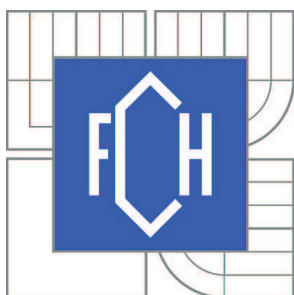


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

POSOUZENÍ VYBRANÝCH PARAMETRŮ NA BIOTECHNOLOGICKOU PRODUKCI POLYHYDROXYALKANOÁTŮ

INFLUENCE OF SELECTED PARAMETERS ON BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF
POLYHYDROXYALKANOATES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. LIBOR EREMKA

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. STANISLAV OBRUČA, Ph.D.

BRNO 2013



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

Zadání diplomové práce

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

Název diplomové práce:

Posouzení vybraných parametrů na biotechnologickou produkci polyhydroxyalkanoátů

Zadání diplomové práce:

1. Rešerše na téma bioprodukce polyhydroxyalkanoátů
 2. Experimentální ověření vlivu vybraných parametrů (DO, redoxní potenciál aj.) na biotechnologickou produkci polyhydroxyalkanoátů z odpadních substrátů
 3. Posouzení vlivu vybraných parametrů na metabolické aktivity produkujícího kmene
 4. Návrh optimálního nastavení sledovaných parametrů pro velkoobjemovou produkci PHA
- Práce bude vypracována v rámci Licenční smlouvy s NAFIGATE Corporation, a.s. a její výsledky budou součástí podání patentové přihlášky.

Termín odevzdání diplomové práce: 3.5.2013

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

Bc. Libor Eremka
Student(ka)

Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2013

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

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

ABSTRAKT

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

Key words

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

Klíčová slova

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

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

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

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

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

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

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

1. OBSAH

1.	OBSAH	5
2.	ÚVOD	7
3.	TEORETICKÁ ČÁST	8
3.1.	Co je to PHA?	8
3.1.1.	scl-PHA	10
3.1.2.	mcl-PHA	10
3.1.3.	lcl-PHA	10
3.1.4.	Materiálové vlastnosti	10
3.1.4.1.	Modifikace vlastností P3HB	10
3.1.4.2.	Vlastnosti mcl-PHA	11
3.2.	Produkce PHA pomocí mikroorganismů	11
3.2.1.	Granule PHA	11
3.2.1.1.	Phasiny	13
3.2.1.2.	PHA polymerázy (syntázy)	13
3.2.2.	Biodegradace PHA	14
3.2.2.1.	Intracelulární degradace	14
3.2.2.2.	Extracelulární degradace	15
3.2.3.	Metabolismu PHA	15
3.2.3.1.	Syntéza poly(3-hydroxybutyrátu)	16
3.2.3.2.	Syntéza poly(3-hydroxybutyrátu-co-3-hydroxyvalerátu)	17
3.2.3.3.	2-Methylcitrátový cyklus	17
3.2.3.4.	Vznik homopolymeru P3HV	18
3.2.3.5.	Syntéza mcl polyhydroxyalkanoátů	19
3.2.4.	Metabolický vznik propionyl-CoA	19
3.2.4.1.	Vznik propionyl-CoA z mastných kyselin s lichým počtem uhlíků	20
3.2.4.2.	Vznik propionyl-CoA z aminokyselin	20
3.2.4.3.	Vznik propionyl-CoA z kyseliny levulové	20
3.2.5.	Vybraní producenti scl-PHA	20
3.2.5.1.	Cupriavidus necator H16	20
3.2.5.2.	Bacillus megaterium	21
3.2.5.3.	Azotobacter vinelandii	21
3.2.5.4.	Methanotrofní a methylotrofní mikroorganismy	22
3.2.5.5.	Fotosyntetizující mikroorganismy	22
3.2.5.6.	Halofilní mikroorganismy	22
3.2.5.7.	Produkce pomocí kvasinek	23
3.2.6.	Producenti mcl-PHA	23
3.2.6.1.	rod <i>Pseudomonas</i>	23
3.2.7.	PHA jako extracelulární metabolit	24
3.3.	Produkce pomocí transgenních rostlin	24
3.3.1.	Syntéza P3HB v rostlinách	25
3.3.2.	Syntéza kopolymerů PHA v rostlinách	26
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
4.1.	Použité chemikálie, materiál, bakterie a přístroje	27
4.1.1.	Produkční bakterie	27

4.1.2.	Chemikálie pro kultivaci mikroorganismů.....	27
4.1.3.	Ostatní chemikálie.....	27
4.1.4.	Přístroje	27
4.2.	Kultivace bakterie <i>Cupriavidus necator</i> H16	27
4.2.1.	Uchování bakterie a příprava inokula	27
4.2.2.	Živná média.....	28
4.2.3.	Vzorky olejů	28
4.2.4.	Kultivace na různých olejích.....	29
5.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	30

2. ÚVOD

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

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

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

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

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

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

3. TEORETICKÁ ČÁST

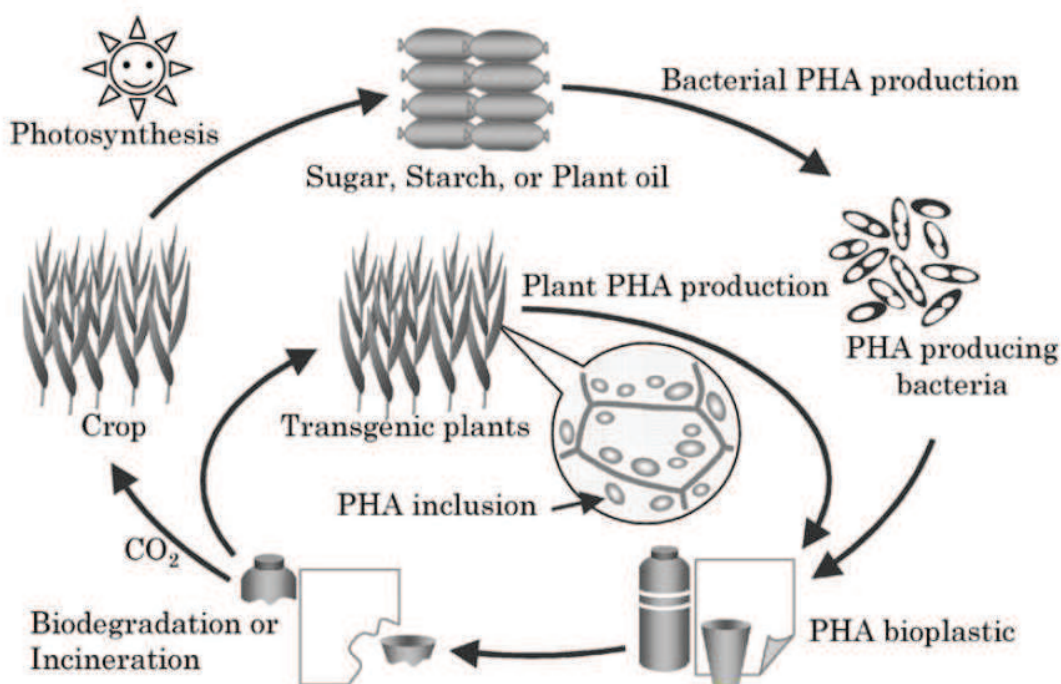
3.1. Co je to PHA?

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

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

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

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



Obrázek 1 Obecné schéma výroby PHA [4]

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

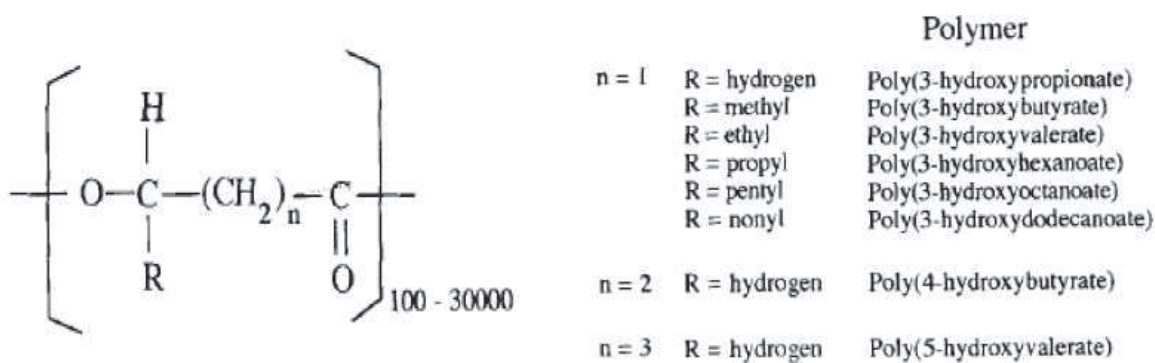
získáme po kyselé hydrolyze čistou opticky aktivní látku R-3-hydroxybutyrát, kterou můžeme použít například pro stereoselektivní organické syntézy. Další aplikační možností PHA je jako nosič biologicky aktivních látek v humánní či veterinární medicíně nebo pro přípravu granulovaných či enkapsulovaných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

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

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

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

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



Obrázek 2 Obecné schéma PHA [10]

Obrázek č. 2 uvádí obecný vzorec těchto lineárních polyesterů.

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

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

3.1.1. scl-PHA

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

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

3.1.2. mcl-PHA

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

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

3.1.3. lcl-PHA

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

3.1.4. Materiálové vlastnosti

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

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

3.1.4.1. Modifikace vlastností P3HB

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

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

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

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

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

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

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

Tabulka 1 porovnání mechanických vlastností různých druhů PHA [13]

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

3.1.4.2. Vlastnosti mcl-PHA

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

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

3.2. Produkce PHA pomocí mikroorganismů

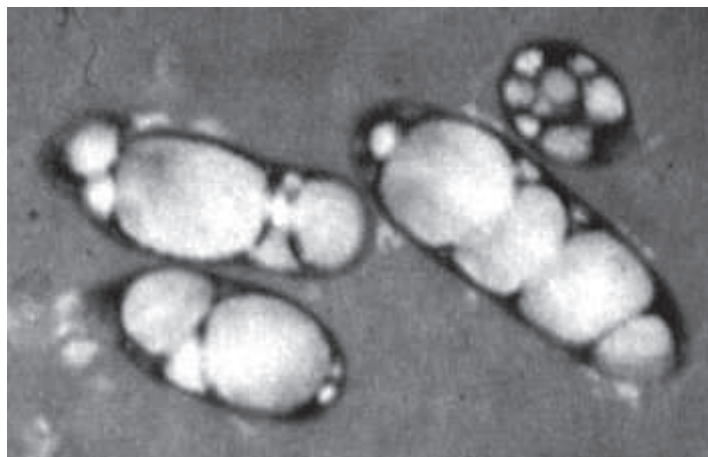
3.2.1. Granule PHA

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

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

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

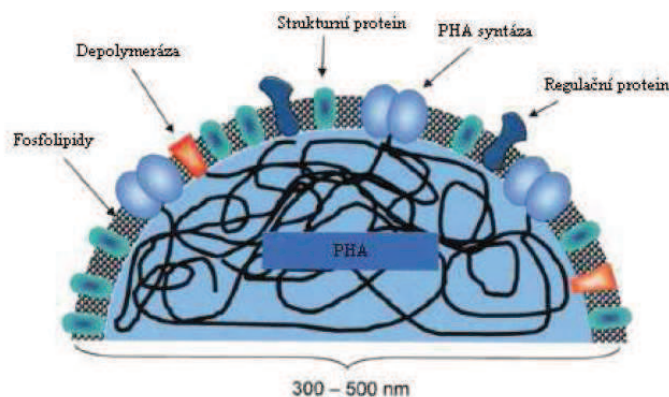
aPHA může být připraven rozpuštěním PHA ve vhodném roztoku organického rozpouštědla (například aceton nebo trichlormetan). A následným přidáním povrchově aktivní látky, lze připravit emulzi. Při odpaření rozpouštědla vznikne hmota gelovité konzistence označována jako „umělý“ PHA neboli aPHA. [14]



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

Hustota inkluzí PHA se pohybuje v intervalu 1,2 – 1,3 g/cm³ u poly(3-hydroxy butyrátu) a okolo 1,05 g/cm³ u mcl-PHA. Pokles hustoty u mcl-PHA je způsoben obsahem vyšších hydroxyalkanoatových kyselin jako monomerů v PHA.

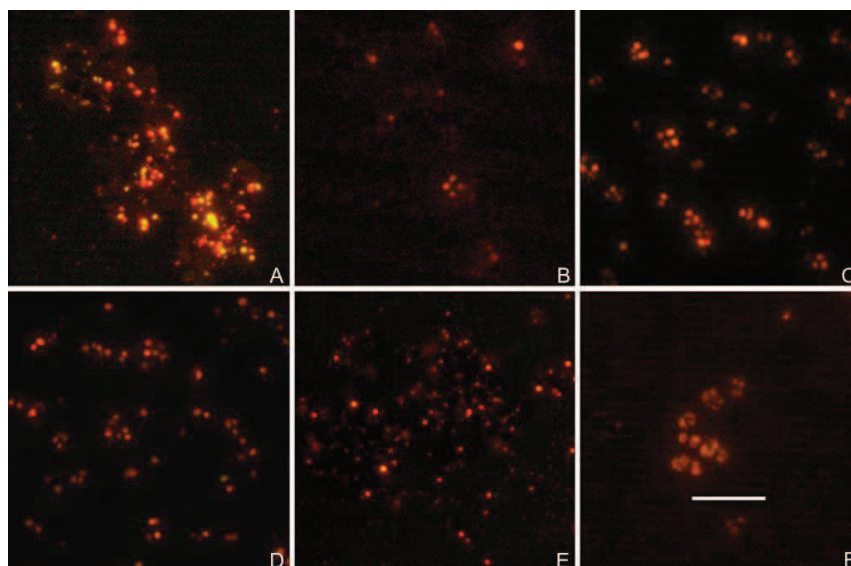
Izolované granule obsahují jako hlavní složku polyester, a to okolo 98%. Dále granule obsahují bílkoviny okolo 1,5%, především regulační proteiny, polymerační a depolymerační enzymy a okolo 0,5 % lipidů a fosfolipidů. [1, 2, 3, 16]



Obrázek 4 Obecné schéma granule PHA [17]

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

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



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

3.2.1.1. Phasiny

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

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

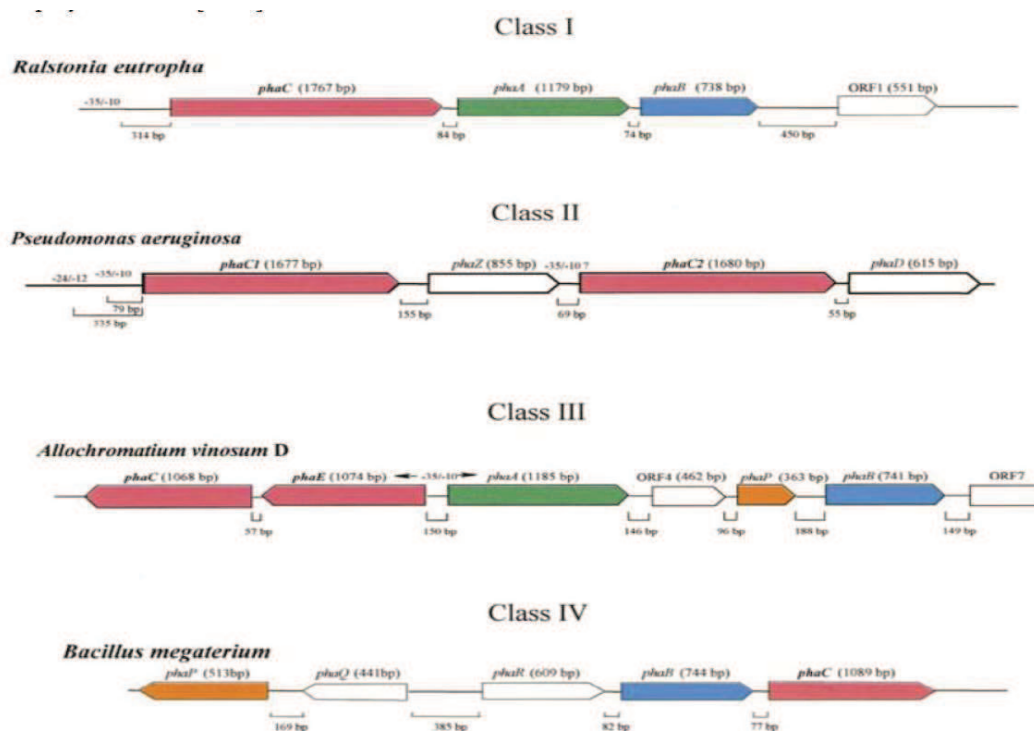
3.2.1.2. PHA polymerázy (syntázy)

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

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

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

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



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

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

phaA	gen pro 3-ketothiolázu	phaD	PHA depolymeráza
phaB	gen pro acetoacetyl-CoA reduktázu	phaE	syntáza III třídy
phaC/C ₁ /C ₂	geny pro PHA syntázy	phaP	syntáza IV třídy

3.2.2. Biodegradace PHA

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

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

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

3.2.2.1. Intracelulární degradace

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

U různým mikroorganismů byla nalezena řada intracelulárních depolymeráz (označovaných jako *phaZ_a*, *phaZ_b*, *phaZ_c* či *phaZ_d*). Tyto enzymy se rozdělují dle lokalizace v buňce. Mohou být volně rozpuštěny v cytoplazmě nebo jsou začleněny do membrány. [21, 22]

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

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

3.2.2.2. Extracelulární degradace

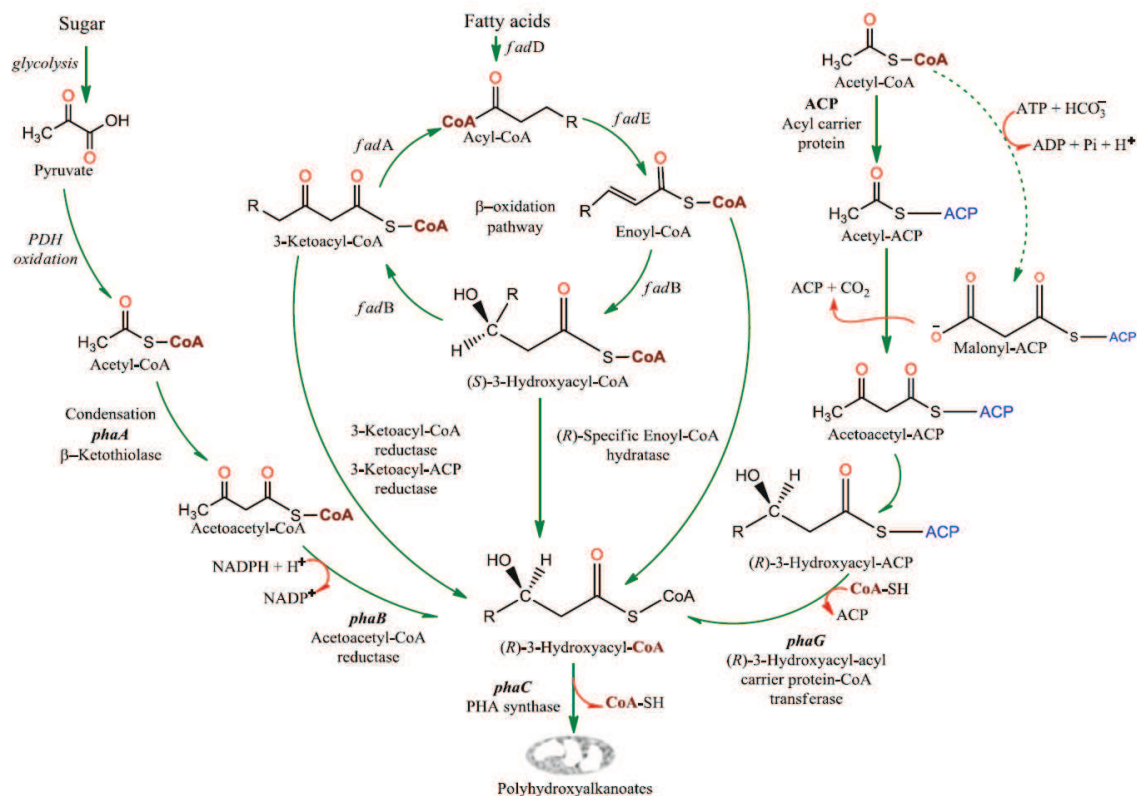
PHA se mimo buňku vyskytuje v tzv. denaturované formě (jak je uvedeno výše, viz. 3.2.1.). Schopnost degradovat extracelulární dPHA a využít jej jako zdroj energie je široce rozšířena mezi mikroorganismy a závisí na schopnosti extracelulární produkce PHA depolymeráz a na ovlivnění jejich aktivity prostředím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

3.2.3. Metabolismu PHA

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

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

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



Obrázek 7 Obecné metabolické schéma vedoucí k PHA [24]

3.2.3.1. Syntéza poly(3-hydroxybutyrátu)

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

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

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

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

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

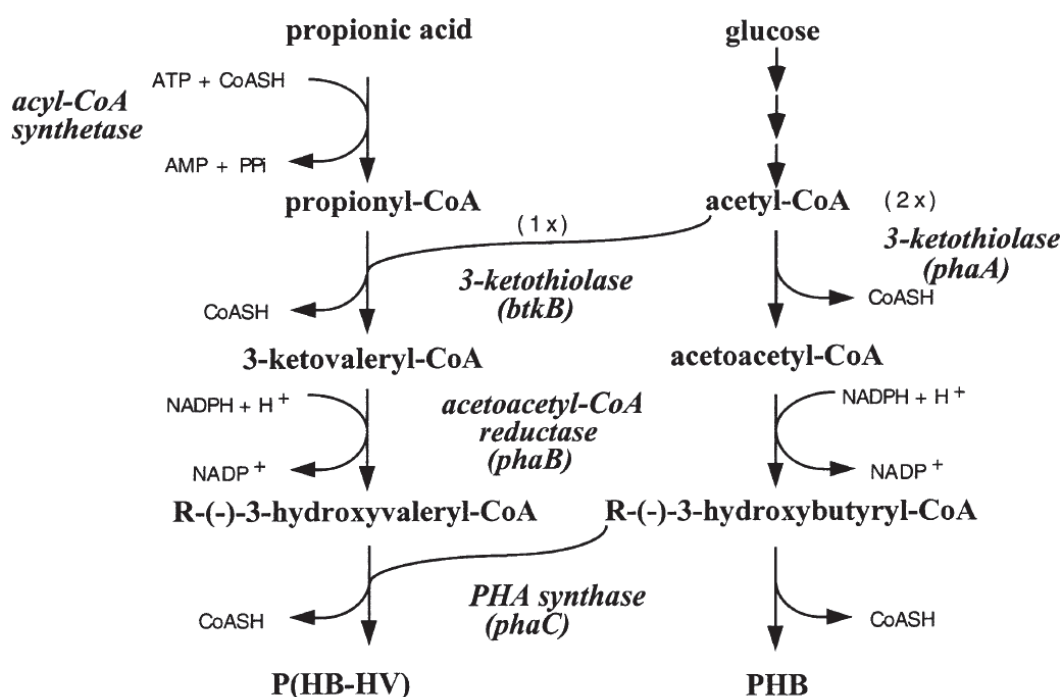
3.2.3.2. Syntéza poly(3-hydroxybutyrátu-co-3-hydroxyvalerátu)

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

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

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

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



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

3.2.3.3. 2-Methylcitrátový cyklus

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

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

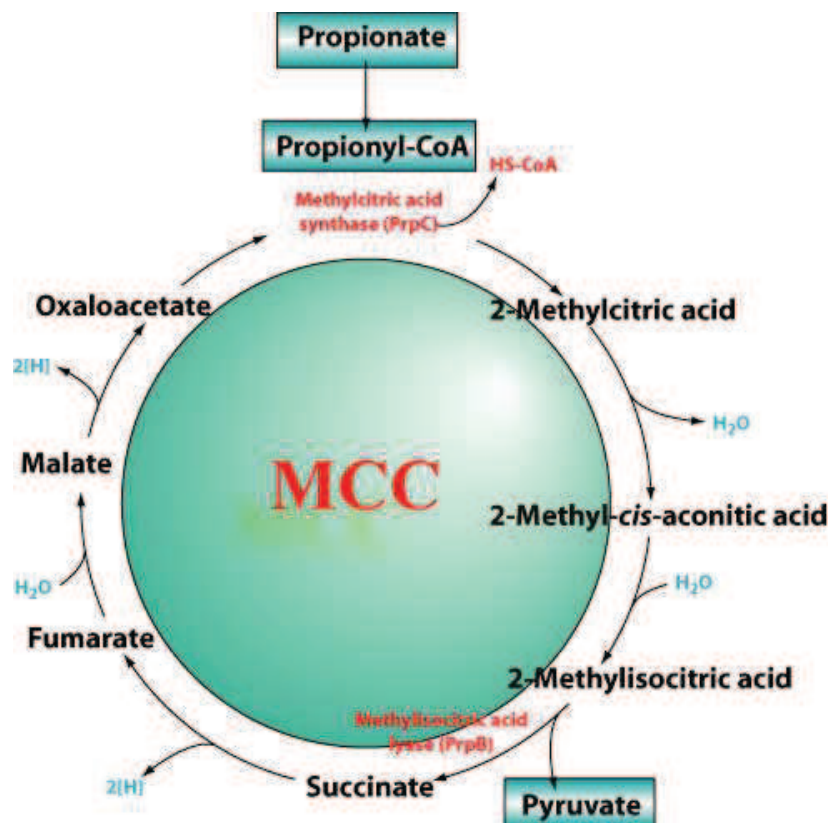
První krok MCC je analogický s citrátovým cyklem, dochází při něm ke kondenzaci propionyl-CoA s oxalacetátem za vzniku 2-methylcitrátu a uvolnění volného koenzymu A. Reakce je katalyzována 2-methylcitrátsyntázou a jedná se o důležitý regulační bod celého MCC cyklu. [26]

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

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

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

Obrázek číslo 9 ilustruje schéma 2-methylcitrátového cyklu.



Obrázek 9 Základní schéma 2-methylcitrátového cyklu [26]

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

3.2.3.4. Vznik homopolymeru P3HV

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

3.2.3.5. Syntéza mcl polyhydroxyalkanoátů

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

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

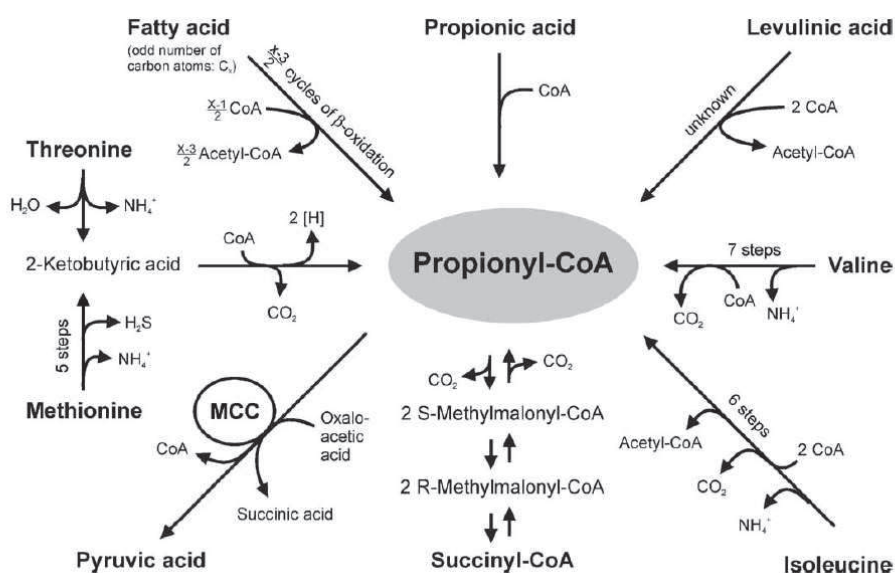
S ohledem na podobnost mezi scl-PHA biosyntézou a mcl-PHA biosyntézou se předpokládá, že dochází k polymeraci pouze R-izomerů 3-hydroxyacyl-CoA. Je tedy předpokládáno, že bakterie akumulující mcl-PHA jsou schopny enzymově katalyzované izomerace S konfigurace na R konfiguraci. [1, 10]

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

3.2.4. Metabolický vznik propionyl-CoA

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

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



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

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

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

3.2.4.2. Vznik propionyl-CoA z aminokyselin

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

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

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

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

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

3.2.4.3. Vznik propionyl-CoA z kyseliny levulové

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

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

3.2.5. Vybraní producenti scl-PHA

3.2.5.1. *Cupriavidus necator* H16

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

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

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

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

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

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

3.2.5.2. *Bacillus megaterium*

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

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

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

3.2.5.3. *Azotobacter vinelandii*

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

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

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

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

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

3.2.5.4. Methanotrofní a methylotrofní mikroorganismy

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

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

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

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

3.2.5.5. Fotosyntetizující mikroorganismy

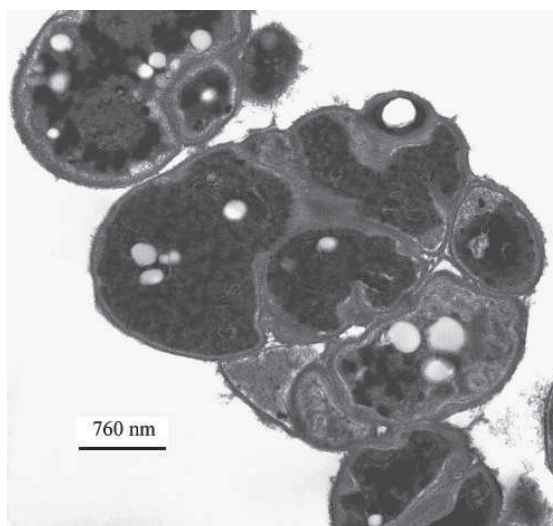
Je známo, že některé fotosyntetizující mikroorganismy jsou schopny akumulovat PHA. Například kyanoakterie *Spirulina subsalsa* u níž je možno zvýšit produkci PHA zvýšením salinity kultivačního média. Mechanismus tohoto iontové stresu zatím nebyl zcela objasněn, ale i při použití stresového faktoru je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

3.2.5.6. Halofilní mikroorganismy

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

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

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



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

3.2.5.7. Produkce pomocí kvasinek

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

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

3.2.6. Producenti mcl-PHA

3.2.6.1. rod *Pseudomonas*

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

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

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

3.2.7. PHA jako extracelulární metabolit

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

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

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

3.3. Produkce pomocí transgenních rostlin

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

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

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

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

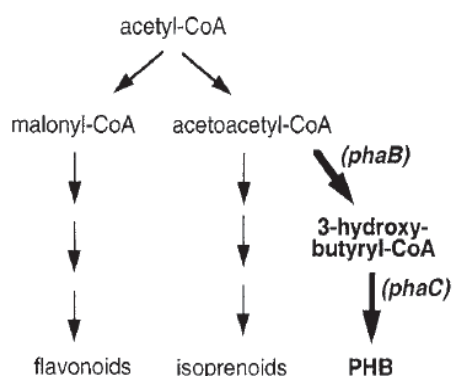
Tabulka 3 udává přehled výtěžků, jakých bylo dosaženo při produkci pomocí transgenních rostlin.

3.3.1. Syntéza P3HB v rostlinách

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

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

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



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

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

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

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

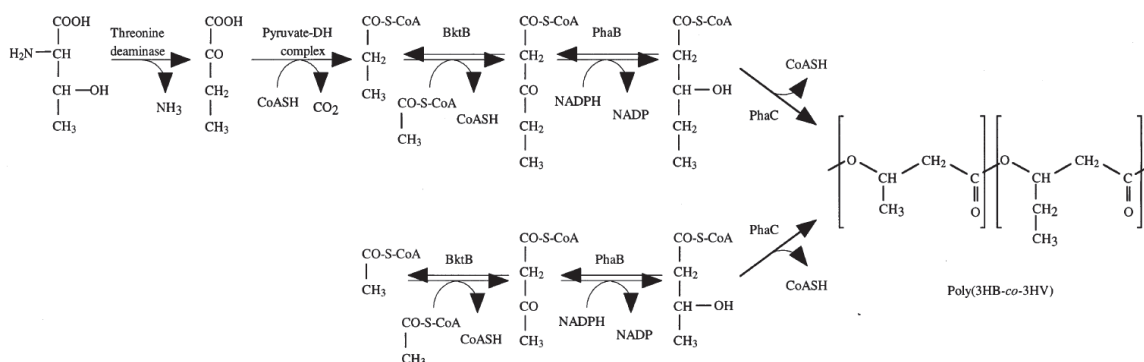
Akumulace P3HB byla také zkoumána v bavlněných vláknech, s cílem změnit materiálové vlastnosti produkované bavlny. Bylo dosaženo akumulace 0,3% P3HB v sušině bavlněných vláknech. U bavlněných vláken s P3HB byl pozorován vzrůst tepelné výhřevnosti a zlepšení tepelných a izolačních vlastností.

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

3.3.2. Syntéza kopolymerů PHA v rostlinách

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

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



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

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použité chemikálie, materiál, bakterie a přístroje

4.1.1. Produkční bakterie

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

4.1.2. Chemikálie pro kultivaci mikroorganismů

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

4.1.3. Ostatní chemikálie

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

4.1.4. Přístroje

Centrifuga Boeco C-28, Hettich Mikro 200
Analytické váhy Boeco
Laminární box Aura mini, Bio Air Instruments
Termostat, LS-35
Temperovaná třepačka, Heidolph Unimax 1010, Labicom s.r.o.
Plynový chromatograf
- Trace GC Ultra FID detektor, Finnigan (USA)
- Kolona – DB-WAX 30 m by 0,25 mm pro stanovení P3HB
- Kolona – SLB-IL 100 pro stanovení mastných kyselin
Fermentor Sartorius BIOSTAT 51 B® plus
ELISA reader BIOTEK EL 808
Mikrocentrifuga Boeco

4.2. Kultivace bakterie *Cupriavidus necator* H16

4.2.1. Uchování bakterie a příprava inokula

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

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

4.2.2. Živná média

Pro uchování kultury bylo použito komerčně dostupné médium Nutrient Broth

Beef extrakt 10 g
 Pepton 10 g
 NaCl 5 g
 Agar 20 g
 Destilovaná voda 1000 ml

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

(NH₄)₂SO₄ 3 g
 Na₂HPO₄ 11,1 g
 KH₂PO₄ 1,02 g
 MgSO₄ 0,2 g
 Roztok stopových prvků* 1 ml
 Destilovaná voda 1000 ml

*Roztok stopových prvků

FeCl₃ 9,7 g
 CaCl₂ 7,8 g
 CuSO₄ 0,156 g
 CoCl₂ 0,119 g
 NiCl₂ 0,118 g
 Destilovaná voda 1 000 ml

4.2.3. Vzorok olejí

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

Tabulka 4 Přehled použitých olejí pro kultivaci

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

4.2.4. Kultivace na různých olejích

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

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

Následující kapitoly této práce jsou utajeny na základě smlouvy číslo 021600009308.

5. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- [11] KOLLER, Martin a Anna SALERNO. Modern biotechnological polymer synthesis: Review. *Food technology and biotechnology*. 2010, č. 48. ISSN 1330-9862.
- [12] HORI, Katsutoshi, Kazuo SOGA a Yoshiharu DOI. Effects of culture conditions on molecular weights of poly(3-hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas putida* from octanoate. *Biotechnology Letters*. 1994, roč. 16, č. 7, s. 709-714. ISSN 0141-5492. DOI: 10.1007/BF00136476. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00136476>
- [13] BRAUNEGG, G. a M. KOLLER. Sustainable polymer production. *Polymer-plastics technology and engineering*. 2004, č. 43. ISSN 0360-2559.
- [14] JENDROSSEK, Dieter. Peculiarities of PHA granules preparation and PHA depolymerase activity determination. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007-3-29, roč. 74, č. 6, s. 1186-1196. ISSN 0175-7598. DOI: 10.1007/s00253-007-0860-9. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s00253-007-0860-9>
- [15] PHA Info. *EcoBioMaterial* [online]. 2006 [cit. 2013-03-07]. Dostupné z: <http://www.ecobiomaterial.com/pha-info.php>
- [16] LEE, Sang. Review: bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and bioengineering*. 1997, č. 49.
- [17] GRAGE, Katrin, Anika C. JAHNS, Natalie PARLANE, Rajasekaran PALANISAMY, Indira A. RASIAH, Jane A. ATWOOD a Bernd H. A. REHM. Bacterial Polyhydroxyalkanoate Granules: Biogenesis, Structure, and Potential Use as Nano-/Micro-Beads in Biotechnological and Biomedical Applications. *Biomacromolecules*. 2009-04-13, roč. 10, č. 4, s. 660-669. ISSN 1525-7797. DOI: 10.1021/bm801394s. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm801394s>
- [18] LEGAT, Andrea, Claudia GRUBER, Klaus ZANGGER, Gerhard WANNER a Helga STAN-LOTTER. Identification of polyhydroxyalkanoates in *Halococcus* and other haloarchaeal species. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, roč. 87, č. 3, s. 1119-1127. ISSN 0175-7598. DOI: 10.1007/s00253-010-2611-6. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s00253-010-2611-6>
- [19] POTTER, Markus a Alexander STEINBACHEL. Poly(3-hydroxybutyrate) Granule-Associated Proteins: Impacts on Poly(3-hydroxybutyrate) Synthesis and Degradation. *Biomacromolecules*. 2005, roč. 6, č. 2, s. 552-560. ISSN 1525-7797. DOI: 10.1021/bm049401n. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm049401n>
- [20] SOLAIMAN, Daniel K. Y. a Richard D. ASHBY. Rapid Genetic Characterization of Poly(hydroxyalkanoate) Synthase and Its Applications. *Biomacromolecules*. 2005, roč. 6, č. 2, s. 532-537. ISSN 1525-7797. DOI: 10.1021/bm0493640. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm0493640>

- [21] UCHINO, K., T. SAITO a D. JENDROSSEK. Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) Depolymerase *PhaZa1* Is Involved in Mobilization of Accumulated PHB in *Ralstonia eutropha* H16. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008-02-11, roč. 74, č. 4, s. 1058-1063. ISSN 0099-2240. DOI: 10.1128/AEM.02342-07. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.02342-07>
- [22] CHEN, H.-J., S.-C. PAN a G.-C. SHAW. Identification and Characterization of a Novel Intracellular Poly(3-Hydroxybutyrate) Depolymerase from *Bacillus megaterium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009-08-04, roč. 75, č. 16, s. 5290-5299. ISSN 0099-2240. DOI: 10.1128/AEM.00621-09. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.00621-09>
- [23] SUDESH, Kumar, Zihua GAN, Akira MAEHARA a Yoshiharu. Surface structure, morphology and stability of polyhydroxyalkanoate inclusion characterised by atomic force microscopy. *Polymer degradation and stability*. 2002, č. 77.
- [24] POIRIER, Yves. Polyhydroxyalkanoate synthesis in planst as a tool for biotechnology and basic studies of lipid metabolism. *Progress in lipid research*. 2002, č. 41.
- [25] HOFFMANN, Nils a Bernd H.A REHM. Regulation of polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*. 2004, roč. 237, č. 1, s. 1-7. ISSN 03781097. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2004.tb09671.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09671.x>
- [26] BRAMER, Christian a Alexander STEINBUCHHEL. The methylcitric acid pathway in *Ralstonia eutropha*: new genes identified involved in propionate metabolism. *Microbiology*. 2001, č. 147.
- [27] LEFEBVRE, Gilles, Magali ROCHER a Gerhart BRAUNEGG. Effect of low dissolved-oxygen concentrations on poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerat) production by *Alcaligenes eutropus*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. 1997, č. 63.
- [28] STEINBUCHHEL, Alexander a Tina LUTKE-EVERSLOH. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*. 2003, roč. 16, č. 2, s. 81-96. ISSN 1369703x. DOI: 10.1016/S1369-703X(03)00036-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X03000366>
- [29] STEINBUCHHEL, Alexander a Ursula PIEPER. Production of a copolyester of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvaleric acid from single unrelated carbon sources by a mutant of *Alcaligenes eutrophus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1992, roč. 37, č. 1, s. -. ISSN 0175-7598. DOI: 10.1007/BF00174193. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00174193>
- [30] GARRITY, Edited by G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2, Pts. A*. 2nd ed., rev. New York: Springer, 2000. ISBN 978-038-7950-402.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[47] PRIBELA, Alexander. *Analýza prírodných látok v potravách*. Bratislava: Alfa, 1978.

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

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

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