



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VYUŽITÍ CALDIMONAS THERMODEPOLYMERANS PRO BIOTECHNOLOGICKOU PRODUKCI BAKTERIÁLNÍCH POLYESTERŮ

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF BACTERIAL POLYESTERS USING CALDIMONAS
THERMODEPOLYMERANS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Pavλίna Janků

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Xenie Kouřilová, Ph.D.

BRNO 2025

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK2124/2024 Akademický rok: 2024/25
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Pavλίna Janků**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biochemická technologie
Vedoucí práce: **Ing. Xenie Kouřilová, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Využití *Caldimonas thermodepolymerans* pro biotechnologickou produkci bakteriálních polyesterů

Zadání bakalářské práce:

- Literární rešerše zaměřená na produkci polyhydroxyalkanoátů při různých kultivačních strategiích pomocí termofilních mikroorganismů
- Studium vlivu kultivačního módu fed–batch na produkci polyhydroxyalkanoátů
- Studium vlivu repeated batch kultivace na produkci polyhydroxyalkanoátů

Termín odevzdání bakalářské práce: 26.5.2025:

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

Pavλίna Janků
studentka

Ing. Xenie Kouřilová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 3.2.2025

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

Abstrakt

Cílem této práce bylo sledovat vliv různých kultivačních strategií na produkci polyhydroxyalkanoátů, biologicky odbouratelných polymerů, které představují alternativu k syntetickým plastům a mají potenciál v oblasti udržitelných materiálů. V experimentální části byly testovány kultivační strategie za pomoci bakterie *Caldimonas thermodepolymerans* DSM 15344, která je schopna syntetizovat polyhydroxyalkanoáty. Nejprve byla provedena klasická batch kultivace. V následujících krocích byla provedena fed-batch kultivace, konkrétně dvoukroková a tříkroková, která umožňuje řízené doplňování zdroje uhlíku a živin v průběhu kultivace za účelem optimalizace kultivačních podmínek a následného zvýšení akumulace polyhydroxyalkanoátů. Závěrečná část experimentu se věnovala repeated batch kultivaci, která umožňuje periodické obnovování média a zároveň zachování kultury.

Na základě provedených experimentů lze konstatovat, že nejvyšší výtěžnosti biomasy i polyhydroxybutyrátu bylo dosaženo při použití kultivační strategie repeated batch. Tato strategie se ukázala jako nejefektivnější ve srovnání s ostatními testovanými kultivačními strategiemi. V případě použití minerálního média obohaceného o zdroj dusíku (NH_4Cl a NB) byl zaznamenán pozitivní vliv na metabolickou aktivitu. Tato zjištění potvrzují, že dostupnost dusíku může pozitivně ovlivnit viabilitu buněk *Caldimonas thermodepolymerans* a tím podporovat syntézu polyhydroxybutyrátu.

Klíčová slova

Caldimonas thermodepolymerans, kultivační strategie, fed-batch, repeated batch, polyhydroxyalkanoáty

Abstract

The subject of this thesis was to investigate the impact of different cultivation strategies on the production of polyhydroxyalkanoates (PHAs), biodegradable polymers that represent an alternative to synthetic plastics and hold promise in the field of sustainable materials. The experimental part focused on the cultivation of bacterium *Caldimonas thermodepolymerans* DSM 15344, which is capable of synthesizing PHAs. Initially, a classical batch cultivation was performed. In the subsequent steps, a fed-batch strategy was applied—specifically two-step and three-step fed-batch processes—which enabled the controlled supplementation of carbon and nutrient sources during cultivation. This approach aimed to optimize growth conditions and enhance PHA accumulation. The final part of the experiment involved repeated batch cultivation, allowing for periodic replacement of the medium while maintaining the culture.

Based on the experiments, the highest yields of biomass and polyhydroxybutyrate (PHB) were achieved using the repeated batch strategy. This method proved to be the most effective among the tested cultivation strategies. Furthermore, the use of mineral media with nitrogen sources (NH₄Cl and NB) demonstrated a positive effect on metabolic activity. These findings suggest that nitrogen availability can positively influence the viability of *Caldimonas thermodepolymerans* cells, thereby supporting PHB synthesis.

Keywords

Caldimonas thermodepolymerans, cultivation strategy, fed-batch, repeated batch, polyhydroxyalkanoates

JANKŮ, Pavlína. *Využití Caldimonas thermodepolymerans pro biotechnologickou produkci bakteriálních polyesterů*. Online, bakalářská práce. Xenie KOUŘILOVÁ (vedoucí práce). Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2025. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/162174>.

Prohlášení

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

.....

podpis

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala Ing. Xenii Kouřilové, Ph.D. za odborné vedení bakalářské práce. Také za pomoc při zpracování teoretické i experimentální části bakalářské práce a za odborné konzultace, ochotu a podporu při práci v laboratoři.

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část	9
2.1	Polyhydroxyalkanoáty.....	9
2.1.1	Struktura	10
2.1.2	Vlastnosti PHA.....	11
2.1.3	Biokompatibilita.....	11
2.1.4	Extrakce PHA	11
2.1.5	Biosyntéza PHA	12
2.1.6	Biodegradace PHA	13
2.2	Využití PHA.....	14
2.2.1	Systémy dodávání léčiv	15
2.2.2	Obaly potravin.....	15
2.3	Extremofilní bakterie	16
2.3.1	Termofilní bakterie	16
2.3.2	<i>Caldimonas thermodepolymerans</i>	16
2.4	Kultivační strategie	17
2.4.1	Batch (vsádková) kultivace.....	17
2.4.2	Repeated batch kultivace	18
2.4.3	Fed-batch (přítoková vsádková) kultivace.....	18
3	Experimentální část.....	20
3.1	Chemikálie.....	20
3.2	Použité přístroje	20
3.3	Kultivace.....	21
3.4	Kultivační strategie	21
3.4.1	Batch kultivace.....	21
3.4.2	Fed-batch kultivace	21
3.4.3	Repeated batch kultivace	22
3.4.4	Stanovení biomasy	23
3.4.5	Stanovení zbytkových cukrů pomocí DNS.....	24
3.4.6	Stanovení PHB v biomase pomocí GC-FID	24
4	Diskuze a výsledky	25
4.1.1	Batch kultivace.....	25
4.1.2	Fed-batch kultivace	26
4.1.3	Repeated batch kultivace	28

5	Závěr	35
6	Literatura.....	37

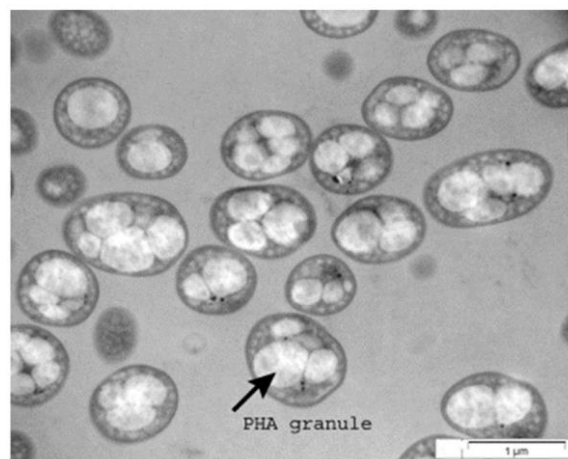
1 Úvod

Celosvětová produkce plastů se stále zvyšuje a předpokládá se, že v následujících letech ještě vzroste. Ročně se vyrobí velké množství plastových materiálů, přičemž značná část z nich končí na skládkách, ve spalovnách nebo v přírodě, kde se pomalu rozkládají. Nadměrné využívání syntetických plastů vede nejen k akumulaci odpadu, ale také k významnému zatížení životního prostředí, zejména kvůli emisím skleníkových plynů a kontaminaci půdy nebo vodních zdrojů mikroplasty. Tato situace vyvolává zájem o hledání udržitelných alternativ, jako jsou biologicky rozložitelné polymery, mezi které patří polyhydroxyalkanoáty. Vzhledem ke své biodegradabilitě představují částečnou náhradu za konvenční petrochemické plasty. Produkce polyhydroxyalkanoátů může být navíc ekologičtější, pokud jsou mikroorganismy kultivovány na odpadních nebo obnovitelných substrátech. Některé mikroorganismy jsou schopny využívat jednoduhlíkaté sloučeniny, mezi které patří methanol, což otevírá další možnosti jako je zužitkování emisí z průmyslových procesů, které lze přeměnit na bioprodukty. Schopnost růstu na takových substrátech je výhodná nejen z hlediska snížení environmentální zátěže, ale i z pohledu ekonomiky bioprodukce [1]. Mezi mikroorganismy produkující PHA patří také termofilní mikroorganismy, nicméně produkce PHA za pomoci těchto mikroorganismů není zcela objasněna. Pro průmyslově udržitelnou a konkurenceschopnou produkci PHA je potřeba aby byl mikroorganismus schopen produkce ve velkoobjemových reaktorech za využití fed-batch nebo repeated batch kultivace, proto je důležité sledovat, jak daný mikroorganismus na tyto kultivační strategie reaguje.

2 Teoretická část

2.1 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou biologicky odbouratelné polymery. PHA mají klíčovou roli jako zásobárna uhlíku a energie pro nesporulující i sporulující bakterie. Jsou to sloučeniny nerozpustné ve vodě, které jsou mikroorganismy syntetizovány jako granule během období stresu, a to při nadbytku uhlíku a nízké koncentraci esenciálních živin nezbytných pro růst jako dusík nebo fosfát. Prokaryotické mikroorganismy ukládají PHA v cytoplasmě ve formě kulovitých inkluzí známých jako PHA granule (Obrázek 1). Průměrná velikost granulí je 0,2-0,5 μm . PHA umožňuje dlouhodobé přežívání bakterií za nedostatku živin. Navíc některé bakterie, které obsahují PHA, vykazují zvýšenou toleranci vůči ultrafialovému (UV) záření, vysoké i nízké teplotě, těžkým kovům a osmotickému šoku [2]. Vlastnosti PHA jsou ovlivněny počtem monomerních jednotek polymeru, což závisí na kmeni bakterie, způsobem kultivace a také použitým zdrojem uhlíku. Nejběžnějším typem PHA, který může být produkován bakteriemi v biologickém procesu, je poly(3-hydroxybutyrát) (PHB). Tento materiál je vysoce krystalický a křehký s teplotou tání blízkou teplotě degradace, což omezuje jeho potenciální využití [3-5].

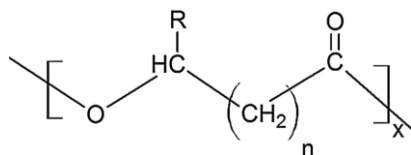


Obrázek 1: PHA granule bakterie *P. putida*, převzato a upraveno [6]

Syntetické polymery jsou široce využívány a nacházejí využití jako obaly, v elektronice nebo dopravě. Nejčastěji používanými polymerními materiály jsou polyethylen, polypropylen, polystyren, polyvinylchlorid, polyuretan, poly(ethylenetereftalát), poly(butylenetereftalát) a nylon [7]. Vzhledem k negativnímu dopadu syntetických plastů na životní prostředí, mezi které se řadí například uvolňování mikroplastů do ekosystémů nebo emise skleníkových plynů, se stále častěji zkoumají možnosti, jak syntetické polymery nahradit. Z toho důvodu jsou zajímavé PHA, jelikož se jedná o biologicky rozložitelné a biokompatibilní polymery, které mohou nahradit běžné plasty v různých odvětvích. PHA jsou extrahovány z mnoha bakteriálních druhů, například *Pseudomonas putida*, *Cuprivadus necator*, *Alcaligenes latus*, *Pseudomonas mendocina*, *Bacillus subtilis* kultivovaných za podmínek omezeného přístupu živin. PHA jsou za fyziologických podmínek pomocí PHA depolymeráz rozkládány na přírodní metabolity, jako jsou 3-hydroxybutyrát a hydroxyacyl-koenzymy A, což jim umožňuje snadné začlenění do biologických systémů. Tato vlastnost je klíčovým faktorem, proč PHA nejsou imunogenní, jsou biokompatibilní a projevují biologickou odbouratelnost [8-10].

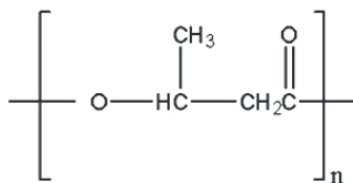
2.1.1 Struktura

PHA jsou lineární polyestery skládající se z monomerů hydroxykyselin spojených esterovou vazbou. Tato vazba vzniká spojením karboxylové skupiny monomeru s hydroxylovou skupinou sousedního monomeru (Obrázek 2). V závislosti na počtu uhlíkových atomů v monomerech jsou PHA klasifikovány do tří odlišných skupin: PHA s krátkým řetězcem (*scl*-PHA), PHA se středně dlouhým řetězcem (*mcl*-PHA) a PHA s dlouhým řetězcem (*lcl*-PHA). *Scl*-PHA se skládají z 3–5 uhlíkových atomů, které jsou syntetizovány mnoha bakteriemi, jako je například *Cupriavidus necator*. *Mcl*-PHA jsou složeny z monomerů obsahujících 6–14 uhlíkových atomů, které jsou syntetizovány především druhy *Pseudomonas*. *Lcl*-PHA jsou složeny z 15 nebo více uhlíkových atomů. Strukturní složení polymerů PHA závisí na zdroji uhlíku dodaném jako substrát pro růst a na použitém bakteriálním kmeni. Vedlejší řetězec může být nasycený nebo nenasycený, může obsahovat aromatické, halogenové, a dokonce epoxidové monomery. Pomocí chemických modifikací vedlejších řetězců lze zavést požadované funkční skupiny, které ovlivňují vlastnosti polymerů [5, 11].



Obrázek 2: Struktura PHA, převzato a upraveno [5]

Mezi bakteriemi nejčastěji produkovaným zástupcem PHA je kyselina polyhydroxybutyrová, také označovaná jako poly(3-hydroxybutyrát), poly(3HB) nebo PHB (Obrázek 3). Poly(3-hydroxybutyrát) (PHB) je přírodní polymer produkovaný bakteriemi jako intracelulární zásobník uhlíku. PHB je klasifikován jako *scl*-PHA tedy jako krátkořetězcový polymerní hydroxyalkanoát se 3–5 uhlíkovými atomy. PHB granule se skládají z jádra polymeru PHB a povrchové vrstvy strukturních a funkčních proteinů. V bakteriálních rodech produkujících PHA se nacházejí čtyři typy proteinů, které jsou spojeny s PHA granulemi: PHA syntáza, PHA depolymerázy, 3HB-oligomer hydroxyláza, phasiny, které se považují za hlavní strukturální proteiny membrány obklopující inkluzi, a regulátor exprese phasinu. Tvzení o přítomnosti fosfolipidů v povrchové vrstvě je založena na *in vitro* izolovaných PHB granulích a často je zobrazována na obrázcích struktury PHB granulí v přehledech o metabolismu PHB. Nicméně *in vivo* přítomnost fosfolipidové vrstvy nebyla prokázána [12-15].



Obrázek 3: Struktura PHB, převzato a upraveno [13]

Ve studii od Bresan S. a kol. [15] tento problém zkoumali pomocí exprese fúzních proteinů DsRed2EC a dalších fluorescenčních proteinů s fosfolipid vázající doménou (LactC2) z lactadherinu pomocí tří modelových organismů. Fúzní proteiny se specificky lokalizovaly na buněčné membráně *Cupriavidus necator*, ale nebyly lokalizovány na PHB granulích. Stejný výsledek byl získán i pro *Pseudomonas putida*, druh, který akumuluje jiný typ PHA granulí souvisejících s PHB. V bakterii *Magnetospirillum gryphiswaldense* byl DsRed2EC-LactC2

detekován na pozici membránově uzavřených magnetozomových řetězců a na cytoplazmatické membráně, ale ne na PHB granulích. V závěru uvedli, že PHB granule zástupců α -proteobakterií, β -proteobakterií a γ -proteobakterií neobsahují fosfolipidy *in vivo*, a také že povrchové vrstvy PHB/PHA granulí u přírodních producentů jsou obecně bez fosfolipidů a skládají se pouze z proteinů [15].

2.1.2 Vlastnosti PHA

PHA disponují atraktivními vlastnostmi a mají uplatnění v široké škále aplikací, včetně průmyslových či biomedicínských odvětví. PHA vykazují velkou strukturní různorodost, jsou biokompatibilní, zcela biologicky odbouratelné, snadno zpracovatelné a netoxické. Vyšší cena surovin může omezovat jejich masovou výrobu, ale udržitelnost s biodegradabilitou vzbuzují stále větší zájem jako alternativa syntetických plastů [16]. Díky těmto vlastnostem mají vysoký potenciál v lékařských aplikacích, například jako jsou nano- a mikro-nosiče pro řízené uvolňování léků. Mechanické a tepelné vlastnosti polyhydroxyalkanoátů mohou být ovlivňovány pomocí koncentrace jednotek poly(3-hydroxyvalerátu) (3HV) v kopolymerech. Pokud má poly(3-hydroxybutyrát-co-3hydroxyvalerát (P(3HB-co-3HV)) vyšší obsah 3HV, povede to k nižší krystalinitě a tím pádem k vyšší flexibilitě a pevnosti [17].

Tepelné vlastnosti polyhydroxyalkanoátů se vyjadřují pro amorfni část pomocí teploty skelného přechodu (T_g) a pro krystalickou část pomocí teploty tání (T_m), kvůli částečně krystalickým vlastnostem PHA. *Mcl*-PHA jsou obecně elastické s nízkou krystalinitou, na rozdíl od *scl*-PHA, které jsou tuhé, křehké s vysokou krystalinitou. Nejedná se ale o pravidlo, v případě *scl*-PHA má PHB modul pružnosti okolo 3,5 GPa a pevnost v tahu přibližně 40 MPa, zatímco poly(4-hydroxybutyrát) (P4HB) má modul pružnosti zhruba 0,15 GPa a pevnost v tahu asi 104 MPa [18]. Jelikož oba *scl*-PHA mají stejný počet uhlíkových atomů ve svých řetězcích, hlavní rozdíl je v poloze R-skupiny (alkyl). Tento rozdíl mění 3D strukturu polymeru, krystalinitu a tedy i mechanické vlastnosti polymeru [17, 19].

2.1.3 Biokompatibilita

Zajištění vysoké biokompatibility je důležité při vystavení lidského nebo zvířecího těla objektu, který se přirozeně nenachází v daném organismu. Biomateriály mohou být v kontaktu s tkáněmi lidského těla, aniž by vyvolávaly negativní reakce organismu, jako je například trombóza nebo alergické reakce. Biokompatibilita je primárním požadavkem pro použití syntetických a přírodních polymerů v biomedicíně. Kromě toho by biomateriály neměly být toxické a neměly by uvolňovat žádné alergenní degradované složky [20]. Biokompatibilitu PHA ovlivňují faktory jako je jejich složení, tvar, poréznost, prostředí, ve kterém se objekt nachází, ale i degradace. Biomateriály se používají v různých lékařských aplikacích, jako je tkáňové inženýrství, nanotechnologie a biotechnologie pro lékařské účely. Některé monomery začleněné do polymerového řetězce se vyskytují přirozeně v lidském těle, z čehož také plyne biokompatibilita PHA. Příkladem je (*R*)-3-hydroxybutyrová kyselina, která se již vyskytuje v lidské krvi [6, 21].

2.1.4 Extrakce PHA

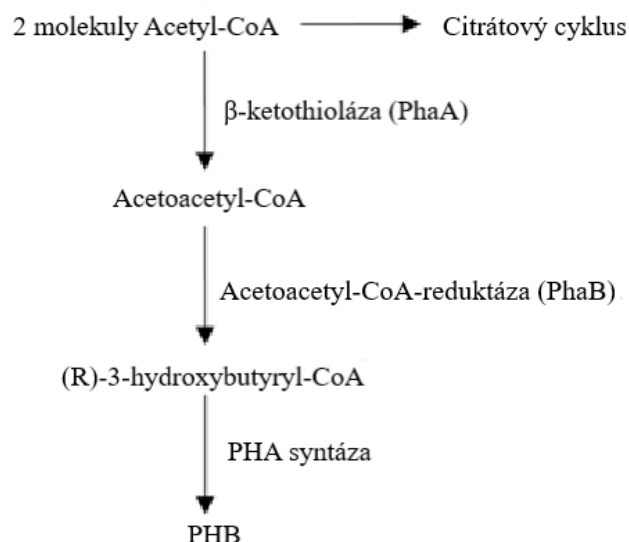
Extrakce je definována jako proces oddělení požadovaného produktu od buněk po kultivaci. Proces extrakce do značné míry závisí na druhu použitého mikroorganismu, substrátu a následném zpracování. Jelikož PHA je metabolický produkt mikroorganismu, po intracelulární syntéze PHA ve formě granulí, začíná extrakce rozpadem buněk a oddělením PHA od ostatních molekul. Při výběru metody pro zpracování hraje klíčovou roli křehkost

buněčné stěny, typ a množství produkovaného PHA, čistota polymeru a environmentální dopad. Po ukončení kultivace jsou buňky odděleny od živného média procesy jako jsou centrifugace, sedimentace a filtrace. Po této separaci biomasy, se většinou používají metody k oslabení buněčné stěny a usnadnění extrakce PHA z buněk za účelem zvýšení výtěžnosti a čistoty získaného materiálu. Mezi tyto metody mohou patřit vysoká teplota, lyofilizace, přidávání solí nebo sonikace. Kromě PHA obsahují mikrobiální buňky mnoho dalších složek, a to polypeptidy, lipidy, DNA, RNA a peptidoglykany. Tyto složky neobsahující PHA jsou označovány jako PHA neobsahující buněčná hmota (NPCM) nebo také reziduální biomasa. Hlavním cílem metody extrakce je získat PHA z NPCM s vysokou čistotou. NPCM může být odstraněna buď chemickým, enzymatickým nebo mechanickým působením. Extrakce PHA může být provedena různými metodami, například extrakcí rozpouštědly (chloroformem, 1,2-dichlormethanem, propylenem, ethylenem atd.), mechanickým rozrušením (vysokotlaková homoginizace) nebo dalšími technikami jako je extrakce superkritickými kapalinami [22, 23].

Ve studii od Yılmaz Nayır T a kol. [24] byla zkoumána extrakce PHA z aktivovaného kalu, rozrušením buněk CO₂ a získáním biopolymerů pomocí chloroformu. Byl zkoumán vliv hustoty buněk, času, tlaku, teploty a objemu methanolu na výtěžek. Experimenty pro akumulaci PHA byly prováděny ve 3 litrovém sekvenčním batch reaktoru, který byl provozován v režimu feast-famine. Anaerobně předupravená odpadní voda z kvasného průmyslu byla použita jako substrát pro aktivovaný kal. Rozpuštěný kyslík byl monitorován během provozu reaktoru a suspenze byla odebrána, když rozpuštěný kyslík vzrostl, což naznačovalo konec fáze feast (překrmení). Obsah PHB byl kvantifikován pomocí plynové chromatografie (GC-FID) jako mg PHB na mg biomasy. Biomasa, která byla použita pro všechny experimenty extrakce obsahovala mezi 20 % a 27 % PHB. Rozrušením 2 g biomasy při tlaku 20 MPa po dobu 15 minut při 40 °C bylo extrahováno 0,13 g biopolymeru/g biomasy. Účinnost uvolnění byla 80 % a čistota PHB činila 80 %. Srovnání extrahovaných biopolymerů s komerčním PHB, pomocí analýzy FTIR (infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací) a TGA (termogravimetrická analýza), mělo obdobné výsledky. Oproti standardnímu postupu extrakce s rozpouštědlem dimethylkarbonátem a CO₂, bylo pozorováno zlepšení chemických a tepelných vlastností při přidání methanolu do procesu s CO₂ [24].

2.1.5 Biosyntéza PHA

PHA jsou syntetizovány několika enzymatickými reakcemi z acetyl-CoA, které katalyzují substrátově specifické syntázy PHA umístěné v cytosolu buňky, kde dochází k akumulaci PHA. Biosyntéza nejčastěji se vyskytujícího typu PHA, probíhá ve třech krocích a začíná acetyl koenzymem A. Dvě molekuly acetyl-CoA jsou kondenzovány na acetoacetyl-CoA, a katalyzovány enzymem β -ketothiolázou (PhaA). Acetoacetyl-CoA je následně redukován acetoacetyl-CoA-reduktázou (PhaB) na (*R*)-3-hydroxybutyryl-CoA za použití NADPH jako kofaktoru. Konečný krok je katalyzován PHA syntázou, kde (*R*)-3-hydroxybutyryl-CoA je polymerizován na PHB za současného uvolnění koenzymu A (Obrázek 4) [5, 12, 25, 26].



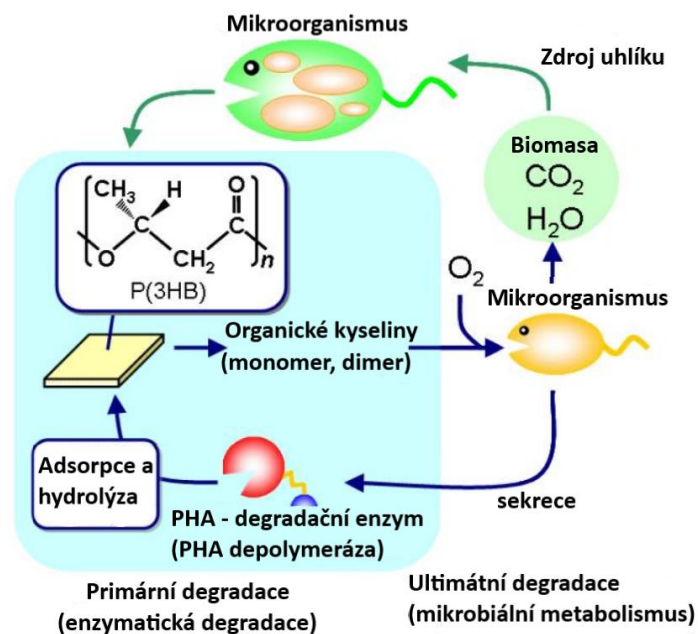
Obrázek 4: Metabolická dráha biosyntézy PHA, převzato a upraveno [27]

PHA syntázy se dělí do čtyř tříd na základě počtu podjednotek, aminokyselinové sekvence a specifity substrátu. Třídy I, III a IV polymerizují monomery krátkého řetězce (scl) (C3–C5), zatímco PHA syntáza třídy II využívá monomery středně dlouhého řetězce (mcl) (C6–C14). PHA syntázy které patří do třídy I a II se skládají pouze z jedné podjednotky, zatímco PHA syntázy třetí a čtvrté třídy vyžadují dva typy podjednotek. PHA syntáza používá (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA jako substrát pro syntézu PHA [5, 12, 25, 26].

2.1.6 Biodegradace PHA

Biodegradace je proces, při kterém jsou organické látky, například polymery rozkládány pomocí mikroorganismů. Biodegradaci plastů v životním prostředí, ovlivňuje chemická struktura, krystalinita, složitost a délka daného polymerového řetězce. Polymery s kratším řetězcem a jednodušší strukturou, jsou více náchylné k biodegradaci mikroorganismy. Důležitou roli při biodegradaci má prostředí, ve kterém jsou polymery umístěny nebo likvidovány. Mezi nejvýznamnější faktory ovlivňující biodegradaci, patří pH, teplota, vlhkost a obsah kyslíku [28].

Biodegradace polymerů probíhá ve třech krocích. Modifikace mechanických, chemických a fyzikálních vlastností polymeru v důsledku růstu mikroorganismů na povrchu nebo uvnitř polymerů, je prvním krokem biodegradace, který se nazývá biodeteriorace. Druhým následujícím krokem je biofragmentace, která způsobuje působením mikroorganismů přeměnu polymerů na oligomery a monomery. Třetím krokem biodegradace je asimilace. Při asimilaci jsou z fragmentovaných polymerů dodávány mikroorganismům zdroje uhlíku, živiny a energie. Tyto mikroorganismy poté přeměňují uhlíky z plastu na oxid uhličitý a vodu, a tím dochází k vzrůstu biomasy (Obrázek 5) [29].



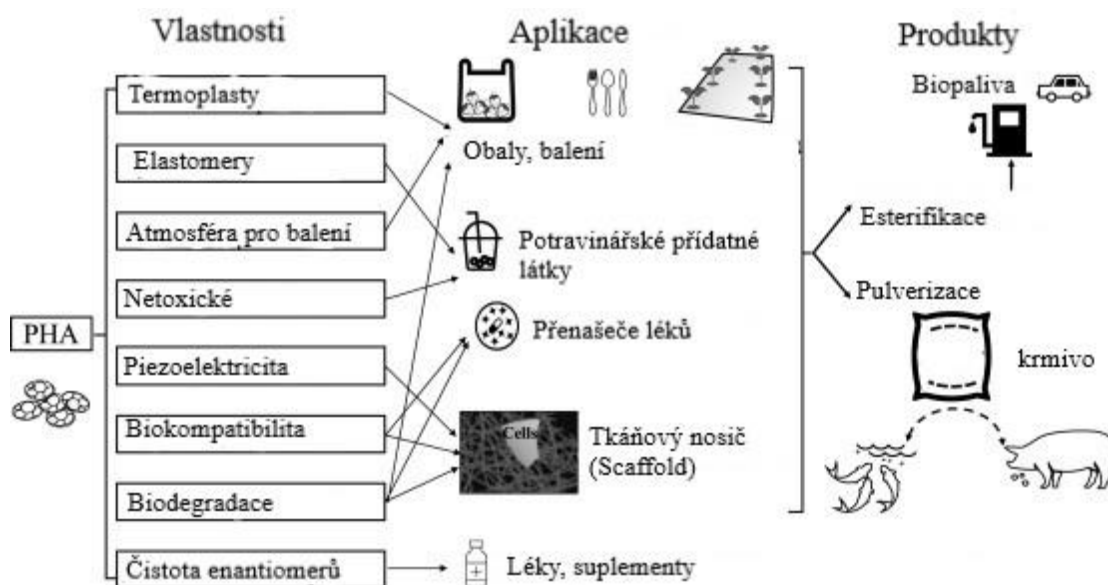
Obrázek 5: Biosyntéza a biodegradace PHA v přírodním prostředí, převzato a upraveno [30]

Ve studii od M. Fernandes a kol. [31] zkoumali biodegradabilitu dvouvrstvého filmu PHB s poly(butylénadipát-*co*-tereftalátem) (PBAT). Směsi PHA s jinými polymery, jako je PBAT, vykazují významná zlepšení vlastností, která jim umožňují splnit požadavky pro obalové aplikace. Biodegradabilita těchto směsí by však měla být testována, aby bylo možné vyhodnotit dopad těchto polymerů na životní prostředí. Například PBAT je kompostovatelný alifaticko-aromatický kopolyester, a jeho biodegradace v přírodních prostředích, jako je půda, je málo prozkoumána, proto v této studii byla hodnocena biodegradace dvouvrstvého filmu složeného z PHB a PBAT půdním mikrobiomem. Dvouvrstvý film dosáhl 47 ± 1 % mineralizace za 180 dní a PHB již po tomto období nebylo detekováno. Zvýšená krystalinita zbytkového PBAT byla znakem biodegradace, což naznačuje, že amorfní oblasti byly přednostně biodegradovány. Bylo izolováno několik mikroorganismů z toho 3 druhy byly úzce příbuzné *Streptomyces coelicoflavus*, *Clonostachys rosea* a *Aspergillus insuetus*, které byly poprvé nalezeny jako mikroorganismy degradující PHB. Dále byly izolovány a identifikovány dva druhy hub *Purpureocillium lilacinum* a *Aspergillus pseudodeflectus*, které degradují PBAT. Dvouvrstvý film degradoval o téměř 50 % během 6 měsíců. PHB bylo pravděpodobně úplně degradováno, a PBAT vykazovalo známky biodegradace během časového průběhu experimentů. Tato zjištění ukazují, že dvouvrstvý film může být biodegradován v půdě za mezofilních teplot, což ukazuje jeho potenciál nahradit syntetické plasty v obalech pro potraviny [31].

2.2 Využití PHA

PHA mají široké využití v zemědělství, akvakultuře a zdravotnictví díky svým biodegradabilním a biokompatibilním vlastnostem (Obrázek 6). Jejich ekonomická hodnota spočívá v tom, že po použití není nutné je likvidovat náročnými procesy jako syntetické plasty, což snižuje množství produkovaného odpadu. V zemědělství se PHA používají k ochraně rostlin a výrobě mulčovacích folií. V oblasti zdravotnictví slouží jako nosiče léčiv, používají se k rekonstrukci orgánů nebo k výrobě umělé kůže. *In vitro* studie byly důkladně zkoumány k potvrzení biokompatibility a nepřítomnosti cytotoxicity materiálů PHA. Byly testovány elementární typy fibroblastů, osteoblastů, chondrocytů, keratinocytů a hepatocytů. Jak již bylo zmíněno v kapitole biokompatibilita, tak biokompatibilní charakteristika polymerů PHA je

způsobena 3-hydroxybutyrovou kyselinou, která je produkována metabolismem buněk a existuje v lidské krvi v koncentracích 0,3–1,3 mM [20, 32].



Obrázek 6: Schéma využití PHA, převzato a upraveno [33]

2.2.1 Systémy dodávání léčiv

Systémy dodávání léčiv byly vytvořeny k obalení aktivní farmaceutické složky (geny, léky atd.) a zajištění jejího kontrolovaného uvolňování na cílovém místě. Pro přípravu biomedicínských materiálů bylo použito mnoho materiálů, včetně přírodních polymerů, syntetických polymerů, nebo jejich směsí. Systém dodávání léčiv z biologicky odbouratelných polymerů se rozkládá na sloučeniny, které mohou být z těla vyloučeny. PHA lze tvarovat do porézních matic, mikrosfér, mikrokapsulí a nanočástic. Systémy dodávání založené na mikrosférách nebo mikrokapsulích byly široce použity k dodávání několika léčiv, jako jsou antibiotika, anestetika, hormony, protizánětlivé látky a vakcíny [32].

2.2.2 Obaly potravin

Biodegradabilní polymery se mohou rozkládat na přírodní látky, jako je voda, oxid uhličitý a methan, pomocí mikroorganismů. Mezi příklady patří bio-termoplasty, mezi které se řadí PHA a přírodní polymery, jako jsou polysacharidy a proteiny. Ačkoli nejsou tak odolné jako tradiční plasty, tyto přírodní polymery nabízejí výhody v podobě udržitelnosti a schopnosti biodegradace. Některé problémy, kterým čelí biopolymerní materiály, zahrnují nižší odolnost vůči vlhkosti, nízkou tepelnou odolnost, sníženou mechanickou pevnost a vyšší náklady ve srovnání s tradičními termoplasty. Za pomoci modifikace, jako je plastifikace, kombinace s nanomateriály nebo výroba vícevrstvých konstrukcí, se dá dosáhnout požadovaných funkčních vlastností pro různé aplikace v oblasti balení potravin [34].

Od 90. let se aplikace PHA v obalovém průmyslu rozšířila o obalové folie, nákupní tašky, víčka a kelímky. PHA mohou být také využity jako vnitřky papírových kelímků, čímž se umožní recyklace kelímků, které jsou v současnosti vyloženy polyethylenem. Určité polymerní materiály PHA vykazují vynikající schopnosti bariéry proti plynu, což je činí vhodnými pro balení potravin a nápojů. Antibakteriální vlastnosti PHA vedou k rostoucímu zájmu o jejich využití v kosmetickém průmyslu například jako kosmetické obaly či hygienické pomůcky. Kromě toho jsou PHA vhodné i pro materiály podobné latexu či teplotně citlivá lepidla [35].

Modifikací PHB začleněním jednotek 3HV se získá kopolymer poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) (PHBV), který má ve srovnání s PHB nižší krystalinitu a nižší teploty tání a skelného přechodu, což umožňuje jeho použití jako fólie v potravinářství. Ve studii od Y.K. Dasan a kol. [36] byla změřena bariéra proti kyslíku PHBV na $0,217 \text{ cm}^3$, což je vhodná hodnota pro balení potravin. PHBV má také bariéru proti kyslíku a vodní páře, což je vhodné pro balení potravin a prodlužuje trvanlivost spotřebitelských produktů. PHB se využívá také pro výrobu brček [35, 36].

2.3 Extremofilní bakterie

Bakterie jsou mimořádně flexibilní mikroorganismy, které se vyvinuly k přežití v rozmanitých extrémních podmínkách. Díky genetické variabilitě a jejich schopnosti rychle reagovat na změny v prostředí, se bakterie mohly přizpůsobit všem oblastem Země, což ukazuje na jejich odolnost a vynikající schopnost adaptace na extrémní podmínky. Extrémní podmínky, jako jsou vysoké teploty, nízké teploty, vysoký tlak, vysoká salinita nebo extrémní sucho, představují prostředí, na které se bakterie přizpůsobily [37]. Extremofily mohou být klasifikovány podle podmínek, které jsou pro ně optimální. Extremofily se dělí na termofily (mezi $45\text{--}80 \text{ }^\circ\text{C}$), hypertermofily (při teplotách vyšších jak $80 \text{ }^\circ\text{C}$), psychrofilny (extrémně nízké teploty), acidofily (nízké pH), alkalofily (vysoké pH) a halofily (vysoká salinita) [38].

Mikroorganismy z extrémních prostředí prokázaly schopnost produkovat polyhydroxyalkanoáty (PHA), a to je činí atraktivními kandidáty pro biotechnologické aplikace a udržitelnou výrobu bioplastů. Hromadění PHA v buňkách extremofilních bakterií slouží jako zásobárna uhlíku a energie. PHA také napomáhá při přizpůsobování se stresovým podmínkám (např. tlak, teplota, salinita) [3].

2.3.1 Termofilní bakterie

Mikroorganismy, které vyžadují vysoké teploty ke svému životu se označují jako termofily. Termofilní bakterie rostou při teplotách nad $45 \text{ }^\circ\text{C}$ a jejich optimální růstová teplota se pohybuje okolo $50\text{--}55 \text{ }^\circ\text{C}$. Tyto organismy obývají různé ekosystémy, jako jsou hlubokomořské průduchy, termální prameny nebo sopky. K adaptaci na tyto prostředí si vyvinuly termofilní mikroorganismy jedinečné mechanismy, jako je adaptace termofilních proteinů pomocí změn aminokyselin v jejich primární struktuře. Tím termofily chrání své buněčné komponenty při vysokých teplotách zvýšením jejich tepelné stability. Termofilní proteiny mají kratší délku aminokyselin s více aminokyselinovými zbytky v α -helixech. Jedním z hlavních mechanismů u termofilů je role teplotních šokových proteinů (Heat shock proteins – HSPs), včetně chaperonů DnaK, GroEL a GroES, které napomáhají při skládání proteinů. Pro stabilizaci membrán termofily používají větvené mastné kyseliny a polyaminy. Kromě glykolýzy proteiny poskytují okamžitou energii pro zvládnání teplotního stresu [7, 37, 39].

2.3.2 *Caldimonas thermodepolymerans*

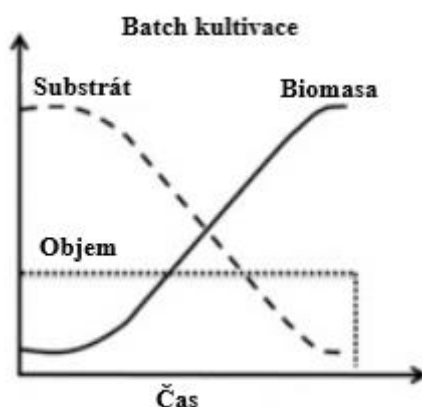
Caldimonas thermodepolymerans byla v literatuře nejdříve popsána pod vědeckým jménem *Schlegelella Thermodepolymerans* [40]. *Caldimonas thermodepolymerans* je tyčinkovitá, termofilní, gramnegativní, aerobní bakterie, která nevytváří spory. Teplotní rozsah pro růst této bakterie je okolo $37\text{--}60 \text{ }^\circ\text{C}$ s optimem přibližně $50\text{--}55 \text{ }^\circ\text{C}$. Tento kmen bakterií tvoří bílé, hladké kolonie na komplexních mediích při teplotách $45\text{--}50 \text{ }^\circ\text{C}$, s optimálním pH 7. Typovým kmenem je kmen K14^T (=LMG 21644^T=DSM 15344^T), a druhým typovým kmenem je DhA-71 (=LMG 21645) [16, 41].

2.4 Kultivační strategie

Mezi hlavní kultivační strategie patří batch neboli vsádková kultivace, fed-batch neboli přítoková vsádková kultivace, nebo také kontinuální kultivace. Aby byl proces kultivace efektivní, měli by se zvážit některé důležité faktory, jako jsou náklady na média a živiny, délka procesu a také výtěžnost a kvalita produktu. Kultivační médium je také ovlivněno koncentracemi živin spojených s růstem. Důležité jsou rovněž některé vedlejší produkty v médiu [42].

2.4.1 Batch (vsádková) kultivace

Pro batch kultivaci je typické, že objem kultury během kultivace zůstává neměnný. Během kultivace mikroorganismy spotřebovávají živiny v médiu a vytvářejí vedlejší produkty, což postupně zpomaluje jejich růst, a to vede k přechodu do stacionární růstové fáze. Batch kultivace patří mezi nejvíce používané kultivační procesy. Jedná se o proces, při kterém jsou přidány všechny živiny a substráty v čase nula, nebo krátce po přidání inokula. Není třeba během této kultivace přidávat živiny, proto objem média zůstává konstantní. Během kultivace se optimalizují parametry procesu jako je teplota, pH a kyslík (aerobní nebo anaerobní kultivace). Obecně je rychlost růstu buněk nejvyšší na začátku batch kultivace, jelikož všechny živiny pro růst mikroorganismů jsou přidány v čase nula a během kultivace se už nepřidávají. Pokles růstu buněk bývá nejčastěji způsoben vyčerpáním substrátu v médiu (Obrázek 7) [42, 43].



Obrázek 7: Graf batch kultivace, převzato a upraveno [43]

Pro produkci ethanolu jsou často využívány batch kultivace, o této produkci se zmiňuje například studie od Mohammad Emal Qazizada [44], kde bylo cílem zvýšit výkonnost kultivačního procesu pomocí vsádkového míchacího bioreaktoru pro výrobu ethanolu s kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* za anaerobních podmínek. Během kultivace byla koncentrace glukózy 200 g/l a doba kultivace činila 11,4 hodin s odstraněním ethanolu (69,1 g/l) a 12 hodin bez odstranění ethanolu (75,9 g/l). Vysoká koncentrace glukózy (200 g/l) v dávkovém míchacím bioreaktoru byla převedena na ethanol. Tyto dosažené výsledky ve vsádkovém míchacím bioreaktoru s vysokou koncentrací substrátu jsou slibné pro návrh bioreaktoru většího měřítka pro výrobu ethanolu s vysokou koncentrací [44].

Ve studii od Qiuyue Tao a kol. [45] byl použit toxický aromatický fenol jako zdroj uhlíku. Byl porovnán vliv batch, fed-batch a kontinuální kultivace na produkci PHA za pomoci fenolu. Toxicitu fenolu během batch kultivace způsobila inhibice, což vedlo k poklesu míry syntézy

PHA. Nicméně batch kultivace dosáhla nejvyššího obsahu PHA v buňkách, a to více než 50 %. Použití kontinuálního režimu také snížilo toxicitu fenolu, ale vedlo to k vyšší syntéze NPCM. U fed-batch kultivace došlo k menší inhibici a k nejvyšším výtěžkům PHA, přičemž 1/3 organického uhlíku fenolu byla fixována do produktu PHA, tudíž fed-batch kultivaci pro produkci PHA za pomoci fenolu má vysoký potenciál v budoucích aplikacích [45].

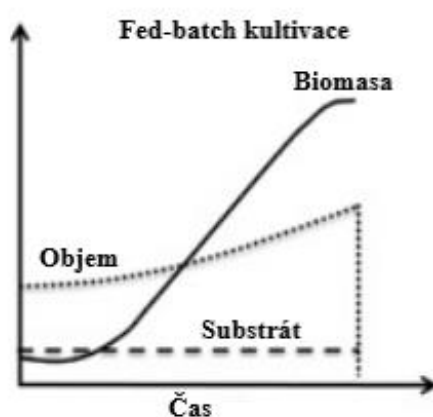
2.4.2 Repeated batch kultivace

U repeated batch kultivace se část mikrobiální kultury nahrazuje čerstvým médiem. Mezi výhody tohoto procesu patří nižší náklady, eliminace časově náročných kroků jako je příprava inokula, očkování, čištění a sterilizace mezi jednotlivými cykly kultivace [46].

Ve studii od Khanna a kol. [47] bylo cílem zkoumat bakterii *Cupriavidus necator* NRRL B14690 pomocí batch a repeated batch kultivace. Pomocí batch kultivace dosáhli 21 g/l biomasy a 9,4 g/l PHB. Výtěžnost byla 0,45 g PHB na g sušiny. Během repeated batch kultivace bylo odstraněno 20 % kultury, která byla následně nahrazena stejným objemem nového média. Za 67 h bylo dosaženo 49 g/l biomasy a 25 g/l PHB. Během dvou cyklů repeated batch kultivace dosáhli trojnásobné produktivity oproti batch kultivaci [47].

2.4.3 Fed-batch (přítoková vsádková) kultivace

Při fed-batch kultivaci je substrát přidáván postupně do bioreaktoru, bez odebírání kultury. Jakmile mikroorganismy spotřebují veškerý substrát a živiny v kultivačním médiu, jsou do bioreaktoru přidány další substráty a živiny tudíž se prodlužuje fáze aktivního růstu. Pokud je do bioreaktoru dodáno více substrátu, než kolik jej mikroorganismy dokážou využít, začne se substrát hromadit a při dosažení vysokých koncentrací může potenciálně bránit růstu biomasy, buď přímo, nebo syntézou inhibičních metabolitů. U fed-batch kultivace obvykle dochází k hromadění biomasy, což je výhodné v případech, kdy je cílem získat vysoké hustoty buněk a produktů. Substrát není během procesu přidáván v nadbytku a hromadění vedlejších produktů je limitováno, proto jsou výtěžky produktu i biomasy na jednotku přidaného substrátu zvýšeny (Obrázek 8) [42].



Obrázek 8: Graf fed-batch kultivace, převzato a upraveno [43]

Studie od Cui a kol. [48] ukazuje možnost zvýšení produkce PHB použitím termofilní bakterie *Chelatococcus daeguensis* TAD1, kdy glycerol sloužil jako substrát. Bylo zjištěno, že nadbytek glycerolu inhibuje akumulaci PHB a organické zdroje dusíku, jako je trypton a kvasničný extrakt, podporují růst *Chelatococcus daeguensis* TAD1. Bylo zjištěno, že použití glycerolu

v nízkých koncentracích, jako jediného zdroje uhlíku spolu s přidáním směsi dusíku (NH_4Cl , trypton a kvasničný extrakt) podporuje akumulaci PHB u *C. daeguensis* TAD1. Výsledky ukázaly, že nejvyšší produktivita PHB byla pozorována při dvoukrokové fed-batch kultivaci, naopak nižší produktivitu vykazovala fed-batch kultivace, a nejnižší produktivita ze zmíněných kultivačních strategií byla pozorována u batch kultivace [48].

Ve studii od Chen a kol. [49] bylo cílem zkoumat bakterii rodu *Thermus* ATCC 27978 pomocí batch a fed-batch kultivace s BTEX (BTEX – benzen - toluen - ethylbenzen - xylen) degradační aktivitou. *Thermus* ATCC 27978 je termofilní bakterie s optimální růstovou teplotou okolo 60 °C. Tato bakterie je schopná aerobního rozkladu benzenu, toluenu, ethylbenzenu a xylenu. Byly testovány 2 způsoby kultivace v bioreaktoru, batch a fed-batch kultivace. Pomocí fed-batch kultivace vzniklo více biomasy a také byla pozorována vyšší BTEX degradační aktivita než pomocí batch kultivace [49].

Ve studii od Ibrahim a kol. [50] byla zkoumána termofilní bakterie *Chelatococcus* MW10, která produkuje PHB. Cílem bylo dosáhnout růstu s vysokou hustotou buněk a vysoké produkce PHB. Cyklická fed-batch kultivace (CFBF) byla prováděna v objemu 42 litrů. Začátek kultivace byl proveden pomocí batch kultivace s koncentrací 30 g /l glukózy. Po 44 h byl zahájen první cyklus, kdy ještě nedocházelo k degradaci PHB. Bylo odebráno 5 litrů kultury, která byla následně nahrazena stejným množstvím čerstvého minerálního média (MSM). Během druhého cyklu bylo odebráno 10 litrů kultury a bylo přidáno jen 5 litrů čerstvého média, aby se zabránilo nadměrnému ředění, které by mohlo ovlivnit růstovou rychlost a akumulaci vedlejších produktů. Po 14 hodinách ve třetím cyklu, bylo doplněno zbývajících 5 litrů čerstvého MSM. Nejvyšší obsah PHB byl dosažen během druhého cyklu s množstvím $16,8 \pm 4,2$ g/l PHB. Na konci CFBF po 265 hodinách, bylo dosaženo vysoké hustoty buněk, a to až $115,0 \pm 4,3$ g/l biomasy [50].

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

- Příprava kryozkumavek: glycerol (Lach-ner, Česká republika)
- Chemikálie použité pro přípravu produkčního media:
 - Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (Lach-ner, Česká republika)
 - Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-ner, Česká republika)
 - Chlorid amonný (Lach-ner, Česká republika)
 - Síran hořečnatý heptahydrát (Lach-ner, Česká republika)
 - Chlorid vápenatý dihydrát (Lach-ner, Česká republika)
 - Citrát železito-amonný (Fluka, Švýcarsko)
 - Kvasničný extrakt (HiMedia Laboratories, Indie)
 - TES II:
 - Chlorid železitý
 - Chlorid zinečnatý
 - Chlorid měďnatý dihydrát
 - Chlorid kobaltnatý hexahydrát
 - Chlorid manganatý hexahydrát
 - Kyselina boritá
 - Xylóza
- Chemikálie použité pro přípravu inokula:
 - Nutrient broth w/1% peptone (HiMedia Laboratories, Indie)
- Chemikálie pro přípravu vzorků na GC:
 - Chloroform (Lach-ner, Česká republika)
 - Roztok s interním standardem (kyselina sírová, methanol, kyselina benzoová)
 - Hydroxid sodný (Lach-ner, Česká republika)
 - Izopropylalkohol (Lach-ner, Česká republika)
- Chemikálie na stanovení redukcí cukrů:
 - Činidlo DNS (3,5-dinitrosalicilová kyselina, hydroxid sodný, vinan sodno-draselný)

3.2 Použité přístroje

- Běžné laboratorní sklo
- Analytické váhy, Ohaus Pioneer PA224C
- Předvážky Kern EW 620-3NM
- Laminární box Aura mini, BioAir-Euroclone
- Magnetická míchačka MMS-3000, Biosan
- Inkubátor třepací ZWYR-D2401, Labwit
- Stolní centrifuga EBA 200, Hettich
- Stolní centrifuga EBA 20 C, Hettich
- Vortex, Benchmark Scientific
- pH metr, pH 50+ DHS XS
- Termoblok, Stuart SBH200D
- Plynový chromatograf s FID, Thermo Scientific Trace 1300
- Nanofotometr, IMPLN P300

3.3 Kultivace

K práci byla použita termofilní bakterie *Caldimonas thermodepolymerans* se sbírkovým číslem DSM 15344. Bakterie byla uchovávána v kryozkumavkách připravených za pomoci 30% roztoku glycerolu. Do kryozkumavky o objemu 1,8 ml bylo napipetováno 0,5 ml glycerolu a 1 ml kultury. Následně byly kryozkumavky zamrazeny při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Glycerol sloužil jako kryoprotektant, který chránil buňky před vystavením nízkým teplotám.

Pro přípravu inokula bylo naváženo 2,5 g Nutrient broth w/1% peptone (NB) (o koncentraci 25 g/l) a smícháno se 100 ml destilované vody. Do dvou Erlenmeyerových baněk o objemu 100 ml bylo vždy nalito 50 ml připraveného roztoku. Erlenmeyerovy baňky byly následně vysterilizovány a vloženy do termostatu o teplotě $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Inokula byla připravována za pomoci předem připravených kryozkumavek ve sterilním prostředí očkovacího boxu. Inokula o teplotě $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ byla zaočkována v očkovacím boxu, a to 750 μl z kryozkumavky.

Potřebné množství minerálního média bylo připraveno navážením požadovaných chemikálií: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (9 g/l), KH_2PO_4 (1,5 g/l), NH_4Cl (1 g/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/l), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,02 g/l), $\text{NH}_4\text{Fe}^{(\text{III})}$ citrát (0,0012 g/l), kvasničný extrakt (0,5 g/l). Takto připravené médium bylo vždy rozlito po 100 ml do 250 ml Erlenmeyerových baněk a následně bylo vysterilizováno a ponecháno v termostatu při teplotě $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté po 20 hodinách od zaočkování inokula bylo přidáno potřebné množství xylózy a roztok stopových prvků TES II (1 ml/l), který se skládá z: EDTA (50 g/l), FeCl_3 (8,3 g/l), ZnCl_2 (0,84 g/l), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,13 g/l), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g/l), $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,016 g/l), H_3BO_3 (0,1 g/l). Následně byla média o objemu 100 ml zaočkována vždy 5 ml připraveného inokula.

3.4 Kultivační strategie

V této práci byly použity 3 kultivační strategie, mezi které patří batch kultivace, fed-batch kultivace a repeated batch kultivace.

3.4.1 Batch kultivace

Nejprve bylo připraveno produkční médium, spolu s inokulem. Takto připravené Erlenmeyerovy baňky byly vysterilizovány a uloženy do termostatu při teplotě $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Každé inokulum bylo zaočkováno 750 μl z předem připravených kryozkumavek a následně byla inokula vložena na třepačku. Do připravených Erlenmeyerových baněk s minerálním médiem, ve sterilním prostředí očkovacího boxu, byla po 20 hodinách přidána xylóza v koncentracích 10, 20, 30, 40 a 50 g/l, přičemž každá koncentrace xylózy byla v duplikátu. Dále bylo do připravených produkčních médií přidáno 100 μl roztoku TES II. Připravená inokula byla slita dohromady a následně do produkčních medií bylo přidáno 5 ml takto připraveného inokula. Takto zaočkováná média byla vložena na třepačku, teplota byla udržována na $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a kultivace probíhala 72 hodin za konstantního míchání při 160 rpm.

3.4.2 Fed-batch kultivace

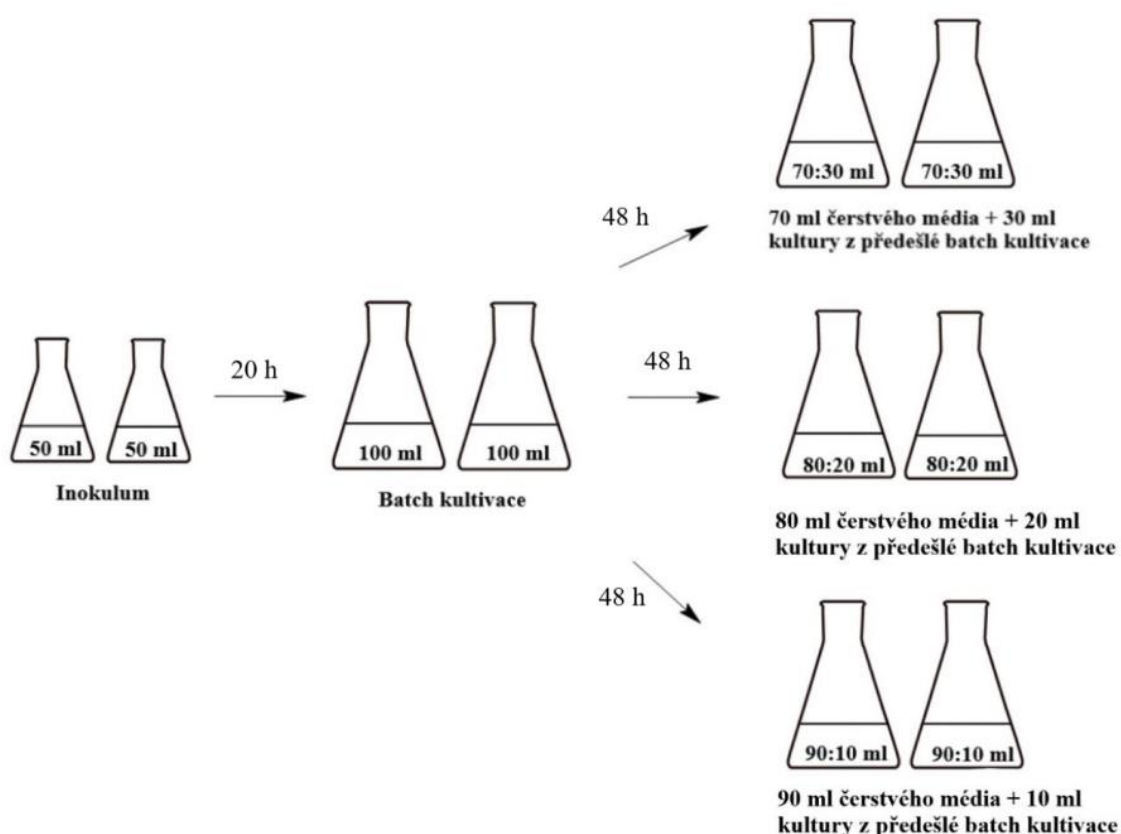
V případě fed-batch kultivace byla xylóza přidávána postupně. Prvním případem fed-batch kultivace byla kultivace na tři kroky, to znamená že se dané množství xylózy přidávalo třikrát v průběhu kultivace, konkrétně v čase nula, 24 hodin a 48 hodin, na rozdíl od batch kultivace, kdy se dané množství xylózy přidalo najednou. Během fed-batch kultivace na tři kroky byla použita celková koncentrace xylózy v koncentracích 10, 20, 30, 40 a 50 g/l. V čase nula bylo přidáno do minerálního média 100 μl roztoku TES II a následně byla přidána první třetina

xylózy. Posléze byla média zaočkována pomocí inokula. Všechny koncentrace byly v duplikátu. Takto připravená média byla uložena na třepačce (160 rpm) při teplotě 50 °C a kultivace probíhala celkově 72 hodin.

Jako druhá byla provedena fed-batch kultivace na dva kroky, z čehož vyplývá že pro danou koncentraci se dané množství xylózy rozdělilo na dvě stejné části a v tomto případě se přidávalo dané množství xylózy v čase nula a 24 hodin. Během přípravy fed-batch kultivace na dva kroky byla opět xylóza přidána v celkových koncentracích 10, 20, 30, 40 a 50 g/l. V čase nula bylo přidáno 100 μ l roztoku TESS II a první část xylózy. Média byla zaočkována. Objem xylózy byl následně přidán ještě po 24 hodinách. Všechny koncentrace byly opět v duplikátu. Takto připravená média byla vložena na třepačku (160 rpm) při teplotě 50 °C. Kultivace probíhala 72 hodin.

3.4.3 Repeated batch kultivace

Jako první byla provedena repeated batch kultivace se třemi různými poměry média a kultury ze související batch kultivace dle schématu uvedeném na obrázku 9. Kultivace byla provedena konkrétně v poměrech 90:10, 80:20 a 70:30. Cílem kultivace bylo určit nejvhodnější poměr pro následnou dlouhodobější repaeted batch kultivaci.

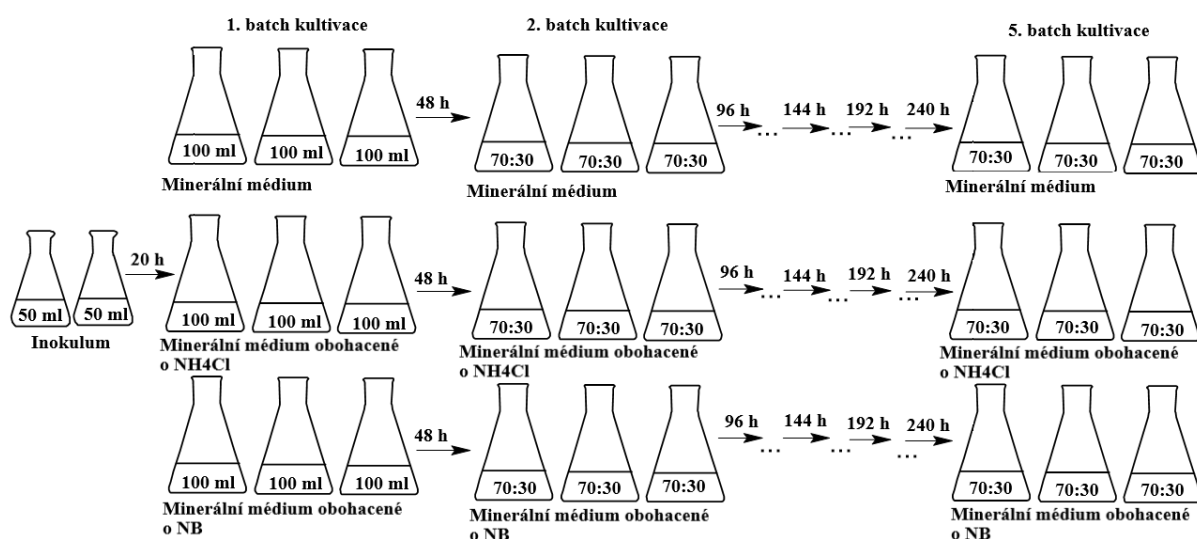


Obrázek 9: Schéma průběhu repeated batch kultivace

Nejdříve byla provedena klasická batch kultivace kdy minerální média byla obohacena roztokem stopových prvků a daným množstvím xylózy (20 g/l). Následně byla média zaočkována. Po 48 hodinách následoval jeden cyklus batch kultivace, kdy byla do minerálních médií o objemu 90, 80 a 70 ml obsahujících roztok TES II a dané množství xylózy (20 g/l), doplněna původní kultura. Tedy 10 ml kultury do 90 ml minerálního média, 20 ml kultury do

80 ml minerálního média, 30 ml kultury do 70 ml minerálního média. Kultivace probíhala v duplikátu. Takto připravená média byla vložena opět na třepačku (160 rpm) při teplotě 50 °C. Kultivace probíhala 72 hodin.

Jako následující byla provedena dlouhodobá repeated batch kultivace. Jako nejvhodnější poměr čerstvého média a předešlé kultury byl vybrán poměr 70:30, protože zde docházelo k nejvyšší výtěžnosti PHB. Pro kultivaci byly použity 3 druhy medií, konkrétně klasické minerální médium, které bylo použito v předešlých případech, následně minerální médium obohacené o NH₄Cl (3 g/l) a dále minerální médium obohacené o NB (1 g/l). Jako v předchozí kultivaci byla jako první provedena klasická batch kultivace. Minerální média byla obohacena roztokem stopových prvků a daným množstvím xylózy (20 g/l). Následně byla média zaočkována inokulem. Po 48 hodinách následovaly další batch kultivace, kdy byla kultura vždy přesazena do čerstvých medií o objemu 70 ml obsahujících roztok TES II a daný objem xylózy (20 g/l). Celkem bylo provedeno 5 cyklů batch kultivace, vždy po 48 hodinách. Kultivace probíhala v triplicáttech podle schématu (Obrázek 10). Během přesazování byl vždy proveden odběr 10 ml kultury pro další analýzu. V průběhu kultivace bylo měřeno pH a OD při 600 nm. Takto připravená media byla vložena opět na třepačku (160 rpm) při teplotě 50 °C. Kultivace probíhala 240 hodin.



Obrázek 10: Schéma průběhu dlouhodobé repeated batch kultivace

3.4.4 Stanovení biomasy

Během kultivace a na konci kultivace bylo odebráno z každé Erlenmeyerovy baňky 10 ml kultury do zkumavek určených pro centrifugaci. Následně byly zkumavky s danou kulturou centrifugovány při 6000 ot/min. Při rotaci v centrifuze došlo k oddělení pevné (biomasa) a kapalně (supernatant) části. Vzniklý supernatant byl odebrán do zkumavek a použit pro analýzu stanovení zbytkových cukrů pomocí dinitrosalicylové kyseliny (DNS). Ke zbylé biomase ve zkumavkách bylo napipetováno 10 ml destilované vody. Pomocí vortexu byla biomasa zhomogenizovaná a následně takto zhomogenizovaný obsah zkumavky byl vložen na centrifugu. Po centrifugaci byla zbylá voda slita, a biomasa ve zkumavce byla vložena do sušárny na 70 °C a usušena do konstantní hmotnosti. Tímto způsobem byla stanovena koncentrace biomasy v g/l. Takto připravená biomasa byla využita pro přípravu vzorků na analýzu plynovou chromatografií.

3.4.5 Stanovení zbytkových cukrů pomocí DNS

Pro přípravu kalibrační křivky byl připraven roztok xylózy o koncentraci 3 g/l. Následně z tohoto zásobního roztoku byla připravena kalibrační řada obsahující koncentrace 0,6; 1,2; 1,8; 2,4; 3 g/l xylózy. Z takto připravených roztoků se napipetovalo 0,5 ml roztoku do zkumavek, ke kterému bylo následně přidáno 0,5 ml činidla DNS. Současně byl připravován blank, do kterého se místo roztoku xylózy přidalo 0,5 ml destilované vody. Takto připravené vzorky byly vloženy do vodní lázně o teplotě 70 °C a inkubovány po dobu 10 minut. Po ukončení inkubace byly zkumavky s roztoky zchlazeny v temnu. Následně bylo přidáno 9 ml destilované vody, aby byl objem roven 10 ml. Nakonec byla změřena spektrofotometricky absorbance při 540 nm. Při měření zbytkových cukrů bylo místo destilované vody použito 0,5 ml vhodně naředěného supernatantu.

3.4.6 Stanovení PHB v biomase pomocí GC-FID

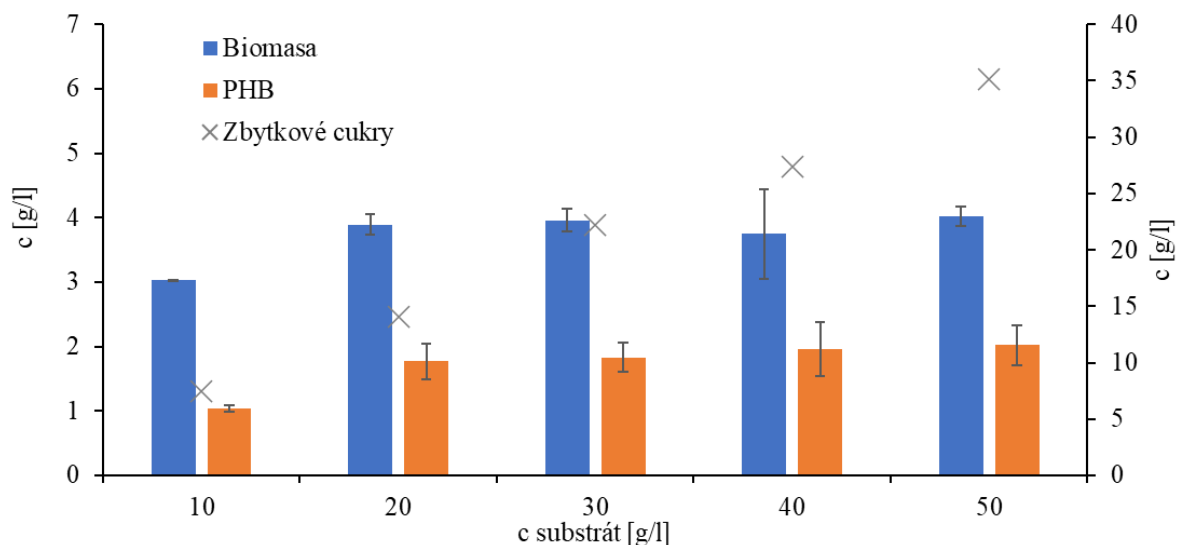
Pro stanovení PHB v biomase byla použita plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem. Jako první byla do vialek na analytických vahách navážena biomasa v množství mezi 8 a 11 mg. Do takto připravených vialek s biomasou byl přidán 1 ml chloroformu a 0,8 ml roztoku s interním standardem (kyselina benzoová). Esterifikační směs byla tvořena chloroformem a kyselinou sírovou s methanolem. Vialky byly uzavřeny a vloženy do termobloku po dobu 3 hodin a za teploty 94 °C. Mezitím bylo do větších vialek připraveno 0,5 ml 0,05 M NaOH. Do takto nachystaných vialek se po uplynutí 3 hodin přelil obsah vialek z termobloku. Následně byly vialky protřepány a došlo k vytvoření dvou fází, kde spodní fáze byla organická. Do nových vialek bylo připraveno 900 µl isopropylalkoholu a následně k nim bylo přidáno 50 µl spodní organické fáze. Tímto postupem byly připraveny vzorky na analýzu pomocí plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem.

4 Diskuze a výsledky

Experimentální část práce byla zaměřena na sledování vlivů různých kultivačních strategií na termofilní bakterii *Caldimonas thermodepolymerans* DSM 15344 se případnou snahou o zvýšení produkce PHB. Nejdříve byla provedena základní batch kultivace, aby bylo možné porovnat výsledky s dalšími kultivačními strategiemi.

4.1.1 Batch kultivace

Batch kultivace byla provedena v koncentracích xylózy 10, 20, 30, 40 a 50 g/l jak již bylo zmíněno výše. V případě koncentrace xylózy 10 g/l byl patrný nižší nárůst biomasy a také zastoupení PHB. V případě vyšších koncentrací substrátu byly však rozdíly minimální (Obrázek 11), kdy se množství biomasy pohybovalo mírně pod 4 g/l. To, že množství biomasy bylo téměř konstantní u posledních čtyř koncentrací, může souviset s tím, že bakterie vždy využije jen určité množství uhlíkatého zdroje a zbytek zůstane nevyužit. U zastoupení PHB lze pozorovat, že s vyšší koncentrací vznikalo více PHB, kdy nejméně PHB vzniklo při koncentracích 10 g/l (1,04 g/l PHB) a nejvíce PHB vzniklo při koncentracích 50 g/l (2,02 g/l PHB). Z toho lze vyvodit že při vzniku PHB zde nedocházelo k inhibici substrátem a bakterie není většími koncentracemi xylózy limitována. Toto lze využít při práci v bioreaktorech, kde budou mít mikroorganismy dostatek substrátu, což může vést k vyšší výtěžnosti produktu, protože při vyšších koncentracích substrátu nedojde k zastavení nebo zpomalení produkce.



Obrázek 11: Závislost koncentrace substrátu na koncentraci zbytkových cukrů, PHB a biomasy pro batch kultivaci

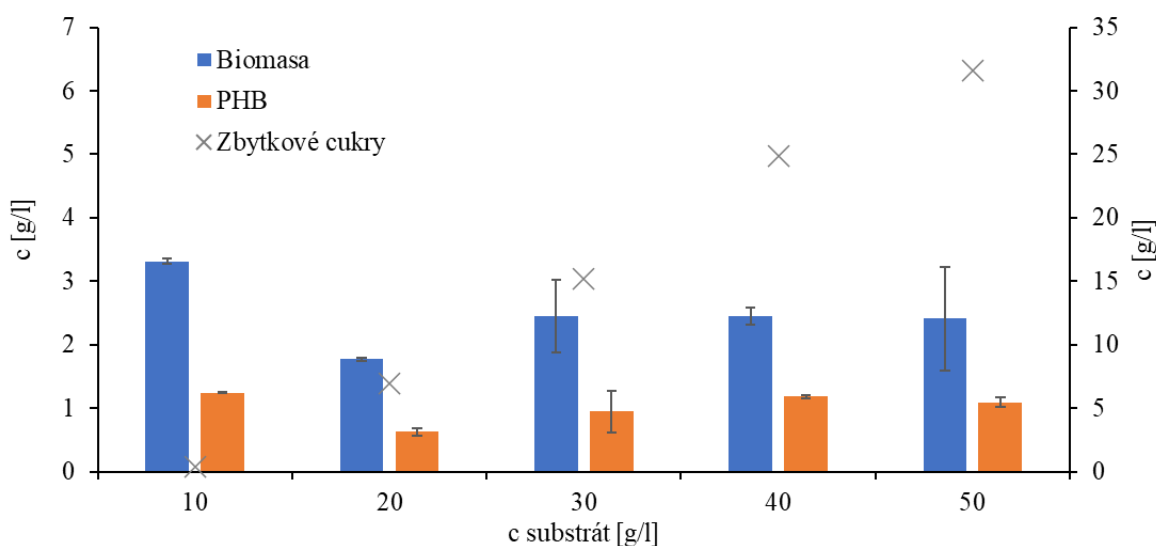
Zbytkové cukry (xylóza) pro batch kultivaci jsou uvedeny v tabulce 1. Procentuální úbytek xylózy se pohybuje v rozmezí 25-30 %. Z toho vyplývá, že bakterie dokáže využívat dostupnou xylózu bez toho, aniž by vyšší koncentrace xylózy negativně ovlivňovaly produkci PHB nebo růst biomasy. Lze pozorovat trend, kde bakterie vždy využije přibližně 30 % substrátu bez ohledu na původní koncentraci, to naznačuje že bakterie využívá jen potřebné množství xylózy (Obrázek 11).

Tabulka 1: Zbytkové cukry pro batch kultivaci

c (g/l)	zbytkový cukr (g/l)	% úbytek
10	7,4	25,7
20	14,1	29,5
30	22,2	26,1
40	27,4	31,4
50	35,1	29,8

4.1.2 Fed-batch kultivace

Fed-batch kultivace na tři kroky byla provedena v koncentracích xylózy 10, 20, 30, 40 a 50 g/l. U koncentrace xylózy 10 g/l byl patrný vyšší nárůst biomasy a také PHB. Koncentrace 20 g/l měla nejnížší množství biomasy a PHB. V případě vyšších koncentrací substrátu byly však rozdíly minimální (Obrázek 12), kdy se množství biomasy pohybovalo mírně pod 3 g/l. Lze pozorovat, že i když při koncentraci 10 g/l vzniklo nejvíce biomasy, zastoupení PHB v biomase bylo nižší než u vyšších koncentrací xylózy. Z toho lze usuzovat, že nižší koncentrace xylózy pozitivně ovlivňuje růst biomasy, zatímco vyšší koncentrace xylózy vedou k vyšší akumulaci PHB.



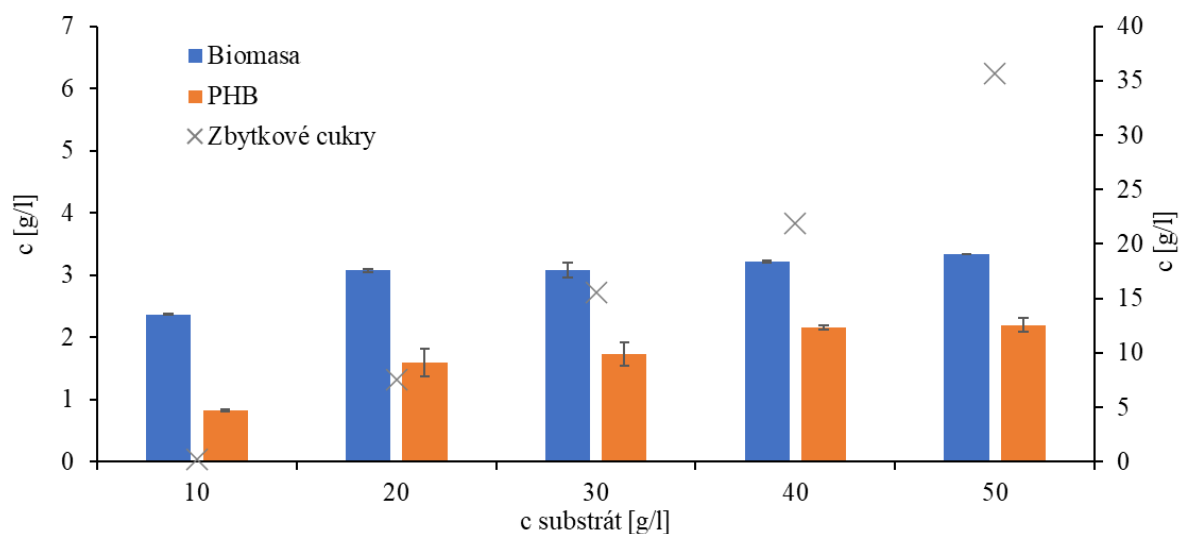
Obrázek 12: Závislost koncentrace substrátu na koncentraci zbytkových cukrů, PHB a biomasy pro fed-batch kultivaci na 3 kroky

Z procentuálního úbytku xylózy lze pozorovat, že při koncentraci 10 g/l byla téměř veškerá xylóza spotřebována. Jak ukazuje tabulka 2, s rostoucí koncentrací substrátu klesá procentuální úbytek, jelikož bakterie nebyla schopna zutilizovat veškerou dostupnou xylózu. Na základě procentuálního úbytku uhlíkatého zdroje je patrné, že při postupném dávkování substrátu *Caldimonas thermodepolymerans* využívá dostupný uhlík výrazně efektivněji než při kultivační strategii batch.

Tabulka 2: Zbytkové cukry pro fed-batch kultivaci na 3 kroky

c (g/l)	zbytkový cukr (g/l)	% úbytek
10	0,4	95,8
20	6,9	65,4
30	15,2	49,2
40	24,9	37,8
50	31,6	36,8

Dvoukroková fed-batch kultivace byla provedena ve stejných koncentracích xylózy jako tříkroková fed-batch kultivace. Během koncentrace xylózy 10 g/l byl zřejmý nižší nárůst biomasy a také zastoupení PHB. V případě vyšších koncentrací substrátu byly však rozdíly minimální (Obrázek 13), kdy se množství biomasy pohybovalo mírně nad 3 g/l. Lze však pozorovat mírný nárůst koncentrace PHB s rostoucí koncentrací xylózy, na rozdíl od koncentrace 10 g/l kde zastoupení PHB bylo velmi nízké oproti ostatním koncentracím. Nejvyšší koncentrace PHB (2,19 g/l) byla pozorována při koncentraci xylózy 50 g/l. Vyšší koncentrace xylózy by proto mohly mít pozitivní vliv na akumulaci PHB. Během fed-batch kultivace na 2 kroky došlo k vyšší výtěžnosti PHB během vyšších koncentrací xylózy konkrétně při 40 a 50 g/l, oproti batch kultivaci.



Obrázek 13: Závislost koncentrace substrátu na koncentraci zbytkových cukrů, PHB a biomasy pro fed-batch kultivaci na 2 kroky

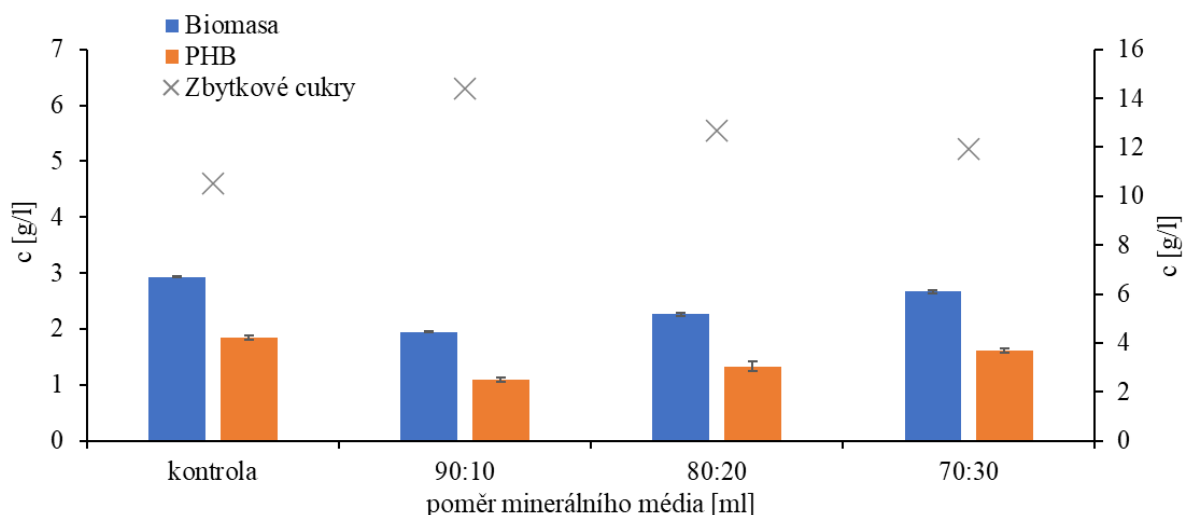
Výsledky zbytkových cukrů lze pozorovat v tabulce 3. Při koncentraci 10 g/l xylózy byla téměř veškerá xylóza během kultivace spotřebována. Se zvyšující se koncentrací xylózy docházelo k poklesu jejího procentuálního úbytku. V grafu (Obrázek 13) lze pozorovat opět rostoucí trend, se zvyšující se koncentrací xylózy roste koncentrace zbytkového substrátu v médiu. Při porovnání s fed-batch kultivací na 3 kroky je patrné, že rozdíly v efektivitě využití substrátu jsou minimální. Nejvyšší rozdíl lze sledovat při koncentraci xylózy 50 g/l kdy při dvoukrokové fed-batch kultivaci došlo k výraznějšímu snížení procentuálního úbytku xylózy než při kultivaci na 3 kroky.

Tabulka 3: Zbytkové cukry pro fed-batch kultivaci na 2 kroky

c (g/l)	zbytkový cukr (g/l)	% úbytek
10	0,2	97,8
20	7,5	62,5
30	15,6	47,9
40	21,9	45,2
50	35,7	28,5

4.1.3 Repeated batch kultivace

První kultivace, která byla provedená pomocí repeated batch sloužila k porovnání výsledků použitých poměrů pro následující dlouhodobější repeated batch kultivaci. Mezi sledovanými poměry 70:30, 80:20, a 90:10 bylo sledováno množství biomasy a PHB, které vzniklo. Kultura, která byla prováděna jako klasická batch kultivace a sloužila jako kontrola dosáhla po 48 hodinách 2,93 g/l biomasy a 1,85 g/l PHB. Z výsledků je patrné, že se zvyšujícím se podílem kultury vůči čerstvému médiu docházelo k nárůstu biomasy i PHB (Obrázek 14). Nejnižší hodnoty byly sledovány u poměru 90:10, zatímco nejvyšší produkce biomasy a PHB byla dosažena při poměru 70:30. Tento poměr byl proto zvolen pro následující dlouhodobou repeated batch kultivaci. Vyšší zastoupení kultury pravděpodobně vedlo k vyšší efektivitě vzniku biomasy a PHB.



Obrázek 14: Závislost koncentrace substrátu na koncentraci zbytkových cukrů, PHB a biomasy pro repeated batch kultivace

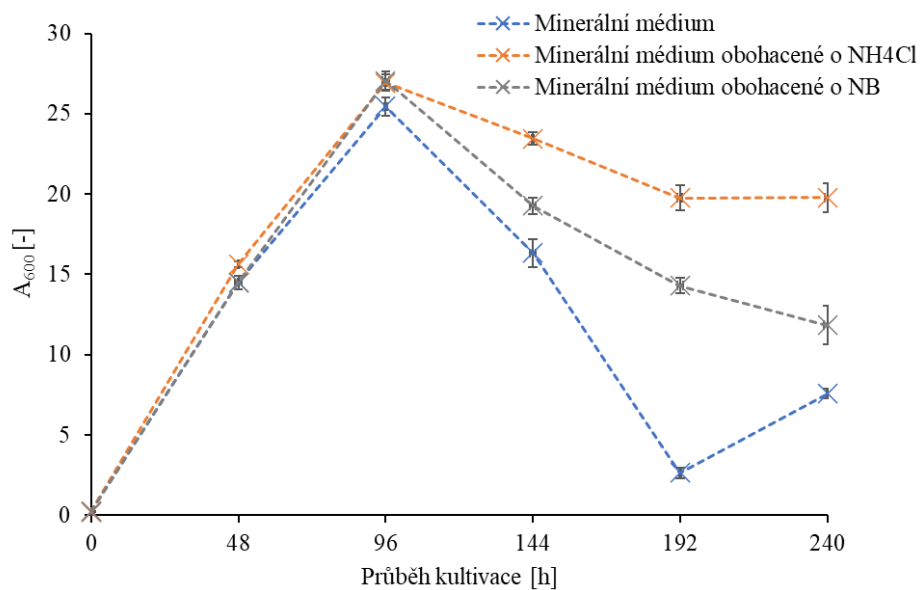
Výsledky zbytkových cukrů jsou uvedeny v tabulce 4. Nejvyšší efektivita spotřeby xylózy byla sledována při poměru 70:30 a nejnižší při poměru 90:10. Poměr 70:30 tak vykázal nejen nejvyšší produkci biomasy a PHB, ale také nejefektivnější využití substrátu. Vyšší podíl kultury pravděpodobně zajistil vyšší množství metabolicky aktivních buněk, které byly schopny rychleji a účinněji přeměňovat xylózu na biomasu a PHB. Na základě těchto faktorů byl poměr 70:30 vyhodnocen jako nejvhodnější pro následnou dlouhodobou repeated batch kultivaci.

Tabulka 4: Zbytkové cukry pro repeated batch kultivaci

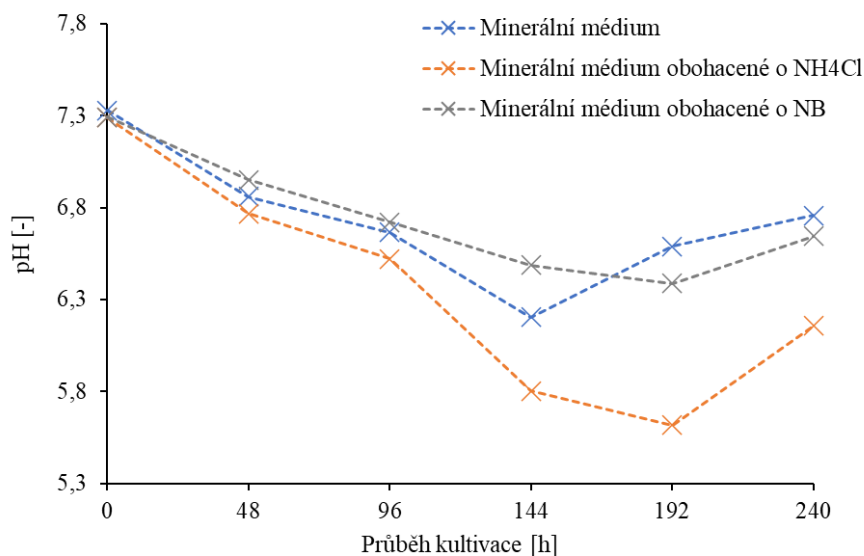
poměr média	zbytkový cukr (g/l)	% úbytek
kontrola	10,5	47,3
90:10	14,4	28,0
80:20	12,7	36,6
70:30	11,9	40,3

Následovala dlouhodobá repeated batch kultivace, kde byl využit poměr čerstvého média a kultury 70:30. Kultivace probíhala za pomoci tří různých médií. Konkrétně klasické minerální médium, které bylo použito i v předešlých kultivacích. Jako druhé médium bylo použito minerální médium obohacené o NH_4Cl (3 g/l), tedy byl použit zdroj anorganického dusíku, a jako třetí minerální médium obohacené o NB (1 g/l), kde byl zdroj dusíku organického původu.

V průběhu kultivace bylo po 48 hodinách měřeno pH a OD. Optická hustota byla měřena při absorpční 600 nm. Jako kontrola bylo měřeno pH a OD také na začátku každé další batch kultivace, tedy po přidání předešlé kultury, kdy se pH ve všech případech téměř rovnalo 7. V grafu (Obrázek 15) lze pozorovat, že k nejvyšší hustotě buněk došlo v 96. hodině při ukončení 2. batch kultivace. Obohacená média dosáhla nepatrně vyšší optické hustoty na rozdíl od klasického minerálního média. Nejnižší zaznamenaná hodnota pH byla 5,62 (Obrázek 16), která byla naměřena pro médium obohacené o NH_4Cl . Během kultivace mělo pH klesající trend, avšak přibližně mezi koncem 4. a 5. batch kultivace byl pozorován mírný nárůst pH. Metabolismus pravděpodobně probíhal klasicky po dobu 192 hodin, kdy docházelo k tvorbě kyselého prostředí vlivem odbourávání živin, nárůst pH poté mohl být způsoben opětovným spuštěním metabolismu. Jen během kultivace s minerálním médiem došlo k nárůstu pH již na konci 3. batch kultivace. Tento jev mohl souviset se zvýšeným odumíráním buněk, pravděpodobně v důsledku metabolického vyčerpání a omezené životaschopnosti buněk. S tím může souviset také viditelný pokles optické hustoty který od konce 2. batch kultivace klesá. U minerálního média lze však pozorovat nárůst optické hustoty během 5. batch kultivace.

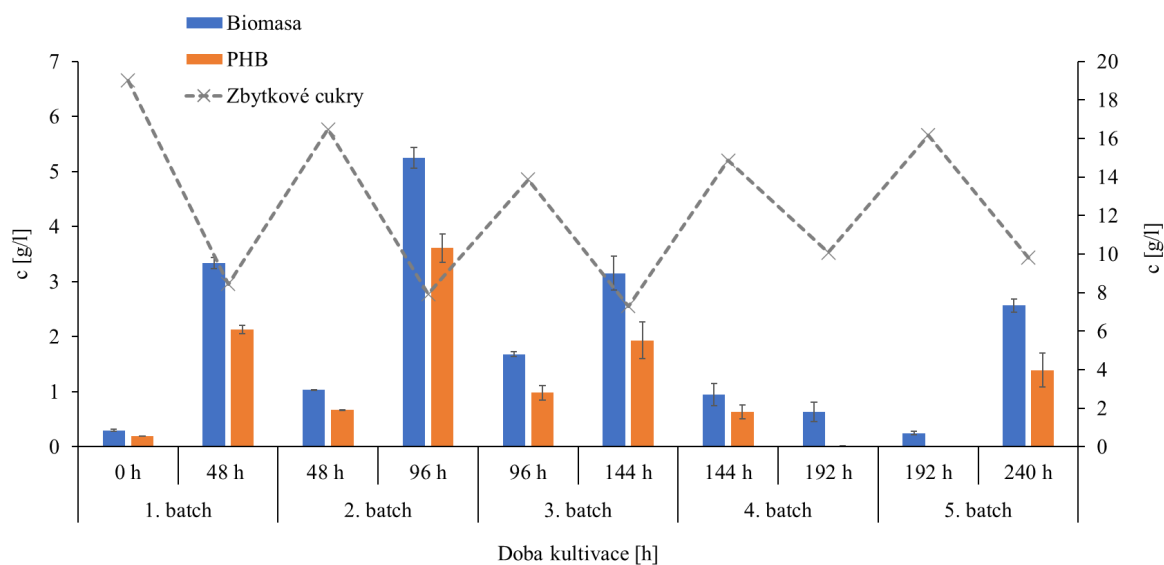


Obrázek 15: Závislosti optické hustoty v časovém průběhu kultivace



Obrázek 16: Závislosti pH v časovém průběhu kultivace

Ze získaných výsledků pro minerální médium lze pozorovat, že k nejvyššímu nárůstu biomasy (5,25 g/l) i PHB (3,61 g/l) došlo na konci 2. batch kultivace (Obrázek 17). To koreluje i s výsledky OD, kdy byla zaznamenána i nejvyšší buněčná hustota. Během 3. batch kultivace došlo k poklesu biomasy i PHB což mohlo být způsobeno nedostatkem živin jako je dusík. Následně během 4. batch kultivace došlo k výraznému poklesu biomasy i PHB, kdy i v předchozím grafu (Obrázek 16) lze pozorovat nárůst pH již od konce 3. batch kultivace, což mohlo naznačovat nižší vznik PHB a nižší spotřebu živin bakterií *Caldimonas thermodepolymerans*. Na konci 4. batch kultivace pH narostlo což souvisí s nízkým nárůstem biomasy i PHB. Tento náhlý výkyv mohl být způsoben nižší metabolickou aktivitou buněk. Následně na konci 5. batch kultivace opět zaznamenán nárůst biomasy a PHB, což značí že buňky pravděpodobně přešly opět do aktivnějšího růstu.



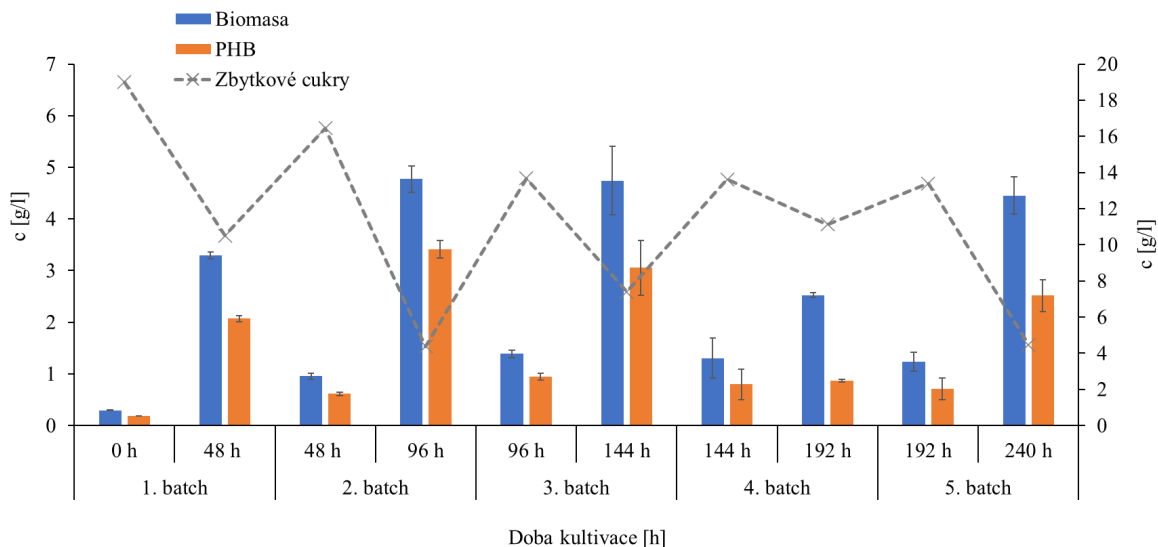
Obrázek 17: Závislost koncentrace substrátu na koncentraci zbytkových cukrů, PHB a biomasy pro minerální médium

Z výsledků zbytkových cukrů lze sledovat, že mezi 1. a 4. batch kulturací došlo k výraznému snižování koncentrace zbytkového cukru, a snižování procentuálního úbytku (Tabulka 5). To naznačuje, že se bakterie mohly nacházet v exponenciální fázi a zdroj uhlíku intenzivně spotřebovávaly. V 5. batch kulturaci se ale trend změnil a koncentrace zbytkového cukru se zvýšila. Snižovaná spotřeba cukru tedy potvrzuje to, že buňky pravděpodobně začaly být metabolicky méně aktivní a nedocházelo k vysoké spotřebě xylózy.

Tabulka 5: Zbytkové cukry pro repeated batch kultivaci za použití minerálního média

kultivace	zbytkový cukr (g/l)	% úbytek
začátek	19,0	-
1. batch	8,5	55,5
2. batch	7,9	51,9
3. batch	7,3	47,4
4. batch	10,1	32,2
5. batch	9,8	39,2

Během repeated batch kultivace s použitím minerálního média obohaceného o anorganický dusík ve formě NH_4Cl lze pozorovat narůstající množství biomasy i PHB až do konce 2. batch kultivace, kde množství biomasy (4,78 g/l) i PHB (3,41 g/l) dosáhlo nejvyšších hodnot (Obrázek 18). Podobné hodnoty jako na konci 2. batch kultivace byly naměřeny i na konci 3. batch kultivace, kdy v případě minerálního média bez přidaného dusíku byl už pozorovaný značný pokles biomasy i PHB. V průběhu 4. batch kultivace byl stejně jako v případě minerálního média bez obohacení dusíkem pozorován pokles produkce. Přesto však tento pokles nebyl tak výrazný jako u média bez přidaného dusíku. Tento rozdíl může souviset s vlivem anorganického dusíku na metabolismus bakterie *Caldimonas thermodepolymerans*, jelikož dusík patří mezi klíčové živiny nezbytné pro syntézu biomolekul. Jeho dostupnost pravděpodobně napomohla udržet částečnou metabolickou aktivitu na konci 4. batch kultivace. Následně na konci 5. batch kultivace lze opět sledovat nárůst jak biomasy, tak i akumulace PHB. Opět došlo k poklesu koncentrace zbytkových cukrů, což naznačuje, že došlo k navýšení metabolické aktivity buněk, a tedy i k opětovné spotřebě xylózy.



Obrázek 18: Závislost koncentrace substrátu na koncentraci zbytkových cukrů, PHB a biomasy pro minerální médium obohacené o NH_4Cl

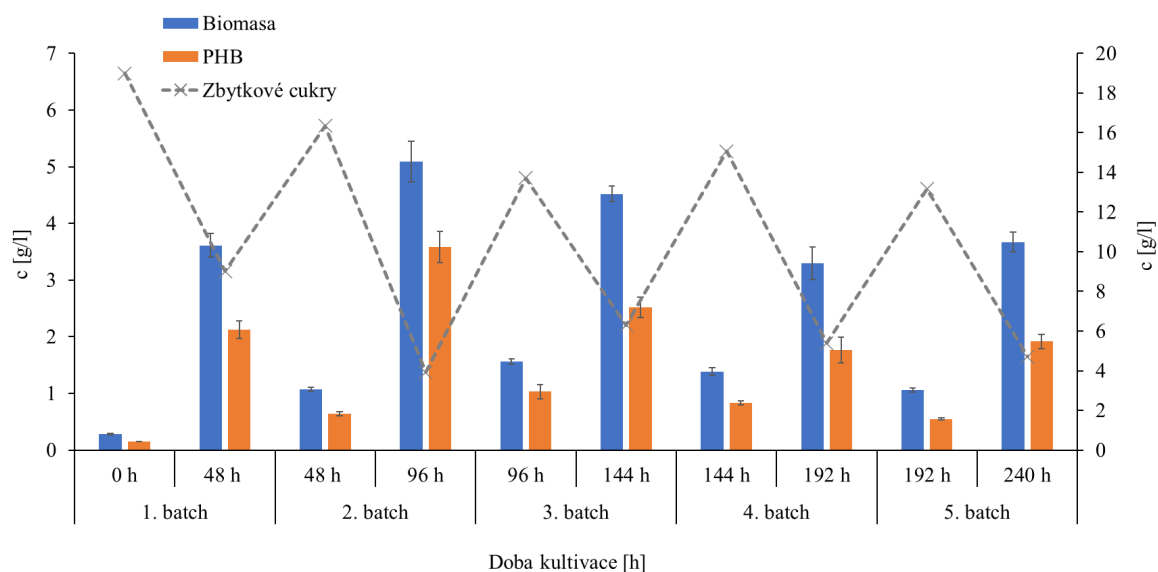
Z výsledků zbytkových cukrů lze sledovat, že docházelo k vzrůstající spotřebě xylózy až do konce 2. batch kultivace, kdy lze pozorovat nejvyšší úbytek zdroje uhlíku a to 73,3 % xylózy (Tabulka 6). Tato doba odpovídá i nejvyšší produkci biomasy a PHB. Během 3. batch kultivace, ale úbytek klesl na 45,9 %, a podobně i na konci 4. batch kultivace byl úbytek nižší (18 %). To mohlo být způsobeno zvýšeným odumíráním buněk, pravděpodobně v důsledku metabolického vyčerpání a omezené životaschopnosti. Naopak na konci 5. batch kultivace došlo opět ke zvýšení úbytku na 66,3 %.

Tabulka 6: Zbytkové cukry pro repeated batch kultivaci za použití minerálního média obohaceného o NH_4Cl

kultivace	zbytkový cukr (g/l)	% úbytek
začátek	19,0	-
1. batch	10,5	44,7
2. batch	4,4	73,3
3. batch	7,4	45,9
4. batch	9,8	18,0
5. batch	4,5	66,3

Repeated batch kultivaci s minerálním médiem obohaceným o NB lze sledovat v grafu (Obrázek 19). Lze sledovat rostoucí trend biomasy i PHB do 2. batch kultivace. Na konci 2. batch kultivace byl největší výtěžek biomasy (5,09 g/l) i PHB (3,59 g/l). Následně začala biomasa i PHB mírně klesat. Během 4. batch kultivace lze opět sledovat větší pokles zastoupení biomasy i PHB. Opět nedošlo k tak razantnímu úbytku biomasy i PHB jako v případě použití minerálního média bez přidaného dusíku. V případě média, kde byl použit anorganický dusík došlo k nižší produkci biomasy než při použití média s organickým dusíkem a dalšími látkami, které se v NB vyskytují, kde byl výtěžek biomasy vyšší. Z těchto výsledků lze usoudit, že pozitivní vliv na metabolismus bakterie *Caldimonas thermodepolymerans* má dusík jak

anorganického, tak i organického původu, ale vhodnějším zdrojem dusíku se jeví organický dusík, jelikož NB obsahuje kromě něj, také malé množství NaCl a dalších složek.



Obrázek 19: Závislost koncentrace substrátu na koncentraci zbytkových cukrů, PHB a biomasy pro minerální médium obohacené o NB

Na základě výsledků zbytkového cukru lze pozorovat v tabulce 7, že během první batch kultivace došlo k výraznému poklesu xylózy což odpovídá úbytku 52,6 %. Nejvyšší míra spotřeby byla zaznamenána na konci 2. batch kultivace, kdy úbytek činil 75,9 %. Na konci 3. batch kultivace došlo k poklesu procentuálního úbytku na 54,1 %, ale už na konci 4. batch kultivace lze pozorovat mírný nárůst úbytku xylózy, z čehož vyplývá, že cukru bylo spotřebováno více než během 3. batch kultivace, ale produkce biomasy i PHB byla vyšší během třetí batch kultivace. Tento výsledek může naznačovat, že spotřebovaná xylóza nebyla efektivně přeměněna na cílové produkty, ale mohla být využita během klidové fáze k částečnému udržení metabolismu. Na konci 5. batch kultivace opět došlo k vyšší spotřebě zdroje uhlíku a navýšení opětovné produkce.

Tabulka 7: Zbytkové cukry pro repeated batch kultivaci za použití minerálního média obohaceného o NB

kultivace	zbytkový cukr (g/l)	% úbytek
začátek	19,0	-
1. batch	9,0	52,6
2. batch	3,9	75,9
3. batch	6,3	54,1
4. batch	5,4	63,9
5. batch	4,7	76,4

Celkově lze říci, že ve všech médiích byl ve na konci 4. batch kultivace pozorován pokles tvorby biomasy i akumulace PHB. Následně, během 5. batch kultivace, došlo opět k nárůstu PHB i biomasy. Lze předpokládat, že příčina může souviset s dočasným snížením metabolické aktivity buněk a přechodem do klidového stavu. Během tohoto klidového stavu došlo k omezení

biosyntézy biomasy a PHB. Následné obnovení růstu a syntézy PHB v 5. batch kultivaci naznačuje, že došlo k opětovnému spuštění metabolismu. Pokles tvorby biomasy a PHB ve 4. batch kultivaci byl patrný ve všech médiích, nicméně méně výrazný byl u médií obohacených o dusík. To naznačuje, že přítomnost přidaného dusíku mohla částečně napomoci udržovat aktivnější metabolismus buněk a tím udržet i částečnou produkci metabolitů. Jelikož nedošlo k výraznému rozdílu mezi použitím anorganického a organického dusíku, tak lze konstatovat, že bakterie *Caldimonas thermodepolymerans* dokáže využít oba zdroje dusíku téměř bez rozdílu.

Ve studii od Khanna a kol. [47] byla zkoumána bakterie *Cupriavidus necator* NRRL B14690 v souvislosti s použitím batch a repeated batch kultivace. Pomocí batch kultivace dosáhli 21 g/l biomasy a 9,4 g/l PHB. Během repeated batch kultivace bylo odstraněno 20 % kultury, která byla následně nahrazena stejným objemem nového média. Za 67 h bylo dosaženo 49 g/l biomasy a 25 g/l PHB [47]. V této práci bylo dosaženo nižších výtěžků, neboť experimenty probíhaly v Erlenmeyerových baňkách, a nikoliv v bioreaktorech. Výtěžky jsou v bioreaktorech obecně vyšší než v baňkách díky přesné kontrole kultivačních podmínek, kterých v baňkách nelze dosáhnout.

5 Závěr

Cílem práce bylo sledovat vliv kultivačních strategií, konkrétně batch, fed-batch a repeated batch kultivace na produkci PHB. Nejdříve byla provedena batch kultivace při koncentracích xylózy 10, 20, 30, 40 a 50 g/l. Od koncentrace 20 g/l se biomasa pohybovala mírně pod 4 g/l a nejvíce PHB vzniklo při koncentraci 50 g/l a to konkrétně 2,02 g/l PHB. Z těchto údajů je zřejmé, že bakterie *Caldimonas thermodepolymerans* není omezena koncentrací zdroje uhlíku a nedochází zde k inhibici. Takže i při vyšších koncentracích xylózy dochází k tvorbě biomasy i PHB, tohoto lze využít v bioreaktorech, kdy by nemuselo při větších koncentracích nedocházet ke snížení tvorby produktu.

Fed-batch kultivace byla provedena dvoukroková i tříkroková opět ve stejných koncentracích xylózy jako batch kultivace. Během dvoukrokové fed-batch kultivace byla přidána xylóza na 2 části, v čase 0 a 24 hodin. Biomasa se pohybovala mírně nad 3 g/l ale zastoupení PHB se s rostoucí koncentrací zvyšovalo. Při koncentraci 40 g/l xylózy vzniklo 2,16 g/l PHB což je více než vzniklo během batch kultivace během které vzniklo při 40 g/l xylózy 1,96 g/l PHB. Během tříkrokové fed-batch kultivace byla xylóza přidána v čase 0, 24 a 48 hodin. V tomto případě se množství biomasy pohybovalo mírně pod 3 g/l a PHB se pohybovalo okolo 1 g/l. Z toho vyplývá, že bakterii *Caldimonas thermodepolymerans* může více vyhovovat větší množství xylózy na začátku kultivace než přidávání zdroje uhlíku po menších částech v průběhu kultivace.

Dále byla provedena repeated batch kultivace ve třech různých poměrech, 90:10, 80:20 a 70:30 čerstvého minerálního média k předešlé kultuře. Jako nejvýhodnější poměr s nejvyšší výtěžností biomasy i PHB byl vybrán poměr 70:30. V dlouhodobé repeated batch kultivaci byla použita tři média, klasické minerální, minerální médium obohacené o NH_4Cl (3 g/l) a minerální médium obohacené o NB (1 g/l). Cílem bylo sledovat vliv jak kultivační strategie repeated batch na produkci PHB, tak také vliv přidaného anorganického a organického dusíku. Během těchto kultivací byl u všech případů pozorován rostoucí trend tvorby biomasy i PHB do 2. batch kultivace, kdy produkce dosáhla svého maxima a biomasa se pohybovala okolo 5 g/l a koncentrace PHB byla přibližně 3,5 g/l. Následovalo snížení tvorby biomasy a PHB na konci 3. batch kultivace, a k úplnému poklesu došlo během 4. batch kultivace. V průběhu kultivace, během které bylo použito minerální médium bez přidaného dusíku, došlo k minimálnímu nárůstu biomasy a PHB. Ale při kultivaci s médiem obohacenými o dusík tento pokles biomasy i PHB nebyl tak razantní. Tento jev mohl nastat kvůli přechodu bakterie do klidové fáze. Následně na konci 5. batch kultivace došlo k opětovnému nárůstu biomasy i PHB u všech kultivací. To mohlo být zapříčiněno opětovným přechodem bakterie z nižší metabolické aktivity do aktivnější fáze růstu. Během kultivace byl pozorován rozdíl mezi použitím anorganického a organického dusíku ve 4. batch kultivaci, kdy při použití organického dusíku došlo k vyšší tvorbě biomasy. To mohlo být způsobeno nejen lepším využitím organického dusíku, ale také dalších látek obsažených v NB.

Na základě provedených experimentů lze konstatovat, že repeated batch kultivace vedla ke zvýšení produkce PHB oproti klasické batch kultivaci a bylo by možné ji aplikovat pro biotechnologickou produkci PHB ve větším měřítku. Při použití médií obohacených o dusík došlo k lepšímu udržení aktivního metabolismu. Výsledky batch kultivace zároveň ukázaly, že bakterie *Caldimonas thermodepolymerans* není negativně ovlivněna vyššími koncentracemi xylózy a nedochází tedy ke snížení produkce PHB a biomasy. Fed-batch kultivace navíc ukázala, že bakterie preferuje vyšší dávku xylózy na začátku kultivace na rozdíl od postupného

přidávání xylózy v průběhu kultivace. Aplikací kultivační strategie repeated batch v bioreaktorech, za použití média obohaceného o dusík s vyšší počáteční koncentrací xylózy, by mohlo dojít k mnohem vyšší produkci PHB.

6 Literatura

- [1] S. Ray, J.-O. Jin, I. Choi, and M. Kim, “Recent trends of biotechnological production of polyhydroxyalkanoates from C1 carbon sources,” *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 10, Jan. 2023, doi: 10.3389/fbioe.2022.907500.
- [2] G.-Y. Tan *et al.*, “Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review,” *Polymers (Basel)*, vol. 6, no. 3, pp. 706–754, Mar. 2014, doi: 10.3390/polym6030706.
- [3] J. Możejko-Ciesielska, S. Ray, and S. Sankhyan, “Recent Challenges and Trends of Polyhydroxyalkanoate Production by Extremophilic Bacteria Using Renewable Feedstocks,” *Polymers (Basel)*, vol. 15, no. 22, p. 4385, Nov. 2023, doi: 10.3390/polym15224385.
- [4] S. Obruca, P. Sedlacek, M. Koller, D. Kucera, and I. Pernicova, “Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications,” *Biotechnol Adv*, vol. 36, no. 3, pp. 856–870, May 2018, doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.12.006.
- [5] J. Możejko-Ciesielska and R. Kiewisz, “Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous?,” *Microbiol Res*, vol. 192, pp. 271–282, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.micres.2016.07.010.
- [6] B. Dalton, P. Bhagabati, J. De Micco, R. B. Padamati, and K. O’Connor, “A Review on Biological Synthesis of the Biodegradable Polymers Polyhydroxyalkanoates and the Development of Multiple Applications,” *Catalysts*, vol. 12, no. 3, p. 319, Mar. 2022, doi: 10.3390/catal12030319.
- [7] N. Atanasova, S. Stoitsova, T. Paunova-Krasteva, and M. Kambourova, “Plastic Degradation by Extremophilic Bacteria,” *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 11, p. 5610, May 2021, doi: 10.3390/ijms22115610.
- [8] D. A. Gregory *et al.*, “Polyhydroxyalkanoates and their advances for biomedical applications,” *Trends Mol Med*, vol. 28, no. 4, pp. 331–342, Apr. 2022, doi: 10.1016/j.molmed.2022.01.007.
- [9] S. Sharma, V. Sharma, and S. Chatterjee, “Contribution of plastic and microplastic to global climate change and their conjoining impacts on the environment - A review,” *Science of The Total Environment*, vol. 875, p. 162627, Jun. 2023, doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.162627.
- [10] M. Ben Abdallah *et al.*, “Advances in polyhydroxyalkanoate (PHA) production from renewable waste materials using halophilic microorganisms: A comprehensive review,” *Science of The Total Environment*, vol. 963, p. 178452, Feb. 2025, doi: 10.1016/j.scitotenv.2025.178452.
- [11] A. K. Singh and N. Mallick, “SCL-LCL-PHA copolymer production by a local isolate, *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 7925,” *Biotechnol J*, vol. 4, no. 5, pp. 703–711, May 2009, doi: 10.1002/biot.200800307.

- [12] M. Pötter and A. Steinbüchel, “Poly(3-hydroxybutyrate) Granule-Associated Proteins: Impacts on Poly(3-hydroxybutyrate) Synthesis and Degradation,” *Biomacromolecules*, vol. 6, no. 2, pp. 552–560, Mar. 2005, doi: 10.1021/bm049401n.
- [13] B. Dariš and Ž. Knez, “Poly(3-hydroxybutyrate): Promising biomaterial for bone tissue engineering,” *Acta Pharmaceutica*, vol. 70, no. 1, pp. 1–15, Mar. 2020, doi: 10.2478/acph-2020-0007.
- [14] A. Pohlmann *et al.*, “Genome sequence of the bioplastic-producing ‘Knallgas’ bacterium *Ralstonia eutropha* H16,” *Nat Biotechnol*, vol. 24, no. 10, pp. 1257–1262, Oct. 2006, doi: 10.1038/nbt1244.
- [15] S. Bresan, A. Sznajder, W. Hauf, K. Forchhammer, D. Pfeiffer, and D. Jendrossek, “Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids,” *Sci Rep*, vol. 6, no. 1, p. 26612, May 2016, doi: 10.1038/srep26612.
- [16] K. Elbanna, T. Lütke-Eversloh, S. Van Trappen, J. Mergaert, J. Swings, and A. Steinbüchel, “*Schlegelella thermodepolymerans* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic bacterium that degrades poly(3-hydroxybutyrate-co-3-mercaptopropionate),” *Int J Syst Evol Microbiol*, vol. 53, no. 4, pp. 1165–1168, Jul. 2003, doi: 10.1099/ijs.0.02562-0.
- [17] M. E. Grigore, R. M. Grigorescu, L. Iancu, R.-M. Ion, C. Zaharia, and E. R. Andrei, “Methods of synthesis, properties and biomedical applications of polyhydroxyalkanoates: a review,” *J Biomater Sci Polym Ed*, vol. 30, no. 9, pp. 695–712, Jun. 2019, doi: 10.1080/09205063.2019.1605866.
- [18] I. Novackova *et al.*, “The role of polyhydroxyalkanoates in adaptation of *Cupriavidus necator* to osmotic pressure and high concentration of copper ions,” *Int J Biol Macromol*, vol. 206, pp. 977–989, May 2022, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.03.102.
- [19] S. Gopi, M. Kontopoulou, B. A. Ramsay, and J. A. Ramsay, “Manipulating the structure of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate (MCL-PHA) to enhance thermal properties and crystallization kinetics,” *Int J Biol Macromol*, vol. 119, pp. 1248–1255, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.08.016.
- [20] A. Pandey, N. Adama, K. Adjallé, and J.-F. Blais, “Sustainable applications of polyhydroxyalkanoates in various fields: A critical review,” *Int J Biol Macromol*, vol. 221, pp. 1184–1201, Nov. 2022, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.09.098.
- [21] E. Akaraonye, T. Keshavarz, and I. Roy, “Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice,” *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, vol. 85, no. 6, pp. 732–743, Jun. 2010, doi: 10.1002/jctb.2392.
- [22] N. S. Kurian and B. Das, “Comparative analysis of various extraction processes based on economy, eco-friendly, purity and recovery of polyhydroxyalkanoate: A review,” *Int J Biol Macromol*, vol. 183, pp. 1881–1890, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.06.007.
- [23] S. Chavan, B. Yadav, R. D. Tyagi, and P. Drogui, “A review on production of polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters by thermophilic microbes using waste feedstocks,” *Bioresour Technol*, vol. 341, p. 125900, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.biortech.2021.125900.

- [24] T. Yılmaz Nayır, S. Konuk, and S. Kara, “Extraction of polyhydroxyalkanoate from activated sludge using supercritical carbon dioxide process and biopolymer characterization,” *J Biotechnol*, vol. 364, pp. 50–57, Feb. 2023, doi: 10.1016/j.jbiotec.2023.01.011.
- [25] Muhammadi, Shabina, M. Afzal, and S. Hameed, “Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications,” *Green Chem Lett Rev*, vol. 8, no. 3–4, pp. 56–77, Oct. 2015, doi: 10.1080/17518253.2015.1109715.
- [26] H.-Y. Sagong, H. F. Son, S. Y. Choi, S. Y. Lee, and K.-J. Kim, “Structural Insights into Polyhydroxyalkanoates Biosynthesis,” *Trends Biochem Sci*, vol. 43, no. 10, pp. 790–805, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.tibs.2018.08.005.
- [27] B. Kunasundari and K. Sudesh, “Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates,” *Express Polym Lett*, vol. 5, no. 7, pp. 620–634, 2011, doi: 10.3144/expresspolymlett.2011.60.
- [28] R. Sehgal and R. Gupta, “Polyhydroxyalkanoate and its efficient production: an eco-friendly approach towards development,” *3 Biotech*, vol. 10, no. 12, p. 549, Dec. 2020, doi: 10.1007/s13205-020-02550-5.
- [29] S. M. Emadian, T. T. Onay, and B. Demirel, “Biodegradation of bioplastics in natural environments,” *Waste Management*, vol. 59, pp. 526–536, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.wasman.2016.10.006.
- [30] K. Numata, H. Abe, and T. Iwata, “Biodegradability of Poly(hydroxyalkanoate) Materials,” *Materials*, vol. 2, no. 3, pp. 1104–1126, Aug. 2009, doi: 10.3390/ma2031104.
- [31] M. Fernandes, A. F. Salvador, and A. A. Vicente, “Biodegradation of PHB/PBAT films and isolation of novel PBAT biodegraders from soil microbiomes,” *Chemosphere*, vol. 362, p. 142696, Aug. 2024, doi: 10.1016/j.chemosphere.2024.142696.
- [32] S. Ladhari, N.-N. Vu, C. Boisvert, A. Saidi, and P. Nguyen-Tri, “Recent Development of Polyhydroxyalkanoates (PHA)-Based Materials for Antibacterial Applications: A Review,” *ACS Appl Bio Mater*, vol. 6, no. 4, pp. 1398–1430, Apr. 2023, doi: 10.1021/acsabm.3c00078.
- [33] Y. Zheng, J.-C. Chen, Y.-M. Ma, and G.-Q. Chen, “Engineering biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) for diversity and cost reduction,” *Metab Eng*, vol. 58, pp. 82–93, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.ymben.2019.07.004.
- [34] J. Cheng, R. Gao, Y. Zhu, and Q. Lin, “Applications of biodegradable materials in food packaging: A review,” *Alexandria Engineering Journal*, vol. 91, pp. 70–83, Mar. 2024, doi: 10.1016/j.aej.2024.01.080.
- [35] H. Park, H. He, X. Yan, X. Liu, N. S. Scrutton, and G.-Q. Chen, “PHA is not just a bioplastic!,” *Biotechnol Adv*, vol. 71, p. 108320, Mar. 2024, doi: 10.1016/j.biotechadv.2024.108320.
- [36] Y. K. Dasan, A. H. Bhat, and F. Ahmad, “Polymer blend of PLA/PHBV based bionanocomposites reinforced with nanocrystalline cellulose for potential application as

- packaging material,” *Carbohydr Polym*, vol. 157, pp. 1323–1332, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2016.11.012.
- [37] I. von Hegner, “Extremophiles: a special or general case in the search for extra-terrestrial life?,” *Extremophiles*, vol. 24, no. 1, pp. 167–175, Jan. 2020, doi: 10.1007/s00792-019-01144-1.
- [38] R. Orellana *et al.*, “Living at the Frontiers of Life: Extremophiles in Chile and Their Potential for Bioremediation,” *Front Microbiol*, vol. 9, Oct. 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.02309.
- [39] J. O’Grady, U. Cronin, J. Tierney, A. V. Piterina, E. O’Meara, and M. G. Wilkinson, “Gaps in the assortment of rapid assays for microorganisms of interest to the dairy industry,” 2020, pp. 1–56. doi: 10.1016/bs.aambs.2020.07.001.
- [40] C. L. Schoch *et al.*, “NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools,” *Database*, vol. 2020, Jan. 2020, doi: 10.1093/database/baaa062.
- [41] X. Kourilova *et al.*, “Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a thermophilic strain of *Schlegelella thermodepolymerans* from xylose rich substrates,” *Bioresour Technol*, vol. 315, p. 123885, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.biortech.2020.123885.
- [42] E. Bolmanis, K. Dubencovs, A. Suleiko, and J. Vanags, “Model Predictive Control—A Stand Out among Competitors for Fed-Batch Fermentation Improvement,” *Fermentation*, vol. 9, no. 3, p. 206, Feb. 2023, doi: 10.3390/fermentation9030206.
- [43] F. Xin *et al.*, “Biosynthetic Technology and Bioprocess Engineering,” in *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier, 2019, pp. 207–232. doi: 10.1016/B978-0-444-64085-7.00009-5.
- [44] M. E. Qazizada, “Design of a Batch Stirred Fermenter for Ethanol Production,” *Procedia Eng*, vol. 149, pp. 389–403, 2016, doi: 10.1016/j.proeng.2016.06.684.
- [45] Q. Tao *et al.*, “Comparison of batch, fed-batch and continuous operation modes for scalable polyhydroxyalkanoate (PHA) production and carbon sequestration from phenol,” *Journal of Water Process Engineering*, vol. 60, p. 105147, Apr. 2024, doi: 10.1016/j.jwpe.2024.105147.
- [46] L. Qu, L.-J. Ren, G.-N. Sun, X.-J. Ji, Z.-K. Nie, and H. Huang, “Batch, fed-batch and repeated fed-batch fermentation processes of the marine thraustochytrid *Schizochytrium* sp. for producing docosahexaenoic acid,” *Bioprocess Biosyst Eng*, vol. 36, no. 12, pp. 1905–1912, Dec. 2013, doi: 10.1007/s00449-013-0966-7.
- [47] S. Khanna and A. K. Srivastava, “Repeated Batch Cultivation of *Ralstonia eutropha* for Poly (β -hydroxybutyrate) Production,” *Biotechnol Lett*, vol. 27, no. 18, pp. 1401–1403, Sep. 2005, doi: 10.1007/s10529-005-0689-1.
- [48] B. Cui, S. Huang, F. Xu, R. Zhang, and Y. Zhang, “Improved productivity of poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) in thermophilic *Chelatococcus daeguensis* TAD1 using glycerol as the growth substrate in a fed-batch culture,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 99, no. 14, pp. 6009–6019, Jul. 2015, doi: 10.1007/s00253-015-6489-1.

- [49] C.-I. Chen and R. T. Taylor, "Batch and fed-batch bioreactor cultivations of a *Thermus* species with thermophilic BTEX-degrading activity," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 47, no. 6, pp. 726–733, Jun. 1997, doi: 10.1007/s002530051002.
- [50] M. H. A. Ibrahim and A. Steinbüchel, "High-Cell-Density Cyclic Fed-Batch Fermentation of a Poly(3-Hydroxybutyrate)-Accumulating Thermophile, *Chelatococcus* sp. Strain MW10," *Appl Environ Microbiol*, vol. 76, no. 23, pp. 7890–7895, Dec. 2010, doi: 10.1128/AEM.01488-10.