



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

SCREENING BIOTECHNOLOGICKÉHO POTENCIÁLU BAKTERIÁLNÍCH KMENŮ PATŘÍCÍCH K RODU ANEURINIBACILLUS

SCREENING THE BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF BACTERIAL STRAINS BELONGING TO THE GENUS
ANEURINIBACILLUS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Pavla Jiroušková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Iva Buchtíková, Ph.D.

BRNO 2025

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1933/2023 Akademický rok: 2024/25
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Pavla Jiroušková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie bioaktivních látek
Vedoucí práce: **Ing. Iva Buchtíková, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Screening biotechnologického potenciálu bakteriálních kmenů patřících k rodu Aneurinibacillus

Zadání diplomové práce:

- Literární rešerše na téma termofilních bakterií patřících k rodu Aneurinibacillus a jemu příbuzných rodů a jejich biotechnologického využití
- Identifikace klíčových genů zapojených do syntézy PHA pomocí molekulárních technik
- Porovnání produkce polyhydroxyalkanoátů mezi sbírkovými kmeny a přírodními izoláty rodu Aneurinibacillus
- Testování biotechnologického potenciálu jednotlivých bakteriálních kmenů

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2025:

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

Bc. Pavla Jiroušková
studentka

Ing. Iva Buchtíková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 3.2.2025

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá screeningem biotechnologického potenciálu vybraných kmenů termofilní bakterie *Aneurinibacillus*. V teoretické části jsou shrnuty poznatky o polyhydroxyalkanoátech (PHA) a jejich kopolymerech, včetně jejich vlastností a využití. Dále se také zabývá dalšími aspekty, které byly v průběhu této práce studovány, zejména tedy biosurfaktanty a enzymy. Experimentální část je zaměřena na ověření schopnosti produkce PHA na úrovni genotypu, screening produkce kopolymerů PHA za využití specifických prekurzorů (laktonů a diolů), zkoumání produkce biosurfaktantů, a produkci enzymů. Pomocí metody PCR byla na úrovni genotypu ověřena schopnost kmenů bakterie *Aneurinibacillus* akumulovat polyhydroxyalkanoáty a byla u ní také detekována přítomnost genu pro PhaC 4. třídy. Po přidavku γ -butyrolaktonu docházelo ke tvorbě kopolymerů s jednotkami 4HB u všech testovaných kmenů v minerálním i komplexním (Nutrient Broth) médiu. Podobně 1,4-butandiol vedl k syntéze 4HB jednotek u všech kmenů na minerálním médiu, zatímco na komplexním médiu byla jejich přítomnost potvrzena pouze u kmenů DSM 5507 a DSM 4410. Při použití δ -valerolaktonu byly jednotky 5HV detekovány u všech kmenů v obou typech médií, s výjimkou kmene DSM 10155, kde byly zaznamenány pouze při kultivaci v komplexním médiu. V případě 1,5-pentandiolu byly jednotky 5HV opět syntetizovány všemi kmeny na minerálním médiu, zatímco v komplexním médiu pouze kmeny DSM 5507 a DSM 4410. Dále byla posouzena emulgační aktivita daných bakteriálních kmenů, a to pomocí metod stanovení emulgačního indexu a Du-Noüy-Ring, ze kterých vyplynulo, že ačkoliv k tvorbě určitého množství biosurfaktantu dochází, nejedná se o závratná množství, která by tuto bakterii předurčovala jako adepta pro průmyslové využití v této konkrétní oblasti. Jako poslední pak byla zkoumána produkce enzymů, kdy v případě produkce zejména lipáz a amyláz bylo dosaženo zajímavých výsledků, které naznačují potenciál tohoto druhu bakterie v průmyslových aplikacích při výrobě enzymů.

KLÍČOVÁ SLOVA

Polyhydroxyalkanoáty, kopolymery, *Aneurinibacillus*, biosurfaktanty, biotechnologická produkce

ABSTRACT

This thesis focuses on the screening of the biotechnological potential of selected strains of the thermophilic bacterium *Aneurinibacillus*. The theoretical part summarizes the knowledge about polyhydroxyalkanoates (PHAs) and their copolymers, including their properties and applications. It also discusses other aspects that have been studied in the course of this work, namely biosurfactants and enzymes. The experimental part focuses on verifying the ability to produce PHAs at the genotype level, screening the production of PHA copolymers using specific precursors (lactones and diols), investigating the production of biosurfactants and enzyme production. The ability of *Aneurinibacillus* strains to accumulate polyhydroxyalkanoates was verified at genotype level using PCR and the presence of the *phaC* class 4 gene was also detected. Upon addition of γ -butyrolactone, copolymer formation with 4HB units occurred in all tested strains in both mineral and complex (Nutrient Broth) media. Similarly, 1,4-butanediol led to the synthesis of 4HB units in all strains on mineral medium, whereas on complex medium their presence was confirmed only in strains DSM 5507 and DSM 4410. Using δ -valerolactone, 5HV units were detected in all strains in both types of media, except for strain DSM 10155, where they were only detected when cultured in complex medium. In the case of 1,5-pentanediol, 5HV units were again synthesized by all strains on mineral medium, whereas in complex medium only strains DSM 5507 and DSM 4410 were detected. Furthermore, the emulsification activity of the bacterial strains in question was evaluated by measuring the emulsification index and Du-Noüy-Ring methods, which showed that although some amount of biosurfactant is produced, it is not a significant amount that would predispose this bacterium as an adept for industrial use in this particular field. Lastly, enzyme production was investigated and interesting results were obtained for the production of lipases and amylases in particular, indicating the potential of this bacterial species in industrial applications for enzyme production.

KEYWORDS

Polyhydroxyalkanoates, copolymers, *Aneurinibacillus*, biosurfactants, biotechnological production

JIROUŠKOVÁ, Pavla. *Screening biotechnologického potenciálu bakteriálních kmenů patřících k rodu Aneurinibacillus*. Diplomová práce. Iva BUCHTÍKOVÁ (vedoucí práce). Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2024.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala paní doktorce Ing. Ivě Buchtíkové, Ph.D za odborné vedení mé diplomové práce, cenné rady a zejména trpělivost se všemi mými zahraničními vrtochy, ke kterým vždy přistupovala s jí vlastním optimismem. Velký dík patří také paní inženýrce Ing. Veronice Řehákové, pod jejímiž křídly se mi vždy dostalo veškeré potřebné pomoci při měření, odborných rad a nekonečné trpělivosti. V neposlední řadě děkuji také mé rodině a přátelům, kteří se mnou během mého studia museli vydržet, ale nepřestali mě podporovat y también a mi querida novia, que me quiere y me apoya en cada momento, aunque nuestra relación internacional no es siempre la más fácil.

OBSAH

1	Úvod.....	6
2	Teoretická část.....	7
2.1	Polyhydroxyalkanoáty.....	7
2.1.1	Struktura a vlastnosti PHA.....	7
2.1.2	Biosyntéza PHA.....	9
2.1.3	Metabolické dráhy biosyntézy PHA.....	9
2.1.4	Substráty pro syntézu PHA.....	12
2.1.5	Typy PHA syntáz.....	12
2.1.6	PHA kopolymery.....	15
2.1.7	Aplikace a využití PHA.....	20
2.2	Mikroorganismy produkující PHA.....	21
2.2.1	Termofilní bakterie.....	22
2.3	Rod <i>Aneurinibacillus</i>	23
2.4	Biosurfaktanty.....	24
2.4.1	Produkce biosurfaktantů bakteriemi <i>Aneurinibacillus</i>	26
2.5	Bakteriální produkce enzymů.....	27
2.5.1	Produkce enzymů bakteriemi <i>Aneurinibacillus</i>	28
3	Experimentální část.....	29
3.1	Použité chemikálie.....	29
3.2	Použité přístroje.....	29
3.3	Použité mikroorganismy.....	31
3.4	Uchovávání bakterií.....	31
3.5	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	31
3.6	Elektroforéza v agarovém gelu.....	33
3.7	Kultivace bakterií.....	33
3.7.1	Příprava inokula.....	33
3.7.2	Příprava a složení produkčních médií.....	34
3.7.3	Zdroje uhlíku použité pro produkci PHA.....	35
3.7.4	Proces kultivace.....	36
3.8	Stanovení obsahu PHA.....	36
3.8.1	Gravimetrická analýza biomasy.....	36
3.8.2	Plynová chromatografie.....	36
3.9	Screening produkce biosurfaktantů.....	37
3.9.1	Testování emulgační aktivity supernatantů.....	37

3.9.2	Měření povrchového napětí metodou Du-Noüy-Ring	37
3.10	Screening produkce enzymů	38
4	Výsledky a diskuze.....	40
4.1	Ověření schopnosti produkce PHA na úrovni genotypu	40
4.2	Produkce PHA kopolymerů bakteriálními kmeny rodu <i>Aneurinibacillus</i>	42
4.2.1	γ -butyrolakton	43
4.2.2	δ -valerolakton.....	46
4.2.3	1,4-butandiol	48
4.2.4	1,5-pentandiol.....	50
4.2.5	Glukóza	52
4.2.6	Glycerol.....	54
4.2.7	Nutrient Broth médium bez přídavku prekurzorů	56
4.2.8	Porovnání kultivací bakterií na médiích NB a MM s přídavkem různých PHA prekurzorů	57
4.3	Stanovení emulgační aktivity supernatantů.....	58
4.4	Měření povrchového napětí metodou Du-Noüy-Ring	60
4.5	Screening produkce enzymů	62
5	Závěr.....	66
6	Seznam použité literatury	68
7	Seznam použitých zkratk a symbolů	84

1 ÚVOD

Plasty jsou poměrně nové materiály, které nám dělají společnost něco málo přes sto let. První plně syntetický plast byl vyroben na počátku 20. století a laická veřejnost jej zná pod názvem „bakelit“. Ten se ve svých dobách využíval v různých aplikacích od stavebního materiálu až po rádia. Výhody plastů se rychle projeví díky jejich lehkým, pevným, levným, odolným a korozivzdorným vlastnostem a jejich využití se značně rozšířilo [1]. Od „bakelitu“ se plasty posunuly mílovými kroky vpřed a staly se nedílnou součástí našeho života v rozličných formách. S narůstajícími aplikacemi plastů a neustále se zvyšující produkcí plastových materiálů však čím dál víc pocítujeme dopady našeho jednání. A to nejen na životní prostředí, ale i na naše vlastní zdraví, neboť problémem nejsou pouze velké kusy, které si většinou představíme při zmínce o znečištění a akumulaci plastů, ale také postupná kumulace tzv. mikroplastů, které jsou pro nás sice neviditelné, ale o to nebezpečnější, neboť si jejich vlivu mnohdy nejsme vědomi.

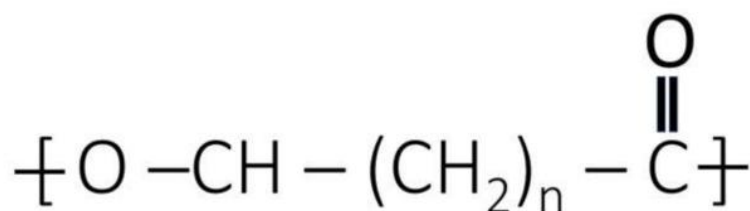
Řešením tohoto rychle narůstajícího problému se zabývá mnoho vědeckých týmů po celém světě, každý sledující některý z různých přístupů. Jednou z možností je výroba tzv. bioplastů, které jsou biologicky odbouratelné a/nebo vyrobené z obnovitelných zdrojů. Ačkoliv plasty zcela nenahradíme, můžeme tímto způsobem omezit jejich nadužívání a tam, kde by to bylo možné, využívat materiály biodegradabilní, které by po zavedení účinných strategií pro nakládání s bioplasty po skončení jejich životnosti byly k našemu životnímu prostředí a zdraví šetrnější [2].

Mezi bioplasty lze zařadit také polyhydroxyalkanoáty (PHA), které dokážou syntetizovat bakterie. Ty je ve formě granulí ukládají ve svých buňkách jako zásoby uhlíku a energie. Ačkoliv se produkce bioplastů jeví jako krok správným směrem, stále se jedná o poměrně nákladný proces, který by jen velice těžce dokázal konkurovat výrobě běžných petrochemických plastů. Proto je předmětem zkoumání optimalizace tohoto výrobního procesu, a to nejen co se procesu samotného týče, ale také kvality produktu. Výzkumné týmy se tak například zabývají využitím rozličných producentů, kteří by mohli být pro produkci vhodní. Jedním ze zajímavých adeptů jsou také termofilní bakterie rodu *Aneurinibacillus*. Výhodou těchto bakterií je jejich optimální teplota růstu, která se pohybuje okolo 50 °C, a při jejich kultivaci se tak oproti jiným producentům snižuje riziko kontaminace nežádoucími mikroorganismy, které by narušovaly klíčové procesy. Dalším důvodem, proč se tento producent jeví jako atraktivní je nejen jeho schopnost využívat rozličné zdroje uhlíku, které jsou přidávány do média během kultivace, ale také zpracovávat prekurzory a zabudovávat díky tomu do struktury výsledného produktu odlišné monomerní jednotky. Po zabudování těchto odlišných molekul tak místo „běžného“ PHA, složeného pouze z monomerních jednotek poly(3-hydroxybutyrátu), může vzniknout mnohem zajímavější kopolymer obsahující i několik různých druhů monomerů. Odlišná skladba polymeru se pak projeví zejména na jeho fyzikálních a chemických vlastnostech. Místo křehkého homopolymeru P(3HB) s vysokou krystalinitou, který je méně vhodný pro širší zpracování a aplikace, tak můžeme získat heteropolymer s vlastnostmi podobnějšími současným plastům.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou biokompatibilní, biodegradabilní polyestery složené z monomerů 3-hydroxyalkanových kyselin spojených esterovou vazbou [3; 4]. Na rozdíl od syntetických polymerů, které jsou vyráběny z fosilních zdrojů, jsou PHA získávány z obnovitelných zdrojů pomocí bakterií [5]. Obecná struktura polyhydroxyalkanoátů je zobrazena na Obrázek 1. PHA se mohou projevovat jako homopolymery, kopolymery nebo heteropolymery v závislosti na jejich monomerním složení [6]. Tyto polymery jsou v mikroorganismech hromaděny jako zásoba energie [3].



Obrázek 1.: Obecná struktura PHA [7].

2.1.1 Struktura a vlastnosti PHA

Mezi PHA lze zařadit mnoho strukturně rozmanitých polyhydroxyalkanoátů o rozličných molekulových hmotnostech, které se pohybují v rozmezí od $5 \cdot 10^4$ do $2 \cdot 10^7$ Da s polymerním řetězcem o obsahu 100-35000 monomerních jednotek. Tyto se díky stereospecifičnosti PHA syntázy vyskytují výhradně s konfigurací *R* (-) [4; 8]. Obecně se dá říct, že vlastnosti PHA jsou velmi podobné vlastnostem konvenčních plastů vyráběných z ropy, jako jsou například polyethylen (PE), polypropylen (PP) nebo polyethylentereftalát (PET) [3; 8]. Jedná se o izotaktické polymery, které jsou nerozpustné ve vodě, jsou odolné vůči hydrolytické degradaci a vyznačují se piezoelektrickými vlastnostmi. Ve vědeckých kruzích patří mezi nejvíce skloňované výhody PHA jejich biokompatibilita, která je příslibem možnosti využití těchto materiálů v rozličných medicínských aplikacích, a biologická rozložitelnost, jež je jejich hlavní výhodou oproti ropným plastům, přičemž výsledné produkty rozkladu závisí na podmínkách, při kterých jsou degradovány. V aerobních podmínkách se rozkládají na vodu a oxid uhličitý, v půdě, odpadních vodách, mořské a jezerní vodě jsou přeměňovány mikroorganismy (za anaerobních podmínek) na metan. Podstatný vliv na rychlost rozkladu mají vnější faktory, jako jsou pH, teplota, vlhkost či mikrobiologická aktivita prostředí [9]. Jako další výhodné vlastnosti PHA je možné jmenovat rozličnost struktur těchto polymerů, či netoxické produkty jejich rozkladu [8; 9]. Mezi další příznivé vlastnosti patří také malá velikost pórů a snadné zpracování. Tyto materiály také prokázaly mnohem lepší odolnost vůči UV degradaci než polypropylen. Polyhydroxyalkanoáty jsou biokompatibilní a neimunogenní, a to díky přírodním metabolitům, které z nich po rozkladu vznikají. Mezi ně patří například 3-hydroxybutyrát či hydroxyacylkoenzym A. Ty také vykazují velmi dobrou bioresolbovatelnost, což umožňuje snadné začlenění těchto metabolitů do biologických systémů [3; 10].

Na druhou stranu mají tyto materiály ve srovnání s konvenčními plasty také řadu nevýhod, mezi ně patří zejména horší tepelné a mechanické vlastnosti, postkrystalizace a široká distribuce molekulové hmotnosti, a tedy i její obtížná přesná kontrola [8]. Jako nežádoucí vlastnost tohoto materiálu se jeví také jeho vysoká hydrofobicita či špatné bariérové vlastnosti pro plyny [10].

Vliv na mechanické vlastnosti PHA má celé množství faktorů a charakteristik daného materiálu. Mezi ty patří zejména monomerní složky, délka řetězce a vzdálenost mezi postranními skupinami a esterovou vazbou [9].

Na základě struktury monomeru (konkrétně počtu uhlíkových atomů obsažených v monomerní jednotce), ze kterých je polymer složen, lze PHA rozdělit do několika skupin [3; 4]:

- PHA s krátkým řetězcem (označovány také zkratkou scl-PHA z anglického Short Chain Length),
- PHA se středně dlouhým řetězcem (se zkratkou mcl-PHA z anglického Medium Chain Length),
- PHA s dlouhým řetězcem (lcl-PHA z Long Chain Length).

První zmíněná skupina je složena z monomerů obsahujících pouze tři až pět uhlíkových atomů. PHA s krátkým řetězcem jsou relativně křehké, vyznačují se vysokou krystalinitou a bodem tání. Výjimku v této skupině polymerů, co se těchto nevhodných vlastností týče, je poly(4-hydroxybutyrát) (P(4HB)) [9]. Obecně jsou však materiály této podskupiny polymerů příliš tuhé a postrádají vhodné mechanické vlastnosti potřebné pro aplikace jako biomedicínské či obalové fólie. Příkladem PHA spadajících do této skupiny může být poly(3-hydroxyvalerát) P(3HV) nebo poly(3-hydroxybutyrát) P(3HB), které jsou produkovány bakterií *Cupriavidus necator* [10].

Jako PHA se středně dlouhým řetězcem se označují ty, které jsou složeny z monomerních jednotek o 6-14 uhlících. Tato skupina se vyznačuje elastomerními vlastnostmi, včetně nízkého bodu tání a nízké krystalinity. Ve srovnání s PHA s krátkým řetězcem mají také nižší hodnotu pevnosti v tahu [9]. Omezení jejich použití však spočívá v jejich nízké mechanické pevnosti. Jako příklad PHA se středně dlouhým řetězcem je možno uvést například poly(3-hydroxyoktanoát) (PHO), který produkuje *Pseudomonas mendocina* [10].

Poslední skupina zahrnuje PHA složené z monomerů s patnácti a více uhlíky. Jako zástupce této skupiny lze uvést poly(3-hydroxypentadekanoát), který produkuje *Pseudomonas aeruginosa* [10].

Fyzikální a chemické vlastnosti polyhydroxyalkanoátů se odvíjejí zejména od délky řetězce polymeru, druhu mikroorganismu, který byl využit pro produkci PHA, a také podmínek nastavených během produkce. V průběhu posledních let byly PHA studovány a navrženy jako materiály pro obaly včetně fólií, krabic, lahví, náterů, vláken a pěnového materiálu [6]. Velmi důležitá charakteristika, kterou PHA nemají společnou s plasty vyráběnými z petrochemických zdrojů, je ta, že neznečišťují a nezatěžují životní prostředí. Dalším velmi významným faktorem, který PHA přidává na atraktivitu jakožto potenciálnímu materiálu, je možnost jeho výroby z obnovitelných zdrojů a bioodpadu [6; 11]. Jedním z důvodů hledání možnosti využití bioodpadu jako zdroje uhlíku pro syntézu PHA je také fakt, že náklady na vhodné substráty mohou tvořit až 45–50 % celkových nákladů a negativně tak ovlivňují ekonomiku tohoto bioproduktu [11]. To je staví do pozice případné budoucí náhrady obtížně

degradabilních materiálů a PHA tak přitahují pozornost mnoha výzkumných týmů. Hlavní omezení PHA jsou náklady na jeho výrobu [3].

2.1.2 Biosyntéza PHA

Produkce PHA je přirozenou schopností některých bakterií. Jedná se o bakterie volně žijící, ale také některé symbiotické či parazitující. Tyto patří do evolučně odlišných taxonomických skupin a najdeme zde zástupce jak gram pozitivních druhů, tak i gram negativních. Jako několik příkladů lze uvést rody *Bacillus* či *Clostridium* spadající pod kmen *Firmicutes* apod. [11]

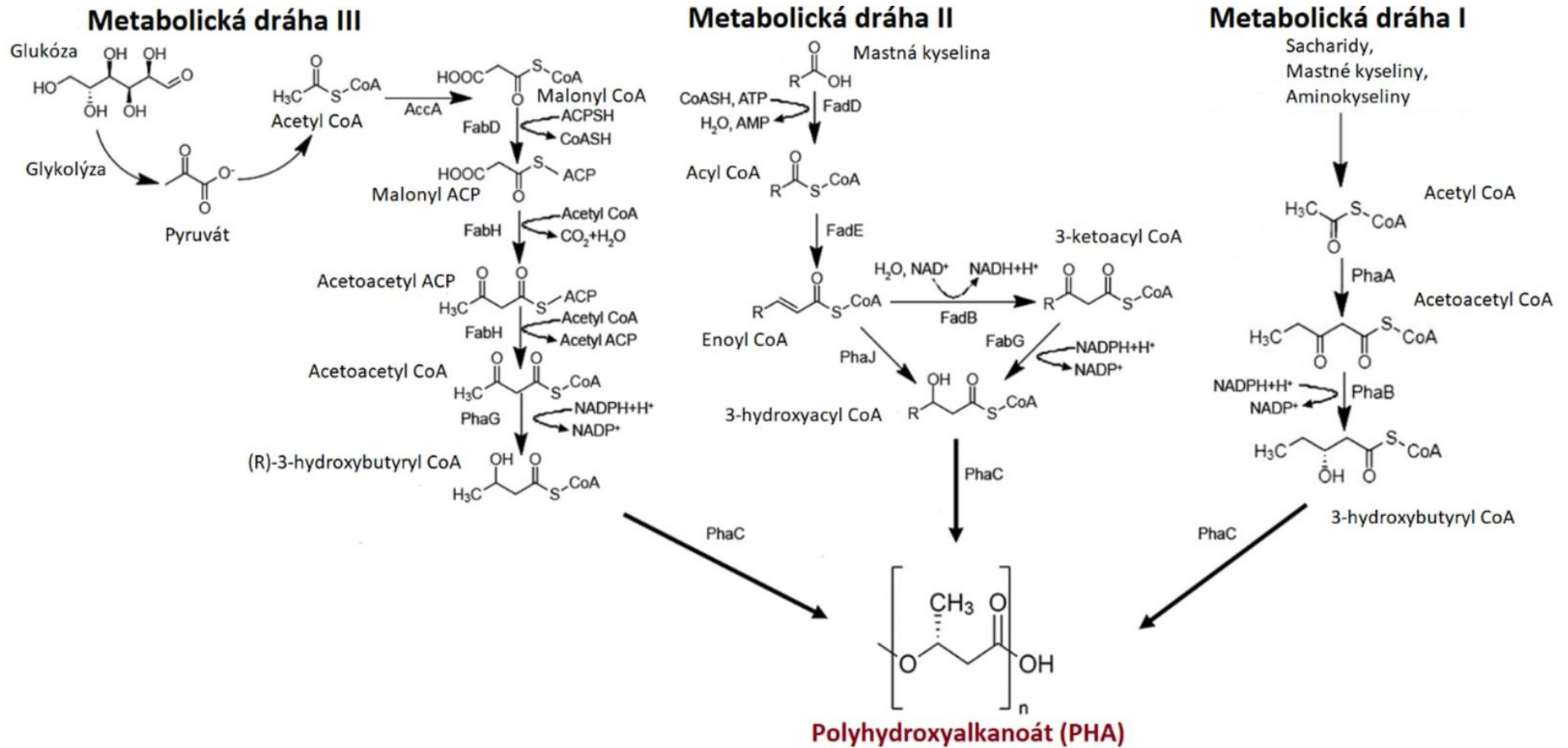
Za normálních podmínek prostředí bakterie získávají energii prostřednictvím cyklu kyseliny trikarboxylové. Ve stresových podmínkách však přecházejí z dráhy produkce energie na dráhu úspory energie. Stresové podmínky, na které některé bakterie reagují, jsou například takové, při kterých je přítomen nadbytek organické hmoty bohaté na uhlík (C), ale naopak se jim nedostává nutričních prvků, mezi které patří dusík, draslík, fosfor, kyslík a hořčík [11].

2.1.3 Metabolické dráhy biosyntézy PHA

V závislosti na typu mikroorganismu, probíhá syntéza PHA aerobně či anaerobně nejčastěji za nepříznivých podmínek růstu. Během produkce je omezen přísun základních růstových živin a zajištěn nadbytek zdroje uhlíku. Složení výsledného PHA je závislé jak na typu bakterií, které dané PHA produkují, tak i na substrátu, a tedy zdroji uhlíku, ze kterého jsou syntetizovány [4]. Konečná struktura vzniklých PHA se odvíjí také od cesty syntézy, která dodává monomery PHA syntéze [12].

Aby bylo možné PHA vyrábět průmyslově, je potřeba znát metabolické dráhy, jakými jsou mikrobiální PHA syntetizovány a zmapovat každý krok. To pomůže při optimalizaci výroby a vývoji nových bakteriálních kmenů, které by byly schopny produkovat větší množství PHA či by byly schopny zpracovávat levnější substráty, a tím by měly příznivý dopad na ekonomiku výroby [13].

Popsány jsou tři hlavní mechanismy syntézy PHA, které jsou katalyzovány různými enzymy (Obrázek 2) [12]. Tyto mechanismy jsou dále spojeny s různými biochemickými drahami, jako jsou glykolýza, citrátový cyklus či metabolické cesty aminokyselin a mastných kyselin. Až doposud bylo identifikováno celkem čtrnáct drah vedoucích k produkci PHA [12; 13].



FadB – enoyl-CoA hydratáza, *FadD* – mastná acyl-CoA syntáza, *FadE* – acyl-CoA dehydrogenáza, *FabG* (*PhaG*) – 3-ketoacyl reduktáza, *FabH* – 3-ketoacyl-ACP syntáza III, *PhaJ* – R-3-hydroxyacyl-CoA hydratáza

Obrázek 2: Schématické znázornění mechanismů syntézy PHA [14]

2.1.3.1 Metabolická dráha I: cesta acetyl-CoA na 3-hydroxybutyryl-CoA

Prvním mechanismem syntézy PHA je produkce monomerů 3-hydroxybutyryl-CoA z molekul acetyl-CoA. Prekurzory tohoto mechanismu, tedy molekuly acetyl-CoA, vstupující do této reakce vznikají z cukrů, mastných kyselin nebo aminokyselin v příslušných metabolických drahách (glykolýza, cyklus trikarboxylových kyselin či β -oxidace mastných kyselin) [13; 15]. Následně jsou tyto monomerní jednotky za pomoci β -ketothiolázy (PhaA) a acetoacetyl-CoA (PhaB) reduktázy přeměněny na 3-hydroxybutyryl-CoA. Poté do hry vstupuje PHA syntáza (PhaC), která katalyzuje polymeraci tohoto monomeru na scl-PHA až dokud nejsou zásoby monomeru vyčerpány. Jako modelový organismus, na kterém je dráha dobře prostudována lze zmínit *Cupriavidus necator* [12; 13].

Za běžných okolností je β -ketothioláza inaktivována koenzymem A, který vzniká za normálního růstu v Krebsově cyklu. Za podmínek, kdy jsou však omezeny ne-uhlíkové živiny, dojde k omezení Krebsova cyklu a není k dispozici volný koenzym A. Ten tedy nemůže inhibovat β -ketothiolázu a dochází k syntéze PHA [13; 15].

Preferovaným zdrojem uhlíku v dráze I je glukóza, která je metabolizována prostřednictvím glykolýzy za vzniku pyruvátu. Za aerobních podmínek se pyruvát přeměňuje na acetyl-CoA, který je využit na syntézu PHA, jak bylo popsáno výše. Pokud je však glukóza zpracovávána za anaerobních podmínek, přeměňuje se vzniklý pyruvát na laktát pomocí enzymu laktátdehydrogenáza. Ten je následně převeden na laktyl-CoA enzymem propionyl-CoA transferáza, který je poté polymerizován PHA syntázou a umožňuje vznik poly(laktid-co-3-hydroxybutyrátu). Jedná se o významný objev v oblasti zkoumání mechanismů biosyntézy PHA [13; 15].

2.1.3.2 Metabolická dráha II: cesta využívající β -oxidaci

Druhým mechanismem syntézy PHA je dráha, která využívá meziprodukty β -oxidačního cyklu k syntéze mcl-PHA. V tomto případě jsou tak zdrojem uhlíku různé varianty mastných kyselin, které lze zpracovat na monomery PHA [12; 15].

Nejprve je mastná kyselina aktivována acyl-CoA syntázou a ATP, dále dochází k přeměně na enoyl-CoA. Ten je dále převeden pomocí *R*-3-hydroxyacyl-CoA hydratázy na *R*-3-hydroxyacyl-CoA, jež je polymerizován za účasti PHA syntázy na mcl-PHA [12]. Další mezisloučeninou, která vzniká během β -oxidace a je použita při polymerizaci, je 3-ketoacyl-CoA [13].

Jako příklady mikroorganismů, které tuto dráhu využívají, lze uvést *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas oleovorans* či *Pseudomonas putida*. [12].

2.1.3.3 Metabolická dráha III: cesta syntézy mastných kyselin *in situ*

Tento mechanismus zahrnuje cyklus syntézy mastných kyselin *in situ*. Pro syntézu PHA v tomto případě slouží *R*-3-hydroxyacyl-ACP, který je přeměňován na monomery 3-hydroxyacyl-CoA [12; 13].

Acetyl-CoA karboxyláza (AccC) přeměňuje acetyl-CoA získaný z metabolismu glukózy na malonyl-CoA. Ten se poté přeměňuje na malonyl-CoA ACP pomocí malonyl-CoA-ACP transacylázy. Malonyl-CoA ACP je v dalším kroku přeměněn na acetoacyl ACP a acetoacetyl-CoA účinkem 3-ketoacyl-ACP syntázy. Acetoacetyl-CoA je převeden na konečný monomer (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA za katalytického účinku 3-ketoacyl-ACP reduktázy [13].

Bylo zjištěno, že cykly syntézy mastných kyselin *in situ* a β -oxidace mohou být nezávisle aktivní a dodávat prekurzory pro syntézu PHA. Proto například pokud *Pseudomonas aeruginosa* roste na nepříbuzných substrátech, je schopna produkovat náhodné kopolymery mcl-PHA [12].

Výroba monomerů scl- a mcl-PHA odvozená od biosyntézy mastných kyselin je velmi zajímavá zejména z toho důvodu, že dráhy biosyntézy mastných kyselin je možné najít ve všech organismech. Za předpokladu, že by se tento systém využíval u fotosyntetických organismů, bylo by možné jako zdroj uhlíku využívat CO_2 místo jiných zdrojů jako jsou cukry, oleje apod. Tím by se také snížily náklady na výrobu [15].

2.1.4 Substráty pro syntézu PHA

Bakterie mají schopnost využívat pro výrobu PHA rozličných substrátů. Použití je možné jak čisté cukry, oleje a mastné kyseliny, tak biologický odpad [11].

Zdroje uhlíku je možné rozdělit na strukturně příbuzné a nepříbuzné. Jako příklad příbuzných lze uvést mastné kyseliny, které mají strukturu podobnou hydroxyalkanovým kyselinám. Jako nepříbuzný substrát bychom mohli jmenovat například glukózu, jejíž struktura se podstatně liší [12; 13]. Z dosud prozkoumaných drah produkce PHA vyplývá, že výchozí zdroj uhlíku, který je během produkce použit, velmi významně ovlivňuje konečnou strukturu PHA [13].

Z ekonomického hlediska je používání čistých substrátů nevýhodné, jelikož se jejich cena může vyšplhat až na 50 % celkových nákladů. Mnohem hospodárnější je tedy využití biologického odpadu, který může zahrnovat rozličné zemědělské zbytky či vedlejší průmyslové produkty jako jsou fermentovaná melasa, výlisky z olivového oleje, datlový sirup či odpadní voda z palmových listů a papíren [11].

João R. Pereira a kol. například využili k biosyntéze PHA se středně dlouhým řetězcem (mcl-PHA) surový glycerol z výroby bionafty [16]. Leire Urbina a kol. využili k produkci tohoto druhu PHA vedlejších produktů výroby cideru jako substrátu [17].

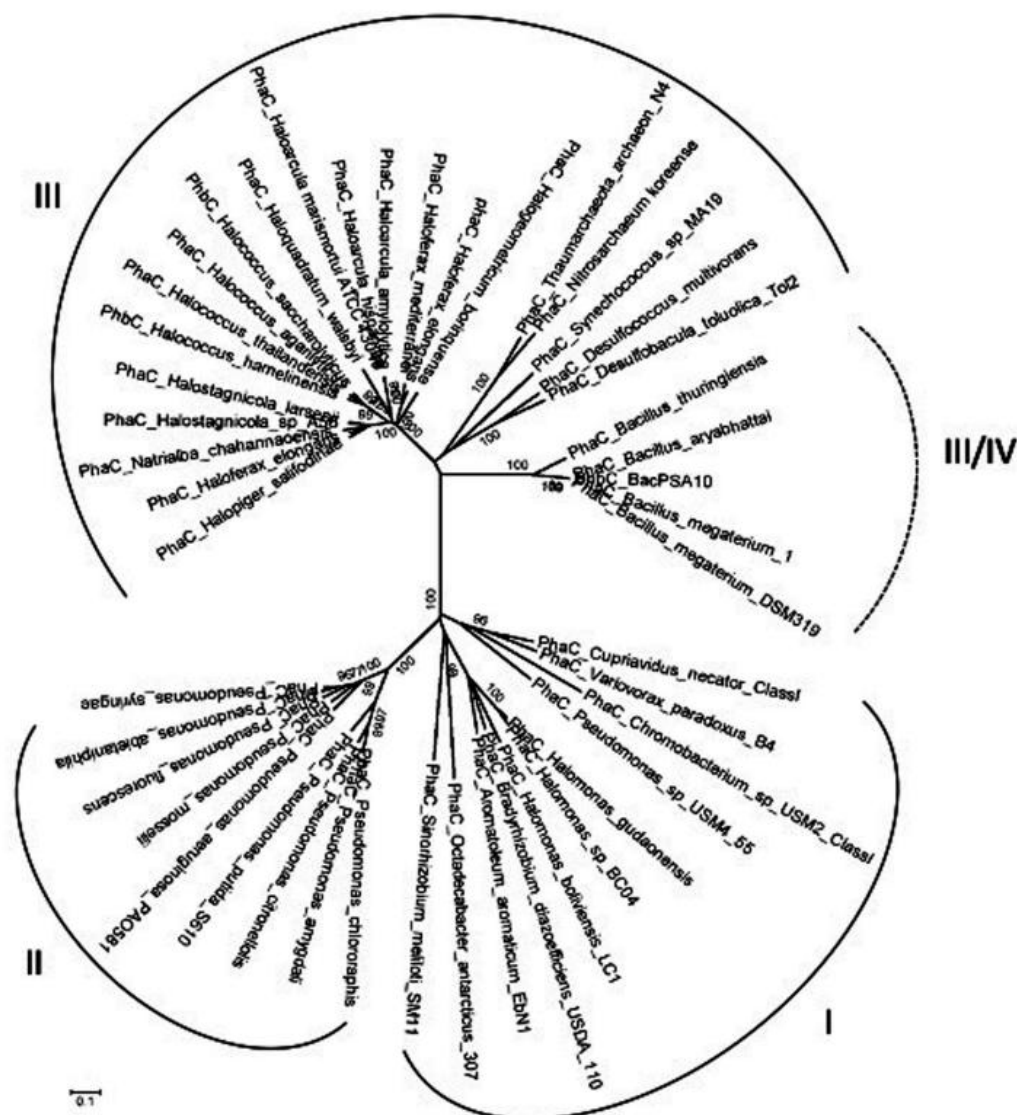
Dalším velice zajímavým obnovitelným zdrojem, o kterém by se dalo uvažovat v souvislosti s produkcí PHA, jsou komplexní organické substráty obsažené v odpadních vodách. Biorafinerie odpadních vod využívají mikroorganismy k čištění odpadních vod a zároveň k výrobě hodnotných produktů. Právě polyhydroxyalkanoáty patří mezi nejzajímavější z těchto produktů a využití zdrojů z procesů čištění odpadních vod by je mohlo začlenit do oběhového hospodářství plastů [4].

2.1.5 Typy PHA syntáz

Klíčovou roli během produkce PHA hraje enzym PHA syntáza (PhaC). PhaC využívá thioestery hydroxyalkanových kyselin (HA) jako substráty a katalyzuje jejich polymeraci za vzniku PHA za současného uvolnění CoA. Jako příklad polymerizovaných monomerů lze uvést 3-hydroxybutyrát (3HB), 3-hydroxyvalerát (3HV) či 4-hydroxybutyrát (4HB). Substrátová specifita PhaC ovlivňuje typ a složení biosyntetizovaných polymerů (PHA s krátkým řetězcem, PHA se středním řetězcem či PHA s dlouhým řetězcem) a má vliv na takové vlastnosti vzniklého materiálu, jako jsou molekulová hmotnost či polydisperzita [18; 19].

PHA syntázy lze rozdělit do 4 tříd. Obecně jsou klasifikovány na základě primární struktury odvozené z aminokyselinových sekvencí, substrátové specifity a složení podjednotek. PhaC

třídy I a II se skládají z jedné podjednotky PhaC. PhaC třídy I preferují substráty scl, zatímco syntázy třídy II preferují mcl. PhaC třídy III a IV mají podobné substrátové preference pro monomery scl, ale pro plnou funkčnost vyžadují další podjednotky. Ty jsou označovány jako PhaE a PhaR [12; 20].



Obrázek 3: Evoluční vztahy PhaC bakterií a archeí [21].

Bylo provedeno mnoho studií, které byly zaměřeny na charakterizaci PhaC z rozličných mikroorganismů z různých prostředí (Obrázek 3). Prozatím existují dva PhaC s popsanou strukturou katalytické domény, a to konkrétně PhaC z *C. necator* (PhaCCn-CAT) (Ser201-Ala589) a PhaC z *Chromobacterium sp.* USM2 (PhaCCs-CAT) (Phe175-Asn567). Obecně se struktura PhaC skládá z C-koncové katalytické domény a N-koncové domény, která je flexibilní. C-koncová doména obsahuje subdoménu, vstupní kanál pro substrát, aktivní

místo a tunel pro výstup produktu. Předpokládá se, že N-terminální doména ovlivňuje dimerizaci a stabilitu dimeru PhaC, enzymatickou aktivitu, substrátovou specifitu a molekulovou hmotnost produkovaného PHA. Dále by mohla ovlivňovat expresi PhaC a jeho schopnost se vázat na granule PHA [20; 21].

Cílem zkoumání a prohlubování našich poznatků týkajících se PHA syntáz zejména prostřednictvím delečních studií je hlubší pochopení vlastností těchto enzymů a lepší identifikace klíčových oblastí, které umožní jejich praktické využití. Jedním z cílů, na které se výzkumníci zaměřili, je také hledání přirozeně vyvinutého PhaC nebo upraveného PhaC se širší substrátovou specifitou pro biosyntézu kopolymerů PHA. Deleční studie provedené s využitím PHA syntáz, které se vyznačují vysokou aktivitou a širokou substrátovou preferencí, by mohly poskytnout další informace o tom, jak primární struktura ovlivňuje vlastnosti těchto syntáz a také následně biosyntézu PHA [19; 20].

PhaC třídy I

Zástupce syntáz třídy I jsou schopny jako substrát využívat CoA-thioester hydroxyalkanoátů s 3–5 atomy uhlíku a byla studována například u bakterie *Cupriavidus necator* (PhaCCn). Primární sekvence PhaCCn byly srovnávány se sekvencemi ostatních PHA syntáz. PhaC třídy I jsou jednojednotkové enzymy strukturované do dvou domén, N-terminální domény a C-terminální katalytické domény. U PhaCCn bylo nalezeno konzervovaných celkem šest bloků a osm konzervovaných aminokyselinových zbytků. Bylo zjištěno, že C-koncová doména obsahuje katalytické místo tvořené triádou Cys-Asp-His a je klíčová pro aktivitu, na rozdíl od vysoce variabilní N-koncové oblasti, která byla na základě analýz zkrácených PHA syntáz *C. necator* posouzena jako nepotřebná. Zajímavým faktem je, že i bez prvních 100 zbytků v N-koncové oblasti si PhaCCn zachovala svou funkčnost [12; 19; 20]

Při analýzách PHA syntáz patřících *Aeromonas hydrophila*, *C. necator* a *Pseudomonas stutzeri* sp. 1317 bylo naopak zjištěno, že N-koncová oblast těchto syntáz je nepostradatelná. Ukázalo se, že u daných syntáz dokáže ovlivnit substrátovou specifitu, produktivitu a molekulovou hmotnost syntetizovaných polymerů [19].

Hui Lim a kol. analyzovali vysoce aktivní syntázu z *Aquitalea sp.* USM4 (PhaC1As), která byla izolována z malajských zdrojů. Bylo zjištěno, že se vyznačuje vrozenou schopností polymerizovat širokou škálu monomerů a produkovat PHA s obsahem monomerů 3HB, 3HV, 4HB a 3-hydroxy-4-methylvalerát (3H4MV) [19].

PhaC třídy II

Tato třída PhaC zahrnuje jednojednotkové enzymy, které jsou obecně menší než PhaC enzymy třídy I. PhaC třídy II dokáží využívat jako substrát CoA-thioestery hydroxyalkanoátů od 6 do 14 atomů uhlíku. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje okolo 62 kDa. Syntázy této třídy se vyskytují především u rodu *Pseudomonas*. Jako příklad bakterie lze uvést *Pseudomonas aeruginosa* [20].

PhaC třídy III

Pro správné fungování PhaC třídy III je potřeba, aby u nich byly přítomny dvě podjednotky, a to katalytická podjednotka kódovaná genem *phaC* a další jednotka, jejíž funkce zůstává neznámá a jež je kódovaná genem s označením *PhaE*. Velikost podjednotky PhaC se pohybuje v rozmezí molekulových hmotností od 39 do 53 kDa, u podjednotky PhaE od 20 do 43 kDa.

PhaC třetí třídy používají jako substráty thioestery CoA hydroxyalkanoátů s krátkým řetězcem, od 3 do 5 atomů uhlíku. U různých druhů je poměr velikostí jednotlivých podjednotek vůči sobě různý. Například v případě *Chlorogloeopsis fritschii* jsou podjednotky PhaC a PhaE přibližně stejně velké (38,1 a 41,8 kDa), naopak například u *Haloferax mediterranei* je katalytická podjednotka výrazně větší než podjednotka PhaE (54,8 a PhaE 20,4 kDa) [20].

PhaC třídy IV

Charakteristika, kterou mají PhaC třídy IV společnou s PhaC třídy III je fakt, že se skládají ze dvou podjednotek enzymu. Katalytickou podjednotkou je zde PhaC, avšak k zajištění funkčnosti je zapotřebí PhaR, jejíž funkce stejně jako u PhaE zůstává neznámá. Stejně jako je tomu u PhaC třídy III, i PhaC třídy IV preferují jako substráty thioestery CoA hydroxyalkanoátů s krátkým řetězcem od 3 do 5 atomů uhlíku. Převážně je možné tuto třídu nalézt u mikroorganismů spadajících do rodu *Bacillus*. Jako příklad zástupců je možno uvést *Bacillus cereus* a *Bacillus megaterium*. Co se velikosti jednotlivých podjednotek týče, katalytická podjednotka je podstatně větší než podjednotka PhaR (cca 41 kDa, respektive 20 kDa) [20].

Některé PHA syntázy je obtížné zařadit do jedné z popsaných skupin, jelikož jsou schopny polymerizovat jak scl- tak mcl- monomery. Jako příklad lze uvést PHA syntázy *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila* 4AK4, *Rhodococcus aethiroporans* I24 či *Chromobacterium* kmen USM2 a PhaCBP-M-CPF4 [18]. U některých organismů, jako například *Halomonas boliviensis* a *Hydrogenophilus thermoluteolus*, byly objeveny geny kódující několik PHA syntáz [20].

2.1.6 PHA kopolymery

PHA trpí mnohými nedostatky, jako jsou vysoká krystalinita, nízká pružnost či vysoká teplota tání, kvůli kterým je obtížné jej použít v různých aplikacích [22]. Špatné fyzikálně-chemické vlastnosti se odvíjejí od jejich nízké molekulové hmotnosti (M_w : $5-10 \cdot 10^{-5}$ Da), která způsobuje jejich vysokou krystalinitu a křehkost. Hlavními faktory regulujícími pevnost polymeru jsou typy monomerů, ze kterých je polymer složen, a jeho výsledná molekulová hmotnost. [11; 23].

Vývoj fermentačních cest z biologicky obnovitelných surovin vedl ke komerčnímu využití PHA. Komerčializaci ve velkém měřítku však komplikuje několik faktorů. Jednak je současná biologická syntéza PHA nákladná, a kromě toho jsou dané biologické cesty výroby omezeny mechanismem polymerace. Při něm je nejčastější inkorporace 3-hydroxybutyrátu [24]. Vzniká tedy homopolymer poly(3-hydroxybutyrát) (P(3HB)) a jeho množství může dosahovat až 90 % hm. sušiny buněk [22].

Mechanické a tepelné vlastnosti polyesterů lze, stejně jako u jiných tříd polymerů, upravovat obecně manipulací se stereomikrostrukturou daného polymeru [24]. Jednou z možností je například vytvoření kompozitů scl-PHA a mcl-PHA či vytvoření kovalentně vázaných kopolymerů [5]. Díky možnosti přizpůsobení opakujících se chirálních jednotek páteře je možné generovat různé stereomikrostruktury jako jsou struktury izotaktické, syndiotaktické, ataktické a stereoblokové. Biologicky odvozené PHA se však hromadí výhradně jako izotaktické polymery s absolutní (*R*)-stereokonfigurací [24]. Nedostatky ve vlastnostech, se kterými se u (P(3HB)) setkáváme, by se daly zlepšit produkcí kopolymerů, kdy by do polymerního řetězce byly začleněny další monomerní jednotky [11].

U některých bakteriálních kmenů bylo zjištěno, že v případě dostupnosti správného substrátu jsou schopny syntetizovat kopolymery PHA s rozličnými monomerními jednotkami,

kteře pak vykazují lepší vlastnosti ve srovnání s (P(3HB)) [22]. Jako příklad lze uvést kopolymer poly(3-hydroxybutyrát-*co*-3-hydroxyvalerát) (P(3HB-*co*-3HV)), který ve své struktuře obsahuje monomery 3-hydroxyvalerátu (3HV) a vykazuje nižší teplotu tání a také méně krystalickou strukturu. Další možností modifikace je včlenění 4-hydroxybutyrátu (4HB) [23].

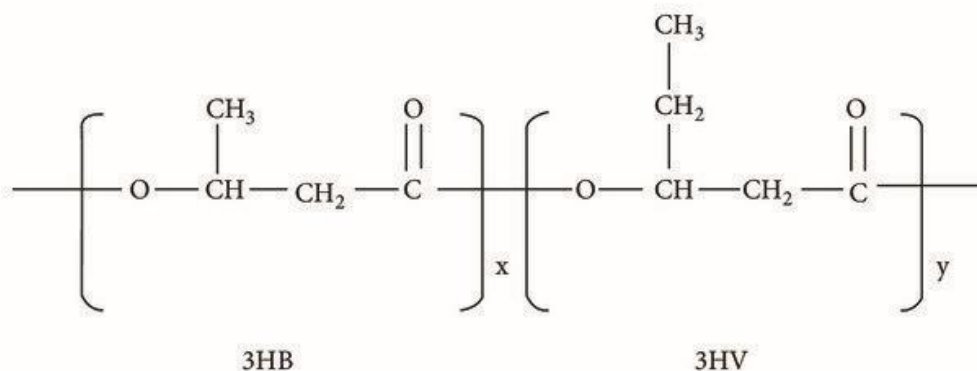
Aby docházelo u mikrobiálních producentů ke vzniku výše zmíněných kopolymerů, je potřeba dodat prekurzory, ze kterých bude možné tyto monomery syntetizovat. K syntéze kopolymerů s obsahem podjednotek 3HV se používají prekurzory s lichým počtem uhlíků – například *n*-propanol, propionát, *n*-pentanol či valerát. V případě produkce polymerů s obsahem monomerů 4HB se pak může jednat o 1,4-butandiol, γ -butyrolakton či 1,6-hexandiol [23].

Lepší vlastnosti vykazují některé kopolymery jako kopolyestery scl- a mcl- monomerů P(3HB-*co*-3H4MV), P(3HB-*co*-4HB) a P(3HB-*co*-3HHx), které vykazují kombinované znaky pružnosti mcl- PHA a houževnatosti scl-PHA [4].

2.1.6.1 P(3HB-*co*-3HV)

P(3HB-*co*-3HV), také označovaný jako PHBV, je jedním z nejznámějších kopolymerů PHA skládající se z monomerních jednotek 3-hydroxybutyrátu (3HB) a 3-hydroxyvalerátu (3HV) (Obrázek 4) a vyznačuje se nižší teplotou tání, sníženou tuhostí či zvýšeným prodloužením do přetržení. Je zároveň také pružnější (tzn. došlo u něj ke snížení Youngova modulu), houževnatější (je u něj možné pozorovat vyšší rázovou pevnost) než P(3HB) a snadněji se zpracovává ve formě [25; 26]. Kromě zmíněných výhod má však tento materiál i své nevýhody. Vykazuje nízkou rychlost degradace, způsobuje zánětlivou reakci a nízkou buněčnou proliferaci. Mezi jeho další vlastnosti patří také hydrofobicita [27].

Vlastnosti kopolymeru se odvíjejí od jeho složení (tedy molárního podílu 3HV). Složení P(3HB-*co*-3HV) se může pohybovat od 0 až do 30 mol. % 3HV. P(3HB-*co*-3HV) s obsahem více než 20 mol. % jednotek 3HV lze například použít k výrobě filmů a vláken s různou elasticitou [25].



Obrázek 4: Chemická struktura P(3HB-*co*-3HV) [28]

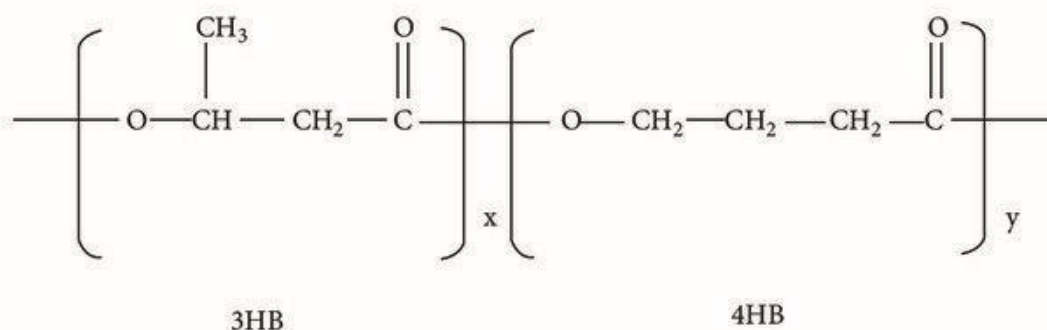
Jen omezený počet mikrobu je schopen tento kopolyester syntetizovat bez potřeby prekurzorů 3HV. Ostatní producenti potřebují k syntéze vhodné prekurzory generující propionyl-CoA. K těmto účelům je možné použít například propionát, n-propanol či valerát. Tyto prekurzory jsou nicméně poměrně nákladné na používání při výrobě tohoto kopolymeru. A aby byla zajištěna lepší ekonomická konkurenceschopnost, byly v některých studiích využívány levnější alternativy, jako například kyselina levulinová. Použití této kyseliny jako prekurzoru se však také nejeví jako optimální z důvodu její mikrobiální inhibiční aktivity [26].

P(3HB-co-3HV) je předmětem dalších studií. Zajímavou modifikací tohoto kopolymeru uskutečnili například Bhatia a kol., kteří ve své studii syntetizovali kopolymer P(3HB-co-3HV) pomocí modifikované *Escherichia coli* YJ101 a dále jej funkcionalizovali kyselinou askorbovou pomocí esterifikace zprostředkované lipázou B z *Candida antarctica*. Takto vzniklý kopolymer P(3HB-co-3HV)-kyselina askorbová vykazoval oproti samotnému P(3HB-co-3HV) zlepšené vlastnosti jako nižší stupeň krystalinity či vyšší teplotu tepelné degradace a hydrofilitu. Byla zaznamenána také zvýšená biodegradabilita [29].

2.1.6.2 P(3HB-co-4HB)

P(3HB-co-4HB) je kopolymer PHA s krátkým řetězcem [30]. Monomery 4-hydroxybutyrátu (4HB) byly poprvé zaznamenány v kopolymerech P(3HB-co-4HB) (Obrázek 5), které byly produkovány za využití bakterie *Cupriavidus necator*, již byla jako hlavní zdroj uhlíku dodávána kyselina 4-hydroxymáselná nebo kyselina 4-chlormáselná. Z následných studií vyplynulo, že je tento kmen schopen syntetizovat monomery 4HB i z jiných strukturně podobných substrátů jako je γ -butyrolakton či 1,4-butandiol.

Kopolymery 4HB se vyznačují obecně lepšími fyzikálními a fyzikálně-chemickými vlastnostmi než ty na bázi 3-hydroxyvalerátu [31]. Díky svým vlastnostem je klasifikován jako vhodný vstřebatelný biomateriál použitelný pro lékařské a farmaceutické aplikace, a to konkrétně například pro podávání léčiv, tkáňové inženýrství, hojení ran apod. Kopolymery s obsahem 4HB monomerů degradují rychleji *in vivo* bez škodlivých vedlejších účinků na lidský organismus ve srovnání s jinými PHA. Tím se zvyšuje jejich biokompatibilita. V závislosti na konkrétním složení P(3HB-co-4HB) vykazují tyto kopolymery velké množství mechanických pevností od vysoce krystalických plastů až po elastomerní materiály. Pro různé aplikace je tak možné kopolymery uzpůsobit specifickým požadavkům [30].



Obrázek 5: Chemická struktura P(3HB-co-4HB) [32]

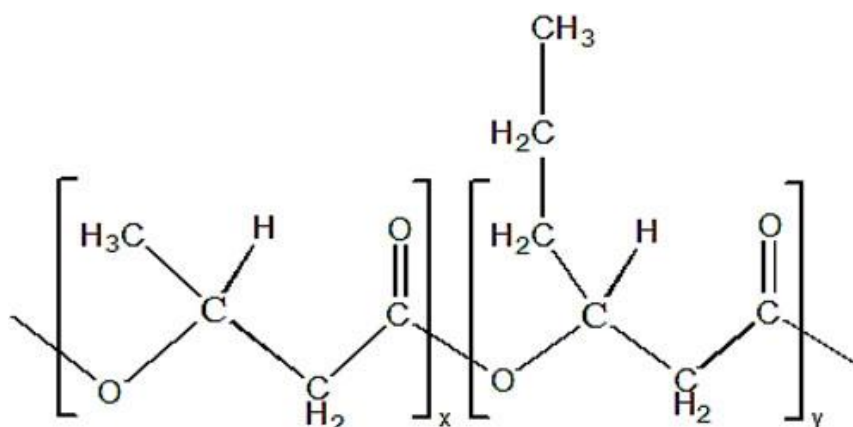
Jedním z mála popsaných producentů schopných začlenit 4-hydroxybutyrát do polymerního řetězce je *Aneurinibacillus* sp. H1, schopný produkovat tento kopolymer s různými podíly 4-hydroxybutyrátu. Tento organismus je schopný inkorporovat monomery 4HB až do 90 mol. % s využitím 1,4-butandiolu jako prekurzoru. Podíl 4HB obsaženého v konkrétním produktu se odvíjí od výchozího poměru 1,4-butandiol : glycerol v substrátu. Vlastnosti produktu je tedy možná ovlivnit změnou kultivačních podmínek [33; 34].

Delftia acidovorans DS-17 je dalším z organismů testovaných na produkci kopolymeru P(3HB-co-4HB). Tato produkuje daný kopolymer s vysokým podílem monomeru 4HB, a to 93 až 99 mol. % v podmínkách, kdy byl jediným zdrojem uhlíku 1,4-butandiol nebo kyselina 4-hydroxymáselná (4HBA) v bezdusíkatém médiu [30].

Ze stejného rodu jako *D. acidovorans* pochází také další producenti schopni syntetizovat P(3HB-co-4HB) s vysokým obsahem monomerů 4HB, a to konkrétně *C. testosteronii* A3 a *D. acidovorans* P4a, které však navzdory stejnému rodu preferují při produkci jiné substráty [30].

2.1.6.3 P(3HB-co-3HHx)

Jedním z dalších pokusů, jak překonat a vylepšit nevhodné vlastnosti homopolymerů PHA, byla kopolymerizace P(3HB) s mcl-PHA monomerem 3-hydroxyhexanoátem. Tak vznikl kopolymer P(3HB-co-3HHx) (Obrázek 6), který se vyznačuje elastomerními vlastnostmi, jako jsou vysoká elasticita, nízká krystalinita a velké prodloužení při přetržení. Stejně jako u ostatních kopolymerů se i vlastnosti tohoto materiálu odvíjejí od molárního složení 3HHx. Obecně platí, že čím vyšší je molární podíl 3HHx, tím víc klesá M_w , T_m , T_g , Youngův modul a pevnost v tahu. Naopak prodloužení při přetržení kopolymeru se zvyšuje. Se zvyšujícím se množstvím monomerních jednotek 3HHx se tak tento kopolymer stává pružnějším, měkčím a lépe zpracovatelným. Bylo například zjištěno, že P(3HB-co-3HHx) s molárním podílem 3HHx 17 mol. % má podobné vlastnosti jako polyethylen o nízké hustotě (LDPE) [35].



Obrázek 6: Chemická struktura P(3HB-co-3HHx) [36]

Během výzkumu byly provedeny testy biologické rozložitelnosti jak za aerobních (mořská voda, sladká voda, půda či domácí kompost), tak i anaerobních podmínek (biodegradace

pomocí PHB depolymerasy). Výslednými produkty aerobní biodegradace byly voda a oxid uhličitý. Při anaerobní biodegradaci bylo P(3HB-co-3HHx) rozloženo na vodu a metan [35].

Mezi případné aplikace tohoto materiálu byly navrženy například scaffoldy pro tkáňové inženýrství, nanovlákná impregnovaná bioaktivními molekulami či nanonosiče [37].

Jedním z prvních bakteriálních kmenů studovaných na produkci P(3HB-co-3HHx) byl *Aeromonas caviae* [35; 38]. V dalších letech byly na produkci tohoto kopolymeru testovány další kmeny jako *C. necator*, *Pseudomonas putida* GPp104 či *A. eutrophus* s různými výsledky obsahu monomeru 3HHx v kopolymeru [35].

2.1.6.4 PHA terpolymery

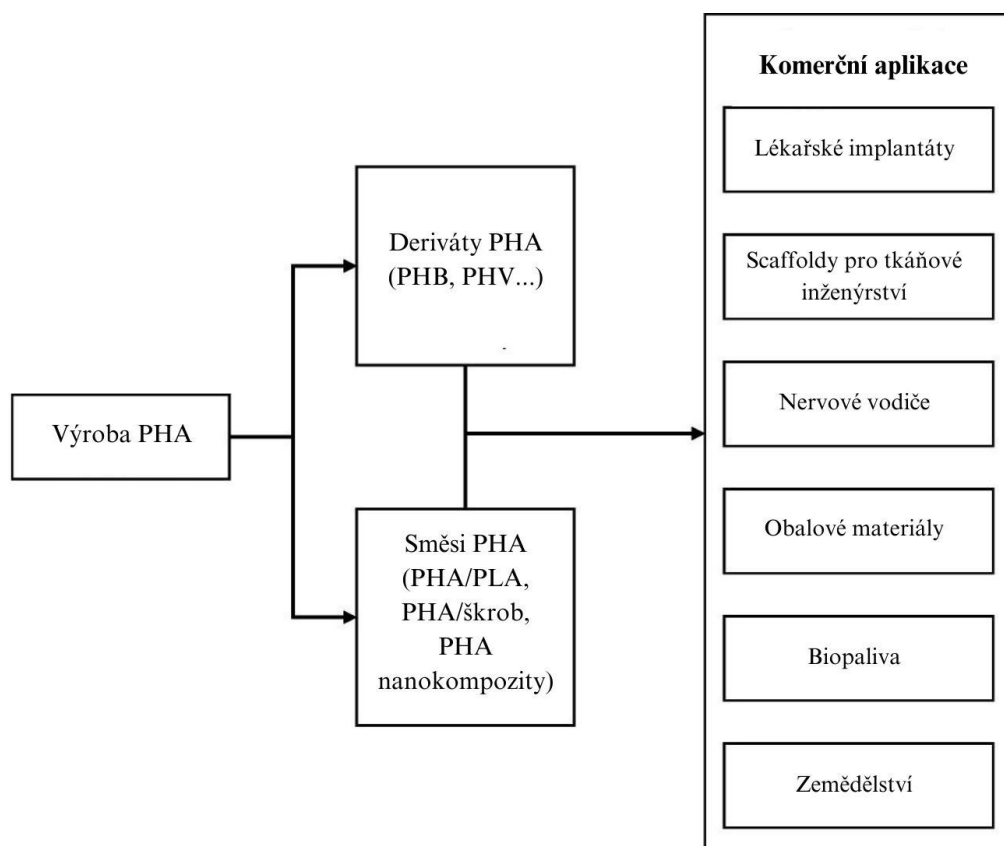
Dalšími PHA polymery jsou takzvané terpolymery. Jedná se o polymery, do kterých je zavedeno více sekundárních monomerů za účelem zlepšení fyzikálně-chemických vlastností výsledných materiálů. Příkladem terpolymeru je P(3HB-co-3HV-co-3HHx) složený z 3-hydroxybutyrátu (3HB), 3-hydroxyvalerátu (3HV) a 3-hydroxyhexanoátu (3HHx) [25; 39].

Za účelem využití pro syntézu tohoto terpolymeru bylo zkoumáno několik bakterií, mezi které patří *Rhodospirillum rubrum* či *Rhodocyclus gelatinosus* [40]. Park a kol. dokázali tento terpolymer syntetizovat za pomoci rekombinantního kmene *Escherichia coli* nesoucího geny pro biosyntézu PHA z rodu *Aeromonas*. K syntéze byly v tomto případě využity jako substráty kyselina dodekanová a mastné kyseliny s lichým počtem uhlíku. Ve své studii také dokázali, že pro zavádění 3HV monomeru do terpolymeru hraje důležitou roli gen *orf1 A. hydrophila* [39].

Hodnoty Youngova modulu u těchto terpolymerů mohou dosahovat hodnot srovnatelných s hodnotami petrochemických plastů. Například P(3HB-co-3HV-co-4HB) s obsahem s 93 mol. % 4HB a 3 mol. % 3HV dosáhl hodnoty prodloužení 430 %, houževnatosti 33 MPa a Youngova modulu 127 MPa. Tyto hodnoty jsou podobné hodnotám LDPE. V případě, že terpolymer obsahoval 55 mol. % 4HB a 34 mol. % 3HV vykazoval Youngův modul 618 MPa, což je hodnota srovnatelná s polypropylenem [25].

2.1.7 Aplikace a využití PHA

Zkoumány a testovány byly rozličné aplikace PHA v různých oblastech (Obrázek 7). V zemědělství, v oblasti lidského zdraví, při výrobě obalových materiálů, lisovaných výrobků, nátěrů papíru, lepidel, filmů či v oblasti akvakultury – tam všude by bylo možné PHA aplikovat [9; 41].



Obrázek 7: Aplikace a využití PHA [40].

2.1.7.1 PHA v oblasti medicínských aplikací

V oblasti biomedicínských aplikací jsou slibným materiálem pro implantáty, díky své biologické odbouratelnosti a biokompatibilitě. Byly studovány čtyři hlavní směry: aplikace v měkkých tkáních, tvrdých tkáních, podávání léčiv a zdravotnických prostředcích [5; 42]. PHA se ukázaly být šetrné ke tkáním krve, kostí, chrupavek a lidských buněčných linií. Z polyhydroxyalkanoátů byly vyvinuty rozličné zdravotní potřeby, jako jsou stehy, obvazy na rány, scaffoldy kostní dřeni, prostředky pro opravu kloubní chrupavky či opravu šlach apod. Důležitým faktorem v těchto aplikacích je fakt, že tyto materiály nejsou cytotoxické, a tedy jsou tolerovány imunitním systémem [42]. Jako další příklady využití lze také jmenovat výrobu chlopní, chirurgických a šicích materiálů, kožní náhrady, náhrady kostních štěpů, kostních hmoždinek, umělou rekonstrukci orgánů apod. [9; 41; 43].

2.1.7.2 PHA v oblasti zemědělství

Pro použití v zemědělství byly vytvořeny geotextilie, stínící sítě či feromonové dávkovače [11]. Jedna ze slibných aplikací je výroba snadno rozložitelné mulče, jako náhrady za syntetické (plastové) mulče, které často končí na skládkách nebo se spalují, a podílejí se tak na znečištění životního prostředí. Jako konkrétní příklad zde lze uvést mulč s označením Nodax™ vyrobený

a patentovaný společností Danimer Scientific (Tabulka 1). Ten je vyroben na bázi kopolymeru PHA, a to konkrétně poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyhexanoátu). Dále lze PHA využít také k produkci kompostovatelných skleníkových fólií šetrných k půdě, pěstebních pytlů, které při rozkladu neuvolňují škodlivé toxiny, nebo ochranných sítí, které mohou sloužit ke zlepšení růstu plodin či jejich ochraně před hmyzem, ptáky či přirozenými klimatickými výkyvy [42].

Tabulka 1: Příklady komerčních využití PHA a jejich derivátů [40].

Název společnosti	Obchodní označení	Aplikace
Danimer Scientific, USA	Nodax	Nátěry, obaly, lamináty z netkaných vláken
Polyferm Canada, Canada	VersaMer	Příspěvky do plastů, barvy a nátěrové hmoty, lepidla, inkousty a tonery a biomedicína
Biomer, Germany	Biomer	Extruze a vstřikování
Kaneka Corporation, Japan	Green Planet	Elektrické komponenty, mulčovací fólie, kompozitní pytle a automobilový průmysl
Bio On, Italy	Minerv	Použití se v kosmetice, jako jsou rtěnky, řasenky, oční linky, laky na nehty atd.
Tianjin GreenBio Materials, China	Sogreen	Pryskyřice

2.1.7.3 PHA jako obalový materiál

Z celkového využití polymerních látek připadá v současné době na balení spotřebních výrobků cca 30 %. Obalování těchto výrobků, jako jsou potraviny, je potřebné z důvodu zachování jejich kvality a trvanlivosti, a aby se předešlo jejich znehodnocení [41]. Obalové materiály jsou ve velké míře vyráběny z konvenčních petrochemických polymerů a rovněž se tak podílejí na znečišťování životního prostředí. V posledních desetiletích tedy byla velká pozornost věnována přípravě ekologičtějších, biodegradabilních alternativ pro výrobu obalů. PHA se díky svým vhodným vlastnostem jeví jako potenciálně vhodná náhrada i v této oblasti využití [9; 44].

Dalším milníkem ve vývoji obalových materiálů z P(3HB) by mohlo být vytvoření aktivních obalů, které by byly na bázi PHA a byly by funkcionalizované, takže by měly další přidanou hodnotu. Velmi zajímavou studii provedli například Mirpoor a kol., kteří se zabývali výrobou aktivních obalů na bázi PHA funkcionalizovaných floretinem. Tyto obaly by byly nejen biodegradabilní, ale měly by schopnost působit proti bakteriím způsobujícím patogenní onemocnění potravin a zabraňovat jejich kažení. Takovýto druh obalů by mohl být velmi žádaný v potravinářském průmyslu [44].

2.2 Mikroorganismy produkující PHA

Nejběžnějším způsobem produkce polyhydroxyalkanoátů je v současné době použití mikroorganismů. Problémem, který produkci komplikuje je nutnost sterilního prostředí [4]. Bakterií, které ve formě různých granulí hromadí PHA, existuje mnoho. Typ PHA, který vzniká je závislý na použitém mikroorganismu [45].

Pro průmyslovou produkci by bylo možné uvažovat například o halofilních bakteriích *Halomonas bluephagenesis*, *Halomonas halophila* či *Halomonas hydrothermalis*. Problémy s průmyslovou aplikací však v tomto případě souvisejí s nutností vysoké koncentrace soli v kultivačním médiu, která by mohla způsobovat jednak korozi vybavení, ale také by byla náročná na nakládání s odpadní vodou či zpětné získávání soli po kultivaci [46].

Pro rozsáhlé bioproceny se obecně používají mezofilní mikroorganismy. Použití mezofilních mikroorganismů má však svá úskalí, co se rozšiřování bioproduktu týče, jelikož zde hrozí zvýšené riziko křížové kontaminace jinými mezofilními mikroby. Jako možná alternativa se tak jeví a přitahuje pozornost možnost využití termofilních fermentačních procesů. Ty probíhají při teplotách okolo 50-60 °C. Díky použití extrémních podmínek jsou tyto postupy odolné vůči kontaminaci mezofilní mikroflórou a jsou tak potenciální variantou kontroly kontaminace těmito mikroorganismy [45; 47].

Pokud by byla termofilní fermentace implementována, mohlo by být k ohřevu fermentoru využito metabolické teplo a energie rozptýlená procesem míchání. Rovněž by se při tomto typu fermentace ušetřily náklady na sterilizaci a bylo by možné proces provozovat v semikontinuálním nebo kontinuálním režimu, který je velmi efektivní. Pro tento bioprodukt by byla potřeba menší množství vody a ušetřila by se i energie potřebná na chlazení, jelikož by docházelo k chlazení okolním vzduchem [45; 47].

Navzdory vyjmenovaným výhodám není termofilní fermentace probádána příliš dobře. Z více než 300 bakterií, o kterých je známo, že produkují PHA, bylo zkoumáno jen velmi malé množství termofilních kmenů. Z toho důvodu je termofilní fermentační proces v komerční praxi zkoumán jen vzácně. Další komplikací průmyslové aplikace termofilní fermentace je optimální teplota těchto bakteriálních kmenů. Navzdory stádiu, ve kterém se současný výzkum nachází, se zdá, že jsou termotolerantní a termofilní bakteriální kmeny pro průmyslovou syntézu PHA zkoumány čím dál více [47; 48].

2.2.1 Termofilní bakterie

Označení „termofilní“ je vlastní mikroorganismům, jejichž optimální růstová teplota přesahuje 45 °C [23; 49; 50]. Tyto bakterie lze rozdělit do tří skupin: mírné termofily, které rostou v teplotním rozmezí 50-60 °C, extrémní termofily, jejichž optimální teplota růstu se pohybuje od 65 do 80 °C a hypertermofily, které rostou při teplotách vyšších než 110 °C. Termofilní mikroorganismy najdeme v různých mořských a suchozemských biotopech. Mezi častá stanoviště přirozeného výskytu patří například hydrotermální průduchy, solfatárová pole, kompostové haldy, horké prameny, hluboké moře či vodní ohřivače [50].

Pro produkci mohou být využívány jak gram-negativní, tak i gram-pozitivní termofilní bakterie. Jednou z termofilních bakterií, u kterých byla syntéza PHA zkoumána a popsána, je *Caldimonas taiwanensis*. Tu zkoumali Chen a kol. při screeningu bakterií produkujících amylázu, které izolovali z horkého pramene v Pingtungu. Tento kmen byl při kultivaci s fruktózou, glycerolem či maltózou schopen akumulovat PHB a při použití kombinace glukonátu a valerátu jako zdroji uhlíku vznikala také kopolymer poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) [P(3HB-co-3HV)] [47; 51]. Tyto výsledky se shodovaly s výsledky studií, které prováděli Takeda a kol. a Koller a kol. na kmenech *Caldimonas manganoxidans* a *Burkholderia funghorum* [47]. Ibrahim a kol. se věnovali screeningu termofilních bakteriálních kmenů z egyptských horkých pramenů, mezi něž patří také *Chelatococcus themostellatus* [46; 47; 52]. Satoh a kol. izolovali termotolerantní bakteriální kmen

s označením SG4502, který byl přiřazen k rodu *Pseudomonas*. Při produkci PHA byla ke kultivaci tohoto kmene použita bionafta a teplota byla udržována na 45 °C [53]. Jednou z nedávno zkoumaných termofilních bakterií pro produkci PHA je také *Caldimonas thermodepolymerans*, u které byla zaznamenána schopnost využívat jako zdroje uhlíku xylózu. Byla izolována na základě své schopnosti degradovat extracelulární materiály, mezi které patří například kopolymery 3-hydroxybutyrátu a 3-merkaptopropionátu. Kouřilová a kol. u tohoto kmene zaznamenali také vznik kopolymerů 3HB a 3HV [46].

Podstatně menší počet studií biosyntézy PHA byl prozatím proveden na gram-pozitivních termofilních kmenech [47]. Hlavní nevýhoda PHA syntetizovaných gram-negativními kmeny bakterií spočívá v obsahu endotoxinů, jako jsou lipopolysacharidy, které jsou hlavní složkou buněčné stěny těchto bakterií. Pokud by se tedy takto vyprodukované PHA použily v nějaké medicínské aplikaci, jako je například výroba implantátů, pacient by byl vystaven riziku vzniku silné imunogenní reakce. Těmto problémům by se dalo předejít použitím gram-pozitivních bakterií při produkci PHA, jelikož tyto lipopolysacharidy neobsahují a jeví se tak jako vhodnější alternativa pro přípravu zdravotnického materiálu [54].

Mezi gram-pozitivní bakterie, které byly studovány a navrženy k účinné produkci PHA, tak patří například *Corynebacterium glutamicum*, dále široká kategorie rodu *Bacillus*, kam jako producenti PHA patří *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. brevis* a další [54]. Pernicová a kol. se soustředili na izolaci termofilních producentů PHA ze smíšených mikrobiálních komunit obsahujících *Bacillus*, *Aneurinibacillus* a *Chelatococcus* [55]. Jako zajímavou novou bakterii pak představili *Aneurinibacillus* H1, který je schopen produkovat také různé kopolymery PHA [47].

2.3 Rod *Aneurinibacillus*

Rod *Aneurinibacillus* byl zařazen mezi 16 rodů bakterií patřících do čeledi *Paenibacillaceae*, a to na základě reklasifikace *Bacillus aneurinolyticus* a příbuzných členů rodu *Bacillus*. Konkrétně do čeledi *Paenibacillaceae* v současné době spadají rody *Paenibacillus*, *Ammonibacillus*, *Ammoniphilus*, *Aneurinibacillus*, *Brevibacillus*, *Chengkuihengella*, *Cohnella*, *Fontibacillus*, *Gorillibacterium*, *Longirhabdus*, *Marinicrinis*, *Oxalophagus*, *Paludirhabdus*, *Saccharibacillus*, *Thermobacillus* a *Xylanibacillus*. Velké množství bakterií z této čeledi se vyznačuje rozličnými charakteristikami vhodnými pro použití v biotechnologiích [56].

Zástupci rodu *Aneurinibacillus* jsou gram-pozitivní, většinou termofilní nebo termotolerantní bakterie tyčinkovitého tvaru. Tvoří endospory a je možné je nalézt na různých stanovištích, jako je například rostlinná rhizosféra, geotermální půdy či mořské prostředí. Jsou schopny produkovat významné sekundární metabolity, jako jsou antibiotika či biosurfaktanty a také vykazují vlastnosti podporující růst rostlin a s tím spojený biokontrolní potenciál. Jeví se tedy jako rod potenciálně dobře aplikovatelný v různých biotechnologických aplikacích [56; 57].

Dalším významným druhem tohoto rodu je *Aneurinibacillus* H1, který studovali Buchtíková a kol., a u něhož byla zaznamenána schopnost produkce PHA. Zvláště zajímavá z pohledu případných aplikací je jeho schopnost produkovat kopolymery obsahující monomery 4-hydroxybutyrátu (4HB) a 3-hydroxyvalerátu (3HV) s mimořádně vysokými frakcemi těchto monomerů. Tento druh je také schopen produkovat terpolymer P(3HB-co-3HV-co-4HB), a to, na rozdíl od *Cupriavidus* DSM 19379, v jednoduchém jednostupňovém kultivačním uspořádání [56; 57].

Řeháková a kol. studovali u tohoto rodu syntézu kopolymerů PHA obsahující monomery jako je 4-hydroxyvalerát (4HV), 5-hydroxyvalerát (5HV) nebo 4-hydroxyhexanoát (4HHx) a prokázali, že jako prekurzory pro tyto monomery jsou bakterie schopny využívat vybrané laktony. Konkrétně se jednalo o γ -valerolakton, γ -hexalakton a δ -valerolakton. Další zjištění, které studie přinesla, bylo, že molární frakce těchto monomerů byly u rodu *Aneurinibacillus* vyšší než u jiných studovaných bakterií [58].

Alenezi a kol. se ve své studii zabývali využitím biokontrolního potenciálu tohoto rodu. Sledovali kontrolou rozvoje chorob rostlin pomocí cyklického peptidu gramicidin S produkovaného druhem *Aneurinibacillus migulanus* a *A. migulanus* NCTC 7096 [59]. Další druh známý svou schopností produkovat gramicidiny je *A. aneurinilyticus* [56].

Asem a kol. využili *A. aneurinilyticus* DBT87 izolovaný z gastrointestinální oblasti nepřezhývkavých prasat ke studiu degradace lignocelulózy, jelikož tento kmen vykazoval dobrou produkci celulózy a xylanázy vhodných pro tuto aplikaci [60].

V rámci tohoto rodu neustále dochází k novým objevům a je zde velký potenciál pro objevy dalších druhů s jedinečnými vlastnostmi, které by byly dobře využitelné pro biotechnologické či zemědělské aplikace [61].

2.4 Biosurfaktanty

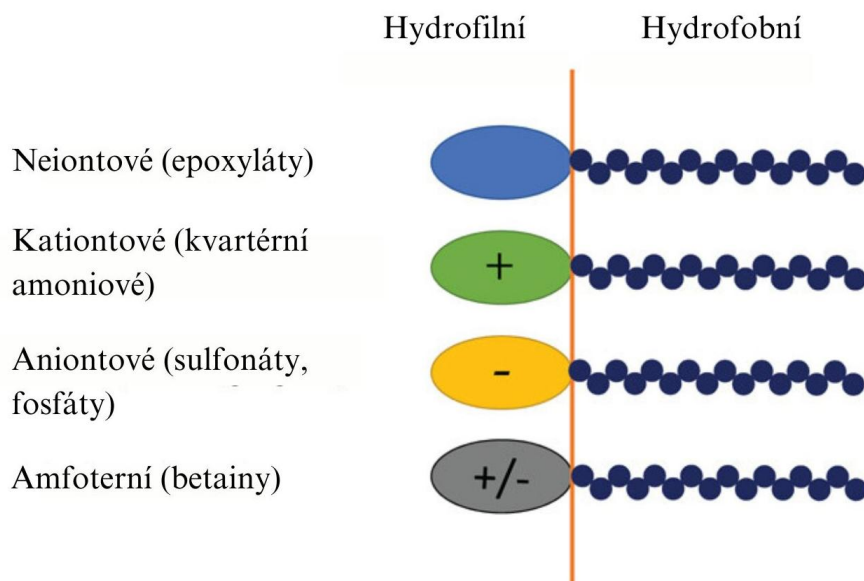
Surfaktanty, neboli povrchově aktivní látky, jsou chemické sloučeniny, které jsou složeny z amfipatických molekul obsahujících jak hydrofobní, tak hydrofilní části. Díky svým vlastnostem se hromadí na fyzikálních rozhraních. Polární části mohou být kationtové, aniontové, neiontové nebo amfoterní, zatímco nepolární části jsou obvykle uhlovodíkové řetězce. Díky této kombinaci hydrofilních a hydrofobních částí jsou tyto látky schopné snižovat povrchové a mezifázové napětí a usnadňují tak interakce mezi molekulami různé polární povahy. Důležitou hodnotou, která je s touto skupinou látek spojena je tzv. kritická micelární koncentrace (CMC). Jedná se o hodnotu, která je definovaná jako minimální koncentrace povrchově aktivní látky potřebná k dosažení nejnižšího povrchového napětí. Po dosažení CMC dochází k agregaci amfipatických molekul a jejich orientaci v rámci systému, přičemž hydrofilní části směřují směrem ven a hydrofobní části směrem dovnitř [62].

Povrchově látky lze rozdělit do čtyř skupin podle polární skupiny na (Obrázek 8):

- Kationtové,
- aniontové,
- neiontové,
- zwitteriontové (amfoterní).

Nejčastěji dostupnými jsou aniontové povrchově aktivní látky. Díky svým dobrým účinkům v čistících systémech nacházejí své uplatnění například v mýdlech či přípravcích osobní hygieny. Dále bychom jejich uplatnění našli také v ropném průmyslu, zdravotnictví či zemědělství. Kationtové povrchově aktivní látky jsou naproti tomu používány v aplikacích na povrchy se záporným nábojem. Jsou tak součástí antikoročních činidel, kondicionérů či změkčovadel. Neiontové povrchově aktivní látky mají hydrofilní část nenabitou a jsou součástí nízkoteplotních detergentů a emulgátorů. Zwitteriontové povrchově aktivní látky jsou amfoterní a nemají dobré čistící a emulgační vlastnosti. Čím jsou však atraktivní, jsou jejich

vynikající dermatologické vlastnosti a kožní snášenlivost, čehož se využívá například při výrobě šamponů a jiné kosmetiky [62].



Obrázek 8: Typy povrchově aktivních látek [63].

Většina syntetických povrchově aktivních látek je produktem petrochemického průmyslu. Tato výroba je však považována za neudržitelnou. Syntetické povrchově aktivní látky mají navíc často problémy s toxicitou a biokompatibilitou a poškozují ekosystémy, což dále omezuje jejich použití. Jako jedno z možných řešení těchto problémů se jeví výroba a využití povrchově aktivních látek na biologické bázi neboli biosurfaktantů, které vznikají jako metabolické produkty při bakteriální nebo houbové fermentaci.

Biosurfaktanty, stejně tak jako syntetické surfaktanty, vykazují emulgační, smáčecí, pěnotvorné, dispergační či solubilizační vlastnosti. Kromě těchto vlastností jsou však navíc biologicky rozložitelné a vykazují pouze malou či vůbec žádnou toxicitu a stabilitu v širokém rozsahu teplot, iontové síly a pH [64]. Jsou produkovány během stacionární růstové fáze a slouží k rozličným účelům, jako je pomoc při vazbě kovů, adheze a deadheze k povrchům, biologické dostupnosti substrátů apod. Ve srovnání s jejich syntetickými protějšky jsou biosurfaktanty biologicky rozložitelné, mají nízkou toxicitu, jsou strukturně rozmanité, a také jsou stabilní v širokém rozmezí jak pH, tak i teplot [65; 66].

Doposud popsané mikrobiální povrchově aktivní látky pocházejí z bakterií, jako jsou *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.* a *Acinetobacter sp.* Ze studií vyplývá, že přirozená úloha biosurfaktantů je spjata s emulgací hydrofobních substrátů, což zlepšuje dostupnost živin nezbytných pro jejich růst. Další funkce spojené s biosurfaktanty v organismech zahrnují také antibiotickou funkci, přichycení či disociaci buněk k povrchům, quorum sensingem a tvorbou biofilmu [64].

Na rozdíl od povrchově aktivních látek syntetického původu, jež jsou klasifikovány podle polární skupiny, se biosurfaktanty dělí podle biochemické povahy a mikrobiálního původu (Tabulka 2) [64]. Biosurfaktanty jako takové lze na základě jejich chemických struktur rozdělit do pěti hlavních kategorií, a to na: glykolipidy, lipopeptidy a lipoproteiny, mastné

kyseliny a kyseliny fosforečné, polybiosurfaktanty a částicové biosurfaktanty. Různé struktury biosurfaktantů lze přičíst mikrobiologickému zdroji, z něhož jsou získány, specifickým podmínkám růstu a substrátům, které byly při kultivaci použity. K nejlépe prozkoumaným biosurfaktantům, které jsou v centru zájmu, patří rhamnolipidy, sofolipidy, mannosyl-erythritolové lipidy (MEL) či surfaktiny [67; 68].

Tabulka 2: Příklady některých typů povrchově aktivních látek a jejich bakteriálního původu [69].

Třída biosurfaktantů	Struktura	Bakterie
Glykolipidy	Ramnolipidy	<i>Pseudomonas</i> spp., <i>P. aeruginosa</i> , <i>Bulkholderia</i> spp.
	Trehalolipidy	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium</i> spp.
Lipopeptidy	Viscosin	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i>
	Iturin, fengycin	<i>Bacillus</i> spp.
Fosfolipidy, mastné kyseliny a neutrální lipidy	Mastné kyseliny	<i>Corynebacterium lepus</i>
	Neutrální lipidy	<i>Nocardia erythropolis</i>
	Fosfolipidy	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Polymerní povrchově aktivní látky	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>

2.4.1 Produkce biosurfaktantů bakteriemi *Aneurinibacillus*

Schopnost produkovat biosurfaktanty byla zaznamenána rovněž u bakterií rodu *Aneurinibacillus*. Tyto bakterie jsou schopny produkovat biosurfaktanty jak extracelulární, tak vázané na buňky, které se diametrálně liší, co se obsahu mastných kyselin týče, jelikož extracelulární biosurfaktant obsahuje přibližně dvojnásobné množství mastných kyselin [70].

López-Prieto a kol. studovali bakterie izolované z kukuřičného výluhu, které byly určeny pomocí amplifikace a sekvenční analýzy *16S rRNA* jako *Aneurinibacillus aneurinilyticus*. Bylo zjištěno, že tento kmen byl schopen produkovat buněčně vázané i extracelulární biosurfaktantové extrakty, které byly dále analyzovány. Zatímco extracelulární biosurfaktant byl tvořen směsí lipopeptidů, obsahující mastné kyseliny C16 a C18 a aminokyseliny, extrakt biosurfaktantu vázaného na buňky obsahoval cyklický dekapeptid gramicidin S a lipopeptidy [70].

Bakterie v souvislosti s kukuřičným výluhem studovali také Lvova a kol., kteří se zabývali studiem koncentrace biosurfaktantů v kultivačních médiích obsahujících sterilizované roztoky kukuřičného výluhu při různých teplotách (20-60 °C) a fermentačních dobách (8-30 dní). Zaznamenali schopnost této bakterie produkovat biosurfaktanty jak extracelulární, tak vázané na buňky a navrhli optimalizovanou produkci obou těchto biosurfaktantů [71]. Nový lipopeptidový biosurfaktant produkováný bakterií rodu *Aneurinibacillus* byli schopni izolovat při své práci také Balan a kol., kteří studovali bakterii izolovanou z Mannarského zálivu v Indii, jež byla určena jako *Aneurinibacillus aneurinilyticus* kmen SBP-11 [72]. Jako bakterie patřící k rodu *Aneurinibacillus* byl identifikován také izolát získaný ze skládky Kahrizak v Teheránu,

u něhož byla zaznamenána schopnost produkce biosurfaktantu, jenž vykazoval stabilitu v rozmezí teplot 20-90 °C a pH 5-10 [73].

2.5 Bakteriální produkce enzymů

Enzymy, jako jsou amylázy, proteázy, karboxymethylcelulázy a mnohé další, mají široké využití v průmyslu při výrobě léčiv, nápojů a potravin či zpracování kůže anebo čištění odpadních vod (viz Tabulka 3). Mikrobiální enzymy jsou upřednostňovány zejména díky vysokým výtěžkům, aktivitě, nákladově efektivní výrobě, exponenciálnímu růstu, použití levných médií a zlepšování kmenů [74]. S rozmachem biotechnologií roste zájem a poptávka po enzymech s novými vlastnostmi, které jsou produkovány kmeny mikroorganismů speciálně vybraných pomocí sofistikovaných screeningových technik a procesní metodologie. Mezi požadavky na enzymy patří například tolerance extrémních podmínek, jako jsou pH, teplota či množství soli, které se používají při průmyslových procesech [75].

Lipázy (E.C.3.1.1.3) patří mezi hydrolázy a katalyzují hydrolýzu triglyceridů, které na rozhraní oleje a vody přeměňují na glycerol a mastné kyseliny. Představují nejrozšířenější třídu enzymů v biotechnologických aplikacích a organické chemii. Své uplatnění nacházejí v mnoha odlišných odvětvích průmyslu, jako jsou například potravinářský, kožedělný, kosmetický, farmaceutický, biopalivový či chemický. Lipázy mohou být kromě mikrobiálního také rostlinného či živočišného původu, ale mikrobiální lipázy jsou ty, které jsou vyráběny v průmyslovém měřítku. Obvykle jsou produkovány na lipidickém zdroji uhlíku, jako jsou oleje, mastné kyseliny či glycerol. Většinou se jedná o extracelulární bakteriální lipázy a vznikají při submerzní fermentaci [76; 77].

Amylázy (EC 3.2.1.1) jsou enzymy hydrolyzující škrob a tvoří cca 65 % celkového trhu s enzymy na světě. Působí na α -1,4-glykosidové vazby molekul škrobu a rozkládají je na monomerní jednotky. Výhodou bakteriálních amyláz je jejich univerzálnost v biochemickém procesu, vysoká rychlost produkce a snadná dostupnost. Amylázy jsou využívány v různých odvětvích průmyslu, jako jsou například potravinářský, textilní či papírenský [74; 78].

Pektinázy (EC 3.2.1.15) jsou průmyslově významnými bakteriálními enzymy, které mohou být produkovány různými mikroorganismy. Tyto působí na pektin, který je hlavní složkou střední vrstvy v buněčné stěně rostlin. Uplatnění nacházejí zejména v potravinářském průmyslu, jelikož se běžně využívají v procesech rozkladu rostlinných materiálů, kde například urychlují extrakci ovocných šťáv z ovoce. Od 60. let 20. století se pektinázy používají také při výrobě vína [79–81].

Mikrobiální proteázy (EC 3.4.21.112) jsou jednou z největších skupin průmyslových enzymů. Využívají se při různých průmyslových procesech např. v potravinářství, ve farmaceutickém průmyslu, při získávání stříbra, při přípravě kůže či textilu, ale i při výrobě čisticích prostředků [82; 83].

Xylanázy (EC 3.2.1.8) jsou rovněž enzymy se širokou škálou průmyslových a biotechnologických aplikací zahrnující například potravinářství, krmivářství, kde se využívá od roku 1980 či papírenský a celulózový průmysl. Další možné uplatnění se skrývá také ve využití k vyšší výtěžnosti cukru ze zemědělských zbytků pro výrobu biopaliv [84–86].

Celulázy (E.C.3.2.1.4) jsou dalšími důležitými hydrolytickými enzymy produkované bakteriemi. Tyto katalyzují rozklad lignocelulózových látek, jako je celulóza,

na monosacharidové jednotky. Tento enzym se řadí celosvětově jako třetí největší komerčně využívaný hydrolytický enzym [75].

Tabulka 3: Bakteriální enzymy a příklady jejich použití. +++++ až + je význam třídy enzymů pro konkrétní použití (na základě množství vyrobeného enzymu a jeho ekonomické hodnoty); -, enzym bez významu pro toto použití [87].

	Škroby	Prací prostředky	Potraviny	Textil	Chemikálie	Pivovarnictví a džusy	Papír a celulóza	Krmiva
Lipázy	-	++	+	-	++++	-	-	-
Amylázy	+++++	++	++	++	-	-	-	-
Proteázy	-	+++++	++	+	-	+	-	-
Xylanázy	-	-	+	-	-	++	++	+
Celulázy	-	++	+	+++	-	-	+	-

2.5.1 Produkce enzymů bakteriemi *Aneurinibacillus*

Bakterie rodu *Aneurinibacillus* se vyznačují schopností produkce široké škály tříd enzymů, což je činí atraktivními pro budoucí výzkum se zaměřením na průmyslové využití [88]. Kamli a kol. se ve své studii zabývali získáním obecného přehledu o typech různých enzymů přítomných v tomto rodu a prozkoumali hlavní a specifické třídy enzymů přítomných v genomu *Aneurinibacillus*. Ze sekvencí základního genomu bylo téměř 30 % přiřazeno k 95 různým podtřídám enzymů. Mezi nejvýznamnější z těchto patřily různé transferázy, včetně enzymů, které přenášejí alkylové nebo arylové skupiny s výjimkou methylových skupin (EC:2.5.1), methyltransferáz (EC:2.1.1) a nukleotidyltransferáz (EC:2.7.7) [89].

Ansari a kol. studovali bakterii izolovanou z vřídla Manikaran v Indii, která byla určena jako *Aneurinibacillus thermoaerophilus* MCW220. U této bakterie detekovali produkci extracelulární termostabilní proteázy [90]. Mezi 140 bakteriálními kmeny, které byly izolovány z himálajského městského sladkovodního jezera, identifikovali Ahmad a kol. ve své studii izolát s názvem BKT-9 jako *Aneurinibacillus aneurinilyticus*. Tento prokázal schopnost produkce celuláz, která byla následně dále zkoumána a optimalizována [91]. Další studované enzymy produkované těmito bakteriemi jsou také lipázy. Těmi se zabývali například Ebrahimpour a kol., kteří zkoumali konkrétně kmen AFNA bakterie *Aneurinibacillus thermoaerophilus* [92]. Proteázy rovněž patří k enzymům studovaným u bakterií rodu *Aneurinibacillus*. Na tyto enzymy se zaměřili ve své studii Padmapriya a kol. a srovnávali proteázy produkované bakteriemi *Aneurinibacillus migulanus*, VITPM11 a *Aneurinibacillus aneurinilyticus*, VITPS07 [93]. Jako další příklad studovaných enzymů lze uvést také xylanázy, na které se zaměřili Irdawati a kol. Ve své studii použili izoláty *Aneurinibacillus thermoaerophilus* SSA2, u kterých se prokázala schopnost syntézy tohoto termostabilního enzymu [94].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

- 1,4-butandiol (Sigma-Aldrich, Německo)
- 1,5-pentandiol (Sigma-Aldrich, Německo)
- Agaróza (Sigma-Aldrich, DEU)
- Citronan amonno-železitý (Fluka, Švýcarsko)
- D-glukóza monohydrát (Lach-Ner, Česká republika)
- Dihydrát chloridu měďnatého (Lach-Ner, Česká republika)
- Dihydrát chloridu vápenatého (Lach-Ner, Česká republika)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, Česká republika)
- DNA žebříček 100 bp (Nippon Genetics Europe, DEU)
- Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Lach-Ner, Česká republika)
- Glycerol bezvodý (Lach-Ner, Česká republika)
- Heptahydrát síranu hořečnatého (Lach-Ner, Česká republika)
- Hexahydrát chloridu kobaltnatého (Lach-Ner, Česká republika)
- Hexahydrát chloridu manganatého (Lach-Ner, Česká republika)
- Hydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich, Německo)
- Hydroxid sodný (Lach-Ner, Česká republika)
- Chlorid amonný (Lach-Ner, Česká republika)
- Chlorid zinečnatý (Lach-Ner, Česká republika)
- Chlorid železitý (Lach-Ner, Česká republika)
- Chloroform p.a. (Lach-Ner, Česká republika)
- Isopropanol p.a. (Lach-Ner, Česká republika)
- Kvasničný extrakt (HiMedia, Indie)
- Kyselina benzoová (Lach-Ner, Česká republika)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), (Lach-Ner, Česká republika)
- Kyselina sírová (Lach-Ner, Česká republika)
- Kyselina trihydrogenboritá (Lachema, Česká republika)
- Master mix One Taq Hot Start se standardním pufrem (New England BioLabs, GBR)
- Methanol (Lach-Ner, Česká republika)
- Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe, DEU)
- Nutrient Broth (HiMedia, Indie)
- PCR loading Yellow load (Top-Bio, CZE)
- PCR voda (B. Braun Medical, DEU)
- Primery (Generi Biotech, CZE)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Lach-ner, CZE)
- Triton-X 100 (Sigma-Aldrich, Německo)
- γ -butyrolakton (Sigma-Aldrich, Německo)
- δ -valerolakton (Sigma-Aldrich, Německo)

3.2 Použité přístroje

- Analytické váhy (Boeco, Německo)
- Blokový termostat Stuart SBH 200D (Bibby Scientific)
- Centrifuga Hettich EBA 20 (Maneko, Česká republika)
- ELFO zdroj Enduro Power Supplies 300V, Labnet
- Inkubátor IP30 (BioTech, Česká republika)
- Laminární box Aura mini (BioAir-Euroclone, USA)

- Magnetická míchačka Kartell (MERCÍ s.r.o., Česká republika)
- Plynový chromatograf s FID, Thermo Scientific, Trace 1300
- Předvážky Kern EW 620-3NM (Německo)
- Temperovaná třepačka Incubator 1000 (Heidolph, Česká republika)
- Tenziometr KSV Sigma 701
- Termocycler CG1-96 PCR, Corbett Research
- Vizualizační systém c200, Azure Biosystem
- Vortex BENCHMIXER (Benchmark Scientific, Inc., USA)

3.3 Použité mikroorganismy

Pro experimentální část diplomové práce bylo vybráno 6 kmenů bakterií rodu *Aneurinibacillus*. Mezi analyzované kmeny patří jak sbírkové kmeny, tak také izoláty s označeními AFN2 a AH30, které byly získány v rámci disertace Ing. Ivy Buchtíkové, Ph.D. [95]. Izoláty AFN2 a AH30 byly izolovány z aktivovaného kalu v čistírně odpadních vod v Bystřici pod Hostýnem v roce 2019. Zbylé kmeny, konkrétně DSM 5507, DSM 4410, DSM 10154 a DSM 10155, jsou kmeny sbírkovými a byly získány z Leibnizova institutu z německé sbírky DSMZ mikroorganismů a buněčných kultur.

3.4 Uchovávání bakterií

Všechny bakteriální kmeny byly uchovávány ve formě kryokultur v 10% roztoku glycerolu v hlubokomrazícím boxu při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ty byly připraveny v kryozkumavkách, do kterých bylo nejprve napipetováno 0,5 ml 30% roztoku glycerolu, a tyto byly následně uzavřeny a sterilovány. Do sterilních kryozkumavek byly následně v laminárním boxu po 1 ml přidány bakteriální kultury.

3.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Nejprve byla provedena duplexní PCR pro detekci genu *16S rRNA*, jež je typický pro bakteriální DNA, a zároveň také genu *phaC* kódujícímu syntázu třídy I. Tento druh PCR byl prováděn s pomocí dvou párů primerů a byly během něj amplifikovány dvě cílové sekvence zároveň. První pár primerů, 16S-F a 16S-R, sloužil k detekci genu *16S rRNA*. Druhý pár, G-D a G-1R, vymezoval úsek molekuly DNA odpovídající genu *phaC*. Sekvence použitých primerů je možné najít v Tabulka 4. Tato duplexní PCR byla realizovatelná díky tomu, že teplota annealingu je u obou párů primerů shodná a zároveň se velikost ampliconů výrazně liší. Rozdílná velikost ampliconů je důležitá pro pozdější separaci a analýzu za pomoci elektroforézy v agarózovém gelu.

Tabulka 4: Primery použité pro duplexní PCR.

Amplifikovaný gen	Označení	Sekvence primerů (5' - 3')	Teplota Annealingu [°C]	Velikost ampliconu [bp]
<i>16S rRNA</i>	16S-F	AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG	55	1,500
	16S-R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T		
<i>phaC</i>	G-D	GTG CCG CCS YRS ATC AAC AAG T	55	551
	G-1R	GTT CCA GWA CAG SAK RTC GAA		

Složení použité duplexní PCR je uvedené v Tabulka 5. Výsledný objem všech směsí byl 25 μl . Dále byla provedena také negativní kontrola (NC) a pozitivní kontrola (PC). Negativní kontrola neobsahovala žádnou DNA. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA z *C. necator* H16, u níž bylo již dříve prokázáno, že obsahuje gen *phaC* [96]. Teplotní profil provedené duplexní PCR je uveden v Tabulka 6.

Tabulka 5: Složky duplexní PCR a jejich množství.

Složka	Objem [μ l]
Master Mix	12,5
Mg ²⁺	2,6
Primer	4 · 1
DNA	1
PCR H ₂ O	4,9

Tabulka 6: Teplotní profil duplexní PCR.

Krok	Podmínky		
	Počet cyklů	Teplota [$^{\circ}$ C]	Doba trvání [s]
Počáteční denaturace	1	94	30
Denaturace		94	30
Annealing	30	55	30
Prodlužování		68	90
Elongace		68	300
Ochlazování	1	4	60

Další samostatná PCR byla provedena pro potvrzení přítomnosti genu kódujícího PHA syntázu 4. třídy. Pro tento účel byly použity primery s označením phaC_F a phaC_R, které byly navrženy pro detekci syntáz 4. třídy u bakterií rodu *Aneurinibacillus*. Údaje o použitých primerech pro tuto PCR jsou uvedeny v Tabulka 7.

Tabulka 7: Primery použité pro samostatnou PCR.

Amplifikovaný gen	Označení	Sekvence primerů (5' - 3')	Teplota Annealingu [$^{\circ}$ C]	Velikost amplikonu [bp]
phaC 4. třídy	PhaC_F	ACACTGGGTATCATTCCACCGG	55	299
	PhaC_R	GCGGCAATGTTTAGCACGTTTG		

V Tabulka 8 je uvedeno složení směsi pro PCR pro potvrzení přítomnosti genu kódujícího PHA syntázu 4. třídy. I v tomto případě byla provedena pozitivní kontrola (PC), která obsahovala DNA bakterie *Anneurinibacillus*, u níž byla prokázána přítomnost cílového genu, a negativní kontrola (NC), která DNA neobsahovala. Teplotní program této PCR odpovídal teplotnímu programu duplexní PCR (viz Tabulka 6).

Tabulka 8: Složení PCR pro potvrzení přítomnosti genu kódujícího PHA syntázu 4. třídy.

Složka	Objem [μl]
Master Mix	12,5
Primer	2 · 1
DNA	1
PCR H ₂ O	9,5

3.6 Elektroforéza v agarovém gelu

Pro vyhodnocení PCR byla použita elektroforéza v 1,2% agarózovém gelu. K jeho přípravě bylo naváženo 1,8 g agarózy do Erlenmeyerovy baňky, která byla následně zalita 150 ml zředěného TBE pufru (složení TBE pufru viz Tabulka 9). Roztok byl následně 5krát přiveden k varu, až dokud se agaróza zcela nerozpustila. Poté byl roztok ponechán k vychladnutí při laboratorní teplotě. Po dostatečném zchladnutí bylo do roztoku přidáno 7 μl interkalačního barviva Midori Green. Připravený roztok byl nalit do formy s hřebenem a byl ponechán 30 minut ke ztuhnutí.

Tabulka 9: Složení TBE pufru.

Složka	Množství
tris(hydroxymethyl)aminomethan	108 g
H ₃ BO ₃	55 g
EDTA	9,3 g
voda	1000 ml

Po ztuhnutí gelu byl vyjmut hřeben a vzorky byly připraveny k nanesení. Před nanesením bylo 10 μl každého jednotlivého vzorku smícháno s 3 μl nanášecího pufru. Z tohoto objemu bylo do jamky naneseno vždy 10 μl. Stejným způsobem byly naneseny do jamek také pozitivní a negativní kontrola. Do jedné z jamek byly dále aplikovány 4 μl délkového standardu. Připravená gelová forma byla umístěna do vany, zalita pufrům TBE. Následně byla připojena ke zdroji napětí, který byl nastaven na 90 V. Elektroforéza probíhala po dobu 30 minut. Po ukončení elektroforézy byl gel přenesen do UV transiluminátoru a vyfotografován při vlnové délce 302 nm.

3.7 Kultivace bakterií

V průběhu měření diplomové práce byl proces kultivace bakterií opakován za identických podmínek pro jednotlivé kmeny dle postupů popsaných níže.

3.7.1 Příprava inokula

Pro každou kultivaci bylo připraveno inokulum. Nejprve bylo namícháno komplexní médium Nutrient Broth (Tabulka 10) o koncentraci 25 g/l, které bylo následně rozděleno po 50 ml do Erlenmeyerových baněk o objemu 100 ml. Připravená média byla sterilována

a po sterilizaci vytemperována na 50 °C. Vytemperovaná média byla zaočkována příslušným kmenem a umístěna na temperovanou třepačku.

Tabulka 10: Složení inokulačního média (Nutrient Broth).

Chemikálie	c [g/l]
Pepton	10
Masný extrakt	10
NaCl	5

3.7.2 Příprava a složení produkčních médií

Bakteriální kmeny byly kultivovány ve dvou typech médií – v komplexním médiu Nutrient Broth a v minerálním médiu (MM). Složení obou médií je uvedeno v Tabulka 10 a Tabulka 11. Média byla rozdělována po 100 ml do 250ml Erlenmeyerových baněk, které byly následně uzavřeny a sterilizovány.

Tabulka 11: Složení minerálního média.

Chemikálie	c [g/l]
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	9
KH ₂ PO ₄	1,5
NH ₄ Cl	1
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,02
NH ₄ Fe ^(III) citrát	0,0012
Kvasničný extrakt	0,5

Vysterilovaná média byla vytemperována na 50 °C a po sterilaci do nich byly přidány zdroje uhlíku, a v případě minerálních médií také roztok stopových prvků TES II (Tabulka 12). Následně byla média zaočkována. Inokulum představovalo 10 % objemu baňky. Připravené baňky byly umístěny na temperovanou třepačku.

Tabulka 12: Složení roztoku stopových prvků.

Chemikálie	c [g/l]
EDTA	50
FeCl ₃	8,3
ZnCl ₂	0,84
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	0,13
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,1
MnCl ₂ · 6 H ₂ O	0,016
H ₃ BO ₃	0,1

3.7.3 Zdroje uhlíku použité pro produkci PHA

Jako prekurzory při produkci polyhydroxyalkanoátů byly využity glukóza (GLU), glycerol (GLY), 1,4-butandiol (1,4-BD), 1,5-pentandiol (1,5-PD), γ -butyrolakton (γ -BL) a δ -valerolakton (δ -VL). V případě glukózy a glycerolu byly tyto zdroje přidávány do produkčních médií samostatně a jejich konečná koncentrace činila 20 g/l. V případě zbylých prekurzorů byly tyto přidávány spolu s glukózou. Jak prekurzor, tak glukóza byly do daného média přidány v množství odpovídajícím konečné koncentraci 4 g/l. V Tabulka 13 je znázorněno složení jednotlivých použitých médií. Veškeré prekurzory a zdroje uhlíku, s výjimkou glycerolu, který byl přidán ještě před sterilací, byly přidány do médií až těsně před zaočkováním narostlou kulturou.

Tabulka 13: Přehled složení produkčních médií s použitými prekurzory.

Médium	Prekurzor	Zkratka	Koncentrace v médiu [g/l]
Minerální	Glukóza	GLU	20
	Glycerol	GLY	20
	Glukóza + δ -valerolakton	GLU + δ -VL	4 + 4
	Glukóza + 1,5-pentandiol	GLU + 1,5-PD	4 + 4
	Glukóza + γ -butyrolakton	GLU + γ -BL	4 + 4
	Glukóza + 1,4-butandiol	GLU + 1,4-BD	4 + 4
Nutrient Broth	Glukóza + δ -valerolakton	GLU + δ -VL	4 + 4
	Glukóza + 1,5-pentandiol	GLU + 1,5-PD	4 + 4
	Glukóza + γ -butyrolakton	GLU + γ -BL	4 + 4
	Glukóza + 1,4-butandiol	GLU + 1,4-BD	4 + 4
	bez zdroje uhlíku		

3.7.4 Proces kultivace

Všechna vysterilovaná inokulační média byla před zaočkováním vytemperována na 50 °C. Následně byla postupně zaočkována ve sterilním laminárním boxu právě rozmraženými bakteriálními kryokulturami. Baňky pak byly umístěny na temperovanou třepačku s parametry nastavenými na 50 °C a 180 rpm, kde byly ponechány k růstu 24 hodin.

Všechna připravená produkční média byla vytemperována na 50 °C. Do nich byly následně přidány veškeré prekurzory a chybějící složky (viz Tabulka 13). Bylo dbáno na to, aby teplota jednotlivých médií pokud možno během úkonů nepoklesla. Následně po přidání veškerých složek, bylo do připravených médií ve sterilním laminárním boxu převedeno 10 ml narostlé kultury. Média s přidanou kulturou byla umístěna na třepačku při 180 rpm a 50 °C, kde byla kultivována po 48 hodin.

3.8 Stanovení obsahu PHA

Po ukončení kultivace byla stanovována a hodnocena získaná biomasa. K tomu bylo využito jak gravimetrické stanovení, tak plynová chromatografie.

3.8.1 Gravimetrická analýza biomasy

Po uplynutí 72 hodin byla kultivace ukončena. Ze všech produkčních médií bylo odebráno celkem 20 ml (vždy po 10 ml) do malých centrifugačních zkumavek. Obsah zkumavek byl následně centrifugován při 6000 rpm, a to po dobu 5 minut. Následně byl supernatant odlit a k usazené biomase bylo přidáno 5 ml destilované vody. Biomasa byla rozsuspendována a za stejných podmínek opět centrifugována. Supernatant byl odlit a biomasa byla uložena k sušení do konstantní hmotnosti při 70 °C. Po ukončení sušení byl obsah jednotlivých zkumavek zvážen na analytických vahách.

3.8.2 Plynová chromatografie

Aby bylo možné chromatograficky stanovit vzniklé PHA, byly vzorky nejprve převedeny na těkavé methylestery pomocí esterifikace. Do krimpovacích vialek bylo naváženo 5–11 mg usušené biomasy (všechny vzorky byly testovány v duplikátech). Do každé vialky byl následně přidán 1 ml chloroformu a 0,8 ml esterifikační směsi tvořené 15% kyselinou sírovou v methanolu s vnitřním standardem kyseliny benzoové o koncentraci 5 mg/ml. Krimpovací vialky byly hermeticky uzavřeny a umístěny do termobloku vyhřátého na 94 °C, kde byly ponechány po dobu 3 hodin, během kterých byl polymer rozštěpen na jednotlivé monomery a esterifikován.

Po uplynutí doby esterifikace byly vialky z termobloku vyjmuty a ponechány při laboratorní teplotě k vychladnutí. V mezičase byly připraveny větší šroubovací vialky, do kterých bylo napipetováno 0,5 ml 50 mM hydroxidu sodného. Obsah ochlazených vialek byl převeden do větších vialek. Vialky byly uzavřeny a jejich obsah intenzivně protřepán. Po protřepání bylo patrné rozdělení obsahu do dvou fází. Pro další analýzu je potřebná fáze spodní, tedy chloroformová. Z té bylo odebíráno 50 µl, které byly napipetovány do malých předem připravených šroubovacích vialek, které obsahovaly 900 µl isopropanolu. Následně byly vialky uzavřeny a analyzovány pomocí plynové chromatografie, jež disponuje plamenově ionizačním detektorem (GC-FID).

3.9 Screening produkce biosurfaktantů

V průběhu studie byla kromě jiného u daných kmenů testována také schopnost produkovat biosurfaktanty. Za tímto účelem byly provedeny testy emulgační aktivity supernatantů a měření povrchového napětí metodou Du-Noüy-Ring popsané v kapitolách 3.9.1 a 3.9.2.

Pro provedení screeningu produkce biosurfaktantů byly využity supernatanty získané po ukončení kultivací prováděných na minerálních médiích obsahujících glukózu (20 g/l) a glycerol (20 g/l) a médiu Nutrient Broth bez přídavku prekurzoru.

3.9.1 Testování emulgační aktivity supernatantů

Do skleněných zkumavek byly napipetovány vždy 3 ml testovaného supernatantu a 3 ml hexanu. Následně byly zkumavky zašroubovány a po dobu jedné minuty byl obsah vortexován.

Jako negativní kontrola sloužila destilovaná voda a minerální a Nutrient Broth média bez přídavků zdroje uhlíku. Do zkumavek byly tedy pipetovány opět 3 ml hexanu a 3 ml destilované vody nebo příslušného MM či NB média.

Pozitivní kontrolou byl pak 5% Triton X-100. Ke 3 ml hexanu byly přidány 3 ml 5% roztoku Tritonu X-100. Obsah byl vortexován za stejných podmínek a všechny zkumavky byly následně uloženy při laboratorní teplotě na 24 hodin.

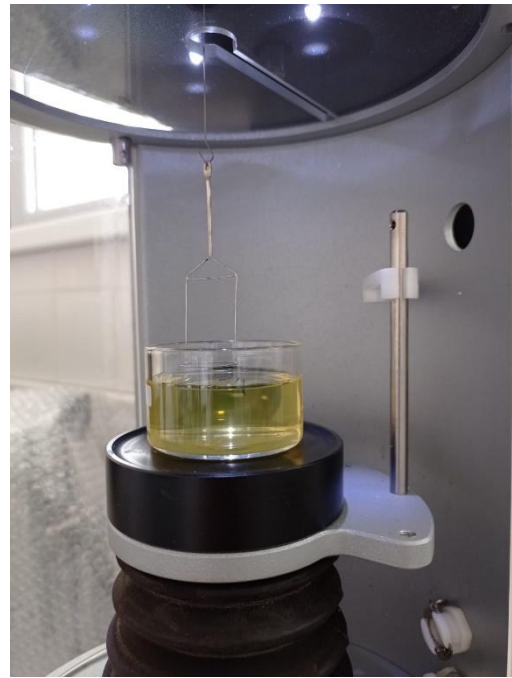
Po uplynutí stanovené doby byla změřena celková výška kapaliny (h_{kapaliny}) a výška emulzní vrstvy (h_{emulze}) v mm. Ze získaných hodnot byl z rovnice (1) vypočítán emulgační index E_{24} :

$$E_{24} = \frac{h_{\text{emulze}}}{h_{\text{kapaliny}}} \cdot 100 \% \quad (1)$$

Jako hranici pro určení, zda-li je organismus dobrým producentem biosurfaktantů, lze použít emulgační index 50 %. Pokud je vytvořená emulze stabilní a emulgační index je roven nebo vyšší než stanovená hranice, jedná se o dobrého producenta biosurfaktantů [97].

3.9.2 Měření povrchového napětí metodou Du-Noüy-Ring

Na měření povrchového napětí byl použit automatizovaný tenziometr KSV, Sigma 701 (viz Obrázek 9 vlevo). Princip měření pomocí tenziometru spočívá ve stanovení síly, kterou je potřeba vynaložit na protažení platinového kroužku skrz mezifázové rozhraní vzduch-kapalina (viz Obrázek 9 vpravo). Nejprve byla provedena kalibrace přístroje. Po kalibraci na něm byly nastaveny příslušné parametry. Následně bylo do nízké kádinky nalito cca 40–50 ml měřeného supernatantu. Platinový kroužek, který slouží k měření povrchového napětí, byl pečlivě vyžihán, aby bylo zajištěno, že nebude obsahovat zbytky předešlých vzorků, a právě měřený vzorek tak nebude kontaminován. Po vyžihání byl kroužek zavěšen do úchytu a bylo spuštěno měření. Doba měření byla nastavena na 5 minut. Pro každý vzorek bylo naměřeno 10 hodnot, ze kterých byl vypočten aritmetický průměr.



Obrázek 9: Tenziometr (vlevo), detail platinového kroužku (vpravo).

Pokud měřený vzorek vykazuje snížení povrchového napětí až pod hranici $40 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$, lze bakterii, která byla v daném médiu kultivována, považovat za dobrého producenta biosurfaktantů [98; 99]. Spolu se supernatanty byly proměřeny také negativní kontroly (jednotlivá média) a pozitivní kontrola (5% roztok Tritonu X-100).

3.10 Screening produkce enzymů

Nejprve byla připravena inokula jednotlivých kmenů bakterie *Aneurinibacillus*. Následně byla připravena pevná média do Petriho misek v závislosti na druhu zkoumaného enzymu. Média byla před nalitím do Petriho misek sterilována. Na připravená média bylo v každé misce nanášeno vždy 10 μl kultury.

Pro zjištění produkce proteáz obsahovala média 8 g/l Nutrient Broth, 10 g/l sušeného odstředěného mléka a 17 g/l agaru. Přítomnost proteáz je zde dokazována rozkladem kaseinu, který se projeví vznikem průhledných zón kolem kolonie bakterií.

V případě lipáz probíhaly kultivace na médiu tvořeném 32,15 g/l Spirit blue agarem, ke kterému bylo po sterilaci přidáno 30 ml/l sterilního slunečnicového oleje. Médium aplikované do Petriho misek bylo modré barvy. Produkce lipáz je v tomto případě ověřena odbarvením agaru.

Amylázy byly testovány na pevném médiu obsahujícím 1 g/l kvasničného extraktu, 5 g/l rozpustného škrobu a 17 g/l agaru. Po kultivaci byl agar obarven pomocí Lugolova roztoku, který obsahoval 100 g/l jodidu draselného a 50 g/l elementárního jódu rozpuštěných v destilované vodě. Produkce amyláz se projevuje vznikem světlejších zón okolo kolonií.

Pro testování pektináz byla média složena z kvasničného extraktu (1 g/l), hydrogenfosforečnanu sodného (6 g/l), dihydrogenfosforečnanu draselného (3 g/l) a pektinu (5 g/l). Stejně jako v případě amyláz byl agar po kultivaci barven pomocí Lugolova roztoku.

U xylanáz kultivace probíhala na pevném médiu složeném z 1 g/l kvasničného extraktu, 5 g/l xylanu a 17 g/l agaru. Po skončení kultivace byla média barvena Kongo červení. Výskyt xylanáz zapříčiní vznik odbarvených zón okolo kolonií bakterií.

Kultivace na médiu sestávajícím z 1 g/l kvasničného extraktu, 5 g/l karboxymethylcelulázy a 17 g/l agaru byla prováděna pro zjištění aktivity celuláz. I v tomto případě byla média po kultivaci barvena Kongo červení a stejně jako v předchozím případě se při výskytu celuláz očekává výskyt odbarvených zón v blízkosti bakterií.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Polyhydroxyalkanoáty jsou zkoumány jako možná ekologičtější biologicky odbouratelná náhrada konvenčních plastů, které zatěžují životní prostředí. PHA jsou produkovány řadou bakterií, a právě mikroorganismus použitý pro daný bioprocес dokáže ovlivnit výsledné PHA, které získáme. Obecně lépe prozkoumané jsou bioprocесy využívající mezofilní mikroorganismy. Jejich použití je však zatíženo různými komplikacemi, mezi které patří také zvýšené riziko kontaminace procesu jinými mezofilními druhy. Proto velkou pozornost přitahuje možnost provozu fermentačních procesů při vyšších teplotách. Aby byla tato fermentace proveditelná, je potřeba použít termofilní mikroorganismy. A právě takovými jsou některé bakterie rodu *Aneurinibacillus* [100].

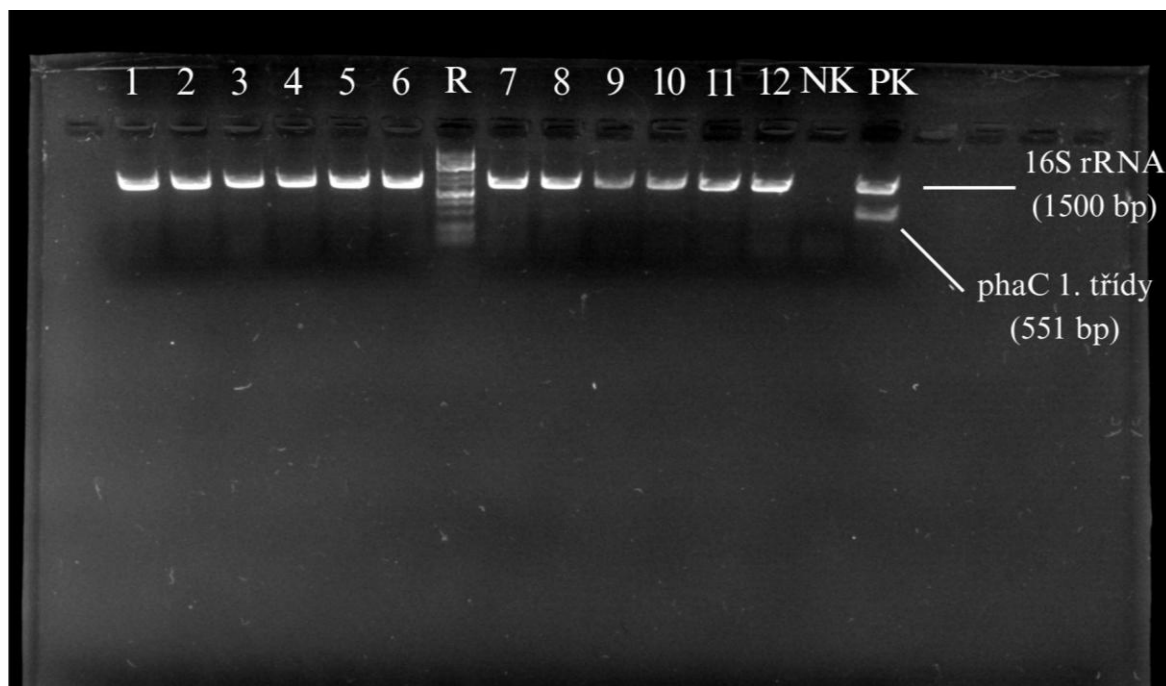
V předchozích studiích bylo zjištěno, že bakterie rodu *Aneurinibacillus* jsou nejen schopny syntetizovat nejběžnější z PHA, tedy poly(3-hydroxybutyrát), ale dokáží v přítomnosti vhodných substrátů produkovat také různé kopolymery. Právě kopolymery se svými mechanickými vlastnostmi nejvíce podobají běžným petrochemickým plastům [100]. Schopnost bakterií rodu *Aneurinibacillus* metabolicky zpracovávat takové množství rozličných substrátů a prekurzorů zřejmě souvisí s jejím bohatým biochemickým aparátem a nízkou substrátovou specifitou PHA syntázy co se délky monomerního řetězce a polohy hydroxyskupiny týče [101].

V rámci této závěrečné práce bylo provedeno srovnání vybraných izolátů a sbírkových kmenů tohoto bakteriálního rodu, co se produkce PHA týče. Jedním z cílů byla produkce kopolymerů, které jsou příslibem lepších fyzikálních a mechanických vlastností konečného materiálu. Pro tuto produkci byly využity specifické prekurzory, konkrétně některé laktony a dioly, které byly přidávány do kultivačního média spolu s dalším zdrojem uhlíku.

4.1 Ověření schopnosti produkce PHA na úrovni genotypu

Dle postupů popsanych v kapitolách 3.5 a 3.6 byla na úrovni genotypu ověřena schopnost kmenů bakterie *Aneurinibacillus* akumulovat polyhydroxyalkanoáty. To bylo dosaženo potvrzením přítomnosti genu pro PHA syntázu (*phaC*), která je zodpovědná za syntézu PHA [103]. Konkrétně byla zkoumána přítomnost genů pro PhaC 1. třídy a PhaC 4. třídy.

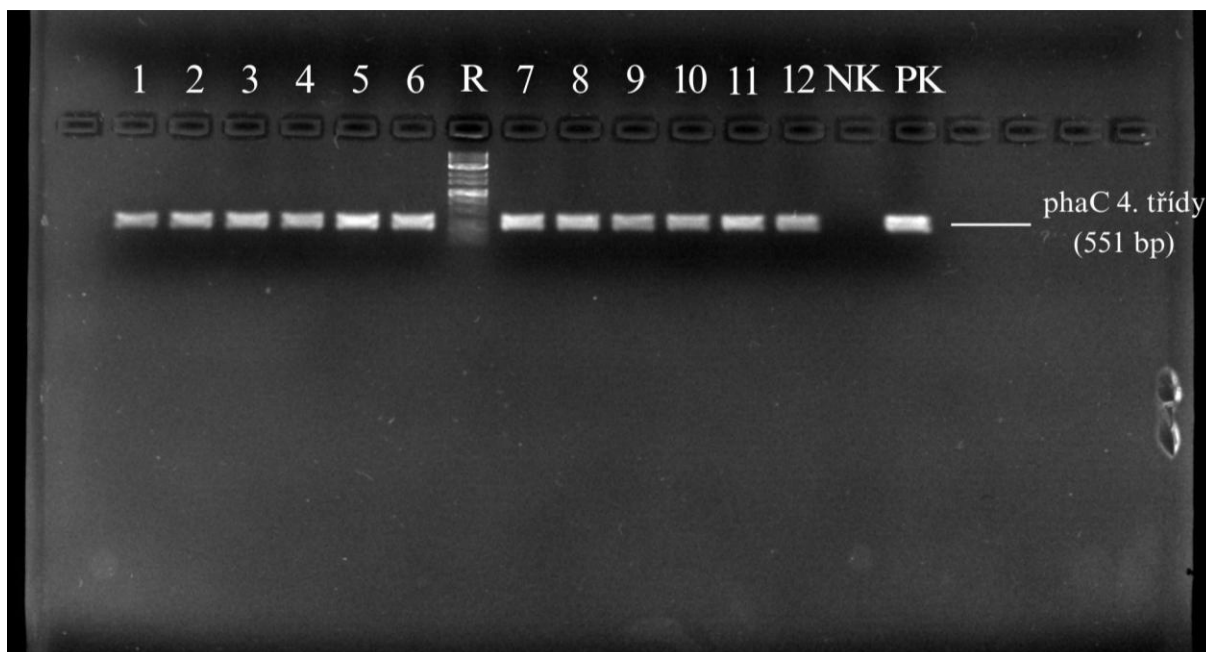
Nejprve byla provedena izolace DNA. Pro ověření úspěšné izolace byla potvrzena přítomnost genu *16S rRNA*, který je specifický pro všechny bakteriální buňky. Toho bylo dosaženo pomocí primerů 16S-F a 16S-R, které zajistily amplifikaci tohoto fragmentu o velikosti 1500 bp. Jak je z Obrázek 10 patrné, přítomnost tohoto genu byla potvrzena, což znamená, že izolace DNA byla úspěšná.



Obrázek 10: Elektroforéza produktů duplexní PCR v agarózovém gelu - detekce genu 16S rRNA a *phaC* 1. třídy; NK - negativní kontrola, PK - pozitivní kontrola (*C. necator* H16), R - DNA žebříček.

Dále byly využity primery G-D a G-1R, které zajistily amplifikaci fragmentu genu *phaC*. Přítomnost genu *phaC* nebyla potvrzena. Z toho vyplynulo, že zkoumané kmeny neobsahují syntázy PHA 1. třídy. Ke stejnému závěru došli ve své studii také Kamli a kol., kteří zkoumali biosyntetický potenciál kmenů *Aneurinibacillus*. V žádném genomu nebyly během jejich studie zjištěny oblasti PKS (polyketidové syntázy) typu I a II [104]. Jako pozitivní kontrola byla v této práci pro testování přítomnosti genu *phaC* využita bakterie *Cupriavidus Necator* H16, u které byla přítomnost tohoto genu potvrzena již v dřívějších studiích [105].

Studována byla také přítomnost genu pro PhaC 4. třídy pomocí jednoduché PCR. Z Obrázek 11 je patrné, že všechny vzorky gen pro PHA syntázu 4. třídy obsahovaly. Jako pozitivní kontrola zde byla využita DNA izolována rovněž z bakterie *Aneurinibacillus*. Přítomnost genů zodpovědných za syntázu PHA třídy IV u bakterie patřící k rodu *Aneurinibacillus*, ve své studii byli schopni potvrdit také Musilová a kol., kteří se zabývali zkoumáním bakterie *Aneurinibacillus thermoaerophilus* CCM 8960. V rámci této práce sekvenovali a sestavili genom bakterie a identifikovali některé její důležité genetické vlastnosti [106].



Obrázek 11: Elektroforéza produktů PCR v agarózovém gelu - detekce genu *phaC* 4. třídy; NK - negativní kontrola, PK - pozitivní kontrola (*Aneurinibacillus*), R - DNA žebříček

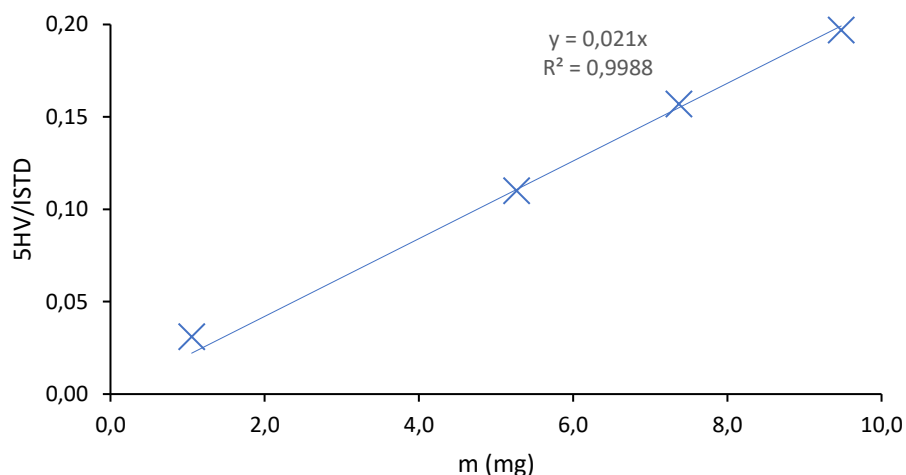
Pomocí metod genetického screeningu byla ověřena přítomnost genů pro syntázu PHA 4. třídy a byl tak u zkoumaných kmenů potvrzen potenciál produkovat PHA. Tyto metody by však samy o sobě nestačily k určení, zda bude daný kmen opravdu PHA kumulovat, jelikož není jasné, zda je potvrzený gen exprimován. Výsledky těchto testů jdou tedy ruku v ruce s analýzami produktů kultivací jednotlivých kmenů, které byly podrobněji popsány v kapitole 4.2.

4.2 Produkce PHA kopolymerů bakteriálními kmeny rodu *Aneurinibacillus*

Cílovými produkty biosyntézy pomocí bakterií rodu *Aneurinibacillus* jsou kopolymery PHA, které mají fyzikální a mechanické vlastnosti nejvýhodnější pro průmyslové použití. K jejich produkci je potřeba využít specifické prekurzory. Konkrétně se jedná o laktony a dioly, které byly zvoleny na základě předchozí studie [102]. Z řady laktonů byly pro biosyntézu použity γ -butyrolakton a δ -valerolakton, jako zástupci diolů byly zařazeny 1,4-butandiol a 1,5-pentandiol.

Pro produkci byla zvolena dvě média, a to Nutrient Broth a minerální médium. Pro obě média byly zvoleny kombinace zdroje uhlíku a také prekurzorů určených ke zkoumání. Přesné rozdělení složek a jejich koncentrací pro jednotlivá média je uvedeno v Tabulka 13.

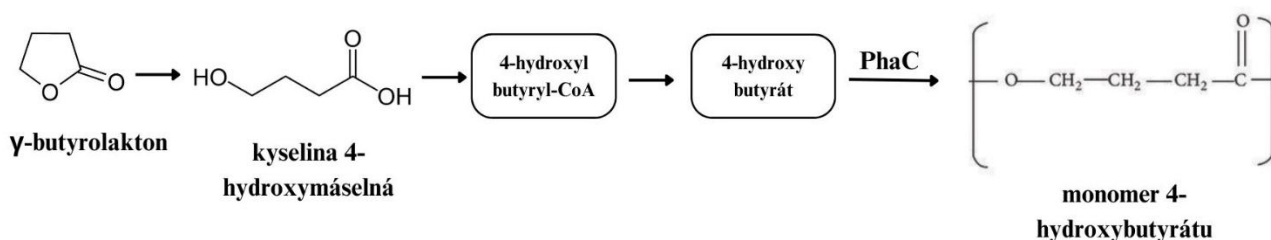
Po ukončení jednotlivých kultivací byl vždy kvantitativně i kvalitativně stanoven obsah PHA pomocí plynové chromatografie. K přesnému stanovení obsahu jednotlivých složek biomasy byla využita kalibrační závislost, která byla sestavena za použití standardů, a ze které byly obsahy dopočítány. Postup přípravy standardů pro její stanovení je obdobný jako příprava vzorků pro kvalitativní stanovení PHA pomocí plynové chromatografie, která je popsána v kapitole 3.8.2. Do krimpovacích vialek byly před esterifikací pipetovány příslušné laktony, tedy γ -BL a δ -VL, v rozsahu 1–9 μ l. Příklad kalibrační křivky je uveden v Graf 1.



Graf 1: Ukázka kalibrační závislosti (δ -VL).

4.2.1 γ -butyrolakton

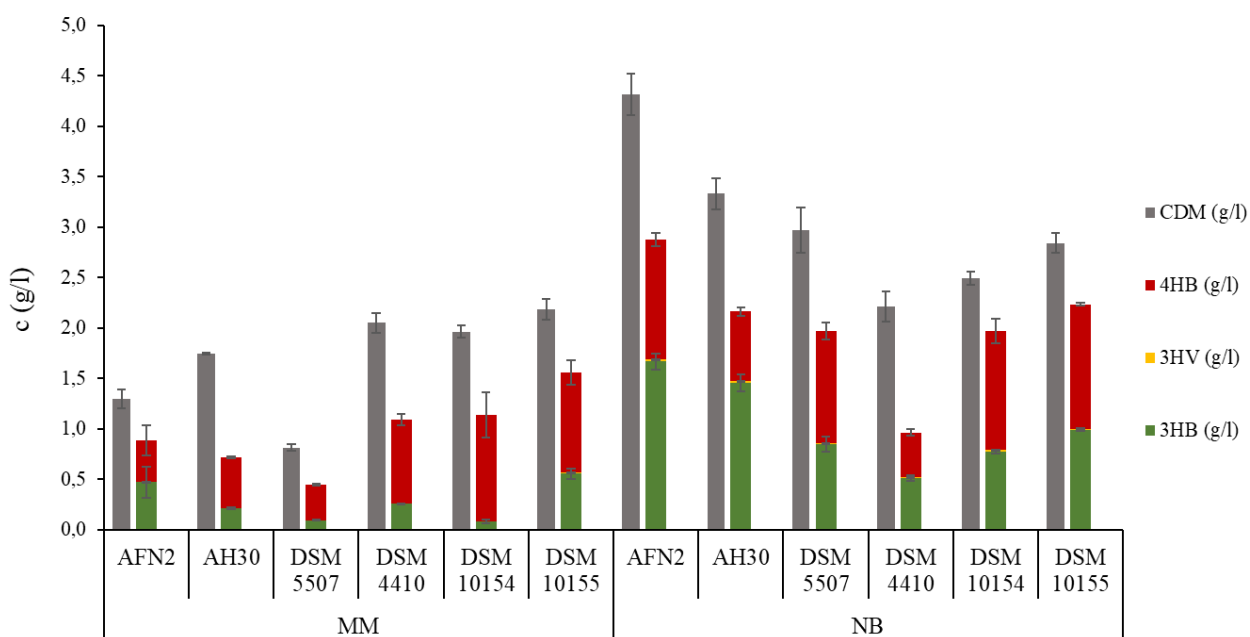
Prvním ze zkoumaných prekurzorů byl γ -butyrolakton. Ten byl do kultivačních médií přidáván spolu s glukózou, pro usnadnění růstu bakterie. Obě složky byly přidávány do médií v koncentraci 4 g/l (Tabulka 13). Γ -butyrolakton je prekurzorem 4-hydroxybutyrátu (4HB). Kopolymery obsahující jak monomery 3-hydroxybutyrátu (3HB), tak monomery 4HB mají zvýšené prodloužení a pevnost v tahu [107]. Způsob metabolického využití γ -butyrolaktonu je naznačen na Obrázek 12.



Obrázek 12: Metabolického využití γ -butyrolaktonu [108].

Jak je z Obrázek 13 patrné, k syntéze většího množství PHA docházelo v médiu Nutrient Broth (NB). U všech sledovaných kmenů byla zaznamenána jak syntéza klasického monomeru 3-hydroxybutyrátu (3HB), tak i monomeru 4-hydroxybutyrátu (4HB), který byl očekáván v souvislosti s přidáním prekurzoru γ -butyrolaktonu. U většiny kmenů obsah 4HB dokonce převyšoval množstvím obsah monomerů 3HB. To je vidět zejména u kultivací prováděných na médiu NB, kde obsah 4HB převyšuje 3HB výrazně u kmenů AH30, DSM 5507, DSM 4410 a DSM 10154. Podobný trend si v minerálním médiu potom drží kmeny DSM 5507 a DSM 10154, ačkoliv rozdíl v množství daných monomerů už není tak výrazný. U všech kmenů byla při kultivaci na NB médiu zaznamenána také tvorba monomeru 3HV, ačkoli jen v zanedbatelném množství. V případě minerálního média bylo 3HV zaznamenáno pouze u kmenů AFN2 a DSM 10155 rovněž v zanedbatelném množství.

K nejvyššímu nárůstu biomasy došlo jednoznačně u kmene AFN2 při kultivaci na médiu Nutrient Broth, a to konkrétně 4,32 g/l. Produkce kopolymeru P(3HB-co-4HB) se u tohoto kmene vyšplhala až na 2,88 g/l. Co se týče poměrného složení monomerů, které zde byly detekovány, tak 3-hydroxybutyrát tvořil téměř 60 mol.% z celkového obsahu PHA. Frakce tvořící 4-hydroxybutyrát se pohybovala těsně nad hranicí 40 mol.%. Kromě 3HB a 4HB obsahovala biomasa také 3HV, které však tvořilo pouze něco okolo 0,7 mol.%. Nejmenší nárůst biomasy byl naopak zaznamenán u kmene DMS 5507 při kultivaci na minerálním médiu. Celkový obsah biomasy zde činil pouze 0,82 g/l s produkcí kopolymeru 0,45 g/l (tedy přibližně 6krát méně). V tomto případě však obsah 4HB převažoval nad obsahem 3HB. 4HB se v tomto případě pohybovalo okolo 77,5 mol.% oproti 3HB, jehož množství se vyšplhalo na 21,5 mol.%. Obsah 3HV u tohoto kmene detekován nebyl.



Obrázek 13: Kultivace bakteriálních kmenů v komplexním médiu Nutrient Broth (NB) a minerálním médiu (MM) s obsahem glukózy (4 g/l) a γ -butyrolaktonu (4 g/l).

Použitím γ -butyrolaktonu jako prekurzoru pro syntézu kopolymeru P(3HB-co-4HB) se zabývala ve své disertační práci také paní doktorka Buchtíková, která kromě jiného prováděla testy rovněž s bakteriemi rodu *Aneurinibacillus* [109]. Při těchto pokusech činila koncentrace γ -butyrolaktonu jako prekurzoru 8 g/l a jednalo se o jediný zdroj uhlíku při kultivaci oproti koncentraci 4 g/l, která byla použita pro experimenty v této práci v kombinaci s glukózou (viz Tabulka 13). Testovány byly celkem 3 izoláty, z nichž jeden (s označením K2) byl schopen produkovat kopolymer se zastoupením necelých 64 mol.% 4HB. Další dva izoláty (H1 a H2) prokázaly vyšší produkci kopolymeru se zastoupením 4HB až 84 mol.% [109]. Těmto výsledkům se v případě této diplomové práce blíží nejvíce produkce na minerálním médiu za využití sbírkových kmenů DSM 5507 a DSM 4410, u kterých byla produkce 4HB stanovena na 78,6 mol.% a 76,3 mol.%. Izolát AH30 rovněž prokázal schopnost produkce tohoto kopolymeru s vysokým podílem 4HB, a to konkrétně 70,0 mol.%, což je

o něco málo více než v případě izolátu K2. Téměř stejné výsledky jako izolát K2 pak prokázal sbírkový kmen DSM 10155, u nějž dosáhl podíl frakce 4HB 63,9 mol.%. U sbírkového kmene DSM 10154 byla naopak zaznamenána vyšší produkce 4HB než u všech předchozích testovaných kmenů a izolátů. Podíl 4HB se v tomto případě vyšplhal až na téměř 93 mol.%.

Buchtíková a kol. rovněž zkoumali schopnost produkce kopolymerů pomocí kmene H1 bakteriálního rodu *Aneurinibacillus*. Jako jeden z použitých prekurzorů byl zvolen také γ -butyrolakton, který byl aplikován jako jediný zdroj uhlíku v koncentraci 8 g/l. Výsledný podíl 4HB ve vzniklém kopolymeru byl stanoven na 63,35 mol.% [110]. To je výsledek mírně nižší než obsahy zaznamenané u většiny námi testovaných kmenů (s výjimkou izolátu AFN2), ale stále srovnatelný.

Miranda de Sousa Dias a kol. studovali produkci poly(3-hydroxybutyrátu-co-4-hydroxybutyrátu) na bakterii *Paraburkholderia sacchari*. Jako prekurzor pro produkci monomerů 4HB byl do kultivačního média přidáván γ -butyrolakton o koncentraci 1,5 g/l. Frakce 4HB ve výsledném kopolymeru v tomto případě činila pouze 20,8 mol.% [111]. Toto množství 4HB je výrazně nižší oproti frakcím tohoto monomeru, které byly zaznamenány v průběhu experimentů této práce, kde nejnižší podíl činil 31,8 mol.% u izolátu AH30 při kultivaci na Nutrient Broth médiu a nejvyšší téměř 93 mol.% u sbírkového kmene DSM 10154 kultivovaném na minerálním médiu. Je však důležité podotknout, že koncentrace prekurzorů, která byla pro kultivace u *Paraburkholderia sacchari* použita byla nižší než u experimentů v této práci.

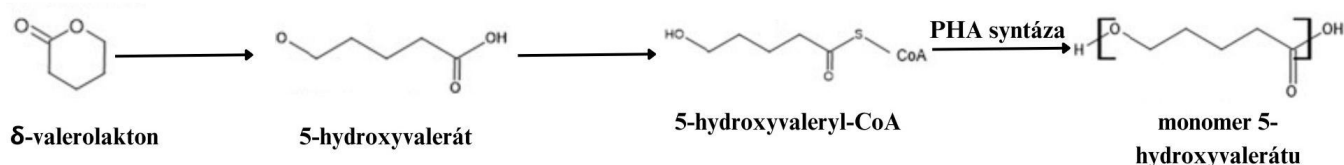
Kim a kol. si pro své studie vybrali bakterii *Cupriavidus necator*. Jako zdroj uhlíku byly pro tento experiment použity fruktóza a γ -butyrolakton, přičemž koncentrace fruktózy se měnila v závislosti na koncentraci použitého γ -butyrolaktonu. Celková koncentrace zdroje uhlíku zde však vždy byla 20 g/l. V případě, kdy byla jako jediný zdroj uhlíku (tedy celých 20 g/l) použita fruktóza, vznikl pouze homopolymer 3HB. Se zvyšujícím se obsahem γ -butyrolaktonu v médiu se pak zvyšoval také podíl frakce 4HB ve vznikajícím kopolymeru, a to od 0,38 mol.% až po 27,4 mol.%. Ze studie rovněž vyplynulo, že buňky *Cupriavidus necator* jsou pravděpodobně inhibovány vysokými koncentracemi γ -butyrolaktonu (nad 6 g/l) [112]. Ačkoliv je potřeba brát v potaz různé koncentrace použitých zdrojů uhlíku a případný prostor pro optimalizaci této metody, pro produkci kopolymeru P(3HB-co-4HB) se jako vhodnější jeví použití bakterií rodu *Aneurinibacillus*.

Amirul a kol. ve své studii využili bakterii *Cupriavidus* USMAA1020, která byla izolována z jezera Kulim v Malajsii. Jako jediný zdroj uhlíku pro své experimenty zvolili γ -butyrolakton. Provedli sérii testů, přičemž se měnila koncentrace γ -butyrolaktonu, a to v rozmezí od 2,5 g/l do 20,0 g/l. S rostoucí koncentrací γ -butyrolaktonu rostl také procentuální podíl frakce 4HB v získaném kopolymeru. Nejnižší zjištěné množství činilo 25 mol.% 4HB při kultivaci s obsahem γ -butyrolaktonu 2,5 g/l. Nejvyšší obsah 4HB byl naopak zaznamenán při kultivaci s γ -butyrolaktonem o koncentraci 20,0 g/l, a to konkrétně 60 mol.% [113]. Tato bakterie se zdá být slibným producentem kopolymeru P(3HB-co-4HB). Podíl frakce 4HB v kopolymeru dosahuje podobných hodnot, jako v této práci. Nicméně je potřeba vzít v úvahu fakt, že v těchto experimentech byla použita podstatně vyšší koncentrace γ -butyrolaktonu pro dosažení vyššího podílu 4HB v kopolymeru oproti experimentům v této diplomové práci. Jak autoři ve své studii uvádějí, zvýšení koncentrace γ -butyrolaktonu v kultivačním médiu vedlo ke zvýšení frakce

4HB v kopolyesteru, ale zároveň bylo spojeno s poklesem molekulové hmotnosti P(3HB-co-4HB) [113].

4.2.2 δ -valerolakton

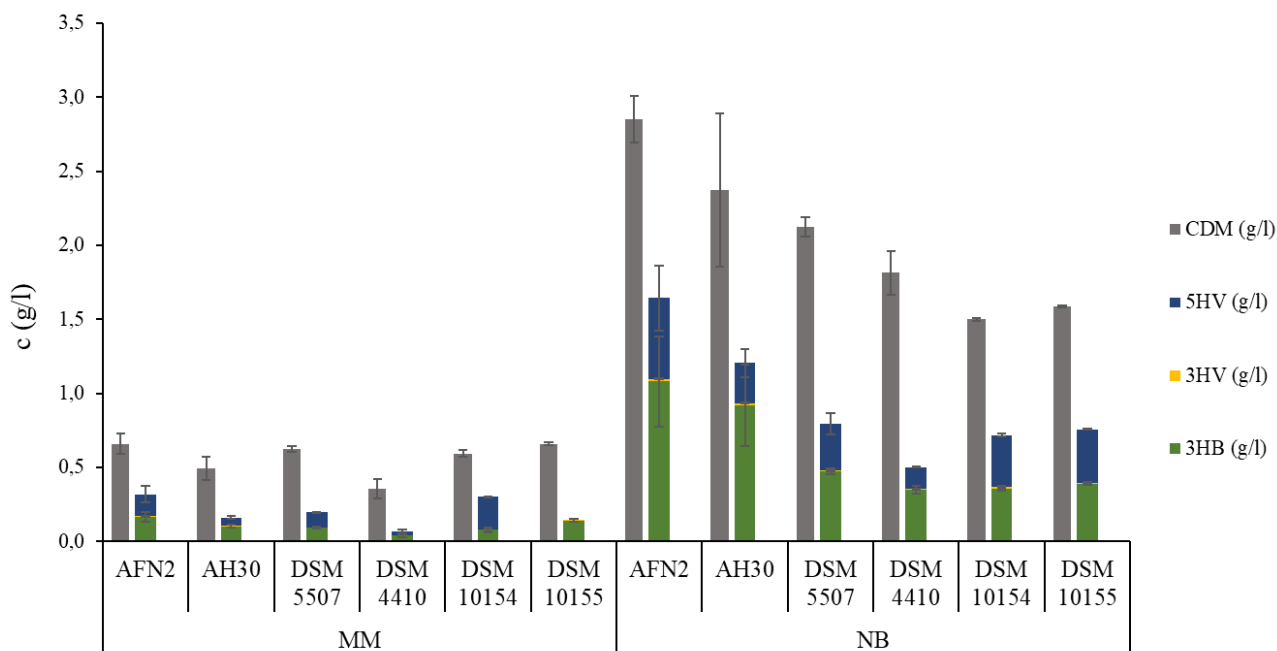
Dalším z laktonů, které byly použity jako prekurzor pro biosyntézu kopolymerů, je δ -valerolakton, který byl do médií přidán podle složení zobrazeném v Tabulka 13. Ten je, jak bylo zjištěno v předchozích studiích, prekurzorem pro tvorbu monomeru 5-hydroxyvalerát (5HV). Způsob metabolického využití tohoto prekurzoru je naznačen na Obrázek 14. Kopolymery P(3HB-co-5HV), které ve své struktuře obsahují monomerní jednotky 5HV vykazují vysokou pevnost v tahu a prodloužení při přetržení. Přítomnost 5HV v polymeru také zlepšuje schopnost degradace pomocí lipáz [114].



Obrázek 14: Metabolické využití δ -valerolaktonu jako prekurzoru pro tvorbu monomeru 5-hydroxyvalerátu [115].

Stejně jako v případě kultivace na γ -butyrolaktonu je možné pozorovat, že k nárůstu biomasy docházelo ve větší míře při kultivacích v NB médiu (viz Obrázek 15). I v tomto případě byla u všech kmenů zaznamenána syntéza tradičního monomeru 3HB. Kromě něj byla pozorována také syntéza monomerů 5HV s výjimkou kultivace kmene DSM 10155 v minerálním médiu, kde 5HV nebylo detekováno mezi produkty. Zde však množství 5HV obsažené ve vznikajícím kopolymeru nepřesahovalo množství 3HB. Na rozdíl od předchozího případu byly mezi produkty u všech kmenů při kultivacích v obou médiích detekovány monomery 3HV. Ty se zde nacházely v mírně vyšším množství, které ale nedosahovalo ani 2 mol. % z celkového obsahu PHA a je tedy zanedbatelné.

Nejvyšší nárůst biomasy byl detekován u kmene AFN2 kultivovaném v médiu NB. Tento výsledek se shoduje s nejvyšší zaznamenanou produkcí biomasy i v předchozím případě. Celkové množství u AFN2 v médiu NB dosáhlo 2,85 g/l a celkový obsah PHA činil 1,64 g/l. Z toho cca 65 mol.% bylo tvořeno monomery 3HB a 34 mol.% monomery 5HV. Množství 3HV se pohybovalo okolo 1 mol.%. Nejnižší nárůst biomasy byl zaznamenán při kultivaci kmene DSM 4410 v minerálním médiu, kdy její celkový obsah dosáhl pouze 0,36 g/l. Celkový obsah PHA pak byl stanoven na pouhých 0,07 g/l, z čehož vyplývá, že tento producent pravděpodobně není nejvhodnějším adeptem pro utilizaci δ -valerolaktonu jako prekurzoru pro produkci kopolymeru.



Obrázek 15: Kultivace bakteriálních kmenů v komplexním médiu Nutrient Broth (NB) a minerálním médiu (MM) s obsahem glukózy (4 g/l) a δ -valerolaktomu (4 g/l).

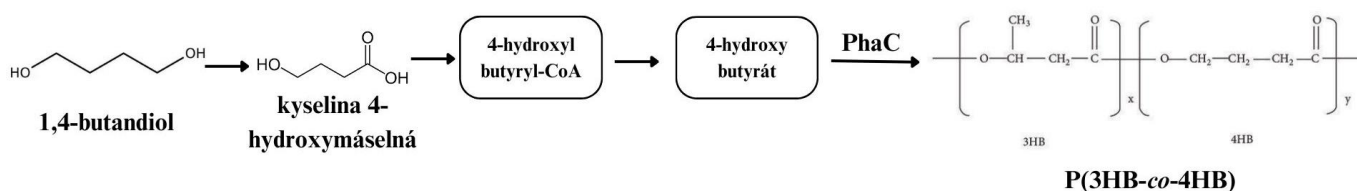
Ve své studii Řeháková a kol. použili jako prekurzor δ -valerolakton v kombinaci s glycerolem na rozdíl od glukózy, která byla přidávána v našem případě. Kultivace prováděli v minerálním médiu. Mezi testovanými kmeny studie byly rovněž kmeny AFN2 a AH30, které byly použity i pro tuto práci. V případě kmene AFN2 Řeháková a kol. zaznamenali celkový obsah PHA 59,6 mol.%. V našem případě bylo množství PHA po kultivaci v minerálním médiu stanoveno na 47,5 mol.%. Tedy celkové získané množství PHA bylo o zhruba 12 mol.% nižší než v případě přidání glycerolu do média. Naproti tomu při kultivaci v Nutrient Broth médiu bylo dosaženo 57 mol.% celkového obsahu PHA, což je srovnatelné množství. U kmene AH30 bylo v předchozí studii stanoveno celkové množství PHA na 55,5 mol.%. V našem případě pak v minerálním médiu činil obsah PHA 63 mol.%, tedy asi o 10 mol.% vyšší, a v NB médiu 49,5 mol.% [101].

Lakshmanan a kol. pro své studie využili negativního mutanta bakterie *Cupriavidus necator* PHB-4, který obsahuje nový gen PHA syntázy (*phacBPM-CPF-4*) (tento gen byl klonován do plazmidu pBBRMCS-2 a transformován do PHA negativního mutanta *Cupriavidus necator* PHB-4). Tato studie se zaměřovala na syntézu kopolymerů s obsahem monomerních jednotek 4HB a 5HV. Jako prekurzor pro kultivace pro syntézu kopolymerů s obsahem jednotek 5HV byl použit Na5HV [116]. Ten byl připraven bazicky katalyzovanou hydrolýzou δ -valerolaktomu, jak bylo již dříve popsáno v práci, kterou publikovali Chuah a kol [117]. Při použití prekurzoru Na5HV byla prokázána syntéza kopolymerů s obsahem monomerních jednotek 5HV. Daný prekurzor byl do média, které jako zdroj uhlíku obsahovalo fruktózu, přidáván v koncentraci 2 g/l. Za těchto podmínek byla zaznamenána produkce kopolymeru, který obsahoval až 22 mol.% frakce 5HV [116]. Tento výsledek se blíží spíše kultivacím, které byly v této diplomové práci realizovány v médiu Nutrient Broth a měly nižší výnos podílu frakce 5HV než ty realizované v minerálním médiu. I tak se však obsahy našich frakcí pohybují

v mírně vyšších číslech. Je však potřeba brát v potaz odlišnosti v experimentu a také fakt, že v našem případě nebyl δ -valerolakton předem upraven, ale byl přidáván přímo do média. Prekurzor byl v této diplomové práci také přidáván ve dvojnásobné koncentraci oproti zmíněné studii. Další testy, které byly v rámci dané studie provedeny, spočívaly v testování různých koncentrací prekurzoru Na5HV do kultivačního média, a to v rozmezí od 0,5 do 20 g/l. Změna koncentrace prekurzoru v kulturách vedla k biosyntéze PHA kopolymerů a terpolymerů s různými molárními podíly monomerů 5HV. Nejvyššího obsahu 5HV bylo dosaženo po přidání Na5HV v koncentraci 20 g/l. V tomto případě vzrostl podíl frakce 5HV až na 85 mol.%. Je však důležité podotknout, že při takto vysoké koncentraci byla značně negativně ovlivněna hmotnost sušiny buněk (0.78 g/l) a obsah PHA (28 mol. %) [116]. Tato hodnota obsahu 5HV přesahuje námi zaznamenaná množství tohoto monomeru v našich experimentech, při kterých bylo jako maximum zaznamenáno 71 mol.% frakce 5HV u kmene DSM 10154 kultivaném v minerálním médiu. Jak lze z výsledků vidět, v případě kultivací v minerálním médiu byly nárůsty PHA podstatně nižší, zato se však u všech kmenů s výjimkou kmene DSM 10155 zvýšil procentuální podíl monomeru 5HV. Ačkoliv tedy docházelo k nižší produkci PHA, výsledné produkty obsahovaly kopolymery s vyšším podílem druhého monomeru.

4.2.3 1,4-butandiol

Jako další druh prekurzorů, které byly přidávány do médií, byly zvoleny dioly. Prvním z nich byl 1,4-butandiol, který je prekurzorem pro biosyntézu monomerů 4HB. Způsob jeho metabolického využití je naznačen na Obrázek 16.



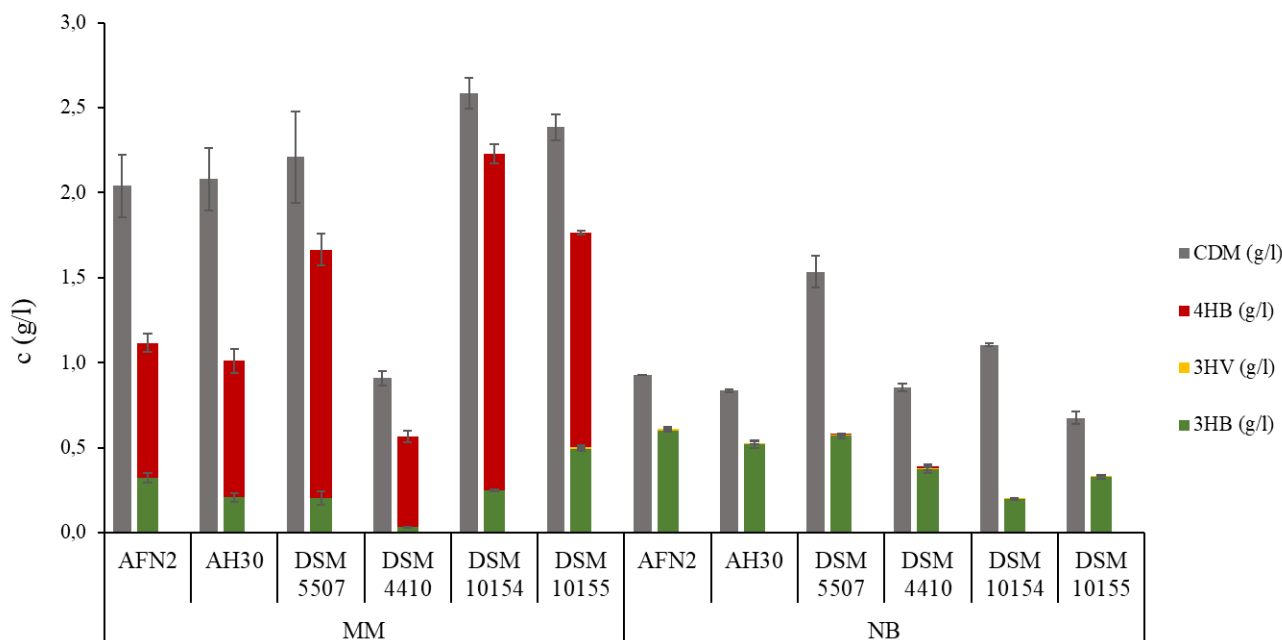
Obrázek 16: Metabolické využití 1,4-butandiolu jako prekurzoru pro syntézu monomerů 4HB [108].

Ve srovnání s použitím laktonů jako prekurzorů je možné pozorovat opačný trend, co se použitých druhů médií týče (viz Obrázek 17). Obecně vyšší produkce biomasy byla pozorována u kultivací prováděných v minerálních médiích. U všech sledovaných kmenů došlo opět k syntéze monomerů 3HB. V případě monomerů 4HB už byla situace zajímavější. U kultivací provedených v minerálních médiích došlo k syntéze 4HB monomerů, které dokonce ve všech případech značně převažovaly oproti obsahu 3HB. U kultivací provedených v NB médiu k syntéze monomerů 4HB nedošlo s výjimkou kmenů DSM 4410 a DSM 5507, nicméně i u těchto kmenů se množství tohoto monomeru pohybovalo pouze mezi 1 a 2 mol.%. Naproti tomu během kultivací v minerálním médiu nedošlo ke vzniku monomeru 3HV, který byl detekován u produktů kmenů kultivovaných v NB médiu. Množství 3HV se nicméně pohybovalo pouze mezi 1 a 3 mol.%.

Nejvíce biomasy bylo detekováno při kultivaci v minerálním médiu sbírkového kmene DSM 10154 s hodnotou 2,59 g/l, z čehož obsah PHA činil cca 86 mol.% (2,23 g/l). Z Obrázek 17 je jasně vidět, že množství monomerů 4HB značně převyšuje 3HB. Množství 4HB bylo

stanoveno na 1,98 g/l (88 mol.%), množství 3HB na pouhých 0,25 g/l (11 mol.%). Nejmenší množství biomasy z kultivací prováděných na minerálním médiu byl schopen vyprodukovat kmen DSM 4410 s celkovým množstvím biomasy stanoveným na 0,91 g/l, z toho PHA 0,57 g/l (cca 62 mol.%). I přes nižší produkci biomasy je z grafu patrná převaha monomerů 4HB oproti 3HB. 4HB tvoří celých 93 mol.% (0,53 g/l) z celkového obsahu PHA, zatímco na 3HB připadá pouze 6 mol.% (0,03 g/l).

V médiu Nutrient Broth bylo nejvíce biomasy pozorováno u sbírkového kmene DSM 5507, a to konkrétně 1,54 g/l, z čehož polyhydroxyalkanoáty byly stanoveny na 0,59 g/l (necelých 38 mol.%). 3HB tvořilo 97,6 mol.% (0,57 g/l) a na 4HB a 3HV připadlo 1,1 a 1,3 g/l. Nejméně biomasy bylo zaznamenáno v NB médiu u kmene DSM 10155. Stanovené množství činilo pouze 0,68 g/l, PHA potom 0,34 g/l. 98,1 mol.% z tohoto množství pak bylo 3HB a zbytek byl tvořen monomery 3HV. 4HB v biomase produkované tímto kmenem detekováno nebylo.



Obrázek 17: Kultivace bakteriálních kmenů v komplexním médiu Nutrient Broth (NB) a minerálním médiu (MM) s obsahem glukózy (4 g/l) a 1,4-butandiolu (4 g/l).

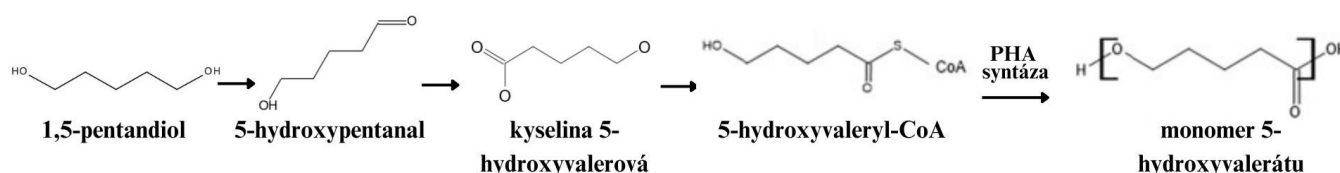
Pernicová a kol. ve své studii zkoumali bakterii *Aneurinibacillus* kmen s označením H1. Mimo jiné se zabývali také produkcí kopolymerů a terpolymerů za použití rozličných prekurzorů, mezi kterými byl také 1,4-butandiol. Ten byl použit jako jediný zdroj uhlíku v koncentraci 8 g/l. Použití tohoto prekurzoru vedlo k produkci kopolymeru s velmi vysokým podílem 4HB, a to konkrétně 79.91 mol.% [110]. Tento bakteriální kmen prokázal schopnost syntézy a inkorporace monomerních jednotek 4HB do kopolymeru srovnatelnou s kmeny testovanými v této diplomové práci. Stejně jako v této práci byl i v této studii větší podíl 4HB ve vzniklém kopolymeru zaznamenán při použití 1,4-butandiolu jako prekurzoru oproti γ -butyrolaktonu.

Ve studii zabývající se produkcí kopolymeru P(3HB-*co*-4HB) testovali Amirul a kol. kromě γ -butyrolaktonu jako zdroje uhlíku při kultivaci také jako zdroj 1,4-butandiol. Experimenty byly prováděny na bakterii *Cupriavidus* USMAA1020. V případě využití 1,4-butandiolu jako zdroje uhlíku byl za stejných podmínek zaznamenán nižší podíl frakce 4HB v daném kopolymeru než při použití γ -butyrolaktonu, a to konkrétně 32 ± 1 mol.% ve srovnání s 51 ± 1 mol.% [113]. Ve srovnání s touto prací, kdy se množství 4HB pohybovalo od cca 71 mol.% až po 93 mol.% je toto množství poměrně nízké. Je třeba však vzít v potaz rozdíly ve složení kultivačního média. V našem případě také při kultivaci na Nutrient Broth médiu nebyl zaznamenán téměř žádný podíl 4HB (kmeny DSM 5507 a DSM 4410), v některých případech dokonce vůbec žádný (kmeny DSM 10154 a DSM 10155 a izoláty AFN2 a AH30). Oproti této studii, kde byl vyšší podíl 4HB zaznamenán při kultivaci na γ -butyrolaktonu oproti 1,4-butandiolu, se v našich výsledcích jako lepší zdroj v minerálním kultivačním médiu projevil 1,4-butandiol.

Vigneswari a kol. pro své experimenty zvolili bakterii *Cupriavidus* USMAA2-4, kterou kultivovali na médiích, ve kterých byl jako zdroj uhlíku zvolen 1,4-butandiol v různých koncentracích. Ty se pohybovaly v rozmezí od 0,50–2,50 % (w/v). Nejnižší zaznamenaný podíl frakce 4HB činil 31 mol.%, zatímco se zvyšující se koncentrací 1,4-butandiolu v médiu se podíl této frakce zvýšil až na 42 mol.% [118]. Obě tyto hodnoty jsou stále nižší než námi zaznamenané výsledky pro bakterie rodu *Aneurinibacillus*, nicméně v případě této diplomové práce byla pro kultivace použita vyšší koncentrace daného prekurzoru (viz Tabulka 13).

4.2.4 1,5-pentandiol

Dalším prekurzorem, který byl využit pro biosyntézu 5HV, byl 1,5-pentandiol. Jeho využití pro produkci monomerních jednotek 5HV je naznačeno na Obrázek 18.



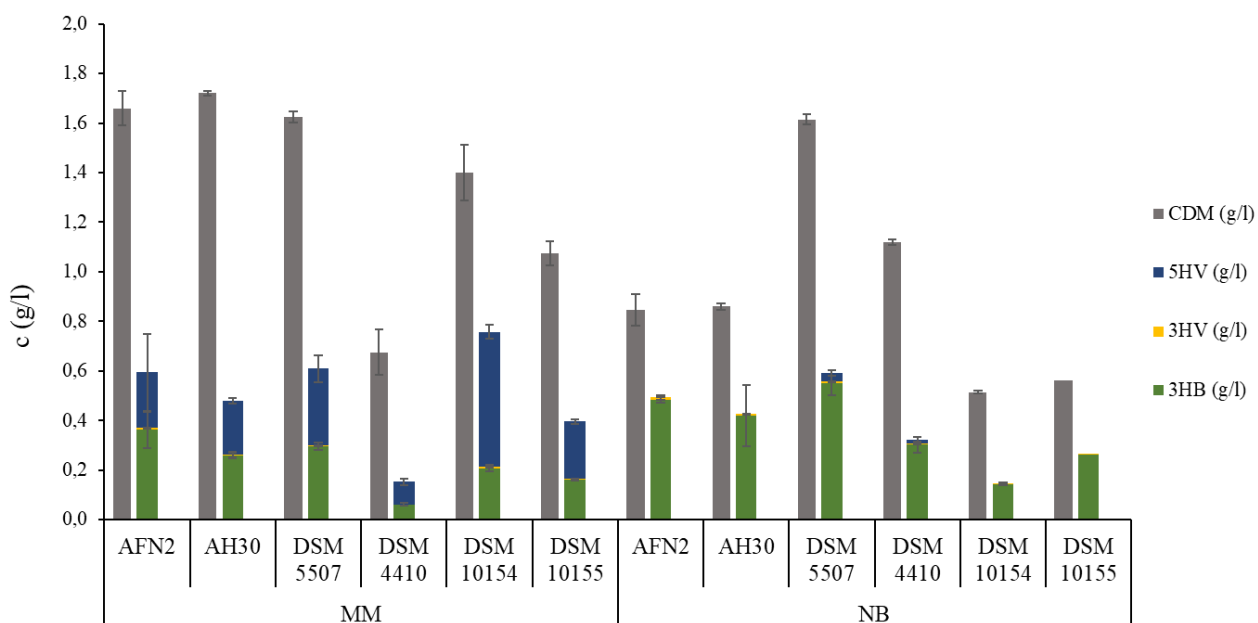
Obrázek 18: Využití prekurzoru 1,5-pentandiol jako prekurzoru pro syntézu monomeru 5HV [119].

Výsledky, co se produkce v médiích NB za použití 1,5-pentandiolu týče (Obrázek 19), jsou srovnatelné s předchozím případem, kdy byl jako prekurzor do produkčního média přidán rovněž diol a produkce cílových kopolymerů příliš nefungovala. V médiu NB monomery 5HV syntetizovány nebyly s výjimkou kmenů DSM 5507 a DSM 4410, u kterých minoritní množství detekováno bylo. Ve velmi malých množstvích pohybujících se od 0,5 do 3 mol.% z celkového obsahu PHA byly také detekovány monomery 3HV. U kultivací, které probíhaly v minerálních médiích, docházelo k syntéze kopolymerů, a monomery 5HV zde skutečně byly detekovány v signifikantních množstvích.

Nejvíce biomasy v minerálním médiu byl schopen vyprodukovat kmen AH30, kde hodnota dosáhla 1,72 g/l. Z toho ovšem celkové množství PHA tvořilo pouze 0,48 g/l (26,6 mol.%). Z grafu lze nicméně vidět, že poměrně dobré zastoupení ve vzniklém kopolymeru má 5HV, které činilo 0,22 g/l, tedy přibližně 45,2 mol.%. 54,1 mol.% pak z tohoto množství připadlo

na monomer 3HB a zbylých 0,7 mol.% na 3HV. Nejmenší nasyntetizované množství biomasy bylo zaznamenáno v minerálním médiu stejně jako v předchozím případě, kdy byl prekurzorem 1,4-butandiol, u sbírkového kmene DSM 4410. U něj se množství biomasy vyšplhalo na pouhých 0,7 g/l. PHA z toho tvořily 0,15 g/l, tudíž cca 22,6 mol.%. I u tohoto polymeru však bylo poměrové rozdělení jednotlivých monomerů vyrovnané. 40,7 mol.% připadlo na 3HB a 59,3 mol.% na 5HV. Množství monomeru 5HV v tomto případě tedy dokonce mírně převažovalo.

V NB médiu bylo nasyntetizováno největší množství biomasy kmenem DSM 5507. To se opět shoduje s výsledky, kdy prekurzorem byl 1,4-butandiol. Celkové množství biomasy, konkrétně 1,62 g/l, se blížilo celkovému množství biomasy vzniklému při kultivacích v minerálním médiu. Množství PHA bylo u tohoto kmene stanoveno na 0,59 g/l, z čehož absolutní většina, 0,55 g/l (cca 93 mol.%), byla tvořena monomerem 3HB. 0,03 g/l připadlo na monomer 5HV. Monomeru 3HV bylo stanoveno jen velmi zanedbatelné množství. Nejmeně biomasy bylo v NB médiu zjištěno u bakteriálního kmene DSM 10154. Celková biomasa zde tvořila pouze 0,52 g/l, PHA pak 0,15 g/l (28,8 mol.%). U tohoto kmene nebyl detekován žádný obsah monomeru 5HV a téměř celý obsah tak byl tvořen 3HB se zanedbatelným podílem 3HV, který se pohyboval kolem 3,6 mol.%.



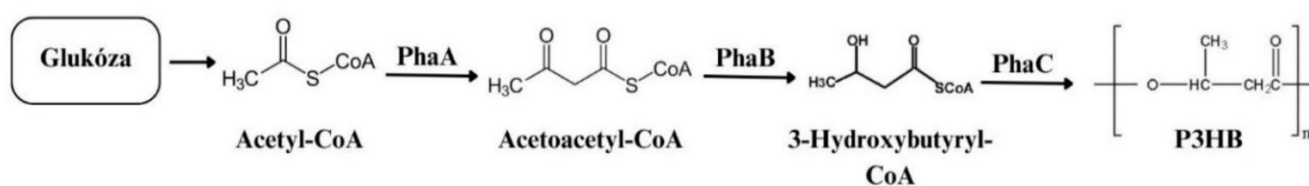
Obrázek 19: Kultivace bakteriálních kmenů v komplexním médiu Nutrient Broth (NB) a minerálním médiu (MM) s obsahem glukózy (4 g/l) a 1,5-pentandiolu (4 g/l).

Ve studii, kterou provedli Yan a kol. byla pro produkci kopolymerů s obsahem monomerních jednotek 5HV studována bakterie *Halomonas bluephagenesis*. Tato studie byla primárně zaměřena na PHA polymerázy, nicméně se zabírala i studiem syntézy těchto kopolymerů. Jako prekurzor byl do kultivačního média přidáván 1,5-pentandiol v koncentraci 5 g/l spolu s glukózou, jejíž koncentrace činila 30 g/l. Z testovaných variant byla zvolena pro další

pokusy polymeráza PhaC_n, která vykazovala nejlepší výsledky. Obsah frakce 5HV při tomto experimentu dosáhl 18,3 mol. % [120]. Toto množství, ačkoliv do kultivačního média byl prekurzor přidáván v mírně vyšší koncentraci než v případě této diplomové práce, je nižší oproti výsledkům v této práci. Je však potřeba vzít v potaz odlišnosti podmínek, při kultivaci stejně tak jako odlišnosti ve složení médií. Za použitých podmínek se však *Aneurinibacillus* jeví jako lepší producent daného kopolymery, co se obsahu frakce 5HV týče.

4.2.5 Glukóza

Následující kultivace byla prováděna za přítomnosti glukózy, která byla přidána do minerálního média. Přidávána byla do výsledné koncentrace glukózy 20 g/l, jak je ostatně vidět v **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** Metabolické využití glukózy je naznačeno na Obrázek 20 a také podrobněji na Obrázek 2.

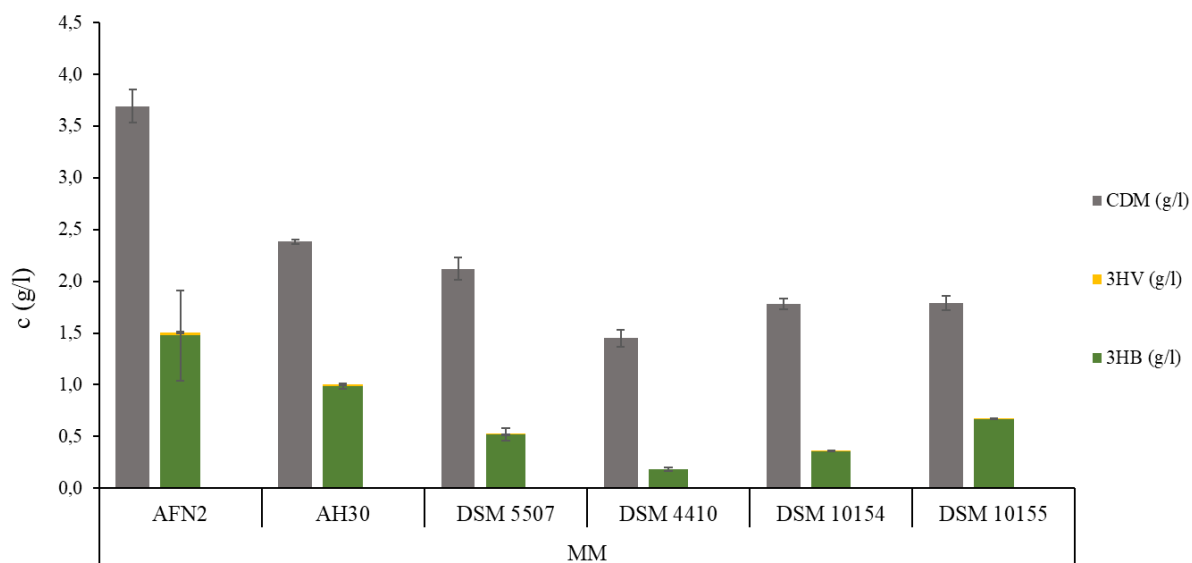


Obrázek 20: Metabolické využití glukózy pro syntézu monomerních jednotek 3HB [119].

Podle očekávání, jelikož nebyly do média přidány žádné prekurzory, nebyla zaznamenána biosyntéza dalších monomerů kromě 3HB a nebyly během této kultivace tedy produkovány kopolymery (viz Obrázek 21).

Nejvíce biomasy bylo vyprodukováno kmenem AFN2. Její množství bylo stanoveno na 3,70 g/l. Celkové množství PHA tvořilo 1,51 g/l. Nejmenší množství biomasy bylo naopak zaznamenáno u kmene DSM 4410, jehož produkce byla menší i ve většině předchozích příkladů. Celkové množství biomasy v tomto případě činilo 1,45 g/l. PHA tvořilo 0,18 g/l, což je cca 12,6 mol.%.

V malém množství byla také u všech kmenů s výjimkou kmene DSM 4410 detekována přítomnost 3HV. Ta se však pohybovala pouze mezi 1 až 2 mol.%.



Obrázek 21: Kultivace bakteriálních kmenů v minerálním médiu (MM) s obsahem glukózy (20 g/l).

Xiao a kol. se zabývali studiem bakteriálního kmene označeného XH2, který byl izolován z ropného pole Gudao v Číně, a byl identifikován jako rod *Aneurinibacillus* na základě morfologie, fyziologicko-biochemické charakterizace a fylogenetické analýzy *16S rRNA*. Pokusy byly prováděny v Erlenmeyerových baňkách při 55 °C ve dvou druzích médií, které obsahovaly glukózu. V prvním případě obsahovalo médium kvasničný extrakt 10 g/l, pepton 20 g/l a glukózu 20 g/l. Výtěžek PHA z této kultivace byl stanoven na 0,1116g/l [121]. Tento výsledek je nižší než při pokusech v této práci. Ve druhém případě byl ze složení média odstraněn pepton a výtěžek PHA se zvýšil 2,4krát, tedy téměř na 0,27 g/l. Skupina analyzovala složení produktů pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektroskopií (GC-MS) a nukleární magnetickou rezonancí. Bylo zjištěno, že hlavními monomery produktu PHA jsou 3-hydroxybutyrát a 3-hydroxyvalerát, přičemž množství monomerů 3HB výrazně převyšuje množství monomerů 3HV, a to v poměru 17,2:1 [121]. Ačkoliv v tomto případě bylo dosaženo menšího množství PHA, lze zde shledat podobnost v trendu monomerního složení, kdy i v této práci obsah 3HB výrazně převyšoval obsah 3HV.

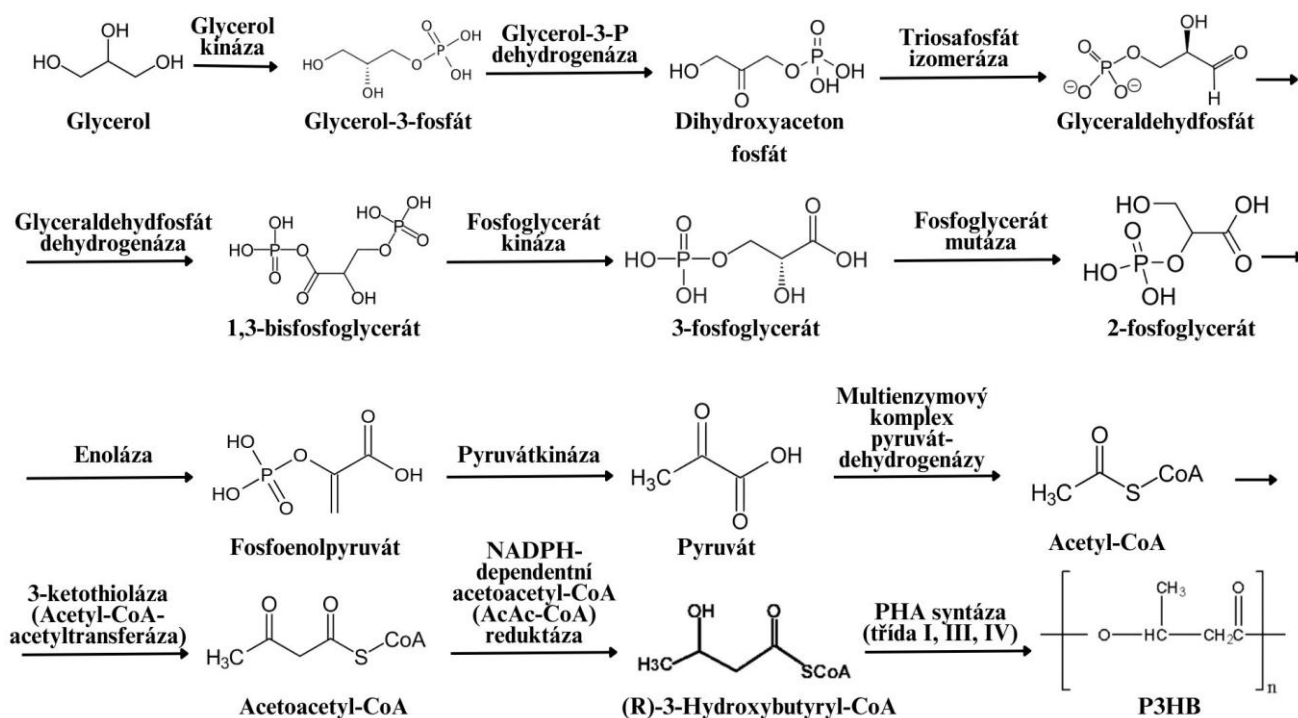
Giedraitytė a Kalėdienė se věnovali studiu syntézy PHA u bakterie *Geobacillus*, konkrétně u kmene AY 946034, který byl izolován z ropného pole v Litvě. Nejprve testovali vliv různých zdrojů uhlíku na růst a akumulaci P(3HB) v buňkách. Stejně jako v této práci probíhala kultivace na minerálním médiu. Jako zdroj uhlíku využili octan sodný, glukózu, sacharózu, maltózu, laktózu, glycerol a škrob. Ty přidávali v koncentraci 10 g/l, tedy v poloviční koncentraci, než jaká byla použita při našich experimentech. Nejvyšší množství P(3HB) (1,03 g/l) a výtěžek produktu (41,1 %) byly zjištěny při použití glukózy [122]. Toto množství je mírně vyšší než námi zaznamenaná množství P(3HB) při studiu bakterie *Aneurinibacillus*. Za předpokladu, že v našem případě byla použita dvojnásobná koncentrace glukózy v médiu se zdá, že *Geobacillus* je schopen velmi efektivně využívat tento zdroj uhlíku při produkci P(3HB).

Tajima a kol. studovali bakterii, která byla izolována z půdy odebrané z plynového pole Yufutsu (Hokkaido) a označena jako kmen INT005. Následně s pomocí morfologických a fyziologických vlastností a částečné nukleotidové sekvence její *16S rRNA*, ji zařadili do rodu *Bacillus* a začali testovat její schopnost produkovat PHA za použití různých zdrojů uhlíku, které byly přidávány do média v koncentraci 1 %. Jedním z těchto byla také glukóza. Na médiu s obsahem glukózy byl stanoven výtěžek na 0,28 g/l, přičemž 98,5 % z tohoto množství tvořily monomerní jednotky 3HB [123]. Množství obsahu 3HB se pohybuje na stejné hladině, jako tomu bylo v našem případě, kdy se množství 3HB pohybovalo v rozmezí od 97 až po 100 %. Obě tyto bakterie jsou tedy schopny využívat glukózu pro produkci PHA s velmi vysokým podílem 3HB.

4.2.6 Glycerol

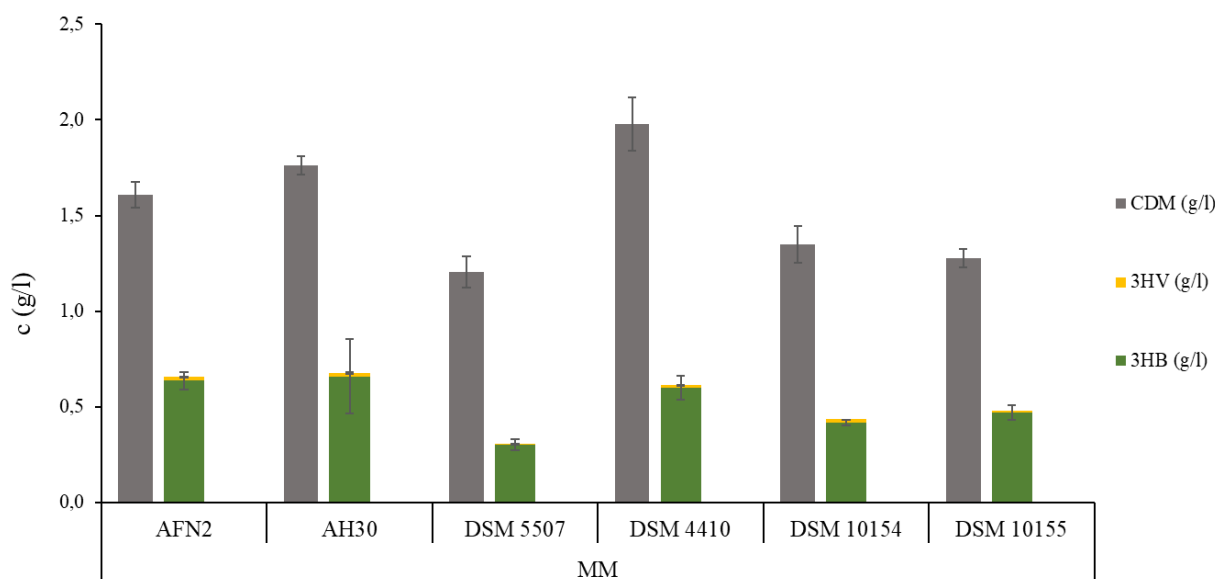
Po testování minerálního média s přidavkem samotné glukózy bylo otestováno médium s přidavkem glycerolu. Glycerol byl přidáván do média do stejné celkové koncentrace jako glukóza v předchozím případě, tedy 20 g/l (viz Tabulka 13. Na Obrázek 22 je vyobrazeno využití glycerolu bakteriemi a jeho metabolické zpracování.

Stejně jako v předchozím případě nebyly bakteriemi syntetizovány kopolymery, jelikož nebyly v médiích přítomny prekurzory pro jiné monomery, které by se do struktury polymeru daly zabudovat. Téměř výhradně syntetizovány tak byly pouze monomery 3HB (viz Obrázek 23). Kromě těchto pak byly v malém množství, stejně jako v předchozím případě, detekovány také monomery 3HV, a to u všech kmenů. Množství 3HV se nicméně pohybovalo pouze mezi 1 až 2 mol.%. Nejvyšší množství 3HV bylo detekováno u kmene DSM 10154, kde tato frakce tvořila z celkového množství PHA 4,1 mol.%.



Obrázek 22: Metabolické využití glycerolu k syntéze PHA [124].

Největší množství biomasy, konkrétně 1,98 g/l, bylo vyprodukováno kmenem DSM 4410. Oproti předchozím kultivacím se tak zdá, že roste lépe na glycerolu než například na glukóze. Množství PHA bylo stanoveno na 0,61 g/l, tedy přibližně 31 mol.%. Nejmenší množství biomasy v médiu s glycerolem vytvořil sbírkový kmen DSM 5507 (pouze 1,21 g/l). Zároveň u něj bylo detekováno i nejmenší procento výskytu monomeru 3HV, které se v tomto případě pohybovalo okolo 1,3. Celkové množství PHA bylo stanoveno na 0,31 g/l, což činí přibližně polovinu toho, co vyprodukoval za těchto podmínek kmen DSM 4410.



Obrázek 23: Kultivace bakteriálních kmenů v minerálním médiu (MM) s obsahem glycerolu (20 g/l).

Pernicová a kol. ve své studii zabývající se použitím osmotické zátěže pro obohacení mikrobiálních konsorcií o termofilní a termotolerantní bakterie produkující polyhydroxyalkanoáty otestovali schopnost jimi použitých izolátů produkovat PHA. Vybrané izoláty, mezi kterými figuroval také námi zkoumaný rod *Aneurinibacillus*, byly kultivovány v baňkách v minerálním médiu, kde jako jediný zdroj uhlíku figuroval glycerol. Kultivace probíhaly po dobu 72 h, přičemž testovány byly dvě teploty: 50 °C a 60 °C. Při kultivaci za nižší teploty byla schopnost produkce PHA podstatně vyšší. V případě vzorků bakterie *Aneurinibacillus* se při kultivacích při teplotě 50 °C pohybovalo množství naakumulovaného PHA mezi přibližně 0,55 g/l až po cca 1,1 g/l [125]. Tyto výsledky číselně relativně odpovídají množství PHA zaznamenaným v této diplomové práci, které se u všech námi použitých izolátů a sbírkových kmenů pohybovalo mezi 0,3 g/l až téměř po 0,7 g/l.

Giedraitytė a Kalėdienėse ve své studii bakterie *Geobacillus* kromě glukózy (kapitola 4.2.5) a dalších zdrojů uhlíku testovali také glycerol. Jak se ukázalo, nebyla při použití glycerolu jako zdroje uhlíku zaznamenána tvorba PHA [122]. Zdá se tedy, že ačkoliv tato bakterie oproti bakterii *Aneurinibacillus* produkuje větší množství polyhydroxyalkanoátů při použití glukózy jako zdroje uhlíku, nedokáže využít k této produkci glycerol. Výhoda bakterie

Aneurinibacillus oproti bakterii *Geobacillus* zdá se spočívat v jisté flexibilitě, pokud bychom porovnávali tyto dva konkrétní námi využití zdroje uhlíku.

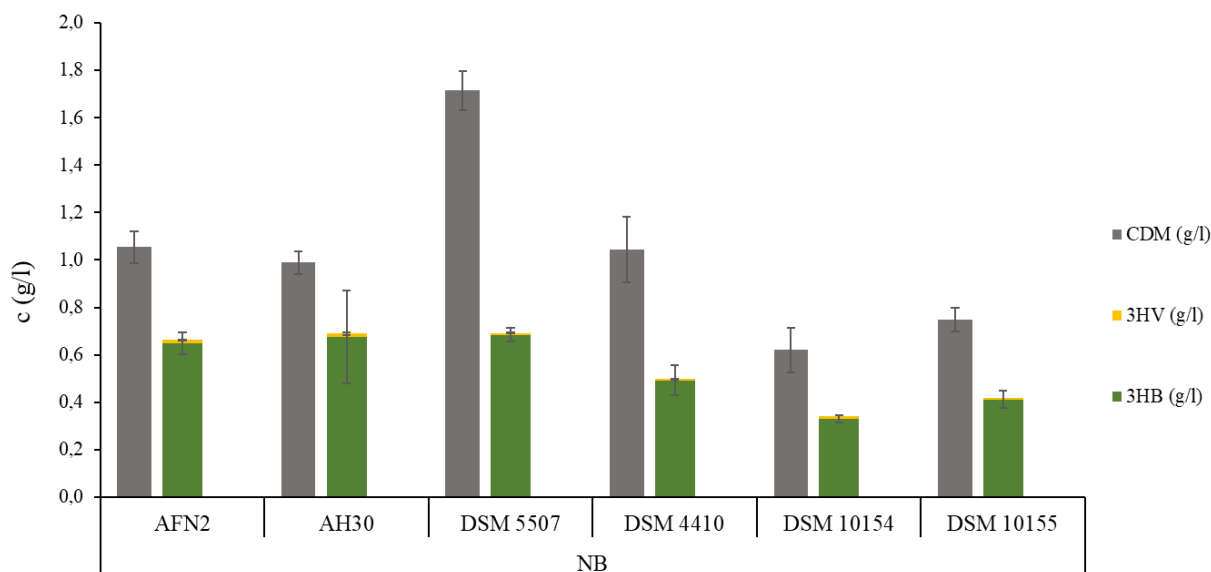
Liu a kol. ve své studii testovali glycerol jako substrát pro produkci PHB s využitím bakterie *Bacillus shackletonii* (viz 4.2.5). Do minerálního produkčního média byl glycerol přidáván do koncentrace 20 g/l. Výtěžek PHB po kultivaci s tímto zdrojem uhlíku byl stanoven na 52,3 % (1,09 g/l) [126]. Tato hodnota je vyšší než výsledky u všech námi testovaných kmenů, které nepřesáhly koncentraci PHB více než 0,7 g/l. Je tedy patrné, že bakterie *Bacillus shackletonii* vykazuje oproti bakterii *Aneurinibacillus* vyšší efektivitu při využití glycerolu jako zdroje substrátu a je schopná produkovat více PHB.

4.2.7 Nutrient Broth médium bez přídavku prekurzorů

Posledním médiem, na kterém byly kultivace prováděny, bylo Nutrient Broth médium, do kterého nebyly přidány žádné další složky (Obrázek 24). Celkové množství naprodukované biomasy bylo mírně menší než v předchozích dvou případech. Ve shodě s předchozími dvěma typy médií však byly druhy monomerů, které byly obsaženy v produktech. Produkty byly skoro úplně tvořeny monomery 3HB (průměrně 97,8 mol.%) a u všech kmenů byly také zaznamenány monomery 3HV, které ale opět tvořily zanedbatelnou část obsahově se pohybující mezi 1 až 3 mol.%.

Největší množství biomasy v tomto médiu dokázal nasyntetizovat kmen DSM 5507 – konkrétně 1,72 g/l. Celkové množství PHA bylo stanoveno na 0,70 g/l, tedy přibližně 41 mol.% z množství biomasy. Nejmenší množství biomasy naopak dokázal vyprodukovat kmen DSM 10154, jehož produkce byla stanovena na 0,62 g/l, z toho PHA 0,34 g/l (tedy cca 55,2 mol.%).

Kultivace na samotném Nutrient Broth médiu v porovnání s kultivacemi v minerálním médiu s glukózou nebo glycerolem ukázaly, že testované bakterie jsou schopny produkovat PHA i bez přítomnosti externího zdroje uhlíku, pouze díky komplexním složkám NB média. Tento jev naznačuje, že bakterie nejsou limitovány nedostatkem esenciálních prvků, což je častý limitující faktor u jiných PHA-produkujících mikroorganismů [127]. Výsledky poukazují na potenciálně odlišné metabolické mechanismy nebo adaptivní vlastnosti studovaných kmenů.



Obrázek 24: Kultivace bakteriálních kmenů v komplexním médiu Nutrient Broth (NB).

4.2.8 Porovnání kultivací bakterií na médiích NB a MM s přidavkem různých PHA prekurzorů

Experimenty dokazují, že ačkoliv se jednalo o kultivace stále stejných kmenů bakterií rodu *Aneurinibacillus* a za identických podmínek, složení produkčních médií mělo obrovský vliv na výsledné produkty, a to jak na jejich množství, tak jejich složení v závislosti na přidaném prekurzoru.

Prvním důležitým rozdílem je volba mezi Nutrient Broth a minerálním médiem. Nutrient Broth je komplexní médium běžně používané při kultivaci pro správný růst buněk v počátečních fázích růstu. Obsahuje hovězí extrakt a pepton, které zajišťují přísun aminokyselin, dusíku, uhlíku, vitamínů a minerálů, kvasnicový extrakt, který je zdrojem vitamínů, zejména skupiny B, a chlorid sodný pro udržení osmotické rovnováhy média [128]. Celkově tak toto médium může dobře podporovat růst buněk, ale nemusí nutně podporovat produkci PHA bakteriemi. Díky bohatému zdroji živin totiž bakterie mohou upřednostnit růst před syntézou zásobních látek, jako jsou polyhydroxyalkanoáty. Obecně je totiž mikrobiální biosyntéza PHA výsledkem omezení živin, jako je dusík, síra, kyslík nebo fosfát [129]. Naproti tomu minerální médium má přesně definované složení a kontrolu dostupnosti živin, což slouží jako nutriční stres a je lepší pro podporu produkce PHA.

Jak z výsledků nicméně vyplynulo, výběr druhu média závisí také na konkrétních zdrojích uhlíku a prekurzorů, které jsou pro konkrétní kultivace využity. V případě využití diolů jako prekurzorů byla vyšší akumulace PHA zaznamenána u kultivací s využitím minerálního média, které podporuje akumulaci PHA. Při využití δ -valerolaktonu a γ -butyrolaktonu se však ukázalo, že větší produkce byla zaznamenána v médiu Nutrient Broth. Je tedy možné, že v případě laktonů toto médium podporuje využití metabolických drah, které jsou příznivé pro tyto substráty.

4.3 Stanovení emulgační aktivity supernatantů

Zkoumané kmeny byly také testovány pro produkci biosurfaktantů, přičemž jedním z testovaných parametrů byl emulgační index. Podle postupů v kapitole 3.9 byl vypočítán emulgační index E_{24} . Výsledné hodnoty pro jednotlivé supernatanty je možné nalézt v Tabulka 14. Hodnoty byly stanoveny pro tři druhy supernatantů, a to konkrétně pro supernatanty získané z kultivací na minerálním médiu s obsahem glukózy (v Tabulka 14 označeno jako MM + GLU), minerálním médiu s glycerolem (MM + GLY) a médiu Nutrient Broth (NB).

Jednotlivé emulgační indexy E_{24} všech supernatantů byly porovnány vůči pozitivní kontrole, která obsahovala 5% Triton X-100, a negativním kontrolám, které tvořily destilovaná voda a čistá minerální a Nutrient Broth média. Emulgační indexy byly rovněž porovnány mezi sebou.

Dále byly také srovnány se stanovenou hranicí pro posouzení, zda-li se jedná o dobré producenty biosurfaktantů (viz kapitola 3.9). Jako hranici pro určení, zda je organismus dobrým producentem biosurfaktantů, byl použit emulgační index 50 %. Emulgační indexy, které jsou rovny nebo vyšší než tato hranice, náleží supernatantům získaným z kultivací dobrých producentů biosurfaktantů [97].

Z Tabulka 14 je patrné, že emulgační indexy všech vzorků jsou nižší než pozitivní kontrola (Tabulka 15). Zároveň bylo pozorováno, že hodnoty emulgačních indexů supernatantů získaných z minerálních médií s obsahem glukózy a glycerolu byly vyšší než u negativní kontroly. Lze tedy předpokládat, že v těchto vzorcích došlo k tvorbě biosurfaktantů v určitém množství. Ani jedna ze stanovených hodnot také nepřekročila hranici 50 %, za kterou je možno považovat daného producenta jako dobrého [97]. Nejvyšší hodnoty E_{24} vykazovaly izoláty AFN2 a AH30. Kmen AH30 se přiblížil dané hranici nejvíce (48 %) a ze zkoumaných kmenů jej lze označit za nejlepšího producenta.

U vzorků supernatantů z médií NB tvorba biosurfaktantů zaznamenána nebyla vůbec s výjimkou kmenů DSM 10154 a DSM 10155, které malou aktivitu vykazují.

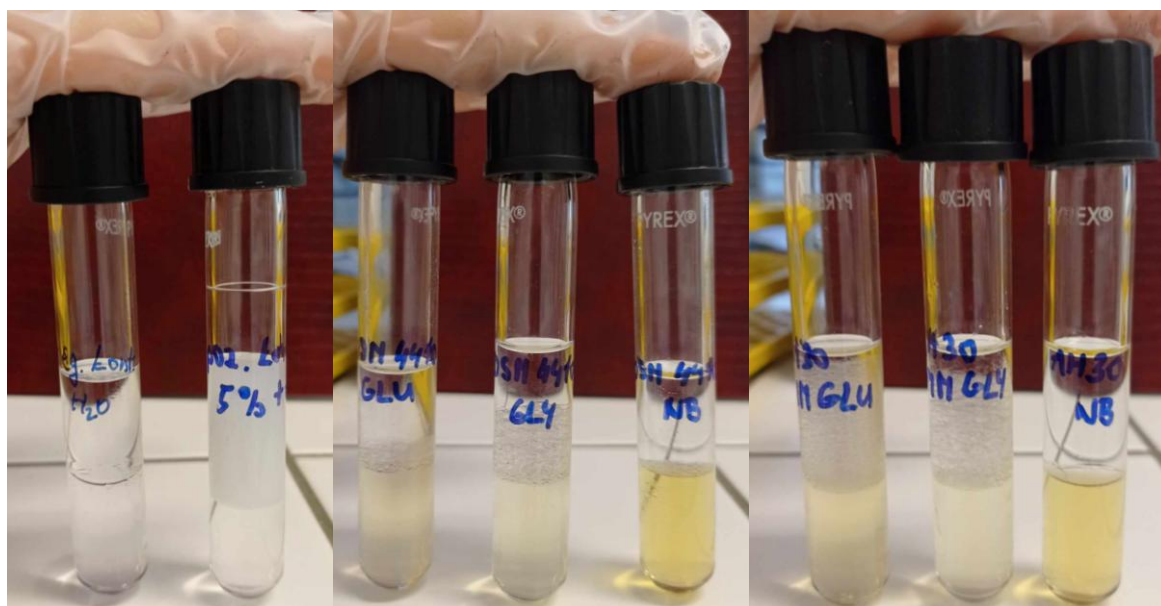
Tabulka 14: Vypočítané hodnoty emulgačních indexů E_{24} supernatantů.

Vzorek	E_{24}		
	Médium produkce		
	MM + GLU	MM + GLY	NB
AFN2	41,7	46,0	0,0
AH30	48,0	44,0	0,0
DSM 4410	13,0	30,0	0,0
DSM 5507	16,0	25,5	0,0
DSM 10154	10,2	22,4	4,3
DSM 10155	13,0	19,6	15,6

Tabulka 15: Vypočítané hodnoty emulgačních indexů E_{24} kontrol.

Kontrola	E_{24}
Pozitivní – Triton X-100	61,2
Negativní – H ₂ O	0,0
Negativní – MM + GLU	0,0
Negativní – MM + GLY	0,0
Negativní – NB	0,0

Příklady průběhu experimentu a ukázky emulze různých vzorků lze vidět na Obrázek 25.



Obrázek 25: Ukázky vytvořených emulzí po ukončení experimentu. (zleva): NK (H₂O), PK (5% Triton X-100), DSM 4410 a AH30

Ram a kol. dokázali izolovat nové tepelně stabilní biosurfaktanty z mořského izolátu SGD-AC-13. Tento kmen byl pomocí sekvence genu *16S rRNA* (1515 bp) a identifikační karty BCL (bioMérieux VITEK®) určen jako rod *Bacillus*. Kromě jiných provedli během studie také emulgační testy supernatantů za účelem stanovení emulgační účinnosti vůči organickým rozpouštědlům. Zkoušky byly provedeny s n-hexanem, benzenem a xylenem. Supernatant byl vždy smísen s daným rozpouštědlem, a směs byla následně vortexována po dobu 2 minut. Zkumavky byly ponechány v klidu po dobu 24 hodin při teplotě 28 °C. Účinnost emulgace byla vypočtena podle stejného vzorce, který byl použit v této práci - viz rovnice (1). Jako negativní kontrola byla použita směs, ve které destilovaná voda nahradila supernatant. V případě hexanu byl emulgační index E_{24} stanoven na 50 %, což je více než u všech vzorků testovaných v rámci této práce [130]. Index nejbližší této hodnotě byl stanoven u izolátu AH30 a činil 48,0 %. Jedná se o poměrně slušný výsledek. Kromě kmene AH30 byla vyšší hodnota emulgačního indexu zaznamenána také u kmene AFN2, a to konkrétně 41,7 %. Tyto dva kmeny jsou tedy relativně srovnatelnými konkurenty studovaného mořského izolátu pro produkci biosurfaktantů. Ostatní testované kmeny se však této hodnotě (50 %) ani zdaleka nepřiblížily a je tedy možné shrnout,

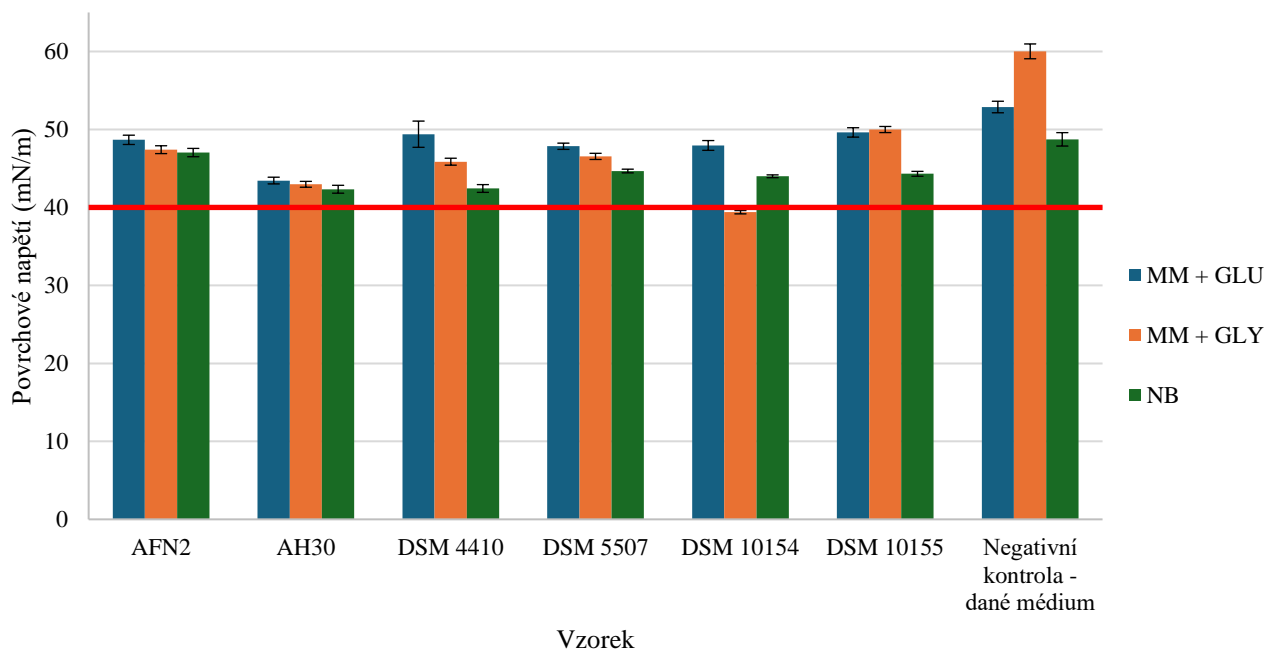
že mořský izolát SGD-AC-13 a kmeny AH30 a AFN2 bakterie *Aneurinibacillus* se pro produkci biosurfaktantů hodí lépe než kmeny DSM 4410, DSM 5507, DSM 10154 a DSM 10155 bakterie *Aneurinibacillus*.

Ibrahim Ewida a kol. studovali izoláty získané ze tří různých vodních prostředí za účelem nalezení nového bakteriálního kmene, který by byl schopen produkovat biosurfaktant. První místo odběru (řeka Nil ve městě Alkanater v gubernii Qalyubia) reprezentovalo čisté vodní prostředí, druhé místo (Řeka Nil v lodní stanici ve městě Imbaba, guvernorat Gíza) představovala vodu znečištěnou ropnými látkami, a poslední (odtok Rahawy, guvernorat Gíza) zastupoval silně znečištěnou odpadní vodu. Jedním ze stanovených parametrů byl emulgační index E_{24} pro jednotlivé izoláty pomocí stejného postupu jako v případě této diplomové práce. Jako organická rozpouštědla však kromě hexanu použili také xylen. Jediný, který vykazoval schopnost produkce biosurfaktantů, byl izolát s označením OCNW9, u kterého byl zaznamenán emulgační index E_{24} 86 %. Jednalo se o izolát z vodního prostředí, které bylo kontaminováno ropnými skvrnami, což se podle autorů shoduje s jinými záznamy o nálezů bakterií schopných produkovat biosurfaktanty z míst kontaminovaných uhlovodíky. Tento izolát byl pomocí metody *16S rRNA* určen jako *Pseudomonas protegens* [97]. Výsledná hodnota emulgačního indexu tohoto izolátu dosahuje téměř dvojnásobku námi získané nejlepší hodnoty. Lze tedy jasně označit izolát bakterie *Pseudomonas protegens* za lepšího a biotechnologicky atraktivnějšího producenta biosurfaktantů.

4.4 Měření povrchového napětí metodou Du-Noüy-Ring

Dle postupu popsaného v kapitole 0 bylo za pomoci automatického tenziometru proměřeno povrchové napětí jednotlivých supernatantů. Výsledky měření byly zpracovány do Graf 2.

Za hranici, která signalizuje přítomnost účinného biosurfaktantu je považováno snížení povrchového napětí testovaného roztoku pod hodnotu $40 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ [98; 99]. Snížení bylo porovnáváno s hodnotou povrchového napětí vody, které činí $72 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ [131]. Jak lze z Graf 2 vyčíst, hodnoty povrchového napětí testovaných supernatantů neklesaly pod tuto hranici s výjimkou kmene DSM 10154 kultivovaném v médiu s obsahem glycerolu. Všechny ostatní testované roztoky vykazovaly hodnoty vyšší, což znamená, že ke tvorbě biosurfaktantů v nich sice došlo, ale daný BS není tak účinný. Tento výsledek je ve shodě s předchozím testováním a stanovením emulgačních indexů jednotlivých supernatantů, které rovněž neprokázaly tvorbu biosurfaktantů ve větší míře. U negativních kontrol bylo zjištěno snížení povrchového napětí oproti povrchovému napětí vody. Lze tedy předpokládat, že složky média samy o sobě mírně snižují povrchové napětí. Při porovnání supernatantů s negativními kontrolami můžeme pozorovat, že došlo k dalšímu mírnému snížení povrchového napětí, nicméně ne dostatečnému, aby překročilo požadovanou hranici. Z toho můžeme usuzovat, že určité množství biosurfaktantu jsou tyto kmeny bakterie *Aneurinibacillus* schopny vyprodukovat, ne však v signifikantním množství, které by bylo biotechnologicky zajímavé.



Graf 2: Naměřené hodnoty povrchového napětí supernatantů.

Balan a kol. studovali kmen s označením SBP-11 mořské bakterie *Aneurinibacillus aneurinilyticus* izolované v Mannarském zálivu v Indii. Tento kmen prokázal schopnost produkce lipopeptidového biosurfaktantu, který byl purifikován, charakterizován a označen názvem Aneurinifactin. Jedním z testů, kterým byla tato látka podrobena, bylo také měření povrchového napětí, ze kterého vyplynulo, že Aneurinifactin byl schopen snížit povrchové napětí vody ze 72 mN m^{-1} na maximální hodnotu 26 mN m^{-1} a ukázal se tak být dobrým biosurfaktantem [132]. Ačkoliv se jedná o stejný bakteriální rod, jako ten, který byl použit v této práci, vykazuje na rozdíl od těchto kmenů dobrou schopnost produkce biosurfaktantů. Je tedy vidět výrazný rozdíl mezi těmito kmeny. Je potřeba však vzít v úvahu, že tento kmen bakterie byl na rozdíl od těch použitých v této práci izolován z mořského prostředí a je možné, že je to jeden z faktorů, který ovlivnil schopnost tohoto kmene produkovat biosurfaktanty.

Marajan a kol. se zabývali zkoumáním bakterií, které byly izolovány z odpadních vod z lisoven palmového oleje a tyto podrobovaly testům na produkci biosurfaktantů. Jednou z použitých metod bylo také měření povrchového napětí metodou Du-Noüy-Ring. Z 18 izolovaných kmenů 2 vykazovaly schopnost snížit povrchové napětí vody ze 72 na 29 mNm^{-1} . Tyto dva izoláty, které byly ve studii označeny jako PUT-R4 a PUT-R10 byly následně identifikovány pomocí sekvenční analýzy genu *16S rRNA* jako zástupci rodu *Bacillus* [133]. Je patrné, že tyto izoláty testované bakterie vykazovaly mnohem lepší schopnost snížit povrchové napětí ve srovnání s *Aneurinibacillem*.

Zouari a kol. také zkoumali biosurfaktanty. Jako cílového producenty zvolili kmeny *Pseudomonas*, které byly izolovány z půdy, která byla kontaminována ropou. Tři z testovaných izolátů, které byly později během studie určeny jako *P. putida*, se ukázaly být dobrými producenty biosurfaktantů a dokázaly snížit povrchové napětí vody

až pod 35 mN m⁻¹ [134]. Tyto kmeny jsou tak vhodnější pro získání biosurfaktantů než námi testované kmeny bakterie *Aneurinibacillus*.

4.5 Screening produkce enzymů

Kromě produkce různých biomolekul (exopolysacharidů, biosurfaktantů apod.) jsou termofilní bakterie zajímavé z biotechnologického a průmyslového hlediska také proto, že dokáží produkovat zajímavé enzymy (amylázy, celulózy, chitinázy, pektinázy, xylanázy, proteázy, lipázy či DNA polymerázy), které jsou termostabilní. Ty mají velký potenciál pro použití v lékařství, průmyslu či zemědělství, jelikož jsou díky své stabilitě při vyšších teplotách a změnách pH preferovány [135]. Význam vědeckého a biotechnologického studia enzymů a úlohy mikroorganismů, které při jejich získávání hrají roli, se tak den ode dne zvyšuje [136].

U všech zkoumaných kmenů bakterie *Aneurinibacillus* byla ověřována schopnost produkovat enzymy. Testy byly zaměřeny na ověření přítomnosti lipáz, amyláz, pektináz, proteáz, xylanáz a celuláz. Veškeré testy byly prováděny v duplikátech (v Tabulka 16 Tabulka 17 označeny jako P. miska 1 a P. miska 2).

Z Tabulka 16 a Tabulka 17 je patrné, že nejvíce produkoványi enzymy napříč kmeny jsou lipázy a amylázy, které byly zaznamenány u všech testovaných kmenů.

Tabulka 16: Schopnost produkce enzymů (lipázy, amylázy a pektinázy). Značení: výrazná produkce: ++, produkce: +, produkce nezaznamenána: -, neúspěšný experiment: /

	Lipázy		Amylázy		Pektinázy	
	P. miska 1	P. miska 2	P. miska 1	P. miska 2	P. miska 1	P. miska 2
AFN2	++	+	-	+	-	-
AH30	+	+	+	+	-	-
DSM 4410	+	++	++	+	-	-
DSM 5507	+	/	++	+	-	-
DSM 10154	++	++	+	+	-	-
DSM 10155	++	-	++	++	-	-

Tabulka 17: Schopnost produkce enzymů (proteázy, xylanázy a celulózy). Značení: výrazná produkce: ++, produkce: +, produkce nezaznamenána: -

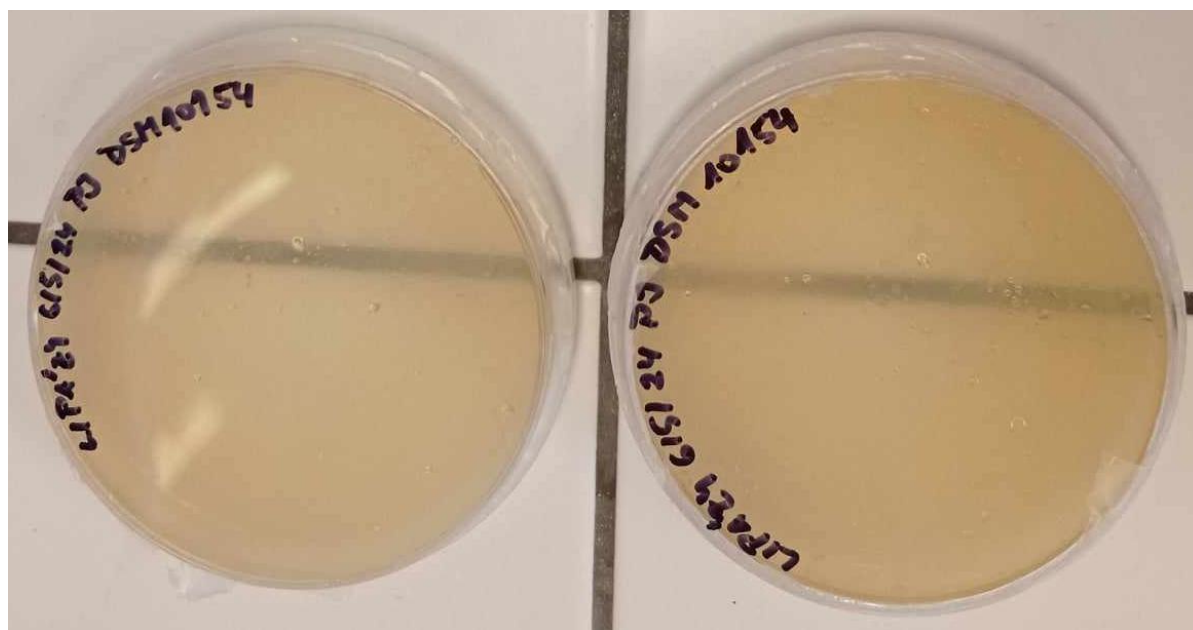
	Proteázy		Xylanázy		Celulózy	
	P. miska 1	P. miska 2	P. miska 1	P. miska 2	P. miska 1	P. miska 2
AFN2	-	-	-	-	-	-
AH30	++	++	-	-	-	-
DSM 4410	-	++	-	-	-	-
DSM 5507	+	-	-	-	-	-
DSM 10154	-	-	-	-	-	-
DSM 10155	-	++	-	-	-	-

Nejvýraznější produkce lipáz byla zaznamenána u kmene DSM 10154, který v obou případech vykazoval velmi silné odbarvení původně modrého agarů připravených misek (Obrázek 26).

Poměrně výrazné odbarvení bylo zaznamenáno také v případě kmenů AFN2 a DSM 4410. Ukázky misek po odbarvení jsou zobrazeny na Obrázek 27. Schopnost rodu *Aneurinibacillus* produkovat lipázy byla zaznamenána také profesorem Rahmanem a jeho pracovní skupinou, která u kmene s označením HZ izolovaným z horkého pramene v Malajsii testovala produkci termostabilní lipázy [137]. Dalším kmenem, u kterého byla rovněž potvrzena produkce lipáz je kmen označený LP-II izolovaný z půdy lisovny oleje [138]. Produkce lipáz byla rovněž potvrzena u kmene AFNA, který zkoumali Ebrahimpour a kol. [136; 137].

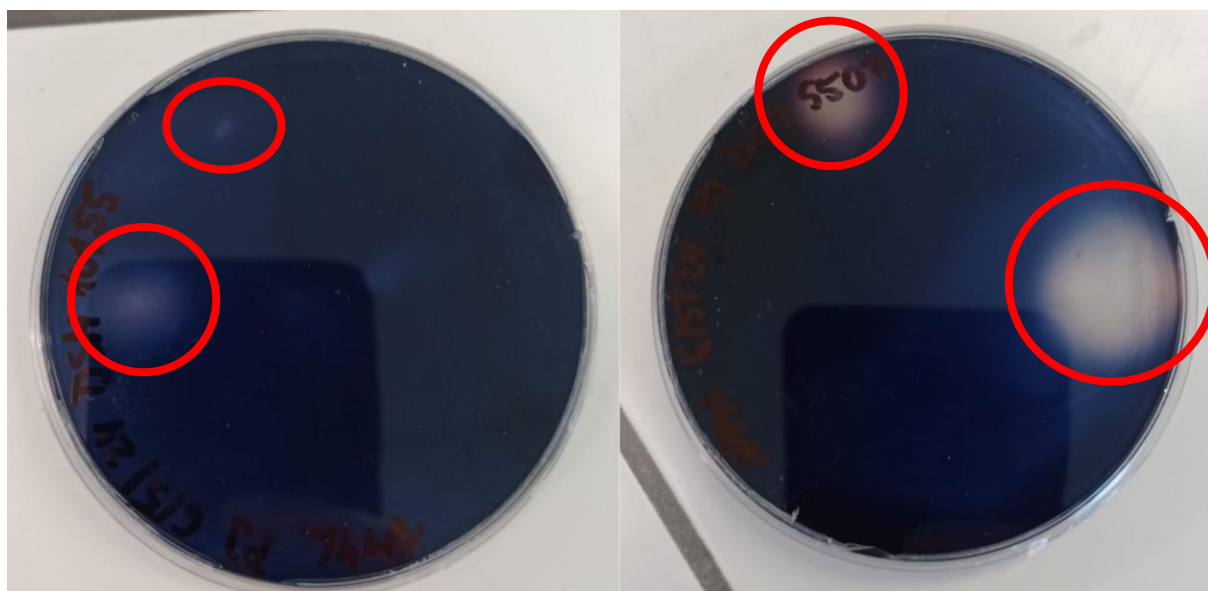


Obrázek 26: Ukázka misek připravených k zaočkování na ověření produkce lipáz.



Obrázek 27: Ukázka misek, po potvrzení produkce lipáz odbarvením agaru.

V případě amyláz byla nejsilnější produkce zaznamenána u kmene DSM 10155. V závěsu za tímto kmenem se jako dobří producenti ukázaly také kmeny DSM 4410 a DSM 5507. U všech těchto kmenů byl vznik světlejších zón okolo kolonií dobře pozorovatelný (Obrázek 28). Produkce amyláz byla u rodu *Aneurinibacillus* potvrzena např. při testování enzymatických potenciálů termofilních bakterií spojených s terestrickými horkými prameny v Alžírsku [139]. Dále byly amylázy zaznamenány také u kmene *A. thermoaerophilus* při screeningu produkce hydrolytických enzymů a analýze metylesterů mastných kyselin termofilních bakterií z horkých pramenů, který prováděli Cankilic a kol. [140].



Obrázek 28: Ukázka misek se zónami odbarvenými díky působení amyláz.

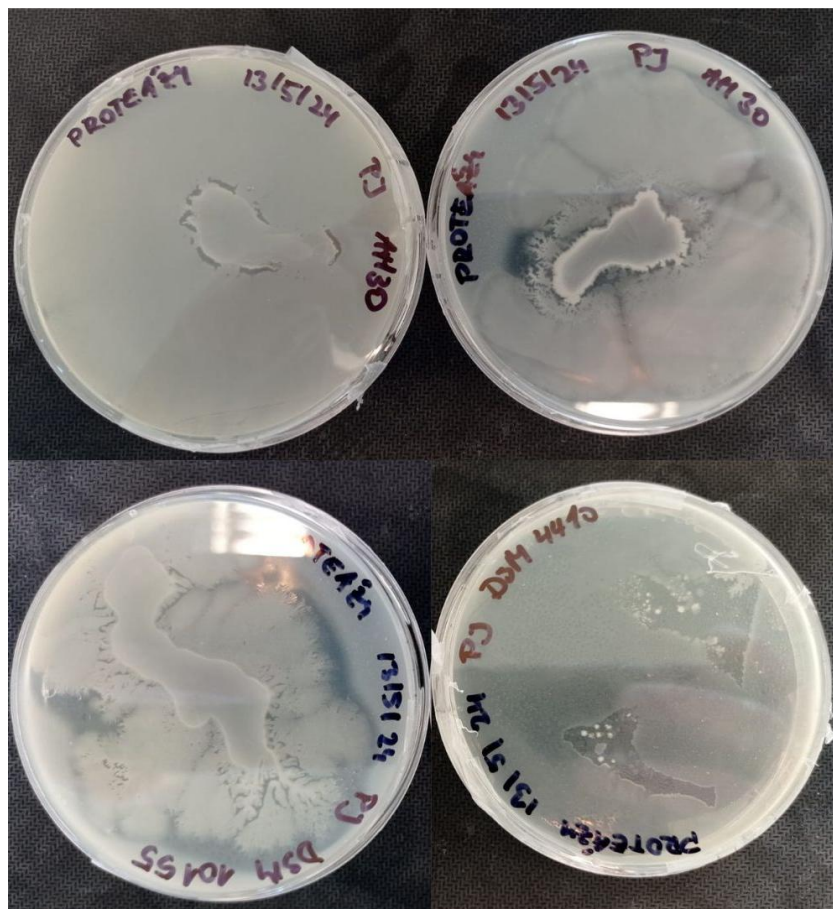
Dále byly v o něco menší míře (ve srovnání s lipázami a amylázami) detekovány proteázy, které však nebyly zaznamenány u kmene AFN2 a DSM 10154. Produkce proteáz byla potvrzena vznikem průhledných zón v blízkosti kolonií, což bylo zapříčiněno rozkladem kaseinu. Jednoznačně nejvýraznější zóny byly zaznamenány u kmene AH30 u obou misek. V menší míře pak byla produkce zaznamenána také u kmenů DSM 4410 a DSM 10155. Méně znatelné zóny se pak vytvořily u jedné ze dvou misek testovaných s kmenem DSM 5507. Naopak žádné zóny nebyly zaznamenány u kmenů AFN2 a DSM 10154. Příklady misek před zaočkováním a výsledků můžeme vidět na Obrázek 29 a Obrázek 30. Produkci proteáz rodem *Aneurinibacillus* prokázali rovněž Ginting a kol., kteří se zabývali identifikací proteolytických termofilů z horkého pramene Moinit Coastal v Indonésii [141] a Bhavania a kol., kteří se zabývali studiem bakteriálních izolátů a hodnotili jejich produkci proteáz [142].

Žádné známky produkce nebyly ani u jednoho kmene zaznamenány během testování na xylanázy, celulózy a pektinázy. Ačkoliv v této práci nebyla zaznamenána přítomnost celuláz ani xylanáz, Asem a kol. a Kamli a kol. u kmene DBT87 přítomnost těchto enzymů zaznamenali [143; 144]. Jelikož výsledky této diplomové práce neprokázaly schopnost testovaných kmenů produkovat xylanázy ani celulózy, je možné, že produkce těchto enzymů je závislá na daném kmeni a variabilitě mezi jednotlivými kmeny a jejich specifickými genetickými a environmentálními podmínkami. V případě pektináz nebyly pro porovnání

nalezeny žádné relevantní články o produkci pektináz tímto rodem, což naznačuje, že produkce pektináz u této bakterie není úplně dokumentována.



Obrázek 29: Příklad misky před zaočkováním k testování produkce proteáz.



Obrázek 30: Příklad misek s průhlednými zónami vzniklými rozkladem kaseinu v okolí kolonií.

5 ZÁVĚR

Tato závěrečná práce se věnuje studiu biotechnologického potenciálu termofilního rodu bakterií *Aneurinibacillus*. Nejprve byla metodami genetického screeningu na úrovni genotypu ověřena schopnost kmenů *Aneurinibacillus* akumulovat PHA. Úspěšná izolace DNA byla potvrzena amplifikací genu *16S rRNA*. Následně byla pomocí specifických primerů amplifikována sekvence genu *phaC*, jehož přítomnost však nebyla potvrzena, což naznačuje absenci PHA syntázy 1. třídy. Naopak, gen pro PHA syntázu 4. třídy byl přítomen u všech vzorků, čímž byl potvrzen potenciál kmenů produkovat PHA.

Následně byl proveden screening produkce PHA kopolymerů pomocí laktonů a diolů. Kultivace s přídavkem 1,4-butandiolu a γ -butyrolaktonu potvrdily syntézu kopolymerů obsahujících monomery 4HB. Jak v případě přídavku diolu, tak po obohacení média o lakton, vykazovaly procentuálně vyšší obsah 4HB produkty kultivací v minerálním médiu. Při použití γ -butyrolaktonu jako prekurzoru byl obsah monomeru 4HB vyšší v minerálním médiu (až 92 mol. %, DSM 10154), avšak i v komplexním médiu NB dosáhl relativně vysokých hodnot (až 60 mol. %). Oproti tomu při použití 1,4-butandiolu byl rozdíl mezi médii výrazný – v NB médiu byla produkce 4HB zaznamenána pouze u kmenů DSM 5507 a DSM 4410, a to v minimálním rozsahu (1–2 mol. %), zatímco v minerálním médiu byl obsah 4HB výrazně vyšší (až 93 mol. %). Kultivace s přídavkem 1,5-pentandiolu nebo δ -valerolaktonu potvrdily produkci kopolymerů obsahujících monomery 5HV, přičemž vyšší zastoupení těchto jednotek bylo zaznamenáno v minerálním médiu. Obsah 5HV zde dosáhl až 70 mol.% při použití 1,5-pentandiolu a 71 mol.% při použití δ -valerolaktonu (oba případy DSM 10154). V NB médiu byly hodnoty výrazně nižší – maximálně 45 mol.% (DSM 10155) pro δ -valerolakton, zatímco při použití 1,5-pentandiolu byla produkce 5HV detekována pouze u dvou kmenů (DSM 5507 a DSM 4410) v rozsahu okolo 5 mol.%. Ze srovnání kultivací vyplývá, že použití diolů jako prekurzorů v médiu Nutrient Broth není efektivní – k syntéze cílových monomerů dochází pouze u některých kmenů a v minimálním množství. V případě použití diolů jako prekurzorů byl obecně zaznamenán vyšší nárůst buněk v minerálních médiích, zatímco po přídavku laktonů byl vyšší nárůst buněk zaznamenán v médiích Nutrient Broth. Je však nutné podotknout, že ačkoliv v případě laktonů byl vyšší nárůst buněk zaznamenán v médiu NB, procentuálně vyšší podíl daného zajímavého monomeru byl v produktech z MM.

Po screeningu produkce PHA byla zkoumána emulgační aktivita supernatantů z kultivací v minerálních médiích s glukózou nebo glycerolem a v médiích Nutrient Broth bez specifického uhlíkového zdroje. Emulgační indexy E_{24} byly porovnány s hodnotou 50 % [97], která je považována za hranici pro dobré producenty biosurfaktantů. I když došlo k produkci biosurfaktantů, jejich množství nepřekročilo stanovenou hranici. Nejlepší výsledky vykázaly kmeny AH30 (48,0 %) a AFN2 (41,7 %), které se projeví jako nejvýznamnější producenti biosurfaktantů mezi zkoumanými kmeny.

Pro hodnocení tvorby biosurfaktantů byly kromě emulgačních indexů E_{24} měřeny také hodnoty povrchového napětí supernatantů metodou Du-Noüy-Ring. Cílem bylo porovnat hodnoty s hranicí $40 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ [98; 99], která indikuje dobrého producenta biosurfaktantů. Výsledky ukázaly, že zkoumané kmeny nevykazovaly schopnost produkovat biosurfaktanty v dostatečném množství, přičemž jediný supernatant s povrchovým napětím pod stanovenou hranicí pocházel z kultivace kmene DSM 10154 v minerálním médiu s glycerolem.

Poslední fáze experimentů se zaměřila na testování produkce klíčových enzymů: lipáz, amyláz, pektináz, proteáz, xylanáz a celuláz. Nejvíce produkovanými enzymy byly lipázy a amylázy, detekované u všech kmenů. Nejvyšší produkci lipáz vykázal kmen DSM 10154, zatímco nejvíce amylázy produkoval kmen DSM 10155. Proteáza byla přítomna u všech kmenů kromě AFN2 a DSM 10154, přičemž nejvyšší produkci proteáz prokázal kmen AH30. Produkce xylanáz, celuláz a pektináz nebyla u žádného kmene zaznamenána.

Výsledky ukazují, že bakterie rodu *Aneurinibacillus* mají významný biotechnologický potenciál, zejména díky vysoké výtěžnosti PHA a schopnosti syntézy zajímavých kopolymerů. I přes omezenou produkci biosurfaktantů a některé enzymatické limitace se ukázaly jako efektivní producenti lipáz a amyláz, což naznačuje jejich využitelnost v enzymatických technologiích. Izoláty AFN2 a AH30 vykazovaly určité odlišnosti oproti sbírkovým kmenům, které byly schopny akumulovat větší množství speciálních monomerů. Kmeny DSM 10154 a DSM 10155 také vykazovaly nejvýraznější potenciál pro produkci lipáz a amyláz.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] NAPPER, Imogen Ellen a Richard C. THOMPSON. Plastic Debris in the Marine Environment: History and Future Challenges. *Global Challenges* [online]. 2020, **4**(6) [cit. 2024-12-02]. ISSN 2056-6646. Dostupné z: doi:10.1002/gch2.201900081
- [2] FREDI, Giulia a Andrea DORIGATO. Recycling of bioplastic waste: A review. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research* [online]. 2021, **4**(3), 159-177 [cit. 2024-12-03]. ISSN 25425048. Dostupné z: doi:10.1016/j.aiepr.2021.06.006
- [3] SAMROT, Antony V., Sree K. SAMANVITHA, N. SHOBANA, et al. The Synthesis, Characterization and Applications of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) and PHA-Based Nanoparticles. *Polymers* [online]. 2021, **13**(19) [cit. 2023-10-31]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym13193302
- [4] MANNINA, Giorgio, Dario PRESTI, Gabriela MONTIEL-JARILLO, Julián CARRERA a María Eugenia SUÁREZ-OJEDA. Recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from wastewater: A review. *Bioresource Technology* [online]. 2020, **297** [cit. 2023-11-08]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2019.122478
- [5] GREGORY, David A., Caroline S. TAYLOR, Annabelle T.R. FRICKER, Emmanuel ASARE, Santosh S.V. TETALI, John W. HAYCOCK a Ipsita ROY. Polyhydroxyalkanoates and their advances for biomedical applications. *Trends in Molecular Medicine* [online]. 2022, **28**(4), 331-342 [cit. 2023-11-07]. ISSN 14714914. Dostupné z: doi:10.1016/j.molmed.2022.01.007
- [6] PÉREZ-ARAUZ, A.O., A.E. AGUILAR-RABIELA, A. VARGAS-TORRES, A.-I. RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, N. CHAVARRÍA-HERNÁNDEZ, B. VERGARA-PORRAS a M.R. LÓPEZ-CUELLAR. Production and characterization of biodegradable films of a novel polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesized from peanut oil. *Food Packaging and Shelf Life* [online]. 2019, **20** [cit. 2023-10-31]. ISSN 22142894. Dostupné z: doi:10.1016/j.fpsl.2019.01.001
- [7] Basic structure of PHA. In: *MDPI* [online]. 2021 [cit. 2023-10-31]. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2073-4360/13/19/3302>
- [8] TAN, Dan, Ying WANG, Yi TONG a Guo-Qiang CHEN. Grand Challenges for Industrializing Polyhydroxyalkanoates (PHAs). *Trends in Biotechnology* [online]. 2021, **39**(9), 953-963 [cit. 2023-10-31]. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2020.11.010
- [9] KANIUK, Łukasz a Urszula STACHEWICZ. *Development and Advantages of Biodegradable PHA Polymers Based on Electrospun PHBV Fibers for Tissue Engineering and Other Biomedical Applications* [online]. 2021, 2021-12-13, **7**(12), 5339-5362 [cit. 2024-03-01]. ISSN 2373-9878. Dostupné z: doi:10.1021/acsbiomaterials.1c00757

- [10] SHARMA, Vibhuti, Rutika SEHGAL a Reena GUPTA. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Properties and Modifications. *Polymer* [online]. 2021, **212** [cit. 2024-03-01]. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2020.123161
- [11] KALIA, Vipin Chandra, Sanjay Kumar SINGH PATEL, Ramasamy SHANMUGAM a Jung-Kul LEE. Polyhydroxyalkanoates: Trends and advances toward biotechnological applications. *Bioresource Technology* [online]. 2021, **326** [cit. 2023-11-06]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.09.064
- [12] CHEN, Guo-Qiang, Ivan HAJNAL, Hong WU, Li LV a Jianwen YE. Engineering Biosynthesis Mechanisms for Diversifying Polyhydroxyalkanoates. *Trends in Biotechnology* [online]. 2015, **33**(10), 565-574 [cit. 2023-11-08]. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2015.07.007
- [13] SINDHU, Raveendran, Aravind MADHAVAN, K.B. ARUN, et al. Metabolic circuits and gene regulators in polyhydroxyalkanoate producing organisms: Intervention strategies for enhanced production. *Bioresource Technology* [online]. 2021, **327** [cit. 2023-11-08]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2021.124791
- [14] Schematic representation of PHA synthesis through pathway I, pathway II, and pathway III. In: *Elsevier* [online]. 2021 [cit. 2023-11-13]. Dostupné z: https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0960852421001309-gr1_lrg.jpg
- [15] LU, Jingnan, Ryan C. TAPPEL a Christopher T. NOMURA. Mini-Review: Biosynthesis of Poly(hydroxyalkanoates). *Polymer Reviews* [online]. 2009, 2009-08-05, **49**(3), 226-248 [cit. 2023-11-09]. ISSN 1558-3724. Dostupné z: doi:10.1080/15583720903048243
- [16] PEREIRA, João R., Diana ARAÚJO, Ana C. MARQUES, et al. Demonstration of the adhesive properties of the medium-chain-length polyhydroxyalkanoate produced by *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* from glycerol. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2019, **122**, 1144-1151 [cit. 2023-11-06]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.09.064
- [17] URBINA, Leire, Phavit WONGSIRICHOT, María Ángeles CORCUERA, Nagore GABILONDO, Arantxa ECEIZA, James WINTERBURN a Aloña RETEGI. Application of cider by-products for medium chain length polyhydroxyalkanoate production by *Pseudomonas putida* KT2440. *European Polymer Journal* [online]. 2018, **108**, 1-9 [cit. 2023-11-06]. ISSN 00143057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2018.08.020
- [18] TAN, Hua Tiang, Min Fey CHEK, Manoj LAKSHMANAN, Choon Pin FOONG, Toshio HAKOSHIMA a Kumar SUDESH. Evaluation of BP-M-CPF4 polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase on the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from plant oil using *Cupriavidus necator* transformants. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, **159**, 250-257 [cit. 2024-03-02]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.05.064
- [19] LIM, Hui, Jo-Ann CHUAH, Min Fey CHEK, Hua Tiang TAN, Toshio HAKOSHIMA a Kumar SUDESH. Identification of regions affecting enzyme activity, substrate binding,

- dimer stabilization and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule morphology in the PHA synthase of *Aquitalea* sp. USM4. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2021, **186**, 414-423 [cit. 2024-03-01]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.07.041
- [20] ZHER NEOH, Soon, Min FEY CHEK, Hua TIANG TAN, Javier A. LINARES-PASTÉN, Ardra NANDAKUMAR, Toshio HAKOSHIMA a Kumar SUDESH. Polyhydroxyalkanoate synthase (PhaC): The key enzyme for biopolyester synthesis. *Current Research in Biotechnology* [online]. 2022, **4**, 87-101 [cit. 2024-03-01]. ISSN 25902628. Dostupné z: doi:10.1016/j.crbiot.2022.01.002
- [21] MOK, Pei-Shze, Jo-Ann CHUAH, Nazalan NAJIMUDIN, Pauline-Woan-Ying LIEW, Bor-Chyan JONG a Kumar SUDESH. In Vivo Characterization and Application of the PHA Synthase from *Azotobacter vinelandii* for the Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoate Containing 4-Hydroxybutyrate. *Polymers* [online]. 2021, **13**(10) [cit. 2024-03-02]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym13101576
- [22] REHAKOVA, Veronika, Iva PERNICOVA, Xenie KOURILOVA, et al. Biosynthesis of versatile PHA copolymers by thermophilic members of the genus *Aneurinibacillus*. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2023, **225**, 1588-1598 [cit. 2023-11-17]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.11.215
- [23] PERNICOVA, Iva, Ivana NOVACKOVA, Petr SEDLACEK, et al. Introducing the Newly Isolated Bacterium *Aneurinibacillus* sp. H1 as an Auspicious Thermophilic Producer of Various Polyhydroxyalkanoates (PHA) Copolymers–1. Isolation and Characterization of the Bacterium. *Polymers* [online]. 2020, **12**(6) [cit. 2023-11-14]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym12061235
- [24] WESTLIE, Andrea H., Ethan C. QUINN, Celine R. PARKER a Eugene Y.-X. CHEN. Synthetic biodegradable polyhydroxyalkanoates (PHAs): Recent advances and future challenges. *Progress in Polymer Science* [online]. 2022, **134** [cit. 2023-11-06]. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2022.101608
- [25] ANJUM, Anbreen, Mohammad ZUBER, Khalid Mahmood ZIA, Aqdas NOREEN, Muhammad Naveed ANJUM a Shazia TABASUM. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2016, **89**, 161-174 [cit. 2023-11-17]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069
- [26] NOVACKOVA, Ivana, Dan KUCERA, Jaromir PORIZKA, Iva PERNICOVA, Petr SEDLACEK, Martin KOLLER, Adriana KOVALCIK a Stanislav OBRUCA. Adaptation of *Cupriavidus necator* to levulinic acid for enhanced production of P(3HB-co-3HV) copolyesters. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2019, **151** [cit. 2023-11-17]. ISSN 1369703X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2019.107350
- [27] RÂPĂ, Maria, Laura Mihaela STEFAN, Ana-Maria SECIU-GRAMA, Alexandra GASPAPINTILIESCU, Ecaterina MATEI, Cătălin ZAHARIA, Paul Octavian STĂNESCU a Cristian PREDESCU. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)

- (P(3HB-co-3HV))/Bacterial Cellulose (BC) Biocomposites for Potential Use in Biomedical Applications. *Polymers* [online]. 2022, **14**(24) [cit. 2023-11-17]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym14245544
- [28] The chemical structure of P(3HB-co-3HV). In: *ResearchGate* [online]. 2019 [cit. 2023-11-18]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/The-chemical-structure-of-P3HB-co-3HV_fig1_331496121
- [29] BHATIA, Shashi Kant, Puneet WADHWA, Ju Won HONG, Yoon Gi HONG, Jong-Min JEON, Eui Seok LEE a Yung-Hun YANG. Lipase mediated functionalization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with ascorbic acid into an antioxidant active biomaterial. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2019, **123**, 117-123 [cit. 2023-11-17]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.11.052
- [30] HUONG, Kai-Hee, Vigneswari SEVAKUMARAN a A. A. AMIRUL. P(3HB- co -4HB) as high value polyhydroxyalkanoate: its development over recent decades and current advances. *Critical Reviews in Biotechnology* [online]. 2021, 2021-05-19, **41**(4), 474-490 [cit. 2023-11-17]. ISSN 0738-8551. Dostupné z: doi:10.1080/07388551.2020.1869685
- [31] DE MACEDO, Matheus A., Edmar R. OLIVEIRA-FILHO, Marilda K. TACIRO, Rosane Aparecida M. PICCOLI, José Gregório C. GOMEZ a Luiziana F. SILVA. Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) [P(3HB-co-4HB)] biotechnological production: challenges and opportunities. *Biomass Conversion and Biorefinery* [online]. [cit. 2023-11-17]. ISSN 2190-6815. Dostupné z: doi:10.1007/s13399-022-03500-2
- [32] Chemical structure of P(3HB-co-4HB). In: *ResearchGate* [online]. 2019 [cit. 2023-11-18]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-P3HB-co-4HB_fig2_331496121
- [33] VODICKA, Juraj, Monika WIKARSKA, Monika TRUDICOVA, et al. Degradation of P(3HB-co-4HB) Films in Simulated Body Fluids. *Polymers* [online]. 2022, **14**(10) [cit. 2023-11-17]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym14101990
- [34] POSPISILOVA, Aneta, Juraj VODICKA, Monika TRUDICOVA, et al. Effects of Differing Monomer Compositions on Properties of P(3HB-co-4HB) Synthesized by *Aneurinibacillus* sp. H1 for Various Applications. *Polymers* [online]. 2022, **14**(10) [cit. 2023-11-17]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym14102007
- [35] TANG, Hui Jia, Soon Zher NEOH a Kumar SUDESH. A review on poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) [P(3HB-co-3HHx)] and genetic modifications that affect its production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. 2022, 2022-12-5, **10** [cit. 2023-11-18]. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2022.1057067
- [36] Chemical structure of P(3HB-co-3HHx). In: *Frontiers* [online]. 2022 [cit. 2023-11-18]. Dostupné z: https://www.frontiersin.org/files/Articles/1057067/fbioe-10-1057067-HTML/image_m/fbioe-10-1057067-g003.jpg

- [37] OLIVEIRA-FILHO, Edmar R., Matheus A. DE MACEDO, Aline C.C. LEMOS, Friederike ADAMS, Olivia M. MERKEL, Marilda K. TACIRO, José Gregório C. GOMEZ a Luiziana F. SILVA. Engineering Burkholderia sacchari to enhance poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) [P(3HB-co-3HHx)] production from xylose and hexanoate. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2022, **213**, 902-914 [cit. 2023-11-18]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.06.024
- [38] Physical Properties and Biodegradability of Microbial Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules* [online]. 1994, **1994**(27), 878-880 [cit. 2023-11-18]. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ma00081a041>
- [39] PARK, Si Jae, Woo Suk AHN, Phillip R. GREEN a Sang Yup LEE. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) by metabolically engineered *Escherichia coli* strains. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 2001, 2001-07-05, **74**(1), 82-87 [cit. 2023-11-18]. ISSN 0006-3592. Dostupné z: doi:10.1002/bit.1097
- [40] BHUBALAN, Kesaven, Wing-Hin LEE, Ching-Yee LOO, Tetsuya YAMAMOTO, Takeharu TSUGE, Yoshiharu DOI a Kumar SUDESH. Controlled biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) from mixtures of palm kernel oil and 3HV-precursors. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2008, **93**(1), 17-23 [cit. 2023-11-18]. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2007.11.004
- [41] PANDEY, Aishwarya, Ndao ADAMA, Kokou ADJALLÉ a Jean-François BLAIS. Sustainable applications of polyhydroxyalkanoates in various fields: A critical review. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2022, **221**, 1184-1201 [cit. 2024-03-02]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.09.098
- [42] SAMROT, Antony V., Sree K. SAMANVITHA, N. SHOBANA, et al. The Synthesis, Characterization and Applications of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) and PHA-Based Nanoparticles. *Polymers* [online]. 2021, **13**(19) [cit. 2024-03-02]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym13193302
- [43] RAY, Subhasree a Vipin Chandra KALIA. Biomedical Applications of Polyhydroxyalkanoates. *Indian Journal of Microbiology* [online]. 2017, **57**(3), 261-269 [cit. 2023-11-06]. ISSN 0046-8991. Dostupné z: doi:10.1007/s12088-017-0651-7
- [44] MIRPOOR, Seyedeh Fatemeh, Giuseppe Tancredi PATANÈ, Iolanda CORRADO, et al. Functionalization of Polyhydroxyalkanoates (PHA)-Based Bioplastic with Phloretin for Active Food Packaging: Characterization of Its Mechanical, Antioxidant, and Antimicrobial Activities. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2023, **24**(14) [cit. 2024-03-03]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms241411628
- [45] CHAVAN, Shraddha, Bhoomika YADAV, R.D. TYAGI a Patrick DROGUI. A review on production of polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters by thermophilic microbes

- using waste feedstocks. *Bioresource Technology* [online]. 2021, **341** [cit. 2023-11-13]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2021.125900
- [46] KOURILOVA, Xenie, Iva PERNICOVA, Karel SEDLAR, Jana MUSILOVA, Petr SEDLACEK, Michal KALINA, Martin KOLLER a Stanislav OBRUCA. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a thermophilic strain of *Schlegelella thermodepolymerans* from xylose rich substrates. *Bioresource Technology* [online]. 2020, **315** [cit. 2023-11-13]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2020.123885
- [47] CHAVAN, Shraddha, Bhoomika YADAV, R.D. TYAGI a Patrick DROGUI. A review on production of polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters by thermophilic microbes using waste feedstocks. *Bioresource Technology* [online]. 2021, **341** [cit. 2023-11-13]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2021.125900
- [48] LÓPEZ-LÓPEZ, Olalla, María-Esperanza CERDÁN a María-Isabel GONZÁLEZ-SISO. *Thermus thermophilus* as a Source of Thermostable Lipolytic Enzymes. *Microorganisms* [online]. 2015, **3**(4), 792-808 [cit. 2024-02-29]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms3040792
- [49] KOURILOVA, Xenie, Iva PERNICOVA, Michaela VIDLAKOVA, et al. Biotechnological Conversion of Grape Pomace to Poly(3-hydroxybutyrate) by Moderately Thermophilic Bacterium *Tepidimonas taiwanensis*. *Bioengineering* [online]. 2021, **8**(10) [cit. 2023-11-14]. ISSN 2306-5354. Dostupné z: doi:10.3390/bioengineering8100141
- [50] OZTAS GULMUS, Ebru a Arzu GORMEZ. Identification and Characterization of Novel Thermophilic Bacteria from Hot Springs, Erzurum, Turkey. *Current Microbiology* [online]. 2020, **77**(6), 979-987 [cit. 2023-11-14]. ISSN 0343-8651. Dostupné z: doi:10.1007/s00284-020-01880-0
- [51] CHEN, Wen-Ming, Jo-Shu CHANG, Ching-Hsiang CHIU, Shu-Chen CHANG, Wen-Chieh CHEN a Chii-Ming JIANG. *Caldimonas taiwanensis* sp. nov., a amylase producing bacterium isolated from a hot spring. *Systematic and Applied Microbiology* [online]. 2005, **28**(5), 415-420 [cit. 2023-11-14]. ISSN 07232020. Dostupné z: doi:10.1016/j.syapm.2005.02.008
- [52] IBRAHIM, M.H.A., A. WILLEMS a A. STEINBÜCHEL. Isolation and characterization of new poly(3HB)-accumulating star-shaped cell-aggregates-forming thermophilic bacteria. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2010, no-no [cit. 2023-11-14]. ISSN 13645072. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04786.x
- [53] SATOH, Y., K. TAJIMA, S. NAKAMOTO, et al. Isolation of a thermotolerant bacterium producing medium-chain-length polyhydroxyalkanoate. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2011, **111**(4), 811-817 [cit. 2023-11-14]. ISSN 13645072. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05093.x
- [54] LIU, Yong, Shaobin HUANG, Yongqing ZHANG a Fuqian XU. Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus shackletonii* K5 from a biotrickling filter for

- the production of polyhydroxybutyrate. *Journal of Environmental Sciences* [online]. 2014, **26**(7), 1453-1462 [cit. 2023-11-14]. ISSN 10010742. Dostupné z: doi:10.1016/j.jes.2014.05.011
- [55] PERNICOVA, Iva, Ivana NOVACKOVA, Petr SEDLACEK, Xenie KOURILOVA, Martin KOLLER a Stanislav OBRUCA. Application of osmotic challenge for enrichment of microbial consortia in polyhydroxyalkanoates producing thermophilic and thermotolerant bacteria and their subsequent isolation. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, **144**, 698-704 [cit. 2023-11-14]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.12.128
- [56] KAMLI, Majid Rasool, Nada A. Y. ALZHRANI, Nahid H. HAJRAH, Jamal S. M. SABIR a Adeel MALIK. Genome-Driven Discovery of Enzymes with Industrial Implications from the Genus *Aneurinibacillus*. *Microorganisms* [online]. 2021, **9**(3) [cit. 2023-11-19]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms9030499
- [57] PERNICOVA, Iva, Ivana NOVACKOVA, Petr SEDLACEK, et al. Introducing the Newly Isolated Bacterium *Aneurinibacillus* sp. H1 as an Auspicious Thermophilic Producer of Various Polyhydroxyalkanoates (PHA) Copolymers–1. Isolation and Characterization of the Bacterium. *Polymers* [online]. 2020, **12**(6) [cit. 2023-11-19]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym12061235
- [58] REHAKOVA, Veronika, Iva PERNICOVA, Xenie KOURILOVA, et al. Biosynthesis of versatile PHA copolymers by thermophilic members of the genus *Aneurinibacillus*. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2023, **225**, 1588-1598 [cit. 2023-11-19]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.11.215
- [59] ALENEZI, Faizah N., Imen REKIK, Ali CHENARI BOUKET, et al. Increased Biological Activity of *Aneurinibacillus migulanus* Strains Correlates with the Production of New Gramicidin Secondary Metabolites. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2017, 2017-04-07, **8** [cit. 2023-11-19]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2017.00517
- [60] ASEM, Dhaneshwaree, Vincent Vineeth LEO, Ajit Kumar PASSARI, et al. Evaluation of gastrointestinal bacterial population for the production of holocellulose enzymes for biomass deconstruction. *PLOS ONE* [online]. 2017, 2017-10-12, **12**(10) [cit. 2023-11-19]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0186355
- [61] HILDEBRANDT, Marvin, Isabell E. BLEILE, Felix ALTHOFF, Sabine ZACHGO, Andrea BRÄUTIGAM, Bart VERWAAIJEN a David A. BALTRUS. Whole-Genome Sequence of *Aneurinibacillus* sp. *Ricciae_BoGa-3*, Isolated from *Riccia fluitans*. *Microbiology Resource Announcements* [online]. 2023, 2023-06-20, **12**(6), e00081-23 [cit. 2023-11-19]. ISSN 2576-098X. Dostupné z: doi:10.1128/mra.00081-23
- [62] SARUBBO, Leonie A., Maria da Gloria C. SILVA, Italo José B. DURVAL, Káren Gercyane O. BEZERRA, Beatriz G. RIBEIRO, Ivison A. SILVA, Matthew S. TWIGG a Ibrahim M. BANAT. Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and

- general perspectives. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2022, **181** [cit. 2024-03-03]. ISSN 1369703X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2022.108377
- [63] Surfactants types determined by the polarity of their head group. In: *Wiley Online Library* [online]. 2023 [cit. 2024-06-17]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1155/2023/2375223>
- [64] DIAS, Marcos André Moura a Marcia NITSCHKE. Bacterial-derived surfactants: an update on general aspects and forthcoming applications. *Brazilian Journal of Microbiology* [online]. [cit. 2024-06-17]. ISSN 1517-8382. Dostupné z: doi:10.1007/s42770-023-00905-7
- [65] MOUAFO, Hippolyte T., Alphonse T. SOKAMTE, Augustin MBAWALA, Robert NDJOUENKEU a Somashekar DEVAPPA. Biosurfactants from lactic acid bacteria: A critical review on production, extraction, structural characterization and food application. *Food Bioscience* [online]. 2022, **46** [cit. 2024-03-03]. ISSN 22124292. Dostupné z: doi:10.1016/j.fbio.2022.101598
- [66] FARIQ, Anila a Azra YASMIN. Production, characterization and bioactivities of biosurfactants from newly isolated strictly halophilic bacteria. *Process Biochemistry* [online]. 2020, **98**, 1-10 [cit. 2024-03-03]. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2020.07.011
- [67] XU, Meng, Xinge FU, Yu GAO, et al. Characterization of a biosurfactant-producing bacteria isolated from Marine environment: Surface activity, chemical characterization and biodegradation. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [online]. 2020, **8**(5) [cit. 2024-03-03]. ISSN 22133437. Dostupné z: doi:10.1016/j.jece.2020.104277
- [68] KARNWAL, Arun, Seweta SHRIVASTAVA, Abdel Rahman Mohammad Said AL-TAWAHA, et al. Microbial Biosurfactant as an Alternate to Chemical Surfactants for Application in Cosmetics Industries in Personal and Skin Care Products: A Critical Review. *BioMed Research International* [online]. 2023, 2023-4-13, **2023**, 1-21 [cit. 2024-06-17]. ISSN 2314-6141. Dostupné z: doi:10.1155/2023/2375223
- [69] Examples of some types of surfactants and their bacterial origin. In: *Springer Link* [online]. 2023 [cit. 2024-06-17]. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s42770-023-00905-7/tables/1>
- [70] LÓPEZ-PRIETO, Alejandro, Lorena RODRÍGUEZ-LÓPEZ, Myriam RINCÓN-FONTÁN, José Manuel CRUZ a Ana Belén MOLDES. Characterization of extracellular and cell bound biosurfactants produced by *Aneurinibacillus aneurinilyticus* isolated from commercial corn steep liquor. *Microbiological Research* [online]. 2021, **242** [cit. 2024-11-23]. ISSN 09445013. Dostupné z: doi:10.1016/j.micres.2020.126614
- [71] LVOVA, Ksenia, Andrea MARTÍNEZ-ARCOS, Alejandro LÓPEZ-PRIETO, Xanel VECINO, Ana Belén MOLDES a José Manuel CRUZ. Optimization of the Operational Conditions to Produce Extracellular and Cell-Bound Biosurfactants by *Aneurinibacillus aneurinilyticus* Using Corn Steep Liquor as a Unique Source of Nutrients. *Fermentation*

- [online]. 2023, **9**(4) [cit. 2024-11-23]. ISSN 2311-5637. Dostupné z: doi:10.3390/fermentation9040351
- [72] BALAN, Shanmugasundaram Senthil, C. Ganesh KUMAR a Singaram JAYALAKSHMI. Aneurinifactin, a new lipopeptide biosurfactant produced by a marine Aneurinibacillus aneurinilyticus SBP-11 isolated from Gulf of Mannar: Purification, characterization and its biological evaluation. *Microbiological Research* [online]. 2017, **194**, 1-9 [cit. 2024-11-23]. ISSN 09445013. Dostupné z: doi:10.1016/j.micres.2016.10.005
- [73] SHARAFI, Hakimeh, Mahya ABDOLI, Hamidreza HAJFARAJOLLAH, et al. First Report of a Lipopeptide Biosurfactant from Thermophilic Bacterium Aneurinibacillus thermoaerophilus MK01 Newly Isolated from Municipal Landfill Site. *Applied Biochemistry and Biotechnology* [online]. 2014, **173**(5), 1236-1249 [cit. 2024-11-23]. ISSN 0273-2289. Dostupné z: doi:10.1007/s12010-014-0928-9
- [74] FASIM, Aneesa, Veena S MORE a Sunil S MORE. Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2021, **69**, 68-76 [cit. 2024-06-27]. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2020.12.002
- [75] MOHAPATRA, B. R., M. BAPUJI a A. SREE. Production of Industrial Enzymes (Amylase, Carboxymethylcellulase and Protease) by Bacteria Isolated from Marine Sedentary Organisms. *Acta Biotechnologica* [online]. 2003, **23**(1), 75-84 [cit. 2024-06-27]. ISSN 0138-4988. Dostupné z: doi:10.1002/abio.200390011
- [76] JAVED, Saira, Farrukh AZEEM, Sabir HUSSAIN, et al. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* [online]. 2018, **132**, 23-34 [cit. 2024-06-27]. ISSN 00796107. Dostupné z: doi:10.1016/j.pbiomolbio.2017.07.014
- [77] GUPTA, R., N. GUPTA a P. RATHI. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2004, 2004-6-1, **64**(6), 763-781 [cit. 2024-06-27]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-004-1568-8
- [78] NAIDU, M. A. Bacterial Amylase: A Review. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*. 2013, **2013**(4(2)), 274 - 287. ISSN 0976 – 3333.
- [79] SHARMA, Nevadita, Madhu RATHORE a Mukesh SHARMA. Microbial pectinase: sources, characterization and applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* [online]. 2013, **12**(1), 45-60 [cit. 2024-06-27]. ISSN 1569-1705. Dostupné z: doi:10.1007/s11157-012-9276-9
- [80] HAILE, Setegn, Abate AYELE a Susana RODRIGUEZ-COUTO. Pectinase from Microorganisms and Its Industrial Applications. *The Scientific World Journal* [online]. 2022, 2022-3-11, **2022**, 1-15 [cit. 2024-06-27]. ISSN 1537-744X. Dostupné z: doi:10.1155/2022/1881305

- [81] Pectinase, aspergillus niger. *MCE - MedChemExpress* [online]. [cit. 2025-01-10]. Dostupné z: <https://www.medchemexpress.com/pectinase.html>
- [82] HAMZA, Temam Abrar. Bacterial Protease Enzyme: Safe and Good Alternative for Industrial and Commercial Use. *International Journal of Chemical and Biomolecular Science*. 2017, **2017**(1), 1-10. ISSN 2381-7380.
- [83] EC 3.4.21.112. *IUBMB Enzyme Nomenclature* [online]. 2006 [cit. 2025-01-10]. Dostupné z: <https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/EC3/4/21/112.html>
- [84] DUTTA, Bhramar, Aparna BANERJEE, Priyanka CHAKRABORTY a Rajib BANDOPADHYAY. In silico studies on bacterial xylanase enzyme: Structural and functional insight. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* [online]. 2018, **16**(2), 749-756 [cit. 2024-06-27]. ISSN 1687157X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jgeb.2018.05.003
- [85] CHAKDAR, Hillol, Murugan KUMAR, Kuppusamy PANDIYAN, Arjun SINGH, Karthikeyan NANJAPPAN, Prem Lal KASHYAP a Alok Kumar SRIVASTAVA. Bacterial xylanases: biology to biotechnology. *3 Biotech* [online]. 2016, **6**(2) [cit. 2024-06-27]. ISSN 2190-572X. Dostupné z: doi:10.1007/s13205-016-0457-z
- [86] EC 3.2.1.8. *IUBMB Enzyme Nomenclature* [online]. 1961 [cit. 2025-01-10]. Dostupné z: <https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/EC3/2/1/8.html>
- [87] *Bacterial enzymes and their field of application*. Třetí.
- [88] KAMLI, Majid Rasool, Nada A. Y. ALZHRANI, Nahid H. HAJRAH, Jamal S. M. SABIR a Adeel MALIK. Genome-Driven Discovery of Enzymes with Industrial Implications from the Genus *Aneurinibacillus*. *Microorganisms* [online]. 2021, **9**(3) [cit. 2024-11-23]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms9030499
- [89] KAMLI, Majid Rasool, Nada A. Y. ALZHRANI, Nahid H. HAJRAH, Jamal S. M. SABIR a Adeel MALIK. Genome-Driven Discovery of Enzymes with Industrial Implications from the Genus *Aneurinibacillus*. *Microorganisms* [online]. 2021, **9**(3) [cit. 2024-11-23]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms9030499
- [90] ANSARI, Zeba, Ambika VERMA, Karuna DHIMAN, Ankita SHARMA a Poonam SHIRKOT. Thermostable protease production by *Aneurinibacillus thermoaerophilus* MCW220, isolated from a hot water spring. *Applied Biological Research* [online]. 2015, **17**(2) [cit. 2024-11-23]. ISSN 0972-0979. Dostupné z: doi:10.5958/0974-4517.2015.00023.3
- [91] AHMAD, Tawseef, Anshula SHARMA, Gaganjot GUPTA, Sheikh MANSOOR, Sumira JAN, Baljinder KAUR, Bilal Ahmad PARAY a Ajaz AHMAD. Response surface optimization of cellulase production from *Aneurinibacillus aneurinilyticus* BKT-9: An isolate of urban Himalayan freshwater. *Saudi Journal of Biological Sciences* [online]. 2020, **27**(9), 2333-2343 [cit. 2024-11-23]. ISSN 1319562X. Dostupné z: doi:10.1016/j.sjbs.2020.04.036

- [92] EBRAHIMPOUR, Afshin, Raja Noor Zaliha Raja Abd. RAHMAN, Nor Hafizah Ahmad KAMARUDIN, Mahiran BASRI a Abu Bakar SALLEH. Lipase production and growth modeling of a novel thermophilic bacterium: *Aneurinibacillus thermoaerophilus* strain AFNA. *Electronic Journal of Biotechnology* [online]. 2011, 2011-07-15, **14**(4) [cit. 2024-11-23]. ISSN 0717-3458. Dostupné z: doi:10.2225/vol14-issue4-fulltext-8
- [93] PADMAPRIYA, D. a C. SHANTHI. Hydrolysates with emulsifying properties prepared from protein wastes using microbial protease. *Food Science and Biotechnology* [online]. 2024, **33**(8), 1847-1857 [cit. 2024-11-23]. ISSN 1226-7708. Dostupné z: doi:10.1007/s10068-023-01490-z
- [94] IRDAWATI, I, A SOFIYYANA, L ADVINDA, et al. Optimization of Agricultural Waste Substrate as an Alternative Medium for Xylan in Producing Xylanase Enzymes by Thermophilic Bacteria. *Journal of Physics: Conference Series* [online]. 2021, 2021-06-01, **1940**(1) [cit. 2024-11-23]. ISSN 1742-6588. Dostupné z: doi:10.1088/1742-6596/1940/1/012052
- [95] BUCHTÍKOVÁ, Iva. *Identifikace a izolace PHA produkujících bakterií*. Brno, 2021. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Stanislav Obruča.
- [96] KOLLER, Martin a Alejandra RODRÍGUEZ-CONTRERAS. Techniques for tracing PHA-producing organisms and for qualitative and quantitative analysis of intra- and extracellular PHA. *Engineering in Life Sciences* [online]. 2015, **15**(6), 558-581 [cit. 2024-06-17]. ISSN 1618-0240. Dostupné z: doi:10.1002/elsc.201400228
- [97] IBRAHIM EWIDA, Ayman Youssef a Walaa SALAH EL-DIN MOHAMED. Isolation and Characterization of Biosurfactant Producing Bacteria from Oil-Contaminated Water. *Biosciences, Biotechnology Research Asia* [online]. 2019, 2019-12-30, **16**(04), 833-841 [cit. 2024-09-15]. ISSN 09731245. Dostupné z: doi:10.13005/bbra/2801
- [98] COOPER, D G, J E ZAJIC a D F GERSON. Production of surface-active lipids by *Corynebacterium lepus*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1979, **37**(1), 4-10 [cit. 2024-06-17]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/aem.37.1.4-10.1979
- [99] PACWA-PŁOCINICZAK, Magdalena, Grażyna A. PŁAZA, Zofia PIOTROWSKA-SEGET a Swaranjit Singh CAMEOTRA. Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2011, **12**(1), 633-654 [cit. 2024-06-17]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms12010633
- [100] CHAVAN, Shraddha, Bhoomika YADAV, R.D. TYAGI a Patrick DROGUI. A review on production of polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters by thermophilic microbes using waste feedstocks. *Bioresource Technology* [online]. 2021, **341** [cit. 2024-05-08]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2021.125900
- [101] REHAKOVA, Veronika, Iva PERNICOVA, Xenie KOURILOVA, et al. Biosynthesis of versatile PHA copolymers by thermophilic members of the genus *Aneurinibacillus*.

- International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2023, **225**, 1588-1598 [cit. 2024-06-28]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.11.215
- [102] ŘEHÁKOVÁ, Veronika. *Studium produkce polyhydroxyalkanoátů pomocí vybraných termofilních zástupců rodu Aneurinibacillus*. Brno, 2022. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Ing. Iva Pernicová, Ph.D.
- [103] REHM, Bernd H.A. a Alexander STEINBÜCHEL. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 1999, **25**(1-3), 3-19 [cit. 2024-06-26]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/S0141-8130(99)00010-0
- [104] KAMLI, Majid Rasool, Nada A. Y. ALZHRANI, Nahid H. HAJRAH, Jamal S. M. SABIR a Adeel MALIK. Genome-Driven Discovery of Enzymes with Industrial Implications from the Genus Aneurinibacillus. *Microorganisms* [online]. 2021, **9**(3) [cit. 2024-11-27]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms9030499
- [105] KOLLER, Martin a Alejandra RODRÍGUEZ-CONTRERAS. Techniques for tracing PHA-producing organisms and for qualitative and quantitative analysis of intra- and extracellular PHA. *Engineering in Life Sciences* [online]. 2015, **15**(6), 558-581 [cit. 2024-06-26]. ISSN 1618-0240. Dostupné z: doi:10.1002/elsc.201400228
- [106] MUSILOVA, Jana, Xenie KOURILOVA, Iva PERNICOVA, Matej BEZDICEK, Martina LENGEROVA, Stanislav OBRUCA a Karel SEDLAR. Novel thermophilic polyhydroxyalkanoates producing strain Aneurinibacillus thermoaerophilus CCM 8960. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2022, **106**(12), 4669-4681 [cit. 2024-11-27]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-022-12039-1
- [107] ZHILA, Natalia a Ekaterina SHISHATSKAYA. Properties of PHA bi-, ter-, and quarter-polymers containing 4-hydroxybutyrate monomer units. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2018, **111**, 1019-1026 [cit. 2024-05-08]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.01.130
- [108] Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) with high 4HB composition and PHA content using 1,4-butanediol and 1,6-hexanediol for medical application. In: *Journal of Polymer Research* [online]. 2017 [cit. 2024-07-29]. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10965-017-1345-x/figures/3>
- [109] PERNICOVÁ, Iva. *IDENTIFIKACE A IZOLACE PHA PRODUKUJÍCÍCH BAKTERIÍ*. Brno, 2021. DIZERTAČNÍ PRÁCE. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Stanislav Obruča.
- [110] PERNICOVA, Iva, Ivana NOVACKOVA, Petr SEDLACEK, et al. Introducing the Newly Isolated Bacterium Aneurinibacillus sp. H1 as an Auspicious Thermophilic Producer of Various Polyhydroxyalkanoates (PHA) Copolymers–1. Isolation and Characterization of the Bacterium. *Polymers* [online]. 2020, **12**(6) [cit. 2024-08-16]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym12061235

- [111] MIRANDA DE SOUSA DIAS, Miguel, Martin KOLLER, Dario PUPPI, Andrea MORELLI, Federica CHIELLINI a Gerhart BRAUNEGG. Fed-Batch Synthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Poly(3-Hydroxybutyrate-co-4-Hydroxybutyrate) from Sucrose and 4-Hydroxybutyrate Precursors by *Burkholderia sacchari* Strain DSM 17165. *Bioengineering* [online]. 2017, **4**(2) [cit. 2024-08-15]. ISSN 2306-5354. Dostupné z: doi:10.3390/bioengineering4020036
- [112] KIM, Jin Seol, Bong Hee LEE a Beom Soo KIM. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Ralstonia eutropha*. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2005, **23**(2), 169-174 [cit. 2024-08-15]. ISSN 1369703X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2005.01.016
- [113] AMIRUL, A.A., A.R.M. YAHYA, K. SUDESH, M.N.M. AZIZAN a M.I.A. MAJID. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer by *Cupriavidus* sp. USMAA1020 isolated from Lake Kulim, Malaysia. *Bioresource Technology* [online]. 2008, **99**(11), 4903-4909 [cit. 2024-08-16]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2007.09.040
- [114] OH, Suk-Jin, Suwon KIM, Yeda LEE, et al. Controlled production of a polyhydroxyalkanoate (PHA) tetramer containing different mole fraction of 3-hydroxybutyrate (3HB), 3-hydroxyvalerate (3 HV), 4 HV and 5 HV units by engineered *Cupriavidus necator*. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2024, **266** [cit. 2024-05-08]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2024.131332
- [115] Fig. 1. Suggested metabolism of A) GVL, B) GHL and C) DVL in tested *Aneurinibacillus* spp. In: *ScienceDirect* [online]. 2023 [cit. 2024-06-28]. Dostupné z: <https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S014181302202774X-gr1.jpg>
- [116] LAKSHMANAN, Manoj, Choon Pin FOONG, Hideki ABE a Kumar SUDESH. Biosynthesis and characterization of co and ter-polyesters of polyhydroxyalkanoates containing high monomeric fractions of 4-hydroxybutyrate and 5-hydroxyvalerate via a novel PHA synthase. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2019, **163**, 122-135 [cit. 2024-08-23]. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2019.03.005
- [117] CHUAH, Jo-Ann, Miwa YAMADA, Seiichi TAGUCHI, Kumar SUDESH, Yoshiharu DOI a Keiji NUMATA. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoate containing 5-hydroxyvalerate units: Effects of 5HV units on biodegradability, cytotoxicity, mechanical and thermal properties. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2013, **98**(1), 331-338 [cit. 2024-08-23]. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2012.09.008
- [118] VIGNESWARI, S., Lee Ai NIK, M. I. A. MAJID a A. A. AMIRUL. Improved production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer using a combination of 1,4-butanediol and γ -butyrolactone. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2010, **26**(4), 743-746 [cit. 2024-08-16]. ISSN 0959-3993. Dostupné z: doi:10.1007/s11274-009-0207-z

- [119] Construction of P(3HB-co-5HV) synthesis pathway in *H. bluephagenesis* using various enzymes. In: *ScienceDirect* [online]. 2022 [cit. 2024-07-29]. Dostupné z: <https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S109671762200060X-gr2.jpg>
- [120] YAN, Xu, Xu LIU, Lin-Ping YU, Fuqing WU, Xiao-Ran JIANG a Guo-Qiang CHEN. Biosynthesis of diverse α,ω -diol-derived polyhydroxyalkanoates by engineered *Halomonas bluephagenesis*. *Metabolic Engineering* [online]. 2022, **72**, 275-288 [cit. 2024-08-23]. ISSN 10967176. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymben.2022.04.001
- [121] XIAO, Zijun, Yu ZHANG, Lijun XI, Fangfang HUO, Jing-yi ZHAO a Jing LI. Thermophilic production of polyhydroxyalkanoates by a novel *Aneurinibacillus* strain isolated from Gudao oilfield, China. *Journal of Basic Microbiology* [online]. 2015, **55**(9), 1125-1133 [cit. 2024-09-08]. ISSN 0233111X. Dostupné z: doi:10.1002/jobm.201400843
- [122] Purification and characterization of polyhydroxybutyrate produced from thermophilic *Geobacillus* sp. AY 946034 strain. *Chemija*. 2015, **2015**(1), p38-45. 8p. ISSN 0235-7216.
- [123] TAJIMA, Kenji, Takaaki IGARI, Daisuke NISHIMURA, Maiko NAKAMURA, Yasuharu SATOH a Masanobu MUNEKATA. Isolation and characterization of *Bacillus* sp. INT005 accumulating polyhydroxyalkanoate (PHA) from gas field soil. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. 2003, **95**(1), 77-81 [cit. 2024-09-10]. ISSN 13891723. Dostupné z: doi:10.1016/S1389-1723(03)80152-4
- [124] Metabolic pathway for conversion of glycerol to P(3HB) via glycolysis and KDPG pathway (left part of illustration until pyruvate), decarboxylation of pyruvate to the central metabolite acetyl-CoA, and formation of P(3HB) by the anabolic PHA enzymes (right part of illustration). In: *ScienceDirect* [online]. 2022 [cit. 2024-08-07]. Dostupné z: <https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S1878818122000603-gr3.jpg>
- [125] PERNICOVA, Iva, Ivana NOVACKOVA, Petr SEDLACEK, Xenie KOURILOVA, Martin KOLLER a Stanislav OBRUCA. Application of osmotic challenge for enrichment of microbial consortia in polyhydroxyalkanoates producing thermophilic and thermotolerant bacteria and their subsequent isolation. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, **144**, 698-704 [cit. 2024-09-08]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.12.128
- [126] LIU, Yong, Shaobin HUANG, Yongqing ZHANG a Fuqian XU. Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus shackletonii* K5 from a biotrickling filter for the production of polyhydroxybutyrate. *Journal of Environmental Sciences* [online]. 2014, **26**(7), 1453-1462 [cit. 2024-09-11]. ISSN 10010742. Dostupné z: doi:10.1016/j.jes.2014.05.011
- [127] KOURMENTZA, Constantina, Jersson PLÁCIDO, Nikolaos VENETSANEAS, Anna BURNIOL-FIGOLS, Cristiano VARRONE, Hariklia N. GAVALA a Maria A. M. REIS. Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA)

- Production. *Bioengineering* [online]. 2017, **4**(2) [cit. 2025-02-25]. ISSN 2306-5354. Dostupné z: doi:10.3390/bioengineering4020055
- [128] LIOFILCHEM. *Nutrient Broth - Liquid medium for the cultivation of nonfastidious microorganisms*. 2017.
- [129] ANDERSON, A J a E A DAWES. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews* [online]. 1990, **54**(4), 450-472 [cit. 2024-09-12]. ISSN 0146-0749. Dostupné z: doi:10.1128/mr.54.4.450-472.1990
- [130] RAM, Hari, Amit KUMAR SAHU, Madhukar S. SAID, Arun G. BANPURKAR, Jayant M. GAJBHIYE a Syed G. DASTAGER. A novel fatty alkene from marine bacteria: A thermo stable biosurfactant and its applications. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2019, **380** [cit. 2024-09-15]. ISSN 03043894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2019.120868
- [131] BALAN, Shanmugasundaram Senthil, C. Ganesh KUMAR a Singaram JAYALAKSHMI. Aneurinifactin, a new lipopeptide biosurfactant produced by a marine *Aneurinibacillus aneurinilyticus* SBP-11 isolated from Gulf of Mannar: Purification, characterization and its biological evaluation. *Microbiological Research* [online]. 2017, **194**, 1-9 [cit. 2024-09-16]. ISSN 09445013. Dostupné z: doi:10.1016/j.micres.2016.10.005
- [132] BALAN, Shanmugasundaram Senthil, C. Ganesh KUMAR a Singaram JAYALAKSHMI. Aneurinifactin, a new lipopeptide biosurfactant produced by a marine *Aneurinibacillus aneurinilyticus* SBP-11 isolated from Gulf of Mannar: Purification, characterization and its biological evaluation. *Microbiological Research* [online]. 2017, **194**, 1-9 [cit. 2024-09-16]. ISSN 09445013. Dostupné z: doi:10.1016/j.micres.2016.10.005
- [133] MARAJAN, C., Z. MOHD ZAK, K. RAMASAMY a S. ABDUL-TALIB. IDENTIFICATION AND SCREENING CHARACTERISATION OF POTENTIAL BIOSURFACTANT PRODUCING BACTERIA ISOLATED FROM PALM OIL MILL EFFLUENT. *Journal of Engineering Science and Technology* [online]. 2015, **2015**(8), 1-9 [cit. 2024-09-16]. Dostupné z: https://jestec.taylors.edu.my/Special%20Issue%20ACEE%202015/UTM_ACEE_094-102.pdf
- [134] ZOUARI, Oumaima, Didier LECOUTURIER, Alice ROCHEX, Gabrielle CHATAIGNE, Pascal DHULSTER, Philippe JACQUES a Dhouha GHRIBI. Bio-emulsifying and biodegradation activities of syringafactin producing *Pseudomonas* spp. strains isolated from oil contaminated soils. *Biodegradation* [online]. 2019, **30**(4), 259-272 [cit. 2024-09-16]. ISSN 0923-9820. Dostupné z: doi:10.1007/s10532-018-9861-x
- [135] BENAMMAR, L., K. İNAN BEKTAŞ, T. MENASRIA, A. O. BELDÜZ, H. I. GÜLER, I. K. BEDAIDA, J. M. GONZALEZ a A. AYACHI. Diversity and enzymatic potential of thermophilic bacteria associated with terrestrial hot springs in Algeria. *Brazilian*

- Journal of Microbiology* [online]. 2020, **51**(4), 1987-2007 [cit. 2024-06-27]. ISSN 1517-8382. Dostupné z: doi:10.1007/s42770-020-00376-0
- [136] BELDUZ KOLCU, Meral, Fulya AY SAL, Ali BELDÜZ a Sabriye ÇANAKÇI. Characterization of a New Thermostable Carboxylesterase from *Aneurinibacillus* sp. PDF24. *Sakarya University Journal of Science* [online]. 2022, 2022-10-20, **26**(5), 956-966 [cit. 2024-06-27]. ISSN 2147-835X. Dostupné z: doi:10.16984/saufenbilder.1074637
- [137] RAHMAN, Raja Noor Zaliha Raja Abd, Malihe MASOMIAN, Abu Bakar SALLEH a Mahiran BASRI. A new thermostable lipase by *Aneurinibacillus thermoaerophilus* strain HZ: nutritional studies. *Annals of Microbiology* [online]. 2009, **59**(1), 133-139 [cit. 2024-06-27]. ISSN 1590-4261. Dostupné z: doi:10.1007/BF03175610
- [138] Characterization of lipase produced by *Aneurinibacillus aneurinilyticus* strain LP-II isolated from soil of oil mill. *Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences (JIPBS)*. 2017, **2017**(4), 158-161. ISSN 2349-2759.
- [139] BENAMMAR, L., K. İNAN BEKTAŞ, T. MENASRIA, A. O. BELDÜZ, H. I. GÜLER, I. K. BEDAIDA, J. M. GONZALEZ a A. AYACHI. Diversity and enzymatic potential of thermophilic bacteria associated with terrestrial hot springs in Algeria. *Brazilian Journal of Microbiology* [online]. 2020, **51**(4), 1987-2007 [cit. 2024-06-27]. ISSN 1517-8382. Dostupné z: doi:10.1007/s42770-020-00376-0
- [140] CANKILIC, Meral Yilmaz. SCREENING OF HYDROLYTIC ENZYME PRODUCTION AND FATTY ACID METHYL ESTERS (FAME) ANALYSIS OF THERMOPHILIC BACTERIA FROM HOT SPRINGS. *Fresenius Environmental Bulletin*. 2017, **2017**(10), 5865-5872.
- [141] GINTING, Elvy Like, Kurniati KEMER, Stenly WULLUR a Agustinus R. URIA. Identification of Proteolytic Thermophiles from Moinit Coastal Hot-Spring, North Sulawesi, Indonesia. *Geomicrobiology Journal* [online]. 2020, 2020-01-02, **37**(1), 50-58 [cit. 2024-06-27]. ISSN 0149-0451. Dostupné z: doi:10.1080/01490451.2019.1662524
- [142] BHAVANI, Mandepudi. Study of Novel Bacterial Soil Isolates for the Evaluation of Protease Production. *Elixir*. 2013, **2013**(61), 16761-16764. ISSN 2229-712X.
- [143] ASEM, Dhaneshwaree, Vincent Vineeth LEO, Ajit Kumar PASSARI, et al. Evaluation of gastrointestinal bacterial population for the production of holocellulose enzymes for biomass deconstruction. *PLOS ONE* [online]. 2017, 2017-10-12, **12**(10) [cit. 2024-06-27]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0186355
- [144] KAMLI, Majid Rasool, Nada A. Y. ALZHRANI, Nahid H. HAJRAH, Jamal S. M. SABIR a Adeel MALIK. Genome-Driven Discovery of Enzymes with Industrial Implications from the Genus *Aneurinibacillus*. *Microorganisms* [online]. 2021, **9**(3) [cit. 2024-06-27]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms9030499

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

1,4-BD	1,4-butandiol
1,5-PD	1,5-pentandiol
3HB	3-hydroxybutyrát
3HHx	3-hydroxyhexanoát
3HV	3-hydroxyvalerát
4HB	4-hydroxybutyrát
4HV	4-hydroxyvalerát
5HV	5-hydroxyvalerát
ACP	acylový nosný protein
ATP	adenosintrifosfát
CDM	suchá hmotnost buněk
CoA	koenzym A
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
GC-FID	plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem
GLU	glukóza
GLY	glycerol
lcl-PHA	PHA s dlouhým řetězcem
mcl-PHA	PHA se středně dlouhým řetězcem
MM	minerální médium
NB	Nutrient Broth
NK	negativní kontrola
P(3HB)	poly(3-hydroxybutyrát)
P(3HB-co-3H4MV)	poly(3-hydroxy-4-methylvalerát)
P(3HB-co-3HHx)	poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyhexanoát)
P(3HB-co-3HV)	poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát)
P(3HB-co-4HB)	poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát)
P(3HV)	poly(3-hydroxyvalerát)
P(4HB)	poly(4-hydroxybutyrát)

PCR	polymerázová řetězová reakce
PHA	polyhydroxyalkanoát(y)
PhaA	acetyl-CoA-acetyltransferáza
PhaB	acetoacetyl-CoA-reduktáza
PhaC	PHA syntáza
PK	pozitivní kontrola
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	otáčky za minutu
scl-PHA	PHA s krátkým řetězcem
TES II	roztok stopových prvků
γ -BL	γ -butyrolakton
δ -VL	δ -valerolakton