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

POSOUZENÍ VYBRANÝCH PARAMETRŮ NA BIOTECHNOLOGICKOU PRODUKCI POLYHYDROXYALKANOÁTŮ

INFLUENCE OF SELECTED PARAMETERS ON BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATES

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE — Bc. LIBOR EREMKA
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE — Ing. STANISLAV OBRUČA, Ph.D.
SUPERVISOR

BRNO 2013

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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	**FCH-DIP0737/2012**	Akademický rok:	**2012/2013**
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií		
Student(ka):	**Bc. Libor Eremka**		
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)		
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)		
Vedoucí práce	**Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**		
Konzultanti:	doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.		

Název diplomové práce:

Posouzení vybraných parametrů na biotechnologickou produkci polyhydroxyalkanoátů

Zadání diplomové práce:

1. Rešerše na téma bioprodukce polyhydroxyalkanoátů
2. Experimentální ověření vlivu vybraných parametrů (DO, redoxní potenciál aj.) na biotechnologickou produkcipolyhydroxyalkanoátů z odpadních substrátů
3. Posouzení vlivu vybraných parametrů na metabolické aktivity produkujícího kmene
4. Návrh optimálního nastavení sledovaných parametrů pro velkoobjemovou produkci PHA

Práce bude vypracována v rámci Licenční smlouvy s NAFIGATE Corporation, a.s. a její výsledky budou součástí podání patentové přihlášky.

Termín odevzdání diplomové práce: 3.5.2013

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

Bc. Libor Eremka Student(ka)	Ing. Stanislav Obruča, Ph.D. Vedoucí práce	doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc. Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2013

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

The aim of this work is to study microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHA). Theoretical part is focused on production of PHA using microoganisms and transgenic plants. Bacterial strain *Cupriavidus necator* H16 was used for laboratory production of PHA. Various waste oils were used as sole carbon and energy source. Salt of propionic adic and 1-propanol were used as intermediate for 3-hydroxyvalerate monomer (3HV) unit. Incorporation of 3HV to polymer can improve material features of PHA. The major part of experimental work was focused to study influence of aeration (concentration of dissolved oxygen) to bacterial growth, selected metabolic pathways and formation of PHA. Furthermore, influence of aeration to monomer composition of polymer was evaluated. According to experimental conclusion of this work it was approved dependance between aeration and monomer composition of PHA. Moreover, it was approved that higher concentration of oxygen supports bacterial growth and influences PHA content in cells. In addition, NADPH is one of the substrates influencing flux of acetyl-CoA throughout the metabolism; higher intracellular concentration of NADPH inhibits TCA cycle and enhances accumulation of PHA in cells. For this reason, specific enzymatic aktivity of several selected intracelular enzymes were measured, including those enzymes which can generate NADPH.

ABSTRAKT

Cílem práce je studium mikrobiální produkce polyhydroxyalkanoátů (PHA). V teoretické části je zpracován stručný přehled produkce PHA pomocí mikroorganismů a transgenních rostlin. Pro laboratorní práci byla využita průmyslově užívaná bakterie *Cupriavidus necator* H16. Různé odpadní oleje byly použity jako jediných zdroj uhlíku a energie. Pro zlepšení materiálových vlastností PHA byly použity prekurzory 1-propanol a propionát sodný, které byly inkorporovány do polymeru ve formě 3-hydroxyvalerátu (3HV). Hlavní část experimentální práce byla zaměřena na studium vlivu aerace (koncentrace rozpuštěného kyslíku v médiu) na tvorbu biomasy, na ovlivnění vybraných metabolických drah a na akumulaci PHA. Dle získaných experimentálních výsledků byla potvrzena závislost mezi aerací a monomerním složením PHA. Dále byl potvrzen fakt, že vyšší koncentrace kyslíku podporuje bakteriální růst a ovlivňuje intenzitu akumulace PHA v buňkách. NADPH má podstatný vliv na osud acetyl-CoA v metabolismu, vyšší vnitrobuněčná koncentrace NADPH inhibuje citrátový cyklus a zvyšuje akumulaci PHA v buňkách. Z toho důvodu byla vyhodnocena enzymová aktivita vybraných intracelulárních enzymů v závislosti na intenzitě aerace, včetně enzymů schopných generovat NADPH.

Key words

Polyhydroxyalkanoate, *Cupriavidus necator*, oxidation stress, P(3HB-co-3HV), PHA, PHB, aeration

Klíčová slova

Polyhydroxyalkanoáty, *Cupriavidus necator*, oxidační stres, P(3HB-co-3HV), PHA, PHB, aerace

EREMKA, L. *Posouzení vybraných parametrů na biotechnologickou produkci polyhydroxyalkanoátů.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 89 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Stanislav Obruča, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. 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 studenta

Poděkování:

Touto formou bych chtěl poděkovat vedoucímu diplomové práce Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a velmi cenné a přínosné rady při práci v laboratoři. Dále bych mu chtěl poděkoval za konzultace a pomoc při psaní samotné diplomové práce.

Dále bych chtěl poděkovat paní doc. RNDr. Ivaně Márové, Csc. za všestrannou pomoc během celého studia, bakalářského i magisterského.

Nakonec bych chtěl poděkovat své rodině, za stálou morální podporu a materiální zajištění díky kterému jsem se mohl věnovat studiu a řádně jej dokončit.

Práce byla podpořena z prostředků projektu "Centrum materiálového výzkumu na FCH VUT v Brně" registrovaného pod číslem CZ.1.05/2.1.00/01.0012/ERDF.

1. OBSAH

1. OBSAH 5
2. ÚVOD 8
3. TEORETICKÁ ČÁST 9
3.1. Co je to PHA? 9
3.1.1. scl-PHA 11
3.1.2. mcl-PHA 11
3.1.3. lcl-PHA 11
3.1.4. Materiálové vlastnosti 11
3.1.4.1. Modifikace vlastností P3HB 11
3.1.4.2. Vlastnosti mcl-PHA 12
3.2. Produkce PHA pomocí mikroorganismů 12
3.2.1. Granule PHA 12
3.2.1.1. Phasiny 14
3.2.1.2. PHA polymerázy (syntázy) 14
3.2.2. Biodegradace PHA 15
3.2.2.1. Intracelulární degradace 15
3.2.2.2. Extracelulární degradace 16
3.2.3. Metabolismu PHA 16
3.2.3.1. Syntéza poly(3-hydroxybutyrátu) 17
3.2.3.2. Syntéza poly(3-hydroxybutyrátu-co-3-hydroxyvalerátu) 18
3.2.3.3. 2-Methylcitrátový cyklus 18
3.2.3.4. Vznik homopolymeru P3HV 19
3.2.3.5. Syntéza mcl polyhydroxyalkanoátů 20
3.2.4. Metabolický vznik propionyl-CoA 20
3.2.4.1. Vznik propionyl-CoA z mastných kyselin s lichým počtem uhlíků 21
3.2.4.2. Vznik propionyl-CoA z aminokyselin 21
3.2.4.3. Vznik propionyl-CoA z kyseliny levulové 21
3.2.5. Vybraní producenti scl-PHA 21
3.2.5.1. Cupriavidus necator H16 21
3.2.5.2. Bacillus megaterium 22
3.2.5.3. Azotobacter vinelandii 22
3.2.5.4. Methanotrofní a methylotrofní mikroorganismy 23
3.2.5.5. Fotosyntetizující mikroorganismy 23
3.2.5.6. Halofilní mikroorganismy 23
3.2.5.7. Produkce pomocí kvasinek 24
3.2.6. Producenti mcl-PHA 24
3.2.6.1. rod *Pseudomonas* 24
3.2.7. PHA jako extracelulární metabolit 25
3.3. Produkce pomocí transgenních rostlin 25
3.3.1. Syntéza P3HB v rostlinách 26
3.3.2. Syntéza kopolymerů PHA v rostlinách 27
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 28
4.1. Použité chemikálie, materiál, bakterie a přístroje 28
4.1.1. Produkční bakterie 28

4.1.2. Chemikálie pro kultivaci mikroorganismů ... 28
4.1.3. Ostatní chemikálie ... 28
4.1.4. Přístroje ... 28
4.2. Kultivace bakterie *Cupriavidus necator* H16 ... 28
4.2.1. Uchování bakterie a příprava inokula ... 28
4.2.2. Živná média ... 29
4.2.3. Vzorky olejů ... 29
4.2.4. Kultivace na různých olejích ... 30
4.2.5. Vliv aerace/oxidačního stresu na tvorbu biomasy, akumulaci PHA a složení akumulovaného polymeru u bakterie *C. necator* H16 ... 30
4.2.5.1. Kultivace v Erlenmayerových baňkách ... 30
4.2.5.2. Kultivace ve fermentoru ... 30
4.2.5.3. Optimalizace kultivace ve fermentoru ... 31
4.2.5.4. Koeficient $Y_{PHA/S}$ a $Y_{X/S}$ ... 31
4.3. Stanovení koncentrace biomasy ... 31
4.3.1. Kalibrace stanovení ... 31
4.3.2. Stanovení biomasy v jednotlivých kultivacích ... 32
4.4. Stanovení složení a koncentrace PHA v biomase ... 32
4.4.1. Stanovení kalibrační křivky PHA ... 32
4.4.2. Stanovení PHA v biomase ... 32
4.5. Stanovení aktivity vybraných enzymů ... 32
4.5.1. Kalibrace stanovení NADH/NADPH ... 32
4.5.2. Příprava enzymového preparátu ... 33
4.5.3. Stanovení aktivity 2-methylcitrát syntázy ... 33
4.5.4. Stanovení aktivity NADP izocitrátdehydrogenázy ... 33
4.5.5. Stanovení aktivity glukóza-6-fosfát dehydrogenázy ... 33
4.5.6. Stanovení aktivity malát dehydrogenázy ... 33
4.5.7. Stanovení aktivity jablečného enzymu ... 34
4.6. Stanovení celkových proteinů Hartree-Lowryho metodou ... 34
4.6.1. Stanovení kalibrační křivky ... 34
4.6.2. Stanovení celkových intracelulárních proteinů ve vzorcích ... 34
4.7. Stanovení vybraných charakteristik lipidů použitých pro kultivaci bakterie *C. necator* H16 ... 34
4.7.1. Stanovení čísla zmýdelnění ... 35
4.7.2. Stanovení čísla kyselosti ... 35
4.7.3. Stanovení esterového čísla ... 35
4.7.4. Stanovení jodového čísla podle Hanuše ... 35
4.7.5. Stanovení peroxidového čísla ... 35
4.7.6. Stanovení zastoupení mastných kyselin v použitých tucích ... 36
4.7.6.1. Transesterifikace mastných kyseliny pomocí KOH ... 36
4.7.6.2. Transesterifikace mastných kyseliny pomocí NaOH pod zpětným chladičem 36
5. VÝSLEDKY A DISKUZE ... 37
5.1. Kalibrace metod ... 37
5.1.1. Stanovení biomasy ... 37
5.1.2. Stanovení PHA ... 38

5.1.2.1. Kalibrační křivka 3HB ... 38
5.1.2.2. Kalibrační křivka 3HV ... 39
5.1.3. Stanovení aktivity vybraných enzymů ... 40
5.1.3.1. Kalibrace stanovení NADH ... 40
5.1.4. Kalibrace stanovení DNTF ... 41
5.1.5. Stanovení celkového obsahu bílkovin ... 42
5.2. Stanovení vybraných charakteristik lipidů použitých pro kultivaci bakterie *C. necator* H16 ... 42
5.2.1. Stanovení tukových čísel ... 43
5.2.2. Stanovení profilu zastoupených mastných kyselin u jednotlivých vzorků tuků 44
5.3. Kultivace bakterie *Cupriavidus necator* H16 ... 46
5.3.1. Kultivace na různých substrátech ... 46
5.3.2. Vliv oxidačního stresu na tvorbu biomasy a akumulaci PHA u bakterie *C. necator* H16 ... 48
5.3.2.1. Kultivace v Erlenmeyerových baňkách ... 48
5.3.2.2. Kultivace v bioreaktoru ... 51
5.3.2.3. Optimalizace kultivace ve fermentoru ... 59
5.4. Stanovení aktivity vybraných enzymů ... 62
5.4.1. Stanovení celkových bílkovin v enzymových preparátech ... 62
5.4.2. Stanovení aktivity izocitrátdehydrogenázy ... 62
5.4.3. Stanovení aktivity 2-methylcitrát syntázy ... 63
5.4.4. Stanovení aktivity glukóza-6-fosfát dehydrogenázy ... 64
5.4.5. Stanovení aktivity jablečného enzymu ... 65
5.4.6. Stanovení aktivity malátdehydrogenázy ... 66
5.4.7. Přehled aktivity vybraných enzymů v závislosti na saturaci fermentoru vzduchem ... 67
5.5. Zhodnocení vlivu oxidačního stresu na metabolismus u bakterie *C. necator* H16 ... 67
6. ZÁVĚR ... 71
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ ... 73
8. PŘÍLOHA ... 74
8.1. Složení hlavních mastných kyselin vybraných tuků a olejů ... 74
8.2. Kalibrace a analýza složení zastoupení mastných kyselin ... 75
8.3. Změny tuků a olejů při smažení ... 76
8.4. Grafická příloha ke kapitole 5.4. ... 77
9. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ ... 85

2. ÚVOD

Polymerní materiály jsou průmyslově vyráběny od třicátých let dvacátého století a v současné době tvoří prakticky nepostradatelnou skupinu látek, bez kterých si téměř nelze přestavit každodenní běžný život v průmyslově vyspělých zemích. Stačí se rozhlédnout kolem sebe a s nadsázkou můžeme říci, že následující generace budou možná dvacáté a dvacáté první století nazývat „dobou plastovou".

Syntetické polymery postupně od svého vzniku nahrazují ve všech odvětvích lidské činnosti tradiční materiály jako je např. sklo, papír, kov, dřevo či keramika.

Polymerní materiály mají řadu vynikajících vlastností, které se staly důležitým prvkem zvyšující komfort a kvalitu našeho života, a to především díky své vysoké molekulové hmotnosti, inertnosti a specifickým vlastnostem, které je možno upravit přesně pro dané použití. Je proto paradoxem, že tyto jejich vlastnosti nám v budoucnosti budou kvalitu a komfort života pravděpodobně zase snižovat. Dochází totiž k narůstající akumulaci těchto materiálů v životním prostředí a k jeho znečišťování. Stav životního prostředí je mimo jiné jedním z faktorů ovlivňující kvalitu života. Dále často dochází ke znečištění životního prostředí již při samotné výrobě nebo recyklaci těchto materiálů.

Další velkou nevýhodou konvekčních polymerů je výroba z fosilních zdrojů. Ropa je v současné době nejvýznamnější neobnovitelný fosilní zdroj na planetě. Lze předpokládat, že s klesající dostupností ropy bude růst její cena a tudíž i cena všech výrobků a materiálů z ní vyráběných. A nakonec při vyčerpání světových zásob ropy, bude další výroba polymerních materiálů značně problematická. Je proto obecně silná motivace pro nalezení nových materiálů jejichž výroba nebude závislá na fosilních zdrojích. Dalším požadavkem na tyto nové materiály je větší kompatibilita s životním prostředím, efektivní recyklace a bezodpadová likvidace.

Jednou z alternativ je produkce tzv. bioplastů. Jedná se o širokou skupinu materiálů, kam patří např.: polymery vyrobené ze škrobu, z kyseliny mléčné nebo polyhydroxyalkanoáty. Společnou vlastností většiny těchto materiálů je možnost jejich produkce z obnovitelných zdrojů a jejich biodegradabilita. Vzhledem k jejich vlastnostem mohou být tyto materiály použity jako náhrada předmětů pro jednorázové použití či předmětů a materiálů, u kterých je postačující relativně krátká trvanlivost – např.: obalové materiály. Dále tyto materiály nabízí řadu zajímavých aplikačních možností ve farmacii, medicíně a jiných speciálních aplikacích.

Polyhydroxyalkanoáty jsou lineární polyestery, které ve svých buňkách akumuluje celá řada přirozeně se vyskytujících mikroorganismů. Tento fenomén je znám již od roku 1921, kdy mikrobiolog Lemoigne poprvé izoloval poly(3-hydroxybutyrát). Od té doby byla provedena řada rozsáhlých studií, jejichž cílem je snížit výrobní náklady na produkci polyhydroxyalkanoátů tak, aby jejich výroba byla konkurence schopná s konvekčními polymery. Jednou z možností zefektivnění mikrobiální výroby polyhydroxyalkanoátů je využití obnovitelných odpadních substrátů nebo aplikace vhodných exogenních stresových vlivů.

3. TEORETICKÁ ČÁST

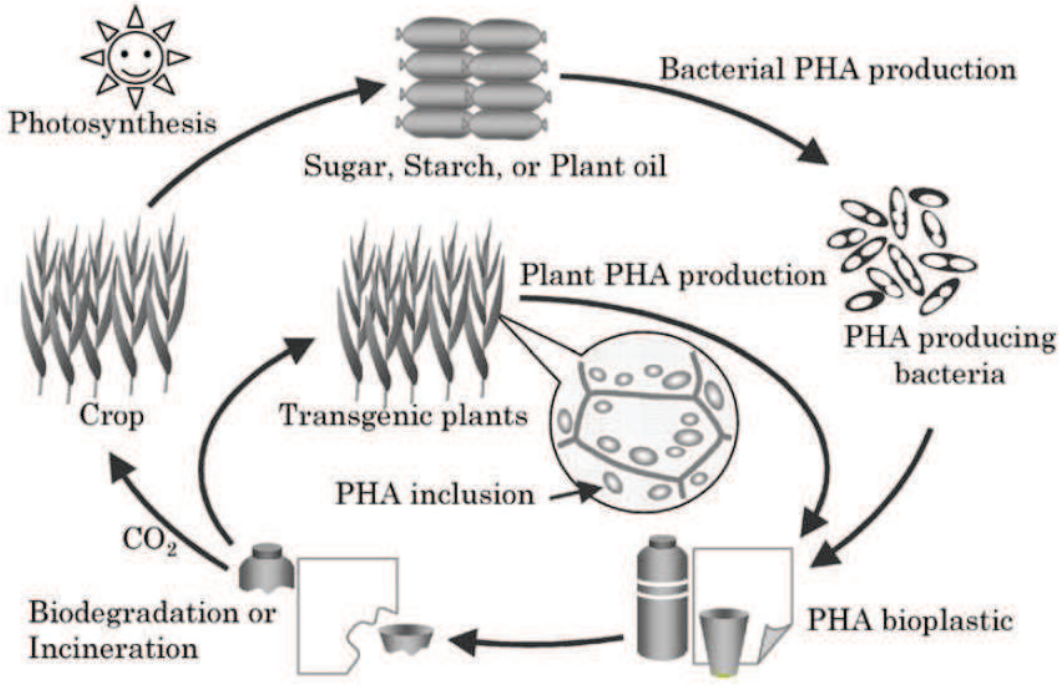
3.1. Co je to PHA?

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou polymerní materiály, které v poslední době vzbuzují zájem odborné i laické veřejnosti. Jedná se o velmi širokou skupinu polyesterů. Hydroxyskupina jedné kyseliny je esterifikována karboxylovou skupinou následující kyseliny, za vzniku lineárního polyesteru. [1]

Stejně jako člověk či řada jiných organismů, i některé bakterie „myslí na horší časy“, ale na rozdíl od člověka však neakumulují triacylglyceroly, ale výše zmíněné polyestery, které je daná bakterie schopna využívat jako zdroj energie a uhlíku, když přijdou zmíněné „horší časy“. [1, 2]

Bakterie jsou obecně velmi dobře vybaveny pro využívání a utilizaci celé řady organických i anorganických sloučenin, včetně různých odpadů a to i za velmi rozdílných podmínek lišící se v závislosti na použitém mikrobiálním kmenu. Některé bakterie jsou navíc schopny akumulovat ve svých buňkách ohromné množství těchto polyesterů. PHA u nich může tvořit až 70-80% suché hmotnosti buněk. [1, 2]

PHA jsou biodegradabilní polymery, to znamená, že tento polyester může být degradován řadou jiných mikroorganismů, pokud bude z produkční bakterie izolován, použit a poté bude výrobek z PHA ponechán volně ve vhodném biotopu. V takovém případě dojde k jeho přirozenému a relativně rychlému rozkladu ve srovnání s běžnými syntetickými polymery z ropy. Dlouhá perzistence syntetických polymerů v životním prostředí je všeobecně známá a je jí věnována značná pozornost. [2, 3]



Obrázek 1 Obecné schéma výroby PHA [4]

PHA tedy díky tomu a díky svým materiálovým vlastnostem, které jsou diskutovány níže, nabízí širokou řadu aplikačních možností – např.: použití pro výrobu některých druhů obalových materiálů, dále při produkci homopolymeru, např.. poly(3-hydroxybutarátu),

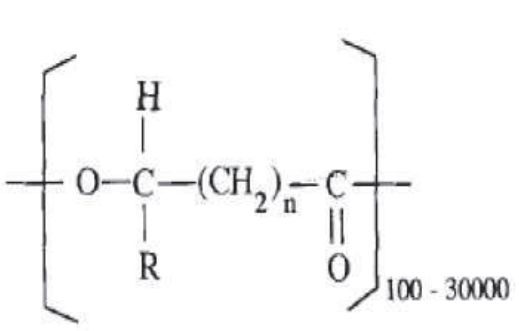
získáme po kyselé hydrolýze čistou opticky aktivní látku R-3-hydroxybutyrát, kterou můžeme použít například pro stereoselektivní organické syntézy. Další aplikační možností PHA je jako nosič biologicky aktivních látek v humánní či veterinární medicíně nebo pro přípravu granulovaných či enkapsuovaných hnojiv s postupným uvolňováním, u kterých intenzita uvolňovaní hnojiva resp. enkapsulované látky bude záviset na rychlosti biodegradace polymeru, která se dá do značné míry regulovat. [1, 3]

Na obrázku č. 1 je schématicky znázorněn obecný princip bioprodukce PHA, kterou v současné době můžeme rozdělit na dvě základní skupiny: výroba pomocí mikroorganismů nebo pomocí transgenních rostlin. [4]

Největší výhodou výroby těchto materiálů je nezávislost výroby na ropě a jiných fosilních zdrojích. Zásoby ropy a jiných fosilních paliv nejsou neomezené. Další výhodou PHA ve srovnání s běžnými polymery je skutečnost, že při výrobě konvekční polymerů dochází k akumulaci velkého množství odpadů, které jsou ohromnou zátěží pro životní prostředí. [1, 5]

Pomocí produkčního mikroorganismu tedy můžeme „vyrábět“ PHA s použitím obnovitelného zdroje ze jako je např.: sacharóza, škrob, rostlinný olej nebo použít odpady z potravinářství či gastronomie jmenovitě např.: melasa, fritovací tuky a jiné.

Použité výrobky z PHA mohou být skládkovány či kompostovány. Při aerobním rozkladu pomocí přítomné mikroflóry jsou za vhodných podmínek rozloženy na oxid uhličitý a vodu a za anaerobních podmínek jsou degradovány na methan, oxid uhličitý a vodu. Vzniklý oxid uhličitý se vrací zpět do koloběhu uhlíku a je následně znovu fixován zelenými rostlinami, jejichž produkty nebo odpady z nich se používají pro produkci PHA. Z výše uvedeného je patrné, že nedochází ke zvyšování množství oxidu uhličitého v atmosféře, jako je tomu např. při likvidaci plastů z ropy ve spalovnách. [6, 7, 8]



		Polymer
n = 1	R = hydrogen	Poly(3-hydroxypropionate)
	R = methyl	Poly(3-hydroxybutyrate)
	R = ethyl	Poly(3-hydroxyvalerate)
	R = propyl	Poly(3-hydroxyhexanoate)
	R = pentyl	Poly(3-hydroxyoctanoate)
	R = nonyl	Poly(3-hydroxydodecanoate)
n = 2	R = hydrogen	Poly(4-hydroxybutyrate)
n = 3	R = hydrogen	Poly(5-hydroxyvalerate)

Obrázek 2 Obecné schéma PHA [10]

Obrázek č. 2 uvádí obecný vzorec těchto lineárních polyesterů.

Při produkci PHA pomocí transgenních rostlin, dochází k akumulaci PHA přímo v rostlinných pletivech. PHA je tedy přímo izolováno z rostlin a použito. Další osud výrobků z PHA je analogický, jak bylo uvedeno u bakteriální produkce (viz výše). Nevýhodou tohoto postupu výroby je polní produkce průmyslových plodin místo potravinářských plodin. Tato skutečnost je s ohledem na stále rostoucí velikost lidské populace na planetě nežádoucí strategií, protože do budoucnosti bude pravděpodobně potřeba výrobou potravin zintensivnit, nikoli přecházet na nepotravinářské plodiny. Rozšíření bioprodukce PHA pomocí transgenních rostlin, ale bude záviset především na ekonomické bilanci výroby, ceně ropy a

dalších klíčových komodit, protože největším problémem širšího rozšíření velkoobjemové výroby PHA je vyšší cena ve srovnání s konvekčními plasty z fosilních zdrojů. [4, 9]

3.1.1. scl-PHA

Scl-PHA („short chain lenght“) je zkratka pro označení polymerů, které obsahují hydroxykyseliny s krátkou délkou řetězce, tz. 3 až 5 atomů uhlíku. [1, 11]

Nejznámější a pravděpodobně nejlépe prostudovaný scl-PHA a polyhydroxyalkanoát vůbec je biopolymer poly(3-hydroxybutyrát) (P3HB). Tento polymer se objevuje jako zásobní látka u řady mikroorganismů a ve formě oligomeru se vyskytuje v celé řadě další nižších i vyšší organismů (u rostlin, hub a živočichů včetně člověka). Jeho ubikvitní rozšíření, biokompatibilita, biodegradabilita a produkce z obnovitelných zdrojů ho činí velmi zajímavou a perspektivní látkou s širokým aplikačním potenciálem, jak je uvedeno výše. Určitou nevýhodou tohoto homopolymeru jsou jeho materiálové vlastnosti, řešení tohoto problému je v současnosti věnována značná pozornost a možnosti ovlivnění jeho materiálových vlastností jsou diskutovány níže. [1, 11]

3.1.2. mcl-PHA

Mcl-PHA („medium chain lenght“) je zkratka pro označení polymerů, které obsahují hydroxykyseliny se střední délkou řetězce, tz. 6 až 14 atomů uhlíku. [1, 11, 12]

Schopnost akumulovat odlišný druh PHA než scl-PHA je způsobeno odlišnou substrátovou specifitou PHA syntázy, jak je uvedeno dále. Akumulace mcl-PHA je obecně považována za charakteristickou pro bakterie rodu *Pseudomonas*. [12]

3.1.3. lcl-PHA

Lcl-PHA („long chain lenght“) je zkratka pro označení polymerů, které obsahují hydroxykyseliny s dlouhou délkou řetězce, tz. více než 15 atomů uhlíku. Lcl-PHA zatím byly připraveny pouze *in vitro* enzymově katalyzovanou polymerací nebo chemickou syntézou. Nebyla dosud pozorována jejich přirozená přítomnost v přírodě. [1, 10]

3.1.4. Materiálové vlastnosti

Mechanické vlastnosti jednotlivých polyesterů jsou silně závislé na monomerním složení a na molekulové hmotnosti akumulovaného polymeru.

Monomerní složení závisí především na použitém produkčním organismu a u bakteriální produkce dále na použitém uhlíkatém substrátu a suplementací média vhodnými prekurzory.

3.1.4.1. Modifikace vlastností P3HB

P3HB homopolymer je kompletně stereoregulární polyester se všemi asymetrickými uhlíky v R konfiguraci - z toho důvodu je vysoce krystalický. Vysoká krystaličnost (typicky 55-80%) ho činí poměrně tuhým a křehkým materiálem s vysokým bodem tání. Mechanické vlastnosti jsou podobné polypropylenu, až na relativní prodloužení, které je u P3HB výrazně nižší než u polypropylenu. Z výše popsaných vlastností je použití P3HB značně omezeno a je zde obecně silná motivace pro modifikaci jeho vlastností. [1, 2, 3]

Modifikace vlastností polymeru akumulovaného u bakterie *Cupriavidus necator* H16 se provádí změnou monomerního složení polymeru za vzniku kopolymeru. Existuje několik postupů, nejpoužívanější je suplementace růstového média prekurzory propionyl-CoA (soli

kyseliny propionové nebo valerové) nebo suplementace média 1,4-butandiolem nebo soli kyseliny 4-hydroxybutanové.

V prvním případě bude vznikat kopolymer P(3HB-co-3HV), procentuální zastoupení jednotlivých frakcí v polymeru bude ovlivněno kultivačními podmínkami, substrátem a řadou dalších faktorů.

V druhém případě bude vznikat kopolymer P(3HB-co-4HB), zastoupení jednotlivých frakcí v polymeru bude opět záviset na řadě experimentální parametrů jako např.: teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku, koncentrace substrátu, koncentrace prekurzorů.

Další potenciální metabolické možnosti vzniku propionyl-CoA udává obrázek 10 a jsou diskutovány níže (viz. 3.2.4.).

Porovnání vlastností P(3HB-co-3HV), P(3HB-co-4HB), polypropylenu a homopolymeru P3HB udává tabulka 1.

Tabulka 1 porovnání mechanických vlastností různých druhů PHA [13]

polymer	teplota tání [°C]	pevnost v tahu [MPa]	pružnost v tahu [GPa]	roztažnost [%]
P3HB	179	40	4	3
P(3HB-co-3HV) 90:10	150	25	1	20
P(3HB-co-3HV) 80:20	135	20	1	100
P4HB	53	104	149	1000
P(3HB-co-4HB) 90:10	159	24	-	242
P(3HB-co-4HB) 10:90	50	65	100	1080
PP	170	34	2	400

3.1.4.2. Vlastnosti mcl-PHA

Mcl-PHA mají výrazně nižší bod tání, který se u většiny mcl-PHA pohybuje v intervalu 39 až 65 °C. Teplota skelného přechodu je obvykle nižší než pokojová teplota a to v rozsahu -40 až -25 °C. V závislosti na monomerním složení dosahují tyto polyestery stupně krystaličnosti až 25%. [1, 13]

Široká variabilita složení monomerů nabízí řadu dalších potenciálních modifikací a použití mcl-PHA, jako např. zesítění mcl-PHA polymeru obsahující nenasycené monomery pomocí elektronového záření. [1, 10]

3.2. Produkce PHA pomocí mikroorganismů

3.2.1. Granule PHA

PHA jsou jako ve vodě nerozpustné polymery akumulovány v mikrobiálních buňkách ve formě intracelulárních inkluzí (granul) oddělených od cytoplazmy, jejichž velikost se obvykle pohybuje v intervalu 100-500 nm. Granule jsou viditelné pomocí elektronového mikroskopu (např. u bakterie *Cupriavidus necator* H16 obrázek č. 3). [1, 10]

Obecné schéma PHA granule je na obrázku č. 4. Pomocí nukleární magnetické resonance bylo zjištěno, že u bakterií akumulujících polyestery se PHA vyskytuje v metastabilním amorfním stavu, někdy v literatuře označovaný jako nPHA (nativní-PHA). Podle struktury se PHA dále označují jako dPHA (denaturovaný-PHA) či aPHA (artificial-umělý-PHA). [10, 13, 14]

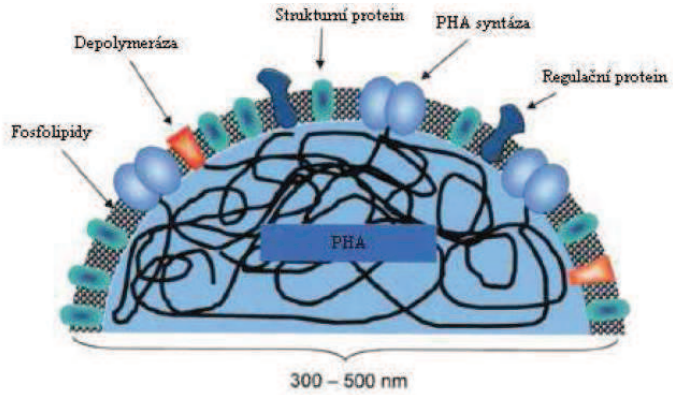
Po buněčné lyzi je buněčná inkluze PHA vystavena vnějším podmínkám a dochází u ní k nevratným změnám, které vedou ke vzniku částečně krystalické struktury polymeru. Tato forma je často nazývána jako dPHA.

aPHA může být připraven rozpuštěním PHA ve vhodném roztoku organického rozpouštědla (například aceton nebo trichlormetan). A následným přidáním povrchově aktivní látky, lze připravit emulzi. Při odpaření rozpouštědla vznikle hmota gelovité konzistence označována jako „umělý“ PHA neboli aPHA. [14]

Obrázek 3 Bakterie *C. necator* H16 [15]

Hustota inkluzí PHA se pohybuje v intervalu 1,2 – 1,3 g/cm^3 u poly(3-hydroxy butyrátu) a okolo 1,05 g/cm^3 u mcl-PHA. Pokles hustoty u mcl-PHA je způsoben obsahem vyšších hydroxyalkanoatových kyselin jako monomerů v PHA.

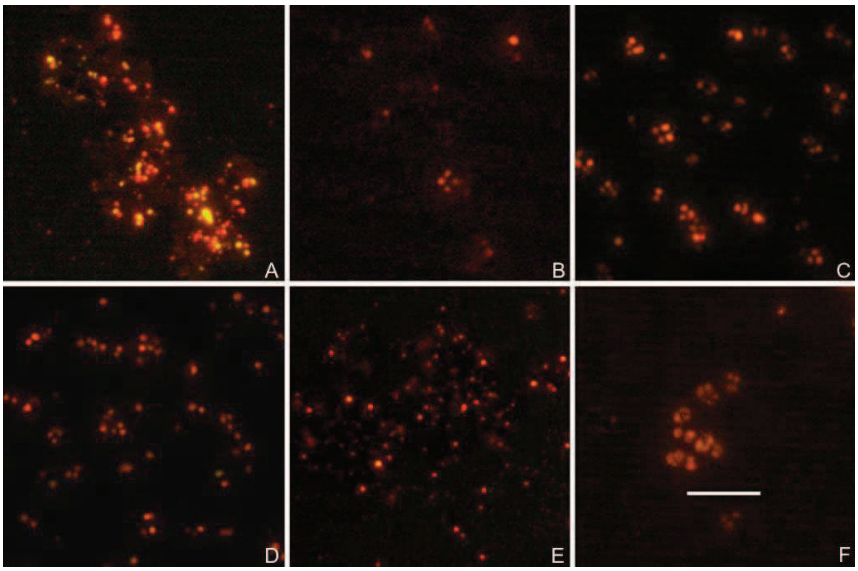
Izolované granule obsahují jako hlavní složku polyester, a to okolo 98%. Dále granule obsahují bílkoviny okolo 1,5%, především regulační proteiny, polymerační a depolymerační enzymy a okolo 0,5 % lipidů a fosfolipidů. [1, 2, 3, 16]



Obrázek 4 Obecné schéma granule PHA [17]

PHA granule uvnitř bakteriální buněk lze obarvit pomocí lipofilních barviv jako např.: Sudan Black, Nile Blue A nebo pomocí barviva Nile Red. [3]

Obrázek č. 5 ukazuje fotografii z fluorescenčního mikroskopu bakterií rodu *Halococcus*, u kterých bylo intracelulární PHA obarveno barvivem Nile Blue A.



Obrázek 5 PHA inkluze u různých kmenů rodu *Halococcus* obarvené barvivem Nile Blue A (bílá čárka = 5 µm) [18]

3.2.1.1. Phasiny

PHA granule jsou obaleny vrstvou fosfolipidů a bílkovin (jak je uvedeno výše), převládající složkou proteinů jsou phasiny. Tyto proteiny mohou tvořit až 5% veškerých bílkovin u bakterií akumulující PHA. [1, 10, 19]

Phasiny jsou nízkomolekulární bílkoviny. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje v intervalu 14 až 28 kDa, pokrývají většinu povrchu PHA granulí a jsou často považovány za hlavní regulační faktor ovlivňující velikost a počet granulí PHA v cytoplazmě. Avšak jejich přesná funkce zatím není přesně známa. [19]

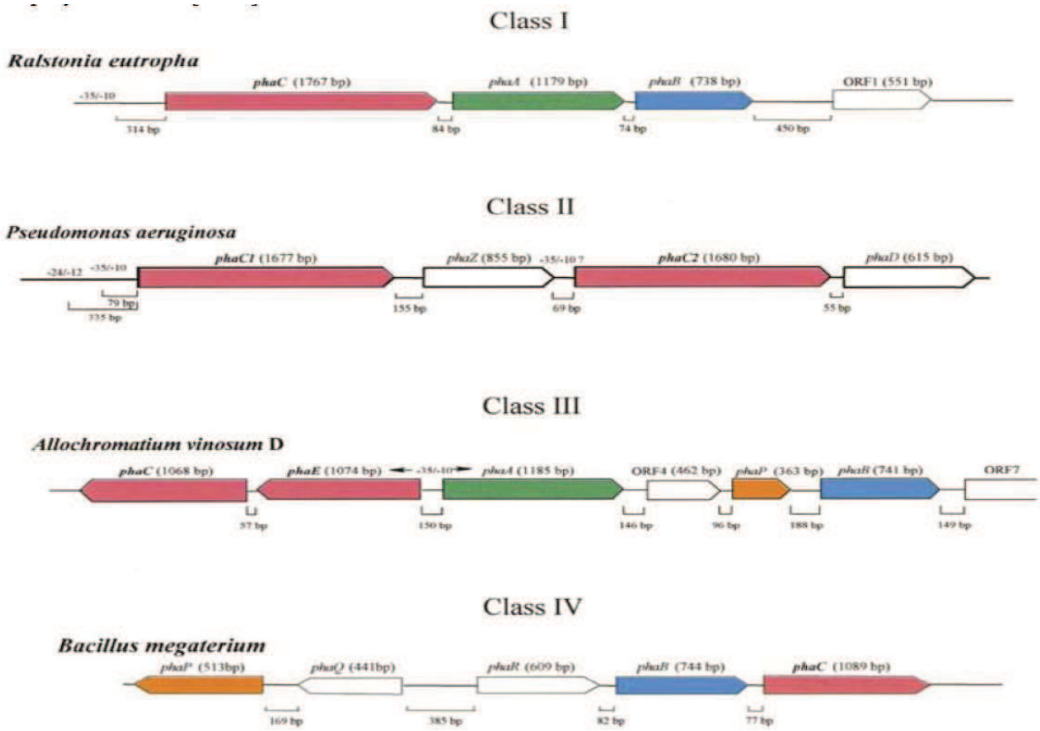
3.2.1.2. PHA polymerázy (syntázy)

PHA syntáza je enzym, který katalyzuje stereoselektivní polymeraci hydroxyl-acyl-CoA za vzniku PHA. Je tedy posledním enzymem při produkci PHA. Tyto enzymy, mohou být rozděleny do čtyř tříd, které se liší podle počtu podjednotek a podle substrátové specifity. [1, 10]

PHA syntázy patřící do I a II skupiny jsou složeny pouze z jedné podjednotky. Podle jejich substrátové specifity studované *in vivo* a *in vitro*, bylo zjištěno, že syntázy I třídy (vyskytující se např. u *C. necator* H16) preferují utilizaci R-3-hydroxyacyl-CoA o počtu uhlíku 3 až 5, zatímco syntázy II třídy (vyskytující se především u rodu *Pseudomonas*) preferují R-3-hydroxyacyl-CoA o počtu uhlíků 6 až 14. PHA syntázy patřící do III třídy jsou dimerní enzymy, vyskytující se např. u bakterie *Allochromatium vinosum,* kde katalyzují polymeraci R-3-hydroxyacyl-CoA o počtu uhlíku 3 až 5. [2, 3, 10]

PHA syntázy IV třídy se podobají syntázám z III třídy, liší se však v jedné ze dvou podjednotek a stejně jako syntázy III třídy katalyzují polymeraci R-3-hydroxyacyl-CoA o počtu uhlíku 3 až 5. Přirozeně se vyskytují např. u bakterie *Bacillus megaterium*. [2, 3, 10]

Obrázek č. 6 znázorňuje grafické rozložení genů kódující PHA synzázy I až IV třídy. Vysvětlivky jednotlivých zkratek jsou uvedeny v tabulce č. 2.



Obrázek 6 Rozložení genů kódující PHA syntázy I až IV třídy [20]

Tabulka 2 Tabulka zkratek k obrázku č. 6 [20]

phaA	gen pro 3-ketothiolázu	phaD	PHA depolymeráza
phaB	gen pro acetoacetyl-CoA reduktázu	phaE	syntáza III třídy
phaC/C_1/C_2	geny pro PHA syntázy	phaP	syntáza IV třídy

3.2.2. Biodegradace PHA

Biodegradabilita PHA je jedna z hlavních předností, která činí tyto materiály atraktivními pro průmyslovou produkci. Biodegradace přirozeně probíhá v cytoplazmě u živých buněk i extracelulárně u výrobku z PHA, který je volně ponechán ve vhodném biotopu. [2, 3]

V této oblasti bylo provedeno mnoho rozsáhlých výzkumů a studií, které lze rozdělit na intracelulární a extracelulární degradaci. Oba procesy se liší zúčastněnými enzymy, které katalyzují hydrolýzu PHA. Důvodem je odlišná fyzikální struktura intracelulárního a extracelulárního PHA.

Podle většiny pozorování dokáží intracelulární depolymerázy utilizovat pouze nPHA a nedokáží hydrolyzovat dPHA, který je hlavní fyzikální struktura PHA mimo buňku. Analogická situace je u extracelulárních depolymeráz, ty nejsou schopny katalyzovat hydrolýzu nPHA, ale hydrolyzují pouze částečně krystalický polymer ve formě dPHA. [1, 2, 10]

3.2.2.1. Intracelulární degradace

Z provedených výzkumů vyplývá přirozená přítomnost PHA syntáz i depolymeráz v buňkách mikroorganismů akumulující PHA. Tyto buňky jsou tak vybaveny pro utilizaci PHA jako energetického zdroje v případě nedostatku využitelného substrátu. Procesy polymerace i depolymerace probíhají současně, avšak odlišnou intenzitou, která je pravděpodobně regulována. Nicméně přesné mechanismy regulace obou protichůdných procesů nejsou doposud známy. [9]

U různým mikroorganismů byla nalezena řada intracelulárních depolymeráz (označovaných jako *phaZ*$_a$, *phaZ*$_b$, *phaZ*$_c$ či *phaZ*$_d$). Tyto enzymy se rozdělují dle lokalizace v buňce. Mohou být volně rozpuštěny v cytoplazmě nebo jsou začleněny do membrány. [21, 22]

Enzymy, které jsou součástí membrány hydrolyzují PHA za vzniku kratších oligomerních řetězců. Enzymy volně rozpuštěné v cytoplazmě mají endo i exo katalytickou aktivitu a katalyzují hydrolýzu PHA-oligomerů až na jednotlivé monomery. [13, 14, 21, 22]

Příprava mutantních mikroorganismů se sníženou enzymovou aktivitou intracelulárních depolymeráz je jedna z možných strategií zefektivnění výroby PHA. [2, 21, 22]

3.2.2.2. Extracelulární degradace

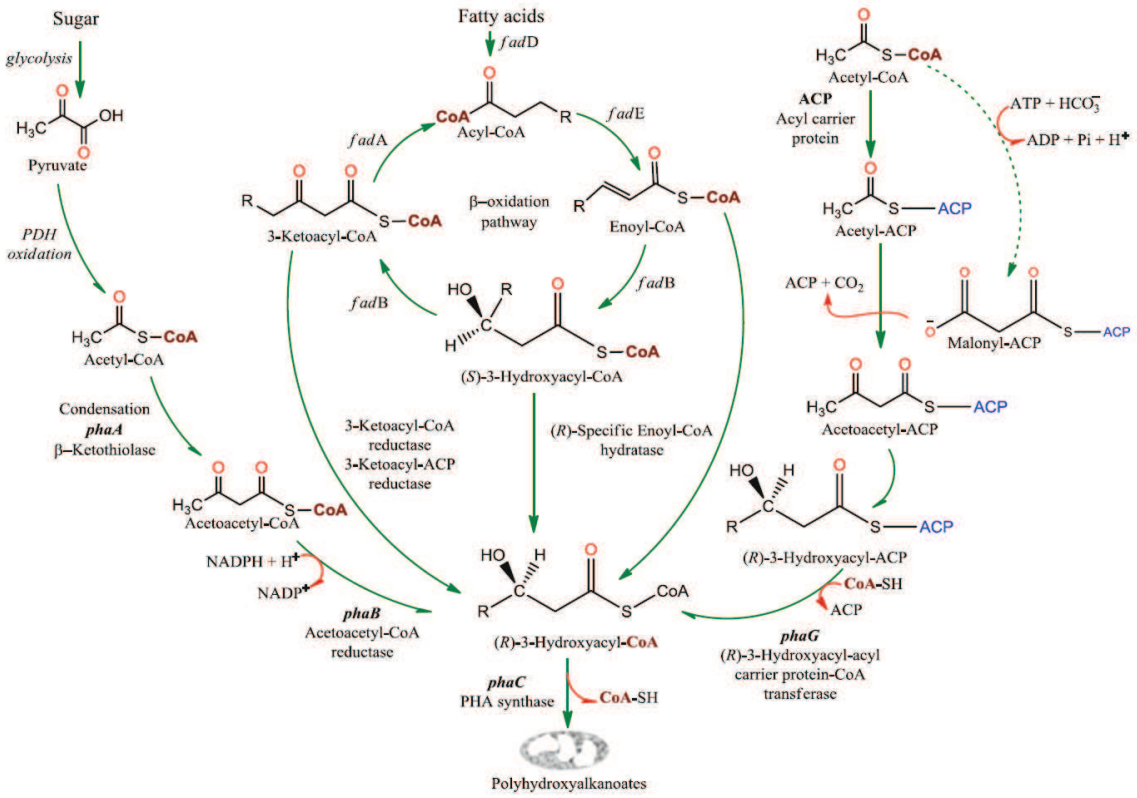
PHA se mimo buňku vyskytuje v tzv. denaturované formě (jak je uvedeno výše, viz. 3.2.1.). Schopnost degradovat extracelulární dPHA a využít jej jako zdroj energie je široce rozšílena mezi mikroorganismy a závisí na schopnosti extracelulární produkce PHA depolymeráz a na ovlivnění jejich aktivity prostředím (pH, iontová síla, teplota prostředí atd.). [23]

3.2.3. Metabolismu PHA

Polyhydroxyalkanoáty jsou u mikroorganismů široce rozšířené a jejich výskyt byl do současnosti prokázán u řady bakterií - gram-negativních, gram-pozitivních, archaebakterií i cyanobakterií. Ačkoli hlavní složkou většiny PHA jsou nasycené nevětvené R-3-hydroxyalkanoatové kyseliny o počtu uhlíku 3 až 15, byly nalezeny i PHA obsahující 4-, 5- nebo 6-hydroxyalkanoátové kyseliny obsahující různé nasycené nebo nenasycené monomery a různé substituenty jako např. kyano skupiny, halogeny a další, které jsou do PHA inkorporovány v závislosti na použitém substrátu, produkčním kmenu a řadě dalších kultivačních faktorů. [1, 10, 24]

Bakterie syntetizující PHA jsou rozděleny do dvou základních skupin, akumulující scl- či mcl-PHA, jak je uvedeno výše. Je ale třeba zdůraznit, že toto rozdělení není rigidní, protože bylo nalezeno několik bakterií, které jsou schopny akumulovat „hybridní“ PHA o počtu uhlíku 4 až 8. To je způsobeno především odlišnou substrátovou specifitou PHA syntázy, která je odpovědná za polymeraci R-3-hydroxyacyl-CoA do PHA. [2, 3, 24]

Z hlediska kinetiky akumulace PHA lze produkční mikroorganismy rozdělit do dvou skupin. (i) První skupina akumuluje PHA pouze při současném nadbytku využitelného uhlíkatého zdroje a nedostatku některých nutrietů (nedostatek využitelného dusíku nebo fosforu a jiných prvků) a PHA lze tedy považovat za sekundární metabolit. Do této skupiny patří např. *C. necator* H16. (ii) Do druhé skupiny se řadí bakterie, které akumulují PHA během buněčného růst bez nutriční limitace při současném nadbytku uhlíkatého zdroje. PHA u těchto mikroorganismů lze považovat za primární metabolit, do této skupiny patří např.: *Azohydromonas lata*, *Azotobacter vinelandi*, *Pseudomonas putida* či *Pseudomonas aeruginosa* . [1, 2, 3, 10]



Obrázek 7 Obecné metabolické schéma vedoucí k PHA [24]

3.2.3.1. Syntéza poly(3-hydroxybutyrátu)

Poly(3-hydroxybutyrát) je nejrozšířenější a nejlépe prostudovaný PHA. Většina současných znalostí o P3HB biosyntéze byla získána studiem bakterie *C. necator*. U bakterie *C. necator* je P3HB syntetizován z acetyl-CoA třemi následnými kroky, jak ukazuje levá část obrázku 7 a obrázek 8. [1, 10]

3-Ketothioláza (kódována *phaA* genem) katalyzuje kondenzaci dvou molekul acetyl-Co-A za vzniku acetoacetyl-CoA. V dalším kroku dochází ke stereospecifické redukci pomocí acetoacetyl-CoA reduktázy (kódována *phaB* genem) za vzniku R-3-hydroxybutyryl-CoA, který je jako monomer pomocí PHA syntázy (kódována *phaC* genem) inkorporován do PHA za současného uvolnění volného koenzymu A. [1, 10]

Důležitým regulačním bodem této dráhy je enzym 3-ketothioláza. Její aktivita je ovlivňována především koncentrací acetyl-CoA a volného HS-CoA v cytoplazmě, kde je dráha lokalizována. Dalším regulačním faktorem je vnitrobuněčná koncentrace NAD(P)H a poměr NAD(P)H/NAD(P)$^+$. [1, 10]

U bakterie *C. necator* dochází k akumulaci P3HB při limitaci růstu nedostatkem některého nutrietu, nejčastěji dusíku nebo fosforu a při přebytku uhlíkatého zdroje. Za takového stavu dojde k vytvoření vysokého poměru NAD(P)H/NAD(P)$^+$ čímž dojde inhibici k isocitrátdehydrogenázy a tím i celého citrátového cyklu. Při snížené možnosti utilizace acetyl-CoA v citrátovém cyklu dojde k využívání acetyl-CoA pro syntézu P3HB. [1, 10]

Bakterie *C. necator* je schopna akumulovat P3HB na sacharidických substrátech, bílkovinných hydrolyzátech i na tucích jako zdroji uhlíku.

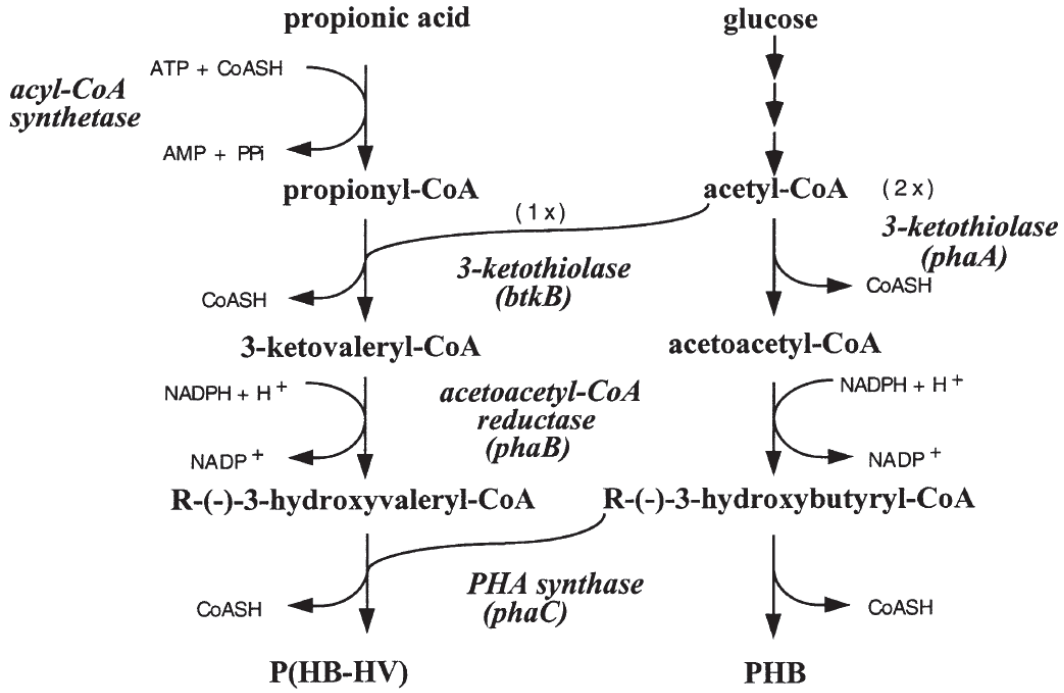
3.2.3.2. Syntéza poly(3-hydroxybutyrátu-co-3-hydroxyvalerátu)

Kvůli nevhodným fyzikálně chemickým vlastnostem homopolymeru P3HB, je věnována značná pozornost produkci kopolymeru s vhodnějšími materiálovými vlastnostmi.

Přídavek soli kyseliny propionové, kyseliny valerové nebo 1-propanolu do produkčního média vede u bakterie *C. necator* H16 k produkci náhodného kopolymeru složeného z 3-hydroxyvalerátu a 3-hydroxybutyrátu P(3HB-co-3HV). [10]

Biosyntetická dráha vzniku P(3HB-co-3HV) u *C. necator* H16 je ukázána na obrázku číslo 8. Kondenzace propionyl-CoA a acetyl-CoA je katalyzována odlišnou 3-ketothiolázou (kódována *btkB* genem), která má vyšší specifitu pro propionyl-CoA než 3-ketothioláza (kódována *phaA* genem). Stereospecifická redukce a polymerace jsou katalyzovány stejnými enzymy jako při produkci homopolymeru P3HB.

Schéma č. 8 popisuje metabolickou dráhu vzniku P3HB a P(3HB-co-3HV)



Obrázek 8 Metabolismus vzniku P(3HB-co-3HV) a PHB [24]

3.2.3.3. 2-Methylcitrátový cyklus

V kapitole 2.1.4.1. byla diskutována možnost změny materiálových vlastností homopolymeru P3HB přídavkem uhlíkatých prekurzorů vedoucí ke vzniku propionyl-CoA. Začlenění do PHA ve formě 3-hydroxyvalerátového monomeru je jedna z metabolických možností utilizace propionyl-CoA.

Další možností utilizace propionyl-CoA je kompletní katabolické odbourání propionyl-CoA. To se děje prostřednictvím 2-methylcitrátového cyklu (označovaný jako MCC), který je také využíván při katabolickém odbourání lichých organických kyselin či jiných utilizovatelných látek, jejichž katabolickým meziproduktem je propionyl-CoA. [26, 27]

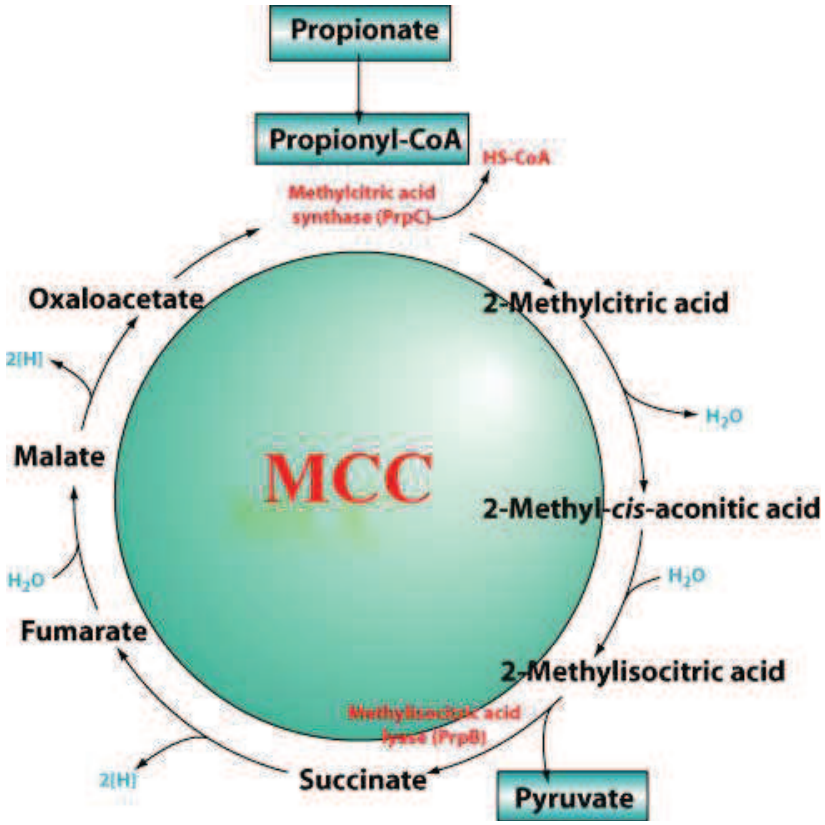
První krok MCC je analogický s citrátovým cyklem, dochází při něm ke kondenzaci propionyl-CoA s oxalacetátem za vzniku 2-methylcitrátu a uvolnění volného koenzymu A. Reakce je katalyzována 2-methylcitrátsyntázou a jedná se o důležitý regulační bod celého MCC cyklu. [26]

V dalším kroku je 2-methylcitrát dehydratován na 2-methyl-cis-akonitát, který je následně hydratován za vzniku 2-methylisocitrátu. [26]

V dalším kroku je 2-methylisocitrát štěpen 2-methylisocitrátlyázou a vzniká pyruvát a sukcinát. Pyruvát je v procesu oxidační dekarboxylace přeměněn pomocí pyruvátdehydrogenázového komplexu na acetyl-CoA. Acetyl-CoA je zcela odbourán v citrátovém cyklu na oxid uhličitý. [26]

Sukcinát „vzniklý z propionátu“ nemůže být přímo odbourán v citrátovém cyklu, protože čtyř-uhlíkaté kyseliny jsou v citrátovém cyklu regenerovány a fungují spíše jako katalyzátory než substráty. Aby mohl být takto vzniklý sukcinát odbourán v citrátovém cyklu musí být nejdříve převeden na pyruvát a poté na acetyl-CoA. [26]

Obrázek číslo 9 ilustruje schéma 2-methylcitrátového cyklu.



Obrázek 9 Základní schéma 2-methylcitrátového cyklu [26]

Úplné katabolické odbourání sukcinátu je pravděpodobně proces katalyzovaný tzv. jablečným enzymem. Sukcinát je nejdříve pomocí enzymů citrátového cyklu přeměněn na malát, u kterého dojde k dekarboxylaci kyseliny jablečné (malátu) za vzniku pyruvátu a oxidu uhličitého. Vzniklý pyruvát je katabolizován pomocí pyruvátdehydrogenázového komplexu na acetyl-CoA. [26]

3.2.3.4. Vznik homopolymeru P3HV

Fakultativně methylotrofní bakterie *Paracoccus denitrificans* syntetizuje a akumuluje homopolymer P3HV během kultivace na n-pentanolu jako jediném uhlíkatém zdroji. Přičemž n-pentanol je oxidován na valerovou kyselinu a následně převeden na valeryl-CoA. Autoři studie předpokládají, že 3-ketovaleryl-CoA, který je tvořen β-oxidací je redukován na (R)-3-hydroxyvaleryl-CoA, který je následně polymerizován. [28]

3.2.3.5. Syntéza mcl polyhydroxyalkanoátů

Dalším typem PHA metabolismu je biosyntéza mcl-PHA, která je charakteristická pro bakterie rodu *Pseudomonas*. Tyto bakterie odvozují R-3-hydroxyacyl-CoA od meziproduktů β-oxidace mastných kyselin, syntézy mastných kyselin *de novo* nebo od oxidace různých alkanů, alkoholů a jiných organických sloučenin. [25]

Biosyntetické prekurzory pro mcl-PHA syntézu jsou příslušné 3-ketoacyl-CoA, S-3-hydroxyacyl-CoA, enoyl-CoA nebo R-3-hydroxyacyl carrier protein (označovaný jako ACP). [1, 10]

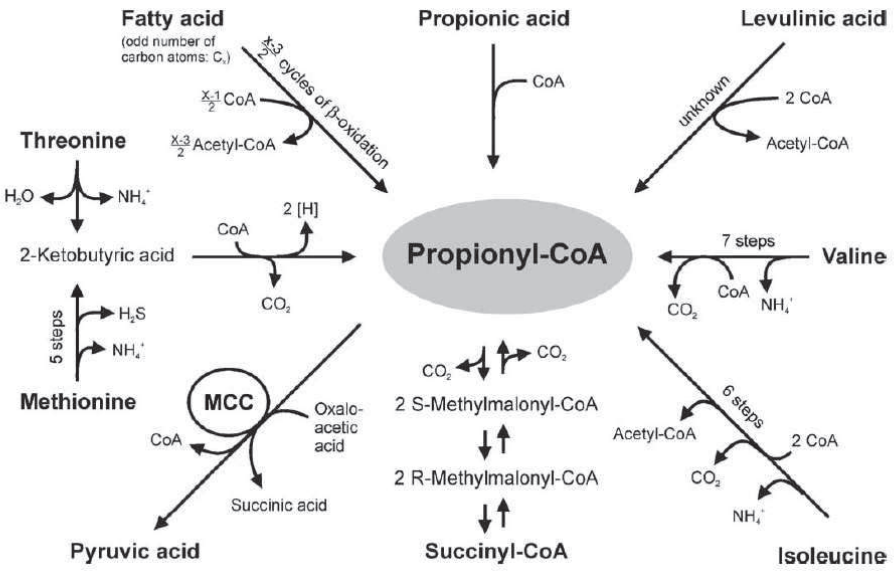
S ohledem na podobnost mezi scl-PHA biosyntézou a mcl-PHA biosyntézou se předpokládá, že dochází k polymeraci pouze R-izomerů 3-hydroxyacyl-CoA. Je tedy předpokládáno, že bakterie akumulující mcl-PHA jsou schopny enzymově katalyzované izomerace S konfigurace na R konfiguraci. [1, 10]

Stručný přehled mcl-PHA metabolismu je uveden na obrázku 7. Podrobný popis a výklad jednotlivých drah a reakčních kroků přesahuje rámec této práce.

3.2.4. Metabolický vznik propionyl-CoA

Přestože u většiny bakterií dochází k produkci P(3HB-co-3HV) pouze při suplementaci média prekurzory o lichém počtu uhlíků. Byly nalezeni i producenti akumulující P(3HB-co-3HV) při růstu jednoduchých substrátech, např. *Rhodococcus rubrum* při růstu na glukóze jako jediném uhlíkatém zdroji akumuluje kopolymer o složení 75 mol% 3HV a 25 mol% 3HB. Metabolická dráha vedoucí k P(3HB-co-3HV) při růstu na glukóze nebyla zatím plně vysvětlena. Je uvažována přeměna sukcinátu na propionát účinkem methylmalonyl-CoA mutázy a methylmalonyl-CoA dekarboxylázy nebo methylmalonyl-CoA:oxalacetát transkarboxylázy. [11, 27, 28]

Obrázek číslo 10 ilustruje metabolické možnosti vzniku a tvorby propionyl-CoA.



Obrázek 10 Potenciální prekurzory pro vznik propionyl-CoA [28]

3.2.4.1. Vznik propionyl-CoA z mastných kyselin s lichým počtem uhlíků

Alifatické organické kyseliny s dlouhým uhlíkatým řetězcem a lichým počtem atomů uhlíku, jako např.: valerová, heptanová, nonanová či undekanová kyselina jsou propiogenní substráty. Při poslední obrátce β-oxidace zůstává propionyl-CoA namísto acetyl-CoA. Protože většina přirozeně se vyskytujících mastných kyselin má sudý počet atomů uhlíku, odpadní tuk či jiný substrát s významnějším obsahem lichých mastných kyselin tak většinou není k dispozici. Proto je využití tohoto jevu ve velkoobjemové produkci spíše v rovině teoretické. [28]

3.2.4.2. Vznik propionyl-CoA z aminokyselin

Katabolismus aminokyselin je dalším důležitým zdrojem propionyl-CoA. Valin, leucin, thereonin a methionin jsou prekurzory pro akumulaci kopolymeru P(3HB-co-3HV), protože jsou katabolyzovány přes propionyl-CoA. [28]

Použití těchto aminokyselin k suplementaci média by bylo velmi neekonomické kvůli ceně aminokyselin a byly by zde další technologické problémy jako např.: omezená rozpustnost některých aminokyselin.

Avšak intracelulární tvorba nebo nadprodukce těchto aminokyselin nebo jejich intermediátů a jejich následná degradace by umožňovala intracelulární tvorbu propionyl-CoA a jeho inkorporaci do PHA bez nutnosti suplementace média.

Tato fermentační strategie byla použita u isoleucin-auxotrofního mutanta *C. necator*. Pokud tato bakterie nebyla limitována využitelným dusíkem, docházelo k sekreci valinu, leucinu a isoleucinu do média. Když však byl navozen stav limitace dusíkem a uhlíkatý substrát byl v nadbytku, byl akumulován P(3HB-co-3HV) na různých nepropiogeních substrátech. Tato produkce je, ale pro masivní rozšíření méně vhodná, kvůli nižším výtěžkům, kterých bylo dosaženo. [29]

Podobná metabolická strategie je využita pro produkci kopolymeru P(3HB-co-3HV) v transgenních rostlinách, jak je uvedeno dále.

3.2.4.3. Vznik propionyl-CoA z kyseliny levulové

PHA akumulované bakteriemi při růstu na kyselině levulové (kyselina 4-oxopentanová) obvykle obsahují mimo 4HV také 3HB a 3HV jako další monomery PHA. Protože kyselina levulova je relativně levný uhlíkatý zdroj, který může být velkoobjemově produkován z obnovitelných zdrojů chemickou konverzí, je tato fermentační strategie pro změnu materiálových vlastností zkoumána a je jí věnována pozornost. [28]

Metabolismus kyseliny levulové při akumulaci PHA však zatím není zcela znám.

3.2.5. Vybraní producenti scl-PHA

3.2.5.1. *Cupriavidus necator* H16

Bakterie *C. necator* H16 dříve nazývána jako *Alcaligenes euthrophus*, *Ralstonia euthropha* H16 či *Wausteria euthropha* je gram-negativní nesporulující chemolitoautotrofní široce rozšířená bakterie, která je rozsáhle prostudována v souvislosti se schopností akumulovat ve velkém množství PHA. Používá se jako modelový organismus pro metabolismus PHA a zároveň je potenciálním průmyslovým producentem těchto biopolymerů. [1, 2, 30]

Bakterie *C. necator* H16 byla v minulosti zvažována jako producent jednobuněčné bílkoviny (single cell protein) pro fortifikaci zemědělských krmiv nebo jako možná kosmická výživa. V současné době je bakterie používána v řadě biotechnologických procesů. Dále je bakterie studována jako producent fotoreaktivního sideroforu cupriachelinu či vysoce selektivní L-thereonin 3-dehydrogenázy pro stanovení L-thereoninu. Bakterie je dále studována jako možný dekontaminat aromatických sloučenin. [31, 32, 33. 34]

C. necator H16 je řazena mezi tzv. knall-gas bakterie, tz. že jako fakultativně chemolitotrofní bakterie je schopna autotrofního růstu a oxid uhličitý ze vzduchu fixuje prostřednictvím Calvinova cyklu, ale v přítomnosti organických substrátů jako glukóza, fruktóza, organické kyseliny či tuky je schopna heterotrofní utilizace těchto látek. [31, 32, 34]

Bakterie ovšem není vybavena enzymem fruktóza-1,6-bisfosfátáza, z toho důvodu zpracovává fruktózu, glukózu a další cukerné látky prostřednictvím Entner-Doudoroffovy dráhy. [31, 32]

Bakterie je v nepřítomnosti kyslíku schopna využít dusičnany jako konečný akceptor elektronů v procesu denitrifikace.

Na obrázku číslo 3 je vidět bakterie *C. necator* H16 a akumulovaný polyester ve formě granulí.

3.2.5.2. Bacillus megaterium

Rod *Bacillus* je rozsáhlý a v životním prostředí velmi rozšířený. Jeho druhy tvoří většinou grampozitivní sporulující peritrichní tyčinky, které mají bohaté enzymové vybavení pro utilizaci různých substrátů, amylolytické, proteolytické, pektolytické enzymy a řadu dalších enzymů, které jsou pomocí bakterií rodu *Bacillus* průmyslově vyráběny. [34]

Řada druhů produkuje antibiotika polypeptidové povahy (bacitracin, subtilin, gramicidin aj.), které pravděpodobně přispěly k velkému rozšíření svých producentů v přírodě. [34, 35]

B. megaterium je sporotvorná bakterie, která sehrála důležitou roli v historii výzkumu a poznání polyhydroxyalkanoátů. U *B. megaterium* byla poprvé popsána akumulace polyhydroxyalkanoátů. Z tohoto důvodu je její metabolismus související s PHA velmi dobře prozkoumán a popsán a v minulosti sloužil jako modelový systém. Biosyntetická dráha PHA je podobná jako u *C. necator*, avšak množství akumulovaného polymeru je nižší (okolo 50% sušiny). Nicméně bakterii je stále věnována pozornost především kvůli širokému enzymovému vybavení, velké odolnosti a nízkým výživovým nároků, což ji činí atraktivní pro utilizaci odpadních surovin různého původu. [34]

3.2.5.3. Azotobacter vinelandii

A. vinelandii je gramnegativní tyčinkovitá široce rozšířená půdní bakterie. Z ekologického pohledu má význam především pro úrodnost půdy, protože je schopna fixovat atmosférický dusík, i když fixace dusíku není tak intenzivní jako u hlízovitých bakterií, např. rodu *Rhizobiaceae*. Avšak unikátní je u ní schopnost fixovat vzdušný dusík za různých podmínek, i aerobních, což u většiny diazotropů vede k zastavení tohoto procesu. [35]

Tato bakterie je známá akumulací dvou průmyslově významných biopolymerů, polyhydroxyalkanoátů a alginátů. [36]

Algináty jsou lineární nevětvené kopolymery β-D-mannuronové kyseliny a α-L-guluronové kyseliny spojené glykosidickou vazbou (1>4). Díky svým vlastnostem se používají např. jako hydrokoloidy v potravinářství, stabilizátory, zahušťovadla či emulgátory. Zastoupení jednotlivých monomerů je značně variabilní a závisí na řadě faktorů. Obdobné

složení a vlastnosti mají i intracelulární polysacharidy některých řas (např. rody *Macrocystis*, *Laminaria*, aj.), ze kterých se tradičně algináty vyrábějí.

O bakterii *A. vinelandi* se uvažuje jako o budoucím průmyslovém zdroji alginátů, který by mohl nahradit výrobu z řas i jako o potenciálním producentu PHA [36]

3.2.5.4. Methanotrofní a methylotrofní mikroorganismy

Jedná se o mikroorganismy, které jsou schopny využívat jedno uhlíkaté organické sloučeniny (např.: methan, methanol) jako zdroj uhlíku a energie.

Bakterie *Methylobacterium organophilum* byla použita pro produkci PHA na methanu, bakterie akumulovala při limitaci dusíkem 57% P3HB v sušině. [37]

Z dalších použitých monokultur byla experimentálně testována bakterie *Methylobacterium extorquens* při růstu na methanolu jako jediném uhlíkatém zdroji byl obsah P3HB v sušině biomasy 30%. [38]

Použití methanu jako výchozí suroviny pro výrobu PHA může být perspektivní především při spojení s technologií anaerobní likvidace biologických odpadů (tzv. bioplynové stanice). Avšak použití mikrobiální monokultury v takovýchto provozech by bylo značně problematické a použití směsné methatrofní mikroflóry způsobuje výrazně nižší produkci PHA, variabilní složení polymeru a v neposlední řady obtížnou izolaci biomasy a regulaci procesu. [2]

3.2.5.5. Fotosyntetizující mikroorganismy

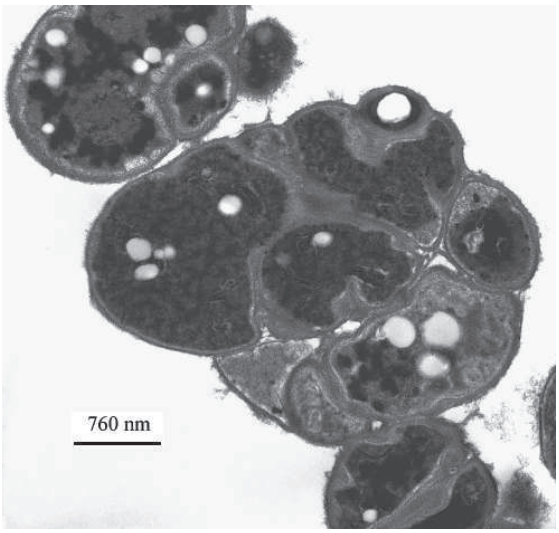
Je známo, že některé fotosyntetizující mikroorganismy jsou schopny akumulovat PHA. Například kyanoakterie *Spirulina subsalsa* u níž je možno zvýšit produkci PHA zvýšením salinity kultivačního média. Mechanismus tohoto iontové stresu zatím nebyl zcela objasněn, ale i při použití stresového faktoru je akumulace PHA relativně nízká. [2, 3, 5]

3.2.5.6. Halofilní mikroorganismy

Přítomnost PHA v halobakteriích byla poprvé popsána v roce 1972. Tento mikroorganismus byl zařazen a nazván jako „*Halobacterium* sp. from the Dead Sea“ podle místa nálezu. Ale na základě pozdější identifikace bylo zjištěno, že se jedná o *Haloarcula marismortui.*[18]

Dosud bylo identifikováno několik dalších potenciálně významných rodů schopných akumulovat P3HB nebo kopolymer P(3HB-co-3HV), jako například rody *Haloferax*, *Halobiforma* nebo *Haloquadratum.*[18]

Obrázek č. 11 ukazuje fotografii mikroorganismu *Halococcus morrhuae* s granulemi P3HB po sedmidenní kultivaci na komplexním médiu.



Obrázek 11 granule PHB uvnitř *Hcc. morrhuae* [18]

3.2.5.7. Produkce pomocí kvasinek

Kvasinky mají obecně větší velikost buňky než většina bakterií. Proto ve srovnání s bakteriemi je u kvasinek jednoduší separace biomasy z kultivačního média, např. pomocí centrifugace nebo filtrace. To by mohlo za určitých podmínek zefektivnit výrobu PHA, proto byla této možnosti v minulosti věnována určitá pozornost. [2]

Například transgenní kvasinka *Saccharomyces pombe* s inkorporovaným plastidem pBHR68, který obsahoval geny kódující 3-ketothiolázu, acetoacetyl-CoA reduktázu a PHA polymerázu z bakterie *C. necator,* dokázala za optimálních podmínek akumulovat 9% P3HB v sušině. [39]

3.2.6. Producenti mcl-PHA

3.2.6.1. rod *Pseudomonas*

Bakterie rodu *Pseudomonas* jsou gramnegativní tyčinkovité široce rozšířené mikroorganismy, které jsou dobře enzymově vybaveny a jsou proto častou kontaminací potravin a potravinářských surovin, kde způsobují jejich znehodnocení. Díky svému širokému enzymovému vybavení patří mezi důležité saprofyty a podílí se významnou měrou na přirozeném koloběhu prvků v přírodě. Do rodu *Pseudomonas* patří nepatogenní druhy, ale i rostlinné a živočišné patogeny nebezpečné i pro člověka. Dále zde můžeme najít průmyslově používané druhy k mikrobiálním transformacím. V poslední době také vzrůstá zájem o tento mikrobiální rod díky jejich schopnosti akumulovat mcl-PHA, které mají odlišné fyzikální a materiálové vlastnosti ve srovnání s homopolymerem P3HB a kopolymerem P(3HB-co-3HV). [1, 35, 40]

Monomerní složení akumulovaných mcl-PHA se velmi liší v závislosti na použitém kmenu, substrátu a kultivačních podmínkách, většinou obsahují až několik různých monomerů v různém procentuálním zastoupení. Byla ale i pozorována schopnost akumulace homopolymeru mcl-PHA. Např. divoký kmen *P. mendocina* akumuloval polyhydroxyoktanoát v množství 31% v sušině, bylo ale dosahováno malého nárůstu biomasy. [5]

U bakterie *P. aeruginosa* IFO3924 byla pozorována simultánní produkce mcl-PHA a rhamnolipidů, produkce obou polymerů byla výrazně ovlivněna teplotou, při 28-30°C převládala produkce rhamnolipidů nad PHA. [1]

3.2.7. PHA jako extracelulární metabolit

PHA jsou obecně akumulovány ve formě intracelulárních granulí. Separace biomasy, její dezintegrace a následná izolace a purifikace produktu jsou procesy, které zásadním způsobem ovlivňují konkurence schopnost a efektivitu průmyslové výroby PHA. Z výše uvedených důvodů je také pozornost věnována možnosti produkce PHA jako extracelulárního metabolitu. [41]

Extracelulární produkce PHA byla pozorována zatím pouze u mutantního mikroorganismu *Alcanivorax borkumensis* SK2 mechanismus produkce PHA do prostředí není zatím znám. Technologie výroby je pod patentovou ochranou.

A. borkumensis SK2 je olej degradující mořská bakterie, extracelulární produkce byla pozorována pouze při kultivaci na olejích a jiných alifatických uhlovodících. [3, 5]

3.3. Produkce pomocí transgenních rostlin

Jedním z limitujících faktorů pro velkoobjemovou bakteriální produkci PHA je cena uhlíkatého substrátu, který je použit pro fermentaci. Protože rostliny jsou autotrofní organismy schopné fotosyntézy, PHA transgenní rostliny by fixovaný oxid uhličitý z atmosféry přímo převáděly na polyester, což by mohlo snížit výrobní náklady. [24]

Tabulka 3 Přehled výtěžků PHA u používaných transgenních rostlin [42]

Buněčný kompartment	Rostlina	Typ PHA	Obsah PHA [%]
cytoplazma	A. thaliana	P3HB	0,1
	řepka	P3HB	0,1
	tabákovník	P3HB	0,01
	bavlník	P3HB	0,3
plastid	A. thaliana	P3HB	8
	řepka - semena	P3HB	6
	kukuřice	P3HB	0,05
	bavlník	P3HB	0,02
	brambory	P3HB	0,04
	vojtěška	P3HB	0,2
	A. thaliana	P(3HB-co-3HV)	1,6
	řepka	P(3HB-co-3HV)	2,3
peroxizom	A. thaliana	Mcl-PHA	0,6
	obilí	P3HB	2

Protože je acetyl-CoA přítomen v rostlinných buňkách v cytozolu, plastidech, mitochondriích, peroxizomech a jinde, teoreticky může být syntéza PHA lokalizována v jakémkoli buněčném kompartmentu.

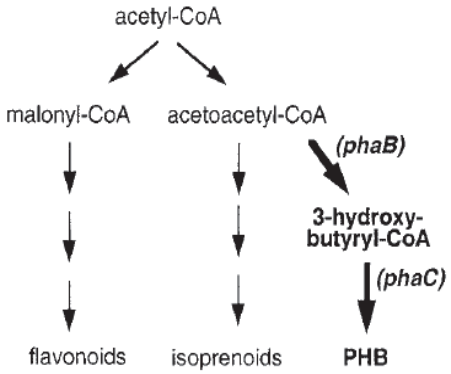
Tabulka 3 udává přehled výtěžků, jakých bylo dosaženo při produkci pomocí transgenních rostlin.

3.3.1. Syntéza P3HB v rostlinách

První PHA produkovaný rostlinami byl homopolymer P3HB. P3HB je syntetizován z acetyl-CoA za katalýzy 3-ketothiolázy, acetoacetyl-CoA reduktázy a PHA syntázy jak ukazuje obrázek 12.

Exprese genů pro acetoacetyl-CoA reduktázu a PHA syntázu z *C. necator* do cytoplazmy rostlinných buněk u *Aradopsis thaliana* vedl k produkci P3HB v množství 0,1% suché hmotnosti výhonků. 3-Ketothioláza nemusí být v případě produkce v cytosolu exprimována, protože je přirozeně přítomna v rostlinné cytoplazmě, kde je zahrnuta v izoprenoidní dráze. Růst rostlin, u kterých byla P3HB dráha lokalizována v cytozolu byl výrazně redukován. Přepokládá se, že inhibice růstu je způsobena vyčerpáním nebo podstatným snížením dostupného množství acetyl-CoA v cytoplazmě pro izoprenoidní dráhu a biosyntézu flavonoidů. Flavonoidy a izoprenoidy jsou mimo jiné důležité rostlinné regulátory a hormony a jejich omezená biosyntéza pravděpodobně výrazně inhibuje růst rostliny. Biosyntéza PHB v cytozolu tedy není považována za vhodnou produkční strategii, protože dochází k malému nárůstu rostlinné biomasy a s nízkým množství akumulovaného polymeru. [43, 44]

Akumulace většího množství P3HB bylo dosaženo v plastidech. Geny kódující P3HB dráhu u *C. necator* byly upraveny a byla připravena transgenní rostlina *A. thaliana,* u které bylo dosaženo akumulace až 40% suché hmotnosti výhonků. Avšak rostliny, které akumulovaly P3HB v množství vyšším než přibližně 5% sušiny vykazovaly chlorózu a byla zde pozorována negativní korelace mezi růstem rostliny a produkcí PHB. [44, 45]



Obrázek 12 Syntéza P3HB v cytoplazmě a další metabolické možnosti acetyl-CoA v cytoplazmě [42]

Ve snaze přenést technologii transgenních rostlin do polnohospodářské produkce, skupina výzkumníků připravila transgenní řepku, u které byla dráha pro akumulaci P3HB implementována do leukoplastů. Zralá semena řepky obsahovala 8% P3HB v sušině. Při akumulaci P3HB v leukoplastech semen řepky nebyl pozorován žádný negativní vliv na vývoj a klíčení semen, ani chloróza u rostliny. Z řady dalších experimentů vyplývá, že leukoplasty jsou vhodnější pro akumulaci P3HB než chloroplasty nebo akumulace v cytoplazmě. Další výhodou zacílení metabolické dráhy do semen řepky, je poměrně dobře zvládnutelná zemědělská produkce a zpracovatelská technologie této plodiny. [42]

Byla provedena řada výzkumů, při kterých byla P3HB biosyntetická dráha vnesena do tabáku, brambor či vojtěšky, avšak bylo dosaženo pouze nízkých nebo žádných výtěžků P3HB. Zatím není plně objasněn důvod, proč nedochází k akumulaci nebo velmi malé akumulaci v těchto rostlinách. Předpokládá se jeden z následujících problémů: tyto rostliny

neexprimují geny z *C. necator* nebo tyto bakteriální proteiny zde mají nízkou aktivitu či jsou inhibovány. [42, 43]

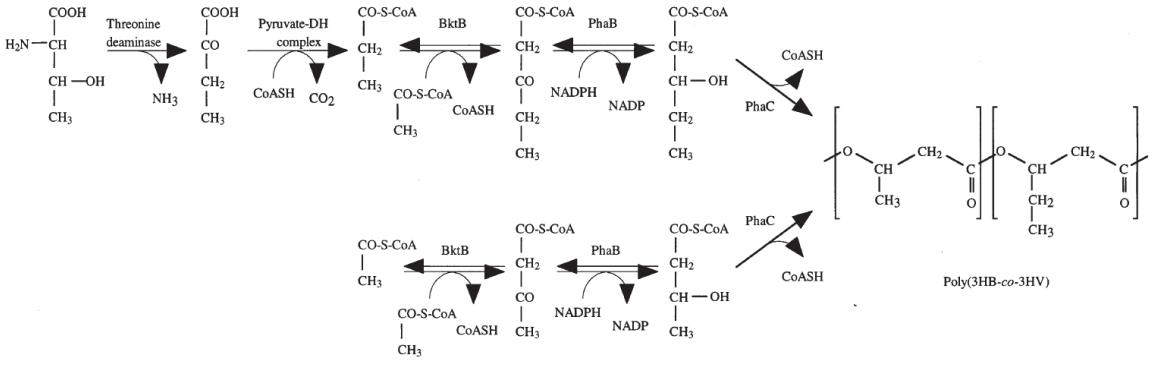
Akumulace P3HB byla také zkoumána v bavlněných vláknech, s cílem změnit materiálové vlastnosti produkované bavlny. Bylo dosaženo akumulace 0,3% P3HB v sušině bavlněných vláknech. U bavlněných vláken s P3HB byl pozorován vzrůst tepelné výhřevnosti a zlepšení tepelných a izolačních vlastností.

Acetyl-CoA je přítomen i v dalších buněčných organelách, v mitochondriích a peroxizomech, P3HB akumulace je teoreticky možná i zde. Avšak biosyntéza a akumulace P3HB v mitochondriích dosud nebyla publikována.

3.3.2. Syntéza kopolymerů PHA v rostlinách

Nejvýznamnějšími kopolymery, kterým je věnována pozornost jsou kopolymer P(3HB-co-3HV) a skupina kopolymerů mcl-PHA.

Při bakteriální produkci P(3HB-co-3HV) je prekurzor pro hydroxyvalerát přidáván do kultivačního média. Při biosyntéze P(3HB-co-3HV) v rostlinách je propionyl-CoA generován modifikací metabolismu větvených aminokyselin. Pro tuto produkci byla modifikována a použita thereonin-deamináza z bakterie *E.coli* (označována *ilvA*), která vede k tvorbě 2-ketobutyrátu, který je dekarboxylován na acetyl-CoA pomocí pyruvátdehydorgenázového komplexu, který je přirozeně přítomen v rostlinných pletivech. Dále byla použita 3-ketothioláza izolována z *C. necator* (kódována genem jako *btkB*), která vykazuje vyšší katalytickou aktivitu k propionyl-CoA než 3-ketothioláza *phaA*. Transgenoze všech čtyř genů (*ilvA*, *btkB*, *phaB* a *phaC*) do *A. thaliana* byla provedena pomocí viru květákové mozaiky (označovaný jako CaMV3S) a bylo dosaženo akumulace 0,2-0,8% PHA s obsahem 4-17mol% 3HV. Shodný postup byl použit pro docílení akumulace v leukoplastech u semen řepky, zde bylo dosaženo akumulace 2% PHA v sušině s obsahem 7mol% 3HV. Akumulace kopolymeru P(3HB-co-3HV) měla při porovnání s akumulací P3HB ve stejných rostlinách negativní vliv celkovou produkci PHA. Z toho vyplynul fakt negativního metabolického ovlivnění expresí thereonin-deaminázy a/nebo produkce propionyl-CoA. Schéma metabolické dráhy vzniku kopolymeru P(3HB-co-3HV) je uvedeno na obrázku 13. [24, 42, 43]



Obrázek 13 Metabolická dráha vzniku P(3HB-co-3HV) u transgenních rostlin [46]

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použité chemikálie, materiál, bakterie a přístroje

4.1.1. Produkční bakterie

Při práci byla použita bakterie, z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně, *Cupriavidus necator* H16 sbírkové číslo CCM 3726.

4.1.2. Chemikálie pro kultivaci mikroorganismů

Nutriet Broth (Himedia)
Agar Powder (Himedia)
Peptone (Himedia)
Beef Extract (Difco laboratories)

4.1.3. Ostatní chemikálie

Poly[3HB-*co*-3HV] (12% 3HV)	- Sigma Aldrich
Triton X	- Sigma Aldrich
Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát	- Sigma Aldrich
Nikotonamid adenin dinukleotid	- Sigma Aldrich
Kyselina oxaloctová	- Sigma Aldrich
Glukósa-6-fosfát	- Sigma Aldrich
DL-isocitrát tri sodný	- Sigma Aldrich
Kyselina DL-jabléčná	- Lachema n.p. Brno

4.1.4. Přístroje

Centrifuga Boeco C-28, Hettich Mikro 200
Analytické váhy Boeco
Laminární box Aura mini, Bio Air Instruments
Termostat, LS-35
Temperovaná třepačka, Heidolph Unimax 1010, Labicom s.r.o.
Plynový chromatograf
- Trace GC Ultra FID detektor, Finnigan (USA)
- Kolona – DB-WAX 3O m by 0,25 mm pro stanovení P3HB
- Kolona – SLB-IL 100 pro stanovení mastných kyselin
Fermentor Sartorius BIOSTAT 5l B® plus
ELISA reader BIOTEK EL 808
Mikrocentrifuga Boeco

4.2. Kultivace bakterie *Cupriavidus necator* H16

4.2.1. Uchování bakterie a příprava inokula

Po oživení lyofilizované sbírkové kultury byla kultura inkubována na Petriho miskách obsahující pevné médium Nutrient Broth v termostatu při teplotě 30 °C. Kultura bakterie *C. necator* H16 byla poté uchovávána na Petriho miskách při teplotě 7 °C. Přeočkování bakteriální kultury bylo prováděno v intervalu 30 dní.

Inokulum pro všechny kultivace bylo připraveno do Erlenmayerových baněk o objemu 100 ml obsahujících 50 ml média Nutrient Broth. Inokulum bylo zaočkováno třikrát bakteriologickou kličkou z agarové plotny a po 24 hodinách kultivace při 30 °C na temperované třepačce při konstantní třepací frekvenci 170 rpm bylo použito pro další práci.

4.2.2. Živná média

Pro uchovávání kultury bylo použito komerčně dostupné médium Nutriet Broth
Beef extrakct 10 g
Pepton 10 g
NaCl 5 g
Agar 20 g
Destilovaná voda 1000 ml

Pro kultivaci bakterie *Cupriavidus necator* H16 bylo použito minerální médium o složení:

$(NH_4)_2SO_4$	3 g
Na_2HPO_4	11,1 g
KH_2PO_4	1,02 g
$MgSO_4$	0,2 g

Roztok stopových prvků* 1 ml
Destilovaná voda 1000 ml

*Roztok stopových prvků

$FeCl_3$	9,7 g
$CaCl_2$	7,8 g
$CuSO_4$	0,156 g
$CoCl_2$	0,119 g
$NiCl_2$	0,118 g

Destilovaná voda 1 000 ml

4.2.3. Vzorky olejů

Tabulka č. 4 udává přehled a označení tuků a olejů, které byly použity pro kultivaci bakterie *C. necator* H16.

Tabulka 4 Přehled použitých olejů pro kultivaci

	vzorek	popis vzorku
1	Řepkový olej I.	Odpadní olej z výroby brambůrek
2	Směs sádla a rostlinného tuku	Odpadní olej z gastronomie – smažení a fritování
3	Řepkový olej II.	Surový, nepurifikovaný olej
4	Palmový tuk	Odpadní olej z výroby koblih - smažení
5	Kávový olej	Olej extrahovaný z odpadního kávového logru
6	Řepkový olej III.	Odpadní olej z gastronomie – smažení a fritování
7	Řepkový olej IV.	Odpadní olej ze studentské menzy – smažení a fritování
8	Slunečnicový olej	Zakoupený v maloobchodní síti, otevřený a skladovaný při laboratorní teplotě v temnu cca 1 rok

4.2.4. Kultivace na různých olejích

Bakterie *C. necator* H16 byla kultivována na různých tucích za stejných experimentálních podmínek. Použitý tuk byl jediný zdroj organického uhlíku. Jako produkční médium bylo použito minerální médium (viz. 4.2.2.), koncentrace substrátu byla pro všechny kultivace 20 g/l, celkový objem kultivační směsi byl 50 ml. Kultivace byla provedena v Erlenmayerově bance o objemu 100 ml na temperované třepačce při 30 °C a při konstantní třepací frekvenci 170 rpm.

Všechna produkční média byla zaočkována z připraveného inokula (viz. 4.2.1.) a po 72 hodinách kultivace bylo stanoveno množství biomasy, obsah a složení PHA v biomase.

4.2.5. Vliv aerace/oxidačního stresu na tvorbu biomasy, akumulaci PHA a složení akumulovaného polymeru u bakterie *C. necator* H16

4.2.5.1. Kultivace v Erlenmayerových baňkách

Kultivace byla provedena ve 100 ml Erlrenmayerových baňkách, které obsahovaly 25; 50 a 75 ml minerálního média (viz. 4.2.2.).

Jako jediný zdroj uhlíku byl použit použitý odpadní fritovací tuk z gastronomie o koncentraci 20 g/l (vzorek oleje č. 7, viz tabulka 4). Baňky byly zaočkovány z inokula na Nutrient Broth mediu (viz. 4.2.1.), kultivace probíhala 72 hodin na temperované třepačce při 30 °C a konstantní třepací frekvenci 170 rpm. Pro každý vzorek byly provedeny dvě paralelní kultivace, v jednom případě byl jako prekurzor 3-hydroxyvalerátu použit propionát sodný a v druhém případě byl použit jako prekurzor 1-propanol.

Na počátku byl přidán propionát sodný resp. 1-propanol o výsledné koncentraci 5 g/l v médiu. Po 72 hodinách kultivace byl stanoven obsah biomasy, složení a množství akumulovaného PHA.

4.2.5.2. Kultivace ve fermentoru

Kultivace byla provedena v 5l fermentoru. Nejdříve bylo připraveno inokulum na médiu Nutriet Broth (viz. 4.2.1.). Toto inokulum bylo použito pro zaočkování Erlenmayerových baněk s minerálním médiem (viz. 5.2.2.). Jako jediný zdroj uhlíku byl použit použitý fritovací olej z gastronomie o koncentraci 20 g/l (vzorek oleje č. 7, viz tabulka 4), inokulační poměr byl 10%. Inokulum s minerálním médiem bylo kultivováno 24 hodin na temperované třepačce při 30 °C a konstantní třepací frekvenci 170 rpm. Po 24 hodinách kultivace bylo toto minerální inokulum použito pro zaočkování fermentoru, inokulační poměr byl 10%.

Pro kultivaci bakterie *C. necator* H16 ve fermentoru bylo použito opět minerální médium (viz. 4.2.2.), objem minerálního média byl 3,5l. Kultivace ve fermentoru byla provedena za konstantní teploty 30 °C a pH 7, hodnota pH byla automaticky regulována přídavkem 0,5 mol/l roztoku NaOH resp. H_2SO_4. Kultivace byly provedeny za konstantní koncentrace rozpuštěného kyslíku, která odpovídala 10; 30; 50 a 70 procentům maximální saturace bioreaktoru.

Jako prekurzor poly-3-hydroxyvalerátu byl použit propionát sodný, který byl přítokován do reaktoru v čase kultivace 9 a 22 hodin. V 9 hodině kultivace bylo přidáno množství prekurzoru odpovídající koncentraci 3 g/l v bioreaktoru a v 22 hodině kultivace bylo přidáno množství prekurzoru odpovídající koncentraci 5 g/l.

V 3; 6; 9; 22; 25; 28 a 30 hodině byla stanovena koncentrace biomasy v bioreaktoru. V 9; 22; 25 a 30 hodině kultivace byl odebrán vzorek pro stanovení složení a obsahu PHA v biomase.

Po ukončení všech kultivací byl odebrán a uchován vzorek biomasy, který byl později použit pro další experimenty.

4.2.5.3. Optimalizace kultivace ve fermentoru

Byla provedena optimalizační kultivace ve fermentoru. Minerální médium, substrát, inokulační poměry a inokulační proces byly shodné jako při předchozích kultivacích ve fermentoru (viz. 4.2.4.2.). Nastavení saturace bioreaktoru vzduchem bylo zvoleno s ohledem na maximální efektivnost procesu. Maximální efektivnost procesu byla zhodnocena na základě analýzy předchozích experimentů (viz. 4.2.5.2.).

Při optimalizační kultivaci byl propionát sodný přidán již do minerálního inokula, koncentrace propionátu v minerálním inokulu byla 0,5 g/l další postup byl totožný jako při předchozích experimentech (viz. 4.2.5.2.).

V 3; 6; 9; 22; 25; 28 a 30 hodině kultivace byla stanovena koncentrace biomasy v reaktoru. V 9; 22; 25 a 30 hodině kultivace byl odebrán vzorek pro stanovení složení a obsahu akumulovaného PHA v biomase.

4.2.5.4. Koeficient $Y_{PHA/S}$ a $Y_{X/S}$

U všech provedených kultivací byl vyhodnocen výtěžnostní koeficient $Y_{PHA/S}$ a $Y_{X/S}$ podle níže uvedených rovnic (viz rovnice 1. a 2.).

$$Y_{PHA/S} = \frac{\text{koncentrace produktu } [\text{g/l}]}{\text{koncentrace substrátu } [\text{g/l}]} \qquad (1.)$$

$$Y_{X/S} = \frac{\text{koncentrace biomasy } [\text{g/l}]}{\text{koncentrace substrátu } [\text{g/l}]} \qquad (2.)$$

Oba koeficienty jsou bezrozměrné veličiny, které udávají poměr akumulovaného PHA resp. biomasy ku množství použitého substrátu.

4.3. Stanovení koncentrace biomasy

V průběhu jednotlivých kultivací byl analyzován obsah biomasy spektofotometrickým měřením zákalu, jako blank byla použita destilovaná voda. Obsah biomasy byl vypočítán ze sestrojené kalibrační křivky.

4.3.1. Kalibrace stanovení

Kalibrační řada roztoků byla připravena ředěním suspenze buněk o známé koncentraci destilovanou vodou a následným měřením absorbance při vlnové délce 630 nm. Ředěním kultury o známé koncentraci biomasy byla sestrojena kalibrační křivka $A_{630nm} = f(c_{biomasa})$.

Pro stanovení sušiny biomasy bylo odebráno 10 ml roztoku buněčné suspenze. Suspenze byla centrifugována (10 000 rpm; 5 min), supernatant byl slit a biomasa byla promyta roztokem Tritonu-X. Biomasa byla opět centrifugována, supernatant slit a nakonec byla biomasa suspendována v 1 ml destilované vody.

Buněčná suspenze byla kvantitativně přenesena do předem zvážených hliníkových misek, misky byly sušeny do konstantní hmotnosti při 105 °C. Z rozdílu hmotnosti hliníkových misek byla vypočítána koncentrace biomasy v původních 10 ml suspenze.

4.3.2. Stanovení biomasy v jednotlivých kultivacích

Během a po skončení kultivace byla u jednotlivých experimentů stanovena koncentrace biomasy v g/l. Každý vzorek byl naředěn tak, aby naměřená hodnota absorbance byla zahrnuta v sestrojené kalibrační křivce.

Vzorek buněčné suspenze pro stanovení koncentrace biomasy byl centrifugován (10 000 rpm, 5 min) supernatant byl slit. Biomasa byla promyta roztokem Tritonu-X a byla opět centrifugována (10 000 rpm, 5 min). Supernatant byl slit a biomasa byla suspendována v původním množství destilované vody. U takto připraveného vzorku byla stanovená hodnota absorbance při 630 nm, jako blank byla použita destilovaná voda.

4.4. Stanovení složení a koncentrace PHA v biomase

Základem metody je převedení akumulovaného PHA na níže vroucí methyl estery příslušných 3-hydroxyalkaoátových kyselin pomocí kysele katalyzované esterifikace.

4.4.1. Stanovení kalibrační křivky PHA

Do vialek byl postupně napipetován komerční roztok P(3HB-co-3HV (12% 3HV) o koncentraci 10 mg/l v množství 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1,0 ml. Dále byl přidán chloroform na výsledný objem 1,0 ml. Poté bylo přidáno 0,8 ml roztoku 15% kyseliny sírové v methanolu s vnitřním standardem kyselinou benzoovou. Takto byly vialky uzavřeny a umístěny do termostatu na 100 °C po dobu 3 hodin, kde proběhla hydrolýza PHA a esterifikace za vzniku příslušných methylesterů.

Po ukončení hydrolýzy byly vialky pro další práci ochlazeny, aby se zamezilo ztrátě těkavých methyl esterů. Ve vodě rozpustné nečistoty byly extrahovány 0,5 ml 0,05 mol/l roztokem NaOH. Po extrakci byla odebrána spodní chloroformová frakce do nové vialky, ta byla ihned uzavřena a použita pro analýzu.

4.4.2. Stanovení PHA v biomase

Odebraný vzorek biomasy byl centrifugován v rychlocentrifugačních zkumavkách (5 min; 12 000 rpm). Supernatant byl slit a biomasa byla suspendována v 5% roztoku Tritonu X. Vzorek byl znovu centrifugován, supernatant slit a biomasa suspendována v 1 ml destilované vody. Vzorek byl převeden do zkumavky typu Eppendorf a centrifugován na mikrocentrifuze (2 min; 10 000 rpm). Supernatant byl opět slit a biomasa byla sušena při 80 °C, při této teplotě došlo k inaktivaci bakterií a vysušení vody.

Do vialek bylo přesně naváženo 10 mg suché biomasy, dále bylo přidáno 1,0 ml chloroformu a 0,8 ml 15% roztoku kyseliny sírové v methanolu s vnitřním standardem kyselinou benzoovou. Vialky byly uzavřeny a další postup byl shodný, jako při stanovení kalibrační křivky PHA viz (4.4.1.).

4.5. Stanovení aktivity vybraných enzymů

4.5.1. Kalibrace stanovení NADH/NADPH

Do zkumavky typu Eppendorf byl přesně navážen NADH a rozpuštěn v 0,05 mol/l fosfátovém pufru pH=7,4, tak aby výsledná koncentrace byla přibližně 0,003 g/ml NADH. Tento zásobní roztok byl rozředěn na pracovní roztok, tak aby výsledná koncentrace NADH byla přibližně 0,0005 mol/l.

Byla připravena řada roztoků od koncentrace $0{,}05 \cdot 10^{-3}$ mol/l do $0{,}5 \cdot 10^{-3}$ mol/l, k ředění pracovního roztoku NADH byl použit 0,05 mol/l fosfátový pufr pH=7,4, který byl použit i pro slepý pokus při stanovení absorbance při 340 nm. Z naměřených hodnot byla vyhodnocena kalibrační křivka jako závislost absorbance na koncentraci NADH.

4.5.2. Příprava enzymového preparátu

Suspenze buněk, která byla použita pro stanovení enzymové aktivity, byla nejdříve centrifugována (10 000 rpm; 5 min), supernatant byl slit. Buňky byly promyty roztokem Tritonu-X a znovu centrifugovány. Buněčná biomasa byla rozsuspendována ve fosfátovém pufru pH=7,4 a bakteriální buňky byly dezintegrovány pomocí ultrazvuku s 20% amplitudou a 3 s pauzou, celková dodaná energie pro dezintegraci buněk byla 25 kJ. Během celého procesu sonifikace byla buněčná suspenze chlazena v ledové lázni, aby se zabránilo denaturaci proteinů a ztrátě enzymové aktivity. Nerozpustné látky a zbytky buněčných struktur byly centrifugovány (12 000 rpm; 5 min; 4 °C) a takto vzniklý supernatant byl použit pro stanovení aktivity vybraných enzymů. [48]

4.5.3. Stanovení aktivity 2-methylcitrát syntázy

Enzymová aktivita 2-methylcitrát syntázy byla vyhodnocena následujícím způsobem: 25 µl enzymového extraktu bylo smícháno s 205 µl fosfátového pufru pH=7,4, který obsahoval (DNTR 0,0099 g na 10 ml; kyselina oxaloctová 0,0033 g na 10 ml). Po přídavku 20 µl propionyl-CoA byla měřena absorance při 405 nm, z naměřených dat byla vyhodnocena enzymová aktivita. [48]

4.5.4. Stanovení aktivity NADP izocitrátdehydrogenázy

Aktivita NADP dependentní izocitrátdehydrogenázy byla stanovena následujícím způsobem: 25 µl intracelulárního enzymového extraktu bylo smícháno s 25 µl 0,01 mol/l NAD a 200 µl 0,05 mol/l fosfátového pufru pH=7,4, který obsahoval 0,05 mol/l izocitrátu a 0,01 mol/l $MgSO_4$ a 0,1 mol/l KCl. [48]

V průběhu 10 min byla měřena absorbance při 340 nm, každých 30 s, z naměřených dat byla vyhodnocena enzymová aktivita.

4.5.5. Stanovení aktivity glukóza-6-fosfát dehydrogenázy

Aktivita glukóza-6-fosfát dehydrogenázy byla měřena následujícím způsobem: 25 µl intracelulárního enzymového extraktu bylo smícháno s 25 µl 0,01 mol/l NADP a 200 µl 0,05 mol/l fosfátového pufru pH=7,4, který obsahoval 0,005 mol/l glukóza-6-fosfátu a 0,03 mol/l MgCl. [48]

V průběhu 10 min byla měřena absorbance při 340 nm, každých 30 s, z naměřených dat byla vyhodnocena enzymová aktivita.

4.5.6. Stanovení aktivity malát dehydrogenázy

Aktivita malát dehydrogenázy byla měřena následujícím způsobem: 25 µl intracelulárního enzymového extraktu bylo smícháno 25 µl 0,01 mol/l NAD a 200 µl 0,05 mol/l fosfátového pufru pH=7,4, který obsahoval 0,05 mol/l malátu, 0,01 mol/l $MgSO_4$ a 0,1 mol/l KCl. [48]

V průběhu 10 min byla měřena absorbance při 340 nm, každých 30 s, z naměřených dat byla vyhodnocena enzymová aktivita.

4.5.7. Stanovení aktivity jablečného enzymu

Aktivita jablečného enzymu byla stanovena následujícím způsobem: 25 µl intracelulárního enzymového extraktu bylo smícháno 25 µl 0,01 mol/l NADP a 200 µl 0,05 mol/l fosfátového pufru pH=7,4, který obsahoval 0,05 mol/l malátu, 0,01 mol/l $MgSO_4$ a 0,1 mol/l KCl. [48]

V průběhu 10 min byla měřena absorbance při 340 nm, každých 30 s, z naměřených dat byla vyhodnocena enzymová aktivita.

4.6. Stanovení celkových proteinů Hartree-Lowryho metodou

Jedná se o spektofotometrické stanovení založené na redukci kyseliny fosfomolybdenové a fosfowolframové tyrozinovými zbytky v proteinu za vzniku modrého zbarvení. Při analýze byly použity tři činidla A, B a C.

Činidlo A: 2 g vínanu sodno-draselného·$4H_2O$; 100 g Na_2CO_3; 500 ml 1M NaOH; doplnit do 1 l vody

Činidlo B: 2 g vínanu sodno-draselného·$4H_2O$; 1 g $CuSO_4$·5H2O; 90 ml H_2O; 10 ml 1M NaOH

Činidlo C: Zředěn 1 díl komerčního Folin-Ciocalteauova činidla s 15 díly vody

4.6.1. Stanovení kalibrační křivky

Do zkumavek bylo napipetováno 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1,0 ml bílkovinného standardu o koncentraci 250 µg/ml, poté byla přidána voda na výsledný objem 1,0 ml. Dále bylo přidáno 0,9 ml činidla A a zkumavky byly inkubovány 10 min při 50 °C na vodní lázni. Po inkubaci a ochlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 0,1 ml činidla B a zkumavky byly ponechány 10 min při laboratorní teplotě. Nakonec bylo přidáno 3 ml činidla C a zkumavky byly opět inkubovány 10 min na vodní lázni při teplotě 50 °C. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla změřena absorbance při 650 nm proti blanku, který byl připraven stejným způsobem jako vzorky, pouze neobsahoval žádný bílkovinný standart.

4.6.2. Stanovení celkových intracelulárních proteinů ve vzorcích

Pro stanovení koncentrace celkových intracelulárních proteinů, byla použita intracelulární suspenze (viz. 4.5.3.). K 0,5 ml suspenze bylo přidáno 0,5 ml fosfátového pufru pH=7,4 a 0,9 ml činidla A, takto vzniklá směs byla inkubována 10 min při 50 °C na vodní lázni. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 0,1 ml činidla B a směs byla inkubována 10 min při laboratorní teplotě. Poté bylo ke směsi přidáno 3 ml činidla C a směs byla inkubována 10 min v 50 °C vodní lázni. Po ochlazení byla změřena absorbance při 650 nm proti blanku. Blank byl připraven stejným způsobem, pouze místo intracelulární suspenze obsahoval destilovanou vodu.

4.7. Stanovení vybraných charakteristik lipidů použitých pro kultivaci bakterie *C. necator* H16

Z analytického hlediska označuje pojem lipidy všechny látky, které se za podmínek metody extrahují lipofilními rozpouštědly. Chemicky se jedná o nehomogenní skupinu látek, do které patří acylglyceroly, vosky, složené lipidy (fosfolipidy, glykolipidy, lipoproteiny), steroidy, terpeny, vitaminy rozpustné v tucích, volné mastné kyseliny a další méně časté lipofilní látky.

4.7.1. Stanovení čísla zmýdelnění

Číslo kyselosti se udává v mg KOH, který je zapotřebí k neutralizace volných i vázaných mastných kyselin v 1 g tuku. Vzorek se zmýdelní varem v nadbytku alkoholického KOH a nezreagovaný KOH se zpětně titruje kyselinou chlorovodíkovou na indikátor fenolftalein.

Do destilační baňky bylo naváženo přesně 2 g tuku, dále bylo přidáno přesně 25 ml KOH a pod zpětných chladičem na topném hnízdě bylo provedeno zmýdelnění po dobu 30 min. Čirý obsah po zmýdelnění byl ihned titrován roztokem HCl do odbarvení indikátoru fenolftaleinu. Souběžně se vzorky byl proveden slepý pokus. [47]

4.7.2. Stanovení čísla kyselosti

Číslo kyselosti udává obsah volných mastných kyselin v tuku a vyjadřuje se jako hmotnost KOH v mg potřebná k neutralizaci 1 g tuku při titraci na fenolftalein v ethanolu.

Bylo naváženo přesně 5 g tuku, tuk byl za horka rozpuštěn v ethanolu na elektrickém vařiči. K horkému roztoku bylo přidáno několik kapek fenolftaleinu a roztok byl titrován obměrným roztokem KOH do růžového zbarvení, které je stabilní po dobu 30 s. Souběžně se vzorky byl proveden slepý pokus. [47]

4.7.3. Stanovení esterového čísla

Esterové číslo je hmotnost KOH v mg potřebná k neutralizaci estericky vázaných kyselin v 1 g tuku. Vypočítá se z rozdílu čísla zmýdelnění a čísla kyselosti. Z esterového čísla lze vypočítat přibližný procentuální obsah glycerolu v tuku podle rovnice:

$$\%_{glycerol} = 0{,}0547 \cdot \check{C}_{esterové}$$

4.7.4. Stanovení jodového čísla podle Hanuše

Jodové číslo udává hmotnost jodu v gramech, která se aduje na 100 g tuku za podmínek metody. Je měřítkem celkového obsahu dvojných vazeb. Při analýze dochází k adici jodmonobromidu na násobnou vazbu. Nezreagovaný jodmonobromid se pomocí jodidu draselného převede na jod dle rovnice:

$$IBr + 2KI \rightarrow KI + KBr + I_2$$

Jod se stanoví thiosíranem na škrobový maz dle rovnice:

$$I_2 + 2Na_2S_2O_3 \rightarrow 2NaI + Na_2S_4O_6$$

Do zábrusové baňky bylo přesně naváženo 0,4 g tuku, který byl rozpuštěn v 10 ml chloroformu a dále bylo přidáno přesně 25 ml IBr, takto vzniklá reakční směs byla uzavřena zátkou navlhčenou v KI, aby se zamezilo ztrátám jodu a byla ponechána 60 min ve tmě za občasného míchání. Po 60 min bylo přidáno 25 ml 10% roztoku KI, po zhruba 1 min bylo přidáno 100 ml vody a směs byla titrována do žlutého zbarvení. Poté bylo přidáno 3-5 ml škrobového mazu a směs se titrovala do odbarvení vodné i organické fáze. Souběžně se vzorky byl proveden slepý pokus. [47]

4.7.5. Stanovení peroxidového čísla

Peroxidové číslo udává množství peroxidů v tuku, které jsou schopny oxidovat jodid na jod za podmínek metody. Vyloučený jod se stanoví titrací roztokem thiosíranu sodného dle rovnice:

$$R - O - OH + 2KI + 2CH_3COOH \rightarrow R\text{-}OH + I_2 + 2CH_3COOK + H_2O$$

$$I2 + 2Na_2S_2O_3 \rightarrow 2NaI + Na_2S_4O_4$$

Peroxidové číslo se vyjadřuje v mg kyslíku na 1 g tuku.

Do zábrusových baněk bylo naváženo přesně 3 g tuku. Navážka byla rozpuštěna ve směsi konc. kys. octové a chloroformu v poměru 3:2. Dále byl přidán 1 ml nasyceného roztoku jodidu draselného a reakční směs byla inkubována 20 min v temnu při laboratorní teplotě za občasného míchání. Po 20 min bylo do směsi přidáno 100 ml vody a směs byla titrována odměrným roztokem thiosíranu sodného do žlutého zbarvení, dále bylo se přidáno 3-5 ml škrobového mazu a titrováno do odbarvení vodné i organické fáze. Souběžně se vzorky byl proveden slepý pokus. [47]

4.7.6. Stanovení zastoupení mastných kyselin v použitých tucích

4.7.6.1. Transesterifikace mastných kyseliny pomocí KOH

Principem metody je převedení olejů na methylestery transesterifikací s hydroxidem draselným.

Do 4 ml vialek bylo přesně naváženo přibližně 70 mg oleje. Byly přidány 3 ml isooktanu, vialka byla uzavřena a protřepána. Došlo k rozpuštění vzorku. Poté bylo přidáno 200 µl methanolického roztoku KOH (13,1 g KOH ve 100 ml absolutního methanolu) a vialky byly silně protřepávány po dobu 30 s. Do roztoku byl přidán 1 g hydrogensíranu sodného a vialky byly znovu protřepány po dobu 15 s. Poté byla odpipetována horní vrstva, která byla 10x zředěna. Tento roztok byl převeden do 2 ml vialek, které byly uzavřeny a analyzovány pomocí plynové chromatografie. [47]

Porovnáním se standardy mastných kyselin bylo zjištěno relativní zastoupení mastných kyselin u jednotlivých vzorků olejů.

4.7.6.2. Transesterifikace mastných kyseliny pomocí NaOH pod zpětným chladičem

Principem metody je převedení olejů na methylestery transesterifikací s hydroxidem sodným.

Do 100 ml destilační baňky bylo přesně naváženo 250 mg vzorku tuku. Dále bylo přidáno 6 ml 0,5 mol/l roztoku NaOH v methanolu a směs byla zahřívána 12 min na topném hnízdě pod zpětným chladičem. Po 12 min bylo přidáno 10 ml hexanu a směs byla dále 1 min zahřívána. Poté byl přidán nasycený vodný roztok NaCl a po vychladnutí směsi byla odpipetována horní vrstva, které byla převedena do vialky. Vialka byla uzavřena a následně analyzována pomocí plynové chromatografie. Porovnáním se standardy mastných kyselin bylo zjištěno relativní zastoupení mastných kyselin u jednotlivých vzorků olejů. [47]

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1. Kalibrace metod

5.1.1. Stanovení biomasy

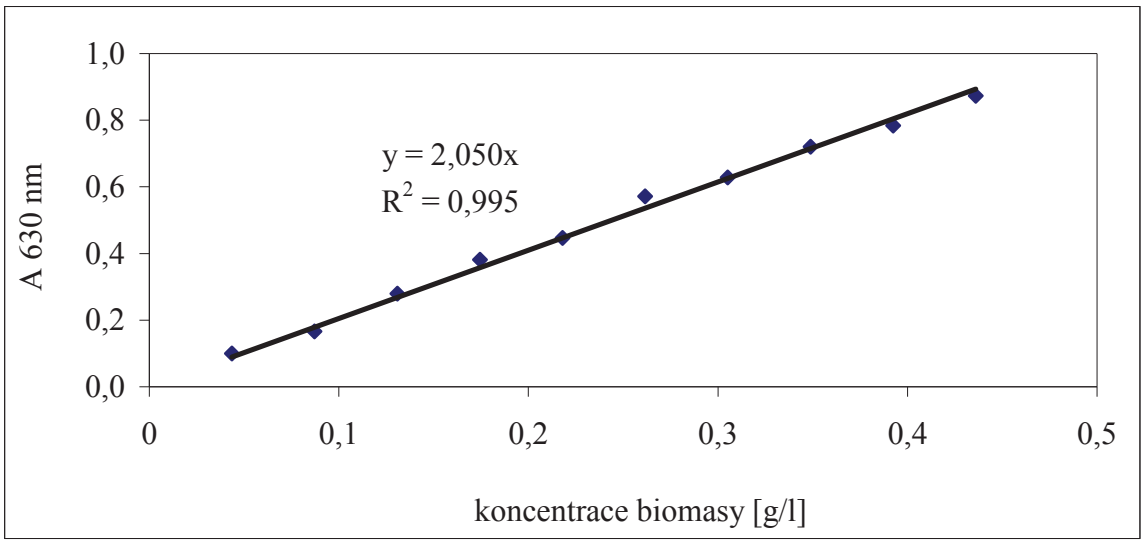
Kalibrační křivka pro množství suché biomasy byla sestavena z hodnot měření zákalu buněk při vlnové délce λ=630 nm. V tabulce č. 5 jsou uvedeny průměrné hodnoty ze tří paralelních stanovení.

Tabulka 5 Stanovení sušiny biomasy

Hmotnost prázdné misky [g]	Hmotnost misky se sušinou [g]	Hmotnost sušiny [g]	Koncentrace biomasy [g/l]
15,8093	15,8299	0,0206	2,06
15,7514	15,7753	0,0239	2,39
14,6204	14,6413	0,0209	2,09
			2,18±0,1

Tabulka 6 Závislost absorbance na koncentraci biomasy při λ=630 nm

Koncentrace biomasy [g/l]	A 630 nm
0,0436	0,100
0,0872	0,166
0,1308	0,280
0,1744	0,381
0,2180	0,447
0,2616	0,572
0,3052	0,628
0,3488	0,720
0,3924	0,784
0,4360	0,873

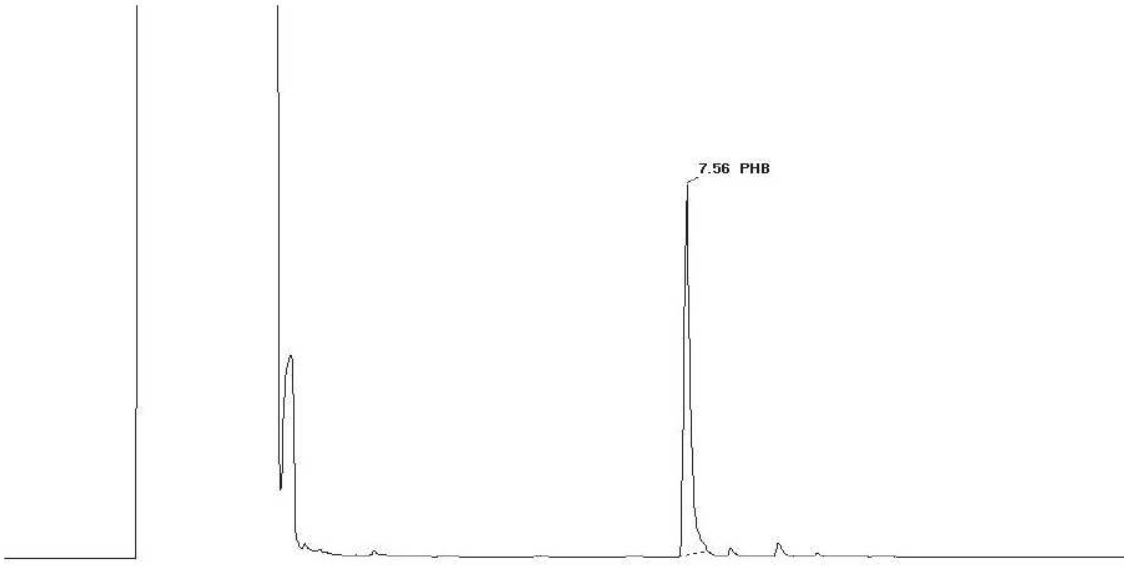


Obrázek 14 Kalibrační závislost stanovení biomasy

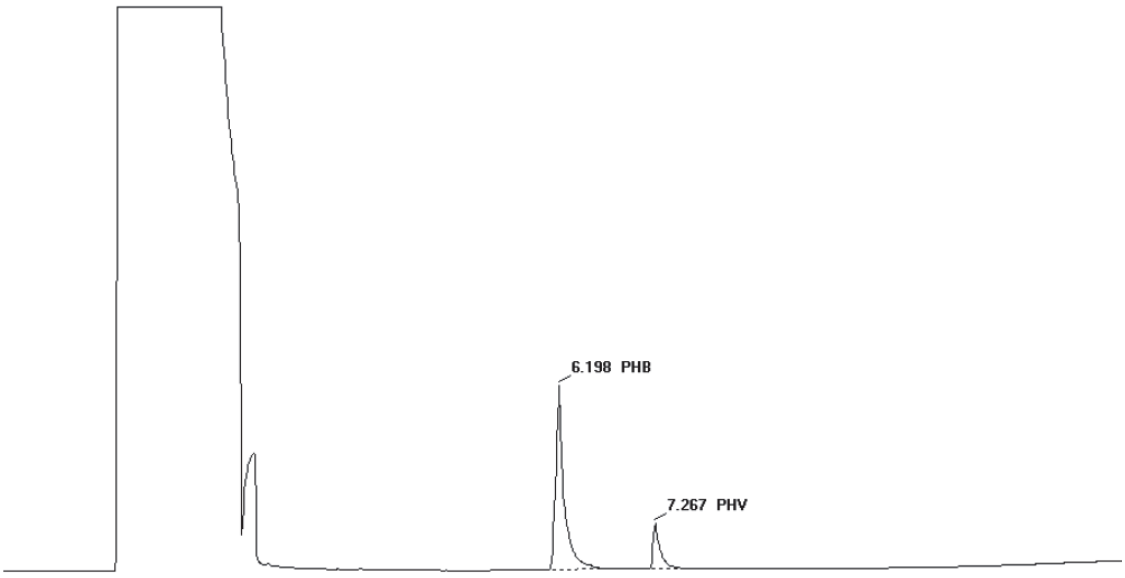
Ze závislosti absorbance na koncentraci byla stanovena kalibrační rovnice $y = 2{,}0496x$. Regresní koeficient má hodnotu $R^2 = 0{,}9950$.

5.1.2. Stanovení PHA

Základním principem stanovení je převedení PHA na příslušné methylestery pomocí kysele katalyzované esterifikace (viz. 4.4.).



Obrázek 15 Chromatogram standardu P3HB



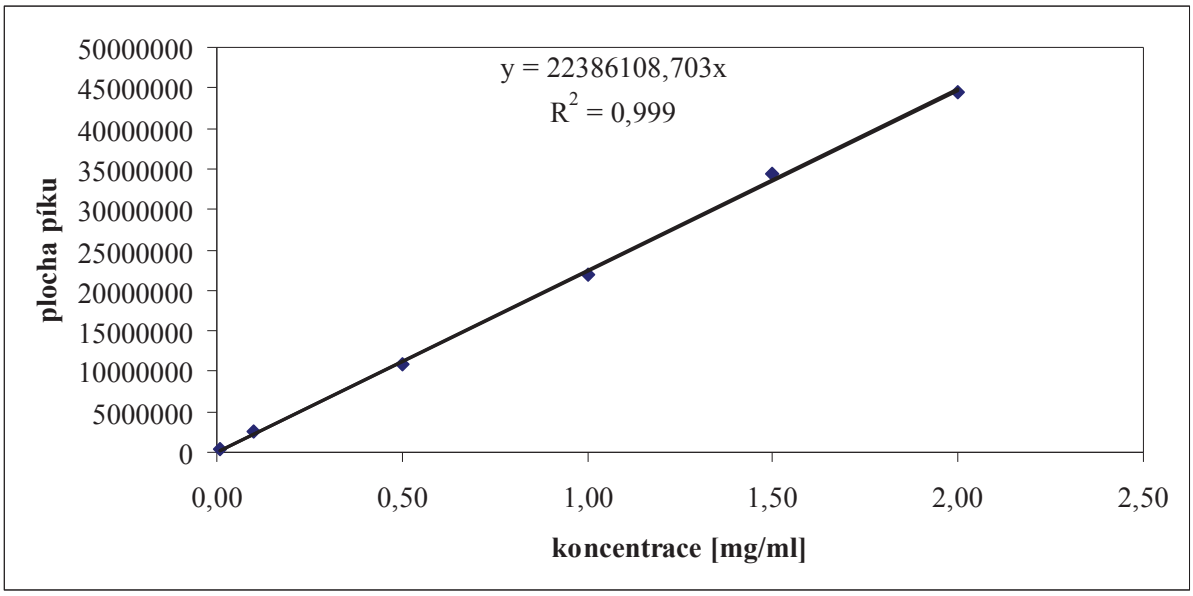
Obrázek 16 Chromatogram standardu P(3HB-co-3HV)

5.1.2.1. Kalibrační křivka 3HB

Kalibrační křivka byla sestavena jako závislost plochy příslušného píku na koncentraci.

Tabulka 7 Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci P3HB

Koncentrace 3HB [mg/ml]	Plocha píku
0,01	311427,8
0,10	2622204
0,50	10894227
1,00	21847834
1,50	34417435
2,00	44467740



Obrázek 17 kalibrační křivka pro P3HB

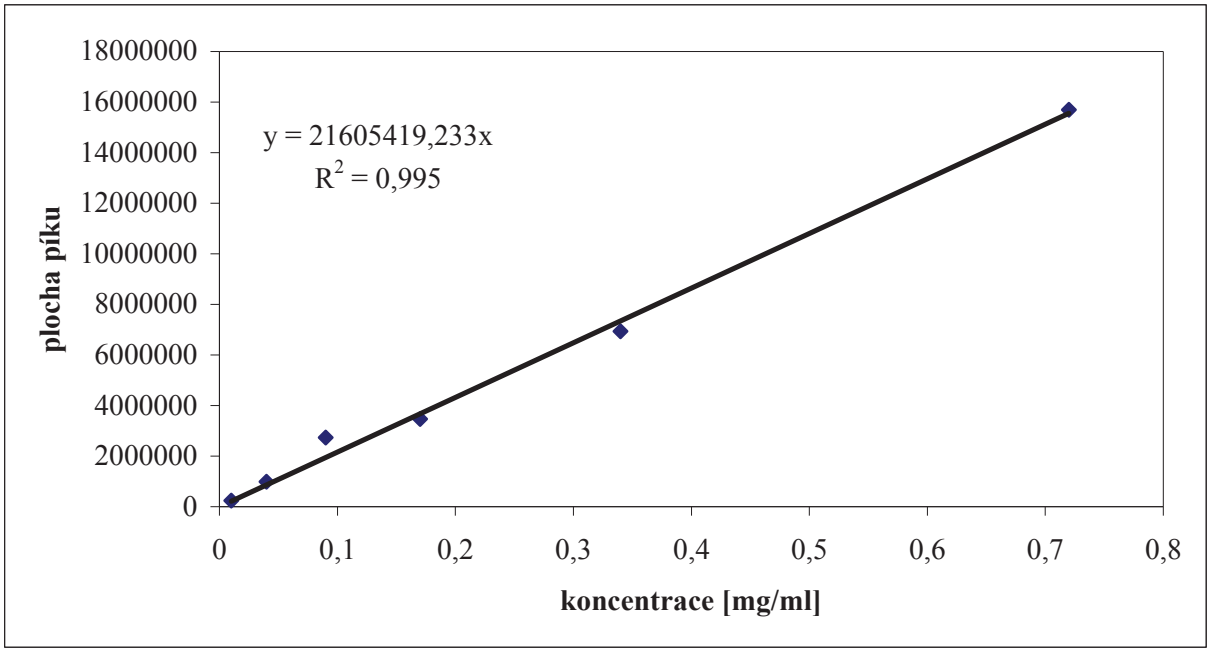
Ze závislosti plochy příslušného píku na koncentraci byla vypočtena kalibrační rovnice $y = 22386108{,}703x$. Regresní koeficient má hodnotu $R^2 = 0{,}999$.

5.1.2.2. Kalibrační křivka 3HV

Kalibrační závislost byla sestavena jako závislost plochy příslušného píku na koncentraci.

Tabulka 8 Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci P3HV

Koncentrace 3HB [mg/ml]	Plocha píku
0,01	245867,2
0,04	984469,8
0,09	2738279
0,17	3463658
0,34	6939317
0,72	15690963



Obrázek 18 Kalibrační křivka pro 3HV

Ze závislosti plochy příslušného píku na koncentraci byla vypočtena kalibrační rovnice $y = 21605419{,}233x$. Regresní koeficient má hodnotu $R^2 = 0{,}995$.

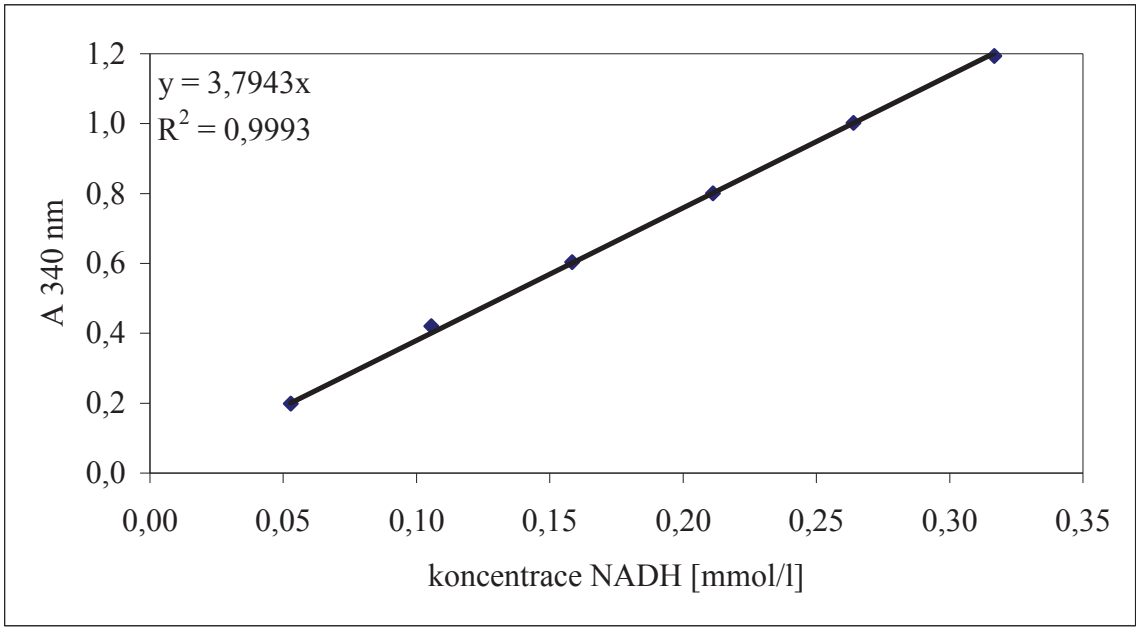
5.1.3. Stanovení aktivity vybraných enzymů

5.1.3.1. Kalibrace stanovení NADH

Kalibrační závislost absorbance na koncentraci NADH byla stanovena měřením při vlnové délce λ=340 nm. V tabulce č. 9 jsou uvedeny průměrné hodnoty ze tří paralelních stanovení.

Tabulka 9 Kalibrace stanovení NADH

A 340 nm	0,1985	0,4205	0,6040	0,8005	1,002	1,1940
koncentrace [mmol/l]	0,053	0,106	0,158	0,211	0,264	0,317



Obrázek 19 Kalibrace stanovení NADH

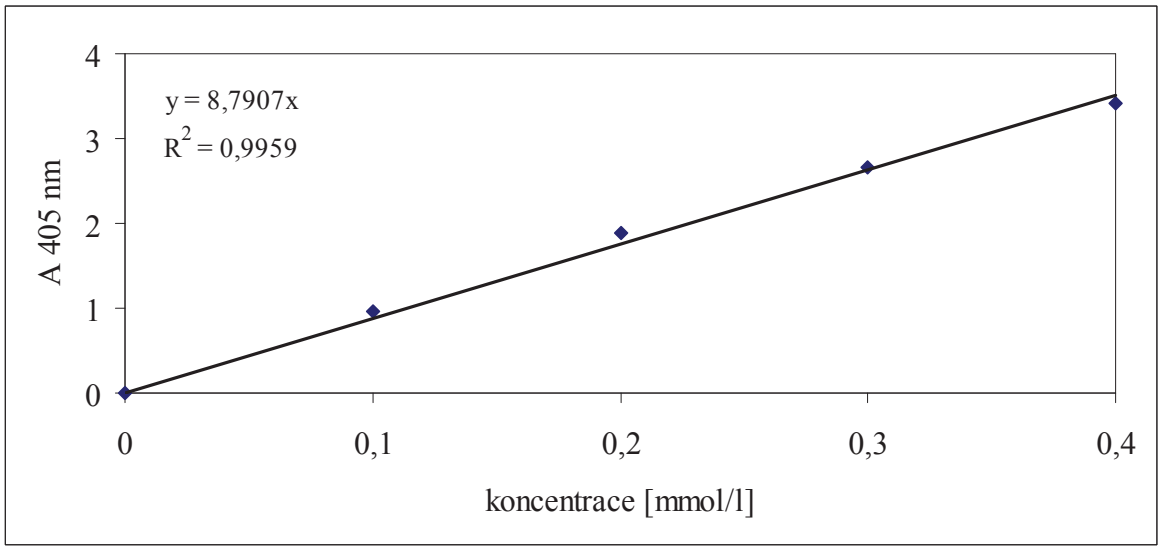
Z grafické závislosti absorbance na koncentraci byla sestavena kalibrační rovnice $y = 3{,}7943x$. Regresní koeficient má hodnotu $R^2 = 0{,}9993$.

5.1.4. Kalibrace stanovení DNTF

Kalibrační křivka DNTF byla sestavena jako závislost absorbance, měřená při vlnové délce λ=405 nm, na koncentraci DNTF.

Tabulka 10 Kalibrace stanovení DNTF

A 405 nm	0	0,956	1,882	2,652	3,424
koncentrace [mmol/l]	0	0,1	0,2	0,3	0,4



Obrázek 20 Kalibrační stanovení NDTF

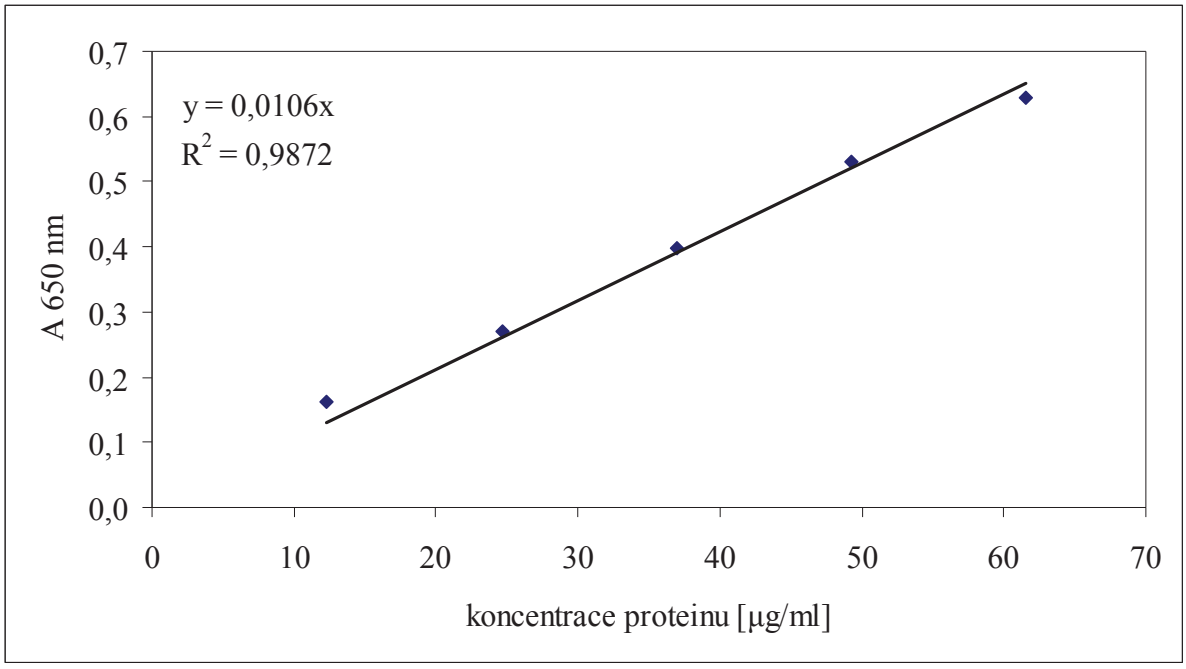
Z grafické závislosti na koncentraci byla vyhodnocena kalibrační rovnice $y = 8{,}7907x$. Regresní koeficient má hodnotu $R^2 = 0{,}9959$.

5.1.5. Stanovení celkového obsahu bílkovin

Množství celkových proteinů bylo stanoveno Hartree-Lowryho metodou (viz. 4.6.). Kalibrační křivka celkového obsahu bílkovin byla stanovena měřením absorbance při vlnové délce λ=650 nm. V tabulce č. 11 jsou uvedeny průměrné hodnoty ze tří paralelních stanovení.

Tabulka 11 Kalibrace stanovení proteinů

A 650 nm	0,163	0,269	0,398	0,53	0,628
konc. proteinu [µg/ml]	12,32	24,64	36,96	49,28	61,60



Obrázek 21 Kalibrační stanovení rozpustných bílkovin

Z grafické závislosti absorbance na koncentraci byla sestavena kalibrační rovnice $y = 0{,}0106x$. Regresní koeficient má hodnotu $R^2 = 0{,}9872$.

5.2. Stanovení vybraných charakteristik lipidů použitých pro kultivaci bakterie *C. necator* H16

Pro analýzu bylo použito celkem osm různých tuků. Jejich přehled udává tabulka číslo 4 (viz. 4.2.3.).

U pěti vzorků tuků se jednalo o odpadní tuky z potravinářské výroby a gastronomie, kde byly použity jako smažící či fritovací oleje. Jeden vzorek tuku byl surový nepurifikovaný rostlinný olej. Další vzorek byl nevhodně dlouhodobě skladovaný rostlinný olej zakoupený v maloobchodní síti uchovaný v původním obalu. A jako poslední vzorek byl olej extrahovaný pomocí hexanu z odpadního kávového logru. Kávový logr je odpadem při přípravě kávy. Jeden z použitých vzorků tuků (palmový tuk) byl za laboratorní teploty tuhá látka.

5.2.1. Stanovení tukových čísel

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit zvolené charakteristiky vybraných tuků za použití klasických metod (viz. 4.7.1; 4.7.2.; 4.7.3.; 4.7.4.; 4.7.5.). Vybrané tuky byly dále použity pro kultivaci bakterie *C. necator* H16.

Tabulka č. 12 udává přibližný procentuální obsah glycerolu, dále udává číslo zmýdelnění, peroxidové číslo, číslo kyselosti a jodové číslo daných vzorků tuků.

Tabulka č. 12 udává střední hodnotu dvou souběžných stanovení pro všechny tukové charakteristiky.

Tabulka 12 Přehled charakteristik tuků použitých pro kultivaci bakterie *C. necator* H16

číslo vzorku tuku (viz. 4.2.3. tabulka 4)	číslo zmýdelnění	číslo peroxidové	číslo kyselosti	číslo jodové	glycerol [%]
1	178	480	2,0	74	10
2	179	88	0,9	75	10
3	190	34	5,4	79	10
4	196	812	3,4	45	11
5	166	585	7,1	70	9
6	182	322	2,7	77	10
7	189	507	3,0	75	10
8	183	557	2,6	80	10

U všech použitých tuků se číslo zmýdelnění pohybovalo v intervalu 166 až 196 mg KOH na 1 g tuku. Tabelované hodnoty čísla zmýdelnění za podmínek metody udává tabulka č. 13.

Tabulka 13 Tabelované hodnoty čísla zmýdelnění [47]

Řepkový olej	170 – 180
Běžné rostlinné oleje	180 – 190
Sádlo	190 – 200
Máslo	220 – 230

Číslo zmýdelnění udává celkový obsah volných i vázaných mastných kyselin (a dále všech dalších přítomných látek neutralizovatelných pomocí KOH). Nejnižší hodnota čísla zmýdelnění byla 166 a to u oleje extrahovaného z kávového logru. U všech ostatních vzorků se číslo zmýdelnění pohybovalo v intervalu od 178 do 196.

Peroxidové číslo vyjádřené v mg kyslíku na 1 g tuku udává celkové množství peroxidů v tuku, které jsou schopny oxidovat jod na jodid za podmínek metody. Nejnižší hodnota peroxidového čísla byla 34 u surového řepkového oleje. Druhá nejnižší hodnota byla zaznamenána u odpadní směsi rostlinného oleje a sádla použitého pro smažení. Nejvyšší hodnota peroxidové čísla byla u odpadního tuku použitého pro smažení koblih.

Přibližné tabelované hodnoty peroxidového čísla za podmínek metody udává tabulka č. 14.

Tabulka 14 Tabelované hodnoty peroxidového čísla [47]

Čerstvé tuky	0 – 40
Tuky po smažení	40 – 200
Žluklé tuky	40 – 400
Tuky po smažení	160 – 1600

Číslo kyselosti udává obsah volných mastných kyselin v tuku vyjádřený v mg KOH na 1 g tuku. Nejvyšší hodnota čísla kyselosti byla 7,1 u oleje extrahovaného z kávového logru. Druhá nejvyšší hodnota byla u surového nerafinovaného řepkového oleje, číslo kyselosti bylo 5,4. Nejnižší hodnota čísla kyselosti byla zaznamenána u odpadní směsi sádla a rostlinného oleje použité pro smažení.

Přibližné tabelované hodnoty čísla kyselosti za podmínek použité metody udává tabulka č. 15.

Tabulka 15 Tabelované hodnoty čísla kyselosti [47]

Rafinované tuky	0 – 1
Surové tuky	1 – 10
Tuky špatné kvality	10 – 50

Jodové číslo je měřítkem celkového obsahu dvojných vazeb. Vyjadřuje se v gramech jodu, které se aduje na 100 g tuku.

Nejnižší stanovená hodnota jodového čísla byla 45 a to u použitého tuku pro smažení koblih. Tento tuk (vzorek č. 4) měl jako jediný analyzovaný vzorek za laboratorní teploty tuhou konzistenci. Nízké jodové číslo naznačuje na nízký celkový obsah dvojných vazeb, což potvrzuje pevné skupenství tuku za laboratorní teploty.

Jodové číslo všech ostatních vzorků se pohybovalo v intervalu od 70 do 80. Nejvyšší hodnota, tj. 80, byla zaznamenána u zakoupeného slunečnicového oleje. Druhá nejvyšší hodnota jodového čísla, tj. 79, byla stanovena u surového nepurifikovaného řepkového oleje.

Procentuální obsah glycerolu byl u všech použitých tuků prakticky stejný, pohyboval se v intervalu mezi 9 až 11 procenty.

5.2.2. Stanovení profilu zastoupených mastných kyselin u jednotlivých vzorků tuků

Cílem analýzy bylo zjistit procentuální zastoupení nejvýznamnějších mastných kyselin v daných vzorcích tuku, které byly dále použity pro kultivaci bakterie *C. necator* H16.

Profil mastných kyselin ve vybraných vzorcích tuků byl analyzován pomocí dvou trans-esterifikačních metod (viz. 4.7.6.1. a 4.7.6.2.). Porovnání metody trans-esterifikace za studena pomocí KOH a za horka pod zpětným chladičem pomocí NaOH udává tabulka číslo 16.

Z porovnání experimentálních dat obou metod se zdá, že metoda trans-esterifikace za studena pomocí KOH je citlivější metodou, protože při trans-esterifikaci pomocí KOH bylo v několika případech detekováno malé množství minoritních mastných kyselin, které nebyly pomocí trans-esterifikace s NaOH detekovány. Např.: u vzorku číslo 8 byly detekovány kyseliny: arachová, α-linolenová, cis-11-eikosaenová a behenová (v množství 0,2%; 0,1%; 0,1%; 0,6%) zatímco při trans-esterifikaci pomocí NaOH nebyly vůbec detekovány. Analogická situace byla pozorována u vzorků číslo 2 a 4 (viz tabulka 16).

Nejvíce zastoupenou mastnou kyselinou v odpadním tuku z výroby brambůrek byla kyselina olejová, její procentuální obsah v tuku byl 60,9%. Druhou nejvíce zastoupenou mastnou kyselinou byla kyselina linolová, její obsah byl 21,1%. Třetí nejvíce zastoupenou mastnou kyselinou byla kyselina α-linolenová její obsah byl 8,1%. Odpadní tuk z výroby brambůrek je řepkový olej, má proto relativně stejné poměrné zastoupení mastných kyselin jako surový nepurifikovaný řepkový oleje, jak můžeme vidět v tabulce číslo 16.

Vzorek č. 2 byla - odpadní smažící směs rostlinného oleje a sádla. Tato směs byla za laboratorní teploty kapalná. Nejvíce zastoupené mastné kyseliny byly: kys. olejová 57,7%; kys. linolová 19,3% a kys. palmitová 8,9%.

Tabulka 16 Zastoupení mastných kyselin v použitých tucích (zvýrazněné jsou majoritní MK daného vzorku)

č. vzorku	metoda esterifikace	laurová kys. (C12:0)	myristová kys. (C14:0)	palmitová kys. (C16:0)	palmitolejová kys. (C16:1)	stearová kys. (C18:0)	olejová kys. (C18:1n9c)	linolová kys. (C18:2n6c)	arachová kys. (C20:0)	α-linolenová kys. (C18:3n3)	cis-11-eikosenová kys. (20:1)	behenová kys. (C22:0)	eruková kys. (C22:1n9)
		zastoupení mastných kyselin v tuku [%]											
1	za studena: KOH	N	N	5,6	0,2	1,6	60,9	21,1	0,5	8,1	1,4	0,3	0,4
	reflux: NaOH	N	N	5,5	0,2	1,9	60,9	21,2	0,4	7,8	1,4	0,3	0,3
2	za studena: KOH	N	0,3	8,9	0,7	3,7	57,7	19,3	0,4	7,3	1,2	0,3	0,3
	reflux: NaOH	N	N	9,9	N	5,4	59,0	18,6	N	6,1	1,1	N	N
3	za studena: KOH	N	N	4,9	0,2	1,5	61,0	20,7	0,5	9,8	1,1	0,2	N
	reflux: NaOH	N	N	4,8	0,2	1,7	62,1	20,3	0,5	9,3	1,9	N	N
4	za studena: KOH	0,3	1,3	49,8	N	4,5	36,7	6,9	0,3	0,1	0,1	N	N
	reflux: NaOH	N	1,1	50,0	N	4,6	37,7	6,5	N	N	N	N	N
5	za studena: KOH	N	N	35,7	N	7,1	9,4	43,7	2,2	1,1	0,3	0,4	N
	reflux: NaOH	N	N	35,4	N	7,6	9,8	42,8	2,7	1,0	0,3	0,5	N
6	za studena: KOH	N	0,2	12,1	0,3	2,6	55,3	21,6	0,5	6,0	1,0	0,3	0,1
	reflux: NaOH	N	0,3	12,4	0,3	3,0	55,3	21,4	N	5,8	1,0	0,4	0,2
7	za studena: KOH	N	0,2	8,5	0,2	3,1	45,6	37,8	0,4	3,0	0,7	0,5	0,1
	reflux: NaOH	N	0,2	8,5	0,2	3,4	47,2	36,0	0,4	2,7	0,7	0,5	0,1
8	za studena: KOH	N	N	7,2	N	3,5	27,0	61,2	0,2	0,1	0,1	0,6	N
	reflux: NaOH	N	N	7,6	N	3,7	29,3	59,5	N	N	N	N	N

Odpadní tuk používaný na smažení koblih měl jako jediný za laboratorní teploty tuhou konzistenci. Jako jediný analyzovaný vzorek obsahoval ve významnějším množství mastné kyseliny s nižším počtem uhlíků, jmenovitě kys. laurovou 0,3% a kys. myristovou 1,3%.

Nejvíce zastoupenou mastnou kyselinou v tomto tuku byla kys. palmitová 49,8%. Druhou nejvíce zastoupenou mastnou kyselinou byla kys. olejová 36,7%.

Nejvíce zastoupenou mastnou kyselinou v oleji extrahovaném z kávového logru byla kys. linolová 43,7%.

Vzorek č. 6 byl odpadní řepkový olej ze smažení z gastronomie. Zastoupení mastných kyselin je analogické jako u vzorků 1 a 3.

Slunečnicový olej zakoupený v obchodě obsahoval nejvíce kyseliny linolové 61,2%. Druhou nejvíce zastoupenou mastnou kyselinou byla kyselina olejová, její obsah byl 27,0%.

Tabulky 39 a 40 (viz. příloha 8.1.) udávají průměrné zastoupení nejvýznamnějších mastných kyselin ve vybraných tucích. Obsah a poměr nejvýznamnějších mastných kyselin analyzovaných ve vybraných tucích dobře koresponduje se složením tuků, které je uvedeno v literatuře.

V příloze (viz. 8.2.) je na obrázku 41 uveden chromatogram standardů mastných kyselin, tabulka 41 uvádí číselný popis standardů mastných kyselin. Na obrázku číslo 42 je zobrazen ukázkový chromatogram vzorku tuku.

5.3. Kultivace bakterie *Cupriavidus necator* H16

5.3.1. Kultivace na různých substrátech

Bakterie *Cupriavidus necator* H16 byla kultivována na různých tucích za výše uvedených experimentálních podmínek (viz. 4.2.4.) za účelem zhodnocení její schopnosti využívat různé druhy odpadních olejových stubstrátů pro svou výživu a pro akumulaci PHA.

Obsah biomasy, PHA a výtěžnostní koeficienty $Y_{X/S}$ a $Y_{PHA/S}$ po 72 hodinové kultivaci udává tabulka č. 17.

Byly provedeny dvě souběžné kultivace, tabulka číslo 17 obsahuje střední hodnoty uváděných parametrů.

Tabulka 17 Obsah biomasy a P3HB po 72. hodinové kultivaci

Č. vzorku	Biomasa [g/l]	P3HB [%]	P3HB [g/l]	$Y_{(X/S)}$	$Y_{(PHA/S)}$
1	12,4±0,1	58,8	7,3±0,1	0,62	0,36
2	11,8±0,2	62,1	7,3±0,4	0,59	0,37
3	13,4±0,1	61,8	8,3±0,3	0,67	0,41
4	11,9±0,7	58,0	6,9±0,9	0,59	0,34
5	13,3±0,4	70,3	9,3±0,1	0,67	0,47
6	10,8±0,6	52,4	5,7±0,7	0,54	0,28
7	12,0±0,3	51,1	6,1±0,1	0,60	0,31
8	9,0±0,1	37,5	3,4±1,1	0,45	0,17

Při tomto experimentu nebyl přidán prekurzor 3HV. Z toho důvodu bakterie *C. necator* H16 akumulovala ve svých buňkách homopolymer P3HB.

Při kultivaci na různých druzích tuků byl zaznamenán největší nárůst biomasy při kultivaci na surovém nepurifikované řepkovém oleji a na oleji extrahovaném z odpadního kávového logru, v obou případech bylo dosaženo výtěžku cca 13 g/l biomasy. Nejnižší hodnota nárůstu biomasy po 72 hodinové kultivaci byla zaznamenána na slunečnicovém oleji zakoupeném v maloobchodní síti, hodnota biomasy byla 9 g/l.

Nejvyšší hodnoty akumulovaného PHA bylo dosaženo při použití oleje extrahovaného z kávového logru, množství PHA bylo 70,3%, naopak nejnižší obsah PHA byl při kultivaci na slunečnicovém oleji zakoupeném v obchodní síti množství PHA v biomase bylo 37,5%.

Tabulka 18 a 19 udává druhou mocninu Pearsonova korelačního koeficientu $\mathbf{R^2}$ a korelačního koeficientu **Cov(x, y**) pro vybrané tukové charakteristiky v závislosti na obsahu biomasy resp. PHA. Oba korelační koeficienty byly vypočteny pomocí funkce v programu MS Excel, funkce RKQ resp. Correl.

Určitou míru korelace lze pozorovat při závislosti PHA na čísle kyselosti a při závislosti obsahu biomasy na čísle kyselosti. Korelační závislost mezi číslem kyselosti a PHA je R^2=0,23 a Cov(x, y)=0,48. Korelační závislost mezi číslem kyselosti a obsahem biomasy je R^2=0,31 a Cov(x, y)=0,55.

Tabulka 18 Tabulka Pearsonova korelačního koeficientu a korelačního koeficientu

Č. vzorku	**PHA** [%]	**číslo zmýdelnění**	**číslo peroxidové**	**číslo kyselosti**	**číslo jodové**
1	58,79	178	480	2,0	74
2	62,06	179	88	0,9	75
3	61,84	190	34	5,4	79
4	58,02	196	812	3,4	45
5	70,25	166	585	7,1	70
6	52,39	182	322	2,7	77
7	51,14	189	507	3,0	75
8	37,46	183	557	2,6	80
	R^2	**0,15**	**0,04**	**0,23**	**0,07**
	Cov(x, y)	**-0,38**	**-0,20**	**0,48**	**-0,26**

Tabulka 19 Tabulka Pearsonova korelačního koeficientu a korelačního koeficientu

Č. vzorku	**Biomasa** [g/l]	**číslo zmýdelnění**	**číslo peroxidové**	**číslo kyselosti**	**číslo jodové**
1	12,4	178	480	2,0	74
2	11,8	179	88	0,9	75
3	13,4	190	34	5,4	79
4	11,9	196	812	3,4	45
5	13,3	166	585	7,1	70
6	10,8	182	322	2,7	77
7	12,0	189	507	3,0	75
8	9,0	183	557	2,6	80
	R^2	**0,03**	**0,05**	**0,31**	**0,03**
	Cov(x, y)	**-0,17**	**-0,22**	**0,55**	**-0,18**

Pozitivní vliv čísla kyselosti (tj. obsah volných mastných kyselin) na nárůst biomasy a akumulaci PHA může být z části vysvětlen snadnějším využíváním volných kyselin jako zdroje energie především v počáteční fázi kultivace. Utilizace volných mastných kyselin nevyžaduje aktivitu extracelulárních lipáz, které katalyzují hydrolýzu acylglycerolů na volné mastné kyseliny a glycerol.

5.3.2. Vliv oxidačního stresu na tvorbu biomasy a akumulaci PHA u bakterie *C. necator* H16

5.3.2.1. Kultivace v Erlenmeyerových baňkách

Byl proveden experiment pro zhodnocení vlivu kyslíku na tvorbu biomasy, množství a složení akumulovaného PHA v biomase.

Kultivace byla provedena v Erlenmeyerových baňkách o objemu 100 ml. Při experimentu byly použity stejné Erlenmeyerovy baňky, které byly naplněny různým množstvím minerálního média (25, 50 a 75 ml) a inkubovány při stejné třepací frekvenci. Při použití většího množství média byl nižší mrtvý objem vzduchu v baňce. Z důvodu kuželovitého tvaru baňky - byla při použití většího množství média - menší styčná plocha hladiny a vzduchu, z toho důvodu byl nižší koeficient přestupu kyslíku ze vzduchu do média. Lze tedy předpokládat, že v baňce s nejmenším množstvím média byla v průběhu kultivace větší koncentrace rozpuštěného kyslíku, než v baňkách s větším objemem média.

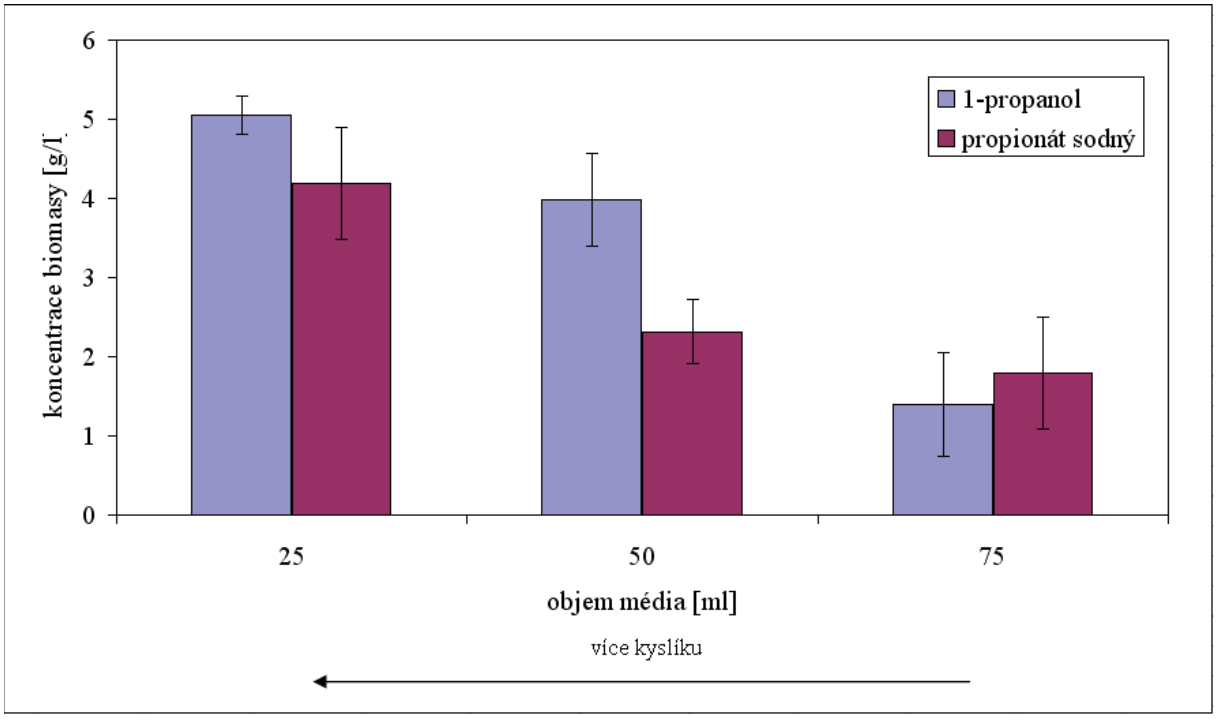
Tabulky 20 a 21 ukazují obsah biomasy a PHA v biomase po 72. hodinové kultivaci při použití 1-propanolu resp. propionátu sodného jako prekurzoru 3HV. Tabulky číslo 20 a 21 obsahují střední hodnoty uváděných parametrů. Pro každý vzorek byly provedeny dva paralelní pokusy.

Tabulka 20 Obsah biomasy, PHA a složení PHA při použití 1-propanolu

Prekurzor 3HV: 1-propanol						
Objem média [ml]	**Biomasa** [g/l]	**PHA** [%]	**PHA** [g/l]	**3HV v PHA** [mol%]	$Y_{PHA/S}$	$Y_{X/S}$
25	5,1±0,2	37,0	1,89±0,1	22,1	0,09	0,26
50	4,0±0,6	49,5	1,98±0,1	14,6	0,10	0,20
75	1,4±0,7	51,2	0,72±0,1	9,0	0,04	0,07

Tabulka 21 Obsah biomasy, PHA a složení PHA při použití propionátu sodného

Prekurzor 3HV: propionát sodný						
Objem média [ml]	**Biomasa** [g/l]	**PHA** [%]	**PHA** [g/l]	**3HV v PHA** [mol%]	$Y_{PHA/S}$	$Y_{X/S}$
25	4,2±0,7	38,9	1,64±0,1	42,6	0,08	0,21
50	2,3±0,4	36,3	0,83±0,1	26,3	0,04	0,12
75	1,8±0,7	51,2	0,92±0,1	9,0	0,05	0,09



Obrázek 22 Závislost obsahu biomasy po 72 hodinové kultivaci

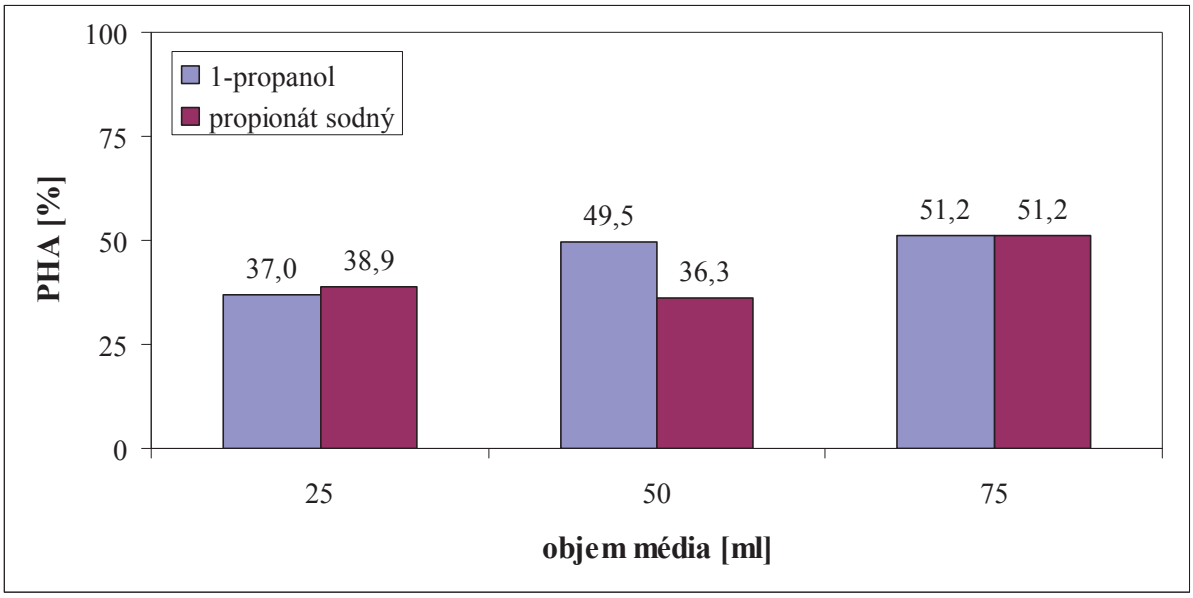
Obrázek č. 22 ukazuje závislost obsahu biomasy při použití různých prekurzorů při odlišném množství dostupného kyslíku v průběhu kultivace. Při experimentu došlo k největšímu nárůstu biomasy při použití 25 ml média – tj. nejmenšího objemu média, v produkční baňce bylo tedy největší množství volného vzduchu. Pro růst biomasy je tedy kyslík pozitivním faktorem. Při suplementaci 1-propanolem byla koncentrace biomasy při obsahu 25 ml média 5,1±0,2 g/l, při suplementaci propionátem sodným byla koncentrace biomasy 4,2±0,7 g/l.

Naopak při použití 75 ml média bylo v produkční baňce minimum volného vzduchu. Za těchto podmínek došlo k nejmenšímu nárůstu biomasy, limitace kyslíkem silně inhibuje růst bakteriální kultury. Při suplementaci 1-propanolem byla koncentrace biomasy 1,4±0,7 g/l resp. 1,8±0,7 g/l při použití propionátu sodného.

Za daných podmínek je z provedeného experimentu patrné, že koncentrace biomasy je přímo úměrná množství dostupného kyslíku v kultivační baňce.

Při použití 1-propanolu došlo k většímu nárůstu biomasy než při použití propionátu sodného, při kultivaci s 25 a 50 ml média. Při kultivaci se 75 ml média takto nelze rozhodnout – koncentrace biomasy pro oba prekurzory leží v intervalu statistické nejistoty.

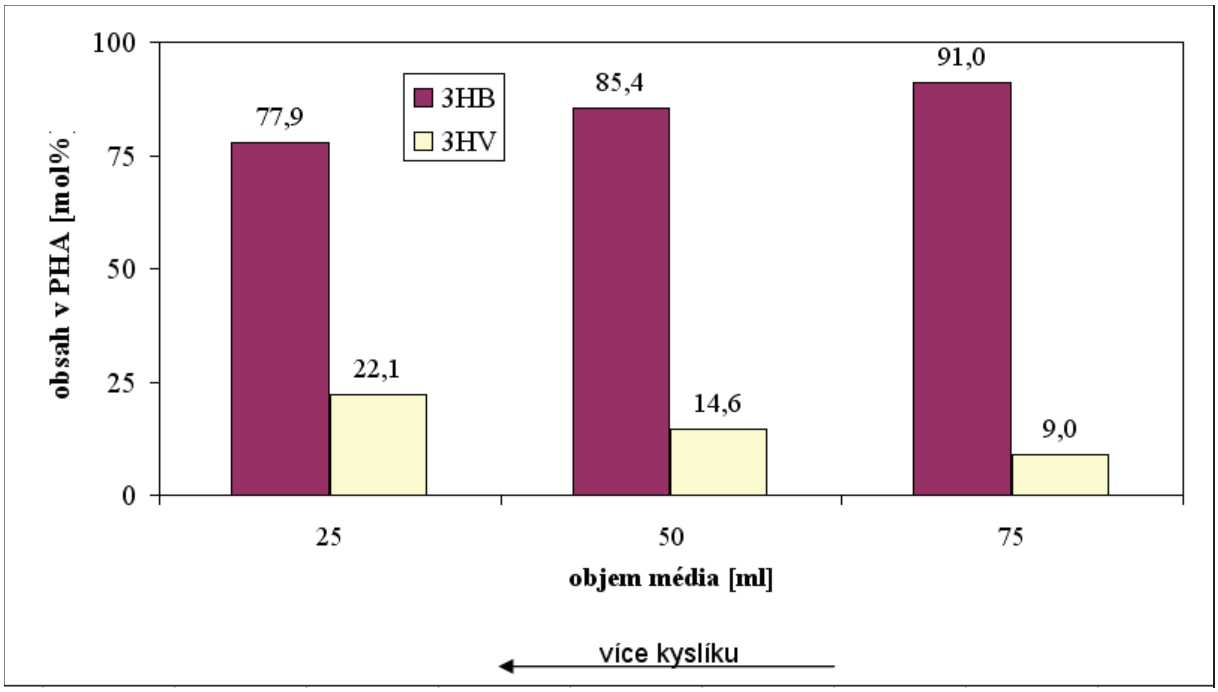
Obrázek číslo 23 udává obsah PHA v biomase po 72 hodinové kultivaci. Při 25 ml média – tj. největší množství volného vzduchu – bylo množství PHA v biomase 37,0% při použití 1-propanolu resp. 38,9% při použití propionátu sodného. Při použití 75 ml média – tj. nejmenší množství volného vzduchu v produkční baňce bylo množství PHA v biomase shodně 51,2% při použití obou prekurzorů. Lze konstatovat, že na rozdíl od růstu je limitace kyslíkem pozitivním faktorem ovlivňujícím akumulaci PHA v buňkách. Tento jev byl opakovaně popsán v literatuře a souvisí s inhibicí Krebsova cyklu při nedostatku kyslíku k regeneraci redukovaných koenzymů. Parciální inhibice Krebsova cyklu posílí tok acetyl-CoA do PHB biosyntetické dráhy, což pozitivně ovlivňuje intracelulární obsah PHB.



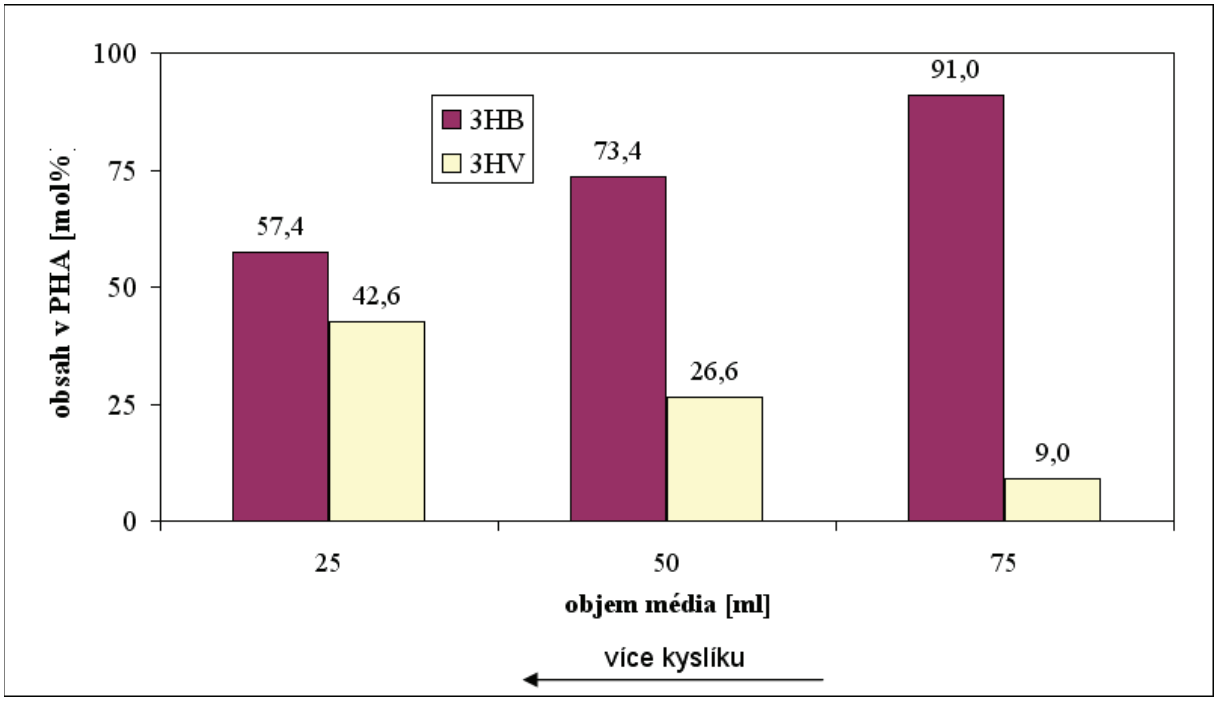
Obrázek 23 Závislost obsahu PHA po 72 hodinové kultivaci

Obrázek číslo 24 udává složení akumulovaného PHA při použití 1-propanolu jako prekurzoru 3HV. Největší množství 3HV bylo zaznamenáno při maximálním množství kyslíku v baňce a to 22,1 mol%, s klesajícím množstvím volného kyslíku v baňce došlo k poklesu množství inkorporovaného 3HV. Při použití 50 resp. 75 ml média bylo množství 3HV 14,6 mol% resp. 9,0 mol%

Obrázek 25 udává složení akumulovaného PHA při použití propionátu sodného jako prekurzoru 3HV. Největší množství 3HV bylo zaznamenáno při maximálním množství kyslíku v baňce a to 42,6 mol%, s klesajícím množstvím volného kyslíku v baňce došlo k poklesu inkorporace 3HV. Při použití 50 resp. 75 ml média bylo množství 3HV 26,6 mol% resp. 9,0 mol%



Obrázek 24 Závislost složení PHA na množství kyslíku při suplementaci 1-propanolem



Obrázek 25 Závislost složení PHA na množství kyslíku při suplementaci propionátem sodným

Z naměřených dat za daných experimentálních podmínek můžeme navrhnout obecný trend: větší množství dostupného kyslíku v baňce vede k většímu nárůstu biomasy. Ale s větším množstvím dostupného kyslíku dochází k poklesu akumulovaného množství PHA v biomase. Dále s větším množstvím dostupného kyslíku dochází k zvýšení obsahu 3HV v akumulovaném polymeru. Tato skutečnost je částečně v rozporu s předchozími pracemi, které popisují negativní vliv vyšší aerace na inkorporaci prekurzorů 3HV do struktury PHA [27]. Další část této práce byla tedy zaměřena na studium akumulace PHA a inkorporaci 3HV s využitím různých módů aerace v laboratorního fermentoru a na objasnění možných metabolických souvislostí mezi limitací/dostupností O_2 a produkcí kopolymeru P(3HB-*co*-3HV)

5.3.2.2. Kultivace v bioreaktoru

Pro zhodnocení vlivu kyslíku na tvorbu biomasy, množství a složení akumulovaného PHA v biomase byla provedena sada kultivací, přičemž při každé kultivaci byla koncentrace rozpuštěného kyslíku (vyjádřená jako % saturace kyslíkem) udržována na jiné konstantní hodnotě – 10, 30, 50 a 70%.

Tabulka 22 udává koncentraci biomasy ve fermentoru v závislosti na čase.

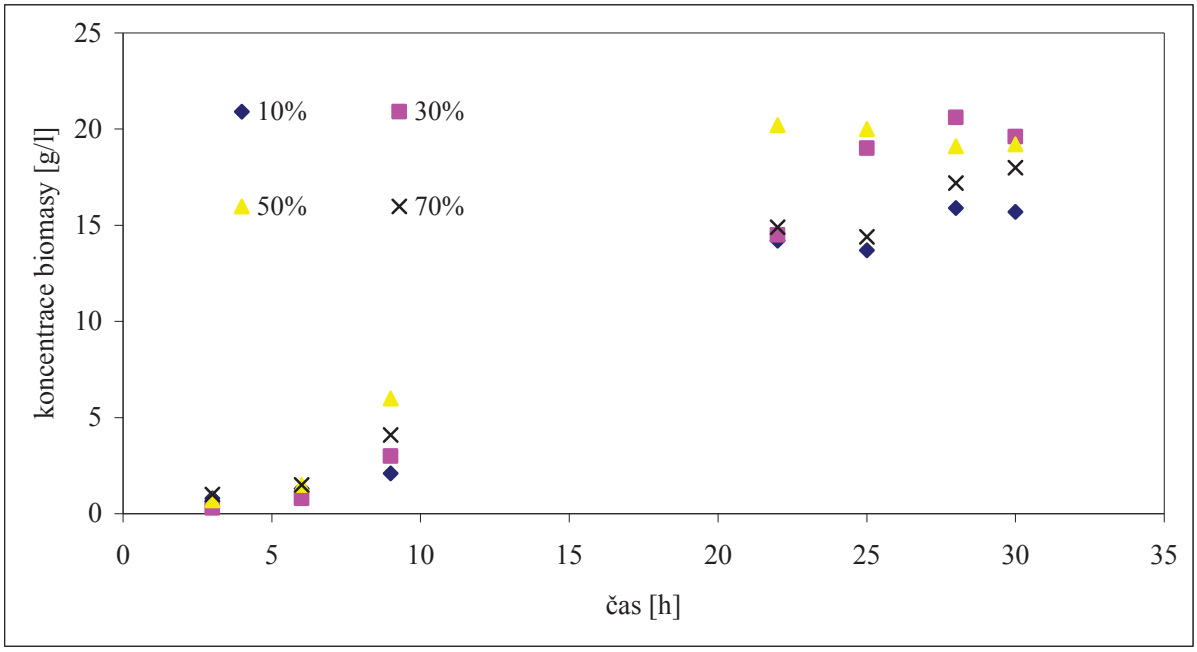
Obrázek 26 zobrazuje množství biomasy v závislosti na čase pro jednotlivé režimy saturace fermentoru vzduchem. Nejvyšší koncentrace biomasy po 30. hodinách kultivace byla 19,6 g/l při použití 30% saturace fermentoru vzduchem. Nejnižší koncentrace biomasy bylo dosaženo po 30. hodinách fermentace při 10% saturace fermentoru vzduchem, její hodnota byla 15,7 g/l.

Tabulky 23 až 26 udávají obsah PHA a složení akumulovaného PHA v závislosti na čase kultivace. Propionát sodný jako prekurzor 3HV byl přidán v čase 9. a 22. hodin. Proto akumulovaný polymer v čase kultivace 9 hodin obsahuje 0% 3HV.

Tabulka 22 Závislost obsahu biomasy na množství kyslíku

	saturace fermentoru vzduchem			
	10%	**30%**	**50%**	**70%**
čas kultivace [h]	**biomasa [g/l]**	**biomasa [g/l]**	**biomasa [g/l]**	**biomasa [g/l]**
3	0,8±0,1	0,3±0,01	0,7±0,01	1,0±0,1
6	1,3±0,1	0,8±0,1	1,5±0,5	1,5±0,1
9	2,1±0,2	3,0±0,2	6,0±0,3	4,1±0,1
22	14,2±0,8	14,5±0,1	20,2±0,2	14,9±0,1
25	13,7±0,1	19,0±0,3	20,0±0,1	14,4±0,1
28	15,9±0,2	20,6±0,6	19,1±0,1	17,2±0,2
30	15,7±0,3	19,6±0,2	19,2±0,3	18,0±0,2

Z níže uvedených dat je patrné, že za daných podmínek fermentace dochází v průběhu kultivace k zvyšování obsahu 3HV v akumulovaném PHA. Maximální množství 3HV bylo ve všech případech v 30. hodině kultivace. Dále je z naměřených dat vidět, že při rostoucí saturaci fermentoru vzduchem dochází ke zvyšování obsahu 3HV v akumulovaném PHA, to potvrzuje trend, který byl pozorován při kultivaci v Erlelmeyerových baňkách (viz. 5.3.2.1.).



Obrázek 26 Závislost koncentrace biomasy na množství kyslíku při kultivaci

Při použití 10% saturace fermentoru kyslíkem byl obsah PHA v biomase 67,0%. Při použití 30% saturace byl obsah PHA v biomase 55,8%, při 50% saturaci 58,0% a při 70% saturaci byl obsah PHA 76,7%.

Tabulka 23 Závislost obsahu PHA a složení PHA při 10% saturaci kyslíkem

10%

[h]	PHA [%]	3HB v PHA [mol%]	3HV v PHA [mol%]
9	26,1±1,1	100,0	0,0
22	61,6±1,2	96,2	3,8
25	60,0±1,5	93,6	6,4
30	67,0±2,6	93,4	6,6

Tabulka 24 Závislost obsahu PHA a složení PHA při 30% saturaci kyslíkem

30%

[h]	PHA [%]	3HB v PHA [mol%]	3HV v PHA [mol%]
9	21,3±0,5	100,0	0,0
22	48,7±0,6	94,6	5,4
25	51,7±4,5	93,4	6,6
30	55,8±5,3	92,3	7,7

Tabulka 25 Závislost obsahu PHA a složení PHA při 50% saturaci kyslíkem

50%

[h]	PHA [%]	3HB v PHA [mol%]	3HV v PHA [mol%]
9	21,3±0,1	100,0	0,0
22	55,0±1,7	94,7	5,3
25	63,9±3,1	91,4	8,6
30	58,0±2,8	90,4	9,6

Tabulka 26 Závislost obsahu PHA a složení PHA při 70% saturaci kyslíkem

70%

[h]	PHA [%]	3HB v PHA [mol%]	3HV v PHA [mol%]
9	25,0±0,7	100,0	0,0
22	76,3±7,0	93,8	6,2
25	77,0±0,6	90,9	9,1
30	76,7±1,1	85,7	14,3

Tabulka č. 27 udává přehled obsahu 3HV v PHA v závislosti na saturaci fermentoru vzduchem. Po 30 hodinách kultivace byl obsah 3HV při 10% saturaci 6,6 mol%, při 30% saturaci 7,7 mol%, při 50% saturaci 9,6 mol% a při 70% saturaci činil obsah 3HV 14,3 mol%.

Tabulka číslo 28 udává přehled výtěžnostních koeficientů $Y_{X/S}$ a $Y_{PHA/S}$ pro jednotlivé režimy saturace fermentoru vzduchem. Největšího výtěžnostního koeficientu $Y_{X/S}$ bylo dosaženo při kultivaci na 30% maximální saturace fermentoru vzduchem $Y_{X/S}$=0,65.

Tabulka 27 Závislost obsahu 3HV v PHA na saturaci kyslíkem (30h kultivace)

saturace kyslíkem [%]	obsah 3HV v PHA [mol%]
10	6,6
30	7,7
50	9,6
70	14,3

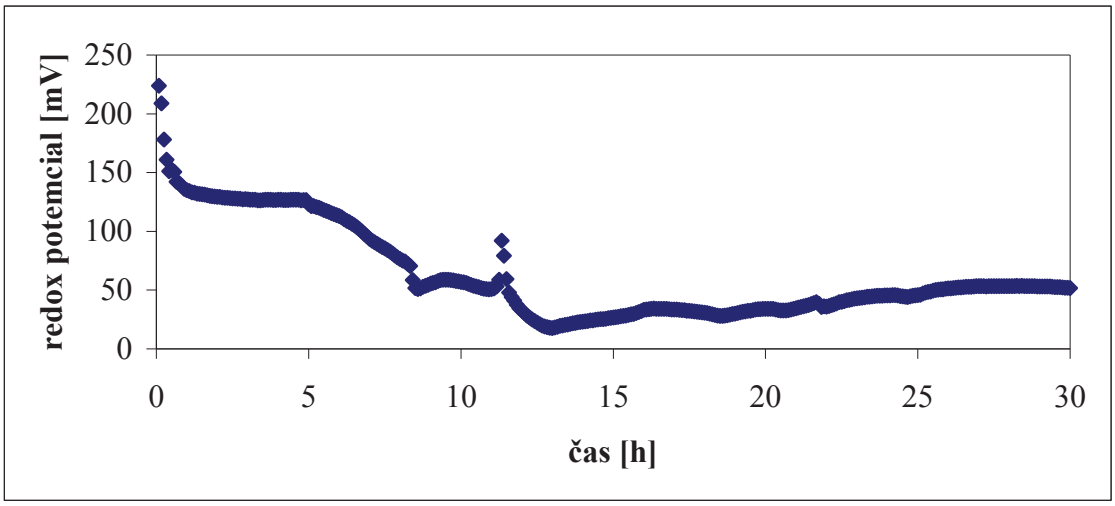
Tabulka 28 Přehled výtěžnostních koeficientů pro kultivace ve fermentoru (30h kultivace)

saturace kyslíkem [%]	$Y_{X/S}$	$Y_{PHA/S}$
10	0,52	0,35
30	0,65	0,36
50	0,64	0,37
70	0,60	0,46

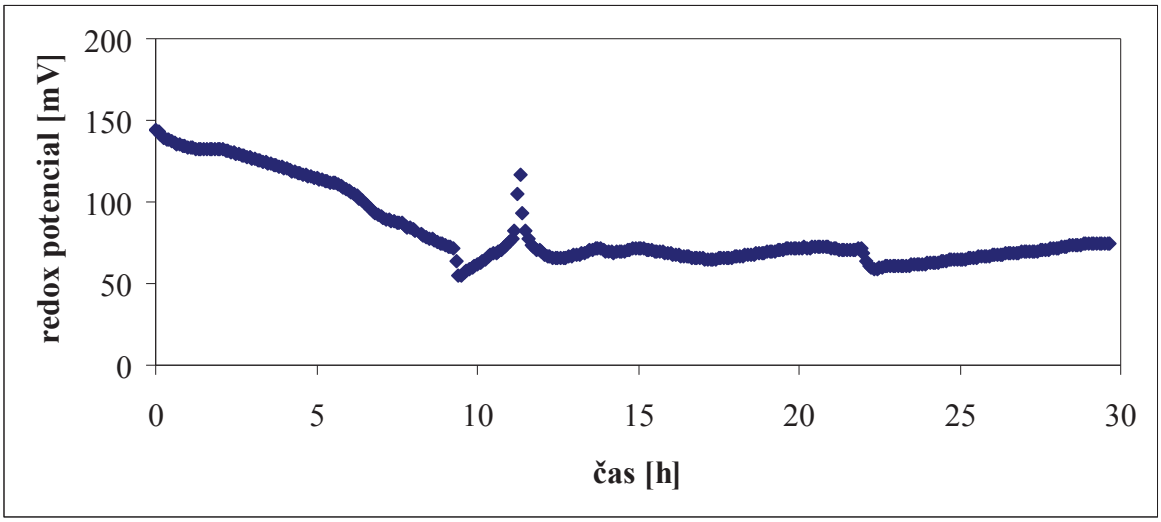
Obrázky 27 až 30 zobrazují závislost redox potenciálu na čase pro jednotlivé režimy kultivace ve fermentoru.

V průběhu prvních zhruba deseti hodin kultivace došlo u všech provedených kultivací k výraznému poklesu redox potenciálu. V časovém intervalu 0 až 10 hodin bakteriální kultura pravděpodobně přecházela z fáze zrychlujícího se růstu do fáze exponenciálního růstu. Intenzivní využívání uhlíkatého substrátu a dalších složek média pravděpodobně vedlo k výše zmíněnému poklesu redox potenciálu.

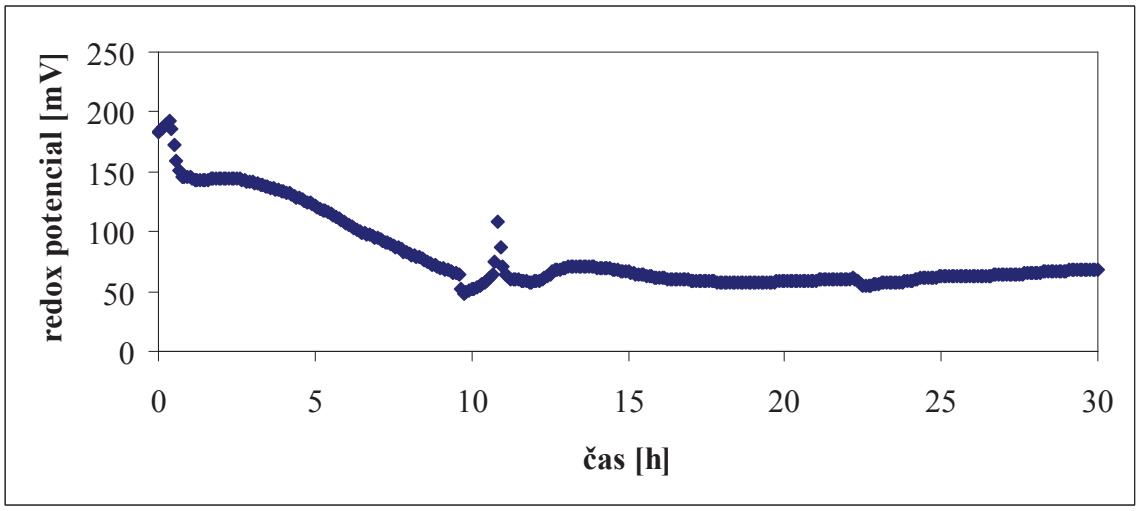
Při všech fermentacích byl propionát sodný přidán po 9. hodině kultivace. Na všech grafech (obrázky 27 až 30) je vidět výrazný vzestup redox potenciálu mezi 10. a 11. hodinou. To pravděpodobně souvisí s přidáním propionátu sodného. Koncentrace propionátu sodného v 9. hodině odpovídala koncentraci 3 g/l. Další suplementace propionátem sodným byla provedena ve 22. hodině kultivace, bylo přidáno množství odpovídající 5 g/l. Celkové přidané množství přidaného propionátu během fermentace bylo tedy 8 g/l. Po druhém přídavku prekurzoru ve 22. hodině kultivace nebyl zaznamenán významnější vzestup redox potenciálu, jak zobrazují níže uvedené grafy.



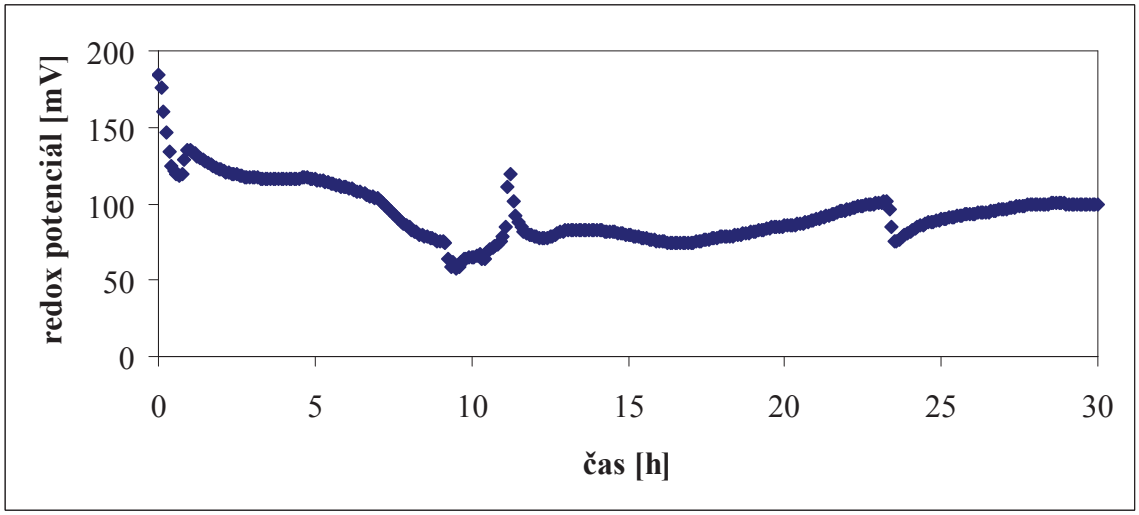
Obrázek 27 Závislost redox potenciálu na čase - 10% saturace kyslíkem



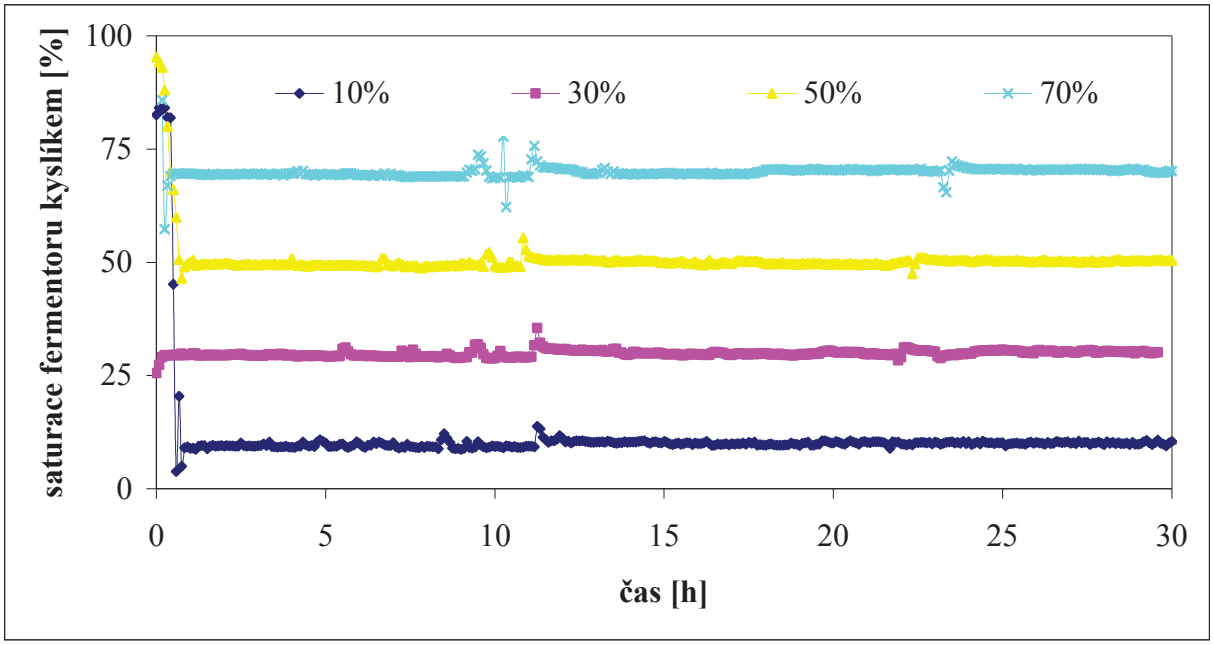
Obrázek 28 Závislost redox potenciálu na čase - 30% saturace kyslíkem



Obrázek 29 Závislost redox pototenciálu na čase - 50% saturace kyslíkem



Obrázek 30 Závislost redox potenciálu na čase - 70% saturace kyslíkem

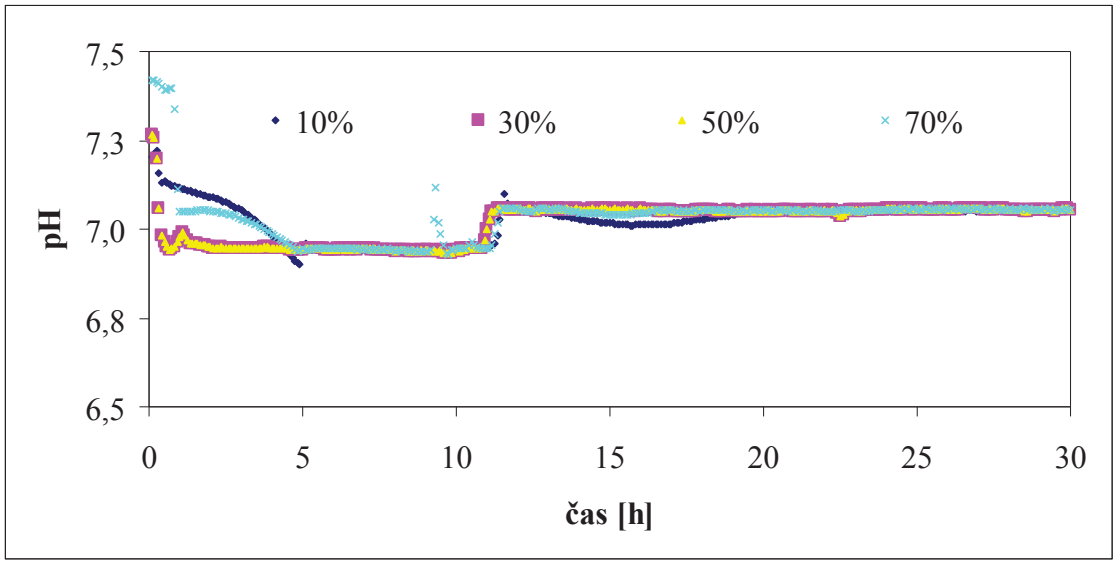


Obrázek 31 Záznam saturace fermentoru kyslíkem na čase kultivace

Obrázek číslo 31 udává grafickou závislost saturace fermentoru vzduchem na čase. Relativně rychle po inokulaci fermentoru došlo ke stabilizaci hodnoty saturace vzduchem bez výraznějších fluktuací. První přídavek propionátu (9 h) je doprovázen nárůstem hodnoty DO, což je pravděpodobně důsledek toxického působení propionátu na bakteriální kultury. Její částečná inhibice zpomalila spotřebu kyslíku což vedlo k nárůstu hodnoty DO. Aby automatický regulační systém fermentoru kompenzoval pokles rychlosti spotřeby kyslíku a udržel nastavenou hodnotu saturace kyslíkem došlo k snížení rychlosti míchání fermentoru (viz. obrázek číslo 33, 34, 35, 36).

Obrázek číslo 32 udává grafickou závislost pH v kultivačním médiu na čase. Optimální pH pro kultivaci bakterie *C. necator* H16 je pH 7. V průběhu kultivace docházelo k využívání tuku jako jediného uhlíkatého zdroje. Účinkem extracelulárních lipáz produkovaných produkční bakterií docházelo k enzymové hydrolýze tuku a tím k uvolnění volných mastných kyselin. Volné mastné kyseliny snižovaly pH média a byly proto neutralizovány automatickým přídavkem 0,5 mol/l roztoku NaOH. Z toho důvodu bylo pH v intervalu prvních deseti hodin na hodnotě 6,95.

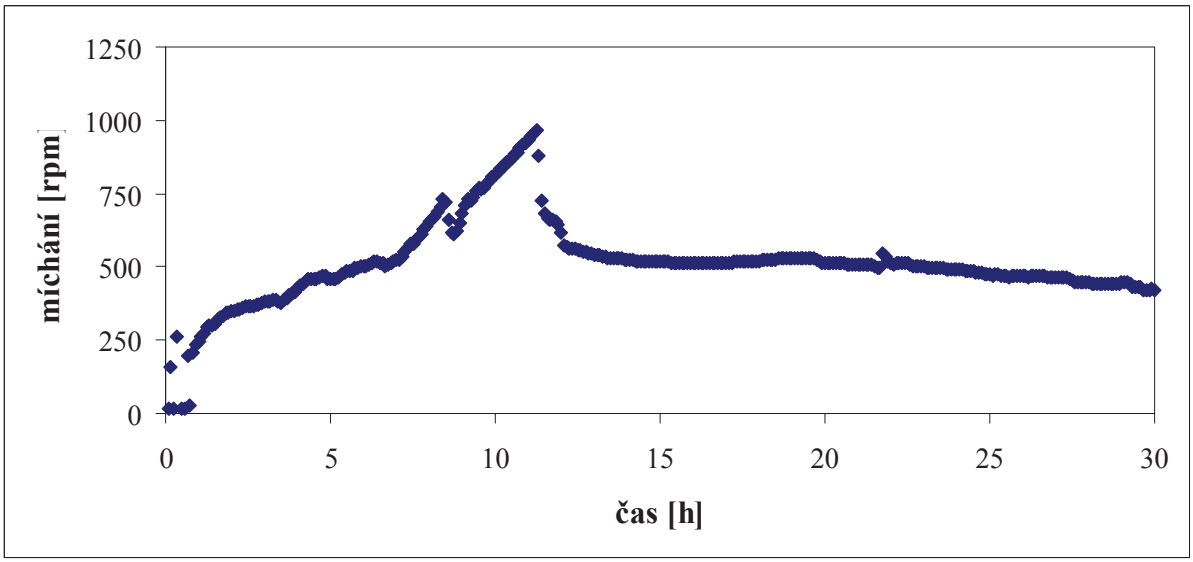
V čase kultivace 9 hodin byl přidán propionát sodný. Propionát sodný je sůl slabé kyseliny a silné zásady. Výsledné pH při disociaci této soli je zásadité. Z toho důvodu došlo u všech provedených kultivací k vzrůstu pH. Automatickým přídavkem 0,5 mol/l kyseliny sírové byla hodnota pH ve fermentoru udržována na hodnotě 7,05, jak zobrazuje obrázek 32.



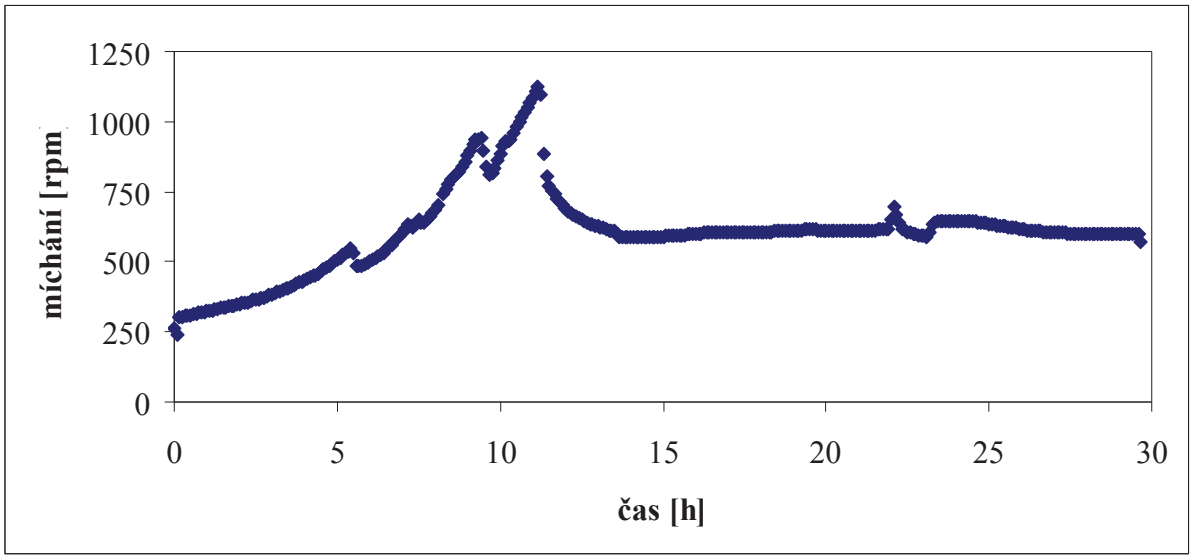
Obrázek 32 Záznam závislosti pH na čase kultivace

Obrázky 33 až 36 udávají grafickou závislost otáček míchadla na čase pro provedené kultivace ve fermentoru.

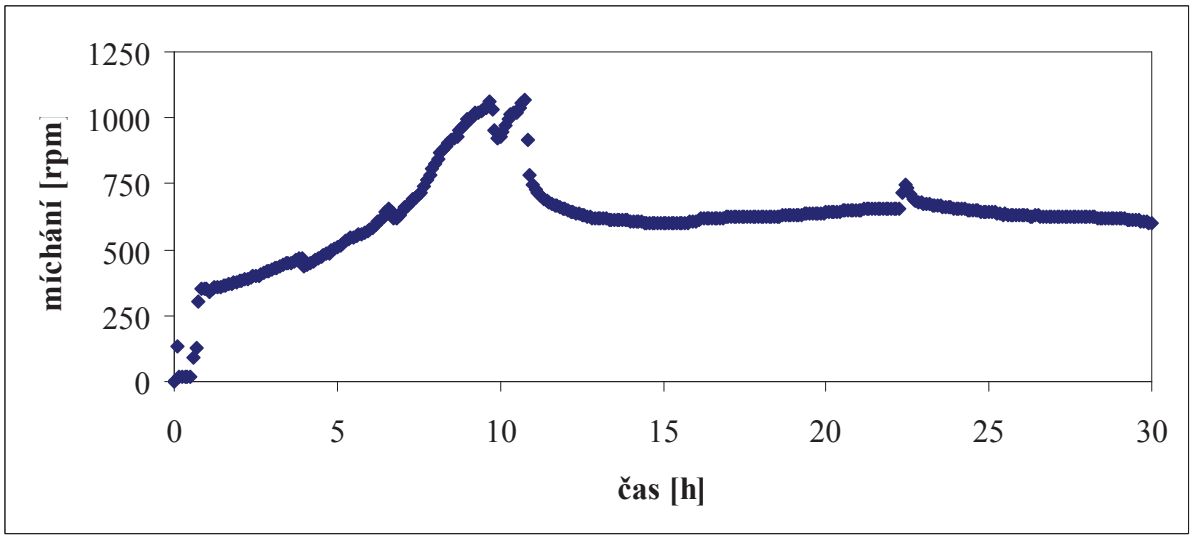
Počet otáček míchadla vyjádřený v rpm byl při fermentaci použit jako hlavní faktor při regulaci množství rozpuštěného kyslíku v médiu. Se vzrůstající intenzitou míchání dochází k větší dispergaci vzduchových bublin, zmenšení jejich velikosti a vzrůstu jejich počtu. To má za následek vzrůst celkového koeficientu přestupu kyslíku z přiváděného vzduchu do média.



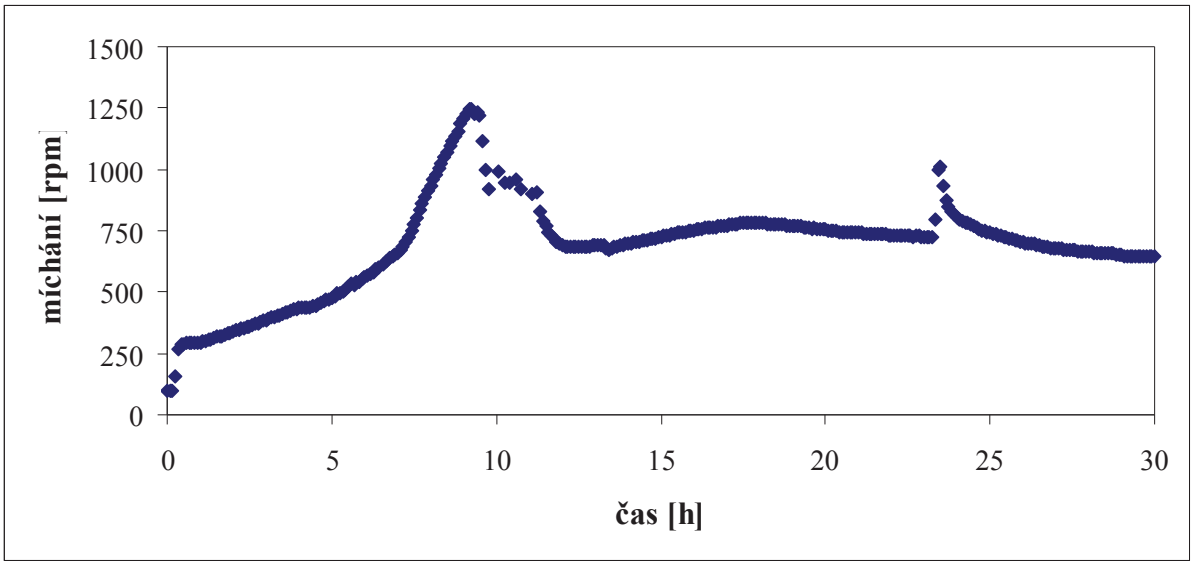
Obrázek 33 Záznam otáček míchadla při 10% saturaci vzduchem



Obrázek 34 Záznam otáček míchadla při 30% saturaci vzduchem



Obrázek 35 Záznam otáček míchadla při 50% saturaci vzduchem



Obrázek 36 Záznam otáček míchadla při 70% saturaci vzduchem

Na výše uvedených obrazcích (33 až 36) můžeme nepřímo pozorovat vzrůstající spotřebu kyslíku během počáteční fáze kultivace.

U všech provedených experimentů docházelo v intervalu prvních 10. hodin kultivace k výraznému vzrůstu intenzity míchání a tedy i k vzrůstu spotřeby kyslíku biomasou. V tomto časovém intervalu se bakteriální kultura pravděpodobně nacházela ve fázi exponenciálního růstu. V deváté hodině kultivace byl přidán propionát sodný. Na výše uvedených grafech je patrný výrazný pokles intenzity míchání po desáté hodině kultivace. To pravděpodobně souviselo s prvním přídavkem propionátu, pravděpodobně vykazuje mírně toxický a inhibiční efekt vůči bakteriální kultuře. První přídavek propionátu sodného pravděpodobně způsobil zpomalení nebo zastavení růstu bakteriální kultury.

Další vliv za snížení počtu otáček míchadla mohl mít samotný přídavek propionátu sodného. Při rozpuštění této soli dojde k ovlivnění výsledného pH média. Lze předpokládat, že přídavek propionátu má vliv i na řadu dalších fyzikálně chemických parametrů, jako např.: rozpustnost plynů v médiu. Pokles otáček míchadla tak mohl být způsoben zvýšením rozpustnosti kyslíku nebo zvýšením koeficientu přestupu kyslíku ze vzduchu do média.

5.3.2.3. Optimalizace kultivace ve fermentoru

Na základě výsledků z předchozích experimentů, byl navržen aerační program pro biotechnologickou produkci P(3HB-co-3HV) pomocí bakteriální kultury *C. necator*. Nejprve byla hodnota DO udržována na hodnotě 30%, tak aby byl podpořen růst kultury. Následně byla aerace snížena na hodnotu 10 % saturace, přičemž tento krok měl podpořit akumulaci polymeru ve stacionární fázi. Experimentální podmínky jsou popsány v kapitole 4.2.5.3. Tabulka číslo 29 udává koncentraci biomasy v závislosti na čase. Po 30 hodinách kultivace bylo dosaženo koncentrace biomasy 21,1 g/l.

Tabulka číslo 30 udává obsah a složení akumulovaného PHA v biomase. Po 30 hodinách kultivace bylo dosaženo obsahu PHA 95,3%.

Prekurzor propionát sodný byl přidán již do minerálního inokula (viz. 4.2.5.3.). Motivací k tomuto kroku byla potenciální možnost adaptace kultury na propionát a minimalizace jeho inhibičního dopadu na růst kultury. Z toho důvodu je 3HV obsažen v PHA ve vzorku z 9. hodiny kultivace. Po 30. hodinách kultivace byl obsah 3HV v PHA 4,5 mol%.

Tabulka 29 Koncentrace biomasy v závislosti na čase

čas kultivace [h]	koncentrace biomasy [g/l]
3	0,5±0,1
6	1,2±0,1
9	2,4±0,2
22	22,3±0,8
25	20,5±0,1
28	21,1±0,2
30	21,1±0,3

Tabulka 30 Obsah a složení PHA

čas kultivace [h]	PHA [%]	PHA [g/l]	3HV v PHA [mol%]
9	33,3	0,8	16,5
22	84,4	18,8	2,5
25	90,1	18,5	3,2
30	95,3	20,1	4,5

Tabulka číslo 31 udává výtěžnostní koeficienty $Y_{X/S}$ a $Y_{PHA/S}$. Po 30 hodinách kultivace byl výtěžnostní koeficient $Y_{X/S}$=0,70 a $Y_{PHA/S}$=0,67. Při provedené optimalizační kultivaci bylo dosaženo vyšších výtěžnostních koeficientů $Y_{X/S}$ a $Y_{PHA/S}$ ve srovnání s výchozími experimenty.

Nejvyššího koeficientu $Y_{X/S}$ bylo dosaženo při předcházejících experimentech u 30% saturaci fermentoru vzduchem, a to $Y_{X/S}$=0,65. Při optimalizační kultivaci se podařilo tento koeficient podařilo zvýšit na $Y_{X/S}$=0,70.

Nejvyššího koeficientu $Y_{PHA/S}$ bylo dosaženo při předcházejících experimentech u 70% saturaci fermentoru vzduchem, a to $Y_{PHA/S}$=0,46. Při optimalizační kultivaci se tento koeficient podařilo zvýšit na $Y_{PHA/S}$=0,67, tedy tento klíčový parametr biotechnologické výroby byl úpravou aeračních podmínek navýšen o cca 45%.

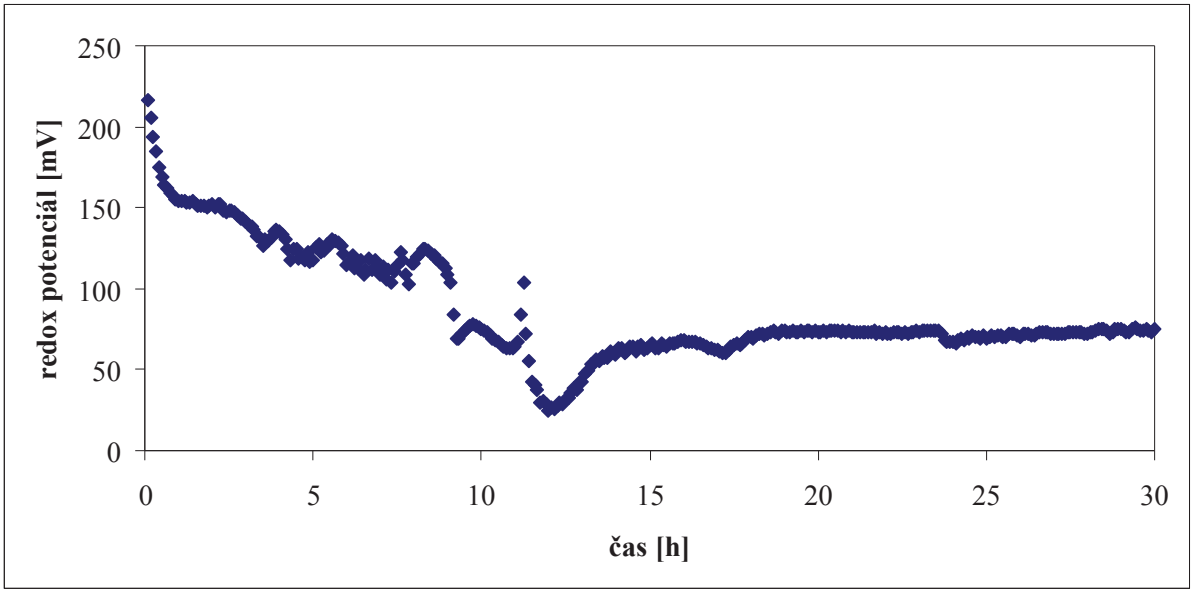
Intracelulární obsah PHA v bakteriální kultuře kultivované s použitím výše popsaného aeračního programu dosáhl ve 30. hodině kultivace 95% suché biomasy. Takto vysoký obsah PHA v buňkách by měl při uvažované biotechnologické produkci PHA výrazně pozitivní vliv také na ekonomickou bilanci isolace PHA z buněk, neboť obecně platí že vyšší obsah PHA v bakteriálních buňkách redukuje množství potřebných extrakčních činidel.

Tabulka 31 Výtěžnostní koeficienty optimalizační kultivace

$Y_{PHA/S}$	$Y_{X/S}$
0,67	0,70

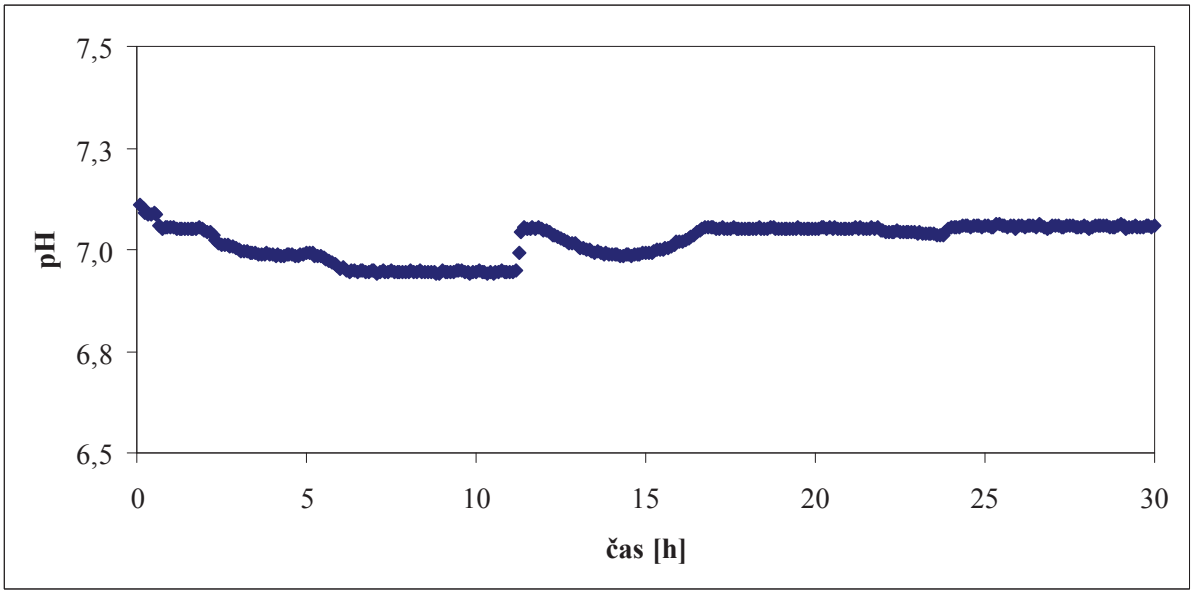
Obrázek 37 udává grafickou závislost redox potenciálu na čase kultivace. Při optimalizační kultivaci byl pozorován analogický efekt po přídavku propionátu sodného jako při předchozích kultivacích (viz. 5.3.2.3.). V průběhu kultivace docházelo k simultánnímu poklesu redox potenciálu spolu se vzrůstem koncentrace biomasy. Po přidání propionátu

sodného v deváté hodině kultivace došlo ke vzrůstu redox potenciálu, analogicky jako u předchozích experimentů (viz. 5.3.2.3.).



Obrázek 37 Záznam redox potenciálu na čase u optimalizační kultivace

Obrázek 38 uvádí záznam závislosti pH na čase kultivace. Závislost pH na čase měla analogický trend jako u předchozích kultivací (viz. 5.3.2.3.).



Obrázek 38 Záznam závislosti pH na čase kultivace

5.4. Stanovení aktivity vybraných enzymů

5.4.1. Stanovení celkových bílkovin v enzymových preparátech

V připravených enzymových preparátech, které byly použity pro měření enzymových aktivit bylo stanoveno celkové množství rozpuštěných bílkovin.

Tabulka číslo 32 udává celkové množství rozpuštěných bílkovin v intracelulárním buněčném lyzátu použitém pro měření enzymové aktivity.

Koncentrace bílkovin byla dále použita pro vyhodnocení specifické enzymové aktivity. Tabulka č. 32 obsahuje střední hodnoty 3 souběžných stanovení.

Tabulka 32 Celkové množství rozpuštěných bílkovin v enzymových preparátech

vzorek: saturace fermentoru vzduchem	koncentrace bílkovin v preparátu [µg/ml]
10%	555±8
30%	403±2
50%	426±8
70%	662±9

5.4.2. Stanovení aktivity izocitrátdehydrogenázy

NADP dependentní izocitrát dehydrogenáza je enzym, který umožňuje buňkám tvořit NADPH. NADPH je důležité redukční činidlo, které se v buňkách spolupodílí na likvidaci reaktivních forem kyslíku, dusíku a některých volných radikálů, dále je důležitým redukčním činidlem, které součástí většiny anabolických drah, včetně biosyntézy PHA.

Izocitrát dehydrogenáza katalyzuje oxidaci izocitrátu na α-ketoglutarát za souběžné redukce NADP na NADPH.

Tabulka 33 shrnuje stanovení a vyhodnocení enzymové aktivity izocitrátdehydrogenázy.

Nejnižší specifická enzymová aktivita byla zaznamenána u preparátu z kultivace s 10% saturací vzduchem. Její hodnota byla 5 nmol/min/µg.

Nejvyšší specifická enzymová aktivita byla naopak vyhodnocena u buněčného lyzátu z kultivace s 70% saturací vzduchem. Její hodnota byla 11 nmol/min/µg.

Byl pozorován vzrůstající trend enzymové aktivity izocitrátdehydrogenázy. Při vyšší saturaci fermentoru kyslíkem byla zaznamenána větší enzymová aktivita. Důvodem může být parciální adaptace vůči oxidačnímu stresu indukovanému vyšší hladinou kyslíku ve fermentačním médiu.

Obrázky 43 až 46 uvedené v příloze (viz. 8.2.) zobrazují závislost absorbance při vlnové délce 340 nm na čase pro vybrané enzymové preparáty.

Tabulka 33 Vyhodnocení enzymové aktivity izocitrátdehydogenázy

	10%	30%	50%	70%
čas [min]	**A 340 nm**	**A 340 nm**	**A 340 nm**	**A 340 nm**
0:00:00	0,226	0,208	0,232	0,286
0:00:20	0,249	0,243	0,257	0,394
0:00:40	0,280	0,264	0,285	0,500
0:01:00	0,312	0,290	0,310	0,572
0:01:20	0,343	0,314	0,338	0,653
0:01:40	0,370	0,342	0,367	0,749
0:02:00	0,409	0,370	0,401	0,852
0:02:20	0,442	0,404	0,435	0,950
0:02:40	0,481	0,437	0,469	1,053
0:03:00	0,519	0,472	0,507	1,150
0:03:20	0,557	0,507	0,548	1,249
0:03:40	0,591	0,545	0,580	1,342
0:04:00	0,640	0,577	0,610	1,428
0:04:20	0,691	0,615	0,648	1,526
0:04:40	0,739	0,653	0,683	1,630
0:05:00	0,791	0,690	0,716	1,725
ΔA	0,57	0,48	0,48	1,44
aktivita [nmol/min]	74	63	64	189
spec.akt. [nmol/min/µg]	**5,4**	**6,3**	**6,0**	**11,1**

5.4.3. Stanovení aktivity 2-methylcitrát syntázy

2-Methylcitrátsyntáza je první enzym 2-methylcitrátového cyklu. Tento enzym katalyzuje kondenzaci propionyl –CoA s oxalacetátem za vzniku 2-methylcitrátu a uvolnění volného koenzymu A. Aktivita tohoto enzymu spolu s aktivitou MCC jsou pravděpodobně klíčové pro katabolismu propionyl-CoA.

Tabulka 34 shrnuje stanovení a vyhodnocení enzymové aktivity 2-methylcitrátsyntázy. Nejnižší specifická enzymová aktivita byla zaznamenána u preparátu z kultivace s 50% saturací vzduchem. Její hodnota byla 0,1 nmol/min/µg.

Nejvyšší specifická enzymová aktivita byla vyhodnocena u buněčného lyzátu z kultivace s 70% saturací vzduchem. Její hodnota byla 0,4 nmol/min/µg.

Obrázky 47 až 50 ilustrují měření enzymové aktivity 2-methylcitrátsyntázy uvedeno v příloze (viz. 8.2.).

Tabulka 34 Vyhodnocení enzymové aktivity 2-methylcitrátsyntázy

	10%	30%	50%	70%
čas [min]	**A 405 nm**	**A 405 nm**	**A 405 nm**	**A 405 nm**
0:00:00	0,98	0,92	0,87	0,88
0:00:30	0,99	0,93	0,88	0,89
0:01:00	0,99	0,93	0,88	0,90
0:01:30	1,00	0,94	0,88	0,92
0:02:00	1,00	0,94	0,88	0,93
0:02:30	1,01	0,94	0,88	0,94
0:03:00	1,01	0,95	0,88	0,94
0:03:30	1,01	0,95	0,89	0,95
0:04:00	1,01	0,96	0,89	0,96
0:04:30	1,02	0,96	0,89	0,97
0:05:00	1,02	0,96	0,89	0,98
ΔA	0,04	0,04	0,02	0,10
aktivita [nmol/min]	3	3	1	7
spec.akt. [nmol/min/µg]	**0,2**	**0,3**	**0,1**	**0,4**

5.4.4. Stanovení aktivity glukóza-6-fosfát dehydrogenázy

Glukóza-6-fosfát dehydrogenáza je první enzym pentózového cyklu. Pentózový cyklus umožňuje buňce, vytvářet pentózy a NADPH. NADPH je důležité redukční činidlo, jak bylo zmíněno výše (viz. 5.4.2.).

Glukóza-6-fosfát dehydrogenáza katalyzuje oxidaci glukóza-6-fosfátu na 6-fosfoglukono-δ-lakton s využitím $NADP^+$ jako akceptoru elektronů.

Tabulka 35 shrnuje stanovení a vyhodnocení enzymové aktivity glukóza-6-fosfátdehydrogenázy. Nejvyšší enzymová specifická enzymová aktivita byla naměřena u preparátu při 70% saturaci vzduchem, její hodnota byla 2 nmol/min/µg. U preparátu při 70% saturace fermentoru vzduchem byla enzymová aktivita 2 nmol/min/µg. Při 10%, 30% a 50% saturaci byla specifická enzymová aktivita 1 nmol/min/µg. Při výpočtu specifické aktivity byl brán rozdíl absorbace v časovém intervalu při kterém docházelo k lineárnímu vzrůstu absorbance měřené při 340 nm.

tabulka 35 Vyhodnocení enzymové aktivity glukóza-6-fosfátdehydrogenázy

	10%	30%	50%	70%
čas [min]	**A 340**	**A 340**	**A 340**	**A 340**
0:00:00	0,620	0,571	0,584	0,980
0:00:20	0,617	0,571	-	0,988
0:00:40	0,640	0,579	0,606	1,021
0:01:00	0,647	0,589	0,620	1,035
0:01:20	0,659	0,605	0,630	1,040
0:01:40	0,670	0,613	0,632	1,048
0:02:00	0,682	0,632	0,637	1,053
0:02:20	0,684	0,638	0,642	1,060
0:02:40	0,686	0,632	0,648	1,065
0:03:00	0,685	0,643	0,650	1,073
0:03:20	0,688	0,648	0,650	1,078
0:03:40	0,691	0,649	0,654	1,075
0:04:00	0,693	0,654	0,657	1,085
0:04:20	0,685	0,654	0,658	1,089
0:04:40	0,689	0,656	0,658	1,096
0:05:00	0,686	0,650	0,658	1,106
ΔA	0,07	0,07	0,06	0,13
aktivita [nmol/min]	14	15	13	28
spec.akt. [nmol/min/µg]	**1,0**	**1,6**	**1,4**	**1,2**

5.4.5. Stanovení aktivity jablečného enzymu

Jablečný enzym je další enzym dovolující buňkám tvořit NADPH. Jablečný enzym katalyzuje oxidaci malátu na pyruvát. Při oxidaci se uvolňuje CO_2 a $NADP^+$ je redukován na NADPH.

Tabulka 36 shrnuje stanovení a vyhodnocení enzymové aktivity jablečného enzymu. Nejvyšší specifická enzymová aktivita byla naměřena u preparátu z kultivace při 70% maximální saturace fermentoru vzduchem. Její hodnota byla 2 nmol/min/µg. U enzymových preparátu z 10, 30 resp. 70% saturace fermentoru byla specifická enzymová aktivita 1 nmol/min/µg.

tabulka 36 Vyhodnocení enzymové aktivity jablečného enzymu

	10%	30%	50%	70%
čas [min]	**A 340 nm**	**A 340 nm**	**A 340 nm**	**A 340 nm**
0:00:00	0,261	0,222	0,217	0,497
0:00:20	0,280	0,238	0,227	0,498
0:00:40	0,285	0,246	0,234	0,513
0:01:00	0,289	0,252	0,242	0,542
0:01:20	0,292	0,249	0,244	0,550
0:01:40	0,289	0,254	0,246	0,548
0:02:00	0,288	0,252	0,243	0,545
0:02:20	0,288	0,253	0,245	0,547
0:02:40	0,294	0,253	0,245	0,555
0:03:00	0,293	0,254	0,246	0,557
0:03:20	0,292	0,254	0,246	0,560
0:03:40	0,289	0,254	0,245	0,560
0:04:00	0,291	0,254	0,243	0,567
0:04:20	0,291	0,255	0,244	0,574
0:04:40	0,292	0,255	0,246	0,575
0:05:00	0,292	0,255	0,246	0,578
ΔA	0,031	0,033	0,029	0,081
aktivita [nmol/min]	10	11	10	26
spec.akt. [nmol/min/µg]	**0,7**	**1,1**	**0,9**	**1,6**

5.4.6. Stanovení aktivity malátdehydrogenázy

Malát dehydrogenáza je jedním z enzymů citrátového cyklu. Tento enzym katalyzuje oxidaci malátu na oxalacetát s NAD^+ jako akceptoru elektronů.

Tabulka 37 shrnuje stanovení a vyhodnocení enzymové aktivity malátdehydrogenázy. Maximální specifická enzymová aktivita byla stanovena u preparátu z fermentace při 70% saturace vzduchem, ato 4 nmol/min/µg. Při 10% saturaci fermentoru vzduchem byla specifická enzymová aktivita 2 nmol/min/µg. Při 30 a 50% saturaci fermentoru kyslíkem byla enzymová aktivita 1 nmol/min/µg.

Obrázky 55 až 58 uvedené v příloze (viz. 8.2.) zobrazují záznam měření enzymové aktivity malátdehydrogenázy.

tabulka 37 Vyhodnocení enzymové aktivity malátdehydrogenázy

	10%	30%	50%	70%
čas [min]	**A 340 nm**	**A 340 nm**	**A 340 nm**	**A 340 nm**
0:00:00	0,32	0,29	0,28	0,40
0:00:20	0,35	0,30	0,29	0,49
0:00:40	0,37	0,31	0,30	0,52
0:01:00	0,39	0,31	0,30	0,55
0:01:20	0,40	0,31	0,31	0,55
0:01:40	0,40	0,32	0,32	0,57
0:02:00	0,40	0,33	0,31	0,57
0:02:20	0,40	0,33	0,32	0,57
0:02:40	0,40	0,33	0,31	0,59
0:03:00	0,40	0,33	0,32	0,59
0:03:20	0,40	0,33	0,32	0,59
0:03:40	0,40	0,33	0,32	0,59
0:04:00	0,40	0,33	0,32	0,60
0:04:20	0,40	0,34	0,32	0,60
0:04:40	0,41	0,33	0,32	0,60
0:05:00	0,41	0,34	0,32	0,60
ΔA	0,08	0,04	0,04	0,20
aktivita [nmol/min]	28	13	14	67
spec.akt. [nmol/min/µg]	**2,0**	**1,3**	**1,3**	**4,0**

5.4.7. Přehled aktivity vybraných enzymů v závislosti na saturaci fermentoru vzduchem

Tabulka č. 38 zobrazuje přehled specifické enzymové aktivity vybraných enzymů v závislosti na saturaci fermentoru vzduchem.

Tabulka 38 Přehled specifické enzymové aktivity vybraných enzymů

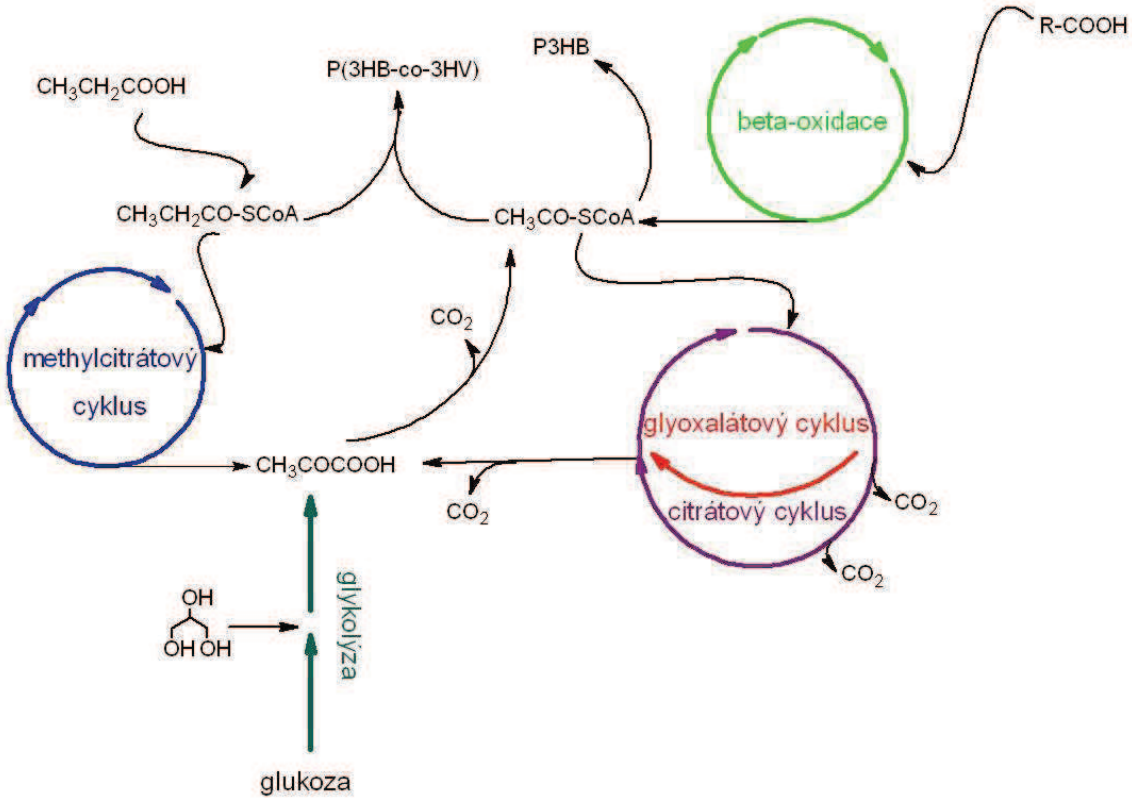
	saturace vzduchem			
	10%	**30%**	**50%**	**70%**
Izocitrát dehydrogenáza	5,4	6,3	6,0	11,1
2-methylcitrát syntéza	0,2	0,3	0,1	0,4
Glukóza-6-fosfát dehydogenáza	1,0	1,6	1,4	1,2
Jablečný enzym	0,7	1,1	0,9	1,6
Malát dehydrogenáza	2,0	1,3	1,3	4,0
	spec.akt. [nmol/min/µg]			

5.5. Zhodnocení vlivu oxidačního stresu na metabolismus u bakterie *C. necator* H16

Při kultivaci bakterie *C. necator* H16 na tuku, jako jediném uhlíkatém zdroji, je předpokládána β-oxidace jako hlavní katabolická dráha pro utilizaci mastných kyselin

vzniklých po enzymové hydrolýze tuku. Glycerol pravděpodobně vstupuje jako meziprodukt do glykolýzy. Obecné schéma metabolismu při růstu na tuku zobrazuje obrázek 39.

Obrázek 40 ilustruje pravděpodobný katabolický proces úplného odbourání propionyl-CoA u bakterie *C. necator*.

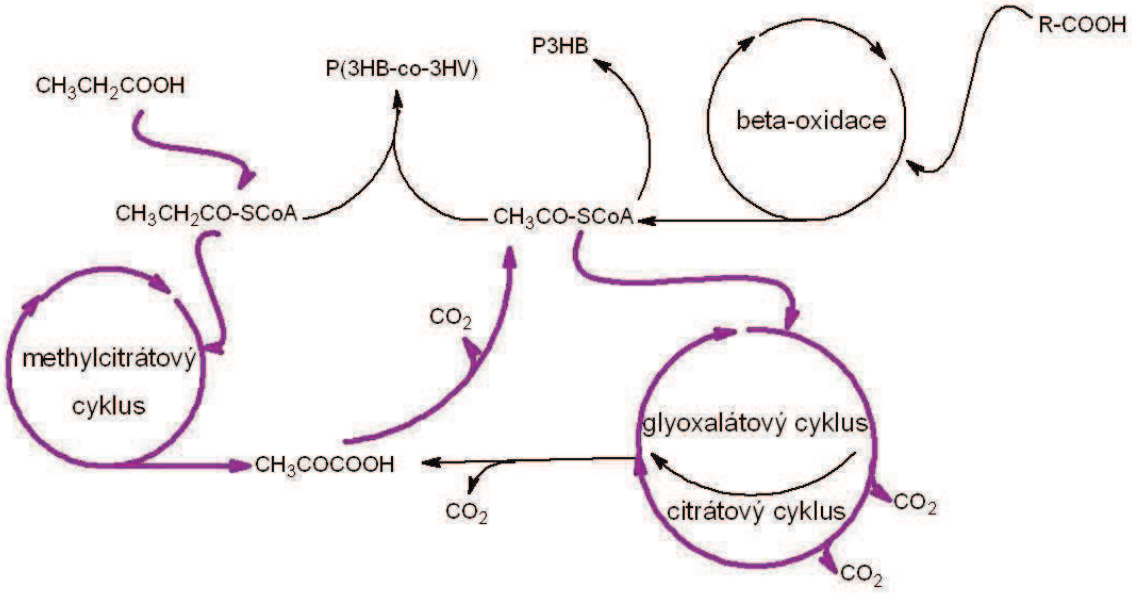


Obrázek 39 Obecné schéma metabolismu PHA při růstu na tuku

Při provedených experimentech byla pozorována závislost mezi množstvím dostupného kyslíku a obsahem 3HV v akumulovaném polymeru (viz. obrázek 24, 25 5.3.2.1. a tabulka 27 5.3.2.1.). Při vzrůstajícím množství dostupného kyslíku docházelo k vzrůstu obsahu 3HV v PHA.

Lze předpokládat, že vzrůstající množství vzduchu při aeraci bude mít za následek větší množství přítomných reaktivních kyslíkových forem a dalších sloučenin způsobující oxidační stres. Tyto reaktivní formy kyslíku, musí bakterie vhodným způsobem eliminovat. Jednou z možností jejich eliminace je pomocí přirozených enzymových mechanismů – např. pomocí superoxiddismutázy, glutathionperoxidázy a dalších. Např.: glutationperoxidáza tvoří redoxní systém, který je reoxidován (regenerován) za účasti NADPH.

Při stanovení enzymové aktivity NADP-depentní izocitrát dehydrogenázy a jablečného enzymu byla nejvyšší enzymová aktivita při 70% maximální saturace vzduchem, tedy při maximální saturaci vzduchem. Tyto enzymy jsou schopny regenerovat NADPH. Je proto pravděpodobné, že jejich vysoká enzymová aktivita souvisí s produkcí NADPH. NADPH je tedy nepřímo použito na likvidaci pro buňku toxických a stresových látek, jejichž množství vzrůstá s množstvím dostupného kyslíku.



Obrázek 40 Schéma kompletního katabolického odbourání propionyl-CoA

Při limitaci kyslíkem bakterie *C. necator* H16 v Erlenmayerových baňkách bylo zaznamenáno nejvyšší množství biomasy při kultivaci s nejvyšším množstvím dostupného kyslíku (viz. obrázek 22 5.3.2.1.). Růst bakteriální biomasy je anabolický proces, který vyžaduje redukční sílu ve formě NADPH. Vysoká enzymová aktivita enzymů (NADP-depentní izocitrát dehydrogenáza a jablečný enzym) může být proto následek intenzivního metabolismu a vysoké potřeby NADPH pro biosyntetické procesy tvorby biomasy, protože tyto enzymy jsou schopny NADPH regenerovat.

Dále byla zaznamenána stoupající enzymová aktivita 2-methylcitrát syntázy při stoupající saturaci fermentoru vzduchem. MCC umožňuje i) úplné katabolické odbourání propionyl-CoA na oxid uhličitý bez tvorby NADPH a to dále pomocí citrátového cyklu (obrázek 40) nebo ii) umožňuje katabolické odbourání propionyl-CoA a současnou tvorbu NADPH pomocí glyoxalátového cyklu. Stoupající enzymová aktivita 2-methylcitrát syntázy při stoupající saturaci fermentoru vzduchem byla pravděpodobně způsobena opět intenzivním nárůstem biomasy a tím i vysokou potřebou energie a NADPH na její růst. NADPH je v tomto případě generováno pomocí jablečného enzymu z malátu. Malát vzniká v glyoxalátovým cyklu koncenzací acetyl-CoA s glyoxalátem. Obě molekuly acetyl-CoA nebo glyoxalát mohou pocházet z propionátu sodného.

Dále byla zaznamenána nejvyšší specifická enzymová aktivita malát dehydrogenázy u 70% saturace fermentoru. Malát dehydrogenáza je enzym citrátového cyklu, který katalyzuje oxidaci malátu a oxalacetát. Z naměřených hodnot lze usuzovat, že při vzrůstající saturaci fermentoru vzduchem docházelo k vzrůstu intenzity citrátového cyklu, protože je k dispozici větší množství kyslíku na reoxidaci redukovaných kofaktorů v elektron-transportním řetězci. Naopak při nižší koncentraci kyslíku bude pravděpodobně vzrůstat poměr NADH/NAD, čímž dojde k částečné inhibici citrátového cyklu a mimo jiné se tím posílí tok acetyl-CoA do PHA syntetické dráhy.

Dále byl zaznamenán vzrůstající obsah 3HV v akumulovaném PHA při stoupající saturaci fermentoru vzduchem (viz.: obrázek 24, 25 5.3.2.1. a 5.3.2.2. tabulka 27). Vzhledem ke vzrůstající aktivitě 2-methylcitrátového cyklu a citrátového cyklu pravděpodobně dochází k poklesu dostupného propionyl-CoA k biosyntéze P(3HB-co-3HV). Mělo by tedy docházet

k poklesu obsahu 3HV v PHA, byl však pozorován zcela opačný efekt ve složení akumulovaného polymeru.

Vzrůstající obsah 3HV v PHA při stoupající saturaci kyslíkem, může být vysvětlen následujícím způsobem. Jak je uvedeno v kapitole o biosyntéze P3HB a P(3HB-co-3HV) (viz. 3.2.3.1. a 3.2.3.2.), kondenzaci dvou molekul acetyl-CoA za vzniku acetetoacetyl-CoA katalyzuje 3-ketothioláza kódována *phaA* genem a kondenzaci propionyl-CoA s acetyl-CoA za vzniku 3-ketovaleryl-CoA katalyzuje 3-ketothioláza kódována *btkB* genem. Jedná se o dva různé enzymy přítomné v buněčném cytosolu. Oba dva enzymy produkují příslušné 3-ketoacyl-CoA, které jsou inkorporovány do PHA za vzniku náhodného kopolymeru. Méně specifická 3-ketothioláza *btkB* se **nenachází** na stejném operonu spolu s *phaA* 3-ketothiolázou. Proto mohou být tyto dva enzymy exprimovány různou intenzitou resp. již exprimované enzymy mohou být rozdílným způsobem regulovány a budou tak mít různou enzymovou aktivitu. Při změně kultivačních podmínek (např.: změna saturace fermentoru kyslíkem) může docházet výraznějšímu vzrůstu enzymové aktivity u *btkB* než u *phaA*. Z toho důvodu by akumulovaný polymer obsahoval větší množství frakce 3HV na úkor 3HB. A při překročení určité minimální koncentraci propionátu v médiu, **nebude** obsah 3HV v PHA závislý na intenzitě citrátového cyklu nebo MCC, ale pouze záviset na aktivitě *btkB* a *phaA* 3-ketothioláz. U bakterie *C. necator* nalezeno celkem 13 genů kódující různé 3-ketothiolázy. [38, 49, 50].

Pro další objasnění různých vlivů na inkorporaci 3HV do PHA, bude pravděpodobně třeba vyhodnotit vliv různých faktorů na specifickou aktivitu *bktB* a *phaA* 3-ketothioláz za stejných podmínek v řadě experimentů se vzrůstající koncentrací rozpuštěného kyslíku (viz. 4.2.5.2.).

Pro kompletní porozumění utilizace, inkorporace a využití propionátu sodného bude třeba vyhodnotit vliv koncentrace propionátu v médiu na inkorporaci 3HV do PHA a dále vyhodnotit současné působení vlivu koncentrace rozpuštěného kyslíku a propionátu sodného. S ohledem na částečnou toxicitu a inhibiční efekt propionátu na bakteriální kulturu.

6. ZÁVĚR

- Cílem této diplomové práce bylo posouzení aerace na proces biotechnologické produkce PHA s využitím odpadních olejů jako substrátů. Zároveň byla posouzena vhodnost různých odpadních/levných olejů pro tento biotechnologický proces.
- Vybrané odpadní oleje byly popsány pomocí základních charakteristik, jako je peroxidové číslo, číslo zmýdelnění, číslo kyselosti, jodové číslo a obsah glycerolu. Zároveň byly tyto oleje použity jako substrát pro biotechnologickou produkci PHA s využitím bakteriální kultury C. necator H16. Ze všech studovaných parametrů se jako nejdůležitější jeví číslo kyselosti. Oleje s vyšší hodnotou tohoto parametru podporovaly růst kultury a produkci PHA. U ostatních parametrů nebyl pozorován významný vliv na proces produkce PHA.
- Aerace je jedním z klíčových parametrů všech aerobních biotechnologických procesů. Proto ji byla v rámci této diplomové práce věnována náležitá pozornost. Byla provedena sada experimentů při kterých byla regulována saturace kyslíku v laboratorním fermentoru na konstantní hodnotě. Z provedených experimentů byly učiněny následující závěry: (i) intenzivnější aerace vede u použité bakteriální kultury k většímu nárůstu biomasy, (ii) při větším množství dostupného vzduchu bylo akumulováno měnší množství PHA v biomase, (iii) při intenzivnější aeraci docházelo k akumulaci většího množství 3HV monomeru v akumulovaném polymeru.
- Na základě těchto experimentů byl navržen aerační program. Prvních 22. hodin kultivace byla saturace fermentoru vzduchem udržována na hodnotě 30% - pro podpoření nárůstu biomasy, po 22. hodinách byla saturace fermentoru vzduchem snížena na 10% - pro podpoření akumulace PHA. Prekurzor propionát sodný byl přítomen již v minerálním inokulu. Aplikace tohoto aeračního programu navýšila produktivitu systému o cca 46%, přičemž obsah PHA v biomase dosáhl enormně vysoké hodnoty 95%. To může mít výrazně pozitivní dopad také na ekonomickou bilanci down-stream procesu.
- Obecně platí, že zefektivnění procesu bioprodukce PHA může být dosaženo buď (i) zvýšením koncentrace biomasy (tj. vzrůst výtěžnostního koeficientu $Y_{X/S}$) nebo (ii) zvýšením množství PHA akumulovaného v biomase (tj. vzrůst výtěžnostního koeficientu $Y_{PHA/S}$). Ideální předpoklad pro zefektivnění průmyslové produkce je kombinace obou možností – tj. vyšší nárůst biomasy s větším množstvím akumulovaného polymeru, s ohledem na ekonomické a energetické náklady spojené s výrobou. Ale vysoké výtěžnostní koeficienty nutně nemusejí znamenat zefektivnění výrobního procesu. Protože např. vysoký nárůst biomasy zahrnuje nutnost intenzivní aerace systému a intenzivní míchání. To jsou energeticky a tudíž i finančně velmi náročné operace. Je proto třeba uvážit i následné operace biotechnologického procesu a nikoli pouze materiálovou bilanci. Dalším klíčovým faktorem, který ovlivňuje konkurence schopnost většiny biotechnologických výrob, včetně produkce PHA, je izolační proces. Možnost regenerace nebo omezení používání chemikálií a rozpouštědel nebo regenerace tepla při izolačním procesu může mít větší vliv na ekonomickou bilanci než zvýšení výtěžnostních koeficientů.
- Při provedených experimentech byl zaznamenám trend vzrůstajícího obsahu 3HV v PHA při vzrůstajícím obsahu rozpuštěného kyslíku. Tento trend byl pozorován jak

při kultivaci v Erlenmayerových baňkách na temperované třepačce tak i v laboratorním fermentoru a pravděpodobně souvisí s adaptací bakteriální kultury k oxidačnímu stresu v přítomnosti vyšší koncentrace kyslíku ve fermentačním médiu. Vzhledem k tomu, že inkorporace 3HV do struktury materiálu má výrazně pozitivní dopad na mechanické vlastnosti polymeru, je nutno tuto skutečnost také brát v potaz při návrhu aeračního programu.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

PHA	polyhydroxyalkanoát
P3HB	poly(3-hydroxybutyrát)
P3HV	poly(3-hydroxyvalerát)
P(3HB-co-3HV)	náhodný kopolymer 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu
PP	polypropylen
MCC	2-methylcitrátový cyklus

8. PŘÍLOHA

8.1. Složení hlavních mastných kyselin vybraných tuků a olejů

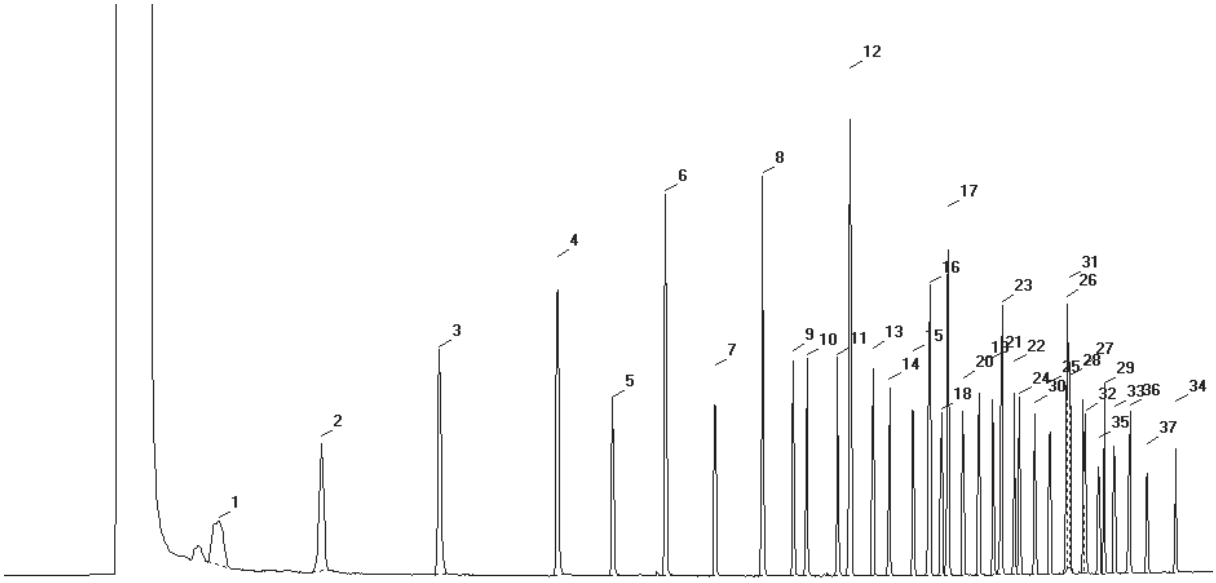
Tabulka 39 Složení hlavních mastných kyselin, uvedeno v procentech [36]

Mastná kyselina	Řepkový olej tradiční	Řepkový olej bezerukový	Slunečnicový olej
laurová	0,1	0,1	0,0 - 0,1
myristová	0,2	0,0 - 0,2	0,0 - 0,2
palmitova	1,5 - 6	3,3 - 6,0	5,0 - 8,0
palmitoolejová	0 - 3	0,1 - 0,6	pod 0,5
stearová	0,5 - 3,1	1,1 - 2,5	2,5 - 7,5
olejová	8 - 60	52,0 - 66,9	13 - 40
linolová	11 - 23	16,1 - 24,8	40 - 74
linolenová	5 - 13	6,4 - 14,1	pod 0,3
arachová	0 - 3	0,2 - 0,8	pod 0,5
eikosaenová	3 - 15	0,1 - 3,4	pod 0,5
eikosadienová	0 - 1	0,0 - 0,1	-
behenová	0 - 2	0,1 - 0,5	0,5 - 1,0
dokosenová	5 - 60	0,0 - 2,0	0,0 - 0,2
dokosadienová	0 - 2	0,0 - 0,1	-
lignocerová	0 - 2	0,0 - 0,2	0,2 - 0,3
tetrakosenová	0 - 3	0,1 - 0,4	-

Tabulka 40 Složení hlavních mastných kyselin, uvedeno v procentech [36]

Mastná kyselina	Vepřové sádlo	Palmový olej	Palmojádrový tuk
laurová	stopy	0 - 0,4	41 - 55
myristová	0,5 - 2,5	0,5 - 2,0	14 - 18
palmitova	20 - 32	40 - 47	6,5 - 10
palmitoolejová	1,7 - 5,0	0 - 0,6	-
stearová	5 - 24	3,5 - 6,0	1,3 - 3,0
olejová	35 - 62	36 - 44	12 - 19
linolová	3 - 16	6,5 - 12	1,0 - 3,5
linolenová	pod 1,5	0,0 - 0,5	0,0 - 0,7
arachová	pod 1,0	0,0 - 1,0	0,0 - 0,3
eikosaenová	pod 1,0	0,1	0,0 - 0,5

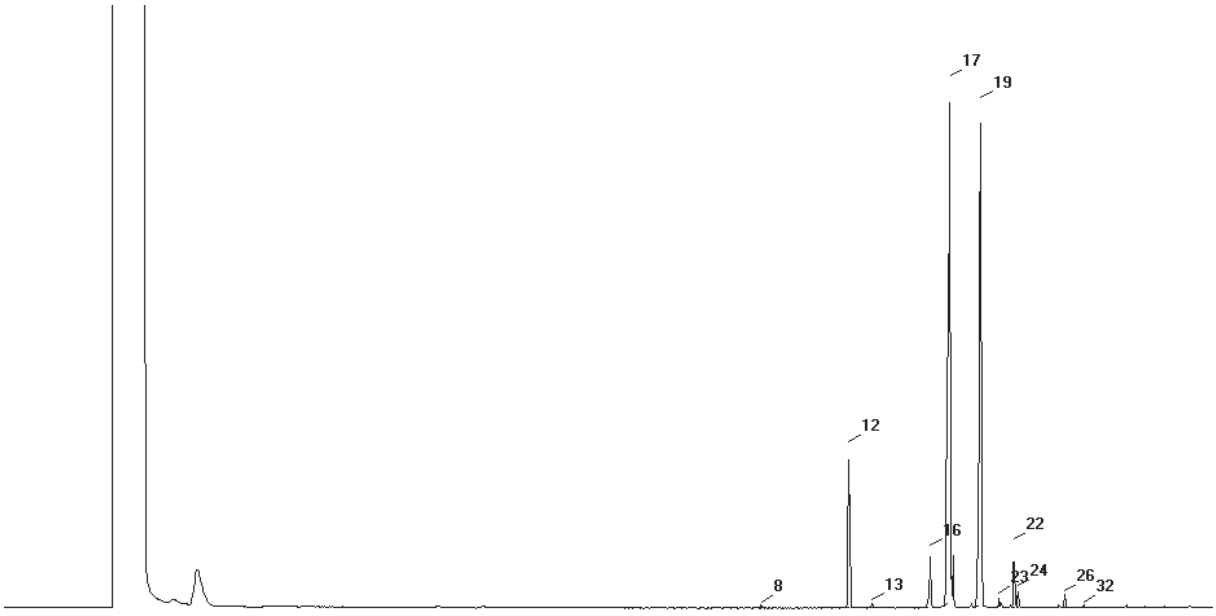
8.2. Kalibrace a analýza složení zastoupení mastných kyselin



Obrázek 41 Chromatogram standardů mastných kyselin

Tabulka 41 Číselný seznam standardů mastných kyselin

číslo	mastná kyselina	číslo	mastná kyselina
1	máselná kys. (C4:0)	20	linolelaidová kys. (C18:2n6t)
2	kapronová kys. (C6:0)	21	γ-linolenová kys. (C18:3n6)
3	kaprylová kys. (C8:0)	22	α-linolenová kys. (C18:3n3)
4	kaprinová kys. (C10:0)	23	arachová kys. (C20:0)
5	undekanová kys. (C11:0)	24	cis-11-eikosenová kys. (20:1)
6	laurová kys. (C12:0)	25	cis-11,14-eikosadienová kys. (C20:2)
7	tridekanová kys. (C13:0)	26	cis-8,11,14-eikosatrienová kys. (C20:3n6)
8	myristová kys. (C14:0)	27	cis-11,14,17-eikosatrienová kys. (C20:3n3)
9	myristolejová kys. (C14:1)	28	arachidonová kys. (C20:4n6)
10	pentadekanová kys. (C15:0)	29	cis-5,8,11,14,17-eikosapentaenová kys. (C20:5n3)
11	cis-10-pentadecenová kys. (C15:1)	30	heneikosanová kys. (C21:0)
12	palmitová kys. (C16:0)	31	behenová kys. (C22:0)
13	palmitolejová kys. (C16:1)	32	eruková kys. (C22:1n9)
14	heptadekanoá kys. (17:0)	33	cis-13,16-dokosadienová kys. (C22:2)
15	cis-10-heptadecenová kys. (C17:1)	34	cis-4,7,10,13,16,19-dokosahexaenová kys. (C22:6n3)
16	stearová kys. (C18:0)	35	trikosanová kys. (C23:0)
17	olejová kys. (C18:1n9c)	36	lignocerová kys. (C24:0)
18	elaidová kys. (C18:1n9t)	37	nervonová kys. (C24:1n9)
19	linolová kys. (C18:2n6c)		



Obrázek 42 Ukázkový chromatogram vzorku tuku

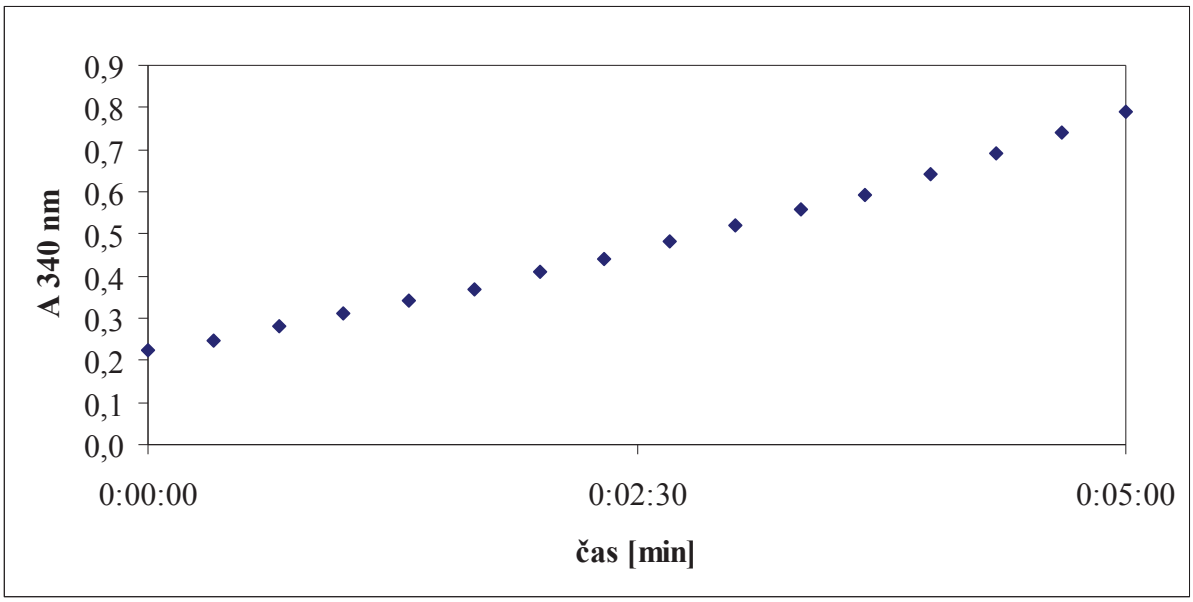
8.3. Změny tuků a olejů při smažení

Během smažení je tuk předehřát na teploty kolem 150-200 °C. Vlastní postup smažení je dvojího typu: i)smažení v tenké vrstvě tuku, ii)smažení ve vrstvě tuku více než 50 mm vysoké, potravina je v tuku ponořena nebo v něm plave – často nazýváno fritování.

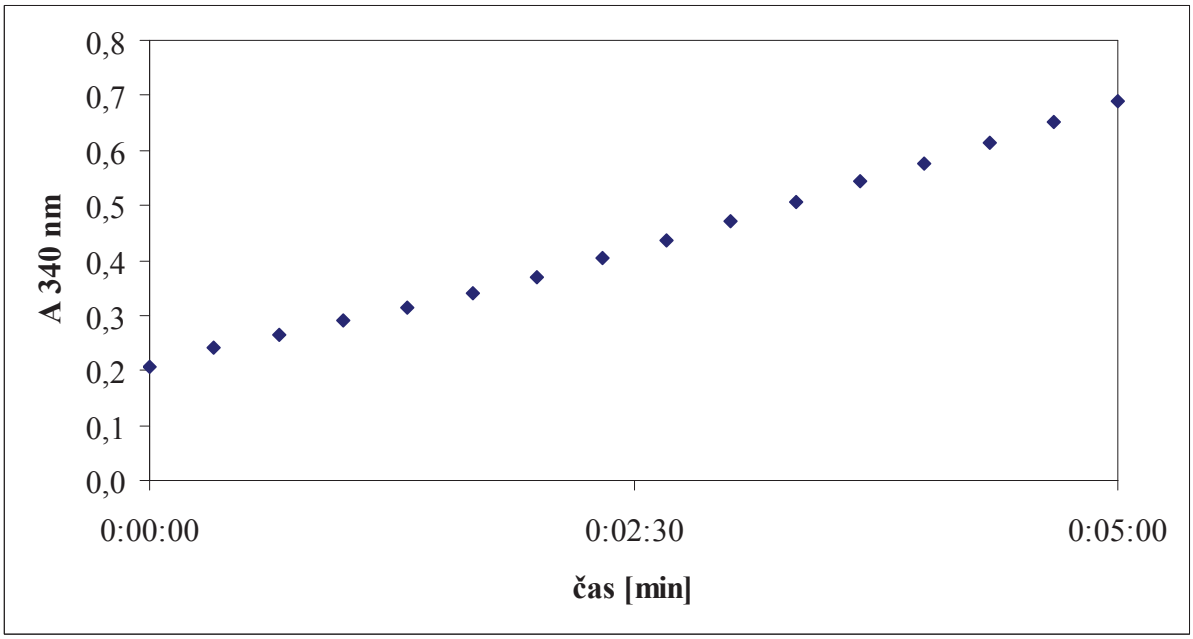
Procesy probíhající v tukové lázni lze rozdělit do několika procesů:

- **hydrolytické procesy**; které nastávají působením horké vodní páry (uvolňované ze smažené potraviny) na horký tuk; tyto procesy představují hlavní procesy probíhající při smažení; hydrolýzou vznikají volné mastné kyseliny, které se z větší části sorbují na smaženou potravinu nebo unikají do ovzduší
- **oxidační procesy**; při teplotách smažení se jedná o velmi rychle procesy; kyslík rozpuštěný v tuku se rychle spotřebovává, takže další oxidace probíhá velmi pomalu a závisí na rychlosti, jakou kyslík difunduje ze vzduchu do oleje
- **polymerační procesy**; jedná se o reakce mezi volnými radikály a interakci volných karboxylových kyselin s hydroxylovými a epoxidovými skupinami oxidovaných mastných kyselin tuku
- **pyrolytické procesy**; např.: dehydratace oxidačních produktů nebo jejich reakce s bílkovinami a jinými složkami smažené potraviny, při nichž vznikají senzoricky výrazně aktivní látky; k pyrolytickým reakcím patří např.: rozklad glycerolu na akrolein

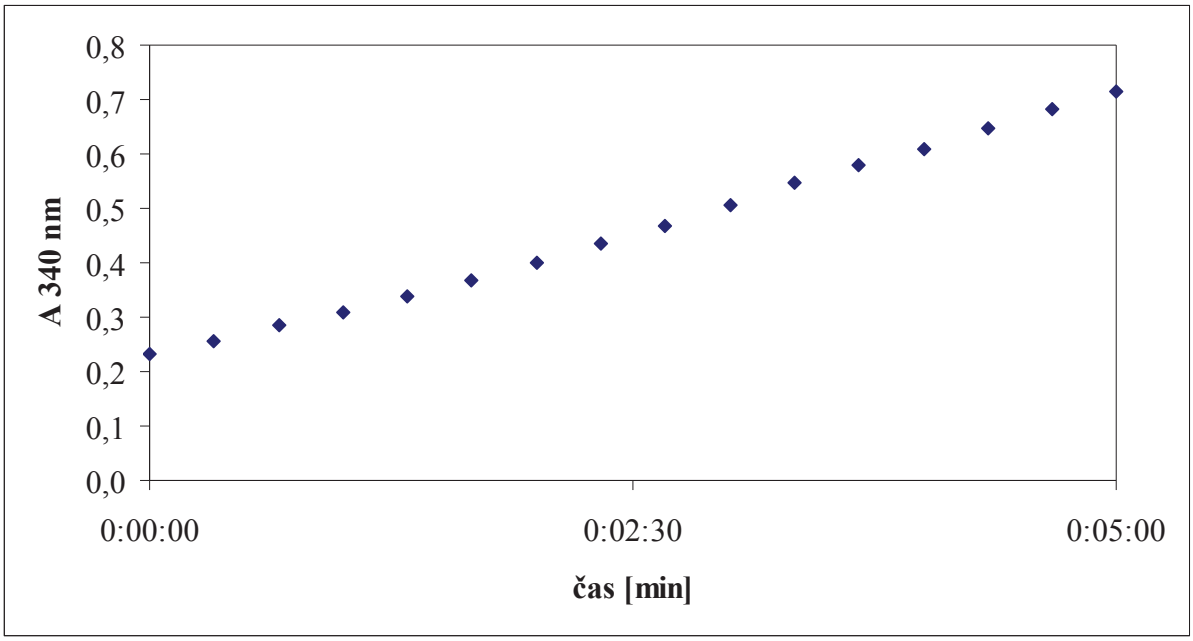
8.4. Grafická příloha ke kapitole 5.4.



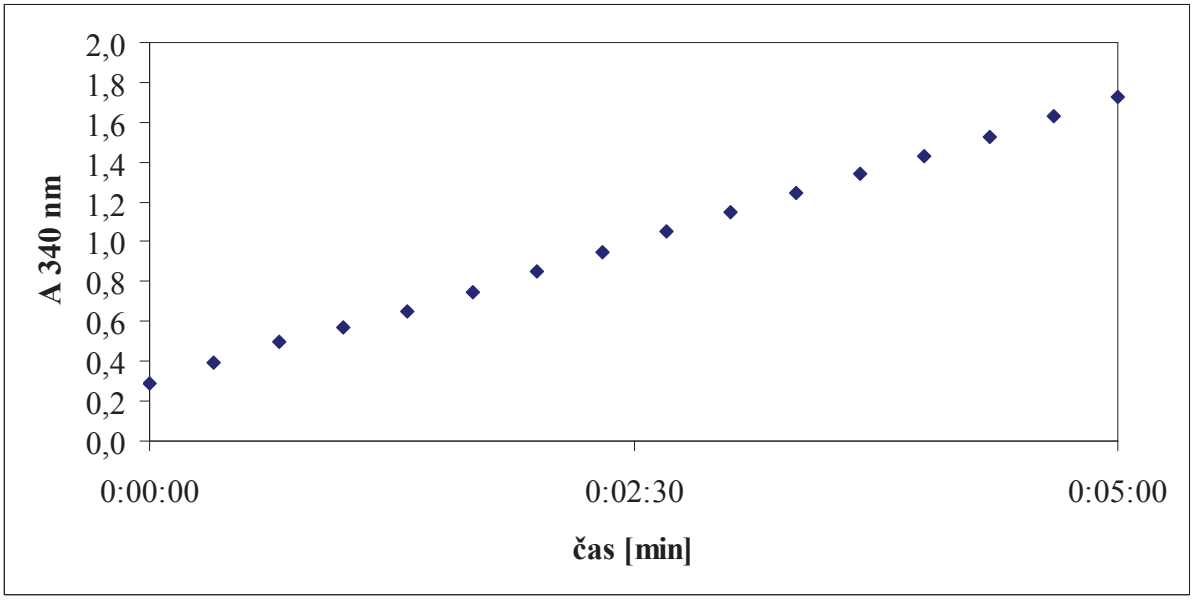
Obrázek 43 Záznam měření aktivity izocitrátdehydrogenázy: 10% saturace vzduchem



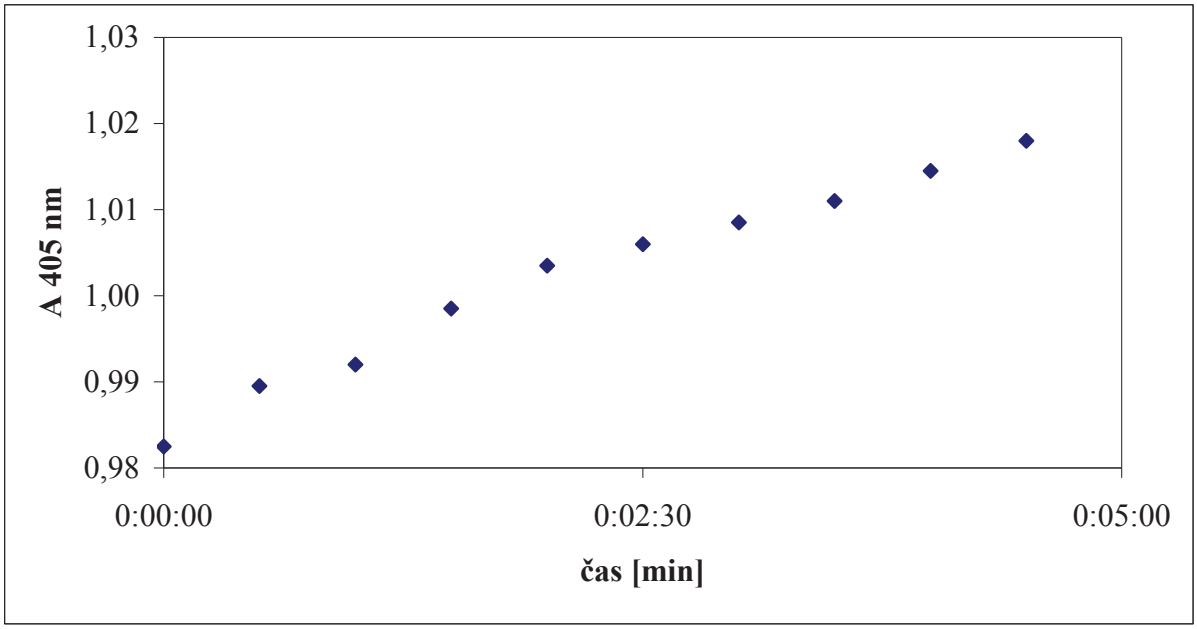
Obrázek 44Záznam měření aktivity izocitrátdehydrogenázy: 30% saturace vzduchem



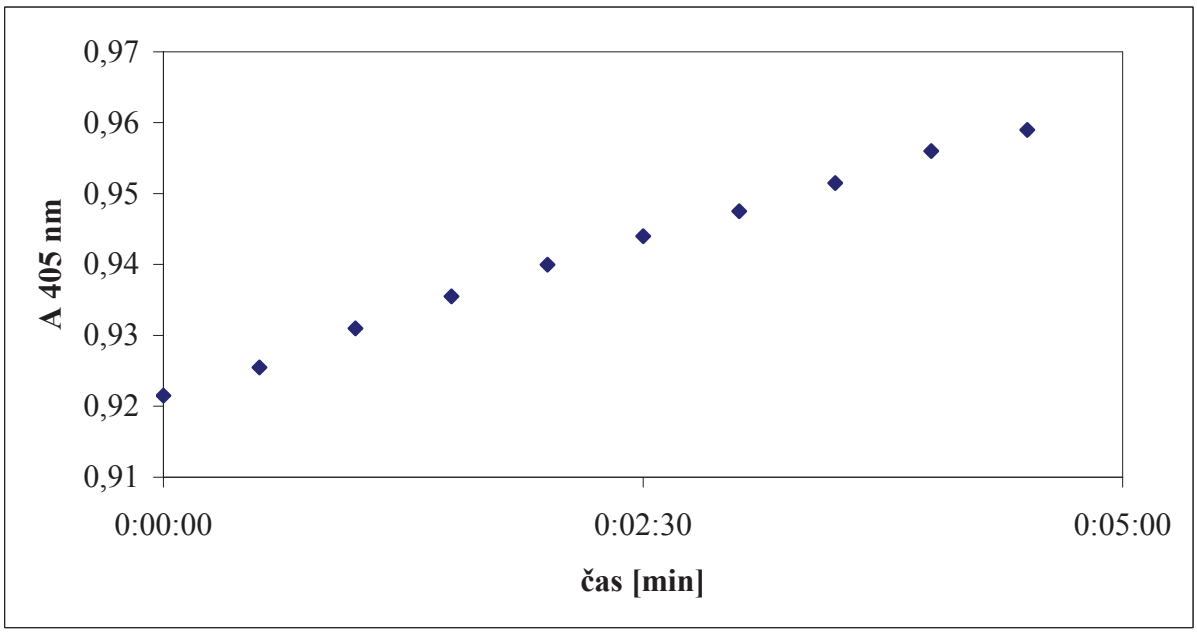
Obrázek 45 Záznam měření aktivity izocitrátdehydrogenázy: 50% saturace vzduchem



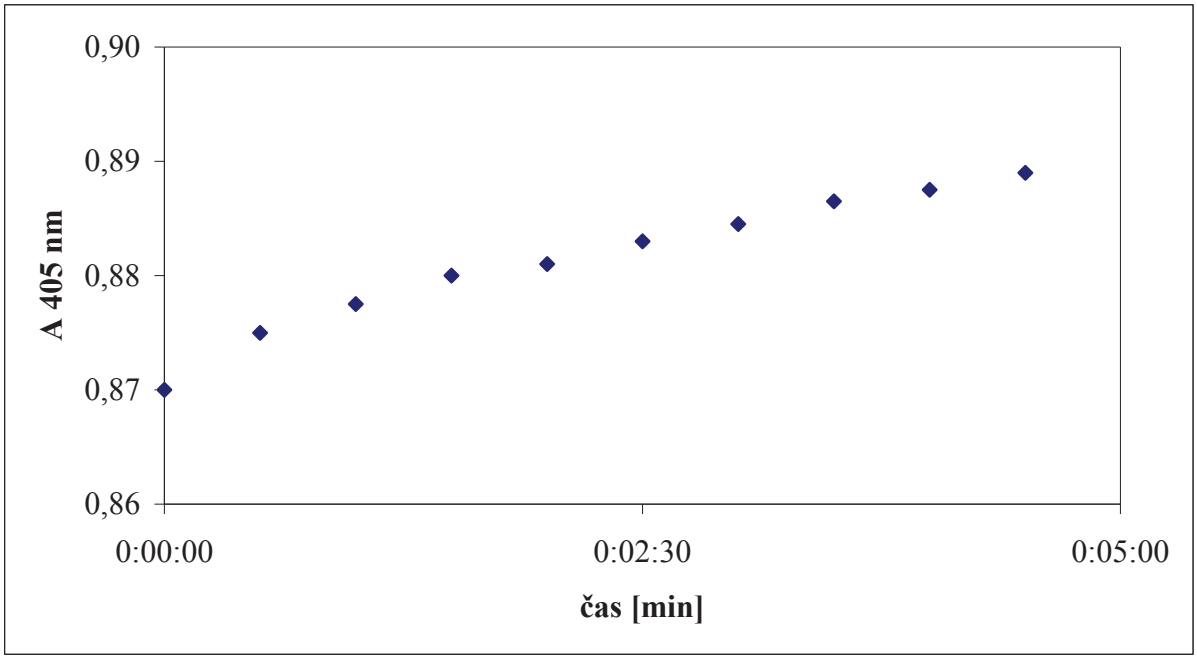
Obrázek 46 Záznam měření aktivity izocitrátdehydrogenázy: 70% saturace vzduchem



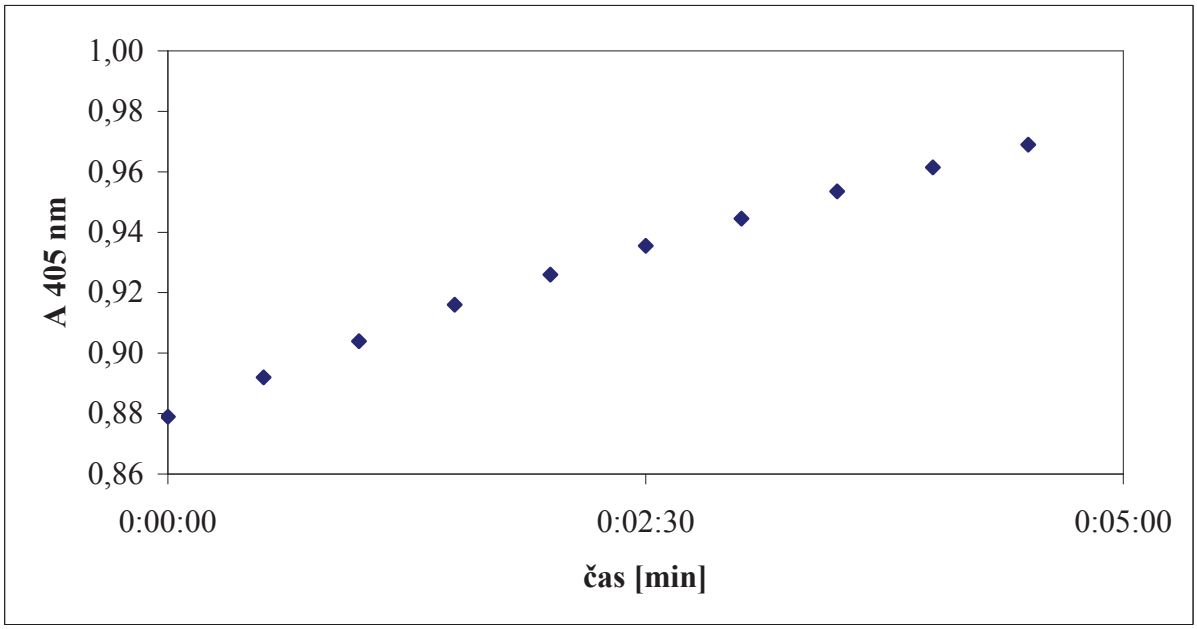
Obrázek 47 Záznam měření aktivity 2-methylcitrátsyntázy: 10% saturace vzduchem



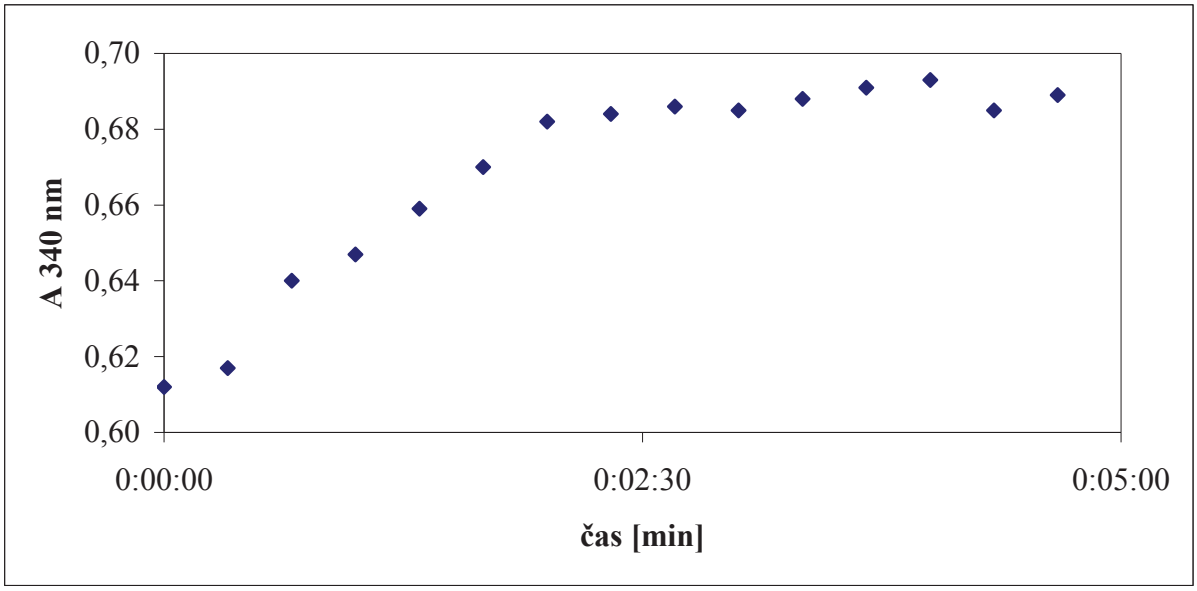
Obrázek 48 Záznam měření aktivity 2-methylcitrátsyntázy: 30% saturace vzduchem



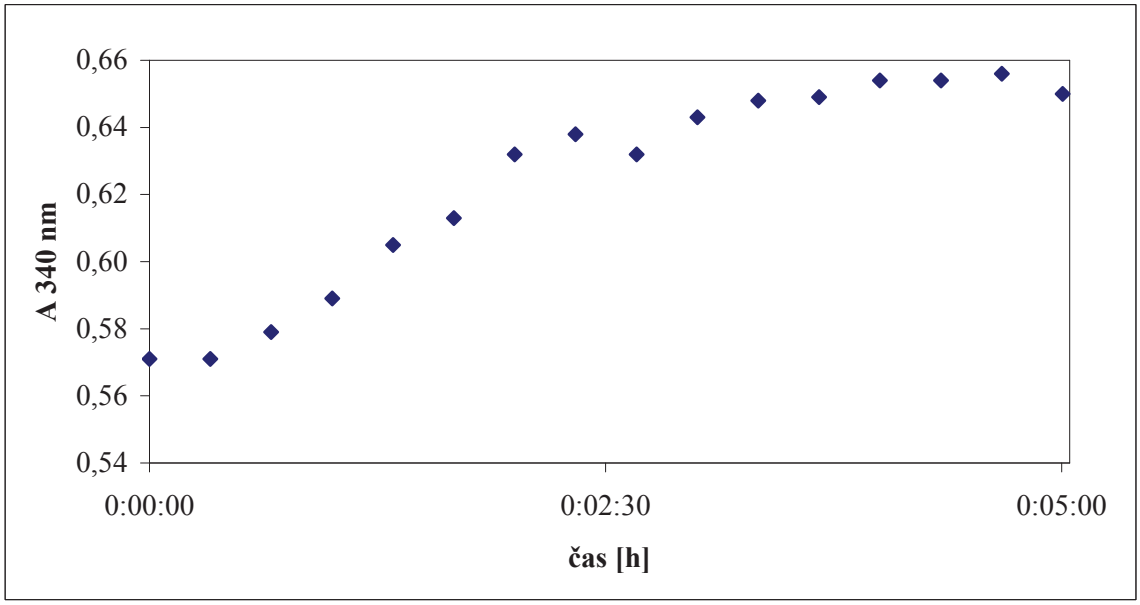
Obrázek 49 Záznam měření aktivity 2-methylcitrátsyntázy: 50% saturace vzduchem



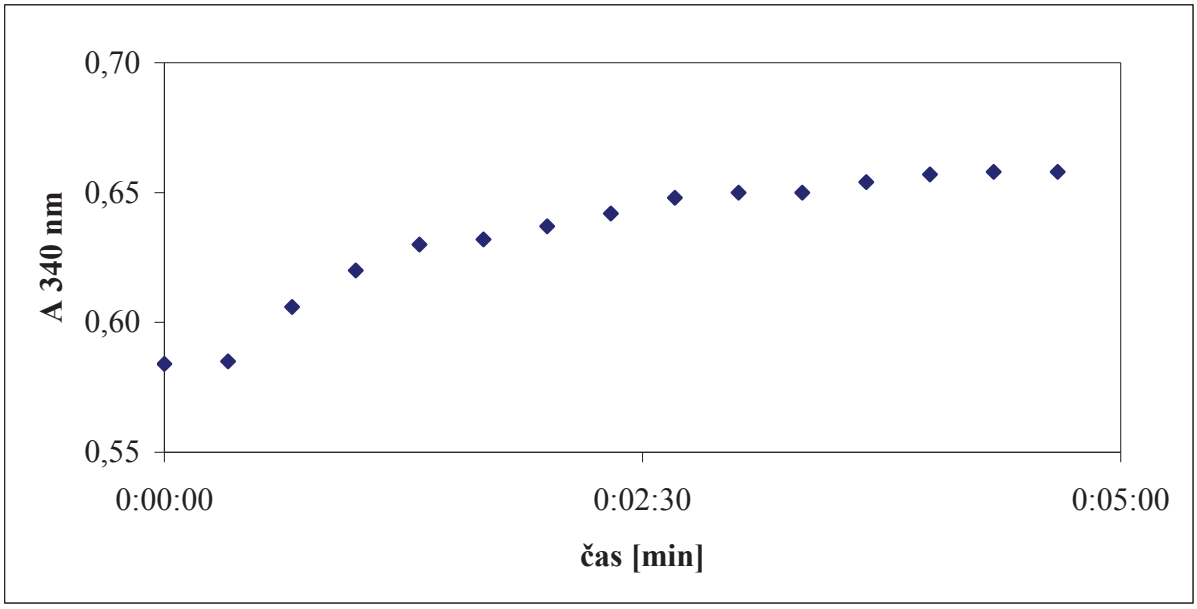
Obrázek 50 Záznam měření aktivity 2-methylcitrátsyntázy: 70% saturace vzduchem



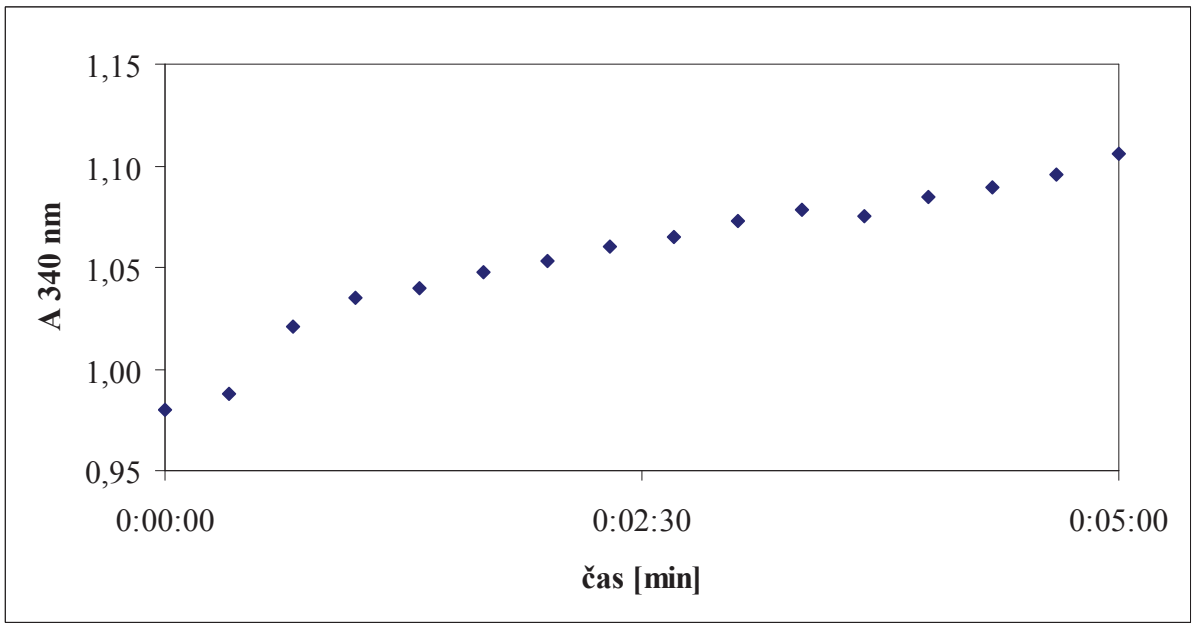
Obrázek 51 Záznam měření aktivity glukóza-6-fosfát dehydogenázy: 10% saturace vzduchem



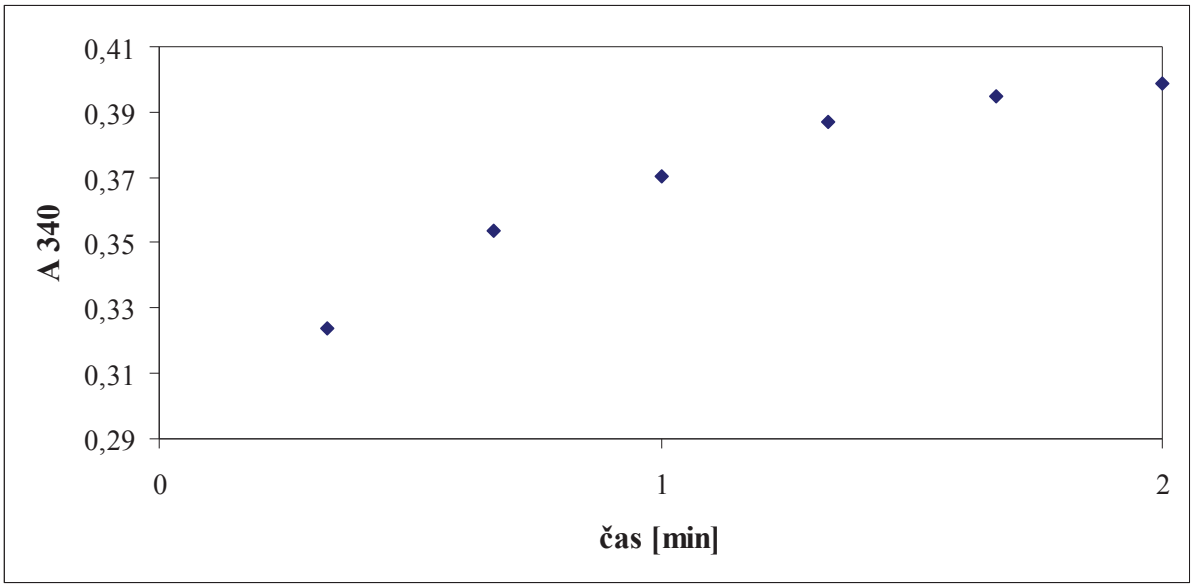
Obrázek 52 Záznam měření aktivity glukóza-6-fosfát dehydogenázy: 30% saturace vzduchem



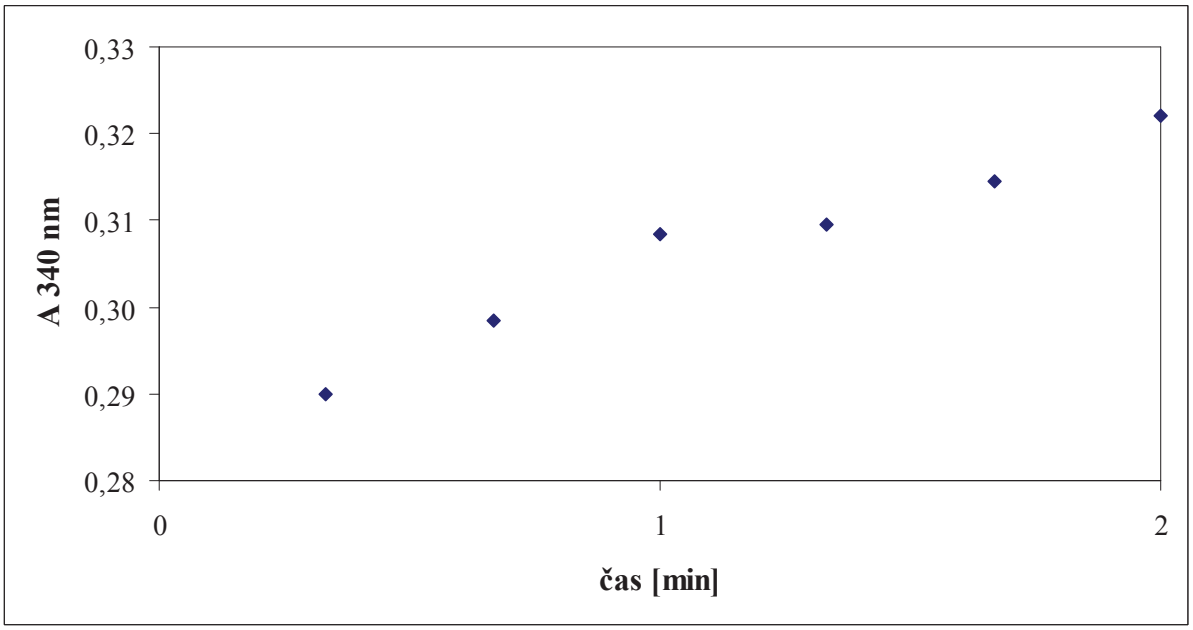
Obrázek 53 Záznam měření aktivity glukóza-6-fosfát dehydogenázy: 50% saturace vzduchem



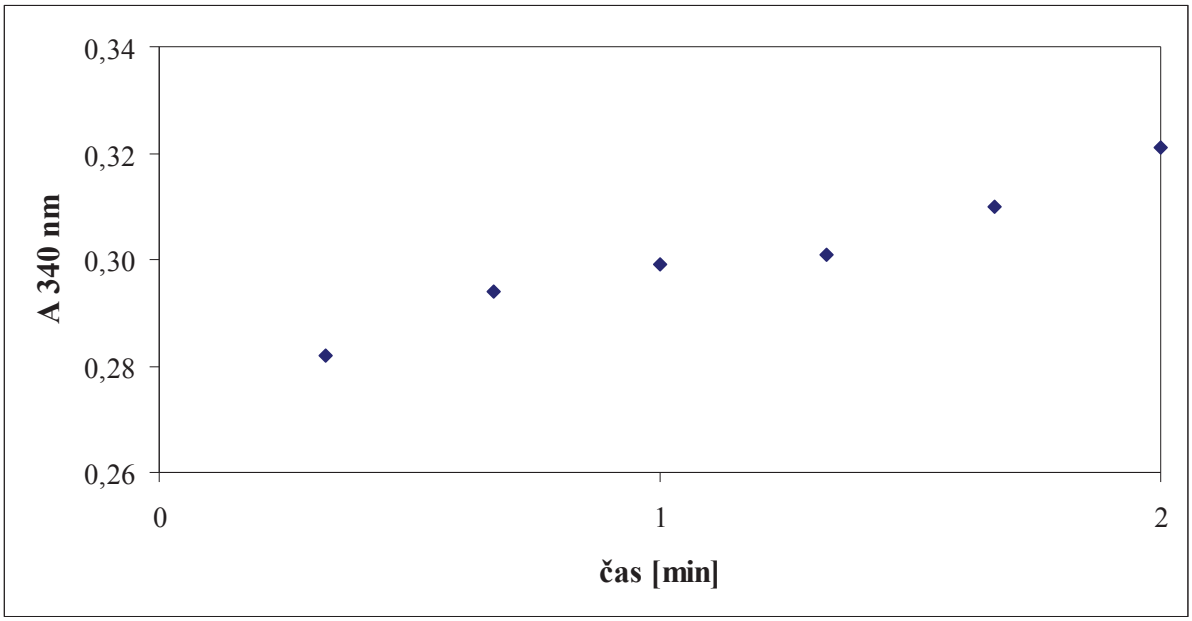
Obrázek 54 Záznam měření aktivity glukóza-6-fosfát dehydogenázy: 70% saturace vzduchem



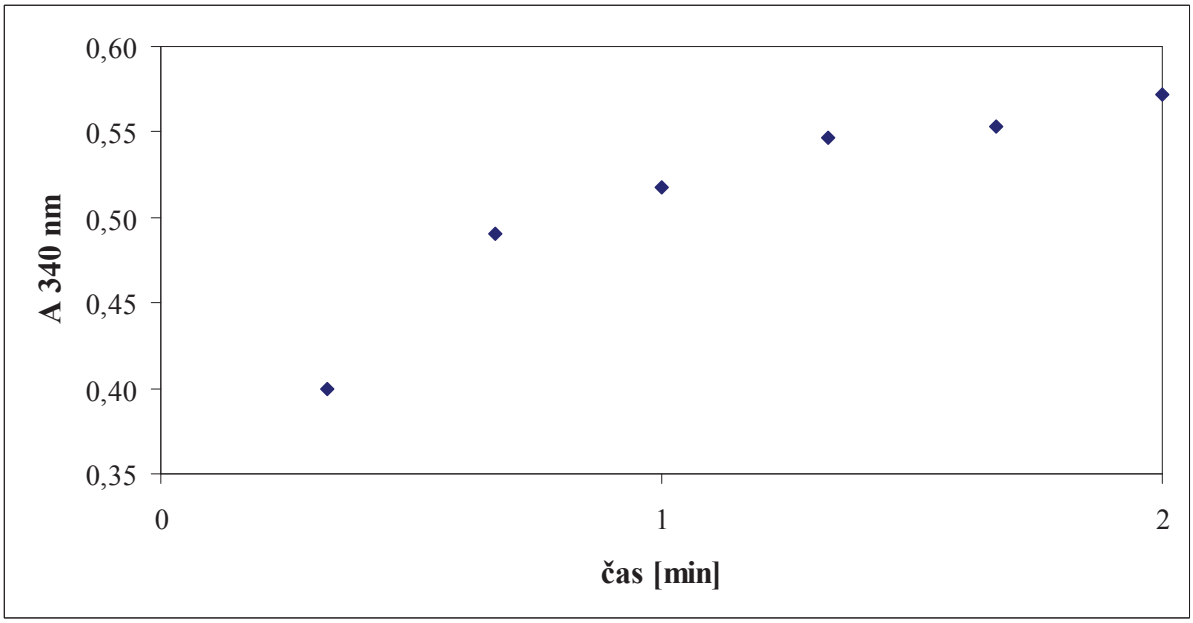
Obrázek 55 Záznam měření aktivity malátdehydrogenázy: 10% saturace vzduchem



Obrázek 56 Záznam měření aktivity malátdehydrogenázy: 30% saturace vzduchem



Obrázek 57 Záznam měření aktivity malátdehydrogenázy: 50% saturace vzduchem



Obrázek 58 Záznam měření aktivity malátdehydrogenázy: 70% saturace vzduchem

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

[1] MICHAEL C. FLICKINGER, [edited by] Michael C.Stephen W. Encyclopedia of bioprocess technology fermentation, biocatalysis, and bioseparation [online]. New York: J. Wiley, 1999 [cit. 2013-03-06]. ISBN 978-159-1244-578.

[2] SOMLEVA, Maria N., Oliver P. PEOPLES a Kristi D. SNELL. PHA Bioplastics, Biochemicals, and Energy from Crops. *Plant Biotechnology Journal*. 2013, roč. 11, č. 2, s. 233-252. ISSN 14677644. DOI: 10.1111/pbi.12039. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1111/pbi.12039

[3] KHANNA, Shilpi a Ashok K. SRIVASTAVA. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*. 2005, roč. 40, č. 2, s. 607-619. ISSN 13595113. DOI: 10.1016/j.procbio.2004.01.053. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959204000949

[4] NOMURA, Christopher T. a Seiichi TAGUCHI. PHA synthase engineering toward superbiocatalysts for custom-made biopolymers. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006-12-18, roč. 73, č. 5, s. 969-979. ISSN 0175-7598. DOI: 10.1007/s00253-006-0566-4. Dostupné z: http://www.springerlink.com/index/10.1007/s00253-006-0566-4

[5] AKARAONYE, Everest, Tajalli KESHAVARZ a Ipsita ROY. Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. *Journal of Chemical Technology*. 2010, roč. 85, č. 6, s. 732-743. ISSN 02682575. DOI: 10.1002/jctb.2392. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.2392

[6] LEE, Eun Yeol a Cha Yong CHOI. Biosynthesis and biotechnological production of degradable polyhydroxyalkanoic acid. *Biotechnol. bioprocess eng.* 1997, č. 2.

[7] GANGURDE, Nilesh S., Riyaz Z. SAYYED, Shashi KIRAN a Arvind GULATI. Development of eco-friendly bioplastic like PHB by distillery effluent microorganisms. *Environmental Science and Pollution Research*. 2013, roč. 20, č. 1, s. 488-497. ISSN 0944-1344. DOI: 10.1007/s11356-012-1021-y. Dostupné z: http://www.springerlink.com/index/10.1007/s11356-012-1021-y

[8] GUMEL, A. M., M. S. M. ANNUAR a Y. CHISTI. Recent Advances in the Production, Recovery and Applications of Polyhydroxyalkanoates. *Journal of Polymers and the Environment*. s. -. ISSN 1566-2543. DOI: 10.1007/s10924-012-0527-1.

[9] STEINBUCHEL, Alexander a Henry VALENTIN. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acid: MiniReview. *FEMS microbiology letters*. 1995. ISSN 0378-1097.

[10] MADISON, Lara a Gjalt HUISMAN. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates) from DNA to plastic. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*. 1999, č. 63. ISSN 1092-2172.

[11] KOLLER, Martin a Anna SALERNO. Modern biotechnological polymer synthesis: Review. *Food technology and biotechnology*. 2010, č. 48. ISSN 1330-9862.

[12] HORI, Katsutoshi, Kazuo SOGA a Yoshiharu DOI. Effects of culture conditions on molecular weights of poly(3-hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas putida* from octanoate. *Biotechnology Letters*. 1994, roč. 16, č. 7, s. 709-714. ISSN 0141-5492. DOI: 10.1007/BF00136476. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/BF00136476

[13] BRAUNEGG, G. a M. KOLLER. Sustainable polymer production. *Polymer-plastics technology and engineering*. 2004, č. 43. ISSN 0360-2559.

[14] JENDROSSEK, Dieter. Peculiarities of PHA granules preparation and PHA depolymerase activity determination. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007-3-29, roč. 74, č. 6, s. 1186-1196. ISSN 0175-7598. DOI: 10.1007/s00253-007-0860-9. Dostupné z: http://www.springerlink.com/index/10.1007/s00253-007-0860-9

[15] PHA Info. *EcoBioMaterial* [online]. 2006 [cit. 2013-03-07]. Dostupné z: http://www.ecobiomaterial.com/pha-info.php

[16] LEE, Sang. Review: bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and bioengineering*. 1997, č. 49.

[17] GRAGE, Katrin, Anika C. JAHNS, Natalie PARLANE, Rajasekaran PALANISAMY, Indira A. RASIAH, Jane A. ATWOOD a Bernd H. A. REHM. Bacterial Polyhydroxyalkanoate Granules: Biogenesis, Structure, and Potential Use as Nano-/Micro-Beads in Biotechnological and Biomedical Applications. *Biomacromolecules*. 2009-04-13, roč. 10, č. 4, s. 660-669. ISSN 1525-7797. DOI: 10.1021/bm801394s. Dostupné z: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm801394s

[18] LEGAT, Andrea, Claudia GRUBER, Klaus ZANGGER, Gerhard WANNER a Helga STAN-LOTTER. Identification of polyhydroxyalkanoates in *Halococcus* and other haloarchaeal species. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, roč. 87, č. 3, s. 1119-1127. ISSN 0175-7598. DOI: 10.1007/s00253-010-2611-6. Dostupné z: http://www.springerlink.com/index/10.1007/s00253-010-2611-6

[19] POTTER, Markus a Alexander STEINBACHEL. Poly(3-hydroxybutyrate) Granule-Associated Proteins: Impacts on Poly(3-hydroxybutyrate) Synthesis and Degradation. *Biomacromolecules*. 2005, roč. 6, č. 2, s. 552-560. ISSN 1525-7797. DOI: 10.1021/bm049401n. Dostupné z: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm049401n

[20] SOLAIMAN, Daniel K. Y. a Richard D. ASHBY. Rapid Genetic Characterization of Poly(hydroxyalkanoate) Synthase and Its Applications . *Biomacromolecules*. 2005, roč. 6, č. 2, s. 532-537. ISSN 1525-7797. DOI: 10.1021/bm0493640. Dostupné z: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm0493640

[21] UCHINO, K., T. SAITO a D. JENDROSSEK. Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) Depolymerase *PhaZa1* Is Involved in Mobilization of Accumulated PHB in *Ralstonia eutropha* H16. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008-02-11, roč. 74, č. 4, s. 1058-1063. ISSN 0099-2240. DOI: 10.1128/AEM.02342-07. Dostupné z: http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.02342-07

[22] CHEN, H.-J., S.-C. PAN a G.-C. SHAW. Identification and Characterization of a Novel Intracellular Poly(3-Hydroxybutyrate) Depolymerase from *Bacillus megaterium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009-08-04, roč. 75, č. 16, s. 5290-5299. ISSN 0099-2240. DOI: 10.1128/AEM.00621-09. Dostupné z: http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.00621-09

[23] SUDESH, Kumar, Zhihua GAN, Akira MAEHARA a Yoshiharu. Surface structure, morphology and stability of polyhydroxyalkanoate inclusion characterised by atomic force microscopy. *Polymer degradation and stability*. 2002, č. 77.

[24] POIRIER, Yves. Polyhydroxyalkanoate synthesis in planst as a tool for biotechnology and basic studies of lipid metabolism. *Progress in lipid research*. 2002, č. 41.

[25] HOFFMANN, Nils a Bernd H.A REHM. Regulation of polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*. 2004, roč. 237, č. 1, s. 1-7. ISSN 03781097. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2004.tb09671.x. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09671.x

[26] BRAMER, Christian a Alexander STEINBUCHEL. The methylcitric acid pathway in *Ralstonia eutropha*: new genes identified involved in propionate metabolism. *Microbiology*. 2001, č. 147.

[27] LEFEBVRE, Gilles, Magali ROCHER a Gerhart BRAUNEGG. Effect of low dissolved-oxygen concentrations on poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerat) production by *Alcaligenes eutropus*. *APPLIED AND ENVIROMENTAL MICROBIOLOGY*. 1997, č. 63.

[28] STEINBUCHEL, Alexander a Tina LUTKE-EVERSLOH. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*. 2003, roč. 16, č. 2, s. 81-96. ISSN 1369703x. DOI: 10.1016/S1369-703X(03)00036-6. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X03000366

[29] STEINBUCHEL, Alexander a Ursula PIEPER. Production of a copolyester of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvaleric acid from single unrelated carbon sources by a mutant of *Alcaligenes eutrophus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1992, roč. 37, č. 1, s. -. ISSN 0175-7598. DOI: 10.1007/BF00174193. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/BF00174193

[30] GARRITY, Edited by G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2, Pts. A*. 2nd ed., rev. New York: Springer, 2000. ISBN 978-038-7950-402.

[31] KREUTZER, Martin F., Hirokazu KAGE a Markus NETT. Structure and Biosynthetic Assembly of Cupriachelin, a Photoreactive Siderophore from the Bioplastic Producer *Cupriavidus necator* H16. *Journal of the American Chemical Society*. 2012-03-21, roč. 134, č. 11, s. 5415-5422. ISSN 0002-7863. DOI: 10.1021/ja300620z. Dostupné z: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja300620z

[32] UEATRONGCHIT, Techawaree a Yasuhisa ASANO. Highly selective l-threonine 3-dehydrogenase from *Cupriavidus necator* and its use in determination of l-threonine. *Analytical Biochemistry*. 2011, roč. 410, č. 1, s. 44-56. ISSN 00032697. DOI: 10.1016/j.ab.2010.11.003. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269710007165

[33] CRAMM, Rainer. Genomic View of Energy Metabolism in *Ralstonia eutropha* H16. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2009, roč. 16, 1-2, s. 38-52. ISSN 1660-2412. DOI: 10.1159/000142893. Dostupné z: http://www.karger.com/doi/10.1159/000142893

[34] OBRUČA, S.: *Controlled production and degradation of selected biomaterials.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 169 s. Vedoucí dizertační práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.

[35] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potraviná*ř*e a biotechnology*. 1. vyd. Praha: VICTORIA PUBLISHING. ISBN 80-856-0571-6.

[36] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, xxii, 580 s. ISBN 978-80-86659-17-6.

[37] ZUNIGA, C., M. MORALES, S. LE BORGNE a S. REVAH. Production of poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) by *Methylobacterium organophilum* isolated from a methanotrophic consortium in a two-phase partition bioreactor. *Journal of Hazardous Materials*. 2011, roč. 190, 1-3. ISSN 03043894. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2011.04.011.

[38] ŠNAJDAR, O. *Regulovaná produkce polyhydroxyalkanoát*ů *bakterií Ralstonia eutropha s využitím různých typů substrátů.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 67 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.

[39] ABUELHAMD, Ashraf. Genetic engineering of *Schizosaccharomyces pombe* to produce bacterial polyhydroxyalkanoates. *Journal of applied science: JASEM*. 2007, č. 11. ISSN 1119-8362.

[40] EREMKA, L. *Produkce mcl-PHA pomocí vybraných bakterií.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 42 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc..

[41] PRIETO, M. A. From Oil to Bioplastics, a Dream Come True?. *Journal of Bacteriology*. 2006-12-28, roč. 189, č. 2, s. 289-290. ISSN 0021-9193. DOI: 10.1128/JB.01576-06. Dostupné z: http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.01576-06

[42] REZZONICO, Enea. Polymers of 3-hydroxyacids in plants. *Phytochemistry reviews*. 2002, č. 1.

[43] ANDERSON, David J., Annathurai GNANASAMBANDAM, Edwina MILLS, Lars K. NIELSEN a Stevens M. BRUMBLEY. Synthesis of Short-Chain-Length/Medium-Chain Length Polyhydroxyalkanoate (PHA) Copolymers in Peroxisomes of Transgenic Sugarcane Plants. *Tropical Plant Biology*. 2011, roč. 4, 3-4, s. 170-184. ISSN 1935-9756. DOI: 10.1007/s12042-011-9080-7. Dostupné z: http://www.springerlink.com/index/10.1007/s12042-011-9080-7

[44] TILBROOK, Kimberley, Leigh GEBBIE, Peer M. SCHENK, Yves POIRIER a Stevens M. BRUMBLEY. Peroxisomal polyhydroxyalkanoate biosynthesis is a promising strategy for bioplastic production in high biomass crops. *Plant Biotechnology Journal*. 2011, roč. 9, č. 9, s. 958-969. ISSN 14677644. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2011.00600.x. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1467-7652.2011.00600.x

[45] YUNUS, Abdul Masani Mat. Transgenic plants producing polyhydroxyalkanoates: Review. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*. 2008, č. 16.

[46] VALENTIN, Henry, Debra BROYLES a Susan COLBURN. PHA production, from bacteria to plants. *International Journal of Biological macromolecules*. 1999, č. 25.

[47] PRIBELA, Alexander. *Analýza prírodních látok v poživatiách*. Bratislava: Alfa, 1978.

[48] ŠNAJDAR, O. *Controlled biotechnological production of polyhydroxyalkanoates.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 85 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Stanislav Obruča, Ph.D..

[49] Pohlmann, A., Fricke, W.F., Reinecke, F., Kusian, B., Liesegang, H., Cramm, R., Eitinger, T., Ewering, C., Pötter, M., Schwartz, E., Strittmatter, A., Voss, I., Gottschalk, G., Steinbüchel, A., Friedrich, B., Bowien, B.: Genome sequence of the bioplasticproducing "Knallgas" bacterium Ralstonia eutropha H16. *Nature Biotechnology*, 2006, vol. 24, pp. 1257-1262. ISSN 1087-0156.

[50] Slater, S., Houmiel, K.L., Tran, M., Mitsky, T.A., Taylor, N.B., Padgette, S.R., Gruys, K.J.: Multiple beta-ketothiolases mediate poly(beta-hydroxyalkanoate) kopolymer synthesis in Ralstonia eutropha. *Journal of Bakteriology*, 1998, vol. 180, pp. 1979-1987. ISSN 0021-9193