3.	Inkorporace 4-hydroxybutyrátu do struktury PHA	60
5.6.3.1.	Využití různých prekurzorů pro syntézu P(3HB-co-4HB).....	60
5.6.3.2.	Tok prekurzorů P(3HB-co-4HB) metabolismem bakterie <i>C. necator</i>	63
5.6.4.	Inkorporace kyseliny mléčné do struktury PHA.....	65
5.6.4.1.	Využití kyseliny mléčné pro produkci P(3HB-co-LA) bakterií <i>C. necator</i>	65
5.7.	Použití komerčně dostupných enzymů k izolaci PHA	67
5.7.1.	Screening lytického potenciálu vybraných enzymů	67
5.7.2.	Optimalizace koncentrace enzymů	68
5.7.3.	Optimalizace koncentrace SDS.....	72
5.7.4.	Vliv různých koncentrací SDS na proteolytickou aktivitu alkalasy a pankreatinu.....	76
5.7.5.	Studium průběhu hydrolytické aktivity alkalasy a pankreatinu během procesu	78
5.7.6.	Stanovení aktivit jednotlivých enzymových složek pankreatinu a alkalázy... ..	79
5.7.6.1.	Stanovení proteázové aktivity pankreatinu a alkalasy.....	79
5.7.6.2.	Stanovení lipázové aktivity pankreatinu a alkalasy.....	79
5.7.6.3.	stanovení celulázové a amylázové aktivity pankreatinu a alkalasy.....	80
5.7.6.4.	Diskuze jednotlivého zastoupení enzymových aktivit u pankreatinu a alkalasy	81
5.7.7.	Aplikace kombinací enzymů k izolaci PHA.....	82
5.8.	Izolace PHA z buněčné kultury s využitím komerčních enzymů	86
5.8.1.	Stanovení koncentrace PHA po lytickém působení enzymů na biomasu získanou z kultivace na řepkovém oleji a fruktóze	86
5.9.	Izolace PHA z buněčné kultury s využitím enzymů z bakterie <i>Bacillus subtilis</i> 88	
5.9.1.	Příprava a charakterizace enzymového roztoku z kultivace bakterie <i>Bacillus subtilis</i>	88
5.9.2.	Izolace PHA pomocí enzymového roztoku z <i>Bacillus subtilis</i>	88
6.	ZÁVĚRY	92
7.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	94
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	100

2. ÚVOD

Již od roku 1930 se setkáváme s petrochemickými plasty, které se staly neoddělitelnou součástí našeho života. Jejich struktura jim předurčila významnou stálost, díky níž nachází petrochemické plasty uplatnění v širokém spektru aplikací a zlepšují komfort a kvalitu našeho života. Postupně nahrazují tradiční materiály jako kovy, sklo nebo papír. Stálost petrochemických plastů je jednou z nejvýznamnějších vlastností pro různorodé aplikace, ale na druhé straně je to těžko překonatelná vlastnost pro jejich likvidaci, zejména v životním prostředí, kde dochází k jejich akumulaci v podobě pevného odpadu. Přičemž přirozené odbourání pevného odpadu bude trvat desítky, možná i stovky let.

Tyto problémy vyústily ve snahu hledat nové plastické materiály s odpovídajícími fyzikálními a chemickými vlastnostmi, které by ovšem byly rozložitelné v přirozeném prostředí, a proto by nepředstavovaly takovou zátěž pro životní prostředí.

S tímto cílem se do popředí dostávají takové pojmy jako biodegradabilita. Degradace polymerních materiálů je přirozený jev, při němž dochází k narušení až úplnému rozpadu polymerních materiálů vlivem mikroorganismů nebo prostředí. Často se ale podílí na degradaci oba tyto faktory. Biodegradabilní materiály se v přirozeném prostředí rozpadnou vlivem vlhkosti, mikroorganismů či teploty a nedochází ke kumulaci pevných odpadů.

Již v roce 1926 byly objeveny polyhydroxyalkanoáty, v přírodě se široce vyskytující zásobní polymery, které se svými vlastnostmi významně blíží dvojici syntetických plastů polypropylenu a polyetyleny. Výhodou polyhydroxyalkanoátů před petrochemickými plasty je jejich rozložitelnost v prostředí v krátkém časovém horizontu pouze za přítomnosti vhodné mikroflóry.

Masovému rozšíření ale stále brání velmi vysoká cena mikrobiálně produkovaných polyhydroxyalkanoátů. Pro snížení ceny polyhydroxyalkanoátů je nutným předpokladem dokonalá znalost možných regulačních faktorů, které vedou k naprodukcii těchto polymerů v biomase. Dalším parametrem, který má velký podíl na ceně výsledného polymeru, je cena zdroje uhlíku pro kultivaci bakteriálních kmenů, kterou je třeba snížit. Proto jsou stále více využívány odpadní substráty potravinářských a zemědělských výrob.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Historie

Již na počátku 20. století byly v bakteriálních buňkách *Azotobacter chroococcum* objeveny intracelulární granule rozpustné v chloroformu [1, 2], ale až v roce 1926 francouzský mikrobiolog Maurice Lemoigne identifikoval, popsal a pojmenoval složení granulí izolovaných z buněk bakterie *Bacillus megaterium* a označil je jako poly-3-hydroxybutyrát (PHB, P3HB), přírodní polymer patřící do skupiny polyhydroxyalkanoátů (PHA) [1, 3, 4].

Na konci padesátých let bylo zjištěno, že P3HB plní v buňce funkci zásobárny uhlíku a energie pro případné období strádání za nepříznivých podmínek. V roce 1974 byly v PHA identifikovány i další monomerní jednotky než jen P3HB [1].

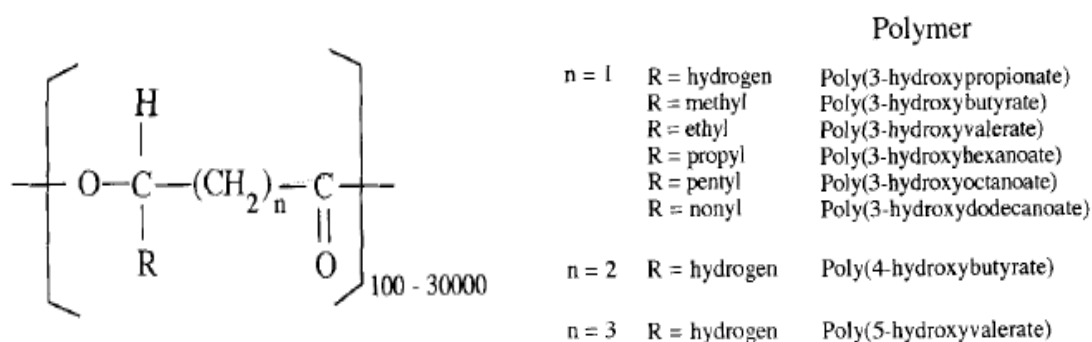
S přibývajícím znalostmi o PHA bylo zjištěno, že lze kultivovat bakterie i na různých substrátech jako jsou oleje, sacharidy či organické kyseliny a inkorporovat tak různé monomerní jednotky do struktury PHA a významně tak zlepšit vlastnosti získaného polymeru. Tyto poznatky přiblížily výrobu plastů [1] tak, že a v roce 1976 se společnost Imperial Chemical Industry (ICI Ltd., UK) rozhodla průmyslově vyrábět PHB [1, 4].

S vývojem genového inženýrství jsou prováděny genové manipulace i při produkci PHA. Příprava nových rekombinantních kmenů bakterií a geneticky modifikovaných rostlin má za cíl zlepšit výtěžek produkce bioplastu a snížit tak celkové náklady produkce [5].

Dnes je snaha maximálně využívat při výrobě především odpadní produkty potravinářských a zemědělských výrob. S tím do jisté míry spojené genové modifikace, které adaptují bakterie na dané odpadní substráty [6, 7].

3.2. Obecný popis PHA

Polyhydroxyalkanoáty se řadí mezi lineární polyestery 2-, 3-, 4-, 5- nebo 6-hydroxyalkanových kyselin a tedy karboxylová skupina jednoho monomeru tvoří esterovou vazbu s hydroxylovou skupinou sousedního monomeru [7, 8, 9, 10]. Obecný vzorec struktury je uveden na obrázku Obr. 1.



Obr. 1: Obecná struktury PHA [11]

Nejvíce rozšířeným PHA, ale také nejčastěji se vyskytující sloučeninou z této třídy opticky aktivních mikrobiálních polyesterů je poly-3-hydroxybutyrát, ve kterém alkylovou skupinu tvoří metylová skupina a hydroxylová skupina je připojena na třetí atom uhlíku (β atom molekuly), a proto atom uhlíku vázající hydroxylovou skupinu má R-konfiguraci [7, 10].

PHA jsou produkovány širokým spektrem bakterií ve formě nerozpustných inkluzí v cytoplasmě [12]. Byly nalezeny jak v gram-pozitivních, tak i gram-negativních bakteriálních buňkách, ve fototrofních a aerobních, ale i v litotrofních nebo organotrofních bakteriích. PHA byly izolovány dokonce i z cyanobakterií a třída *Halobacteriaceae* patří do říše *Archea* [4, 8, 10, 11].

PHA jsou syntetizovány jako zásoba energie a uhlíku za podmínek, pokud má bakteriální buňka omezený přístup k potřebnému množství zdrojů dusíku, kyslíku, síry, fosforu, železa, hořčíku nebo draslíku v životním prostředí, ale zdroj uhlíku v daném prostředí není nijak omezen [2, 11]. Pokud dojde k přerušení přístupu zdroje uhlíku, PHA je rozložen depolymerázou a uvolněný uhlík znovu vstupuje do metabolických a energetických drah buňky [2, 9, 11].

Podle prekurzorů, které se nachází v živném médiu bakterií a tvoří mimo jiné i zdroj uhlíku, jsou do struktury PHA zakomponovány různé monomerní jednotky [8]. Vědci už izolovali více než 150 různých PHA z různých bakteriálních kmenů [13] tvořených od kyseliny hydroxypropionové až po kyselinu hydroxyhexadekanovou [10]. Díky stereospecifitě biosyntetických enzymů jsou monomery hydroxyalkanových kyselin v PHA pouze v R(-) konformaci [11, 14].

Podle počtu uhlíků v monomerní jednotce lze dělit polyhydroxyalkanoáty na tři skupiny: polymery s krátkým řetězcem (sclPHA) mající tři až pět uhlíků, polymery se středně dlouhým řetězcem (mclPHA) mající šest až čtrnáct uhlíků v monomerní jednotce [4, 8, 10, 14] a polymery s dlouhým řetězcem (lcl PHA), který čítá více jak 14 atomů uhlíku [15]. Průměrná molekulová hmotnost PHA (M_n) je vyšší jak $4 \cdot 10^6$ daltonů v závislosti na substrátu, růstových podmínkách (pH média, teploty) a producentu a polydisperzita je obvykle kolem 2,0 (M_w/M_n) [7, 16].

Produkce PHA bakteriální cestou předpovídá vzniklým polymerům biokompatibilitu, která je zaručena stereospecifitou enzymů zapojených do syntézy [15]. PHA mají dále velmi dobré vlastnosti podobající se syntetickým termoplastům, například polypropylenu [8, 9, 10]. Na rozkladu se podílí enzymy jiných bakterií, jako jsou PHA hydroláza nebo PHA depolymerázy [7]. Při degradaci jsou při aerobních podmínkách kompletně rozloženy na vodu a oxid uhličitý a při anaerobních podmínkách jsou rozloženy na metan pomocí mikroorganismů přítomných v půdě, říční a mořské vodě a v odpadních vodách [2].

Díky jejich biodegradovatelnosti a významným mechanickým vlastnostem se začaly využívat na produkci obalových materiálů, v medicíně, farmacii, zemědělství a potravinovém průmyslu nebo pro syntézu enantiomericky čistých látek a produkci barev [12, 17].

3.2.1. SCL PHA

Short-chain-length (scl PHA) je typické označení pro skupinu PHA, jež mají monomerní jednotku tvořenou (R)-3-hydroxy kyselinami se třemi až pěti uhlíky v molekule. Jejich nejvýznamnějším zástupcem je poly(3-hydroxybutyrát), který je produkován řadou bakterií, např. *Cupriavidus necator* [4]. Dalším zástupcem řazeným k této skupině je poly-3-hydroxyvalerát (PHV), jež tvoří pěti uhlíkatou kostru monomerních jednotek [7].

Hlavní rozdíl mezi scl PHA a mcl PHA je zapříčiněn různorodostí v substrátové specifitě PHA syntázy, která může podle druhu mikroorganismu, z něhož pochází, zpracovávat jen určitý rozsah délky uhlovodíkového řetězce [2]. Podle různorodosti monomerních struktur se posléze odvíjí i vlastnosti polymerů. Zatímco scl PHA díky relativně vysokému podílu krystalických struktur vykazují spíše termoplastické vlastnosti, mcl PHA disponují s minimální krystalitou, a tak větší část PHA inkluzí je tvořeno amorfni hmotou, která zvyšuje elastické a adhesivní vlastnosti mcl PHA [18].

Kopolymery PHB, patřící také do této skupiny, jsou syntetizovány, pokud je bakterie kultivována na směsném médiu, jako je například směs glukózy a valerátu a vznikají kopolymery s nahodilým uspořádáním jednotlivých monomerních jednotek [7]. Procentuální zastoupení jednotek je odvozeno od koncentrace jednotlivých substrátů v živném médiu [19].

V posledních letech bylo objeveno, že scl PHA je ubikvitní složkou přírody. Vyskytuje se v oligomerní formě s nízkou molekulovou hmotností od 120 do 200 monomerních jednotek, které se nachází v mikroorganismech, rostlinách i živočišné říši včetně člověka. Zde se ale PHA v mnoha případech vyskytuje ve formě PHB-Na-polyfosfátového komplexu přítomného v membránách, kde zřejmě plní funkci membránového iontového kanálu [4].

3.2.2. MCL PHA

Medium-chain-length (mcl PHA) jsou složeny z C₆ až C₁₄ 3-hydroxyalkanových kyselin [1, 7]. Tyto polymery jsou syntetizovány především bakteriemi rodu *Pseudomonas*, jež patří do rRNA homologické skupiny I a několika dalšími bakteriemi [19], pokud jsou v živném médiu přítomné různé alifatické alkany, alkanoáty a alkoholy nebo alifatické mastné kyseliny. Bakterie jsou ovšem schopné syntetizovat mcl PHA i z glukózy a mnoha dalších strukturálně méně podobných uhlíkových zdrojů [13]. Schopnost syntézy mcl PHA zajišťuje PHA syntáza řazená do druhé třídy PHA syntáz a reprezentativním mikroorganismem je *Pseudomonas oleovorans* [1].

Základní význam při syntéze mcl PHA mají dvě metabolické dráhy - β -oxidace mastných kyselin a *de novo* syntéza mastných kyselin, které zpracovávají prekurzory obsažené v živném médiu a tvoří zásobní dráhu pro dodávání monomerních jednotek pro syntézu mcl PHA [20]. Nejrozšířenější a základní monomerní jednotkou je (R)-3-hydroxyoktanoátová jednotka, která byla objevena v roce 1983 a uvedené datum je současně považováno za objev mcl PHA [21].

3.2.3. Syntéza a struktura granulí

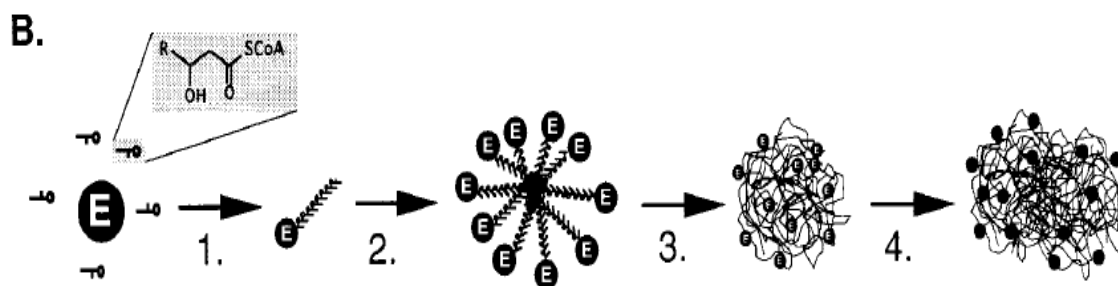
PHA se v bakteriálních buňkách vyskytují jako oddělené intrabuněčné granule (inkluzie), jež jsou složeny přibližně z 97,5% PHA, 2% z proteinů a 0,5 % tvoří lipidy [22]. PHA granule jsou lokalizovány do buněčné cytoplasmy a jejich typická velikost se v průměru pohybuje v rozmezí od 0,2 do 0,5 μm [1, 22], jejich hustota dosahuje 1,18 – 1,24 $\text{g}\cdot\text{cm}^3$ [1]. Studium granulí pod elektronovým mikroskopem prozradilo, že PHA granule jsou od cytoplasmy odděleny jednovrstevnou membránou o tloušťce 15 – 20 nm, jejichž neoddělitelnou součástí jsou proteiny potřebné k syntéze a degradaci PHA [22].

Již jsou známy čtyři typy proteinů spojených se syntézou a degradací PHA nacházející se v bakteriálních kmenech produkujících PHA: PHA syntáza, PHA depolymeráza, phasiny a regulátory exprese phasinů [22].

Počet granulí v bakteriální buňce je zřejmě závislý na bakteriálním kmenu, protože podle provedené studie se v buňkách bakterie *C. necator* tvoří 8 až 12 granulí různé velikosti,

kdežto buňka bakterie *Pseudomonas oleovorans* obsahuje pouze jednu nebo dvě velké PHA granule [15].

Mechanismus tvorby granulí není zatím zcela znám, ale byly navrženy dva modely. První „micelární model“ vychází z aktivace PHA polymerázy (syntázy), která je více či méně rozpuštěna v cytoplasmě. Aktivace PHA syntázy pravděpodobně souvisí se vzrůstající koncentrací 3-hydroxybutyryl-CoA v cytoplasmě. Během začínající lag-fáze pomalu narůstají řetězce a vzniklé oligomery HB jsou připojeny k enzymu (1). Narůstající oligomery HB díky své velikosti a hydrofobicitě tvoří micelární struktury (2). Díky hydrofobicitě je vytvořeno dvoufázové rozhraní, kdy polymeráza je lokalizována na povrchu a dochází k oddělení PHA od cytosolu (2). Díky vzniku granulí, enzymy mohou velmi rychle produkovat hydrofobní polymer do hydrofobního prostředí micely (3.). Se zvyšující se koncentrací dochází k tvorbě granulárních struktur (4.). Granule o vyšším objemu vznikají syntézou velkého množství polymeru nebo dochází k koalescenci malých granulí (slučování malých granulí ve větší celky) [8, 11].



Obr. 2: Mechanismus tvorba granulí; E značí PHA syntázu [8].

Druhý model předpokládá ukotvení PHA syntázy na vnitřní stranu cytoplasmatické membrány již před započítím PHA syntézy nebo jakmile dojde k uvolnění PHA řetězce z enzymu. V tomto případě syntéza polymeru je vedena do membránového meziprostoru. Inkluze je přichycena na membránu až do konečné fáze syntézy granule a až poté je uvolněna z membrány [11].

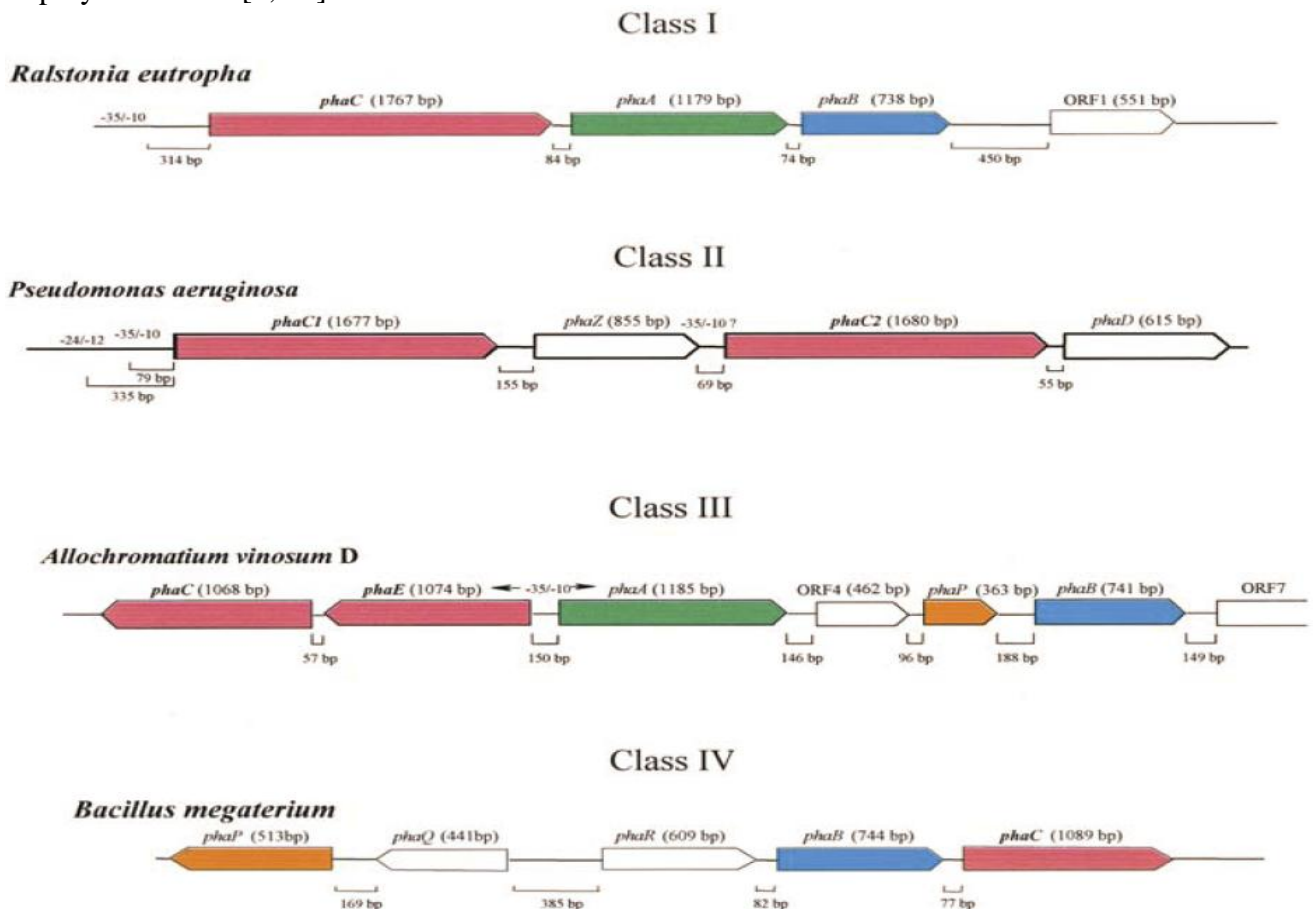
Dříve se předpokládalo, že PHA inkluze *in vivo* jsou pevné látky s krystalickou strukturou, ale pomocí nukleární magnetické rezonance bylo zjištěno, že PHA inkluze *in vivo* jsou tvořeny tekutým, vysoce amorfním polymerem. Tato skutečnost vysvětluje, proč techniky jako centrifugace vedou k rychlé a nevratné ztrátě možnosti degradace pomocí intracelulárních depolymerizačních enzymů [1]. Jádrem granule dále obsahuje malé množství vody, která zabraňuje krystalizaci polymeru *in vivo* a působí jako plastifikátor [11].

Pokud je ale PHB vyizolováno z buňky, dochází ke krystalizaci polymeru. PHA *in vivo* je pod termodynamickou kontrolou. Pokud je PHB *in vitro* podrobena centrifugaci, ochotně podléhá koalescenci ve hmotu o vyšším objemu a může se objevit rychlá krystalizace. Další zrychlení krystalizace je zapříčiněno i heterogenní nukleací, jež je způsobena externími molekulami odlišnými od PHA, nejčastěji buněčnými komponenty, které netvoří polymer [1].

3.2.3.1. PHA syntáza (PhaC)

PHA syntáza je klíčovým enzymem syntézy PHA, kde katalyzuje stereoselektivní konverzi (R)-3-hydroxyacyl-CoA na výsledný polymer za současného uvolnění koenzymu A. V mikroorganismech bylo nalezeno několik druhů PHA syntáz, které využívají různé druhy uhlíkatých substrátů a prekurzorů ve formě (R)-3-hydroxyacyl-CoA a jsou využívány různými metabolickými drahami [11]. Významnou vlastností PHA syntázy je substrátová

specifita, která tvoří jeden ze dvou nejvýznamnějších faktorů ovlivňujících výsledné složení PHA. Druhým faktorem ovlivňujícím složení PHA jsou metabolické dráhy, které zpracovávají uhlíkaté prekurzory a dodávají tak monomerní jednotky vhodné pro začlenění do polymeru PHA [7, 24].



Obr. 3: Rozložení jednotlivých genů kódujících PHA syntázy první až čtvrté třídy; *phaA* gen kódující b-ketothiolázu, *phaB* kóduje acetoacetyl-CoA reduktázu, *phaC/C1/C2* jsou geny pro PHA syntázy, *phaE* a *phaP* kóduje podjednotku PHA syntázy III. třídy, *phaR* kóduje regulační proteiny, *phaZ* je gen pro PHA depolymerázu a ORF a *phaD* kódují proteiny s neznámou funkcí [23].

PHA syntáza se nachází jak vázaná v membráně granulí, tak i volně cirkuluje v cytoplasmě. PHA syntáza vyskytující se volně v cytoplasmě má nižší enzymovou aktivitu, proto je pro optimální rychlost syntézy nutná optimální koncentrace enzymů vázaných na adekvátně velký povrch granulí [8]. Aktivita PHA syntázy má dále rozhodující vliv na molekulovou hmotnost vzniklého polymeru; s rostoucí aktivitou PHA syntázy klesá molekulová hmotnost vzniklého polymeru [8, 14].

Do současnosti byly získány nukleotidové sekvence 59 genů kódujících PHA syntázy ze 44 různých druhů bakterií a s ohledem na primární strukturu odvozenou z nukleotidových sekvencí, počet jednotek a substrátovou specifitu enzymů byly rozlišeny 4 druhy PHA syntáz [20, 24, 25].

PHA syntázy první a druhé třídy jsou složeny pouze z jedné podjednotky o molekulové hmotnosti ležící v rozmezí 61 až 73 kDa. Zatímco typickým představitelem první třídy je bakterie *Cupriavidus necator*, která katalyzuje syntézu PHA z 3-, 4- a 5-hydroxyalkyl-CoA čítajícím 3-5 atomů uhlíku za vzniku scl PHA [26], PHA syntáza druhé třídy se nachází u

bakterií *Pseudomonas aeruginosa* a katalyzuje kondenzaci mezi (R)-3-hydroxyalkyl-CoA jednotkami se 6 až 14 atomy uhlíku za vzniku mcl PHA [11, 27, 28]. V nedávné době bylo ale zjištěno, že *Cupriavidus necator* může inkorporovat i minimální množství 3HHx, 3HO a 3HDD monomerních jednotek [20].

PHA syntázy patřící do třetí třídy jsou složeny již ze dvou podjednotek – PhaC a PhaE. Podjednotka PhaC vykazuje 21 – 28 % podobnost s PhaC, kdežto PhaE nemá žádnou podobnost s PhaC, ale obě podjednotky mají 40 kDa [23, 28]. Představitelem třetí třídy PHA syntáz je fototrofní bakterie *Allochromatium vinosum*, která preferuje vznik scl PHA [27] a využívá (R)-3-hydroxymastné kyseliny skládající se z 3 až 5 uhlíků [23].

Poslední čtvrtá třída PHA syntáz je typická pro rod *Bacillus* a je také složena ze dvou podjednotek, jedna o velikosti 22 kDa (PhaR), která je velmi podobná podjednotce PhaR PHA syntázy třetí třídy, a druhá o velikosti 40 kDa (PhaC) [11, 23, 24]. Na Obr. 3 je uvedena organizace jednotlivých genů pro PHA syntázy.

3.2.3.2. PHA depolymeráza (PhaZ)

PHA depolymeráza je intramolekulární enzym vyskytující se v bakteriích syntetizujících PHA, který katalyzuje degradaci amorfního polymeru uvnitř granulí a je nezbytně nutná pro imobilizaci uhlíku z PHA granulí [11]. PhaZ lze nalézt na povrchu granulí, kde jsou vázány na jednovrstevnou membránu [8].

Některé organismy jsou schopny produkovat i extracelulární depolymerázy, které ale rozkládají PHA v životním prostředí a působí tedy na polymer v krystalické formě, kdežto intramolekulární depolymerázy jsou aktivní pouze na amorfní PHA. Odlišnosti jsou pak zřejmé i v mechanismu katalýzy těchto depolymeráz, přestože mají například stejnou charakteristiku lipázových či esterázových enzymů [1, 11].

Rychlost depolymerizační reakce intramolekulární depolymerázou bakterie *C. necator* probíhá velmi pomalu a je 10 krát pomalejší než syntéza PHA [1]. Degradace polymeru je vedena přes thiolýzu za vzniku 3-hydroxybutyryl-CoA, což potvrzuje předpoklad současné syntézy a štěpní PHA [11].

3.2.3.3. Phasiny (PhaP)

PHA granule v mikrobiální buňce jsou obaleny fosfolipidy a proteiny. Převládající složkou proteinů jsou phasiny, které tvoří 5% z celkové koncentrace buněčných proteinů u bakterií tvořících PHA [14].

Phasiny jsou nízkomolekulární proteiny s molekulovou hmotností pohybující se v rozmezí 14 až 28 kDa [11, 29]. Díky skutečnosti, že pokrývají většinu povrchu hydrofobního jádra PHA granulí, jsou zřejmě hlavním faktorem ovlivňujícím velikost a počet granulí v cytoplasmě a jejich aktuální množství je obdobné množství PHA [14, 29], i když jejich přesná funkce a mechanismus nejsou známy [1]. Vliv na počet, velikost a morfologii PHA granulí má i vztah mezi transkripční genů *phaP* a *phaR*. Jestliže transkripce *phaR* probíhá rychleji než *phaP*, dochází k akumulaci regulačních proteinů phasinů a v buňce je akumulován nízký počet velkých granulí. Pokud je situace opačná a v buňce je navýšená koncentrace phasinů vůči jejich regulačním proteinům, buňka pak obsahuje velké množství malých granulí [30]. Phasiny se přímo účastní syntézy PHA, protože ve svém řetězci u C-konce proteinu obsahují dvě krátké hydrofobní sekvence, které pravděpodobně mají schopnost vázat se na PHA inkluzi [1].

Phasiny bakterie *C. necator* jsou kódovány genem *PhaP* a tvorba samotných PhaP je závislá na akumulaci a biosyntéze PHA. Majoritním zástupcem phasinů je PhaP1 bakterie *C. necator*, který má právě stěžejní roli při produkci PHA. Při nedostatku PhaP vzniká jen jedna granule a při jeho přebytku je zase syntetizováno velké množství velmi malých granulí [22], proto je tento gen řízen regulačním proteinem PhaR, který se váže na DNA a podílí se tak na regulaci produkce PHA. [30, 31].

Kromě PhaP1 byly u bakterie *C. necator* detekovány ještě další tři homology, které v proteinech PHA granulí mají minoritní zastoupení. Zatímco PhaP3 a PhaP4 jsou vázány na povrch PHA granulí, PhaP2 je uložen volně v cytoplasmě s možností vazby na povrch PHA granulí. Jejich přesná funkce není zatím známa, ale předpokládá se, že alespoň jeden z těchto proteinů spolupracuje s depolymerázou, která musí získat přístup k polymeru, který je uzavřen membránou [14, 31].

3.2.3.4. Regulační proteiny exprese phasinů (PhaR)

Expese phasinů je docílena díky autoregulačním represorům, které jsou u bakterie *C. necator* kódovány genem *phaR*. Výskyt homologů PhaR a jejich organizace v genomu byla detailně studována již u 29 mikroorganismů [29]. PhaR jsou schopné vázat se na tři místa v buňce: (i) promotorová oblast PhaP1, (ii) promotorová oblast PhaR a (iii) povrch PHA granulí. Protein se váže jak na strukturu DNA, tak i na PHA granule, čímž se podílí na regulaci produkce PHA [22].

Proteiny PhaR se vážou na gen *phaP* DNA řetězce blíže k 5' konci. Zde jsou vyhrazena dvě místa, která v sobě zahrnují počáteční místa transkripce s -10 regionem a -35 region umístěný na 5' konci σ^{70} promotoru na *phaR*. Oba tyto celky obsahují 12 bp opakující se sekvence (GCAMMAAWTMMMD) na paralelním i antiparalelním řetězci. PhaR se také váže na +68 bp od *phaR* startovacího kodonu, kde se nachází σ^{54} promotor. PhaR protein je schopný interagovat i s PHA granulemi [29].

PhaR jsou za podmínek nevhodných pro syntézu PHA navázány na promotor *PhaP* a brání transkripci tohoto genu, tedy tvorbě phasinů, díky vysoké koncentraci PhaR v cytoplasmě. Pokud jsou ale podmínky vyhovující pro tvorbu PHA, PHA syntáza začne syntetizovat polyesterový řetězec a tvoří granule. PhaR, jež mají vysokou vaznost na hydrofobní povrch, se váží na povrch granulí. Tímto dojde ke snížení koncentrace PhaR v cytoplasmě na hodnotu, která je dostatečná pro potlačení represe genů pro *PhaP* a začíná syntéza PhaP, které jsou ihned navázány na PHA granule a žádné phasiny necirkulují volně v cytoplasmě. Když PHA granule dosáhne dostatečné velikosti a není už žádné místo pro navázání PhaR, dochází ke zvýšení koncentrace PhaR v cytoplasmě a k vazbě na sekvenci DNA, což vede k represi transkripce *phaP* a represi vlastního genu *phaR*. Tato autoregulační represe zabraňuje tvorbě většího počtu PhaR, než je nezbytně nutné pro syntézu PHA [11, 22, 29].

PhaR má tedy dvojitou funkci a tudíž dvě oddělené domény pro vazbu na dvě dané molekuly. Vazba na PHA granule je ireversibilní a řízena zejména nspecifickými hydrofobními interakcemi, tedy užívá vysoké afinity, ale nízké specifity. Vazba na DNA je reversibilní a vysoce specifická, tato vazba je vedena přes N-konec PhaR proteinu, který se vyznačuje vysokou podobností s PhaR jiných mikroorganismů [11, 29].

3.2.4. Fyzikálně chemické vlastnosti

Polyhydroxyalkanoáty mají unikátní vlastnosti, jejichž zásluhou jsou tyto polymery stále více sledovány a doporučovány k praktickému užití v průmyslu. Řadí se mezi termoplasty a/nebo elastomery, které umožňují lisování P(3HB) či vyrábění filmů a vláken. Díky mikrobiální produkci jsou produkovány jako čisté enantiomery a jsou opticky aktivní. P(3HB) nevykazuje toxicitu vůči savčím buňkám a je biokompatibilní s různými druhy buněk zahrnující osteoblasty, epitelové buňky a chondrocyty. P(3HB) vykazuje piezoelectricitu, je nerozpustný ve vodě, ale dobře se rozpouští v chloroformu, z jehož roztoku se sráží přidávkem metanolu nebo etanolu. Tento polymer dosahuje vysokého stupně polymerizace a s tím související vysoké molekulové hmotnosti sahající nad několik miliónů Daltonů [13, 24, 32].

Scl PHA, mezi něž patří P(3HB) a P(3HB-co-3HV), jsou krystalické polymery, které jsou křehké (lámavé) a tuhé, s vysokou teplotou tání a nízkou teplotou skelného přechodu, zatímco druhý z řady scl polymerů - P(4HB) - je pevný, ohebný termoplastický polymer s relativně jednoduchou strukturou [32].

Nejvýznamnější z řady polymerů, mikrobiálně produkováný P(3HB) má termoplastické vlastnosti, které umožňují jeho lisování či vyrábění filmů a vláken. Jeho pevnost v tahu se velmi podobá polyetylenu [2]. P(3HB) je velmi křehký, lámavý a tuhý. Jeho průmyslové zpracování je obtížné díky jeho vysoké teplotě tání, která dosahuje hodnoty 175°C a velmi se tak blíží teplotě degradace polymeru na kyselinu krotonovou, která se udává na hodnotu 185 °C [33]. Biodegradabilita P(3HB) za vzniku CO₂ a H₂O za aerobních a na CH₄ a H₂O za aerobních podmínek je vysoká [32].

Mcl PHA jsou termoplastické elastomery s nízkou krystalizací a pevností v tahu, ale s vysokou roztažností. Ve srovnání s scl PHA mají nižší teploty tání a vyšší teploty skelného přechodu [32], jak je uvedeno v **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů..**

Tab. 1: Fyzikální a chemické vlastnosti P(3HB) a polypropylenu (PP) [27].

Vlastnost	scl PHA	mcl PHA	PP
Teplota tání (°C)	53-80	30-80	176
Teplota skelného přechodu (°C)	-148-4	-40-150	-10
Hustota (g/cm ³)	1,25	1,05	0,91
Krystalizace (%)	40-80	20-40	70
Pevnost v tahu (MPa)	43	20	34
Roztažnost (%)	6-1000	300-400	400
Rezistence vůči rozpouštědlům	nízká	nízká	dobrá
Odolnost vůči UV	dobrá	dobrá	nízká
Biodegradabilita	dobrá	dobrá	žádná

Mnohem lepší fyzikální a chemické vlastnosti jsou ale pozorovány u kopolymerů, kde chemické a fyzikální vlastnosti závisí na podílu dalších monomerů v polymeru.

Například kopolymer P(3HB-co-3HV) je charakterizován zvýšením pevnosti v tahu a nízkou teplotou tání, která závisí od podílu HV monomeru v polymeru a díky tomu během výroby nepodléhá teplotní degradaci [33]. Vlastnosti vybraných kopolymerů jsou uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2: Srovnání fyzikálních vlastností různých PHA a syntetického polypropylenu [1, 32]

Polymer	Teplota tání (°C)	Teplota skelného přechodu (°C)	Youngův modul (GPa)	Roztažnost (%)	Pevnost v tahu (MPa)
P(3HB)	180	4	3,5	5	40
P(4HB)	53	-48	149	1000	104
P(3HB-co-20% 3HV)	145	-1	1,2	50	20
P(3HB-co-14% 4HB)	150	-7	-	444	26
P(3HB-co-10% 3HHx)	127	-1	-	400	21
P(3HB-co-6% 3HD)	130	-8	-	680	17
polypropylen	176	-10	1,7	400	34,5

3.3. Biosyntéza PHA

Mikroorganismy jsou schopné pomocí svých metabolických drah zpracovávat nepřeberné množství uhlíkatých substrátů různých druhů a díky rozmanitému množství stereospecifických PHA syntáz jsou mikroorganismy schopné uhlíkaté kostry metabolicky aktivované thioesterovou vazbou na koenzym A začlenit do polymerní struktury PHA.

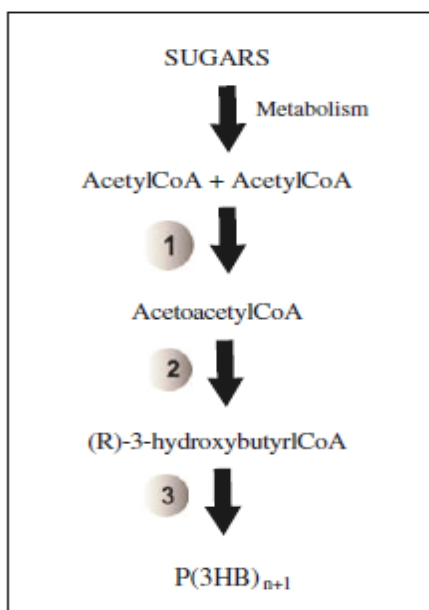
Biosyntéza je závislá na přítomnosti klíčových enzymů, jedním z nejvýznamnějších klíčových enzymů je PHA syntáza [11].

3.3.1. Popis metabolismu

V dnešní době je známo již několik metabolických drah PHA vyskytujících se v bakteriální říši. Zatím byly identifikovány čtyři hlavní metabolické dráhy pro biosyntézu a inkorporaci téměř všech známých konstituentů bakteriálních PHA [2, 34].

Nejdéle známou a nejvíce prostudovanou je biosyntéza PHA u bakterií *Cupriavidus necator* na sacharidickém substrátu v médiu, který je základními katabolickými drahami rozložen na acetyl-CoA. Právě acetyl-CoA je prvním krokem ze tří stupňové konverze acetyl-CoA na P(3HB) [34, 35].

Za přítomnosti biosyntetického enzymu β -ketothiolázy je vytvořena vazba uhlík-uhlík během biologické Claisenovy kondenzace ze dvou jednotek acetyl-CoA za vzniku acetoacetyl-CoA. Enzym NADPH-dependentní acetoacetyl-CoA reduktáza je zapojen do druhého kroku biosyntézy a usnadňuje průběh a zvyšuje rychlost selektivní redukce acetoacetyl-CoA na R-(-)-3-hydroxybutyryl-CoA. Třetí a poslední krok této metabolické dráhy je katalyzován PHA syntázou, která spojuje nasyntetizované enantiomerní jednotky R-(-)-3-hydroxybutyryl-CoA za vzniku esterové vazby a vytváří tak rostoucí řetězec P(3HB) [2, 27, 33, 34, 35]. Popsané schéma je znázorněno na Obr. 4.



Obr. 4: Biosyntéza PHA bakterií *Cupriavidus necator* kultivované na sacharidických substrátech. (1) β -ketothioláza, (2) NADPH dependentní acetyl-CoA reduktáza, (3) P(3HB) polymeráza (syntáza) [35].

Druhým typem biosyntézy PHA je pětistupňová metabolická dráha u fotosyntetizujících bakterií *Rhodospirillum rubrum* (*Rhodopseudomonas rubrum*). Tato dráha je velmi podobná již výše uvedené, ale liší se v druhém kroku, kdy acetoacetyl-CoA je nejprve za přítomnosti NADPH-dependentní acetoacetyl-CoA reduktázy redukován na S-(+)-3-hydroxybutyryl-CoA, který je následně pomocí dvou enoyl-CoA-hydratáz konvertován na R-(-)-3-hydroxybutyryl-CoA, což je jediná stereomerní forma substrátu vhodná pro PHA syntázu. [1, 2, 11, 34].

Třetí typ biosyntézy PHA byl objeven u bakterií patřících k rodu *Pseudomonas* do rRNA homologické skupiny I. V této biosyntetické dráze jsou do mcl PHA struktury zabudovávány meziproducty z β -oxidace mastných kyselin a zdrojem uhlíku pro polymer jsou tedy mastné kyseliny [34, 35]. Celá dráha začíná aktivací mastných kyselin thioesterovou vazbou na koenzym A, aby daná sloučenina mohla vstoupit do β -oxidace mastných kyselin. V β -oxidaci je převedena na trans-2-enoyl-CoA a (S)-3-hydroxyacyl-CoA na 3-ketoacyl-CoA, který je štěpen β -ketothiolázou na acetyl-CoA a na acyl-CoA, který má o dva uhlíky méně ve srovnání s acyl-CoA, který do β -oxidace původně vstoupil [13, 35].

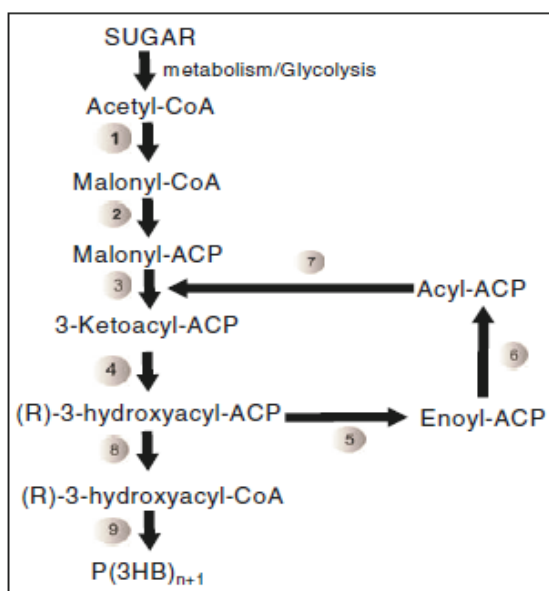
Za podmínek vhodných pro tvorbu PHA nedochází k úplnému rozkladu mastných kyselin na acetyl-CoA, případně propionyl-CoA v případě mastných kyselin s lichým počtem uhlíků, ale β -oxidace běží jen do doby, kdy se objeví vhodné intermediáty pro syntézu PHA, které jsou vhodným enzymovým vybavením mikroorganismu ihned převedeny na (R)-3-hydroxyacyl-CoA. (R)-3-hydroxyacyl-CoA je zpracováván PHA syntázou a zapojen do nově vznikajícího polymeru [1, 13].

Příkladem inkorporace 3-hydroxyoktanoátových a 3-hydroxyhexanoátových monomerních jednotek do struktury PHA je kultivace bakterie *Pseudomonas oleovorans* na médiích obsahujících oktan nebo kyselinu oktanovou a její soli za současné limitace dostupných dusíkatých látek. 3-hydroxyoktanoátové a 3-hydroxyhexanoátové monomery tvoří majoritní podíl výsledného polymeru [1, 34, 35].

Poslední čtvrtý typ biosyntézy PHA (viz. Obr. 5) je využíván u bakterií patřících k rodu *Pseudomonas* do rRNA homologické skupiny II. Prekurzory těchto kopolymerů mcl PHA jsou syntetizovány z acetyl-CoA [2] v anabolické dráze mastných kyselin („de novo“ syntéza mastných kyselin), která je například u *Pseudomonas putida* nezávislá na syntéze PHA. Základní monomerní jednotkou čtvrtého typu biosyntetické dráhy PHA je 3-hydroxydekanoát a nejvýznamnějším představitelem je bakterie *Pseudomonas aeruginosa* [35].

Příkladem bakterie s uvedeným typem metabolismu je *Pseudomonas putida*. Při její kultivaci na kyselině oktánové je zjištěna tvorba kopolymeru tvořeného z 3-hydroxyoktanoátových (hlavní podíl polymeru) a 3-hydroxyhexanoátových monomerních jednotek (minoritní podíl v polymeru). Jestliže je ale zdroj uhlíku zaměněn za glukonát, vzniká kopolymer složený z (R)-3-hydroxydekanoátu, jako majoritní podíl PHA a minoritní složku zastupuje dvojice (R)-3-hydroxydekanoátového a (R)-3-hydroxyoktanoátového monomeru [13].

Inkorporace intermediátů z biosyntézy mastných kyselin vede k zakomponování monomerů s více než 12 uhlíky v jednotce a zároveň obsahujících dvojně vazby. Tento klíčový znak má význam pro průmysl, protože s mol% monomerů s dvojnou vazbou roste i teplota rozkladu výsledného polymeru [26].



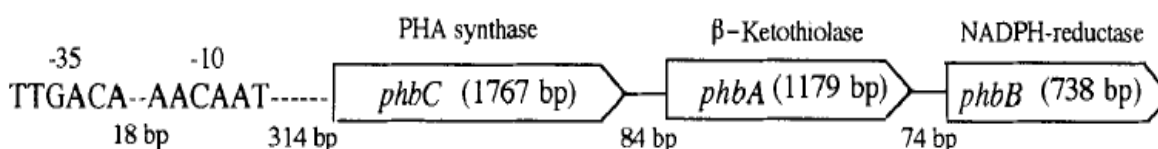
Obr. 5: Biosyntéza PHA z „de novo“ syntetizovaných mastných kyselin v metabolismu bakterií *pseudomonas* (skupina II). (1) acetyl-CoA karboxyláza, (2) ACP-malonyl transferáza, (3) 3-ketoacyl ACP-syntáza, (4) 3-ketoacyl ACP reduktáza, (5) 3-hydroxyacyl ACP reduktáza, (7) 3-ketoacyl ACP syntáza, (8) 3-hydroxyacyl ACP-CoA transferáza, (9) PHB syntáza [35].

Pátý a poslední typ biosyntézy PHA v bakteriálních buňkách vychází z přítomného systému metabolických drah majících jako výstupní produkt 4-hydroxyalkanové kyseliny. Většina z těchto monomerních jednotek se ale v PHA vyskytuje pouze za dostatečné koncentrace daných prekurzorů v kultivačním médiu. Struktury vznikajících monomerních jednotek mají vysokou spojitost se strukturou využitého prekurzoru. Získané 4-hydroxyalkanové kyseliny jsou přímo přeměněny na odpovídající thioester koenzymu A za katalýzy CoA transferázou nebo thiokinázou [26].

3.3.2. Enzymové vybavení buňky pro syntézu PHA

Geny pro enzymy zapojené do biosyntézy PHB bakterie *Cupriavidus necator* jsou kódovány jedním jednoduchým operonem *phaCBA*. β -ketothioláza je kódována genem *phbA*, NADPH dependentní acetyl-CoA reduktáza exprimována z genu *phbB* a struktura P(3HB) syntázy je kódována v genu *phbC*. Promotorová sekvence σ^{70} je uložena 307 bp v opačném směru posunu polymerázy [5, 26]. Všechny tři geny jsou syntetizovány stejným směrem a jejich rozložení v operonu je zobrazeno na obrázku Obr. 6.

Geny pro enzymy účastníci se tvorby granulí - phasiny (PhaP) a gen pro tvorbu depolymerázy PHB (PhaZ) jsou zařazeny na stejné operonové jednotce a DNA polymerázou jsou čteny ve stejném směru jako geny kódující enzymové vybavení pro tvorbu P(3HB) [5].



Obr. 6: Organizace operonové jednotky enzymů pro biosyntézu základní jednotky PHA u *C. necator* [11]

Enzym β -ketothioláza (EC 2.3.1.9.) je představován třemi izoenzymy, jež se liší v substrátové specifitě. β -ketothiolázy katalyzují reversibilní přenos aktivované acetylové skupiny na acyl-CoA [27].

První druh β -ketothiolázy (*bktB*) je homotetramerem o velikosti 46 kDa a syntetizuje 3-hydroxyvaleryl-CoA z propionyl-CoA a acetyl-CoA. Dříve se předpokládalo, že je zapojena také do β -oxidace mastných kyselin. Druhým isomerem je A forma β -ketothiolázy, která se skládá také z homotetrameru, ale velikosti 44 kDa. Tato β -ketothioláza katalyzuje vznik 3-hydroxybutyryl-CoA ze dvou molekul acetoacetyl-CoA. Třetí isoenzym se vyskytuje v eukaryotech, kde se účastní syntézy steroidních látek z prekursoru acetoacetyl-CoA [8, 27].

Acetoacetyl-CoA reduktáza (ACR) EC 1.1.1.36., druhý enzym zapojený do syntézy PHA, reversibilně redukuje acetoacetyl-CoA na 3-hydroxybutyryl-CoA v přítomnosti pyridinového nukleotidu, který slouží jako donor iontů vodíku. U bakterie *C. necator* je ACR přítomná ve dvou izomerních formách. NADH dependentní ACR je schopna zpracovat jak R(+)- tak i L(-)-isomer s dlouhým uhlíkovým řetězcem za vzniku L(+)-hydroxybutyryl-CoA. NADPH dependentní ACR je schopná zpracovávat pouze D(-)-hydroxyacyl-CoA se čtyřmi až šesti uhlíky v řetězci za vzniku D(-)-hydroxybutyryl-CoA [28KO]. Ačkoliv v bakteriální buňce *C. necator* byly objeveny obě formy, v syntéze PHA je zapojena pouze NADPH acetyl-CoA reduktáza [8].

Posledním enzymem je PHA syntáza, která je součástí obalové vrstvy granulí a je popsána v kapitole 3.2.3.1.

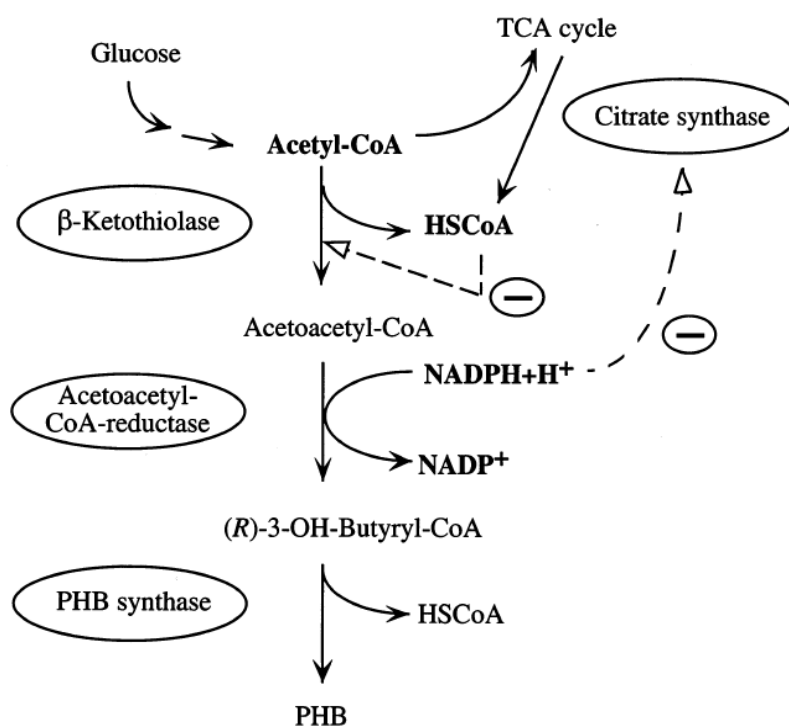
Genetická informace u bakterie *Pseudomonas oleovorans* je kódována operonem *phaC1ZC2D*, který kóduje dvě polymerázy (PhaC1 a PhaC2), depolymerázu (PhaZ) a D protein (PhaD) [5].

3.3.3. Regulace produkce PHA

Regulace produkce PHA je důležitým faktorem v syntéze PHA, je studována na několika úrovních: (i) aktivace/represe genové exprese *pha* genů specifickými signály z prostředí, například jako hladovění, (ii) aktivace enzymů syntetizujících PHA specifickými buněčnými komponentami nebo metabolickými meziprodukty, (iii) inhibice metabolických enzymů kompetitivních cyklů a následné obohacení o požadované meziprodukty pro syntézu PHA, (iv) a kombinace výše uvedených [9].

3.3.3.1. Regulace na enzymové úrovni

Regulace na enzymové (fyziologické) úrovni je vedena přes kofaktory inhibující syntetické enzymy a dostupností metabolitů pro syntézu PHA [8KO]. Hlavními faktory, které řídí tok metabolitů drahami na enzymové úrovni a ovlivňují tak tvorbu PHA u *C. necator*, jsou acetyl-CoA a volný koenzym A. Mezi další důležité faktory mající vliv na regulaci produkce se řadí citrátsyntáza, a to díky možnosti kontroly koncentrace volného koenzymu A. Koenzym A reguluje aktivitu β -ketothiolázy. Svůj význam v regulaci plní i koncentrace intramolekulárního NAD(P)H a vysoký poměr mezi NAD(P)H/NAD(P), protože NAD(P)H je důležitým faktorem pro aktivaci NADPH-dependentní acetoacetyl-CoA reduktázy [9, 36].



Obr. 7: Dráha syntézy PHA a regulační dráha; (TCA-citrátový cyklus)[9]

Acetyl-CoA je výchozím produktem jak pro syntézu PHA, ale stejně tak je důležitý i pro syntézu vysokomolekulárních látek a redukováných koenzymů, pokud vstoupí do citrátového cyklu. Tok acetyl-CoA je u *C. necator* regulován poměrem přítomného NAD(P)H a NAD(P) [36]. Jestliže se v buňce zvýší poměr NAD(P)H/NAD(P), dochází k inhibici citrátsyntázy a isocitrátdehydrogenázy, což zajistí dostatek acetyl-CoA pro β -ketothiolázou a vzniká acetoacetyl-CoA, který je schopný pokračovat v syntéze PHA. NADPH je proto také limitujícím faktorem pro syntézu [9, 34].

Při kultivaci bakterie za dostatečné koncentrace dusíku je v buňce vysoká koncentrace koenzymu A, který vzniká při zpracování acetyl-CoA v citrátovém cyklu. Volný koenzym A je zodpovědný za inhibici β -ketothiolázy, čímž dochází k inhibici PHA syntézy [9, 34]. Schéma regulačních drah je uvedeno na Obr. 7.

3.3.3.2. Regulace na genové úrovni

Intenzivní regulace biosyntetické dráhy PHA probíhá i na úrovni genové exprese, při níž je využíváno alternativních σ -faktorů a autoinduktivních molekul [8]. Jedním z nejvýznamnějších regulačních proteinů je PhaR, který ovlivňuje expresi *phaP* genů a byl popsán v kapitole 3.2.3.4. Je také známo, že proteiny nutné pro syntézu granulí jsou produkovány pouze za podmínek produkce PHA a to pouze v takové koncentraci, která je nezbytně nutná pro úplné dokončení granulí. Žádné proteiny se nevyskytují volně rozpuštěny v médiu, z čehož vyplývá, že proteiny mají vlastní systém samoregulace [9]. Řada dalších regulačních faktorů exprese genů *pha* a *phb* byla identifikována a popsána a studium této oblasti stále pokračuje.

Například promotor indukovaný limitací fosforem na 5'konci byl identifikován u bakterie *Acinetobacter* sp. [8, 37]. Zajímavý je regulační protein LuxR u bakterie *Vibrio harveyi*, který nekontroluje jen bioluminiscenci, ale podílí se i na syntéze PHA. Exprese genu pro LxuR je aktivována pomocí 3-hydroxybutyryl-homoserinlaktonu (patří mezi N-acetylhomoserinlaktony, které zprostředkovávají regulaci závislou na koncentraci buněčné kultury) a probíhá za vysoké koncentrace buněk v médiu. Proto se předpokládá, že LuxR je zodpovědný za naprodukcí PHA ve stacionární fázi růstu kultury [8, 38].

Geny *nrB* a *nrC* byly objeveny v mnoha bakteriích, kde hrají významnou roli v regulaci dusíku, ale u bakterie *Azospirillum brasilense* SP7 regulují i syntézu PHA. Jsou také spojeny s limitací amonnými ionty [39]. Dále bylo zjištěno, že i klíčové proteiny regulace dusíku - P_{II} protein (kódovaný genem *glnB*) a P_z protein (kódovaný genem *glnZ*) vytváří komplex, který se bezprostředně podílí na regulaci syntézy PHA bakterie *Azospirillum brasilense* SP7 [40].

Bakterie rodu *Pseudomonas* jsou schopné syntetizovat PHA pomocí dvou různých metabolických drah: (i) s využitím β -oxidace mastných kyselin nebo (ii) zapojením do „*de novo*“ syntézy mastných kyselin. Při kultivaci bakterie *P. aeruginosa* PAO1 na glukonátu je pro produkci PHA striktně vyžadována přítomnost funkčního RpoN σ -faktoru, zatímco produkce PHA na mastných kyselinách není na tomto faktoru závislá. RpoN je σ^{54} -faktor, který je zapojen do aktivace určitých „non-house-keeping“ promotorů během růstové fáze buněk [8, 41].

Další regulační protein nazývaný PhbR_{Ps}, byl izolován z bakterie *Pseudomonas* sp.61-3, což je unikátní kmen schopný produkovat buď homopolymer PHB nebo kopolymer, skládající se z monomerů obsahujících 4 až 12 uhlíkových atomů. Ovšem regulační protein PhbR_{Ps} je přítomen pouze za podmínek produkce homopolymeru PHB [9].

3.4. Bakteriální producenti PHA

Mikroorganismy schopné produkovat PHA patří mezi gram-pozitivní i gram-negativní bakterie, dále zde patří fototrofní a aerobní, ale i v litotrofní nebo organotrofní bakterie. PHA byly izolovány dokonce i z cyanobakterií a třída *Halobacteriaceae* patřící do říše *Archei*. Na základě podmínek nutných pro produkci polymeru mohou být bakterie produkující PHA rozděleny do dvou základních kategorií [4, 8, 10, 11].

První skupina je tvořena bakteriemi, které pro akumulaci PHA v buňkách vyžadují limitní koncentrace esenciálních nutrietů, mezi které se řadí dusík, fosfor, hořčík nebo síra. Zároveň je ale nutné dodržovat v živném médiu vysokou koncentraci zdroje uhlíku. Mezi bakterie náležící do této skupiny se řadí *C. necator*, *Protomonas extorquens* a *Protomonas oleovorans* [9, 42].

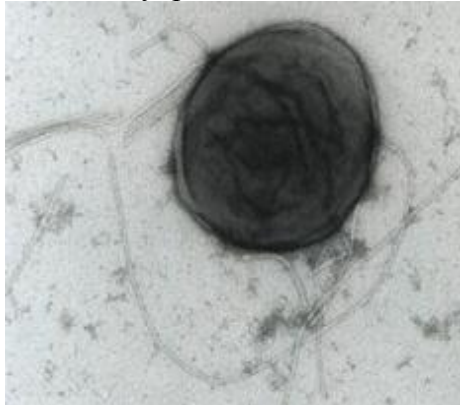
Druhá skupina bakterií produkujících PHA nevyžaduje žádné omezující podmínky pro produkci PHA, ale žádaný polymer produkuje již během samotného růstu bakterie. Do této skupiny je zahrnuta bakterie *Alcaligenes latus*, mutantní kmen *Azotobacter vinelandii* a rekombinantní *Escherichia coli* [9, 42].

V této diplomové práci byla pro produkci PHA studována bakterie řadící se do první skupiny, bakterie *Cupriavidus necator*.

3.4.1. Bakterie *Cupriavidus necator* H16

Cupriavidus necator H16 (s dřívějšími názvy *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes eutrophus* či *Wautersia eutropha*) je nejlépe prostudovanou bakterií pro produkci PHB, jelikož je schopna produkovat vysoké množství PHA v jednoduchém minerálním médiu [43].

Jedná se o půdní, gram-negativní, nesportující bakterii s fakultativně chemolitho-autotrofním organismem a řadí se také mezi denitrifikační bakterie, jelikož za anaerobních podmínek může jako konečný akceptor elektronů využívat dusičnany. Nejsou-li v prostředí přítomné organické látky [44, 45], *C. necator* může využívat H_2 jako donor elektronů, čímž se řadí mezi tzv. „knallgas“ bakterie (bakterie využívající H_2 a O_2 jako donor elektronů). Pokud je kultivována na médiu bohatém na živiny, převládá aerobní metabolismus. [37, 46].



Obr. 8: Bakterie *Cupriavidus necator* H16

C. necator je pohyblivá bakterie, jež je vybavena peritrichálními bičíky. Je schopná růst při $41^\circ C$ a je odolná vůči niklu a kombinaci niklu a kadmia [37]. Základní geny pro široké spektrum možných substrátů, které je *C. necator* schopen využít, jsou uloženy na 0,44Mbp konjugovaném megaplasmidu pHG1 [45]. Kromě megaplasmidu pHG1 je genom *C. necator* H16 složen ze dvou kruhových chromosomů o velikosti 4,1 a 2,9 Mbp, které dohromady kódují 6 116 genů [46]. Molární procento cytosinu a guaninu je rovno 65,5 %. Schopnost *C. necator* syntetizovat bioplasty je zakódována v megaplasmidu pHG1 [37].

C. necator byla považována za bakterii, která syntetizuje jen scl PHA. Pokud je ale v kultivaci zdrojem uhlíku oktanoát sodný a dále je zde přítomen akrylát sodný, který inhibuje β -oxidaci mastných kyselin, bakterie jsou schopné syntetizovat i mcl PHA a vytvořit tak tetrapolymer z monomerů 3-hydroxyoctanoátu, 3-hydroxydekanoátu, 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu [20].

3.5. Využití odpadních substrátů k produkci PHA

Ačkoliv jsou polyhydroxyalkanoáty vysoce biodegradovatelné v rozmanitém spektru prostředí a za celé řady podmínek, jejich významnou nevýhodou je vysoká produkční cena ve srovnání s tradičními petrochemickými plasty. Proto jsou neustále vyhledávány alternativní cesty, jak snížit cenu vyráběných bioplastů [47].

Jak tedy docílit snížení výrobních cen biodegradovatelných plastů? K řešení by mohla vést celá řada postupů - od účinnějšího fermentačního procesu, lepší izolace či purifikace PHA, produkce nových rekombinantních kmenů obsahujících enzymové vybavení pro produkci PHA až k využívání levných substrátů [7, 48], jímž bude věnována tato kapitola.

Tab. 3 udává základní zdroj uhlíku, jenž je využitelný pro mikrobiální produkci PHA. Kromě základního zdroje uhlíku obsahují odpadní substráty i vedlejší uhlíkaté substráty, které mohou sloužit jako prekurzory monomerních jednotek. Další výhodou je častá přítomnost dusíkatých látek a dalších sloučenin, které mohou podporovat růst buněk a tvorbu PHA. Jejich přítomnost často šetří finanční prostředky [49]. Kultivace bakteriální biomasy na odpadních substrátech sice vede k produkci kýženého polymeru, ale získaná koncentrace PHA je nižší (kolem 65 %) než při kultivaci na čistých substrátech, kde koncentrace PHA dosahuje až 80 % biomasy při kultivacích ve fermentoru [50]. Tento problém by však mohl být vyřešen prací s rekombinantními kmeny bakterií, kdy do genomu bakterie, nejčastěji *Escherichia coli*, jsou pomocí vektorů vkládány geny pro enzymové vybavení nutné pro produkci PHA [48].

Tab. 3: Přehled odpadních substrátů rozdělených podle základní složky uhlíkového zdroje [49]

Druh substrátu	Levné odpadní substráty
Sacharidy	Melasa Škrob a jeho hydrolyzáty (maltóza) Laktóza v syrovátce Celulózoové hydrolyzáty z papírenství
Tuky a oleje (mastné kyseliny)	Odpady z produkce bionafty (methanol a glycerol)
Alkoholy	Rostlinné a živočišné odpady
Organické kyseliny	Kyselina mléčná z mlékarenství

S cílem získat vyšší výtěžky PHA jsou často bakterie akumulující PHA izolovány z prostředí, kde se vyskytuje odpadní produkt, který ale může být využit jako substrát pro izolované mikroorganismy. U těchto mikroorganismů je předpoklad, že jsou částečně adaptovány na tento substrát.

Příkladem je izolace bakterií *Actinobacillus* sp. z okolí továrny na alkoholické nápoje. Odpadní vody z této výroby obsahují sacharidy a dusíkaté látky, které jsou s výhodou využity při kultivaci organismů zde izolovaných mikroorganismů [34]. Dalším příkladem je izolace bakterie *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 získaná ze zemědělsko-průmyslových odpadních olejů [51].

3.5.1. Využití odpadních substrátů obsahujících sacharidy

Odpadní vody a odpady ze zemědělství a potravinářské výroby ještě stále obsahují vysoké procento následně využitelných sacharidů a dalších látek, které lze využít v jiných odvětvích.

Příkladem jsou krmné směsi pro dobytek, následná izolace stopových prvků či použití pro mikrobiální fermentační procesy, při nichž je získáváno široké spektrum produktů a mezi nimi i polyhydroxyalkanoáty [34].

Významným odpadním sacharidickým substrátem je syrovátka vznikající jako odpadní produkt při výrobě sýrů mlékárenských závodů. Surovátka tvoří 80-90% mléka použitého pro výrobu a obsahuje přibližně 4,5% laktózy, 0,8% proteinů, 1% solí a 0,1-0,8% kyseliny mléčné [52]. Nevýhodou tohoto substrátu je nízká rozpustnost laktózy (210 g/l) ve srovnání s glukózou (700 g/l), proto pro fermentaci je nutné provádět na relativně velkém objemu odpadní vody [34].

Studie produkce PHB na syrovátce ukázala, že tento odpadní produkt může být využíván rekombinantní bakterií *Escherichia coli* CGSC 4401, která je schopna využít laktózu, ale geny pro enzymy zapojené do syntézy PHA byly vloženy z bakterie *C. necator*. Touto kultivací může být získána biomasa obsahující až 81 % PHB (5,2 g/l) v biomase [52].

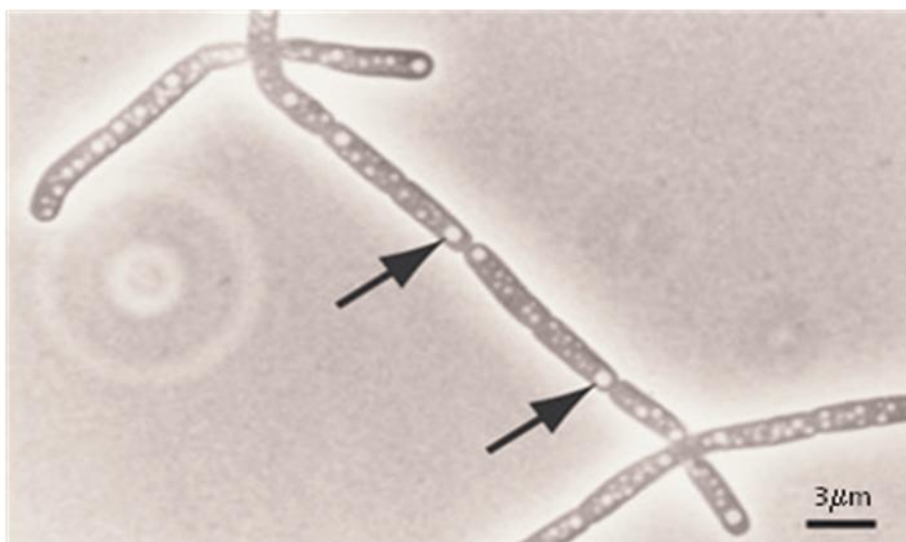
Produkce PHA na laktózových substrátech může být docílena i přípravou rekombinantní *C. necator*, která má místo genu pro PHA depolymerázu začleněny geny *LacZ*, *LacI* a *LacO* pro využití laktózy bakterií *E. coli*. Tato genetická úprava má vyšší výtěžek i díky odstranění depolymerizačních enzymů z buňky [6].

Dalším cukernatým substrátem, který lze využít pro produkci PHA, je xyloza obsažená v lignocelulóзовých odpadních substrátech ze zemědělství. Xyloza je vhodným substrátem pro bakterie *Pseudomonas cepacia*, ale produkce PHA je celkem nízká. V současnosti je používán rekombinantní kmen *E. coli* s genem izolovaným z *C. necator*. Touto fermentací byla získána biomasa obsahující až 35,8 % PHA. Výrazně vyšších výsledků bylo ještě dosaženo obohacením média o zdroj dusíku (hydrolyzát sojových bobů), kdy získaný polymer obsahoval až 74 % biomasy [48].

Významným potravinářským odpadním produktem je melasa. Například sojová melasa vznikající při zpracování sojových bobů. V současné době nemá významné průmyslové využití, protože v ní přítomné oligosacharidy jsou jen částečně stravitelné pro zvířata a nestavitelné pro člověka [53]. Sojová melasa ale obsahuje 30% podíl fermentovatelných sacharidů, z nichž je nejvíce zastoupena rafinóza, sacharóza a stachyóza [18].

Již dnes je využívána ve fermentačních procesech zahrnujících například syntézu kyseliny mléčné bakteriemi *Lactobacillus salivarius* nebo produkci butanolu pomocí *Clostridium beijerinckii*. Pro produkci PHA byla na sojovou melasu naočkována bakterie *Pseudomonas corrugata* produkující mcl-PHA. Bakterie *P. corrugata* využívá pouze sacharózu a za použití 5% CDW sojové melasy lze dosáhnout vysokých hodnot koncentrace biomasy (3,2 – 3,6 g CDW/l), ale koncentrace PHA je velmi nízká (5-17% CDW) [18].

V pozdější studii byly izolovány bakterie z půdy a usazenin sojových polí v USA a byly zařazeny do rodu *Bacillus sp.* CL1 (viz. Obr. 9). Tento kmen je schopný využít rafinózu a tvořit až 90% podíl polyhydroxyalkanoátů v biomase. Stejně vysoká produkce PHA je pozorována i u dalších sacharidických substrátů (glukóza, fruktóza, sacharóza, galaktóza, stachyóza) [53].



Obr. 9: Buňky bakterie *Bacillus* sp. kmen CL1 pod mikroskopem. Šipky zvýrazňují PHA inkluze v buňkách [53].

Dalším odpadním produktem jsou odpady obsahující vysoký obsah škrobu. Pro tento odpadní produkt byla navržena dvoustupňová utilizace, kdy v prvním kroku byl škrob převeden fermentačně na organické kyseliny - kyselinu octovou (60-80%), propionovou (10-30 %) a kyselinu butanovou (5-40 %), čímž došlo k přeměně až 43% škrobu na organické kyseliny. V druhém kroku byla provedena kultivace bakterie *C. necator* na získaném roztoku organických kyselin, což vedlo k produkci kopolymeru P(3HB-co-3HV). Celková koncentrace PHA tvořila 55 g vzhledem k 100 g celkové koncentrace uhlíku [54].

Výroba javorového sirupu v Kanadě s sebou přináší i velké množství odpadních vod obsahujících zejména sacharózu. Ta může být s výhodou využita jako významný substrát pro bakterii *C. necator*, která je schopna vyprodukovat biomasu se 77,6 % žádaného polymeru, v tomto případě P(3HB) [55].

3.5.2. Využití odpadních substrátů na bázi olejů

Pro růst bakterie *C. necator* jsou výborným a levným zdrojem uhlíku tuky a oleje, při jejichž využití může být získán až 80% obsah polymeru v buňkách bakterie [56]. Například při kultivaci *C. necator* na olivovém oleji byl získán polymer P(3HB) o molekulové hmotnosti v rozmezí 200-400 kDa [57].

Nevýhodou kultivací na olejích bakterie *C. necator* je syntéza homopolymeru, pokud ale dojde k rekombinantní úpravě genomu, je tato bakterie schopna produkovat kopolymery, jež mají lepší fyzikální a chemické vlastnosti. Při genové expresi PHA syntázy bakterie *Aeromonas caviae* vektorově vložená do *C. necator* lze získat enzymy pro produkci kopolymeru P(3HB-co-HH), kde 3-hydroxyhexanoátový monomer představuje 4-5 mol% polymeru a celkový obsah polymeru v biomase dosahuje až 80% [57, 58], zejména při kultivaci na sojovém oleji [59].

Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 je pohyblivá, gram-negativní bakterie tyčinkovitého tvaru, která je schopna využít celou řadu substrátů, především mastné kyseliny. Vysoké produkce kopolymeru PHA (54,5 % CDW) bylo dosaženo při její kultivaci na odpadní technické kyselině olejové (obsah kyseliny olejové až 80,7 %), ještě větší zisk PHA o hodnotě 66,1 % byl získán při kultivaci na odpadních volných mastných kyselinách,

kdežto kultivace na glukóze dosahovala jen 16,8 % obsahu biomasy. S výhodou byl použit i odpadní fritovací olej z potravinářských závodů [51].

Vedlejší produkty a odpadní substráty produkce palmového oleje mají velmi slibné vlastnosti pro produkci PHA a nejlepším bakteriálním kmenem pro produkci byla zvolena *C. necator* H16 [56]. Stejná bakterie je schopna využít zdroj uhlíku ze sojového oleje, přičemž získaná biomasa kultury kultivovaná ve fermentoru o koncentraci 118-126 g/l obsahovala 72-76 % PHB [60].

Kultivace bakterie *Pseudomonas* sp. kmenu DR2 na kukuřičném oleji vedla k produkci PHA tvořícího až 37,34 % biomasy. Tento polymer je složen z 3-hydroxyoctanoátového, 3-hydroxydekanového a 3-hydroxydodekanového monomeru [60].

3.5.3. Využití odpadních substrátů na bázi organických kyselin

Pro produkci PHA byl využit POME, což je vodný roztok, který vzniká ve velkých objemech při mletí palmových plodů. Sice se jedná o olejnatý substrát, který je ale nejprve pomocí anaerobní fermentace převeden na těkavé organické kyseliny – octovou, máselnou a propionovou v poměru 3:1:1, které jsou následně využity k produkci kopolymeru PHA. (POME je koloidní suspenze obsahující 95-96,5% vody, 0,6-0,7% oleje a 4-5% pevných látek [61].

Další autoři navrhli produkci PHA ze škrobnatých odpadních vod, které byly podrobeny dvěma krokům. Nejprve byl proveden rozklad odpadu na organické kyseliny, které byly následně odfiltrovány do bioreaktoru, kde byla kultivována bakterie *C. necator*. Získaný polymer představoval 34,1 % biomasy, přičemž koncentrace biomasy dosáhla 1,2 g/l [62].

3.5.4. Využití odpadních substrátů obsahujících alkoholy

Nejen odpadní substráty z potravinářských výrob mohou být využity k mikrobiální produkci PHA, ale také odpadní produkty z výroby bionafty.

Kultivací bakteriálního kmenu *Cupriavidus necator* DSM 545 využívající k produkci PHA odpadní glycerol pocházející z výroby bionafty byla získána biomasa o koncentraci 68,8 g/l, z čehož 38 % biomasy bylo tvořeno polymerem o molekulové hmotnosti v rozmezí $7,9 \cdot 10^5$ až $9,6 \cdot 10^5$ Da. Nevýhodou tohoto substrátu je ovšem vysoký obsah sodíku a dalších příměsí, které významně zkracují produkční fázi PHB [60, 63].

Ve srovnání s kultivací na čistém glycerolu byla získána jen polovina možného PHA. Pokud je ale provedena úprava koncentrace dusíku a čas kultivace, lze sledovat až 30% nárůst produktivity a získat tedy biomasu s obsahem polymeru až 50 % [62].

3.6. Produkce PHA s využitím prekurzorů

Prvním monomerem, který byl inkorporován do struktury P(3HB), byl 3-hydroxyvalerát. Tato monomerní jednotka je začleněna do struktury PHA při kultivaci *C. necator* H16, pokud kultivační médium obsahuje kromě zdroje uhlíku i podíl acetátu a propionátu. Takto získaný polymer obsahuje různý 3HV v rozmezí 0 až 45 % [59].

Kultivace bakterie *C. necator* NCIMB 11599 na valerátu vede taktéž k inkorporaci HV monomeru do struktury a může tvořit až 80% podíl polymeru. Jestliže byl do kultivačního média přidán 5-chlorvalerát a valerát, získaný polymer obsahoval 3HB, 3HV a 5HV monomery, které tvořily až 46% biomasy. Zastoupení 5HV monomeru v polymeru dosahovalo 52 % [64].

C. necator H16 stejně tak jako *C. necator* NCIMB 11599 byly kultivovány v médiu s obsahem butyrátu a valerátu. Zatímco *C. necator* NCIMB 11599 akumuloval P(3HB-co-3HV) s až 90% obsahem 3HV, *C. necator* H16 produkoval P(3HB-co-3HV) jen s 75 % zastoupením. Také molekulová hmotnost byla nižší u H16 [65].

Použití butyrátu a 4-hydroxybutyrové kyseliny nebo směsí s 4-hydroxybutyrátem, butan-1,4-diolem nebo γ -butyrolactonem vede k akumulaci P(3HB-co-4HB) při kultivaci *C. necator* H16. Médium tvořené směsí butyrátu, valerátu a 4-hydroxybutyrátu vede k produkci PHA s 45% 4HB a 23% 3HV monomeru [8].

Významným substrátem pro *Alcaligenes* sp. kmen AK201 jsou mastné kyseliny (C₂–C₂₀). Zatímco P(3HB) byl produkován na mastných kyselinách se sudým počtem uhlíků, kyseliny s lichým počtem uhlíků tvořily kopolymer P(3HB-3HV) a podíl 3HV byl vyšší u mastných kyselin s nižším počtem uhlíků. Při produkci na rostlinných olejích a tucích se pohyboval obsah polymeru kolem 50 % na biomasu [8].

3.7. Srovnání možných strategií izolace PHA

Izolace PHA z bakteriální buňky je dalším důležitým krokem, který významně ovlivňuje náklady na celkovou produkci PHA. Nízkonákladová izolace může snížit celkovou cenu získaného polymeru a konkurovat tak petrochemickým plastům. Cílem izolace je také získat vysoce čistý polymer, který může být využit ve všech odvětvích od medicíny, přes obalové materiály až po industriální použití. Cílem izolačního kroku je zvýšit stupeň rozrušení buněčné stěny, který může být ještě doplněn o předčištění vzorku biomasy získané po kultivaci [66].

Strategie zisku PHA z biomasy může být rozdělena do tří kroků – předčištění, extrakce a purifikace, které vedou k zisku vysoce čistého polymeru.

3.7.1. Předčištění vzorků

Tento krok izolace je zařazen bezprostředně za kultivační krok, kdy narostlá kultura je zcentrifugována a promyta. Předčištění se provádí jako jednostupňové nebo vícestupňové s využitím různých metod s cílem usnadnit pozdější rozrušení buněčné membrány [67].

Základní způsob předčištění je ohřev biomasy na určitou teplotu. Tento ohřev má za následek denaturaci a rozpuštění genetické informace a proteinů, které tvoří buněčnou stěnu, což vede k porušení stability membrány a zamezení zvýšení viskozity roztoku. Denaturace je s výhodou využita pro inaktivaci DNA depolymerázy, která následně už není schopna denarovat získaný polymer [68, 69].

Například pro bakterii *C. necator* DSM545, bylo v literatuře uvedeno, že pro předčištění lze použít teplotu 85°C po dobu 15 minut [68].

Dalším možným přečištěním je aplikace solí – chloridu sodného nebo chloridu draselného. Tyto soli vykazují ale nižší účinnost na porušení buněčné stěny, pokud jsou aplikovány za vyšší teploty. V takové kultivaci sice dojde k narušení buněk, ale spíše účinkem teploty [70].

Mezi další možné způsoby chemického předčištění se řadí přidavek alkalického roztoku hydroxidu sodného, který byl použit při předčištění buněk bakterie *Allcaligenes latus* před následnou mechanickou disrupcí za pokojové teploty [70]. Účinnou předúpravou biomasy před mechanickou disrupcí je přidavek 0,01% SDS, který stejně jako další povrchově aktivní látky odstraní lipidy [71]. S přibývajícím koncentrací SDS roste i stupeň narušení buněčné membrány [70].

Mezi další fyzikální předúpravy vzorků lze řadit zamrazování. Snížení teploty pod bod mrazu vede k tvorbě krystalů v buňce, které nabírají na objemu a tak jsou schopné rozrušit buňku. Zamrazování je i jedna z technik dlouhodobého uskladnění kultury [67].

3.7.2. Extrakční metody

3.7.2.1. Metody využívající rozpustnosti PHA

Jedná se o jednu z nejstarších metod pro izolaci PHA a tato metoda je založena na rozpustnosti PHA v organickém rozpouštědle, zatímco buněčné komponenty zůstávají nerozpuštěny a často jsou odfiltrovávány ze získaného roztoku PHA [4].

Mechanismus působení rozpouštědla může být rozdělen do dvou kroků. V prvním kroku je modifikována permeabilita buněčné membrány, a až ve druhém kroku je PHA rozpuštěno. PHA je následně z roztoku rozpouštědla získáno buď odpařením rozpouštědla, nebo vysrážením v roztocích, které PHA nerozpouští [67].

V literatuře již bylo publikováno 48 rozpouštědel pro extrakci PHA. Nejvýznamnějšími a nejlepšími rozpouštědly jsou chlorované uhlovodíky (chloroform, 1,2-dichlorethan, trichlorethylen a metylenchlorid) a jejich azeotropické směsi (1,1,2-trichlorethan s vodou), cyklické uhlovodíky a případně směsi chloroformu s dalšími uhlovodíky [4, 72].

Extrakce sčl a mcl PHA se liší. Náročnější sčl PHA je rozpustný především v uvedených chlorovaných uhlovodících, jako je chloroform, kdežto mcl PHA jsou rozpustné v mnohem širším spektru chemikálií (například v acetonu používaném pro předčištění vzorku), které jsou levnější a méně toxické [71].

Extrakce PHA z bakterie *C. necator* může být provedena různými rozpouštědly, například za použití 1,2-propandiolu vede k 79% zisku PHA s čistotou 99,1 % [67].

Isolace mcl PHA z biomasy *Pseudomonas putida* je příkladem použití acetonu jako rozpouštědla PHA. Předúprava vzorku byla provedena přidávkem methanolu, který má velmi malý vliv na ztrátu polymeru ve srovnání s NaOH a zahříváním biomasy. Methanol navíc biomasu vysuší, čímž podpoří pozdější izolaci. Samotná izolace byla provedena Soxhletovou extrakcí, která byla mnohem účinnější než přímý kontakt s acetonem. Vyšší čistota může být dosažena opětovným rozpuštěním v acetonu a precipitací mcl PHA přidávkem studeného metanolu [71].

3.7.2.2. Metody založené na rozpuštění dalších buněčných komponent

Metody izolace, kdy je žádoucí odstranění buněčných komponent netvořících PHA, se často skládají ze tří kroků. Nejprve je biomasa získaná po kultivaci zahřívána na vyšší teplotu s cílem denaturovat proteiny a DNA, druhým krokem je často proteolytické rozložení buněčných komponent a na závěr je získaný polymer přečištěn, tedy promyt povrchově aktivní látkou [71].

Metoda izolace využívající proteiny byla poprvé publikována firmou Zeneca jako alternativa k extrakční izolaci. Při této izolaci je využíváno proteolytických enzymů, které disponují vysokou schopností štěpit vazby mezi jednotlivými aminokyselinami buněčné membrány a rozrušit tak obalovou vrstvu PHA [67].

Další studie byla provedena při izolaci PHA z bakterie *C. necator* DSM 545, ve které byly ze šestice enzymů vybrány trypsin, bromelain a lysozym, jež vykazují vysokou proteolytickou aktivitu dané bakterie. Nejlepší výsledek byl získán za použití 2% bromelainu (50 °C, pH 9), kdy dosahovala čistota získaného PHA 88,8% [68].

Ve studii byl použit také pankreatin. Jeho využití vedlo v izolačním postupu k zisku jen 62,2 % polymeru, ale jeho čistota se dosáhla na 90% [68].

Metoda pro zisk mcl PHA pro zisk z biomasy *Pseudomonas* pomocí enzymů zahrnuje tepelnou denaturaci biomasy, po níž následuje přidavek nadbytku enzymu a SDS za spoluúčasti EDTA. Sledování tohoto procesu prokázalo, že biomasa netvořící PHA je rozpuštěna a lze získat polymer o čistotě 95 %. SDS se váže na povrch granulí, čímž sice zabraňuje znovunavázání agregátů vzniklých z rozrušené biomasy, ale zároveň je to látka snižující čistotu polymeru, kterou lze odstranit pouze několikanásobným promytím. Proto je snaha minimalizovat množství SDS při izolaci [73].

Další studie byla zaměřena na izolaci PHA z buněk *P. putida* PGA1 za použití alkalasy a bylo citováno, že koncentrace alkalasy je převládající faktor při enzymové izolaci. Bylo zjištěno, že pouze 20 minut stačí pro hodnotný lytický průběh. Následná purifikace PHA, který byl v roztoku obklopen rozrušenou biomasou, byla provedena pomocí ultrafiltrace a kontinuální diafiltrace. Nakonec bylo získáno 90 % polymeru s čistotou 92,6% [69].

Další metoda kombinující použití chlornanu sodného a enzymů byla provedena na bakteriích *Burgholderia* sp PTU9. Ze spektra proteolytických enzymů byl vybrán papain, po jehož aplikaci bylo získáno 78 % polymeru s čistotou 89% [67].

Nejen enzymová izolace PHA byla studována. V literatuře bylo publikováno velké množství postupů využívajících organických i anorganických chemikálií.

K velmi účinným, efektivním a ekonomickým metodám používaným k izolaci PHA patří rozpouštění biomasy, která netvoří PHA pomocí povrchově aktivních látek, jako je například dodecylsulfát sodný. Tato povrchově aktivní látka je schopná procházet přes fosfolipidové dvouvrstvy. Při zvyšující se koncentraci SDS v roztoku, roste i procento inkorporovaných molekul do membrány, dokud nepraskne a nevytvoří velké micely složené z fosfolipidů membrány a povrchově aktivní látky, přičemž PHA je uvolněn do prostředí. Další funkcí povrchově aktivní látky je rozpustnost proteinů, ale i buněčných komponent netvořících PHA [47, 67]. Jeden gram SDS je schopný rozpustit 0,72 g buněčných komponent neobsahujících PHA [66].

Isolace PHA pomocí povrchově aktivní látky, konkrétně dodecylsulfát sodný (SDS), byla aplikována na biomasu *R. eutropha* NCIMB11599, přičemž bylo zjištěno, že pokud poměr mezi SDS a biomasou je vyšší než 0,4, lze získat PHA s čistotou přesahující 95 % [66].

Komponenty netvořící PHA lze rozpustit například za využití chlornanu sodného a získat tak čistý PHA – 86% čistota u *C. necator* a 93% čistota u *E. coli*. Nevýhodou této metody je vysoká degradace polymeru během izolace, ta ale není pozorována, pokud je PHA izolována z buněk *C. necator* a *E. coli*. Tato zvláštnost je připisována krystalické morfologii polymeru v bakteriích [67].

Pokud byla izolace pomocí chlornanu draselného kombinována se záhřevem biomasy PHA, byl z buněk *Cupriavidus taiwanensis* 184 získán s čistotou 99% a 94% účinností izolace [67]. Vlivem chlornanu draselného klesá molekulová hmotnost, pokud je ale přidán sulfát sodný, lze pokles molekulové hmotnosti zmírnit z původních 30 % na 14% [74].

Další možnou strategií je izolace pomocí směsi chelatačního činidla a povrchově aktivní látky. Mechanismus rozrušení buněčné stěny povrchově aktivní látkou byl vysvětlen již dříve. Mechanismus akce chelatačního činidla je závislý od složení buněčné stěny. Pokud buněčná stěna obsahuje dvojmocné ionty, činidlo je schopno vytvořit komplexy s těmito ionty a destabilizovat vnější membránu. Tato nestabilita ale vyvolá oslabení vnitřní membrány a

buňka se rozpadá. Použití chelatačního činidla tak hraje důležitou roli při dezintegraci buněk biomasy a významně zvyšuje čistotu získaného polymeru [47, 73].

Ačkoliv metody, kdy je použita povrchově aktivní látka a chelatační činidlo, jsou vyhovující a lze získat produkt o vysoké čistotě, přičemž není zatíženo životní prostředí, přece jen je zde problém s velkým množstvím odpadní vody. Proto byl navržen proces, kdy je jednou použitá odpadní voda je znovu obohacena o malé množství povrchově aktivní látky a chelatačního činidla. Pokud čistota získaného polymeru klesne pod 96 %, k čemuž obvykle dojde po 7 cyklech, je výsledná odpadní voda přečištěna přidávkem kyseliny chlorovodíkové a aktivního uhlí [75].

Tento postup byl testován na bakterii *C. necator*, za koncentrací 0,12:1 pro povrchovou látku:CDW a 0,8:1 pro chelát (EDTA):CDW. Čistota polymeru sice dosáhla 98,7 %, ale molekulová hmotnost klesla z 402 000 na 316 000 [75].

Významný podíl v izolaci PHA z bakteriálních buněk hrají i mechanické metody, jež se dělí do dvou velkých skupin. První skupinu představují metody, kde dochází ke kontaktu buněk s pevnými překážkami a řadí se zde kuličkové mlýny. Druhou skupinou jsou postupy, kde je využíváno kapaliny, jako například při vysokotlaké homogenizaci [67]

3.7.3. Purifikační metody

Obecně užívanými metodami pro přečištění získaného polymeru je aplikace peroxidu vodíku kombinovaná s aktivitou enzymů nebo chelatačních iontů [77]. Dále byla vyvinuta metoda užívající ozón, kdy do toku plynného kyslíku je přidáno 2-5 % ozónu. Přítomnost ozónu zapříčiňuje bělení, deodorizaci a rozpustnost přítomných nečistot [76].

Tato metoda by v budoucnu mohla nahradit použití peroxidu vodíku, která má mnoho nevýhod, jako je například vysoká teplota (80-100°C), nestabilita peroxidu vodíku při vysokém obsahu biomasy nebo snížení molekulové hmotnosti získaného polymeru [76].

4. PRAKTICKÁ ČÁST

4.1. Použité chemikálie, materiál a přístroje

4.1.1. Bakteriální kmeny

V práci byla použita bakteriální kultury *Cupriavidus necator* H16 a *Bacillus subtilis* CCM 2793, které byly získány z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

4.1.2. Chemikálie pro kultivaci mikroorganismů

Agar Powder, Himedia (India)
Beef extract, Difco laboratories (USA)
Peptone, Himedia (India)
Nutrient Broth, Himedia (Indie)

4.1.3. Ostatní chemikálie

Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid], Fluka (USA)
Poly[3-HB-co-HV] (USA)
1,4-butandiol (USA)

Všechny ostatní použité chemikálie byly čistoty p.a.

4.1.4. Přístroje

Plynový chromatograf:

Trace GC Ultra FID detector, Finnigan (USA)
Kolona - DB-WAX 30 m by 0,25 mm

Ostatní přístroje:

Spektrofotometr VIS, Helios δ , Unicam (UK)
Spektrofotometr UV-VIS, Helios α , Unicam (UK)
Centrifuga Boeco U-32R, Hettich Zentrifugen (Německo)
Analytické váhy, Boeco (Německo)
Laminární box Aura Mini, Bio Air Instruments (USA)
Termostat IP 60, LTE Scientific, Ltd. (Německo)
Termostatovaná třepačka, Heidolph Unimax 1010, Labicom s.r.o. (ČR)
Termostat, LS-35 (ČR)
Vortex, TK3S, Kartell spa (USA)
Bežné laboratorní sklo a vybavení.

4.2. Kultivace bakterií *Cupriavidus necator* a *Bacillus subtilis*

4.2.1. Uchování kultury a příprava inokula

Po oživení lyofilizované sbírkové kultury byla kultura uchovávána na Petriho miskách obsahující pevné médium Nutrient Broth v termostatu při teplotě 30 °C. Přeočkování bylo prováděno pravidelně v intervalu 30 dní.

Inokulum bylo připraveno do Erlenmeyerových baněk o objemu 100 ml s 50 ml kultivačního média. Inokulum bylo zaočkováno buď třikrát bakteriologickou kličkou

z agarové plotny nebo 2 ml kultury z tekutého média. Připravené inokulum bylo kultivováno 24 hodin při 30 °C na rotační třepačce při 150 rpm.

4.2.2. Živná média pro *Cupriavidus necator* H16

Pro uchovávání kultury bylo použito komerčně dostupné médium Nutriet Broth

Beef extrakt	10 g
Pepton	10 g
NaCl	5 g
Agar	20 g
Destilovaná voda	1000 ml

Pro kultivaci bakterie *Cupriavidus necator* bylo použito minerální médium o složení:

Fruktóza/ Olej	1 g/2 ml
(NH ₄) ₂ SO ₄	3 g
Na ₂ PO ₄	11,1 g
Citrát	1,7 g
KH ₂ PO ₄	1,02 g
Roztok stopových prvků*	1 ml
Destilovaná voda	1000 ml

*Roztok stopových prvků

FeCl ₃	9,7 g
CaCl ₃	7,8 g
CuSO ₄	0,156 g
CoCl ₂	0,119 g
NiCl ₂	0,118 g
CrCl ₂	0,062 g
Destilovaná voda	1 000 ml

4.2.3. Živná média pro *Bacillus subtilis*

Pro uchovávání kultury bylo použito komerčně dostupné médium Nutriet Broth, jak je uvedeno v kapitole 4.2.1.

Pro kultivaci bakterie *Bacillus subtilis* bylo použito minerální médium o složení:

Pepton	5 g
Beef extract	3 g
MnSO ₄	0,01 g
Destilovaná voda	1000 ml

4.3. Stanovení koncentrace biomasy v jednotlivých kultivacích

4.3.1. Stanovení kalibrační křivky

Během jednotlivých kultivací byla biomasa stanovována pomocí spektrofotometrického stanovení zákalu. Měření bylo prováděno při vlnové délce $\lambda = 630$ nm proti destilované vodě jako blanku. Přepočítání na suchou hmotnost biomasy byl proveden pomocí sestavené kalibrační přímky.

Kalibrační přímka byla sestrojena ředěním suspenze buněk destilovanou vodou. Pro stanovení sušiny bylo odebráno 10 ml roztoku buněčné suspenze. Roztok biomasy byl stočen (8000 rpm, 5 minut). Roztok nad biomasou byl slit a biomasa byla rozsuspendována v 1 ml destilované vody. Připravený roztok biomasy byl kvantitativně přenesen do předem zvážených a vysušených hliníkových misek, které byly následně sušeny při 105 °C do konstantní hmotnosti. Po vyjmutí a ochlazení v exsikátoru byly znovu zváženy. Rozdíl hmotností váženek nám udával hmotnost biomasy v 10 ml. Nakonec byla zjištěná koncentrace převedena na jednotku g/l. Stanovení bylo provedeno třikrát. Ředěním kultury o známé koncentraci biomasy byla sestrojena kalibrační přímka $A_{630\text{ nm}} = f(c_{\text{biomasa}})$.

4.3.2. Stanovení koncentrace biomasy

Po ukončení kultivace byla stanovena koncentrace biomasy pomocí spektrofotometrického stanovení zákalu (turbidimetrie) při vlnové délce $\lambda = 630\text{ nm}$ proti destilované vodě jako blanku. Přepočítání na suchou hmotnost biomasy bylo provedeno pomocí sestrojené kalibrační přímky.

4.4. Analýza PHB

Pro stanovení obsahu PHB v jednotlivých kultivacích bakterie *Cupriavidus necator* bylo po ukončení kultivace odebráno vždy 10 ml. Buněčná suspenze z kultivace byla převedena do zkumavek a stočena (8000 rpm, 5 minut) a destilovanou vodou znovu promyta. Roztok získaný nad biomasou byl slit a biomasa byla rozsuspendována v 1 ml destilované vody. Buněčná suspenze byla převedena do mikrozkušavek typu Eppendorf o objemu 1,5 ml a k oddělení biomasy byla použita mikrocentrifuga (10 000 rpm, 5 minut). Roztok nad biomasou byl opět slit a biomasa byla vysušena v sušárně při teplotě 60 až 75 °C. Takto připravené zkumavky byly uchovávány v mrazničce při teplotě -28 °C. Pro stanovení obsahu PHA byla použita metoda plynové chromatografie [78, 79].

4.4.1. Stanovení PHB plynovou chromatografií s FID detekcí

Plynová chromatografie je metoda, kterou lze použít pouze pro (polo)těkavé látky, proto PHA musí být převedeny na estery jednoduchých hydroxykyselin. Jedná se o převedení PHB na více těkavý methylester β -hydroxykarboxylové kyseliny pomocí kyseliny katalyzované esterifikace. Methylester lze pak stanovit pomocí plynové chromatografie [80].

4.4.1.1. Stanovení kalibrační křivky 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu

Do vialek byl postupně napipetován roztok komerčního P(3HB-co-3HV) (Sigma) o přesné koncentraci 1,5 g/l v množstvích 0,25; 0,5; 0,75 a 1 ml. Postupně byl přidán chloroform na výsledný objem 1 ml a dále bylo přidáno po 0,8 ml 15% roztoku kyseliny sírové v metanolu. Vialky byly neprodyšně uzavřeny a uloženy do termostatu při 100 °C na 3 hodiny. Následně byly vialky ochlazeny na co nejnižší teplotu a ochlazený produkt byl extrahován 0,5 ml roztoku 0,005 M NaOH. Po protřepání a oddělení fází byla spodní chloroformová vrstva odpipetována a přenesena do vialek, které byly následně neprodyšně uzavřeny [78].

Takto připravené vzorky byly naskládány do autosampleru na plynovém chromatografu s plamenově-ionizačním detektorem.

4.4.1.2. Stanovení kalibrační křivky 4-hydroxybutyrátu

Do vialek byl postupně napipetován roztok komerčního γ -butyrolaktonu (Sigma) o přesné koncentraci 1,5 g/l v množstvích 0,25; 0,5; 0,75 a 1 ml. Objem ve vialkách byl doplněn chloroformem na objem 1 ml a bylo přidáno po 0,8 ml 15% roztoku kyseliny sírové v metanolu. Neprodyšně uzavřené vialky byly uloženy do termostatu (100°C na 3 hodiny). Následně byly vialky ochlazeny na co nejnižší teplotu a ochlazený produkt byl extrahován 0,5 ml roztoku 0,005 M NaOH. Po protřepání a oddělení fází byla spodní chloroformová vrstva odpipetována a přenesena do vialek, které byly následně neprodyšně uzavřeny [78].

Takto připravené vzorky byly naskládány do autosampleru na plynovém chromatografu s plamenově-ionizačním detektorem.

4.4.1.3. Stanovení PHA v biomase

Do vialek bylo postupně přesně naváženo přibližně 2 mg stanovované biomasy. Dále byl přidán 1 ml chloroformu a 0,8 ml 15% roztoku kyseliny sírové v metanolu. Vialky byly neprodyšně uzavřeny a uloženy do termostatu při 100°C na 3 hodiny. Následně byly vialky ochlazeny na co nejnižší teplotu a ochlazený produkt byl extrahován 0,5 ml roztoku 0,005 M NaOH. Po protřepání a oddělení fází byla spodní vrstva odpipetována a přenesena do vialek, které byly následně neprodyšně uzavřeny [78].

Takto připravené vzorky byly naskládány do autosampleru plynového chromatografu s plamenově-ionizačním detektorem. Výsledná koncentrace byla vyjádřena jako hmotnost PHA v gramech na hmotnost biomasy taktéž uváděné v gramech (CDW).

Kromě koncentrace PHA a koncentrace biomasy byla u izolačních experimentů dále určena hodnota čistoty PHA po lyzi buněčné kultury vyjádřená jako procento hmotnosti PHA k celkové hmotnosti biomasy a tedy dána vztahem (2):

$$PHA\% = \frac{c_{PHA} \cdot 100}{X_t} \quad (2),$$

kde c_{PHA} je koncentrace PHA vzorku (g/l) a X_t je celková koncentrace biomasy.

Dále byla stanovena koncentrace biomasy neobsahující PHA (X_{NPHA} , g/l) pomocí následující rovnice (3):

$$X_{NPHA} = X_t - c_{PHA} \quad (3).$$

Pro stanovení účinnosti izolace a purifikace PHA byla dále uvedeny a počítány dvě hodnoty. První veličinou je rozpustnost biomasy netvořící PHA (S_{NPHA}) vyjádřená v procentech a druhá veličina určuje vzrůst čistoty PHA (Δ purity). S_{NPHA} byla počítána podle rovnice (4)

$$S_{NPHA} = \frac{X_{NPHA_t} - X_{NPHA_0}}{X_{NPHA_0}} \cdot 100 \quad (4),$$

kde X_{NPHA_t} a X_{NPHA_0} jsou hodnoty koncentrací biomasy neobsahující PHA v čase 0 a v čase t . Posledním výpočtem byla určena již zmiňovaná změna čistoty vzorku a byla spočítána podle rovnice (5)

$$\Delta purity = \frac{PHA\%_t - PHA\%_0}{100\% - PHA\%_0} \cdot 100 \quad (5),$$

kde $PHA\%_0$ a $PHA\%_t$ jsou hodnoty pro PHA% v čase t a v čase 0 [68].

4.4.1.4. Stanovení kalibrační křivky kyseliny mléčné

Do vialek byl postupně napipetován roztok komerční kyseliny mléčné (Sigma) o přesné koncentraci 1,5 g/l v množstvích 0,25; 0,5; 0,75 a 1 ml. Objem ve vialkách byl doplněn chloroformem na objem 1 ml a bylo přidáno po 0,8 ml 15% roztoku kyseliny sírové v metanolu. Neprodyšně uzavřené vialky byly uloženy do termostatu (100°C na 3 hodiny). Následně byly vialky ochlazeny na co nejnižší teplotu a ochlazený produkt byl extrahován 0,5 ml roztoku 0,005 M NaOH. Po protřepání a oddělení fází byla spodní chloroformová vrstva odpipetována a přenesena do vialek, které byly následně neprodyšně uzavřeny [78]. Takto připravené vzorky byly naskládány do autosampleru na plynovém chromatografu s plamenově-ionizačním detektorem.

4.5. Kalibrace spektrofotometrického stanovení redukujících cukrů

V průběhu práce byla využívána metoda stanovení celulózové a amylázové aktivity studovaných enzymů, která je založena na uvolnění redukujících cukrů (glukóza) ze substrátů (karboxymethylcelulóza v případě studia celulózové aktivity nebo škrob v případě studia amylázové aktivity) podle metody Somogyi-Nelsona.

Roztoky glukózy o koncentraci 5 až 50 mg bylo doplněny o 0,5 ml činidla I a o 0,5 ml činidla II a uloženy ve vodní lázni o teplotě 95°C na 10 minut. Po ochlazení byly vzorky doplněny o činidlo III a zkumavky byly doplněny destilovanou vodou na objem 10 ml. Na spektrofotometru byla u každého vzorku třikrát proměřena absorbance při vlnové délce 720 nm. Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost absorbance na koncentraci glukózy v roztoku. Z regresní rovnice byly potom počítány koncentrace glukózy pro jednotlivé vzorky.

4.6. Kalibrace spektrofotometrického stanovení *p*-nitrofenolu

Pro stanovení lipázové aktivity studovaných enzymů byla sestrojena kalibrační křivka závislosti koncentrace uvolněného *p*-nitrofenolu na absorbanci.

Objem 0,05 až 0,50 ml standardního roztoku 0,5mM *p*-nitrofenylpalmitátu po kroku 0,05 bylo odpipetováno do čistých zkumavek. Všechny vzorky byly doplněny na objem 5 ml Tris·Cl puřem (0,1M, [pH 8,2]) a byl přidán 1 ml lipázy. Vzorky byly dobře promíchány a inkubovány při teplotě 30°C 30 minut. Absorbance jednotlivých vzorků byla proměřena na spektrofotometru při vlnové délce 410 nm. Každý vzorek byl proměřen třikrát. Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost absorbance na koncentraci *p*-nitrofenolu v roztoku. Z regresní rovnice byly potom počítány koncentrace uvolněného *p*-nitrofenolu pro jednotlivé vzorky [81].

Jako blank byl použit roztok, který byl připraven stejným postupem jako jednotlivé vzorky, jen roztok enzymu byl zaměněn za destilovanou vodu v požadovaném množství.

4.7. Inkorporace vybraných monomerů do struktury PHA

4.7.1. Srovnání produkce PHA na olejových substrátech a fruktóze

V tomto experimentu byla sledována produkce PHA na různých potravinářských olejích a zároveň byl porovnáván vliv olejů na produkci PHA ve srovnání s kultivací na fruktóze.

Bakterie byly kultivovány ve 100 ml baňkách s 25 ml minerálního média, kde jako uhlíkatý substrát byly použity jedlé potravinářské oleje – slunečnicový, sojový, řepkový a

kukuřičný. Poslední baňky obsahovala sacharidický zdroj uhlíku – fruktózu. Tato média byla zaočkována 2 ml inokula, které bylo připraveno s 24 hodinovým předstihem na živném médiu Nutrient Broth.

Kultivace probíhala 72 hodin a po ukončení byla proměřena absorbance při vlnové délce 720 nm. Následně bylo odebráno 10 ml buněčné suspenze, která byla stočena (60 000 rpm, 10 min), promyta destilovanou vodou, znovu stočena, rozmyta v 1 ml destilované vody, převedena do zkumavek typu Eppendorf a zcentrifugována (10 000rpm, 5 minut). Získaná biomasa byla vysušena v sušárně při 75°C a podle kapitoly 4.4.1.3. upravena pro stanovení na GC s FID detektorem. Získané výsledky byly zpracovány podle výpočtů uvedených v totožné kapitole.

4.7.2. Prekurzory 3-hydroxyvalerátu

Bakterie *Cupriavidus necator* je schopná díky prekurzorům v médiu produkovat PHA, které ve struktuře obsahují i jiné monomery než jen PHB. Pokud je jako prekurzor použit 1-propanol, 1-pentanol, kyselina valerová nebo propionát sodný, může dojít k inkorporaci 3HV do struktury PHA.

Pro tento experiment bylo připraveno minerální médium, jež bylo zaočkováno inokulem, které bylo připraveno s 24 hodinovým předstihem na živném médiu Nutrient Broth. Každá Erlenmeyerova baňka obsahovala 50 ml média s biomasou. 24 hodin po zaočkování byly do média přidány prekurzory 1-propanol, 1-pentanol, kyselina valerová a propionát sodný. Všechny prekurzory byly přidány ve 24. hodině kultivace v 1% a 0,5% koncentraci.

Kultivace byla ukončena v 72. hodině růstu biomasy. Následně byla proměřena absorbance, z níž byla podle kalibrační křivky spočtena koncentrace biomasy. Z kultury bylo odebráno 10 ml a stočeno (60 000 rpm, 10 min). Získaná biomasa byla promyta destilovanou vodou, znovu odstředěna, převedena do zkumavek typu Eppendorf, stočena na mikrocentrifuze (10 000, 5 min) a vysušena v sušárně. Takto připravené vzorky byly podrobeny analýze na GC s FID detektorem a ze získaných výsledků byla vypočtena hodnota koncentrace a rozpustnost biomasy netvořící PHB a změna čistoty, jak je uvedeno v kapitole 4.4.1.3.

4.7.3. Prekurzory 4-hydroxybutyrátu

Pokud je buněčná kultura *Cupriavidus necator* kultivována na olejnatém uhlíkovém substrátu a zároveň se v médiu objeví některý z prekurzorů - kyselina mléčná, 1,4-butandiol nebo γ -butyrolakton, dojde k úpravě zpracování těchto prekurzorů v metabolických drahách bakterie, které vedou kromě inkorporace 3HB i k inkorporaci 4HB monomerů.

Postup tohoto experimentu se neliší od postupu uvedeného v kapitole 4.7.2. Jediná odlišnost je v použití prekurzorů. Zde byla použita kyselina mléčná, 1,4-butandiol a γ -butyrolakton. Všechny prekurzory byly do kultivací přidávány ve dvou koncentracích, 1% a 0,5% prekurzor.

4.8. Použití komerčně dostupných enzymů k izolaci PHA

4.8.1. Screening lytického potenciálu vybraných enzymů

Buněčná kultura kultivovaná na živném médiu Nutrient Broth byla tepelně deaktivována (85°C, 30 min), odstředěna (8000 rpm, 5 minut), promyta destilovanou vodou a po třetím odstředění byla kultury rozmyta v požadovaném pufru a rozpipetována po 25 ml do baněk.

Poté byl přidán enzym, o koncentraci uvedené v tabulce 4. Baňky byly umístěny na třepačku (125 rpm, 2 hodiny) a ve třicetiminutových intervalech byl odebrán vzorek, u něhož byla proměřena absorbance při vlnové délce 540 nm. Naměřené hodnoty absorbance byly pro jednotlivé enzymy srovnány a byla spočítána relativní redukce absorbance AR podle uvedeného vzorce (1) [31x]

$$AR = \frac{(Abs_{\min} - Abs_0) \cdot 100}{Abs_0} \quad (1),$$

AR je relativní redukce absorbance, Abs_0 je absorbance naměřená v čase nula a Abs_{\min} je absorbance měřená po určitém čase.

4.8.2. Optimalizace koncentrace enzymů

Biomasa kultivovaná ve fermentoru v předchozích experimentech [82] byla zcentrifugována a rozmyta ve fosfátovém pufru (50mM [pH 8,0]) tak, aby se výsledná koncentrace biomasy v baňkách rovnala 100 – 130 g/l. Takto připravená kultura byla rozředěna na koncentraci kolem 10 g/l buněk a suspenze byla rozdělena po 25 ml do baněk. Následně byl přidáván enzym pankreatin, jehož hmotnost odpovídala 1%, 2%, 3%, 4% a 5% hmotnosti biomasy obsažené v baňce. Jednotlivé navážky pankreatinu byly rozpuštěny ve fosfátovém pufru (50mM [pH 8,0]). V případě alkalasy, která je za laboratorních podmínek kapalná, byl přídavek 100, 200, 300, 400 a 500 μ l na baňku. Takto připravené vzorky byly umístěny na třepačku (125 rpm, 2 hodiny, 50 °C) a po dvouhodinové inkubaci byly vzorky stočeny, přeneseny do zkumavek typu Eppendorf a důkladně vysušeny v sušárně při teplotě 60°C. Koncentrace PHB byla stanovena plynovou chromatografií s FID detektorem.

4.8.3. Optimalizace koncentrace SDS

Kultura kultivovaná ve fermentoru podle článku [82] byla rozředěna na koncentraci 10 g/l ve fosfátovém pufru (50mM [pH 8,0]) a takto připravená kultura byla rozlita do 100 ml Erlenmayerových baněk po 25 ml kultury. Do takto připravených baněk byl přidán enzym v 1% koncentraci na CDW a SDS v koncentracích 0,04; 0,06; 0,08; 0,10 a 0,12 g/l na CDW.

Takto připravené vzorky byly uloženy na třepačce (170 rpm) na dobu 120 minut, po této době byl celý objem suspenze stočen (6000 rpm, 10 min), promyt destilovanou vodou a získaná směs biomasy a PHA byla převedena do zkumavek typu Eppendorf, které byly znovu stočeny (10 000 rpm, 5 min). Takto upravené vzorky byly důkladně vysušeny v sušárně (75 °C).

Pro stanovení koncentrace PHA byly naváženy 2 mg připravených vzorků a upraveny podle postupu v kapitole 4.4.1.3. a nakonec byly analyzovány na GC s FID detektorem.

4.8.4. Vliv různých koncentrací SDS na proteolytickou aktivitu alkalasy a pankreatinu

V tomto experimentu bylo studováno, jak se mění aktivita přítomného enzymu (alkalasa, pankreatin) v závislosti na koncentraci povrchově aktivní látky SDS. Studium závislosti aktivity enzymu na koncentraci SDS byla provedena jednoduchou metodou stanovení proteolytické aktivity alkalasy a pankreatinu [83].

4.8.4.1. Stanovení proteolytické aktivity enzymů

Jako substrát byl použit roztok azokaseinu (5 mg/ml). Azokasein je chemicky modifikovaný kasein s navázanou oranžovou sulfanilamidovou skupinou. Enzymatickou

hydrolyzou (50°C, 60 min) se uvolňují barevné peptidy rozpustné v trichloroctové kyselině, které jsou následně detekovány při 440 nm. Jednotka aktivity je pak definována jako množství enzymu katalyzující přeměnu substrátu doprovázenou nárůstem absorbance o 0,001 za 1 minutu za podmínek testu

Získané absorbance byly zprůměrovány a pomocí vzorce 6 přepočítány na aktivitu A jednotlivých enzymů a dále pankreatin a trypsin byly podle rovnice 7 přepočteny na specifickou aktivitu A_{sp} .

$$A = \frac{1000 \cdot Abs}{t} \quad (6),$$

$$A_{sp} = \frac{A}{m} \quad (7),$$

kde Abs je absorbance proměřovaných vzorků a t je čas inkubace vzorků, v našem případě odpovídá 60 min. Ve specifické aktivitě figuruje hmotnost m použitého enzymu. Specifická aktivita pro alkalasu určována nebyla, protože alkaláza je dodávána jako roztok a tudíž nelze přesně určit hmotnost obsaženého enzymu.

4.8.4.2. Stanovení lipázové aktivity enzymů

Ke stanovení lipázové aktivity alkalasy, pankreatinu a lipázy bylo ve zkumavce postupně smícháno 2,5 ml Tris-HCl pufru (0,1M, [pH 8,2]) a 2,5 ml roztoku substrátu, tedy 420 μ M p-nitrofenylpalmitátu. Na závěr byl přidán 1 ml roztoku testovaného enzymu. Po 30 minutách byla proměřena absorbance jednotlivých vzorků na spektrofotometru při vlnové délce 410 nm. Vzorky byly proměřovány proti blanku, který byl připraven stejným postupem jako jednotlivé vzorky, jen roztok enzymu byl zaměněn za destilovanou vodu v požadovaném množství.

Hodnota koncentrace p-nitrofenolu byla stanovena na základě sestrojené kalibrační křivky a aktivita jednotlivých enzymů byla vypočtena jako podíl látkového množství n uvolněného p-nitrofenolu ve vzorku a doby inkubace t reakčních směsí podle rovnice 8. Stejně jako v předchozí kapitole byla určena specifická aktivita podle vzorce 7.

$$A = \frac{n}{t} \quad (8)$$

4.8.4.3. Stanovení amylázové a celulózy aktivita enzymů

Jako substrát byl použit 0,5% roztok škrobu v případě stanovení amylázové aktivity nebo 1% roztok karboxymethylcelulózy při stanovení celulózy aktivita. V případě alkalasy byl použit desetkrát zředěný roztok a pro pankreatin byl použit roztok enzymu o koncentraci 3,3 mg/ml ve fosfátovém pufru (50mM [pH 8,0]). Připravené vzorky byly inkubovány 2 hodiny při teplotě 30 °C v termostatu. Jako blank byl použit vzorek stejného složení, ale roztok enzymu byl nahrazen destilovanou vodou.

Obsah redukujících sacharidů, které se během reakce uvolnily, byl stanoven pomocí Somogyi-Nelsonovy metody.

K přípravě roztoku Somogyi-Nelsona I bylo potřeba připravit v odměrné baňce o objemu 1000 ml 24 g bezvodého Na₂CO₃, 16 g NaHCO₃, 144 g bezvodého Na₂SO₄ a 12 g vinanu sodno-draselného. Roztok Somogyi-Nelson II byl připraven ze 4 g CuSO₄.5H₂O, 24 g bezvodého Na₂SO₄ a 200 ml destilované H₂O. Smícháním 25 g molybdenanu draselného rozpuštěného v 450 ml destilované vody, 21 ml koncentrované H₂SO₄ a 3 g Na₂AsO₄.7H₂O v 25 ml destilované vody byl získán poslední roztok Somogyi-Nelson III.

Ke stanovení obsahu redukujících cukrů bylo k 1 ml vzorku zředěného podle potřeby přidáno 0,5 ml roztoku Somogyi-Nelson I, 0,5 ml roztoku Somogyi-Nelson II. Po promíchání byly zkumavky ponechány 10 minut ve vroucí vodní lázni, poté byly ochlazeny na laboratorní teplotu a do každé bylo přidáno 0,5 ml roztoku Somogyi-Nelson III, po rozpuštění vzniklé sraženiny Cu_2O a promíchání byl objem roztoků doplněn na 10 ml destilovanou vodou a při 720 nm byla proměřena absorbance proti slepému vzorku, který byl připraven jako jednotlivé vzorky, pouze bylo použito místo 1 ml vzorku, 1 ml destilované vody.

Aktivity enzymů byla následně vypočítána jako podíl látkového množství n a délky inkubace vzorků t . Látkové množství redukujících sacharidů bylo vypočteno z jejich koncentrace, která byla zjištěna pomocí kalibrační křivky. Specifická aktivita pankreatinu byla stanovena podle vzorce 7.

4.8.5. Aplikace kombinací enzymů

Pro stanovení účinnosti enzymů ve směsi byla provedena řada pokusů. Pro vzorky byla použita kultura, která byla kultivována ve fermentoru [82]. Získaná biomasa s vysokým obsahem PHB byla zcentrifugována, promyta destilovanou vodou, znovu odstředěna a rozředěna na koncentraci 100 g/l ve fosfátovém pufru (50mM [pH 8,0]). Část biomasy bylo ponecháno v původním médiu. Takto připravená biomasa byla zamrazena pro následné použití.

Rozmražená biomasa byla rozředěna na požadovanou koncentraci 10 g/l fosfátovým pufrům (50mM [pH 8,0]) a rozlita do Erlenmaerových baněk po 25 ml. Do každé baňky byly ke kultuře přidány enzymy v 1% množství na CDW a SDS o koncentraci 0,08 g SDS na CDW. Aplikace a postupy jednotlivých prací jsou rozepsány v níže uvedené tabulce 1.

Tab. 4: Aplikace a postupy jednotlivých prací v experimentech za použití ředěné biomasy uchovávané v pufru.

Číslo baňky	0. hodina experimentu	1. hodina experimentu	Postupy během experimentu
1	Alkalasa, pankreatin	-	-
2	Alkalasa	Pankreatin	-
3	Pankreatin	Alkalasa	-
4	Alkalasa	Pankreatin	Odstředění po 1. hodině
5	Pankreatin	Alkalasa	Odstředění po 1. hodině

Další sada vzorků byla připravena z kultury deaktivované záhřevem a následně uchovávané v původním kultivačním médiu. Buněčná suspenze byla opět naředěna fosfátovým pufrům na konečnou koncentraci 10 g/l. Dále byl stejně jako v předchozích pěti vzorcích použit odpovídající roztok SDS o koncentraci 0,011 g/l a 1% enzymů (na CDW). Aplikace jednotlivých enzymů byly provedeny podle následující tabulky.

Tab. 5: Plán aplikace jednotlivých enzymů v experimentech za použití kultury uchovávané v původním médiu

Číslo baňky	Enzym
6	Alkalasa, pankreatin
7	Alkalasa
8	Pankreatin

Vzorky v baňkách označených čísly 9 a 10 byly připraveny z původní neředěné kultury, která byla uchovávána v pufru. Zde byl, stejně jako v předchozích baňkách, zachován poměr enzym/biomasa a SDS/biomasa v koncentracích, které byly vyhodnoceny v optimalizačních krocích. Aplikace enzymů byla provedena podle plánu uvedeného v Tab. 6.

Tab. 6: Rozpis skladby jednotlivých enzymů v experimentech za použití neředěné kultury uchovávané v pufru.

Číslo baňky	Enzym
9	Pankreatin
10	Alkalasa

Pro poslední dvě baňky byla znovu použita ředěná kultura (koncentrace 10 g/l) uchovávaná ve fosfátovém pufru, k níž byly přidány enzymy alkalasa (baňka 11) a pankreatin (baňka 12). Hmotnost pankreatinu ve všech případech byla vztažena na koncentraci biomasy a činila tak 1% její hmotnosti na CDW. Množství kapalné alkalasy bylo podle již dříve provedených optimalizačních experimentů stanoveno na množství 100 μ l a taktéž činní 1% hmotnosti enzymu na CDW.

Celkový čas inkubace na rotační třepačce (170 rpm) u všech vzorků byl 2 hodiny čistého času. Po ukončení pokusu byly vzorky stočeny (6000 rpm, 10 minut), promyty destilovanou vodou, kvantitativně převedeny do zkumavek typu Eppendorf a uloženy v sušárně při teplotě 75 °C. Po vysušení byla u všech vzorků v navážce 2 mg stanovena koncentrace přítomného PHB na GC s FID detektorem.

4.9. Izolace PHA z buněčné kultury s využitím enzymového roztoku po kultivaci bakterie *Bacillus subtilis*

4.9.1. Stanovení koncentrace PHA po lytickém působení enzymů na biomasu získanou z kultivace na řepkovém oleji a fruktóze

Biomasa získaná z kultivace na řepkovém oleji a na fruktóze byla denaturována při 85 °C po dobu 30 minut ve vodní lázni. Následně byla biomasa ochlazená a doplněna o SDS v množství 0,08 g/g CDW a alkalázu v 1% množství (100 μ l/ 0,25 g biomasy). Takto připravené vzorky byly uloženy na třepačku (170 rpm). Po dvou hodinách byla biomasa odstředěna (6000 rpm, 10 min), promyta destilovanou vodou, znovu zcentrifugována, rozmyta v 1 ml destilované vody a kvantitativně převedena do zkumavek typu Eppendorf a znovu stočena na mikrocentrifuze (10 000 rpm, 5 min).

Takto zpracované vzorky byly uloženy v sušárně vyhřáté na 75 °C. Po vysušení byly vzorky analyzovány na GC s FID detektorem. Koncentrace PHB a PHV byly přepočteny z kalibračních křivek pro 3-hydroxyvalerát a 3-hydroxybutyrát.

4.9.2. Příprava a charakterizace enzymového roztoku z kultivace bakterie *Bacillus subtilis*

Podle návodu pro přípravu živných médií pro rod *Bacillus* v kapitole 4.2.3. byla připravena média pro inokula, do nichž byly naočkovaná bakterie *Bacillus subtilis* a při 30°C byla kultivována 24 hodin na rotační třepačce při 150 rpm.

Živná média byla připravena rovněž podle kapitoly 4.2.3. Do šesti 100 ml Erlenmayerových baněk bylo přidáno po 50 ml média. Polovina připravených baněk byla přímo zaočkována přídatkem 1 ml inokula. Druhá polovina baněk byla kromě 1 ml inokula doplněna ještě o 1 ml buněčné suspenze (100 g/l) bakterie *Cupriavidus necator* kultivované ve fermentoru [82]. Takto připravené kultury byly kultivovány 30 hodin při 30°C na rotační třepačce (170 rpm).

Po skončení kultivace byly jednotlivé buněčné suspenze odstředěny a u získaných supernatantů byla proměřena proteázová aktivita podle postupu uvedeného v kapitole 4.8.4.1., jediný rozdíl byl v době inkubace, kdy v tomto případě štěpení azokaseinu probíhalo pouze 45 minut.

4.9.3. Izolace PHA pomocí enzymového roztoku po kultivaci *Bacillus subtilis*

Pro izolaci PHA z biomasy byla použita kultura kultivovaná ve fermentoru a uchovávaná ve fosfátovém pufru. Kultura byla naředěna na koncentraci 10 g/l a do jednotlivých baněk byl přidán enzymový roztok po kultivaci *Bacillus subtilis* v objemech 20, 30 a 40 ml, a to jak z baněk kultivovaných bez biomasy, tak i z baněk kultivovaných s biomasou *Cupriavidus necator*. Dále byl přidán SDS o koncentraci 0,08 g SDS/ g CDW. Následně byly vzorky upravovány podle postupu uvedeného v kapitole 4.8.5.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1. Kalibrace spektrofotometrického stanovení biomasy

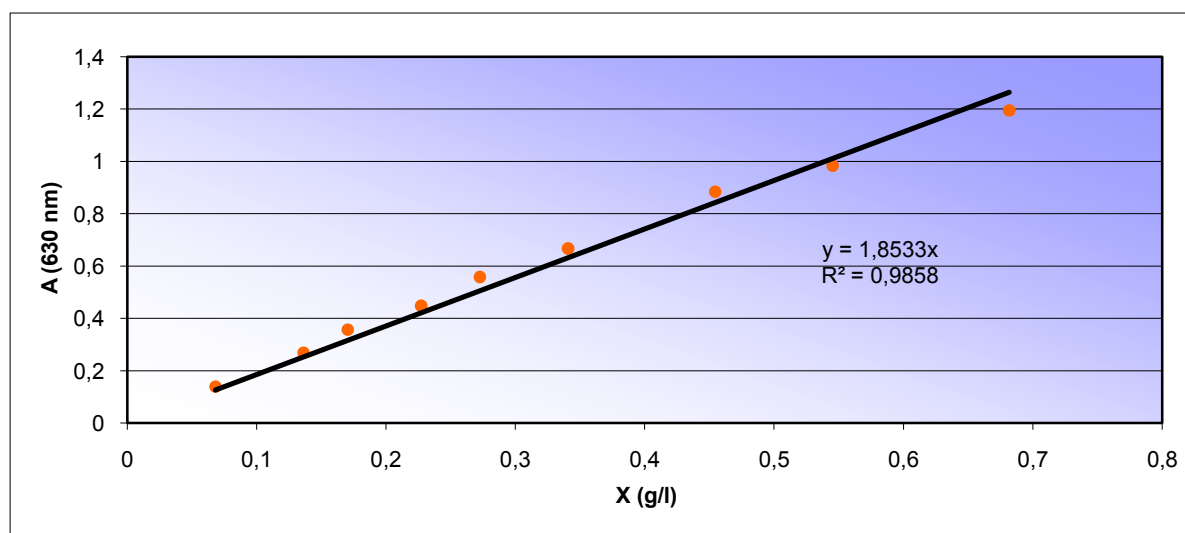
Kalibrační závislost množství suché hmotnosti biomasy a zákalu byla stanovena z hodnot spektrofotometrického měření zákalu ($\lambda = 630 \text{ nm}$) suspenze buněk, která byla připravena přesným ředěním kultury, jejíž počáteční suchá hmotnost biomasy byla stanovena ve třech paralelních měřeních.

Tab. 7: Stanovení sušiny biomasy

Hmotnost prázdné váženky (g)	Hmotnost váženky se sušinou (g)	Hmotnost sušiny (g)	Koncentrace sušiny biomasy (g/l)
15,9149	15,9281	0,0132	1,32
16,0057	16,0201	0,0144	1,44
15,6921	15,7054	0,0133	1,33
		Průměr	$1,3633 \pm 0,0544$

Tab. 8: Závislost zákalu stanoveného při $\lambda = 630 \text{ nm}$ na množství biomasy

Sušina biomasy (g/l)	$A_{\text{prům}} (630 \text{ nm})$
0,6817	$1,195 \pm 0,013$
0,5453	$0,980 \pm 0,045$
0,4544	$0,884 \pm 0,017$
0,3408	$0,667 \pm 0,015$
0,2727	$0,558 \pm 0,005$
0,2272	$0,448 \pm 0,027$
0,1704	$0,357 \pm 0,027$
0,1363	$0,269 \pm 0,016$
0,0682	$0,139 \pm 0,002$



Graf 1: Kalibrační závislost zákalu stanoveného při 630 nm na suché hmotnosti biomasy

Z grafické závislosti (Graf 1) zákalu na hmotnosti biomasy byla stanovena kalibrační závislost $y = 1,8533 x$, která byla dále používána pro stanovení koncentrace biomasy. Regresní koeficient je $R^2 = 0,9858$.

5.2. Stanovení PHA plynovou chromatografií s FID detekcí

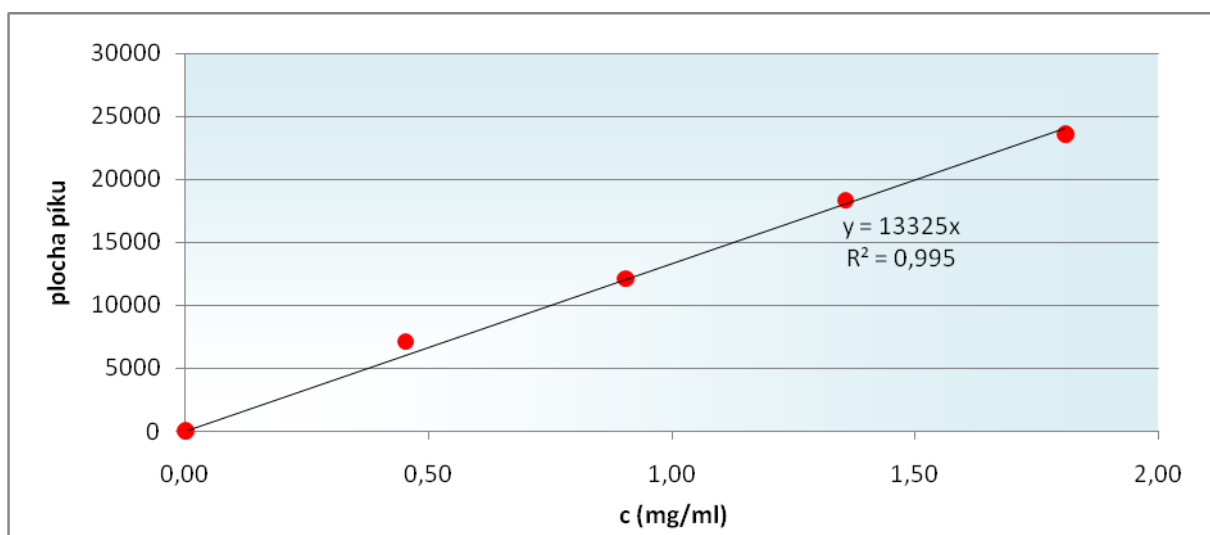
Pro stanovení PHB plynovou chromatografií bylo nutné převést PHB na více těkavý methylester β -hydroxykarboxylové kyseliny pomocí kyseliny katalyzované esterifikace. Takto připravený reálný vzorek (stejný jako u předchozích dvou stanovení) byl analyzován na GC (kap. 4.5.3).

5.2.1. Stanovení kalibračních křivek 3HB, 3HV a 4HB

Kalibrační přímka byla sestavena jako závislost plochy píku na známé koncentraci standardu obsahujícího 3HB, 3HV a 4HB. Retenční čas 3HB byl 2,09 minuty, pro 3HV to bylo 2,95 minuta a 4HB byl eluován v čase 2,75 minut a kyselina mléčná v čase 1,52, což nám zároveň určuje kvalitativní charakteristiku vzorku.

Tab. 9: Závislost koncentrace 3-hydroxybutyrátu na ploše píku chromatogramu

Koncentrace 3HB (mg/ml)	Plocha píku
0	0
0,45	7101
0,90	12116
1,36	18328
1,81	23604

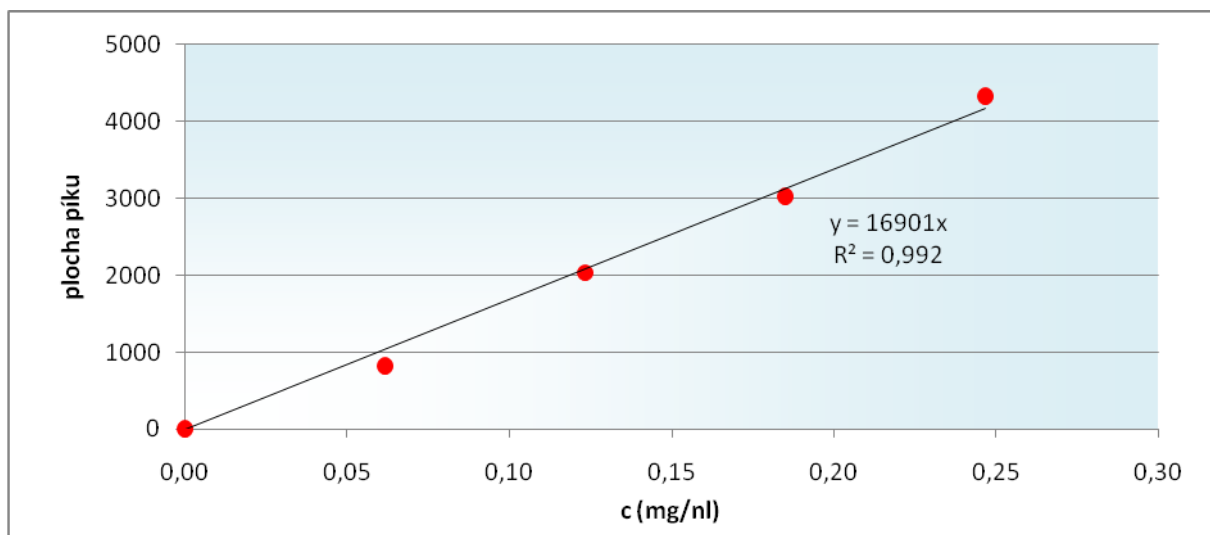


Graf 2: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci 3HB (mg/ml)

Kalibrační závislost 3HB o rovnici $y = 13325x$ a s regresním koeficientem $R^2 = 0,9957$ byla sestavena jako závislost plochy píku na koncentraci 3HB (mg/ml) ve vzorku (Graf 2). Příslušný pík PHB byl eluován v čase 2,09 minut. Stanovení bylo provedeno vždy dvakrát, v tabulce 9 jsou uvedeny průměrné hodnoty plochy píků ze dvou stanovení.

Tab. 10: Závislost koncentrace 3-hydroxyvalerátu na ploše píku chromatogramu

Koncentrace 3HV (mg/ml)	Plocha píku
0,00	0
0,06	823
0,12	2032
0,18	3024
0,25	4325

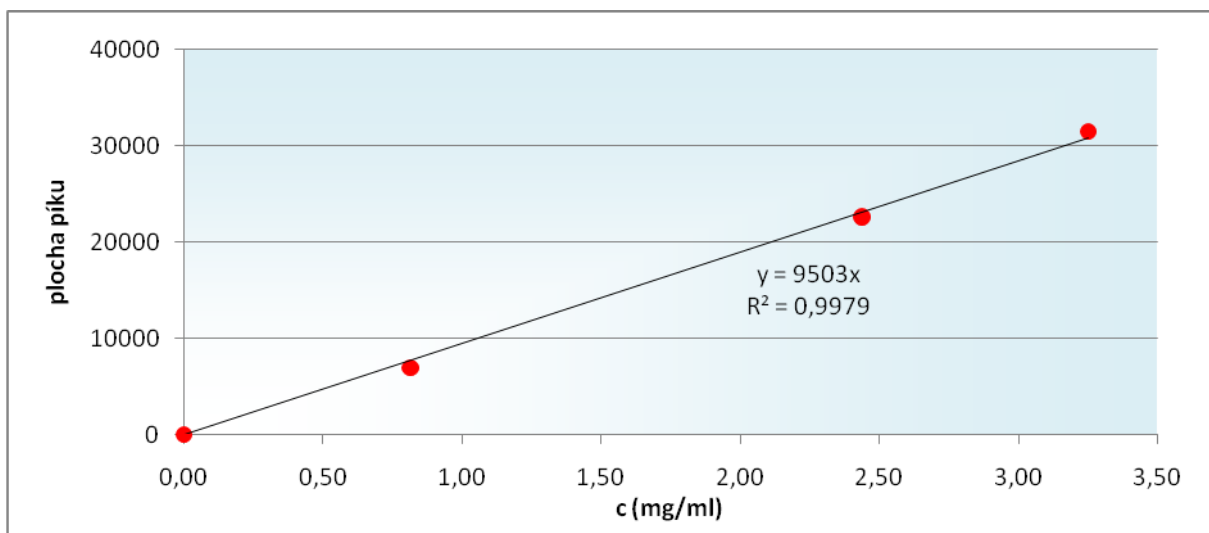


Graf 3: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci 3HV (mg/ml)

Kalibrační závislost 3HV o rovnici $y = 16901x$ a s regresním koeficientem $R^2 = 0,9928$ byla sestavena jako závislost plochy píku na koncentraci 3HV (mg/ml) ve vzorku (Graf 3). Příslušný pík 3HV byl eluován v čase 2,95 minut. Stanovení bylo provedeno vždy dvakrát, v tabulce 10 jsou uvedeny průměrné hodnoty plochy píků ze dvou stanovení.

Tab. 11: Závislost koncentrace 4-hydroxybutyrátu na ploše píku chromatogramu

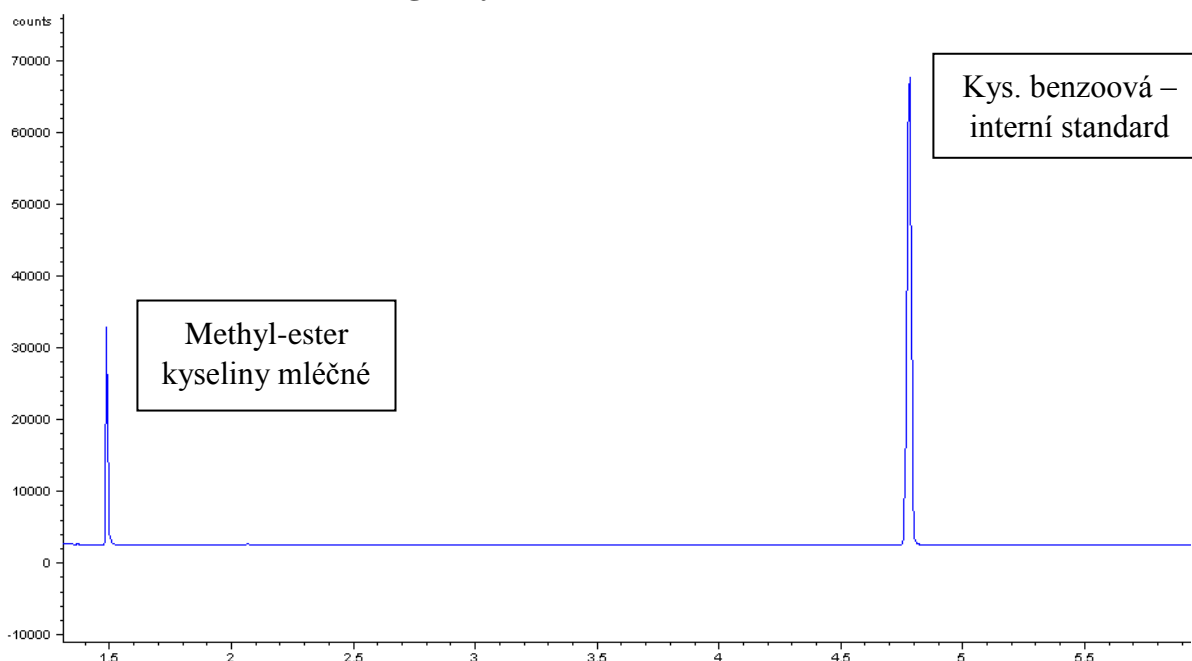
Koncentrace 4HB (mg/ml)	Plocha píku
0,00	0
0,81	6932
2,44	22622
3,25	31489



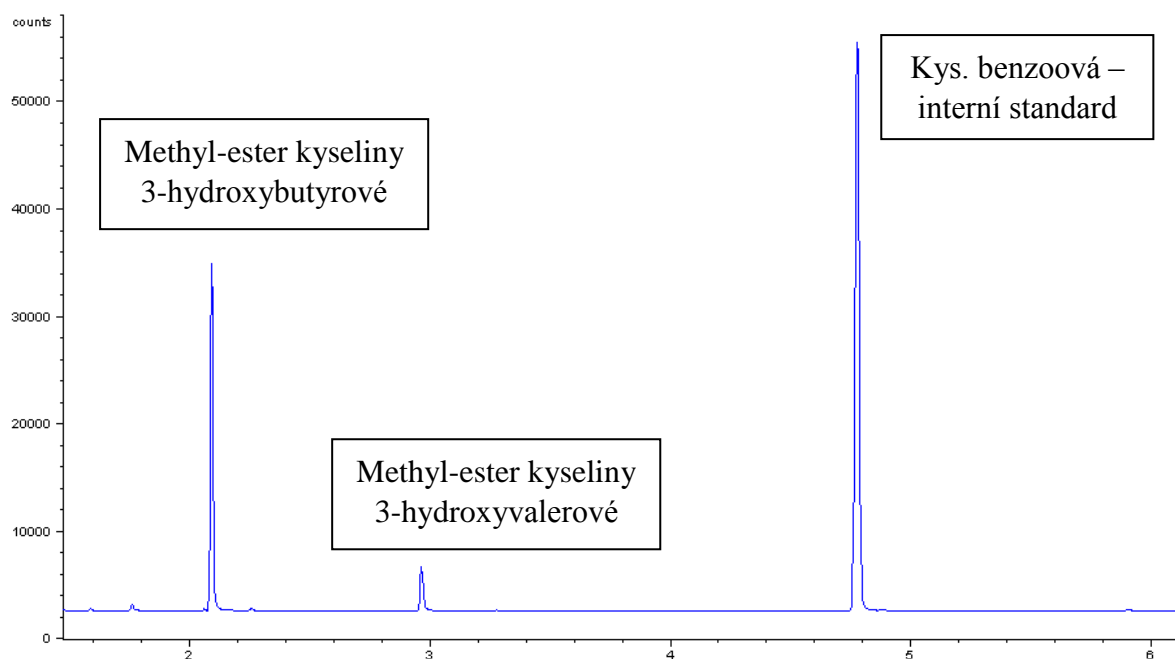
Graf 4: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci 4HB (mg/ml)

Kalibrační závislost 4HB o rovnici $y = 9503x$ a s regresním koeficientem $R^2 = 0,9979$ byla sestavena jako závislost plochy píku na koncentraci 4HB (mg/ml) ve vzorku (Graf 4). Příslušný pík 4HB byl eluován v čase 2,75 minut. Stanovení bylo provedeno vždy dvakrát, v tabulce 11 jsou uvedeny průměrné hodnoty plochy píků ze dvou stanovení.

5.2.2. GC chromatogramy



Graf 5: Chromatogram standardu kyseliny mléčné (retenční čas 1,5 minuty)



Graf 6: Chromatogram standardu P(3HB-co-3HV).

Obsah PHA v biomase byl stanoven přímo rozpuštěním PHB obsaženého v biomase v chloroformu. Vyextrahovaný PHB byl převeden kyselou hydrolyzou na těkavý methylester β -hydroxykarboxylové kyseliny (kap 4.4.1.)

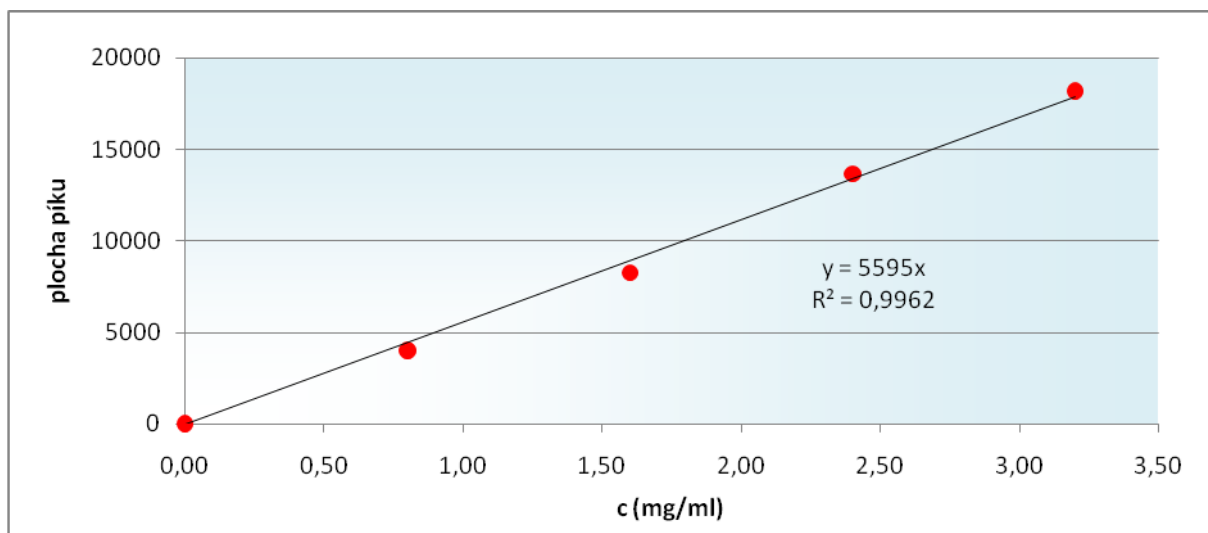
Výhodou metody stanovení PHA plynovou chromatografií je časová nenáročnost a možnost využít autosampleru, což umožní efektivní analýzu velkého počtu vzorků. Plynová chromatografie je navíc nejvíce citovanou metodou v odborné literatuře [22, 78, 79] a je uváděna jako nejspolehlivější metoda pro stanovení PHB v biomase.

5.3. Stanovení koncentrace kyseliny mléčné pomocí GC s FID detekcí

Během experimentu byla kultura *Cupriavidus necator* kultivována také s přidávkem prekursoru – kyselinou mléčnou, jež byla částečně převedena na 4HB monomer, ale byla také v nezměněné formě zakomponována do struktury PHA. Koncentrace monomerů laktátu ve vzorku byla stanovena z kalibrační křivky, která byla sestrojena jako závislost plochy píku na koncentraci kyseliny mléčné.

Tab. 12: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci 4HB (mg/ml)

Koncentrace 4HB (mg/ml)	Plocha píku
0,00	0
0,80	4022
1,60	8263
2,40	13650
3,20	18197



Graf 7: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci kyseliny mléčné (mg/ml)

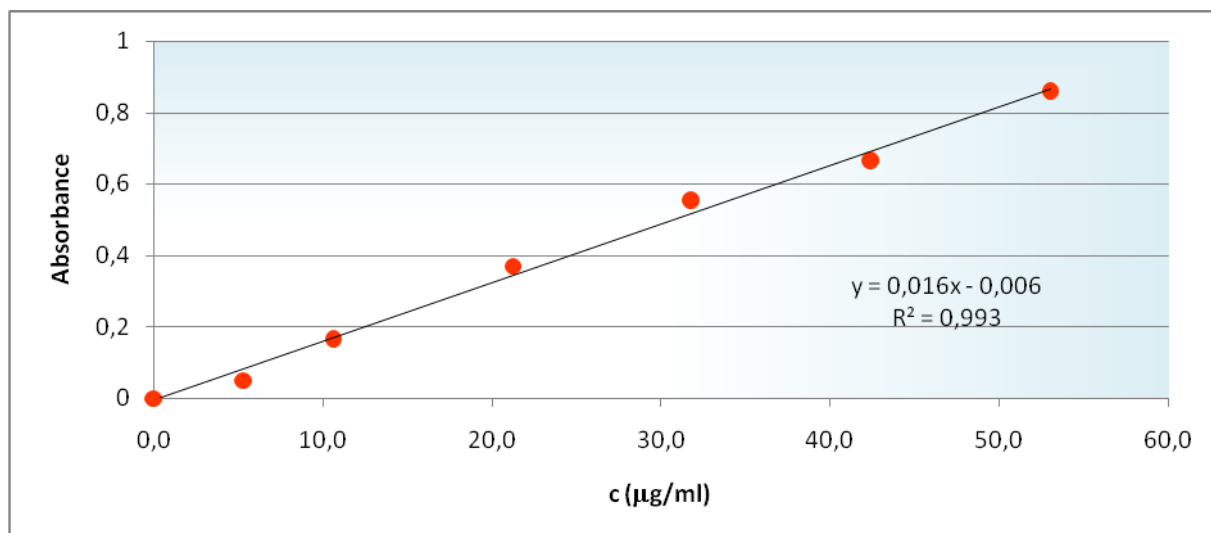
Kalibrační závislost kyseliny mléčné o rovnici $y = 5595x$ a s regresním koeficientem $R^2 = 0,9962$ byla sestavena jako závislost plochy píku na koncentraci 4HB (mg/ml) ve vzorku (Graf 7). Příslušný pik kyseliny mléčné byl eluován v čase 1,52 minuty. Stanovení bylo provedeno vždy dvakrát, v tabulce 12 jsou uvedeny průměrné hodnoty plochy píků ze dvou stanovení.

5.4. Kalibrace spektrofotometrického stanovení redukujících cukrů

V průběhu práce bylo využíváno metody stanovení celulázové a amylázové aktivity studovaných enzymů, která je založena na uvolnění redukujících cukrů (glukóza) ze substrátů. Koncentrace takto uvolněné glukózy z karboxymethylcelulózy nebo škrobu byla vypočtena z kalibrační křivky, kde je zachycena závislost absorbance roztoku na koncentraci glukózy (Graf 8), jak je popsáno v metodě Somogyi-Nelsona.

Tab. 13: kalibrační křivka – závislost absorbance na koncentraci roztoku glukózy ($\mu\text{g/ml}$)

Koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]	Abs
0,0	0,000
5,3	0,050
10,6	0,163
21,2	0,370
31,8	0,552
42,4	0,662
53,0	0,857



Graf 8: Grafická závislost absorbance na koncentraci glukózy

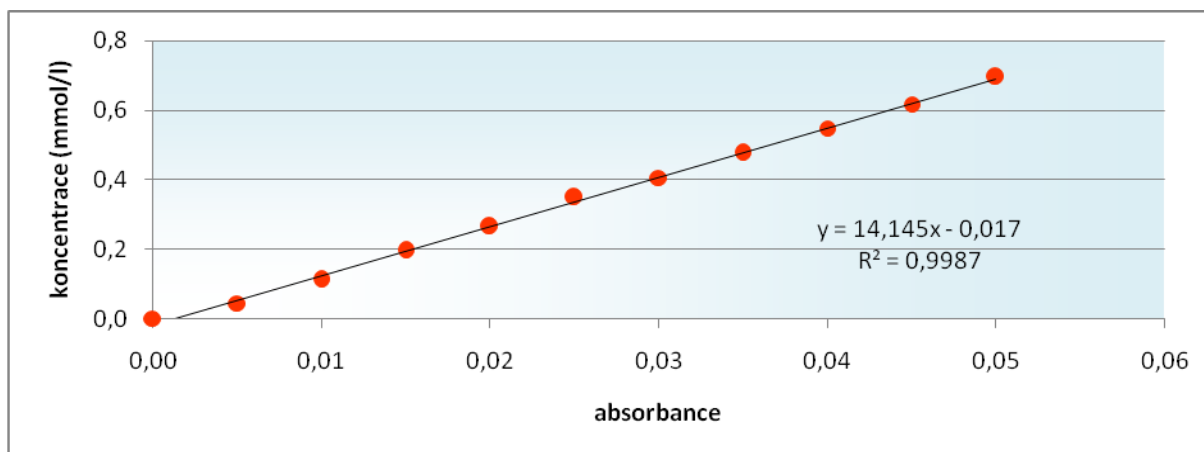
Roztoky o přesných koncentracích byly podle Somogyi-Nelsonovy metody upraveny a byla proměřena jejich absorbance. Naměřené hodnoty byly zaneseny do grafu 8 a ze získané regresní rovnice $y = 0,0164x - 0,0063$ byly počítány koncentrace měřených vzorků. Regresní koeficient byl stanoven na hodnotu $R^2 = 0,9938$.

5.5. Kalibrace spektrofotometrického stanovení *p*-nitrofenolu

Tato metoda kvantifikuje množství *p*-nitrofenolu uvolněného enzymovou hydrolyzou z *p*-nitrofenolpalmitátu, který byl použit jako substrát při stanovení lipázové aktivity enzymů.

Tab. 14: Kalibrační křivka pro stanovení koncentrace *p*-nitrofenolu při stanovení lipázové aktivity enzymů.

koncentrace (mmol/l)	A (410 nm)
0,000	0,000
0,005	0,044
0,010	0,112
0,015	0,196
0,020	0,265
0,025	0,349
0,030	0,405
0,035	0,476
0,040	0,548
0,045	0,617
0,050	0,696



Graf 9: Kalibrační křivka závislosti koncentrace *p*-nitrofenolu na absorbanci

Z grafické závislosti koncentrace *p*-nitrofenolu na absorbanci byla získána regresní rovnice $y = 14,144x - 0,017$, která zároveň slouží pro výpočet koncentrací *p*-nitrofenolu ve vzorcích (Graf 9). Regresní koeficient byl stanoven na hodnotu $R^2 = 0,9987$.

5.6. Inkorporace vybraných monomerů do struktury PHA

5.6.1. Srovnání produkce PHA na olejových substrátech a fruktóze

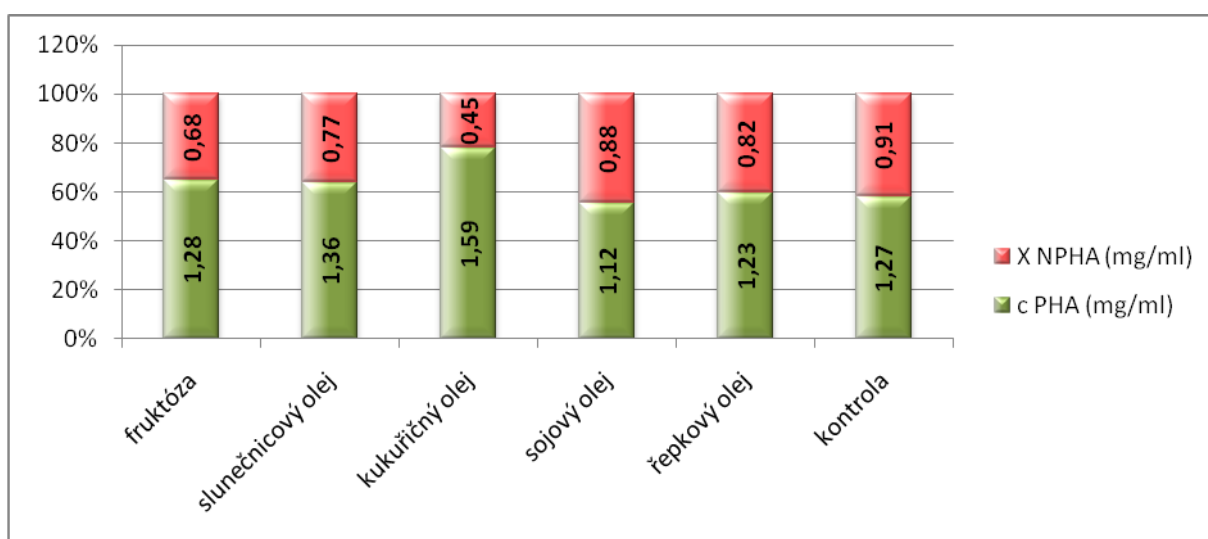
Řada zahraničních autorů uvádí, že oleje jsou dobré zdroje uhlíku pro růst kultury *Cupriavidus necator* a za omezených růstových podmínek jsou oleje zdrojem uhlíku pro syntézu PHA v bakteriální buňce [56, 58]. Z těchto důvodů byla sledována produkce PHA na různých olejnatých substrátech ve srovnání s produkcí PHA na fruktóze.

Tab. 15: Naměřené hodnoty pro navážku biomasy X_t (mg/ml) a koncentraci PHA v biomase c_{PHA} (mg/ml), hodnoty procentuálního zastoupení PHA v biomase. Dále je uvedena koncentrace biomasy netvořící PHA.

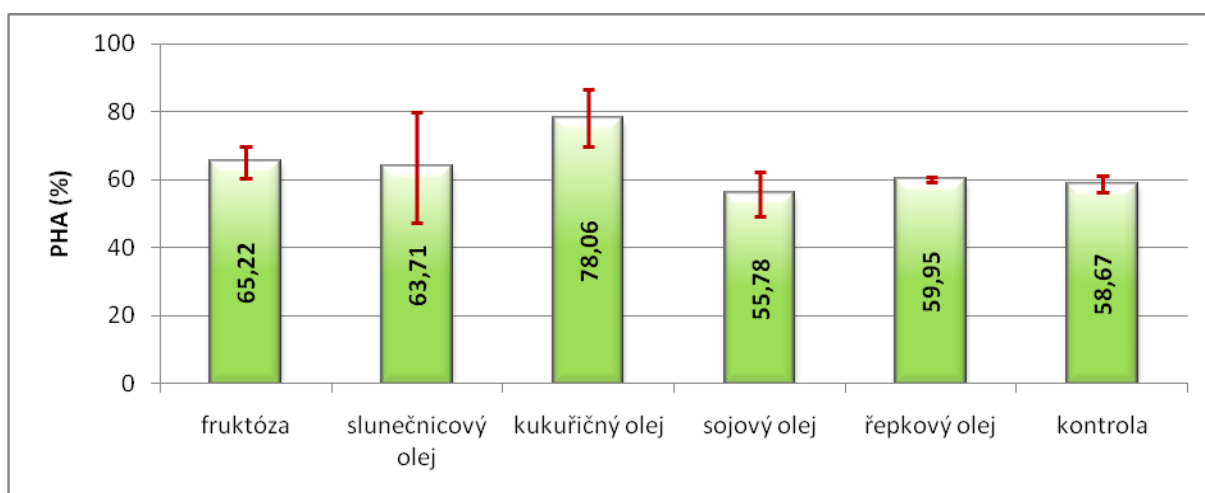
Použitý substrát	X_t (mg/ml)	c_{PHA} (mg/ml)	PHA (%)	X_{NPHA} (mg/ml)
Fruktóza	$1,96 \pm 0,06$	$1,28 \pm 0,05$	$65,22 \pm 4,65$	0,68
Slunečnicový olej	$2,14 \pm 0,01$	$1,36 \pm 0,34$	$63,71 \pm 16,21$	0,77
Kukuřičný olej	$2,04 \pm 0,01$	$1,59 \pm 0,17$	$78,06 \pm 8,44$	0,45
Sojový olej	$2,00 \pm 0,03$	$1,12 \pm 0,11$	$55,78 \pm 6,57$	0,88
Řepkový olej	$2,05 \pm 0,13$	$1,23 \pm 0,09$	$59,95 \pm 0,69$	0,82
kontrola	$2,18 \pm 0,01$	$1,27 \pm 0,05$	$58,67 \pm 2,40$	0,91

Tab. 16: Výtěžky biomasy po kultivaci (g/l) a koncentrace PHA v biomase (g/l)

Použitý substrát	Koncentrace biomasy (g/l)	Koncentrace PHA (g/l)
Fruktóza	16,33 ± 0,14	10,65 ± 0,09
Slunečnicový olej	17,88 ± 2,11	11,39 ± 1,34
Kukuřičný olej	17,03 ± 0,37	13,30 ± 0,29
Sojový olej	15,62 ± 3,47	8,71 ± 1,93
Řepkový olej	17,19 ± 0,66	10,30 ± 0,40
kontrola	12,42 ± 0,47	7,29 ± 0,28



Graf 10: zastoupení koncentrace PHA a koncentrace buněčných komponent tvořících PHA v získané biomase. Koncentrace biomasy je vyjádřena jako 100% složka.



Graf 11: Procentuální obsah PHA v biomase po kultivaci bakterie *C. necator* na olejnatých substrátech ve srovnání s fruktózou. Kontrola kultivovaná na minerálním médiu.

Z výsledků kultivačních experimentů (Tabulka 15, Graf 10, 11) bylo zjištěno, že nejvyšší procentuální zastoupení PHA v biomase bylo naměřeno při kultivaci na kukuřičném oleji, kde byla koncentrace PHA $1,59 \pm 0,17$ mg/ml a koncentrace PHA tvořících buněčných komponent byla 0,45 mg/ml, což představuje $78,06 \pm 8,44$ % (kapitola 4.4.1.3).

Druhým substrátem s nejvyšším procentuálním zastoupením PHA byla fruktóza. Zde se produkce PHA snížila vzhledem ke kukuřičnému oleji o 22,72 % a byla stanovena na $65,22 \pm 4,65$ %. Koncentrace PHA byla $1,28 \pm 0,05$ mg/ml a koncentrace biomasy netvořící PHA odpovídala 0,68 mg/ml.

Nejmenší procentuální zastoupení PHA v biomase bylo stanoveno při kultivaci bakterie *C.n.* na sojovém oleji ($55,78 \pm 6,57$ % PHA v biomase). Tato hodnota byla dokonce nižší než použitá kontrolní kultivace. Koncentrace PHA byla nejnižší z celé kultivace $1,12 \pm 0,11$ mg/ml a koncentrace buněčných komponent neobsahujících PHA byla nejvyšší hodnotou z této veličiny v kultivaci a měla hodnotu 0,88 mg/ml.

Kultivace na rostlinných olejích celkově dosahují vysokých hodnot koncentrací biomasy, jak uvádí tabulka 16. Nejvyšší koncentrace byla dosažena při kultivaci na kukuřičném oleji $17,88 \pm 2,11$ g/l a nejvyšší celková koncentrace PHA v biomase dosáhla $13,30 \pm 0,29$ při kultivaci na kukuřičném oleji. Nejnižší koncentrace biomasy z uvedených kultivací byla naměřena při kultivaci na sojovém oleji ($15,62 \pm 3,47$ g/l) a zde byla nejnižší i celková koncentrace PHA v biomase - $8,71 \pm 1,93$ g/l.

Tab. 17: procentuální zastoupení jednotlivých mastných kyselin v rostlinných olejích použitých v uvedeném experimentu [84]

Mastná kyselina		Sojový	Slunečnicový	Řepkový	Kukuřičný
Myristová	C 14:0	< 0,5	3,0-10,0	-	-
Palmitová	C 16:0	7,0-14,0	< 1,0	2,5-6,0	9,0-14,0
Palmitolejová	C 16:1	< 1,0	1,0-10,0	< 0,6	< 0,5
Stearová	C 18:0	3,0-5,5	14,0-35,0	0,8-2,5	0,5-4,0
Olejová	C 18:1	18,0-26,0	55,0-75,0	50,0-66,0	24,0-42,0
Linolová	C 18:2	50,0-57,0	< 0,3	18,0-28,0	34,0-62,0
Linolenová	C 18:3	5,5-10,0	< 1,5	6,0-14,0	< 2,0
Arachidová	C 21:4	< 0,6	< 0,5	0,1-1,2	< 1,0
Eikosanová	C 20:0	< 1,0	< 0,5	0,1-4,3	< 0,5

Jedlé rostlinné oleje mají podle rostliny, ze které jsou získávány, různé zastoupení mastných kyselin tvořících triacylglyceroly, jak je uvedeno v Tab. 17. Odlišnosti jsou jak v různorodém zastoupení mastných kyselin, tak i v procentuálním zastoupení jednotlivých nasycených a nenasycených alifatických mastných kyselin.

Triacylglyceroly obsahující mastné kyseliny jsou nejprve rozštěpeny na glycerol a volné mastné kyseliny, které se zapojují do metabolismu buňky a vstupují do β -oxidace mastných kyselin. Délka potřebná k rozkladu je závislá od délky alifatického řetězce mastné kyseliny – čím má mastná kyselina kratší řetězec, tím je rychleji odbourána a využita jako zdroj energie a uhlíku v anabolických reakcích buňky. S přítomností nenasycených dvojných vazeb roste náročnost rozkladu mastných kyselin v organismu [85].

Z těchto důvodů musí produkce PHA záviset na složení a obsahu mastných kyselin v použitém oleji. Podle uvedené teorie lze předpokládat nejvyšší produkci u kukuřičného oleje, který obsahuje nejvyšší procentuální zastoupení kyseliny palmitové (až 14,0 %) z uvedených mastných kyselin. Dále je zde ve vyšším obsahu přítomna jen kyselina olejová (až 42 %) a linolová (až 62 %).

U sojového oleje je situace opačná. Tento olej tvoří z 50 % kyselina linolová, až z 10 % kyselina linoleová a až z 26 % kyselina olejová, které jsou pro metabolismus náročnější na zpracování.

5.6.2. Inkorporace prekurzorů 3-hydroxyvalerátu do struktury PHA

Pro kultivaci PHA s monomerními jednotkami 3-hydroxyvalerátu byla buněčná kultura *Cupriavidus necator* kultivována s tří- a pětiuhlíkatými prekurzory této monomerní jednotky. Jako zdroj uhlíku byl použit řepkový olej. Zástupcem tříuhlíkatých prekurzorů byl propionát sodný a propan-1-ol, mezi pětiuhlíkatými prekurzory byl použit pentan-1-ol a kyselina valerová.

5.6.2.1. Využití tříuhlíkatých prekurzorů pro syntézu P(3HB-co-3HV)

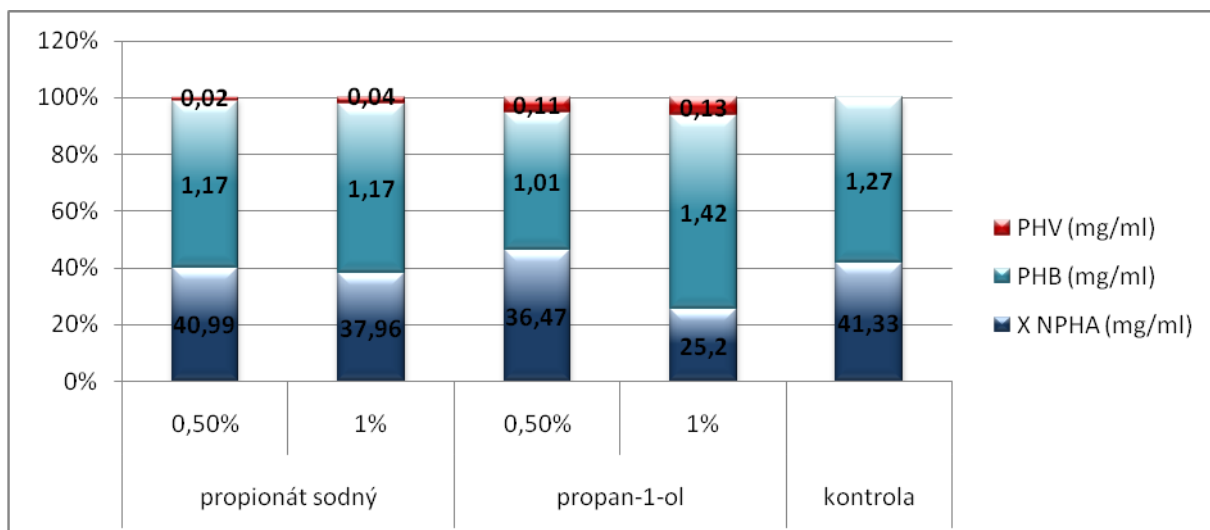
Pro inkorporaci 3-hydroxyvalerátových jednotek do polymerní struktury PHA byly využity tříuhlíkaté prekurzory – 0,5% a 1% propionát sodný a 0,5% a 1% propan-1-ol.

Tab. 18: Přehled navážek biomasy X_t (mg/ml), koncentrace PHA, PHB a PHV ve studovaných vzorcích, procentuální zastoupení PHA v biomase a procentuální zastoupení jednotlivých monomerů 3HB a 3HV ve výsledném polymeru při kultivaci bakterií *Cupriavidus necator* s prekurzory 3HV – propionátem sodným a propan-1-olem.

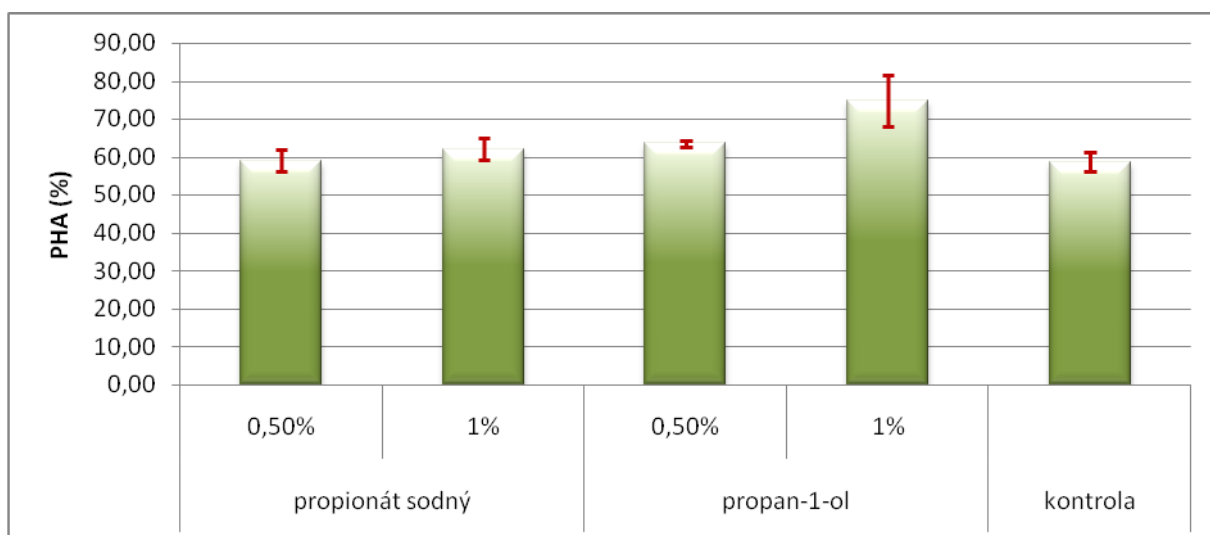
Koncentrace prekurzoru	X_t (mg/ml)	C_{PHA} (mg/ml)	PHA(%)	C_{PHB} (mg/ml)	PHB (%)	C_{PHV} (mg/ml)	PHV (%)	X_{NPHB} (mg/ml)
0,5% propionát sodný	1,99	1,19	59,02 ± 2,85	1,17	98,32	0,02	1,68	0,80
1% propionát sodný	1,96	1,21	62,04 ± 2,89	1,17	96,69	0,04	3,31	0,75
0,5% propan-1-ol	2,09	1,12	63,53 ± 0,85	1,01	90,18	0,11	9,82	0,96
1% propan-1-ol	2,08	1,55	74,80 ± 6,83	1,42	91,61	0,13	8,39	0,53
kontrola	2,08	1,27	58,67 ± 2,48	1,27	100,00	0,00	0,00	0,91

Tab. 19: Výtěžky biomasy po kultivaci (g/l) a koncentrace PHA v biomase (g/l)

Koncentrace prekurzoru	Koncentrace biomasy (g/l)	Koncentrace PHA (g/l)
0,5% propionát sodný	13,82 ± 1,21	4,15 ± 0,31
1% propionát sodný	15,64 ± 1,95	9,71 ± 1,21
0,5% propan-1-ol	10,27 ± 1,54	6,52 ± 0,98
1% propan-1-ol	10,10 ± 0,35	7,55 ± 0,26
kontrola	12,42 ± 0,47	7,29 ± 0,28



Graf 12: Koncentrace jednotlivých složek získané biomasy; celková koncentrace biomasy odpovídá 100%, která je tvořena koncentrací 3HB a 3HV monomerních jednotek a koncentrací buněčných komponent netvořících PHA X_{NPHA} . Za podmínek, kdy je bakterie *C.n.* kultivována v přítomnosti prekursorů valerátového monomeru.



Graf 13: Procentuální koncentrace PHA v biomase buněčné kultury.

Propionát sodný a propan-1-ol jsou tříuhlíkaté sloučeniny, které mohou být využity jako prekursor 3-hydroxyvalerátu a být tak inkorporovány do struktury PHA, pokud jsou přidány do kultivačního média *Cupriavidus necator*.

Při kultivaci bakteriální kultury za použití 0,5% propionátu sodného, byl obsah PHA $59,02 \pm 2,85$ %, z čehož 98,32 % bylo tvořeno 3HB monomerními jednotkami a 3HV monomerní jednotka byla zastoupena 1,68 % (Graf 12, 13). S navýšením koncentrace prekursoru na 1% množství v kultivačním médiu byla navýšena i koncentrace PHV v biomase na hodnotu 3,31 %. Zvýšením koncentrace prekursoru o 0,5% tedy došlo k navýšení množství 3HV monomeru v PHA polymeru oproti 0,5% propionátu sodnému až o 50,75 %. Dále došlo i k navýšení procentuálního zastoupení PHA ($62,04 \pm 2,89$ %) o 4,9 % a zároveň bylo sníženo množství biomasy netvořící PHA o 6,25 % vzhledem ke kultivaci s nižším množstvím prekursoru. Pro srovnání je uvedena kontrola kultivovaná bez přítomnosti prekursoru, tudíž

zde nebyla naměřena přítomnost 3-hydroxyvalerátového monomeru a procentuální zastoupení 3HB monomeru bylo stanoveno na 100 %. Uvedené hodnoty jsou shrnuty v tabulce 18 a 19)

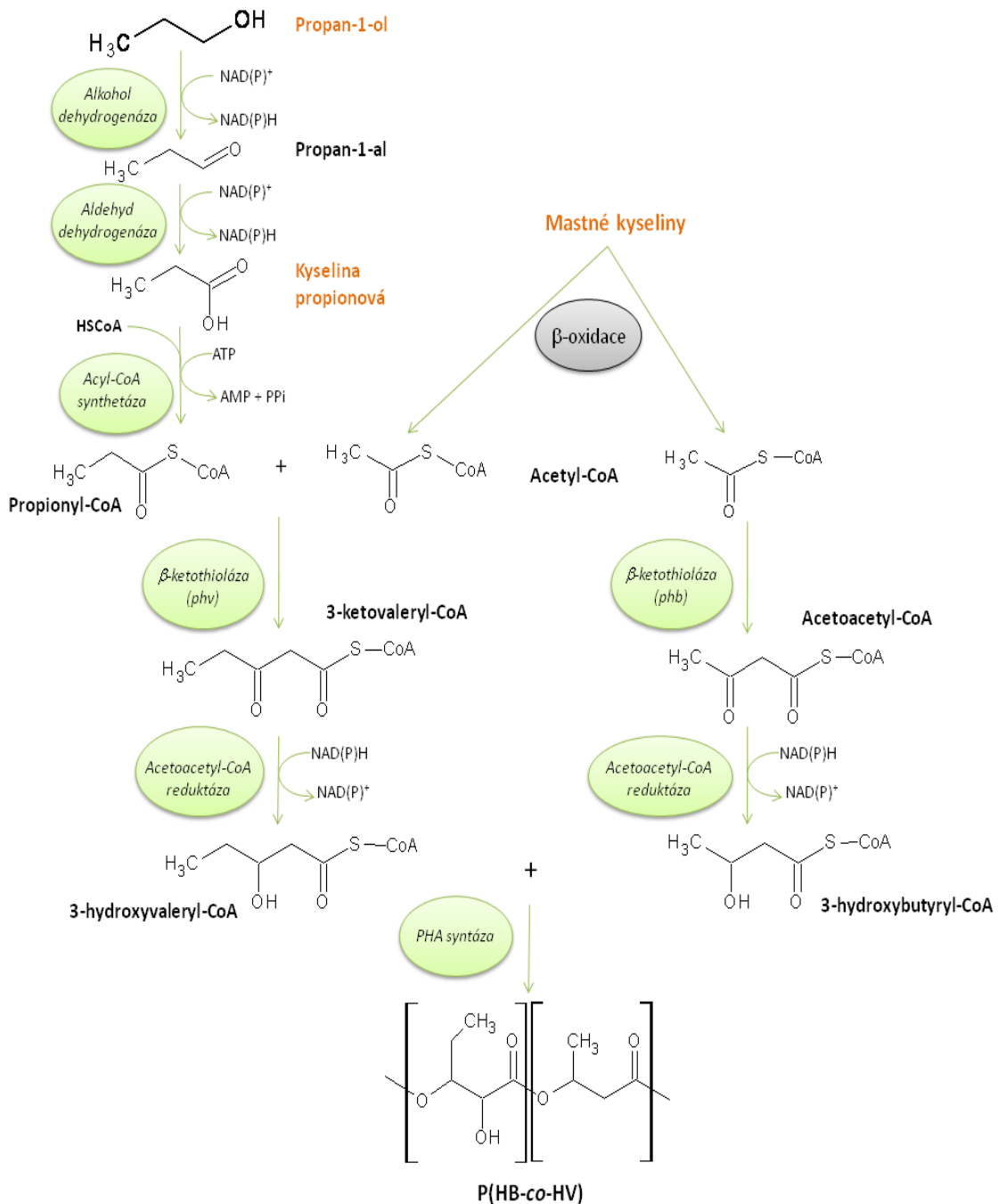
Procentuální zastoupení monomeru v polymeru závisí na koncentraci použitého prekurzoru, který je využíván pro tvorbu monomerní jednotky 3HV a na dostatečné koncentraci uhlíkatého zdroje. Pokud je ovšem prekurzor využíván bakteriálními buňkami i jako zdroj uhlíku, získaným polymerem po izolaci je homopolymer poly(3-hydroxyvalerát) [86].

V případě použití 0,5% propan-1-olu bylo stanoveno procentuální zastoupení PHA $63,53 \pm 0,85$ %, z čehož 90,18 % bylo zastoupeno 3HB monomerem a zbylých 9,82 % představoval 3HV monomer, což je nejvyšší naměřená hodnota 3HV v tomto experimentu. V kultivaci, kde byl 0,5% propan-1-ol zaměněn za 1% propan-1-ol, došlo sice k navýšení množství PHA na $74,80 \pm 6,83$ %, ale koncentrace 3HV monomeru se snížila o 14,56 % na hodnotu 8,39 %. Tento pokles byl kompenzován nárůstem koncentrace 3HB monomeru na 91,61%, což představuje navýšení o 1,56% vůči kultivaci s 0,5% propan-1-olem.

Po ukončení kultivací byla nefelometricky stanovena koncentrace biomasy v kultivačním médiu a byl vypočten celkový výtěžek PHA v jednotlivých kultivacích (Tab. 19). Baňky obsahující 0,5% propionát sodný obsahovaly vyšší koncentraci biomasy oproti kontrole ($12,42 \pm 0,47$ g/l) a dosáhly hodnotu $13,82 \pm 1,21$ g/l. V kultivacích s vyšší koncentrací propionátu sodného vzrostla koncentrace až na hodnotu $15,64 \pm 1,95$ g/l a celkový výtěžek PHA byl $9,71 \pm 1,21$ g/l. Opačný vliv měl přírůstek propan-1-olu. Při přírůstku 0,5% propan-1-olu poklesla koncentrace biomasy v kultivačním médiu na $10,27 \pm 1,54$ g/l, z čehož celkový výtěžek PHA představoval $6,52 \pm 0,98$ g/l. Při zvýšení koncentrace byla inhibice růstu biomasy ještě navýšena, tudíž koncentrace poklesla na $10,10 \pm 0,35$ g/l.

5.6.2.2. Tok tříuhlíkatých prekurzorů *P(3HB-co-3HV)* metabolismem bakterie *Cupriavidus necator*

Propan-1-ol a propionát sodný jsou tříuhlíkaté sloučeniny vstupující do metabolismu bakterií *Cupriavidus necator*. Výsledným produktem tohoto metabolismu jsou polyestery 3HV a 3HB, pokud je okolní prostředí dostatečně nasyceno zdrojem uhlíku, v našem případě olejovým substrátem, který zároveň slouží zdroj uhlíkaté kostry pro syntézu 3HB.



Obr. 10: Tok prekurzorů – propan-1-olu a kyseliny propionové metabolismem bakterie *Cupriavidus necator* [87]

Začlenění tříuhlíkatých prekurzorů do struktury PHA (Obr. 10) začíná převedením propan-1-olu na propan-1-al v přítomnosti alkoholdehydrogenázy. Aldehyddehydrogenáza zajišťuje přeměnu propan-1-alu na kyselinu propionovou, což je další látka, která byla využita jako prekurzor v kultivacích s cílem produkce kopolymeru P(3HB-co-3HV). Pro postup kyseliny propionové v metabolismu je nutná aktivace za současného využití koenzymu A a za katalýzy Acyl-CoA syntázou, čímž vznikne propionyl-CoA. Takto aktivovaná sloučenina reaguje spolu s acetyl-CoA v přítomnosti β-ketothiolázy za vzniku β-ketovaleryl-CoA, což

představuje první krok syntézy polymeru. Druhým krokem je redukce β -ketovaleryl-CoA na (R)-3-hydroxyvaleryl-CoA, který je substrátem selektivního enzymu PHA syntázy, která dokončí polymerizační reakci a zakomponuje tak 3HV monomerní jednotku do struktury heteropolymeru [82, 87, 88].

Mastné kyseliny, jež jsou získány štěpením olejnatého substrátu, vstupují do β -oxidace a jsou rozloženy na acetyl-CoA, který může být využit jak k syntéze hydroxyvalerátové monomerní jednotky, tak i k tvorbě biomasy nebo jako jeden z výchozích substrátů pro tvorbu hydroxyvalerátového monomeru [35].

Syntéza hydroxybutyrátových jednotek probíhá ve třech standardních krocích, jež začínají syntézou acetoacetyl-CoA v přítomnosti β -ketothiolázy z dvou molekul acetyl-CoA. Druhým krokem je redukce acetoacetyl-CoA na 3-hydroxybutyryl-CoA za katalýzy acetoacetyl-CoA reduktázy. Posledním enzymem zapojeným do syntézy polymeru je PHA syntáza, která spojuje jednotlivé (R)-3-hydroxybutyryl-CoA za vzniku polymerní struktury [13, 89].

Rozdíly v obsahu mezi jednotlivými prekurzory mohou být způsobeny lepší využitelností propan-1-olu před využitelností propionátu sodného, když je součástí metabolismu propanolu. Zisk vyššího obsahu 3HB v kultivaci s 1% propan-1-olem než v kultivaci s 1% propionátem sodným lze připsat lepším schopnostem propan-1-olu rozpustit olej a tak zajistit lepší a rychlejší využitelnost tohoto substrátu pro buněčnou kulturu.

5.6.2.3. Využití pětiuhlíkatých prekurzorů pro syntézu P(3HB-co-3HV)

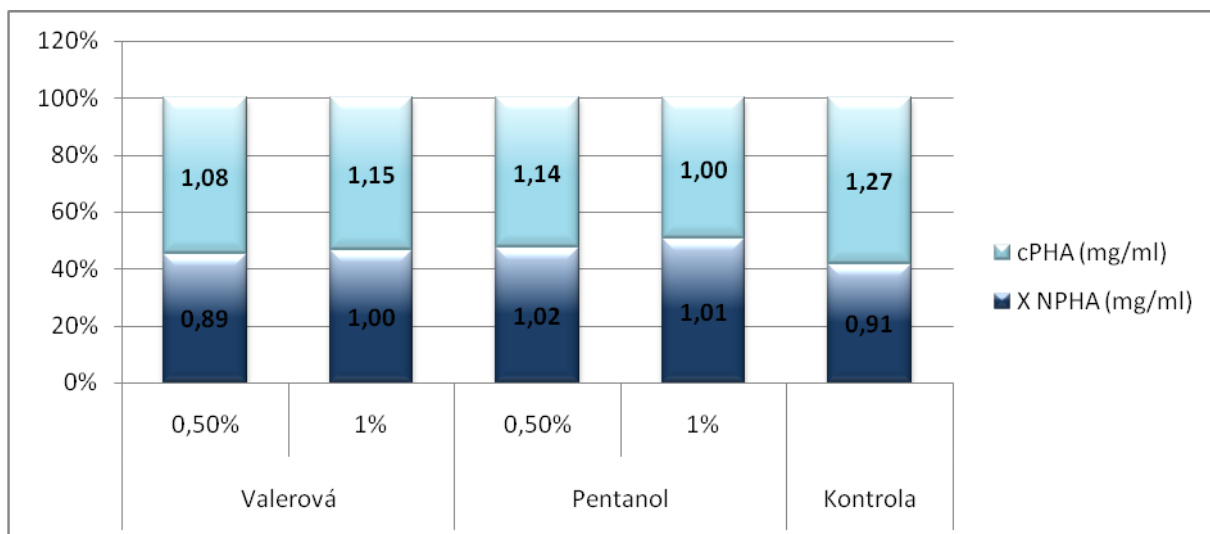
Pro inkorporaci 3-hydroxyvalerátových jednotek do polymerní struktury PHA byly využity pětiuhlíkaté prekurzory – kyselina valerová a pentan-1-ol ve dvou koncentracích (0,5% a 1% koncentrace prekurzoru v kultivačním médiu)

Tab. 20: Přehled koncentrace biomasy X_t (mg/ml) a koncentrace PHA ve studovaných vzorcích a procentuální zastoupení PHA v biomase při kultivaci bakterií *Cupriavidus necator* s prekurzory 3HV – kyselinou valerovou a pentan-1-olem.

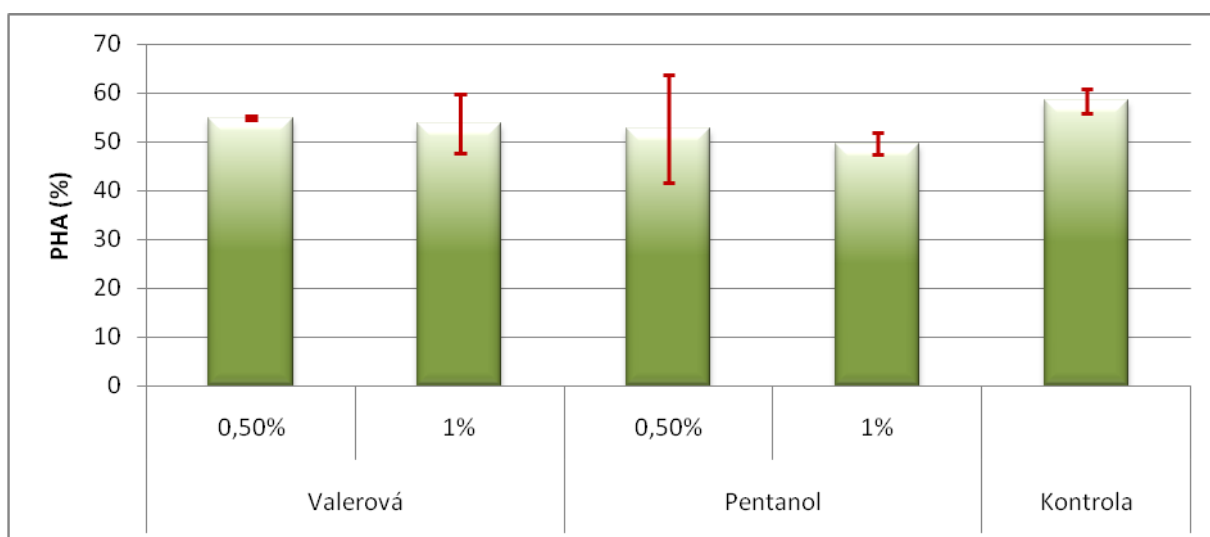
Prekurzor	Koncentrace prekurzoru	X_t (mg/ml)	c_{PHA} (mg/ml)	PHA (%)	X_{NPHA} (mg/ml)
kyselina valerová	0,50%	1,97 ± 0,01	1,08 ± 0,01	54,88 ± 0,34	0,89
	1%	2,15 ± 0,12	1,15 ± 0,20	53,68 ± 6,15	1,00
pentan-1-ol	0,50%	2,17 ± 0,02	1,14 ± 0,25	52,66 ± 11,03	1,02
	1%	2,01 ± 0,01	1,00 ± 0,04	49,60 ± 2,17	1,01
kontrola	-	2,18 ± 0,01	1,27 ± 0,05	58,35 ± 2,41	0,91

Tab. 21: Výtěžky biomasy po kultivaci (g/l) a koncentrace PHA v biomase (g/l)

Prekurzor	Koncentrace prekurzoru	Koncentrace biomasy (g/l)	Koncentrace PHA (g/l)
kyselina valerová	0,50%	7,03 ± 0,53	3,86 ± 0,29
	1%	7,09 ± 1,01	3,80 ± 0,54
pentan-1-ol	0,50%	4,22 ± 0,75	2,22 ± 0,39
	1%	3,38 ± 0,27	1,68 ± 0,13
kontrola	-	12,42 ± 0,47	7,29 ± 0,28



Graf 14: Procentuální vyjádření koncentrací jednotlivých složek získané biomasy; celkové množství biomasy odpovídající 100% je tvořeno procentuálním zastoupením PHA a X_{NPHA} , což je procento látek obsažených v biomase, ale netvořících PHA.



Graf 15: Procentuální koncentrace PHA v biomase buněčné kultury.

Tabulky 20 a 21 a z grafy 14 a 15 uvádí výsledky kultivace studované bakterie na pětiuhlíkatých prekurzorech 3-hydroxyvalerátové monomerní jednotky vyplývá, že bakterie není schopna zakomponovat ani jeden ze dvou studovaných pětiuhlíkatých prekurzorů do struktury PHA, protože v biopolymeru nebylo detekováno žádné množství 3HV. Tato skutečnost je způsobena změnou toku této pětiuhlíkaté struktury v metabolismu.

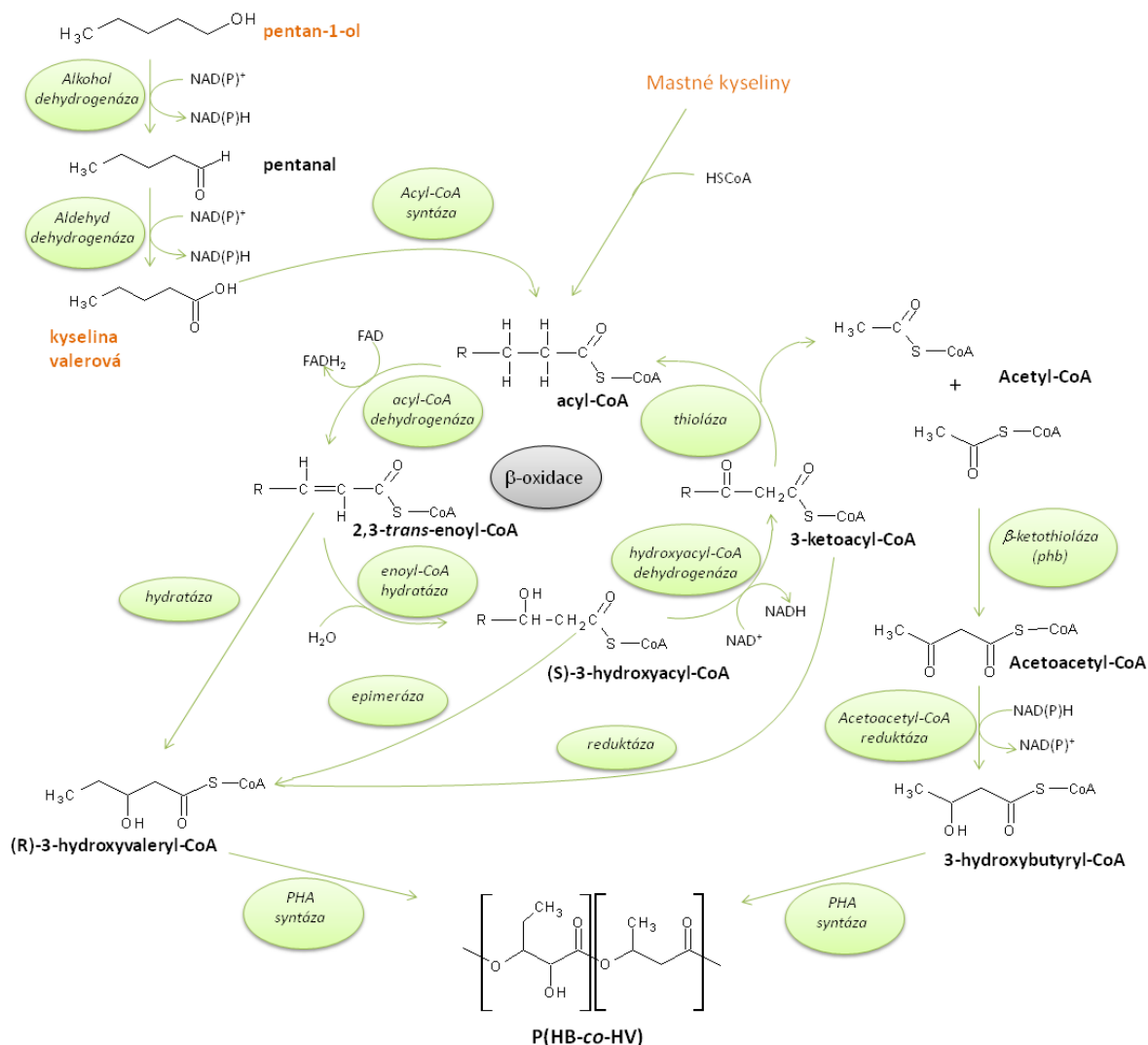
Vzhledem ke skutečnosti, že nebyla naměřena žádná koncentrace 3HV monomerní jednotky, je PHA tvořen homopolymerem poly(3-hydroxybutyrátu), a proto naměřené množství PHA odpovídá množství PHB.

V případě použití 0,5% a 1% kyseliny valerové byl naměřen obsah PHA $54,88 \pm 0,34$ % a $53,68 \pm 6,15$ % v biomase. Za použití 0,5% a 1% pentan-1-olu byl zjištěn obsah PHA v biomase ve výši $52,66 \pm 11,03$ % a $49,60 \pm 2,17$ %. U obou prekurzorů je pozorován nižší obsah PHA v biomase při vyšší koncentraci prekurzoru, což může být vysvětleno také tím, že prekurzor je stresový faktor působící inhibičně jak na produkci biomasy, tak i na PHA.

V kultivacích, kde byl použit pentan-1-ol, docházelo s narůstající koncentrací tohoto prekurzoru k úbytku růstu biomasy během kultivace, což bylo prokázáno nefelometrickým stanovením zákalu po ukončení kultivace. V kultivacích, kde byl použit 0,5% pentan-1-ol byla naměřená koncentrace biomasy po ukončené kultivaci jen $4,22 \pm 0,75$ a celkový výtěžek PHA byl $2,22 \pm 0,39$ g/l. Při použití koncentrovanějšího pentan-1-olu poklesla koncentrace biomasy až na $3,38 \pm 0,27$ g/l, kde celková koncentrace PHA byla $1,68 \pm 0,13$ g/l. Tato skutečnost je připisována toxickému účinku pentan-1-olu na růst kultury.

5.6.2.4. Tok pětiuhlíkatých prekurzorů P(3HB-co-3HV) metabolismem bakterie *Cupriavidus necator*

Pětiuhlíkaté prekurzory P(3HB-co-3HV) jsou podle literatury plně zapojovány do metabolismu bakterie a předpokládají tvorbu uvedeného heteropolymeru. Předpokládaný tok pětiuhlíkatých prekurzorů metabolismem bakterie vedoucím k tvorbě P(3HB-co-3HV) je uveden na Obr. 11.



Obr. 11: Tok prekurzorů – pentan-1-olu a kyseliny valerové metabolismem bakterie *Cupriavidus necator* [1, 15, 87, 90, 91, 92, 93].

Zapojení pentan-1-olu začíná sledem oxidačních a hydratačních reakcí vedoucím k tvorbě kyseliny valerové a její následné aktivaci na valeryl-CoA za přítomnosti acyl-CoA syntázy. Tento meziprodukt tvorby PHA není substrátem β -ketothiolázy, ale jedná se o meziprodukt β -oxidace mastných kyselin, do které je také zapojen. Valeryl-CoA vstupuje do Lynenovy spirály a je substrátem pro acyl-CoA dehydrogenázu, kde výsledným produktem je 2,3-*trans*-pentenoyl-CoA. Tento produkt je v rámci této dráhy hydratován za vzniku (S)-3-hydroxyvaleryl-CoA a enzymem hydroxyacyl-CoA dehydrogenázou je dokončena přeměna pentan-1-olu na 3-ketovaleryl-CoA [13].

3-ketovaleryl-CoA může pokračovat do dalších krocích Lynenovy spirály a rozložit se až na acetyl-CoA a propionyl-CoA. Acetyl-CoA následně vstupuje do dráhy pro syntézu biomasy za předpokladu, že bakterie má dostatečnou výživu v médiu. Při nutričním omezení média je acetyl-CoA převáděn na polymer [13].

Dalším možným zpracováním 3-ketovaleryl-CoA je výstup z β -oxidace mastných kyselin s následnou enzymovou přeměnou 3-ketovaleryl-CoA reduktázou na (R)-3-hydroxyvaleryl-CoA, což je sloučenina, jež vyhovuje substrátové specifitě PHA syntázy. Tento enzym je schopný dokončit syntézu kopolymeru a zakomponovat hydroxyvalerátovou jednotku do kopolymeru P(3HB-*co*-3HV) [94].

Pro syntézu 3HV monomerní jednotky může být využit i (S)-3-hydroxyvaleryl-CoA, jenž je v přítomnosti epimerázy převeden na (R)-izomer, který již je substrátem pro PHA syntázu. Třetím meziproduktem Lynenovy spirály, který může být využit pro produkci 3HV monomerní jednotky je 2,3-*trans*-pentenoyl-CoA, který je substrátem hydratázy a v přítomnosti vody je přeměněn na (R)-3-hydroxyvaleryl-CoA [13, 94].

Zdrojem uhlíku pro syntézu hydroxybutyrátového monomeru je především olejnatý substrát, který je pomocí β -oxidace rozložen na acetyl-CoA. Ten je výchozím meziproduktem pro syntézu, která pokračuje za přítomnosti β -ketothiolázy tvorbou acetoacetyl-CoA a enzymovou reakcí v přítomnosti acetoacetyl-CoA reduktázy vzniká (R)-3-hydroxybutyryl-CoA, jenž je PHA syntézou inkorporován do struktury PHA [7].

V předložené práci bylo analýzou polymeru získaného kultivací na olejnatém substrátu v přítomnosti prekurzorů pentan-1-olu a valerové kyseliny zjištěno, že polymer žádné monomery hydroxyvalerátu neobsahuje. Tato skutečnost je zřejmě způsobena maximálním zapojením enzymů β -oxidace, která probíhá takovou rychlostí, že 3-ketovaleryl-CoA není z této dráhy předčasně odveden, ale pokračuje dál až do konečného rozkladu na acetyl-CoA. Ten je poté využit jen pro syntézu homopolymeru PHB v případě obou použitých prekurzorů.

5.6.3. Inkorporace 4-hydroxybutyrátu do struktury PHA

5.6.3.1. Využití různých prekurzorů pro syntézu P(3HB-*co*-4HB)

Sloučeniny butan-1,4-diol a γ -butyrolakton jsou snadno využity v metabolismu bakterie, pokud se vyskytují v živném médiu mikrobiální buňky. Zapojení do katabolických reakcí vede k úpravě na čtyřuhlíkaté aktivované sloučeniny, jež mohou být využity jako zdroj energie a uhlíku pro buňku. Pokud je ale aktivovaný meziprodukt zpracováván PHA syntézou, je tato sloučenina zakomponována do struktury polymerního řetězce za vzniku kopolymeru P(3HB-*co*-4HB).

Tab. 22: Koncentrace PHA a procentuální zastoupení PHA v biomase; koncentrace biomasy netvořící PHA a její rozpustnost (S_{NPHA}) a změna čistoty vzorků vůči kontrole u kultivací s různými prekurzory P(3HB-co-4HB).

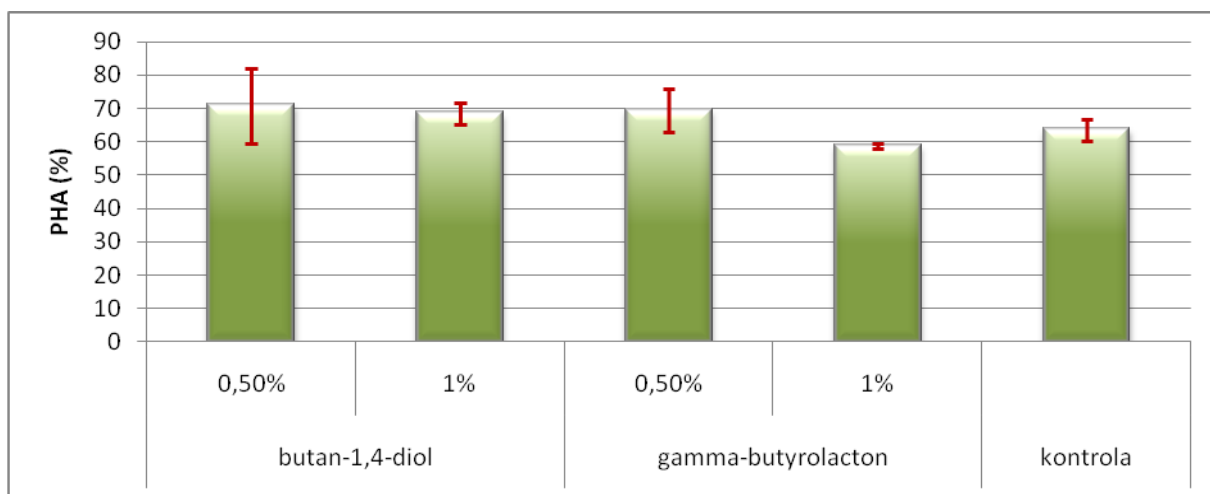
prekurzor	X_t (mg/ml)	c_{PHA} (mg/ml)	PHA (%)	X_{NPHA} (mg/ml)
0,50% butan-1,4-diol	2,03	1,433 ± 0,225	70,780 ± 11,268	0,592
1% butan-1,4-diol	2,06	1,411 ± 0,092	68,442 ± 3,116	0,649
0,50% γ -butyrolakton	2,15	1,491 ± 0,121	69,443 ± 6,587	0,659
1% γ -butyrolakton	2,015	1,183 ± 0,001	58,716 ± 0,679	0,832
kontrola	2,02	1,287 ± 0,090	63,657 ± 3,196	0,733

Tab. 23: Naměřené hodnoty koncentrací 3HB a 4HB monomerních jednotek tvořících kopolymer p(3HB-co-4HB) jejich procentuální zastoupení v biomase.

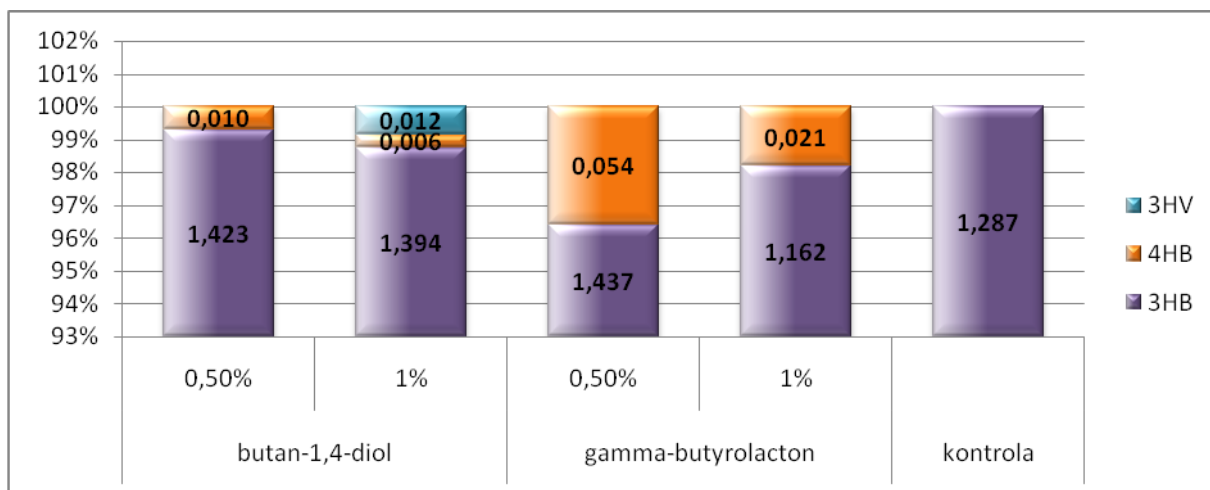
prekurzor	c_{3HB} (mg/ml)	3HB (%)	c_{4HB} (mg/ml)	4HB (%)
0,50% butan-1,4-diol	1,423 ± 0,219	99,30	0,010 ± 0,005	0,70
1% butan-1,4-diol	1,394 ± 0,089	98,76	0,006 ± 0,001	0,39
0,50% γ -butyrolakton	1,437 ± 0,124	96,40	0,054 ± 0,004	3,60
1% γ -butyrolakton	1,162 ± 0,001	98,20	0,021 ± 0,001	1,80
kontrola	1,287 ± 0,090	100,00	-	0,00

Tab. 24: Výtěžky biomasy po kultivaci (g/l) a koncentrace PHA v biomase (g/l)

prekurzor	Koncentrace biomasy (g/l)	Koncentrace PHA (g/l)
0,50% γ -butyrolakton	7,70 ± 0,51	5,34 ± 0,35
1% γ -butyrolakton	8,83 ± 0,49	5,18 ± 0,29
0,50% butan-1,4-diol	10,88 ± 0,20	7,45 ± 0,14
1% butan-1,4-diol	11,87 ± 1,21	8,40 ± 0,86
kontrola	9,16 ± 0,57	5,83 ± 0,37



Graf 16: Procentuální zastoupení celkového množství PHA akumulovaného v biomase bakteriálních buněk Cupriavidus necator.



Graf 17: Procentuální vyjádření koncentrace monomerních jednotek 3HB, 4HB a 3HV v rámci celkové koncentrace polymeru (100% složka odpovídá koncentraci PHA).

Při kultivaci bakterie *Cupriavidus necator* na olejnatých substrátech s přidavkem prekurzorů bylo zjištěno, že bakterie jsou opravdu schopny takto podávané prekurzory využít a zakomponovat do struktury produkovaného polymeru.

Nejvyšší procentuální zastoupení PHA (tabulka 22 a 23) bylo naměřeno při kultivaci s 0,5% butan-1,4-diolem, kdy se procentuální obsah PHA zvýšil na $70,282 \pm 11,268$ %. Koncentrace buněčných komponent netvořících PHA byla $0,592$ mg/ml z celkového množství biomasy $2,03 \pm 0,01$ mg/ml. Druhá nejvyšší hodnota byla stanovena v kultivaci s 0,5% γ -butyrolaktonem, kde byl naměřen procentuální obsah PHA $69,443 \pm 6,587$ %. Tato kultivace zároveň obsahovala nejvyšší procentuální obsah 4HB monomeru - 3,60 % obsahu PHA.

Druhá kultivace, která vedla k nejvyššímu procentuálnímu obsahu 4HB monomeru, byla kultivace s 1% γ -butyrolaktonem, kde byl tento obsah vypočten na 1,80 %. Vzhledem ke skutečnosti, že koncentrace 4HB monomeru v kultivacích, kde byl použit butan-1,4-diol, byla o jeden řád nižší, lze říci, že γ -butyrolakton je obecně lepším prekurzorem pro produkci kopolymerů s 4HB monomerními jednotkami. Metabolické využití butan-1,4-diolu může být způsobeno pravděpodobnou i nízkou specifitou alkoholdehydrogenázy vůči tomuto substrátu.

Při srovnání koncentrací prekurzorů a koncentrací výsledného monomeru 4HB ve struktuře polyhydroxyalkanoátů je zřejmé, že při vyšších koncentracích prekurzorů dochází k poklesu koncentrace 4HB monomerních jednotek ve struktuře, což může být způsobeno navýšením toxického účinku na bakteriální kulturu, takže prekurzor nevstupuje do dráhy syntetizující PHA, ale je využit na zvládnutí výživových potřeb buněčné kultury.

V médiu obsahujícím 1% butan-1,4-diol byla kromě monomerních jednotek 3HB a 4HB naměřena i nízká koncentrace 3HV odpovídající $0,012 \pm 0,003$ mg/ml, což představuje 0,19% celkové koncentrace získaného polymeru. V dalších kultivacích 3HV monomerní jednotky nebyly vůbec naměřeny, což může být způsobeno buď nízkou koncentrací prekurzoru (v případě 0,5% butan-1,4-diolu a 0,5% γ -butyrolaktonu), nebo neschopností využít daný prekurzor k tvorbě 3HV monomerní jednotky (v případě použití γ -butyrolaktonu).

Koncentrace biomasy po kultivaci (tabulka 24) byla při použití γ -butyrolaktonu nižší než koncentrace biomasy u kontroly $9,16 \pm 0,57$ g/l. Vyšší koncentrace jak biomasy, tak celková koncentrace PHA byla vyšší za použití 1% γ -butyrolaktonu - $8,83 \pm 0,86$ g/l, celková koncentrace PHA představovala $5,18 \pm 0,29$ g/l. Opačná situace byla u butan-1,4-diolu,

protože zde koncentrace biomasy byla vyšší než u kontroly; u 1% butan-1,4-diolu byla stanovena na $11,87 \pm 1,21$ g/l. Celková koncentrace PHA v biomase po kultivaci dosahovala $8,40 \pm 0,86$ g/l.

5.6.3.2. Tok prekurzorů P(3HB-co-4HB) metabolismem bakterie *C. necator*

Literární zdroje uvádí, že γ -butyrolakton a 1,4-butandiol jsou vhodnými prekurzory pro inkorporaci 4-hydroxybutyrátové monomerní jednotky do struktury polymeru s cílem produkce P(3HB-co-4HB), kde 3HB monomerní jednotka může být tvořena přímo z olejnatého substrátu v médiu nebo z použitých prekurzorů díky vedlejší metabolické dráze vedoucí přes (R)-4-hydroxybutyryl-CoA až na acetyl-CoA [91].

Přítomnost 1,4-butandiolu v kultivačním médiu vede s výhodou k jeho zapojení do metabolismu bakteriální buňky (obrázek 12), která má dostatečné enzymové vybavení. Tento ω -alkandiol je dvoustupňovou enzymatickou reakcí převeden na kyselinu 4-hydroxybutyrovou. V prvním kroku je 1,4-butandiol převeden na 4-hydroxybutan-1-al za katalýzy alkohol dehydrogenázy. Ve druhém kroku je využita aldehyddehydrogenáza, která katalyzuje vznik kyseliny 4-hydroxybutyrové [13, 95, 96].

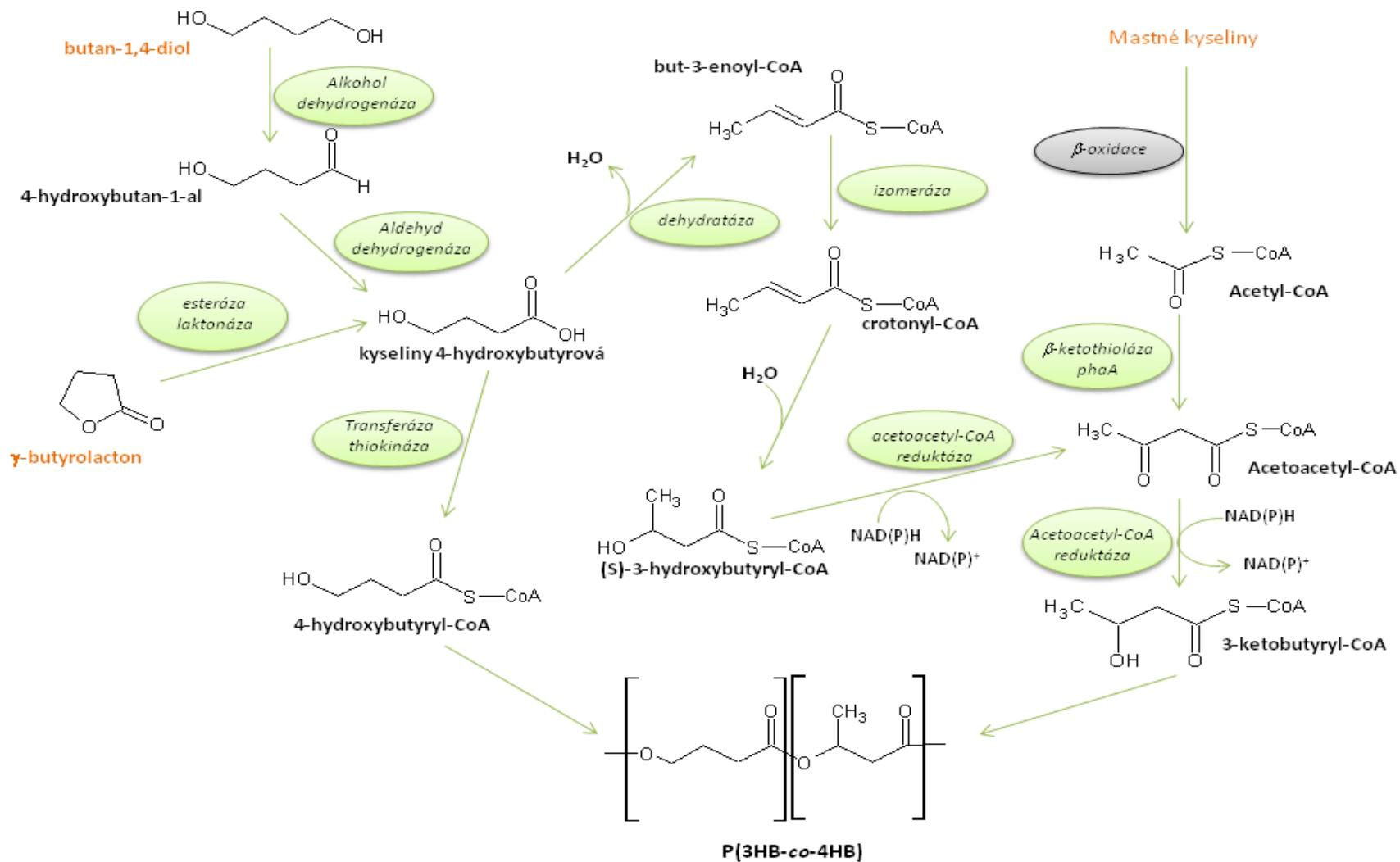
Zpracování γ -butyrolaktonu bakteriálním metabolismem s cílem inkorporace 4HB do polymeru začíná jeho hydrolytickým štěpením na kyselinu 4-hydroxybutyrovou. Tato reakce může být katalyzována esterázou nebo laktonázou. Esteráza schopná štěpit γ -butyrolacton byla izolována například z bakterie *Ralstonia eutropha*, kmen CH34 [13].

Z obou použitých prekurzorů vzniká jako intermediát kyselina 4-hydroxybutyrová, která je dále za katalýzy transferázou nebo thiokinázou převedena na 4-hydroxybutyryl-CoA, jenž je substrátem PHA syntázy a vzniká výsledný polymer.

Zdrojem uhlíku pro 3HB monomerní jednotku je z podstatné části olejnatý substrát přítomný v kultivačním médiu. Syntéza 3HB je realizovaná rozkladem mastných kyselin na acetyl-CoA, jenž je základním výchozím intermediátem pro syntézu 3HB monomeru, jak bylo uvedeno již v předchozí kapitole.

Inkorporace 3HB monomeru u bakterie *C. necator* může být realizována také z přítomného prekurzoru, jak bylo popsáno při kultivaci pouze na prekurzorech [91]. Po převedení dostupného prekurzoru na kyselinu (R)-4-hydroxybutyrovou může pokračovat metabolická dráha za přítomnosti dehydratázy přeměnou na 3-butenoyl-CoA. Následně je s využitím izomerázy převeden vzniklý 3-butenoyl-CoA na krotonyl-CoA, na kterém v dalším kroku probíhá adiční reakce za vzniku (S)-3-hydroxybutyryl-CoA. Tato sloučenina ještě nemůže díky své konfiguraci být využita jako substrát pro PHA syntázu, ale v přítomnosti NADPH-dependentní acetoacetyl-CoA reduktázy je převedena acetoacetyl-CoA. Zde se dráha napojuje na klasickou cestu syntézy 3HB monomeru z acetyl-CoA [13].

Při kultivaci s 1% butan-1,4-diolem byla v získaném polymeru detekována také 3HV monomerní jednotka, která pravděpodobně vzniká přirozenou syntézou v metabolismu *C. necator* při biosyntéze PHB [7]. Tato dráha vychází z acetyl-CoA, který vstupuje do citrátového cyklu a přemění se až na sukcinyl-CoA. Ten je za využití methylmalonyl-CoA mutázy převeden na methylmalonyl-CoA. Následná dekarboxylační reakce za současného uvolnění oxidu uhličitého vede k přeměně na propionyl-CoA, který dále reaguje s acetyl-CoA v přítomnosti β -ketothiolázy (bktB) za vzniku 3-ketovaleryl-CoA a enzym acetoacetyl-CoA reduktáza dokončí jeho přeměnu na 3-hydroxyvaleryl-CoA, jež je substrátem pro PHA syntázu. Ta propojí získané aktivované monomerní jednotky za využití polymerizační (kondenzační) reakce do výsledného polymeru [8, 26, 94, 97].



Obr. 12: Tok prekurzorů – pentan-1-olu a kyseliny valerové metabolismem bakterie *Cupriavidus necator*[94, 97]

5.6.4. Inkorporace kyseliny mléčné do struktury PHA

5.6.4.1. Využití kyseliny mléčné pro produkci P(3HB-co-LA) bakterií *C. necator*

Kyselina mléčná je tříuhlíkatá 2-hydroxykyselina, která může být také použita jako zdroj uhlíkaté kostry pro tvorbu polyhydroxyalkanoátu, neboť po vstupu do metabolismu může být aktivována vazbou na CoA pomocí thiolázy za vzniku thioesteru (R)-laktyl-CoA. Tato sloučenina je následně využita jako substrát pro PHA syntázu, která dokončí syntézu výsledného kopolymeru P(3HB-co-LA), pokud je bakterie kultivována ještě na dalších uhlíkatých substrátech, v našem případě na olejích.

Tab. 25: Koncentrace biomasy, koncentrace celkového obsahu PHA a koncentrace buněčných komponent netvořících PHA (X_{NPHA}) a procentuální zastoupení PHA v biomase při kultivaci bakterie v přítomnosti kyseliny mléčné.

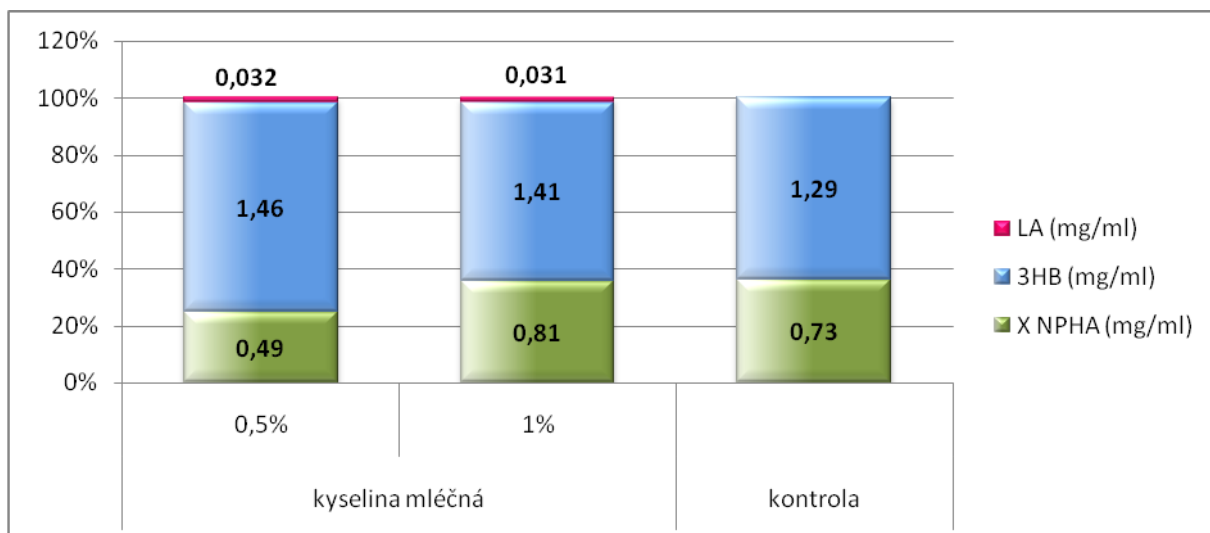
Koncentrace prekurzoru	X_t (mg/ml)	c_{PHA} (mg/ml)	PHA (%)	X_{NPHA} (mg/ml)
0,5% kyselina mléčná	1,99	1,49 ± 0,05	75,10 ± 2,37	0,49
1% kyselina mléčná	2,25	1,44 ± 0,25	64,21 ± 11,67	0,81
kontrola	2,02	1,29 ± 0,09	63,66 ± 3,20	0,73

Tab. 26: Koncentrace 3HB a LA a jejich procentuální zastoupení v biomase při kultivaci bakterie *Cupriavidus necator* s kyselinou mléčnou.

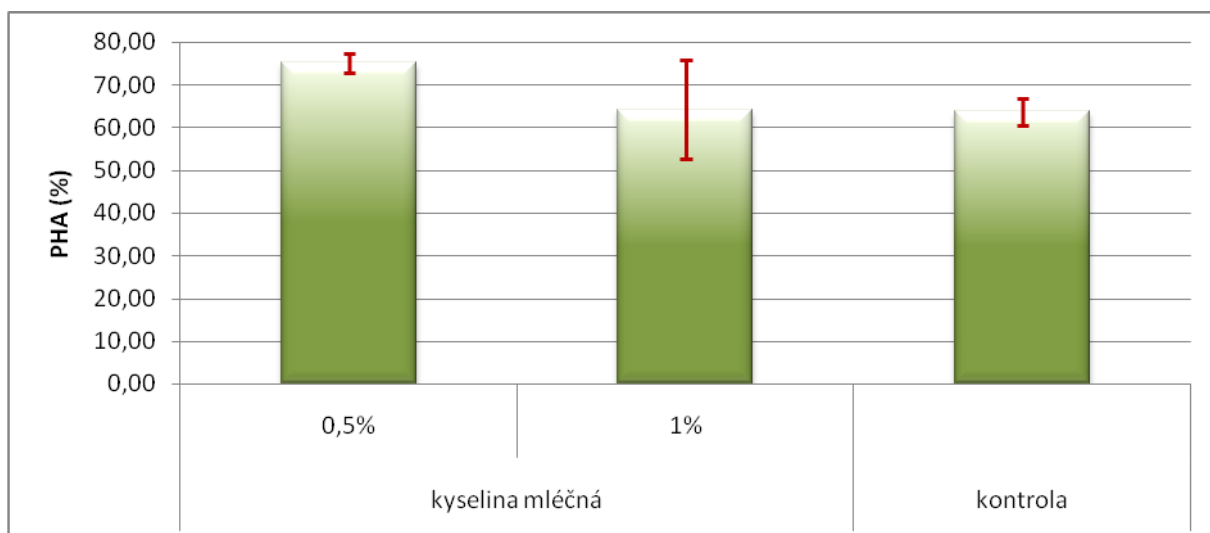
Koncentrace prekurzoru	c_{3HB} (mg/ml)	3HB (%)	c_{LA} (mg/ml)	LA (%)
0,5% kyselina mléčná	1,46 ± 0,04	97,82	0,032 ± 0,008	2,18
1% kyselina mléčná	1,41 ± 0,26	97,85	0,031 ± 0,009	2,15
kontrola	1,29 ± 0,09	100,00	-	0,00

Tab. 27: Výtěžky biomasy po kultivaci (g/l) a koncentrace PHA v biomase (g/l)

Prekurzor	Koncentrace biomasy (g/l)	Koncentrace PHA (g/l)
0,5% kyselina mléčná	7,43 ± 0,16	5,58 ± 0,12
1% kyselina mléčná	7,76 ± 1,39	4,98 ± 0,90
Kontrola	9,16 ± 0,57	5,83 ± 0,37



Graf 18: Procentuální vyjádření koncentrace monomerních jednotek 3HB, LA a koncentrace buněčných komponent netvořících PHA jako podíly celkové koncentrace biomasy (100% složka odpovídá koncentraci biomasy X_t)



Graf 19: Procentuální zastoupení PHA v biomase

Kultivace bakterie *Cupriavidus necator* v přítomnosti kyseliny mléčné vede k produkci kopolymeru složeného z 3-hydroxybutyrátové a laktátové monomerní jednotky. V experimentu (tabulka 25 a 26, graf 18 a 19), kde byla použita 0,5% kyselina mléčná, tvořila inkorporovaná monomerní jednotka odvozená od kyseliny mléčné 2,18% výsledného polymeru. Zbývajících 97,82 % bylo tvořeno 3-hydroxybutyrátovou monomerní jednotkou. Celkový obsah PHA dosáhl v této kultivaci $75,10 \pm 2,37$ %.

Při navýšené koncentraci kyseliny mléčné na 1% v kultivačním médiu došlo k poklesu tvorby PHA a procentuální obsah poklesl na hodnotu $64,21 \pm 11,67$ %, kdežto procentuální obsah LA monomerní jednotky poklesl jen minimálně - o 1,4 %, takže procentuální zastoupení 3HB a LA zůstalo téměř stejné jako v kultivaci s 0,5% kyselinou mléčnou.

Koncentrace biomasy (tabulka 27) po kultivaci s laktátem dosahovala nižších hodnot než kontrola. Ačkoliv vyšší hodnota koncentrace biomasy byla naměřena v kultivaci s 1% laktátem ($7,76 \pm 1,39$ g/l), celková koncentrace PHA byla vyšší u 0,5% laktátu a dosahovala $5,58 \pm 0,12$ g/l.

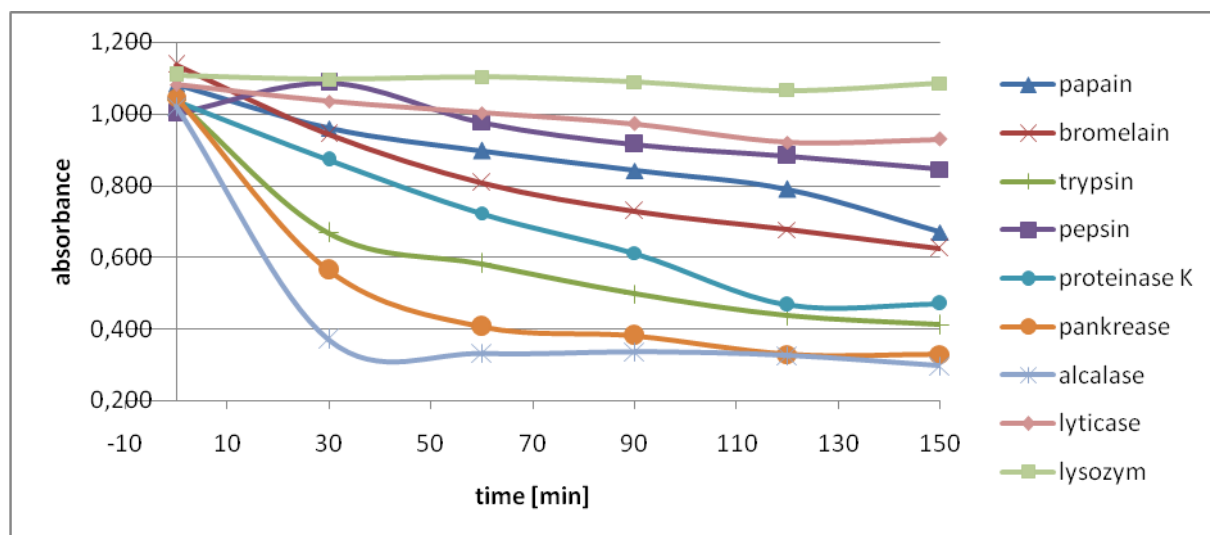
5.7. Použití komerčně dostupných enzymů k izolaci PHA

5.7.1. Screening lytického potenciálu vybraných enzymů

V této laboratorní práci byla studována závislost koncentrace biomasy v čase po aplikaci enzymů, jež jsou uvedeny v tabulce 28. Pověštinou byly použity 5% enzymy v množství (g enzymu/g CDW) při jejich optimálním pH a teplotě. Naměřené hodnoty AR vyjadřují procentuální úbytek absorbance dané kultury, ke kterému došlo díky enzymatické lyzi buněk. Stanovené hodnoty AR byly porovnány a následně byly vybrány dva nejúčinnější a nejefektivnější enzymy.

Tab. 28: Souhrn použitých enzymů, podmínky, za kterých byly dané enzymy použity a výpočtem získaná hodnota AR sloužící k porovnávání účinnosti enzymů.

Název enzymu	Rozpouštěcí pufr	Teplota (°C)	Množství enzymu (g/g CDW)	AR (%)
Papain	Sodno-fosfátový (50mM, [pH 8])	37	2,5%	38,26
Bromelain	Citrátový-P [pH 4,8]	50	5%	44,95
Trypsin	Sodno-fosfátový (50mM, [pH 8])	37	5%	60,47
Pepsin	Citrátový (1M HCl)	37	5%	15,43
Proteináza K	Sodno-fosfátový (50mM, [pH 8])	37	5%	54,71
Pankreatin	Sodno-fosfátový (50mM, [pH 8])	50	5%	68,55
Alkalasa	Sodno-fosfátový (50mM, [pH 8])	50	100 μ l	70,91
Lytikasa	Sodno-fosfátový (50mM, [pH 8])	37	5%	14,14
Lysozym	Sodno-fosfátový (50mM, [pH 8])	37	5%	2,08



Graf 20: Sledování úbytku biomasy při působení různých enzymů v průběhu 150 minut

Teplně inaktivovaná bakteriální kultura *Cupriavidus necator* H16 může být efektivně lyzována různými komerčními enzymy, především proteázami, které štěpí peptidové vazby a rozrušují tak buněčnou membránu. Pro tento experiment bylo vybráno pouze devět enzymů v jejich optimálním prostředí, jak je uvedeno v tabulce výše (Tab. 28) a získané hodnoty měření jsou shrnuty v grafu (Graf 20).

Nejvyšší hodnota AR byla naměřena pro alkalasu, u níž bylo dosaženo hodnoty 70,91. Tato hodnota dokládá, že účinnost enzymu je zde nejvyšší a také zde bylo pozorováno, že hodnota absorbance klesla na minimum již po třiceti minutách a pak zůstávala konstantní, což by v průmyslové výrobě mohlo významně zkrátit dobu izolace.

Druhým neúčinnějším enzymem byl podle hodnoty AR (68,55) vybrán pankreatin. Za ideálních podmínek pro jeho aktivitu výrazně poklesla absorbance kultury s jeho přidavkem. Nejvyšší úbytek biomasy byl ale naměřen až ve 120. minutě kultivace, pak už se absorbance nijak významně neměnila.

Na druhou stranu některé enzymy téměř vůbec nerozrušovaly buněčnou stěnu, absorbance téměř neklesala a hodnota AR dosahovala velmi nízkých hodnot. Příkladem je lysozym nebo o něco účinnější lytikasa, které dosahovaly hodnot AR 2,08 nebo 14,14.

Nízká účinnost některých enzymů byla zřejmě způsobena nízkou specifitou enzymů na buněčnou stěnu bakterie *Cupriavidus necator* H16. Tato bakterie patří mezi gramnegativní buňky, ale například právě lysozym je účinný na lyzi grampozitivních buněk, protože je schopen hydrolyzovat 1,4- β -vazby mezi kyselinou N-acetylmuramovou a N-acetyl-D-glukosamidovými zbytky v peptidoglykanech a mezi N-acetyl-D-glucosaminovými zbytky v chitodextrinech [98]. Podobně neschopnost štěpit tuto bakteriální stěnu má lytikáza, která štěpí β -1,3 vazbu v glukanech. Je tvořena glukonázovou aktivitou a alkalickou proteázou a dokáže specificky štěpit buněčnou stěnu kvasinek [99].

Pro lyzi gramnegativních buněk pomocí lysozymu by bylo nutné přidat chelatační činidlo (například EDTA), které naruší ochrannou vrstvu buněk a odhalí peptidoglykanovou vrstvu [100], nebo za současného použití enzymu proteinázy K, což je enzym, jenž lyzuje vnější membránu buňky. Poslední možností je přidavek povrchově aktivní látky (například SDS), která rozpouští vnější membránu buňky [68].

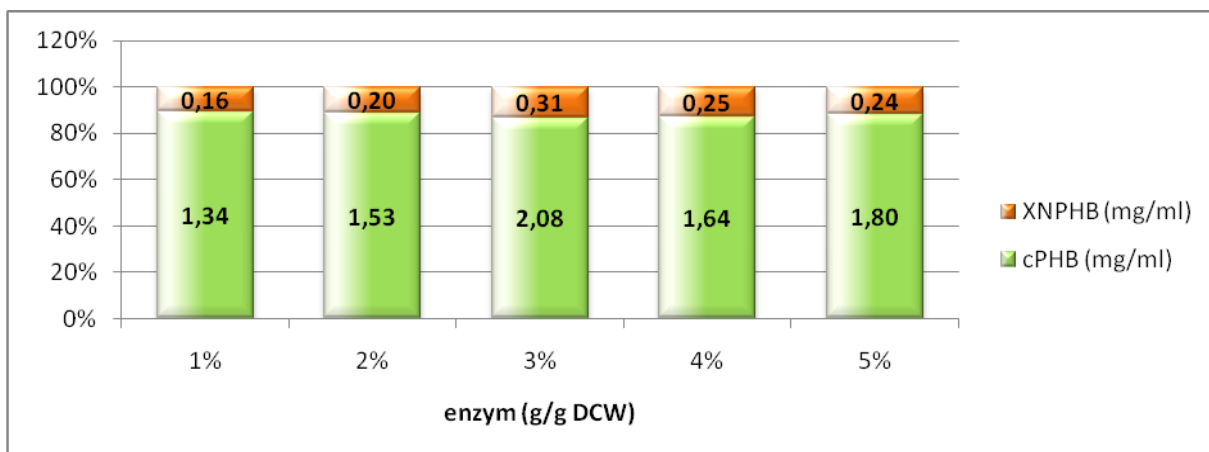
V následujících experimentech studujících izolaci PHB z biomasy byl zvolen čas 120 minut, protože tento čas je dostatečný pro hydrolyzu buněčné stěny a při tomto čase bylo dosaženo nejvyšší účinnosti u alkalázy i u pankreatinu. Zajímavostí je, že hodnota AR byly pro alkalasu a pankreatin v tomto čase úplně stejná.

5.7.2. Optimalizace koncentrace enzymů

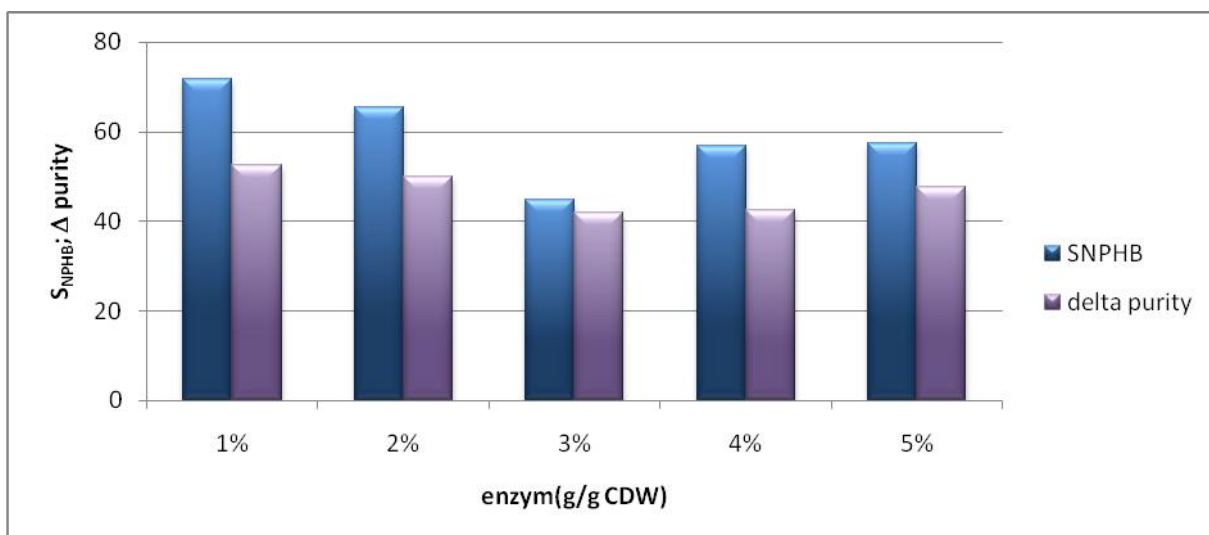
U vzorků, které byly odebrány ve druhé hodině, byla stanovována koncentrace získaného PHB pomocí GC s FID detektorem a ze získaných hodnot byly vypočítány další veličiny, které dostatečně vyjadřují účinnost a efektivitu enzymů a jsou podrobně popsány v předešlé kapitole 4.4.1.3.

Tab. 29: Výsledky analýzy pankreatinu

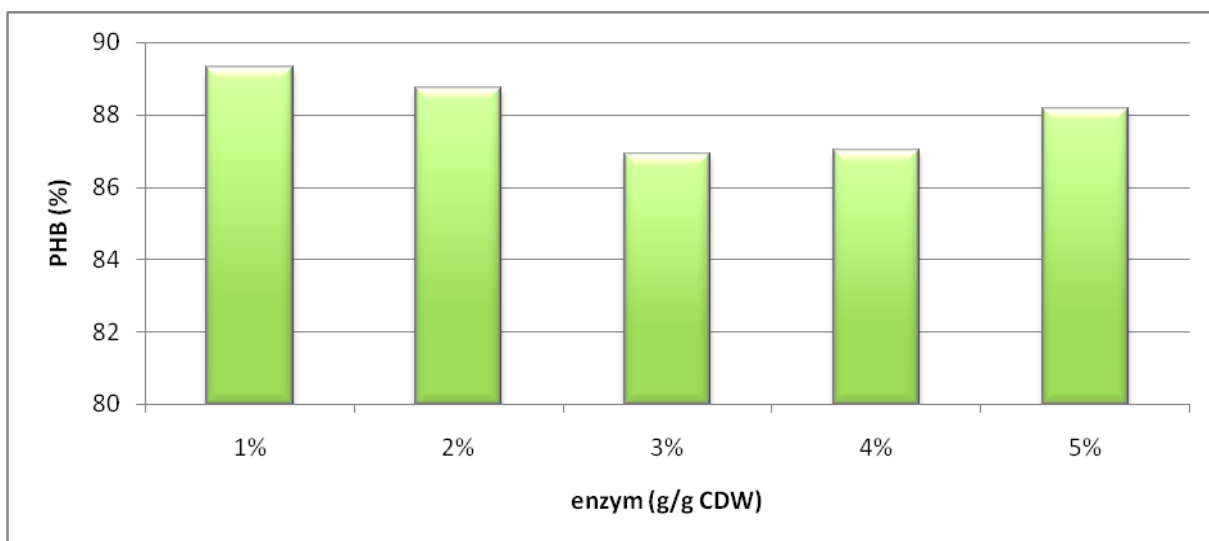
g/g CDW	X_t (mg/ml)	c_{PHB} (mg/ml)	PHB(%)	X_{NPHB} (mg/ml)	S_{NPHB}	Δ purity
1%	1,50	1,34 \pm 0,01	89,28	0,16	71,65	52,64
2%	1,73	1,53 \pm 0,02	88,70	0,20	65,54	50,08
3%	2,39	2,08 \pm 0,01	86,87	0,31	44,71	42,02
4%	1,89	1,64 \pm 0,02	86,99	0,25	56,68	42,56
5%	2,04	1,80 \pm 0,02	88,15	0,24	57,41	47,68
Kontrola	2,50	1,93 \pm 0,19	77,36 (PHB(%)) ₀	0,57 (X_{NPHB}) ₀	-	-



Graf 21: PHB a biomasa netvořící PHB v celkovém množství biomasy. Dělení jednotlivých sloupců vyjadřuje míru příspěvku koncentrace PHB a koncentrace biomasy netvořící PHB k celkové koncentraci biomasy získané po lytickém působení enzymů, která je vyjádřena 100 %.



Graf 22: Závislost rozpustnosti komponent buňky netvořících PHB a závislost změny čistoty na objemu přidávaného pankreatinu vztaheného na CDW.



Graf 23: Závislost procentuální koncentrace PHB na množství přidávaného pankreatinu.

Aplikace pankreatinu významně navyšovala podíl PHA v biomase. Je to pravděpodobně dáno tím, že pankreatin je schopen efektivně lyzovat buňky a „rozpuštět“ celou řadu buněčných komponent, což je zapříčiněno složením samotného pankreatinu – jedná se o směs amylázy, lipázy a proteázy.

Z uvedených grafů 21, 22, 23 a tabulky 29 je patrné, že nejvyšší procentuální zastoupení PHB v biomase dosahující až na hodnotu 89,28% vyizolované biomasy je při použití 1% pankreatinu. Tuto skutečnost potvrzuje také nejvyšší hodnota stanovená u rozpustnosti biomasy neobsahující PHB - 71,65. S touto veličinou úzce souvisí celková koncentrace biomasy neobsahující PHB, která byla z daných pěti případů nejnižší, tedy vzorek biomasy o koncentraci 1,5 mg/ml obsahoval po lyzi buněk pouze 0,16 mg/ml nerozpuštěných buněčných komponent neobsahujících PHB.

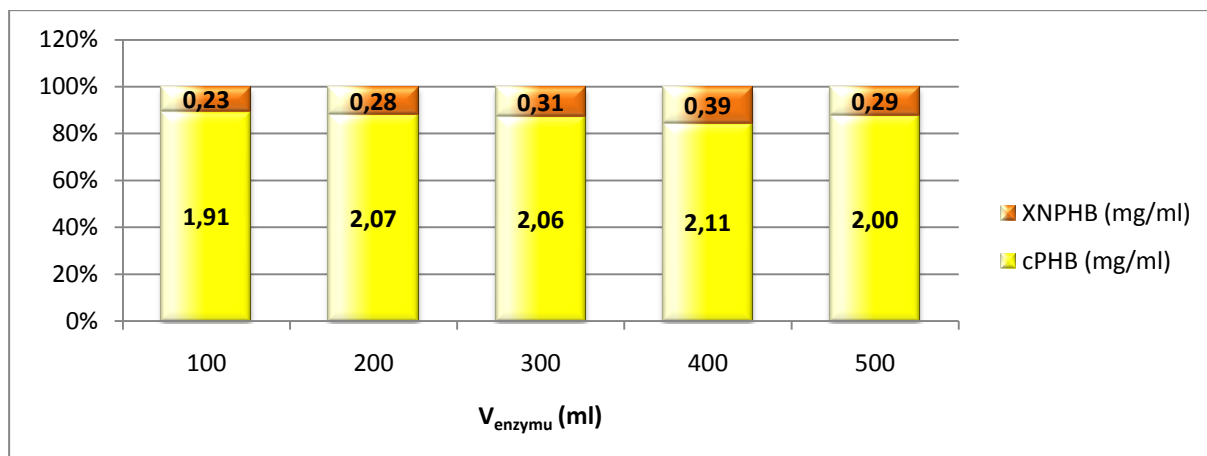
Při použití 1% pankreatinu byl pozorován nejvyšší vzrůst čistoty a dosahoval hodnotu 52,64. Při použití 1% pankreatinu je tedy účinnost enzymu nejefektivnější a získaný PHB vykazuje nejvyšší čistotu, je nejméně znečištěn biomasou netvořící PHB.

3% a 4% koncentrace pankreatinu vztažená na hmotnost biomasy měla celkově nižší účinnost vzhledem k ostatním koncentracím. Vzorky obsahovaly jen 87% PHB v biomase a koncentrace buněčných komponent se v konečném vzorku zvýšila na množství 0,31 a 0,25 mg/ml, jak je patrné z výše uvedené tabulky. Čistota vzorků s 3% a 4% enzymem v porovnání s nejlépe hodnoceným klesla o téměř deset bodů.

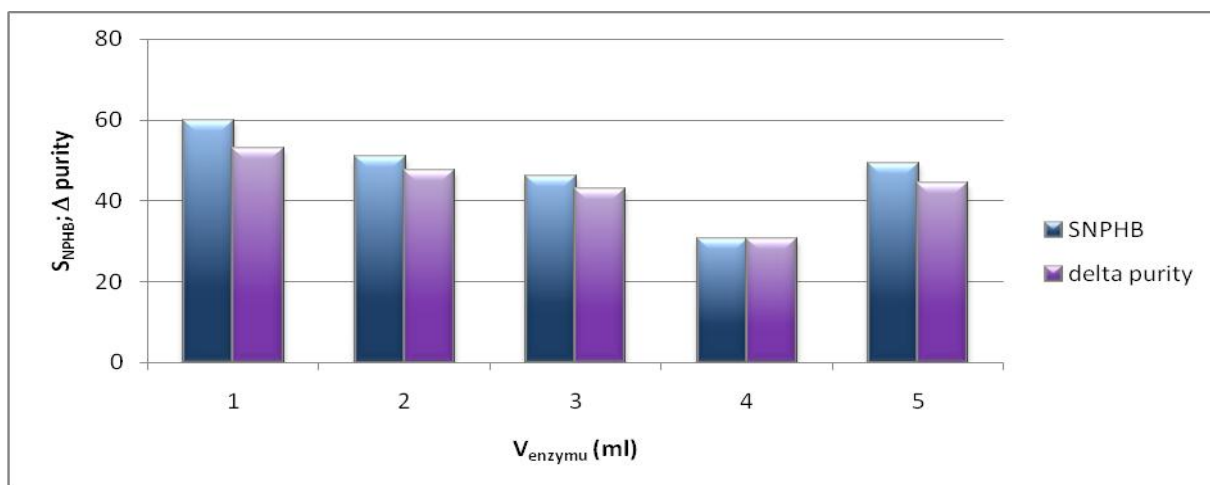
Dobré výsledky jsou pozorovány také u kultury, která byla podrobena buněčné lyzi za použití 2% enzymu. Procentuální obsah PHB ve vzorku se blíží 89%. Je zde tedy nízký obsah buněčných komponent netvořících PHB (0,20 mg/ml v 1,75 mg/ml), které po izolaci znečišťují vzorek, ale čistota vzorku i tak dosahuje na hodnotu 50,08.

Tab. 30: Výsledky analýzy alkalasy

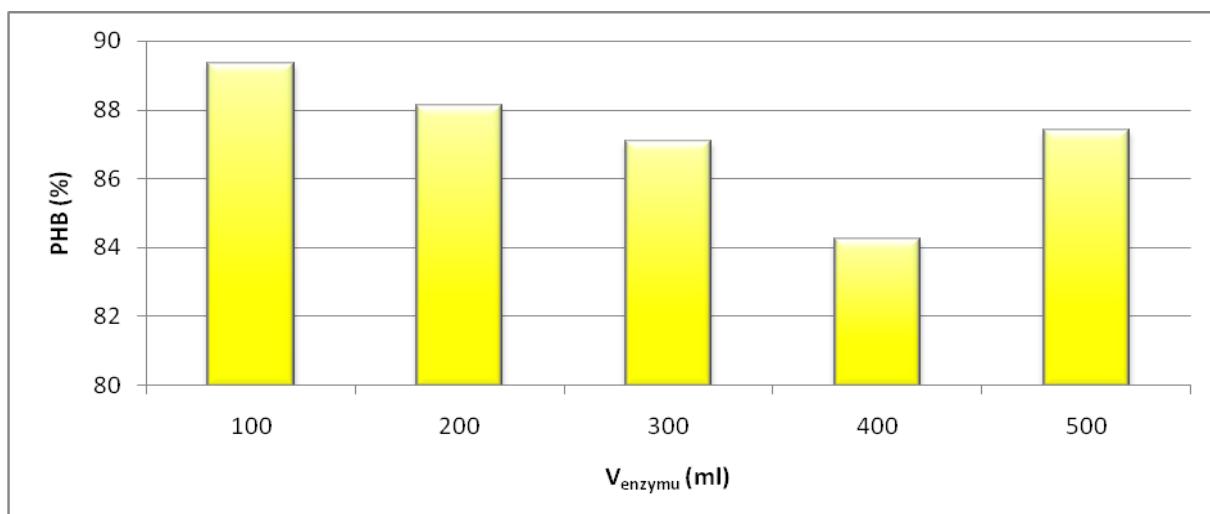
$V_{\text{enzym}} (\mu\text{l})$	X_t (mg/ml)	$c_{\text{PHB}} (\text{mg/ml})$	PHB(%)	X_{NPBH} (mg/ml)	S_{NPBH}	Δpurity
100	2,14	1,91 ± 0,01	89,30	0,23	59,66	52,76
200	2,35	2,07 ± 0,02	88,08	0,28	50,65	47,37
300	2,37	2,06 ± 0,03	87,06	0,31	45,93	42,83
400	2,50	2,11 ± 0,04	84,23	0,39	30,51	30,34
500	2,29	2,00 ± 0,03	87,39	0,29	49,10	44,29
Kontrola 1	2,23	1,93 ± 0,19	77,36 (PHB(%)) ₀	0,57 ($X_{\text{NPBH}t}$)	-	-



Graf 24: Zastoupení PHB a biomasy netvořící PHB v celkovém množství biomasy. Dělení jednotlivých sloupců vyjadřuje míru příspěvku koncentrace PHB a koncentrace biomasy netvořící PHB k celkové koncentraci biomasy získané po lytickém působení enzymů, která je vyjádřena 100 %.



Graf 25: Závislost rozpustnosti komponent buňky netvořících PHB a závislost změny čistoty na objemu přidávané alkalázy.



Graf 26: Závislost procentuální koncentrace PHB na objemu alkalázy.

Porovnáním získaných hodnot s alkalasou (grafy 24, 25 a 26 a tabulka 30) bylo zjištěno, že nejvyšší účinnost byla naměřena v baňce, do které bylo přidáno 100 μ l alkalasy. Tento vzorek obsahoval až 89,3% PHA v biomase. Po lyzi buněčné stěny a hydrolýze dalších buněčných komponent alkalázou byl rozdíl v procentuálním obsahu PHA mezi zmíněným vzorkem a kontrolou 11,9 % a změna čistoty dosáhla až na hodnotu 52,76 vzhledem ke kontrole. Jako kontrola byla v tomto případě použita kultura, do které nebyl přidán žádných z enzymů, a tak procentuální obsah PHB v biomase byl nízký a odpovídal 77,23 % biomasy.

Ostatní kultivace s vyšším přídatkem alkalasa měly výrazně slabší procentuální podíl PHA v získané biomase. Nejnižší hodnota byla naměřena při přidavku 400 μ l alkalasy, kde byla změna čistoty stanovena na hodnotu 30,34 a procentuální zastoupení PHB v biomase dosahovalo jen 84,23%.

Při srovnání výsledků alkalasy a pankreatinu bylo zjištěno, že oba enzymy mají nejvyšší účinnost při použití nižší dávky enzymu (g/g DCW). Procentuální obsah PHB v biomase se liší pouze o 0,02 % a změna čistoty je u alkalasy o 0,08 vyšší, což mimo jiné souvisí s koncentrací složek neobsahujících PHB, protože za použití alkalasy je rozpustnost složek neobsahujících PHB mírně vyšší ve srovnání s pankreatinem. V rámci chyby měření ale můžeme říct, že výsledky si odpovídají, takže účinnost enzymů je v daných koncentracích velmi podobná.

Pro následující laboratorní práci byl tedy, jak v případě pankreatinu, tak v případě alkalasy, používán 1% enzym (g/g CDW) a to i z důvodů ekonomických. Cena komerčních enzymů je relativně vysoká, proto je snaha docílit co nejvyšší produkce PHB a účinnosti jeho izolace při aplikaci co možná nejmenšího množství enzymu tak, aby se nezvyšovaly provozní náklady a s nimi i konečná cena materiálů.

5.7.3. Optimalizace koncentrace SDS

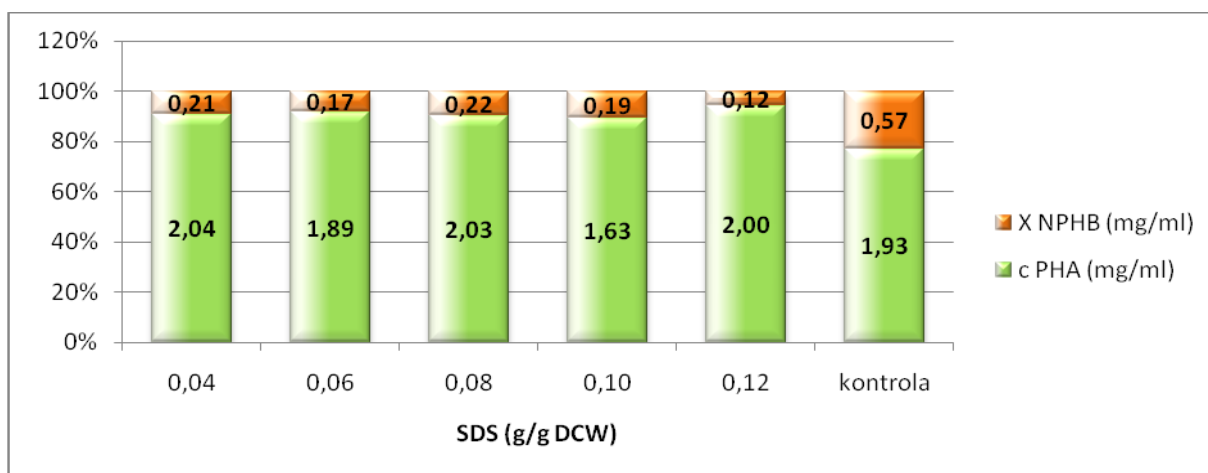
Povrchově aktivní látky, jako je například dodecylsulfát sodný (SDS), mají schopnost rozrušit buněčnou stěnu bakterie, protože jsou schopné inkorporace do buněčné membrány. S rostoucí koncentrací inkorporovaných molekul SDS do fosfolipidové dvojvrstvy roste i objem buňky, a pokud je překročen práh nasycení, buněčná membrána praská a buněčný obsah je ve formě micel tvořených povrchově aktivními látkami a fosfolipidy z membrány uvolněn do okolního roztoku. PHB, který byl uzavřen v buňce, je nyní rozptýlen do roztoku obklopený buněčnými micelami a zbytky buněčné hmoty, což je označováno jako biomasa netvořící PHB [67].

Druhou funkcí povrchově aktivní látky je zvyšování rozpustnosti některých buněčných složek. Povrchově aktivní látky nejen že rozpouští proteiny, ale jsou také schopné rozpouštět i ostatní buněčné komponenty, které netvoří PHB [47, 67].

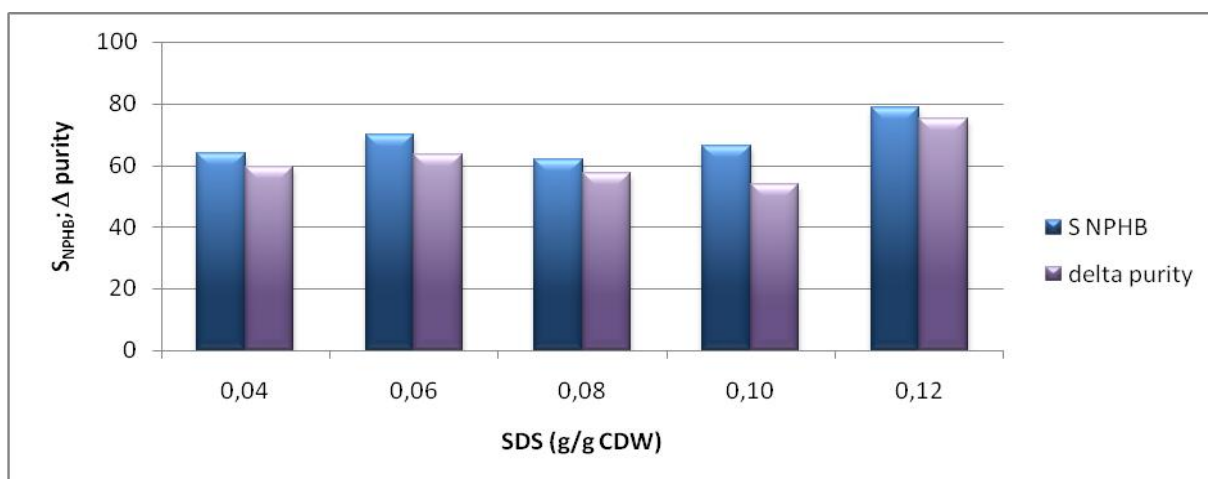
Tyto dvě funkce tedy umožňují nárůst zisku PHA z biomasy s vysokou čistotou po lytickém působení enzymů, proto byla studována závislost čistoty získaného PHA a jeho získané množství na koncentraci SDS přítomného během enzymové hydrolýzy biomasy.

Tab. 31: Výsledky analýzy vzorků po působení pankreatinu na biomasu s přidávkem různých koncentrací SDS.

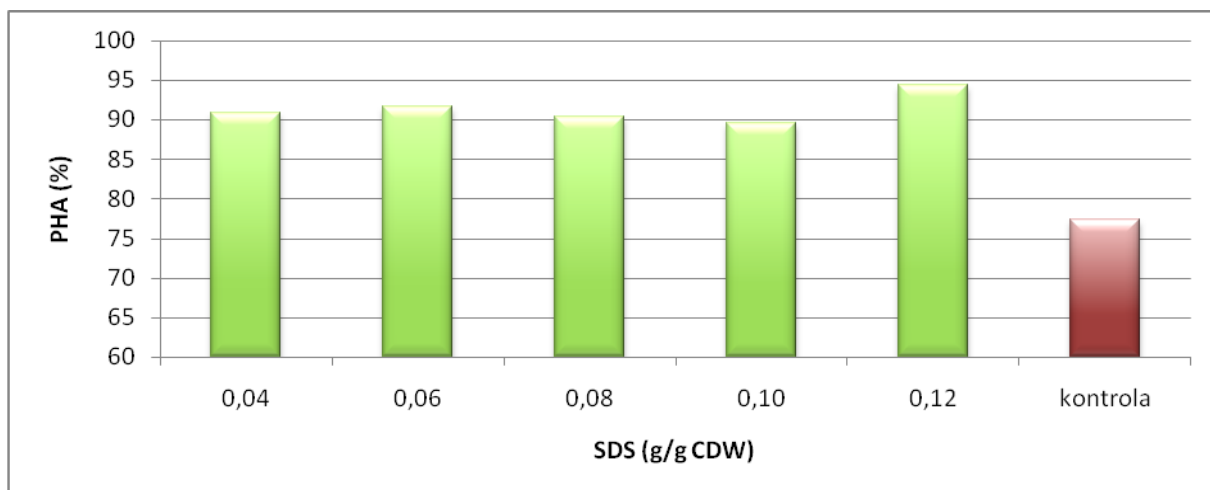
SDS (g/g DCW)	X_t (mg/ml)	c_{PHB} (mg/ml)	PHB [%]	X_{npbh} (mg/ml)	S_{NPBH}	Δ Purity
0,04	2,25	2,04	90,86 ± 0,04	0,21	63,90	59,61
0,06	2,06	1,89	91,70 ± 0,12	0,17	70,00	63,33
0,08	2,25	2,03	90,33 ± 0,07	0,22	61,83	57,29
0,10	1,82	1,63	89,51 ± 0,13	0,19	66,50	53,66
0,12	2,12	2,00	94,33 ± 0,30	0,12	78,93	74,98
kontrola	2,50	1,93	77,36 ± 0,63	0,57	-	-



Graf 27: PHA a biomasy netvořící PHA v celkovém množství biomasy. Dělení jednotlivých sloupců vyjadřuje míru příspěvku koncentrace PHA a koncentrace biomasy netvořící PHA k celkové koncentraci biomasy získané po lytickém působení enzymů, která je vyjádřena 100 %.



Graf 28: Závislost rozpustnosti komponent buňky netvořících PHA a závislost změny čistoty na množství SDS za použití pankreatinu.



Graf 29: Závislost procentuální koncentrace PHA na množství přidávaného SDS. Pro lyzi buněčné kultury byl aplikován pankreatin.

Povrchově aktivní látka dodecylsulfát sodný (SDS) má významný vliv, pokud je přidána během enzymatického procesu získu PHA z biomasy (graf 27, 28, 29).

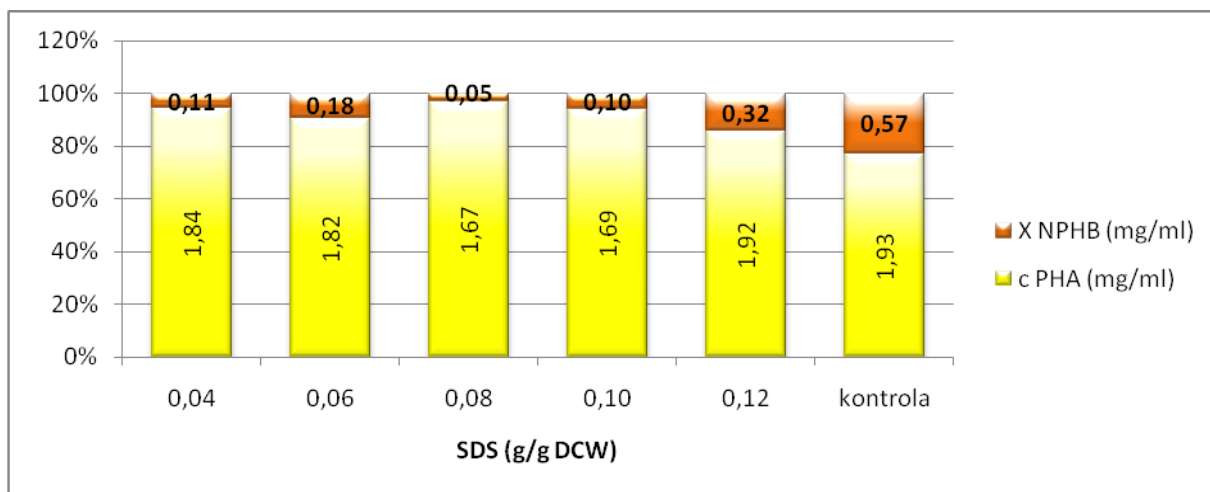
U vzorku s kontrolou, která neobsahovala SDS, byla zjištěna koncentrace biomasy 2,50 mg/ml (tabulka 31), z čehož jen 1,93 mg/ml představovala koncentrace PHA v biomase. Zbylá koncentrace 0,57 mg/ml byla hodnota biomasy netvořící PHA, kontrola obsahovala $77,36 \pm 0,63$ % PHA v biomase. Mezi kontrolou a vzorkem s přidavkem 0,1 g SDS/g CDW, který ze studovaných pěti vzorků obsahoval nejmenší procento PHA ($89,51 \pm 0,13$ %), je rozdíl v procentuálním obsahu PHA až 12,5 %. U vzorku s 0,1 g SDS/g CDW byla zároveň stanovena i nejnižší Δ purity s hodnotou 53,66.

Nejvhodnější koncentrace SDS za použití pankreatinu byla stanovena na hodnotu 0,12 g SDS/g CDW. Při této koncentraci SDS bylo procentuální zastoupení PHA v biomase až 94,33 %. Z koncentrace biomasy 2,12 mg/ml byla koncentrace PHA 2,0 mg/ml a koncentrace biomasy netvořící PHA byla stanovena na hodnotu 0,12 mg/ml. Rozpustnost buněčných komponent netvořících PHA vzrostla na hodnotu 78,93 a změna čistoty tohoto vzorku by nejvyšší dosažená - 74,98.

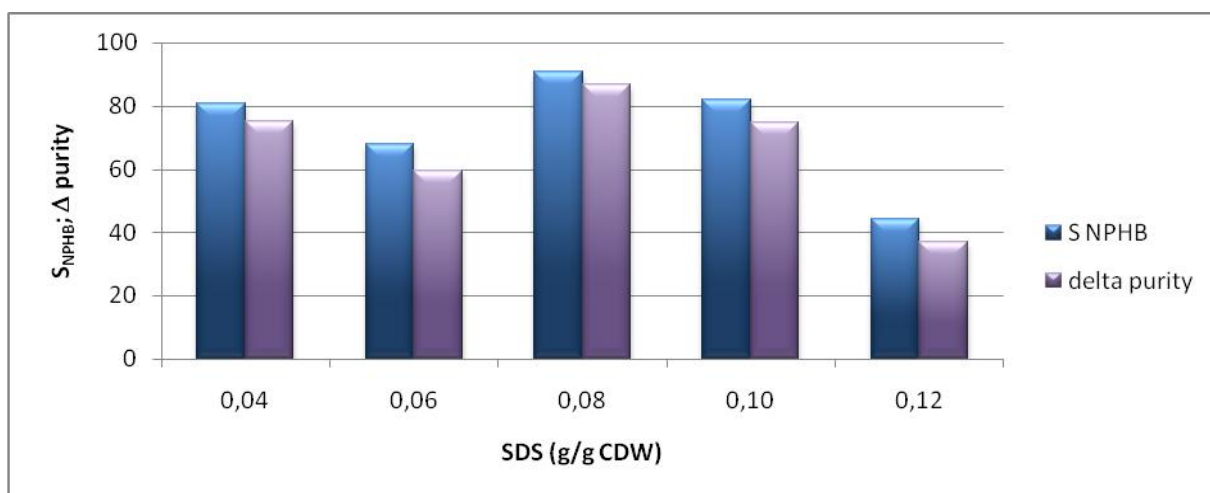
Vyhodnocením grafu jednotlivého procentuálního zastoupení PHA v biomase (Graf 29) je patrné, že SDS má významný vliv na zvýšení izolace a čistoty PHA z biomasy. Kromě vzorku o koncentraci 0,12 g SDS/g CDW se procentuální koncentrace PHA liší v rozsahu 2,19 % a osciluje kolem 90,6 % PHA v biomase.

Tab. 32: Výsledky analýzy vzorků po působení alkalázy na biomasu s přidavkem různých koncentrací SDS

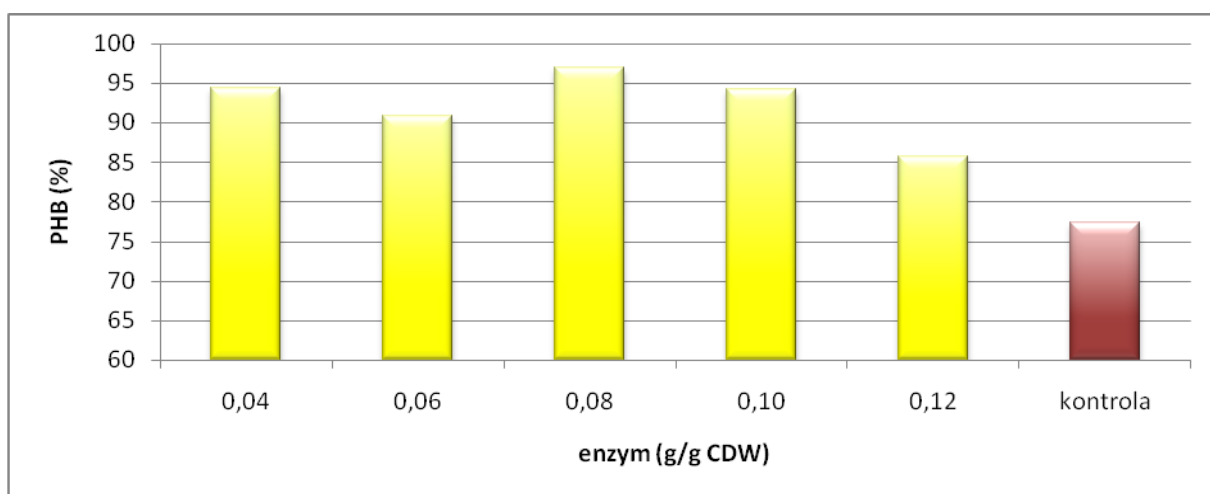
SDS (g/g DCW)	X_t (mg/ml)	c_{PHB} (mg/ml)	PHB [%]	X_{nphb}	S_{NPBH}	Δ Purity
0,04	1,95	1,84	$94,35 \pm 0,32$	0,11	80,69	75,06
0,06	2,00	1,82	$90,81 \pm 0,01$	0,18	67,76	59,41
0,08	1,72	1,67	$96,97 \pm 0,01$	0,05	90,87	86,63
0,10	1,79	1,69	$94,26 \pm 0,18$	0,10	81,97	74,64
0,12	2,24	1,92	$85,76 \pm 0,13$	0,32	44,03	37,09
kontrola	2,50	1,93	$77,36 \pm 0,63$	0,57	-	-



Graf 30: PHB a biomasa netvořící PHB v celkovém množství biomasy. Dělení jednotlivých sloupců vyjadřuje míru příspěvku koncentrace PHB a koncentrace biomasy netvořící PHB k celkové koncentraci biomasy získané po lytickém působení enzymů, která je vyjádřena jako 100 %.



Graf 31: Závislost rozpustnosti komponent buňky netvořících PHB a závislost změny čistoty na koncentraci SDS za použití alkalasy.



Graf 32: Závislost procentuální koncentrace PHB na množství přidávaného SDS. Pro lyzi buněčné kultury byla aplikována alkalasa.

Při studiu vlivu různých koncentrací SDS na zisk PHA z biomasy za použití alkalasy (tabulka 32, graf 30, 31, 32) bylo zjištěno, že nejvyšší procentuální zastoupení PHA v biomase o hodnotě $96,97 \pm 0,01$ % je v přítomnosti $0,08$ g SDS/g CDW a změna čistoty činí $86,63$ vzhledem ke kontrole, u které byl naměřen procentuální obsah PHA $77,36 \pm 0,63$ %.

Pokud bylo přidáno k biomase větší množství SDS než $0,08$ g SDS/g CDW, procentuální obsah postupně s přibývajícím koncentrací klesá, takže při koncentraci $0,12$ g SDS/g CDW poklesl na hodnotu $85,76 \pm 0,13$ a koncentrace PHA v biomase se snížila o $11,22\%$. Tento pokles by mohl být připisován denaturačnímu vlivu SDS na aktivitu enzymů.

S ohledem na další experimenty byla koncentrace $0,08$ g SDS/g CDW vybrána jako nejvhodnější jak v případě alkalasy, tak pankreatinu, i když u pankreatinu se nejednalo o koncentraci s nejvyšším ziskem PHA. Tato koncentrace byla vybírána s ohledem na použití enzymů ve směsi v pozdějších pracích.

Je zajímavé, že ve vzorcích s $0,012$ g SDS/g CDW bylo za použití pankreatinu získáno až $94,33 \pm 0,30$ % PHA (nejvyšší hodnota s pankreatinem), u alkalasy byl procentuální obsah PHA při stejné koncentraci SDS jen $85,76 \pm 0,13$ % (nejnižší hodnota s alkalázou).

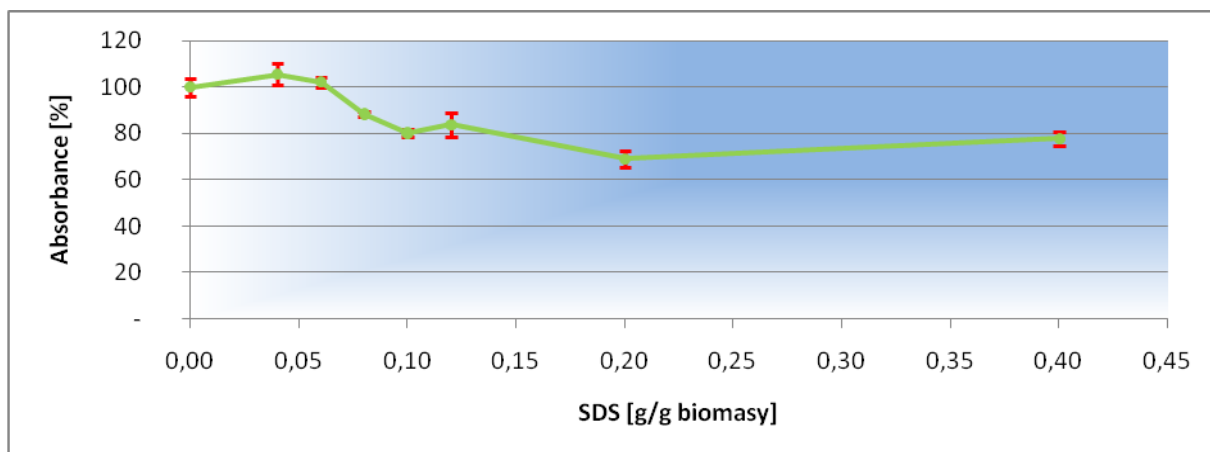
Tato skutečnost zřejmě vypovídá o různém vlivu různých koncentrací SDS na dané enzymy, které jsou využity k hydrolýze biomasy s obsahem PHA. Proto jako další krok byl zařazen experiment, který sleduje, jak je ovlivněna aktivita enzymů pankreatinu a alkalasy za použití různých koncentrací SDS.

5.7.4. Vliv různých koncentrací SDS na proteolytickou aktivitu alkalasy a pankreatinu

V tomto experimentu bylo studováno, jak se mění aktivita přítomného enzymu (alkalasa, pankreatin) v závislosti na koncentraci SDS. Získané výsledky byly přepočteny jako procentuální hodnota aktivity vzhledem ke kontrole, která SDS neobsahovala.

Tab. 33: Absorbance naměřené pro proteázovou aktivitu a procentuální aktivita pankreatinu vzhledem ke kontrole neobsahující SDS.

SDS [g/g CDW]	Abs _{prům} (442 nm)	Aktivita enzymu [%]
0,00	$0,827 \pm 0,032$	$100,00 \pm 3,86$
0,04	$0,872 \pm 0,041$	$105,44 \pm 4,70$
0,06	$0,845 \pm 0,018$	$102,14 \pm 2,14$
0,08	$0,730 \pm 0,007$	$88,27 \pm 0,96$
0,10	$0,663 \pm 0,012$	$80,11 \pm 1,74$
0,12	$0,693 \pm 0,036$	$83,74 \pm 5,27$
0,20	$0,571 \pm 0,020$	$68,98 \pm 3,42$
0,40	$0,642 \pm 0,020$	$77,67 \pm 3,05$



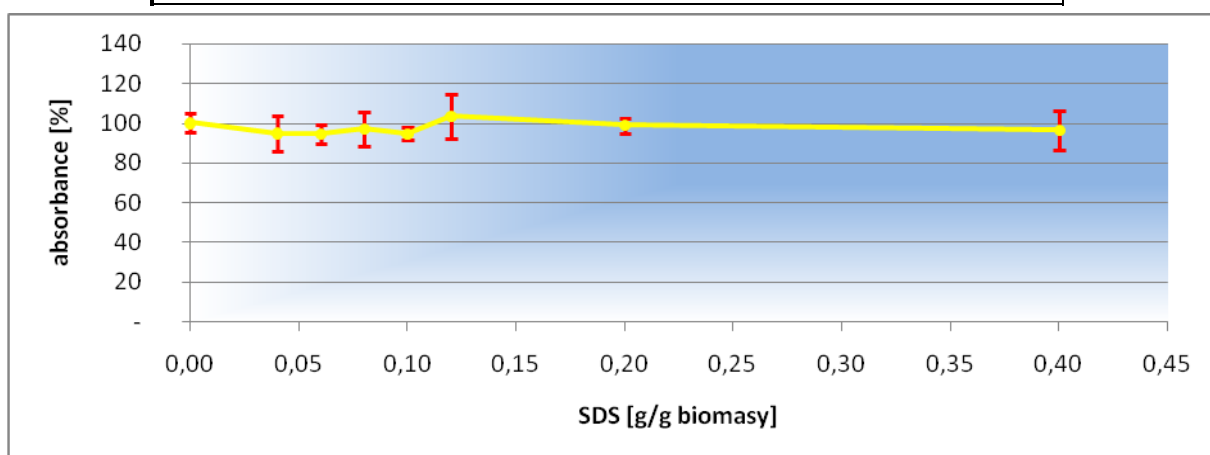
Graf 33: Pankreatin – souvislost mezi koncentrací SDS a aktivitou enzymu

Na výše uvedeném grafickém znázornění výsledků je patrná souvislost aktivity pankreatinu s koncentrací SDS (graf 33). Nejvyšší aktivita pankreatinu byla pozorována při koncentraci 0,04 g SDS/ g CDW (tabulka 33), kdy enzym vykazoval aktivitu $105,44 \pm 4,7$ %. Od této hodnoty aktivita pankreatinu s rostoucí koncentrací SDS pozvolna klesala, ale zároveň neklesla pod šedesátiprocentní hranici. Mezi koncentracemi 0,06 a 0,08 g SDS/ g CDW klesla aktivita pod 100 % hranici.

Nejnižší hodnota aktivity pankreatinu byla zaznamenána při koncentraci 0,20 g/g biomasy, kdy aktivita enzymu poklesla na $68,98 \pm 3,42$ %.

Tab. 34: Absorbance naměřené pro proteázovou aktivitu a procentuální aktivita alkalasy vzhledem ke kontrole neobsahující SDS.

SDS [g/g CDW]	Abs _{prům} (442 nm)	Aktivita enzymu [%]
0,00	$0,428 \pm 0,020$	$100,00 \pm 4,75$
0,04	$0,406 \pm 0,036$	$94,86 \pm 8,81$
0,06	$0,405 \pm 0,020$	$94,70 \pm 4,85$
0,08	$0,415 \pm 0,035$	$97,04 \pm 8,43$
0,10	$0,404 \pm 0,013$	$94,54 \pm 3,13$
0,12	$0,442 \pm 0,048$	$103,43 \pm 10,92$
0,20	$0,422 \pm 0,016$	$98,75 \pm 3,80$
0,40	$0,411 \pm 0,041$	$96,18 \pm 9,99$



Graf 34: Alkaláza – vliv SDS na aktivitu enzymu.

Dle uvedené grafické závislosti absorbance na obsahu SDS v buněčné kultuře (graf 34) a výše uvedené tabulky 34 je zřejmé, že zde není závislost mezi přítomným množstvím SDS ve vzorku a schopností enzymu lyzovat buněčnou membránu. V rámci směrodatných odchylek naměřených hodnot lze říci, že získané výsledky se statisticky významně neliší a aktivita enzymu se s přibývajícím množstvím SDS zásadně nemění. Naměřené aktivity vyjádřené v procentech se nacházejí kolem hodnoty 100% ve všech studovaných koncentracích.

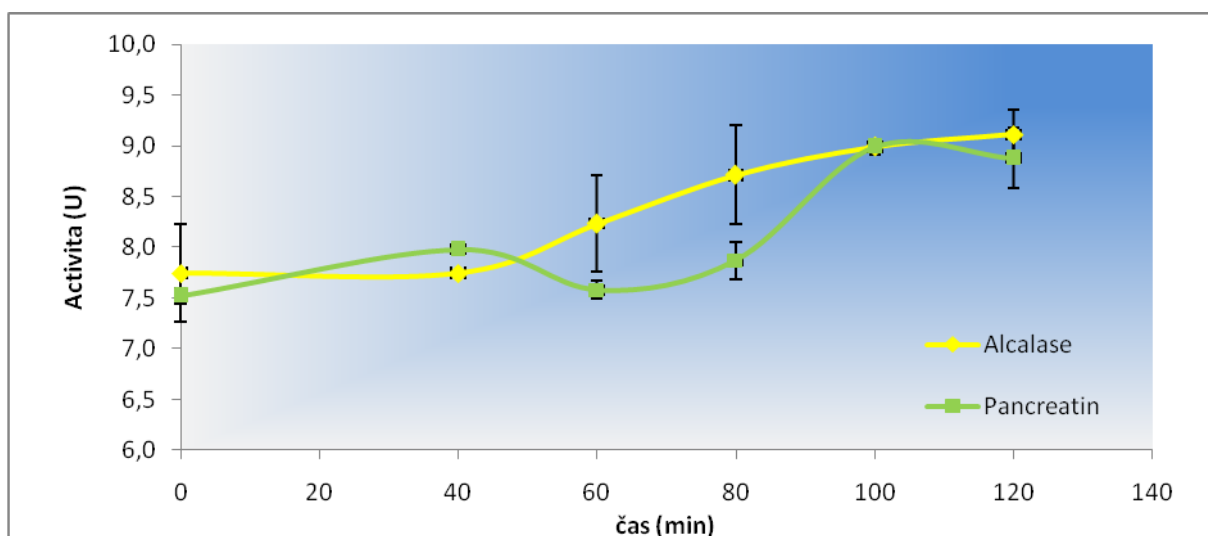
Pro další experimenty prováděné v této práci bylo k buněčné kultuře přidáváno 0,08 g SDS/g CDW, tedy stejná koncentrace jako u pankreatinu, kde je závislost aktivity enzymu na koncentraci SDS zřejmá a důležitá.

5.7.5. Studium průběhu hydrolytické aktivity alkalasy a pankreatinu během procesu

Pomocí jednoduché metody sledování proteázové aktivity enzymu bylo studováno, jestli nedochází k výraznému poklesu nebo naopak k výraznému nárůstu aktivity enzymů (Kap. 4.8.4). Průběh aktivit byl sledován do 120. minuty. Aktivita enzymu v daném čase byla vždy vyjádřena i jako procentuální nárůst vzhledem k počátku pokusu, tedy k čase nula.

Tab. 35: Hodnoty aktivit pankreatinu a alkalasy během procesu

čas (min)	Alkalasa		Pankreatin	
	A (U)	A (%)	A (U)	A (%)
0	7,74 ± 0,48	100	7,52 ± 0,08	100
40	7,74 ± 0,01	100	7,98 ± 0,04	106
60	8,23 ± 0,48	106	7,58 ± 0,09	101
80	8,71 ± 0,49	113	7,87 ± 0,18	105
100	8,99 ± 0,03	116	8,99 ± 0,08	120
120	9,11 ± 0,24	118	8,88 ± 0,30	118



Graf 35: Průběh aktivity enzymů v průběhu procesu jeho působení

Z vedených hodnot (tabulka 35, graf 35) je zřejmé, že během lytického rozkladu buněčné stěny pankreatinem a alkalosou nedochází k výraznému poklesu aktivit enzymů, spíše celkově

dochází k nárůstu jejich aktivit. Tento nárůst může být způsoben zkoncentrováním média, které bylo po dobu dvou hodin inkubováno při 50°C.

U pankreatinu byl do 40. minuty pozorován mírný nárůst aktivity o 6%, pak byl pozorován mírný pokles aktivity, ale hladina neklesla pod hodnotu naměřenou v čase nula. Po 60. minutě byl pokles aktivity vystřídán opětovným nárůstem, který trval až do sté minuty a dosáhl hodnotu $8,99 \pm 0,08$ U, což odpovídá 120% počáteční aktivity. Ve sté a sto dvacáté minutě se hodnoty aktivit neliší, pokud přihlédneme ke směrodatným odchylkám.

Aktivita alkalasy zaznamenávala již od počátku pokusu nárůst, který ve 120. minutě dosáhl hodnotu $9,11 \pm 0,24$ U, takže aktivita alkalasy vzrostla o 18% vůči počáteční hodnotě. Po 120. minutě už nebyly aktivity sledovány.

5.7.6. Stanovení aktivit jednotlivých enzymových složek pankreatinu a alkalázy

5.7.6.1. Stanovení proteázové aktivity pankreatinu a alkalasy

Tímto experimentem byla měřena proteázová aktivita pankreatinu a alkalázy, která by měla být hlavní složkou těchto preparátů a proto lze očekávat vysoké hodnoty.

Tab. 36: Stanovení proteázové aktivity pankreatinu a alkalasy

enzym	Ø hmotnost enzymu (mg)	Abs _ø	čas (min)	A (unit)	A _{sp} (U/mg)
pankreatin	5,60	0,55	60	9,17	1,64
alkalasa	-	0,50	60	8,30	-
trypsin	5,60	0,42	60	6,96	1,24

V tabulce Tab. 36 jsou shrnuty výsledky měření proteázové aktivity komerčních enzymů trypsinu, pankreatinu a alkalasy. Trypsin, proteolytický enzym, byl použit se záměrem porovnat jeho enzymovou aktivitu s alkalázou a pankreatinem.

U pankreatinu, což je směs enzymů, v níž je zastoupena pankreatická amyláza, trypsin a pankreatická lipáza, byla naměřena vysoká hodnota proteolytické aktivity - 9,17 U a specifická aktivita 1,64 U/mg. Ve srovnání s trypsinem má pankreatin téměř o 32% vyšší aktivitu.

Alkalasa je komerčně dostupná alkalická protéza, která obsahuje i další enzymatické aktivity. Ve srovnání s pankreatinem je zde enzymová aktivita nižší o 10,5 %, ale ve srovnání s trypsinem je vyšší o 19 %. Specifickou aktivitu v tomto případě nelze porovnat, jelikož alkalasa je za laboratorní teploty v kapalném stavu a nelze přesně zjistit množství proteinů v roztoku.

Zjištěné hodnoty proteolytických aktivit potvrzují schopnost daných enzymů štěpit proteinové buněčné komponenty na jednodušší peptidy. Podíl proteázové aktivity na celkovém efektu alkalázy i pankreatinu je zřejmě nejvyšší ze všech zastoupených aktivit.

5.7.6.2. Stanovení lipázové aktivity pankreatinu a alkalasy

Lipázy jsou enzymy řazené do skupiny triacylglycerol acylhydroláz (EC 3.1.1.3.) a jsou tedy schopné štěpit esterovou vazbu mezi glycerolovou částí a částí mastných kyselin v triacylglycerolech a tedy jejich primárním substrátem jsou triacylglyceroly. Těto schopnosti

se využívá i při stanovení lipázové aktivity enzymů. Ta spočívá v přípravě modelového roztoku s obsahem syntetického substrátu p-nitrofenylpalmitátu, kde mezi fenolovým zbytkem a zbytkem mastné kyseliny je esterová vazba, která je během stanovení štěpena. Uvolněný p-nitrofenol je kvantitativně stanoven spektrofotometrickou metodou [81].

Vzhledem ke skutečnosti, že pankreatin i alkalasa jsou směsi enzymů a podle literatury by oba tyto enzymy měly mít zastoupenou i lipázu, bylo předpokládáno, že i tato aktivita bude detekována. Ke srovnání byla současně měřena i lipázová aktivita komerční lipázy.

Tab. 37: Stanovení lipázové aktivity

enzym	Ø hmotnost enzymu (mg)	Abs _ø	c (mmol/l)	n (µmol)	A (unit)	A _{sp} (U/mg)
lipása	5,6	0,437	6,170	37,02	1,23	0,22
pankreatin	5,6	0,142	1,990	11,94	0,40	0,07
alkalasa	-	0,149	2,091	12,55	0,42	-

Výše uvedená tabulka 37 shrnuje závěry ze stanovení lipázové aktivity enzymů. Dle očekávání, nejvyšší lipázová aktivita byla naměřena u komerční lipázy. Alkalasa s pankreatinem mají lipázovou aktivitu téměř totožnou. Pankreatin má aktivitu 0,40 U a specifickou aktivitu 0,07 U/mg. Alkalasa dosáhla hodnotu 0,42 U a specifická aktivita nebyla stanovována. Ve srovnání s proteázovou aktivitou je lipázová aktivita u pankreatinu 23 krát nižší a u alkalasy 20 krát nižší. U alkalasy se nemusí nutně jednat o lipázovou aktivitu, ale je možné, že samotná proteáza je do jisté míry schopna štěpit substrát použitý při testu enzymové aktivity [81].

5.7.6.3. stanovení celulázové a amylázové aktivity pankreatinu a alkalasy

Stanovení celulázové a amylázové aktivity bylo provedeno stejným způsobem, rozdíl byl pouze v substrátu. U pankreatinu byla předpokládána vyšší amylázová aktivita, kdežto alkalasa by měla mít vyšší celulázovou aktivitu.

Tab. 38: Stanovení celulázové aktivity

enzym	m _{enzymu} (mg)	C ₀ cukrů (g/l)	C ₂ cukrů (g/l)	Δ c (g/l)	n (mol)	A (U)	A _{sp} (U/mg)
pankreatin	6,2	0,138	0,560	0,422	0,00422	3,52·10 ⁻¹⁰	5,68·10 ⁻⁸
alkalasa	-	2,995	2,817	-0,178	-0,00178	-1,48·10 ⁻¹⁰	-

Z uvedených výsledků nelze objektivně porovnat míru aktivity studovaných enzymů (tabulka 38). Během měření zřejmě došlo k chybě, protože nelze naměřit zápornou hodnotu aktivity enzymu, jak byla naměřena v případě alkalasy. Také by tato hodnota mohla znamenat, že alkalasa nedisponuje žádnou celulázovou aktivitou a není schopná štěpit β-1,4 glykosidické vazby mezi jednotkami glukózy obsažené v celulóze.

Amylolytická aktivita pankreatinu byla stanovena na hodnotu 3,52·10⁻¹⁰ U a specifická aktivita byla 5,68·10⁻⁸ U/mg. Ve srovnání s dříve uvedenou proteázovou a lipázovou aktivitou, které se pohybují ve stejných řádech, celulázová aktivita je mnohonásobně nižší, ale zároveň je měřitelná a pankreatinem prokazatelně vykazovaná.

Tab. 39: Stanovení amylázové aktivity

enzym	m_{enzymu} (mg)	C_0 cukrů (g/l)	C_2 cukrů (g/l)	Δc (g/l)	n (mol)	A (U)	A_{sp} (U/mg)
pankreatin	6,2	2,457	3,218	0,762	0,0076	$6,33 \cdot 10^{-10}$	$1,02 \cdot 10^{-7}$
alkalasa	-	0,877	2,120	1,243	0,0124	$1,03 \cdot 10^{-9}$	-

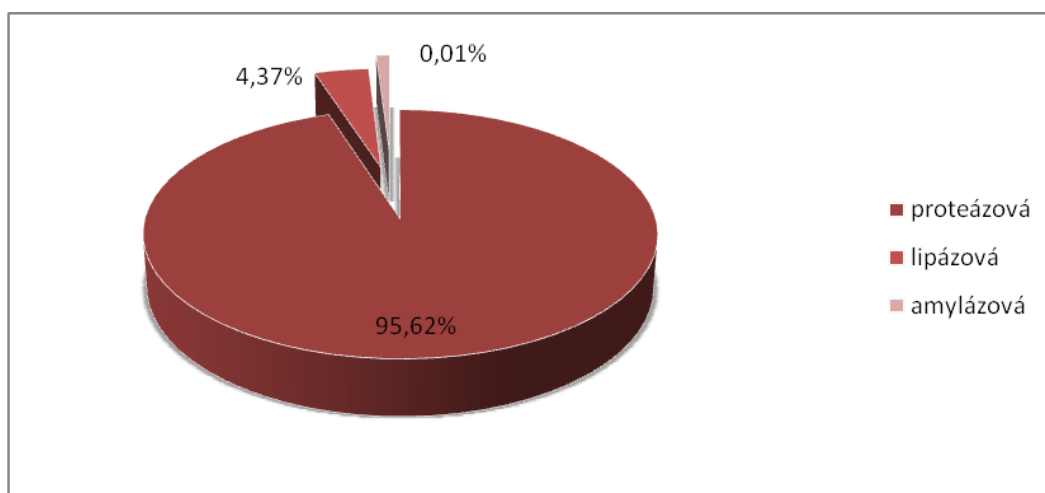
Provedením stanovení amylázové aktivity bylo zjištěno, že vyšší amylázovou aktivitu má alkalasa, která je téměř dvojnásobně vyšší než u pankreatinu. Aktivita alkalasy byla stanovena na hodnotu $1,03 \cdot 10^{-9}$ U, kdežto amylázová aktivita pankreatinu dosáhla jen na hodnotu $6,33 \cdot 10^{-10}$ U a specifickou aktivitou $1,02 \cdot 10^{-7}$ U (tabulka 39).

Vzájemným srovnáním amylázové a celulózy aktivity bylo zjištěno, že amylázová aktivita pankreatinu je dvojnásobně vyšší než jeho celulózy aktivita. Tyto výsledky potvrzují literární údaje, že pankreatin je složen z amylázy, lipázy a protézy [81].

Z porovnání těchto aktivit v alkalasy je zřejmá nepřítomnost celulózy aktivity, ale zároveň nízká amylázová aktivita alkalasy.

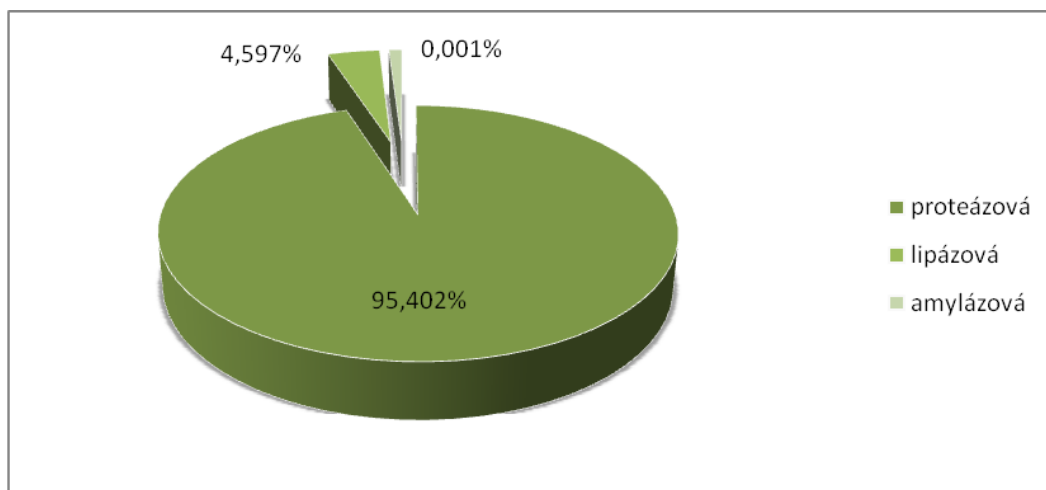
5.7.6.4. Diskuze jednotlivého zastoupení enzymových aktivit u pankreatinu a alkalasy

Alkalická protéza i pankreatin jsou směsné enzymy, což znamená, že obsahují směs enzymů štěpících nejrůznější substráty. Jak už bylo uvedeno výše, pankreatin je složen z pankreatické amylázy, trypsinu a pankreatické lipázy. Jakou měrou tyto enzymy přispívají k celkové aktivitě pankreatinu, je znázorněno v Graf 36.



Graf 36: Zastoupení jednotlivých enzymových aktivit v pankreatinu

Z grafu 36 znázorňujícím jednotlivé zastoupení aktivit pankreatinu je patrné, že majoritní zastoupení má proteázová aktivita, která tvoří 95,62 % aktivity pankreatinu. Lipázová, amylázová a celulózy aktivita jsou zde minoritní složkou a dohromady tvoří zbývajících 4,38 % aktivity pankreatinu, z čehož 4,37 % je připisováno lipázové aktivitě. Celulózy a amylázová aktivita se dělí o 0,01% aktivity pankreatinu, přičemž větší podíl má amylázová aktivita.



Graf 37: Zastoupení jednotlivých enzymových aktivit v alkalase

V případě alkalasy byla proteázová aktivita taktéž majoritně zastoupena a číselně tvořila 95,402 % (graf 37). Lipázová aktivita spolu s amylázovou tvoří opět minoritní složky. Lipázová aktivita tvoří 4,597 % aktivity alkalasy. Amylázová aktivita má nejmenší zastoupení – pouze 0,001 % Na rozdíl od pankreatinu, enzym alkalasa nevykazuje celulózovou aktivitu.

Srovnání procentuálního zastoupení proteázových aktivit studovaných enzymů potvrzuje skutečnost, že proteázová aktivita má menší procentuální zastoupení v alkalase než v pankreatinu.

5.7.7. Aplikace kombinací enzymů k izolaci PHA

V následujícím experimentu byla sledována účinnost dříve studovaných hydrolytických enzymů alkalasy a pankreatinu při izolaci PHB z buněčné kultury. Jednotlivé pokusy byly prováděny za měnících se technologických podmínek, jak je uvedeno v kapitole 4.8.5.

Tab. 40: Koncentrace biomasy, PHB, procentuální obsah PHB, koncentrace a rozpustnost látek netvořících PHB a čistota izolovaného PHB.

Číslo baňky	Kombinace enzymů	X_t (mg/ml)	C_{PHB} (mg/ml)	PHB(%)	X_{NPBH} (g)	S_{NPBH}	Δ purity
1	Oba najednou	2,16	2,02 ± 0,16	93,62 ± 1,38	0,14	76,10	71,83
2	A + P (po 1. hod)	2,31	2,13 ± 0,09	92,29 ± 1,75	0,18	68,68	65,93
3	P + A (po 1. hod)	2,28	2,18 ± 0,01	95,49 ± 0,65	0,10	81,97	80,10
4	A/odstředění/P	2,17	2,09 ± 0,15	96,54 ± 0,76	0,08	86,80	84,70
5	P/odstředění/A	2,00	1,85 ± 0,10	92,68 ± 0,31	0,15	74,43	67,66
kontrola	-	2,5	1,93 ± 0,19	77,36 ± 0,10	0,57	0,00	0,00

kde A značí přidavek alkalasy a P přidavek pankreatinu k buněčné suspenzi.

V experimentu (tabulka 40), kde bylo použito přidavku alkalasy i pankreatinu najednou v nulté hodině, bylo dosaženo významné, ale v porovnání s ostatními vzorky nízké procentuální koncentrace PHB (93,62 ± 1,38 %) i čistoty tohoto vzorku (71,83). Z uvedených hodnot je možné usuzovat, že využití obou enzymů současně nemá významný vliv na lyzi bakteriální stěny buněk, spíše se navzájem negativně ovlivňují a z průmyslového hlediska není výhodné pracovat s oběma enzymy dohromady.

V baňkách 2 a 3 byly použity rovněž oba enzymy, ale přidavek druhého byl realizován až po hodině inkubace kultury s prvním enzymem. V baňce 2, kde nejprve byla použita alkalasa a po hodině byl přidán pankreatin, dosahovala čistota vzorku na hodnotu 65,93 a koncentrace PHB v biomase tvořila $92,29 \pm 1,75$ %. V případě opačného pořadí přidavku enzymů (baňka 3) byla stanovena vyšší čistota 80,10 i koncentrace PHB v biomase ($95,49 \pm 0,65$ %). Tyto hodnoty se od sebe navzájem liší o 3,20%.

Tato významná odlišnost může být spojena se snížením aktivity v závislosti na přidavku pankreatinu a následném snížení aktivit obou enzymů, dále pak má vliv i krátká doba inkubace (60 minut) pankreatinu v médiu. Při opačném postupu, který byl proveden v baňce 3, má pankreatin dostatek času zvýšit svou aktivitu na maximální hodnotu, ale alkalasa nestihne dosáhnout maximální účinnosti.

V baňce 4, kde byla použita alkalasa, po hodině bylo médium odfiltrováno a byl přidán pankreatin, dosáhl procentuální obsah PHB $96,54 \pm 0,76$ % a čistota vzrostla na 84,70. Významná odlišnost od baňky 5, kde byly enzymy přidány v opačném pořadí a procentuální obsah PHB v biomase a čistota byly $92,68 \pm 0,31$ % a 67,60, může být způsobena nepřesným vážením nebo také tím, že po centrifugaci jednotlivých vzorků již nebyl do baňek přidán roztok SDS, který má významný vliv na čistotu konečného produktu [100].

Tab. 41: Koncentrace biomasy, koncentrace PHB, procentuální obsah PHB, koncentrace a rozpustnost látek netvořících PHB a změna čistoty vyizolovaného PHB z ředěné kultury uchovávané v původním médiu.

Číslo baňky	Kombinace enzymů	X_t (mg/ml)	c_{PHB} (mg/ml)	PHB(%)	X_{NPBH} (g)	S_{NPBH}	Δ purity
6	oba najednou	2,41	$2,45 \pm 0,20$	$101,65 \pm 2,00$	0,00	100,00	107,28
7	alkalasa	2,28	$2,21 \pm 0,11$	$97,08 \pm 3,57$	0,07	88,20	87,10
8	pankreatin	1,99	$1,94 \pm 0,05$	$97,78 \pm 3,29$	0,05	91,60	90,19
kontrola	-	2,5	$1,93 \pm 0,19$	$77,36 \pm 0,10$	0,57	0,00	0,00

Baňky 7, 8 jsou velmi zajímavé, protože zde byly naměřeny nejvyšší koncentrace PHB - $2,21 \pm 0,11$ g/l a $1,94 \pm 0,05$ g/l, což odpovídá $97,08 \pm 3,57$ % a $97,78 \pm 3,29$ g/l. Změna čistoty byla stanovena na 87,10 v baňce 7 a 90,19 v baňce 8, což svědčí o vysoké rozpustnosti buněčných komponent netvořících PHB pomocí zvolených enzymů (tabulka 41).

Proto lze usuzovat, že pokud se provádí izolace PHB z nakultivované biomasy, měla by kultura, stejně jako v našem případě, zůstat v původním kultivačním minerálním médiu. V předešlých kultivacích, kde bylo růstové minerální médium zaměněno za fosfátový pufr (50mM [pH 8,0]), byly výtěžky mnohem menší (viz výše).

Tab. 42: Koncentrace biomasy, PHB, procentuální obsah PHB, koncentrace a rozpustnost látek netvořících PHB a změna čistoty vyizolovaného PHB z neředěné kultury uchovávané ve fosfátovém pufru.

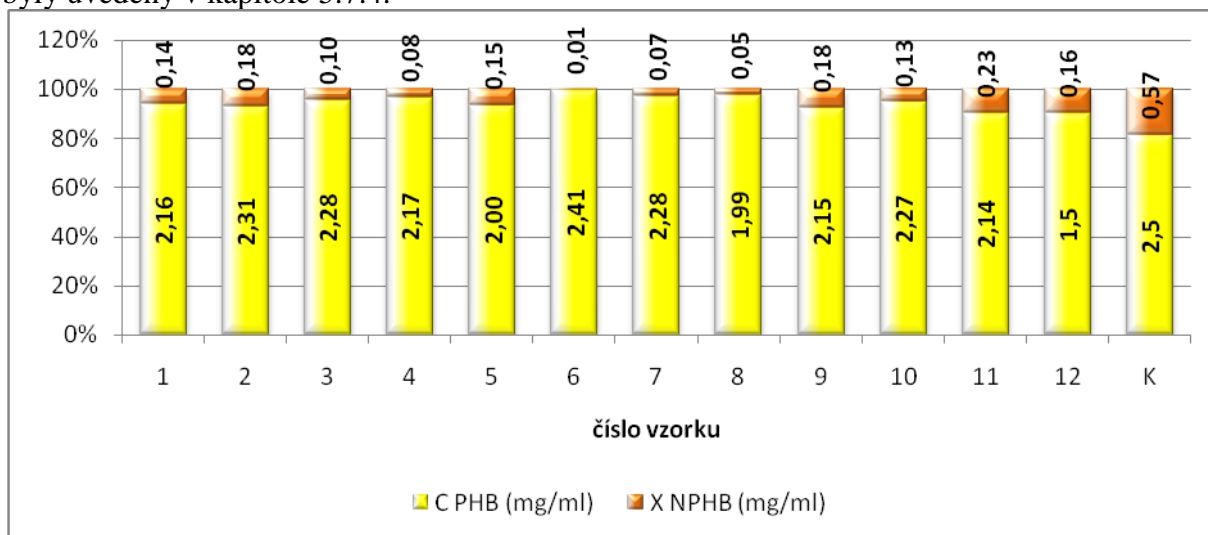
Číslo baňky	Kombinace enzymů	X_t (mg/ml)	c_{PHB} (mg/ml)	PHB(%)	X_{NPBH} (g)	S_{NPBH}	Δ purity
9	oba najednou	2,15	$1,97 \pm 0,10$	$91,61 \pm 1,47$	0,18	68,55	62,95
10	alkalasa	2,27	$2,14 \pm 0,14$	$94,26 \pm 4,52$	0,13	77,53	74,65
kontrola	-	2,5	$1,93 \pm 0,19$	$77,36 \pm 0,10$	0,57	0,00	0,00

Při zkoušce lyze buněčné kultury bylo v baňkách 9 a 10 použito i neředěné médium z fermentoru o koncentraci 100 g/l uchovávané ve fosfátovém pufru. Zde byl obsah PHB v biomase vypočítán na $91,61 \pm 1,47 \%$ v případě alkalasy a $94,26 \pm 4,52 \%$ v případě pankreatinu, jak je uvedeno v tabulce 42. Procentuální obsah PHB v biomase dosahuje vysokých hodnot, ale pomyslnou 95% hranici mezi vysokou a nízkou čistotou PHB nepřekonal. Nedokonalá čistota může být způsobena právě skutečností, že lyzovaná biomasa byla rozředěna pufrům místo růstového minerálního média, což snižuje jak procentuální obsah PHB, tak i čistotu a rozpustnost buněčných komponent neobsahujících PHB.

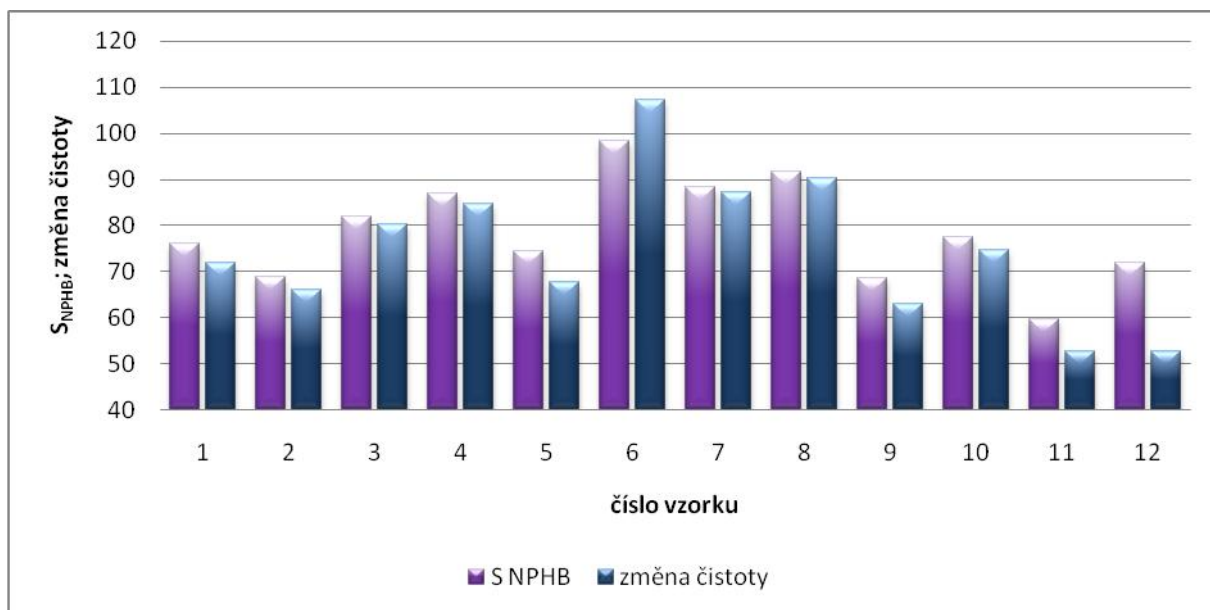
Tab. 43: Koncentrace biomasy, koncentrace PHB, procentuální obsah PHB, koncentrace a rozpustnost látek netvořících PHB a změna čistoty vyizolovaného PHB z ředěné kultury uchovávané ve fosfátovém pufru.

Číslo baňky	Kombinace enzymů	X_t (mg/ml)	C_{PHB} (mg/ml)	PHB(%)	X_{NPHB} (mg/ml)	S_{NPHB}	Δ purity
11	alkalasa	2,14	$1,91 \pm 0,01$	$89,30 \pm 0,10$	0,23	59,60	52,74
12	pankreatin	1,50	$1,34 \pm 0,00$	$89,28 \pm 0,10$	0,16	71,65	52,65
kontrola	-	2,50	$1,93 \pm 0,19$	$77,36 \pm 0,10$	0,57	0,00	0,00

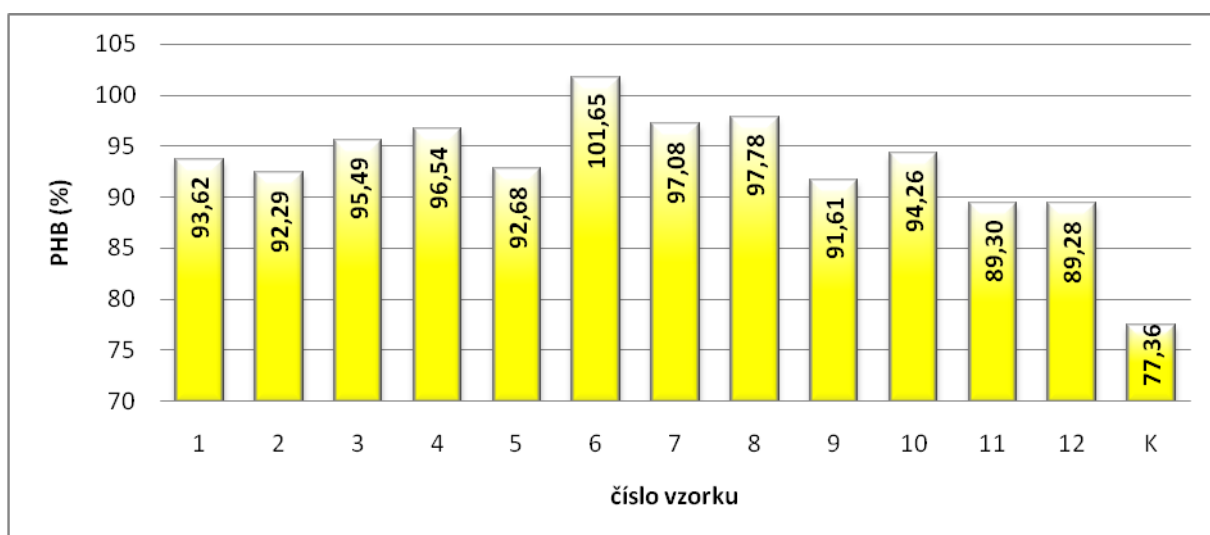
Pokud je lyze buněčné kultury prováděna bez použití SDS (baňky 11 a 12), je procentuální obsah PHB v biomase $89,30 \pm 0,10 \%$ a $89,28 \pm 0,10 \%$ (tabulka 43). Výsledkem srovnání baněk s přidávkem SDS a bez SDS je významný rozdíl jak v procentuální koncentraci PHB, tak hlavně v čistotě PHB. Závěrem lze potvrdit, že přítomnost SDS významně navyšuje konečné procentuální zastoupení PHB v biomase na základě principů, jež byly uvedeny v kapitole 5.7.4.



Graf 38: Koncentrace biomasy X_t (mg/ml) vyjádřená jako 100% složka rozdělená na jednotlivé obsahové složky - koncentrace PHB (mg/ml) a koncentrace složek buňky netvořících PHB (mg/ml).



Graf 39: Grafické znázornění rozpustnosti biomasy netvořící PHB a změny čistoty v prováděných experimentech označených 1-12. Symbolem K je označen kontrolní vzorek.



Graf 40: Graf obsahu PHA z jednotlivých experimentů vyjádřen procentuální koncentrací PHA. Pod označením K je uveden kontrolní vzorek.

Z uvedených grafů 38, 39 a 40 je zřejmé, že nejvyšší koncentrace PHA byla získána ve vzorcích 7 a 8, tedy ve vzorcích, v nichž byly enzymy pankreatin a alkalasa aplikovány na ředěnou buněčnou suspenzi získanou při kultivaci ve fermentoru a po fermentaci byla uchovávána v původním kultivačním médiu. Tyto dva zmíněné vzorky obsahovaly nejmenší procento PHA netvořících buněčných komponent a byla u nich pozorována nejvyšší hodnota změny čistoty.

V dalších experimentech, kdy byla prováděna kultivace na různých substrátech nebo v přítomnosti různých prekurzorů, byla používána pro lyzi buněčné stěny během izolace PHA z biomasy alkalasa v množství 100 μ l/0,25 g CDW a SDS v množství 0,08 g/g CDW.

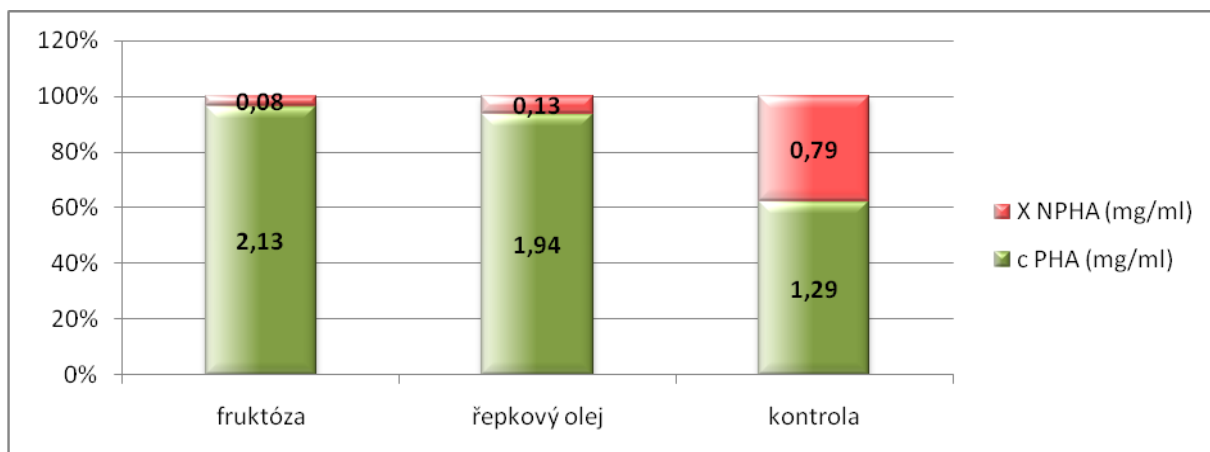
5.8. Izolace PHA z buněčné kultury s využitím komerčních enzymů

5.8.1. Stanovení koncentrace PHA po lytickém působení enzymů na biomasu získanou z kultivace na řepkovém oleji a fruktóze

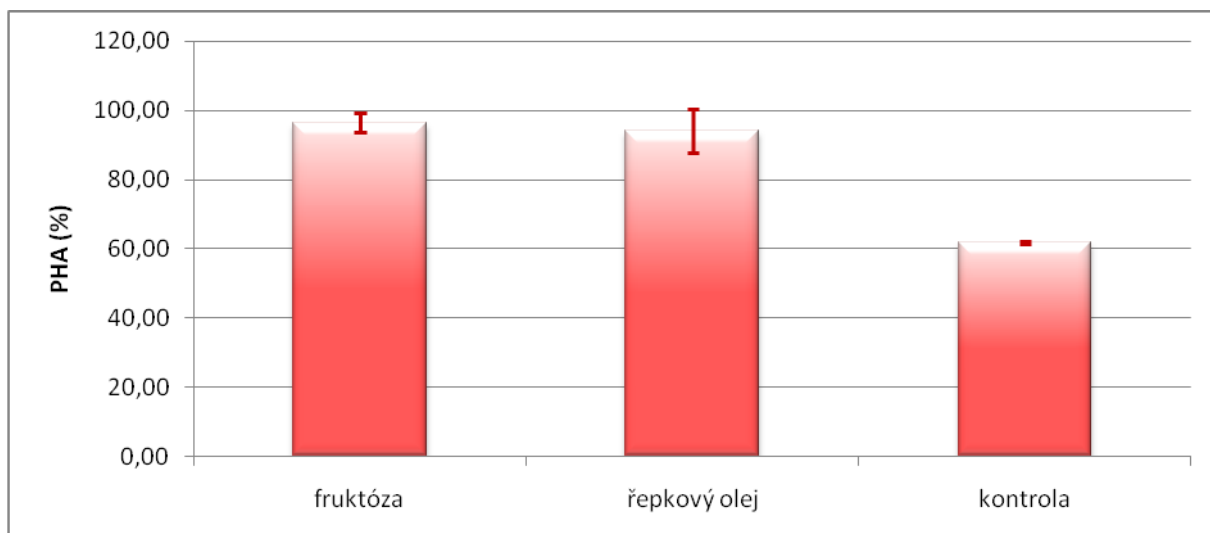
Tímto experimentem byla studována souvislost mezi typem substrátu (sacharidický či olejnatý) a vlivem na enzymovou izolaci PHA z buněčné suspenze. Ze sacharidických substrátů byla vybrána fruktóza, jež je nejlepším zdrojem uhlíku pro utilizaci buněčným metabolismem bakterie *C. necator*, z olejnatých substrátů byl ze stejného důvodu vybrán řepkový olej. Tento olej byl používán i v dříve prováděných experimentech pro kultivaci kultury *Cupriavidus necator* [82].

Tab. 44: Koncentrace biomasy, PHA, procentuální obsah PHA, koncentrace a rozpustnost látek netvořících PHA a změna čistoty vyizolovaného PHA z kultivací bakterie *Cupriavidus necator* na fruktóze a řepkovém oleji..

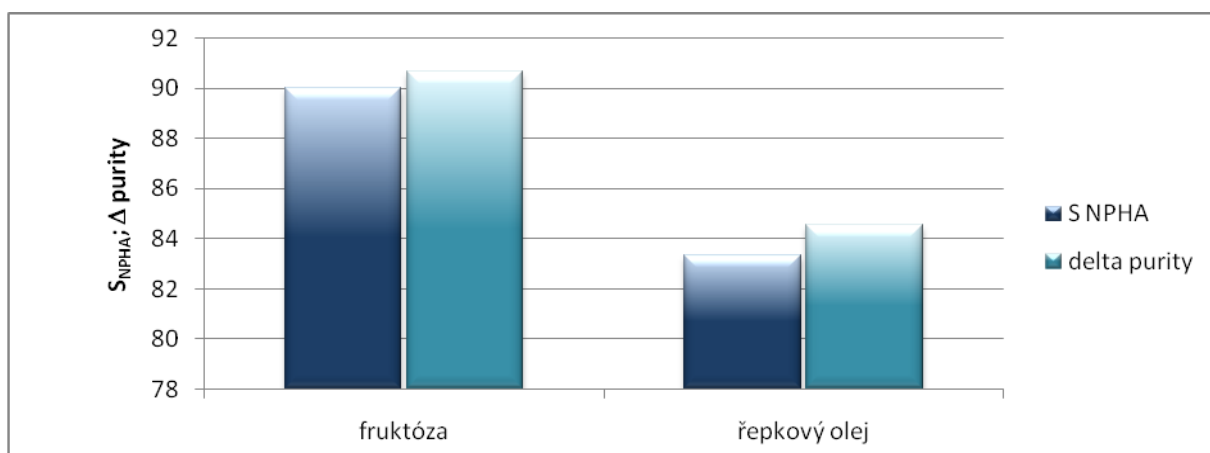
	X_t (mg/ml)	c_{PHA} (mg/ml)	PHA (%)	X_{NPHA} (mg/ml)	S_{NPHA}	Δ purity
fruktóza	2,21 ± 0,06	2,13 ± 0,12	96,43 ± 2,71	0,08	90,02	90,66
řepkový olej	2,07 ± 0,15	1,94 ± 0,03	94,10 ± 6,22	0,13	83,35	84,55
kontrola	2,08 ± 0,07	1,29 ± 0,05	61,80 ± 0,26	0,79	-	-



Graf 41: Množství PHA a množství biomasy netvořící PHB v celkovém množství biomasy. Dělení jednotlivých sloupců vyjadřuje míru příspěvku koncentrace PHB a koncentrace biomasy netvořící PHA k celkové koncentraci biomasy získané po lytickém působení enzymů, která je vyjádřena 100 %.



Graf 42: Procentuální zastoupení PHA v biomase při kultivaci bakterie *C.n.* na fruktóze a řepkovém oleji.



Graf 43: Grafické znázornění rozpustnosti biomasy netvořící PHB a změny čistoty po enzymovém působení u kultivací na řepkovém oleji a fruktóze.

Purifikační krok po kultivaci bakterie *Cupriavidus necator* na fruktóze a řepkovém oleji významně zvýšil čistotu vzorků. Ve vzorcích pocházejících z kultivace na fruktóze byla naměřena procentuální koncentrace $96,43 \pm 2,71$ % a ve srovnání s procentuálním zastoupením PHA v biomase po kultivaci ($65,22 \pm 4,65$ %, kap. 5.6.1) procentuální obsah PHA v biomase vzrostl o 31,21%. Po purifikaci byla naměřena koncentrace PHA $2,13 \pm 0,12$ mg/ml a koncentrace buněčných komponent netvořících PHA byla 0,08 mg/ml, což předurčuje jejich vysokou rozpustnost - 90,02. Změna čistoty byla 90,66 (tabulka 44, graf 41, 42, 43).

Při použití řepkového oleje při kultivaci byl po purifikaci procentuální obsah PHA v biomase nižší než při kultivaci na fruktóze, ale stále nepřesahoval 95% hranici procentuálního obsahu PHA v biomase – hodnota dosahovala $94,10 \pm 6,22$ %. Ve srovnání se vzorky proměřenými ihned po purifikaci se procentuální obsah PHA navýšil o 34,15%. Opět došlo k navýšení koncentrace PHA na $1,94 \pm 0,03$ mg/ml a snížení koncentrace složek netvořících PHA na 0,13 mg/ml v porovnání se vzorky proměřenými před purifikačním krokem. Změna čistoty u tohoto vzorku dosáhla 84,55 vůči kontrolní kultivaci.

Z uvedených výsledků je patrné, že forma zdroje uhlíku nemá výrazný vliv na purifikační krok zařazený po kultivaci. Po kultivaci na fruktóze byla koncentrace PHA vyšší než u kultivace na řepkovém oleji, dané pořadí zůstalo stejné, jen došlo ke snížení rozdílu mezi naměřenými hodnotami. Rozdíl mezi procentuálními obsahy PHA po kultivaci byl 5,2 %, kdežto tento rozdíl po purifikaci se snížil jen na 2,33%. Z toho lze usuzovat, že kultivace, jež obsahují v živném médiu olejnaté substráty jako zdroj uhlíku, nijak neovlivňují purifikační proces vedený enzymovou cestou, ale naopak mohou více přispívat k jeho lepšímu výsledku.

5.9. Izolace PHA z buněčné kultury s využitím enzymů z bakterie *Bacillus subtilis*

5.9.1. Příprava a charakterizace enzymového roztoku z kultivace bakterie *Bacillus subtilis*

Pro izolaci PHA z bakteriálních buněk bakterie *Cupriavidus necator* byl použit supernatant po kultivaci bakterie *Bacillus subtilis*, který obsahuje převážně proteolytické enzymy. Naměřená proteolytická aktivita získaných enzymových roztoků po kultivaci je uvedena v tabulce.

Tab. 45: Proteolytická aktivita enzymových roztoků bakterie *Bacillus subtilis* při kultivaci bez a s kulturou *Cupriavidus necator*. Objem média značí použité množství média při následně prováděné izolaci PHA z bakteriálních buněk.

kultivace	Objem média (ml)	Abs	A (unit)
s kulturou <i>Cupriavidus necator</i>	20	0,038	0,84
	30	0,042	0,93
	40	0,041	0,91
bez kultury <i>Cupriavidus necator</i>	20	0,047	1,05
	30	0,044	0,98
	40	0,043	0,96

Proměřením proteolytické aktivity enzymového roztoku *Bacillus subtilis* byla zjištěna relativně nízká proteolytická aktivita získaného supernatantu (tabulka 45). Dále byla vyvrácena hypotéza, která předpokládala potenciálně vyšší proteolytickou aktivitu v supernatantu buněk, které od začátku kultivace obsahovaly buněčnou suspenzi mrtvých buněk *Cupriavidus necator*. Zdá se, že nedochází k tvorbě žádných indukovatelných enzymů, ale dochází spíše k mírnému poklesu produkce volných enzymů do roztoku.

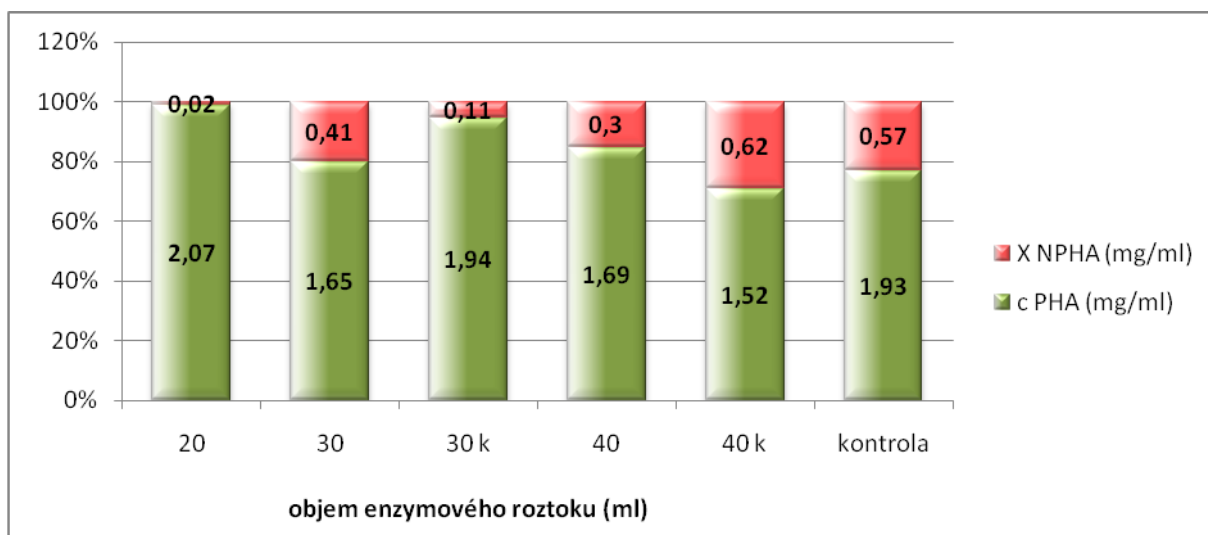
Proteolytická aktivita supernatantu z kultivací s buněčnou suspenzí *C.n.* byla naměřena postupně 0,84; 0,93 a 0,91 U. Zatímco proteolytická aktivita supernatantů z kultivací bez buněčné suspenze *C. necator* byla mírně navýšená a dosahovala postupně na hodnoty 1,05; 0,98 a 0,96 U.

5.9.2. Izolace PHA pomocí enzymového roztoku z *Bacillus subtilis*

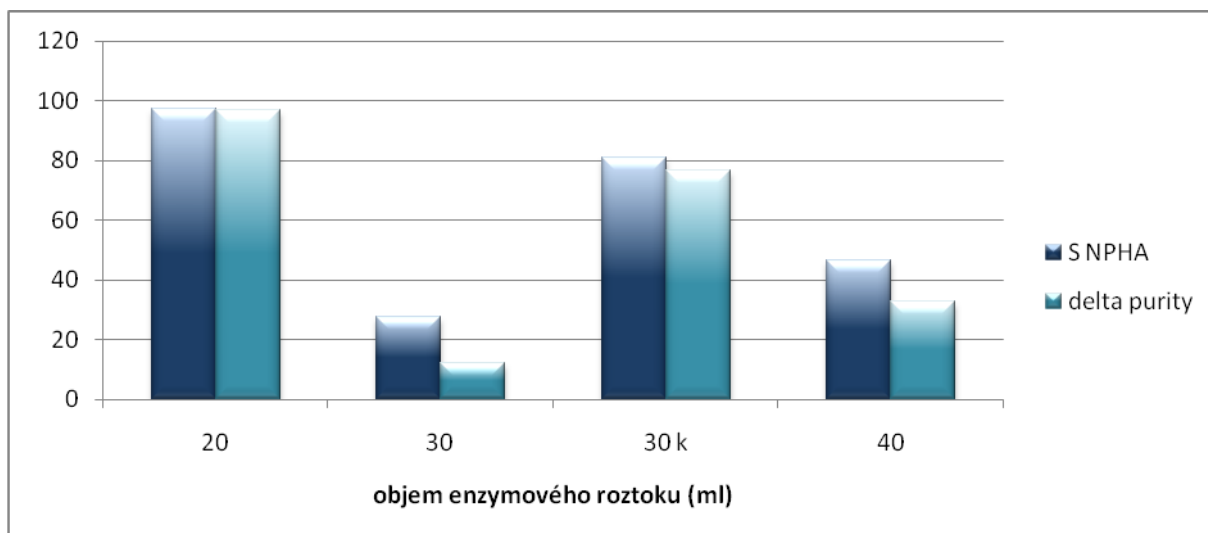
Aplikace enzymového roztoku s proteolytickou aktivitou získaného z bakterie *Bacillus subtilis* a SDS byly přidány k biomase bakterie *Cupriavidus necator* uchovávané ve fosfátovém pufru.

Tab. 46: Souhrn hodnot – aplikace enzymového roztoku bakterie *B. subtilis* na izolaci PHA z buněčné suspenze *C. necator*; koncentrace biomasy - X_t (mg/ml), koncentrace PHA - c_{PHA} (mg/ml), procentuální obsah PHA, koncentrace biomasy netvořící PHA - X_{NPHA} (mg/ml), rozpustnost PHA netvořících buněčných komponent - S_{NPHA} a změna čistoty - Δ purity

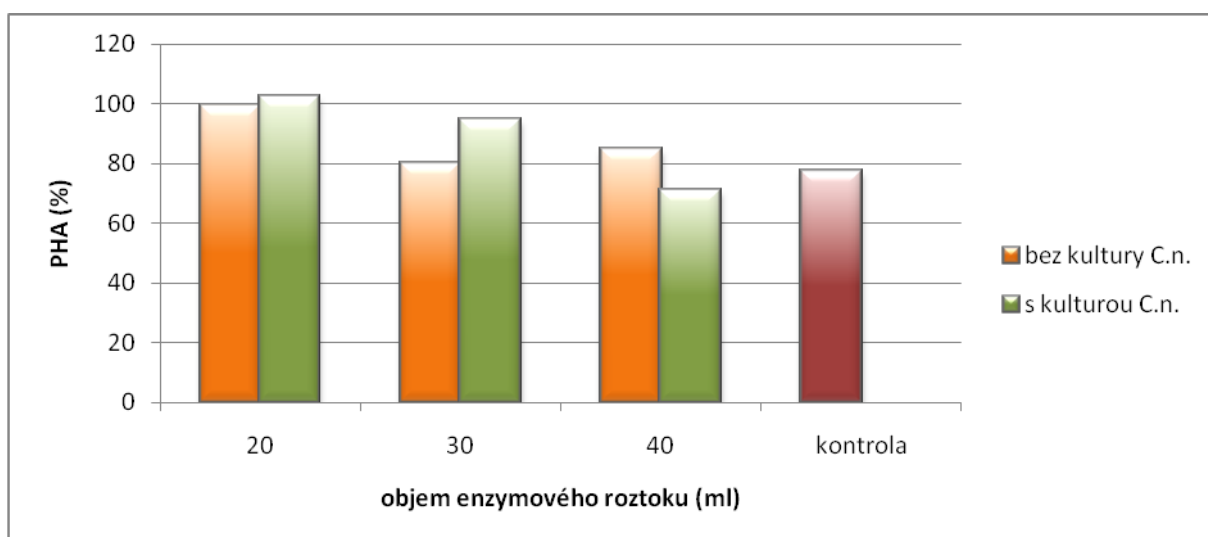
	Objem média (ml)	X_t (mg/ml)	c_{PHA} (mg/ml)	PHA (%)	X_{NPHA} (mg/ml)	S_{NPHA}	Δ purity
bez kultury	20	2,09	2,07 ± 0,01	99,24 ± 0,40	0,02	97,21	96,67
<i>Cupriavidus necator</i>	30	2,06	1,65 ± 0,03	79,97 ± 2,11	0,41	27,62	12,16
	40	1,99	1,69 ± 0,02	84,71 ± 1,40	0,30	46,62	32,94
s kulturou <i>Cupriavidus necator</i>	20	2,14	2,19 ± 0,01	102,40 ± 0,46	-	-	-
	30	2,05	1,94 ± 0,01	94,65 ± 0,52	0,11	80,75	76,52
	40	2,14	1,52 ± 0,01	70,98 ± 0,60	0,62	-	-
kontrola	-	2,50	1,93 ± 0,19	77,20 ± 0,10	0,57	0,00	0,00



Graf 44: Procentuální zastoupení jednotlivých složek ve vzorku po působení enzymového roztoku z kultivace *B. subtilis*. Koncentrace biomasy (100% složka) je složena z koncentrace PHA (mg/ml) a z koncentrace buněčných komponent netvořících PHA (mg/ml); indexem K jsou označeny enzymové roztoky kultivované s přidavkem biomasy *C. necator*.



Graf 45: grafické zobrazení vypočtených hodnot pro rozpustnost buněčných komponent netvořících PHA (S_{NPHA}) a pro změnu čistoty (Δ purity) v závislosti na použitých objemech enzymových roztoků po kultivaci bakterie *B. subtilis*; indexem K jsou označeny enzymové roztoky kultivované s přidavkem biomasy *C. necator*.



Graf 46: Procentuální zastoupení PHA v biomase buněčné kultury *C.n.* po přidavku různého množství enzymového roztoku získaného jako supernatant po kultivaci *B.s.* s kulturou *C.n.* a bez této kultury.

Z výše uvedené tabulky 46 a grafů 44, 45, 46 lze vyčíst, že při kultivaci bakterie *B. subtilis* s biomasou *C. necator* je procentuální zastoupení PHA vyšší než v případě použití enzymových roztoků z kultivací bakterie *Bacillus subtilis* bez biomasy *C. necator*.

Tato skutečnost je ale v rozporu s předchozím měřením proteolytických aktivit, protože proteolytická aktivita roztoků získaných kultivací s biomasou byla nižší než u kultivací bez biomasy, proto byla předpokládána vyšší procentuální koncentrace PHA u enzymových roztoků kultivovaných bez biomasy *C. necator* (viz tabulka 45, kap. 5.9.1.)

Tato odlišnost by mohla být způsobena tím, že enzymový roztok nevykazuje jen proteolytickou aktivitu, ale i další aktivity, které se částečně mohou podílet na lyzi buněčných komponent. Dalším důvodem by mohla být přítomnost biomasy *C. necator* při kultivaci *B.*

subtilis a s tím spojená produkce indukovatelných enzymů se specifitou na bakteriální buňku *C. necator*.

Zajímavostí je, že s přibývajícím množstvím jednotlivých enzymových roztoků dochází k poklesu procentuálního obsahu PHB. S navyšujícím přídatkem enzymového roztoku úměrně roste i koncentrace enzymu v roztoku a jak bylo uvedeno již v kapitole 5.7.2, kde byla studována optimalizace koncentrace enzymů pro lyzi buněčné stěny biomasy, s přibývajícím koncentrací enzymů slábne schopnost jejich lytického potenciálu, která je znovu navyšována při vysokých koncentracích enzymů.

Nejvyšší procentuální obsah byl tedy naměřen v kultivaci s 20 ml enzymového roztoku při kultivaci bez biomasy *C. necator* a dosáhl hodnotu $99,24 \pm 0,40$ % PHA v biomase. Koncentrace komponent netvořících PHA byla velmi nízká, pouze 0,02 mg/ml. Rozpustnost buněčných komponent potom dosáhla na hodnotu 97,21 a změna čistoty byla 96,67. Experiment, kde bylo použito 20 ml enzymového roztoku z baňky, kde byla přítomná kultura *C. necator*, nebyla dále zařazována do výsledků, protože procentuální koncentrace se dostala přes 100 %, což není možné. Tato chyba vznikla pravděpodobně nepřesným vážením na analytických vahách. I když byl tento vzorek vyřazen, je zde velmi vysoká pravděpodobnost, že tento enzymový roztok je vysoce účinný a získaný polymer bude vykazovat vysokou procentuální čistotu.

Dále byla z hodnot vyřazena baňka se 40 ml média a enzymovým roztokem získaným z kultivace s přídatkem biomasy *C. necator*, protože procentuální koncentrace PHA poklesla pod procentuální hodnotu PHA kontroly, což také není možné a tato chyba je zřejmě také následkem nepřesného vážení.

Významných hodnot bylo dosaženo v baňce, kde byl použit enzymový roztok po kultivaci bakterie *B. subtilis* v základním médiu s přídatkem buněčné suspenze *C. necator*. Zde byla procentuální koncentrace PHA stanovena na $94,65 \pm 0,52$ %. Koncentrace PHA byla $1,94 \pm 0,01$ mg/ml a koncentrace PHA netvořících buněčných komponent byla pouze 0,11 mg/ml. Z uvedených koncentrací lze také předurčit vysokou rozpustnost PHA netvořících buněčných komponent vypočtenou na 80,75, přičemž změna čistoty dosáhla 76,52.

Tento experiment potvrdil, že pro izolaci PHA z bakteriálních buněk lze s výhodou použít supernatant po kultivaci bakterie *B. subtilis*. Pokud je tato bakterie kultivována v médiu, jež je obohaceno o určité množství mrtvých buněk *C. necator*, je lytická schopnost supernatantu ještě navýšena, i když proteolytická aktivita byla ve srovnání s kultivací *B. subtilis* bez buněčné suspenze *C. necator* mírně snížena.

6. ZÁVĚRY

V rámci předložené práce byla sledována produkce polyhydroxyalkanoátů bakterií *Cupriavidus necator* H16 na různých odpadních substrátech. Druhá část práce byla zaměřena na izolaci získaného PHB enzymovou lyzí s přidavkem povrchově aktivní látky.

- První část práce se zbývá srovnáním produkce PHA na rostlinných olejích a fruktóze. Bakterie *C. necator* byla schopna využít všechny vybrané substráty, nicméně oleje se zdají být lepšími substráty pro produkci PHA než sacharidy. Například při kultivaci s kukuřičným olejem byl dosažen procentuální obsah 78 % PHA, kdežto při kultivaci s fruktózou jen 59 %.
- V další části práce byla sledována inkorporace vybraných monomerů do struktury polymeru při kultivacích *C. necator* v kultivačním médiu s řepkovým olejem a vybraným prekurzorem. Za použití 0,5% propan-1-olu byla do struktury začleněna 3HV monomerní jednotka, která tvořila 9,82 % polymeru. Inkorporace monomerů může významně ovlivnit mechanické vlastnosti polymeru.
- Při aplikaci pětiuhlíkatých prekurzorů 3HV jednotky nebyla detekována žádná koncentrace dalších monomerních jednotek, zřejmě z důvodu vysokého toku metabolitů drahou β -oxidace mastných kyselin při kultivaci na olejích. Metabolismus pak není schopen odčerpávat intermediáty do jiných metabolických drah.
- Kultivace bakterie s prekurzory 4HB monomeru vedla k jeho inkorporaci do struktury PHA, ale výsledná koncentrace 4HB monomeru v polymeru byla nízká. Zajímavostí byla při kultivaci s 1% butan-1,4-diolem detekce 3HV monomerní jednotky, která vzniká pravděpodobně methylmalonátovou drahou.
- Studium možných postupů izolace PHA z bakteriálních buněk bylo zahájeno srovnávací analýzou lytického potenciálu různých proteolytických enzymů vůči bakteriálním kulturám. Nejvyšší schopnost lyze studované gram-negativní buňky bakterie *C. necator* měly enzymy pankreatin a alkalasa.
- Koncentrace enzymu je důležitým parametrem, který ovlivňuje stupeň lyze buněčné membrány. Pokud je přidána vysoká dávka enzymu, dochází ke snížení lyze buněčné membrány. Optimální koncentrace enzymů byla stanovena na 1 % CDW jak u alkalasy, tak i pankreatinu.
- Významnou složkou při izolaci PHA z bakteriálních buněk se ukázala být povrchově aktivní látka SDS, která nejenže napomáhá buněčné lyzi, ale zvyšuje i čistotu izolovaného polymeru. Optimální koncentrace SDS byla stanovena na 0,04 g na g CDW. Přebytek SDS je nežádoucí, protože se váže na povrch granulí a snižuje tak kvalitu výsledného polymeru. Při studiu vlivu různých koncentrací SDS na proteázy nebyla prokázána žádná významná inhibice proteolytické aktivity enzymů při nižších koncentracích SDS, spíše došlo k mírnému navýšení. Zvláště alkalasa se jeví být vůči inhibici SDS prakticky inertní.

- V dalších experimentech byly sledovány aktivity jednotlivých enzymových složek pankreatinu a alkalázy. Proměřením proteázové, lipázové, celulázové a amylázové aktivity pankreatinu bylo prokázáno, že pankreatin vykazuje všechny uvedené aktivity. Alkaláza nevykazuje celulázovou aktivitu. Dále bylo zjištěno, že proteázová aktivita alkalázy a pankreatinu během lyze biomasy neklesá, ale spíše došlo k jejímu mírnému navýšení.
- V další části byly studovány různé strategie aplikace enzymů pankreatinu a alkalasy na buněčnou biomasu o různé koncentraci a v různých médiích. Nejvyšší lytická aktivita a zisk PHA o nejvyšší čistotě přesahující 97 % byl získán za aplikace alkalázy a pankreatinu na buněčnou kulturu lyzovanou v původním kultivačním médiu. Kvalita získaného preparátu PHA významně převyšovala ostatní produkty kultivací prováděné především ve fosfátovém pufru. Současné využití obou enzymů sice vede k vysoké čistotě získaného PHA, ale z hlediska ekonomického by bylo pravděpodobně velmi nákladné.
- Studium vlivu použité formy zdroje uhlíku v kultivaci na izolační krok potvrdilo vzájemnou nezávislost. Jak po kultivaci na fruktóze, tak i po kultivaci na olejích byl získán vysoce čistý polymer.
- Enzymový preparát získaný z kultivace bakterie *Bacillus subtilis* byl s výhodou využit na lyzi buněčné membrány studované bakterie *C.necator*. S použitím 20 ml roztoku enzymů získaného z kultivace *B. subtilis* byl získán polymer PHA o čistotě 99 %. Přídavek usmrcené biomasy *C. necator* do kultivace bakterie *B. subtilis* v nulté hodině ještě podpořil lytickou aktivitu získaného enzymového preparátu.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Sudesh, K., Abe, H., Doi, Y.: Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci*, 2000, vol. 25, p. 1503-1555.
- [2] Khanna, S., Srivastava, A.K.; Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, 2005. vol. 40. 607-619 s. ISSN 1359-5113.
- [3] Lemoigne, M., *Encyklopedia britannica*, online 2011, [cit 13. 5. 2011] <<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/1520101/Maurice-Lemoigne>>
- [4] Flickinger, M.C. - Drew, S.W.; *Encyclopedia of Bioprocess Technology – Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation. Volumes 1-5*. John Wiley & Sons, 1999. 2024-2133 s. ISBN 1-59124-457-9.
- [5] Luengo, J.M., Garcia, B., Sandoval, A., Naharro, G., Olivera, E.R.: Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, vol. 6, p. 251-260.
- [6] Pavolo, S., et all: Polyhydroxyalkanoates production by engineered *Cupriavidus necator* from waste material containing lactose. *Bioresource Technology*, 2010, Vol. 101, p. 7902–7907.
- [7] Verlinden. R.A.J. et all: Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology*, 2007, vol. 102, p.
- [8] Madison, L.L., Huisman, G.W.: Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1990, vol. 63. p. 21-53.
- [9] Kessler, B., Witholt, B.: Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *Journal of Biotechnology*, 2001, vol. 86, p. 97-104.
- [10] Merick, J. M.: Microbial water-insoluble aliphatic polyesters (PHA). *Biopolymers*, 2002, vol. 3a, p. 105-124.
- [11] Lee, S.Y.: Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, Vol. 49, P. 1-14.
- [12] Rehm, B.H.A., Steinbüchel, A.: Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *International journal of Biological Macromolecules*, 1999, vol. 25, p. 3-19.
- [13] Steinbuchel, A., Eversloh, T.L.: Metabolic engineering and pathway construction biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, 2003, vol. 16, p. 81-96.
- [14] Sudesh, K., Doi, Y.; Polyhydroxyalkanoates, *Handbook of Biodegradable Polymers*, 1st edition: Smithers Rapra Technology, 2005. s. 219-256. ISBN 978-1-85957-3.
- [15] Zinn, M., Witholt, B., Egli, T.: Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, vol. 53, p. 5-21.
- [16] Weusthuis, R. A., et all: Fermentative production of mcl PHAs, *Biopolymers*, 2002, vol. 3a, p. 290-305.
- [17] Wang, J., Yu, H.Q.: Biosynthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) and extracellular polymeric substances (EPS) by *Ralstonia eutropha* ATCC 17699 in batch cultures. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, vol. 75, p. 871-878.
- [18] Solaiman, D.K.Y, Ashby, R.D., Hotchkiss, A.T., Foglia, T.A.: Biosynthesis of medium-chain-length poly(hydroxyalkanoates) from soy molasses. *Biotechnology letters*, 2006, vol. 28, p. 157-162.

- [19] Steinbuchel, A. et al: Biosynthesis of polyesters in bacteria and recombinant organisms. *Polymer Degradation and Stability*, 1998, vol. 59, p. 177-182.
- [20] Green, P.R. et al: Formation of Short Chain Length/Medium Chain Length Polyhydroxyalkanoate Copolymers by Fatty Acid β -Oxidation Inhibited *Ralstonia eutropha*. *Biomacromolecules*, 2002, vol. 3, p. 208-213.
- [21] Weusthuis, R.A., Kessler, B., Dielissen, P.M., Withold B.; Fermentative production of Medium-chain-length Poly(3-hydroxyalkanoate). *Biopolymers*, 2002, vol. 3a, p. 291-316.
- [22] Ptter, M., Steinbuchel, A.: Poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins: Impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation, *Biomacromolecules*, 2005. vol.6, p. 552-560.
- [23] Rehm, B.H.A.: Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochemical Journal*, 2003, vol. 376, p. 15-33.
- [24] Valappil, S.P., Boccaccini, A.R., Bucke, Ch., Roy, I.: Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2007, vol. 91, p. 1-17.
- [25] Yang, T.H. et al: Biosynthesis of Polylactic Acid and Its Copolymers Using Evolved Propionate CoA Transferase and PHA Synthase. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, Vol. 105, p. 150-160.
- [26] Lee, E.Y., Choi, Ch. Y.: Biosynthesis and Biotechnological Production of Degradable Polyhydroxyalkanoic Acid. *Biotechnology and Bioprocess Engineering.*, 1997, vol. 2, p. 1-10.
- [27] Trotsenko, Y.A., Belova, L.L.: Biosynthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) and Its Regulation in Bacteria. *Microbiology*, 2000, vol. 69, p. 635-645.
- [28] Rehm, B.H.A., Steinbuchel, A.: Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1999, vol. 25, p. 3-19.
- [29] Potter, M., Madkour, M.H., Mayer, F., Steibuchel, A.: Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology*, 2002, vol. 148, p. 2413-2426.
- [30] Seo, M.Ch., Shin, H.D., Lee, Y. H.: Transcription level of granule-associated *phaP* and *phaR* genes and granular morphogenesis of poly- β -hydroxyalkanoate granules in *Ralstonia eutropha*. *Biotechnology Letters*, 2004, vol. 26, p. 617-622.
- [31] Kuchta K., Chi L., Fuchs H., Ptter M., Steinbuchel A.: Studies on the influence of phasins on accumulation and degradation of PHB and nanostructure of PHB granules in *Ralstonia eutropha* H16, *Biomacromolecules*, 2007. vol. 8, p. 657-662.
- [32] Akaraonye, E., Keshavarz, T., Roy, I.: Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2010, vol. 85, p. 732-743.
- [33] Tokiwa, Y., Ugwu, Ch., U.: Biotechnological production of (R)-3-hydroxybutyric acid monomer. *Journal of Biotechnology*, 2007, vol. 132, p. 264-272.
- [34] Lee, S.Y., Choi, J.: Production and degradation of polyhydroxyalkanoates in waste environment. *Waste Management*, 1999. Vol. 19, p. 133-139.
- [35] Naik, S., Gopal, S.K.V., Somal, P.: Bioproduction of polyhydroxyalkanoates from bacteria: a metabolic approach. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, vol. 24, p. 2307-2314.

- [36] Lee, I.Y. et al: Regulation of poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis by nicotinamide nucleotide in *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiology Letters*, 1995, vol. 131, p. 35-39.
- [37] Schembri, M. A., Bayla, R. C., Davies, J. K.: Phosphate Concentration Regulates Transcription of the *Acinetobacter* Polyhydroxyalkanoic Acid Biosynthetic Genes. 1995, *Journal of Bacteriology*, Vol. 177, Is. 15, p. 4501-4507.
- [38] Miyamoto, C. M., Sun, W., Meighen, E. A.: The LuxR regulator protein controls synthesis of polyhydroxybutyrate in *Vibrio harveyi*. 1998, *Biochemica et Biophysica Acta*, Vol. 1384, p. 356–364.
- [39] Sun, J., et al: The *ntxB* and *ntxC* Genes Are Involved in the Regulation of Poly-3-Hydroxybutyrate Biosynthesis by Ammonia in *Azospirillum brasilense* Sp7, *Applied and Environmental microbiology*, 2000, Vol. 66, p. 113-117.
- [40] Sun, J., et al: Involvement of *glnB*, *glnZ*, and *glnD* Genes in the Regulation of Poly-3-Hydroxybutyrate Biosynthesis by Ammonia in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 2002, Vol. 68, p. 985-988.
- [41] Timm, A., Steinbuchel, A.: Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *European Journal of Biochemistry*. 1992, Vol. 209, p. 15-30.
- [42] Yup Lee, S., Park, S.J.: Fermentative production of SCL-PHAs, *Biopolymers*, 2002, vol. 3a, p. 263-290 s.
- [43] Marchessault, R.H., Yu, Ga-er.; Crystalization and material properties of Polyhydroxyalkanoates, *Biopolymers*, 2002, vol. 3b, p. 157-202.
- [44] Vandamme, P., Coenye, T.: Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, vol. 54, p. 2285–2289.
- [45] Schwartz, E. and Friedrich, B.: A physical map of the megaplasmid pHG1, one of three genomic replicons in *Ralstonia eutropha* H16, 2001, *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 201, Issue 2, p. 213–219.
- [46] Pohlmann, A et al.: Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16, *Nature Biotechnology*, 2006, Vol. 24, p. 1257-1262. ISSN: 1087-0156.
- [47] Chen, Y., Chen, J., Yu, C., Du, G., Lun, S.: Recovery of poly-3-hydroxybutyrate from *Alcaligenes eutrophus* by surfactant-chelate aqueous system. *Process Biochemistry*, 1999, vol. 34, p. 153-157.
- [48] Lee, S.Y., Choi, J., Wong, H.H.: Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1999, vol. 25, p. 31-36.
- [49] Braunegg, G., Bona, R., Koller, M.: Sustainable Polymer Production. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 2004, Vol. 43. Is. 6, p. 1779-1793.
- [50] Hafuka, A., Sakaida, K., Satoh, H., Takahashi, M., Watanabe, Y., Okabe, S.: Effect of feeding regimens on polyhydroxybutyrate production from food wasted by *Cupriavidus necator*. *Bioresource Technology*, 2010, vol. 102, p. 3551-3553.
- [51] Fernández, D. et al: Agro-industrial oily wastes as substrates for PHA production by the new strain *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 40045: Effect of culture conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 2005, vol. 26, p. 159-167.

- [52] Lee, S. Y., Middelberg, A. P. J., Lee, Y. K.: Poly(3-hydroxybutyrate) production from whey using recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, Vol. 19, Nr. 10, p. 1033-1035.
- [53] Full, T.D., Jung, D.O., Madigan, M.T.: Production of poly- β -hydroxyalkanoates from soy molasses oligosaccharides by new, rapidly growing *Bacillus* species. *Letters in Applied Microbiology*, 2006, vol. 43, p. 377-384.
- [54] Yu, J.: Production of PHA from starchy wastewater via organic acids. *Journal of Biotechnology*, 2001, vol. 86, p. 105-112.
- [55] Yezza, A., Halasz, A., Levadoux, W., Hawari, J.: Production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* from maple sap. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, vol. 77, p. 269-274.
- [56] Sudesh, K., Bhubalan, K., Chuan, J.A., Kek, Y.K., Kamilah, H., Sridewi, N., Lee, Y.F.: Synthesis of polyhydroxyalkanoate from palm oil and some new applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, vol. 89, p. 1373-1386.
- [57] Fukui, T., Doi, Y.: Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, Vol. 49, p. 333-336.
- [58] Mifune, J. et al: Engineering of pha operon on *Cupriavidus necator* chromosome for efficient biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from vegetable oil. *Polymer Degradation and Stability*, 2010, vol. 95, p. 1305-1312.
- [59] Nakamura, S., Fukui, T., Mifune, J.: Targeted engineering of *Cupriavidus necator* chromosome for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from vegetable oil. *Canadian Journal of Chemistry*, 2008, Vol. 86, p. 621-627.
- [60] Chanprateep, S.: Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2010, vol. 110, p. 621-632.
- [61] Yang, Y.H. et al: Optimization of growth media components for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from organic acids by *Ralstonia eutropha*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, vol. 87, p. 2037-2045.
- [62] Castilho, L.R., Mitchell, D.A., Freire, D.M.G.: Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 2009, vol. 100, p. 5996-6009.
- [63] Cavalheiro, J. M. B. T. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Process Biochemistry*. 2009, vol. 44, p. 509–515.
- [64] Doi et al.: Biosynthesis of terpolyesters of 3-hydroxybutyrate, 3-hydroxyvalerate, and 5-hydroxyvalerate in *alcaligenes eutrophus* from 5-chloropentanoic and pentanoic acids. *Macromolecular Rapid Communications*, 1987, vol. 8, Nr. 12, p. 631–635.
- [65] Doi et al.: Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes eutrophus* from butyric and pentanoic acids, *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 28, Is 4-5, p. 330-334.
- [66] Kim, M., Cho, K.S., Ryu, H.W., Lee, E.G., Chang, Y.K.: Recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from high cell density culture of *Ralstonia eutropha* by direct addition of sodium dodecyl sulfate. *Biotechnology letters*, 2003, vol. 25, p. 55-59.
- [67] Jacquel, N., Lo, Ch.W., Wei, Y.H., Wu, H.S., Wang, S.S.: Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal*, 2008, vol. 39, p. 15-27.

- [68] Kapritchoff, F.M., Viotti, A.P., Alli, R.C.P., Zuccolo, M., Pradella, J.G.C., Maiorano, A.E., Miranda, E.A., Bonomi, A.: Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*. *Journal of Biotechnology*, 2006, vol. 122, p. 453-462.
- [69] Yasotha, K., Aroua, M .K., Ramachandran, K.B., Tan, I.K.P: Recovery of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) trough enzymatic digestion treatments and ultrafiltration. *Biochemical Engineering Journal*, 2006, vol. 30, p. 260-268.
- [70] Tamer, I. M., Moo-Young, M., Chisti, Y.: Optimization of poly(b-hydroxybutyric acid) recovery from *Alcaligenes latus*: combined mechanical and chemical treatments. *Bioprocess Engineering*, 1998, vol. 19, p. 459-468.
- [71] Jiang, X., Ramsay, J.A., Ramsay, B.A.: Acetone extraction of mlc-PHA from *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, vol. 67, p. 212-219.
- [72] Terada, M., Marchessault, R.H.: Determination of solubility parameters for poly(3-hydroxyalkanoates). *International Journal of Biological Macromolecules*, 1999, vol. 25, p. 207-215.
- [73] de Koning, G. J. M. Witholt, B.: A process for the recovery of poly(hydroxyalkanoates) from *Pseudomonads* - Part 1: Solubilization. *Bioprocess Engineering*, 1997, vol. 17, p. 7-13.
- [74] Roh, K. S., et all: The effects of sodium bisulfite in extraction of PHB by hypochlorite. *Biotechnology technics*, 1995 Vol. 9, Is. 10, p. 709-712.
- [75] Chen, Y., Yang, H., Zhou, Qi, Chen, J., Gu, G.: Cleaner recovery of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus*. *Process Biochemistry*. 2001, vol. 36, p. 501-506.
- [76] Horowitz, D., Brennan, E.: Methods for separation and purification of biopolymers, 2001, U.S. patent 20010006802.
- [77] Rijk, T.C. et all; Methods for analysis of Poly(3-hydroxyalkanoate) composition. *Biopolymers*, 2002. vol. 3b, p. 1-21.
- [78] Brandl, H., et all: *Pseudomonas oleovorans* as a source of Poly(b-hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988. vol. 54 (8). p. 1977-1982.
- [79] Zhang, S. et all; Poly(3-hydroxybutyrate) biosynthesis in the biofilm of *Allcaligenes eutrophus*, using glucose enzymatically release from pulp fiber sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004. vol. 77 (11), p. 6776-6782.
- [80] Horowitz, D.M.; Amorphous, biomimetic granules of polyhydroxybutyrate: preparation, characterization, and biological implications. *Journal of the American Chemical Society*, 1994, vol. 116, P. 2695-2702.
- [81] Waterhouse, A. L.: Lipase assay. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* 2003.
- [82] Obruca, S., Marova, I., Snajdar, O., Mravcova, L., Svoboda, Z: Production of polz(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* from waste rapeseed oil using propanol as a precursor of 3-hydroxyvalerate. *Biotechnology Letters*, 2010, vol. 32, p. 1925-1932.
- [83] STEVEN M. Denkin, S. M., Nelson, D. R.: Induction of Protease Activity in *Vibrio anguillarum* by Gastrointestinal Mucus. *Applied and environmental mikrobiology*, 1999, vol. 46, p. 3555–3560.

- [84] Bockisch, M., *Fats and Oils Handbook*, AOCS Press, Champaign, 1998, p. 1452, ISBN 0-935315-82-9.
- [85] MURRAY, R. K. *Harperova bichemie*. Jinočany : H+H Vyšehradská s.r.o., 2001, s. 872
- [86] Shen, X.W. et al: Production and characterization of homopolymer poly(3-hydroxyvalerate) (PHV) accumulated by wild type and recombinant *Aeromonas hydrophila* strain 4AK4. *Bioresource Technology*, 2009, vol. 100, p. 4296-4299.
- [87] Ojumu, T.V., Yu, J., Solomon, B.O.: Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology*, 2004, vol. 3, p. 18-24.
- [88] Steinbuchel, A., Hein, S.: Biochemical and Molecular Basis of Microbial Synthesis of Polyhydroxyalkanoates in Microorganisms. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2001, vol. 71, p.XXX.
- [89] Zou, X.H., Chen, G.Q.: Metabolic Engineering for Microbiol Production and Applications of Copolyesters Consisting of 3-Hydroxybutyrate and Medium-Chain-Length 3-Hydroxyalkanoates. *Macromolecul Bioscience*, 2007, vol. 7, p. 174-182.
- [90] Yamane, T., Chen, X.F., Ueda, S.: Growth-Associated Production of Poly(3-Hydroxyvalerate) from *n*-Pentanol by a Methylophilic Bacterium, *Paracoccus denitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, vol. XXX, p. 380-384.
- [91] Valentin, H.E., Zwingmann, G., Schonebaum, A., Steinbuchel, A.: Metabolic pathway for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-4-hydroxybutyrate) from 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*. *European Journal of Biochemistry*, 1995, vol. 227, p. 43-60.
- [92] Grage, K. et al: Bacterial Polyhydroxyalkanoate Granules: Biogenesis, Structure, and Potential Use as Nano-/Micro-Beads in Biotechnological and Biomedical Applications. *Biomacromolecules*, 2009, vol. 10, p. 660-669.
- [93] Azira, T.M.F et al: Biosynthesis of Poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate-*co*-4-hydroxybutyrate) terpolymer by *Cupriavidus* sp. USMAA2-4 through two-step cultivation process. *World J Microbiol Biotechnol*, DOI 10.1007/s11274-011-0693-7.
- [94] Aldor, I.S., Keasling, J.D.: Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, vol. 14, p. 475-483.
- [95] Skraly, F. A., Production of polyhydroxyalkanoates from polyols. 2010, U.S. patent 2010/002919.
- [96] Doi, Y., Biosynthesis of copolyesters in *Alcaligenes eutrophus* H16 from carbon-13 labeled acetate and propionate. *Macromolecules*, 1987, Vol. 20, p. 2988-2991
- [97] VOLOVA, Tatiana. *Polyhydroxyalkanoates : Plastic material of 21st century*. New York : Nova science publisher, 2004, p. 285.
- [98] Lewis, R.J., *Hawley's Condensed Chemical Dictionary*. New York : Wiley-Blackwell, 2007. 1245
- [99] Scott, J.H., Schekman, R.: Lyticase: Endoglucanase and Protease Activities That Act Together in Yeast Cell Lysis. *Journal of Bacteriology*, 1980, vol. 142, p. 414-423.
- [100] Brannen, J. K., Davison, P. M., Enhancement of nisine, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethalenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, vol. 90, p. 423-433.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

PHA	polyhydroxyalkanoáty
PHB	polyhydroxybutyrát
P(3HB)	poly(3-hydroxybutyrát)
P(4HB)	poly(4-hydroxybutyrát)
PHV	polyhydroxyvalerát
P(3HV)	poly(3-hydroxyvalerát)
scl PHA	short-chain-length PHA
mcl PHA	medium-chain-length PHA
lcl	long-chain-length PHA
P(3HB-co-3HV)	kopolymer poly 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu
P(3HB-co-20% 3HV)	kopolymer poly (3-hydroxybutyrátu a 20% 3-hydroxyvalerátu)
P(3HB-co-16% 4HB)	kopolymer poly(3-hydroxybutyrátu a 14% 4-hydroxybutyrátu)
P(3HB-co-10% 3HHx)	kopolymer poly(3-hydroxybutyrátu a 10% 3-hydroxyhexanoátu)
P(3HB-co-6% 3HD)	kopolymer poly(3-hydroxybutyrátu a 6% 3-hydroxydekanoátu)
ACR	acetyl-CoA reduktáza
TCA	tricarboxylic acid cycle
CDW	cells dry weight
POME	palm oil melt eluent
SDS	dodecylsulfát sodný
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
GC FID	plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem
3HB	3-hydroxybutyrátová monomerní jednotka
4HB	4-hydroxybutyrátová monomerní jednotka
3HV	3-hydroxyvalerátová monomerní jednotka