



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VYUŽITÍ RAMANOVY SPEKTROSKOPIE A RAMANOVSKÉ PINZETY K ANALÝZE A ISOLACI PHA PRODUKUJÍCÍCH BAKTERIÍ

UTILIZATION OF RAMAN SPECTROSCOPY AND RAMAN TWEEZERS FOR ANALYSIS AND ISOLATION
OF PHA PRODUCING BACTERIA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Barbora Beránková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1260/2018
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Barbora Beránková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název diplomové práce:

Využití Ramanovy spektroskopie a Ramanovské pinzety k analýze a izolaci PHA produkujících bakterií

Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Studium možného využití Ramanovské pinzety k identifikaci a izolaci PHA produkujících bakteriálních kmenů

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019

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

Bc. Barbora Beránková
student(ka)

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá studiem využití Ramanovy spektroskopie a Ramanovské pinzety k analýze a izolaci bakteriálních kmenů produkujících polyhydroxyalkanoáty (PHA). Pomocí plynové chromatografie s FID detekcí jsme stanovili obsah polyhydroxybutyrátu (P(3HB)) v biomase PHA produkujících bakteriálních kmenů *Burkholderia cepacia*, *Halomonas halophila*, *Cupriavidus necator* H16 a jeho mutantního kmene *Cupriavidus necator* H16/PHB-4 a dále *Lactobacillus delbrueckii*, která sice není producentem polyhydroxyalkanoátů, ale byla vybrána jakožto zástupce grampozitivních bakterií. Následně jsme díky Ramanově mikrospektroskopii, Ramanovské pinzetě a FT-IR spektrometru v kombinaci s Ramanovým FT-modulem dokázali potvrdit či vyvrátit přítomnost P(3HB) u bakterií. Dále práce popisuje bakterii *Cupriavidus necator* H16, která je modelovým organismem pro produkci P(3HB), a její mutantní kmen *Cupriavidus necator* H16/PHB-4. Bakteriální kmen *Cupriavidus necator* H16 byl kultivován v produkčním minerálním médiu o různém obsahu dusíku, a zároveň kultivace probíhala i v tekutém médiu Nutrient Broth, čímž byla připravena bakteriální biomasa s různým obsahem P(3HB), spektra se následně porovnávala se spektrem bakteriálního kmene *Cupriavidus necator* H16/PHB-4. Ramanova spektroskopie nachází dobré uplatnění při charakterizaci složení jednotlivých bakteriálních buněk, je rychlým, všestranným a prakticky neinvazivním nástrojem pro studium buněk.

KLÍČOVÁ SLOVA

Ramanova spektroskopie, Ramanovská pinzeta, *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* H16/PHB-4, *Burkholderia cepacia*, *Halomonas halophila*, *Lactobacillus delbrueckii*

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the study of the utilization of Raman spectroscopy and Raman tweezers for analysis and isolation of polyhydroxyalkanoates (PHA) producing bacteria. Using gas chromatography with FID detection, we determined the polyhydroxybutyrate (P(3HB)) content of the PHA biomass of bacterial strains *Burkholderia cepacia*, *Halomonas halophila*, *Cupriavidus necator* H16 and its mutant strain *Cupriavidus necator* H16/PHB-4 and *Lactobacillus delbrueckii*, which is not a producer of polyhydroxyalkanoates but this bacteria was selected as representative of Gram-positive bacteria. Subsequently, thanks to Raman microspectroscopy, Raman tweezers and FT-IR spectrometer in combination with Raman FT-module, we were able to confirm or disprove the presence of P(3HB) in bacteria. Furthermore, the thesis describes *Cupriavidus necator* H16, which is a model organism for the production of P(3HB), and his mutant strain *Cupriavidus necator* H16/PHB-4. The bacterial strain *Cupriavidus necator* H16 was cultivated in a production mineral medium of various nitrogen contents, while cultivation was also carried out in liquid Nutrient Broth. By this cultivation we were able to reach various P(3HB) content in bacterial biomass, the spectra were subsequently compared with the spectrum of the bacterial strain *Cupriavidus necator* H16/PHB-4. Raman spectroscopy is well used to characterize the composition of individual bacterial cells, is a fast, versatile, and virtually non-invasive tool for studying cells.

KEYWORDS

Raman spectroscopy, Raman Tweezers, *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* H16/PHB-4, *Burkholderia cepacia*, *Halomonas halophila*, *Lactobacillus delbrueckii*

BERÁNKOVÁ, Barbora. *Využití Ramanovy spektroskopie a Ramanovské pinzety k analýze a izolaci PHA produkujících bakterií*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113528>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Stanislav Obruča.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala mému vedoucímu doc. Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D. za trpělivost, ochotu a cenné připomínky při zpracování mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat mým konzultantům Ing. Danu Kučerovi za pomoc při práci v laboratoři a pečlivou korekturu mé teoretické části a Mgr. Otu Samkovi, Dr. za nápady a pomoc při realizaci mé experimentální části. Ing. Petru Sedláčkovi, Ph.D. patří poděkování za analýzu vzorků pomocí FT-IR spektrometru s Ramanovým FT-modulem.

Speciální poděkování patří Mgr. Martinu Kizovskému, který byl po celou dobu naší spolupráce trpělivý, dokázal mi zodpovědět veškeré dotazy týkající se Ramanovy mikrospektroskopie a ochotně mi pomohl při vyhodnocování dat, a také Ústavu přístrojové techniky AV ČR v Brně za možnost zpracování experimentální části v jejich prostorách.

Mému manželovi a rodině děkuji nejen za podporu a trpělivost při vypracovávání této diplomové práce, ale i za obrovskou podporu během celého mého studia.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
	2.1 Polyhydroxyalkanoáty (PHA)	9
	2.1.1 Historie PHA.....	9
	2.1.2 Rozdělení a typy PHA.....	10
	2.1.3 Biosyntéza PHA.....	12
	2.1.4 Biodegradace P(3HB).....	14
	2.1.5 Bakterie produkující PHA	15
	2.1.5.1 <i>Cupriavidus necator</i> H16.....	16
	2.1.5.2 <i>Cupriavidus necator</i> H16/PHB-4.....	16
	2.1.5.3 <i>Burkholderia cepacia</i>	16
	2.1.5.4 <i>Halomonas halophila</i>	17
	2.1.6 Aplikace PHA	17
	2.2 Ramanova spektroskopie.....	18
	2.2.1 Historie Ramanovy spektroskopie	18
	2.2.2 Princip Ramanovy spektroskopie.....	18
	2.2.3 Využití Ramanovy spektroskopie	20
	2.2.4 Ramanova spektroskopie buněk	20
	2.2.5 Ramanovská pinzeta.....	21
	2.2.5.1 Princip.....	21
	2.2.5.2 Isolace a třídění buněk	23
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
	3.1 Použité mikroorganismy, chemikálie a přístrojové vybavení	24
	3.1.1 Použité mikroorganismy.....	24
	3.1.2 Použité chemikálie	24
	3.1.3 Použité přístrojové vybavení	24
	3.2 Kultivace mikroorganismů	25
	3.2.1 Příprava a kultivace bakteriálních inokul	25
	3.2.2 Kultivace bakterií za účelem produkce P(3HB)	26
	3.2.3 Kultivace bakterie <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	28
	3.3 Stanovení biomasy	29

3.3.1	Gravimetrické stanovení obsahu biomasy	29
3.4	Stanovení PHA pomocí plynové chromatografie s FID	29
3.4.1	Stanovení kalibrační závislosti	29
3.4.2	Příprava vzorků pro plynovou chromatografii.....	30
3.5	Spektroskopické techniky.....	30
3.5.1	Příprava vzorků na Ramanovu analýzu.....	30
3.5.1.1	FT-IR spektrometr v kombinaci s Ramanovým FT-modulem.....	30
3.5.1.2	Ramanova mikrospektroskopie	31
3.5.1.3	Ramanovská pinzeta	32
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	33
4.1	Gravimetrické stanovení obsahu biomasy.....	33
4.2	Stanovení obsahu PHA v biomase.....	34
4.3	Spektroskopické techniky.....	36
4.3.1	Studium charakteristických Ramanovských spekter vybraných bakteriálních kmenů	36
4.3.1.1	<i>Cupriavidus necator</i> H16.....	36
4.3.1.2	<i>Cupriavidus necator</i> H16/PHB-4	40
4.3.1.3	<i>Halomonas halophila</i>	44
4.3.1.4	<i>Burkholderia cepacia</i>	47
4.3.1.5	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	50
4.3.2	Studium charakteristických Ramanovských spekter u bakterie <i>Cupriavidus necator</i> s různým obsahem P(3HB)	54
5	ZÁVĚR.....	58
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	60
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	67

1 ÚVOD

Rychlá, přesná a spolehlivá identifikace mikroorganismů je důležitým kritériem v mnoha odvětvích výzkumu či průmyslu, ať už se jedná o charakterizaci mikroorganismů v lékařství, při farmaceutické výrobě nebo v technologiích, které zpracovávají potraviny. Samotná identifikace mikroorganismů bývá zdlouhavá a často celý proces trvá déle než jeden den. Postupně byly vyvíjeny různé analytické metody, které umožňují rozsáhnou a rychlou identifikaci mikrobů.

V posledních dvou desetiletích nabízí velké uplatnění Ramanova spektroskopie, která poskytuje spolehlivou a nedestruktivní identifikaci jednotlivých bakteriálních buněk. Jednou z hlavních výhod Ramanovy spektroskopie je schopnost vyobrazení celkového složení buňky, tato metoda se využívá k charakterizaci nukleových kyselin, proteinů, sacharidů či lipidů v buňkách, možná je i charakterizace různých typů buněk a prokázání fyziologických nebo fenotypových změn v jednotlivých živých buňkách či charakterizace produkce polyhydroxyalkanoátů (PHA) během kultivačního procesu a detekce množství PHA v jednotlivých časech růstu daných bakterií. Díky tomu je možné živé buňky a tkáně identifikovat na základě jejich „biochemického podpisu“ za fyziologických podmínek.

Celosvětovým problémem je momentálně velké množství plastů, které velmi často bývají v přírodě téměř nerozložitelné, proto se nabízí možnost nahradit klasické plasty na bázi ropy alternativními materiály, které mají podobné vlastnosti, ale navíc schopnost degradace. Mezi nejznámější, biologicky odbouratelné plasty patří PHA, které jsou zcela biosyntetické, biologicky odbouratelné a plně recyklovatelné do organického odpadu. PHA jsou syntetizovány a uloženy v bakteriálních buňkách ve formě intracelulárních granulí.

Pomocí Ramanovy spektroskopie jsme schopni detekovat obsah PHA v bakteriálních buňkách, porovnat mezi sebou spektra a určit obsah PHB. Díky Ramanovské pinzetě máme schopnost provést analýzu na úrovni jedné buňky, díky optické pasti, která se vytvoří k fixaci buňky, jsme schopni zjistit nejen chemické složení buňky, ale buňkou je možné následně i manipulovat.

V této diplomové práci jsem se zabývala uplatněním Ramanovy spektroskopie a Ramanovské pinzety v analýze a izolaci PHA produkujících bakterií. Pomocí Ramanovy spektroskopie a následně Ramanovské pinzety byly studovány buňky jednotlivých zástupců PHA produkujících bakterií za různých podmínek přípravy.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Polyhydroxyalkanoáty (PHA)

Syntetické plasty jsou chemickým průmyslem vyráběny od počátku 30. let, mají pozitivní vlastnosti, jako je pevnost, lehkost a trvanlivost. Přestože jsou biologicky nerozložitelné, stávají se důležitým materiálem pro zlepšení kvality lidského života. Plastové výrobky jsou často jednoúčelově využívány, zejména při balení potravin nebo jako zdravotnický materiál. Protože plastové výrobky nejsou biologicky odbouratelné, hromadí se v našem ekosystému, což má za následek značnou zátěž pro nakládání s pevným odpadem. Každý rok se vyrobí kolem 400 milionů tun plastu a z toho až 40 % je pouze na jedno použití. Více než osm milionů tun plastů vstupuje každý rok do oceánu, nejčastěji jako vyhazované odpadky z lodí nebo jako pozůstalý odpad z pláží. Odborníci udávají, že do roku 2050 bude množství plastu v oceánu vážit více než množství ryb v oceánu. Je velmi obtížné snížit spotřebu plastových výrobků kvůli jejich všestranným vlastnostem, ale je možné nahradit klasické plasty na bázi ropy alternativními materiály, které mají podobné vlastnosti, ale navíc schopnost degradace [1], [2].

Mezi různými typy biologicky rozložitelných plastů patří mezi nejznámější polyhydroxyalkanoáty (PHA), které jsou zcela biosyntetické, biologicky odbouratelné a plně recyklovatelné do organického odpadu. Polyhydroxyalkanoáty jsou přírodní polyestery složené z různých hydroxyalkanoátů. Tyto polyestery mají chemické a fyzikální vlastnosti podobné plastům vyráběných na bázi ropy, proto přitahují velkou pozornost převážně z důvodu jejich možné náhrady. Hlavní výhodou polyhydroxyalkanoátů je biologická rozložitelnost a biokompatibilita [3], [4].

PHA jsou akumulovány v bakteriálních buňkách ve formě intracelulárních granulí. Ačkoliv více než 300 různých mikroorganismů syntetizuje PHA, pouze několik z nich, jako např. *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas oleovorans*, *Paracoccus denitrificans*, *Protomonas extorquens* a rekombinantní *E. coli*, jsou schopné produkovat dostatečné množství PHA pro produkci ve velkém měřítku. Ke tvorbě polymeru dochází v podmínkách nedostatku, kdy růst samotné biomasy je omezen limitací přísunu dusíku, fosforu nebo kyslíku, avšak za nadbytečného přísunu uhlíkatých surovin [1], [5], [6].

2.1.1 Historie PHA

Prvním příkladem PHA, který byl objeven, byl poly(3-hydroxybutyrát) P(3HB). V roce 1926 francouzský vědec Maurice Lamoigne poprvé izoloval a charakterizoval P(3HB) z grampozitivní bakterie *Bacillus megaterium*. Od této první zmínky se začalo více soustředit na mikroorganismy, ve kterých by se akumulace P(3HB) mohla vyskytovat [7].

Roku 1958 vědci Macrae a Wilkinson dokázali, že zástupci grampozitivních či gramnegativních bakterií nebo archeobakterií syntetizují a shromažďují PHA jako zásobní formu energie a uhlíku za podmínek omezení živin, avšak pouze při vysokém poměru uhlíku

k dusíku. Začátkem roku 1959 byly zřízeny společnosti, které podporovaly PHA jako bioplasty šetrné k životnímu prostředí [7].

V roce 1974 dokázali Wallen a Rohwedder identifikovat i jiné typy PHA než pouze P(3HB). Izolací z aktivovaného kalů odpadních vod bylo získáno majoritní množství 3-hydroxyvalerátů (3HV) a minoritní množství 3-hydroxyhexanoátu (3HHx). Identifikace dalších druhů PHA měla velký vliv na rozvoj výzkumu těchto polyesterů, vzrostl i obchodní zájem o tento bakteriální polymer. V roce 1976 společnost Imperial Chemical Industries (ICI Ltd., UK) uznala potenciální použitelnost P(3HB) jakožto možnou náhradu některých druhů plastů pocházejících z ropy. V této fázi se také uskutečnila první průmyslová výroba kopolymeru složeného z 3-hydroxybutyrátu (3HB) a 3-hydroxyvalerátu (3HV), který je na trhu známý pod názvem Biopol™ [7], [8].

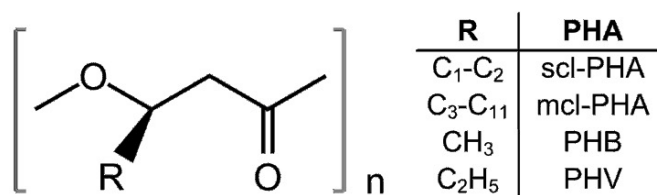
Začátkem roku 1980 započala další etapa vývoje, a to ve výzkumu týkajícího se klonování a charakterizace genů podílejících se na biosyntéze těchto bakteriálních polyesterů. Nástupem molekulární biologie se vyskytly nové možnosti pro biologický výzkum PHA, což přispělo k pochopení principu biosyntézy PHA na genové úrovni. Od 90. let vědci z celého světa pracují na využívání PHA pro různé průmyslové, zemědělské a lékařské aplikace [8].

V posledním desetiletí byla pozornost věnována přechodu z plastů na bázi ropy na biologické alternativy, které jsou založeny na obnovitelných zdrojích, jsou schopné biologického rozpadu a kompostování a splňují vlastnosti klasických plastů. Aby bylo PHA konkurenceschopné klasickým plastům na bázi ropy, je potřeba, aby byly schopné jim konkurovat z hlediska jak kvality, tak i hlediska ekonomického. Některé studie se zabývají nalezením a využíváním různých alternativ, převážně levných surovin nebo odpadních látek pro produkci PHA, jako je např. použitý fritovací olej. Nevýhodou však stále zůstávají vysoké výrobní náklady PHA. Zatímco cena polymerů, jako je polypropylen (PP) nebo polyethylen (PE) se pohybuje kolem 0,60–0,87/lb USD, náklady na biopolymer PHA se odhadují na 3–4krát vyšší. Hlavním důvodem jsou vysoké náklady za substráty s vysokou čistotou, jako je třeba glukosa. Předpokládá se, že s rostoucí dostupností surovin z obnovitelných zdrojů a rostoucí poptávkou po odbouratelných plastech se naskytne vhodnější ekonomická příležitost pro využití biologicky rozložitelných polymerů pro biomedicínské, balicí a potravinářské aplikace [9], [10],[11].

2.1.2 Rozdělení a typy PHA

Polyhydroxyalkanoáty jsou lineární polyestery skládající se z monomerů hydroxykyselin (HA) spojených pomocí esterové vazby. Tato vazba se vytváří spojením karboxylové skupiny jednoho monomeru s hydroxylovou skupinou sousedního monomeru [1].

Polyhydroxyalkanoáty jsou nejčastěji klasifikovány do dvou skupin v závislosti na počtu atomů uhlíku v monomerních jednotkách (Obrázek 1). V mikrobiálních polyesterech se všechny monomerní jednotky vyskytují v konformaci R vzhledem ke stereospecifitě biosyntetických enzymů. Molekulová hmotnost u PHA se pohybuje v rozmezí 200 000–3 000 000 Da [7].



Obrázek 1 - Struktura PHA [12]

První skupinou jsou PHA s krátkým řetězcem (scl – short-chain-length), obsahují 3 až 5 atomů uhlíků a jsou syntetizovány širokým spektrem bakterií, jako je např. *Cupriavidus necator*. Pro scl-PHA byly detekovány monomerní jednotky oxidované i v jiných polohách než pouze na třetím uhlíku, příkladem je třeba 4-hydroxybutyrát (4HB), 4-hydroxyvalerát (4HV) a 5-hydroxyvalerát (5HV) [7], [13].

Nejlépe charakterizovaným a nejvíce studovaným typem PHA, produkovaného mnoha typy mikroorganismů, je poly(3-hydroxybutyrát) P(3HB) (Obrázek 1). Procento P(3HB) v těchto buňkách je normálně velmi nízké, mezi 1 % až 30 %, ale za vhodných fermentačních podmínek, kdy je přebytek uhlíku na úkor dusíku, produkce biopolymeru vzroste na výtěžnost až 90 %. Je to krystalický, lineární polyester kyseliny 3-hydroxymáselné, generovaný celou řadou bakterií jako uhlíková rezerva, průmyslově je nejčastěji vyráběn fermentací glukózy bakterií *Cupriavidus necator*. Mechanické vlastnosti P(3HB) jsou velmi podobné běžným plastům jako je polypropylen nebo polyethylen. P(3HB) má užitečné vlastnosti, jako je nerozpustnost ve vodě, odolnost vůči vlhkosti, optická čistota a dobrá rozpustnost kyslíku. Nevýhodou je, že teplota tání je velmi blízká teplotě rozkladu P(3HB), z tohoto důvodu je jeho zpracování komplikovanější. Mechanické vlastnosti komerčně dostupného P(3HB) nacházejí uplatnění při aplikaci v lékařství jako implantáty [5], [8], [14], [15], [17], [18].

Zahrnutím (3-hydroxyvalerátu) (3HV) do struktury P(3HB) vzniká kopolymer poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) P(3HB-co-3HV). Množství 3HV v kopolymeru je důležitým parametrem pro dosažení optimálních vlastností materiálu. Zvýšený obsah 3HV v kopolymeru má za následek snížení teploty tání, ale zároveň i snížení pevnosti a pružnosti v tahu, jsou tedy i lépe tvárné, a proto jsou lepšími kandidáty na komoditní materiál než čistý P(3HB). Porovnání vlastností P(3HB) a jeho kopolymeru je uvedeno níže (Tabulka 1). Také bylo dokázáno, že méně krystalická složka 3HV v kopolymeru vykazuje vyšší rychlost degradace než vysoce krystalická složka 3HB, proto je možné úpravou procentuálního složení obsahu 3HV v kopolymeru „ladit“ požadovanou dobu degradace [15], [19], [20].

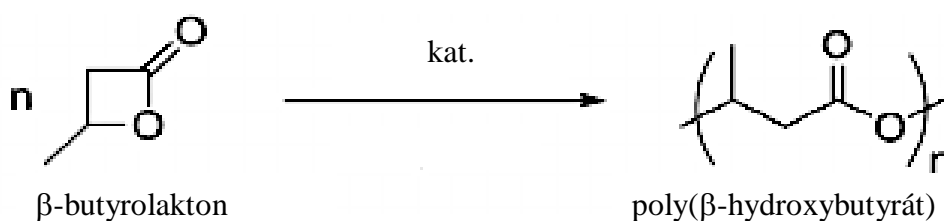
Tabulka 1 - Srovnání fyzikálních vlastností polymerů [20]

Polymer	Bod tání (°C)	Pevnost v tahu	Pružnost
P(3HB)	179	40	3,5
P(3HB-co-3HV) 3 mol% 3HV	170	38	2,9
P(3HB-co-3HV) 9 mol% 3HV	162	37	1,9
P(3HB-co-3HV) 14 mol% 3HV	150	35	1,5
P(3HB-co-3HV) 20 mol% 3HV	145	32	1,2
P(3HB-co-3HV) 25 mol% 3HV	137	30	0,7
Polypropylen (PP)	170	35	1,7
Polyethylentereftalát (PET)	262	56	2,2
Polystyren (PS)	110	50	3,1

Druhou skupinou jsou PHA s dlouhým řetězcem (mcl – medium-chain-length) skládající se z 6 až 14 atomů uhlíku. Mezi hlavní zástupce schopné akumulace PHA s dlouhým řetězcem patří převážně druhy rodu *Pseudomonas*. Na rozdíl od scl-PHA zde byly všechny doposud zjištěné monomerní jednotky oxidovány pouze na třetím uhlíku, výjimku tvoří nedávno identifikovaný 4-hydroxyhexanoát (4HHx). PHA s dlouhým řetězcem jsou elastomery s velmi úzkým teplotním rozmezím, s nízkou teplotou tání a toto činí mcl-PHA pružnějším a elastičtějším materiálem, než je PHA s krátkým řetězcem [1], [7], [13].

2.1.3 Biosyntéza PHA

PHB může být vyrobeno buď pomocí chemické syntézy, nebo biosyntézou, kdy jsou PHA syntetizovány a intracelulárně akumulovány v buňce. Chemická syntéza vychází z polymerace β -butyrolaktonu, kdy dochází k otevření kruhu cyklické sloučeniny (ring-opening polymerization). Reakci katalyzují hlavně organokovové katalyzátory na bázi zinku a hliníku [22].

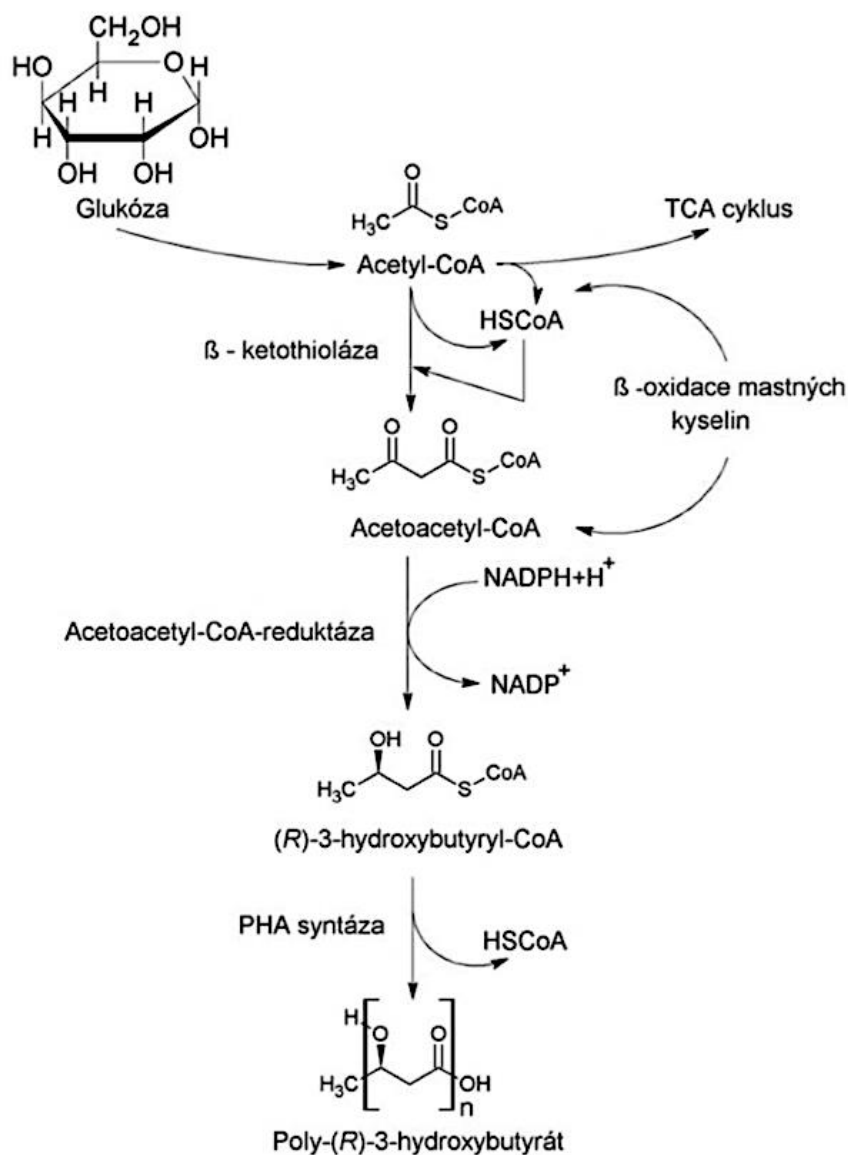


Obrázek 2 - Ring-opening polymerization [23]

Polyhydroxyalkanoáty v bakteriích slouží jako intracelulární zásobárna potravy a energie, jsou produkovány buňkou při omezeném množství živin v prostředí. Omezením živin se aktivuje metabolická cesta, která shlukuje acetylové jednotky z Krebsova cyklu (TCA) a dále pokračuje až k samotné výrobě P(3HB). Syntéza P(3HB) závisí na řadě podmínek, včetně povahy použitých zdrojů uhlíku a dusíku, ve většině bakterií se P(3HB) syntetizuje, pokud je

zdroj uhlíku v nadbytku a další živina, nejčastěji dusík, síra nebo fosfor, je limitována [21], [22].

Počet metabolických cest k produkci P(3HB) se neustále zvyšuje, avšak nejprostudovanější biosyntetická dráha pro produkci P(3HB) se skládá ze sledu tří enzymatických reakcí, které jsou katalyzovány třemi různými enzymy. Třístupňovou reakci zahajuje acetyl-CoA. Dvě molekuly acetyl-CoA jsou kondenzovány na acetoacetyl-CoA pomocí enzymu β -ketoacylthiolasu (PhaA), ten je následně redukován na (R)-3-hydroxybutyryl-CoA, kde je reakce katalyzována NADPH-dependentní reduktázou (PhaB). Posledním krokem je kondenzace dvou monomerních jednotek, katalyzovaných stereospecifickou PHA syntázou (PhaC) za vzniku poly(3-hydroxyalkanoátů). V této biosyntetické dráze jsou zapotřebí geny *phaA*, *phaB* a *phaC*, které kódují příslušné enzymy [15], [22].



Obrázek 3 - Biosyntetická dráha poly(3-hydroxybutyrátu) [16]

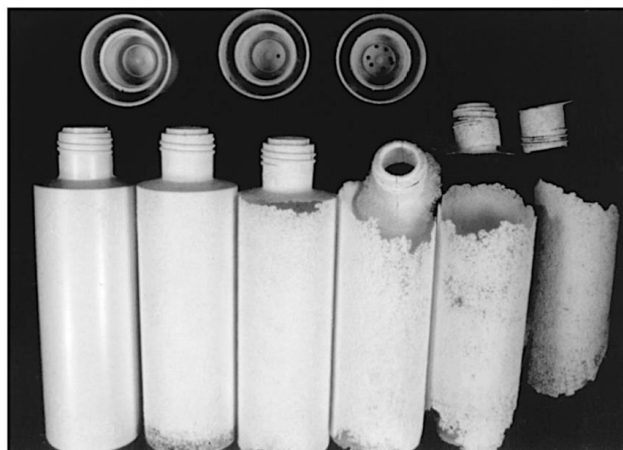
Biosyntéza PHA je regulována na enzymatické úrovni a je ovlivněna výběrem vhodného substrátu, který zajistí optimální podmínky pro akumulaci P(3HB). Intracelulární koncentrace acetyl-CoA a volného koenzymu A má významný vliv na regulaci syntézy polymerů. Při vhodných růstových podmínkách, kdy je mikroorganismus kultivován v médiu bez limitace dusíkem, se acetyl-CoA oxiduje v Krebsově cyklu (TCA). Během reakce se generuje NADH, využívané pro biosyntetické účely. Při přetrvávajícím růstu se zvyšuje koncentrace NADH, čímž se snižuje aktivita cyklických enzymů TCA, citrát syntázy a isocitrát dehydrogenázy [22].

2.1.4 Biodegradace P(3HB)

Biodegradace je proces, při kterém dochází k rozkladu složité struktury organických sloučenin na netoxické produkty s nižší molekulovou hmotností. Konečné produkty biodegradace mohou být dále využity pro speciální bakterie, které jsou schopny zpracovat nežádoucí organické sloučeniny jako zdroj energie a uhlíku pro svůj růst. Jednou z jedinečných vlastností PHA materiálů je jejich biologická rozložitelnost v přírodním prostředí, jako je půda či voda. Biodegradace PHA může probíhat za anaerobních podmínek, kdy konečnými produkty je oxid uhličitý, voda a methan, nebo při aerobních podmínkách za vzniku oxidu uhličitého a vody [24], [25].

Enzymatická degradace je dvoustupňový proces. V prvním kroku se naváže enzym na polymerní substrát a následně katalyzuje hydrolytické štěpení. Obecně existují dva typy PHA depolymeráz, které jsou klasifikovány jako intracelulární PHA depolymerázy a extracelulární PHA depolymerázy [25].

Při intracelulární degradaci dochází k hydrolyze endogenních zásob uhlíku, který je naakumulován uvnitř buňky. Enzymy, katalyzující intracelulární degradaci PHA, jsou intracelulární PHA depolymerázy. Intracelulární P(3HB) depolymerázy dokáží rychle a efektivně hydrolyzovat nativní P(3HB) granule, které obsahují proteiny a lipidy. Je známo, že některé bakterie produkující PHA intracelulárně degradují PHA ve stresových či nějak nepříznivých podmínkách pro svůj růst. Ačkoliv intracelulární P(3HB) depolymerázy hrají řadu důležitých rolí při degradaci P(3HB), kvůli složitosti jejich působení není o tomto enzymu tolik známo [8], [25], [26].



Obrázek 4 - Degradace PHA. Lahev z P(3HB-co-3HV) inkubována během léta při průměrné teplotě 20 °C ve splaškovém kalu. Průběh degradace zaznamenáván v 0, 2, 4, 6, 8 a 10 týdnech (zleva doprava) [29]

V přirozeném prostředí se granule PHA nahromaděné v bakteriích uvolňují do životního prostředí po lýzy buněk. Extracelulární degradace využívá hydrolýzy pevného, částečně krystalického polymeru P(3HB), který není možné hydrolyzovat intracelulární P(3HB) depolymerázou na ve vodě rozpustné oligomery a monomery pomocí extracelulárních P(3HB) depolymeráz, které produkují některé druhy mikroorganismů. Extracelulární PHA depolymerázy jsou rozděleny do dvou tříd na základě jejich substrátové specifity. Jedna skupina obsahuje scl-PHA depolymerázy, které degradují pouze P(3HB) a jeho kopolyestery. Druhá skupina se skládá z depolymeráz mcl-PHA. Primárně rozkládají alifatické a aromatické PHA, skládající se z dlouhých 3-hydroxyalkanoátů se 6 až 14 atomy uhlíku. Podle studie je známo, že většina PHA degradujících mikroorganismů produkuje pouze jeden typ PHA depolymeráz [8], [25], [26].

Na proces biodegradace má vliv několik faktorů, mezi ty nejzásadnější patří teplota, vlhkost, pH, obsah živin a kyslíku nebo polymerní složení. Rychlost enzymatické eroze P(3HB) depolymerázou je silně závislá na koncentraci enzymu. Povrchové podmínky či celková chemická struktura hrají důležitou roli v biodegradacích procesech. Obecně platí, že polyestery s postranními řetězci jsou méně asimilovány než ty, které postranní řetězce nemají [25], [26].

2.1.5 Bakterie produkující PHA

Polyhydroxyalkanoáty jsou ve většině bakterií syntetizovány a intracelulárně akumulovány ve formě granulí za nepříznivých podmínek růstu, jako je omezení dusíku, fosforu, hořčiku nebo kyslíku, a to za přítomnosti nadbytku uhlíku. Každá granule je obklopena fosfolipidovou membránou, ve které jsou umístěny proteiny, včetně PHA syntázy a depolymerázy. Velmi důležité je proto vyvinout takovou kultivační strategii, aby byla výroba PHA co nejefektivnější [28], [30].

2.1.5.1 *Cupriavidus necator* H16

Bakterie *Cupriavidus necator* H16, dříve známá pod názvem *Ralstonia eutropha* H16 je gramnegativní, fakultativně chemolitotrofní prokaryota, která našla široké uplatnění jako biotechnologický produkční mikroorganismus, zejména k produkci biopolymerů. Tato bakterie je schopna využívat CO₂ a H₂ jako zdroj uhlík a energie pro svůj růst. Pro svůj aerobní růst vyžaduje jednoduché zdroje uhlíku ve formě fruktosy či glukosy a přidavek minerálních solí [31], [32].



Obrázek 5 - Bakterie *Cupriavidus necator* H16

Cupriavidus necator H16 je producentem scl-PHA, obvykle P(3HB). Buňky této bakterie jsou schopné akumulace PHA polymeru v množství až 80 hm. % suché buněčné hmoty. V přítomnosti glukosy a kyseliny propionové, jakožto prekurzoru k tvorbě 3HV, je *Cupriavidus necator* H16 schopna syntézy kopolymeru P(3HB-co-3HV) s obsahem 3HV v rozmezí 5 až 25 mol. % [30], [31], [32].

2.1.5.2 *Cupriavidus necator* H16/PHB-4

Na začátku šedesátých let 20. století přitahovaly pozornost různé druhy mutantních druhů bakterií *Cupriavidus necator*, jakožto možný producent tzv. single-cell proteinu (SCP), určený k výrobě výživy pro zvířata a nebo jako potrava pro kosmonauty ve vesmíru. Během těchto výzkumů byl izolován mutantní kmen a nejvýznamnější zástupce PHB negativních mutantů *Cupriavidus necator* H16/PHB-4. Tento mutant byl izolován převážně z toho důvodu, že zvířata i lidé nejsou schopni polymer P(3HB) degradovat, a proto pro ně nemá žádný nutriční význam [34].

Mutantní kmen, bakterie *Cupriavidus necator* H16/PHB-4, je tedy stejnou bakterií jako modelový organismus pro produkci PHA, bakterie *Cupriavidus necator* H16, avšak s tím rozdílem, že není možná produkce polymeru P(3HB) [34].

2.1.5.3 *Burkholderia cepacia*

Burkholderia cepaciae je gramnegativní bakterie, původně parazitující na cibulovitých rostlinách. Společně s dalšími bakteriemi tvoří tzv. *Burkholderia cepacia* komplex (BCC). V současnosti tento komplex obsahuje okolo dvaceti příbuzných druhů bakterií. Tato bakterie je problematickým patogenem u pacientů s onemocněním jako je cystická fibróza nebo chronická granulomatózní choroba. *Burkholderia cepaciae* vykazuje vysokou odolnost vůči mnoha antibiotikům a dezinfekčním látkám [35], [36].

Pro bakterii *Burkholderia cepacia* je možné využívat širokou škálu zdrojů uhlíku, včetně xylulózy, galaktózy, glukózy, glycerolu, k produkci PHA s krátkým řetězcem (scl-PHA). Kromě homopolymeru polyhydroxybutyrátu P(3HB) a polyhydroxyvalerátu P(3HV), je schopná produkce i kopolymeru P(3HB-co-3HV). Začleněním P(3HV) s P(3HB) za vzniku kopolymeru je možné získat nižší krystalinitu a lepší elasticnost materiálu [35], [37], [38].

2.1.5.4 *Halomonas halophila*

Halomonas halophila, dříve známá jako *Deleya halophila*, je gramnegativní a aerobní, halofilní bakterie. Tato bakterie produkuje PHA, v případě kultivace v minerálním médiu s omezeným obsahem dusíku je *Halomonas halophila* schopna akumulace PHA až 82hm. % buněčné sušiny. Jelikož se jedná o halofilní bakterii, nejvyšších výtěžků P(3HB) dosahuje při optimální koncentraci NaCl 60 g/l. [42], [43], [44].

2.1.6 Aplikace PHA

Současným problémem je nadměrná produkce odpadu spolu s nadměrným množstvím vyprodukovaných plastů, které se v přírodě rozkládají mnoho desítek až stovek let. Momentálně je kladen důraz na ekologickou činnost a zamezení nadbytečné produkce odpadu, proto se čím dál více zvyšuje zájem o využívání PHA, hlavní příčinou je, že PHA jsou netoxické, biokompatibilní a biologicky odbouratelné termoplasty, jejichž velkou výhodou je možnost jejich výroby z obnovitelných zdrojů. Díky vlastnostem, jako je vysoká krystalinita, optická aktivita či nerozpustnost ve vodě, jsou velkou konkurencí polypropylenu, nejvíce využívaného plastu získávaného v petrochemickém průmyslu [15], [28].

V posledních letech se společnosti začaly zajímat o využití PHA v obalových, biomedicínských či zemědělských aplikacích. Původně byly PHA používány k výrobě běžných předmětů, jako jsou lahve na šampon a obalové materiály. PHA byly převážně vyvinuty jako obalové fólie, především k použití jako nákupní tašky, obaly a jednorázové předměty. Mohou být použity i jako nosiče pro dlouhodobé uvolňování herbicidů nebo insekticidů. Vysoká molekulová hmotnost PHA může být užitečná při výrobě ultra silných vláken využívaných v rybářství [28].

Homopolymer P(3HB) a kopolymer P(3HB-co-3HV) jsou nejvíce studované PHA pro lékařské aplikace. V posledních letech jsou považovány za přední materiál při výrobě kardiovaskulárních přípravků (srdeční chlopně, stenty, štěpy), uplatnění nacházejí i jako drug delivery systémy (tablety, mikronosiče pro protinádorovou léčbu), při léčbě ran (stehy), ale i v ortopedii jako implantáty, prostředky na opravu šlach. Díky vysoké imunotoleranci, nízké toxicitě a možné biologické odbouratelnosti je přínosné uplatnění polyhydroxyalkanoátů v tkáňovém inženýrství [28], [45].

Každým rokem poptávka po bioplastech roste, ale i přesto jsou polyhydroxyalkanoáty stále relativně novou skupinou biologicky rozložitelných polymerů, které mají v budoucnu velký potenciál využití díky jejich širokému spektru možného uplatnění [28].

2.2 Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie je laserová technologie, která se v posledních dvou desetiletích rozrostla od fyziky a chemie až k biomedicině. Může být využívána jako neinvazivní, nedestruktivní, dokonce i bezkontaktní monitorovací metoda v řadě biomedicínských oborů. Ramanovské spektrum vyobrazuje celkové molekulární složení, včetně specifických signálů z proteinů, nukleových kyselin, lipidů a sacharidů, ale i anorganických látek biologických vzorků. Díky tomu mohou být živé buňky a tkáně identifikovány na základě jejich „biochemického podpisu“ za fyziologických podmínek. Ramanova spektroskopie poskytuje spolehlivé výsledky, které lze rychle získat z minimálního objemu vzorku [46].

2.2.1 Historie Ramanovy spektroskopie

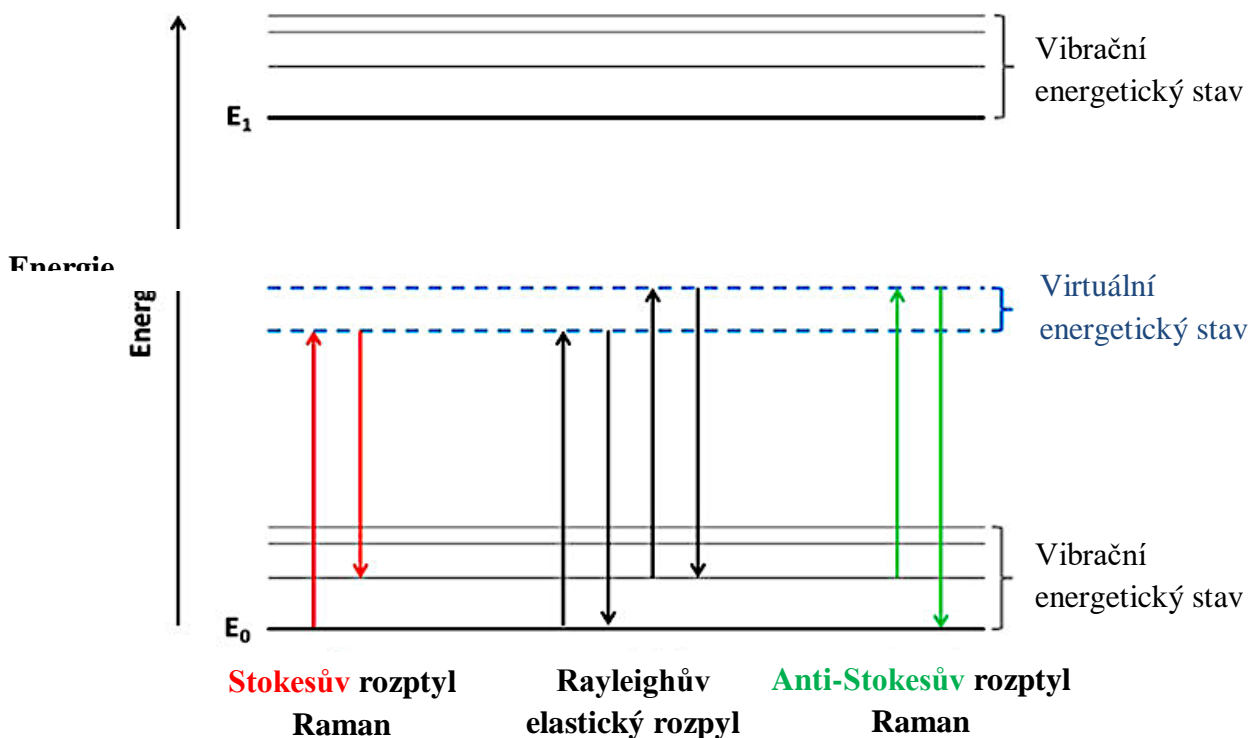
Objevitelem tzv. Ramanova rozptylu je indický lékař Chandrasekhara Venkata Ramana, který jej nejdříve předpověděl a poté roku 1928 popsal jako nový druh sekundárního záření. Ramanův efekt je nepružným rozplyem elektromagnetického záření, který vzniká v důsledku výměny energie mezi zářením a molekulovými vibracemi. Roku 1930 C. V. Raman získal Nobelovu cenu za výzkum světelného rozptylu a objevu Ramanova rozptylu [46], [47].

Vzhledem k citlivosti metody byla Ramanova spektroskopie poprvé použita k odhalení molekulárních struktur čistých chemikálií a dodnes se využívá k charakterizaci a identifikaci chemických složek a pevných látek [46].

2.2.2 Princip Ramanovy spektroskopie

Ramanova spektroskopie je rychlá, přímá a nedestruktivní analytická metoda, která studuje vibrační přechody molekul, díky kterým získáváme informace o struktuře a vlastnostech molekuly. Tato metoda je založena na měření rozptyleného záření vznikajícího z interakcí monochromatického laserového paprsku, který dopadá na molekuly vzorku, a tím dochází k jeho excitaci ze základního elektronového stavu do tzv. virtuálního energetického stavu [49], [50].

Jsou známy dva typy rozptylů, Rayleighův a Ramanův. Při Rayleighově (elastickém) rozptylu je molekula excitovaná ze základního stavu do virtuálního stavu a při následné deexcitaci je emise záření o stejné energii i vlnové délce, jako byla jejich původní hodnota. U Ramanova (neelastického) rozptylu dochází ke změně energie záření. Pokud se molekula po deexcitaci vrací na vyšší energetickou vibrační hladinu základního elektronového stavu a emituje záření o nižší energii, tedy větší vlnové délce, než bylo budící záření, projeví se zde změna v Ramanově spektru jako Stokesovy linie. Molekuly, které se nachází ve vyšší vibrační hladině elektronového stavu a po deexcitaci se vrací z virtuální hladiny na základní vibrační hladinu základního elektronového stavu s větší energií emisního záření a nižší vlnovou délkou než u budícího záření, vykazují v Ramanově spektru tzv. anti-Stokesovy linie [49], [50]. Zobrazení jednotlivých přechodů je znázorněno na obrázku níže (Obrázek 6).



Obrázek 6 - Znáornění jednotlivých přechodů mezi energetickými stavy molekuly [51]

Podmínkou aktivity vibrace v Ramanově spektroskopii je změna polarizovatelnosti molekuly během vibrace. Polarizovatelnost molekuly je v podstatě mírou schopnosti posouvat v molekule náboje působením elektrického pole a vytvářet indukovaný dipól. Polarizovatelnost molekuly má úzký vztah k charakteru molekulových orbitalů. Změna polarizovatelnosti je způsobena jejich deformací. Polarizovatelnost molekuly má velký význam při studiu nepolárních vazeb. Ramanovo spektrum popisuje závislost intenzity Ramanova rozptylu na vlnové délce, popřípadě relativním vlnočtu [49], [52].

Jelikož je Ramanův rozptyl velmi slabý, je nutné využít takový zdroj záření, který poskytuje stabilní a intenzivní záření. Nejčastěji se používají lasery produkující laserové světlo ve viditelné oblasti Nd:YAG (např. 532 nm) nebo blízké infračervené oblasti (např. 785 nm), pro oddělení poměrně slabého Ramanova rozptylu od intenzivního Rayleighového rozptylu se využívá dvojitý, popřípadě trojitý monochromátor a různé druhy filtrů. Rozptýlené záření se poté měří kolmo na směr dopadajícího paprsku. Jako detektory se často využívají citlivější CCD detekce [46], [49].

2.2.3 Využití Ramanovy spektroskopie

Ramanovu spektroskopii je možné využít k identifikaci širokého spektra látek. Ramanovu spektroskopii je možné provádět jak kvalitativní, tak i kvantitativní analýzu stopového množství širokého spektra látek. Výhodou této techniky je identifikace jak tuhých, tak i tekutých vzorků. Ramanova spektroskopie nevyžaduje, aby byly vzorky opticky čisté, proto není potřeba žádné speciální úpravy vzorků [49], [50], [53].

Tato analytická metoda našla uplatnění k identifikaci zneužívaných a nezákonných látek, mezi které nejčastěji patří amfetamin, barbiturát či kokain. Byl popsán i způsob využití Ramanovy spektroskopie s Fourierovou transformací a infračervenou spektroskopií pro charakterizaci benzodiazepinů, které se využívají jako sedativa, antiepileptika nebo myorelaxancia. Ramanova spektroskopie může být využita i pro mikrostrukturní charakterizaci nosičových systémů, převážně k pochopení interakcí léčiv a pomocných látek [49], [50].

Jedním z nejzajímavějších potenciálních aplikací Ramanovy spektroskopie je studium farmaceutických sloučenin. V reálném čase mohou být monitorovány in vitro distribuce léčiv a buněčná odpověď, což může napomoci jak k finančnímu snížení stádií vývoje léčiv, tak i potřebě studií na zvířatech. Apoptóza, buněčná odpověď na toxickou látku, může být detekována změnami Ramanových spekter. Tato technika již byla použita k prokázání distribuce protinádorového léčiva při rakovině prsu. Dalším velkým potenciálem použití Ramanovy spektroskopie je diagnostika různých onemocnění, jako je ateroskleróza, osteoartróza a rakovina. Mnoho onemocnění pochází ze základních biochemických změn uvnitř buněk a Ramanova spektroskopie dokáže detekovat tyto jemné změny [55].

S Ramanovou spektroskopií se můžeme setkat v oblastech od potravinářské chemie, biotechnologie, mikrobiologie až po genové inženýrství. Obrovské uplatnění nachází i v oboru medicíny, kde je možné Ramanovu spektroskopii využít k diagnostice např. nádorových buněk [53], [54].

2.2.4 Ramanova spektroskopie buněk

Ramanova spektroskopie je rychlou metodou k identifikaci významných druhů mikroorganismů, jako jsou kvasinky, bakterie, řasy, plísňe, ale slouží i k rozpoznání biologických vzorků. Tato metodou poskytuje jakýsi chemický „otisk prstu“, který je charakteristický pro jednotlivé buňky. Ramanovo spektrum dokáže poskytnout cenné informace o vnitřním prostředí buněk. Buňka je základní biologickou jednotkou všech živých organismů a pochopení principu buněčné dynamiky a procesů kolem je nezbytné pro biologický význam, protože většina onemocnění se vyskytuje právě v důsledku buněčných abnormalit způsobených intracelulárními biochemickými změnami. Celulární zobrazování umožňuje tyto intracelulární biochemické změny rozpoznat, Ramanova spektroskopie je proto vhodnou zobrazovací metodou buněk, protože překonává některá omezení současných technik [55], [56], [57], [58].

Ramanovu spektroskopii, na rozdíl od infračervené spektroskopie, je možné provádět ve vhodných podmínkách, kvůli slabé intenzitě signálu vody. Buňky mohou být zobrazeny buď ve fosfátovém pufru (PBS), nebo médiu [55].

Jednou z hlavních výhod Ramanovy spektroskopie je schopnost stanovit základní chemickou strukturu buňky, čím dál častěji bývá tato metoda využívána k charakterizaci nukleových kyselin, proteinů, sacharidů či lipidů v buňkách, možná je i charakterizace různých typů buněk a prokázání fyziologických nebo fenotypových změn v jednotlivých živých buňkách či charakterizace produkce P(3HB) během kultivačního procesu a detekce množství P(3HB) v jednotlivých bodech růstu daných bakterií [55], [57].

První studie na živých buňkách byly provedeny pomocí Ramanova spektrometru spojeného s mikroskopem. Následné studie zdůraznily, že použití vhodného laserového paprsku je zásadní pro zachování integrity vzorku a životaschopnosti buněk [46].

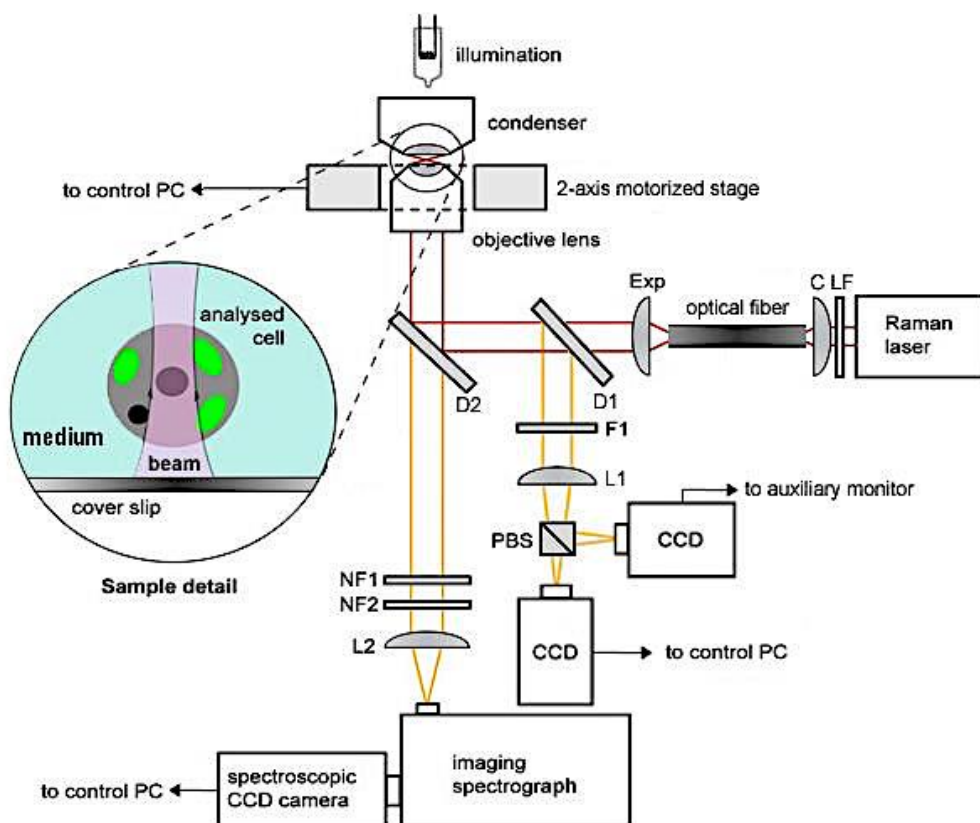
2.2.5 Ramanovská pinzeta

Spojením Ramanovy spektroskopie s konfokálním optickým mikroskopem lze dosáhnout analýzy velmi malého objemu vzorku. Tuto techniku lze uplatnit pouze na imobilizované vzorky. Existuje však velká skupina látek, převážně živých buněk, které jako součást živých organismů, vytváří Brownův pohyb nebo nějaký typ pohybu a při jejich analýze je nutné je znehybnit, v mnoha případech ale díky tomu může dojít k nežádoucímu narušení chemických reakcí v živých buňkách. Dalším omezením klasické Ramanovy spektroskopie je neschopnost s objekty manipulovat, tedy klesá možnost důkladné analýzy biologických molekul bez fyzického kontaktu [59], [61].

Hlavním průkopníkem optického laserového zachycení je Arthur Ashkin. Roku 1970 úspěšně využil radiační tlak ze souvislého laserového zdroje a zachytil tak částice o velikosti mikronů. Tento princip byl později využitý k zachycení atomů a elektrických částic. První optická pinzeta byla vyvinuta roku 1986 a měla schopnost ovládat objekty (atomy, viry, bakterie, proteiny, buňky a jiné biologické molekuly) v rozmezí od 5 nm do více než 100 nm. Roku 2018 získal A. Ashkin, spolu s G. Morou a D. Stricklandem Nobelovu cenu za převratné objevy v oboru laserové fyziky [59], [60].

2.2.5.1 Princip

Relativně nedávný vývoj optických pinzet a s tím spojený optický způsob imobilizace buněk přinesl průlom ve studiích na úrovni jedné buňky. Optická pinzeta je zařízení využívající mechanického účinku fokusovaného laserového paprsku k prostorovému zachycení a možnost přemísťování mikroobjektů a nanoobjektů. Ramanovská pinzeta je tedy technika, která kombinuje nefyzikální zachycení pomocí optické pinzety spolu s Ramanovou spektroskopií, díky tomu tato technika umožňuje porozumět jednotlivým buňkám či mikroorganismům v jejich fyziologickém prostředí [59], [61], [63].



Obrázek 7 - Schéma Ramanovské pinzety [62]

Laser prochází úzkopásmovým filtrem LF a čočkou C je veden optickým vláknem k expandéru Exp, dále prochází dichroickým zrcadlem D1 a odrazem dopadá na dichroické zrcadlo D2 do objektivu mikroskopu, tvoří se optická past. Rozptýlené záření prochází přes pásmové filtry NF, kde odfiltruje vlnovou délku použitého laseru a zachycené buňky sbírá objektiv. Zbytek rozptýleného záření prochází přes čočku L2 do spektroskopické sestavy, která zpracovává ramanovský signál. Buňky je možné pozorovat v bílém světle, které se odrazilo od dichroického zrcadla D2 a D přes filtr infračerveného světla F1 a polarizační dělič PBS do dvou nezávislých kamer CCD [62].

Ramanovská pinzeta je poměrně nová technologie, která spojuje optické pinzety s Ramanovou spektroskopií. Prostřednictvím optických pinzet můžeme vzorek fixovat. Tato technika optické imobilizace může analyzovat vzorek bez fyzického kontaktu. Laserový paprsek je zaveden do invertovaného mikroskopu přes vysoce rozlišovací objektiv za účelem vytvoření optické pasti. Optická past se vytváří, když laserový paprsek vtáhne studovaný objekt do svého středu, tedy do místa s nejvyšší intenzitou, pozorovaný objekt je poté možné držet na místě, nebo jím posunovat. Pro proud fotonů ze světla je pozorovaný objekt průhledný, to znamená, že jednotlivé fotony jím projdou, nepohlí se ani neodrazí, ale změni svůj směr z důvodu vyššího indexu lomu objektu než okolního prostředí. Foton, který projde objektem při změně směru, část své hybnosti předá, a tím se objekt posune, tímto způsobem je objekt vtahován zaostřeným proudem mnoha fotonů do místa s nejvyšší intenzitou [59], [64].

Pro aplikaci Ramanovské pinzety se obecně využívají kontinuální lasery. Použití laseru s dlouhou vlnovou délkou vede k tomu, že na detektor dopadá menší množství Ramanova rozptylu než při kratší vlnové délce, čímž se sníží poměr signál-šum. Biologické buňky obsahují komplexní směsi biomolekul v buněčných membránách a ty obsahují nukleové kyseliny, proteiny, polysacharidy a lipidy. Pochopení různých buněčných procesů vyžaduje identifikaci molekul uvnitř živých buněk, a proto je Ramanovská pinzeta vhodným nástrojem k dosažení těchto informací [59], [65].

Výsledky z Ramanovské pinzety jsou zobrazeny jako Ramanova spektra, kdy každý vrchol spektrogramu představuje ve vzorku určitý druh molekuly (DNA, aminokyselina, amid). Pro každou molekulu je spektrum jedinečné, což umožňuje charakteristický „otisk prstu“ u každé molekuly [59].

2.2.5.2 Isolace a třídění buněk

Jedním z nejvyužívanějších nástrojů k oddělení buněčných populací je průtoková cytometrie, ale její nevýhodou je poměrně obtížné studium buněk bez fluorescenčního značení nebo následná nemožnost využití živých buněk po roztřídění. Manipulace s jednotlivými buňkami má mimořádný význam v biomedicinském výzkumu, jako je oplodnění *in vitro*, mikrobiologie, kmenové buňky či regenerační medicína. Pro manipulaci s jednotlivými buňkami byly vyvinuty dva hlavní typy technik. První technikou jsou skenovací sondy, jako je mikroskop pro atomovou sílu (AFM) nebo skenovací tunelový mikroskop (STM), druhým typem je technika fungující jako gradientní past, která zahrnuje optické pinzety a dielektroforetické pasti. Při měření Ramanovskou pinzetou se využívá laser o vlnové délce 1064 nm sloužící k manipulaci zachycené buňky a poté laser o vlnové délce 532 nm nebo 785 nm sloužící k vytvoření excitace molekuly a k následnému získání charakteristického spektra [66], [67].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité mikroorganismy, chemikálie a přístrojové vybavení

3.1.1 Použité mikroorganismy

Pro experimentální práci byly použity bakteriální kmeny *Cupriavidus necator* H16 CCM 3726, *Halomonas halophila* CCM 3662, *Burkholderia cepacia* CCM 2656 a *Lactobacillus delbrueckii* CCM 7190 získané z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně. Dále byla použita bakteriální kultura *Cupriavidus necator* H16/PHB-4 DSM 541 zakoupená z Liebnitz institutu, Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur Braunschweig.

3.1.2 Použité chemikálie

- Citrát železito-amonný, Fluka, Česká republika
- Dihydrát chloridu vápenatého, Lachema, Česká republika
- Dihydrogenfosforečnan draselný, lach-ner, Česká republika
- Dodekadyhrát dihydrodenfosforečnanu sodného, lach-ner, Česká republika
- Fruktosa, lach-ner, Česká republika
- Glukosa, lach-ner, Česká republika
- Heptahydrát síranu hořečnatého, lach-ner, Česká republika
- Chlorid sodný, lach-ner, Česká republika
- Chloroform, VWR International, USA
- Immersion Oil Type DF, Cargille laboratory, USA
- Kyselina benzoová, Penta, Česká republika
- Methanol, VWR International, USA
- MRS Broth, Himedia, Indie
- Nutrient Broth, Himedia, Indie
- Peptone, Himedia, Indie
- Síran amonný, lach-ner, Česká republika
- Yeast Extract Powder, Himedia, Indie

Použité chemikálie byly v čistotě p.a. a vyšší.

3.1.3 Použité přístrojové vybavení

- Analytické váhy, Ohaus, PA224C (Švýcarsko)
- Centrifuga, HERMLE, Z 36 HK (Německo)
- Centrifuga, Hettich, D-78532 (Německo)
- Centrifuga, Sigma, 1-14 Microfuge
- FT-IR spektrometr, Nicolet is50 v kombinaci s Ramanovým FT-modulem
- Inkubátor, IP60
- Laminární box Aura mini, BioAir

- Magnetická míchačka, Kartell, TKO
- Nanofotometr, Implen, P300
- Plynový chromatograf s FID, Thermo Scientific, Trace 1300; kolona: DB-WAX 30 m by 0,25 mm
- Ramanův mikrospektrometr, Renishaw inVia (Velká Británie)
- Temperovaná třepačka, Heidolph, Incubator 1000 (Německo)
- Termoblok, Stuart, SBH130D
- Váhy, Kern EW 620-3NM (Německo)
- Vortex, Kartell, TK3S
- Běžné laboratorní sklo a vybavení

3.2 Kultivace mikroorganismů

3.2.1 Příprava a kultivace bakteriálních inokul

Na přípravu inokul pro bakterie *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* H16/PHB-4, *Burkholderia cepacia* bylo připraveno tekuté Nutrient Broth médium (NB) o koncentraci 25 g/l. K přípravě inokula pro bakterii *Lactobacillus delbrueckii* bylo použito tekutého MRS Broth médium o koncentraci 55,15 g/l. Pro přípravu inokula kmene *Halomonas halophila* bylo použito komplexní živné médium (CNM). V Erlenmeyerových baňkách o objemu 100 ml s 50 ml NB média byly kmeny kultivovány vždy ve dvou paralelních provedeních.

Složení NB média:

- | | |
|--------------------|----------|
| • Peptone | 10,00 g |
| • Beef extract | 10,00 g |
| • NaCl | 5,00 g |
| • Destilovaná voda | 1 000 ml |

Složení MRS Broth média:

- | | |
|----------------------------------|----------|
| • Proteinový pepton | 10,00 g |
| • Hovězí extrakt | 10,00 g |
| • Kvasničný extrakt | 5,00 g |
| • Dextrosa | 20,00 g |
| • Polysorbát 80 | 1,00 g |
| • Citrát amonný | 2,00 g |
| • Octan sodný | 5,00 g |
| • Síran hořečnatý | 0,10 g |
| • Síran manganatý | 0,05 g |
| • Hydrogenfosforečnan didraselný | 2,00 g |
| • Destilovaná voda | 1 000 ml |

Složení CNM média:

- Peptone 15,00 g
- Yeast extract powder 3,00 g
- Glukose 1,00 g
- NaCl 66,00 g
- Destilovaná voda 1 000 ml

Navážené množství daného média bylo rozpuštěno v destilované vodě. Připravené tekuté médium bylo sterilováno v tlakovém hrnci s uzavřeným ventilem při teplotě 121 °C po dobu 20 minut v tlakovém hrnci s uzavřeným ventilem.

Po ukončení sterilace a následném ochlazení média na laboratorní teplotu byly v laminárním sterilním boxu zaočkovány kultury z dříve připravených kryozkumavek.

Následná kultivace inokula probíhala u bakteriálních kmenů *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* H16/PHB-4, *Burkholderia cepacia* a *Halomonas halophila* na temperované třepačce s frekvencí třepání 180 rpm při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin. U kmene *Lactobacillus delbrueckii* kultivace inokula probíhala taktéž na temperované třepačce s frekvencí třepání 180 rpm po dobu 24 hodin, avšak při teplotě 37 °C.

3.2.2 Kultivace bakterií za účelem produkce P(3HB)

Za účelem produkce polyhydroxyalkanoátů byla připravená inokula přeočkována do produkčního média s obsahem fruktosy nebo glukosy, což bylo použito jako zdroj uhlíku. Pro bakteriální kmeny *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* H16/PHB-4, *Burkholderia cepacia* a *Halomonas halophila* byla použita produkční média v uvedeném složení. Kmen *Cupriavidus necator* H16 byl navíc přeočkován i do tekutého média Nutrient Broth z důvodu následného porovnání produkčních vlastností P(3HB). V Erlenmeyerových baňkách o objemu 250 ml se 100 ml produkčního média byly kmeny kultivovány vždy ve dvou paralelních provedeních.

Jako produkční minerální médium pro bakteriální kmeny *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* H16/PHB-4 bylo použito produkční minerální médium o následujícím složení:

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,00 g
- KH_2PO_4 1,02 g
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 11,10 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,20 g
- Fruktosa 20 g
- Roztok stopových prvků MES*
- Destilovaná voda 1 000 ml

Roztok stopových prvků MES a zásobní roztok fruktosy o koncentraci 400 g/l byly připraveny a sterilovány separátně.

Minerální médium použité pro kmen *Halomonas halophila* bylo následujícího složení:

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,00 g
- KH_2PO_4 1,02 g
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 11,10 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,20 g
- NaCl 66 g
- Glukosa 20 g
- Roztok stopových prvků MES* 1 ml
- Destilovaná voda 1 000 ml

Roztok stopových prvků MES a zásobní roztok glukosy o koncentraci 400 g/l byly připraveny a sterilovány separátně.

*Složení roztoku stopových prvků MES:

- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 9,7 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7,8 g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,156 g
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,119 g
- $\text{NiCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,118 g
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g
- 0,1 mol/l HCl 1 000 ml

Pro bakteriální kmen *Burkholderia cepacia* bylo použito produkční médium o následujícím složení:

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,75 g
- KH_2PO_4 1,50 g
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9,08 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g
- $\text{NH}_4^- \cdot \text{Fe}^{\text{III}}$ citrát 0,06 g
- Glukosa 20 g
- Roztok stopových prvků TES** 1 ml
- Destilovaná voda 1 000 ml

Roztok stopových prvků TES a zásobní roztok glukosy o koncentraci 400 g/l byly připraveny a sterilovány separátně.

**Složení roztoku stopových prvků TES:

• ZnSO ₄	0,1 g
• MnCl ₂	0,03 g
• H ₃ BO ₃	0,3 g
• CoCl ₂	0,02 g
• NiCl ₂	0,02 g
• Na ₂ MoO ₄	0,03 g
• 0,1 mol/l HCl	1 000 ml

Navážky daných chemikálií byly rozpuštěny v požadovaném množství destilované vody. Připravené tekuté médium a roztoky stopových prvků MES a TES byly sterilovány při teplotě 121 °C po dobu 20 minut v tlakovém hrnci s uzavřeným ventilem.

Vysterilovaná média a ostatní roztoky byly následně ochlazeny na laboratorní teplotu. V laminárním sterilním boxu bylo do jednotlivých médií přidáno příslušné množství fruktosy či glukosy a roztok stopových prvků MES či TES. Následně byla do připravených roztoků zaočkována příslušná inokul vždy v množství 10 % objemu média.

Připravené zaočkované kultury bakteriálních kmenů *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* H16/PHB-4, *Burkholderia cepacia* a *Halomonas halophila* byly kultivovány na temperované třepačce s frekvencí třepání 180 rpm teplotě při 30 °C po dobu 48 hodin. U kmene *Lactobacillus delbrueckii* kultivace probíhala taktéž na temperované třepačce s frekvencí třepání 180 rpm po dobu 48 hodin, avšak při teplotě 37 °C.

3.2.3 Kultivace bakterie *Lactobacillus delbrueckii*

Pro bakteriální kmen *Lactobacillus delbrueckii* bylo na kultivaci použito MRS Broth médium, tedy stejné jako na přípravu bakteriálního inokula (3.2.1). V Erlenmeyerových baňkách o objemu 250 ml se 100 ml produkčního média byly kmény kultivovány vždy ve dvou paralelních provedeních.

Navážka daného MRS Broth média byla rozpuštěna v požadovaném množství destilované vody. Připravené tekuté bylo sterilováno při teplotě 121 °C po dobu 20 minut v tlakovém hrnci s uzavřeným ventilem.

Vysterilované médium bylo následně ochlazené na laboratorní teplotu. V laminárním sterilním boxu bylo do sterilního média zaočkováno příslušné inokulum vždy v množství 10 % objemu média.

Připravená zaočkovaná kultura bakteriálního kmene *Lactobacillus delbrueckii* byla kultivována na temperované třepačce s frekvencí třepání 180 rpm při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin.

3.3 Stanovení biomasy

Obsah biomasy byl stanovoven po 48 či 72 hodinách, a to gravimetrickou metodou. U vzorků *Cupriavidus necator* H16, *Burkholderia cepacia* a *Halomonas halophila* byl z vysušené biomasy následně stanoven obsah polyhydroxyalkanoátů.

3.3.1 Gravimetrické stanovení obsahu biomasy

Po ukončení kultivace bylo odebráno vždy 10ml vzorku do předem zvážených zkumavek. Vzorky byly následně centrifugovány při 6 000 ot/min po dobu 5 minut. Vzniklé supernatany byly slity ze zkumavky a následně bylo k sedimentu přidáno 10 ml destilované vody. Směsi byly rozsuspendovány pomocí Vortexu a poté znovu centrifugovány při 6 000 ot/min po dobu 5 minut. Supernatany byly opět slity a získaná biomasa byla sušena v sušárně při 75 °C do konstantní hmotnosti.

Po úplném vysušení byla pomocí analytických vah stanovena koncentrace biomasy ve vzorcích v g/l vždy ve dvou paralelních provedeníh.

3.4 Stanovení PHA pomocí plynové chromatografie s FID

Ve vysušené biomase byla pomocí plynové chromatografie s FID detektorem provedena kvalitativní a kvantitativní analýza polyhydroxyalkanoátů. Pro stanovení polyhydroxyalkanoátů je nutné vzorky nejprve převést pomocí kyseliny katalyzované hydrolyzy a následně esterifikaci na methylestery, které lze analýzou plynové chromatografie s FID detekcí stanovit.

3.4.1 Stanovení kalibrační závislosti

Kalibrační závislost pro stanovení 3-hydroxybutyrátu ve vzorcích byla získána pomocí plynové chromatografie s FID detektorem, analýzou standardů o známém obsahu jednotlivých monomerů.

Kalibrační závislost byla sestavena pomocí standardního roztoku obsahující kopolymer P(3HB-co-3HV) s obsahem 88 % 3HB a 12 % HV. Standardní roztok byl napipetován do krimpovacích vialek o objemu 0,05; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1 ml a doplněn chloroformem na celkový objem 1 ml. K roztokům bylo přidáno 0,8 ml 15 % kyseliny sírové v methanolu a 5 mg/ml kyseliny benzoové, jakožto interního standardu (ISTD). Zakrimpované vialky byly umístěny do termobloku na 3 hodiny při teplotě 94 °C. Po ukončení esterifikace a následném chlazení na laboratorní teplotu byl celkový objem smíchán s 0,5 ml hydroxidem sodného o koncentraci 0,05 mol/dm³. Po protřepání a následném oddělení fází bylo ze spodní fáze odpipetováno 0,05 ml do čistých vialek a přidáno 0,95 ml chloroformu a objem byl doplněn na 1 ml. Vialky byly řádně uzavřeny a jednotlivé standardy analyzovány pomocí plynové chromatografie s FID detektorem.

3.4.2 Příprava vzorků pro plynovou chromatografii

Zároveň se stanovováním obsahu biomasy gravimetrickou metodou byl stanovován i obsah polyhydroxyalkanoátů v biomase.

Do krimplovacích vialek bylo odebráno vždy přibližně 10 mg vysušené biomasy (Gravimetrické stanovení obsahu biomasy), poté byl přidán 1 ml chloroformu a 0,8 ml 15 % kyseliny sírové v methanolu a 5 mg/ml kyseliny benzoové (ISTD). Vialky byly zakrimplovány a směs byla udržována po dobu 3 hodin v termobloku při teplotě 94 °C. Po esterifikaci a následném ochlazení na laboratorní teplotu byla směs extrahována 0,5 ml roztoku chloridu sodného o koncentraci 0,05 mol/dm³. Po oddělení vrstev bylo do nově připravených vialek napipetováno 0,05 ml roztoku ze spodní chloroformové fáze a přidáno 0,95 ml chloroformu. Vialky byly řádně uzavřeny a vzorky byly analyzovány pomocí plynové chromatografie s FID detektorem vždy ve dvou paralelních provedeních.

3.5 Spektroskopické techniky

U vybraných bakteriálních kmenů byla stanovena charakteristická ramanovská spektra pomocí FT-IR spektrometru v kombinaci s Ramanovým FT-modulem, Ramanovým mikrospektrometrem a Ramanovskou pinzetou.

3.5.1 Příprava vzorků na Ramanovu analýzu

Vzorky byly nakultivovány podle postupu již výše zmíněného (3.2.2 a 3.2.3). Kultivace bakteriálních kmenů probíhala po dobu 48 hodin. Po ukončení kultivace bylo odebráno do 2 ml zkumavek Eppendorf množství 1,5 ml bakteriální kultury, následně byly vzorky upraveny podle požadavků na daný typ Ramanovského spektrometru.

3.5.1.1 FT-IR spektrometr v kombinaci s Ramanovým FT-modulem

Při měření Ramanovských spekter pomocí FT-IR spektrometru v kombinaci s Ramanovým FT-modulem byla odebraná bakteriální kultura centrifugována při otáčkách 6 000 ot/min po dobu 5 minut. Vzniklé supernatany byly slity ze zkumavky a následně bylo k sedimentu přidáno 1,5 ml destilované vody. Směsi byly rozsuspendovány pomocí Vortexu a poté znovu centrifugovány při 6 000 ot/min po dobu 5 minut. Supernatany byly opět slity a získaná biomasa byla sušena v sušárně při 75 °C do konstantní hmotnosti. Vysušená biomasa byla následně měřena pomocí FT-IR spektrometru v kombinaci s Ramanovým FT-modulem laserem s vlnovou délkou 1 064 nm, s výkonem 200–500 mW, minimálním množstvím skenů 256 a rozlišením 1 cm⁻¹. Při zpracování dat nebyl odfiltrován Rayleighův rozptyl z pozadí. Spektra byla snímána v rozsahu 400–4 000 cm⁻¹, avšak při vyhodnocování byl brán ohled pouze na oblast 700–1 800 cm⁻¹.



Obrázek 8 - FT-IR spektrometr v kombinaci s Ramanovým FT-modulem [68]

3.5.1.2 Ramanova mikrospektroskopie

Pro Ramanovu mikrospektroskopii byla odebraná bakteriální kultura centrifugována při otáčkách 3 000 ot/min po dobu 2 minut. Vzniklé supernatany byly slity ze zkumavky a následně bylo k sedimentu přidáno 1,5 ml destilované vody. Směsi byly rozsuspendovány pomocí Vortexu a poté znovu centrifugovány při 3 000 ot/min po dobu 2 minut. Přibližně 5–10 μl buněčné suspenze bylo napipetováno na kalciumfluoridové (CaF) podložní sklíčko a měřeno za použití Ramanova mikrospektrometru Renishaw. Taktéž byly měřeny buněční suspenze, které se sušily na vzduchu přibližně 30 minut, a následně i vzorek nanesený přímo z média, jednotlivá spektra byla měřena minimálně třikrát a poté mezi sebou porovnána. Všechna měření probíhala za použití laseru o vlnové délce 532 nm a 785 nm s výkonem 500 mW a intenzitou 100 %, objektivu x20, expozice 1 s a 30 akumulací. U zeleného laseru 532 nm byla spektra snímána v rozsahu 400–2 100 cm^{-1} , při použití červeného laseru 785 nm byla spektra snímána v rozsahu 724–1 800 cm^{-1} . Při zpracování naměřených hodnot byla spektra zohledněna pouze v rozsahu 700–1 800 cm^{-1} v případě laseru 532 nm a 730–1 800 cm^{-1} pro laser 785 nm. Při vyhodnocování spekter bylo odstraněno pozadí pomocí funkce Rolling Circle Filter (RCF) s nastavením 300 pixelů s 60násobným provedením a následně odfiltrován šum pomocí funkce Savitzky-Golay.

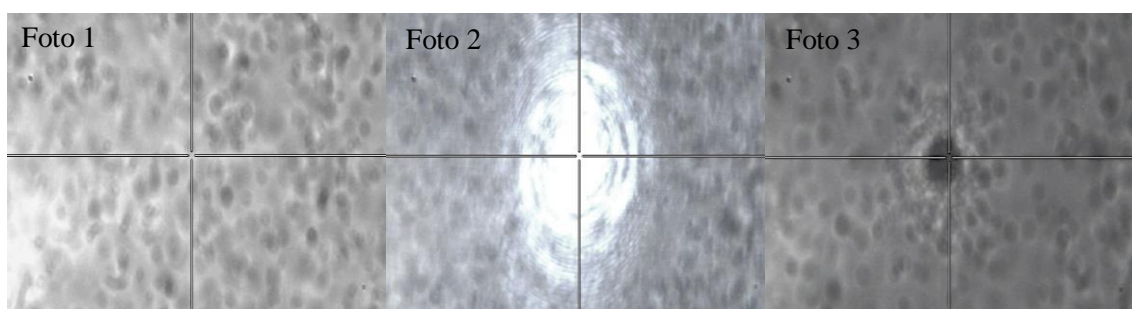
Jeden z problémů Ramanových spekter je přítomnost relativně vysokého fluorescenčního pozadí. RCF je vysokofrekvenční signální filtr, používaný k odstranění pozadí. Tato metoda je založena na rozdílu poloměrů zakřivení Ramanových píků a pozadí [69].



Obrázek 9 - Ramanova mikrospektroskopie

3.5.1.3 Ramanovská pinzeta

Vzorky nakultivované v tekutých kultivačních médiích byly přímo naneseny do prostoru mezi skleněné podložní a krycí sklíčko mikroskopu v objemu asi 5–10 μl . Před zahájením měření byl na krycí sklíčko nanesen imerzní olej typu DF. Laser o vlnové délce 1 064 nm byl použit k vytvoření optické pasti. Následně byl na zachycenou buňku v optické pasti použitý laser o vlnové délce 532 nm s výkonem 500 mW a intenzitou 100 %, objektivu x20, expozice 1 s a 30 akumulací. Spektra byla snímána v rozsahu 400–2 100 cm^{-1} , avšak při zpracování spektrem byla spektra zohledněna pouze v rozsahu 700–1 800 cm^{-1} . Při vyhodnocování spekter bylo odstraněno pozadí pomocí funkce Rolling Circle Filter (RCF) s nastavením 300 pixelů s 60násobným provedením a následně odfiltrován šum pomocí funkce Savitzky-Golay.



Obrázek 10 - Vizualizace principu Ramanovské pinzety, Foto 1 - Buňky *Cupriavidus necator* H16 zachycené při měření Ramanovým mikrospektroskopem, Foto 2 - Vytvoření optické pasti laserem o vlnové délce 1 064 nm, Foto 3 - Ukázka zachycených buněk po vypnutí optické pasti

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Experimentální část diplomové práce byla zaměřena na studium využití Ramanovy spektroskopie a Ramanovské pinzety při analýze gramnegativních bakteriálních kmenů produkujících PHA – *Cupriavidus necator* H16 a jeho mutantního kmene *Cupriavidus necator* H16/PHB–4, *Burkholderia cepacia* a *Halomonas halophila* a grampozitivní bakterii *Lactobacillus delbrueckii*, která neprodukuje biopolymer PHA.

Bakterie *Cupriavidus necator* H16 byla kultivována v tekutém Nutrient Broth médiu a v produkčním minerálním médiu (3.2.2) s různým obsahem síranu amonného, a to v množství 1 g, 3 g a 5 g síranu amonného na 1 l média. Ostatní bakteriální kmeny – *Cupriavidus necator* H16/PHB–4, *Burkholderia cepacia*, *Halomonas halophila* a *Lactobacillus delbrueckii* byly kultivovány v médiích uvedených v kapitole 3.2.2 a 3.2.3.

U *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* H16/PHB–4, *Burkholderia cepacia*, *Halomonas halophila* a *Lactobacillus delbrueckii* byl po 48hodinové kultivaci stanoven obsah biomasy gravimetrickou metodou a následně pomocí plynové chromatografie s FID detekcí byl u PHA produkujících bakterií stanoven obsah P(3HB) v biomase.

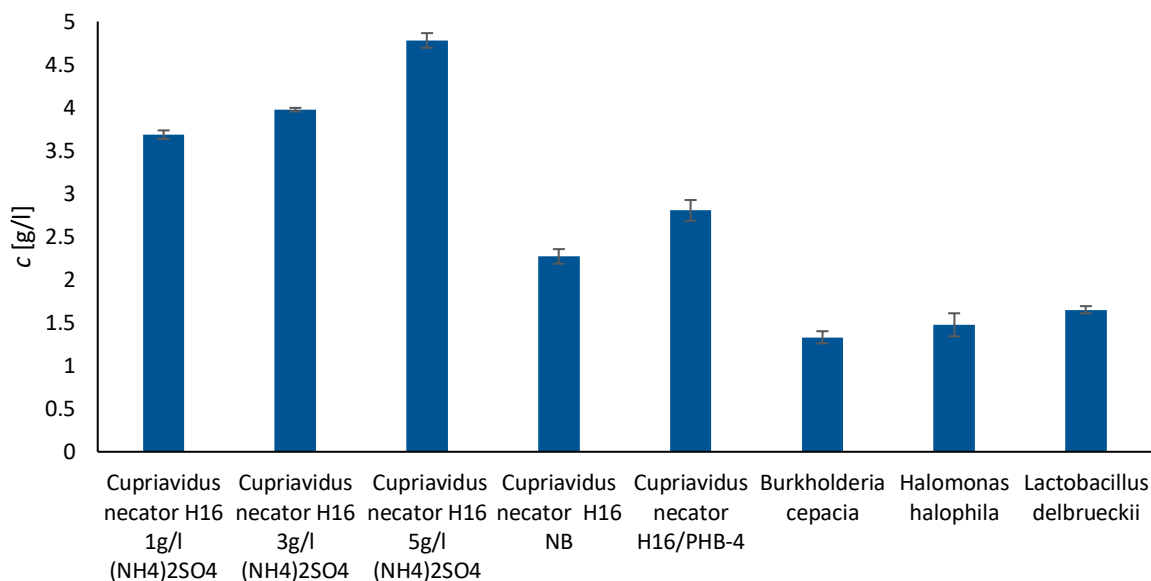
Pomocí Ramanovy spektroskopie, Ramanovy mikrospektroskopie a Ramanovské pinzety byla stanovena charakteristická Ramanovská spektra jednotlivých bakterií, která byla mezi sebou následně porovnána a diskutována.

4.1 Gravimetrické stanovení obsahu biomasy

Obsah biomasy byl stanovován gravimetrickou metodou po 48hodinové kultivaci z 10 ml bakteriální kultury (3.3.1) vždy ve dvou paralelních provedeních.

Tabulka 2 - Gravimetrické stanovení obsahu biomasy

	c_1 [g/l]	c_2 [g/l]	\bar{c} [g/l]	smodch
<i>Cupriavidus necator</i> H16 1g/l (NH ₄) ₂ SO ₄	3,72	3,65	3,69	0,05
<i>Cupriavidus necator</i> H16 3g/l (NH ₄) ₂ SO ₄	3,96	3,99	3,98	0,02
<i>Cupriavidus necator</i> H16 5g/l (NH ₄) ₂ SO ₄	4,72	4,84	4,78	0,08
<i>Cupriavidus necator</i> H16 NB médium	2,21	2,33	2,27	0,08
<i>Cupriavidus necator</i> H16/PHB–4	2,89	2,72	2,81	0,12
<i>Burkholderia cepacia</i>	1,38	1,28	1,33	0,07
<i>Halomonas halophila</i>	1,57	1,38	1,48	0,13
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	1,62	1,68	1,65	0,04



Obrázek 11 - Grafické znázornění obsahu biomasy jednotlivých bakteriálních kmenů gravimetrickou metodou

Je patrné, že největšího množství biomasy bylo dosaženo u bakteriálního kmene *Cupriavidus necator* H16 (Obrázek 11), kde bylo v médiu obsaženo 5 g/l síranu amonného, poté s klesajícím množstvím síranu amonného klesal i obsah biomasy. U bakteriálních kmenů *Burkholderia cepacia*, *Halomonas halophila* a *Lactobacillus delbrueckii* bylo dosaženo velmi podobných hodnot obsahu biomasy v sušině.

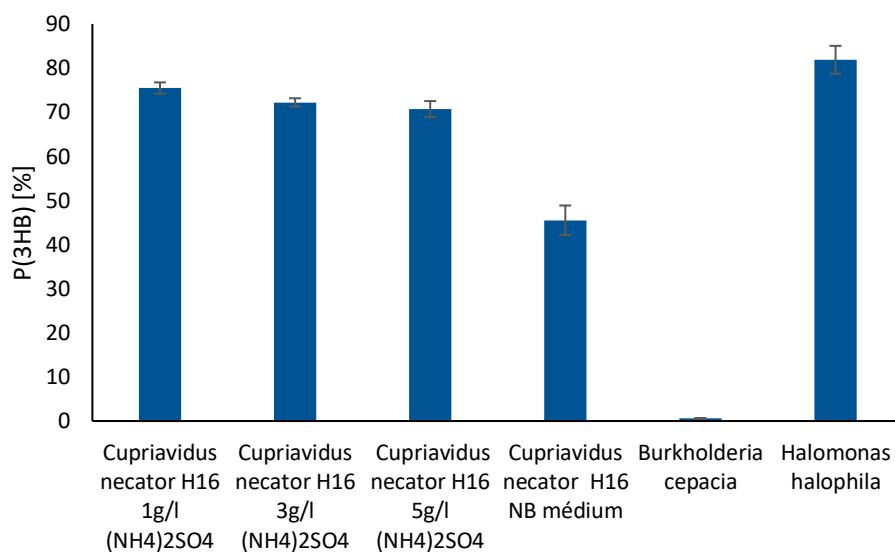
4.2 Stanovení obsahu PHA v biomase

Pomocí plynové chromatografie s FID detekcí byl stanoven obsah polyhydroxyalkanoátů v biomase jednotlivých vzorků, které jsou schopné akumulace. Z připravené kalibrační řady roztoků (3.4.1) byla stanovena kalibrační přímka $y = 0,0748987 \cdot x$ pro stanovení obsahu PHA v biomase.

Jednotlivé plochy píků daných vzorků byly odečteny na základě retenčních časů z chromatogramů. Následně byl pomocí rovnice kalibrační přímky stanoven obsah P(3HB) v biomase.

Tabulka 3 - Stanovení obsahu P(3HB) plynovou chromatografií

	P(3HB) [%]	smodch
<i>Cupriavidus necator</i> H16 1g/l (NH ₄) ₂ SO ₄	75,47	1,29
<i>Cupriavidus necator</i> H16 3g/l (NH ₄) ₂ SO ₄	72,23	0,93
<i>Cupriavidus necator</i> H16 5g/l (NH ₄) ₂ SO ₄	70,71	1,81
<i>Cupriavidus necator</i> NB médium	45,52	3,35
<i>Burkholderia cepacia</i>	0,57	0,00
<i>Halomonas halophila</i>	81,88	3,16



Obrázek 12 - Obsah P(3HB) v biomase u jednotlivých bakteriálních kmenů produkujících PHA

Nejvyššího množství P(3HB) po 48hodinové kultivaci dosahoval bakteriální kmen *Halomonas halophila*, a to obsahu 81,88 % (Obrázek 12). U bakteriálního kmene *Cupriavidus necator* H16 se s přibývajícím množstvím síranu amonného v médiu snižoval obsah P(3HB) v biomase, nejnižší množství pak obsahovala bakteriální kultura *Cupriavidus necator* H16, která byla kultivovaná v Nutrient Broth (NB) médiu, toto médium není vhodnou volbou pro kultivaci bakterií za účelem produkce PHA. Bakteriální kmen *Burkholderia cepacia* vyprodukoval téměř nulové množství P(3HB), předpokládá se, že tato bakterie neměla dodržené optimální podmínky pro biosyntézu polymeru, proto nedošlo k jeho akumulaci.

4.3 Spektroskopické techniky

4.3.1 Studium charakteristických Ramanovských spekter vybraných bakteriálních kmenů

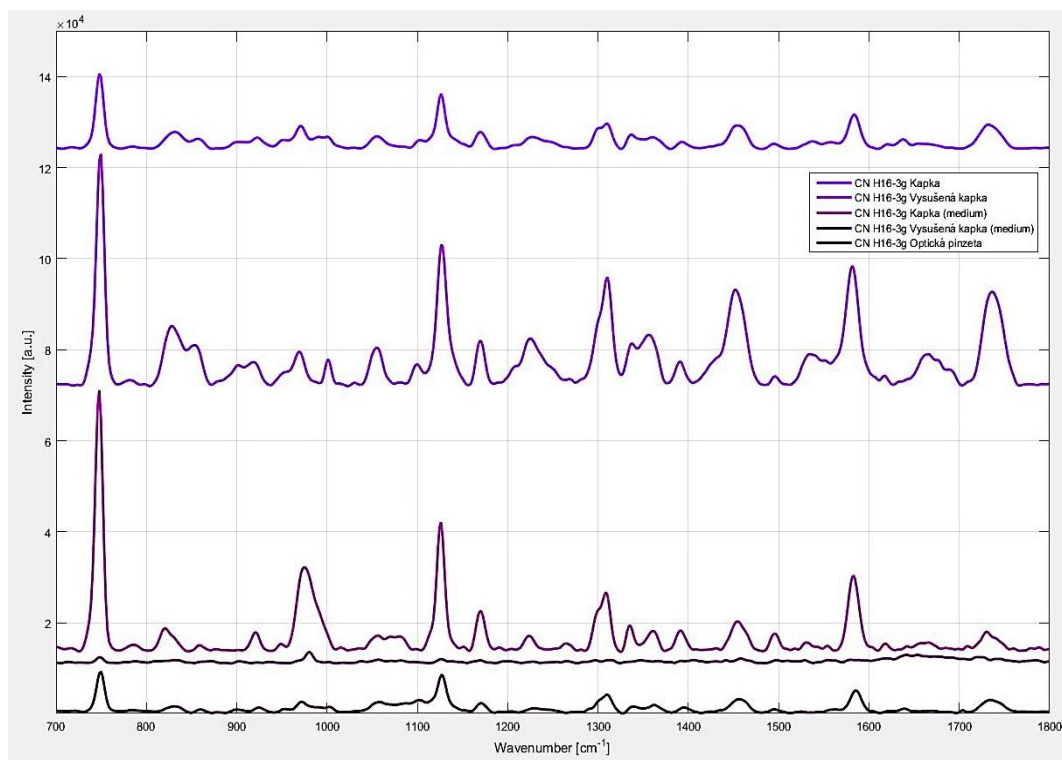
V experimentu se pracovalo s bakteriemi *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* H16/PHB-4, *Burkholderia cepacia*, *Halomonas halophila* a *Lactobacillus delbrueckii*. Za účelem získání charakteristických Ramanových spekter bakterií byl využitý FT-IR spektrometr v kombinaci s Ramanovým FT-modulem, Ramanův mikrospektrometr a Ramanovská pinzeta. Je třeba poznamenat, že před spektroskopickým měřením byla provedena úprava bakteriální kultury (3.5.1) a navíc z důvodu porovnání vlivu média na výsledné spektrum byla Ramanovým spektroskopem analyzována i přímo bakteriální médium, ve které byly bakterie kultivovány.

Tabulka 4 - Ramanovy pásy pozorované ve spektrech bakteriálních buněk [70], [71], [72]

Vlnočť [cm ⁻¹]	Charakteristická skupina
745–749	
780–791	DNA (fosfodiesterová vazba)
830–838	P(3HB)
1 001–1 004	ν (CC) proteiny (fenylalanin)
1 121–1 127	ν (C–O–O) symetrická glykosidická vazba ν (C–N) a ν (C–C)
1 305–1 340	Lipidy
1 417–1 458	Lipidy
1 580–1 586	Amid II
1 663–1 670	Amid I
1 735–1 740	P(3HB)

4.3.1.1 *Cupriavidus necator* H16

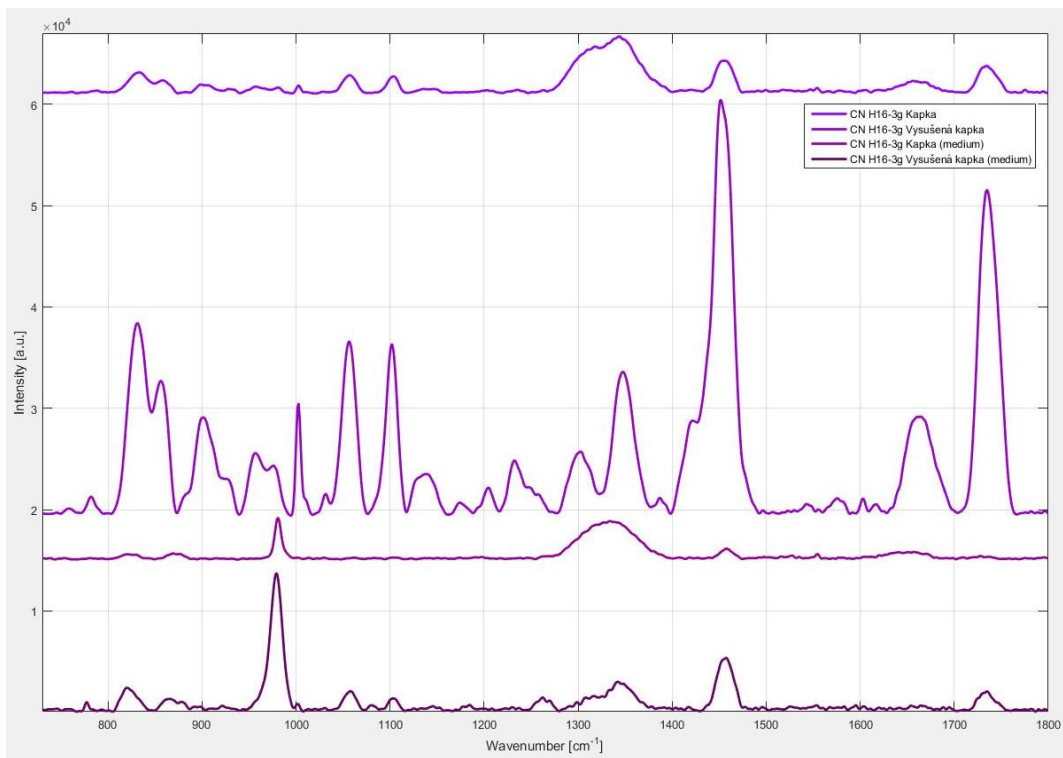
Pomocí Ramanovy mikrospektroskopie s využitím laseru 532 nm bylo stanoveno charakteristické spektrum bakterie *Cupriavidus necator* H16 (Obrázek 13). Vzorek byl aplikován na podložní sklíčko ve formě kapky, obsahující bakteriální kulturu zbavenou kultivačního média (3.5.1.2), následně byla měřena ta samá kapka, avšak po zaschnutí na podložním sklíčku. Z důvodu porovnání vlivu kultivačního média na Ramanovo spektrum byly analyzovány vzorky také přímo z kultivačního média. Při využití Ramanovské pinzety nebyl vzorek před aplikací do prostoru mezi podložní a krycí sklíčko nějak upraven, byla tedy použita přímo bakteriální kultura, ve kterém byla bakterie *Cupriavidus necator* H16 kultivována.



Obrázek 13 - *Cupriavidus necator* H16,
měřeno zeleným laserem 532 nm

Z obrázku (Obrázek 13) můžeme vidět, že spektra bakterie *Cupriavidus necator* H16 při různé úpravě vzorku před aplikací jsou si velmi podobná. Získali jsme intenzivní signál v oblastech charakteristických pro běžné buňky. Mezi nejvýraznější píky se v tomto spektru řadí 745 cm^{-1} , 1125 cm^{-1} a 1580 cm^{-1} . Vrchol kolem 1125 cm^{-1} by mohl být přiřazen valenční (stretching) vibraci, při které se mění délka vazby $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ ze symetrických glykosidických vazeb nebo $\nu(\text{C}-\text{N})$ a $\nu(\text{C}-\text{C})$. Pík 1580 cm^{-1} by mohl být amid II, který je způsoben deformační (bending) vibrací $\delta(\text{NH})$, při které se mění valenční úhel a valenční vibrací $\nu(\text{CN})$. Pro identifikaci P(3HB) se vyskytují odezvy v několika Ramanových posunech (Raman shift) převážně ve vlnóčtech 830 cm^{-1} a 1738 cm^{-1} . Nejvýraznější pro identifikaci P(3HB) bývá pík kolem vlnóčtu 1738 cm^{-1} , který odpovídá valenční vibraci esterových skupin $\nu(\text{C}=\text{O})$. Na základě těchto spekter můžeme jako nejlepší vyhodnotit to, ve kterém byla analyzována bakterie *Cupriavidus necator* H16 ve formě vysušené kapky, kdy bakteriální kultura byla před analýzou promyta vodou z důvodu zbavení se kultivačního média v kultuře. V tomto případě jsou zřetelně vidět i Ramanovy píky ve vlnóčtech 1002 cm^{-1} , které odpovídají proteinům (fenylalanin), 1452 cm^{-1} nebo 1310 cm^{-1} lipidy (C-H) a nebo 1670 cm^{-1} odpovídající amidu I, který je způsoben valenční vibrací $\nu(\text{C}=\text{O})$ v peptidových vazbách.

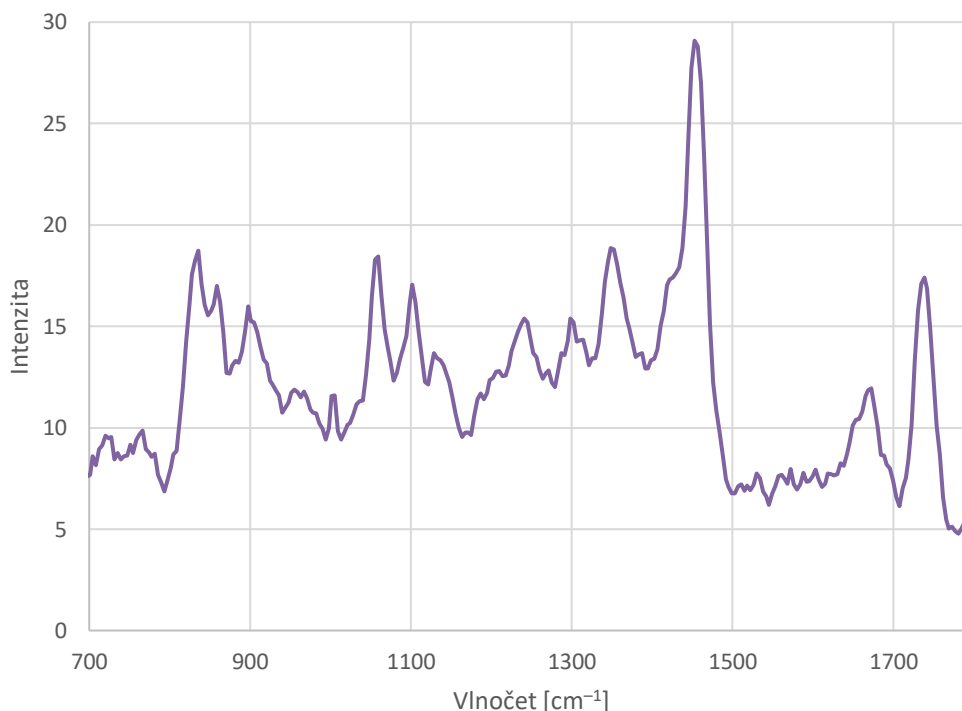
Dalším příkladem je stanovení spekter pomocí Ramanovy mikrospektroskopie s využitím laseru 785 nm (Obrázek 14). Vzorky byly připraveny stejným způsobem jako při měření spekter laserem 532 nm, avšak v tomto případě nebyla použita Ramanovská pinzeta z důvodu použití skla, které poskytuje velkou fluorescenci v oblasti kolem $1\,200\text{ cm}^{-1}$ – $1\,400\text{ cm}^{-1}$ při použití červeného laseru 785 nm. Přes fluorescenci pak velmi slabé Ramanovy signály nelze vidět.



Obrázek 14 - *Cupriavidus necator* H16,
měřeno červeným laserem 785 nm

Opět si můžeme povšimnout (Obrázek 14), že jednotlivá spektra bakterie *Cupriavidus necator* H16 jsou si velmi podobná. Na první pohled se jako dominantní jeví píky 836 cm^{-1} a $1\,740\text{ cm}^{-1}$, které signalizují přítomnost P(3HB) v bakteriálních buňkách *Cupriavidus necator* H16. V tomto případě jsou zřetelně vidět i Ramanovy píky ve vlnočtech 785 cm^{-1} , který odpovídá DNA (fosfodiesterová vazba), poté $1\,002\text{ cm}^{-1}$ proteiny (fenylalanin), $1\,452\text{ cm}^{-1}$ nebo $1\,310\text{ cm}^{-1}$ lipidy (C–H) a nebo $1\,670\text{ cm}^{-1}$ odpovídající amidu I.

FT-IR spektrometrem v kombinaci s Ramanovým FT-modulem jsme získali Ramanovské spektrum bakterie *Cupriavidus necator* H16 (Obrázek 15). V tomto případě byla na experiment využita vysušená biomasa (3.5.1.1).



Obrázek 15 - *Cupriavidus necator* H16,
FT-IR spektrometr v kombinaci s Ramanovým FT-modulem

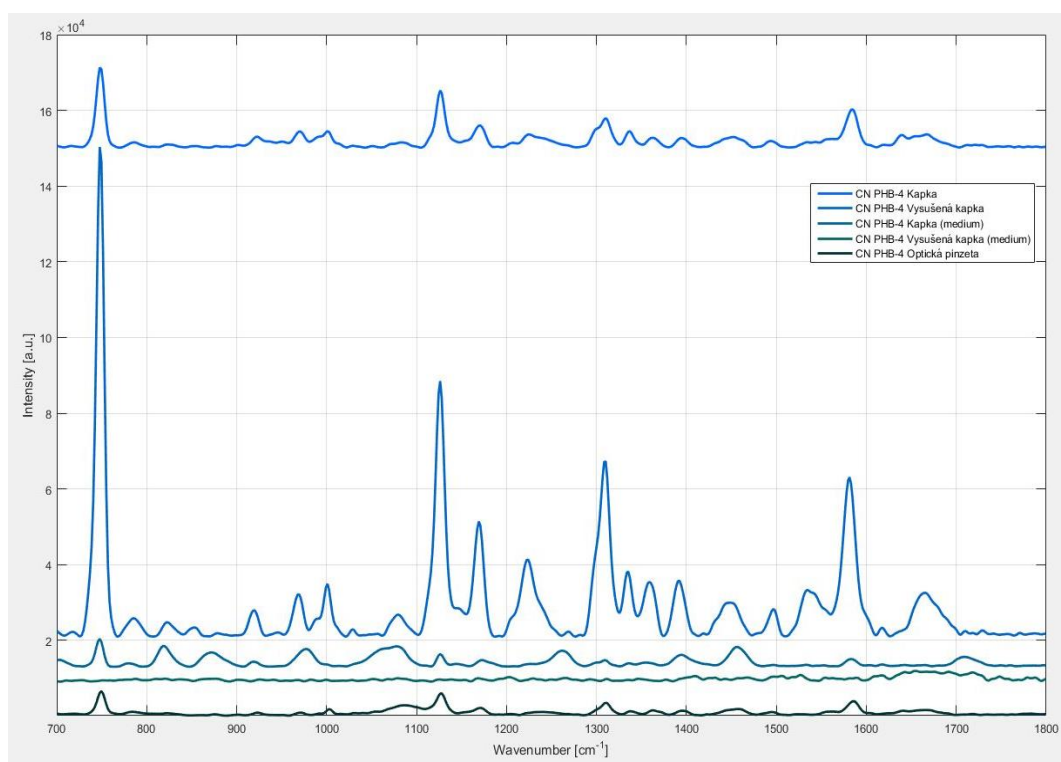
Při analýze FT-IR spektrometrem v kombinaci s Ramanovým FT-modulem (Obrázek 15) byl využíván laser o vlnové délce 1 064 nm, který poskytuje slabší intenzitu záření než lasery 532 nm či 785 nm. Přítomnost P(3HB) je i zde možné ověřit pomocí píku ve vlnočtu 1 742 cm⁻¹. Ostatní důležité píky jako proteiny 1 009 cm⁻¹, lipidy 1 426 cm⁻¹ či 1 310 cm⁻¹, amid I 1 677 cm⁻¹ jsou ve spektru také zaznamenány. I FT-IR spektrometr v kombinaci s Ramanovým FT-modulem je vhodnou metodou k charakterizaci bakterie *Cupriavidus necator* H16 pomocí Ramanového spektra, nevýhodou této metody však je poměrně zdlouhavá příprava vysušené biomasy.

Při porovnání všech laserů zelený laser 532 nm excituje nějaké přechody navíc, převážně ve vlnočtech 745 cm⁻¹, 1 125 cm⁻¹ a 1 580 nm⁻¹. Toto je způsobeno větší intenzitou záření, a tedy schopností excitovat molekuly vzorku ze základního elektronového stavu do virtuálního energetického stavu. Nevýhodou je však poměrně vysoká hodnota fluorescence ve vzorku. Nejvíce se nám tedy osvědčilo využívání červeného laseru 785 nm, které poskytuje přesné spektrum bez nežádoucí fluorescence vzorku, ale i v tomto případě se vyskytla nevýhoda, a to při využívání Ramanovské pinzety k identifikaci bakterie. Ramanovská pinzeta umožňuje

zachycení jedné buňky, v našem případě se nám zachycení na úrovni jedné buňky nepodařilo, a to kvůli příliš husté bakteriální kultuře. Tyto experimenty jsou zároveň screeningem možností využití Ramanovské pinzety k izolaci PHA produkujících buněk pomocí Ramanovské pinzety. Podle našich výsledků je pomocí Ramanovské pinzety jednoznačně možné identifikovat bakterie bohaté na PHA a díky manipulačním možnostem Ramanovské pinzety je tedy principiálně možné využít Ramanovskou pinzetu k izolaci a purifikaci PHA produkujících bakterií. Jako nejpodrobnější spektrum bylo stanoveno spektrum při využití laseru 785 nm, kdy byla použita vysušená, média zbavená kapka bakteriální kultury *Cupriavidus necator* H16.

4.3.1.2 *Cupriavidus necator* H16/PHB-4

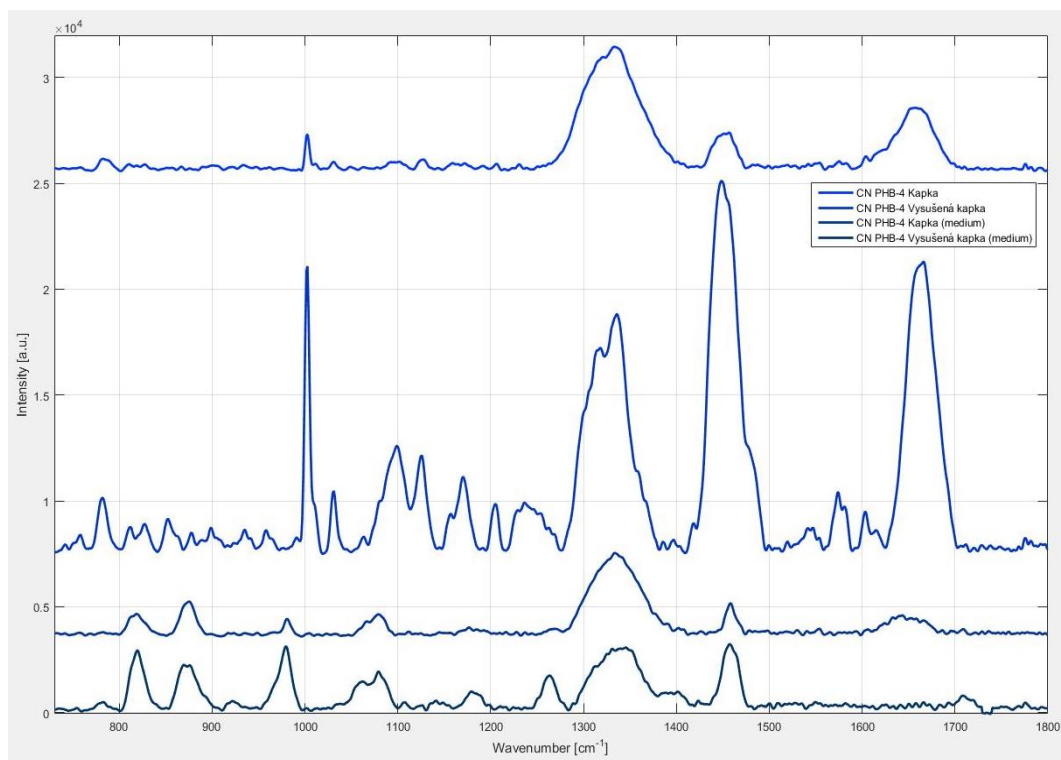
Ramanovou mikrospektroskopií s využitím laseru 532 nm bylo stanoveno charakteristické spektrum bakterie *Cupriavidus necator* H16/PHB-4 (Obrázek 16). Vzorek byl aplikován na podložní sklíčko ve formě kapky, obsahující bakteriální kulturu zbavenou kultivačního média (3.5.1.2), následně byla měřena stejná kapka, avšak po zaschnutí na podložním sklíčku. Z důvodu porovnání vlivu kultivačního média na Ramanovo spektrum byly analyzovány vzorky také přímo z kultivačního média. Při využití Ramanovské pinzety nebyl vzorek před aplikací do prostoru mezi podložní a krycí sklíčko nějak upraven, byla tedy použita přímo bakteriální kultura, ve kterém byla bakterie *Cupriavidus necator* H16/PHB-4 kultivována.



Obrázek 16 - *Cupriavidus necator* H16/PHB-4,
měřeno zeleným laserem 532 nm

Na obrázku výše (Obrázek 16) je znázorněno spektrum bakterie *Cupriavidus necator* H16/PHB-4 při různé úpravě vzorku před aplikací. Ramanovo spektrum odhaluje některé charakteristické signály charakteristické pro běžné buňky, mezi nejvýraznější píky v tomto spektru patří 749 cm^{-1} , $1\,127\text{ cm}^{-1}$ a $1\,586\text{ cm}^{-1}$. Vrchol kolem $1\,127\text{ cm}^{-1}$ by mohl být přiřazen valenční (stretching) vibraci, při které se mění délka vazby $\nu(\text{C-O-C})$ ze symetrických glykosidických vazeb nebo $\nu(\text{C-N})$ a $\nu(\text{C-C})$. Pík $1\,586\text{ cm}^{-1}$ by mohl být amid II, který je způsoben deformační (bending) vibrací $\delta(\text{NH})$, při které se mění valenční úhel a valenční vibrací $\nu(\text{CN})$. Bakterie *Cupriavidus necator* H16/PHB-4 je mutantním kmenem bakterie *Cupriavidus necator* H16, přestože se jedná o téměř totožný kmen, mutant *Cupriavidus necator* H16/PHB-4 není schopný produkce polymeru P(3HB), a tudíž i v Ramanových spektrech zcela chybí přítomnost píků ve vlnočtech 830 cm^{-1} a 1738 cm^{-1} , které signalizují přítomnost P(3HB). Jako nejlepší z analyzovaných spekter lze považovat to, ve kterém byla použita bakterie *Cupriavidus necator* H16/PHB-4 ve formě vysušené kapky, tedy bakteriální kultura byla před analýzou promyta vodou a tímto způsobem zbavena kultivačního média v kultuře. Zřetelně jdou vidět Ramanovy píky ve vlnočtech 791 cm^{-1} , který odpovídá DNA (fosfodiesterová vazba), poté $1\,004\text{ cm}^{-1}$ proteiny (fenylalanin), $1\,307\text{ cm}^{-1}$ lipidy (C-H) a nebo $1\,671\text{ cm}^{-1}$ odpovídající amidu I, který je způsoben valenční vibrací $\nu(\text{C=O})$ v peptidových vazbách.

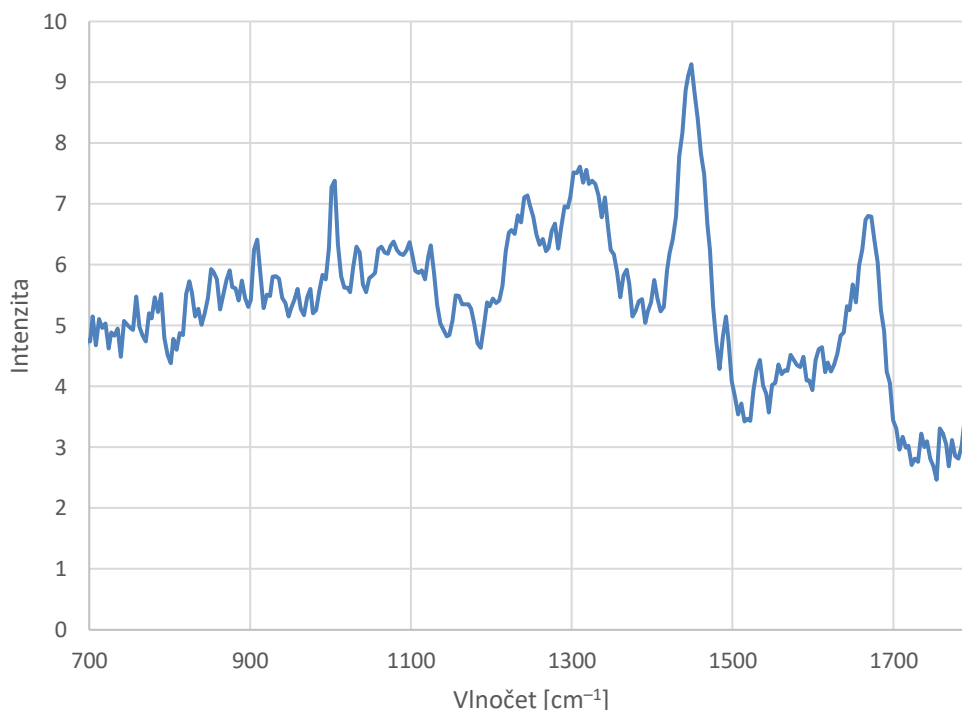
Dále jsme stanovovali Ramanova spektra mutantního kmene *Cupriavidus necator* H16/PHB-4 pomocí Ramanovy mikrospektroskopie s využitím laseru 785 nm (Obrázek 17). Vzorky byly připraveny stejným způsobem jako při měření spekter laserem 532 nm , avšak v tomto případě nebyla použita Ramanovská pinzeta z důvodu použití skla, které poskytuje velkou fluorescenci v oblasti kolem $1\,200\text{ cm}^{-1}$ – $1\,400\text{ cm}^{-1}$ při použití červeného laseru 785 nm . Přes fluorescenci pak velmi slabé Ramanovy signály nelze vidět.



Obrázek 17 - *Cupriavidus necator* H16/PHB-4,
měřeno červeným laserem 785 nm

Na první pohled se mezi dominantní píky řadí $1\ 001\ \text{cm}^{-1}$ proteiny (fenylalanin), $1\ 419\ \text{cm}^{-1}$ či $1\ 310\ \text{cm}^{-1}$ lipidy (C–H) a $1\ 670\ \text{cm}^{-1}$, který odpovídá amidu I. Drobný pík $786\ \text{cm}^{-1}$ poté odpovídá DNA (fosfodiesterová vazba).

Následně jsme pomocí FT-IR spektrometr v kombinaci s Ramanovým FT-modulem získali Ramanovské spektrum bakterie *Cupriavidus necator* H16/PHB-4 (Obrázek 18). V tomto případě byla na experiment využita vysušená biomasa (3.5.1.1).



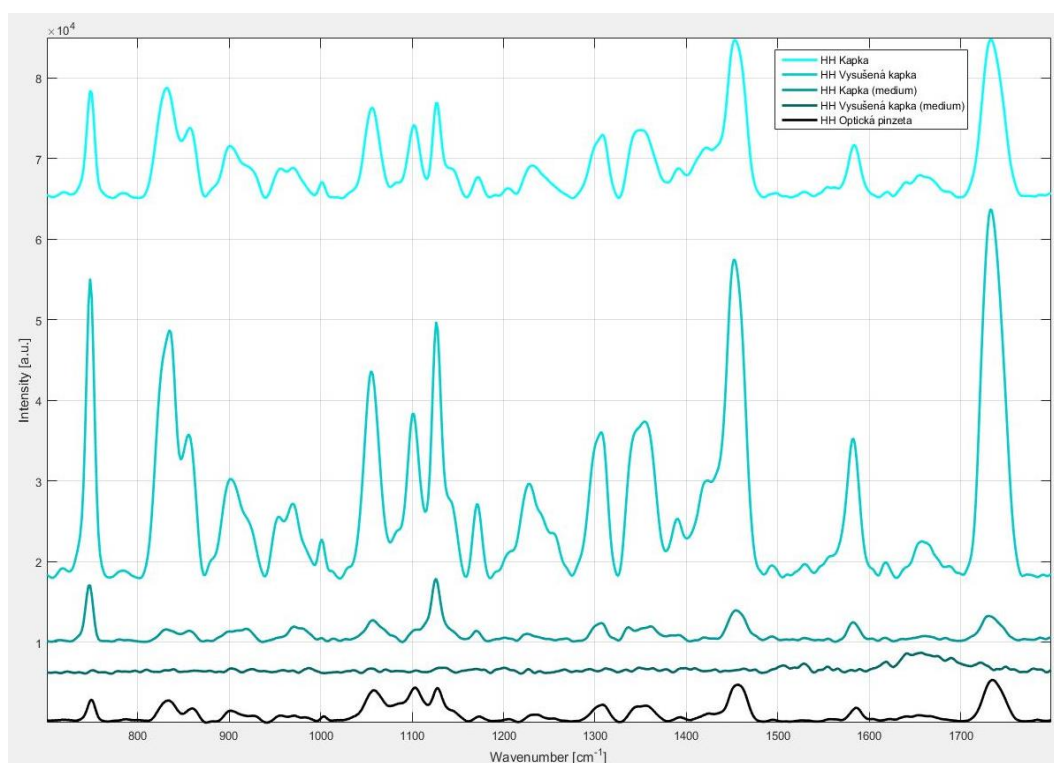
Obrázek 18 - *Cupriavidus necator* H16/PHB-4,
FT-IR spektrometr v kombinaci s Ramanovým FT-modulem

Při analýze (Obrázek 18) byl využíván laser o vlnové délce 1 064 nm, který poskytuje slabší intenzitu záření než lasery 532 nm či 785 nm. I zde mezi důležité píky patří proteiny 1 002 cm^{-1} , lipidy 1 310 cm^{-1} a amid I 1 673 cm^{-1} . Přestože spektrum vykazuje náznak šumu je i přesto FT-IR spektrometr v kombinaci s Ramanovým FT-modulem vhodnou metodou k charakterizaci bakterie *Cupriavidus necator* H16/PHB-4 pomocí Ramanového spektra, nevýhodou této metody je však poměrně zdlouhavá příprava vysušené biomasy.

Při porovnání všech laserů zelený laser 532 nm, stejně jako *Cupriavidus necator* H16, excituje některé přechody navíc, převážně ve vlnočtech 749 cm^{-1} , 1 127 cm^{-1} a 1 586 cm^{-1} . Toto je způsobeno větší intenzitou záření, a tedy schopností excitovat molekuly vzorku ze základního elektronového stavu do virtuálního energetického stavu. Nevýhodou je však poměrně vysoká hodnota fluorescence ve vzorku. I v tomto případě se nám osvědčilo využívání červeného laseru 785 nm, které poskytuje přesné spektrum bez nežádoucí fluorescence vzorku, ale s neschopností použít Ramanovskou pinzetu k identifikaci bakterie. Jako nejpodrobnější spektrum bylo stanoveno spektrum při využití laseru 785 nm, kdy byla použita vysušená, média zbavená kapka bakteriální kultury *Cupriavidus necator* H16/PHB-4.

4.3.1.3 *Halomonas halophila*

Spektrum bakterie *Halomonas halophila* (Obrázek 19) bylo stanoveno Ramanovou mikrospektroskopií s využitím zeleného laseru 532 nm. Vzorek byl aplikován na podložní sklíčko ve formě kapky, obsahující bakteriální kulturu zbavenou kultivačního média (3.5.1.2), následně byla měřena stejná kapka, avšak po zaschnutí na podložním sklíčku. Z důvodu porovnání vlivu kultivačního média na Ramanovské spektru byly analyzovány vzorky také přímo z kultivačního média. Při využití Ramanovské pinzety nebyl vzorek před aplikací do prostoru mezi podložní a krycí sklíčko nějak upraven, byla tedy použita přímo bakteriální kultura, ve kterém byla bakterie *Halomonas halophila* kultivována.

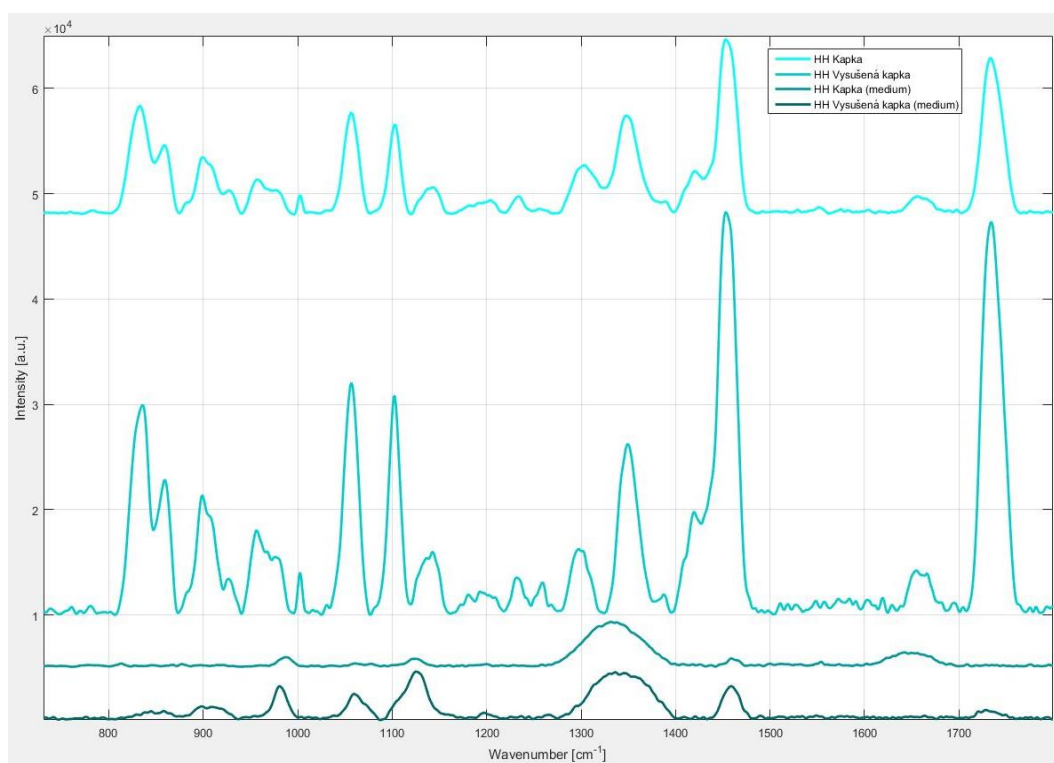


Obrázek 19 - *Halomonas halophila*,
měřeno zeleným laserem 532 nm

Spektra bakterie *Halomonas halophila* při různé úpravě vzorku před aplikací jsou si velmi podobná. Mezi nejvýraznější linie se v tomto spektru řadí 836 cm⁻¹ a 1735 cm⁻¹, které signalizují přítomnost P(3HB). Nejvýraznější pro identifikaci P(3HB) je pík 1735 cm⁻¹, který odpovídá valenční vibraci esterových skupin ν (C=O). Na základě těchto spekter můžeme jako nejlepší vyhodnotit to, ve kterém byla analyzována bakterie *Halomonas halophila* ve formě vysušené kapky, bakteriální kultura byla před analýzou promyta vodou z důvodu zbavení se kultivačního média v kultuře. Mezi další výrazné píky patří 748 cm⁻¹, 1126 cm⁻¹, odpovídající valenční (stretching) vibraci, při které se mění délka vazby ν (C–O–C) ze symetrických glykosidických vazeb nebo ν (C–N) a ν (C–C) a 1586 cm⁻¹ amid II, způsobený deformační (bending) vibrací δ (NH). Decentní pík 780 cm⁻¹ je přiřazen DNA

(fosfodiesterová vazba), $1\ 002\ \text{cm}^{-1}$ proteiny (fenylalanin) a nebo $1\ 663\ \text{cm}^{-1}$ odpovídající amidu I, který je způsoben valenční vibrací $\nu(\text{C}=\text{O})$ v peptidových vazbách. Záznam spektra ve formě vysušené kapky (médium) nám v tomto případě neposkytuje zcela čitelné spektrum, píky jsou zde o velmi nízké intenzitě.

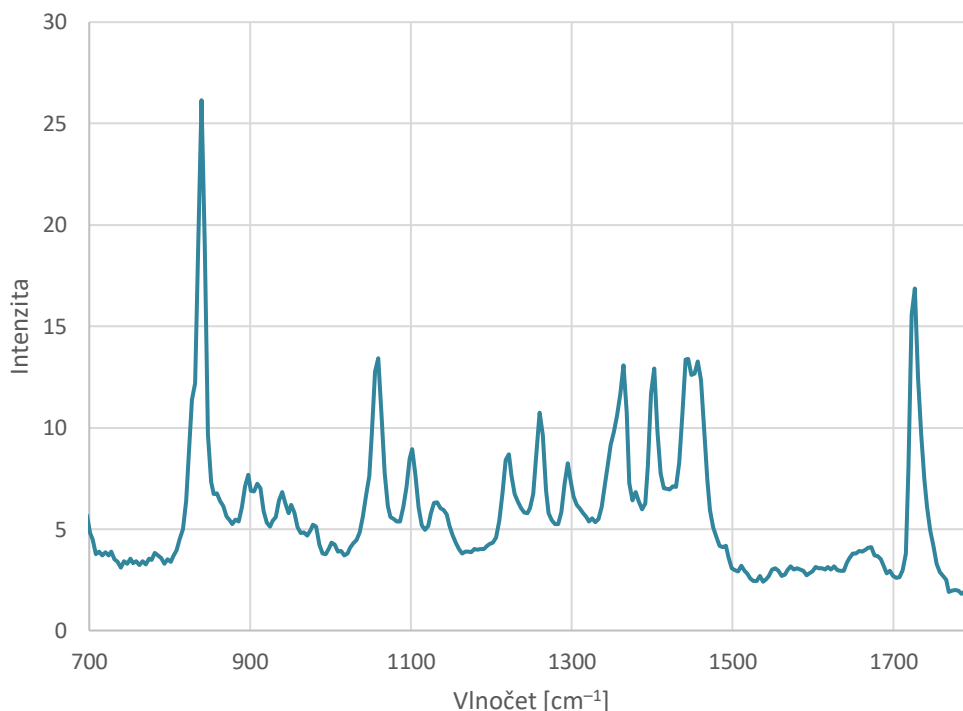
Ramanova mikrospektroskopie s využitím červeného laseru $785\ \text{nm}$ je znázorněna na obrázku níže (Obrázek 20). Vzorky byly připraveny stejným způsobem jako při měření spekter laserem $532\ \text{nm}$, avšak v tomto případě nebyla použita Ramanovská pinzeta z důvodu použití skla, které poskytuje velkou fluorescenci v oblasti kolem $1\ 200\ \text{cm}^{-1}$ – $1\ 400\ \text{cm}^{-1}$ při použití červeného laseru $785\ \text{nm}$. Přes fluorescenci pak velmi slabé Ramanovy signály nelze vidět.



Obrázek 20 - *Halomonas halophila*,
změřeno červeným laserem $785\ \text{nm}$

Spektra pro vzorky, které byly před analýzou zbaveny kultivačního média promytím vodou, jsou si u bakterie *Halomonas halophila* velmi podobná (Obrázek 20). Ramanovo spektrum média nám v tomto případě neposkytuje zcela přesné spektrum, je zde poměrně velká absence důležitých píků např. u HH kapka (médium) chybí pík $1\ 730\ \text{cm}^{-1}$ přiřazený k polymeru P(3HB). U bakterie *Halomonas halophila*, kde jsme se zbavili kultivačního média promytím vodou, jsou hlavní píky signalizující přítomnost P(3HB) v bakteriálních buňkách $838\ \text{cm}^{-1}$ a $1\ 738\ \text{cm}^{-1}$. Ramanovy píky ve vlnočtech $1\ 004\ \text{cm}^{-1}$ odpovídají proteinu (fenylalanin), $1\ 425\ \text{cm}^{-1}$ či $1\ 305\ \text{cm}^{-1}$ lipidy (C–H) a $1\ 672\ \text{cm}^{-1}$ amidu I.

Pomocí FT-IR spektrometr v kombinaci s Ramanovým FT-modulem získali Ramanovské spektrum bakterie *Halomonas halophila* (Obrázek 21). V tomto případě byla na experiment využita vysušená biomasa (3.5.1.1).



Obrázek 21 - *Halomonas halophila*,
FT-IR spektrometr v kombinaci s Ramanovým FT-modulem

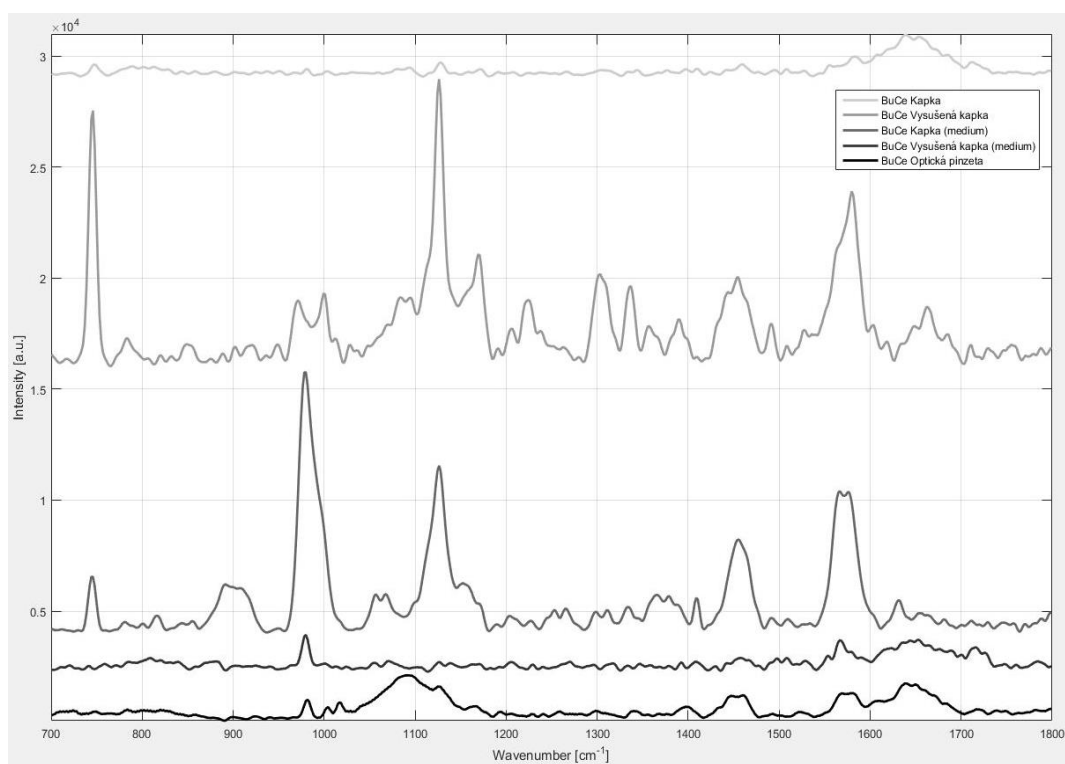
Při analýze FT-IR spektrometrem v kombinaci s Ramanovým FT-modulem (Obrázek 21) byl využíván laser o vlnové délce 1 064 nm, který poskytuje slabší intenzitu záření než lasery 532 nm či 785 nm. Mezi dominantní pík ve spektru výše patří 840 cm⁻¹ DNA (fosfodiesterová vazba). Ve vlnočet 1 727 cm⁻¹ je znázorněna přítomnost polymeru P(3HB). FT-IR spektrometr v kombinaci s Ramanovým FT-modulem může být použit k charakterizaci bakterie *Halomonas halophila* pomocí Ramanového spektra, nevýhodou této metody je ale poměrně zdlouhavá příprava vysušené biomasy.

Při porovnání všech laserů zelený laser 532 nm opět excituje určité přechody navíc, převážně ve vlnočtech 748 cm⁻¹, 1 126 cm⁻¹ a 1 586 cm⁻¹. Toto je způsobeno větší intenzitou záření, a tedy schopností excitovat molekuly vzorku ze základního elektronového stavu do virtuálního energetického stavu. Nevýhodou je však poměrně vysoká hodnota fluorescence ve vzorku. I v tomto případě se nám osvědčilo využívání červeného laseru 785 nm, které poskytuje přesné spektrum bez nežádoucí fluorescence vzorku, ale s neschopností použít Ramanovskou pinzetu k identifikaci bakterie. Jako nejpodrobnější spektrum bylo stanoveno spektrum

při využití laseru 785 nm, kdy byla použita vysušená, média zbavená kapka bakteriální kultury *Halomonas halophila*.

4.3.1.4 *Burkholderia cepacia*

Pomocí Ramanovy mikrospektroskopie s využitím zeleného laseru 532 nm bylo stanoveno charakteristické spektrum bakterie *Burkholderia cepacia* (Obrázek 22). Vzorek byl aplikován na podložní sklíčko ve formě kapky, obsahující bakteriální kulturu zbavenou kultivačního média (3.5.1.2), následně byla měřena kapka po zaschnutí na podložním sklíčku. Z důvodu porovnání vlivu kultivačního média na Ramanovo spektrum byly analyzovány vzorky také přímo z kultivačního média. Při využití Ramanovské pinzety nebyl vzorek před aplikací do prostoru mezi podložní a krycí sklíčko nějak upraven, byla tedy použita přímo bakteriální kultura, ve kterém byla bakterie *Burkholderia cepacia* kultivována.

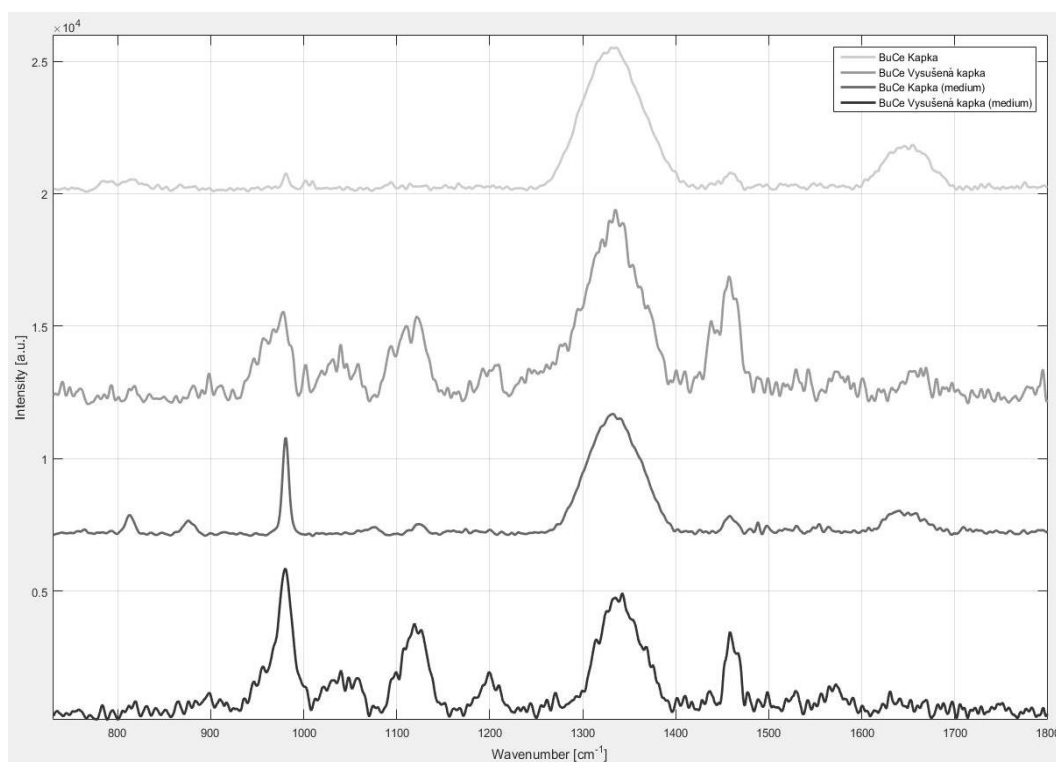


Obrázek 22 - *Burkholderia cepacia*,
měřeno zeleným laserem 532 nm

Z obrázku (Obrázek 22) můžeme vidět, že spektra bakterie *Burkholderia cepacia* při různé úpravě vzorku před aplikací jsou si velmi podobná. Ramanovo spektrum odhaluje některé charakteristické emisní přechody, které se běžně v bakteriálních buňkách vyskytují. Nejintenzivnějších hodnot dosahují píky v oblastech 746 cm⁻¹, 1126 cm⁻¹ odpovídající valenční (stretching) vibraci, při které se mění délka vazby ν (C–O–C) ze symetrických glykosidických vazeb nebo ν (C–N) a ν (C–C) a 1580 cm⁻¹ amid II, který je způsoben

deformační (bending) vibrací δ (NH), při které se mění valenční úhel a valenční vibrací ν (CN). Bakterie *Burkholderia cepacia* je producentem polymeru P(3HB), v našem případě dochází k absenci píků, které signalizující přítomnost polymeru (830 cm^{-1} a 1738 cm^{-1}). Plynovou chromatografií s FID detekcí jsme si ověřili, že v této bakterii opravdu nedošlo k akumulaci polymeru P(3HB). Předpokládá se, že tato bakterie neměla pravděpodobně nastavené optimální podmínky pro biosyntézu polymeru, proto nedošlo k jeho akumulaci. Další Ramanovy píky ve vlnočtech $1\ 002\text{ cm}^{-1}$ odpovídají proteinům (fenylalanin), $1\ 440\text{ cm}^{-1}$ nebo $1\ 308\text{ cm}^{-1}$ lipidy (C–H) a nebo $1\ 668\text{ cm}^{-1}$ odpovídající amidu I, který je způsoben valenční vibrací ν (C=O) v peptidových vazbách. V případě měření spekter u vzorků vysušené kapky bakterie *Burkholderia cepacia* v médiu zcela chybí některé píky, stejný případ nastal i u použití Ramanovské pinzety. V tomto případě zřejmě chyba nastala při nedostatečném zachycení buňky v optické pasti.

Dalším příkladem je stanovení Ramanových spekter pomocí Ramanovy mikrospektroskopie s využitím červeného laseru 785 nm (Obrázek 23). Vzorky byly připraveny stejným způsobem jako při měření spekter laserem 532 nm , avšak v tomto případě nebyla použita Ramanovská pinzeta z důvodu použití skla, které poskytuje velkou fluorescenci v oblasti kolem $1\ 200\text{ cm}^{-1}$ – $1\ 400\text{ cm}^{-1}$ při použití červeného laseru 785 nm . Přes fluorescenci pak velmi slabé Ramanovy signály nelze vidět.

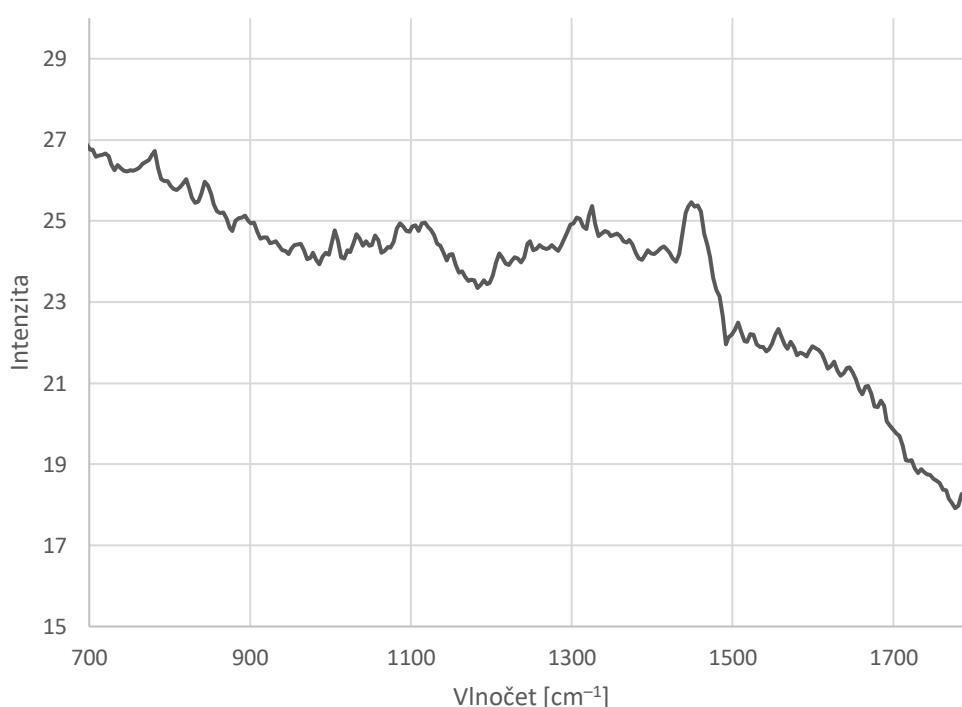


Obrázek 23 - *Burkholderia cepacia*,
měřeno červeným laserem 785 nm

Na obrázku výše (Obrázek 23) si můžeme všimnout, že jednotlivá spektra bakterie *Burkholderia cepacia* jsou si velmi podobná, přestože spektra jak vysušené, média zbavené kapky, tak i vysušená kapka média vykazují náznak šumu. Ve spektru jsou nalezeny píky

980 cm^{-1} , 1 121 cm^{-1} odpovídající valenční (stretching) vibraci, při které se mění délka vazby ν (C–O–C) ze symetrických glykosidických vazeb nebo ν (C–N) a ν (C–C), 1 334 cm^{-1} nebo 1 437 cm^{-1} pro lipidy. I v tomto případě je ve spektrech absence píku kolem 1 730 cm^{-1} , který značí přítomnost polymeru P(3HB). V případě vzorků bakterie *Burkholderia cepacia* ve formě kapky, zbavené média a kapky nanesené přímo z kultivačního média lze pozorovat pík mezi 1 300–1 400 cm^{-1} , kultura zřejmě nebyla dostatečně hustá a dávala slabý signál, který fluorescence od skla zcela pohltila.

FT-IR spektrometr v kombinaci s Ramanovým FT-modulem vytvořil Ramanovo spektrum bakterie *Burkholderia cepacia* (Obrázek 24). V tomto případě byla na experiment využita vysušená biomasa (3.5.1.1).



Obrázek 24 - *Burkholderia cepacia*,
FT-IR spektrometr v kombinaci s Ramanovým FT-modulem

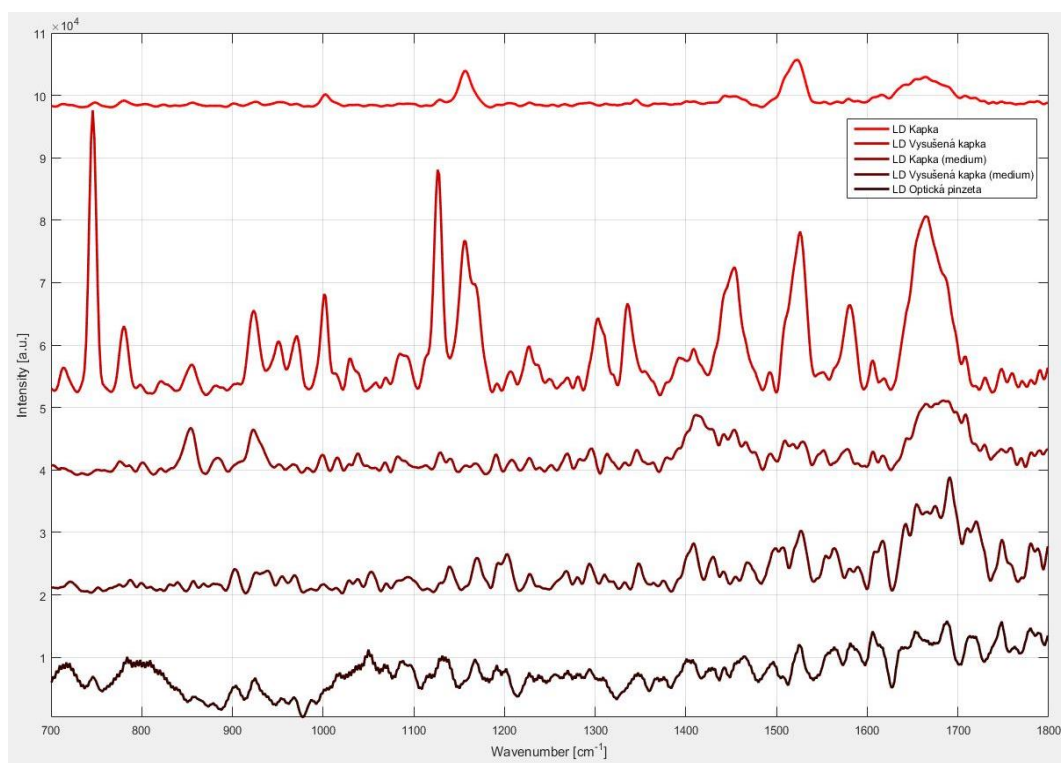
Při analýze FT-IR spektrometrem v kombinaci s Ramanovým FT-modulem (Obrázek 24) byl využíván laser o vlnové délce 1 064 nm, který poskytuje slabší intenzitu záření než lasery 532 nm či 785 nm. Spektrum vykazuje vysokou fluorescenci vzorku, a tím se stává téměř nečitelné. FT-IR spektrometr v kombinaci s Ramanovým FT-modulem tedy vhodnou metodou k charakterizaci bakterie *Burkholderia cepacia*.

Bakterie *Burkholderia cepacia*, přestože je producentem polymeru P(3HB), neobsahovala, jak se ze spekter zřejmě, žádný polymer, což je v souladu se získanými daty z plynové chromatografie s FID detekcí. Při využití červeného laseru 785 cm^{-1} vykazovaly vzorky

náznak šumu. Při využití zeleného laseru 532 cm^{-1} se nám nepovedlo zachytit buňku pomocí optické pasti, z toho důvodu lze ve spektru vidět pouze spektrum kultivačního média. Bakterie *Burkholderia cepacia* zřejmě k zachycení Ramanového spektra vyžaduje laser o vyšší intenzitě, proto jako nejpodrobnější spektrum bylo stanoveno spektrum při využití laseru 532 nm , kdy byla použita vysušená, média zbavená kapka bakteriální kultury *Burkholderia cepacia*.

4.3.1.5 *Lactobacillus delbrueckii*

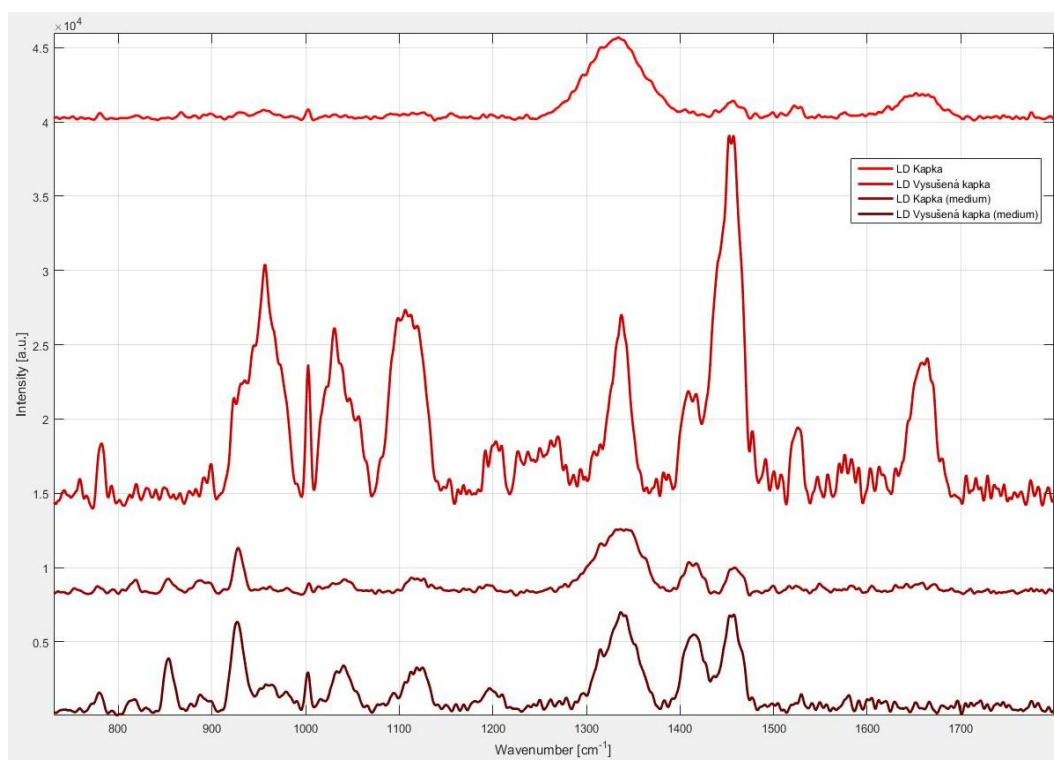
Pomocí Ramanovy mikrospektroskopie s využitím laseru 532 nm bylo stanoveno charakteristické spektrum bakterie *Lactobacillus delbrueckii* (Obrázek 25). Vzorek byl aplikován na podložní sklíčko ve formě kapky, obsahující bakteriální kulturu zbavenou kultivačního média (3.5.1.2), následně byla měřena ta samá kapka, avšak po zaschnutí na podložním sklíčku. Z důvodu porovnání vlivu kultivačního média na Ramanovo spektrum byly analyzovány vzorky také přímo z kultivačního média. Při využití Ramanovské pinzety nebyl vzorek před aplikací do prostoru mezi podložní a krycí sklíčko nějak upraven, byla tedy použita přímo bakteriální kultura, ve kterém byla bakterie *Lactobacillus delbrueckii* kultivována.



Obrázek 25 - *Lactobacillus delbrueckii*,
měřeno zeleným laserem 532 nm

Na obrázku výše (Obrázek 25) je znázorněno spektrum grampozitivní bakterie *Lactobacillus delbrueckii* při různé úpravě vzorku před aplikací. Nejpřesnější spektrum z této série nám poskytuje to, ve kterém byla použita vysušená, média zbavená kapka bakterie *Lactobacillus delbrueckii*. Ramanovo spektrum odhaluje některé charakteristické intenzivní signály, mezi nejvýraznější píky v tomto spektru patří 746 cm^{-1} , $1\,126\text{ cm}^{-1}$ a $1\,583\text{ cm}^{-1}$. Vrchol kolem $1\,126\text{ cm}^{-1}$ by mohl být přiřazen valenční (stretching) vibraci, při které se mění délka vazby ν (C–O–C) ze symetrických glykosidických vazeb nebo ν (C–N) a ν (C–C). Pík $1\,583\text{ cm}^{-1}$ by mohl být amid II, který je způsoben deformační (bending) vibrací δ (NH), při které se mění valenční úhel a valenční vibrací ν (CN). Dalšími zajímavými píky jsou $1\,306\text{ cm}^{-1}$ či $1\,455\text{ cm}^{-1}$ zastupující lipidy nebo $1\,668\text{ cm}^{-1}$ pro amid I, který je způsoben valenční vibrací ν (C=O) v peptidových vazbách. V tomto případě si lze povšimnout i píku pro DNA (fosfodiesterová vazba) a to ve vlnočtu 782 cm^{-1} .

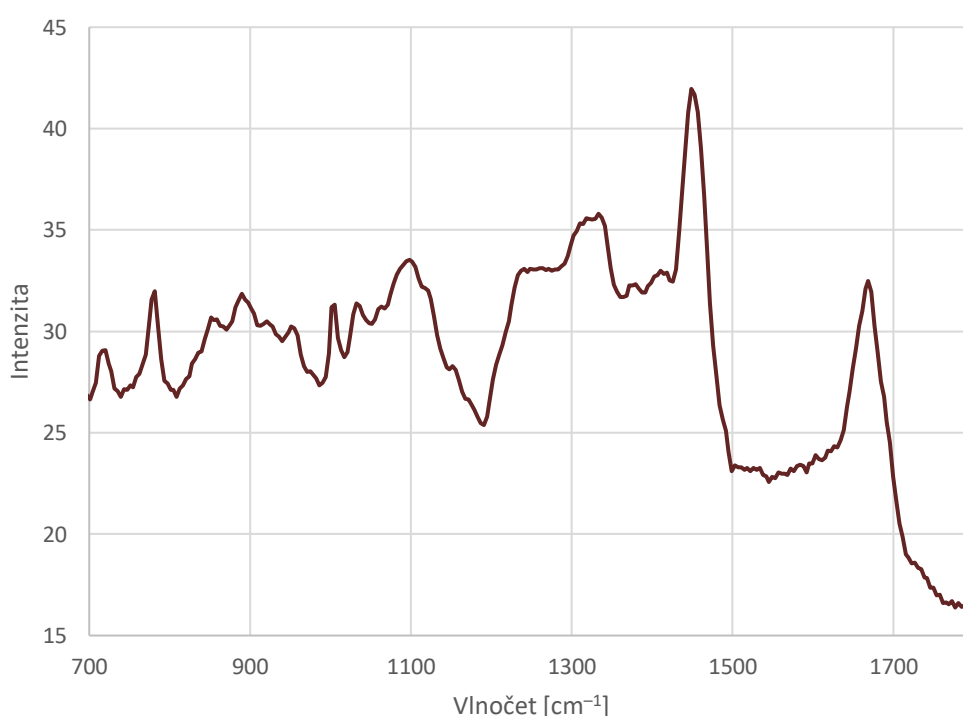
Dále jsme stanovovali Ramanova spektra kmene *Lactobacillus delbrueckii*, pomocí Ramanovy mikrospektroskopie s využitím červeného laseru 785 nm (Obrázek 26). Vzorky byly připraveny stejným způsobem jako při měření spekter laserem 532 nm , avšak v tomto případě nebyla použita Ramanovská pinzeta z důvodu použití skla, které poskytuje velkou fluorescenci v oblasti kolem $1\,200\text{ cm}^{-1}$ – $1\,400\text{ cm}^{-1}$ při použití červeného laseru 785 nm . Přes fluorescenci pak velmi slabé Ramanovy signály nelze vidět.



Obrázek 26 - *Lactobacillus delbrueckii*,
měřeno červeným laserem 785 nm

Spektra bakterie při různé úpravě vzorku před aplikací jsou si velmi podobná. Mezi nejvýraznější emisní linie se v tomto spektru řadí 928 cm^{-1} , $1\,340\text{ cm}^{-1}$ a $1\,458\text{ cm}^{-1}$, který zastupuje lipidy. Signál lze zaznamenat i u přechodu 782 cm^{-1} DNA (fosfodiesterová vazba), $1\,001\text{ cm}^{-1}$ proteiny (fenylalanin) a $1\,666\text{ cm}^{-1}$ amid I. V případě vzorku *Lactobacillus delbrueckii* ve formě kapky zbavené média a kapky nanesené přímo z kultivačního média lze pozorovat pík mezi $1\,300\text{--}1\,400\text{ cm}^{-1}$, kultura zřejmě nebyla dostatečně hustá a dávala slabá signál, který fluorescence od skla zcela pohltila.

Nakonec jsme pomocí FT-IR spektrometr v kombinaci s Ramanovým FT-modulem získali Ramanovské spektrum bakterie *Lactobacillus delbrueckii* (Obrázek 27). V tomto případě byla na experiment využita vysušená biomasa (3.5.1.1).



Obrázek 27 - *Lactobacillus delbrueckii*,
FT-IR spektrometr v kombinaci s Ramanovým FT-modulem

Při analýze FT-IR spektrometrem v kombinaci s Ramanovým FT-modulem (Obrázek 21) byl využíván laser o vlnové délce $1\,064\text{ nm}$, který poskytuje slabší intenzitu záření než lasery 532 nm či 785 nm . Mezi hlavní, důležité píky se řadí 778 cm^{-1} DNA (fosfodiesterová vazba), $1\,453\text{ cm}^{-1}$ lipidy a $1\,673\text{ cm}^{-1}$ amid I. FT-IR spektrometr v kombinaci s Ramanovým FT-modulem může být použit k charakterizaci bakterie *Lactobacillus delbrueckii* pomocí Ramanového spektra, nevýhodou této metody je ale poměrně zdlouhavá příprava vysušené biomasy.

Bakterie *Lactobacillus delbrueckii* je grampozitivní bakterií, neprodukuje polymer P(3HB), a tudíž i v Ramanových spektrech zcela chybí přítomnost píků ve vlnočtech 830 cm^{-1} a

1738 cm^{-1} , které signalizují přítomnost P(3HB). Tato bakterie byla použita k analýze Ramanových spekter převážně jako jediný zástupce grampozitivní bakterie mezi studovanými vzorky. Při porovnání všech laserů zelený laser 532 nm opět excituje některé přechody navíc, převážně ve vlnočtech 746 cm^{-1} , 1 126 cm^{-1} a 1 583 cm^{-1} . Toto je způsobeno větší intenzitou záření, a tedy schopností excitovat molekuly vzorku ze základního elektronového stavu do virtuálního energetického stavu. Nevýhodou je však poměrně vysoká hodnota fluorescence ve vzorku. Bakterie *Lactobacillus delbrueckii* stejně jako *Burkholderia cepacia* zřejmě vyžaduje k zachycení Ramanového spektra laser o vyšší intenzitě, proto jako nejpodrobnější spektrum bylo stanoveno spektrum při využití laseru 532 nm, kdy byla použita vysušená, média zbavená kapka bakteriální kultury *Lactobacillus delbrueckii*.

Pomocí plynové chromatografie s FID detekcí jsme stanovili obsah P(3HB) v biomase PHA produkujících bakteriálních kmenů, následně jsme díky Ramanově mikrospektroskopii, Ramanovské pinzetě či FT-IR spektrometr v kombinaci s Ramanovým FT-modulem dokázali potvrdit přítomnost P(3HB) u bakterií, které tento polymer produkují, tedy u *Cupriavidus necator* H16 a *Halomonas halophila*. U bakterie *Burkholderia cepacia* se nám přítomnost polymeru P(3HB) neprokázala ani jednou z uvedených metod.

Při práci s Ramanovskou pinzetou se nám nepodařilo zachytit vzorek na úrovni jedné buňky, ale na první pohled bylo zřejmé, že použitím optické pasti se buňky soustřeďovaly do ohniska záření, které past vytvářela, bez fyziologického poškození buněk. Pro lepší využití Ramanovské pinzety a následné manipulaci jednou buňkou je zapotřebí řidší kultury s obsahem menšího množství bakteriálních buněk, než bylo použito v našem případě. Přestože při práci s Ramanovskou pinzetou bylo dosaženo ve spektrech menší intenzity než při využití Ramanovy mikrospektroskopie, lze Ramanovu pinzetu považovat za vhodnou metodu při kvalitativním vyhodnocování spekter, zároveň je její největší výhodou rychlost analýzy a není potřebná speciální úprava vzorku. Principiálně výsledky naznačují, že Ramanovskou pinzetu je možné využít k izolaci PHA produkujících bakterií ze smíšeného konsorcia.

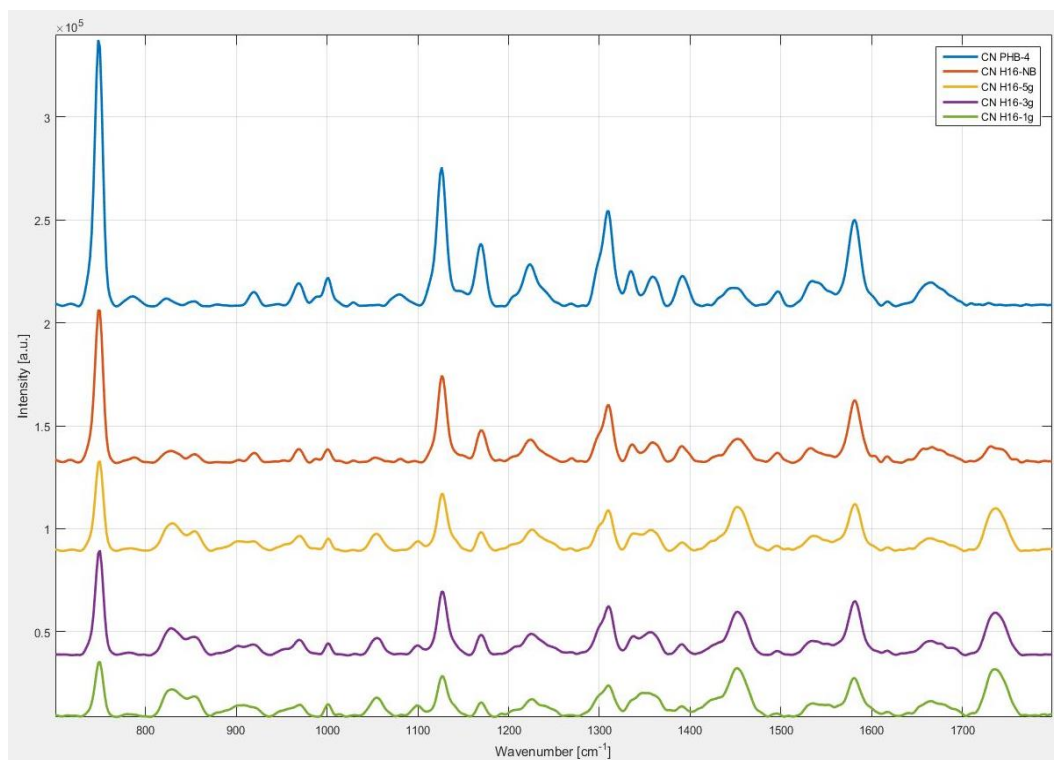
Zelený laser 532 nm má větší energii než laser 785 nm a tím pádem je vyšší pravděpodobnost molekulu vybudit, toto platí jak pro Ramanovský (stokesův) rozptyl, tak i pro fluorescenci a Rayleighův rozptyl. Díky zelenému laseru tedy můžeme získat větší signál, ale s rizikem velké fluorescence. Z tohoto důvodu je potřeba zvolit vhodný laser a jeho parametry nastavení individuálně pro každý vzorek.

Nejvíce se nám při využití Ramanovy spektroskopie osvědčila aplikace vzorku, který byl před analýzou zbavený zbytku kultivačního média, spektra vykazovala přesněji vykreslené a intenzivnější píky. Naopak za nejméně informující spektra lze považovat ta, ve kterých byly použity vzorky nanesené přímo z kultivačního média, v tomto případě byly vykreslené jen některé charakteristické píky, proto lze tato spektra považovat pouze za orientační.

4.3.2 Studium charakteristických Ramanovských spekter u bakterie *Cupriavidus necator* s různým obsahem P(3HB)

V tomto experimentu jsem se zaměřila na bakterii *Cupriavidus necator* H16, která je modelovým organismem pro produkci P(3HB), a její mutantní kmen *Cupriavidus necator* H16/PHB-4, která naopak není schopná produkce polymeru P(3HB) ve svých buňkách. Bakteriální kmen *Cupriavidus necator* H16 byl kultivován v produkčním minerálním médiu (3.2.2) o různém obsahu dusíku, což mělo vliv na produkci polymeru, a zároveň kultivace probíhala i v tekutém médiu Nutrient Broth, spektra byla následně porovnána se spektrem bakteriálního kmene *Cupriavidus necator* H16/PHB-4. Za účelem získání charakteristických Ramanových spekter bakterií byl využit Ramanův mikrospektrometr, měření probíhalo s použitím zeleného laseru o vlnové délce 532 nm a následně s použitím červeného laseru 785 nm. Vzorky bakterií byly před analýzou promyty destilovanou vodou a následně byly po aplikaci na podložní sklíčko zaschnuty (3.5.1.2).

Na obrázku níže (Obrázek 28) je znázorněno typické Ramanovo rozptylové spektrum bakterie *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* H16/PHB-4 získané Ramanovým mikrospektrometrem s využitím zeleného laseru 532 nm.



Obrázek 28 - *Cupriavidus necator* kultivovaná v různých kultivačních médiích, měřeno zeleným laserem 532 nm;

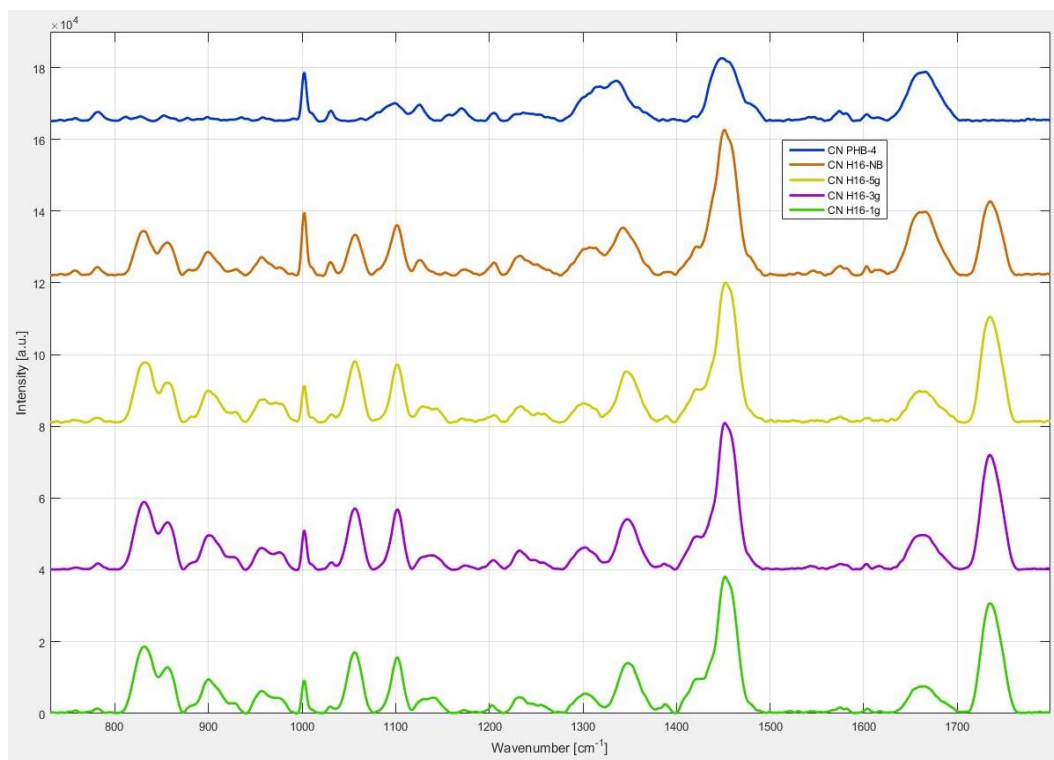
Na první pohled je zřejmé, že spektra (Obrázek 28) bakterie *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* H16/PHB-4 jsou si velmi podobná. Hlavním rozdílem je absence píku

u *Cupriavidus necator* H16/PHB-4 ve vlnočtu kolem 830 cm^{-1} a 1738 cm^{-1} , které signalizují přítomnost P(3HB). Spektrum odhaluje některé charakteristické intenzivní signály, které se v bakteriálních buňkách běžně vyskytují. Mezi nejvýraznější píky se v tomto spektru řadí 745 cm^{-1} , 1125 cm^{-1} a 1580 cm^{-1} .

U píku 745 cm^{-1} by se podle článku [74] mohlo jednat o tryptofan a nebo podle [75] o thymín, avšak u obou případů nelze pozorovat ve spektrech všechny silné přechody [76]. Případně by se podle studie z roku 2015 [73] mohlo jednat o ATP, tvorba P(3HB) je nepřímo ovlivněna množstvím dostupného ATP, což by vysvětlovalo trend ve spektrech, kde při nejvyšším obsahu P(3HB) v buňce byla velikost píku 745 cm^{-1} nejmenší, naopak u bakterie *Cupriavidus necator* H16/PHB-4, která není schopná produkce P(3HB) velikost píku 745 cm^{-1} dosahovala nejvyšší hodnoty ze studovaných vzorků. Pík 745 cm^{-1} nelze přímo identifikovat, i ve studii [70] nebo [77] nebyli schopni tento vrchol přiřadit charakteristické skupině, nicméně v našem případě je velice zajímavé, že jeho intenzita nepřímo koreluje s obsahem P(3HB) v bakteriálních buňkách. Tato skutečnost naznačuje, že identifikace píku 745 cm^{-1} je zajímavým experimentálním úkolem do budoucna.

Vrchol kolem 1125 cm^{-1} zastupuje valenční (stretching) vibraci, při které se mění délka vazby $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ ze symetrických glykosidických vazeb nebo $\nu(\text{C}-\text{N})$ a $\nu(\text{C}-\text{C})$. Pík 1580 cm^{-1} je amid II, který je způsoben deformační (bending) vibrací $\delta(\text{NH})$, při které se mění valenční úhel, a valenční vibrací $\nu(\text{CN})$. Pro identifikaci P(3HB) se vyskytují odezvy v několika Ramanových píkách (830 cm^{-1} a 1738 cm^{-1}). Nejvýraznější pro identifikaci P(3HB) bývá pík kolem vlnočtu 1738 cm^{-1} , který odpovídá valenční vibraci esterových skupin $\nu(\text{C}=\text{O})$.

Ramanova mikrospektroskopie bakterii *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* H16/PHB-4 s využitím červeného laseru 785 nm je znázorněna na obrázku níže (Obrázek 29).



Obrázek 29 - *Cupriavidus necator* kultivovaná v různých kultivačních médiích, měřeno červeným laserem 785 nm

I na tomto příkladu je zřejmé, že emisní linie (Obrázek 29) bakterie *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* H16/PHB-4 jsou si velmi podobné. U bakteriálního kmene *Cupriavidus necator* H16/PHB-4 je ve vlnočtu kolem 830 cm^{-1} a 1738 cm^{-1} absence píků, které signalizují přítomnost P(3HB). Dále spektrum odhaluje, že s přibývajícím množstvím dusíku v podobě síranu amonného v kultivačním médiu u bakterie *Cupriavidus necator* H16, klesalo množství polymeru P(3HB) v buňkách této bakterie, podle spektra tedy nejvyšších hodnot dosahovala kultura *Cupriavidus necator* H16, kde bylo do produkčního minerálního média přidáno 1 g/l síranu amonného, naopak nejnižšího množství polymeru bylo v případě kultivace *Cupriavidus necator* H16 v komerčně dostupném médiu Nutrient Broth, toto médium není, díky vysokému obsahu dusíku, vhodnou volbou pro kultivaci bakterií za účelem produkce PHA.

V experimentu jsem se zaměřila zejména na přítomnost biopolymeru P(3HB), který se vyskytuje u vybraných PHA produkujících bakteriálních kmenů intracelulárně ve formě granulí. Při porovnání Ramanových spekter (Obrázek 28 a Obrázek 29) s výsledky z plynové chromatografie s FID detekcí (Obrázek 12), pomocí které jsme získali přesný obsah P(3HB) v sušině buněk, dosažené výsledky spolu dobře korelovaly. V obou případech nejvyšších obsahů P(3HB) dosahovala bakterie *Cupriavidus necator* H16, kde byla limitace živin dusíkem, bylo tedy do produkčního minerálního média přidáváno nejnižší množství síranu amonného a to 1 g/l kultivačního média. Naopak nejnižšího množství P(3HB) bylo naměřeno u bakterie *Cupriavidus necator* H16, která byla kultivována v Nutrient Broth médiu. Mutantní

kmen *Cupriavidus necator* H16/PHB-4 není schopný produkce polymeru PHA, toto jsme si potvrdili při vyhodnocování spekter, v tomto případě charakteristický pík pro přítomnost P(3HB) chyběl.

Tato metoda nachází dobré uplatnění při charakterizaci složení jednotlivých bakteriálních buněk. Velkou výhodou Ramanovy mikrospektroskopie je velmi malá spotřeba vzorku při analýze. Ramanova mikrospektroskopie je rychlým, všestranným a prakticky neinvazivním nástrojem pro studium buněk.

5 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce byla zaměřena na studium využití Ramanovy spektroskopie a Ramanovské pinzety k analýze a potenciální izolaci gramnegativních bakteriálních kmenů produkujících PHA.

V experimentální části byly analyzovány bakteriální kmeny, které za vhodných podmínek tvoří polyhydroxyalkanoáty – *Burkholderia cepacia*, *Halomonas halophila*, *Cupriavidus necator* H16 a dále jeho mutantní kmen *Cupriavidus necator* H16/PHB–4, který není schopný produkce polymeru P(3HB). Studium se soustředilo i na bakterii *Lactobacillus delbrueckii*, která sice není producentem polyhydroxyalkanoátů, ale byla vybrána jakožto náš jediný studovaný zástupce grampozitivních bakterií. Pomocí plynové chromatografie s FID detekcí jsme stanovili obsah P(3HB) v biomase PHA produkujících bakteriálních kmenů, následně jsme díky Ramanově mikrospektroskopii, Ramanovské pinzetě či FT-IR spektrometr v kombinaci s Ramanovým FT-modulem dokázali potvrdit přítomnost P(3HB) u bakterií, které tento polymer produkují, tedy u *Cupriavidus necator* H16 a *Halomonas halophila*. U bakterie *Burkholderia cepacia* se nám přítomnost polymeru P(3HB) neprokázala ani jednou z uvedených metod.

Při práci s Ramanovskou pinzetou za použití laseru 532 nm se nám nepodařilo zachytit vzorek na úrovni jedné buňky, ale na první pohled bylo zřejmé, že použitím optické pasti se buňky soustřeďovaly do ohniska, které past vytvářela, záření bez fyziologického poškození buněk. Pro lepší využití Ramanovské pinzety a následné manipulaci jednou buňkou je zapotřebí řidší kultury s obsahem menšího množství bakteriálních buněk, než bylo použito v našem případě. Přestože při práci s Ramanovskou pinzetou bylo dosaženo ve spektrech menší intenzity než při využití Ramanovy mikrospektroskopie, lze Ramanovu pinzetu považovat za vhodnou metodu při kvalitativním vyhodnocování spekter, zároveň je její největší výhodou rychlost analýzy a není potřebná speciální úprava vzorku. Je důležité zmínit, že pomocí Ramanovské pinzety je možné identifikovat PHA produkující bakterie na úrovni jedné buňky a zároveň s vybranými buňkami fyzicky manipulovat. Proto je principiálně možné využít Ramanovskou pinzetu k izolaci PHA produkujících kmenů ze směsných mikrobiálních konsorcií.

Nejvíce se nám při využití Ramanovy spektroskopie osvědčila aplikace vzorku, který byl před analýzou zbavený zbytku kultivačního média, spektra vykazovala přesněji vykreslené a intenzivnější píky. Naopak za nejméně informující spektra lze považovat ta, ve kterých byly použity vzorky nanesené přímo z kultivačního média, v tomto případě byly vykreslené jen některé charakteristické píky, proto lze tato spektra považovat pouze za orientační.

Pozornost byla dále zaměřena na bakterii *Cupriavidus necator* H16, která je modelovým organismem pro produkci P(3HB), a její mutantní kmen *Cupriavidus necator* H16/PHB–4, která naopak není schopná produkce polymeru P(3HB) ve svých buňkách. Bakteriální kmen *Cupriavidus necator* H16 byl kultivován v produkčním minerálním médiu o různém obsahu dusíku, a zároveň kultivace probíhala i v tekutém médiu Nutrient Broth, spektra byla následně porovnána se spektrem bakteriálního kmene *Cupriavidus necator* H16/PHB–4.

Po porovnání Ramanových spekter bakterií *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* H16/PHB-4 s výsledky z plynové chromatografie s FID detekcí, pomocí které jsme získali přesný obsah P(3HB) v sušině buněk, dosažené výsledky spolu dobře korelovaly. V obou případech nejvyšších obsahů P(3HB) dosahovala bakterie *Cupriavidus necator* H16, kde byla limitace živin dusíkem, bylo tedy do produkčního minerálního média přidáváno nejmenší množství síranu amonného a to 1 g/l kultivačního média. Naopak nejmenší množství P(3HB) bylo naměřeno u bakterie *Cupriavidus necator* H16, která byla kultivována v Nutrient Broth médiu. Mutantní kmen *Cupriavidus necator* H16/PHB-4 není schopný produkce polymeru PHA, toto jsme si potvrdili při vyhodnocování spekter, v tomto případě charakteristický pík pro přítomnost P(3HB) chyběl. Intenzita píku 745 cm^{-1} negativně korelovala s obsahem P(3HB) v bakteriálních buňkách, proto by bylo zajímavé tento pík přiřadit konkrétnímu metabolitu.

Ramanova spektroskopie nachází dobré uplatnění při charakterizaci složení jednotlivých bakteriálních buněk. Velkou výhodou Ramanovy mikrospektroskopie je velmi malá spotřeba vzorku při analýze. Ramanova mikrospektroskopie je rychlým, všestranným a prakticky neinvazivním nástrojem pro studium buněk.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] MOŽEJKO-CIESIELSKA, Justyna a Robert KIEWISZ. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous?. *Microbiological Research*. 2016, **192**, 271-282. DOI: 10.1016/j.micres.2016.07.010. ISSN 09445013. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S094450131630043>
- [2] What is the problem with plastic?. In: *BBC* [online]. London: BBC, 2018 [cit. 2018-11-04]. Dostupné z: <https://www.bbc.co.uk/newsround/42810179>
- [3] SAGONG, Hye-Young, Hyeoncheol Francis SON, So Young CHOI, Sang Yup LEE a Kyung-Jin KIM. Structural Insights into Polyhydroxyalkanoates Biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences*. 2018, **43**(10), 790-805. DOI: 10.1016/j.tibs.2018.08.005. ISSN 09680004. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000418301531>
- [4] FRADINHO, J.C., J.M.B. DOMINGOS, G. CARVALHO, A. OEHMEN a M.A.M. REIS. Polyhydroxyalkanoates production by a mixed photosynthetic consortium of bacteria and algae. *Bioresource Technology*. 2013, **132**, 146-153. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.01.050. ISSN 09608524. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852413000734>
- [5] CHANPRATEEP, Suchada. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2010, **110**(6), 621-632. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2010.07.014. ISSN 13891723. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172310002525>
- [6] *Izolace polyhydroxyalkanoátů z mikrobiální biomasy* [online]. Chemické listy, 2016, **110**(12) [cit. 2018-11-04]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/120/120>
- [7] Flickinger, M.C., Drew, S.W.: *Encyclopedia of Bioprocess Technology – Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*, Volumes 1-5: John Wiley & Sons, 1999. 2024-2133 p. ISBN 1-59124-457-9.
- [8] SUDESH, K, H ABE a Y DOI. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*. 2000, **25**(10), 1503-1555. DOI: 10.1016/S0079-6700(00)00035-6. ISSN 00796700. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670000000356>
- [9] OBRUCA, Stanislav, Ivana MAROVA, Ondrej SNAJDAR, Ludmila MRAVCOVA a Zdenek SVOBODA. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* from waste rapeseed oil using propanol as a precursor of 3-hydroxyvalerate. *Biotechnology Letters*. 2010, **32**(12), 1925-1932. DOI: 10.1007/s10529-010-0376-8. ISSN 0141-5492. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-010-0376-8>
- [10] KOLLER, Martin. Advances in Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. *Bioengineering*. 2017, **4**(4), 88. DOI: 10.3390/bioengineering4040088. ISSN 2306-5354. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2306-5354/4/4/88>
- [11] KOURMENTZA, Constantina, Jerisson 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*. 2017, **4**(4), 55. DOI: 10.3390/bioengineering4020055. ISSN 2306-5354. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2306-5354/4/2/55>

- [12] *Non-pathogenic Pseudomonas as platform hosts for industrial biocatalysis* [online]. Aachen: Industrial Biocatalysis, 2016 [cit. 2018-11-19]. ISBN 978-981-4463-89-8. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/290868884_Non-Pathogenic_pseudomonas_as_platform_for_industrial_biocatalysis
- [13] LEONG, Yoong Kit, Pau Loke SHOW, Chien Wei OOI, Tau Chuan LING a John Chi-Wei LAN. Current trends in polyhydroxyalkanoates (PHAs) biosynthesis: Insights from the recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*. 2014, **180**(20), 52-65. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.03.020. ISSN 01681656. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165614001321>
- [14] SASTRI, Vinny R. Other Polymers. *Plastics in Medical Devices*. Elsevier, 2010, 2010, 217-262. DOI: 10.1016/B978-0-8155-2027-6.10009-1. ISBN 9780815520276. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780815520276100091>
- [15] REDDY, C.S.K, R GHAI, RASHMI a V.C KALIA. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*. 2003, **87**(2), 137-146. DOI: 10.1016/S0960-8524(02)00212-2. ISSN 09608524. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852402002122>
- [16] MACRAE, R. M., WILKINSON, J. F.: The influence of cultural conditions on poly- β -hydroxybutyrate synthesis in *Bacillus megaterium*. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*, 1958, **27**, 73-78. ISSN 0308-2105
- [17] BARHAM, P. J., A. KELLER, E. L. OTUN a P. A. HOLMES. Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: poly-3-hydroxybutyrate. *Journal of Materials Science*. 1984, **19**(9), 2781-2794. DOI: 10.1007/BF01026954. ISSN 0022-2461. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF01026954>
- [18] KHANNA, Shilpi a Ashok K. SRIVASTAVA. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*. 2005, **40**(2), 607-619. DOI: 10.1016/j.procbio.2004.01.053. ISSN 13595113. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959204000949>
- [19] MISRA, Superb K., Sabeel P. VALAPPIL, Ipsita ROY a Aldo R. BOCCACCINI. Polyhydroxyalkanoate (PHA)/Inorganic Phase Composites for Tissue Engineering Applications. *Biomacromolecules*. 2006, **7**(8), 2249-2258. DOI: 10.1021/bm060317c. ISSN 1525-7797. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm060317c>
- [20] BRAUNEGG, Gerhart, Gilles LEFEBVRE a Klaus F GENSER. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*. 1998, **65**(2-3), 127-161. DOI: 10.1016/S0168-1656(98)00126-6. ISSN 01681656. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165698001266>
- [21] LENZ, Robert W. a Robert H. MARCHESSAULT. Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology. *Biomacromolecules*. 2005, **6**(1), 1-8. DOI: 10.1021/bm049700c. ISSN 1525-7797. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm049700c>
- [22] KESSLER, Birgit a Bernard WITHOLT. Poly(3-Hydroxyalkanoates). *Encyclopedia of Bioprocess Technology*. Hoboken, NJ, USA, 2002, 2002-10-15. DOI: 10.1002/0471250589.ebt168. ISBN 0471250589. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471250589.ebt168>

- [23] BRULÉ, Emilie, Vincent GUÉRINEAU, Philippe VERMAUT, et al. Polymerization of cyclic esters using N-heterocyclic carbene carboxylate catalysts. *Polymer Chemistry*. 2013, **4**(8), 2414-2423. DOI: 10.1039/c3py00108c. ISSN 1759-9954. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3py00108c>
- [24] ALTAEE, Nadia, Gamal A. EL-HITI, Ayad FAHDIL, Kumar SUDESH a Emad YOUSIF. Biodegradation of different formulations of polyhydroxybutyrate films in soil. *SpringerPlus*. 2016, **5**(1). DOI: 10.1186/s40064-016-2480-2. ISSN 2193-1801. Dostupné také z: <http://springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/s40064-016-2480-2>
- [25] ROOHI, Mohd Rehan ZAHEER a Mohammed KUDDUS. PHB (poly- β -hydroxybutyrate) and its enzymatic degradation. *Polymers for Advanced Technologies*. 2018, **29**(1), 30-40. DOI: 10.1002/pat.4126. ISSN 10427147. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pat.4126>
- [26] JENDROSSEK, Dieter a René HANDRICK. Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates. *Annual Review of Microbiology*. 2002, **56**(1), 403-432. DOI: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160838. ISSN 0066-4227. Dostupné také z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.56.012302.160838>
- [27] SHRIVASTAV, Anupama, Hae-Yeong KIM a Young-Rok KIM. Advances in the Applications of Polyhydroxyalkanoate Nanoparticles for Novel Drug Delivery System. *BioMed Research International*. 2013, **2013**, 1-12. DOI: 10.1155/2013/581684. ISSN 2314-6133. Dostupné také z: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/581684/>
- [28] AKARAONYE, Everest, Tajalli KESHAVARZ a Ipsita ROY. Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2010, **85**(6), 732-743. DOI: 10.1002/jctb.2392. ISSN 02682575. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.2392>
- [29] Madison, L.L., & Huisman, G.W. (1999). Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and molecular biology reviews* : 1999, **63**(1), 21-53 .
- [30] YU, Jian. Microbial Production of Bioplastics from Renewable Resources. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*. Elsevier, 2007, 2007, , 585-610. DOI: 10.1016/B978-044452114-9/50024-4. ISBN 9780444521149. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444521149500244>
- [31] GRUBER, Steffen, Helmut SCHWAB a Petra HEIDINGER. CbbR and RegA regulate cbb operon transcription in *Ralstonia eutropha* H16. *Journal of Biotechnology*. 2017, **257**, 78-86. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2017.07.005. ISSN 01681656. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165617315171>
- [32] ABOULNAGA, Elhussiny A., Huibin ZOU, Thorsten SELMER a Mo XIAN. Development of a plasmid-based, tunable, tolC -derived expression system for application in *Cupriavidus necator* H16. *Journal of Biotechnology*. 2018, **274**, 15-27. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2018.03.007. ISSN 01681656. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165618300804>
- [33] EcoBioMaterial.com [online]. c2015 [cit. 2018-11-01]. Physiology of PHA Metabolism. Dostupné z: <http://www.ecobiomaterial.com/who-i-am/physiology-of-pha-metabolism/>
- [34] RABERG, Matthias, Birgit VOIGT, Michael HECKER, Alexander STEINBÜCHEL a Marie-Joelle VIROLLE. A Closer Look on the Polyhydroxybutyrate- (PHB-) Negative Phenotype of *Ralstonia eutropha* PHB-4. *PLoS ONE*. 2014, **9**(5). DOI: 10.1371/journal.pone.0095907. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0095907>

- [35] ZHU, Chengjun, Christopher T. NOMURA, Joseph A. PERROTTA, Arthur J. STIPANOVIC a James P. NAKAS. Production and characterization of poly-3-hydroxybutyrate from biodiesel-glycerol by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759. *Biotechnology Progress*. 2009, **26**(2), 424-430. DOI: 10.1002/btpr.355. ISSN 87567938. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/btpr.355>
- [36] Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev*. 1996;**60**(3):539-74.
- [37] PAN, Wenyang, Joseph A. PERROTTA, Arthur J. STIPANOVIC, Christopher T. NOMURA a James P. NAKAS. Production of polyhydroxyalkanoates by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759 using a detoxified sugar maple hemicellulosic hydrolysate. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2012, **39**(3), 459-469. DOI: 10.1007/s10295-011-1040-6. ISSN 1367-5435. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-011-1040-6>
- [38] PAN, Wenyang, Christopher T. NOMURA a James P. NAKAS. Estimation of inhibitory effects of hemicellulosic wood hydrolysate inhibitors on PHA production by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759 using response surface methodology. *Bioresource Technology*. 2012, **125**, 275-282. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.08.107. ISSN 09608524. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852412013028>
- [39] NASCIMENTO, Valkirea Matos, Luiziana Ferreira SILVA, José Gregório Cabrera GOMEZ a Gustavo Graciano FONSECA. Growth of *Burkholderia sacchari* LFM 101 cultivated in glucose, sucrose and glycerol at different temperatures. *Scientia Agricola*. 2016, 1883-, **73**(5), 429-433. DOI: 10.1590/0103-9016-2015-0196. ISSN 0103-9016.
- [40] GUAMÁN, Linda P., Carlos BARBA-OSTRIA, Fuzhong ZHANG, Edmar R. OLIVEIRA-FILHO, José Gregório C. GOMEZ a Luiziana F. SILVA. Engineering xylose metabolism for production of polyhydroxybutyrate in the non-model bacterium *Burkholderia sacchari*. *Microbial Cell Factories*. 2018, **17**(1), 1-11. DOI: 10.1186/s12934-018-0924-9. ISSN 1475-2859. Dostupné také z: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-018-0924-9>
- [41] MENDONÇA, T.T., J.G.C. GOMEZ, E. BUFFONI, R.J. SÁNCHEZ RODRIGUEZ, J. SCHRIPEMA a M.S.G. LOPES. Exploring the potential of *Burkholderia sacchari* to produce polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*. 2014, (4), 815-829. DOI: 10.1111/jam.12406. ISSN 13645072. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jam.12406>
- [42] KUCERA, Dan, Iva PERNICOVÁ, Adriana KOVALCIK, et al. Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*. *Bioresource Technology*. 2018, **256**, 552-556. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.02.062. ISSN 09608524. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852418302554>
- [43] QUESADA, E., A. VENTOSA, F. RUIZ-BERRAQUERO a A. RAMOS-CORMENZANA. *Deleya halophila*, a New Species of Moderately Halophilic Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1984, **34**(3), 287-292. DOI: 10.1099/00207713-34-3-287. ISSN 0020-7713. Dostupné také z: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-34-3-287>
- [44] KOVALCIK, Adriana, Dan KUCERA, Petra MATOUSKOVA, Iva PERNICOVA, Stanislav OBRUCA, Michal KALINA, Vojtěch ENEV a Ivana MAROVA. Influence of removal of microbial inhibitors on PHA production from spent coffee grounds employing *Halomonas halophila*. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2018, **6**(2), 3495-3501. DOI: 10.1016/j.jece.2018.05.028. ISSN 22133437. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213343718302744>

- [45] CHEN, Guo-Qiang. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society Reviews*. 2009, **38**(8), 2434-2446. DOI: 10.1039/b812677c. ISSN 0306-0012. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b812677c>
- [46] BRAUCHLE, Eva a Katja SCHENKE-LAYLAND. Raman spectroscopy in biomedicine - non-invasive in vitro analysis of cells and extracellular matrix components in tissues. *Biotechnology Journal*. 2013, **8**(3), 288-297. DOI: 10.1002/biot.201200163. ISSN 18606768. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/biot.201200163>
- [47] DE BEER, T., A. BURGGRAEVE, M. FONTEYNE, L. SAERENS, J.P. REMON a C. VERVAET. Near infrared and Raman spectroscopy for the in-process monitoring of pharmaceutical production processes. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011, **417**(1-2), 32-47. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.12.012. ISSN 03785173. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517310009324>
- [48] C.V. Raman. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2018 [cit. 2018-11-30]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/C._V._Raman
- [49] BUMBRAH, Gurvinder Singh a Rakesh Mohan SHARMA. Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*. 2016, **6**(3), 209-215. DOI: 10.1016/j.ejfs.2015.06.001. ISBN 10.1016/j.ejfs.2015.06.001. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2090536X15000477>
- [50] PAUDEL, Amrit, Dhara RAIJADA a Jukka RANTANEN. Raman spectroscopy in pharmaceutical product design. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2015, **89**, 3-20. DOI: 10.1016/j.addr.2015.04.003. ISBN 10.1016/j.addr.2015.04.003. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X15000599>
- [51] EMBER, Katherine J. I., Marieke A. HOEVE, Sarah L. MCAUGHTRIE, et al. Raman spectroscopy and regenerative medicine: a review. *Npj Regenerative Medicine*. 2017, **2**(1). DOI: 10.1038/s41536-017-0014-3. ISSN 2057-3995. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/s41536-017-0014-3>
- [52] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody: učebnice základů instrumentálních analytických metod*. 1. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 1996. 203 s. ISBN 80-902155-0-5.
- [53] LI-CHAN, E.C.Y. The applications of Raman spectroscopy in food science. *Trends in Food Science & Technology*. 1996, **7**(11), 361-370. DOI: 10.1016/S0924-2244(96)10037-6. ISBN 10.1016/S0924-2244(96)10037-6. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224496100376>
- [54] PENCE, Isaac a Anita MAHADEVAN-JANSEN. Clinical instrumentation and applications of Raman spectroscopy. *Chemical Society Reviews*. 2016, **7**, 1958-1979. DOI: 10.1039/c5cs00581g. ISBN 10.1039/C5CS00581G. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5CS00581G>
- [55] SMITH, Rachael, Karen L. WRIGHT a Lorna ASHTON. Raman spectroscopy: an evolving technique for live cell studies. *The Royal Society of Chemistry*. 2016, **141**, 3590-3600. DOI: 10.1039/C6AN00152A. ISBN 10.1039/C6AN00152A. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6AN00152A>

- [56] SAMEK, O., P. ZEMÁNEK, A. JONÁŠ a H.H. TELLE. Characterization of oil-producing microalgae using Raman spectroscopy. *Laser Physics Letters*. 2011, **8**(10), 701-709. DOI: 10.1002/lapl.201110060. ISBN 10.1002/lapl.201110060. Dostupné také z: <http://stacks.iop.org/1612-202X/8/701>
- [57] LI, Mengqiu, Jian XU, Maria ROMERO-GONZALEZ, Steve A BANWART a Wei E HUANG. Single cell Raman spectroscopy for cell sorting and imaging. *Current Opinion in Biotechnology*. 2012, **23**(1), 53-63. DOI: 10.1016/j.copbio.2011.11.019. ISBN 10.1016/j.copbio.2011.11.019. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166911007300>
- [58] DE GELDER, Joke, Diana WILLEMSE-ERIX, Maarten J. SCHOLTES, et al. Monitoring Poly(3-hydroxybutyrate) Production in *Cupriavidus necator* DSM 428 (H16) with Raman Spectroscopy. *Analytical Chemistry*. 2008, **80**(6), 2155-2160. DOI: 10.1021/ac702185d. ISBN 10.1021/ac702185d. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac702185d>
- [59] AI, Min, Jun-Xian LIU, Shu-Shi HUANG, Gui-Wen WANG, Xiu-Li CHEN, Zhi-Cheng CHEN a Hui-Lu YAO. Application and Progress of Raman Tweezers in Single Cells. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. 2009, **37**(5), 758-763. DOI: 10.1016/S1872-2040(08)60105-X. ISSN 18722040. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S187220400860105X>
- [60] The Nobel Prize in Physics 2018. In: *The Nobel Prize* [online]. Nobel Media, 2018 [cit. 2018-11-30]. Dostupné z: <https://www.nobelprize.org/prizes/physics/2018/summary/>
- [61] XIE, C., J. MACE, M. A. DINNO, Y. Q. LI, W. TANG, R. J. NEWTON a P. J. GEMPERLINE. Identification of Single Bacterial Cells in Aqueous Solution Using Confocal Laser Tweezers Raman Spectroscopy. *Analytical Chemistry*. 2005, **77**(14), 4390-4397. DOI: 10.1021/ac0504971. ISSN 0003-2700. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac0504971>
- [62] *LASER 53: sborník příspěvků mezioborové konference*. Praha: Ústav přístrojové techniky AV ČR, 2013. ISBN 978-80-87441-10-7.
- [63] RASMUSSEN, M. B., L. B. ODDERSHEDE a H. SIEGUMFELDT. Optical Tweezers Cause Physiological Damage to *Escherichia coli* and *Listeria* Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008, **74**(8), 2441-2446. DOI: 10.1128/AEM.02265-07. ISSN 0099-2240. Dostupné také z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.02265-07>
- [64] Optické mikromanipulační techniky. In: *ÚPT AV ČR* [online]. Brno [cit. 2018-11-30]. Dostupné z: <https://info.isibrno.cz/omi/index.html>
- [65] SNOOK, Richard D., Timothy J. HARVEY, Elsa CORREIA FARIA a Peter GARDNER. Raman tweezers and their application to the study of singly trapped eukaryotic cells. *Integr. Biol* [online]. 2009, **1**(1), 43-52 [cit. 2018-11-30]. DOI: 10.1039/B815253E. ISSN 1757-9694. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=B815253E>
- [66] HUANG, Wei E., Andrew D. WARD a Andrew S. WHITELEY. Raman tweezers sorting of single microbial cells. *Environmental Microbiology Reports*. 2009, **1**(1), 44-49. DOI: 10.1111/j.1758-2229.2008.00002.x. ISSN 17582229. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1758-2229.2008.00002.x>
- [67] ZHANG, H. a K.-K. LIU. Optical tweezers for single cells. *Journal of The Royal Society Interface* [online]. 2008, **5**(24), 671-690 [cit. 2018-11-30]. DOI: 10.1098/rsif.2008.0052. ISSN 1742-5689. Dostupné z: <http://rsif.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rsif.2008.0052>

- [68] FT-Ramanův modul. In: *Nicolet CZ* [online]. [cit. 2019-03-15]. Dostupné z: <http://www.nicoletcz.cz/ft-ramanuv-modul>
- [69] SAMEK, Ota, Alexandr JONÁŠ, Zdeněk PILÁT, Pavel ZEMÁNEK, Ladislav NEDBAL, Jan TRÍSKA, Petr KOTAS a Martin TRTÍLEK. Raman Microspectroscopy of Individual Algal Cells: Sensing Unsaturation of Storage Lipids in vivo. *Sensors*. 2010, **10**(9), 8635–8651. DOI: 10.3390/s100908635. ISSN 1424-8220. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1424-8220/10/9/8635>
- [70] HARZ, M., P. RÖSCH, K.-D. PESCHKE, O. RONNEBERGER, H. BURKHARDT a J. POPP. Micro-Raman spectroscopic identification of bacterial cells of the genus *Staphylococcus* and dependence on their cultivation conditions. *The Analyst*. 2005, **130**(11), 1543–1550. DOI: 10.1039/b507715j. ISSN 0003-2654. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b507715j>
- [71] SAMEK, Ota, Stanislav OBRUČA, Martin ŠILER, et al. Quantitative Raman Spectroscopy Analysis of Polyhydroxyalkanoates Produced by *Cupriavidus necator* H16. *Sensors*. 2016, **16**(11), 1–7. DOI: 10.3390/s16111808. ISSN 1424-8220. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1424-8220/16/11/1808>
- [72] TAN, Yingyun, Bing YAN, Lili XUE, Yi LI, Xianyang LUO a Ping JI. Surface-enhanced Raman spectroscopy of blood serum based on gold nanoparticles for the diagnosis of the oral squamous cell carcinoma. *Lipids in Health and Disease*. 2017, **16**(1), 1–9. DOI: 10.1186/s12944-017-0465-y. ISSN 1476-511X. Dostupné také z: <https://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12944-017-0465-y>
- [73] FANG, Hui, Hong Jun YIN, Ming Yang LV, Hai Jun XU, Yong Mei ZHAO, Xin ZHANG a Zheng Long WU. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015, **69**. DOI: 10.1016/j.bios.2015.02.023. ISSN 09565663. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566315001141>
- [74] CHENG, Wen-Ting a Ming-Tzen LIU. Micro-Raman Spectroscopy Used to Identify and Grade Human Skin Pilomatrixoma. *Microscopy Research and Technique*. 2005, **68**(2), 75–79. DOI: 10.1002/jemt.20229. ISSN 1059-910X. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jemt.20229>
- [75] CHAN, James W., Douglas S. TAYLOR, Theodore ZWERDLING a Stephen M. LANE. Micro-Raman Spectroscopy Detects Individual Neoplastic and Normal Hematopoietic Cells. *Biophysical Journal*. 2006, **90**(2), 648–656. DOI: 10.1529/biophysj.105.066761. ISSN 00063495. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349506722433>
- [76] MOVASAGHI, Zanyar, Shazza REHMAN a Ihtesham U. REHMAN. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2007, **42**(5), 493–541. DOI: 10.1080/05704920701551530. ISSN 0570-4928. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/05704920701551530>
- [77] ESPAGNON, Isabelle, Denis OSTROVSKII, Raphaël MATHEY, et al. Direct identification of clinically relevant bacterial and yeast microcolonies and macrocolonies on solid culture media by Raman spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*. 2014, **19**(2), 1–13. DOI: 10.1117/1.JBO.19.2.027004. ISSN 1083-3668. Dostupné také z: <http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/article.aspx?doi=10.1117/1.JBO.19.2.027004>

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

PHA	polyhydroxyalkanoáty
HA	hydroxykyselina
3HB	3-hydroxybutyrát
4HB	4-hydroxybutyrát
P(3HB)	poly(3-hydroxybutyrát)
3HV	3-hydroxyvalerát
4HV	4-hydroxyvalerát
5HV	5-hydroxyvalerát
P(3HB- <i>co</i> -3HV)	poly(3-hydroxybutyrát- <i>co</i> -3-hydroxyvalerát)
4HHx	4-hydroxyhexanoát
5HHx	5-hydroxyhexanoát
PP	polypropylen
PET	polyethyltereftalát
PS	polystyren
scl	short-chain-length
mcl	medium-chain-length
SCP	single-cell protein
TCA	Krebsův cyklus
AFM	mikroskop pro atomovou sílu
STM	skenovací tunelový mikroskop
NB	Nutrient Broth médium
CNM	komplexní živné médium
ISTD	interního standardu
FT-IR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací