



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# BIOTECHNOLOGICKÁ PRODUKCE POLY(3-HYDROXYBUTYRATU-CO-4-HYDROXYBUTYRATU) [P(3HB-CO-4HB)]

MICROBIAL SYNTHESIS OF POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-CO-4-HYDROXYBUTYRATE) [P(3HB-CO-4HB)]

### DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Hana Dugová

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.

BRNO 2020

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1426/2019 Akademický rok: 2019/20  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Bc. Hana Dugová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Biotechnologická produkce poly(3-hydroxybutyratu-co-4-hydroxybutyratu) [P(3HB-co-4HB)]

### Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše na zadané téma.
2. Studium produkce PHA pomocí *Cupriavidus malaysiensis* a *Comamonas acidovorans*.
3. Základní charakterizace připravených kopolymerů.
4. Vyhodnocení výsledků, jejich diskuze a závěr práce.

### Termín odevzdání diplomové práce: 31.7.2020:

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

-----  
Bc. Hana Dugová  
student(ka)

-----  
doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## ABSTRAKT

Táto diplomová práca je zameraná na produkciu poly(3-hydroxybutyrátu-co-4-hydroxybutyrátu) [P(3HB-co-4HB)], pomocou bakteriálneho druhu *Cupriavidus malaysiensis* (DSM 19379), *Delftia acidovorans* (CCM 2410, CCM 283, DSM 39) a *Azohydromonas lata* (CCM 4448). Cieľom práce bolo štúdium produkcie PHA, jeho následná izolácia a základná charakterizácia kopolyméru. Teoretická časť sa zaoberá základným popisom polyhydroxyalkanoátov a ich zaradením do biopolymérov. Ďalej boli popísané najpreskúmanejšie PHA, ich biosyntéza a najznámejší bakteriálny producenti. Praktická časť sa následne venuje samotnej kultivácii piatich bakteriálnych kmeňov, z čoho u štyroch z nich bolo potrebné správne nastaviť kultivačný postup a docieľiť produkciu správneho polyméru. Ako prekursor pre syntézu jednotky 4-hydroxybutyrát boli použité dva uhlíkové substráty, butan-1,4-diol a  $\gamma$ -butyrolaktón. Po kultivácií bola biomasa charakterizovaná spektrofotometricky, gravimetricky a pomocou plynovej chromatografie. Z každého bakteriálneho kmeňa bol pomocou prečistenia v etanole a rozpustenia v chloroforme izolovaný polymér. Takto izolované polyméry boli charakterizované pomocou diferenciálnej skenovacej kalorimetrie, termogravimetrickej analýzy, veľkostne vylučovacej chromatografie a infračervenej spektrometrie.

## ABSTRACT

This diploma thesis studied the ability of *Cupriavidus malaysiensis*, *Delftia acidovorans* and *Azohydromonas lata* to produce poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate), [P(3HB-co-4HB)], by using  $\gamma$ -butyrolactone and 1,4-butanediol as carbon substrates. The objective of this work was the production and characterisation of isolated polyhydroxyalkanoates (PHA). The theoretical part deals with the basic description and classification of polyhydroxyalkanoates. Next, the biosyntheses of the most investigated PHAs were described. The practical section of the work discusses and presents the output of the cultivation of five bacterial strains selected for the production of [P(3HB-co-4HB)], namely, *Cupriavidus malaysiensis* (DSM 19379), *Delftia acidovorans* (DSM 39), *Delftia acidovorans* (CCM 2410), *Delftia acidovorans* (CCM 283) and *Azohydromonas lata* (CCM 4448).

The effect of the modified cultivation conditions for each of the used bacteria on the PHA production yields was discussed. The produced biomass after the cultivation was characterised spectrophotometrically, gravimetrically and by gas chromatography. Polymers were isolated from the biomass by the extraction in chloroform. The isolated polymers were characterised from the viewpoint of chemical composition, molecular weight and thermal properties by using Attenuated total reflection infrared spectroscopy, Size exclusion chromatography, Differential scanning calorimetry and Thermogravimetric analysis.

## KLÚČOVÉ SLOVÁ

*Cupriavidus malaysiensis*, *Delftia acidovorans*, poly(3hydroxybutyrát-co-4hydroxybutyrát),  $\gamma$ -butyrolaktón, butan-1,4-diol

## KEY WORDS

*Cupriavidus malaysiensis*, *Delftia acidovorans*, poly(3hydroxybutyrate-co-4hydroxybutyrate),  $\gamma$ -butyrolactone, 1,4-butanediol

DUGOVÁ, Hana. *Biotechnologická produkce poly(3-hydroxybutyrátu-co-4-hydroxybutyrátu) [P(3HB-co-4HB)]* [online]. Brno, 2020 [cit. 2020-07-29]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123781>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Adriána Kovalčík.

## PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne, a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....  
podpis študenta

## POĎAKOVANIE

Rada by som poďakovala vedúcej mojej diplomovej práce doc. Ing. Adriáne Kovalčík Ph.D. za odborné vedenie, trpezlivosť a veľmi cenné rady pri spracovaní praktickej i teoretickej časti diplomovej práce.

Ďalej by som chcela poďakovať Ing. Ive Pernicovej za veľkú pomoc pri práci v laboratóriu, Ing. Zdenkovi Špitálskemu Ph.D. z Ústavu polymérov SAV Bratislava za pomoc pri spracovaní polymérov v tavenine a tiež všetkým, ktorí sa podieľali na analýzach a spracovaní vzoriek v experimentálnej časti mojej diplomovej práce.

Práca bola financovaná prostredníctvom projektu ORION. Program ORION získal finančné prostriedky z výskumného a inovačného programu Európskej únie Horizont 2020 na základe dohody o grante č. 741527. Ďalej bola práca podporená projektom SoMoPro (projekt č. 6SA18032). Projekt získal finančné prostriedky z programu pre výskum a inovácie Horizont 2020 Európska únia v rámci akcií Marei Sklodowska-Curie a je spolufinancovaný Jihomoravským krajom podľa grantovej dohody č. 665860. Poznámka: Tento materiál odráža iba postoje autora a EÚ nie je zodpovedná za akékoľvek použitie prezentovaných informácií.



Jihomoravský kraj



jcmm

SO-MO-PRO-

# OBSAH

1	Úvod.....	8
2	Teoretická časť .....	9
2.1	Biopolyméry .....	9
2.1.1	Biopolyméry z obnoviteľných zdrojov, biodegradovateľné .....	10
2.1.2	Biopolyméry z obnoviteľných zdrojov, nebiodegradovateľné.....	10
2.1.3	Biopolyméry z fosílnych palív, biodegradovateľné .....	10
2.2	Polyhydroxyalkanoáty .....	10
2.2.1	Fyzikálne vlastnosti PHA .....	12
2.2.2	Biodegradácia polyhydroxyalkanoátov .....	12
2.2.3	Biomedicínske využitie PHA .....	13
2.2.4	Využitie PHA v poľnohospodárstve .....	14
2.3	Doteraz najpreskúmanejšie polyhydroxyalkanoáty .....	14
2.3.1	Poly(3-hydroxybutyrát) .....	14
2.3.2	Poly(4-hydroxybutyrát) .....	15
2.3.3	Poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) .....	15
2.3.4	Poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát) .....	15
2.4	Mikrobiálni producenti P(3-HB-co-4-HB) .....	16
2.4.1	<i>Cupriavidus malaysiensis</i> sp. ....	16
2.4.2	<i>Delftia acidovorans</i> .....	16
2.4.3	<i>Cupriavidus necator</i> .....	17
2.4.4	Rekombinantná <i>Escherichia coli</i> .....	17
2.4.5	<i>Azohydromonas lata</i> .....	19
2.5	Biosyntéza polyhydroxyalkanoátov mikroorganizmami .....	19
2.5.1	Biosyntéza P(3HB-co-4HB).....	20
2.5.2	Enzým PHA syntáza.....	21
2.5.3	Tvorba granúl .....	22
2.6	Ciele a motivácia práce.....	23
3	Praktická časť .....	24
3.1	Použité mikroorganizmy, chemikálie a prístroje .....	24
3.1.1	Použité mikroorganizmy .....	24
3.1.2	Chemikálie .....	24
3.1.3	Prístroje .....	24

3.2	Kultivácia mikroorganizmov .....	25
3.2.1	Oživenie bakteriálnych kultúr a ich uchovávanie .....	25
3.2.1.1	Príprava kryoskúmaviiek .....	25
3.2.2	Príprava inokula .....	26
3.2.3	Príprava minerálneho média vhodného pre produkciu P(3-HB-co-4-HB) .....	27
3.2.4	Kultivácia bakteriálneho kmeňa v bioreaktore.....	29
3.2.5	Optimalizácia produkcie polyméru kmeňom <i>Delftia acidovorans</i> CCM 2410 pomocou analýzy vplyvu koncentrácie kyslíka .....	30
3.2.6	Optimalizácia produkcie polyméru kmeňom <i>Delftia acidovorans</i> CCM 2410 pomocou analýzy vplyvu koncentrácie inokula.....	30
3.3	Základná charakterizácia biomasy a izolácia PHA .....	31
3.3.1	Stanovenie biomasy gravimetrickou metódou .....	31
3.3.2	Stanovenie obsahu polyméru v biomase pomocou plynovej chromatografie....	31
3.3.3	Stanovenie optickej hustoty bakteriálnych kultúr .....	31
3.3.4	Izolácia vyprodukovaného P(3-HB-co-4-HB) .....	31
3.4	Základná charakterizácia pripravených PHA .....	32
3.4.1	Veľkostne vylučovacia chromatografia s detektorom statického rozptylu svetla vo viacerých uhloch ( SEC- MALS).....	32
3.4.2	Diferenciálna skenovacia kalorimetria (DSC) .....	32
3.4.3	Termogravimetrická analýza (TGA).....	32
3.4.4	Infračervená spektrometria (FT-IR) .....	33
3.4.5	Spracovanie vyprodukovaného P(3-HB-co-4-HB) do podoby filamentu.....	33
3.4.6	Mechanické ťahové skúšky polyméru.....	33
4	Výsledky a diskusia .....	34
4.1	Výber vhodného kultivačného média pre jednotlivé bakteriálne kmene .....	34
4.2	Kultivácia bakteriálneho kmeňa <i>Cupriavidus malaysiensis</i> DSM 19379 .....	36
4.2.1	Vplyv koncentrácie inokula na produkciu polyméru pri použití dvoch rôznych zdrojov uhlíka .....	38
4.2.2	Kultivácia v bioreaktore .....	40
4.2.3	Výsledky z DSC, TGA analýzy .....	43
4.3	Kultivácia bakteriálneho kmeňa CCM 4448 .....	45
4.4	Kultivácia bakteriálneho kmeňa <i>Delftia acidovorans</i> CCM 2410 .....	47
4.4.1	Analýza vplyvu koncentrácie inokula .....	47
4.4.2	Analýza vplyvu koncentrácie kyslíka .....	49

4.5	Kultivácia bakteriálneho kmeňa <i>Delftia acidovorans</i> CCM 283 a DSM 39.....	50
4.6	Porovnanie mechanických vlastností izolovaných polymérov.....	53
4.6.1	Výsledky z DSC a TGA analýzy.....	54
4.6.2	Výsledky z FTIR analýzy.....	55
5	Záver.....	57
	Zoznam použitých zdrojov.....	59
	Zoznam použitých skratiek a symbolov.....	65

# 1 ÚVOD

Táto práca sa sústredila na biosyntézu polymérov, pomocou piatich bakteriálnych kmeňov za účelom produkcie kopolyméru poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát). Téma bola vybraná na základe skutočnosti, že biodegradabilita polyméru je veľmi dôležitý faktor pre výrobu nových polymérnych materiálov, pretože znečistenie životného prostredia plastovými predmetmi a obalmi predstavuje v poslednej dobe výrazný ekologický problém. Preto sa široká škála vedeckých tímov zaoberá produkciou vhodných náhrad za polyméry pochádzajúce z petrochemického priemyslu. Jednou z potencionálnych náhrad syntetických polymérov sú aj polyhydroxyalkanoáty (PHA), jedná sa o polyestery syntetizované ako zásobná látka baktérií. Produkcia PHA v mikroorganizmoch je odozva na zvýšenie množstva uhlíkového substrátu alebo na limitáciu esenciálnych živín v produkčnom médiu. Granule PHA sa ukladajú v cytoplazme ako prípadný zdroj živín na prežitie v stresových podmienkach. Výhodou tohto materiálu je jeho schopnosť rozložiť sa v prírodnom prostredí za vhodných podmienok už v rádoch niekoľkých mesiacov až na oxid uhličitý a vodu. Avšak aj PHA majú hneď niekoľko negatívnych vlastností ako je vysoká cena produkcie a izolácie, vysoké nároky na sterilitu práce, nízka výťažnosť a negatívum taktiež predstavuje nízka termálna stabilita PHA.

Najviac preskúmaným a najpoužívanejším polyhydroxyalkanoátom je poly(3-hydroxybutyrát) (P3HB), ktorý bol prvýkrát izolovaný z bakteriálnej biomasy už v roku 1926 z bakteriálneho kmeňa *Bacillus megaterium*. V posledných rokoch sa na priemyselnú produkciu najviac využívajú rekombinantné bakteriálne kmene, poprípade *Cupriavidus necator*, ktorý dokáže vyplniť až 90 % svojej suchej hmotnosti práve polymérom P3HB. Tento polymér sa svojimi vlastnosťami významne podobá polypropylénu, ktorý je často využívaný na výrobu jednorazového riadu, obalov a ďalších produktov. Nevýhodou P3HB je jeho tuhosť, krehkosť, vysoká kryštalinita a malé rozpätie medzi teplotou topenia a teplotou degradácie a z toho dôvodu má obmedzené termické spracovanie.

Pre zlepšenie jeho vlastností sa k tomuto monoméru cielene pridávajú iné monomérne jednotky za vzniku kopolymérov. Táto diplomová práca sa venuje produkcii kopolyméru, ktorý okrem monomérskej jednotky 3-hydroxybutyrátu (3HB) obsahuje aj monomérsnu jednotku 4-hydroxybutyrát (4HB) a má pre termické spracovanie lepšiu stabilitu. Na rozdiel od čistého P3HB je P(3HB-co-4HB) kopolymér viac elastický a plastický, má nižšiu kryštalinitu a vyššiu teplotu topenia. Vďaka týmto vlastnostiam sa termické spracovanie stáva jednoduchším. Produkcia kopolyméru vybraného pre túto diplomovú prácu je vo viacerých ohľadoch náročnejšia ako produkcia P3HB. V prvom rade je oveľa menší počet vhodných mikroorganizmov, ktoré sú schopné ho syntetizovať, ďalej je potrebný viac špecifický zdroj uhlíka, poprípade geneticky modifikovaný mikroorganizmus.

Časť práce úzko súvisela s projektom ORION, ten sa venoval produkcii ale aj ďalšiemu spracovaniu pripraveného kopolyméru. Na túto prácu bol vybraný bakteriálny kmeň *Cupriavidus malaysiensis* DSM19378, ktorý mal najvyššie výťažnosti polyméru. Projekt mal názov „3D models with BIO origin“. Ďalej sa diplomová práca zaoberala výberom vhodného mikroorganizmu a charakterizáciou vyprodukovaných a vyizolovaných kopolymérov. Výsledkom práce je vyhodnotenie najvhodnejšieho kmeňa z hľadiska produkcie P(3HB-co-4HB).



## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

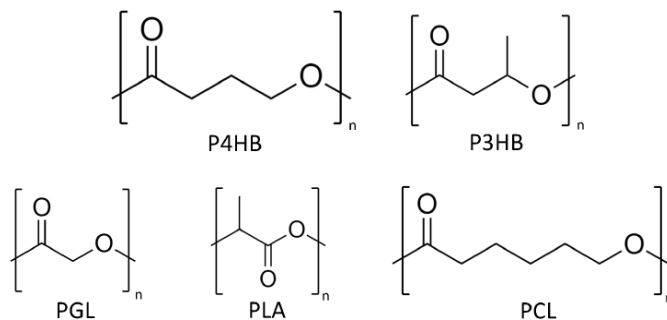
### 2.1 Biopolyméry

V súčasnej dobe, kedy je planéta stále viac a viac znečistená odpadom z ropného priemyslu, sa hľadajú alternatívy pre mnohé výrobky dennej spotreby. Medzi problematické materiály sa zaraďujú aj synteticky vyrábané polyméry a preto spoločnosť postupne tlačí na vyvíjanie nových, prírodnejších a biologicky rozložiteľných polymérov. Názov biopolyméry však zahŕňa niekoľko ďalších pojmov, ktoré je potrebné presnejšie definovať, pretože spotrebiteľ často siaha po BIO výrobku v snahe robiť niečo prospešné bez bližších informácií ako sa tieto materiály vyrábajú, alebo aký majú dopad na životné prostredie pri rozklade. [1] Biopolyméry ako také, sú vyrábané z obnoviteľných zdrojov hlavne vo forme sacharidov a proteínových substancií ako je kukuričný škrob, cukor, drewná buničina alebo sójový proteín. Takto vyrobené polyméry sa definujú tiež ako biodegradabilné čiže biologicky rozložiteľné. [2] Podľa európskej normy môže byť biodegradabilný polymér vyrobený biologickou i petrochemickou cestou, podmienkou je schopnosť rozpadat' sa na menšie častice v konkrétnom časovom období a pri určitých podmienkach prostredia. Ďalším takýmto pojmom je kompostovateľný materiál, ten už má prísnejšie kritériá rozkladu. V praxi to znamená, že najmenej 90 % polyméru sa rozloží za menej ako 6 mesiacov až na oxid uhličitý a vodu pôsobením mikroorganizmov ako sú plesne a baktérie.

Pri priemyselnom kompostovaní je nutné pre každý typ polyméru vykonať niekoľko testov. Ako prvý sa sleduje rozpad v konečnom komposte, kedy je skúšobný materiál kompostovaný s biologickým odpadom po dobu 3 mesiacov a po uplynutí časového úseku musí byť hmotnosť zbytkov skúšobného materiálu menej ako 10 % pôvodnej hmotnosti. Žiadne zložky polyméru nemôžu mať negatívny vplyv na kompostovanie a množstvo ťažkých kovov v polyméry musí dodržiavať stanovené limity. Taktiež je nutné aby menej ako 10 % častíc dosahovalo veľkosť väčšiu ako 2 mm. [3]

Druhý dôležitý pojem je biobased = polymér na biologickom základe. Do tejto skupiny patria polyméry, ktoré sú vyrobené z časti alebo úplne z obnoviteľných zdrojov. Finálny produkt sa z chemického hľadiska môže zhodovať s polymérmí z petrochemického priemyslu avšak ako vstupná surovina je použitá obnoviteľná biologická zložka ako je kukurica, cukor, škrob a i..

Tento popis ukazuje, že biopolyméry (alebo bioplasty) sa kategorizujú podľa dvoch kritérií, prvé je zdroj surového materiálu a druhé je biodegradabilita polyméru. [4]



Obrázok 1: Vybrané štruktúry biopolymérov [5]

### 2.1.1 Biopolyméry z obnoviteľných zdrojov, biodegradovateľné

Do tejto kategórie spadajú synteticky vyrobené polyméry, zobrazené na obrázku 1, z obnoviteľných zdrojov, ako je kyselina polymliečna (PLA), [1] hojne využívaný alifatický polyester derivovaný z kukuričného škrobu, koreňa a škrobu tapioky alebo cukrovej trstiny. [6] Produkcia je ako u štandardného termoplastu do vlákien alebo filmu a na syntézu sa najčastejšie využívajú tieto tri techniky:

- a) priama kondenzačná polymerizácia,
- b) azeotropická dehydratačná kondenzácia,
- c) polymerizácia cez tvorbu laktidu a polymerizácia s otvorením kruhu (ROP). [7]

Ďalej do kategórie biodegradovateľných biopolymérov z obnoviteľných zdrojov patria polyméry produkované mikroorganizmami ako sú polyhydroxyalkanoáty (PHA). Tieto polyestery vznikajú ako zásobná látka v cytoplazme mikroorganizmov pri nadmernej koncentracii uhlíkového zdroja, pri limitácii prísunu niektorého esenciálneho minerálu alebo vystavením mikroorganizmu oxidačnému stresu. [8] Posledný typ polymérov v tejto kategórii sú prirodzene sa vyskytujúce biopolyméry ako škrob a proteíny, ktoré sú rôznymi cestami prirodzene syntetizované v biosfére. [1]

### 2.1.2 Biopolyméry z obnoviteľných zdrojov, nebiodegradovateľné

Táto skupina zahŕňa syntetické polyméry z obnoviteľných zdrojov ako špecifické polyamidy z ricínového oleja, ďalej polyestery založené na biopropandiole, biopolyetyléne, biopolypropyléne, biopolyvinylchloride syntetizované z bioethanolu, ktorý sa vyrába napríklad z cukrovej trstiny. Zaradujú sa sem aj prirodzene sa vyskytujúce biopolyméry ako prírodný kaučuk a jantár.

### 2.1.3 Biopolyméry z fosílnych palív, biodegradovateľné

Biopolyméry vyrábané z fosílnych palív ktoré sú certifikované ako biodegradovateľné a kompostovateľné, to tejto kategórie patria syntetické alifatické polyestery z ropy alebo zemného plynu. Poly( $\epsilon$ -kapolaktón) (PCL) (Obrázok 1), poly(butylén sukcinát) (PBS) a časť alifatických aromatických kopolyesterov, ktoré sú aspoň čiastočne vyrobené z fosílnych palív ale môžu byť rozložené mikroorganizmami [1].

## 2.2 Polyhydroxyalkanoáty

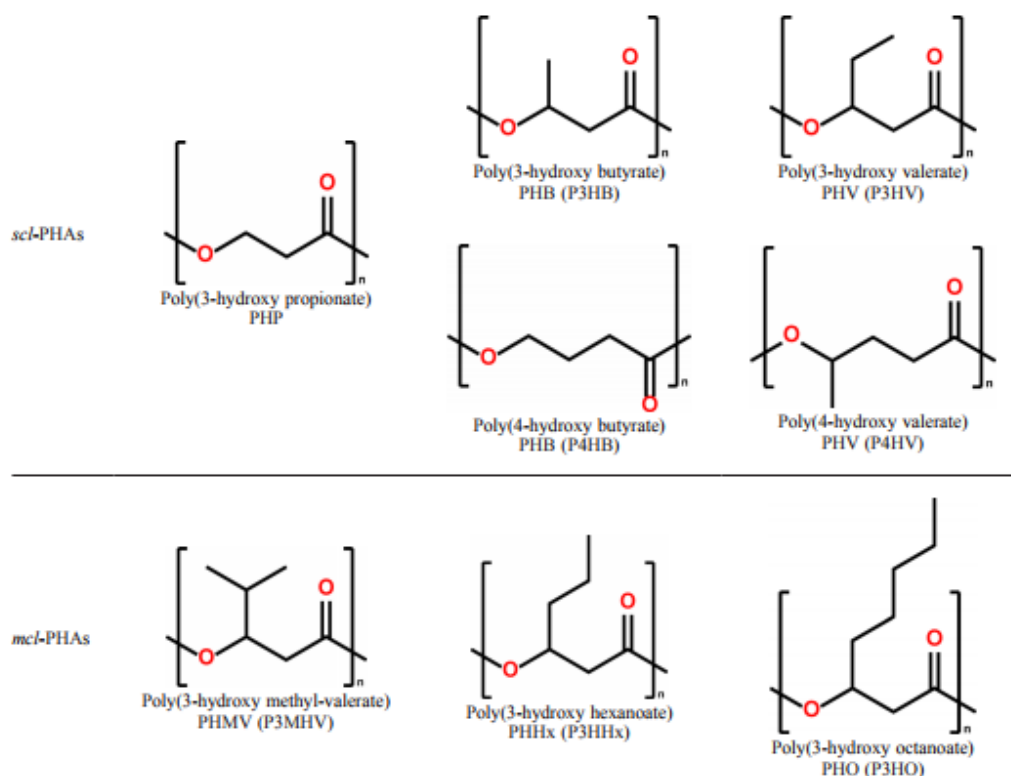
Polyhydroxyalkanoáty (PHA) sú polyestery kyseliny  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -hydroxyalkánovej, tiež známe ako 3-, 4-, 5-, 6- hydroxykyseliny alebo -hydroxykarboxylové kyseliny. Hydroxykyseliny sa rozlišujú hlavne podľa pozície hydroxylovej skupiny ku karboxylovej skupine, ale tiež podľa dĺžky bočného alkylového reťazca ako je to zobrazené na obrázku 2. Známych je viac ako 150 hydroxylových kyselín, ktoré boli detegované v bakteriálnych PHA. Tieto zložky sú produkované mikroorganizmami, ktoré sú kultivované na uhlíkovom substráte obsahujúcom rôzne typy chemických štruktúr ako zásobná látka nachádzajúca sa v cytoplazme vo forme granúl.

PHA monomér môže byť v rozsahu od 3 atómov uhlíka (3-hydroxypropionát) až po 14 atómov uhlíka (3-hydroxytetradekanoát). Vo všeobecnosti sú polyméry zložené z monomérov s krátkymi reťazcami krehké a s narastajúcou dĺžkou reťazcov sa materiál stáva viac

flexibilným, napríklad poly(3-hydroxyoktanoát) (P3HO) je elastomér. Podľa počtu atómov uhlíka sa PHA klasifikujú na PHA<sub>SCL</sub> s krátkym reťazcom (short chain lenght), ktoré majú 3-5 atómov uhlíka a sú semikryštalické a druhou skupinou sú PHA<sub>MCL</sub> so stredne dlhým reťazcom (medium chain lenght), ktoré majú 6-14 atómov uhlíka a sú to elastoméry s nízkou kryštalinitou a veľmi nízkou teplotou topenia v rozsahu 24-65 °C (Obrázok 2). [9]

PHA sú produkované niekoľkými bakteriálnymi kmeňmi, ktorým slúžia ako intracelulárna zásoba uhlíka a energie. Môžu zastupovať až 90 % suchej buncenej hmotnosti baktérií a nachádzajú sa v cytoplazme vo forme granúl. Prirodzene produkované sú pôdnymi baktériami a následne degradované tými istými baktériami v pôde, na komposte alebo v morskom sedimente. [10]

Biodegradácia čistého polyméru začína, keď baktérie rastú na povrchu PHA a začnú produkovať enzýmy, ktoré rozštiepia biopolymér na monomérmé jednotky kyseliny hydroxylovej. Kyselina hydroxylová je následne spotrebovaná baktériami v rastovej fáze a použitá ako uhlíkový substrát pre rast bunky.



Obrázok 2: Niekoľko základných polyhydroxyalkanoátov rozdelených podľa dĺžky reťazca monoméru [11]

Táto trieda polyesterov predstavuje potencionálnu alternatívu k polymérom vyrobeným z fosílnych palív, využitie našli ako obalové materiály, vrecia na odpadky ale ponúka sa aj možnosť využitia v biomedicínskych aplikáciách. Vďaka ich biokompatibilite je možné vyrábať z nich chirurgické stehy, obvazy na rany, lubrikačné prášky, cievky, tkaninové scaffoldy, chirurgické fixačné implantáty pri zlomenine kosti a iné. Vďaka ich kompozičnej rozmanitosti je možné produkovať PHA so širokou škálou fyzikálnych vlastností. V súčasnosti medzi komerčne vyrábané PHA patria poly(3hydroxybutyrát) (P3HB), poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) [P(3HB-co-3HV)], poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát) [P(3HB-co-4HB)] a poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyhexanoát) [P(3HB-co-HHx)]. [12]

### 2.2.1 Fyzikálne vlastnosti PHA

Polyhydroxyalkanoáty majú širokú škálu fyzikálnych vlastností podľa kompozície monomérov a dĺžky postranných reťazcov. Teplota topenia PHA je v rozmedzí 40 - 180 °C, teplota skelného prechodu je od -55 do -5 °C, kryštalinita polymérov sa uvádza od 0 % do 80 % pričom rýchlosť kryštalizácie sa dá regulovať a predĺženie pri pretrhnutí je približne od 5 % až po 500 %. Pri znižovaní molekulovej hmotnosti polyméru zostáva teplota skelného prechodu relatívne konštantná, avšak teplota topenia sa znižuje. Hustota polyméru sa uvádza okolo 1,18 – 1,26 g/cm<sup>3</sup> pre P3HB. [1]

Na rozdiel od iných biopolymérov, ktoré sú buď rozpustné vo vode alebo citlivé na vlhkosť, sú PHA nerozpustné vo vode a relatívne rezistentné voči hydrolytickej degradácii. Vykazujú tiež dobrú priepustnosť kyslíka a odolnosť voči pôsobeniu ultrafialového svetla. Nevýhoda je nízka stabilita pri vystavení kyselinám a zásadám, rozpustné sú v chloroforme a iných chlórovaných rozpúšťadlách. [6]

PHA ako sú P3HB a P(3HB-co-3HV) majú nevýhodu v tom, že sú vysoko termosenzitívne a preto je spracovanie problematické. Ich vysoká teplota topenia (okolo 180 - 190 °C) prispieva k tomu, že rozdiel medzi oblasťou topenia polyméru a začiatkom tepelnej degradácie (okolo 190- 200 °C) je veľmi úzky a komplikuje spracovanie v tavenine. U niektorých polymérov je dokonca možné, že teplota spracovania v tavenine je vyššia ako začiatok tepelnej degradácie čo spôsobuje, že PHA podliehajú termolýze, to znamená, že molekulová hmotnosť polyméru sa znižuje počas spracovania a tým sa menia výsledné mechanické vlastnosti výrobku. Možným riešením je veľmi presné kontrolovanie podmienok spracovania, vďaka čomu sa dá minimalizovať termická degradácia PHA počas jeho spracovania v tavenine. [1] Jednotlivé faktory, ktoré musia byť kontrolované, sú: teplota pri ktorej je vykonávané spracovanie v tavenine, čas kedy je polymér vystavený vysokej teplote, vlhkosť resp. dostatočné vysušenie polyméru pred spracovaním, šmykové namáhanie počas spracovania. Ďalšia metóda ako zvýšiť termostabilitu PHA je ich sieťovanie napríklad pomocou laktónov a laktámov, alebo sieťovanie s acetanhydridom. Nevýhodou polyhydroxyalkanoátov je ich nízka rýchlosť kryštalizácie a tendencia lepiť sa na kovy [13].

### 2.2.2 Biodegradácia polyhydroxyalkanoátov

Biodegradácia PHA *in vitro* môže prebiehať priamo pôde, v komposte alebo v morskom sedimente. Výhodou je, že PHA degradujú ako v aeróbnom tak aj anaeróbnom prostredí bez toho, aby vznikali nejaké toxické produkty. Degradáciu ovplyvňuje niekoľko základných faktorov ako je mikrobiálna aktivita, vlhkosť, teplota, pH prostredia, veľkosť exponovanej povrchovej plochy vzorky, molekulová hmotnosť polyméru (kopolyméru), chemické zloženie monomérov a kryštalinita vzorky. Mikroorganizmy, ktoré sú schopné degradovať PHA sa zaraďujú do rôznych taxónov ako sú gram-negatívne, gram-positívne baktérie a huby. Doteraz bolo zistených asi 39 účinných bakteriálnych druhov. Najväčšie zastúpenie majú mezofilné baktérie. Treba však podotknúť, že aj veľmi malá časť termofilných mikroorganizmov je schopná degradovať PHA a to pri teplote 50 °C, ako je *Bacillus* kmeň TT96. [14] Pri porovnaní PHA s inými biopolymérami je rýchlosť biodegradácie približne v tomto poradí PHA ≈ PCL > PBS > PLA. Rýchlosť sa taktiež odvíja od zastúpenia monomérových jednotiek v PHA.

Medzi prvé mikroorganizmy u ktorých bola preukázaná schopnosť degradácie PHA sú druhy *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, v súčasnosti sem patria mikroorganizmy z pôdy (*Pseudomonas lemoigne*, *Comamonas sp.*, *Acidovorans feacalis*, *Aspergillus fumigates*, *Variovorax paradoxus*) z aktivovaných kalov (*Alcaligenes feacalis*, *Pseudomonas*, *Illyobacter delafieldi*), zo sladkej a morskej vody (*Comamonas testosterone*, *Pseudomonas stutzeri*). [15] Princípiálne mikroorganizmy produkujú enzýmy, ktoré štiepia polyméry na jednotlivé zložky hydroxykyseliny a tie sú ďalej spotrebované mikroorganizmami ako zdroj uhlíka. Hlavným enzýmom spôsobujúcim biodegradáciu je PHB depolymeráza. Zastúpenie mikroorganizmov, ktoré sú schopné degradovať PHB bolo odhadnuté na 0,5– 9,6 % zo všetkých existujúcich druhov. Aktuálne sa ako sľubný spôsob degradácie ukazuje kompostovanie pri vyššej teplote pomocou termofilných mikroorganizmov (napr. *Streptomyces sp.*). [16] Výborné výsledky boli dosiahnuté termotolerantnou plesňou *Aspergillus sp.*, ktorá degradovala až 90 % PHB filmu po 5 dňovej kultivácii na 50 °C [17]. Výsledkom aeróbnej degradácie PHA je premena až na oxid uhličitý a vodu, pri anaeróbnej kultivácii je to oxid uhličitý a metán. Degradácia PHA prebieha čiastočne aj hydrolyzou. Ako už bolo spomínané, prítomnosť rozličných monomérov v PHA kopolyméroch ovplyvňuje degradáciu vzorky rôzne. [18]

Experiment testujúci hydrolytický i enzymatický proces degradáciu ukázal, že prítomnosť jednotky 4HB v polyesteroch zvyšuje rýchlosť oboch typov degradácie. To je spôsobené tým, že esterové skupiny kopolyesterového reťazca 4HB sú stéricky menej bránené ako jednotky 3HB a 3HV a teda závisí na kompozícii polyméru. Z literatúry vyplýva, že rýchlosť degradácie resp. erózie povrchu vzoriek prebieha v poradí  $P(3HB\text{-}co\text{-}4HB) > P(3HB) > P(3HB\text{-}co\text{-}3HV)$ . Niektorí autori tvrdia, že rýchlosť degradácie vzorky nie je ovplyvňovaná výslednou kryštalinitou polyméru. [19]

### 2.2.3 Biomedicínske využitie PHA

Vlastnosti, vďaka ktorým je možné použitie PHA v biomedicínskych a farmaceutických aplikáciách sú biodegradabilita a biokompatibilita, vďaka čomu vyhovujú požiadavkám mnohých aplikácií *in vivo*. V prvom rade boli PHA zaradené ako adhézne bariéry, chirurgické sieťky, materiál na rekonštrukciu šliach a kĺbovej chrupavky, kardiovaskulárne náplasti, kožné stehy, obvazy na rany, nitovacie kostné doštičky, opora kostnej drene, cvočky, svorky, skrutky, stehy a náhrady kostného štepu. [20]

Do budúca sa rozvíja hlavne potenciál využitia PHA ako opory (scaffolds) v tkaninovom inžinierstve, pretože sa pomaly začína upúšťať od používania syntetických štepov a tkanivových implantátov a uprednostňuje sa postup založený na tkaninovom inžinierstve, kde sa používajú porézne degradovateľné oporné materiály s integrovanými bunkami a biologickými molekulami na obnovenie tkanivových funkcií a regeneráciu tkanív a orgánov. Regenerácia tkaniva si však vyžaduje komplexnú a dobre organizovanú integráciu rôznych bunkových a molekulárnych častí s vhodnou príľnavosťou (adhéziou) buniek, proliferáciou, migráciou a diferenciáciou, čo by malo viesť ku komplexnému obnoveniu funkcie tkaniva v 3D štruktúre. [21] [22]

## 2.2.4 Využitie PHA v poľnohospodárstve

Najvýznamnejšia časť polymérov využívaných v poľnohospodárstve sú synteticky vyrobené materiály z fosílnych palív, ktoré sa samostatne v prírode nerozkladajú a len malá časť z nich je kompostovateľná. Patrí sem: poly- $\epsilon$ -kaprolakton, poly(vinylalkohol), poly(esteramidy) alebo aj aromaticko-alifatické kopolyestery. Tieto produkty sú ale využívané v obrovských množstvách a ich likvidácia predstavuje ekologický problém. Syntetické polyméry, ako sú polyetylén (napr. Marlex), polykarbonát (napr. Lexan), polytetrafluóroetylén (napr. Teflón), polyvinylchlorid (PVC) alebo fenolformaldehydový polykondenzát (Bakelit), sú nebiodegradovateľné makromolekuly, ktoré sa hromadia v pôde a vode a tým spôsobujú znečistenie suchozemskej aj vodnej fauny a flóry. Taktiež predstavujú potenciálnu hrozbu pre zavlažovacie kanály a drenážne systémy. Sú známe prípady, keď dobytok alebo vodné vtáctvo a ryby prehltili plastový obal, čo spôsobilo zablokovanie ich dýchacieho alebo tráviaceho traktu a následnú smrť zadusením alebo vyhladovaním. Z environmentálneho hľadiska by preto bolo výhodné začať používať plne biodegradovateľné polyméry, avšak problémom je vysoká cena a často nedostatočné fyzikálne vlastnosti v porovnaní s bežnými polymermi napr. polyolefinmi. Od roku 1990 sú na trhu biodegradovateľné polyestery, napríklad kyselina polymliečna (PLA), polykaprolaktón (PCL), poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) (PHBHV). Tieto polyméry spĺňajú požiadavky na biodegradabilitu avšak, ich použitie predstavuje niekoľkonásobne vyššie náklady a na modifikácii ich fyzikálnych vlastností sa stále pracuje. Vyššie vymenované biodegradovateľné polyestery našli uplatnenie napríklad ako plastové fólie na sadenie (tzv. mulčovacie fólie), obaly na sadenice, a polymérne matrice s inkorporovanými insekticídmi alebo liečivami. [1]

## 2.3 Doteraz najpreskúmanejšie polyhydroxyalkanoáty

### 2.3.1 Poly(3-hydroxybutyrát)

Poly(3-hydroxybutyrát) (P3HB alebo PHB) je syntetizovaný a uložený v bunkách ako zdroj energie u rôznych mikroorganizmov. P3HB môžu byť extrahované z mikroorganizmov rôznymi technikami. Hlavný produkčný proces pozostáva z 2 krokov: (1) fermentatívny krok, v ktorom mikroorganizmy premieňajú sacharidy z produkčného média a kumulujú P3HB ako rezervný zdroj energie, (2) extrakčný krok, v ktorom je polymér kumulovaný v bunke extrahovaný a purifikovaný na čisté P3HB granule. P3HB je homopolymér v stereoregulárnom usporiadaní s vysokou kryštalinitou kvôli čomu je tento polymér tuhý a krehký. P3HB má nízku viskozitu taveniny a úzku teplotnú škálu v ktorej je spracovateľný. Prirodzená krehkosť a tepelná nestabilita počas spracovania taveniny zhoršuje jeho komerčné uplatnenie. Na prekonanie krehkosti tohto materiálu sa používa niekoľko metód:

- a) plastifikácia P3HB prídavkom plastifikátora,
- b) zmena kinetiky kryštalizácie prídavkom nukleačného činidla,
- c) kopolymerizácia 3-hydroxybutyrátu s 3-hydroxyvalerátom alebo s vyšším homológom PHA,
- d) regulácia podmienok pri spracovaní,
- e) kalandrovanie materiálu nad izbovou teplotou, ale pod teplotou topenia v závislosti od jeho zloženia,

- f) po dosiahnutí úplnej kryštalizácie zahrievanie tvarovaného materiálu na 120 °C a viac. [13]

P3HB má viacero možných aplikácií, napríklad ako obaly pre jednorazové produkty, v poľnohospodárstve na predĺženie uvoľňovania hnojív a agrochemikálií, v medicíne na kontrolované uvoľňovanie medicínskych substancií alebo ako biofilter v nebiodegradovateľných polyméroch na urýchlenie degradácie materiálu. [1]

### 2.3.2 Poly(4-hydroxybutyrát)

Poly(4-hydroxybutyrát) (P4HB) môže byť produkovaný použitím transgénnych fermentačných metód. Fyzikálne vlastnosti polyméru predstavujú teplotu skleneného prechodu -51 °C a teplotu topenia okolo 60°C. Komerčný produkt P4HB od spoločnosti Tepha, Inc. je silný, ohybný termoplastický polyester, ktorý má jednoduchú štruktúru. Biologická produkcia má niekoľko výhod oproti klasickej chemickej syntéze, chemická syntéza P4HB s vysokou molekulovou hmotnosťou je náročná v dôsledku tendencie voľnej kyseliny laktonizovať za vzniku relatívne neobmedzeného a kineticky výhodného päť členného kruhu. Alternatívny postup syntézy P4HB je polymerizácia otvorením kruhu s voľnými radikálmi pomocou 2-metylén-1,3-dioxolánu, výsledkom je kopolymér obsahujúci jednotky a otvoreným aj zatvoreným kruhom. P4HB a jeho kopolyméry majú uplatnenie v medicínskych aplikáciách ako implantovateľné zdravotné pomôcky alebo na kontrolované uvoľňovanie bioaktívnych substancií. [1] [22]

### 2.3.3 Poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát)

Poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) [P(3HB-co-3HV)] je kopolymér, v ktorom sa jednotky 3-hydroxyvalerátu zakomponujú do štruktúry P3HB počas fermentácie. P(3HB-co-3HV) má oproti P3HB vyššiu flexibilitu a húževnatosť a nižšiu teplotu spracovania. Komerčne dostupný je P(3HB-co-3HV), ktorý obsahuje menej ako 15 mol. % jednotky HV. Tento komerčný kopolymér nemá príliš vysokú húževnatosť, predĺženie v ťahu pri pretrhnutí a bolo by výhodnejšie, keby koncentrácia monomérovej jednotky HV bola vyššia, ale takýto polymér nie je komerčne dostupný kvôli príliš vysokej produkčnej cene. Na druhú stranu aj so zvyšujúcim sa obsahom jednotky HV zostáva elasticita polyméru viac menej porovnateľná. Vo všeobecnosti znamená znižujúci obsah HV zvyšovanie teploty topenia, permeability a skelného prechodu. P3HB a P(3HB-co-3HV) majú zo spotrebiteľského hľadiska niekoľko neuspokojivých vlastností, ako je pomalá kryštalizácia a nízka viskozita. Taktiež zostáva P(3HB-co-3HV) po tepelnom spracovaní lepkavý čo je problém pri extrudačnom spracovaní do formy vlákna, kedy hrozí polepenie a je nutné dodržiavať dlhší ochladzovací proces pred namotáním vlákna na cievku. Komerčne dostupné P(3HB-co-3HV) má rozsah predĺženia pri pretrhnutí 4 – 42 % pričom u P4HB je to hodnota až 1000 %. P(3HB-co-3HV) nachádza využitie ako biodegradabilná náhrada pre synteticky vyrobené živice, rovnako bola študovaná pre možné využitie v biomedicínskych materiáloch v rovnakom rozsahu ako P3HB. [1] [23]

### 2.3.4 Poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát)

P(3HB-co-4HB) bol prvý raz izolovaný v roku 1988 z bakteriálneho kmeňa *Ralstonia eutropha* kultivovanom na kyseline 4-hydroxybutyrovej a kyseline 4-chlorobutyrovej, použitých ako zdroj uhlíka. Zakomponovanie jednotky 4HB do P3HB zvyšuje možnosti použitia tohto

materiálu. Kopolymér dosahuje podľa zastúpenia jednotky 4HB širokú škálu fyzikálnych vlastností od vysoko kryštalického polyméru až po vysoko elastický materiál. Všeobecne sa pri kultivácií používajú ako uhlíkový zdroj kyselina 4-hydroxybutyrová,  $\gamma$ -butyrolaktón a bután-1,4-diol. Bohužiaľ sú tieto zdroje uhlíka oveľa drahšie ako glukóza alebo iné zdroje, potrebné k produkcii P3HB. Vysoká cena vstupného materiálu a nízka koncentrácia biomasy počas kultivácie predstavujú prekážky pri priemyselnom využití tohto kopolyméru aj napriek jeho veľmi pozitívnym vlastnostiam. [1] [24]

## 2.4 Mikrobiálny producenti P(3HB-co-4HB)

### 2.4.1 *Cupriavidus malaysiensis* sp.

*Cupriavidus malaysiensis* je druh zo širokej skupiny rodu *Cupriavidus*, ktorý bol izolovaný v Malajzii z jazera Kulim, rieky Sg. Pinang a z ryžového poľa Sg. Manik a bol označený ako USMAA 1020. Identifikácia a príslušnosť k rodu *Cupriavidus* bola dokázaná na základe génu 16S RNA ktorý mal vysokú podobnosť s génom 16S RNA referenčného kmeňa *Cupriavidus pauculus* a *Cupriavidus respiraculli* tak isto pomer báz DNA C:G potvrdil, že sa jedná o organizmus rodu *Cupriavidus*. To, že ide o nový druh bolo zase dokázané hybridizáciou DNA medzi USMAA 1020 a najbližšími fylogenetickými príbuznými rodu *Cupriavidus*, pretože väzba na DNA bola veľmi malá, 10 % a 17 %. [25]

Druh *Cupriavidus malaysiensis* sa môže klasifikovať ako aeróbná, gram-negatívna, pohyblivá baktéria s tyčinkovitým tvarom, ktorá nesporuluje a nekvasí. Jej kolónie vytvárajú na agarovej platni typické béžové až žlté, hladké ohraničené kolónie. Optimálny bakteriálny rast je pri rozsahu pH od 6 do 7 a pri teplote 30 – 37 °C. Tento druh je tiež schopný rásť v prítomnosti 0,5; 1,0 a 1,5 % chloridu sodného ale nie už na 4,0 %. [26]. *Cupriavidus malaysiensis* je schopný produkovať polyhydroxyalkanoáty použitím rôznych druhov uhlíkového substrátu. Produkcia kopolyméru P(3HB-co-4HB) je podmienená prítomnosťou niektorého z prekursorov štruktúrne podobných monomérovej jednotke 4HB. Medzi takéto prekursorov patrí napríklad 4-hydroxybutyrová kyselina, butan-1,4-diol,  $\gamma$ -butyrolaktón,  $\epsilon$ -caprolactone, hexán-1,6-diol alebo dioly a karboxylové kyseliny s hydroxylovou skupinou na poslednom atóme uhlíka. U tohto druhu je tiež výrazný rozdiel v schopnosti utilizovať glukózu a fruktózu keďže koncentrácia biomasy na fruktóze bola 10,8 g/l zatiaľ čo koncentrácia biomasy na glukóze len 2,3 g/l. Táto skutočnosť sa odvíja od toho, že príbuzný kmeň *Cupriavidus necator* H16 divokého typu tiež nie je schopný efektívne využiť glukózu, pretože nemá aktivitu enzýmu 6-fosfofruktokináza. Tento bakteriálny druh je tiež schopný použiť ako substrát glycerol, na ktorom dosahoval pomerne vysokú koncentráciu biomasy avšak produkcia PHA bola pri tomto substráte najnižšia zo všetkých vyššie spomínaných. [27]

### 2.4.2 *Delftia acidovorans*

Jedná sa o známu baktériu divokého typu, inak nazývanú aj *Comamonas acidovorans*, ktorá dokáže efektívne akumulovať vysokomolekulárne PHA obsahujúce jednotku 4-hydroxybutyrát (4HB) vo vysokej koncentrácii. U tohto bakteriálneho druhu by malo byť možné dosiahnuť produkciu P(3HB-co-4HB) so širokou škálou monomérov 4HB a to použitím kombinácie substrátov. Jeden zo substrátov je glukóza a k nej sa v rôznom pomere pridáva štruktúrne podobný prekursor jednotky 4HB akým je napríklad bután-1,4-diol alebo 4-hydroxybutyrová



kyselina. Tento bakteriálny druh vie veľmi podobným spôsobom produkovať aj P(3HB-co-3HV) a to prídavkom valerátu sodného. [28] Zaujímavosťou u tohto bakteriálneho druhu je, že jeden z používaných kmeňov *Delftia acidovorans* DSMZ 10474 bol izolovaný z oblasti kontaminovanej herbicídmi v stavebnej suti a bolo veľmi prekvapivé, že tento kmeň bol schopný syntetizovať kopolymér P(3HB-co-4HB). [29]

Kultivácia tohto bakteriálneho druhu prebieha pre zvýšenie akumulácie PHA v médiu bez prítomnosti dusíka. Ako bolo už vyššie spomenuté vhodnou kombináciou uhlíkového substrátu je možné doceliť vysokej koncentrácie jednotky 4HB. Bolo zistené, že kombináciou glukózy a butan-1,4-diolu je možné dosiahnuť koncentráciu viac ako 40 hm.% P(3HB-co-4HB) na suchú hmotnosť biomasy. Pozitívny efekt bol pozorovaný pri použití glukózy v prvej fáze kultivácie, čo spôsobí premenu glukózy na monomér P3HB a následným pridaním prekursoru tvorby monoméru 4HB bola docielená produkcia kopolyméru P(3HB-co-4HB). [24]

### 2.4.3 *Cupriavidus necator*

Bakteriálny druh *Cupriavidus necator* je už dlhodobo skúmaný hlavne kvôli produkcií poly-3-hydroxybutyrátu (P3HB). Tento mikroorganizmus patrí k fakultatívne chemolitotrofným gramnegatívnym baktériám a v literatúre je možné nájsť ho pod názvom *Ralstonia Eutropha*, *Autersia Etropha* alebo *Lacaligenes eutrophus*. Dokáže vykonávať aeróbne aj anaeróbne dýchanie. *C. necator* je tiež schopný využiť jednoduché i zložité zdroje uhlíka a to najmä vo forme sacharidov, olejov, mastných kyselín alebo aj z oxidu uhličitého. Rovnako je schopná využiť ako zdroj uhlíka priemyselný odpad, vďaka čomu sa dajú znížiť náklady na produkciu PHB a zároveň odpadové látky zužitkovať. [30]

Okrem schopnosti produkovať polymér P3HB sa uvádza, že bakteriálny druh *Cupriavidus necator* dokáže produkovať kopolymér P(3HB-co-4HB) s rôznym zastúpením jednotky 4HB (0-100 mol. %). Pri kultivácii, s cieľom dosiahnuť produkciu tohto kopolyméru, je rovnako ako u vyššie spomínaných bakteriálnych druhov nutná prítomnosť uhlíkového substrátu vo forme prekursoru jednotky 4HB a limitácia koncentráciou dusíka v produkčnom médiu. [31]

Kultivácia môže ako u predchádzajúcich bakteriálnych druhov prebiehať aj pomocou kombinácie viacerých uhlíkových substrátov, napríklad s použitím sójového oleja a  $\gamma$ -butyrolaktónu. Pri testovaní rôznych pomerov týchto uhlíkových substrátov bolo zistené, že zvyšovanie koncentrácie  $\gamma$ -butyrolaktónu v produkčnom médiu viedlo k zvýšeniu koncentrácie jednotky 4HB. Na druhú stranu má táto látka rovnako aj inhibičné účinky a z toho dôvodu sa pri jej vyššej koncentrácii znižovala produkcia biomasy a teda aj celková koncentrácia PHA. [32]

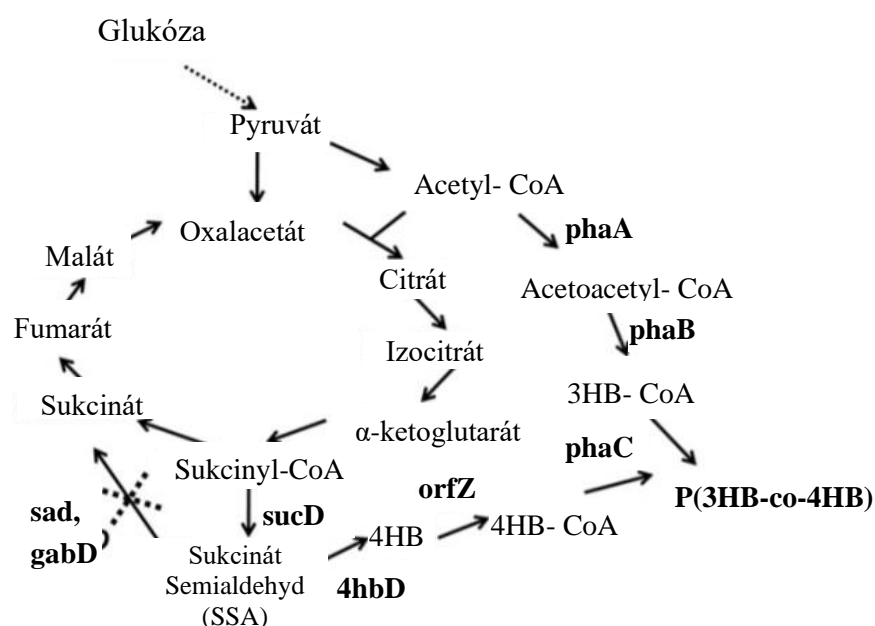
### 2.4.4 Rekombinantná *Escherichia coli*

Už roku 1884 nemecký mikrobiológ a lekár Theodor Escherich študoval detské mikróby a ich úlohu v tráviacom trakte. Počas štúdie objavil rýchlo rastúcu baktériu, ktorú nazval *Bacterium colicommune* dnes už známa ako *Escherichia coli*. Táto baktéria začala mať čoraz viac pozornosti vďaka jej výborným mikrobiologickým vlastnostiam ako sú: rýchly rast, odolnosť, nepatogénnosť, schopnosť rásť na niekoľkých živných médiách a rovnako možnosť izolovať ju prakticky od každého človeka. Vďaka tomu sa z tohto druhu stal modelový organizmus, s kompletne sekvenovaným genetickým kódom a s významnou úlohou v genetickom

inžinierstve, farmaceutickej výrobe a v neposlednom rade v biotechnologickom priemysle. Bakteriálny druh *Escherichia coli* je typický gram negatívny *Bacillus*, ktorý má asi 1  $\mu\text{m}$  na dĺžku a 0,35  $\mu\text{m}$  na šírku a typicky sa nachádza v gastrointestinálnom trakte človeka a tvorí tak prevažne nepatogénnu fakultatívnu flóru ľudského čreva. Niektoré kmene tejto baktérie ale môžu spôsobovať ochorenie gastrointestinálneho, močového alebo centrálného nervového systému. [33]

Z pohľadu PHA nie je bakteriálny druh *Escherichia coli* schopný syntetizovať P3HB ani akumulovať žiadne iné polyestery vo svojej cytoplazme. Na základe toho, a dobre charakterizovaných genetických informáciách *E. coli*, bol vytvorený rekombinant, ktorý je schopný PHA produkovať. Dosiahnuté to bolo vložением génu kódujúceho PHA syntázu z bakteriálneho kmeňa *Cupriavidus necator* a ďalej zavedenie génov *sucD*, *4hbD* a *orfZ* z druhu *Clostridium kluyveri*, čo malo uľahčiť produkciu 4hydroxybutyrol-CoA a začlenenie do kopolyméru P(3HB-co-4HB). Vytvorenie rekombinantnej baktérie na produkciu tohto kopolyméru malo veľkú výhodu oproti všetkým divokým kmeňom, pretože vďaka úpravám v genetickej informácii bola schopná produkovať kopolymér aj pri kultivácii na glukóze a nebolo už potrebné využívať drahé prekurzory jednotky 4BH.

Vytvorenie kopolyméru z glukózy viedlo cez citrátový cyklus kedy sa sukcinyl-CoA najskôr redukoval na sukcinát semialdehyd (SSA), následne sa SSA redukoval na 4HB, ktorý sa prevádza na 4HB-CoA prostredníctvom CoA- transferázy. V poslednom kroku sa 4HB-CoA polymerizuje pomocou PHA syntázy. Tento proces je možné vidieť na obrázku 3. Vďaka tomu, že operón PHA syntázy z *Cupriavidus necator* je v *E. coli* dostatočne exprimovaný, je možné dosiahnuť vysokú hladinu PHB a to až 70-80 % suchej hmotnosti biomasy. Posledným krokom ako v tomto postupe zvýšiť koncentráciu H4HB je delécia génov *sad* a *gabD*, aby sa eliminovala sukcinátová tvorba zo sukcinátového semialdehydu, ktorý je potrebný na zvýšenie toku uhlíka na biosyntézu 4HB. [34], [35]



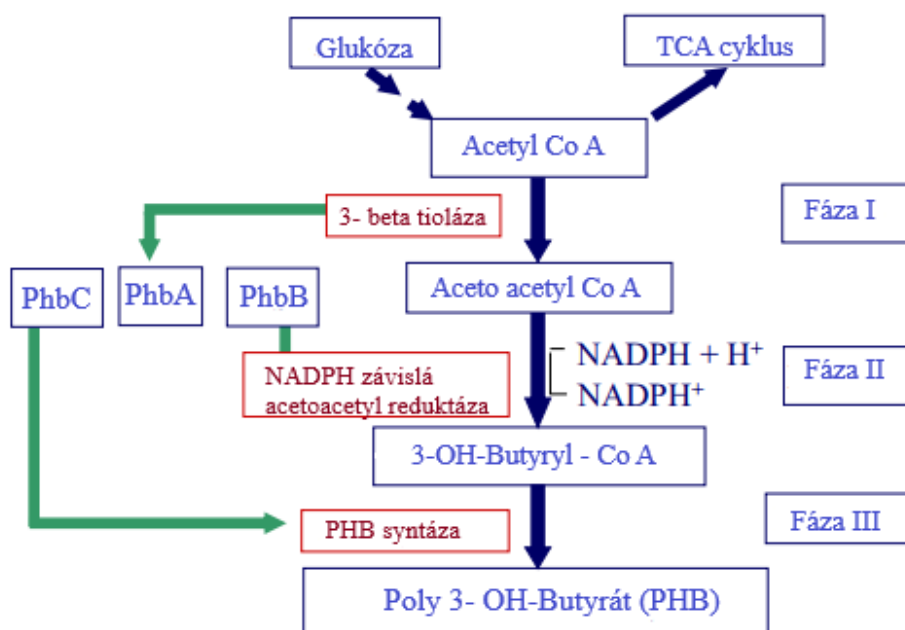
Obrázok 3: Geneticky upravená dráha produkcie P(3HB-co-4HB) v rekombinantnej *E. coli* (prevzaté, upravené) [34]

### 2.4.5 *Azohydromonas lata*

Jedná sa o gram negatívnu, aeróbnu, tyčinkovitú baktériu, inak nazývanú aj *Alcaligenes latus*, ktorá je podobná vyššie spomínaným divokým druhom. Rovnako dokáže syntetizovať P(3HB-co-4HB) avšak len za prítomnosti prekursoru ako je  $\gamma$ -butyrolaktón, 4-hydroxybutyrát alebo butan-1,4-diol. Kultivácie s cieľom vyššej produkcie PHA prebiehajú v produkčnom médiu bez prítomnosti dusíka. Rovnako ako u predchádzajúcich bakteriálnych druhov aj tu predstavujú uhlíkové prekursor 4HB príliš drahý substrát s možnými inhibičnými účinkami a preto sa pristupuje ku kombináciám napríklad so sacharózou. [36]

## 2.5 Biosyntéza polyhydroxyalkanoátov mikroorganizmami

Vo väčšine baktérií, ako je najznámejší producent *Cupriavidus necator* H16, prebieha syntéza PHA pomerne jednoduchou trojkrokovou reakciou, začínajúcou acetyl-CoA (Obrázok 4). V prvom kroku kondenzujú 2 molekuly acetyl-CoA za katalýzy 3-beta tiolázy. Následne je vytvorený Acetoacetyl-CoA stereoselektívne redukovaný na R-3-hydroxybutyryl-CoA pomocou acetoacetyl-CoA reduktázy za spotreby 1 molekuly NADPH. V poslednom kroku sú monoméry R-3-hydroxybutyryl-CoA polymerizované pomocou PHB syntázy. Výsledným produktom je poly(3-hydroxybutyrát) a voľná molekula CoA. [37]



Obrázok 4: Schéma biosyntézy polyhydroxyalkanoátov (prevzaté, upravené) [37]

Ďalšou možnosťou syntézy je cesta  $\beta$ -oxidácie, tento spôsob sa dá pozorovať predovšetkým u bakteriálneho kmeňa *Pseudomonas*, kultivovanom na aktivovaných kaloch. Medziprodukty, ktoré sú počas  $\beta$ -oxidácie konvertované na R-3-hydroxyacyl-CoA, z masných kyselín doteraz neboli úplne detailne popísané. [38]

Nasledujúca cesta syntézy PHB pochádza z de novo syntézy masných, ktorá premieňa medziprodukty masných kyselín alebo sacharidov na rôzne R-3-hydroxyacyl-CoA. Tie sú využité ako substráty pre PHA syntázu. [39]

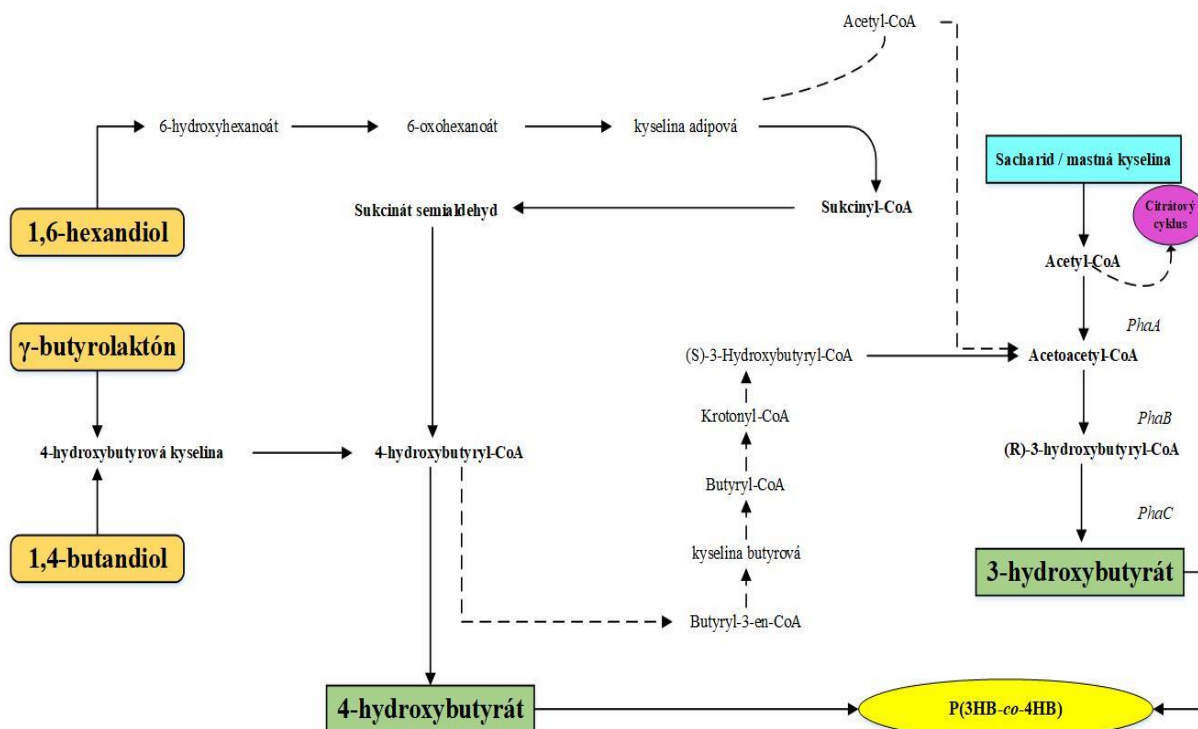
### 2.5.1 Biosyntéza P(3HB-co-4HB)

Niekoľko baktérií, ktoré obsahujú PHA<sub>SCL</sub> syntázu je schopných inkorporovať kyselinu 4-hydroxybutyrovú (4HB) do PHA. Začlenenie tejto jednotky však silne závisí od použitia prekursorových substrátov ako zdrojov uhlíka (Obrázok 5). Táto podmienka platí aj pre všetky ostatné zložky PHA iné ako 3HB, ktoré sa bežne syntetizujú len za podmienky použitia prekursorového substrátu. Doposiaľ nebol popísaný žiadny divý kmeň baktérie, ktorá by syntetizovala PHA s obsahom 4HB z nepríbuzného zdroja uhlíka. Jedinou možnosťou, ako získať jednotku 4HB zakorporovanú do PHA pri použití jednoduchého zdroja uhlíka akým je glukóza alebo aj za pomoci aminokyselín, je využitie genetického inžinierstva, vďaka ktorému je možné pozmeniť metabolickú dráhu ako je popísané v kapitole 2.4.4. Aktuálne je preferované investovať do vývoja geneticky modifikovaných bakteriálnych kmeňov, vďaka čomu by bolo možné dosiahnuť biotechnologickú výrobu poly-4hydroxybutyrátu z lacných zdrojov uhlíka. [34] [40]

Syntéza jednotky 4HB v divokých kmeňoch prebieha pri použití prekursorov akými sú kyselina 4-hydroxybutyrová, butan-1,4-diol,  $\gamma$ -butyrolaktón [41] PHA obsahujúce jednotky 4HB boli prvý krát pozorované u baktérie *Cupriavidus necator* kultivovanej na kyseline 4-hydroxybutyrovej ako zdroji uhlíka. Neskôr bola biosyntéza takýchto PHA dosiahnutá aj v ďalších druhoch obsahujúcich PHA<sub>scl</sub> syntázu. [40]

Pri použití kyseliny 4-hydroxybutyrovej ako uhlíkového substrátu začína priebeh syntézy premenou tejto kyseliny na 4HB-CoAa to pomocou transferázy alebo tiokinázy. Avšak väčšina bakteriálnych kmeňov zabudováva aj jednotku 3HB a tak vzniká kopolymér a to hlavne pri vyššej koncentrácii PHA v biomase, čím viac PHA sa v biomase nachádza, tým viac obsahuje finálny produkt jednotky 3HB. U vyššieho zastúpenia jednotky 4HB je bežná veľmi nízka koncentrácia polyméru v biomase. Začlenenie komonoméru 3HB je výsledkom katabolizmu kyseliny 4-hydroxybutyrovej, tento katabolizmus vedie k medziproduktom, z ktorých sa syntetizuje 3-hydroxybutyryl-CoA. Použitie  $\gamma$ -butyrolaktónu bolo rovnako preskúmané na bakteriálnom druhu *Cupriavidus malaysiensis*. Laktón v tomto prekuzore je hydrolyticky rozštiepený na 4-hydroxybutyrovú kyselinu, tento krok býva katalyzovaný esterázami alebo laktonázami a ďalšie kroky už sú zhodné s vyššie spomenutým postupom. Premena butan-1,4-diolu alebo iného  $\omega$ -alkandiolu je spôsobená zase oxidáciou na príslušnú  $\omega$ -hydroxymastnú kyselinu, ktorá je následne prevedená na tioester koenzýmuA a je ďalej podrobený  $\beta$ -oxidácií až kým nevznikne 4HB-CoA a keďže 4HB-CoA nie je na rozdiel od 3HB-CoA chirálny medziprodukt, tak môže byť priamo polymerizovaný PHA syntázou. [40]

Katabolizmus jednotky 4HB bol detailne preštudovaný u bakteriálneho druhu *Cupriavidus necator* H16, kedy je PHA syntéza schopná viesť hlavnú katabolickú cestu pravdepodobne cez semialdehyd kyseliny jantárovej a kyselinu jantárovú, ktoré sú katalyzované 4HB-dehydrogenázou a semialdehyd-dehydrogenázou kyseliny jantárovej. Kombináciou génu kódujúceho túto PHA syntázu u *Cupriavidus necator* a ďalších génov od *Clostridium kluyveri* (orfZ) začlenených do rekombinantnej *E. coli* vzniká jednotka 4HB aj z jednoduchých uhlíkových substrátov. [34] [40]



Obrázok 5: Biosyntéza poly(3hydroxybutyrát-co-4hydroxybutyrát); (prevzaté, upravené) [42]

## 2.5.2 Enzým PHA syntáza

PHA syntáza je kľúčový enzým potrebný pre biosyntézu polyesterov, ktorý premieňa rozpustný monomérny tioester R-hydroxyacyl-CoA na nerozpustný polymér za súčasného uvoľnenia koenzýmu A. Tento rozpustný enzým sa počas kovalentnej katalýzy polyesterového reťazca mení na amfipatický enzým. PHA syntézy sú komplexne skúmané a bolo izolovaných viac ako 60 génov kódujúcich tento enzým s následným rozdelením do 4 skupín podľa ich primárnej štruktúry, bakteriálneho kmeňa z ktorého boli izolované, kompozície jednotiek a substrátovej špecificity pre monoméry s rôznou dĺžkou reťazca. Rôzne PHA syntázy produkujú veľmi odlišné typy PHA polymérov a niektoré majú špecifické vlastnosti ako je tepelná rezistencia, tolerancia k vysokej koncentrácii solí a iné. [43]

Trieda I PHA syntázy pozostáva z jednej podjednotky PhaC s molekulovou hmotnosťou v rozmedzí 60-70 kDa. Izolovaná bola primárne z bakteriálneho kmeňa *Cupriavidus necator*. Podľa substrátovej špecificity enzýmu využíva táto trieda predovšetkým PHA<sub>SCL</sub> s hydroxylovou skupinou v polohe C3 alebo C4, avšak za určitých špecifických podmienok dokáže pracovať aj s PHA<sub>MCL</sub>. Napríklad ak je ako uhlíkový zdroj použitá masťná kyselina s párnym počtom uhlíkov. [44]

Trieda II PHA syntázy je podobná triede I, má jednu podjednotku PhaC1 alebo PhaC2. Podľa štúdií vykonaných na *Pseudomonas aeruginosa* trieda II polymerizuje CoA tioester PHA<sub>MCL</sub> monomérov pozostávajúcich z 6-12 atómov uhlíka za predpokladu cesty syntézy z  $\beta$ -oxidácie masťných kyselín alebo de novo biosyntézy z masťných kyselín. Analýza génov PhaC1 a PhaC2 ukázala, že majú veľmi podobnú substrátovú špecificitu ale rozdiel je v tom, že PhaC1 dosahuje vyššiu katalytickú rýchlosť a produkuje nižšie molekulové hmotnosti PHA ako PhaC2.

Trieda III PHA syntázy, od prvých dvoch sa už výrazne odlišuje tým, že ide o heterodimér, ktorý obsahuje 2 plne aktívne podjednotky. PhaC podjednotka podobná s ostatnými skupinami

a PhaE, ktorá ukazuje minimálnu podobnosť s inými PHA syntázami. Molekulová hmotnosť je približne 40 kDa. Táto trieda je používaná k syntéze PHA<sub>SCL</sub> a je schopná akumulovať do 21 % polyméru v suchej bunkovej hmotnosti za prítomnosti glukózy.

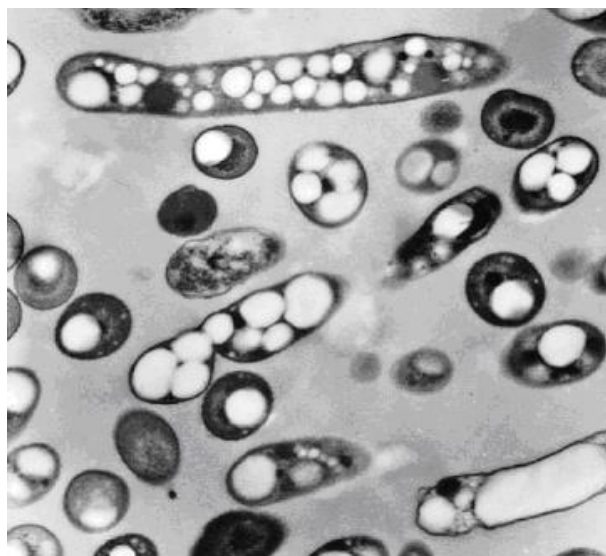
Trieda IV PHA syntázy, jedná sa opäť o heterodimér zložený z PhaC a PhaR podjednotiek s molekulovou hmotnosťou okolo 20kDa. [44]

### 2.5.3 Tvorba granúl

PHA syntáza nie je zakomponovaná len v biosyntéze PHA, ale hrá dôležitú úlohu aj pri formovaní granúl. Okrem nej sú s tvorbou granúl spojované ďalšie tri enzýmy a to PHA depolymerázy, 3HB-oligomérhydroxyláza a phazíny (PhaPs). Výskumy purifikovaných granulátov ukázali, že granule zvyknú obsahovať okrem PHA aj proteíny a lipidy a ich priemer býva okolo 200 až 500 nm (Obrázok 6). Granule PHB boli identifikované ako drsné s obsahom rôznych trhlín a prasklín. [45] Formovanie a tvorba v bakteriálnych bunkách boli popísané dvomi modelmi formovania granúl: a) micelárny model b) tvorba pučením [43]

V micelárnom modeli rozpustný enzým premení hydrofóbny monomér-CoA na oligomér, ktorý zostáva viazaný na enzým. Po dosiahnutí kritickej micelárnej koncentrácie, čo je koncentrácia oligomérov, po ktorej prekročení začína tvorba micel, začne komplex enzým-oligomér tvoriť micely s enzýmami a fosfolipidovou vrstvou umiestnenou na povrchu. Tento proces prebieha v cytoplazme mimo membránu. Micely expandujú a javia sa ako intracelulárne granulové štruktúry, ktoré sa dajú jednoducho pozorovať na fázovom kontrastnom mikroskope. Tento model je podporený faktom, že PHA granule môžu byť formované *in vitro* bez prítomnosti membrány.

Na druhú stranu štúdia pomocou elektrónovej mikroskopie ukázala, že membrána slúži ako materiál obklopujúci PHA granule, a preto sa prikláňa k modelu pri ktorom dochádza k tvorbe granúl pučením. V tomto modeli je PHA polymeráza zakomponovaná do cytoplazmatickej membrány, jednotlivé oligoméry sú taktiež viazané s enzýmami avšak hydrofóbne prostredie v ktorom rastie polymér, sa nachádza medzi fosfolipidovou vrstvou a cytoplazmatickou membránou. [46]



Obrázok 6: Baktérie akumulujúce polyhydroxyalkanoáty vo forme granúl vo vnútri buniek, zaberajúce až 90 % suchého obsahu baktérie *Cupriavidus Necator* [47]

## 2.6 Ciele a motivácia práce

Motivácia a téma záverečnej práce sa čiastočne odvíjala od projektu ORION „3D models with bio origin“, v ktorom bolo cieľom produkovať čo najväčšie množstvo kopolyméru P(3HB-co-4HB). Ako bolo už spomenuté tento kopolymér má lepšie fyzikálne vlastnosti pre spracovanie v tavenine ako monomér 3HB a preto z neho mal byť vytvorený vhodný filament na použitie do 3D tlačiarne. Tým sa inšpirovala diplomová práca, v ktorej bolo testovaných niekoľko producentov P(3HB-co-4HB) s cieľom vybrať toho najlepšieho.

Konkrétne ciele boli rozdelené do štyroch bodov:

- 1) Literárna rešerš na zadanú tému
- 2) Štúdium produkcie PHA pomocou vybraných bakteriálnych kmeňov
- 3) Základná charakteristika pripravených kopolymérov
- 4) Vyhodnotenie výsledkov, ich diskusia a záver

Výber použitých producentov sa odvíjal od viacerých faktorov. Kmeň *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379 bol vybraný podľa inej študentky FCH VUT [48], Ďalej kmeň *Delftia acidovorans* CCM 283 odpovedal aj označeniu IFO 13582 a opieral sa o článok podľa, ktorého mu bol nakoniec priradený kultivačný postup, tento kmeň pochádzal z českej zbierky mikroorganizmov a preto bol ľahko dostupný. [49] Podobne kmeň *Delftia acidovorans* CCM 2410 pochádzal z českej zbierky, avšak neopieral sa o žiadny konkrétny článok išlo len o použitie ďalšieho kmeňa rovnakého bakteriálneho druhu. Posledný kmeň od *Delftia acidovorans* DSM 39 bol použitý na základe literatúry v ktorej bol označený ako vhodný na produkcia monomérskej jednotky 4HB. [50] Kmeň *Azohydromonas lata* je tiež známy schopnosťou produkovať monomér 4HB a bol otestovaný na základe toho, že sa jeden z jeho kmeňov nachádzal v českej zbierke mikroorganizmov, tá bola pre prácu preferovaná.

Motiváciou práce bola aj perspektívna téma produkcie PHA, ktorá predstavuje ekologickejšiu náhradu viacerých plastových výrobkov a obalov preto je dôležité venovať sa tejto oblasti. Hľadanie a úprava nových materiálov je téma, ktorá má svoje miesto v biotechnológii, aby sa umožnilo postupne znížiť náklady na ich produkciu a izoláciu, vďaka čomu by sa tento materiál mohol rozšíriť používať ako v priemyselnom odvetví tak v každodennom živote. Konkrétne výber kopolyméru P(3HB-co-4HB) má potenciál na využívanie v 3D tlačiarnach. PHA sa už na výrobu filamentov používajú avšak skôr ako kompozit k filamentom z PLA. Je teda dôležité pracovať na výskume PHA a to ako z pohľadu použitých odpadných substrátov hlavne na produkciu PHB, znižovanie celkových nákladov kultivácií a produkcia rôznych kopolymérov a lepšími vlastnosťami ako samotné PHB.

## 3 PRAKTICKÁ ČASŤ

### 3.1 Použité mikroorganizmy, chemikálie a prístroje

#### 3.1.1 Použité mikroorganizmy

Na experimentálnu časť boli použité baktérie z Českej zbierky mikroorganizmov Masarykovej univerzity v Brne (CCM) druh *Delftia acidovorans* a *Azohydromonas lata*. Ďalej boli použité mikroorganizmy zakúpené v Nemeckej zbierke Liebnitz Institut DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures (DSM). Išlo o druh *Delftia acidovorans* a *Cupriavidus malaysiensis*, zoznam konkrétnych kmeňov je uvedený v tabuľke 1.

Tabuľka 1: Bakteriálne kmene použité pre diplomovú prácu

Bakteriálny druh	Zbierkové číslo	Optimálna teplota	Optimálne pH
<i>Cupriavidus malaysiensis</i>	DSM 19379	30 °C	7,0
<i>Delftia acidovorans</i>	DSM 39	30 °C	7,0
<i>Delftia acidovorans</i>	CCM 2410	30 °C	7,0
<i>Delftia acidovorans</i>	CCM 283	30 °C	7,0
<i>Azohydromonas lata</i>	CCM 4448	30 °C	7,0

#### 3.1.2 Chemikálie

Nutrient Broth, Himedia  
Agar – Agar, Roth  
Peptone, Himedia  
Yeast extract powder, Himedia  
Beef extract, Himedia  
Chlorid sodný; p.a.; Lachner  
D- glukóza monohydrát; p.a.; Lachner  
bután-1,4-diol, p.a.; Sigma Aldrich  
 $\gamma$ -butyrolaktón, >98%; Sigma Aldrich  
Chloroform; per HPLC; Fischer Chemical

#### 3.1.3 Prístroje

Spektrofotometer, Spekol 1300  
Temperovaná trepačka, Unimax1010  
Sušiareň, Binder FD 53, 2L  
Magnetická miešačka, Benchmark  
Bioreaktor, BioFlo 115  
Laminárny box s UV lampou, Aura mini  
Termostat biologický,  
Centrifúga, EBA 200  
Vortex, Heidolph Reax Top  
Analytické váhy, Pioneer  
Váhy elektronické, Kern 440  
Váhy elektronické, Helago EK-300i



Vysokorychlostná chladená centrifúga, Hermle  
pH metr, pH Test 30, Thermo Scientific  
plynový chromatograf Trace 1300 GC Ultra FID detector, Finnigan, kolóna Agilent J&W DB-WAX 30 m by 0,25 mm, Agilent Technologies, vyhodnocovací software: Thermo Software Xcalibur  
SEC chromatograf s kolonou Plgel mixed-C 5  $\mu\text{m}$ , 300 by 7,5 mm, Agilent Technologies, detektory: MALS – DAWN HELEOS II, diferenční refraktometr OPTILAB T-REX, Wyatt Technology  
TA Instruments, Q5000IR  
Teplotne modulovaný kalorimeter, TA Instruments, DSC Q2000  
FTIR spektrometer, Nicolet iS50  
DSM Xplore 5 & 15 Micro Compounder Model 2009, Verzia 2.0  
Dynamometer Instron 4301, Instron Corporation  
Pre prácu bolo ďalej použité štandardné laboratórne sklo a pomôcky

## 3.2 Kultivácia mikroorganizmov

### 3.2.1 Oživenie bakteriálnych kultúr a ich uchovávanie

Všetky baktérie až na kmeň DSM 19379, ktorý už bol uchovávaný v kryoskúmavkách na Fakulte chemickej VUT v Brne, boli dodané v lyofilizovanom stave a boli oživované podľa návodu od dodávateľa. Po ich aktivovaní boli krížovým rozterom aplikované na pevné agarové platne na Petriho misky a zaočkované do kvapalného média. Pred očkovaním boli pripravené médiá sterilizované v tlakovom hrnci po dobu 40 minút, ďalej boli ochladené a po zaočkovaní bolo tekuté médium ponechané na trepačke pri 30°C a 160 rpm. Petriho misky boli po zaočkovaní zalepené parafilmom, aby sa zabránilo kontaminácií a vysušovaniu média a na niekoľko dní sa uložili do termostatu pri teplote 30°C. Kultivácia nových baktérií trvala rôzne dlhú dobu v intervale 24-72 hodín. Petriho misky sa následne vložili do chladničky na 8-10°C a kultúra mohla byť takto uchovávaná maximálne na dobu 1 mesiaca, následne musela byť preočkovaná na nové Petriho misky. Kultúra v tekutom médiu bola po kultivácii ešte raz preočkovaná do nového tekutého média, aby sa overila jej životaschopnosť a po 24 hodinách sa z nej pripravili kryoskúmavky, ktoré zaručili uchovanie kultúry na dlhú dobu.

#### Zloženie média na Petriho miske:

Nutrient Broth:	25 g
Agar (len pre médium na Petriho misky):	20 g
Destilovaná voda:	1000 ml

#### 3.2.1.1 Príprava kryoskúmaviek

Pre dlhodobé uchovanie bakteriálnych kultúr bolo z každého bakteriálneho kmeňa pripravených 20 kryoskúmaviek. Do každej kryoskúmavky bolo pipetované 0,5 ml 30% roztoku glycerolu, následne boli kryoskúmavky uzavreté a sterilizované v tlakovom hrnci 40 minút. Po sterilizácii boli ochladené na teplotu 30°C a v očkovačom boxe sa do každej pipetoval 1ml inokula daného bakteriálneho kmeňa. Hotové kryoskúmavky boli uchovávané v mraziacom boxe pri teplote -80 °C.

### 3.2.2 Príprava inokula

Inokulum bolo vždy pripravené veľmi podobnou cestou. Najskôr sa v Erlenmeyerovej banke namiešal roztok podľa receptu pre danú bakteriálnu kultúru. Výsledný roztok bol sterilizovaný 40 minút v tlakovom hrnci so zavretým ventilom. Po sterilizácii a vychladnutí bola do roztoku zaočkovaná bakteriálna kultúra v sterilnom prostredí očkovacieho boxu. Kultúra sa očkovala buď z kryoskúmavky (1,5 ml kultúry na 100 ml inokulačného roztoku) alebo z Petriho misky (pomocou vyžihanej kľučky sa z misky približne 3 krát preniesla kultúra do 10 ml roztoku). Po zaočkovaní sa Erlenmeyerova banka umiestnila na temperovanú trepačku. Kultivácia inokula prebiehala vždy 24 hodín pri 30 °C a 160 rpm. Tento postup v kombinácii so zložením inokula č. 1 bol pri optimalizácii kultivácií použitý na všetky bakteriálne kmene a nakoniec bol vybratý ako najlepší pre bakteriálne kmene: DSM 19379, DSM 39 a CCM 283.

#### Zloženie inokula č. 1:

Nutrient broth	25 g
Destilovaná voda	1000 ml

Dvojstupňová kultivácia inokula pre bakteriálny kmeň *Delftia acidovorans* CCM 2410: V prvom kroku bola použitá 1 kryoskúmavka na 100 ml inokulačného roztoku č. 1 a kultivácia prebiehala 24 hodín. V druhom kroku bolo pripravené a vysterilizované inokulum č. 2, taktiež 100 ml, ktoré sa odlišovalo prítomnosťou glukózy a v laminárnom boxe doňho boli zaočkované 3 ml prvého inokula. Kultivácia opäť prebiehala 24 hodín, po nej už bol bakteriálny kmeň preočkovaný do minerálneho média.

#### Zloženie inokula č. 2:

Nutrient broth	25 g
Glukóza	10 g
Destilovaná voda	1000 ml

Dvojstupňová kultivácia pre bakteriálny kmeň *Delftia acidovorans* CCM 4448: pri kultivácii tohto bakteriálneho kmeňa bola opakovane dosahovaná nízka optická hustota oproti ostatným kmeňom, preto bol otestovaný aj dvojstupňový postup kultivácie. V prvom kroku bolo pripravené inokulum podľa zloženia č. 3 s kultúrou z kryoskúmavky. Zloženie tohto inokula bolo priložené k dodaciemu listu baktérií z Českej zbierky mikroorganizmov. Kultivácia pokračovala podľa zloženia minerálneho média č. 4, kapitola 3.2.3. Po dokončení kultivácie bola kultúra zaočkovaná na Petriho misky, inkubovaná 24 hodín pri 30°C a následne boli z týchto Petriho misiek pripravené nové inokulá. Zloženie roztoku sa nelíšilo, iná bola len očkovaná kultúra.

#### Zloženie inokula č. 3:

Kvasničný extrakt	5 g
Peptón	5 g
Glukóza	10 g
Destilovaná voda	1000 ml

Inokulum č. 4 bolo použité pre bakteriálny kmeň *Delftia acidovorans* DSM 39: príprava prebehla podľa klasického postupu prípravy inokula, popísaného na začiatku tejto kapitoly. Kmeň DSM 39 bol dokúpený až neskôr a preto boli na jeho kultiváciu vybrané 2 typy inokula. Zloženie inokula č. 4 kopíruje zloženie iného typu Nutrient broth, ktorý bol použitý v literatúre a nebol dostupný v laboratóriu.

#### **Zloženie inokula č. 4:**

Kvasničný extrakt	3 g
Hovädzí extrakt	3 g
Peptón	10 g
Chlorid sodný	10 g
Destilovaná voda	1000 ml

### **3.2.3 Príprava minerálneho média vhodného pre produkciu P(3-HB-co-4-HB)**

Po 24 hodinách kultivácie inokula bola bakteriálna kultúra preočkovaná do minerálneho (produkčného) média. Médium bolo podľa literatúry pripravené do požadovaného objemu v Erlenmeyerovej banke. Následne sa roztok sterilizoval v tlakovom hrnci minimálne 30 minút so zatvoreným ventilom. Po sterilizácii sa roztok nechal vychladnúť na teplotu približne 30 °C. Práca pokračuje v laminárnom boxe, kde bol do sterilného roztoku pridaný uhlíkový substrát, roztok stopových prvkov v koncentrácií 1 µl/ml a inokulum v rôznej koncentrácii. Koncentrácie jednotlivých komponentov boli stanovené podľa literatúry a podľa potrieb daného bakteriálneho kmeňa. Pre túto diplomovú prácu boli použité rôzne zloženia minerálnych médií a roztokov stopových prvkov. Po dokončení produkčného média je toto ponechané na trepačke pri 30 °C, 160 rpm na 42 hodín alebo 72 hodín podľa potreby bakteriálneho kmeňa.

Kultivácia bakteriálneho kmeňa *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379: na kultiváciu bolo použité minerálne médium č. 1 a roztok stopových prvkov č. 1. Toto minerálne médium bolo pripravené vyššie opísaným postupom. Po sterilizácii 100 ml média bolo v laminárnom boxe pridaných 5 ml inokula; 0,1 ml roztoku stopových prvkov a 8g/l uhlíkového substrátu. Hotové produkčné médium bolo ponechané 72 hodín na temperovanej trepačke pri 160 rpm a 30°C. Po kultiváciu bol celý objem premiestnený do šrubovacej reagenčnej fľaše a vložený do sušiarne na 24 hodín. Tento krok slúžil na zjednodušenie centrifugácie, pretože bez zahriatia nebolo možné, aby sa biomasa dokonale centrifugovala ani pri vysokých otáčkach a nízkej teplote v centrifúge.

#### **Zloženie minerálneho média č. 1:**

(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	3 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,02 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O	11.1 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,063 g
Destilovaná voda	1000 ml

#### **Zloženie roztoku stopových prvkov č.1:**

FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	9,7 g
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	7,8 g
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,156 g

CoCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,119 g
NiCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	0,118 g
0,1 M HCl	1000 ml

Kultivácia bakteriálneho kmeňa *Delftia acidovorans* CCM 2410: zložky média boli navážené podľa zloženia minerálneho média č. 2 na 100 ml. Médium bolo sterilizované minimálne 30 minút v tlakovom hrnci s uzavretým ventilom. Počas sterilizácie bol pri teplote 16°C a pri 4000 rfc centrifugovaný celý objem, 100 ml, inokula č. 2. Do minerálneho média bola sterilne premiestnená celá centrifugovaná biomasa, 10 g/l uhlíkového substrátu a 0,1 ml roztoku stopových prvkov č. 2. Hotové produkčné médium bolo ponechané na temperovanej trepačke pri 30°C a 160 rpm na dobu 48 hodín.

**Zloženie minerálneho média č. 2 [24]:**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,8 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,1mM
Destilovaná voda	1000 ml

**Zloženie roztoku stopových prvkov č.2 [24]:**

FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	2,78 g
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	1,98 g
CoSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	2,81 g
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	1,67 g
CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,17 g
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,29 g
0,1M HCl	1000 ml

Kultivácia bakteriálneho kmeňa *Delftia acidovorans* DSM 39 a CCM 283: zložky média boli navážené podľa zloženia minerálneho média č. 3 do objemu 100 ml. Následne bolo upravené pH minerálneho média na hodnotu 7 pomocou 30% roztoku hydroxidu sodného. Pripravené médium bolo sterilizované minimálne 30 min. v tlakovom hrnci so zatvoreným ventilom. Po vychladnutí bolo do minerálneho média pipetovaných 0,1 ml roztoku stopových prvkov č. 3, 10 g/l uhlíkového substrátu a 10 ml inokula (podľa zloženia inokula č. 1). Hotové produkčné médium bolo ponechané na temperovanej trepačke pri teplote 30°C a 160 rpm na dobu 72 hodín.

**Zloženie minerálneho média č. 3 [51]:**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O	7,16 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,65 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1 g
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	1 g
Kyselina citrónová	5 g

**Zloženie roztoku stopových prvkov č.3 [51]:**

CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,217 g
FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,0162 g
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,0078 g
NiCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,118 g
CrCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,135 g
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,156 g
0,1 M HCl	1000 ml

Minerálne médium použité na dvojstupňovú kultiváciu bakteriálneho kmeňa *Azohydromonas lata* CCM 4448: médium a roztok stopových prvkov boli pripravené podľa dodacieho listu, priloženého k bakteriálnym kmeňom z českej zbierky mikroorganizmov. Médium bolo pripravené do Erlenmeyerových baniek na objem 100 ml. Citrát železito amónny bol rozpustený v 2 ml vody a sterilizácia prebiehala oddelene od ostatných zložiek média. Po sterilizácii bol do roztoku pridaný citrát železito amónny, 0,5 ml/100 ml TES roztoku a uhlíkový zdroj (glukóza a butan-2,4-diol v rôznych pomeroch) v celkovej koncentrácii 10 g/l. Po 72 hodinách kultivácie boli z tejto kultúry zaočkované nové Petriho misky a celý proces od inokula cez minerálne médium sa opakovával s použitím kultúry na nových Petriho miskách. Po takej kultivácii bola dosiahnutá vyššia optická hustota a z kultúry mohlo byť izolované malé množstvo polyméru.

**Zloženie minerálneho média č. 4:**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O	2,9 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,3 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,5 g
NH <sub>4</sub> Cl	1 g
NaHCO <sub>3</sub>	0,5 g
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,01 g
Citrát železito- amónny	0,05 g
Destilovaná voda	980 ml

**Zloženie roztoku stopových prvkov č.4:**

ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	0,03 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,3 g
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,2 g
CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,01 g
NiCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,02 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,03 g
Destilovaná voda	1000 ml

**3.2.4 Kultivácia bakteriálneho kmeňa v bioreaktore**

Pre kultiváciu v bioreaktore bola vybraná len bakteriálna kultúra *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19378 z dôvodu, že táto konkrétna baktéria mala už optimalizované média pre produkciu

mikroorganizmov v rámci inej diplomovej práce. Cieľom kultivácie bolo porovnanie produkcie PHA v prostredí bioreaktoru a v Erlenmeyerových bankách.

Prvým krokom pri kultivácii v bioreaktore je príprava inokula. V tomto konkrétnom prípade to bol bioreaktor s objemom 2 l, ktorý je potrebné naplniť vždy maximálne do  $\frac{3}{4}$  objemu a preto bol kultivačný objem všetkých komponentov dohromady 1,5 l. Inokulum tvorilo 10 % celkového objemu, teda 150 ml. Zloženie a príprava sú popísané v kapitole 3.2.2. (zloženie inokula č. 1). Minerálne médium bolo pripravené priamo v nádobe bioreaktoru podľa kapitoly 3.2.3. (zloženie minerálneho média č. 1 a zloženie roztoku stopových prvkov č.1). Po namiešaní minerálneho média bol pridaný  $\gamma$ -butyrolaktón v koncentrácii 10 g/l a 1,5 ml roztoku stopových prvkov. Po skompletizovaní roztoku bol bioreaktor dôkladne uzavretý a sterilizovaný v autokláve. Po sterilizácii sa bioreaktor zapol, pripojili sa pH sonda, miešanie, aerácia, teplotný detektor a zaočkovovalo sa 150 ml inokula. Kultivácia prebiehala pri 30 °C, pH 7 a pri koncentrácii rozpusteného kyslíka 20 %. Počas kultivácie bol 2 krát pridaný protipenivý prípravok a po 12 hodinách kultivácie bolo pridaných ďalších 10 g/l  $\gamma$ -butyrolaktónu a teda finálna koncentrácia uhlíkového substrátu bola 20 g/l. Kultivácia prebiehala celkovo 23 hodín a pH bolo regulované na stabilnej hodnote 7 pomocou prítoku 30% NaOH a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Počas kultivácie boli prvých 12 hodín odoberané vzorky každé 3 hodiny a po noci boli odobraté ešte v čase 21 a 23 hodiny kultivácie. Vzorky sa odobrali vždy paralelne do dvoch 10 ml centrifugačných skúmaviek a bola na nich odmeraná optická hustota, ďalej boli vzorky použité pre gravimetrické stanovenie biomasy, vid' kapitola 3.3.1 a analýzu pomocou plynovej chromatografie.

### **3.2.5 Optimalizácia produkcie polyméru kmeňom *Delftia acidovorans* CCM 2410 pomocou analýzy vplyvu koncentrácie kyslíka**

Predpokladalo sa, že koncentrácia jednotiek 3HB a 4HB môže byť ovplyvňovaná koncentráciou kyslíka prítomného pri kultivácii. Pre tento pokus bolo použitých šesť 500 ml Erlenmeyerových baniek v ktorých bol rôzny objem minerálneho média od 50 do 300 ml. Tým, že médium v banke siahalo do rôznej výšky, bola tu aj rôzna koncentrácia kyslíka. Ostatné kroky kultivácie boli rovnaké ako štandardná kultivácia kmeňa CCM 2410 uvedená v kapitole 2.3.2.

### **3.2.6 Optimalizácia produkcie polyméru kmeňom *Delftia acidovorans* CCM 2410 pomocou analýzy vplyvu koncentrácie inokula**

Pre kultiváciu kmeňa CCM 2410 bola použitá 2 stupňová kultivácia inokula pričom štandardne sa v druhom kroku pridávali 3 obj.% prvého inokula. V tomto pokuse boli otestované rôzne očkovacie koncentrácie prvého inokula. Príprava začala rovnako ako štandardná príprava podľa postupu v kapitole 3.2.2. Prvé inokulum bolo pripravené z kryoskúmavky alebo z Petriho misky. Po 24 hodinách bol pripravený roztok na druhé inokulum, ktorý obsahoval aj glukózu (zloženie inokula č. 2, kapitola 3.2.2.). Do piatich 100 ml roztokov sterilného média bolo postupne očkované 1,3,5,7 a 9 ml z prvého inokula a ďalej prebiehala kultivácia podľa štandardného postupu pre daný bakteriálny kmeň.

### **3.3 Základná charakterizácia biomasy a izolácia PHA**

#### **3.3.1 Stanovenie biomasy gravimetrickou metódou**

Po každej bakteriálnej kultivácii bolo odobratých 10 ml do presne zváženej centrifugačnej skúmavky. Biomasa bola podľa konkrétnej potreby daného bakteriálneho kmeňa stočená na centrifúge. Číry roztok, ktorý zostával nad biomasou bol vyliaty a k biomase bola pipetovaná voda, v ktorej sa za pomoci vortexu biomasa znovu uvoľnila zo steny skúmavky a bolo možné prečistiť ju pomocou ďalšej centrifugácie. Tento postup bol opakovaný ešte raz. Po centrifugácii bola biomasa ponechaná v sušiarňi na 70°C až do úplného vysušenia. Následne bola skúmavka znovu zvážená a bolo vypočítané množstvo biomasy v roztoku v g/l.

#### **3.3.2 Stanovenie obsahu polyméru v biomase pomocou plynovej chromatografie**

Množstvo polyméru v biomase a zastúpenie monomérov v PHA boli zisťované pomocou plynovej chromatografie. Postup nadväzoval na stanovenie biomasy gravimetrickou metódou, kapitola 3.3.1. Vysušená biomasa bola presne vážená na analytických váhach v rozmedzí 9-10 mg do krimpovacej vialky, k biomase bol pipetovaný 1 ml chloroformu a 0,8 ml transesterifikačnej zmesi ( 15% roztok kyseliny sírovej v methanole s vnútorným štandardom 5 mg/ml kyseliny benzoovej). Vialky boli zatvorené a ponechané na 3 hodiny v termostate pri teplote 100 °C kde prebieha hydrolýza PHA a esterifikácia za vzniku príslušných methylestrov. Po 3 hodinách boli vialky pred otvorením ochladené na laboratórnu teplotu, aby sa zamedzilo úniku prchavých látok. Počas chladnutia bolo do väčších šrubovacích vialiek pipetovaných 0,5 ml 0,05 M roztoku NaOH a pridá sa do nich celý obsah z krimpovacej vialky po esterifikácii. Vialka sa zašraubuje, pretrepe a nechá sa rozdeliť. Do menšej šrubovacej vialky sa pipetuje 950 µl chloroformu a 50 µl spodnej chloroformovej fázy, ktorá vznikla po extrakcii. Táto vialka sa jemne zašraubuje a týmto je pripravená na analýzu pomocou plynovej chromatografie.

#### **3.3.3 Stanovenie optickej hustoty bakteriálnych kultúr**

Počas optimalizácií kultivačných médií bola vzorka odoberaná každých 24 hodín. Po optimalizácii všetkých podmienok kultivácie sa vzorka odoberala až po ukončení kultivácie. Z kultúry bol v sterilných podmienkach odobratý 1 ml, ten bol podľa potreby riedený najčastejšie 5 krát a na spektrofotometrii bola zmeraná optická hustota pri 600 nm. Ako blank bola použitá destilovaná voda.

#### **3.3.4 Izolácia vyprodukovaného P(3-HB-co-4-HB)**

Po ukončení kultivácie bol roztok s biomasou niekoľko krát zamrazený a rozmrazený z dôvodu, že vznikajúce kryštáliky vody rozrušovali cytoplazmatickú membránu, vďaka čomu sa následne mohol polymér jednoduchšie uvoľňovať z bunky. Po finálnom rozmrazení bola biomasa centrifugovaná. Baktéria *Cupriavidus malaysiensis* DSM19379 sa centrifugovala pri otáčkach 10 000 rpm po dobu 10 min len raz bez prečistenia. Ostatné 4 bakteriálne kmene boli centrifugované pri nižších otáčkach 8 000 rpm, rovnako dlhú dobu. Následne bola stočená biomasa ešte 2 krát rozmiešaná v destilovanej vode a znovu cetrifugovaná, aby došlo k jej prečisteniu od zvyškov produkčného média. Biomasa sa z centrifugačných nádob premiestnila do 250 ml Erlenmeyerových baniek, bola zaliata približne 200 ml etanolu a uzatvorená tak, aby

sa zabránilo úniku prchavých látok. Erlenmeyerova banka bola 24 hodín purifikovaná na magnetickej miešačke. Po 24 hodinách sa suspenzia filtrovala na Büchnerovom lieviku za zníženého tlaku. Filtrát mohol byť zlikvidovaný a filtračný koláč obsahujúci biomasu s polymérom bol naspäť premiestnený do 250 ml Erlenmeyerovej banky, zaliaty približne 200 ml chloroformu a uzavretý. Táto biomasu v chloroforme bola opäť ponechaná na magnetickej miešačke na 24 hodín. Po uplynutí tohto času bola suspenzia za stáleho miešania zahrievaná. Ohrev prebiehal až do varu chloroformu a pri danej teplote bola suspenzia udržiavaná 30 minút. Týmto krokom bolo docielené rozpustenie uvoľneného polyméru v chloroforme a roztok dostal hnedú farbu a slizkú konzistenciu. Po prevarení bola suspenzia filtrovaná na Büchnerovom lieviku za zníženého tlaku do etanolu. Filtračný koláč sa po filtrovaní vrátil naspäť do Erlenmeyerovej banky a postup s chloroformom sa opakoval až pokiaľ nezostali po filtrácii len suché a sypké kúsky biomasy. Vo filtráte bol viditeľný polymér, ktorý bol vyzrážaný vďaka etanolu. Tento filtrát sa nechal odparovať, poprípade bola použitá elektrická odparka. Po dôkladnom vysušení a odparení bol vyizolovaný polymér zväžený a mohol byť použitý na ďalšie analýzy.

### **3.4 Základná charakterizácia pripravených PHA**

#### **3.4.1 Veľkostne vylučovacia chromatografia s detektorom statického rozptylu svetla vo viacerých uhloch ( SEC- MALS)**

Priemerné molekulové hmotnosti a polydisperzita izolovaných polymérov boli analyzované pomocou veľkostne vylučovacej chromatografie. Vzorka polyméru bola navážená do šrubovacej vialky a bolo k nej napipetované 1,5 ml chloroformu (HPLC kvalita) v koncentracii 4 mg/ml. Vialka bola uzatvorená a umiestnená do termobloku na 70 °C, po niekoľkých minútach sa vialka pretrepala a vizuálne bolo skontrolované úplné rozpustenie polyméru. Po schladení na laboratórnu teplotu boli vzorky podrobené analýze, na nástrek na kolónu bolo použitých 100 µl roztoku a analýza prebiehala pri prietoku 0,6 µl/min.

#### **3.4.2 Diferenciálna skenovacia kalorimetria (DSC)**

Pomocou tejto metódy boli pozorované teplota topenia, entalpia topenia, skelný prechod a kryštalinita polyméru. Bolo na to použité malé množstvo polyméru, ktoré bolo umiestnené do hliníkovej misky s viečkom a analýza prebiehala v cykloch. V prvom cykle bola vzorka zahrievaná od teploty 25 °C do 190 °C, druhý cyklus predstavovalo chladenie z 190 °C na -60 °C a tretí cyklus bolo opätovné zahriatie na 190 °C. Rýchlosť zahrievania bola vždy 10 °C/min a medzi cyklami bola teplota podržaná na konštantnú hodnotu po dobu 1 minúty.

#### **3.4.3 Termogravimetrická analýza (TGA)**

Metóda využívaná na štúdium priebehu termolýzy a horenia polymérov, pri ktorom sa sledujú zmeny hmotnosti pri tepelnom namáhaní. Na analýzu bolo použité malé množstvo vzorky, ktorá bola uložená do hliníkovej nádoby a zahrievaná rýchlosťou 10 °C/min od teploty 25 °C až po teplotu 500 °C. Pomocou tohto merania bola zisťovaná tepelná stabilita získaných vzoriek PHA, počiatočná teplota rozkladu ( $T_d$ ) stanovená z termogravimetrickej krivky a teplota, pri ktorej rýchlosť rozkladu dosahovala maximum ( $T_{max}$ ) bola stanovená z termogravimetrickej krivky derivovanej podľa teploty s percentuálnou hodnotou hmotnosti na ose Y.



#### 3.4.4 Infračervená spektrometria (FT-IR)

Týmto meraním bola stanovená chemická štruktúra izolovaných PHA. Vzorky boli merané pomocou ATR FTIR, čo predstavuje infračervenú spektrometriu s Fourierovou transformáciou meranú metódou zoslabeného úplného odrazu na jedno odrazovom diamantovom nadstavci. Spektrum bolo merané v oblasti od 4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$  pri laboratórnej teplote a výsledná štruktúra bola porovnávaná s hodnotami dostupnými v odbornej literatúre.

#### 3.4.5 Spracovanie vyprodukovaného P(3-HB-co-4-HB) do podoby filamentu

Touto metódou je základný materiál zmiešaný v tavenine s aditívami za vzniku homogénnej zmesi. Polymér bol spracovaný pomocou DSM Xplore Micro Compounder s dvomi súhlasnými šnekmi a 15 ml zmiešavacou komorou. Bakteriálnym kmeňom *Cupriavidus malaysiensis* DSM19379 bolo naprodukované dostatočné množstvo polyméru pre spracovanie do podoby filamentu. Izolovaný, vysušený polymér bol nastrihaný na malé kúsky s približným priemerom 0,5 cm. Na jeden filament bolo použitých 10 g polyméru, ten bol nadávkovaný do Micro Compondera pri teplote 165 °C pri otáčkach 50 rpm pomocou násypky. Po nadávkovaní sa násypka vytiahla, zložila sa zátka a otáčky boli zvýšené na 100 rpm po dobu 5 minút, aby sa zabezpečila dôkladná homogenizácia celej zmesi. Po 5 minútach boli otáčky opäť znížené na 50 rpm a bola otvorená vypúšťacia komora, z ktorej sa extrudoval polymér. Hrúbka filamentu bola regulovaná ručne navíjaním na uzatvorenú valcovitú nádobu naplnenú studenou vodou. Voda zabezpečila rýchlejšie chladenie filamentu, ktorý sa po stuhnutí vložil do zatváracieho vrecúška, aby sa nachádzal v prostredí s konštantnou vlhkosťou. Pri nesprávnom uchovávaní by sa mohli meniť vlastnosti vytvoreného filamentu.

#### 3.4.6 Mechanické ťahové skúšky polyméru

Mechanické ťahové skúšky polyméru boli stanovované na vzorkách izolovaných z bakteriálneho kmeňa *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379 a konkrétne na filamente z tohto polyméru. Kus filamentu s dĺžkou približne 10 cm bol pripevnený z oboch koncov do Dynamometra Instron 4310, ktorý je určený na testovanie mechanických vlastností materiálov v ťahu. Po zapnutí začal dynamometer polymér naťahovať až do momentu pretrhnutia. Z merania bolo možné stanoviť Youngov modul, pevnosť v ťahu a dĺžkové predĺženie pri pretrhnutí.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

### 4.1 Výber vhodného kultivačného média pre jednotlivé bakteriálne kmene

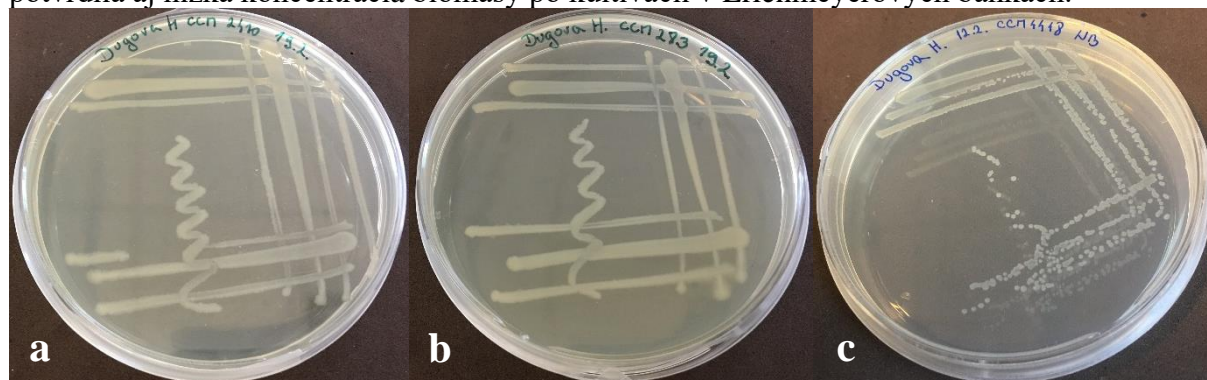
Pre diplomovú prácu boli vybrané 3 bakteriálne kmene z českej zbierky mikroorganizmov, ktorých kultiváciu bolo potrebné optimalizovať. Ďalej bol používaný kmeň *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379, ktorého kultivácia a produkcia už boli optimalizované a bol využitý hlavne pre vysokú výťažnosť PHA. S odstupom času bol doobjednaný a otestovaný ešte jeden bakteriálny kmeň DSM 19379.

Cieľom bolo izolovať a charakterizovať PHA z každého z týchto kmeňov. Ako prvé bolo testované zloženie inokula, minerálneho média a roztoku stopových prvkov, ktoré boli priložené v dodacom liste baktérií. Ako je možné vidieť v Tabuľka 2 2, na kultiváciu bolo použité inokulum č. 1 a inokulum č. 3. U všetkých troch baktérií sa ukázalo ako vhodnejšie inokulum č. 1, keďže dosahovali vyššiu výťažnosť biomasy a tiež vyšší zákal ktorý sa prejavil na hodnote absorbancie. Pri prvej kultivácii bolo pozorované, že bakteriálny kmeň CCM 4448 sa od ďalších dvoch kmeňov výrazne odlišuje nižšou produkciou biomasy, ale hlavne nižším zákalom kultivačného média. Ako zdroj uhlíka bol zvolený butan-1,4-diol v koncentrácii 10g/l, pretože práve táto látka predstavuje jeden z možných substrátov pre bakteriálnu produkciu poly(3hydroxybutyrát-co-4hydroxybutyrátu).

Tabuľka 2: Hodnoty absorbancie a koncentrácia biomasy u vybraných bakteriálnych kultúr; I1: inokulum č.1; I3: inokulum č.3; MM4: minerálne médium č. 4

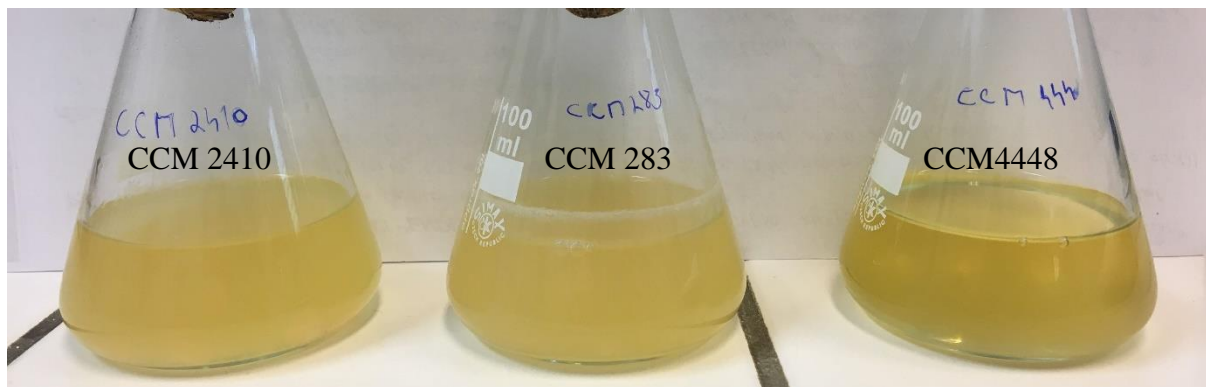
Bakteriálny kmeň	Kultivácia	Butan-1,4-diol (g/l)	Biomasa (g/l)	A <sub>600nm</sub> 24 hod.	A <sub>600nm</sub> 48 hod.	A <sub>600nm</sub> 72 hod.
CCM 283	I1; MM4	10	0,23	0,753	0,8	0,782
CCM 2410	I1; MM4	10	0,42	0,856	0,971	1,032
CCM 4448	I1; MM4	10	0,13	0,661	0,726	0,539
CCM 283	I3; MM4	10	0,14	0,386	0,434	0,485
CCM 2410	I3; MM4	10	0,33	0,588	0,699	0,811
CCM 4448	I3; MM4	10	-	0,01	0,019	0,044

Nižšia aktivita kmeňa CCM 4448 bola pozorovaná aj na Petriho miskách, kde boli baktérie očkované krížovým rozterom. Na obrázku 7 a a b sú bakteriálne kmene CCM 2410 a CCM 283, ktoré tvorili na agarovej platni hladké plynulé kolónie a boli vhodné na uchovávanie v chladničke ako základ pre očkovanie inokula. Na druhú stranu, kmeň CCM 4448 na obrázku c tvoril len malé množstvo kolónií vo väčšej vzdialenosti od seba, čo potvrdila aj nízka koncentrácia biomasy po kultivácii v Erlenmeyerových bankách.



Obrázok 7: Bakteriálne kultúry na Petriho miskách; a: CCM 2410; b: CCM 283; c: CCM4448

Výsledky z tabuľky 2 bolo možné jednoducho potvrdiť vizuálne, ihneď po kultivácií, čo je zobrazené na obrázku 8. Na prvý pohľad sa dá odlíšiť, že produkcia bakteriálneho kmeňa CCM 4448 bola od ďalších dvoch kmeňov nižšia. Tento kmeň bol ďalej kultivovaný s použitím glukózy a až potom sa pridával butan-1,4-diol, čo je bližšie popísané v kapitole 4.3. Taktiež sa na plynovej chromatografii nepreukázala schopnosť využitia jednotky 4HB a preto bol kmeň CCM 4448 z ďalšej optimalizácie vyradený.



Obrázok 8: Zákal minerálneho média po ukončení kultivácie troch bakteriálnych kmeňov

Minerálne médium č. 4 (MM4), priložené k dodaciemu listu nebolo konkrétne prispôbené na produkciu žiadanej PHA, preto boli vyhľadované ďalšie možnosti kultivácie. Kultivácie ďalej prebiehali podľa zloženia inokula č. 1 a podľa zloženia minerálneho média č. 2,3 a 4.

Minerálne médium č. 2 bolo použité 2 rôznymi spôsobmi. Najskôr sa na kultiváciu využilo 10 % inokula, čo predstavovalo na 100 ml média 10 ml inokula. Týmto postupom však bola dosiahnutá len veľmi nízka koncentrácia biomasy u oboch testovaných bakteriálnych kmeňov. Druhý postup bol zvolený prenesením celej hmotnosti biomasy z inokula do minerálneho média popísaný v kapitole 3.2.3. Po využití tohto postupu bol zaznamenaný výrazný nárast koncentrácie biomasy u všetkých testovaných kultúr.

Ďalšie testované bolo minerálne médium č. 3 (MM3). Toto médium sa podľa koncentrácie biomasy ukázalo ako veľmi účinné pre bakteriálny kmeň CCM 283 a DSM 39 a bolo pripravované podľa kapitoly 3.2.3.

Tabuľka 3: Výber najvhodnejšieho minerálneho média pre kultiváciu rôznych bakteriálnych kmeňov

Bakteriálny kmeň	Kultivácia	inokulum (%)	Butan-1,4-diol (g/l)	Biomasa (g/l)	Riedenie	A <sub>600nm</sub>
CCM 283	I1; MM2	10	10	0,19	-	0,496
CCM 283	I1; MM2	100	10	1,39	5x	0,599
CCM 283	I1; MM3	10	10	2,05	5x	0,473
CCM 283	I1; MM4	10	10	0,23	-	0,8
CCM 2410	I1; MM2	10	10	-	-	0,591
CCM 2410	I1; MM2	100	10	1,44	5x	0,674
CCM 2410	I1; MM3	10	10	0,78	5x	0,207
CCM 2410	I1; MM4	10	10	0,42	-	0,971
DSM 39	I1; MM2	100	10	1,22	5x	0,129
DSM 39	I1; MM3	10	10	1,4	5x	0,552

Postupným testovaním a kultiváciami baktérií na rôznych minerálnych médiách bolo pre každý bakteriálny kmeň vybrané jedno médium, ktoré bolo využívané na jeho kultiváciu s cieľom izolovať čo najvyššie množstvo PHA. Zeleno vyznačené riadky v tabuľke 3 ukazujú aké kultivačné médiá boli vybrané pre jednotlivé kmene. Najvýraznejšie zakalenie a teda aj hodnotu absorbancie dosahoval kmeň CCM 2410, koncentrácia biomasy u vybraného média MM2 predstavovala 1,44 g/l. Ďalšie dva bakteriálne kmene dosahovali vyššiu koncentráciu u MM3 a to 1,4 g/l u DSM 39 a 2,05 g/l u CCM283.

Bakteriálnemu druhu *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379 bolo od začiatku priradené MM1, ktoré už bolo optimalizované a dosahovalo vysokú koncentráciu biomasy okolo 4,0 g/l a zakalenie produkčného média čím prevyšuje všetky ostatné testované kmene.

#### 4.2 Kultivácia bakteriálneho kmeňa *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379

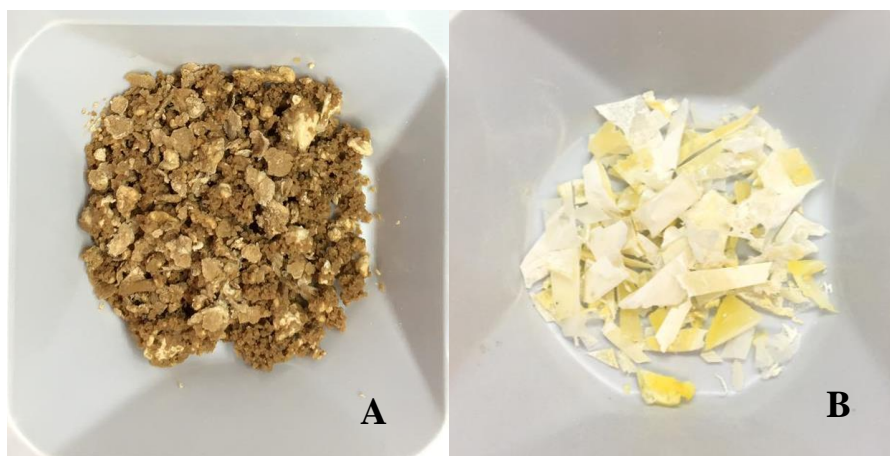
Bakteriálny kmeň *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379 bol vybraný a otestovaný študentkou Ing. Kateřinou Drábkovou v diplomovej práci s názvom Biotechnologická produkcia PHA pomocou *Cupriavidus malaysiensis*; 2019. Tento kmeň bol vybraný znovu, pretože podľa dostupnej literatúry dosahuje jednu z najvyšších produkcií P(3HB-co-4HB) a vďaka tomu sa dalo izolovať dostatočné množstvo polyméru na vytvorenie viacerých filamentov.

Kultivácia začala podľa postupu popísaného v kapitole 3.2.2, inokulum č. 1 a pokračovala podľa kapitoly 3.2.3, minerálne médium č. 1. V rámci projektu ORION bolo cieľom izolovať aspoň 30 g P(3HB-co-4HB), kultivácia preto prebiehala v 25 Erlenmeyerových bankách s objemom média 200 ml. Zákal minerálneho média na konci kultivácie je zachytený na obrázku 9. Kultúra mala po kultivácii výrazný kyslo- mliečny pach.



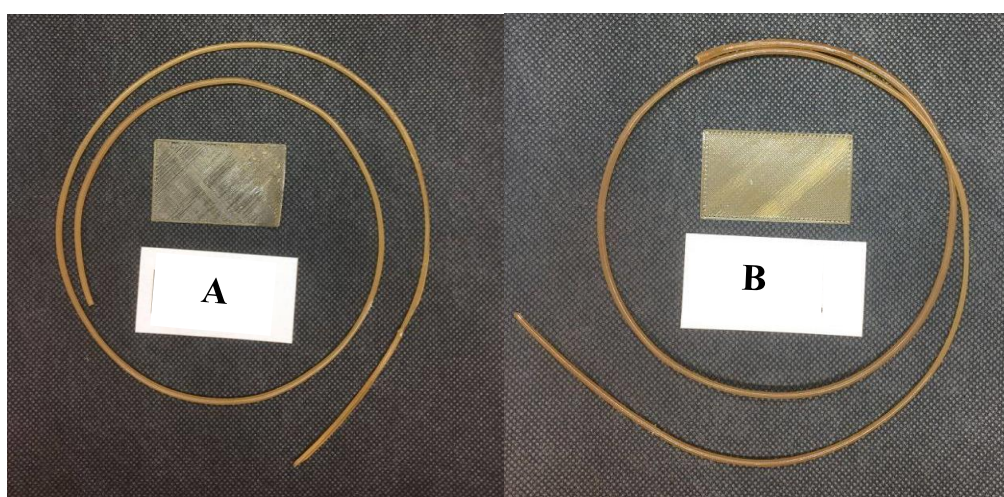
Obrázok 9: Kultivácia kmeňa DSM 19379

Po niekoľkých opakovaní a príprave približne 20 litrov kultúry prebehla izolácia PHA podľa postupu v kapitole 3.3.4 a tak bol dosiahnutý cieľ 30 g kopolyméru. Na Obrázok 10 A je možné vidieť zbytok biomasy po izolácii PHA a na obrázku B je izolovaný polymér. Polymér má na obrázku bielu aj žltú farbu to je spôsobené tým, že väčšie množstvá polyméru izolované v prvé dva dni boli sušené pomocou elektrickej odparky, ktorá bola zahrievaná a PHA mal po úplnom vysušení nažltnúť farbu. Izolácia, ktorá prebiehala na 3 deň obsahovala už len malé množstvo polyméru a preto sa nechala voľne odpariť v digestori pri laboratórnej teplote a polymér zostal čisto biely.



Obrázok 10: : Biomasa(A) a PHA izolované (B) z bakteriálneho kmeňa DSM 19379

Izolovaný polymér bol v rámci projektu ORION ďalej použitý na vytvorenie 4-filamentov podľa kapitoly 3.4.5. Filamenty boli vyrobené s cieľom použitia filamentu do 3D tlačiarne na vytvorenie scaffoldu z biodegradovateľného materiálu. Fyzikálne vlastnosti izolovaného polyméru sa dostatočne odlišovali od tuhého a krehkého P3HB, aj keď zastúpenie jednotky 4HB v kopolyméri predstavovalo len približne 10 hm. %. Na obrázku 11 je možné vidieť dva pripravené filamenty. Filament A obsahuje prídavok plniva, antioxidačného činidla aj zmäkčovadla a filament B obsahuje len plnivo a antioxidačné činidlo. Fyzikálne vlastnosti pripravených filamentov je možné porovnať s čistým P3HB, napríklad dĺžkové predĺženie pri pretrhnutí u P3HB má hodnotu 5 %, pevnosť v ťahu je 43 MPa a kryštalinitu má okolo 60 %. Hodnota dĺžkového predĺženia pri pretrhnutí u izolovaného P(3HB-co-4HB) dosiahlo priemernú hodnotu až 1521 %, pevnosť v ťahu sa znížila až na 18,8 MPa a kryštalinita po tepelnom spracovaní do podoby filamentu klesla na 15 %, i keď samotný izolovaný polymér mal kryštalinitu 28 %. Tým bolo potvrdené, že už pri malom prídavku jednotky 4HB, sa z tuhého a krehkého materiálu akým je P3HB stáva jemnejší a flexibilnejší materiál s možným využitím do 3D tlače.



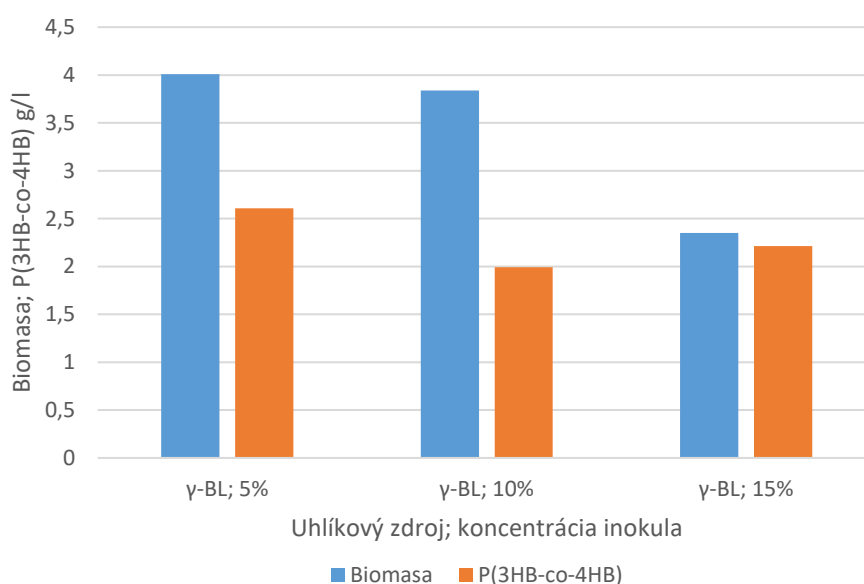
Obrázok 11: Filamenty vytvorené z PHA izolovaného z bakteriálneho kmeňa DSM 19379

#### 4.2.1 Vplyv koncentrácie inokula na produkciu polyméru pri použití dvoch rôznych zdrojov uhlíka

Na kultiváciu bakteriálnej kultúry boli použité dva rôzne druhy uhlíkového substrátu, prvým z nich bol 1,4-butandiol a druhým  $\gamma$ -butyrolaktón. Oba tieto substráty boli vybrané podľa literatúry ako prekursor tvorby kopolyméru P(3HB-co-4HB). Pri využití glukózy, ktorá predstavuje najčastejšie využívaný zdroj uhlíka nie je bakteriálny kmeň schopný tvoriť jednotku 4HB.

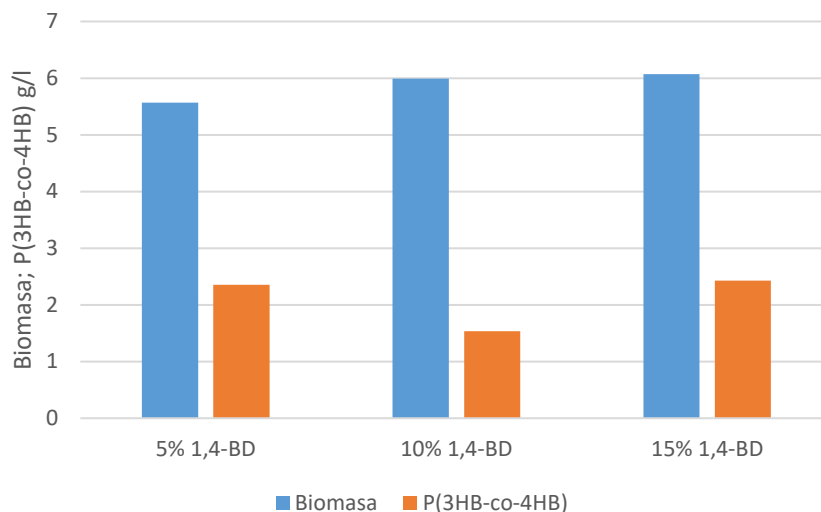
Inokulum bolo pripravené podľa kapitoly 3.2.2, zloženie inokula č.1. Kultivácia prebiehala v 250 ml Erlenmeyerových bankách, do ktorých sa pripravilo 100 ml minerálneho média. Koncentrácia uhlíkového substrátu pre tento bakteriálny kmeň bola vždy pri kultivácii v Erlenmeyerových bankách  $8 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Do minerálneho média bolo za sterilných podmienok pipetovaných 5, 10 a 15 % inokula a to pre oba uhlíkové substráty. Dohromady mal teda tento experiment 6 vzoriek.

Prvý testovaný uhlíkový zdroj bol  $\gamma$ -butyrolaktón, na obrázku 12 je možné vidieť porovnanie koncentrácie biomasy a naprodukovaného PHA na konci kultivácie. Minerálne médium bolo v tomto prípade zaočkované 5 %, 10 % alebo 15 % inokula. Ako je možné vidieť, koncentrácia inokula nemala výrazný vplyv na koncentráciu polyméru pretože jeho koncentrácia sa pohybovala od 2,0 g/l do 2,6 g/l. Na druhú stranu koncentrácia biomasy bola najvyššia pri použití 5% inokula. Ako najvýhodnejšia koncentrácia inokula bola vybraná hodnota 5 % pri ktorej boli najvyššie výt'azky.



Obrázok 12: Koncentrácia biomasy a PHA pri použití  $\gamma$ -butyrolaktónu ako uhlíkového zdroja a rôznej koncentracii inokula

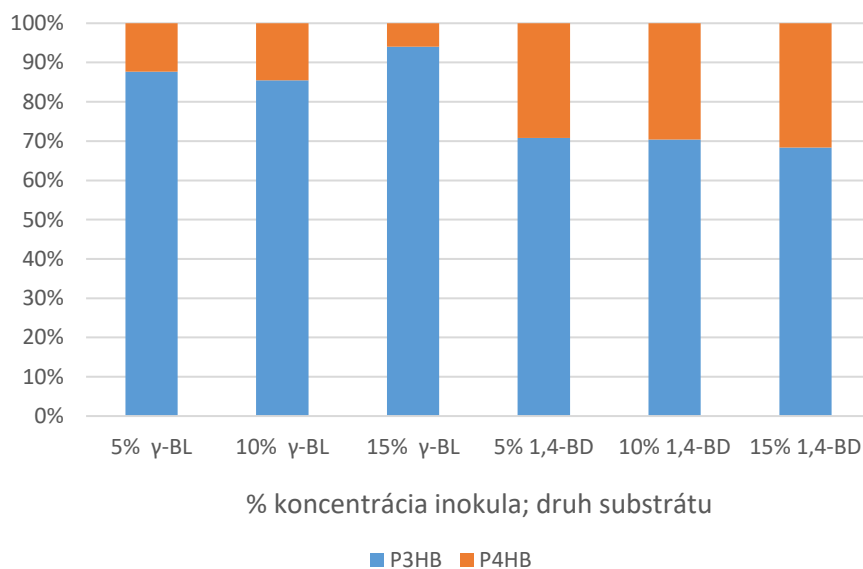
Druhým testovaným uhlíkovým zdrojom bol butan-1,4-diol, ktorý bol rovnako ako  $\gamma$ -butyrolaktón pridaný do minerálnych médií s 3 rôznymi koncentraciami inokula. V tomto prípade bol pozorovaný rozdiel hlavne v koncentracii biomasy, ktorá vzrástla až na 6,1 g/l, na druhú stranu koncentrácia PHA bola pri použití butan-1,4-diolu o niečo nižšia a to od 1,5 g/l do 2,4 g/l. Z Obrázok 13 13 je teda možné určiť, že najvhodnejšia koncentrácia inokula pri použití butan-1,4-diolu je 15 %.



Obrázok 13: Koncentrácia biomasy a PHA pri použití 1,4-butandiolu ako uhlíkového zdroja a rôznej koncentrácii inokula

Po analýze vysušenej biomasy na plynovej chromatografii bol zistený jeden výraznejší rozdiel medzi dvomi použitými uhlíkovými substrátmi. Na obrázku 14 je viditeľný rozdiel v percentuálnom zastúpení jednotiek 3HB a 4HB. Zatiaľ čo pri použití  $\gamma$ -butyrolaktónu ( $\gamma$ -BL) bola koncentrácia jednotky 4HB v rozmedzí od 5 % do 14 %, pri použití butan-1,4-diolu (1,4-BD) sa koncentrácia jednotky 4HB zvýšila až na 30 % a pri použití všetkých troch koncentrácií inokula bol pomer medzi jednotkami 3HB a 4HB veľmi podobný.

Výsledkom tohto experimentu teda je, že výhodnejší uhlíkový zdroj na produkciu 4HB je butan-1,4-diol, no vyššia koncentrácia PHA bola dosiahnutá pomocou  $\gamma$ -butyrolaktónu.



Obrázok 14: Percentuálne zastúpenie jednotiek 3HB a 4HB pri použití dvoch uhlíkových substrátov a rôznej koncentrácii inokula;

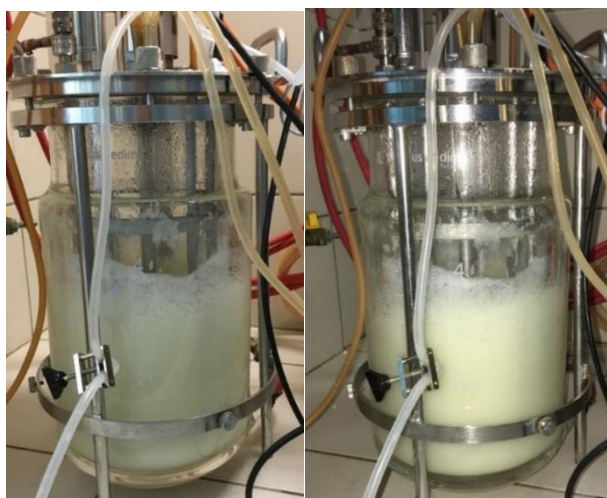
#### 4.2.2 Kultivácia v bioreaktore

Keďže bakteriálny kmeň DSM 19379 sa v Erlenmeyerových bankách ukázal ako výborný producent PHA, bola otestovaná aj kultivácia v bioreaktore. Postup prípravy je uvedený v kapitole 3.2.4. Vzorky z kultivácie boli na začiatku odobierané každé 3 hodiny a cez noc vznikla 9 hodinová medzera počas ktorej sa vzorky neodoberali. Z bioreaktoru bolo odobratých vždy 2 x 10 ml za sterilných podmienok, aby nedošlo ku kontaminácii obsahu bioreaktoru. Výsledky z analýzy odobratých vzoriek sú zobrazené v tabuľke 4. Pri vzorkách odobratých v čase 0 a 3 hodiny chýbajú informácie o PHA, je to z toho dôvodu, že v odobratom množstve média ešte nebolo dostatočné množstvo biomasy, ktorá by mohla byť použitá na plynovú chromatografiu.

Tabuľka 4: Analýza biomasy bakteriálneho kmeňa DSM 19379 po kultivácii v bioreaktore

čas [hod]	biomasa [g/l]	PHA [g/l]	PHA hm. %	3HB [%]	4HB [%]	Riedenie	A <sub>600nm</sub>
0	0,08	-	-	-	-	-	0,582
3	0,33	-	-	-	-	2x	0,58
6	1,14	0,10	8,46	82,74	17,26	10x	0,356
9	4,7	0,45	9,57	86,78	13,22	10x	0,914
12	14,76	0,79	5,36	45,01	54,99	20x	0,569
21	7,38	2,07	28,08	93,06	6,94	50x	0,411
23	20,47	0,52	12,33	46,71	53,29	50x	0,431

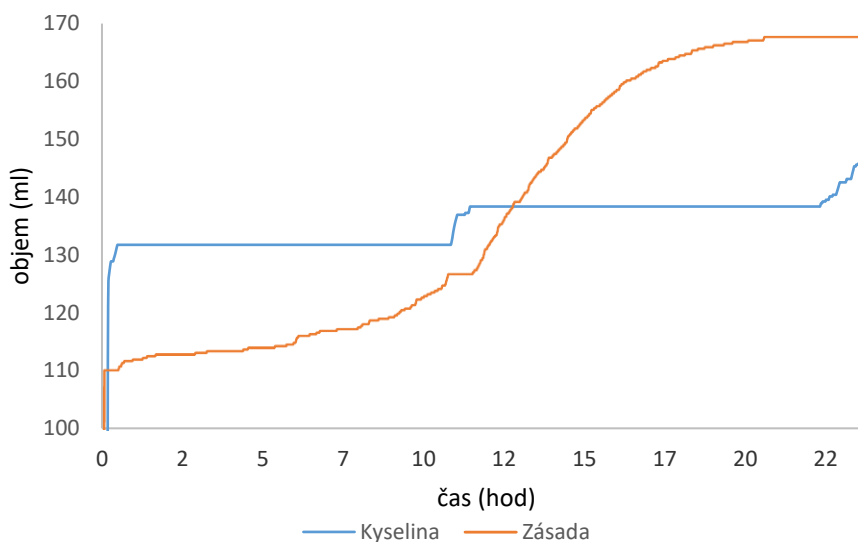
Kultivácia v bioreaktore sa od vsádzkovej kultivácie v bankách odlišovala v koncentracii uhlíkového substrátu. Do bioreaktoru bol pridaný  $\gamma$ -butyrolaktón 10g/l dva krát, na začiatku kultivácie a po 11 hodinách, zakalenie média je možné vidieť na Obrázok 15. Rovnako bolo 2 krát pridané aj činidlo proti peneniu, prvý raz po 10 hodinách a druhý raz po 12 hodinách kultivácie. Ďalším rozdielom bola veľmi vysoká optická hustota a koncentrácia biomasy. V tabuľke 4 je možné vidieť, že biomasa dosiahla na konci kultivácie koncentráciu až 20,47 g/l čo predstavuje 6,5 násobný nárast oproti Erlenmeyerovým bankám. Ale žiaľ, koncentrácia PHA výrazne klesla až na 0,52 g/l z pôvodných 2,6 g/l. To indikuje, že kopolymér bol spotrebovaný ako zdroj energie. Posledným rozdielom bola výrazná zmena sensorických vlastností suspenzie, ktorá mala na konci kultivácie veľmi sladký pach.



Obrázok 15: Kultivácia bakteriálneho kmeňa DSM 19379 v bioreaktore v čase 0hod. a v čase 23hod.

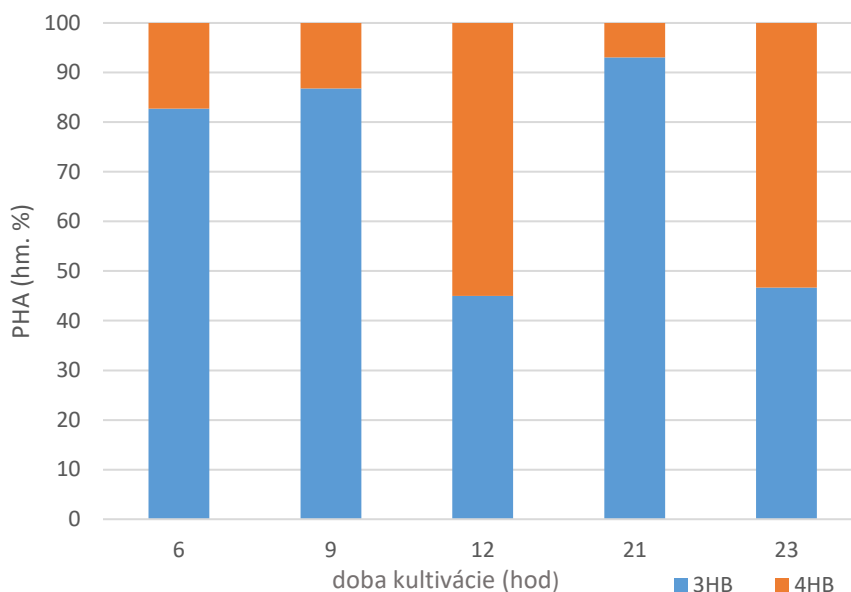


Počas kultivácie v bioreaktore bola po celú dobu sledovaná a regulovaná hodnota pH a hodnoty sa zaznamenávali každú minútu. Pri odchýlení pH od hodnoty 7,0 sa automaticky pridávala kyselina alebo zásada. Na Obrázok 16 je zaznamenaná táto úprava pH v čase. Prvotný skok v čase 0 ukazuje úpravu pH na požadovanú hodnotu. Po prvých 15 minútach sa hodnota ustálila a do sterilného média bolo pridané inokulum.



Obrázok 16: Udržiavanie pH počas kultivácie v bioreaktore, zaznamenané prídavky kyseliny a zásady v čase

Bakteriálny rast má vždy pri kultivácii niekoľko krokov. Prvým je lag fáza, v ktorej sa kultúra prispôbuje prostrediu a nedochádza k takmer žiadnemu rastu. Tejto fáze podľa nízkych prídavkov zásady odpovedá prvých 6-8 hodín. Toto tvrdenie potvrdzuje aj koncentrácia biomasy, ktorá do 6 hodín bola okolo 1,1 g/l a až potom sa začala zvyšovať. Dlhé trvanie lag fázy je pre kultiváciu nežiadúce, pretože počas nej ešte nedochádza k produkcii PHA. Po lag fáze nastupuje fáza zrýchleného rastu počas ktorej sa bakteriálna kultúra množí najvyššou rýchlosťou. Nasleduje exponenciálna fáza, ktorej však predchádzal prídavok  $\gamma$ -butyrolaktónu. Tento uhlíkový substrát nárazovo znížil pH v bioreaktore, preto bola v čase 11 hodín zaznamenaná skoková zmena prídavkov kyseliny a zásady. V exponenciálnej fáze došlo k výraznému nárastu produkcie biomasy až na 14,8 g/l a zásada bola pridávaná vo väčšom množstve, môže za to tvorba kyslých metabolitov. Koncentrácia PHA v exponenciálnej fáze bola 0,8 g/l. Medzi 18 a 20 hodinou kultivácie dochádzalo postupne k spomaleniu rastu baktérií za čo mohlo postupné vyčerpanie uhlíkového substrátu. Po približne 20 hodinách kultivácie teda začala stacionárna fáza, v ktorej začína hladovanie a postupné odumieranie baktérií, rovnako dochádza k tvorbe sekundárnych metabolitov mikroorganizmov a preto bola koncentrácia PHA počas stacionárnej fázy 2,1 g/l. Poslednou fázou ktorú je možné pozorovať na obrázku 16 je odumieranie kultúry, ktoré sa dá identifikovať pridávaním kyseliny v čase 22,5 hodiny. Počas tejto fázy dochádza k hladovaniu a teda aj spotrebovávaniu PHA, ktoré bunky majú ako zásobnú látku a do média sa dostávajú zásadité bázické splodiny rozpadnutých bakteriálnych buniek. Koncentrácia PHA po ukončení kultivácie zase klesla na 0,5 g/l.

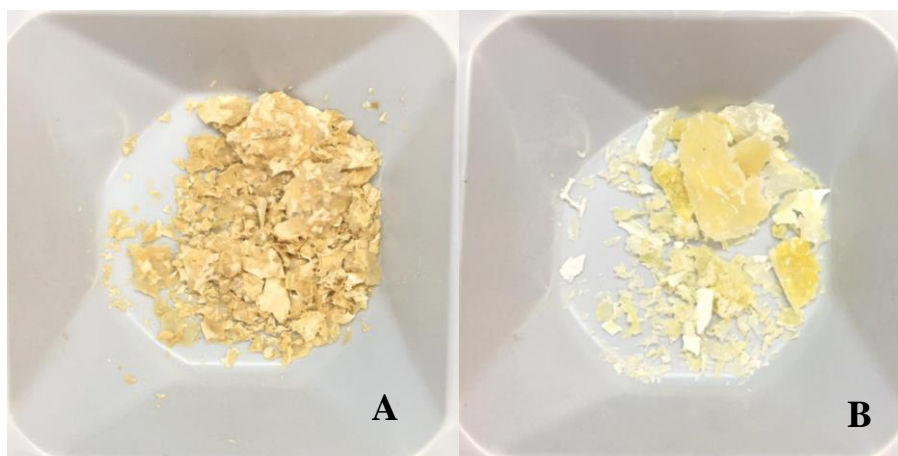


Obrázok 17: Zastúpenie jednotiek 3HB a 4HB v PHA pri kultivácii v bioreaktore

Počas kultivácie bakteriálneho kmeňa DSM 19379 bolo v odobratých vzorkách sledované aj zloženie PHA, to je možné vidieť na obrázku 17. Prvá vzorka analyzovaná na plynovom chromatografe bola odobratá v čase 6 hodín. V tomto čase bola ešte koncentrácia PHA veľmi nízka a vyššie zastúpenie mala jednotka 3HB. Po 9 hodinách kultivácie bolo zloženie veľmi podobné, no koncentrácia PHA sa zvýšila z 0,1 g/l na 0,4 g/l. Po 12 hodinách je možné pozorovať výrazný nárast koncentrácie jednotky 4HB až na 55 %, táto skutočnosť mohla byť zapríčinená prídavkom  $\gamma$ -butyrolaktónu po 11 hodinách kultivácie. V 21 hodinách kultivácie bola koncentrácia PHA najvyššia no vyššie zastúpenie mala zase jednotka 3HB. Na konci kultivácie už dochádzalo k postupnému spotrebovaniu PHA hladujúcimi baktériami čo mohlo zapríčiniť pokles zastúpenia jednotky 3HB, ktorá mohla byť metabolizovaná ako prvá. Keďže PHA sú intracelulárne sekundárne metabolity bola ich koncentrácia v stacionárnej fáze najvyššia, ale pravdepodobne po nedostatočnom množstve uhlíka v médiu, došlo k spotrebe PHA ako zdroj energie.

Výsledná podoba izolovaného polyméru a zbytku biomasy sú zobrazené na obrázku 18. Biomasa na obrázku A sa morfológicky výrazne odlišovala od biomasy, ktorá zostala po izolácii polyméru kultivovaného v Erlenmeyerových bankách. Biomasa z bioreaktoru mala oveľa bledšiu farbu aj keď sa jednalo o jeden a ten istý bakteriálny kmeň. Rozdielna bola aj izolácia PHA, biomasa rozmiešaná v chloroforme sa výrazne zložitejšie filtrovala a aj na niekoľko pokusov nebolo možné dostať z nej celý obsah PHA. Kým u kultivácie v Erlenmeyerových bankách bola biomasa na konci izolácie v podobe suchých tmavých zhlukov tak biomasa z bioreaktoru zostala na filtračnom papieri ako kompaktná lepkavá hmota. Na druhú stranu izolovaný polymér bol na prvý pohľad totožný s polymérom z vsádzkovej kultivácie.

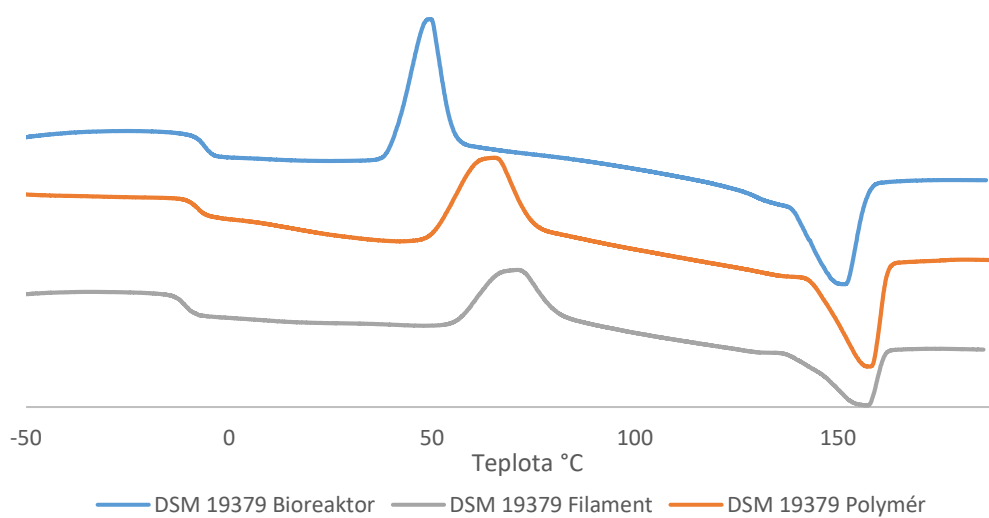
Produkcia polyméru v bioreaktore sa v tomto prípade ukázala ako menej účinná ako kultivácia v bankách, keďže chod bioreaktoru je energeticky náročný a zastúpenie PHA v biomase bolo nízke a izolácia mala zložitejší priebeh.



Obrázok 18: Biomasa(A) a PHA izolované (B) z bakteriálneho kmeňa DSM 19379 po kultivácii v bioreaktore

#### 4.2.3 Výsledky z DSC, TGA analýzy

Polyméry izolované z baktérie *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379 boli dostupné na analýzu v troch podobách. Prvý bol PHA izolovaný po kultivácii v Erlenmeyerových bankách, druhý bol filament vytvorený z tohto polyméru a tretí bol PHA izolovaný po kultivácii v bioreaktore. Tieto tri formy polyméru boli testované na diferenciálnej skenovacej kalorimetrii, termogravimetrickej analýze a veľkostne vylučovacej chromatografii, aby bolo možné porovnať ich vlastnosti.



Obrázok 19: DSC analýza PHA produkovaného jedným bakteriálnym kmeňom v rôznych formách

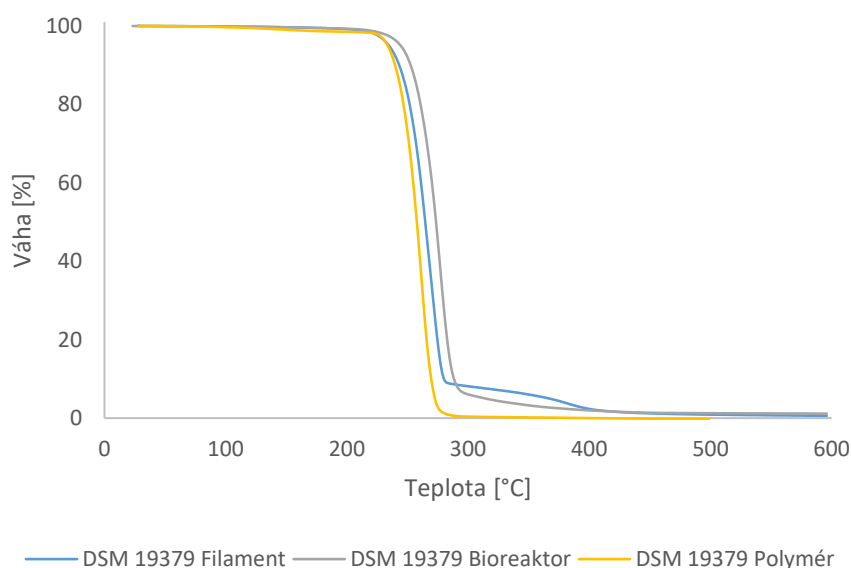
Tabuľka 5 zobrazuje hodnoty teploty topenia ( $T_m$ ), enthalpie topenia ( $\Delta H_m$ ), teploty studenej kryštalizácie ( $T_{cc}$ ), entalpie studenej kryštalizácie a výslednej sumy enthalpie ( $\Sigma H$ ). Výsledná suma enthalpie poukazuje na hodnotu a zmenu stupňa kryštalinity vo vzorke. Keď porovnáme teploty topenia u kopolyméru izolovaného z produkcie v Erlenmeyerových bankách a v bioreaktore, tak kopolymér izolovaný z bioreaktora má o  $6^\circ\text{C}$  nižšiu teplotu topenia, čo je ovplyvnené rozdielnym pomerom monomérnych jednotiek v kopolyméri. Teplota topenia vzorky filamentu sa od teploty topenia kopolyméru z Erlenmeyerových baniek takmer nelíši, čo súvisí z jeho pôvodom. Filament bol pripravený z kopolyméru kultivovaného v Erlenmeyerových bankách. Najväčší rozdiel zaznamenaný medzi týmito troma vzorkami bol v teplote studenej kryštalizácie, čo súvisí s rozdielnou kinetikou kryštalizácie vzoriek.

Výsledná hodnota enthalpie,  $\Sigma H$ , sa odlišuje výraznejšie kvôli rozdielnemu zloženiu kopolymérov a ich spracovaniu v prípade filamentu, ktorý už prešiel teplotnou úpravou počas spracovania v tavenine. Molekulová hmotnosť bola najvyššia pri vzorke z bioreaktora, čo mohlo byť zapríčinené vyššou prítomnosťou jednotky 4HB v polyméri. Po spracovaní polyméru do podoby filamentu molekulová hmotnosť klesla, no rozdiel bol iba 12,5 kDa, vďaka tomu môžeme predpokladať, že nedošlo k výraznej degradácii polyméru. Stupeň polydisperzity dosahoval najvyššiu hodnotu zase u vzorky izolovanej z bioreaktora a rovnako ako u molekulovej hmotnosti to mohlo byť zapríčinené vyššou koncentráciou jednotky 4HB a rôzne dlhými reťazcami PHA.

Tabuľka 5: Výsledky z DSC, TGA a SEC-MALS analýz na PHA izolovanom z jedného bakteriálneho kmeňa;  $T_m$ : teplota topenia;  $\Delta H_m$ : entalpia topenia;  $T_{cc}$ : teplota studenej kryštalizácie;  $X_c$ : kryštalinita;  $T_d$ : teplota degradácie;  $T_{max}$ : teplota degradácie s najvyššou rýchlosťou rozkladu polyméru;  $M_w$ : molekulová hmotnosť;  $D$ : polydisperzita

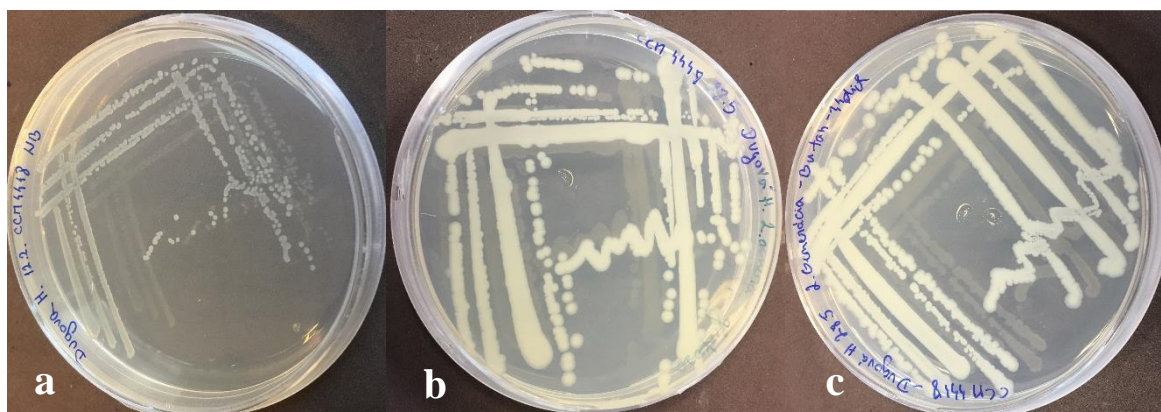
Vzorka	DSC 2 ohrievací cyklus						TGA		SEC-MALS	
	$T_m$ [°C]	$\Delta H_m$ [J/g]	$T_{cc}$ [°C]	$\Delta H_{cc}$ [J/g]	$\Sigma H$ (J/g)	$T_g$ [°C]	$T_d$ [°C]	$T_{max}$ [°C]	$M_w$ [kDa]	$D$
PHA banky	158	27,6	65	35,9	-8,3	-7,5	245	261	365,5	1,31
PHA bioreaktor	152	37,6	49	32,6	5,0	-6,2	259	277	601,9	1,74
Filament	157	20	71	25,9	-5,9	-10,8	249	269	353	1,26

Výsledky z termogravimetrickej analýzy sú zobrazené na obrázku 20. Hodnoty sú veľmi podobné. Najnižšia odolnosť voči teplotnému pôsobeniu bola pri vzorke izolovanej z kultivácie v bankách pretože teplota degradácie bola 245 °C, teplota degradácie u vzorky z biorektora bola vyššia o 14 °C. V porovnaní s čistým polymérom P3HB, ktorý má teplotu degradácie okolo 270 °C mali izolované kopolyméry nižšiu tepelnú odolnosť.



Obrázok 20: TG analýza PHA produkovaného jedným bakteriálnym kmeňom v rôznych formách

### 4.3 Kultivácia bakteriálneho kmeňa CCM 4448



Obrázok 21: Kmeň CCM 4448; a: 1 generácia; b: 2. generácia na glukóze; c: 2. generácia na butan-1,4-diol

Kultivácia bakteriálneho kmeňa CCM 4448 prebiehala opakovane veľmi neúspešne a pomocou uhlíkových prekursorov vhodných na produkciu jednotky 4HB nebolo možné dosiahnuť výraznejší rast bakteriálnej kultúry. Pri použití glukózy ako uhlíkového substrátu sa podarilo dosiahnuť vyšší zákal kultivačného média a tiež vyššiu koncentráciu biomasy. Keď už bola kultúra životaschopná bolo pripravené minerálne médium č. 4 podľa kapitoly 3.2.3. Do média boli zaočkované tri rôzne typy inokula. Prvé bolo považované za prvú generáciu a bolo očkované z kryoskúmavky, druhé bolo z Petriho misky a bola to kultúra, ktorá už raz prešla rastom na glukóze a tretie inokulum bolo tiež z Petriho misky na ktorú bola očkovaná kultúra kultivovaná na butan-1,4-diole. Druhé a tretie inokulum boli v tomto prípade považované za druhú generáciu pretože štandardne sa Petriho misky očkujú z 24 hodinového inokula, no v týchto dvoch prípadoch bola na Petriho misky zaočkovaná kultúra z minerálneho média na konci kultivácie.

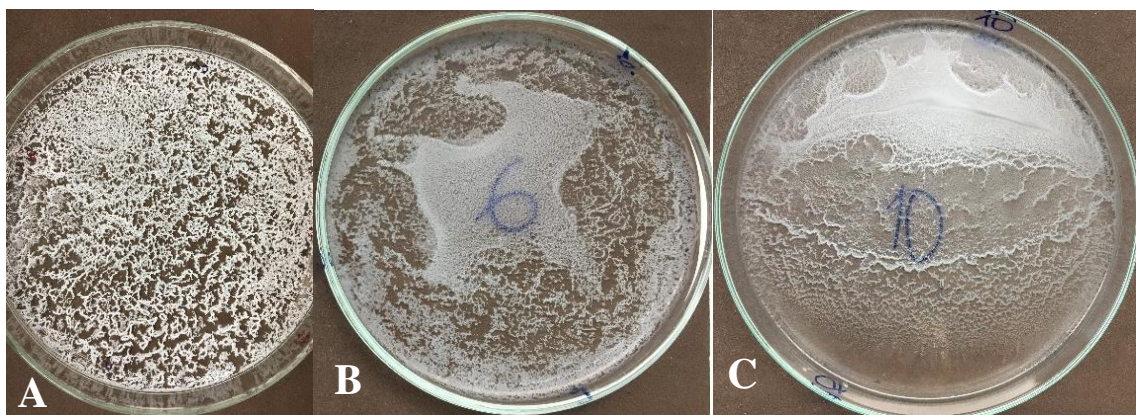
Na obrázku 21 je vidieť rozdiel v životaschopnosti kultúry, na obrázku a je kultúra zaočkovaná z inokula vytvoreného z kryoskúmavky. Druhé dve sú vyššie popísané kultúry druhej generácie očkované z minerálneho média.

Tabuľka 6: Rôzne kultivačné techniky použité na bakteriálny kmeň CCM4448, výsledky koncentrácie biomasy po kultivácii a hodnoty absorbancie bakteriálnych kultúr po kultivácii ( I1: inokulum č.1; GLU: glukóza; 1,4-BD: butan-1,4-diol, MM4: minerálne médium č. 4; kryo: kultúra z kryoskúmavky)

Kultivácia	Pôvod	Glukóza (g/l)	Butan-1,4-diol (g/l)	Biomasa g/l	Riedenie	A <sub>600nm</sub> 48 hodín
I1; MM4	1. generácia	10	0	1,7	10x	0,579
I1 kryo; MM4	1. generácia	2	8	1	5x	0,545
I1 kryo; MM4	1. generácia	4	6	1,97	10x	0,658
I1 kryo; MM4	1. generácia	6	4	0,92	5x	0,667
I1 kryo; MM4	1. generácia	8	2	0,52	5x	0,399
I1 GLU; MM4	2. generácia	2	8	0,89	5x	0,9
I1 GLU; MM4	2. generácia	4	6	1,68	10x	0,76
I1 GLU; MM4	2. generácia	6	4	1,53	10x	0,673
I1 GLU; MM4	2. generácia	8	2	1,55	10x	0,722
I1 1,4-BD; MM4	2. generácia	2	8	0,68	5x	0,89
I1 1,4-BD; MM4	2. generácia	4	6	1,77	10x	0,729
I1 1,4-BD; MM4	2. generácia	6	4	1,2	10x	0,747
I1 1,4-BD; MM4	2. generácia	8	2	0,91	10x	0,636

Keďže bakteriálny kmeň dosahoval vyššiu optickú hustotu pri použití glukózy ako uhlíkového substrátu tak boli na experiment použité rôzne pomery uhlíkových substrátov, uvedené v tabuľke 6. Kultivácie prebiehali 48 hodín a následne boli odobrané vzorky na gravimetrické stanovenie biomasy. Po dokonalom vysušení a zvážení biomasy bolo viditeľné, že najlepšie výsledky namnoženia bakteriálneho kmeňa boli dosiahnuté pri kombinácii 4 g/l glukózy + 6 g/l butan-1,4-diolu. Vzorky ktoré mali stanovenú koncentráciu biomasy na viac ako 1 g/l boli navážené a podľa kapitoly 3.3.2 boli pripravené na analýzu pomocou plynovej chromatografie. Výsledky však ukázali, že vzorky obsahujú len malé množstvo jednotky 3 HB a to maximálne v koncentracii 0,1 g/l a jednotka 4HB nebola vo vzorkách zastúpená vôbec. Počas toho ako prebiehala analýza na plynovej chromatografii bol z biomasy izolovaný polymér. Polymér sa podarilo izolovať z troch vzoriek, všetky tri boli kultivované na kombinácii uhlíkového substrátu 4 g/l glukózy a 6 g g/l butan-1,4-diol. Po izolácii bol polymér v roztoku etanolu a chloroformu ponechaný pri laboratórnej teplote v Petriho miskách. Po odparení a dôkladnom vysušení vytvorili polyméry nesúvislý povlak čisto bieleho polyméru zobrazený na obrázku 22. Polymér bol z Petriho misiek opatrne zoškrabaný špachtľou, zvážený a použitý na diferenciálnu skenováciu kalorimetriu a na stanovenie molekulovej hmotnosti. Izolovaný polymér z bakteriálneho kmeňa CCM 4448 mal váhu maximálne okolo 10 mg na 100 ml minerálneho média. Toto množstvo nebolo dostatočné na vykonanie ďalších analýz ako je termogravimetrické stanovenie alebo infračervená spektrometria.

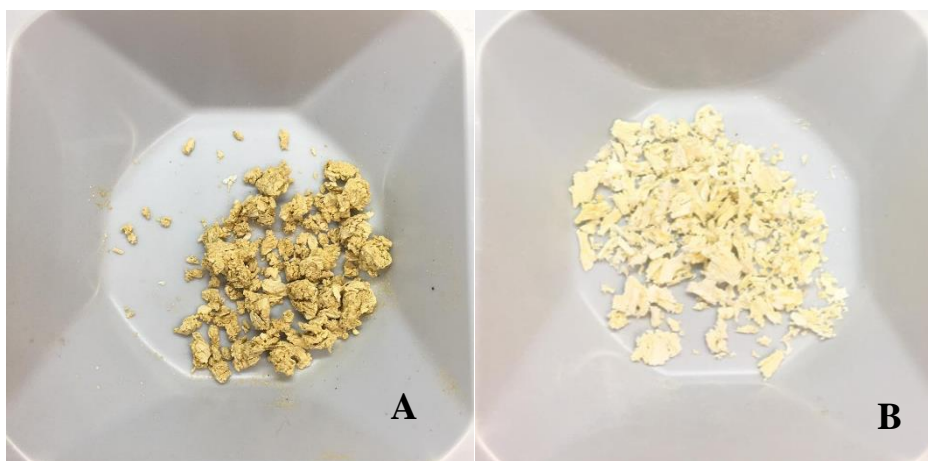
Kultivácia daného bakteriálneho kmeňa bola týmto experimentom ukončená, keďže mal najnižšie koncentrácie biomasy zo všetkých testovaných kmeňov a na plynovej chromatografii sa nepreukázala schopnosť utilizovať jednotku 4HB.



Obrázok 22: polymér izolovaný z bakteriálneho kmeňa CCM 4448; A: II kryo MM4; B: II GLU MM4; C: II 1,4-BD MM4

#### 4.4 Kultivácia bakteriálneho kmeňa *Delftia acidovorans* CCM 2410

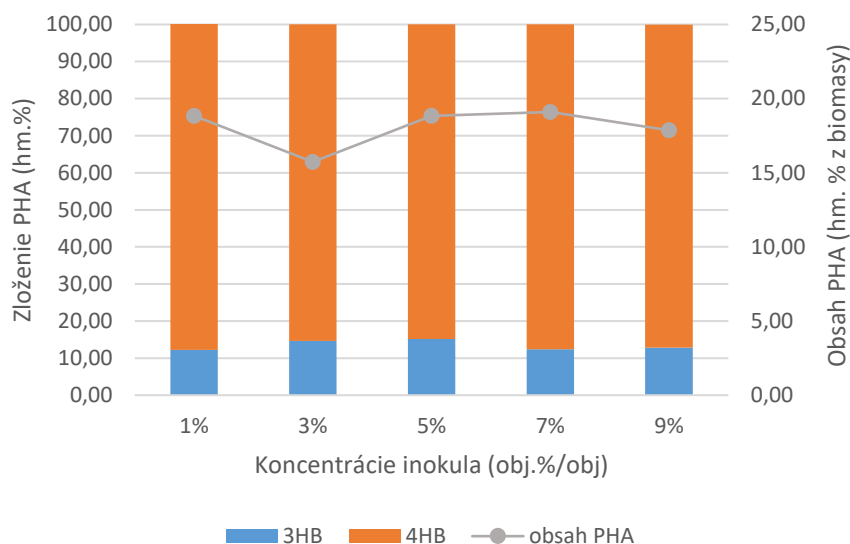
Pre bakteriálny kmeň CCM 2410 bolo vybrané vhodné médium na kultiváciu v kapitole 4.1. Tento kmeň mal zo všetkých testovaných baktérií najvyššie zastúpenie jednotky 4HB a to približne 80- 90 hm. %. Množstvo polyméru v celkovej hmotnosti suchej biomasy bolo okolo 17 hm. % čo v priemere predstavovalo 0,27 g/l. Izolácia polyméru prebiehala podľa postupu uvedeného v kapitole 3.3.4 a biomasa začala po dvoch opakovaníach procesu izolácie tvoriť suché zhluky. Tým že biomasa sa po izolácii zmenila na suchú hmotu dalo sa predpokladať, že celý obsah polyméru sa podarilo izolovať. V prípade, že by biomasa zostala tekutá a lepkavá izolácia by pokračovala. Izolovaný P(3HB-co-4HB) mal po dôkladnom vysušení čisto bielu farbu ako ukazuje Obrázok 23 B. Polymér bol po izolácii charakterizovaný pomocou diferenciálnej skenovacej kalorimetrie, termogravimetrickej analýzy, infračervenej spektroskopie a bola stanovená molekulová hmotnosť pomocou veľkostne vylučovacej chromatografie.



Obrázok 23: Biomasa(A) a PHA izolované (B) z bakteriálneho kmeňa CCM 2410

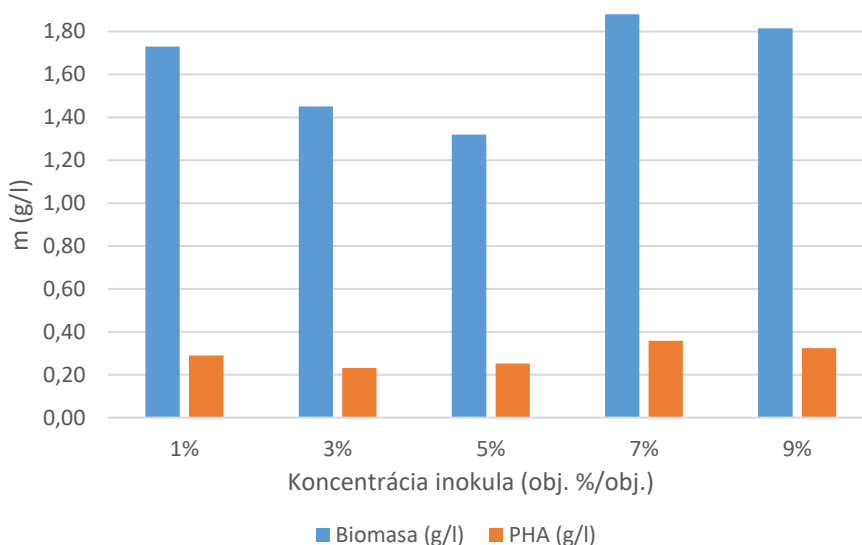
##### 4.4.1 Analýza vplyvu koncentrácie inokula

Podľa postupu k minerálnemu médiu č. 4 boli pri kultivácii použité 3 ml inokula č. 1 s optickou hustotou  $A = 2,0$  na zaočkovanie inokula č.2 podľa kapitoly 3.2.2. V tomto experimente boli otestované aj ďalšie koncentrácie inokula. Do 100 ml minerálneho média boli postupne pipetované 1,3,5,7 a 9 ml inokula č. 2. Po ukončení kultivácie boli odobraté vzorky biomasy a obsah polyméru bol stanovený gravimetricky a plynovou chromatografiou. Na obrázku 24 je možné vidieť že zastúpenie monomérskej jednotky 3HB a jednotky 4HB sa pri zmene koncentrácie použitého inokula takmer nelíšilo a na výsledné vlastnosti polyméru nemalo vplyv. Podobne to bolo s koncentraciou celkového PHA v biomase, ktorá bola najnižšia pri použití 3 % inokula a ostatné koncentrácie vychádzali opäť veľmi rovnako. Tým, že rozdiely medzi jednotlivými vzorkami boli príliš malé, bolo možné zliať všetky nakultivované roztoky do jedného, vďaka čomu bol dosiahnutý vyšší finálny objem kultúry na izoláciu polyméru. Izolácia pri použití väčšieho objemu prebiehala jednoduchšie, u malých objemov bolo náročné premiestniť vždy kvantitatívne celú biomasu z centrifugačnej skúmavky, poprípade rozmiešať dokonale celú hmotnosť v chloroforme bez toho, aby biomasa nezostávala na stenách použitého laboratórneho skla.



Obrázok 24: Vplyv koncentrácie inokula na zloženie a obsah PHA

Koncentrácia použitého inokula síce nemala vplyv na koncentráciu monomérnych jednotiek, ale koncentrácia biomasy mala najvyššiu hodnotu pri použití 7 % inokula. Podobná hodnota bola nameraná aj pri použití 9 % inokula, tým pádom aj najvyššia koncentrácia PHA bola nameraná pri použití 7 % inokula a bolo to 0,36 g/l P(3HB-co-4HB). Pre kultiváciu s cieľom izolovať čo najvyššie množstvo biomasy a PHA bola vybraná koncentrácia 7 %. Podľa optickej hustoty vykazovala najvyššiu hodnotu absorpcie pri 5 násobnom zriedení vzorka s 9 % inokulom a to  $A = 0,740$  a najnižšiu absorpciu mala vzorka s použitím 1 % inokula  $A = 0,55$ . Absorbancia vzoriek tu mala vzostupný charakter. Experiment nakoniec ukázal, že aj keď sa na očkovanie minerálneho média pri kultivácii kmeňa CCM 2410 používa celá hmotnosť centrifugovanej biomasy, tak koncentrácia bakteriálnych buniek použitých na zaočkovanie inokula nemá na finálny produkt takmer žiadny vplyv.



Obrázok 25: Vplyv koncentrácie inokula na produkciu PHA



#### 4.4.2 Analýza vplyvu koncentrácie kyslíka

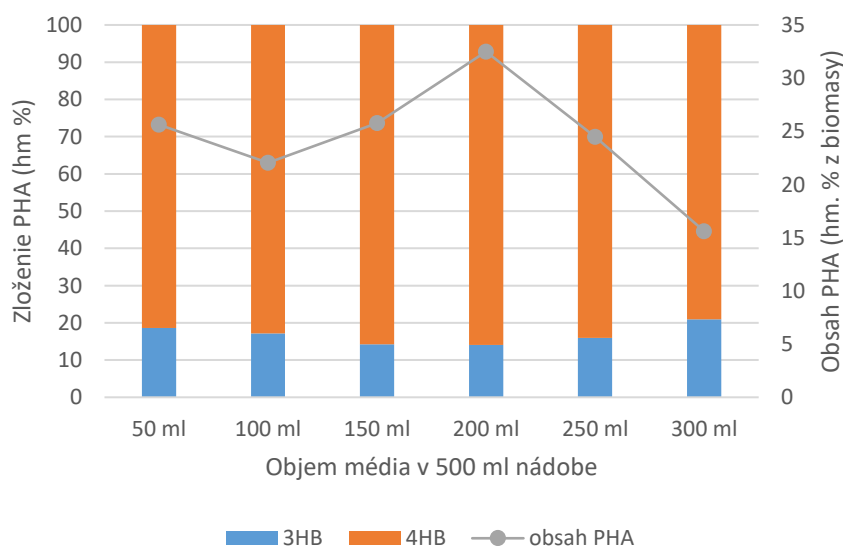
Koncentrácia dostupného kyslíka je pre kultiváciu aeróbných bakteriálnych kultúr nevyhnutný faktor a podľa toho bol navrhnutý ďalší experiment. Príprava experimentu je popísaná v kapitole 3.2.6. Kultivácia všetkých 6 vzoriek prebiehala v rovnakých 500 ml nádobách, ktoré boli uzavreté po celú dobu kultivácie. Po 42 hodinách a ukončení kultivácie boli odobraté vzorky a po vysušení biomasy bolo analyzované gravimetrické stanovenie biomasy a rozbor polyméru pomocou plynovej chromatografie.

Výsledky gravimetrického stanovenia biomasy ukázali u prvých dvoch vzoriek koncentráciu biomasy nižšiu ako je 1 g/l. Koncentrácia biomasy sa vzostupne zvyšovala s pribúdajúcim objemom v jednotlivých vzorkách. Najvyššia koncentrácia biomasy bola teda u vzorky, ktorá mala v 500 ml banke objem média 300 ml.

Percentuálny hmotnostný podiel PHA na suchú hmotnosť biomasy a v tomto prípade aj celková koncentrácia PHA mala najvyššiu hodnotu u vzorky, ktorá obsahovala 200 ml média v 500 ml banke. Táto vzorka mala 0,34 g/l polyméru čo predstavovalo 32,5 % z hmotnosti biomasy. Naopak najnižšie množstvo PHA bolo stanovené na prvé 2 vzorky s najnižším objemom média, kedy bola koncentrácia PHA len 0,13 g/l a 0,17 g/l a podobne na tom bola aj posledná vzorka s objemom 300 ml média a s koncentráciou PHA 0,24 g/l.

Na Obrázok 26 je možné vidieť, že zastúpenie monomérnych jednotiek 3 HB a 4HB vo výslednom polyméri je opäť veľmi podobné tak ako aj u predchádzajúceho experimentu. Z toho dôvodu bolo opäť možné všetky vzorky zmiešať a izolovať súčasne. Pri detailnejšom rozbere je ale možné vidieť, že najvyššie zastúpenie jednotky 4HB je vo vzorke obsahujúcej 200 ml média v 500 ml banke. V tejto vzorke mala jednotka 4HB 85,9 hm.%. Naopak najnižšia koncentrácia jednotky 4 HB bola pri poslednej vzorke obsahujúcej 300 ml média a to 79 %.

Z tohto experimentu je možné určiť, že najlepšia je vzorka obsahujúca 200 ml média v 500 ml Erlenmeyerovej banke. Pre ďalšie kultivácie s cieľom produkovať čo najväčšie množstvo polyméru bol ďalej používaný už len tento objem. Po vybratí najvhodnejšieho média a kultivačného postupu bol vždy tento postup niekoľkokrát zopakovaný s cieľom izolovať dostatočné množstvo polyméru potrebné na jeho charakterizáciu pomocou rôznych analýz.

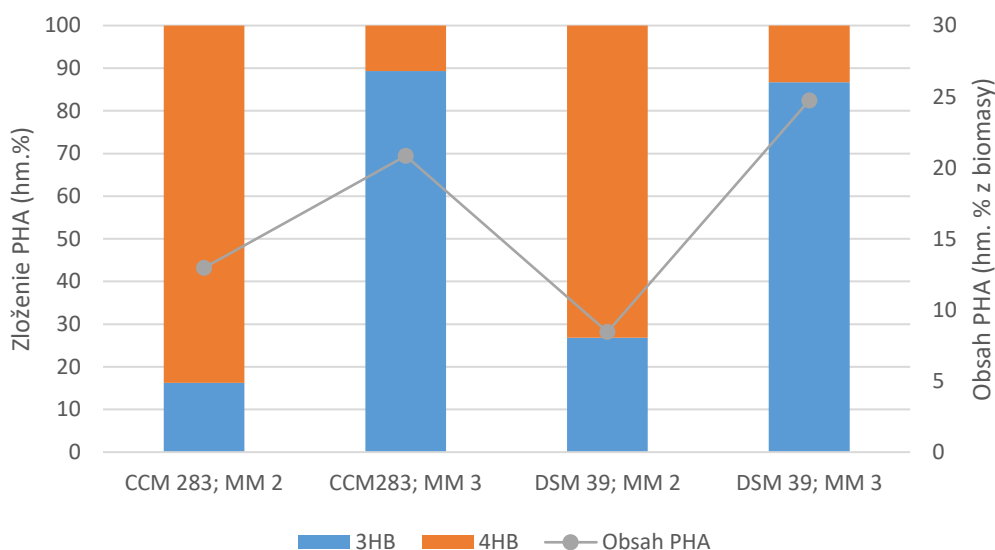


Obrázok 26: Vplyv koncentrácie kyslíka na kultiváciu kmeňa CCM 2410

#### 4.5 Kultivácia bakteriálneho kmeňa *Delftia acidovorans* CCM 283 a DSM 39

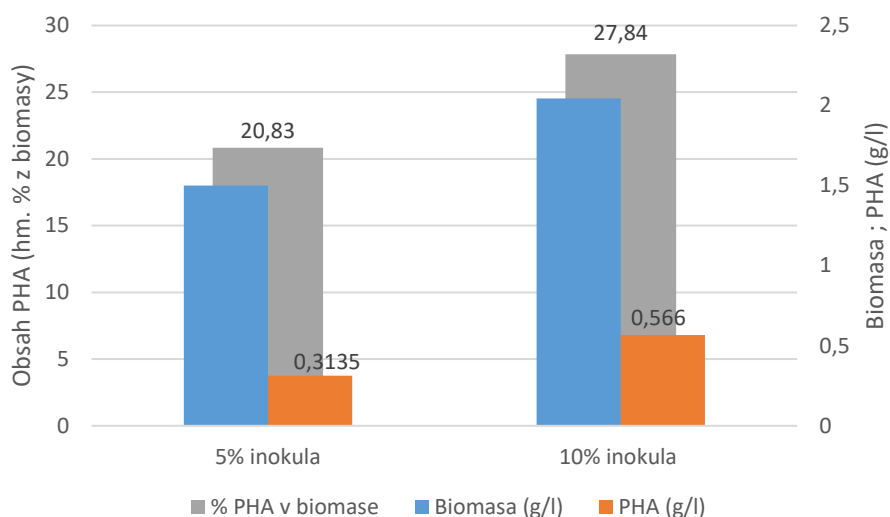
Poslednými testovanými bakteriálnymi kmeňmi boli *Delftia acidovorans* CCM 283 a DSM 39. Pre tieto kmene bolo ako najvhodnejšie médium vybrané MM2. Na obrázku 27 je možné vidieť, že na kultiváciu bolo testované aj minerálne médium č. 2, ktoré bolo využívané na kultiváciu bakteriálneho kmeňa CCM 2410 avšak obsah naprodukovovaného PHA sa pri týchto dvoch médiách výrazne odlišoval. Zatiaľ čo pri médiu MM2 bolo u oboch kmeňov výrazné zastúpenie jednotky 4HB ako pri kmeni CCM 2410, tak pri médiu MM3 zase výrazne prevyšovala koncentrácia jednotky 3HB a jednotka 4HB mala zastúpenie len okolo 11% podobne ako pri kultivácií bakteriálneho kmeňa DSM 19379.

Minerálne médium č. 3 bolo u týchto 2 kmeňov vyradené, pretože aj keď dosahovalo vysoký pomer jednotky 4HB tak celková koncentrácia PHA bola príliš nízka a to len 8,5 – 13 hm. % z biomasy. Na druhú stranu minerálne médium č. 3 malo obsah PHA 20,8 – 24,7 hm. % z biomasy.



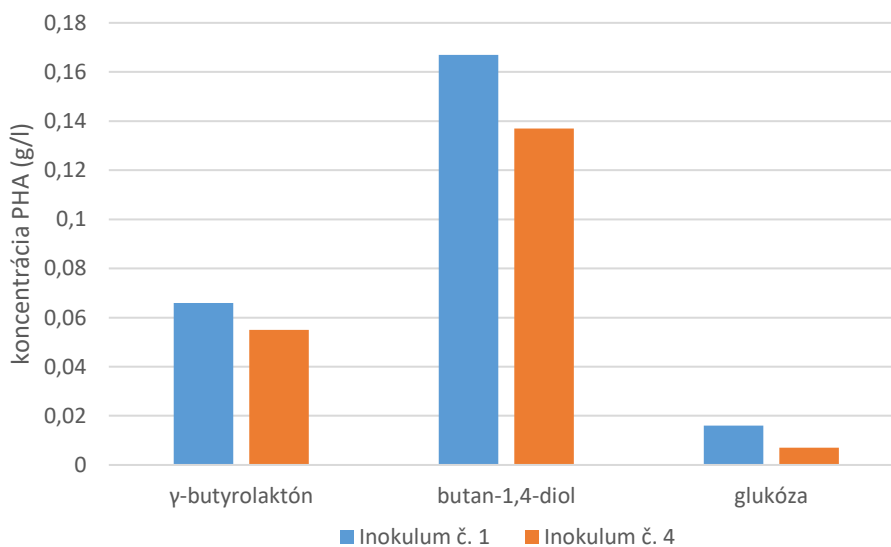
Obrázok 27: Zmena zloženia polyméru pri použití 2 rôznych MM na bakteriálne kmene CCM 283 a DSM 39

Kultivácia bakteriálneho kmeňa CCM 283 už ďalej pokračovala len podľa zloženia inokula č. 1 a zloženia minerálneho média č. 3. Okrem výberu vhodného kultivačného média bola testovaná vhodná koncentrácia inokula a to pri použití 5 % a 10 % inokula očkovaného do produkčného média. Koncentrácie boli vybrané na základe toho, že pri bakteriálnom kmeni DSM 19379 bola najlepšia koncentrácia použitého inokula 5 %, no pri CCM 283 bola používaná koncentrácia 10 % vybraná na základe literatúry prislúchajúcej k danému zloženiu minerálneho média. Výsledky ukázali, že vhodnejšia je koncentrácia 10 % kvôli vyššej koncentracii biomasy i polyméru. Výsledky sú zobrazené na obrázku 28. Na druhú stranu zastúpenie jednotky 4HB bolo vyššie pri použití 5 % inokula, kedy tento monomér predstavoval 15 % celkovej hmotnosti polyméru a u 5 % inokula mala jednotka 4 HB zastúpenie 10 % z celkovej hmotnosti polyméru. Keďže dosiahnuté výsledky boli dostačujúce a bolo možné izolovať kopolymér P(3HB-co-4HB) s týmto bakteriálnym kmeňom, už neprebíhali žiadne ďalšie experimenty. Pomocou zvoleného postupu boli kultivované 3 litre média, z ktorých bolo možné izolovať dostatočné množstvo polyméru.

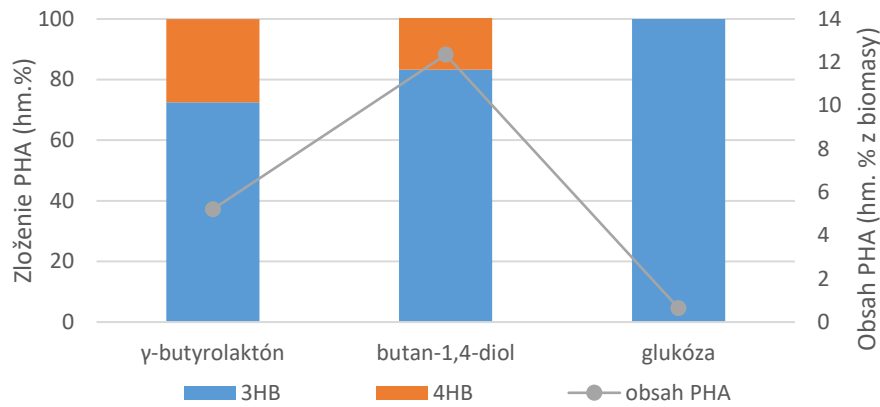


Obrázok 28: Vplyv koncentrácie inokula na bakteriálny kmeň CCM 283

Bakteriálny kmeň DSM 39 bol do diplomovej práce zaradený ako posledný. Na jeho kultiváciu bolo v kapitole 4.1 vybrané vhodné minerálne médium, na ktorom bol možný bakteriálny rast. Po výbere vhodného média boli otestované ešte aj rôzne zdroje uhlíkového substrátu na koncentráciu PHA v médiu. Výsledky experimentu sú vyhodnotené na obrázku 29 a jasne ukazujú, že najlepším uhlíkovým substrátom pre kmeň DSM 39 je butan-1,4-diol. Najnižšia koncentrácia PHA bola nameraná pri použití glukózy. Butan-1,4-diol sa teda ukázal ako veľmi vhodný prekursor na kultiváciu kopolyméru P(3HB-co-4HB) pre 3 testované bakteriálne kmene druhu *Delftia acidovorans* a  $\gamma$ -butyrolaktón bol použitý len na kultiváciu baktérie *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379. Na obrázku 29 je tiež zobrazené použitie dvoch rôznych inokúl. Inokulum č. 1 bolo komplexné médium Nutrient broth a Inokulum č. 2 bolo vybrané z literatúry, kde bolo použité v kombinácii s minerálnym médiom č. 3. Zloženie inokula, ale nemalo výrazný vplyv na priebeh kultivácie a preto bolo ďalej používané inokulum č. 1.



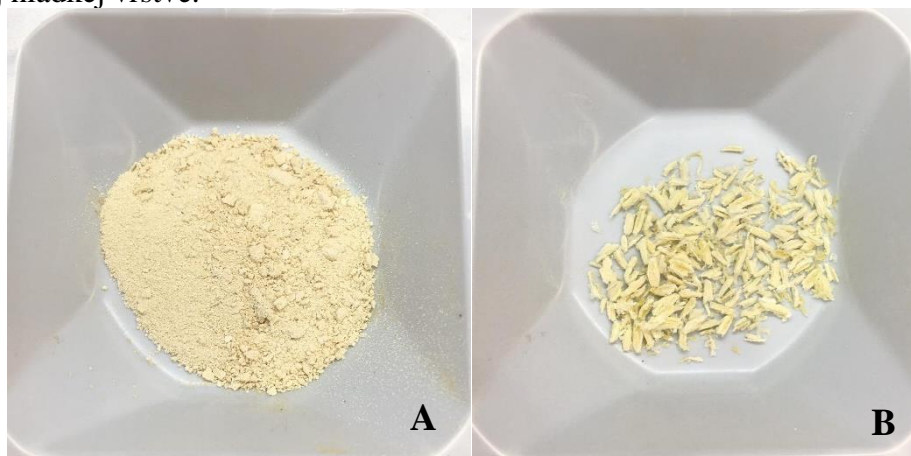
Obrázok 29: Vplyv zloženia inokula na produkciu bakteriálneho kmeňa DSM 39



Obrázok 30: Vplyv použitého uhlíkového substrátu na zloženie a obsah PHA u bakteriálneho kmeňa DSM 39

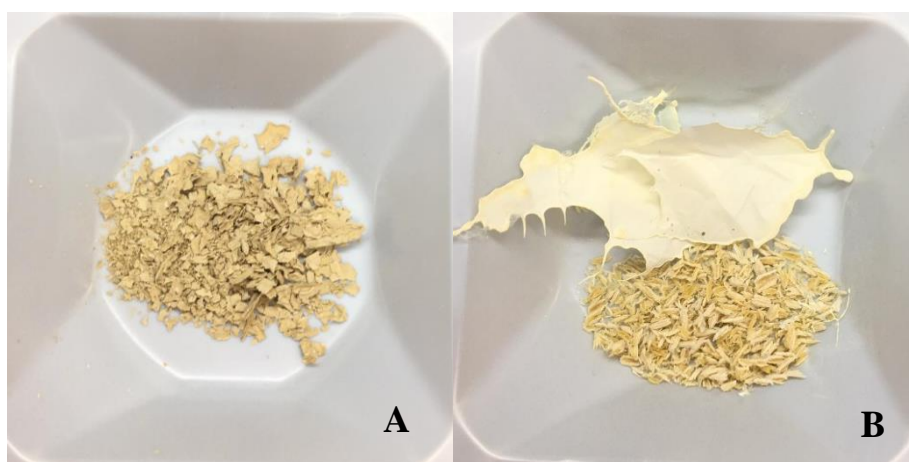
Obrázok 30 ukazuje vplyv použitého uhlíkového substrátu na zloženie PHA. Ako najvhodnejší substrát bol vybraný butan-1,4-diol, ktorý mal zastúpenie jednotky 4HB 17,8 g/l čo je veľmi podobná hodnota ako pri kultivácii kmeňa CCM 283. Použitie  $\gamma$ -butyrolaktónu ukázalo vyššie zastúpenie jednotky 4HB a to až 27,5 hm. %. Takéto zastúpenie by bolo vhodné na izoláciu polyméru pretože polymér izolovaný z kmeňa DSM 19379 mal okolo 10 hm.% jednotky 4HB, a kmeň CCM 2410 mal koncentráciu 4HB okolo 90 hm. %. Koncentrácia 27,5 hm. % by preto bola vhodná na porovnanie mechanických vlastností izolovaných polymérov, no aj napriek vhodnému pomeru monomérov nebol  $\gamma$ -butyrolaktón vhodný substrát kvôli nízkej celkovej koncentrácii PHA, ktorá bola 0,07 g/l. Glukóza bola použitá ako substrát len na porovnanie koncentrácie biomasy pretože nie je prekursorom na tvorbu 4HB. Na ďalšie kultivácie a izoláciu P(3HB-co-4HB) bol teda použitý substrát butan-1,4-diol s koncentráciou polyméru 0,12 g/l.

Na izoláciu polyméru boli z oboch kmeňov kultivované 1,5 – 3 litre média. Izolácia kmeňa CCM 283 prebiehala 3 krát a po dokončení zostala biomasa sypká a tuhá. Izolácia kmeňa DSM 39 prebiehala 5 krát pretože biomasa bola po každej filtrácii ešte príliš viskózná a tekutá. Po poslednej, piatej, filtrácii zostala biomasa stále v tekutom stave no s výrazne nižšou viskozitou. Biomasy z oboch kmeňov boli vysušené v sušiarňi na 75°C. Izolované polyméry boli v roztokoch etanolu a chloroformu a po izolácii boli ponechané v Petriho miskách na odparenie pri laboratórnej teplote. Po odparení boli polyméry prilepené na Petriho miskách v jednotnej hladkej vrstve.



Obrázok 31: Biomasa(A) a PHA izolované (B) z bakteriálneho kmeňa CCM 283

Na obrázku 31 a obrázku 32 je výsledok izolácie polyméru. Na obrázku A sú zbytky biomasy a na obrázku B je izolovaný polymér. Biomasa z bakteriálneho kmeňa CCM 283 bola po vysušení jemná a prášková so svetlosivou farbou, čím sa výrazne odlišovala od ostatných vzoriek, ktoré mali biomasu prevažne hnedej farby. Polymér bol v tomto prípade čisto bielej farby a z Petriho misky bol odstránený špachtľou. U bakteriálneho kmeňa DSM 39 bola biomasa po vysušení taktiež prilepená na Petriho misku pretože pred sušením to bola stále suspenzia v prevažne kvapalnom stave. Izolovaný polymér bol rozdelený na dvoch miskách. Na prvej bol polymér izolovaný v prvých 4 dňoch a na druhej bol polymér z poslednej izolácie. Misky sa odlišovali v tom, že prvá bola pokrytá súvislou bielou vrstvou polyméru, ktorý bolo treba oddeliť špachtľou a na druhej miske sa vytvoril jemný film, ktorý nebolo treba zo skla odlepovať. Film je viditeľný na obrázku 32 B. Po vysušení boli vzorky pripravené na analýzu pomocou diferenciálnej skenovacej kalorimetrie, termogravimetrickú analýzu, infračervenú spektrometriu a veľkostne vylučovaciu chromatografiu.



Obrázok 32: Biomasa(A) a PHA izolované (B) z bakteriálneho kmeňa DSM 39

#### 4.6 Porovnanie mechanických vlastností izolovaných polymérov

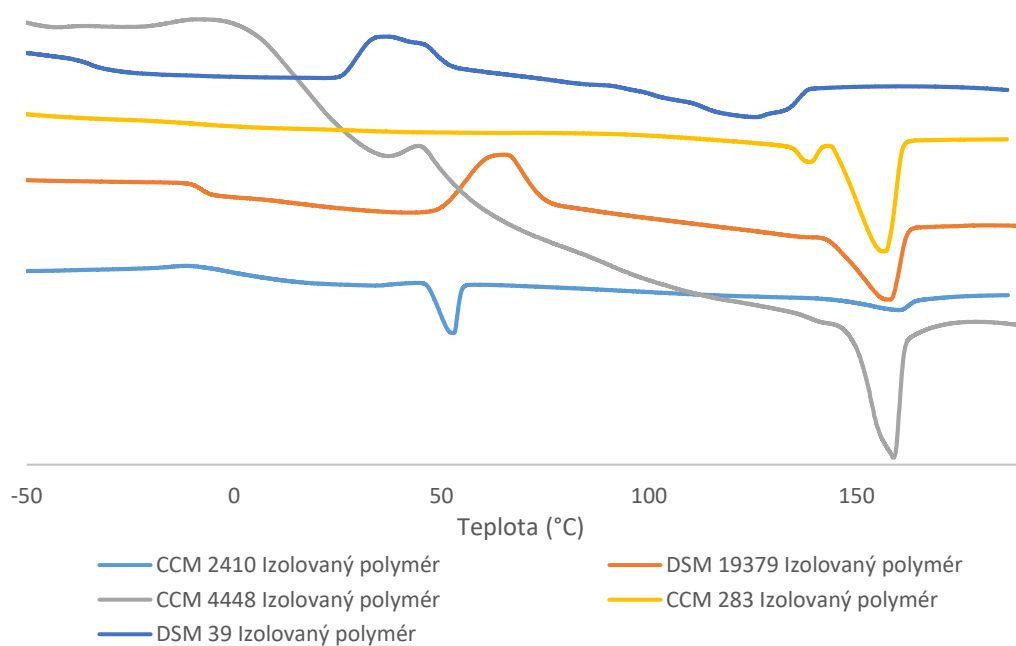
Pomocou optimalizácie kultivácií jednotlivých bakteriálnych kmeňov sa podarilo izolovať dostatočné množstvo všetkých piatich polymérov. Najväčšie množstvo polyméru bolo izolované z baktérie *Cupriavidus malaysiensis* a to viac ako 30 g. Kultivácie tohto kmeňa boli opakované niekoľkokrát a koncentrácia izolovaného polyméru dosahovala väčšinou hodnotu 1,6-1,8 g/l, aj keď zastúpenie polyméru v biomase bolo podľa stanovenia plynovou chromatografiou vyššie. K stratám dochádzalo napríklad pri centrifugácií, pretože tento kmeň musel byť centrifugovaný pri veľmi vysokých otáčkach a jeho sedimentácia nebola ideálna. Ďalšie straty nastávali pri filtrovaní a premiestňovaní biomasy počas izolácie kedy sa mohlo stať, že určité množstvá biomasy zostávali na laboratórnom skle alebo na plastových centrifugačných skúmavkách. Pri izolácii polyméru z kmeňa CCM 4448 bol výťažok zo 100 ml približne 10 mg, u tohto kmeňa nebola vykonaná opakovaná kultivácia pretože sa nepotvrdila prítomnosť jednotky 4HB. Bakteriálne kmene CCM 283, CCM 2410 a DSM 39 mali po izolácii veľmi podobnú výťažnosť a zo všetkých troch sa podarilo izolovať približne 0,5 h polyméru z 2 litrov kultivovaného média.

#### 4.6.1 Výsledky z DSC a TGA analýzy

Ako prvá bola porovnaná teplota topenia izolovaných polymérov. U štyroch vzoriek sa výrazne prejavila prítomnosť jednotky poly-3-hydroxybutyrát, ktorá má teplotu topenia okolo 160 °C. Posun teploty topenia do nižších teplôt bol výrazný u vzorky DSM 39 kedy bola teplota topenia stanovená na 126 °C. Tento pokles teploty topenia bol spôsobený prítomnosťou jednotky 4HB. Ďalej prítomnosť 4HB výrazne ovplyvnila kryštalinitu kopolymérov, ako je vidieť z nízkych hodnôt sumy výslednej entalpie ( $\Sigma H$ ) u vzoriek CCM 4448, DSM 19379 a DSM 39. Kopolymér izolovaný z CCM 2410 mal tiež nízku hodnotu entalpie topenia, ale od ostatných vzoriek sa výrazne odlišoval prítomnosťou dodatočného píku topenia pri teplote 52 °C. Tento nový pík môže indikovať prítomnosť ďalšej monomérskej jednotky v kopolyméry, ktorý nebol identifikovaný no v podobnom teplotnom okruhu sa nachádza teplota topenia monomérskej jednotky 4HB. Všetky namerané hodnoty sú zaznamenané v tabuľke 7. Porovnanie molekulových hmotností izolovaných polymérov ukazujú vyššiu molekulovú hmotnosť u polyméru s vyšším zastúpením jednotky 4HB.

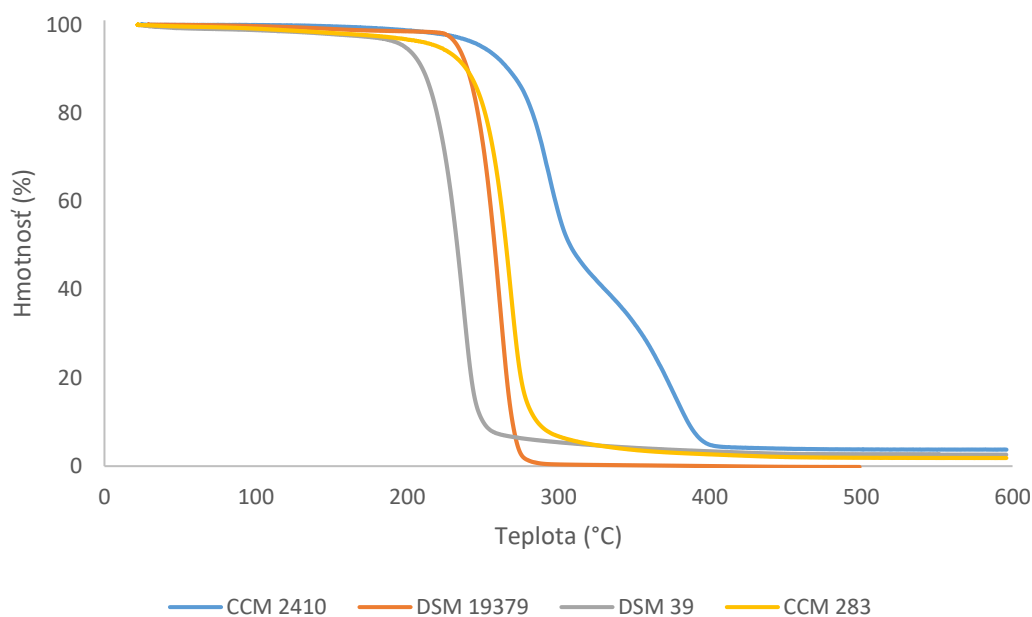
Tabuľka 7: Výsledky z DSC, TGA a SEC-MALS analýz na PHA izolovanom z rôznych bakteriálnych kmeňov;  $T_m$ : teplota topenia;  $\Delta H_m$ : entalpia topenia;  $T_{cc}$ : teplota studenej kryštalizácie;  $\Sigma \Delta H = \Delta H_m - \Delta H_{cc}$ ;  $T_d$ : teplota degradácie;  $T_{max}$ : teplota degradácie s najvyššou rýchlosťou rozkladu polyméru;  $M_w$ : molekulová hmotnosť;  $\bar{D}$ : polydispersita

Bakteriálny kmeň	DSC 2. ohrievací cyklus					TGA		SEC-MALS	
	$T_m$ [°C]	$\Delta H_m$ [J/g]	$T_{cc}$ [°C]	$\Delta H_{cc}$ [J/g]	$\Sigma \Delta H$ [J/g]	$T_d$ [°C]	$T_{max}$ [°C]	$M_w$ [kDa]	$\bar{D}$
DSM 19379	158	27,6	65	35,9	-8,3	245	261	365,5	1,31
CCM 2410	52; 160	16,4	-	-	16,4	270; 338	293; 377	445,15	1,49
CCM 283	139; 157	43,2	66	39,0	4,2	252	269	-	-
CCM 4448	159	46,8	45	9,1	37,7	-	-	-	-
DSM 39	126	30,6	36	26,9	3,7	219	237	-	-



Obrázok 33: Porovnanie výsledkov DSC analýzy zo všetkých izolovaných PHA

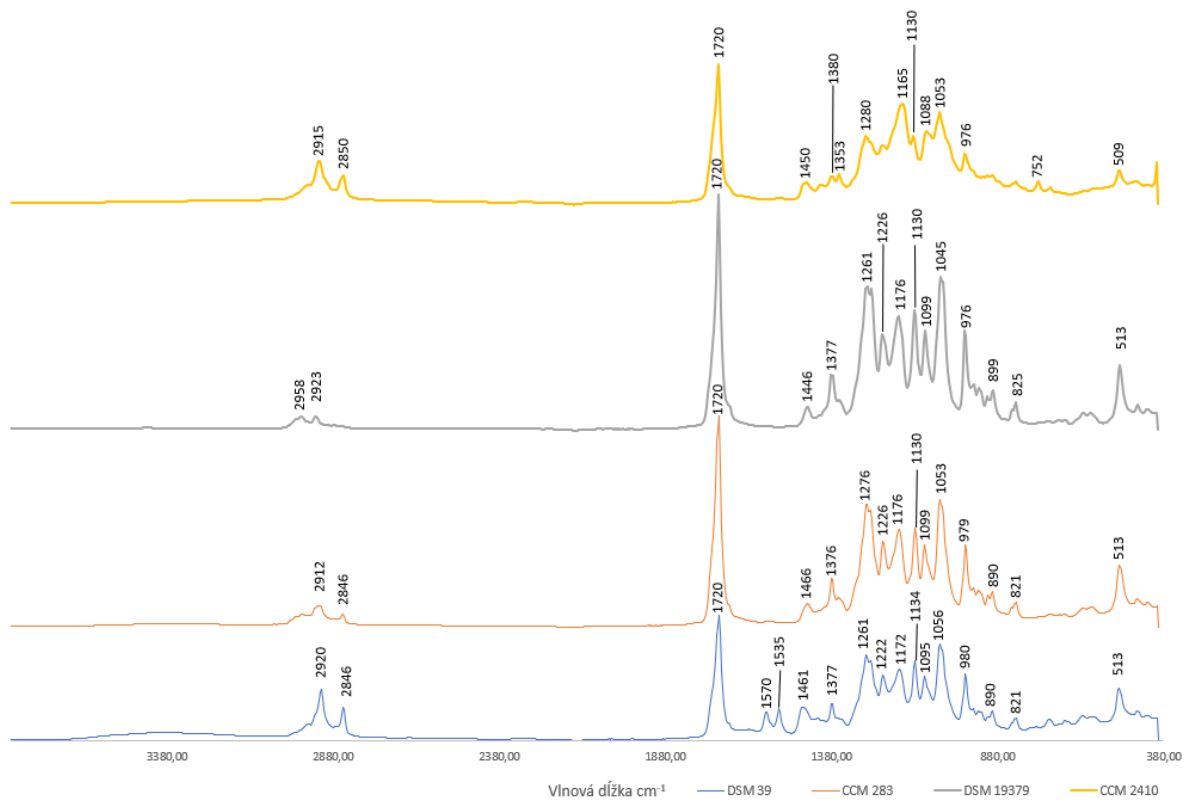
Ďalej boli vzorky analyzované termogravimetrickou metódou, pomocou nej bola stanovená teplota začiatku degradácie ( $T_{\text{onset}}$ ) a teplota, pri ktorej dosahuje degradácia najvyššiu rýchlosť ( $T_{\text{max}}$ ). Najvýraznejší výsledok bol zaznamenaný u vzorky z bakteriálneho kmeňa CCM 2410, u ktorej boli skokovo detegované dve teploty degradácie, prvá bola pri teplote 270 °C a druhá pri teplote 338°C, vyššia teplota degradácie približne odpovedá hodnote pre čistý polymér P4HB. Vďaka najvyššej koncentracii jednotky 4HB bola vzorka CCM 2410 najviac odolná na tepelné pôsobenie a degradovala ako posledná. Podľa obrázka 34 je možné povedať, že najviac podobný priebeh mali vzorky DSM 19379 a CCM 283 a najmenšiu odolnosť na pôsobenie tepla mala vzorka DSM 39, ktorá mala najnižšiu hodnotu teploty degradácie.



Obrázok 34: Porovnanie výsledkov TG analýzy z izolovaných PHA

#### 4.6.2 Výsledky z FTIR analýzy

Výsledné spektrá z FTIR analýzy štyroch izolovaných polymérov sú zobrazené na obrázku 35. Výsledky jednotlivých vzoriek sú veľmi podobné a píky odpovedajú výskytu PHA. Dá sa predpokladať, že žiadna zo vzoriek neobsahuje väčšie znečistenie, ktoré by sa odrážalo na výslednom spektre. Najvýraznejší pík nameraný pri vlnovej dĺžke  $1720\text{ cm}^{-1}$  patrí karbonylovej vibrácii v esterovej skupine, dva píky v oblasti  $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$  zobrazujú charakteristické metylové a metylénové skupiny P3HB. Píky v okolí hodnôt  $1450\text{ cm}^{-1}$  a  $1380\text{ cm}^{-1}$  sú zasa asymetrické a symetrické vibrácie metylovej skupiny. Prítomnosť alifatickej esterovej skupiny charakterizuje prítomnosť kryštalickej fázy a to v okolí píkov s hodnotou  $1276\text{ cm}^{-1}$  a  $1226\text{ cm}^{-1}$ , na druhú stranu prítomnosť amorfnej fázy je možné pozorovať pri hodnote  $1261\text{ cm}^{-1}$  a  $1176\text{ cm}^{-1}$ .



Obrázok 35: Porovnanie výsledkov FTIR analýzy z izolovaných PHA



## 5 ZÁVER

- Cieľom diplomovej práce bola biotechnologická produkcia a izolácia polyméru poly(3hydroxybutyrátu-co-4hydroxybutyrátu, na ktorú bolo vybraných 5 bakteriálnych kmeňov. Dostupné boli *Delftia acidovorans* DSM 39, CMM 283 CCM 2410; *Azohydromonas lata* CCM 4448 a *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379.
- V prvom kroku boli pre všetky baktérie otestované rôzne minerálne médiá a pre každú bolo vybrané médium na ktorom bola dosiahnutá najvyššia optická hustota a koncentrácia biomasy. Výsledkom bolo použitie jedného média pre kmeň DSM 19379, ďalšieho pre kmeň CCM 2410 a tretie pre kmene DSM 39 a CCM 283.
- Kultivácia *C. malaysiensis* bola okrem diplomovej práce použitá aj v rámci projektu ORION a preto boli kultivácie opakované niekoľkonásobne s cieľom izolovať minimálne 30 g polymér. Tento cieľ bol splnený pomocou kultivácií v Erlenmeyerových bankách a následne bol izolovaný polymér použitý na vytvorenie niekoľkých filamentov, ktoré boli ďalej využité na vytlačenie scaffoldov na 3D tlačiarňi českej značky Prusa
- Kultivácia kmeňa *C. malaysiensis* CCM 19379 bola otestovaná aj pomocou bioreaktora no výsledná koncentrácia PHA v biomase bola výrazne nižšia ako pri produkcií v Erlenmeyerových bankách. Na druhú stranu výhodou bola vyššia molekulová hmotnosť a vyššia teplotná odolnosť podľa výsledkov TGA bola teplota degradácie polyméru z bioreaktora  $T_d=269^{\circ}\text{C}$  a teplota degradácie polyméru z baniek bola  $T_d=245^{\circ}\text{C}$ .
- Ďalšia testovaná baktéria bola *Azohydromonas lata* CCM 4448, tento bakteriálny kmeň vykazoval od začiatku najnižšiu produkciu biomasy. Po niekoľkých pokusoch sa podarilo izolovať polymér aj z tohto kmeňa avšak na výsledkoch plynovej chromatografie sa ukázalo, že obsahuje len P3HB a rovnako výsledok z DSC sa veľmi odlišoval od ostatných testovaných kmeňov a preto bol tento z ďalších experimentov vyradený.
- Najvyššia koncentrácia monomérovej jednotky 4HB v kopolyméri P(3HB-co-4HB) bola detegovaná u bakteriálneho kmeňa CCM 2410 a to až na koncentráciu okolo 90 hm. %. Koncentrácia polyméru bola v tomto prípade približne 0,27 g/l. Pre tento kmeň bol vybraný experiment s použitím rôznych koncentrácií prvého inokula a rovnako experiment na koncentráciu dostupného kyslíka počas kultivácie. Výsledkom bolo, že koncentrácia inokula nemala výrazný vplyv na produkciu polyméru. Pri koncentrácií kyslíka boli už rozdiely zreteľnejšie a najvyššia produkcia bola dosiahnutá pri použití 200 ml média do 500 ml Erlenmeyerovej banky a to 0,34 g/l a najnižšia koncentrácia bola vo vzorke 50 ml média v 500 ml banke a to 0,13 g/l.
- U tohto polyméru sa výrazne prejavila prítomnosť jednotky 4HB aj na DSC kde sa objavili 2 píky teploty topenia a rovnako 2 píky na TG analýze, zobrazujúce 2 teploty degradácie, jeden pre P3HB a druhý pre P4HB
- Posledné 2 bakteriálne kmene mali najvyššiu produkciu polyméru a aj samotnej biomasy pri použití rovnakého minerálneho média MM3. Bolo na nich testované aj minerálne médium MM2 a aj keď pri jeho použití dosahovali väčšiu koncentráciu

jednotky 4HB tak bolo zvolené médium MM3 kde bola vyššia celková koncentrácia kopolyméru P(3HB-co-4HB) s nižším zastúpením jednotky 4HB.

- Z bakteriálnych kmeňov CCM 283 a DSM 39 mal vyššiu výťažnosť kmeň CCM 283 a bol na ňom vykonaný experiment s dvomi rôznymi koncentraciami inokula a to 5 % a 10 %. Výsledky ukázali, že vhodnejšia koncentrácia inokula použitá na zaočkovanie minerálneho média je 10 %. Pri tejto koncentrácii v kombinácii s minerálnym médiom č. 3 bola dosiahnutá najvyššia koncentrácia P(3HB-co-4HB) zo všetkých troch kmeňov bakteriálneho druhu *Delftia acidovorans* a to 0,57 g/l.
- Bakteriálny kmeň DSM bol posledným testovaným a rovnako bol do diplomovej práce zaradený až neskôr a okrem výberu vhodného média s ním bol vykonaný experiment na výber vhodného uhlíkového substrátu. Testované boli tri a to butan-1,4-diol,  $\gamma$ -butyrolaktón a glukóza. Z experimentu vyšiel ako najlepší substrát butan-1,4-diol pri ktorom boli dosahované najvyššie koncentrácie biomasy aj PHA. Koncentrácia bola ale i tak najnižšia zo všetkých 3 kmeňov baktérie *Delftia acidovorans* a bolo to 0,12 g/l.
- Výsledkom práce bolo, že kopolymér P(3HB-co-4HB) bol úspešne izolovaný z troch kmeňov bakteriálneho druhu *Delftia acidovorans* a z bakteriálneho druhu *Cupriavidus malaysiensis*. Neúspešne prebehla len kultivácia a produkcia pomocou bakteriálneho druhu *Azohydromonas lata*.
- Izolované polyméry boli porovnané a u všetkých okrem CCM 2410 výrazne prevažovali charakteristické rysy polyméru P3HB a to ako pri DSC analýze tak pri TGA analýze. Jedine kmeň CCM 2410 mal výrazné zastúpenie P4HB a preto sa výrazne odlišovali jeho teploty topenia, teploty degradácie.
- Z pohľadu výťažnosti dosiahol najlepšie výsledky kmeň *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379 pri kultivácii v Erlenmeyerových bankách a to až 4 g/l biomasy a 2,6 g/l kopolyméru P(3HB-co-4HB) so zastúpením monomérskej jednotky 4HB okolo 10 hm. %.

## ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] NIAOUNAKIS, Michael. *Biopolymers: processing and products*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 2015. Plastics design library. ISBN 978-0-323-26698-7.
- [2] KIJCHAVENGKUL, Thitisilp a Rafael AURAS. *Compostability of polymers*. Polymer International [online]. 2008, 57(6), 793-804 [cit. 2019-11-20]. DOI: 10.1002/pi.2420. ISSN 09598103. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pi.2420>
- [3] ČSN EN 13432. *Obaly - Požadavky na obaly využitelné ke kompostování a biodegradaci*. Praha: Český normalizační institut, 2001.
- [4] NIAOUNAKIS, Michael. *Biopolymers: reuse, recycling, and disposal*. 1 st. Edition. Waltham, MA: Elsevier/WA, William Andrew is an imprint of Elsevier, 2013. ISBN 978-1-45573145-9.
- [5] UTSUNOMIA, Camila, *Qun REN a Manfred ZINN*. Poly(4-Hydroxybutyrate): Current State and Perspectives. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology [online]. 2020, 8 [cit. 2020-07-17]. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00257. ISSN 2296-4185. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2020.00257/full>
- [6] KUMBAR, Sangamesh G., *Cato T. LAURENCIN a Meng DENG*, ed. Natural and synthetic biomedical polymers. 1st ed. Burlington, MA: Elsevier, 2014. ISBN 978-0-12-396983-5.
- [7] SAVIOLI LOPES, M., A. JARDINI a R. MACIEL FILHO. Synthesis and Characterizations of Poly (Lactic Acid) by Ring-Opening Polymerization for Biomedical Applications. Chemical Engineering Transactions [online]. 2014, 2014(38), 331-336 [cit. 2019-11-22]. DOI: 10.3303/CET1438056. Dostupné z: <https://www.cetjournal.it/index.php/cet/article/view/CET1438056>
- [8] RAZA, Zulfiqar Ali, *Sharjeel ABID a Ibrahim M. BANAT*. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. International Biodeterioration & Biodegradation [online]. 2018, 126(1), 45-56 [cit. 2019-11-26]. DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.10.001. ISSN 09648305. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830517300276>
- [9] WINNACKER, Malte. *Polyhydroxyalkanoates: Recent Advances in Their Synthesis and Applications*. European Journal of Lipid Science and Technology [online]. 2019, 121(11) [cit. 2020-07-16]. DOI: 10.1002/ejlt.201900101. ISSN 1438-7697. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ejlt.201900101>
- [10] REDDY, C.S.K, R GHAI, RASHMI a V.C KALIA. Polyhydroxyalkanoates: an overview. Bioresource Technology [online]. 2003, 87(2), 137-146 [cit. 2020-07-25]. DOI: 10.1016/S0960-8524(02)00212-2. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852402002122>
- [11] LUEF, K. P. *Poly(hydroxy alkanoate)s in Medical Applications*. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly [online]. 2015, 29(2), 287-297 [cit. 2018-01-19]. DOI: 10.15255/CABEQ.2014.2261. ISSN 03529568. Dostupné z: [http://pierre.fkit.hr/hdki/cabeq/pdf/29\\_2\\_2015/Cabeq\\_2015-02-web\\_Luef.pdf](http://pierre.fkit.hr/hdki/cabeq/pdf/29_2_2015/Cabeq_2015-02-web_Luef.pdf)

- [12] SUDESH, K, *H ABE a Y DOI*. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science* [online]. 2000, 25(10), 1503-1555 [cit. 2019-11-27]. DOI: 10.1016/S0079-6700(00)00035-6. ISSN 00796700. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670000000356>
- [13] NIAOUNAKIS, Michael. *Biopolymers: applications and trends*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 2015. ISBN 978-032-3353-991.
- [14] TOKIWA, Yutaka a *Buenaventurada P. CALABIA*. Review Degradation of microbial polyesters. *Biotechnology Letters*. 2004, 26(15), 1181-1189. DOI: 10.1023/B:BILE.0000036599.15302.e5. ISSN 0141-5492. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1023/B:BILE.0000036599.15302.e5>
- [15] TOKIWA, Yutaka, *Buenaventurada CALABIA*, *Charles UGWU* a Seiichi AIBA. Biodegradability of Plastics. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2009, 10(9), 3722-3742 [cit. 2020-07-16]. DOI: 10.3390/ijms10093722. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/10/9/3722>
- [16] BUGNICOURT, E., *P. CINELLI*, *A. LAZZERI* a *V. ALVAREZ*. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters* [online]. 2014, 8(11), 791-808 [cit. 2019-11-27]. DOI: 10.3144/expresspolymlett.2014.82. ISSN 1788618X.
- [17] SANCHEZ, James G., *Akio TSUCHII* a Yutaka TOKIWA. Degradation of polycaprolactone at 50 °C by a thermotolerant *Aspergillus* sp. *Biotechnology Letters* [online]. 2000, 22(10), 849-853 [cit. 2019-11-28]. DOI: 10.1023/A:1005603112688. ISSN 01415492. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1005603112688>
- [18] LEE, Sang Yup a *Jong-il CHOI*. Production and degradation of polyhydroxyalkanoates in waste environment. *Waste Management* [online]. 1999, 19(2), 133-139 [cit. 2020-07-16]. DOI: 10.1016/S0956-053X(99)00005-7. ISSN 0956053X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956053X99000057>
- [19] DOI, Yoshiharu, *Youko KANESAWA*, *Masao KUNIOKA* a Terumi SAITO. Biodegradation of microbial copolyesters: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Macromolecules* [online]. 1990, 23(1), 26-31 [cit. 2019-11-28]. DOI: 10.1021/ma00203a006. ISSN 0024-9297. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma00203a006>
- [20] CHEN, Guo-Qiang a *Qiong WU*. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* [online]. 2005, 26(33), 6565-6578 [cit. 2019-11-25]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.04.036. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961205003510>
- [21] TIWARI, Atul a *Ravi B. SRIVASTAVA*, ed. *Biotechnology in Biopolymers: Developments, Applications & Challenging Areas*. 1st ed. Shawbury: Smithers Rapra, 2012. ISBN 978-1-84735-542-3.
- [22] MARTIN, David P. a *Simon F. WILLIAMS*. Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial. *Biochemical Engineering*

- Journal [online]. 2003, 16(2), 97-105 [cit. 2020-01-24]. DOI: 10.1016/S1369-703X(03)00040-8. ISSN 1369703X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X03000408>
- [23] ANJUM, Anbreen, *Mohammad ZUBER*, *Khalid Mahmood ZIA*, Aqdas NOREEN, Muhammad Naveed ANJUM a Shazia TABASUM. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of *recent advancements*. International Journal of Biological Macromolecules [online]. 2016, 89, 161-174 [cit. 2020-01-24]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813016303774>
- [24] LEE, Wing-Hin, *Mohd N.M. AZIZAN* a Kumar SUDESH. Effects of culture conditions on the composition of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Comamonas acidovorans*. Polymer Degradation and Stability [online]. 2004, 84(1), 129-134 [cit. 2020-02-26]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2003.10.003. ISSN 01413910. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141391003003549>
- [25] AMIRUL, A.A., *A.R.M. YAHYA*, K. SUDESH, M.N.M. AZIZAN a M.I.A. MAJID. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer by *Cupriavidus sp. USMAA1020* isolated from Lake Kulim, Malaysia. Bioresource Technology [online]. 2008, 99(11), 4903-4909 [cit. 2020-07-16]. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.09.040. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852407007870>
- [26] RAMACHANDRAN, Hema, *Nur Asilla Hani SHAFIE*, Kumar SUDESH, Mohamad Noor AZIZAN, Mohamad Isa Abdul MAJID a Al-Ashraf Abdullah AMIRUL. *Cupriavidus malaysiensis* sp. nov., a novel poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) accumulating bacterium isolated from the Malaysian environment. Antonie van Leeuwenhoek [online]. 2018, 111(3), 361-372 [cit. 2020-07-16]. DOI: 10.1007/s10482-017-0958-8. ISSN 0003-6072. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10482-017-0958-8>
- [27] KUCERA, NOVACKOVA, *PERNICOVA*, *SEDLACEK* a *OBRUCA*. Biotechnological Production of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-4-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) Terpolymer by *Cupriavidus* sp. DSM 19379. Bioengineering [online]. 2019, 6(3) [cit. 2020-07-16]. DOI: 10.3390/bioengineering6030074. ISSN 2306-5354. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2306-5354/6/3/74>
- [28] LOO, Ching-Yee a *Kumar SUDESH*. Biosynthesis and native granule characteristics of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in *Delftia acidovorans*. International Journal of Biological Macromolecules [online]. 2007, 40(5), 466-471 [cit. 2020-07-16]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2006.11.003. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813006003230>
- [29] MOTHESE, G. a *J.-U. ACKERMANN*. Synthesis of Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) with a Target Mole Fraction of 4-Hydroxybutyric Acid Units by Two-Stage Continuous Cultivation of *Delftia acidovorans* P4a. Engineering in Life Sciences [online]. 2005, 5(1), 58-62 [cit. 2020-07-16]. DOI: 10.1002/elsc.200420056. ISSN 1618-0240. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elsc.200420056>

- [30] DUGOVÁ, H. *Vliv oxidačního stresu na bakteriální kultury*. Brno, 2018. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 44 s. Vedoucí práce Doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
- [31] RAO, Urmila, R. *SRIDHAR a P.K. SEHGAL*. Biosynthesis and biocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* from spent palm oil. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2010, 49(1), 13-20 [cit. 2020-07-16]. DOI: 10.1016/j.bej.2009.11.005. ISSN 1369703X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X09003362>
- [32] PARK, Dae Hoo a *Beom Soo KIM*. Production of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Ralstonia eutropha* from soybean oil. *New Biotechnology* [online]. 2011, 28(6), 719-724 [cit. 2020-07-16]. DOI: 10.1016/j.nbt.2011.01.007. ISSN 18716784. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678411000331>
- [33] BLOUNT, Zachary D. *The unexhausted potential of E. coli*. *ELife* [online]. 2015, 4 [cit. 2020-07-16]. DOI: 10.7554/eLife.05826. ISSN 2050-084X. Dostupné z: <https://elifesciences.org/articles/05826>
- [34] LI, Zheng-Jun, *Zhen-Yu SHI, Jia JIAN, Ying-Ying GUO, Qiong WU a Guo-Qiang CHEN*. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from unrelated carbon sources by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering* [online]. 2010, 12(4), 352-359 [cit. 2020-07-17]. DOI: 10.1016/j.ymben.2010.03.003. ISSN 10967176. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096717610000194>
- [35] VALENTIN, Henry E a *Douglas DENNIS*. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* grown on glucose. *Journal of Biotechnology* [online]. 1997, 58(1), 33-38 [cit. 2020-07-17]. DOI: 10.1016/S0168-1656(97)00127-2. ISSN 01681656. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165697001272>
- [36] HIRAMITSU, Masaya, *Naoyuki KOYAMA a Yoshiharu DOI*. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Alcaligenes latus*. *Biotechnology Letters* [online]. 1993, 15(5), 461-464 [cit. 2020-07-22]. DOI: 10.1007/BF00129318. ISSN 0141-5492. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00129318>
- [37] RAY, Subhasree a *Vipin Chandra KALIA*. Microbial Cometabolism and Polyhydroxyalkanoate Co-polymers. *Indian Journal of Microbiology* [online]. 2017, 57(1), 39-47 [cit. 2018-01-19]. DOI: 10.1007/s12088-016-0622-4. ISSN 0046-8991. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12088-016-0622-4>
- [38] VERLINDEN, R.A.J., *D.J. HILL, M.A. KENWARD, C.D. WILLIAMS a I. RADECKA*. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2007, 102(6), 1437-1449 [cit. 2020-07-27]. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x. ISSN 1364-5072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x>

- [39] REHM, Bernd H. A., *Timothy A. MITSKY* a *Alexander STEINBÜCHEL*. Role of Fatty Acid De Novo Biosynthesis in Polyhydroxyalkanoic Acid (PHA) and Rhamnolipid Synthesis by Pseudomonads: Establishment of the Transacylase (PhaG)-Mediated Pathway for PHA Biosynthesis in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2001, 67(7), 3102-3109 [cit. 2020-07-25]. DOI: 10.1128/AEM.67.7.3102-3109.2001. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <https://AEM.asm.org/content/67/7/3102>
- [40] DOI, Yoshiharu, *Atsushi SEGAWA* a *Masao KUNIOKA*. Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in *Alcaligenes eutrophus*. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 1990, 12(2), 106-111 [cit. 2020-07-23]. DOI: 10.1016/0141-8130(90)90061-E. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/014181309090061E>
- [41] STEINBÜCHEL, Alexander a *Tina LÜTKE-EVERSLÖH*. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2003, 16(2), 81-96 [cit. 2020-07-23]. DOI: 10.1016/S1369-703X(03)00036-6. ISSN 1369703X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X03000366>
- [42] MD. IQBAL, *Nurhezreen* a *A.A. AMIRUL*. Synthesis of P(3HB-co-4HB) copolymer with target-specific 4HB molar fractions using combinations of carbon substrates. *J Chem Technol Biotechnol* [online]. 2014, 89(3), 407-418 [cit. 2020-07-22]. DOI: 10.1002/jctb.4133. ISSN 02682575. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.4133>
- [43] PRIETO, Maria A., *Laura I. de EUGENIO*, *Beatriz GALÁN*, *José M. LUENGO* a *Bernard WITHOLD*. Synthesis and Degradation of Polyhydroxyalkanoates. *Pseudomonas* [online]. 1st ed. Dordrech: Springer, 2007, s. 397-428 [cit. 2019-11-28]. ISBN 978-1-4020-6097-7.
- [44] ZOU, Huibin, *Mengxun SHI*, *Tongtong ZHANG*, *Lei LI*, *Liangzhi LI* a *Mo XIAN*. Natural and engineered polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase: key enzyme in biopolyester production. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2017, 101(20), 7417-7426 [cit. 2019-11-29]. DOI: 10.1007/s00253-017-8485-0. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-017-8485-0>
- [45] PÖTTER, Markus a *Alexander STEINBÜCHEL*. Poly(3-hydroxybutyrate) Granule-Associated Proteins: Impacts on Poly(3-hydroxybutyrate) Synthesis and Degradation. *Biomacromolecules* [online]. 2005, 6(2), 552-560 [cit. 2020-07-27]. DOI: 10.1021/bm049401n. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm049401n>
- [46] VOLOVA, T. G. *Polyhydroxyalkanoates--plastic materials of the 21st century: production, properties, applications*. 1st ed. Hauppauge, N.Y.: Nova Science Publishers, 2004. ISBN 978-1590339923.
- [47] OBRUČKA, Stanislav. *Polyhydroxyalkanoáty - přirozeně odbouratelné plasty*. Agris [online]. Praha: Agris, 2007 [cit. 2018-01-19]. Dostupné z: <http://www.agris.cz/clanek/155286>

- [48] DRÁBKOVÁ, Kateřina. *Biotechnologická produkce PHA pomocí Cupriavidus malaysiensis* [online]. Brno, 2019 [cit. 2020-02-26]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113527>. Diploma thesis. Brno university of technology. Vedoucí práce Doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
- [49] HSIEH, Wen-chuan, *Yuki WADA a Hiroshi MITOMO*. Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) Produced by *Delftia acidovorans* in Different Cell-Concentration and Fed-Batch Cultures. FIBER [online]. 2004, 60(3), 95-98 [cit. 2020-07-25]. DOI: 10.2115/fiber.60.95. ISSN 0037-9875. Dostupné z: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/fiber/60.95?from=CrossRef>
- [50] ROMANELLI, Maria Giovanna, *Silvana POVOLO, Lorenzo FAVARO, Federico FONTANA, Marina BASAGLIA a Sergio CASELLA*. Engineering *Delftia acidovorans* DSM39 to produce polyhydroxyalkanoates from slaughterhouse waste. International Journal of Biological Macromolecules [online]. 2014, 71, 21-27 [cit. 2020-07-25]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.03.049. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813014002219>
- [51] HSIEH, Wen-Chuan, *Yuki WADA a Chih-Pong CHANG*. Fermentation, biodegradation and tensile strength of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Delftia acidovorans*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers [online]. 2009, 40(2), 143-147 [cit. 2020-02-26]. DOI: 10.1016/j.jtice.2008.11.004. ISSN 18761070. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1876107008001922>



## ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

PHA	polyhydroxyalkanoáty
P3HB	poly-3-hydroxybutyrát
P4HB	poly-4-hydroxybutyrát
P(3HB-co-4HB)	poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát)
P3HO	poly-3-hydroxyoxanoát
PHBV	poly(hydroxybutyrát-co-hydroxyvalerát)
PHBHHx	poly(hydroxybutyrát-co-hydroxyhexanoát)
PVC	polyvinylchlorid
PLA	polylactic acid
ROP	ring open polymerization
PCL	polycaprolactone
PBS	polybutylene succinate
SCL	short chain lenght
MCL	medium chain lenght
CCM	czech collection of microorganisms
DSM	deutsche sammlung von mikroorganismen
SEC-MLAS	size exclusion chromatography with multi-angle scattering analysis
DSC	diferenciálna skenovacia kalorimetria
TGA	termogravimetrická analýza
IRS	infrared spectroscopy
GC	gas chromatoraphy
MM	minerálne médium
I	inokulum
$\gamma$ -BL	$\gamma$ - butyrolaktón
1,4-BD	butan-1,4-diol