

# Screening genů produkujících biomateriály – polyhydroxyalkanoáty

Bc. Daniela Máčalová

---

Diplomová práce  
2021



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2020/2021

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Daniela Máčalová**  
Osobní číslo: **T19388**  
Studijní program: **N0711A130011 Biomateriály a kosmetika**  
Studijní obor: **Biomateriály a kosmetika**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **Screening genů produkujících biomateriály – polyhydroxyalkanoáty**

### Zásady pro vypracování

#### I. Teoretická část

1. Charakteristika polyhydroxyalkanoátu (PHA).
2. Možnosti získávání a využití PHA.
3. Charakteristika mikroorganismů vyskytujících se při tvorbě PHA.
4. Vliv substrátů na tvorbu PHA.

#### II. Praktická část

1. CI práce.
2. Metoda PCR pro stanovení bakterií produkující PHA.
3. Screening producentů PHA.
4. Vyhodnocení a zpracování výsledků.
5. Diskuze a formulace závěrů.

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

- [1] ANDERSON, A. J. a E. A. DAWES, 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol Rev.* 54(4), 450-472.
- [2] CHEN, Guo-Qiang a Junyu ZHANG. Microbial polyhydroxyalkanoates as medical implant biomaterials. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology.* 2017, 46(1), 1-18. DOI: 10.1080/21691401.2017.1371185. ISSN 2169-1401.
- [3] TUFAIL, Saiqa, Sajida MUNIR a Nazia JAMIL. Variation analysis of bacterial polyhydroxyalkanoates production using saturated and unsaturated hydrocarbons. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2017, 48(4), 629-636. DOI: 10.1016/j.bjm.2017.02.008. ISSN 15178382.
- [4] MARTÍNEZ-GUTIÉRREZ, Carolina A., Hever LATISNERE-BARRAGÁN, José Q. GARCÍA-MALDONADO a Alejandro LÓPEZ-CORTÉS. Screening of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria and PhaC-encoding genes in two hypersaline microbial mats from Guerrero Negro, Baja California Sur, Mexico. *PeerJ.* 2018, 6. DOI: 10.7717/peerj.4780. ISSN 2167-8359.
- [5] Databáze Web of Science.
- [6] Doporučení dle vedoucího.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Pavel Pleva, Ph.D.**  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce: **2. ledna 2021**  
Termín odevzdání diplomové práce: **14. května 2021**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.**  
ředitel ústavu

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

### **Prohlašuji,**

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## ABSTRAKT

V současné době se čím dál častěji používají biomateriály v medicínských aplikacích. Mezi tyto biomateriály patří i polyhydroxyalkanoáty (PHA), což je rozsáhlá skupina polymerů, které mají schopnost biodegradace a jsou biokompatibilní. Tyto polymery jsou produkovány některými mikroorganismy jako zásoba energie. Objevení těchto PHA producentů a pochopení biochemie jejich biosyntézy vede k nalezení vhodných producentů pro výrobu PHA, dokonce dokážeme určit jaký substrát pro výrobu PHA preferují a jaký typ PHA produkují.

Tato práce optimalizuje metodu polymerázové řetězové reakce (PCR) pro nalezení genů podílejících se na syntéze PHA. Hledanými geny jsou všechny čtyři třídy PHA syntáz (kódovány geny *phaC*, *phaE*, *phaR*), které katalyzují polymeraci. Dále jsou hledány klíčové geny kódující enzymy podílející se na tvorbě PHA ze sacharidů a mastných kyselin (*phaA*, *phaB*, *phaJ*, *phaG*, *fabG*). Zoptimalizovaná metoda byla pak použita pro otestování 77 mikrobiálních kmenů zahrnující 16 různých mikrobiálních rodů. U většiny z těchto mikroorganismů byla potvrzena přítomnost, alespoň jednoho z nich. Pouze u 10 kmenů nebyla potvrzena žádná přítomnost sledovaných genů. Přítomnost klíčové PHA syntázy byla potvrzena u 47 kmenů.

Zoptimalizovaná metoda v této práci přináší cenné informace o biochemických pochodech pro tvorbu PHA u testovaných mikroorganismů. Díky ní lze nalézt nové producenty PHA a substrát, který vyžadují pro tvorbu.

Klíčová slova: polyhydroxyalkanolát, biomateriál, PCR, biotechnologie

## ABSTRACT

Nowadays, biomaterials have been increasingly used in medical applications. These biomaterials incorporate polyhydroxyalkanoates (PHA), a considerable group of polymers that are both biodegradable and biocompatible. This group of polymers is produced by some microorganisms as an energy supply. The discovery of these PHA producers and the comprehension of their biochemistry of biosynthesis lead to the detection of convenient conditions to produce PHA. Actually, it is possible to determine what is their preferred substrate for PHA production and what type of PHA they are able to produce.

This thesis optimizes polymerase chain reaction (PCR) method for detecting genes involved in PHA synthesis. The detecting genes are all four classes of PHA synthase (encoded by the *phaC*, *phaE*, *phaR* genes), which catalyse polymerization. Furthermore, key genes encoding enzymes involved in the formation of PHA from carbohydrates and fatty acids (*phaA*, *phaB*, *phaJ*, *phaG*, *fabG*) are sought. Then, the optimized method was used to test 77 microbial strains comprising 16 different microbial genera. Most of these microorganisms have been confirmed by the presence of at least one of them. Only in 10 strains no presence of monitored genes was confirmed. The presence of key PHA synthase was confirmed in 47 strains.

The optimized method in this thesis provides valuable information about biochemical processes for PHA synthesis in examined microorganisms. Thanks to this are possible to recover new producers of PHA and the substrate they require for PHA synthesis.

Keywords: polyhydroxyalkanoate, biomaterial, PCR, biotechnology

## **PODĚKOVÁNÍ**

Především bych chtěla poděkovat svému vedoucímu Ing. Pavlu Plevovi, PhD. za jeho cenné rady, skvělé vedení, vstřícnost, ochotnost a motivaci během celého studia. Dále bych chtěla poděkovat zaměstnancům z Ústavu ochrany životního prostředí za pomoc s prací v laboratoři a vytvoření přátelského prostředí. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 POLYHYDROXYALKANOÁTY</b> .....	<b>12</b>
1.1 HISTORIE .....	14
1.2 MATERIÁLOVÉ VLASTNOSTI .....	14
1.3 VYUŽITÍ .....	15
1.3.1 Biomateriál .....	16
<b>2 PRODUCENTI POLYHYDROXYALKANOÁTŮ</b> .....	<b>19</b>
2.1 GRAMNEGATIVNÍ BAKTERIE .....	19
2.2 GRAMPOZITIVNÍ BAKTERIE .....	21
2.3 ARCHEA .....	21
2.4 REKOMBINANTNÍ PRODUCENTI .....	22
2.5 BIOSYNTÉZA POLYHYDROXYALKANOÁTŮ .....	23
2.5.1 Tvorba polyhydroxyalkanátů ze souvisejících zdrojů .....	23
2.5.2 Tvorba polyhydroxyalkanoátů s krátkým řetězcem z dalších zdrojů .....	25
2.5.3 Tvorba polyhydroxyalkanoátů se středně dlouhým řetězcem z dalších zdrojů .....	27
2.5.4 Polymerace pomocí polyhydroxyalkanoát syntázy .....	29
<b>3 METODY DETEKCE POLYHYDROXYALKANOÁTŮ</b> .....	<b>33</b>
3.1 GENETICKÉ TESTY .....	34
<b>4 MOŽNOSTI ZÍSKÁVÁNÍ PHA</b> .....	<b>38</b>
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>39</b>
<b>5 CÍL PRÁCE</b> .....	<b>40</b>
<b>6 POUŽITÝ MATERIÁL</b> .....	<b>41</b>
6.1 TESTOVANÉ BAKTERIÁLNÍ KULTURY .....	41
6.2 POUŽITÉ KULTIVAČNÍ MÉDIA .....	44
6.3 POUŽITÉ PRIMERY .....	45
<b>7 POUŽITÉ METODY</b> .....	<b>46</b>
7.1 IZOLACE DEOXYRIBONUKLEOVÉ KYSELINY .....	46
7.2 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE .....	46
<b>8 VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>49</b>
8.1 OPTIMALIZACE SCREENINGU GENŮ .....	49
8.1.1 Optimalizace teploty annealingu .....	49
8.1.2 Vytváření multiplexu PCR .....	52
8.2 SCREENING GENŮ .....	56



8.2.1	Rod <i>Acinetobacter</i> .....	59
8.2.2	Rod <i>Bacillus</i> .....	60
8.2.3	Rod <i>Citrobacter</i> .....	61
8.2.4	Rod <i>Cupriavidus</i> .....	61
8.2.5	Rod <i>Escherichia</i> .....	61
8.2.6	Rod <i>Guehomyces</i> .....	62
8.2.7	Rod <i>Klebsiella</i> .....	62
8.2.8	Rod <i>Kosakonia</i> .....	62
8.2.9	Rod <i>Lelliottia</i> .....	63
8.2.10	Rod <i>Lysinibacillus</i> .....	63
8.2.11	Rod <i>Oceanobacillus</i> .....	63
8.2.12	Rod <i>Pantoea</i> .....	63
8.2.13	Rod <i>Pseudomonas</i> .....	64
8.2.14	Rod <i>Rahnella</i> .....	66
8.2.15	Rod <i>Staphylococcus</i> .....	67
8.2.16	Rod <i>Stenotrophomonas</i> .....	67
<b>ZÁVĚR .....</b>		<b>68</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>		<b>70</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>		<b>95</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>		<b>98</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>		<b>99</b>

## ÚVOD

Již na počátku 17. století zazněla slavná otázka: „Být či nebýt?“ od slavné postavy Hamleta z jedné ze Shakespearových tragédií (Shakespeare, 2016). Dnes se zahlcením zpráv o znečištění naší planety především polymerním materiálem bychom tuto otázku mohli upravit na: „Být či nebýt s polymery?“. I přes neustále narůstající znečištění polymerním odpadem a narůstajícímu se počtu odpůrců polymerů by mělo být odpovědí: „Určitě být“ (Ritchie a Roser, 2019). Při hlubším zamyšlení je tato odpověď zřejmá. Protože bez polymerů nelze žít. Samotné naše tělo obsahuje polymery (např. bílkoviny, nukleové kyseliny) a i v rostlinách jsou polymery. Takže kdyby nebyly polymery, nebyli by lidé, zvířata a ani rostliny a tím pádem by nebyl ani život. Pak by tedy otázka: „Být či nebýt?“ byla úplně zbytečná (Stoklasa, 2005). Možná lepší otázka by byla: „Být či nebýt se syntetickými polymery?“. Zde je odpovědět už těžší. Dnešní společnost je stále obklopena syntetickými polymery. Vyrábíme z nich nejrůznější výrobky od nábytku přes různé součástky po obaly, biomateriály, a dokonce jsou součástí kosmetických výrobků. Syntetické polymery jsou důležité pro veškerý průmysl (Mishra, 2019). Dokázala by vůbec dnešní společnost se obejít bez těchto věcí a tím i bez syntetických polymerů? Přestože první syntetický polymer byl vyroben teprve v roce 1907 myslím si, že už bychom nezvládli žít bez syntetických polymerů (Crespy, Bozonnet a Meier, 2008). Ovšem pokud budeme nadále znečišťovat naši planetu nejspíš už nebudeme kde moct žít. Další otázkou pak je: „Jak žít s polymery?“. Odpovědí by mohlo být předcházení vzniku odpadu, recyklace, používání biodegradovatelných polymerů a cirkulární ekonomika. Jedním z příkladů řešením této otázky je i mikrobiální produkce polyhydroxyalkanoátu (PHA). PHA mají díky své úplné biodegradovatelnosti, biokompatibilitě a podobným mechanickým vlastnostem polypropylenu (PP) široké uplatnění především jako jednorázový plast (Rai *et al.*, 2011a; Kosior, Messias a Fowler, 2006). Bohužel výroba PHA oproti PP je dražší, proto nachází uplatnění především jako biomateriál (Thorat Gadgil, Killi a Rathna, 2017).

S prodlužující se délkou života roste potřeba po těchto biomateriálech, proto je nezbytné hledat levnější metody produkce, nové producenty a syntetizovat PHA s optimálními vlastnostmi pro danou aplikaci. Screening genů podílející se na produkci PHA vede k pochopení syntézy PHA a nalezení nových producentů a tím může vést i k snížení ceny PHA a nalezení dalších typů PHA.

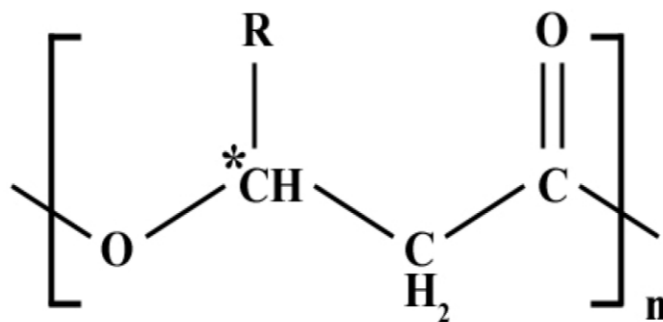
## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 POLYHYDROXYALKANOÁTY

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) neboli polyhydroxy mastné kyseliny jsou skupinou polyesterů, které jsou syntetizovány mikroorganismy. Molekula PHA je tvořena 600 až 35 000 monomerními jednotkami (R)-hydroxy mastné kyseliny (Khanna a Srivastava, 2005). Každý mer obsahuje postranní řetězec (R), který je obvykle tvořen nasycenou alkylovou skupinou viz (Obr. 1 a Tab. 1) nebo méně často nenasycenou alkylovou skupinou, rozvětvenou alkylovou skupinou či substituovanou alkylovou skupinou (Lu, Tappel a Nomura, 2009). PHA lze na základě počtu uhlíku postranního řetězce rozdělit na PHA s krátkým řetězcem (scl PHA) s 3-5 uhlíky, se středně dlouhým řetězcem (mcl PHA) s 6-14 uhlíky a dlouhým řetězcem (lcl PHA) s více jak 15 uhlíky (Khanna a Srivastava, 2005). Díky této rozmanitosti merů tvořící PHA existuje přes 150 různých typů PHA, které mohou být jako homopolymery i kopolymery (Zinn a Hany, 2005).

PHA se řadí mezi biodegradovatelné polymery, což podle normy Mezinárodní organizace pro normalizaci ISO 472:2013, 2013 znamená, že jejich chemická struktura podléhá degradaci způsobenou biologickou aktivitou, především enzymy. Podle stejné normy (ISO 472:2013, 2013) patří PHA i mezi biologicky recyklovatelné polymery, protože se za řízených podmínek rozpadají až na stabilizované organické zbytky, vodu a oxid uhličitý při aerobních podmínkách kompostování a při anaerobních podmínkách navíc vzniká methan. Biodegradabilních polymerů je celá řada. Zahrnují jednak přírodní polymery (kolagen, chitin, škrob, celulóza atd.) i syntetické (polylaktid, polyglykolid atd.) (Vroman a Tighzert, 2009). Výhodou PHA oproti některým jiným biodegradovatelným polymerům je, že na mikrobiální produkci PHA se nevyužívá zemědělská půda. Ovšem vzhledem nízké a stále drahé produkci se PHA syntetizuje i pomocí geneticky upravených rostlin, kde už je potřebná zemědělská půda (Flickinger a Drew, 1999). Díky své biodegradovatelnosti má potenciální využití jako obalový materiál a výrobě zemědělských fólií (Chen, 2011; Bucci, Tavares a Sell, 2005). Je pravděpodobné, že PHA časem dokonce nahradí typické obalové materiály jako je polyetylen, polypropylen a polyethylentereftalát (Kosior, Messias a Fowler, 2006).

Další výhodou je biokompatibilita PHA s krví a tkáněmi. Lze ho tedy využít jako materiál pro chirurgické implantáty a na sutury ran. Ve farmacii se využívá jako materiál na výrobu lékových mikrokapslí a jako obalový materiál tablet (Sharma a Mudhoo, 2011).

Obrázek 1 PHA (upraveno dle Tan *et al.*, 2014)Tabulka 1 Názvy PHA podle počtu uhlíku a navázaného substituentu (upraveno dle Tan *et al.*, 2014)

R skupina	Počet uhlíků	Název polymeru
Methyl	4	Poly(3-hydroxybutyrát)
Ethyl	5	Poly(3hydroxyvalerát)
Propyl	6	Poly(3-hydroxyhexanoát)
Butyl	7	Poly(3-hydroxyheptanoát)
Pentyl	8	Poly(3-hydroxyoktanát)
Hexyl	9	Poly(3-hydroxynonanoát)
Heptyl	10	Poly(3-hydroxydekanonát)
Oktyl	11	Poly(3-hydroxyundekanonát)
Nonyl	12	Poly(3-hydroxydodekanonát)
Decyl	13	Poly(3-hydroxytridekanonát)
Undecyl	14	Poly(3-hydroxytetradekanonát)
Dodecyl	15	Poly(3-hydroxypentadekanonát)
Tridecyl	16	Poly(3-hydroxyhexadekanonát)

## 1.1 Historie

Historie PHA začala již v roce 1926, kdy Lemoign objevil poly(R-3-hydroxybutyrát) (P(3HB)). Lemoing izoloval a charakterizoval P(3HB) z bakterie *Bacillus megaterium* (Lemoigne, 1926). Od té doby bylo PHA nalezeno v řadě grampozitivních i gramnegativních bakterií i archebakterií (Lee, 1996). S dalším objevem přišli v roce 1958. Macrae a Wilkinson (1958) zjistili, že P(3HB) bakterie produkují při nadbytku uhlíku a nedostatku dusíku. Z tohoto objevu usoudili, že mikroorganismy P(3HB) produkují jako intracelulární zásobní látku. S rokem 1973 přišla ropná krize, což vedlo ke hledání alternativních zdrojů plastů (Volova, 2004). Této situace využila firma Imperial Chemical Industries (ICI Ltd., UK) a přišla v roce 1976 na trh s kopolymerem poly(3-hydroxybutyrát-3-hydroxyvalerát) (P(3HB-co-3HV)), který pojmenovali jako Biopol™. Ovšem tento kopolymer byl výrazně dražší než obvyklé plasty. Cenu snížila v roce 1996 americká firma Monsanto, která zakoupila práva Biopolu™ a začala jej produkovat transgenními rostlinami (Flickinger a Drew, 1999).

Dnes již jsou PHA vyráběny řadou firem pod různými komerčními názvy např. Biocycle, Biogreen, Biomer, Ecogen, Goodfellow, Jangu Nantian, Minerv-PHA, Mirel, Mtabolic, Nodax a Tepha (Bugnicourt *et al.*, 2014). Z Českých firem je to firma Nafigate corporate, která přišla na trh s konceptem Hydal. Hydal využívá na produkci P(3HB) odpadní fritovací olej jako vhodný substrát pro mikroorganismy. Nafigate prodává jednak know-how výroby P(3HB) a také vyrábí z P(3HB) peelingové kousky do sprchového mléka, čím předchází k dostávání se mikroplastů do životního prostředí. Jejím dalším produktem je opalovací krém, kde využívá P(3HB) jako ochranu proti ultrafialovému záření (UV) (Biotechnologie Hydal, c2019).

## 1.2 Materiálové vlastnosti

Polyhydroxyalkanoáty mají podobné materiálové vlastnosti jako tradičně užívané plasty (např. PP). Díky nim PHA získal velký zájem ve vědě i průmyslu. Ovšem tyto parametry se mohou pohybovat v širokém rozmezí, protože jsou ovlivněny mnoha parametry např. typem monomerní jednotky, chemickou strukturou, a především molekulovou hmotností. Polyhydroxyalkanoáty s krátkými řetězci jsou nepružné a křehké kvůli vyšší úrovni krystalinity, a proto tyto PHA pak nejsou vhodné pro komerční využití jako jsou obaly či biomedicínské aplikace. Nicméně mcl PHA mají vyšší elongaci při přetržení a nižší teplotu skelného přechodu, proto se chovají elasticky (Rai *et al.*, 2011a). Podobně jako mcl PHA

se chovají i lcl PHA. Polyhydroxyalkanoáty s dlouhými řetězci mají ještě nižší teplotu skelného přechodu a vyšší viskozitu. K získání nejlepších vlastností se vytváří kopolymery s různě dlouhých řetězců. Díky kopolymeraci mají PHA lepší tažnost a zpracovatelnost i pro komerční a biomedicínské aplikace (Singh *et al.* 2017; Kumar *et al.*, 2015). V (Tab. 2) je souhrn tepelných a mechanických vlastností vybraných PHA společně s tradičními polymery jako je PP a nízkohustotní polyetylen (LDPE).

Tabulka 2 Materiálové vlastnosti PHA (PHB – polyhydroxybutyrát, PHV – polyhydroxyvalerát, PHHD – polyhydroxyhexadekanát, PHOD – polyhydroxyoktadekanát, PHO – polyhydroxyoktanát, PHHx –polyhydroxyhexanoát, PHA – směs polyhydroxyalkanoátů) (upraveno dle Singh *et al.*, 2019)

Materiál, molové frakce u kopolymerů	Teplota tání (°C)	Teplota skelného přechodu (°C)	Youngův modul (GPa)	Pevnost v tahu (MPa)	Elongace při přetržení (%)
P(3HB)	180	4	3,5	40	5
P(3HB-co-3HV), 80:20	145	-1	0,8	20	50
P(3HB-co-3HA), 94:6	133	-8	0,2	17	680
P(3HB-co-3HHD-co-3HOD), 95,7:1,0:1,8:1,5	131	-14	0,3	19	723
P(4HB)	53	-48	0,149	104	1000
P(3HB-co-4HB), 84:16	152	-8	-	26	444
P(3HO-co-3HHx), 88:12	61	-35	0,008	9	380
PP	176	-10	1,7	38	400
LDPE	130	-36	0,2	10	620

### 1.3 Využití

Polyhydroxyalkanoáty se řadí mezi ideální kandidáty materiálů pro balení potravin. Mají slibné vlastnosti pro tento účel jako je biologická rozložitelnost, hydrofobicita, netoxicity, nelineární optická aktivita, termoplasticita a nepropustnost pro plyny a vodu

(Bugnicourt *et al.*, 2014; Koller, 2014; Tan *et al.*, 2014; Rhim, Park a Ha, 2013; Gao *et al.*, 2011; Chen, 2009; Thellen *et al.*, 2008; Khanna a Srivastava, 2005; Choi *et al.*, 2003; Sudesh, Abe a Doi, 2000).

Další možnou aplikací PHA jsou potahy papíru a lepenek pro balení potravin. Při nanesení potahu z PHB a P(3HB-co-3HV) na papír a karton byla prokázána schopnost snížit absorpci vlhkosti a paropropustnosti (Cyras, Soledad a Analía, 2009; Cyras *et al.*, 2007 a Kuusipalo 2000a, 2000b).

Jelikož stále roste poptávka po biologicky rozložitelných plastech, která je poháněna vládními předpisy i politikou proti plastům na jedno použití a s trendem zavádění udržitelného rozvoje a oběhového hospodářství, je stále větší poptávka i po PHA. Předpokládá se, že biologicky rozložitelné plasty budou časem dominovat v různých aplikacích, především v obalových materiálech. Mezi klíčové hráče pro produkci PHA se dnes řadí Kaneka Corporation (Japonsko), Danimer Scientific (USA), Shenzhen Ecomann Biotechnology Co., Ltd (Čína), Bio-On Srl (Itálie), Newlight Technologies, LLC (USA) a TianAn Biological Materials Co. Ltd. (Čína). Danimer Scientific (USA) je největším hráčem na trhu s PHA, která se stále rozšiřuje především do zemích Severní Ameriky a Asijsko-pacifické oblasti. Kaneka Corporation (Japonsko), která v roce 2019 chtěla zvýšit svou výrobní kapacitu na 5 000 tun PHA za rok (Polyhydroxyalkanoate (PHA) Market by Type (Short Chain Length, Medium Chain Length), Production Method (Sugar Fermentation, Vegetable Oil Fermentation, Methane Fermentation), Application, and Region – Global Forecast to 2024, 2019).

Ovšem cena PHA je stále dražší než u běžně používaných obalových materiálů, proto nachází uplatnění především jako biomateriál (Thorat Gadgil, Killi a Rathna, 2017).

### 1.3.1 Biomateriál

Biomateriály jsou materiály používané na zařízení, které nahrazují část těla či jeho funkci bezpečným a fyziologicky přijatelným způsobem. Jedná se o materiály pro použití v medicínských aplikacích určených ke kontaktu s biologickými systémy (Park a Lakes, 2007). Aby mohl být daný materiál použit do biomedicínských aplikací musí být biokompatibilní, což je schopnost podporovat vhodně buněčnou aktivitu bez vyvolání systémových reakcí pacienta, ani jeho produkty vznikající degradací nesmí vyvolávat záněty (Shoichet, 2010). Na testování požadavků biokompatibility v České republice se využívá norma vydávaná Mezinárodní organizací pro normalizaci ISO 10993 - Biologické hodnocení zdravotnických prostředků (ISO 10993, 2010).



Při studiu biokompatibility *in vivo* PHA vyvolávaly minimální imunitní odpověď podobnou běžně používaným chirurgickým materiálům jako je hedvábí či katgut (Brigham a Sinskey, 2012). Vývojem PHA lze docílit vhodných mechanických vlastností i požadovanou dobou biodegradace pro konkrétní aplikaci (Chen, 2010a). Schopnost biodegradace PHA je důležitou vlastností pro aplikace v tkáňovém inženýrství a při dodávkách léků (Chen a Wu, 2005). Vhodnost této aplikace podporuje i snadná přilnavost a množení buněk jako jsou adrenokortikální buňky, epitelální buňky, fibroblasty, hepatocyty, chondrocyty, mezenchymální kmenové buňky, nervové kmenové buňky, osteoblasty a vaskulární buňky hladkého svalstva, proto se PHA využívá jako scaffold. Další skvělou vlastností PHA je schopnost degradovat povrchovou erozí, proto jsou PHA ideálními kandidáty na použití jako nosiče léčiv (Chen, 2010a).

Dále se PHA používá v široké škále chirurgických materiálů a implantátů jako jsou cvočky, chirurgická síť, kolíky, kostní dlahy, kostní hmoždinky, nýty, stehy, svorky, šrouby, ortopedické, obvazy na rány, zařízení na opravu menisku, záplaty na implantáty a peány a žilní chlopně (Chen, 2010a). V roce 2009 byl objeven potenciál využití PHA granulí jako proteinový imobilizér, který lze použít při diagnostice a v terapeutických aplikacích (Grage *et al.*, 2009).

Důležitým progresem v použití PHA bylo schválení prvního komerčního produktu z PHA TephaFLEX® americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration) pro biomedicínské aplikace (Lizarraga-Valderrama *et al.*, 2016).

Svémi jedinečnými vlastnostmi (vysoká kompatibilita s nervovými buňkami a kontrolované degradace od povrchu) je PHA ideální kandidát pro výrobu potrubí při opravách periferních nervů. Polyhydroxyalkanoláty jsou dokonce vhodnější pro tyto aplikace, než jiné používané polymery pro tuto aplikaci jako je např. polylaktid (PLA), polyglykolid (PGA). Protože PHA má kontrolovanější degradaci od povrchu, kdežto ostatní degradují hromadnou erozí (Lizarraga-Valderrama *et al.*, 2016). U P(3HB) byla dokonce prokázána schopnost opravy nervové mezery velké 40 mm (Mohanna, Terenghi a Wiberg, 2009).

Polyhydroxyalkanoláty lze aplikovat i při operacích kardiovaskulárního systému. Jedním z využití jsou P(3HB) náplasti, které slouží k uzavření perikardu po operaci srdce k zábraně adheze mezi srdcem a hrudní kostí. U těchto náplastí bylo prokázáno snížení zánětu, absence infekce a nepřítomnost pooperačních adhezí. Studium P(3HB) náplastí bylo provedeno i na léčbu defektu síňového septa, u které zajistily plnou regeneraci endotelu (Williams a Martin, 2005).

Dále jsou PHA vhodné pro řízenou regeneraci kostí a tkání, která lze použít např. při léčbě paradontózy. Toto onemocnění způsobuje degradaci alveolární kosti a paradontu a použití bariérové membrány z PHA vede k lepší regeneraci poškozené tkáně (Williams a Martin, 2005; Zinn, Witholt a Egli, 2001).

Využití PHA v reparacích kostí je též vhodnou volbou. Díky povrchové degradaci poskytují lepší mechanickou oporu a poskytují delší čas pro obnovu kosti než ostatní používané polymery a tím snižuje riziko selhání implantátu (Rose a Oreffo, 2002). Kopolymery P(3HB-co-3HHx) jsou vhodné pro použití v tkáňovém inženýrství chrupavek kvůli svým elastomerním vlastnostem a podporováním produkce extracelulárního matrixu v kloubní chrupavce (Deng *et al.*, 2003).

Další využití PHA je jako nosič léčiva. Při vnesení naplněné PHA matrice léčivem do těla dochází k průběžnému uvolňování léčiva v diskrétních dávkách, protože se PHA postupně degraduje pomocí nespecifických lipáz a esteráz. Výhodou PHA nosičů je možnost ovlivnit kinetiku uvolňování úpravou polymerních vlastností např. změnou postranních řetězců monomeru (Lizarraga-Valderrama *et al.*, 2016).

## 2 PRODUCENTI POLYHYDROXYALKANOÁTŮ

Mezi producenty PHA je zahrnováno více jak 70 bakteriálních a archaálních rodů (Lu, Tappel a Nomura, 2009; Poli *et al.*, 2011). Mikroorganismy produkují PHA jako zásobárnu uhlíku, která jim pomáhá pro přežití stresových situací. Proto jsou producenti PHA odolnější vůči stresu, jako je UV záření, teplo i osmotický šok (Kadouri *et al.*, 2005). Producenti PHA jsou jako biokatalyzátory, kteří dokážou spojovat velké množství uhlíku metabolickými dráhami. Mezi zdroje těchto uhlíků patří sacharidy (např. arabinóza, fruktóza, glukóza, maltóza), n-alkány (např. hexan, oktan, dodekan), n-alkanové kyseliny (např. kyselina octová, kyselina máselná, kyselina valerová, kyselina laurová), n-alkoholy (např. methanol, ethanol, glycerol oktanol) a plyny (např. methan a oxid uhličitý) (Verlinden *et al.*, 2007; Anderson a Dawes, 1990). Dokonce dokážou producenti PHA přeměňovat odpadní látky s obsahem uhlíku na PHA (Koller *et al.*, 2010). Mezi tyto odpady patří např. fritovací olej, odpad z octu, potravinový odpad, zemědělský odpad, odpadní voda, surový glycerol z výroby bionafty, plastový odpad a skládkové plyny (Tan *et al.*, 2014).

### 2.1 Gramnegativní bakterie

Většina z PHA producentů jsou gramnegativní bakterie (Lu, Tappel a Nomura, 2009). PHA s krátkým řetězcem jsou syntetizovány s vysokou produkcí mnoha gramnegativními bakteriálními rody např. *Azohydromonas*, *Burkholderia* a *Cupriavidus* (Tan *et al.*, 2014). U *Azohydromonas lata* (ATCC 29714) byla prokázána schopnost produkovat P(3HB) v 50 % až 88 % hmotnosti z celkové hmotnosti vysušených buněk (% CDM) z různých cukerných zdrojů jako je glukóza, fruktóza a sacharóza (Grothe, Moo-Young a Chisti, 1999; Wang a Lee, 1997; Gomez *et al.*, 1996; Yamane, Fukunaga a Lee, 1996). Oproti tomu *Burkholderia* sp. USM (JCM 15050) vytváří až 69 % CDM P(3HB) z mastných kyselin (Chee *et al.*, 2010). U *Cupriavidus necator* H16 (ATCC 17699) byla prokázána schopnost používat rozmanité substráty jako jsou sacharidy (glukóza, fruktóza), CO<sub>2</sub>, rostlinné oleje (kukuřičný, olivový a palmový olej), n-alkanové kyseliny (kyselina 4-hydroxyhexanová) pro tvorbu P(3HB) v 67–88,9 % CDM (Fukui a Doi, 1998; Gomez *et al.*, 1996; Valentin *et al.*, 1994; Sonnleitner *et al.*, 1979). Kvůli vysoké produkci se často se tyto gramnegativní bakterie používají v průmyslu (Chen, 2010b). Dalšími gramnegativními producenti produkujícími PHA jsou methylofilní bakterie, díky kterým by mohlo dojít ke snížení ceny PHA, protože methanol je levnější substrát, než často používané cukerné substráty (Khanna a Srivastava, 2005). Mezi tyto methalofilní bakterie patří

*Methylobacterium extorquens* (ATCC 55366) a *Paracoccus denitrificans* (ATCC 177741) s produkcí P(3HB) až 46 % CDM z methanolu a produkcí P(3HV) s až 24 % CDM z n-pentanolu (Yamane, Chen a Ueda, 1996; Bourque, Pomerleau a Groleau, 1995).

Mezi producenty mcl PHA se řadí zástupci z rodu *Pseudomonas*. Mezi tyto zástupce patří *Pseudomonas putida* mt-2 (NCIMB 10432) s produkcí až 77 % CDM z kyseliny oktanové (Shahid *et al.*, 2013). U některých zástupců z rodu *Pseudomonas* byla prokázána schopnost produkovat kopolymery scl-mcl PHA. Mezi tyto druhy patří *P. marginalis* (DSM 50276), *P. mendocina* (ATCC 25411), *P. putida* GPO1 (ATCC 29347) a *P. oleovorans* (ATCC 8062) při použití n-alkanoátů a 1,3-butandiolu jako zdroje uhlíku. Kopolymer scl-mcl PHA u většiny pseudomonád obsahuje menší množství scl PHA (méně než 7,8 mol% P(3HB)), ovšem u *P. oleovorans* (ATCC 8062) při použití 4-hydroxyhexanové kyseliny jako substrátu vzniká scl-mcl PHA kopolymer obsahující mery s převahou scl PHA (92,4 mol% P(3HB)) (Lee *et al.*, 1995; Valentin *et al.*, 1994; Gross *et al.*, 1989). Rod *Pseudomonas* je znám pro své bioremediační vlastnosti a dokáže dokonce zpracovat toxické a nerozložitelné substráty s aromatickými uhlíky (Poblete-Castro *et al.*, 2012). Těto vlastnosti bylo využito a byla prokázána u *P. putida* F1(DSM 6899), *P. putida* mt-2 (NCIMB 10432) a *P. putida* CA-3 (NCIMB 41162) schopnost přeměnit toxické látky (ethylbenzen, benzen, toluen, xylen a styren) na mcl PHA (Nikodinovic *et al.*, 2008).

Tvorba PHA byla zaznamenána i u gramnegativních extremofilních bakterií. U těchto bakterií dochází k produkci PHA jen za speciálních kultivačních podmínek, buď v substrátech s vysokou koncentrací soli nebo za zvýšené teploty. Mezi tyto extremofilních producenty patří halofilní *Halomonas boliviensis* LC1 (DSM 15516) s produkcí 56 % CDM P(3HB) ze škrobového hydrolyzátu a 0,77 M koncentrací NaCl a termofilní *Thermus thermophilus* HB8 (ATCC 27634) s produkcí 35,6 % CDM kopolymeru scl-mcl PHA ze syrovátky při kultivaci při 70 °C (Pantazaki *et al.*, 2009).

Velkou nevýhodou použití gramnegativních producentů je přítomnost lipopolysacharidových endotoxinů na povrchu buněčné membrány, které se mohou dostávat do vyzolovaného PHA (Rai *et al.*, 2011a). Tyto endotoxiny mohou vyvolávat silné zánětlivé reakce (Ray *et al.*, 2013), proto by byly takto kontaminované PHA nevhodné pro použití jako biomateriál. Endotoxiny lze ovšem z PHA odstranit oxidačními činidly (tj. chlornan sodný, NaOH, ozon, peroxid vodíku a benzoylperoxid), opakovaním extrakcí rozpouštědlem nebo čištěním aktivním uhlím po extrakci rozpouštědlem (Rai *et al.*, 2011a; Wampfler *et al.*, 2010; Chen a Wu, 2005).

## 2.2 Grampozitivní bakterie

Mezi grampozitivní producenty PHA jsou zahrnuty rody *Bacillus*, *Caryophanon*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Microlunatus*, *Microcystis*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Streptomyces* (Lu, Tappel a Nomura, 2009). Oproti gramnegativním grampozitivní produkují menší množství PHA, proto se v průmyslu moc nevyužívají (Valappil *et al.*, 2007; Karr, Waters a Emerich, 1983). Ovšem existuje i několik grampozitivních bakterií s vyšší produkcí, než mají některé gramnegativní bakterie. Mezi producenty s vysokou produkcí se řadí *Streptomyces* sp. (ATCC 1238) s produkcí 82 % CDM scl PHA při použití glukózy jako substrátu (Valappil *et al.*, 2007; Karr, Waters a Emerich, 1983). Některé grampozitivní bakterie dokáží syntetizovat i kopolymery mcl PHA či scl-mcl PHA při použití vhodného substrátu a kultivačních podmínek. Například u *Bacillus megaterium* (DSM 509) při použití glycerolu a kyseliny jantarové v minerálním médiu doplněného dusíkem se vytváří výhradně P(3HB), ovšem při použití stejného substrátu pouze bez dusíku vytváří kopolymery obsahující jednotky scl i mcl PHA (scl-mcl PHA) a při kultivaci na kyselině oktanové v nepřítomnosti dusíku výlučně mcl PHA (Shahid *et al.*, 2013). I přes nižší produkci jsou grampozitivní producenti vhodnější pro výrobu PHA pro medicínské aplikace, protože neobsahují endotoxiny (Valappil *et al.*, 2007). Nicméně některé grampozitivní bakterie vytváří lipoglykany nebo lipoteichové kyseliny, které vyvolávají obdobnou reakci v těle jako endotoxiny (Ray *et al.*, 2013). Například rody *Corynebacterium*, *Nocardia* a *Rhodococcus* vytváří lipoglykany (Sutcliffe, Brown a Dover, 2010; Nigou, Gilleron a Puzo, 2003; Misaki, Azuma a Yamamura, 1977) a některé kmeny z rodu *Bacillus*, *Clostridium* a *Staphylococcus* kyselinu lipoteichovou (Sutcliffe, 1995; Ruhland a Fiedler, 1990).

## 2.3 Archea

Dalšími producenty jsou halofilní archea. Mezi tyto producenty se řadí rody *Haloferax*, *Halalkalicoccus*, *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halobiforma*, *Halococcus*, *Halopiger*, *Haloquadratum*, *Halorhabdus*, *Halorubrum*, *Halostagnicola*, *Haloterrigena*, *Natrialba*, *Natrinema*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Natronomonas* a *Natronorubrum* (Han *et al.*, 2010). Halofilní archea potřebují pro normální aktivitu svých enzymů vysoké koncentrace soli (až 6 M NaCl) (Danson a Hough, 1997). Produkce PHA u halofilních archeí byla prokázána z glukózy, těkavých mastných kyselin, škrobu, hydrolyzátu syrovátky, vinassi a surového glycerolu produkce bionafty. Jejich produkce PHA je převážně nízká

mezi 0,8 až 22,9 % CDM. Ovšem objevily se i halofilní archea s vysokou produkcí. Mezi nejlepší producenty se řadí *Haloferax mediterranei* (DSM 1411) s produkcí 50–76 % CDM při nutné přítomnosti NaCl v koncentraci 2–5 M (Hermann-Krauss *et al.*, 2013; Bhattacharyya *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2010; Koller *et al.*, 2008). Velkou výhodou využití halofilních archeí při získávání PHA je jejich schopnost lýze v destilované vodě a tím uvolňovat granule PHA, které se pak mohou získávat odstředováním při nízké rychlosti (Poli *et al.*, 2011). Nemusí se tedy používat při získávání extrakčních rozpouštědel a tím představuje snadnější, méně chemicky, energeticky i ekologicky náročný proces (Tan *et al.*, 2014).

## 2.4 Rekombinantní producenti

Přirození producenti produkují PHA pomalu s malými výtěžky, a ještě je v průběhu degradují. Tato problematika vede k rozvoji rekombinantních producentů PHA, kteří jsou schopni akumulovat vysoké množství PHA a nemusí způsobovat degradaci PHA. Díky rekombinantním kmenům dochází i k snižování ceny PHA, protože dokáží využívat různé zdroje uhlíku. Mezi rekombinantní mikroorganismy patří *Cupriavidus necator*. Ten sice dokáže PHA dobře produkovat, ovšem roste pomalu. Pomocí genetické úpravy se podařilo snížit fermentační čas o 20 % při zachování stejné produkce (Thirumala a Vishnuvardhan Reddy, 2012). Divoký kmen *Cupriavidus necator* nedokáže využívat laktózu jako zdroj uhlíku a přirozeně dokáže rozkládat PHA. Tento nedostatek byl odstraněn vybráním genu PHA depolymerázy a nahrazením geny pro schopnost trávit laktózu, které byly získány z *Escherichia coli*, což umožnilo tomuto rekombinantnímu kmenu mRePT produkovat polymer z laktózy, a i zvýšit výtěžky (Povolo *et al.*, 2010). Dále se hojně upravuje pro produkci PHA *Escherichia coli*, která přirozeně nedokáže PHA tvořit, ale je dobře prozkoumána a rychle se množí, proto je hojně využívána. Dále byly upraveny na produkci PHA *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus* spp., *Corynebacterium glutamicum*, *Lactococcus lactis*, *Methylobacterium*, *Paracoccus denitrificans* *Pseudomonas* a *Rhizobium meliloti*. (Thirumala a Vishnuvardhan Reddy, 2012).

Pro produkci PHA byly upraveny i vyšší organismy (např. kvasinky, hmyz a rostliny). Jedním z upravených vyšších organismů je kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, která dokáže produkovat jen 0,5 % CDM P(3HB) (Poirier, Erard a Petétot, 2001). Pro produkci P(3HB) byl i upraven hmyz *Spodoptera frugiperda* s produkcí 0,16 % CDM (Williams, Rahn a Sherman, 1996). Vhodnými geneticky upravenými producenty jsou rostliny.

Tyto transgenní rostliny mohou vyrábět PHA z CO<sub>2</sub> a sluneční energie a tím snížit cenu PHA (Thirumala a Vishnuvardhan Reddy, 2012).

## 2.5 Biosyntéza polyhydroxyalkanoátů

Byla popsána celá řada různých cest, které vedou k tvorbě PHA. Znalost těchto cest a působících enzymů umožňuje optimalizovat výrobu PHA polymerů šitých na míru pro danou aplikaci (Tan *et al.*, 2014). Některé z těchto cest jsou blíže popsány v následujících kapitolách.

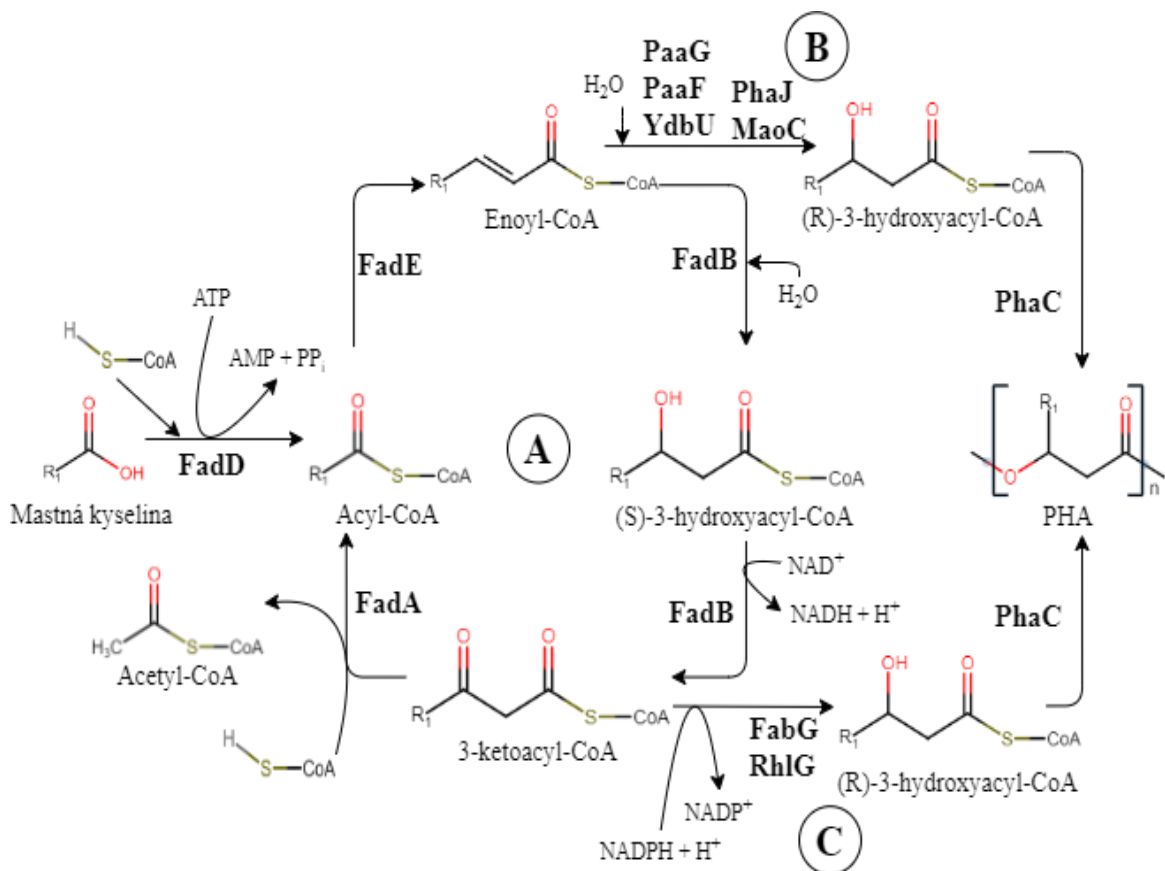
Biosyntéza PHA je složitá a zahrnuje různé metabolické dráhy (Krebsův cyklus, Calvinův cyklus, glykolýza,  $\beta$ -oxidace atd.) (Tan *et al.*, 2014; Lu, Tappel a Nomura, 2009; Madison a Huisman, 1999;). Řada meziproductů těchto metabolických cest je sdílena s PHA metabolismem, hlavně acetylkoenzym A (acetyl-CoA). Ovšem metabolismus a vznik daného typu PHA je závislý na nutričních podmínkách (Steinbüchel a Hein, 2001). Například při podmínkách bohatých na živiny se vytváří velké množství koenzymu A (CoA) a tím dochází k blokaci syntézy PHA pomocí inhibice 3-ketothiolázy. Takže vytvořený CoA je směřován do Krebsova cyklu pro výrobu energie a růst buněk. Naopak při nevyvážených podmínkách živin (při nedostatku základní živiny jako je dusík a fosfor a nadbytku uhlíku) hladina CoA nepůsobí inhibičně, proto acetyl-CoA se využívá na tvorbu PHA (Ratledge a Kristiansen, 2001; Jung a Lee, 2000). Díky této regulaci pro akumulaci PHA mohou producenti PHA maximalizovat zisk z živin při různých podmínkách (Tan *et al.*, 2014).

### 2.5.1 Tvorba polyhydroxyalkanátů ze souvisejících zdrojů

Řada PHA vzniká ze substrátů, které slouží jako prekurzory monomeru. Výsledný PHA je pak podobný k výchozímu substrátu. Většina těchto prekurzorů jsou různé varianty mastných kyselin, které jsou producenty PHA zpracovány do podoby PHA monomerů pomocí enzymatické aktivity  $\beta$ -oxidace. Fyziologickou funkcí  $\beta$ -oxidace (viz Obr. 2 cesta A) je katabolizace mastných kyselin pro produkci energie. Mastná kyselina je na začátku cyklu aktivována pomocí acyl-CoA syntázy (FadD) a adenosintrifosfátu (ATP). Následně aktivovaná mastná kyselina je oxidována acyl-CoA dehydrogenázou (FadE) za vzniku 2-enoyl-CoA, který je poté hydratován enoyl-CoA hydratázou (FadB) za vzniku S-3-hydroxyacyl-CoA, který je následně oxidován na 3-ketoacyl-CoA. Nakonec působí 3-ketoacyl-CoA thioláza (FadA) za uvolnění acetyl-CoA a vzniku sloučeniny acetyl-CoA a mastné kyseliny, která je zkrácena o dva uhlíky při proběhnutí jednoho cyklu. U

pseudomonád je cesta produkce PHA pomocí  $\beta$ -oxidace důležitá pro produkci mcl PHA (Witholt a Kessler, 1999). Pro zlepšení produkce mcl PHA je možné i geneticky zablokovat FadA a FadB v  $\beta$ -oxidační dráze (Liu a Chen, 2007). Případně lze ovlivnit produkci PHA pomocí transkripčního faktoru  $\beta$ -oxidace FadR (Qi, Steinbüchel a Rehm, 1998).

Meziprodukty  $\beta$ -oxidace (enoyl-CoA a 3-ketoacyl-CoA) mohou být dále využity na tvorbu PHA pomocí enzymů. Cesta B (Obr. 2) ukazuje využití enoyl-CoA pro produkci PHA. Při nedostatku FadB mohou homologové enzymy PaaG, PaaF a YdbU vyrábět monomery pro výrobu PHA (Park a Lee, 2004; Snell *et al.*, 2002). Kromě toho existují R-specifické enoyl hydratázy (PhaJ a MaoC), kteří dokážou zachytávat enoyl-CoA z  $\beta$ -oxidačního cyklu mastných kyselin za vzniku monomerů PHA (Park a Lee, 2003; Tsuge *et al.*, 2000; Fukui *et al.*, 1999). Při cestě C se (Obr. 2) využívá 3-ketoacyl-CoA na produkci PHA pomocí 3-ketoacylreduktázy (FabG a RhlG), kteří ho dokáží zachytávat z  $\beta$ -oxidačního cyklu, za vzniku R-3-hydroxyacyl-CoA monomerů pro výrobu PHA (Nomura *et al.*, 2008; Park, Park a Lee, 2002; Taguchi *et al.*, 1999).



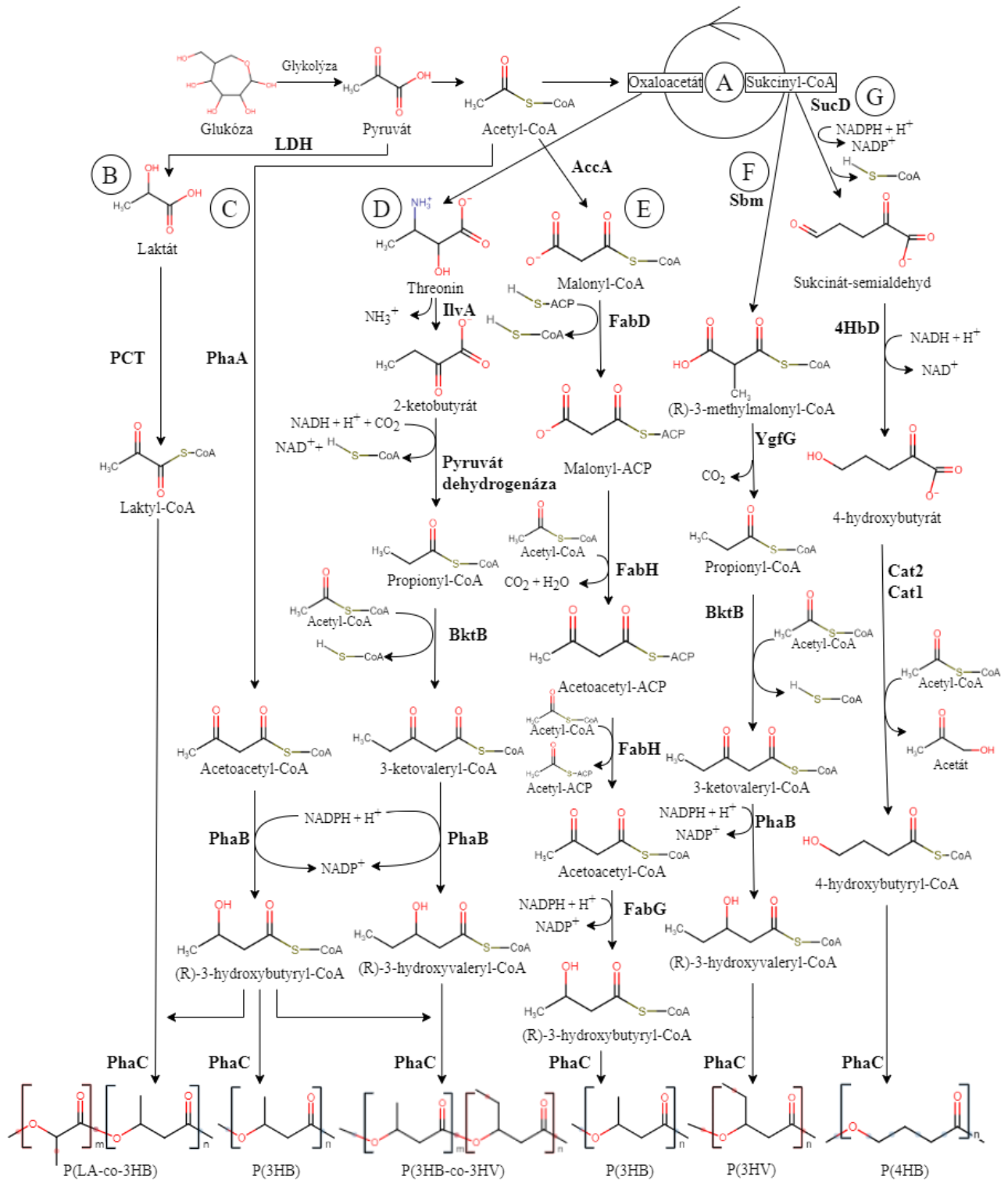
Obrázek 2 Tvorba PHA pomocí  $\beta$ -oxidace (AMP – adenosinmonofosfát, PP<sub>i</sub> – difosfát, NADH – nikotinamidadeninindinukleotid, NADPH – nikotinamidadeninindinukleotidfosfát) (upraveno dle Lu, Tappel a Nomura, 2009)



### 2.5.2 Tvorba polyhydroxyalkanoátů s krátkým řetězcem z dalších zdrojů

Jedním ze substrátů na produkci scl PHA je glukóza. Na začátku cesty se glukóza metabolizuje glykolýzou a vzniká pyruvát. Při aerobním růstu se pyruvát převádí na acetyl-CoA, který následně může být využit k výrobě redukčních ekvivalentů pomocí cyklu trikarboxylové kyseliny (Obr. 3 cesta A). Z glukózy může vznikat i kopolymer scl PHA s laktidem poly(laktid-co-3-hydroxybutyrát (Taguchi *et al.*, 2008). Při syntéze tohoto kopolymeru (Obr. 3 cesta B) se pyruvát přeměňuje na laktát pomocí laktátdehydrogenázy (LDH). Laktát se poté přeměňuje na laktyl-CoA působením pronionyl-CoA transferázy (PCT). Kopolymer nakonec vzniká kopolymerací laktyl-CoA s 3HB monomerem vzniklým z cesty C (Valentin a Steinbüchel, 1994). Při této cestě C (Obr. 3) mikroorganismy přeměňují glukózu na pyruvát pomocí glykolýzy a následně z něj vytvoří acetyl-CoA. Poté dvě molekuly acetyl-CoA spolu kondenzují pomocí 3-ketothialázy (PhaA) za vzniku acetoacetyl-CoA, který se následně redukuje NADPH acetoacetyl-CoA reduktázou (PhaB) a vzniká tak hydroxybutyryl-CoA. Posledním krokem je samotná polymerace hydroxybutyrylu-CoA pomocí PHA syntázy (PhaC) za vzniku P(3HB) (Lenz a Marchessault, 2005). Z glukózy může vznikat i kopolymer P(3HB-co-3HV). Běžná mikrobiologická syntéza tohoto kopolymeru probíhá ve směsi glukózy a propionátu (Holmes, 1985). Cesta D (Obr. 3) popisuje cestu přeměny threoninu z cyklu trikarboxylových kyselin (TCA cyklu) na 2-ketobutyryl-CoA pomocí 3-hydroxyvalerát threonin deaminázy (IlvA). Poté se 2-ketobutyryl-CoA redukuje pomocí pyruvátdehydrogenásou na propionyl-CoA, který se následně ve dvou krocích katalyzuje na 3-(R)-hydroxyvaleryl-CoA pomocí ketothiolázy (BktB) a PhaB. Na závěr se polymeruje na kopolymer P(3HB-co-3HV) (Slater *et al.*, 1998). Další možností tvorby scl PHA z glukózy je cesta E (Obr. 3), která popisuje cestu pro vznik P(3HB) přes biosyntetickou cestu mastných kyselin za pomoci enzymů acetyl-CoA karboxylázy (AccA), malonyl-CoA:ACP transacylázy (FabD), 3-ketoacyl-ACP syntázy III (FabH), 3-ketoacyl-ACP reduktázy (FabG) (Tsay *et al.*, 1992). Cesta F (Obr. 3) ukazuje cestu k produkci P(3HV) ze sukcinyl-CoA vzniklého cyklem trikarboxylové kyseliny. Sukcinyl-CoA se prostřednictvím koenzym B12 dependentní methylmalonyl CoA mutázy (Sbm) přeměňuje na 2-(R)-methylmalonyl-CoA, který je následně převeden na propionyl-CoA pomocí methylmalonyl-CoA dekarboxylázy (YgfG). Propionyl-CoA se poté převádí na 3-ketovaleryl-CoA a následně na (R)-3-hydroxyvaleryl-CoA, ze kterého následně vznikne P(3HV) (Aldor *et al.*, 2002). Cesta G (Obr. 3) ukazuje produkci P(4HB), při které se využívá k polymeraci monomer 4-hydroxybutyryl-CoA

z sukcinyl-CoA vzniklý z trikarboxylázového cyklu. V první fázi sukcinát depolymeráza (SucD) katalyzuje proměnu sukcinyl-CoA na sukcinát-semialdehyd, který se pak redukuje na 4-hydroxybutyrát pomocí 4-hydroxybutyrát dehydrogenázou (4HbD). Následně se 4-hydroxybutyrát převádí na 4-hydroxybutyryl-CoA pomocí 4-hydroxybutyrylové kyseliny-CoA transferázy (Cat1 nebo Cat2) (Hein *et al.*, 1997; Saito a Doi, 1994).

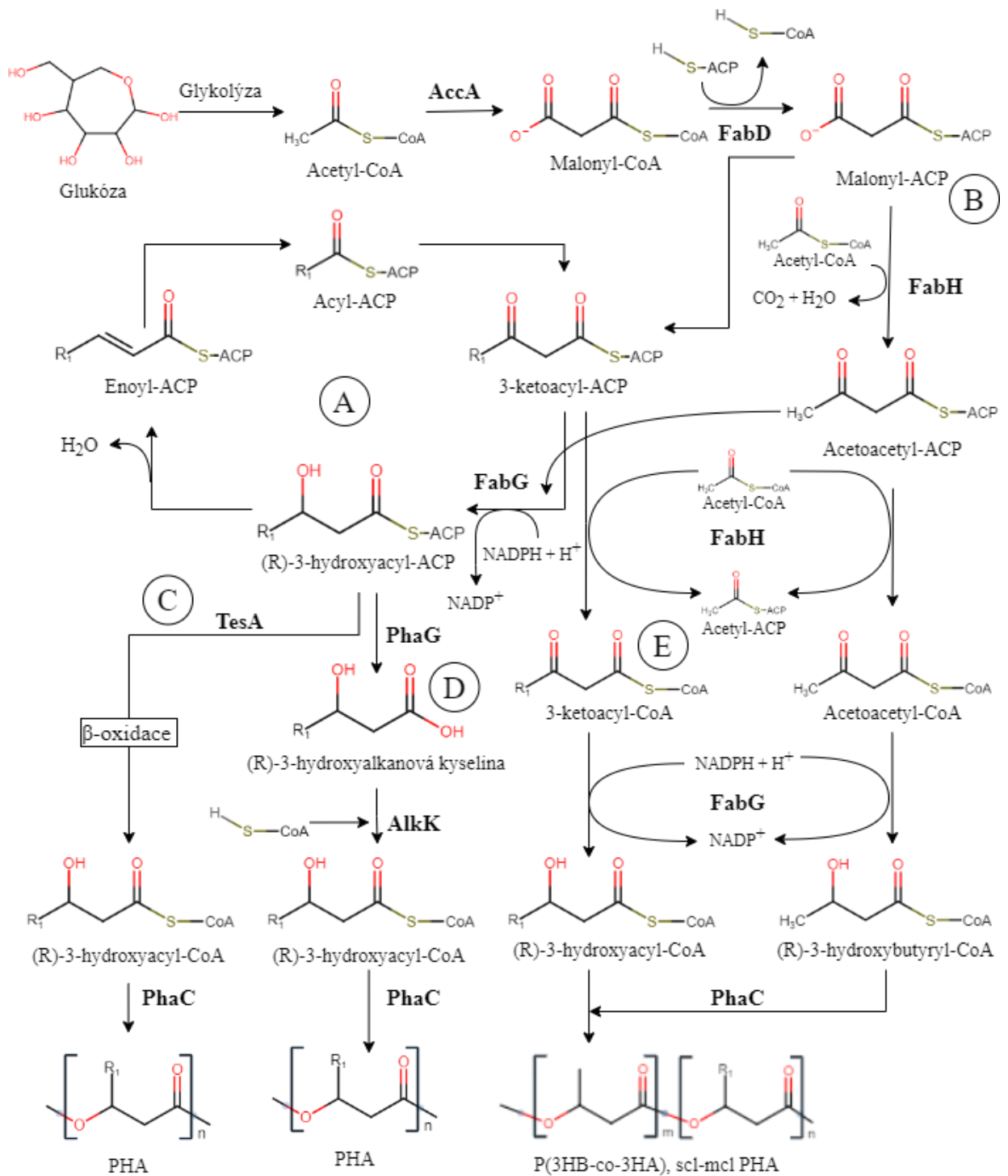


Obrázek 3 Produkční dráhy scl PHA z glukózy (upraveno dle Lu, Tappel a Nomura, 2009)

### 2.5.3 Tvorba polyhydroxyalkanoátů se středně dlouhým řetězcem z dalších zdrojů

Existuje řada způsobů biosyntézy mcl PHA z nesouvisejících zdrojů uhlíku s daným PHA produktem (Obr. 4). Všechny tyto způsoby jsou odvozeny z dráhy biosyntézy disociované kyseliny. Na rozdíl od  $\beta$ -oxidace (viz Obr. 2 cesta A), která redukuje mastné acylové substráty o dva uhlíky za uvolnění acetyl-CoA při každém cyklu a kde jsou veškeré meziprodukty spojené s CoA, biosyntéza mastných kyselin (Obr. 4 cesta A) vytváří mastné kyseliny přidáváním po dvou uhlících za jeden cyklus prostřednictvím meziproduktů spojených s acylovým nosným proteinem (ACP). Tyto biosyntetické dráhy mastných kyselin jsou přítomny ve všech organismech, proto byly použity u rekombinantního producenta PHA *Escherichia coli*. Schopnost produkovat PHA (Obr. 4 cesta B a E) byla u toho mikroorganismu způsobena pomocí genu pro FabH, který má specifickou mutaci, která mění substrátovou specifitu s různými geny PHA syntázy. Tato úprava vede k produkci scl-mcl PHA kopolymerů při nadbytku glukózy (Nomura *et al.*, 2005; Nomura *et al.*, 2004a; Nomura *et al.*, 2004b). Dále lze geneticky modifikovat geny pro thioesterázy (TesA), díky čemuž lze produkovat mcl PHA pomocí  $\beta$ -oxidace (Obr. 4 cesta C), ovšem při tomto způsobu je nezbytné odstranění genů kódující enzymy zapojené do  $\beta$ -oxidační dráhy (*fadR* a *fadB*) (Rehm a Steinbüchel, 2001; Klinke *et al.*, 1999). Cesta D (Obr. 4) využívá meziprodukt (R)-3-hydroxyacyl-ACP, při které PhaG na něj působí jako hydroxyacyl-ACP specifická thioesteráza a vzniká (R)-3-hydroxyalkanová kyselina. Tuto hydroxykyselinu aktivuje acyl-CoA syntáza (AlkK) za vzniku (R)-3-hydroxyacyl-CoA, který následně je polymerizován (Satoh *et al.*, 2005).

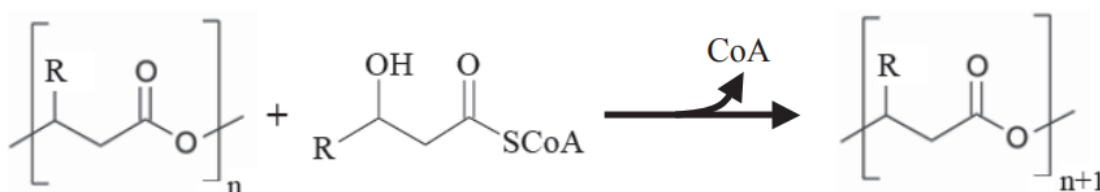
Přítomnost biosyntetických cest mastných kyselin ve všech organismech činí produkci PHA skrz tuto cestu atraktivní, protože tyto systémy mohou být přeneseny na rostliny a tím i snížit cenu PHA, díky využití CO<sub>2</sub> místo rostlinných olejů a cukrů jako zdroje uhlíku (Lu, Tappel a Nomura, 2009).



Obrázek 4 Produkční dráhy pro tvorbu mcl PHA (upraveno dle Lu, Tappel a Nomura, 2009)

### 2.5.4 Polymerace pomocí polyhydroxyalkanoát syntázy

Pro vznik polymeru PHA je klíčovým enzymem u všech cest PHA syntáza, která způsobuje polymeraci monomerních jednotek za uvolnění CoA (viz Obr. 5) (Rehm, 2003).

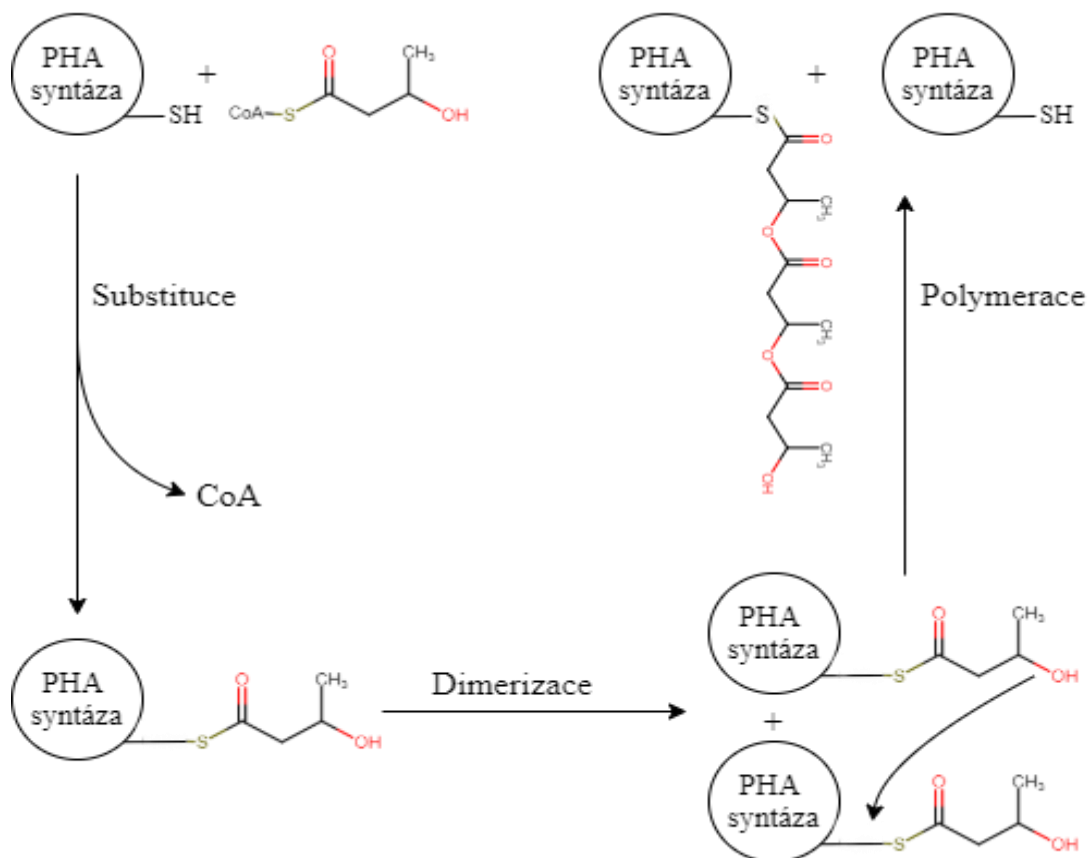


Obrázek 5 Polymerace PHA (Rehm, 2003)

Existují celkem čtyři třídy PHA syntáz, které se rozlišují na základě jejich primárních sekvencí, substrátové specifitě a složením podjednotek (Rehm, 2003). Syntázy 1. a 2. třídy jsou tvořeny pouze z jedné podjednotky typu PhaC tvořícího homodimer s molekulovou hmotností mezi 61 a 73 kDa, 3. třída tvoří heterodimer z PhaC-PhaE a 4. třída též tvoří heterodimer ovšem z PhaC-PhaR. PhaC podjednotka u 3. a 4. třídy má hmotnost asi 40 kDa a jeho aminokyselinová sekvence je z 21-28 % podobná s podjednotkou PhaC z 1. a 2. třídy. PhaE má molekulovou hmotnost 40 kDa a PhaR 20 kDa (Rehm, 2007). Syntázy 1., 3. a 4. třídy upřednostňují monomery s krátkým řetězcem, proto pomocí nich vznikají scl PHA, a 2. třída upřednostňuje monomery se střední délkou, proto vytváří mcl PHA (Chek *et al.*, 2017).

U všech tříd syntáz je katalyticky aktivním místem konzervovaný cystein, ke kterému se kovalentně připojuje rostoucí řetězec PHA. V aktivním místě je cystein spolu s dalšími konzervovanými aminokyselinami (histidin a asparát) spojen a vytváří katalytickou triádu (Jendrossek, 2009).

Díky cysteinu a asparátu se nachází v reakci dvě thiolové skupiny. Pravděpodobně thiolová skupina aspartátu (viz Obr. 6) působí jako obecný bazický katalyzátor aktivující 3-hydroxylovou skupinu 3-hydroxybutyryl-CoA nebo vázaného 3-hydroxybutyrylu pro následné reakce za vzniku kyslíkové esterové vazby, což je důležité pro prodlužování řetězce (Tian, Sinskey a Stubbe, 2005a). A cysteinová thiolová skupina slouží jako přijímací místo pro substrát (Rehm, 2007).



Obrázek 6 Model katalytického mechanismu PHA syntázy (upraveno dle Rehm, 2007)

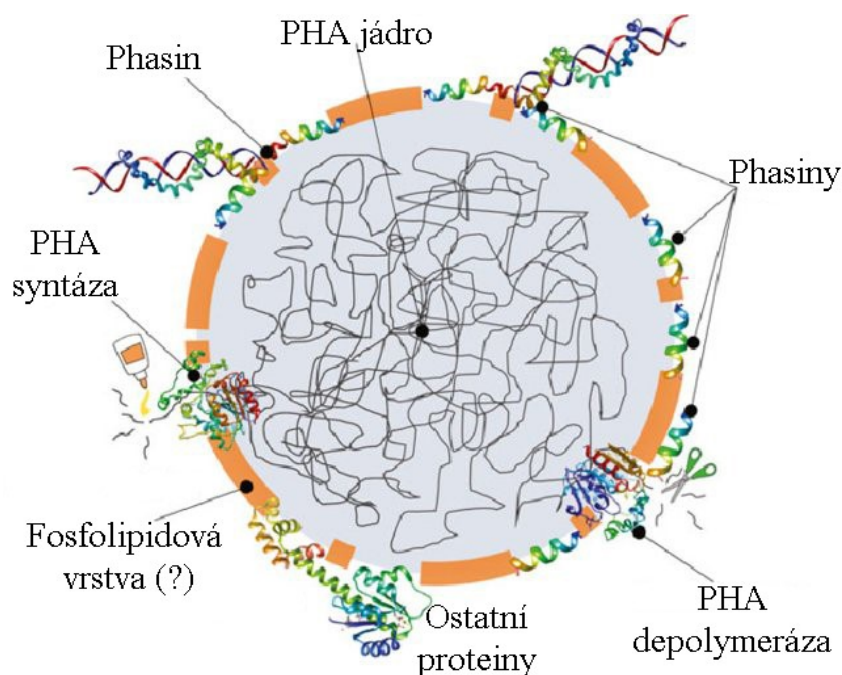
Syntáza PHA katalyzuje reakci na rozhraní voda–polyester. Vznikající PHA je hydrofobní, ovšem substrát, ze kterého PHA vzniká je rozpuštěný ve vodě. Díky doméně PHA syntázy exponované ve vodě dokáží mikroorganismy tento substrát využít pro tvorbu PHA. Syntáza PHA zůstává navázána na povrchu PHA granule a vznikající polymer roste dovnitř. Dokonce byla prokázána větší enzymatická aktivita syntázy připojené k polymeru než v rozpuštěné formě. Ovšem PHA syntáza se dokáže i rozpouštět podle dostupnosti substrátu a následného prodloužení hydrofobního PHA řetězce (Rehm, 2003). Díky tomu vznikají granule PHA s hydrofobním PHA v jádru a aktivními polyesterovými syntázami na povrchu (Rehm, 2007).

## 2.6 PHA uvnitř mikroorganismů

Mikroorganismy PHA vytváří jako cytoplazmatické inkluze velké 0,2–0,5 $\mu$ m. Velikost i počet těchto inkluzí závisí na daném mikroorganismu. Inkluze z PHA se též označují jako karbosomy, protože se jedná o nadmolekulární komplexy, které uprostřed obsahují PHA jádro a na povrchu se nacházejí strukturální a funkční proteiny (viz Obr. 7) (Jendrossek,

2009). Přesné složení povrchu granulí stále není známo. Byla ovšem prokázána přítomnost PHA syntázy, PHA depolymerázy, PhaR a phasinů (Steinbüchel *et al.*, 1995; Wieczorek *et al.*, 1995; Pieper-Fürst *et al.*, 1994; Griebel a Merrick, 1971). Syntáza a depolymeráza PHA jsou klíčové enzymy pro metabolismus PHA. Syntéza je nezbytná pro polymeraci a uložení energie do polymeru, a naopak depolymeráza rozkládá nahromaděné PHA a tím poskytuje živiny pro mikroorganismus při hladovění (Schlegel a Gottschalk, 1962; Schlegel, Gottschalk a Von Bartha, 1961). Největší podíl na povrchu PHA granulí zastupují proteiny nazývané phasiny, které zabraňují koalescenci granulí *in vivo* tvorbou proteinové vrstvy mezi hydrofilní cytoplazmou a hydrofobním PHA (Wieczorek, Steinbüchel a Schmidt, 1996). Phasiny i ovlivňují kinetiku tvorby snižováním lag fáze (Jurasek a Marchessault, 2004). Tvorbu phasinů reguluje represor PhaR, který se též nachází na povrch granulí (Pötter *et al.*, 2002).

Dlouhá léta se předpokládalo, že se na povrchu granulí nachází i fosfolipidy. Tento předpoklad vycházel z nalezení kyseliny fosfatidové a další lipidové sloučeniny při extrakci PHA acetonem (Griebel, Smith a Merrick, 2002). Ovšem Bresan *et al.* (2016) zjistili, že karbozomy zástupců  $\alpha$ -proteobakterií,  $\beta$ -proteobakterií a  $\gamma$ -proteobakterií nemají fosfolipidy *in vivo* a tím i předpokládají, že u přírodních producentů PHA granule neobsahují fosfolipidy. Je proto možné, že se fosfolipidy vážou na hydrofobní PHA v průběhu izolace granulí po rozrušení buněk.

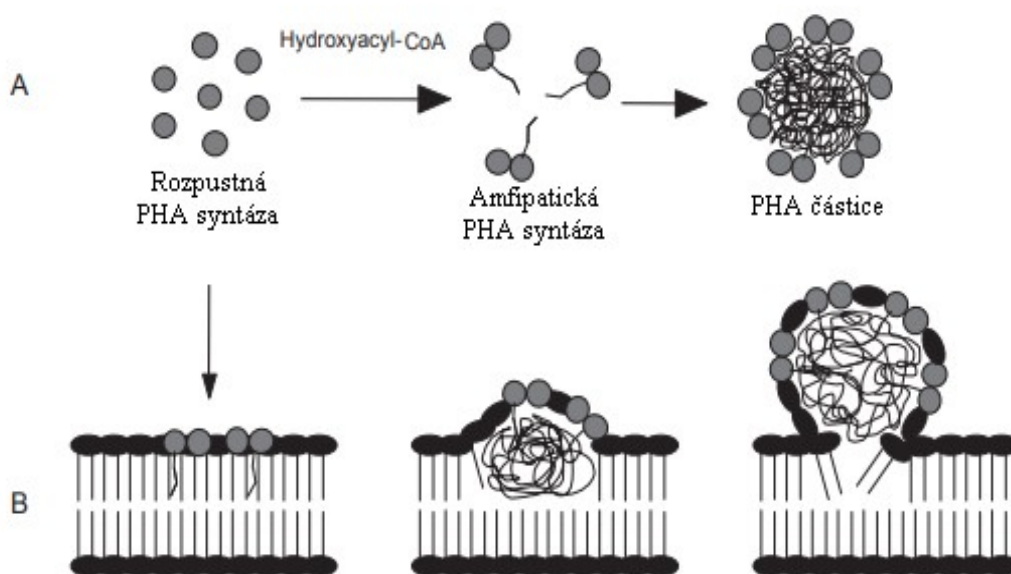


Obrázek 7 Struktura PHA granule (upraveno dle Maestro a Sanz, 2017)



Vznik PHA granulí *in vivo* začíná hned jak je poskytnut substrát tj. (R)-3-hydroxyacyl-CoA thioesteráza. Enzym PHA syntáza je stále vyráběna v malém množství a hned při přítomnosti substrátu začne katalyzovat jeho polymeraci. Rostoucí řetězec vznikajícího polymeru zůstává vázán k enzymu, a tím převádí původně rozpustný enzym na amfipatickou molekulu (Hezayen, Steinbüchel a Rehm, 2002). Pro vznik granulí byly popsány dva typy modelů: (A) model micely a (B) model pučení (Obr. 8) (Rehm, 2007).

Pro nalezení správného modelu byla publikována řada prací. Tian, Sinskey a Stubbe (2005b) zjistili, že granule vznikají pouze ze středu buňky za účinku mediačních prvků jako lešení, které poskytují místa pro syntézu pro zahájení tvorby granulí. Ovšem elektronovou mikroskopií byly sledovány denaturované vzorky. Ve stejném roce byla vydána studie používající fluorescenční mikroskopii, která zjistila, že granule v raném stadiu jsou lokalizovány na pólech buněk, což naznačuje, že tvorba granulí začíná na pólech buněk podle modelu pučení (Peters a Rehm, 2005). Vznik granulí PHA na buněčných pólech byla též potvrzena barvením granulí PHA nilskou červení (Jendrossek, 2005; Schultheiss *et al.*, 2005). Tyto studie *in vivo* podporují model pučení díky lokalizace tvorby granulí v blízkosti cytoplazmatické membrány na pólech buněk. V obou modelech se při tvorbě granulí PHA syntáza přeměňuje na amfipatickou molekulu připojenou k vznikajícímu PHA řetězci a proces sestavování probíhá buď v membráně, nebo v cytosolu (viz Obr. 8). Velikost PHA granulí roste s růstem PHA řetězce, protože PHA syntáza neustále připojuje a přivádí prekurzory z cytosolu (Rehm, 2007).



Obrázek 8 Vznik PHA granule – modelem micely (A), modelem pučení (B) (upraveno dle Rehm, 2007)



### 3 METODY DETEKCE POLYHYDROXYALKANOÁTŮ

Existuje řada metod, jak prokázat mikrobiální tvorbu PHA. Tyto metody lze rozdělit na kvalitativní, kvantitativní a charakterizační metody, které charakterizují PHA buď přímo v biomase nebo po jejich izolaci z mikroorganismů (Tan *et al.*, 2014).

Kvalitativní metody, které prokazují schopnost produkovat PHA u mikroorganismů, zahrnují barvení, genetické testy a transmisivní elektronovou mikroskopii (TEM) (Tan *et al.*, 2014). Genetické testy detekují geny způsobující produkci PHA a blíže tato metoda je popsána v kapitole 3.1. Barvení PHA granulí se využívá k rychlé detekci nových mikrobů s potenciálem produkovat PHA díky snadné přípravě vzorků. K detekci se využívají barviva nilská modř, nilská červeň a súdánská čern (Godbole, 2016; Tan *et al.*, 2014; Burdon, 1946). Těmito barvami se mnohou jednak barvit kolonie narostené na pevných půdách, ale i fixované preparáty pro následnou mikroskopii (Ostle a Holt, 1982; Godbole, 2016). Barviva nilská modř a nilská červeň se mohou přidávat i přímo do pevných půd před kultivací (Spiekermann *et al.*, 1999). Při barvení kolonií na pevných půdách pomocí súdánské černi se barvivo pevně váže na PHA granule a následný oplach kolonií ethanolem u producentů PHA nedokáže vymýt barvivo, proto kolonie producentů zůstávají tmavé a kolonie neprodukující PHA se odbarví (Liu *et al.*, 1998). U mikroskopické metody se též súdánská čern pevně váže na PHA granule, a i po oplachu xylenem zůstávají PHA granule černé a zbytek buňky se dobarvuje do kontrastu safraninem (Burdon, 1946). Barviva nilská modř a nilská červeň se též vážou na PHA granule a při ultrafialovém osvětlení PHA granule vyzařují oranžové světlo (Godbole, 2016). Ovšem barvení může někdy vykazovat falešné výsledky díky přichytávání barviv na nepolyhydroxyalkanolátové lipidové sloučeniny či odbarvením PHA granulí (Spiekermann *et al.*, 1999). Oproti tomu TEM poskytuje přímou vizualizaci intracelulárních PHA granulí, avšak příprava vzorků je časově náročná a vyžaduje použití radioaktivních chemikálií (Bassas Galia, 2010). Všechny tyto kvalitativní metody ovšem nedokáží kvantifikovat množství PHA ani poskytnou informace o složení.

Pro určení množství PHA lze jednak zjistit obsah PHA vážením po izolaci, ale lze použít i spektrofotometrické stanovení (Godbole, 2016). Kvantifikovat pomocí spektrofotometrické metody lze jenom P(3HB). Při této metodě se P(3HB) přeměňuje na kyselinu krotonovou při zahřívání v koncertované kyselině sírové. Následně se obsah P(3HB) stanoví spektrofotometricky měřením vzniklého roztoku při vlnové délce 235 nm (Valappil *et al.*, 2007; Karr, Waters a Emerich, 1983; Ward a Dawes, 1973). Dále lze kvantifikovat i charakterizovat PHA pomocí moderních analytických metod, kterými jsou infračervená

spektroskopie s Fourierovou transformací (Hong *et al.*, 1999), kapalinovou chromatografií (Grubelnik *et al.*, 2008; Hesselmann *et al.*, 1999) a plynovou chromatografií (Bassas Galià, 2010).

Pro další charakterizaci PHA lze po izolaci použít nukleární magnetickou rezonanční spektroskopii, hmotnostní spektroskopii, stanovit tepelné vlastnosti pomocí diferenční skenovací kalorimetrie či diferenciální termické analýzy, krystalinitu a mechanické vlastnosti (Tan *et al.*, 2014).

### 3.1 Genetické testy

Pro detekci genů podílejících se na tvorbě PHA se využívá polymerázová řetězová reakce (PCR) (Tan *et al.*, 2014). PCR je reakce, která umožňuje zesílení specifického fragmentu deoxyribonukleové kyseliny (DNA) (tj. PCR produktu) ze složitého fondu DNA (tj. šablony) (Mullis, 1990). V PCR se vytváří kopie daného fragmentu (amplifikace) za potřeby pouze stopového množství DNA, proto se jedná o velmi citlivou metodu (Garibyan a Avashia, 2013).

Pro provedení PCR je zapotřebí přítomnosti šablony DNA, páru primerů, nukleotidů a polymerázy DNA. Nukleotidy (adenin, thymin, cytosin a guanin) slouží jako základní kameny pro stavbu výsledného produktu PCR. Tyto nukleotidy jsou spojovány enzymem DNA polymerázou (Garibyan a Avashia, 2013). V PCR se využívá teplotně stabilní polymeráza DNA nazývaná se *Taq* DNA polymeráza, která byla získána z bakterie *Thermus aquaticus* (Lorenz, 2012).

Primery jsou krátké úseky DNA s definovanou sekvencí, které ohraničují cílovou DNA, která má být amplifikována a detekována. Jejich délka je 15 až 30 bází. Primery slouží jako počáteční bod pro DNA polymerázu, na které může stavět daný PCR produkt (Garibyan a Avashia, 2013). Pro prokázání schopnosti produkce PHA jsou páry primerů navrženy tak, aby došlo k amplifikaci genů podílejících se na syntéze PHA, tj. především PHA syntázy (gen *phaC*). PHA syntáza je enzym, který způsobuje produkci PHA. Přítomnost genu *phaC* je typická u PHA-akumulujících mikroorganismů a nepřítomnost u neprodukcujících mikroorganismů, proto *phaC* slouží jako základ pro identifikaci potencionálních producentů PHA (Revelo Romo *et al.*, 2007). Ovšem pomocí PCR lze detekovat i další geny podílející se na produkci PHA, které jsou blíže popsány v kapitole 2.5. Pro úspěšnou amplifikaci musí být dané primery vhodně navrženy. Pro jednu sledovanou sekvenci se navrhnou vždy dva primery. Jeden primer je orientován ve směru 5' → 3' (tzv. forward) a druhý v opačném

směru 3' → 5' (tzv. reverse). Při nevhodném navrhnutí primerů může primer reagovat sám ze sebou za vzniku tzv. vlásenek či může reagovat s druhým primerem za vzniku tzv. dimerů. Je proto nezbytné sledovat sekvenci navrhovaných primerů a též se musí sledovat i jejich teplota tání. Drasticky odlišné teploty tání primerů v PCR reakci totiž neumožní všem primerům se efektivně navázat na cílovou sekvenci při annealingovém cyklu PCR (Lorenz, 2012).

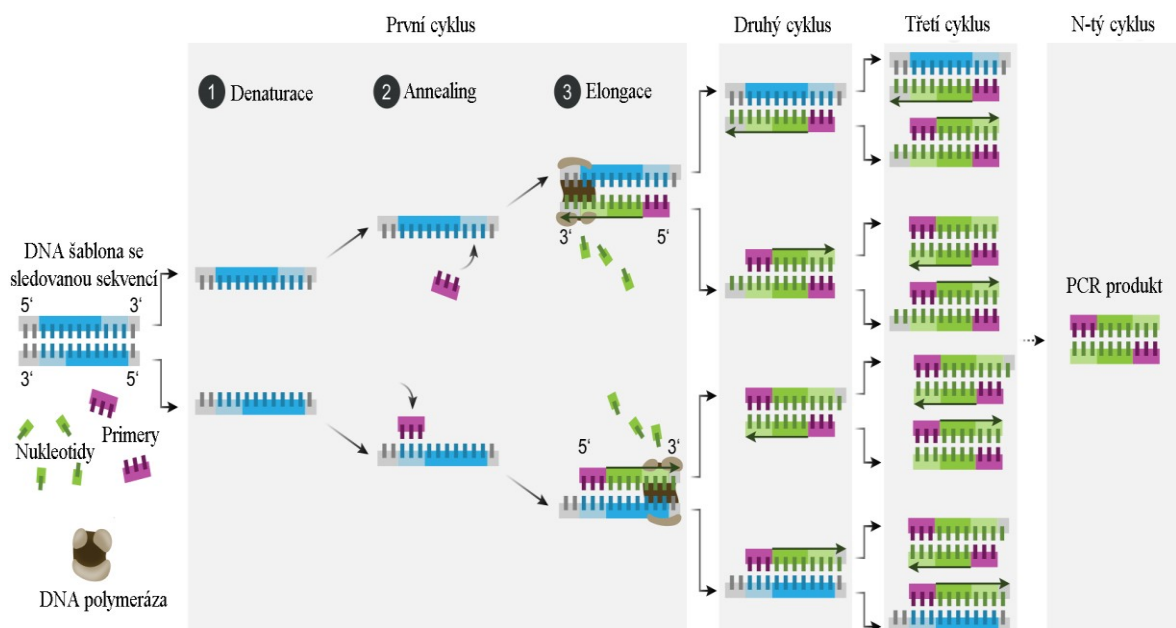
Správně navržené primery pak v průběhu PCR nasedají na šablonu DNA při nalezení komplementárních bází a následně se podle šablony DNA vytváří daný PCR produkt. Tato šablona DNA se získá izolací DNA ze sledovaného mikroorganismu (Garibyan a Avashia, 2013).

Izolaci DNA lze provést různými způsoby. V prvním kroku jsou buňky lyzovány a následně se odstraňují buněčné nečistoty obvykle odstředěním. Proteiny lze denaturovat proteázou či se mohou vysrážet organickými rozpouštědly např. fenolem a následně odstranit odstředěním. Ribonukleovou kyselinu (RNA) lze odstranit RNázou. DNA se poté nechává z roztoku vysrážet pomocí přidání ethanolu. Vzniklá sraženina se poté oddělí od roztoku odstředěním a následně se rozpustí ve dvakrát destilované vodě či v TE (tris(hydroxymethyl)aminomethan/ethylendiaminotetraoctová kyselina) pufru. Další metody izolace jsou technologie založené na bázi oxidu křemičitého, magnetické separaci, technologie výměny aniontů a další (Gupta, 2019; Dhaliwal, 2013). Správně zvolený způsob izolace by měl vést k účinné extrakci kvalitní DNA, zisku dostatečného množství DNA a k úspěšnému odstranění kontaminantů (Dhaliwal, 2013). K posouzení kvality a výtěžnosti lze např. využít spektrofotometrie. Nukleové kyseliny mají při vlnové délce 260 nm absorpční maximum a proteiny jej mají při vlnové délce 280 nm. Poměr absorpčních  $A_{260}/A_{280}$  je u kvalitně vyizolované DNA okolo 1,8. Poměr menší než 1,7 značí kontaminaci proteiny (Gupta, 2019).

Po izolaci DNA se získaná DNA smíchá s primery, nukleotidy a DNA polymerázou. Výsledný roztok umístí do stroje (tzv. termocykleru), který umožní opakované cykly amplifikace DNA. Termocykler snižuje a zvyšuje teplotu v přesných předem naprogramovaných krocích, které jsou vhodné pro vytvoření PCR produktu (Weier a Gray, 1988). Prvním fází je počáteční denaturace při teplotě obvykle 94 °C až 98 °C trvající okolo 3 minut v závislosti na DNA polymeráze. Delší doba počáteční denaturace by mohla zničit enzymatickou aktivitu DNA polymerázy. Ovšem existují i metody tzv. hot-start, při kterých je počáteční denaturace prodloužena (Lorenz, 2012). Při hot-start PCR je DNA polymeráza

navázána na protilátku, která brání aktivitě DNA polymerázy a tím i tvorbě sekundárních produktů pře zahájením PCR. Při počáteční denaturaci dochází k inaktivaci této protilátky a tím k zahájení aktivity DNA polymerázy (Farrell, 2017). Následně se opakují tři kroky (viz Obr. 9). Při prvním kroku dochází k zahřátí nad teplotu tání cílové DNA, což způsobí oddělení pramenů DNA od sebe. Tento krok se nazývá denaturace. Následně probíhá tzv. annealing, při kterém se teplota snižuje na teplotu vhodnou pro navázání primerů na cílenou DNA. K navázání primerů dojde jen pokud primer je komplementární s nějakým úsekem DNA. Poté se teplota opět zvyšuje na teplotu, při které je DNA polymeráza schopna od primerů vytvořit PCR produkt z nukleotidů podle DNA. V tomto kroku dochází k tzv. elongaci. Každým opakováním těchto tří kroků dochází k zdvojnásobování daného úseku DNA (Garibyan a Avashia, 2013). Po zopakování těchto tří cyklů obvykle 25–40krát nastává tzv. závěrečná elongace. V závěrečné elongaci dochází k dokončení syntézy. Na závěr se ukončí reakce chlazením roztoku na teplotu 4 °C (Lorenz, 2012).

Po namnožení cílové sekvence se PCR produkt detekuje. Nejpoužívanější metoda detekce je barvení PCR produktu chemickým barvivem, které je schopno vázat se na DNA např. ethidiumbromidem. Následně se produkt analyzuje pomocí agarózové gelové elektroforézy, při níž dochází k oddělování DNA produktů na základě velikosti a náboje. Agarózová gelová elektroforéza tedy umožňuje určit přítomnost i velikost PCR produktu. Vedle PCR produktu se na gel nanáší i standardizovaná sada DNA produktů se známými velikostmi, která slouží jako měřítko pro určení velikosti PCR produktu (Garibyan a Avashia, 2013).



Obrázek 9 Mechanismus PCR (upraveno dle Enzoklop, 2020)

Ačkoliv PCR je jednoduchá technika, která přináší rychlé výsledky, má i řadu nevýhod. Vzhledem k tomu, že PCR je velice citlivá metoda, může jakákoliv kontaminace vzorku i malým množstvím DNA přinést zavádějící výsledky (Garibyan a Avashia, 2013; Smith a Osborn, 2009). Další nevýhodou pro návrh primerů pro PCR je znalost sekvence cílové sekvence. Proto lze pomocí PCR identifikovat pouze známé geny. Dalším omezením je, že se primery mohou vázat i na nespecifické sekvence, které jsou podobné, ale ne identické s cílovou sekvencí. Mimo to mohou být i nukleotidy nesprávně začleňovány do sekvence. Bohužel kvůli těmto omezením mohou vznikat nespecifické PCR produkty (Garibyan a Avashia, 2013).

K zabránění nespecifických produktů lze předejít jednak správným navržením primerů, zabráněním kontaminace vzorku, správným nastavením časů a teplotních podmínek v PCR cyklech, správnou koncentrací PCR činidel a přidáním aditiv (Lorenz, 2012). Další možností je zesílení citlivosti na cílený fragment pomocí nested PCR. V nested PCR se používají dva páry primerů, které se zaměřují na jedno místo. První pár zesiluje cílový fragment podle šablony DNA pomocí PCR. Druhý pár primerů zesiluje kratší sekvenci z prvního PCR produktu, který vznikl pomocí první dvojice primerů (Marmioli a Maestri, 2007).

PCR lze detekovat naráz více různých cílů pomocí tzv. multiplex PCR. V multiplexu PCR se do reakce zahrnuje dvě a více dvojic primerů a díky tomu lze ušetřit čas, úsilí i náklady na detekci oproti PCR s jednou dvojicí primerů. Primery v multiplexu PCR musí být pečlivě vybrány s podobnou teplotou tání a velikost výsledných PCR produktů by se měla natolik lišit, aby se při vizualizaci pomocí gelové elektroforézy vytvořily odlišná pásma. Nevýhodou multiplexu PCR je složitější vyvinutí optimální reakce a je méně citlivý (Shen, 2019).

## 4 MOŽNOSTI ZÍSKÁVÁNÍ PHA

Získávání PHA se jako jiné biotechnologie skládá ze dvou částí upstreamu a downstreamu (Zapletal a Trejbal, 2016).

Upstreamem je kultivační část, která je výrazně ovlivněna podmínky kultivace. Zásadní roli hraje použitý bakteriální kmen, substrát, pH a další. Vhodný substrát by měl být bohatý na uhlík a měl obsahovat málo dusíku (Zapletal a Trejbal, 2016).

Downstreamem je už vlastní izolace PHA z bakterií. Vzhledem k rozmanitosti PHA je tato část komplikovaná, především u extrační metody. Protože musíme použít vhodné rozpouštědlo pro daný PHA. První částí downstreamu je zakoncentrování kultivačního média. Zakoncentrování se většinou provádí odstředováním, případně filtrací či lyofilizací. Následně je vhodné zakoncentrovaný roztok inaktivovat, aby živé mikroorganismy nezpůsobovaly degradaci PHA. Inaktivace se provádí většinou rychlým zahřátím na 85 °C. Zahřátím dojde k narušení membrán, což napomáhá i lepšímu uvolňování granulí PHA. Dalším krokem je samotná izolace, kterou lze provádět různými postupy např. extraxcí či digescí (Zapletal a Trejbal, 2016).

U extrakce se granule PHA rozpouští vhodným rozpouštědlem. Roztok PHA se oddělí od buněčných zbytků většinou odstředěním za vysokých otáček. Poté se z roztoku PHA nechá vysrážet přidáním precipitantu či se nechá z roztoku odpařit rozpouštědlo např. ve sprejové sušárně (Zapletal a Trejbal, 2016).

U digesce je postup opačný. PHA zůstává v pevné formě a zbytek se nechá rozpustit. Rozpuštění zbytků lze provést např. chlornanem sodným (Alper *et al.*, 1963), chlorečnanem či enzymy. Lze i porušit buněčné stěny pomocí povrchově aktivních látek např. dodecylsulfátem sodným (Ramsay *et al.*, 1990). Digesci lze provádět i mechanicky např. vysokotlakou homogenizací (Kunasundari a Sudesh, 2011).

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je vytvořit rychlou a snadnou metodu pro detekci genů (PCR), které jsou součástí produkce PHA u mikroorganismů a touto metodu použít na screening producentů PHA. Dílčí cíle jsou:

- navrhnu vhodné primery pro detekci všech čtyř tříd PHA syntáz a dalších genů podílejících se na tvorbě PHA (*phaA*, *phaB*, *phaJ*, *phaG* a *fabG*)
- zoptimalizovat podmínky a průběh PCR pro detekci genů
- vytvořit a zoptimalizovat multiplex PCR z navržených primerů
- pomocí multiplex PCR provést screening u vybraných mikroorganismů
- z výsledků screeningu určit producenty PHA, průběh jejich produkce PHA a typ vyprodukovaného PHA



## 6 POUŽITÝ MATERIÁL

### 6.1 Testované bakteriální kultury

Pro optimalizaci PCR metody byly použity bakteriální druhy, jejichž známé sekvence genů umožnily návrh primerů. Z České sbírky mikroorganismů (CCM) byl použit *Cupriavidus neactor* CCM 3726 pro optimalizaci screeningu syntázy 1. třídy a genů *phaA* a *phaB*, *Pseudomonas mendocina* CCM 3590 pro syntázu 2. třídy a genu *phaG* a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 pro gen *phaJ* a *fabG*. Dále byl pro optimalizaci screeningu syntázy 3. třídy použit izolát GK CIP 5/1 získaný z mléčných výrobků poskytnutý Výzkumným ústavem mlékárenským z Prahy, který byl identifikován jako *Stenotrophomonas maltophilia* (Máčalová, 2019). Pro optimalizaci syntázy 4. třídy byl použit izolát D117 získaný z česneku, který byl identifikován jako *Bacillus megaterium* a pro optimalizaci genu *phaG* byl použit izolát z chilli papričky D68 identifikovaný jako *Pseudomonas putida*. Jako negativní kontrola byl použit transgenní kmen *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , který byl též použit jako negativní kontrola v Montenegro et al., 2017.

Zoptimalizovanou PCR metodou byl proveden screening genů u 52 mikrobiálních kmenů získaných ze různých odrůd ovoce a zeleniny, které byli identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF). Dále byl proveden screening genů u 20 kmenů *Escherichia coli* poskytnutých Mgr. Magdou Janalíkovou, PhD. Všechny použité kmeny s kultivačními podmínkami jsou uvedeny v Tab. 3.

Tabulka 3 Použité mikroorganismy, jejich původ a kultivační podmínky

Označení kultur	Mikrobiální druh	Původ	Teplota kultivace (°C)	Půda	Vztah ke kyslíku
CCM 3590	<i>Pseudomonas mendocina</i>	-	37	BHI	aerobní
CCM 3726	<i>Cupriavidus neactor</i>	-	37	BHI	aerobní
CCM 3955	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	37	BHI	aerobní
GK CIP 5/1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	mléčné výrobky	30	BHI	aerobní
DH5 $\alpha$	<i>Escherichia coli</i>	-	37	BHI	aerobní
D10	<i>Pantoea agglomerans</i>	okurek	37	BHI	aerobní
D11	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ssp. <i>amyloliquefaciens</i>	cibule	37	BHI	aerobní
D13	<i>Pantoea agglomerans</i>	mrkev	37	BHI	aerobní
D16	<i>Pseudomonas koreensis</i>	paprika	37	BHI	aerobní
D17	<i>Pantoea agglomerans</i>	okurek	37	BHI	aerobní

Označení kultur	Mikrobiální druh	Původ	Teplota kultivace (°C)	Půda	Vztah ke kyslíku
D23	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	kedlubna	37	BHI	aerobní
D27	<i>Pantoea agglomerans</i>	okurek	30	M17	aerobní
D28	<i>Pseudomonas koreensis</i>	kedlubna	30	M17	aerobní
D28b	<i>Pantoea agglomerans</i>	kedlubna	30	M17	aerobní
D31	<i>Bacillus simplex</i>	římský salát	30	BHI	anaerobní
D32	<i>Bacillus megaterium</i>	římský salát	30	BHI	anaerobní
D36	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	salát ledový	37	BHI	aerobní
D37	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	římský salát	37	BHI	aerobní
D47	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	zelí bílé	30	BHI	aerobní
D52	<i>Lelliottia amnigena</i>	zelí bílé	30	BHI	aerobní
D55	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	zelí bílé	30	M17	aerobní
D61	<i>Oceanobacillus caeni</i>	římský salát červený	37	BHI	aerobní
D68	<i>Pseudomonas putida</i>	chilli paprička	37	BHI	aerobní
D69	<i>Citrobacter braakii</i>	lilek	37	BHI	aerobní
D78	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ssp. <i>plantarum</i>	paprika	30	M17	aerobní
D80	<i>Bacillus cereus</i>	rajče	30	M17	aerobní
D93	<i>Pseudomonas fragi</i>	mrkev	6,5	BHI	aerobní
D100	<i>Pseudomonas corrugata</i>	okurka	30	BHI	aerobní
D102	<i>Pseudomonas antarctica</i>	česnek	30	BHI	aerobní
D105	<i>Oceanobacillus kimchii</i>	cibule červená	37	BHI	aerobní
D109	<i>Pantoea agglomerans</i>	česnek	37	BHI	aerobní
D111	<i>Staphylococcus</i> sp.	okurka	37	BHI	aerobní
D116	<i>Bacillus</i> sp.	cibule červená	30	BHI	anaerobní
D117	<i>Bacillus megaterium</i>	česnek	30	BHI	anaerobní
D124	<i>Pseudomonas marginalis</i>	česnek	30	M17	aerobní
D140	<i>Oceanobacillus</i> sp.	celerová nať	37	BHI	aerobní
D146	<i>Pseudomonas putida</i>	červená řepa	30	BHI	aerobní
D165	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	salát	37	BHI	aerobní
D171	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	salát	37	BHI	aerobní
D173	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	salát	30	BHI	aerobní
D180	<i>Pseudomonas gessardii</i>	broskev	30	BHI	aerobní
D183	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	broskev	30	BHI	aerobní

Označení kultur	Mikrobiální druh	Původ	Teplota kultivace (°C)	Půda	Vztah ke kyslíku
D186	<i>Pseudomonas veronii</i>	jablko	30	M17	aerobní
D199	<i>Bacillus megaterium</i>	ředkev	30	BHI	anaerobní
D201	<i>Bacillus megaterium</i>	ředkev bílá	30	BHI	anaerobní
D212	<i>Klebsiella oxytoca</i>	ředkev bílá	37	BHI	aerobní
D214	<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	ředkev bílá	30	BHI	aerobní
D218	<i>Rahnella aquatilis</i>	pórek	30	BHI	aerobní
D220	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	kopr	30	M17	aerobní
D221	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	ředkev bílá	30	M17	aerobní
D223	<i>Kosakonia cowanii</i>	rajče	30	M17	aerobní
D228	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	pórek	30	BHI	aerobní
D233	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	broskev	6,5	BHI	aerobní
D234	<i>Guehomyces pullulans</i>	broskev	6,5	BHI	aerobní
D237	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	ředkev	6,5	BHI	aerobní
D238	<i>Pseudomonas libanensis</i>	ředkev bílá	6,5	BHI	aerobní
D239	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	kopr	6,5	BHI	aerobní
114	<i>Escherichia coli</i>	kuřecí kůže	37	BHI	aerobní
119	<i>Escherichia coli</i>		37	BHI	aerobní
123	<i>Escherichia coli</i>		37	BHI	aerobní
126	<i>Escherichia coli</i>		37	BHI	aerobní
F10	<i>Escherichia coli</i>	klíčky	37	BHI	aerobní
F53	<i>Escherichia coli</i>	mungo	37	BHI	aerobní
F77	<i>Escherichia coli</i>	jarní cibulka	37	BHI	aerobní
F108	<i>Escherichia coli</i>	cuketa	37	BHI	aerobní
I/2	<i>Escherichia coli</i>	bažant	37	BHI	aerobní
I/3a	<i>Escherichia coli</i>		37	BHI	aerobní
I/6a	<i>Escherichia coli</i>		37	BHI	aerobní
II/2	<i>Escherichia coli</i>		37	BHI	aerobní
S7	<i>Escherichia coli</i>	kachna	37	BHI	aerobní
S10	<i>Escherichia coli</i>	kachna	37	BHI	aerobní
S17	<i>Escherichia coli</i>	bažant	37	BHI	aerobní
S23	<i>Escherichia coli</i>		37	BHI	aerobní
S32	<i>Escherichia coli</i>		37	BHI	aerobní
S33	<i>Escherichia coli</i>		37	BHI	aerobní
S34	<i>Escherichia coli</i>		37	BHI	aerobní
S35	<i>Escherichia coli</i>		37	BHI	aerobní

## 6.2 Použité kultivační média

Pro kultivaci testovaných mikroorganismů (viz Tab. 4) byla použita mozko-srdcová infuze (BHI, Himedia, Bombaj, Indie) a M17 pevná půda (Himedia, Bombaj, Indie).

Pevná půda BHI při teplotě 25 °C má finální pH  $7,4 \pm 0,2$  a obsahuje:

<u>Látka</u>	<u>Množství (g/l)</u>
Telecí mozek, infuzní forma	200,00
Hovězí srdce, infuzní forma	250,00
Proteózový peptid	10,00
Dextróza	2,00
Chlorid sodný	5,00
Fosforečnan sodný	2,50
Agar	15,00

Finální pH pevné půdy M17 při teplotě 25 °C je  $7,1 \pm 0,1$  a obsahuje:

<u>Látka</u>	<u>Množství (g/l)</u>
Trypton	2,50
Pepton	2,50
Sójový pepton	5,00
Extrakt z kvasnic	2,50
Hovězí extrakt	5,00
Kyselina askorbová	0,50
Síran hořečnatý	0,25
Laktóza	5,00
$\beta$ -glycerofosfát disodný	19,00
Agar	15,00

### 6.3 Použité primery

Pro screening genů podílejících se na produkci PHA byly navrženy primery pomocí programu Primer3 (v. 0.4.0) (Singapur). Pro návrh primerů byly použity sekvence daných genů získané z Evropského archivu nukleotidů (pro primery *phaJ*, *phaG1* a *phaG2*) a z Národního centra pro biotechnologické informace (pro zbylé ostatní primery). Veškeré navrhnuté a použité primery a velikosti jejich PCR produktů jsou uvedeny v Tab. 4. Při návrhu primerů byla zvolena teplota jejich tání 59–62 °C a délka PCR produktů, tak aby mohlo dojít k jejich vzájemné kombinaci pro vytvoření PCR reakce v multiplexu.

Dále byly použity primery *fabGF* a *fabGR* pro detekci genu *fabG* z Ren *et al.* (2000).

Tabulka 4 Použité primery, jejich sekvence a velikost výsledného PCR produktu v počtu párů bází (bp)

Primer	Gen	Sekvence primeru (5'-3')	Velikost produktu (bp)
<i>phaAF</i>	<i>phaA</i>	CCATGACCATCAACAAGGTG	262
<i>phaAR</i>		TATTCCTTGGCCACGTTCTC	
<i>phaB1F</i>	<i>phaB</i>	AATGTGGCTGACTGGGACTC	164
<i>phaB1R</i>		GAGGTCAGGTTGGTGTTCGAT	
<i>phaSyn1F</i>	<i>phaC</i> (PHA syntáza – 1.třída)	TGCGCAACATGATGGAAGAC	204
<i>phaSyn1R</i>		AGTACTTGTTGATGCACGGC	
<i>phaSyn2aF</i>	<i>phaC</i> (PHA syntáza – 2.třída)	GTTCAACACTGGAGGCAGCA	133
<i>phaSyn2aR</i>		GGGTGTGCAGGCCAGATTAC	
<i>phaSyn2bF</i>	<i>phaC</i> (PHA syntáza – 2.třída)	TACATCGAGGCGCTCAAGGA	594
<i>phaSyn2bR</i>		GCCGAACAGATGAGCCGATT	
<i>phaSyn3F</i>	<i>phaE</i> (PHA syntáza – 3.třída)	CAGTGGATGCTGCAGGGC	463
<i>phaSyn3R</i>		GCAGGCCGATACGTTCACTC	
<i>phaSyn4F</i>	<i>phaR</i> (PHA syntáza – 4.třída)	AAATGAAGTAACGGGGCGCT	326
<i>phaSyn4R</i>		CCTGAAGCTGCTCACCTTGA	
<i>phaJF</i>	<i>phaJ</i>	CGAGTACACCAGCAGCATCG	287
<i>phaJR</i>		GGTTCTTCGGCAGTTCTCG	
<i>fabGF</i>	<i>fabG</i>	TGGCTCGAGAGAGAGAAAGGAGA	750
<i>fabGR</i>		TTCCGCAACGAATTCTAGAC	
<i>phaG1F</i>	<i>phaG</i>	GATGCGCGACTATCTGGACC	401
<i>phaG1R</i>		TGACATTGCGGGTGTTCCTCG	
<i>phaG2F</i>	<i>phaG</i>	ACGTAACCTGCACCCACAGT	500
<i>phaG2R</i>		GCACCGGGATGTTGATATTG	
<i>phaG3F</i>	<i>phaG</i>	AGAAGGCAGTGGTGAGTTCG	425
<i>phaG3R</i>		ACAGGCGGTCTTGTTCCTCA	

## 7 POUŽITÉ METODY

### 7.1 Izolace deoxyribonukleové kyseliny

Izolace bakteriální deoxyribonukleové kyseliny (DNA) byla provedena pomocí kitu NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel, Düren, Německo). Na začátku byla bakteriální kličkou z pevné půdy odebrána 24hodinová bakteriální, která byla rozsuspendována do 200  $\mu$ l pufru T1. Následně bylo k suspenzi přidáno 25  $\mu$ l Proteinázi K a 200  $\mu$ l pufru B3. Takto připravená suspenze byla promíchána pomocí vortexu a poté byla zahřívána po dobu 15 minut na 70 °C. Po uplynulé době záhřevu došlo k lýze buněk a následně bylo ke vzorku přidáno 210  $\mu$ l 96% ethanolu (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika) k vysrážení DNA. Vzorek byl promíchán na vortexu acelý obsah vzorku byl přenesen na kolonku NucleoSpin®Tissue, která byla vložena do sběrné zkumavky. Takto připravený vzorek byl centrifugován při 11 000 ot/min po dobu 1 minuty pro zachycení vysrážené DNA na kolonce. Po centrifugaci byl proteklý filtrát odstraněn. Zachycená DNA na kolonce byla promyta pomocí 500  $\mu$ l promývacího pufru BW a vzorek byl poté centrifugován při 11 000 ot/min po dobu 1 minuty. Filtrát byl opět odstraněn a na kolonku bylo nanášeno 600  $\mu$ l druhého promývacího pufru B5 a vzorek byl znovu centrifugován při 11 000 ot/min. Filtrát byl znovu odstraněn a kolonka promyta 600  $\mu$ l pufru B5 a zcentrifugována. Na závěr promývání byl opět filtrát odstraněn a kolonka centrifugována při 11 000 ot/min po dobu 1 minuty k dokonalému odstranění promývacích pufrů. Po centrifugaci byla kolonka přenesena do 1,5ml mikrozkušavky typu Eppendorf a na kolonku bylo nanášeno 50  $\mu$ l elučního pufru BE pro eluci pročištěné DNA. Eluce na kolonce probíhala při pokojové teplotě po dobu 5 minut a následně byl roztok centrifugován při 11 000 ot/min po dobu 1 minuty. U takto získaného vzorku DNA byla stanovena koncentrace a čistota pomocí měření absorbance při vlnové délce 260 nm a 280 nm na přístroji Tecan Infinite® 200 PRO (Tecan, Männedorf, Švýcarsko).

### 7.2 Polymerázová řetězová reakce

Po izolaci DNA byla získaná DNA smíchána s PCR vodou, primery (Eastport – Metabion, Praha, Česká republika) naředěnými na koncentraci 25  $\mu$ M a GoTaq® Hot Start Green Master mixem (Promega, Madison, USA). Množství jednotlivých činidel podle počtu primerů v reakci jsou uvedeny v Tab. 5. Při každé PCR byl vytvořen i kontrolní vzorek se stejným složením jen bez DNA.

Tabulka 5 Složení PCR směsi s GoTaq® Hot Start

Činidlo	Množství (μl)			
	PCR voda	7	5	2
GoTaq® Hot Start	10	10	10	10
primer 1F	1	1	1	1
primer 1R	1	1	1	1
primer 2F	-	1	1	1
primer 2R	-	1	1	1
primer 3F	-	-	1	1
primer 3R	-	-	1	1
primer 4F	-	-	-	1
primer 4R	-	-	-	1
DNA	1	1	2	2

PCR směs byla následně umístěna do termocykleru Aeris™ (ESCO, Singapur), kde probíhala samotná reakce. Průběh PCR je uveden v Tab. 6.

Tabulka 6 Průběh PCR

Název kroku	Teplota (° C)	Čas (min)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	5	1
Denaturace	95	0,5	40
Annealing	55–70	0,5	
Elongace	72	1	
Závěrečná elongace	72	10	1
Chlazení	4	∞	1

Po neúspěšné amplifikaci PCR produktu při optimalizaci byla namíchána směs skládající se z primerů o koncentraci 10 μM, PCR vody, DNA a EliZyme™ HS Robust MIX Red (Elisabeth Pharmacon, Brno, Česká republika) podle Tab. 7 a následná PCR probíhala stejně jak je uvedeno v Tab. 6.

Tabulka 7 Složení PCR směsi s EliZyme™ HS Robust MIX Red

Činidlo	Množství (μl)
PCR voda	9,5
EliZyme™ HS Robust MIX Red	12,5
primer 1F	1
primer 1R	1
DNA	1

Po neúspěšné amplifikaci byl dále vyzkoušen vliv aditiva dimethylsulfoxidu (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) v koncentraci 2, 5 a 10 % se stejným průběhem PCR (viz Tab. 6). Složení PCR reakce je uvedeno v Tab. 8.

Tabulka 8 Složení PCR reakce s přidavkem DMSO

Činidlo	Množství (μl)		
	2 % DMSO	5 % DMSO	10 % DMSO
PCR voda	6,6	6	5
GoTaq® Hot Start	10	10	10
primer 1F	1	1	1
primer 1R	1	1	1
DMSO	0,4	1	2
DNA	1	1	1

### 7.3 Elektroforéza

PCR produkty byly detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy.

Před zahájením vlastní elektroforézy byl připraven 1,5 % agarózový gel. Na začátku přípravy gelu bylo vypočtené množství agarózy (Lonza, Rockland, USA) smícháno v TAE (tris-acetát- ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA)) pufru, který obsahoval 0,04 M Tris, 0,001 M EDTA Na<sub>2</sub>, 0,02 M kyselina octová (vše Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Výsledná směs byla přivedena k varu pomocí mikrovlnné trouby k dokonalému rozpuštění agarózy. Do roztoku bylo poté přidáno barvivo GelRed™ (Biotium, Fremont, USA) v koncentraci 10 μl/100 ml gelu, díky němuž lze vizualizovat DNA. Teplý roztok byl následně vylit do horizontální aparatury s hřebínkem. Po ztuhnutí byl hřebínek odstraněn a gel byl ponořen do elektroforetické vany obsahující 1x koncentrovaný TAE pufr. Do jamek gelu, které vznikly po vyjmutí hřebínku, bylo nanášeno 5 μl PCR produktu a 5 μl srovnávacího markeru peqGOLD 100 bp Plus (VWR Peqlab, Erlangen, Německo). Po nanášení produktů a markeru byla elektroforetická vana zapojena do zdroje elektrického napětí. Elektroforéza probíhala při napětí 120 V po dobu 60 minut. Po proběhnutí elektroforézy byl gel přenesen do transiluminátoru InGeniusLHR (Syngene, Cambridge, Velká Británie), kde byl sledován a zdokumentován pod UV světlem pomocí fotodokumentačního systému GeneSnap.



## 8 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 8.1 Optimalizace screeningu genů

Optimalizace PCR pro screening genů probíhala vždy na stejném druhu mikroorganismu, ze kterého byla získána sekvence sledovaného genu pro návrh primerů. Pro primery phaA, phaB1a phaSyn1 byla provedena optimalizace PCR na *Cupriavidus neactor* CCM 3726. Pro primery phaSyn2a, phaSyn2b byla provedena optimalizace PCR na *Pseudomonas mendocina* CCM 3590, pro phaSyn3 na *Stenotrophomonas maltophilia* GK CIP 5/1, pro phaSyn4 na *Bacillus megaterium* D117 a pro primery phaJ s fabG na *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955. Dále byla provedena optimalizace PCR pro primery phaG1, phaG2 na *Pseudomonas mendocina* CCM 3590 a pro phaG3 na *Pseudomonas putida* D68.

V první fázi optimalizace byla stanovena optimální teplota annealingu a následně byly primery vhodně zkombinovány pro vytvoření multiplexu PCR.

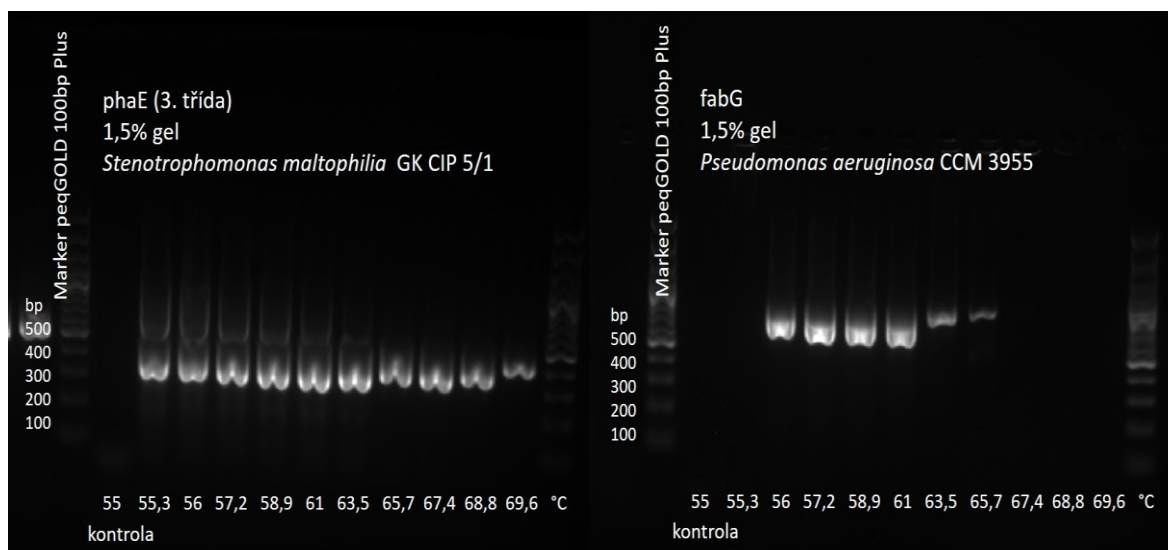
#### 8.1.1 Optimalizace teploty annealingu

Čistota a výtěžek PCR produktů závisí na několika parametrech, do nichž patří i teplota annealingu. Při nevhodné teplotě annealingu mohou vznikat vedlejší produkty a snižuje se i výtěžek požadovaného produktu. Optimalizace této teploty je obzvláště důležitá při amplifikaci dlouhých PCR produktů či při použití celkové genomové DNA jako šablony PCR. Při zvolení nízké teploty annealingu dochází k amplifikaci nescifických PCR produktů, což se projeví výskytem více než jednoho signálu na agarózovém gelu po proběhnutí elektroforézy. Naopak při zvolení vysoké teploty dochází k snížení výtěžku až zástavě tvorby PCR produktu (Rychlik, Spencer a Rhoads, 1990).

Optimalizace teploty annealingu proběhla pomocí tzv. gradientové PCR. Při gradientové PCR byly otestovány různé teploty annealingu v jedné reakci, což vedlo k rychlému nalezení optimální teploty. Díky tomu došlo k snížení až vyloučení vzniku vedlejších produktů PCR (Ishii a Fukui, 2001). Pro optimalizaci teploty annealingu bylo sledováno rozpětí 55–70 °C, a to vždy pro jeden primerový pár. Ostatní hodnoty PCR programu zůstaly zachovány, jak je uvedeno v Tab. 6.

Primery phaSyn1, phaSyn2a, phaSyn2b, phaA, phaB1a phaJ vytvářely PCR produkt při všech testovaných teplotách bez tvorby vedlejšího produktu. Primery phaSyn4 a fabG též netvořily vedlejší PCR produkty při všech sledovaných teplotách. Ovšem u primerů phaSyn4 došlo k zástavě tvorby požadovaného PCR produktu při teplotě 68,8 °C a u primerů fabG

(viz Obr. 10) při teplotě 67,4 °C. Naopak primery phaSyn3 (viz Obr. 10) sice tvořily požadovaný PCR produkt při všech teplotách ovšem do teploty 63,5 °C vznikal i vedlejší produkt. Proto optimální teplota annealingu pro všechny výše zmíněné primery a pro tvorbu multiplexu PCR byla stanovena na 65 °C.



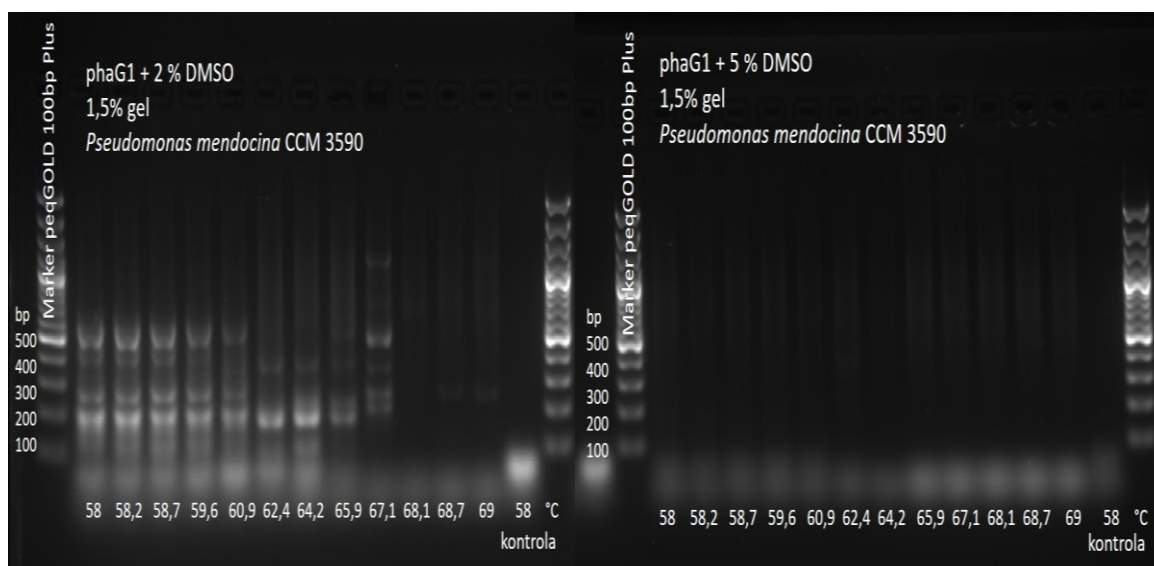
Obrázek 10 Agarózový gel s produkty po gradientové PCR při optimalizaci teploty annealingu pro syntázu 3. třídy s primery phaSyn3 (vlevo) a pro gen *fabG* (vpravo)

Dalšími optimalizovanými primery byly primery pro gen *phaG* (*phaG1*, *phaG2* a *phaG3*). První optimalizovanou dvojicí primerů byla *phaG1*. Při PCR s touto dvojicí primerů měl vznikat produkt o velikosti 401 bp u *Pseudomonas mendocina*, ovšem při teplotách do 66 °C vznikaly vedlejší produkty a při vyšších teplotách přestal vznikat i produkt s požadovanou velikostí. Pro zlepšení amplifikace požadovaného specifického produktu byl proto vyzkoušen vliv rozdílného složení PCR směsi. Tato směs byla připravena s EliZyme™ HS Robust MIX Red podle Tab. 7 a PCR reakce probíhala při teplotě annealingu od 58 do 69 °C. EliZyme™ HS Robust MIX Red byl vytvořen pro amplifikaci extrémně složitých templátů s dosažením výjimečných výsledků s vysokou výtěžností a specifitou produktů i ve směsích s PCR inhibitory. Pravděpodobně díky vysoké výtěžnosti nakonec tato reakce vedla ke vzniku vedlejších produktů při všech sledovaných teplotách. Dále byl vyzkoušen vliv přídavku DMSO na tvorbu specifických PCR produktů. Směs s DMSO byla připravena a použita v koncentraci 2, 5 a 10 % (viz Tab. 8).

DMSO se obvykle přidává do PCR reakcí s DNA šablonami bohatými na guanin a cytosin. Přidává se v koncentracích 1–10 % (Lorenz, 2012). DMSO se dokáže navázat na šablonu DNA, což destabilizuje její strukturu dvojité šroubovice (Simon *et al.*, 2009). To je obzvláště

vhodné pro šablony s vyšším množstvím guaninu a cytosinu, jelikož mají zvýšenou pevnost vodíkové vazby mezi sebou a tím zvyšují obtížnost denaturace DNA (Chakrabarti a Schutt, 2001). Přidání DMSO tedy dokáže zlepšovat výtěžky i specifitu PCR (Hardjasa, Ling a Ma, 2010).

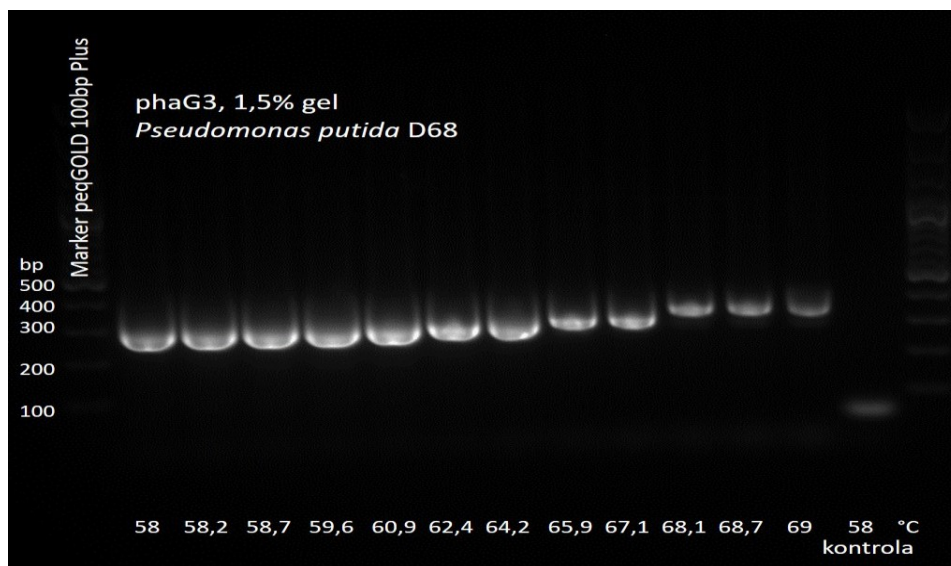
Přídavek 5 a 10 % DMSO zastavil amplifikaci PCR produktů při všech sledovaných teplotách a 2% přídavek DMSO nedokázal zabránit vzniku vedlejších produktů (Obr. 11). Zástava amplifikace PCR produktů u přídavku 5 a 10 % byla pravděpodobně způsobena inhibicí DNA polymerázy, kterou dokáže způsobit přídavek DMSO větší než 2 % (Lorenz, 2012).



Obrázek 11 Vliv přídavku 2 % (vlevo) a 5 % (vpravo) DMSO na tvorbu PCR produktů primerů phaG1

Jelikož nedošlo k zoptimalizování dvojice primerů phaG1, byly tyto primery vyřazeny z následných testů. Pro stejný gen byl navrhnout nový primer phaG2, který byl opět optimalizován na *Pseudomonas mendocina*. PhaG2 primery měly vytvářet produkt o velikosti 500 bp. Ovšem při všech sledovaných annealingových teplotách v PCR reakci s GoTaq® Hot Start Green Master mixem i s s EliZyme™ HS Robust MIX Red se nevytvořil žádný PCR produkt. Proto byla i tato dvojice primerů z dalšího testování vyřazena. Další dvojicí primerů na screening *phaG* genu byla phaG3. Tato dvojice primerů byla získaná ze sekvence *phaG* genu z *Pseudomonas putida*, proto byla optimalizována na stejném druhu. Primery phaG3 (viz Obr. 12) dokázaly vytvořit specifický produkt při všech sledovaných annealingových teplotách bez tvorby vedlejších produktů. Tento primer tedy prokázal svou schopnost a byl použit pro další screening genu *phaG*. Neúspěšná optimalizace primerů

phaG1 a phaG2 byla pravděpodobně způsobena nepřítomností genu *phaG* u kmene *Pseudomonas mendocina* CCM 3590. Jeho přítomnost nebyla potvrzena ani použitím primerů phaG3 viz Tab. 9.



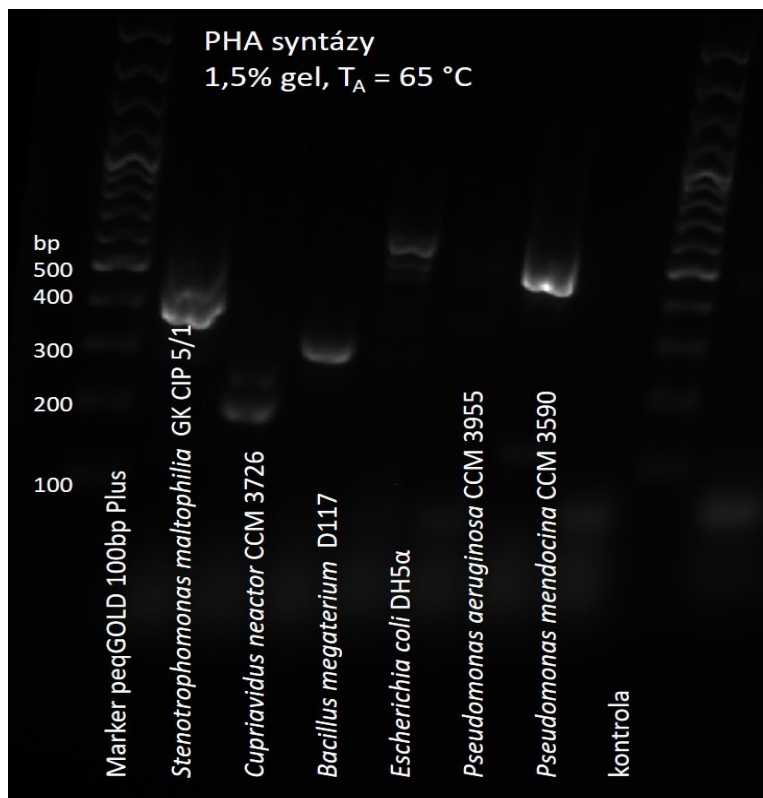
Obrázek 12 PCR produkty primerů phaG3 při různých teplotách annealingu

Pomocí gradientové PCR byla stanovena optimální teplota annealingu 65 °C. Při této teplotě byla provedena optimalizace PCR v multiplexu i následný screening genů u mikroorganismů.

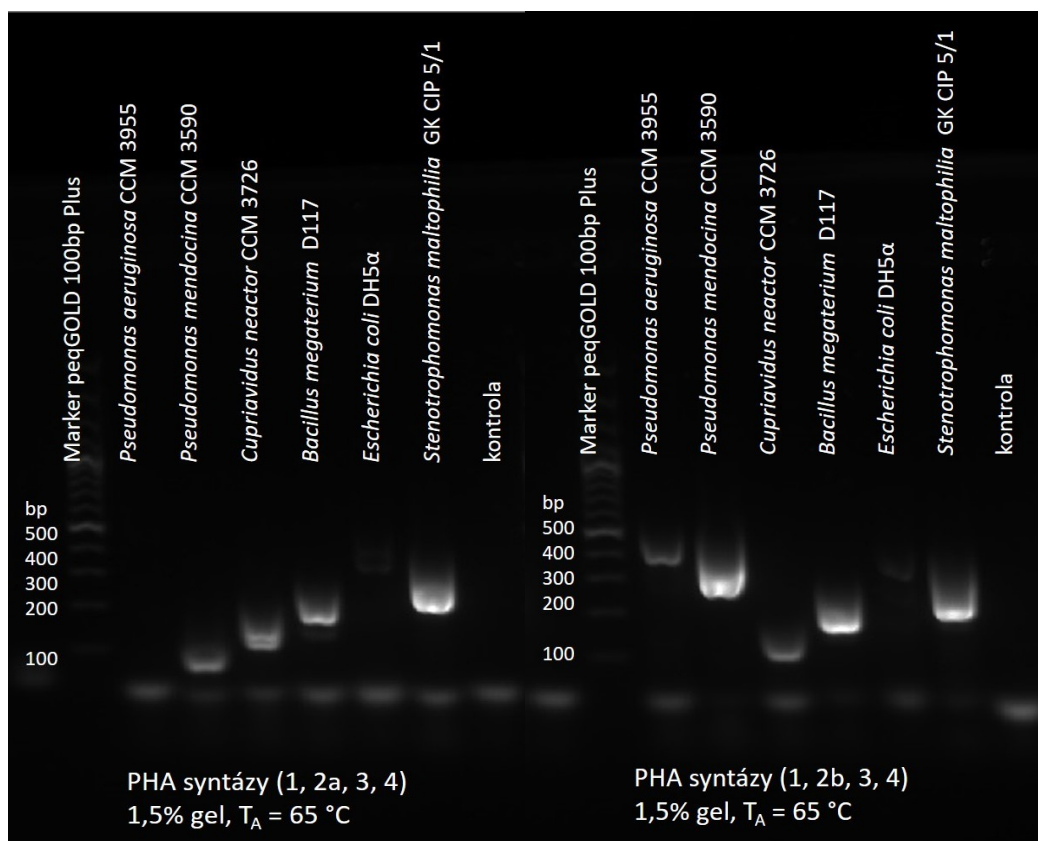
### 8.1.2 Vytváření multiplexu PCR

Po stanovení optimální teploty annealingu byla navržena kombinace několika párů primerů k vytvoření PCR multiplexu.

První skupinou pro vytvoření multiplexu PCR byly PHA syntázy. První multiplex PCR obsahoval všech pět párů PHA syntáz (*phaSyn1*, *phaSyn2a*, *phaSyn2b*, *phaSyn3* a *phaSyn5*). Jelikož v optimalizaci byly dvě dvojice primerů pro gen PHA syntázy 2. třídy (primery *phaSyn2a* a *phaSyn2b*), byly vytvořeny další dva multiplexy, a to jeden s čtveřicí primerů s *phaSyn2a* a druhý s *phaSyn2b*. U pětice PHA syntáz (Obr. 13) se u *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 nevytvořil žádný specifický produkt. U *Pseudomonas mendocina* CCM 3590 se měly vytvořit dva specifické produkty použitím primerů *phaSyn2a* a *phaSyn2b*, ale vznikl pouze jeden od *phaSyn2b*. Je tedy pravděpodobné, že primery *phaSyn2b* lépe vytváří PCR produkt a svou přítomností zabraňují produkci PCR produktu *phaSyn2a*. Vzhledem k těmto nedostatkům a také horší čitelnosti pěti PCR produktů v jedné reakci byl screening pětice PHA syntáz zavrhnut.



Obrázek 13 PCR produkty všech pěti primerů pro PHA syntázy v multiplexu PCR ( $T_A$  – teplota annealingu)

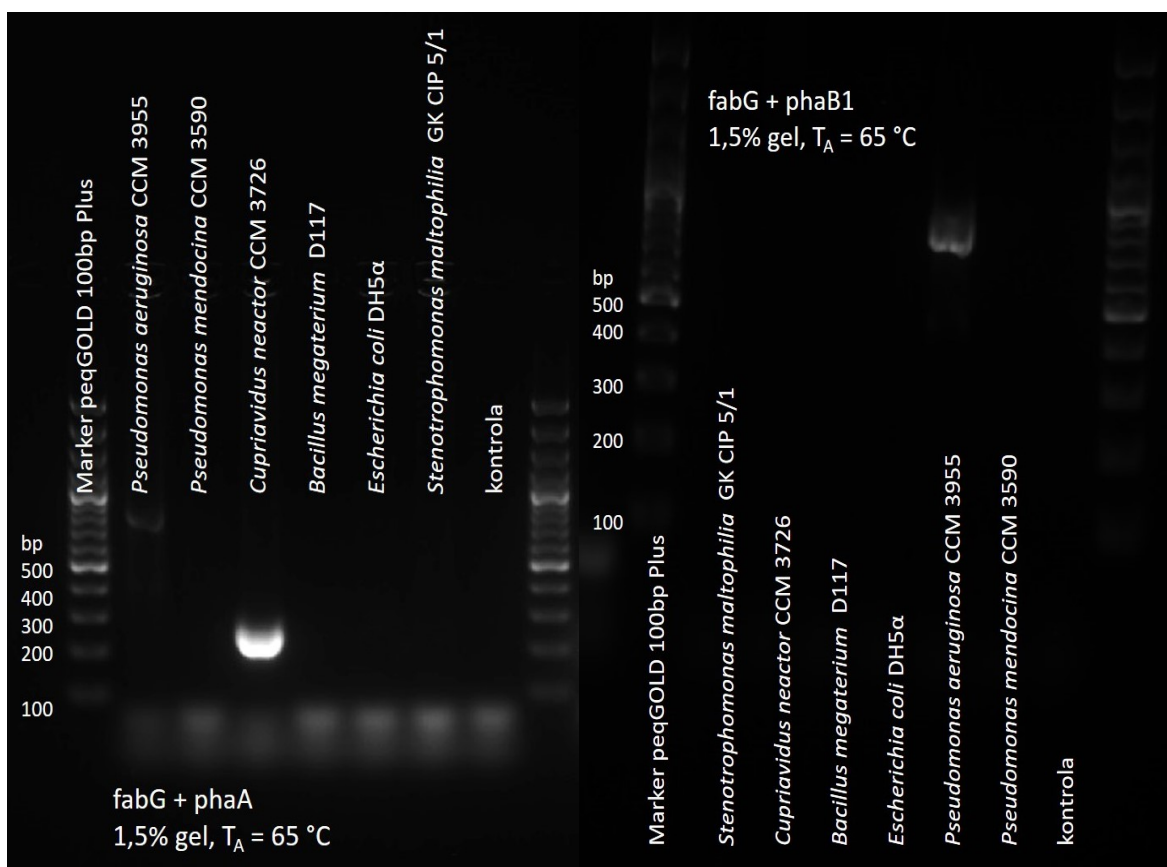


Obrázek 14 PCR produkty čtveřice primerů pro PHA syntázy – s primery phaSyn2a (vlevo), s phaSyn2b (vpravo)



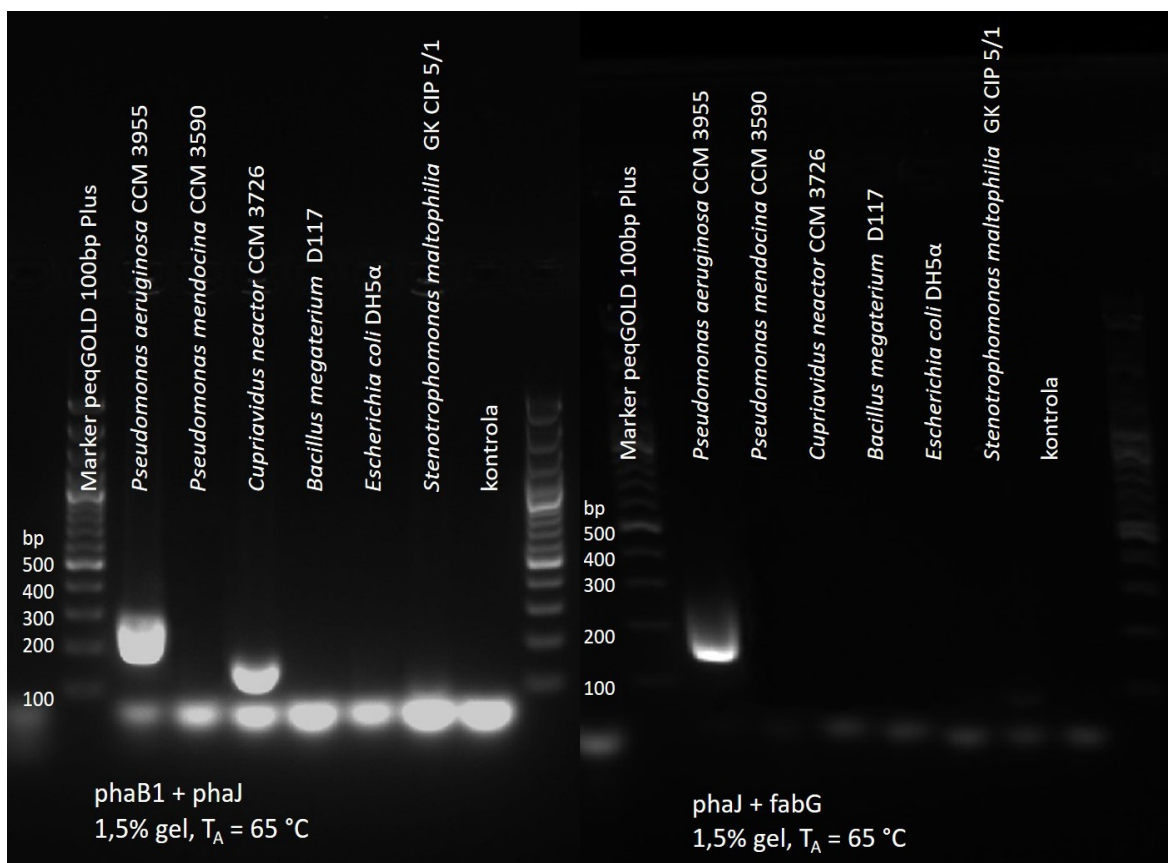
U multiplexu s čtveřicí primerů pro screening syntáz s phaSyn2a (Obr. 14) opět nevznikal žádný PCR produkt u *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, ovšem při použití čtveřice s phaSyn2b (Obr. 14) byla u tohoto kmene potvrzena přítomnost PHA syntázy 2. třídy. Multiplex PCR s phaSyn2b primery byl nakonec použit pro další testování reálných bakterií.

Dále proběhla optimalizace k nalezení vhodné kombinace ostatních primerů (tj. phaA, phaB1, phaG3 phaJ a fabG). Jelikož primery fabG vytváří nejdelší PCR produkt (o velikosti 750 bp) mohly být zkombinovány se všemi ostatními primery. Byly tedy otestovány dvojice fabG + phaA, fabG + phaB1 a fabG + phaJ. U dvojice fabG + phaB1 (Obr. 15) nebyl vytvořen specifický produkt phaB1 primeru u *Cupriavidus neactor* CCM 3726, naopak u dvojice fabG + phaJ (Obr. 16) nebyl vytvořen specifický produkt primeru fabG u *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955. Ovšem při použití dvojice primerů fabG + phaA (Obr. 15) došlo k vytvoření obou specifických PCR produktů. Tato sada primerů proto byla použita pro další testování.



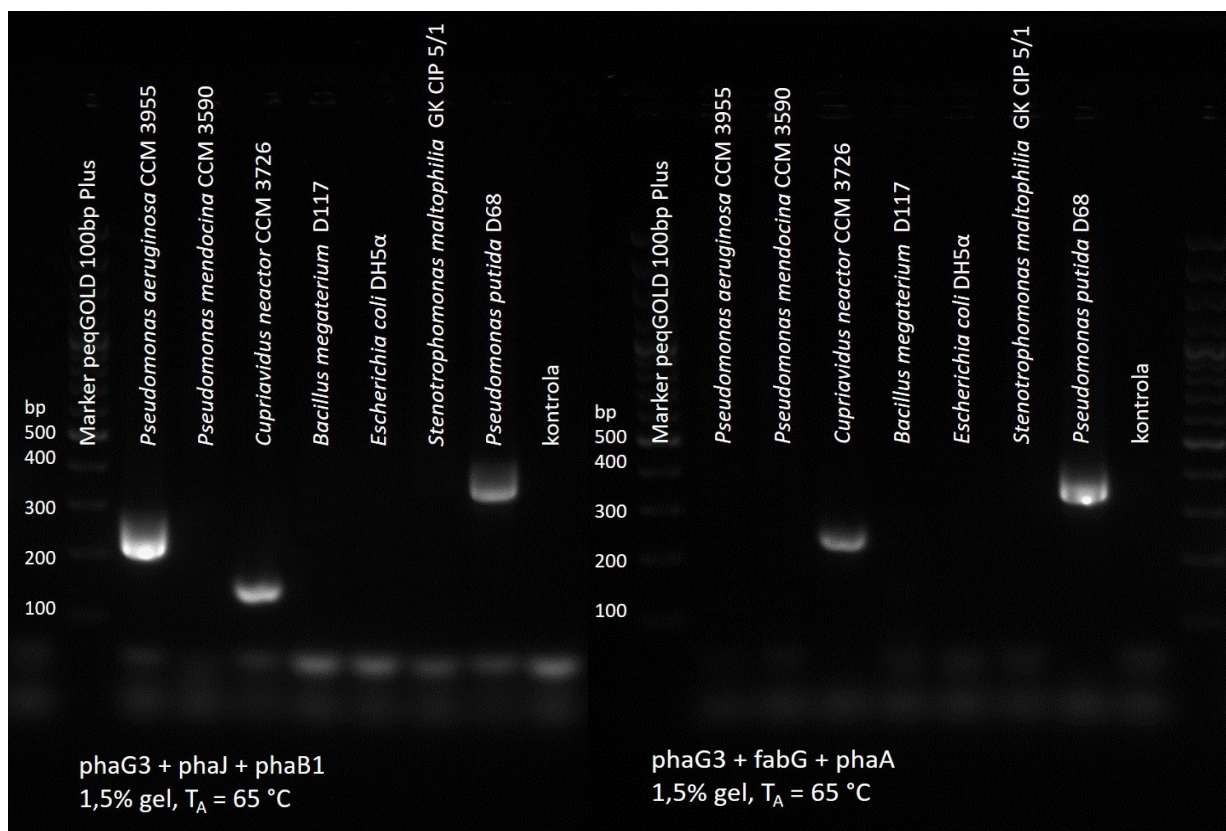
Obrázek 15 PCR produkty dvojic primerů – fabG + phaA (vlevo), fabG + phaB1 (vpravo)

Dále proběhlo hledání vhodného primeru k primerům phaJ. Jelikož phaJ vytváří PCR produkty o velikosti 287 bp, nebylo vhodné vytvořit multiplex PCR s phaA, protože primery phaA vytváří PCR produkty o podobné velikosti, tj. o velikosti 262 bp. PCR produkty těchto primerů by tedy nešly od sebe dobře odlišit. Primery phaJ byly tedy zkombinovány s primery fabG a phaB1 (Obr. 16). Kombinace phaJ a fabG byla popsána již výše. U multiplexu PCR phaB1 + phaJ (Obr. 16) vznikaly pomocí obou primerů specifické produkty, proto tato dvojice primerů byla použita pro další testování.



Obrázek 16 PCR produkty dvojice primerů – phaB1 + phaJ (vlevo), fabG + phaJ (vpravo)

Posledním krokem optimalizace k vytvoření multiplexu PCR bylo vytvoření z vhodných dvojic primerů (fabG + phaA a phaB1 + phaJ) trojici s phaG3. Trojice primerů fabG + phaA + phaG3 (Obr. 17) v multiplexu nevytvářela PCR produkt fabG primerů u *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, proto tato trojice byla posouzena jako nevhodná pro další screening genů. Naopak trojice primerů phaB1 + phaJ + phaG3 (Obr. 17) dokázala vytvořit všechny specifické PCR produkty, proto byla použita pro screening genů testovaných mikroorganismů.



Obrázek 17 PCR produkty trojice primerů – phaB1 + phaJ + phaG3 (vlevo), fabG + phaA + phaG3 (vpravo)

## 8.2 Screening genů

Screening genů probíhal pomocí zoptimalizovaných skupin primerů v multiplexu PCR, tj. čtveřice PHA syntáz (phaSyn1 + phaSyn2b + phaSyn3 + phaSyn4), trojice primerů (phaB1 + phaJ + phaG3) a dvojice (fabG + phaA), při teplotě annealingu  $65^\circ\text{C}$ . Byl proveden screening genů podílející se na tvorbě PHA u celkem 77 mikrobiálních kmenů. U většiny z těchto mikroorganismů byla potvrzena přítomnost, alespoň jednoho z nich. Pouze u 10 kmenů (tj. *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *amyloliquefaciens* D11, *Lysinibacillus xylanilyticus* D23, *Bacillus megaterium* D32, *Oceanobacillus caeni* D61, *Citrobacter braakii* D69, *Pseudomonas antarctica* D102, *Bacillus* sp. D116, *Klebsiella oxytoca* D212, *Guehomyces pullulans* D234 a *Escherichia coli* F77) nebyla potvrzena žádná přítomnost sledovaných genů. Přítomnost klíčové PHA syntázy byla potvrzena u 47 kmenů. Výsledky všech testovaných mikrobiálních kmenů jsou uvedeny v Tab. 9.



Tabulka 9 Výsledky screeningu genů podílejících se na produkci PHA (+ – přítomnost daného genu, - – neprokázána přítomnost daného genu)

Mikrobiální druh	pha Syn1	pha Syn2	pha Syn3	pha Syn4	pha A	fab G	pha B1	pha G3	pha J
<i>Pseudomonas mendocina</i> CCM 3590	-	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>Cupriavidus neactor</i> CCM 3726	+	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	-	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> GK CIP 5/1	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> DH5α	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Pantoea agglomerans</i> D10	+	-	-	+	-	-	+	-	+
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ssp. <i>amyloliquefaciens</i> D11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pantoea agglomerans</i> D13	-	-	-	+	-	+	+	-	-
<i>Pseudomonas koreensis</i> D16	+	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Pantoea agglomerans</i> D17	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> D23	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pantoea agglomerans</i> D27	+	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>Pseudomonas koreensis</i> D28	-	-	+	-	+	-	-	-	+
<i>Pantoea agglomerans</i> D28b	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Bacillus simplex</i> D31	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Bacillus megaterium</i> D32	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> D36	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> D37	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> D47	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lelliottia amnigena</i> D52	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> D55	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Oceanobacillus caeni</i> D61	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas putida</i> D68	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Citrobacter braakii</i> D69	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ssp. <i>plantarum</i> D78	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> D80	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fragi</i> D93	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas corrugata</i> D100	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas antarctica</i> D102	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Oceanobacillus kimchii</i> D105	+	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>Pantoea agglomerans</i> D109	-	-	-	+	-	+	+	+	-
<i>Staphylococcus</i> sp. D111	+	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Bacillus</i> sp. D116	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus megaterium</i> D117	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas marginalis</i> D124	+	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>Oceanobacillus</i> sp. D140	-	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>Pseudomonas putida</i> D146	-	-	+	-	-	+	-	-	-
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> D165	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> D171	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> D173	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Mikrobiální druh	pha Syn1	pha Syn2	pha Syn3	pha Syn4	pha A	fab G	pha B1	pha G3	pha J
<i>Pseudomonas mendocina</i> CCM 3590	-	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>Cupriavidus nector</i> CCM 3726	+	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	-	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Pseudomonas gessardii</i> D180	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> D183	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Pseudomonas veronii</i> D186	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Bacillus megaterium</i> D199	-	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>Bacillus megaterium</i> D201	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i> D212	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas extremorientalis</i> D214	+	-	+	-	-	-	+	+	+
<i>Rahnella aquatilis</i> D218	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> D220	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Stenotrophomonas</i> sp. D221	+	-	-	+	-	-	+	-	+
<i>Kosakonia cowanii</i> D223	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Pseudomonas tolaasii</i> D228	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> D233	+	+	-	-	+	-	-	+	-
<i>Guehomyces pullulans</i> D234	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> D237	-	+	-	+	-	-	+	-	+
<i>Pseudomonas libanensis</i> D238	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> D239	+	-	-	+	-	+	+	-	-
<i>Escherichia coli</i> 114	-	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>Escherichia coli</i> 119	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> 123	+	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> 126	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> F10	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> F53	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> F77	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> F108	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> I/2	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> I/3a	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> I/6a	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> II/2	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> S7	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> S10	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> S17	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> S23	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> S32	+	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> S33	+	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> S34	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> S35	+	-	-	-	+	-	-	-	-

Zoptimalizovanou metodou multiplexu PCR byl proveden screening 9 genů podílejících se na produkci PHA u celkem 77 mikrobiálních kmenů. Byl proveden screening genů všech čtyř tříd PHA syntáz, kódované geny *phaC* (první a druhá třída), *phaE* (třetí třída) a *phaR* (čtvrtá třída), které jsou blíže popsány v kapitole 2.5.4. Dále byl proveden screening dalších genů, které jsou zapojeny do cyklu syntézy PHA. Konkrétně genů zapojených do produkce scl PHA z glukózy (geny *phaA* a *phaB*) viz kapitola 2.5.2, do produkce PHA ze souvisejících zdrojů pomocí  $\beta$ -oxidace (geny *phaJ* a *fabG*) viz kapitola 2.5.1 a do produkce mcl PHA pomocí biosyntézy disociované kyseliny (gen *phaG*) viz kapitola 2.5.3. Do testování bylo zahrnuto 16 různých mikrobiálních rodů (*Acinetobacter*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Cupriavidus*, *Escherichia*, *Guehomyces*, *Klebsiella*, *Kosakonia*, *Lelliottia*, *Lysinibacillus*, *Oceanobacillus*, *Pantotea*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Staphylococcus* a *Stenotrophomonas*) a všechny výsledky jejich screeningu genů zapojených do produkce PHA jsou uvedeny v Tab. 9.

### 8.2.1 Rod *Acinetobacter*

Z rodu *Acinetobacter* bylo do screeningu zařazeno celkem šest kmenů stejného bakteriálního druhu *Acinetobacter calcoaceticus*. U třech z testovaných kmenů (D47, D55 a D165) byla potvrzena přítomnost genů pro produkci PHA syntázy 1. třídy. Ovšem pouze *Acinetobacter calcoaceticus* D165 byla potvrzena i přítomnost genu *phaB*. Proto je pravděpodobné, že kmen D165 dokáže produkovat scl PHA z glukózy. U kmenu *Acinetobacter calcoaceticus* D165 nebyla potvrzena přítomnost *phaA* genu, což naznačuje, že pravděpodobně vytváří P(3HV) pomocí cesty D či F v Obr. 3. U kmenů *Acinetobacter calcoaceticus* D47 a D55 nebyla potvrzena přítomnost dalšího genu zahrnutého do metabolismu PHA, proto nelze říct jakou cestou scl PHA vyrábí. U kmenů *Acinetobacter calcoaceticus* D36, D171 a D173 sice nebyla potvrzena přítomnost některé PHA syntázy, ovšem u D36 byla potvrzena přítomnost genu *fabG*, u D171 přítomnost *phaB* a u D173 přítomnost *phaA*. Je tedy možné, že tyto geny využívají v jiném metabolismu než na produkci PHA. Obecně lze o rodu *Acinetobacter* konstatovat, že byly v některých z testovaných zástupců objeveny geny pro PHA syntázu 1. třídy, *phaA*, *phaB* a *fabG*. Díky přítomnosti PHA syntázy 1. třídy by měly přednostně vytvářet scl PHA a díky *phaA* a *phaB* by tento rod měl být schopen využívat sacharidy. Ovšem u jednoho kmene byl objeven i gen *fabG*, díky jemuž rod *Acinetobacter* dokáže využívat i tuky a tím pádem pravděpodobně vytvářet mcl PHA. Tyto domněnky potvrzují Elsayed *et al.* (2016), kteří pomocí *Acinetobacter baumannii* dokázali dosáhnout nejlepší produkce PHB z kukuřičného oleje. Zatím co Vierkant, Martin a Stewart (1990) zjistili, že

zástupci z rodu *Acinetobacter* dokáží produkovat PHB i ze sacharidů. V jejich studii, u tří kmenů ze šesti, bylo dosaženo optimální produkce z glukózy. Jeden kmen preferoval pro produkci xylózu a dva z nich nereagovali na monosacharidy. Schopnost produkovat scl i mcl PHA pomocí tohoto rodu byla potvrzena Kung *et al.* (2007), kteří ze sójového oleje dokázali vytvářet PHB a PHHx. Produkci mcl PHA pomocí zástupců z rodu *Acinetobacter* dosáhli i z kukuřičného oleje Song *et al.* (2008).

### 8.2.2 Rod *Bacillus*

Z rodu *Bacillus* bylo otestováno devět kmenů, z toho čtyři (D32, D117, D199 a D201) byly stejného druhu *Bacillus megaterium*. U pěti kmenů (D31, D80, D117, D199 a D201) byla potvrzena přítomnost alespoň jedné z PHA syntáz a u třech kmenů (*Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *amyloliquefaciens* D11, *Bacillus megaterium* D32 a *Bacillus* sp. D116) nebyla potvrzena přítomnost ani jednoho ze sledovaných genů. U kmenu *Bacillus simplex* D32 byla prokázána přítomnost PHA syntázy 1. třídy a genu *phaA*, proto pravděpodobně dokáže produkovat scl PHA. U kmene *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* D78 byla též potvrzena přítomnost genu *phaA*, ovšem nebyla potvrzena přítomnost některé PHA syntázy. Proto pravděpodobně *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* D78 využívá tento gen pro jiný účel než pro produkci PHA. Dalším testovaným kmenem byl *Bacillus cereus* D80, u kterého byla potvrzena pouze přítomnost PHA syntázy 4. třídy. Gen PHA syntázy 4. třídy byl objeven též u tří kmenů *Bacillus megaterium* (D117, D199 a D201). Tato PHA syntáza 4. třídy je typická pro rod *Bacillus* a díky ní vytváří scl PHA. Dokonce pro studium PHA syntázy 4. třídy se hojně využívá *Bacillus megaterium*, u kterého byla v roce 1999 objevena (Tsuge, Hyakutake a Mizuno, 2015; McCool a Cannon, 1999). U *Bacillus megaterium* D199 byla též objevena přítomnost genu *fabG*, proto tento kmen pravděpodobně dokáže vytvářet PHA se souvisejících zdrojů pomocí  $\beta$ -oxidace (cesta C v Obr. 2). Na rozdíl u druhého kmene *Bacillus megaterium* D201 byla prokázána přítomnost genu *phaA*, který je součástí tvorby PHA z glukózy. U *Bacillus* spp. byla prokázána schopnost využívat ligno-celulóznové biologické odpady i cukry pro tvorbu homopolymerů i kopolymerů (Singh *et al.*, 2013; Patel *et al.*, 2012; Patel, Singh a Kalia, 2011; Porwal *et al.*, 2008). Schopnost vytvářet kopolymery u rodu *Bacillus* je pravděpodobně způsobena prokázanou přítomností genů v této diplomové práci, které jsou zapojeny jednak do produkce PHA z glukózy, ale i ze souvisejících zdrojů. Tuto myšlenku potvrzuje i výzkum Mohandas *et al.* (2018), kteří prokázali schopnost produkce P(3HB-co-3HV) z glycerolu u *Bacillus cereus*. Jejich výsledný kopolymer obsahoval 12 mol. % P3HV

při použití surového glycerolu, ovšem přídavek kyseliny propionové zvýšil produkci P3HV o 30 mol. %. Díky tomu je pravděpodobné, že geny zapojené do tvorby PHA ze souvisejících zdrojů mohou ovlivnit množství P3HV. Pomocí složení substrátu lze tedy i dosáhnout požadovaného polymeru na míru dané aplikace. Pomocí správného složení substrátu lze získat i čisté homopolymery P3HB, což dokázali Ray a Kalia (2017), kteří z glukózy pomocí *Bacillus thuringiensis* a *Bacillus cereus* produkovali homopolymer P3HB. Velkou výhodou u rodu *Bacillus* je i nepřítomnost lipopolysacharidů (tj. endotoxinů) ve vnější membráně, proto je PHA získané z nich vhodné pro použití i v medicínských aplikacích (Singh, Patel a Kalia, 2009).

### 8.2.3 Rod *Citrobacter*

Z rodu *Citrobacter* byl do testování zařazen pouze jeden kmen *Citrobacter braakii* D69, u kterého nebyla prokázána přítomnost ani jedno z testovaných genů. Přestože u testovaného kmene nebyla prokázána schopnost produkce, u *Citrobacter* sp. byla prokázána schopnost produkce PHA (Rehman, Jamil a Husnain, 2007). Tento rod dokáže produkovat i polyfosfáty, které se dají využít též jako biomateriál (Moradali a Rehm, 2020).

### 8.2.4 Rod *Cupriavidus*

Rod *Cupriavidus* též v testování zahrnoval pouze jeden kmen *Cupriavidus neactor* CCM 3726. Tento kmen byl použit již při optimalizaci a byla u něj prokázána přítomnost PHA syntázy 1. třídy, genu *phaA* a *phaB*. Díky kombinaci těchto genů je *Cupriavidus neactor* CCM 3726 schopen vytvářet P(3HB) z glukózy (cesta C v Obr. 3). *Cupriavidus neactor* je jeden z nejpoužívanějších a nejvíce prozkoumaných producentů PHA. Byla u něj prokázána přítomnost všech detekovaných genů (PHA syntázy 1. třídy, *phaA* i *phaB*) (Sagong *et al.*, 2018). Díky detekci těchto genů lze i potvrdit správný průběh a nastavení PCR.

### 8.2.5 Rod *Escherichia*

Dále bylo otestováno 21 kmenů *Escherichia coli*. Pouze u jednoho kmene *Escherichia coli* F77 nebyla prokázána přítomnost sledovaných genů. U všech kmenů kromě F77 a DH5 $\alpha$  byla prokázána přítomnost genu *phaA*. U 12 kmenů *Escherichia coli* (119, 123, 126, I/2, I/3a, I/6a, II/2, S7, S32, S33, S34 a S35) byla prokázána přítomnost genů PHA syntázy 1. třídy, u kmene *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  přítomnost PHA syntázy 3. třídy a u kmenů *Escherichia coli* 123, S32 a S33 přítomnost PHA syntázy 4. třídy. Též byla prokázána

přítomnost *phaB* u kmene *Escherichia coli* 114. Z těchto výsledků lze usuzovat, že řada zástupců z druhu *Escherichia coli* by mohla být schopna produkovat scl PHA. Přestože v této studii byly objeveny geny zapojené do PHA cyklu, je *Escherichia coli* považovaná za PHA neprodukující bakterii. Díky neschopnosti produkce PHA se často využívá pro tvorbu rekombinantních PHA produkujících kmenů (Favaro, Basaglia a Casella, 2019; Srirangan *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2009). Je proto možné, že některé kmeny z přírodního prostředí jsou schopny produkce PHA a tím i dokážou lépe snášet stresové podmínky. Případně můžou mít neaktivní geny zapojené do PHA cyklů či mohlo dojít k falešné pozitivitě. K ověření schopnosti tvorby PHA by bylo vhodné u těchto kmenů udělat další testy ověřující fenotypově produkci PHA např. barvení barvivy súdánskou černí, nilskou modří, nilskou červení či provést izolaci případného PHA s následnou charakterizací.

### 8.2.6 Rod *Guehomyces*

Jediným zástupcem z kvasinek byl kmen *Guehomyces pullulans* D234, u kterého nebyla prokázána přítomnost ani jednoho ze sledovaných genů. Mezi producenty PHA se obecně řadí jen bakterie a archea (Poli *et al.*, 2011; Lu, Tappel a Nomura, 2009), ovšem kvasinky lze využít na tvorbu rekombinantních producentů PHA. Díky své vyšší odolnosti vůči kontaminaci, schopnosti využít širokého spektra substrátů a schopnosti přežít i v drsnějších podmínkách představují kvasinky atraktivní potenciál pro tvorbu rekombinantních producentů PHA (Biernacki *et al.*, 2017).

### 8.2.7 Rod *Klebsiella*

Přítomnost ani jednoho genu též nebyla prokázána u jediného zástupce z rodu *Klebsiella* (*Klebsiella axytoca* D212). Přestože se v této práci nepodařilo prokázat přítomnost sledovaných genů zapojený do PHA cyklu, byla u některých zástupců rodu *Klebsiella* prokázána schopnost tvořit PHA z xylózy (Lopes *et al.*, 2009). Dále zástupci z rodu *Klebsiella* dokázali vytvářet kopolymer P(HB-co-HV) ze siřičitanu z tvrdého dřeva a tím i dokázali schopnost přežít v drsných podmínkách (Ferreira *et al.*, 2016). Je tedy možné, že *Klebsiella axytoca* D212 může nést ve svém genomu odlišnou sekvenci genů, než byla testována, a díky níž je schopna produkce PHA.

### 8.2.8 Rod *Kosakonia*

K testování byl použit jeden zástupce z rodu *Kosakonia* (*Kosakonia cowanii* D223), u kterého se potvrdila přítomnost pouze *phaA* genu. Proto pravděpodobně tento gen využívá

v jiném než PHA metabolismu. Bohužel nebyly zatím zaznamenány další studie, které by se tímto rodem zabývaly. Bylo by tedy vhodné provést další studie rodu *Kosakonia* s více kmeny pro ověření neschopnosti produkce PHA.

### 8.2.9 Rod *Lelliottia*

Screening genů byl proveden též u jednoho zástupce z rodu *Lelliottia*. U kmene z toho rodu *Lelliottia amnigena* D52 byla prokázána přítomnost genu PHA syntázy 1. třídy a *phaA*, proto pravděpodobně dokáže vytvářet scl PHA. Naneštěstí nebyly doposud publikovány studie, které by potvrzovaly či vyvracely schopnost produkce PHA u rodu *Lelliottia*. Proto by bylo vhodné provést další studie s více kmeny tohoto rodu.

### 8.2.10 Rod *Lysinibacillus*

U zástupce rodu *Lysinibacillus* (*Lysinibacillus xylanilyticus* D23) nebyla prokázána přítomnost některého z testovaných genů. Ovšem u rodu *Lysinibacillus* byla prokázána schopnost vytvářet PHA v krátkém časovém období z různých zdrojů uhlíku bez přítomnosti endotoxinů. Díky tomu je PHA z rodu *Lysinibacillus* vhodné pro výrobu biomateriálů (Edilane *et al.*, 2016). Je tedy možné, že kmen *Lysinibacillus xylanilyticus* D23 patří mezi PHA-neprodukujícího zástupce z rodu *Lysinibacillus* případně je schopný produkovat PHA pomocí jiné sekvence genů, než byla sledována v této práci.

### 8.2.11 Rod *Oceanobacillus*

Z rodu *Oceanobacillus* byly otestovány tři kmeny. U kmene *Oceanobacillus caeni* D61 nebyla prokázána přítomnost ani jednoho z testovaných genů. Screening genů u kmene *Oceanobacillus kimchii* D105 prokázal přítomnost PHA syntázy 1. a 3. třídy a genu *phaB*, proto je pravděpodobné, že tento kmen je schopen vytvářet scl PHA z glukózy. Naopak u kmene *Oceanobacillus* sp. D140 byla též prokázána přítomnost PHA syntázy 3. třídy v kombinaci s genem *phaJ*, proto pravděpodobně *Oceanobacillus* sp. D140 dokáže vytvářet PHA se souvisejících zdrojů pomocí  $\beta$ -oxidace viz cesta B v Obr. 2. Schopnost produkce PHA u rodu *Oceanobacillus* potvrzuje jeho zařazení mezi PHA-produkující bakterie (Subramanian, Maruthamuthu a Baltrus, 2019).

### 8.2.12 Rod *Pantoea*

Z rodu *Pantoea* bylo otestováno šest zástupců druhu *Pantoea agglomerans*. U všech z nich, kromě *Pantoea agglomerans* D17, byla prokázána přítomnost PHA syntázy 4. třídy. Taktéž

u všech, kromě *Pantoea agglomerans* D28b, byla prokázána přítomnost *phaB*. U kmene *Pantoea agglomerans* D10 byla prokázána také přítomnost genu PHA syntázy 1. třídy a *phaJ*. *PhaJ* byl nalezen pouze u tohoto kmene ze zástupců z rodu *Pantoea*. Díky přítomnosti kombinace těchto genů je kmen *Pantoea agglomerans* D10 pravděpodobně schopný vytvářet PHA jak z glukózy, tak i ze souvisejících zdrojů pomocí  $\beta$ -oxidace (cesta B v Obr. 2). Naopak u kmenů *Pantoea agglomerans* D13, D17 a D109 byla prokázána přítomnost genu *fabG*. Díky tomu kmeny *Pantoea agglomerans* D13, D17 a D109 jsou schopny pravděpodobně vytvářet PHA z glukózy i se souvisejících zdrojů (cesta C v Obr. 2). U kmene *Pantoea agglomerans* D109 byla navíc objevena přítomnost genu *phaG*, proto pravděpodobně dokáže vytvářet PHA i pomocí biosyntézy disociované kyseliny (cesta D v Obr. 4). U kmene *Pantoea agglomerans* D17 sice nebyla prokázána přítomnost žádné PHA syntázy, ale byla prokázána přítomnost genů *fabG* a *phaB*, proto možná využívá tyto geny v jiném metabolismu než pro tvorbu PHA. U kmene *Pantoea agglomerans* D27 byla prokázána přítomnost genu PHA syntázy 1. a 4. třídy a *phaB*, proto pravděpodobně tvoří PHA z glukózy. U kmene *Pantoea agglomerans* D28b byly též objeveny geny PHA syntázy 1. a 4. třídy, ale už ne žádný jiný. Proto je kmen *Pantoea agglomerans* D28b pravděpodobně schopný vytvářet PHA jinou cestou, která nebyla zahrnuta do screeningu. Schopnost produkovat PHA u rodu *Pantoea* potvrdili i Gasser, Müller a Berg (2009).

### 8.2.13 Rod *Pseudomonas*

Z rodu *Pseudomonas* bylo otestováno celkem 21 kmenů a byla u tohoto rodu potvrzena přítomnost všech sledovaných genů alespoň u některých z nich. Pravděpodobně díky tomu rod *Pseudomonas* dokáže vytvářet různé typy PHA z různých substrátů. Schopnost využívat rozmanité substráty byla u rodu *Pseudomonas* potvrzena řadou studií a díky tomu se tento rod řadí mezi atraktivní producenty PHA (Pereira *et al.*, 2019; Naveen *et al.*, 2015). Syntáza PHA 2. třídy, která byla u řady kmenů z tohoto rodu potvrzena, je typická pro rod *Pseudomonas* a díky ní dokáže tento rod vytvářet mcl PHA (Mozejko-Ciesielska, Szacherska a Marciniak, 2019).

U kmenu *Pseudomonas mendocina* CCM 3590 byla prokázána přítomnost genu PHA syntázy 2. třídy a *fabG*, proto tento kmen pravděpodobně vytváří mcl PHA ze souvisejících zdrojů pomocí  $\beta$ -oxidace (cesta C v Obr. 2). Schopnost produkce PHA u *Pseudomonas mendocina* potvrdila výzkumná skupina Rai *et al.* (2011b), kteří pomocí *Pseudomonas mendocina* vytvářeli PHO z octanátu sodného.



U kmene *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 byla též prokázána přítomnost genu PHA syntázy 2. třídy a genu *phaJ*. Lze tedy předpokládat tvorbu mcl PHA (cesta B v Obr. 2). Takovou cestu tvorby potvrzují studie, která u *Pseudomonas aeruginosa* prokázala schopnost vytvářet mcl PHA z technické kyseliny olejové, mastných kyselin, ale i z odpadních olejů a sacharidů (Fernández *et al.*, 2005; Hoffmann a Rehm, 2004).

Dále byly otestovány dva kmeny stejného druhu *Pseudomonas koreensis* D16 a D28. Kmen *Pseudomonas koreensis* D16 má ve svém genomu gen pro PHA syntázu 1. třídy a *phaJ*, proto pravděpodobně dokáže vytvářet scl PHA ze souvisejících zdrojů (cesta B v Obr. 2). Gen *phaJ* byl prokázán i u druhého kmenu *Pseudomonas koreensis* D28, ovšem u tohoto kmene nebyl nalezen gen PHA syntázy 1. třídy. *Pseudomonas koreensis* D28 prokázala přítomnost PHA syntázy 3. třídy a genu *phaA*, proto patrně dokáže vytvářet PHA z glukózy i ze souvisejících zdrojů.

Další testovaný kmen *Pseudomonas oryzihabitans* D37, prokázal pouze přítomnost *phaB*. Z druhu *Pseudomonas putida* byly otestovány dva kmeny D68 a D146 a u obou byla prokázána přítomnost genu *fabG*. Kmen *Pseudomonas putida* D68 navíc obsahoval gen *phaG*, ale žádnou z PHA syntáz. U kmenu *Pseudomonas putida* D146 byla prokázána i přítomnost genu PHA syntázy 3. třídy, proto nejspíš dokáže produkovat PHA pomocí  $\beta$ -oxidace ze souvisejících zdrojů (cesta C v Obr. 2). Obecně se *Pseudomonas putida* považuje za přirozeného producenta mcl PHA (de Eugenio *et al.*, 2010). Tento druh je geneticky a metabolicky rozmanitý, díky čemuž je schopný produkovat mcl PHA z různých zdrojů uhlíku, jako jsou mastné kyseliny pomocí  $\beta$ -oxidace, nebo z cukrů a aromatických sloučenin pomocí biosyntézy disociované kyseliny. To bylo našem případě prokázáno přítomností genu *phaG* i *fabG*, a také popsáno ve studiích autorů Nickel a de Lorenzo (2014) a Prieto *et al.* (2016). Ovšem pro produkci mcl PHA nebyl prokázán gen PHA syntázy 2. třídy u testovaných kmenů. Což lze vysvětlit tím, že přítomnost PHA syntázy 2. třídy je kmenově závislá.

Schopnost produkce PHA byla prokázána i u *Pseudomonas fragi* D93 pomocí PHA syntázy 4. třídy a u *Pseudomonas corrugata* D100 pomocí PHA syntázy 1. třídy. Naopak u kmenu *Pseudomonas antarctica* D102 nebyla prokázána přítomnost žádného ze sledovaných genů. U *Pseudomonas marginalis* D124 byla prokázána přítomnost řady genů (PHA syntázy 1., 2. a 3. třídy, *phaA* a *fabG*). Díky tomu by *Pseudomonas marginalis* D124 mohla být schopna vytvářet scl i mcl PHA, a dokonce i jejich vzájemné kopolymery (scl-mcl PHA) z glukózy i ze souvisejících zdrojů. U kmenů *Pseudomonas gessardii* D180, *Pseudomonas frederiksbergensis* D183, *Pseudomonas veronii* D186 a *Pseudomonas libanensis* D238

nebyla prokázána přítomnost ani jedné z PHA syntáz, ale pouze přítomnost ostatních genů zapojených do drah tvorby PHA. Gen *phaA* byl nalezen u *Pseudomonas frederiksbergensis* D183 a *Pseudomonas libanensis* D238, gen *phaB* u *Pseudomonas veronii* D186 a gen *fabG* byl nalezen u *Pseudomonas gessardii* D180. Z druhu *Pseudomonas frederiksbergensis* byl otestován ještě jeden kmen *Pseudomonas frederiksbergensis* D237, u kterého byla prokázána přítomnost PHA syntázy 2. a 4. třídy, *phaB* a *phaJ*. Díky přítomnosti těchto genů je *Pseudomonas frederiksbergensis* D237 nejspíš schopna vytvářet scl i mcl PHA a jejich vzájemné kopolymery z glukózy i ze souvisejících zdrojů (cesta B v Obr. 2). U kmene *Pseudomonas extremorientalis* D214 byla objevena přítomnost PHA syntázy 1. a 3. třídy, *phaA*, *phaG* a *phaJ*, proto je tento kmen pravděpodobně schopen vytvářet PHA ze souvisejících zdrojů pomocí  $\beta$ -oxidace (cesta B v Obr. 2), z glukózy i pomocí biosyntézy disociované kyseliny (cesta D v Obr. 4). U kmenu *Pseudomonas chlororaphis* D220 byla prokázána přítomnost genu PHA syntázy 1. třídy a *phaB*, proto nejspíš dokáže produkovat scl PHA z glukózy. Kmen *Pseudomonas tolaasii* D228 též pravděpodobně produkuje scl PHA z glukózy, jelikož byly u něj nalezeny geny PHA syntázy 1. třídy a *phaA*. U kmene *Pseudomonas rhodesiae* D233 byla prokázána přítomnost genu PHA syntázy 1. a 2. třídy, *phaA* a *phaG*, díky tomu má tento kmen potenciál vytvářet scl, mcl i scl-mcl PHA z glukózy i pomocí biosyntézy disociované kyseliny. Posledním otestovaným kmenem z rodu *Pseudomonas* byl kmen *Pseudomonas fluorescens* D239, u kterého byla detekována přítomnost genu PHA syntázy 1. a 4. třídy, *fabG* a *phaB*. Díky těmto genům je pravděpodobně schopný syntetizovat scl PHA z glukózy i ze souvisejících zdrojů (cesta C v Obr. 2). Tyto výsledky se shodují s výzkumem Lim, Rhie a Kim (2018), ve kterém u *Pseudomonas fluorescens* KLR101 prokázali schopnost produkovat scl PHA z cukrů a mastných kyselin a též prokázaly gen PHA syntázy 1. třídy.

#### 8.2.14 Rod *Rahnella*

Z rodu *Rahnella* byl otestován jeden kmen *Rahnella aquatilis* D218, u kterého byla potvrzena pouze přítomnost genu *phaG*. Je tedy možné, že tento kmen využívá gen *phaG* k jiným účelům než na tvorbu PHA. Případně může obsahovat PHA syntázu s jinou než detekovanou sekvencí. Přestože v této práci nebyla potvrzena schopnost produkce PHA u tohoto rodu, Kumar *et al.* (2018) dokázali zástupcem tohoto rodu vyprodukovat P3HB z glukózy.

### 8.2.15 Rod *Staphylococcus*

Z rodu *Staphylococcus* byl do screeningu zahrnut pouze jeden *Staphylococcus* sp. D111, u něhož byla prokázána přítomnost genu PHA syntázy 1. třídy a *phaJ*. Tudíž pravděpodobně dokáže vytvářet scl PHA ze souvisejících zdrojů pomocí  $\beta$ -oxidace (cesta B v Obr. 2). U zástupce stejného rodu *Staphylococcus epidermis* byla prokázána schopnost produkce PHB ze sladu, odpadu ze sóji, mléka, octu a sezamového oleje (Wong *et al.*, 2004, 2005). Schopnost využívat olej za výroby PHB (scl PHA) koresponduje s detekovanými geny v tomto rodu.

### 8.2.16 Rod *Stenotrophomonas*

Posledním testovaným rodem byl *Stenotrophomonas*. U kmene *Stenotrophomonas maltophilia* GK CIP 5/1 byla prokázána pouze přítomnost genu PHA syntázy 3. třídy. Je možné, že tento kmen dokáže vytvářet scl PHA, ovšem pravděpodobně odlišnou cestou, než byly sledovány v této práci. Dalším kmenem z tohoto rodu byl *Stenotrophomonas* sp. D221, u kterého byla prokázána přítomnost genu PHA syntázy 1. a 4. třídy, *phaB* a *phaJ*. Díky kombinaci těchto genů pravděpodobně *Stenotrophomonas* sp. D221 dokáže vytvářet scl PHA z podobných zdrojů pomocí  $\beta$ -oxidace i z glukózy. Schopnost produkce z glukózy potvrdili Iqbal, Khan a Jamil (2016), kterým se podařilo vyprodukovat PHB také z bramborového škrobu.

## ZÁVĚR

Řada mikroorganismů dokáže přirozeně produkovat PHA. PHA jsou polymery, které díky své biodegradovatelnosti a biokompatibilitě mají široké využití především jako jednorázový plast a biomateriál. Bohužel výroba PHA je stále drahá a složitá. Ovšem díky pochopení biosyntézy PHA a nalezení nových producentů, může dojít ke snížení ceny PHA, zoptimalizování produkce PHA i nalezení nových typů PHA.

V této práci byla navržena a zoptimalizována rychlá a jednoduchá metoda pro detekci 9 genů, které jsou zapojeny do produkce PHA. Hledanými geny v této metodě jsou všechny čtyři třídy PHA syntáz (kódovány geny *phaC*, *phaE*, *phaR*), které katalyzují polymeraci. Dále jsou detekovány klíčové geny kódující enzymy podílející se na tvorbě PHA ze sacharidů a mastných kyselin (*phaA*, *phaB*, *phaJ*, *phaG*, *fabG*). Pomocí této metody lze nalézt vhodné producenty pro výrobu PHA, a dokonce určit jaký substrát pro výrobu PHA preferují, jakou cestou a jaký typ PHA produkují. Což přináší cenné poznatky pro výzkum i průmysl.

Výslednou vhodnou metodou bylo vytvoření tří skupin primerů v multiplexu PCR, tj. čtveřice PHA syntáz (*phaSyn1* + *phaSyn2b* + *phaSyn3* + *phaSyn4*), trojice primerů (*phaB1* + *phaJ* + *phaG3*) a dvojice (*fabG* + *phaA*) a nalezení vhodné teploty annealingu 65 °C. Tato metoda může sloužit k rychlému screeningu genů dalších možných producentů PHA.

Následně byl touto metodou proveden screening genů podílejících se na tvorbě PHA u celkem 77 mikrobiálních kmenů zahrnujících 16 různých mikrobiálních rodů (*Acinetobacter*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Cupriavidus*, *Escherichia*, *Guehomyces*, *Klebsiella*, *Kosakonia*, *Lelliottia*, *Lysinibacillus*, *Oceanobacillus*, *Pantotea*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Staphylococcus* a *Stenotrophomonas*). U většiny z těchto mikroorganismů byla potvrzena přítomnost, alespoň jednoho z nich. Pouze u 10 kmenů (tj. *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *amyloliquefaciens* D11, *Lysinibacillus xylanilyticus* D23, *Bacillus megaterium* D32, *Oceanobacillus caeni* D61, *Citrobacter braakii* D69, *Pseudomonas antarctica* D102, *Bacillus* sp. D116, *Klebsiella oxytoca* D212, *Guehomyces pullulans* D234 a *Escherichia coli* F77) nebyla potvrzena žádná přítomnost sledovaných genů. Přítomnost klíčové PHA syntázy byla potvrzena u 47 kmenů.

Tato metoda zkoumá pouze genetickou vybavenost mikroorganismů, a proto by bylo vhodné po rychlém počátečním screeningu genů provést ještě fenotypové testy u vytipovaných producentů.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

ALDOR, I. S. *et al.*, 2002. Metabolic Engineering of a Novel Propionate-Independent Pathway for the Production of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) in Recombinant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **68**(8), 3848–3854 [cit. 2021-04-03]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.68.8.3848-3854.2002

ALPER, R. *et al.*, 1963. *Biopolymers 1*.

ANDERSON, A. J. a E. A. DAWES, 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol Rev* [online]. **54**(4), 450–472 [cit. 2019-11-15]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC372789/>

BASSAS GALIÀ, M., 2010. Isolation and Analysis of Storage Compounds. TIMMIS, Kenneth N., ed. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, s. 3725–3741 [cit. 2021-04-12]. ISBN 978-3-540-77584-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-540-77587-4\_292

BHATTACHARYYA, A. *et al.*, 2012. Utilization of vinasse for production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. *AMB Express* [online]. **2**(1), 1–10 [cit. 2021-03-20]. ISSN 2191-0855. Dostupné z: doi:10.1186/2191-0855-2-34

BIERNACKI, M. *et al.*, 2017. Enhancement of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) accumulation in *Arxula adenivorans* by stabilization of production. *Microbial Cell Factories* [online]. **16**(1) [cit. 2021-4-28]. ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/s12934-017-0751-4

*Biotechnologie Hydal* [online], c2019. Praha: Nafigate [cit. 2019-11-13]. Dostupné z: <https://www.nafigate.com/cs/biotechnologie-hydal>

BOURQUE, D., Y. POMERLEAU a D. GROLEAU, 1995. High-cell-density production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) from methanol by *Methylobacterium extorquens*: production of high-molecular-mass PHB. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **44**(3–4), 367–376 [cit. 2021-03-07]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/BF00169931

BRESAN, S. *et al.*, 2016. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids. *Scientific Reports* [online]. **6**(1) [cit. 2021-04-04]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep26612

- BRIGHAM, C. J. a A. J. SINSKEY, 2012. Applications of Polyhydroxyalkanoates in the Medical Industry. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries* [online]. **2012**(1), 53–60 [cit. 2021-03-06]. ISSN 1927-3037/12. Dostupné z: doi:10.6000/1927-3037.2012.01.01.03
- BUCCI, D.Z., L.B.B. TAVARES a I. SELL, 2005. PHB packaging for the storage of food products. *Polymer Testing* [online]. **24**(5), 564–571 [cit. 2019-11-13]. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2005.02.008. ISSN 01429418. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142941805000334>
- BUGNICOURT, E. *et al.*, 2014. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters* [online]. **8**(11), 791–808 [cit. 2019-11-14]. DOI: 10.3144/expresspolymlett.2014.82. ISSN 1788618X. Dostupné z: <http://www.expresspolymlett.com/letolt.php?file=EPL-0005219&mi=c>
- BURDON, K. L., 1946. Fatty Material in Bacteria and Fungi Revealed by Staining Dried, Fixed Slide Preparations 1. *Journal of Bacteriology* [online]. **52**(6), 665–678 [cit. 2021-04-13]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.52.6.665-678.1946
- CRESPY, D., M. BOZONNET a M. MEIER, 2008. 100 Years of Bakelite, the Material of a 1000 Uses. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. **47**(18), 3322–3328 [cit. 2019-11-13]. DOI: 10.1002/anie.200704281. ISSN 14337851. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.200704281>
- CYRAS, V. P. *et al.*, 2007. Biodegradable double-layer films based on biological resources: Polyhydroxybutyrate and cellulose. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. **106**(2), 749–756 [cit. 2021-02-27]. ISSN 00218995. Dostupné z: doi:10.1002/app.26663
- CYRAS, V. P., C. Ma. SOLEDAD a V. ANALÍA, 2009. Biocomposites based on renewable resource: Acetylated and non acetylated cellulose cardboard coated with polyhydroxybutyrate. *Polymer* [online]. **50**(26), 6274–6280 [cit. 2021-02-27]. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2009.10.065
- DANSON, M. J. a D. W. HOUGH, 1997. The Structural Basis of Protein Halophilicity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* [online]. **117**(3), 307–312 [cit. 2021-03-20]. ISSN 03009629. Dostupné z: doi:10.1016/S0300-9629(96)00268-X
- DE EUGENIO, L. I. *et al.*, 2010. The turnover of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* KT2442 and the fundamental role of PhaZ

- depolymerase for the metabolic balance. *Environmental Microbiology* [online]. **12**(1), 207–221 [cit. 2021-4-28]. ISSN 14622912. Dostupné z: doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02061.x
- DENG, Y. *et al.*, 2003. Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) promoted production of extracellular matrix of articular cartilage chondrocytes in vitro. *Biomaterials* [online]. **24**(23), 4273–4281 [cit. 2021-03-06]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9612(03)00367-3
- DHALIWAL, A., 2013. DNA Extraction and Purification. *Materials and Methods* [online]. **3**(2013), 191 [cit. 2021-04-12]. ISSN 2329-5139. Dostupné z: doi:10.13070/mm.en.3.191
- EDILANE, M. F. *et al.*, 2016. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by *Lysinibacillus* sp. strain UEA-20.171. *African Journal of Biotechnology* [online]. **15**(34), 1827–1834 [cit. 2021-4-28]. ISSN 1684-5315. Dostupné z: doi:10.5897/AJB2016.15329
- ELSAYED, N. S. *et al.*, 2016. Cost-effective production of the bio-plastic poly-beta-hydroxybutyrate using *Acinetobacter baumannii* isolate P39. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* [online]. **05**(06), 552–556 [cit. 2021-4-26]. ISSN 13385178. Dostupné z: doi:10.15414/jmbfs.2016.5.6.552-556
- ENZOKLOP, 2020. Schematic mechanism of PCR. In: *Wikipedia* [online obrázek]. [cit. 2021-04-21]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase\\_chain\\_reaction#/media/File:Polymerase\\_chain\\_reaction-en.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction#/media/File:Polymerase_chain_reaction-en.svg)
- FARRELL, R. E., 2017. RT-PCR. *RNA Methodologies* [online]. 5th. United States: Elsevier, s. 209–281 [cit. 2021-04-12]. ISBN 9780128046784. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-804678-4.00008-7
- FAVARO, L., M. BASAGLIA a S. CASELLA, 2019. Improving polyhydroxyalkanoate production from inexpensive carbon sources by genetic approaches: a review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* [online]. **13**(1), 208–227 [cit. 2021-4-28]. ISSN 1932104X. Dostupné z: doi:10.1002/bbb.1944
- FERNÁNDEZ, D. *et al.*, 2005. Agro-industrial oily wastes as substrates for PHA production by the new strain *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 40045: Effect of culture conditions. *Biochemical Engineering Journal* [online]. **26**(2–3), 159–167 [cit. 2021-4-28]. ISSN 1369703X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2005.04.022
- FERREIRA, A. M. *et al.*, 2016. Polyhydroxyalkanoates-accumulating bacteria isolated from activated sludge acclimatized to hardwood sulphite spent liquor. *Annals of*



*Microbiology* [online]. **66**(2), 833–842 [cit. 2021-4-28]. ISSN 1590-4261. Dostupné z: doi:10.1007/s13213-015-1169-z

FLICKINGER, M. C. a S. W. DREW, 1999. *Encyclopedia of Bioprocess Technology – Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation, Volumes 1-5*. USA: John Wiley, s. 2024–2133. ISBN 1-59124-457-9.

FUKUI, T. a Y. DOI, 1998. Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **49**(3), 333–336 [cit. 2021-03-07]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s002530051178

FUKUI, T. *et al.*, 1999. Co-expression of polyhydroxyalkanoate synthase and ( R )-enoyl-CoA hydratase genes of *Aeromonas caviae* establishes copolyester biosynthesis pathway in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **170**(1), 69–75 [cit. 2021-04-02]. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb13356.x

GAO, X. *et al.*, 2011. Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. **22**(6), 768–774 [cit. 2021-02-21]. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2011.06.005

GARIBYAN, L. a N. AVASHIA, 2013. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *Journal of Investigative Dermatology* [online]. **133**(3), 1–4 [cit. 2021-04-12]. ISSN 0022202X. Dostupné z: doi:10.1038/jid.2013.1

GASSER, I., H. MÜLLER a G. BERG, 2009. Ecology and characterization of polyhydroxyalkanoate-producing microorganisms on and in plants. *FEMS Microbiology Ecology* [online]. **70**(1), 142–150 [cit. 2021-4-28]. ISSN 01686496. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00734.x

GODBOLE, S., 2016. Methods for identification, quantification and characterization of polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Bioassays* [online]. **5**(04), 4977–4983 [cit. 2021-04-12]. ISSN 2278-778X. Dostupné z: doi:10.21746/ijbio.2016.04.005

GOMEZ, J. G. C. *et al.*, 1996. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **45**(6), 785–791 [cit. 2021-03-07]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s002530050763

GRAGE, K. *et al.*, 2009. Bacterial Polyhydroxyalkanoate Granules: Biogenesis, Structure, and Potential Use as Nano-/Micro-Beads in Biotechnological and Biomedical

Applications. *Biomacromolecules* [online]. **10**(4), 660–669 [cit. 2021-03-06]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm801394s

GRIEBEL, R. J. a J. M. MERRICK, 1971. Metabolism of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate: Effect of Mild Alkaline Extraction on Native Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate Granules. *Journal of Bacteriology* [online]. **108**(2), 782–789 [cit. 2021-04-04]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.108.2.782-789.1971

GRIEBEL, R., Z. SMITH a J. M. MERRICK, 2002. Metabolism of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate). I. Purification, composition, and properties of native poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) granules from *Bacillus megaterium*. *Biochemistry* [online]. **7**(10), 3676–3681 [cit. 2021-04-04]. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi00850a047

GROSS, R. A. *et al.*, 1989. The biosynthesis and characterization of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas oleovorans*. *Macromolecules* [online]. **22**(3), 1106–1115 [cit. 2021-03-07]. ISSN 0024-9297. Dostupné z: doi:10.1021/ma00193a018

GROTHER, E., M. MOO-YOUNG a Y. CHISTI, 1999. Fermentation optimization for the production of poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. **25**(1–2), 132–141 [cit. 2021-03-07]. ISSN 01410229. Dostupné z: doi:10.1016/S0141-0229(99)00023-X

GRUBELNIK, Andreas *et al.*, 2008. A simple HPLC-MS method for the quantitative determination of the composition of bacterial medium chain-length polyhydroxyalkanoates. *Journal of Separation Science* [online]. **31**(10), 1739–1744 [cit. 2021-04-12]. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.200800033

GUPTA, N., 2019. DNA extraction and polymerase chain reaction. *Journal of Cytology* [online]. **36**(2), 116–117 [cit. 2021-04-12]. ISSN 0970-9371. Dostupné z: doi:10.4103/JOC.JOC\_110\_18

HAN, J. *et al.*, 2010. Wide Distribution among Halophilic Archaea of a Novel Polyhydroxyalkanoate Synthase Subtype with Homology to Bacterial Type III Synthases. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **76**(23), 7811–7819 [cit. 2019-11-15]. DOI: 10.1128/AEM.01117-10. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.01117-10>

HARDJASA, A., M. LING a K. MA, 2010. Investigating the Effects of DMSO on PCR Fidelity Using a Restriction Digest-Based Method. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)* [online]. **14**, 161–164 [cit. 2021-4-24]. Dostupné z:

[https://microbiology.ubc.ca/sites/default/files/roles/drupal\\_ungrad/JEMI/14/JEMI14\\_161-164.pdf](https://microbiology.ubc.ca/sites/default/files/roles/drupal_ungrad/JEMI/14/JEMI14_161-164.pdf)

HEIN, S. *et al.*, 1997. Biosynthesis of poly(4-hydroxybutyric acid) by recombinant strains of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **153**(2), 411–418 [cit. 2021-04-03]. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.1997.tb12604.x

HERMANN-KRAUSS, C. *et al.*, 2013. Archaeal Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Co- and Terpolyesters from Biodiesel Industry-Derived By-Products. *Archaea* [online]. **2013**, 1–10 [cit. 2021-03-20]. ISSN 1472-3646. Dostupné z: doi:10.1155/2013/129268

HESSELMANN, R. P. X. *et al.*, 1999. Determination of polyhydroxyalkanoates in activated sludge by ion chromatographic and enzymatic methods. *Journal of Microbiological Methods* [online]. **35**(2), 111–119 [cit. 2021-04-12]. ISSN 01677012. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-7012(98)00107-9

HEZAYEN, F. F., A. STEINBÜCHEL a B. H. A. REHM, 2002. Biochemical and enzymological properties of the polyhydroxybutyrate synthase from the extremely halophilic archaeon strain 56. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. **403**(2), 284–291 [cit. 2021-04-04]. ISSN 00039861. Dostupné z: doi:10.1016/S0003-9861(02)00234-5

HOFFMANN, N. a B. H. A. REHM, 2004. Regulation of polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **237**(1), 1–7 [cit. 2021-4-28]. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1016/j.femsle.2004.06.029

HOLMES, P. A., 1985. Applications of PHB - a microbially produced biodegradable thermoplastic. *Physics in Technology* [online]. **16**(1), 32–36 [cit. 2021-04-03]. ISSN 0305-4624. Dostupné z: doi:10.1088/0305-4624/16/1/305

HONG, K. *et al.*, 1999. A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **51**(4), 523–526 [cit. 2021-04-12]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s002530051427

CHAKRABARTI, R. a C. E. SCHUTT, 2001. The enhancement of PCR amplification by low molecular-weight sulfones. *Gene* [online]. **274**(1–2), 293–298 [cit. 2021-4-24]. ISSN 03781119. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-1119(01)00621-7

CHEE, J.-Y. *et al.*, 2010. Isolation and Characterization of a *Burkholderia* sp. USM (JCM15050) Capable of Producing Polyhydroxyalkanoate (PHA) from Triglycerides, Fatty

Acids and Glycerols. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. **18**(4), 584–592 [cit. 2021-03-07]. ISSN 1566-2543. Dostupné z: doi:10.1007/s10924-010-0204-1

CHEK, M. F. *et al.*, 2017. Structure of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase PhaC from *Chromobacterium* sp. USM2, producing biodegradable plastics. *Scientific Reports* [online]. **7**(1), 1–15 [cit. 2021-04-03]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-05509-4

CHEN, G. –Q., 2011. Biofunctionalization of Polymers and Their Applications. NYANHONGO, G. S., W. STEINER a G. GÜBITZ, ed. *Biofunctionalization of Polymers and their Applications* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, s. 29–45 [cit. 2019-11-13]. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. DOI: 10.1007/10\_2010\_89. ISBN 978-3-642-21948-1. Dostupné z: [http://link.springer.com/10.1007/10\\_2010\\_89](http://link.springer.com/10.1007/10_2010_89)

CHEN, G.–Q. a Q. WU, 2005. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* [online]. **26**(33), 6565–6578 [cit. 2021-03-06]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2005.04.036

CHEN, G.–Q., 2009. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society Reviews* [online]. **38**(8) [cit. 2021-02-21]. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/b812677c

CHEN, G.–Q., 2010a. Industrial Production of PHA. CHEN, G. –Q., ed. *Plastics from Bacteria* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, s. 121–132 [cit. 2019-11-15]. Microbiology Monographs. DOI: 10.1007/978-3-642-03287-5\_6. ISBN 978-3-642-03286-8. Dostupné z: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-03287-5\\_6](http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-03287-5_6)

CHEN, G.–Q., 2010b. Plastics Completely Synthesized by Bacteria: Polyhydroxyalkanoates. CHEN, G. G.–Q., ed. *Plastics from Bacteria* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, s. 17–37 [cit. 2021-03-06]. Microbiology Monographs. ISBN 978-3-642-03286-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-03287-5\_2

CHOI, W. M. *et al.*, 2003. Preparation and characterization of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)-organoclay nanocomposites. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. **90**(2), 525–529 [cit. 2021-02-25]. ISSN 0021-8995. Dostupné z: doi:10.1002/app.12702

IQBAL, B., N. KHAN a N. JAMIL, 2016. Polyhydroxybutyrate Production by *Stenotrophomonas* and *Exiguobacterium* Using Renewable Carbon Source. *Annual*

*Research & Review in Biology* [online]. **9**(5), 1–9 [cit. 2021-4-28]. ISSN 2347565X. Dostupné z: doi:10.9734/ARRB/2016/23066

ISHII, K. a M. FUKUI, 2001. Optimization of Annealing Temperature To Reduce Bias Caused by a Primer Mismatch in Multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **67**(8), 3753–3755 [cit. 2021-4-24]. ISSN 1098-5336. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.67.8.3753-3755.2001

ISO 10993, 2010. *ISO 10993: Biologické hodnocení zdravotnických prostředků*. 10. Česká republika: Mezinárodní organizace pro standardizaci.

*ISO 472:2013: Plastics — Vocabulary*, 2013. 4th ed. Switzerland: International Organization for Standardization.

JENDROSSEK, D., 2005. Fluorescence Microscopical Investigation of Poly(3-hydroxybutyrate) Granule Formation in Bacteria. *Biomacromolecules* [online]. **6**(2), 598–603 [cit. 2021-04-04]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm049441r

JENDROSSEK, D., 2009. Polyhydroxyalkanoate Granules Are Complex Subcellular Organelles (Carbonosomes). *Journal of Bacteriology* [online]. **191**(10), 3195–3202 [cit. 2021-04-04]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.01723-08

JUNG, Y.–M. a Y.–H. LEE, 2000. Utilization of oxidative pressure for enhanced production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and poly(3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) in *Ralstonia eutropha*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. **90**(3), 266–270 [cit. 2021-03-20]. ISSN 13891723. Dostupné z: doi:10.1016/S1389-1723(00)80080-8

JURASEK, L. a R. H. MARCHESSAULT, 2004. Polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* cells: a computer simulation. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **64**(5), 611–617 [cit. 2021-04-04]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-003-1551-9

KADOURI, D. *et al.*, 2005. Ecological and Agricultural Significance of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Critical Reviews in Microbiology* [online]. **31**(2), 55–67 [cit. 2019-11-15]. DOI: 10.1080/10408410590899228. ISSN 1040-841X. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408410590899228>

KARR, D. B., J. K. WATERS a D. W. EMERICH, 1983. Analysis of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* Bacteroids by Ion-Exclusion High-Pressure Liquid Chromatography and UV Detection. *Appl Environ Microbiol* [online]. **46**(6), 1339–1344 [cit. 2019-11-15]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC239573/>

- KHANNA, S. a A. K. SRIVASTAVA, 2005. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry* [online]. **40**(2), 607–619 [cit. 2021-02-25]. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2004.01.053
- KLINKE, S. *et al.*, 1999. Production of Medium-Chain-Length Poly(3-Hydroxyalkanoates) from Gluconate by Recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **65**(2), 540–548 [cit. 2021-04-03]. ISSN 1098-5336. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.65.2.540-548.1999
- KOLLER, M. *et al.*, 2008. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biosynthesis from Whey Lactose. *Macromolecular Symposia* [online]. **272**(1), 87–92 [cit. 2021-03-20]. ISSN 10221360. Dostupné z: doi:10.1002/masy.200851212
- KOLLER, M. *et al.*, 2010. Microbial PHA Production from Waste Raw Materials. CHEN, G.-Q., ed. *Plastics from Bacteria* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, s. 85–119 [cit. 2019-11-15]. Microbiology Monographs. DOI: 10.1007/978-3-642-03287-5\_5. ISBN 978-3-642-03286-8. Dostupné z: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-03287-5\\_5](http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-03287-5_5)
- KOLLER, M., 2014. Poly(hydroxyalkanoates) for Food Packaging: Application and Attempts towards Implementation. *Applied Food Biotechnology*. **1**(1), 3–15. ISSN 2345-5357. Dostupné z: doi:10.22037/afb.v1i1.7127
- KOSIOR, E., R. MESSIAS a P. FOWLER, 2006. *Lightweight compostable packaging: Literature review*. Banbury: The Waste and Resources Action Programme.
- KUMAR, A. *et al.*, 2015. Commercialization of Bacterial Cell Factories for the Sustainable Production of Polyhydroxyalkanoate Thermoplastics: Progress and Prospects. *Recent Patents on Biotechnology* [online]. **9**(1), 4–21 [cit. 2019-11-14]. DOI: 10.2174/2211550104666150615211414. ISSN 18722083. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1872-2083&volume=9&issue=1&spage=>
- KUMAR, V. *et al.*, 2018. Bioplastic reservoir of diverse bacterial communities revealed along altitude gradient of Pangi-Chamba trans-Himalayan region. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **365**(14) [cit. 2021-4-28]. ISSN 1574-6968. Dostupné z: doi:10.1093/femsle/fny144
- KUNASUNDARI, B. a K. SUDESH, 2011. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Express Polymer Letters* [online]. **5**(7), 620–634 [cit. 2019-11-15].

DOI: 10.3144/expresspolymlett.2011.60. ISSN 1788618X. Dostupné z: <http://www.expresspolymlett.com/letolt.php?file=EPL-0002230&mi=c>

KUUSIPALO, J., 2000a. PHB/V in Extrusion Coating of Paper and Paperboard: Part I: Study of Functional Properties. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. **8**(1), 39–47 [cit. 2021-02-27]. ISSN 15662543. Dostupné z: doi:10.1023/A:1010124205584

KUUSIPALO, J., 2000b. PHB/V in Extrusion Coating of Paper and Paperboard—Study of Functional Properties. Part II. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. **8**(2), 49–57 [cit. 2021-02-27]. ISSN 15662543. Dostupné z: doi:10.1023/A:1011565519440

LEE, E. Y. *et al.*, 1995. Biosynthesis of copolyesters consisting of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from 1,3-butanediol or from 3-hydroxybutyrate by *Pseudomonas* sp. A33. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **42**(6), 901–909 [cit. 2021-03-07]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/BF00191189

LEE, S. Y., 1996. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*. **49**, 1–14. ISSN 0006-3592.

LEMOIGNE, M., 1926. Produits de déshydratation et de polymérisation de l'acide  $\beta$ -oxybutyrique. *Bulletin de la Société de Chimie Biologique*. **8**, 770–782. ISSN 0037-9042.

LENZ, R. W. a R. H. MARCHESSAULT, 2005. Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology. *Biomacromolecules* [online]. **6**(1), 1–8 [cit. 2021-04-03]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm049700c

LIM, J. H., H.-G. RHIE a J. N. KIM, 2018. Identification and Analysis of Putative Polyhydroxyalkanoate Synthase (PhaC) in *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. **28**(7), 1133–1140 [cit. 2021-5-11]. ISSN 1017-7825. Dostupné z: doi:10.4014/jmb.1803.03006

LIU, M. *et al.*, 1998. A Novel Screening Method for Isolating Exopolysaccharide-Deficient Mutants. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **64**(11), 4600–4602 [cit. 2021-04-13]. ISSN 1098-5336. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.64.11.4600-4602.1998

LIU, W. a G.-Q. CHEN, 2007. Production and characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate with high 3-hydroxytetradecanoate monomer content by *fadB* and *fadA* knockout mutant of *Pseudomonas putida* KT2442. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **76**(5), 1153–1159 [cit. 2021-04-02]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-007-1092-8

- LIZARRAGA-VALDERRAMA, L.R. *et al.*, 2016. Biomedical Applications of Polyhydroxyalkanoates. NEVES, N. M. a R. L. REIS, ed. *Biomaterials from Nature for Advanced Devices and Therapies* [online]. Hoboken, New Jersey: John Wiley, s. 337–383 [cit. 2021-02-27]. ISBN 9781119126218. Dostupné z: doi:10.1002/9781119126218.ch20
- LOPES, M. S. G. *et al.*, 2009. Screening of bacteria to produce polyhydroxyalkanoates from xylose. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. **25**(10), 1751–1756 [cit. 2021-4-28]. ISSN 0959-3993. Dostupné z: doi:10.1007/s11274-009-0072-9
- LORENZ, T. C., 2012. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments* [online]. **2012**(63), 3998 [cit. 2021-04-12]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/3998
- LU, J., R. C. TAPPEL a C. T. NOMURA, 2009. Mini-Review: Biosynthesis of Poly(hydroxyalkanoates). *Polymer Reviews* [online]. **49**(3), 226-248 [cit. 2021-04-03]. ISSN 1558-3724. Dostupné z: doi:10.1080/15583720903048243
- MACRAE, R. M. a J. F. WILKINSON, 1958. The influence of cultural conditions on poly- $\beta$ -hydroxybutyrate synthesis in *Bacillus megaterium*. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*. **27**, 73–79. ISSN 0308-2105.
- MÁČALOVÁ, D., 2019. *Antimikrobní vlastnosti biodegradabilních polymerů na biofilm pozitivní mikroorganizmy*. Zlín. Bakalářská práce. Vedoucí práce P. Pleva.
- MADISON, L. L. a G. W. HUISMAN, 1999. Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiol Mol Biol Rev* [online]. **63**(1), 21–53 [cit. 2019-11-15]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98956/>
- MAESTRO, B. a J. M. SANZ, 2017. Polyhydroxyalkanoate-associated phasins as phylogenetically heterogeneous, multipurpose proteins. *Microbial Biotechnology* [online]. **10**(6), 1323–1337 [cit. 2021-04-20]. ISSN 1751-7915. Dostupné z: doi:10.1111/1751-7915.12718
- MARMIROLI, N. a E. MAESTRI, 2007. Polymerase chain reaction (PCR). *Food Toxicants Analysis* [online]. Burjassot: Elsevier, s. 147–187 [cit. 2021-04-12]. ISBN 9780444528438. Dostupné z: doi:10.1016/B978-044452843-8/50007-9
- MCCOOL, G. J. a M. C. CANNON, 1999. Polyhydroxyalkanoate Inclusion Body-Associated Proteins and Coding Region in *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology* [online]. **181**(2), 585–592 [cit. 2021-4-27]. ISSN 1098-5530. Dostupné z: doi:10.1128/JB.181.2.585-592.1999



- MISAKI, A., I. AZUMA a Y. YAMAMURA, 1977. Structural and Immunochemical Studies on D-Arabino-D-Mannans and D-Mannans of Mycobacterium tuberculosis and Other Mycobacterium Species1. *The Journal of Biochemistry* [online]. **82**(6), 1759–1770 [cit. 2021-03-07]. ISSN 1756-2651. Dostupné z: doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a131874
- MISHRA, M., 2019. *Encyclopedia of Polymer Applications, 3 Volume Set*. USA: CRC Press. ISBN 9781498729932.
- MOHANDAS, S. P. *et al.*, 2018. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoate from marine *Bacillus cereus* MCCB 281 utilizing glycerol as carbon source. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. **119**, 380–392 [cit. 2021-4-27]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.07.044
- MOHANNA, P.–N., G. TERENGIHI a M. WIBERG, 2009. Composite PHB-GGF conduit for long nerve gap repair: A long-term evaluation. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery* [online]. **39**(3), 129–137 [cit. 2021-03-06]. ISSN 0284-4311. Dostupné z: doi:10.1080/02844310510006295
- MONTENEGRO, E. *et al.*, 2017. Molecular Diagnostic for Prospecting Polyhydroxyalkanoate-Producing Bacteria. *Bioengineering* [online]. **4**(2), 155–164 [cit. 2021-4-24]. ISSN 2306-5354. Dostupné z: doi:10.3390/bioengineering4020052
- MORADALI, M. Fata a Bernd H. A. REHM, 2020. Bacterial biopolymers: from pathogenesis to advanced materials. *Nature Reviews Microbiology* [online]. **18**(4), 195–210 [cit. 2021-4-27]. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/s41579-019-0313-3
- MOZEJKO-CIESIELSKA, J., K. SZACHERSKA a P. MARCINIAK, 2019. Pseudomonas Species as Producers of Eco-friendly Polyhydroxyalkanoates. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. **27**(6), 1151–1166 [cit. 2021-4-28]. ISSN 1566-2543. Dostupné z: doi:10.1007/s10924-019-01422-1
- MULLIS, K. B., 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American* [online]. **262**(4), 56–65 [cit. 2021-04-12]. ISSN 0036-8733. Dostupné z: doi:10.1038/scientificamerican0490-56
- NAVEEN, S. V. *et al.*, 2015. Unmodified medium chain length polyhydroxyalkanoate (uMCL-PHA) as a thin film for tissue engineering application – characterization and in vitro biocompatibility. *Materials Letters* [online]. **141**, 55–58 [cit. 2021-4-28]. ISSN 0167577X. Dostupné z: doi:10.1016/j.matlet.2014.10.144

- NIGOU, J., M. GILLERON a G. PUZO, 2003. Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis. *Biochimie* [online]. **85**(1–2), 153–166 [cit. 2021-03-07]. ISSN 03009084. Dostupné z: doi:10.1016/S0300-9084(03)00048-8
- NIKEL, P. I. a V. DE LORENZO, 2014. Robustness of *Pseudomonas putida* KT2440 as a host for ethanol biosynthesis. *New Biotechnology* [online]. **31**(6), 562–571 [cit. 2021-4-28]. ISSN 18716784. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbt.2014.02.006
- NIKODINOVIC, J. *et al.*, 2008. The conversion of BTEX compounds by single and defined mixed cultures to medium-chain-length polyhydroxyalkanoate. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **80**(4), 665–673 [cit. 2021-03-07]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-008-1593-0
- NOMURA, C. T. *et al.*, 2004a. Coexpression of Genetically Engineered 3-Ketoacyl-ACP Synthase III (fabH) and Polyhydroxyalkanoate Synthase (phaC) Genes Leads to Short-Chain-Length-Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate Copolymer Production from Glucose in *Escherichia coli* JM109. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **70**(2), 999–1007 [cit. 2021-04-03]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.70.2.999-1007.2004
- NOMURA, C. T. *et al.*, 2004b. Effective Enhancement of Short-Chain-Length–Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate Copolymer Production by Coexpression of Genetically Engineered 3-Ketoacyl-Acyl-Carrier-Protein Synthase III (fabH) and Polyhydroxyalkanoate Synthesis Genes. *Biomacromolecules* [online]. **5**(4), 1457–1464 [cit. 2021-04-03]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm049959v
- NOMURA, C. T. *et al.*, 2005. Expression of 3-Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Reductase (fabG) Genes Enhances Production of Polyhydroxyalkanoate Copolymer from Glucose in Recombinant *Escherichia coli* JM109. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **71**(8), 4297–4306 [cit. 2021-04-03]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.71.8.4297-4306.2005
- NOMURA, C.T. *et al.*, 2008. FabG Mediates Polyhydroxyalkanoate Production from Both Related and Nonrelated Carbon Sources in Recombinant *Escherichia coli* LS5218. *Biotechnology Progress* [online]. **24**(2), 342–351 [cit. 2021-04-02]. ISSN 8756-7938. Dostupné z: doi:10.1021/bp070303y
- OSTLE, A. G. a J. G. HOLT, 1982. Nile blue A as a fluorescent stain for poly-beta-hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **44**(1), 238–241 [cit. 2021-04-12]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.44.1.238-241.1982

- PANTAZAKI, A. A. *et al.*, 2009. Production of polyhydroxyalkanoates from whey by *Thermus thermophilus* HB8. *Process Biochemistry* [online]. **44**(8), 847–853 [cit. 2021-03-07]. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2009.04.002
- PARK, J. B. a R. S. LAKES, 2007. *Biomaterials: an introduction*. 3rd ed. New York: Springer. ISBN 978-0-38737880-0.
- PARK, S. J. a S. Y. LEE, 2003. Identification and Characterization of a New Enoyl Coenzyme A Hydratase Involved in Biosynthesis of Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates in Recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* [online]. **185**(18), 5391–5397 [cit. 2021-04-02]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.185.18.5391-5397.2003
- PARK, S. J. a S. Y. LEE, 2004. New fadB homologous enzymes and their use in enhanced biosynthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates infadB mutant *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. **86**(6), 681–686 [cit. 2021-04-02]. ISSN 0006-3592. Dostupné z: doi:10.1002/bit.20065
- PARK, S. J., J. P. PARK a S. Y. LEE, 2002. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates rich in specific monomers. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **214**(2), 217–222 [cit. 2021-04-03]. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.2002.tb11350.x
- PATEL, S. K. S. *et al.*, 2012. Exploitation of defined bacterial cultures for production of hydrogen and polyhydroxybutyrate from pea-shells. *Biomass and Bioenergy* [online]. **36**, 218–225 [cit. 2021-4-27]. ISSN 09619534. Dostupné z: doi:10.1016/j.biombioe.2011.10.027
- PATEL, S. K. S., M. SINGH a V. C. KALIA, 2011. Hydrogen and Polyhydroxybutyrate Producing Abilities of *Bacillus* spp. From Glucose in Two Stage System. *Indian Journal of Microbiology* [online]. **51**(4), 418–423 [cit. 2021-4-27]. ISSN 0046-8991. Dostupné z: doi:10.1007/s12088-011-0236-9
- PEREIRA, J. R. *et al.*, 2019. Demonstration of the adhesive properties of the medium-chain-length polyhydroxyalkanoate produced by *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* from glycerol. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. **122**, 1144–1151 [cit. 2021-4-28]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.09.064
- PETERS, V. a B. H. A. REHM, 2005. In vivo monitoring of PHA granule formation using GFP-labeled PHA synthases. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **248**(1), 93–100 [cit. 2021-04-04]. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1016/j.femsle.2005.05.027

- PIEPER-FÜRST, U. *et al.*, 1994. Purification and characterization of a 14-kilodalton protein that is bound to the surface of polyhydroxyalkanoic acid granules in *Rhodococcus ruber*. *Journal of Bacteriology* [online]. **176**(14), 4328–4337 [cit. 2021-04-04]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.176.14.4328-4337.1994
- POBLETE-CASTRO, I. *et al.*, 2012. Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida* and related species. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **93**(6), 2279–2290 [cit. 2021-03-07]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-012-3928-0
- POIRIER, Y., N. ERARD a J. M.D.–C. PETÉTOT, 2001. Synthesis of Polyhydroxyalkanoate in the Peroxisome of *Saccharomyces cerevisiae* by Using Intermediates of Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **67**(11), 5254–5260 [cit. 2021-03-20]. ISSN 1098-5336. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.67.11.5254-5260.2001
- POLI, A. *et al.*, 2011. Synthesis, Production, and Biotechnological Applications of Exopolysaccharides and Polyhydroxyalkanoates by Archaea. *Archaea* [online]. **2011**, 1–13 [cit. 2021-03-20]. ISSN 1472-3646. Dostupné z: doi:10.1155/2011/693253
- Polyhydroxyalkanoate (PHA) Market by Type (Short Chain Length, Medium Chain Length), Production Method (Sugar Fermentation, Vegetable Oil Fermentation, Methane Fermentation), Application, and Region - Global Forecast to 2024, 2019. *Markets and Markets* [online]. USA: MarketsandMarkets [cit. 2020-11-26]. Dostupné z: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/pha-market-395.html>
- PORWAL, S. *et al.*, 2008. Hydrogen and polyhydroxybutyrate producing abilities of microbes from diverse habitats by dark fermentative process. *Bioresource Technology* [online]. **99**(13), 5444–5451 [cit. 2021-4-27]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2007.11.011
- PÖTTER, M. *et al.*, 2002. Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology* [online]. **148**(8), 2413–2426 [cit. 2021-04-04]. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi:10.1099/00221287-148-8-2413
- POVOLO, S. *et al.*, 2010. Polyhydroxyalkanoates production by engineered *Cupriavidus necator* from waste material containing lactose. *Bioresource Technology* [online]. **101**(20), 7902–7907 [cit. 2021-03-20]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2010.05.029
- PRIETO, A. *et al.*, 2016. A holistic view of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology* [online]. **18**(2), 341–357 [cit. 2021-4-28]. ISSN 14622912. Dostupné z: doi:10.1111/1462-2920.12760

- QI, Q., A. STEINBÜCHEL a B. H.A REHM, 1998. Metabolic routing towards polyhydroxyalkanoic acid synthesis in recombinant *Escherichia coli* (fadR): inhibition of fatty acid  $\beta$ -oxidation by acrylic acid. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **167**(1), 89–94 [cit. 2021-04-16]. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.1998.tb13212.x
- RAI, R. *et al.*, 2011a. Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. *Materials Science and Engineering: R: Reports* [online]. **72**(3), 29–47 [cit. 2021-03-07]. ISSN 0927796X. Dostupné z: doi:10.1016/j.mser.2010.11.002
- RAI, R. *et al.*, 2011b. Poly-3-hydroxyoctanoate P(3HO), a Medium Chain Length Polyhydroxyalkanoate Homopolymer from *Pseudomonas mendocina*. *Biomacromolecules* [online]. **12**(6), 2126–2136 [cit. 2021-4-28]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm2001999
- RAMSAY, J. A. *et al.*, 1990. Recovery of poly-3-hydroxyalkanoic acid granules by a surfactant-hypochlorite treatment. *Biotechnology Techniques*. **4**(4), 221–226.
- RATLEDGE, C. a B. KRISTIANSEN, ed., 2001. *Basic biotechnology*. 2. Cambridge: Cambridge University Press.
- RAY, A. *et al.*, 2013. Bacterial cell wall macroamphiphiles: Pathogen-/microbe-associated molecular patterns detected by mammalian innate immune system. *Biochimie* [online]. **95**(1), 33–42 [cit. 2021-03-07]. ISSN 03009084. Dostupné z: doi:10.1016/j.biochi.2012.06.007
- RAY, S. a V. C. KALIA, 2017. Polyhydroxyalkanoate Production and Degradation Patterns in *Bacillus* Species. *Indian Journal of Microbiology* [online]. **57**(4), 387–392 [cit. 2021-4-27]. ISSN 0046-8991. Dostupné z: doi:10.1007/s12088-017-0676-y
- REHM, B. H. a A. STEINBÜCHEL, 2001. Heterologous expression of the acyl-acyl carrier protein thioesterase gene from the plant *Umbellularia californica* mediates polyhydroxyalkanoate biosynthesis in recombinant *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **55**(2), 205–209 [cit. 2021-04-03]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s002530000541
- REHM, B. H. A, 2007. Biogenesis of Microbial Polyhydroxyalkanoate Granules: a Platform Technology for the Production of Tailor-made Bioparticles. *Current Issues in Molecular Biology* [online]. **9**(1), 41–62 [cit. 2021-04-03]. ISSN 14673037. Dostupné z: doi:10.21775/cimb.009.041

- REHM, B. H. A., 2003. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochemical Journal* [online]. **376**(1), 15–33 [cit. 2021-04-03]. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/bj20031254
- REHMAN, S., N. JAMIL a S. HUSNAIN, 2007. Screening of different contaminated environments for polyhydroxyalkanoates-producing bacterial strains. *Biologia* [online]. **62**(6), 650–656 [cit. 2021-4-27]. ISSN 0006-3088. Dostupné z: doi:10.2478/s11756-007-0144-y
- REN, Q. *et al.*, 2000. FabG, an NADPH-Dependent 3-Ketoacyl Reductase of *Pseudomonas aeruginosa*, Provides Precursors for Medium-Chain-Length Poly-3-Hydroxyalkanoate Biosynthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* [online]. **182**(10), 2978–2981 [cit. 2021-03-21]. ISSN 1098-5530. Dostupné z: doi:10.1128/JB.182.10.2978-2981.2000
- REVELO ROMO, D. M. *et al.*, 2007. A most effective method for selecting a broad range of short and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate producing microorganisms. *Electronic Journal of Biotechnology* [online]. **10**(3) [cit. 2021-04-12]. ISSN 07173458. Dostupné z: doi:10.2225/vol10-issue3-fulltext-13
- RHIM, J.-W., H.-M. PARK a C.-S. HA, 2013. Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Progress in Polymer Science* [online]. **38**(10–11), 1629–1652 [cit. 2021-02-21]. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2013.05.008
- RITCHIE, H. a M. ROSER, 2019. Plastic Pollution. *Our World in Data* [online]. [cit. 2019-11-13]. Dostupné z: <https://ourworldindata.org/plastic-pollution>
- ROSE, F. R. A. J. a R. O. C. OREFFO, 2002. Bone Tissue Engineering: Hope vs Hype. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **292**(1), 1–7 [cit. 2021-03-06]. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1006/bbrc.2002.6519
- RUHLAND, G. J. a F. FIEDLER, 1990. Occurrence and structure of lipoteichoic acids in the genus *Staphylococcus*. *Archives of Microbiology* [online]. **154**(4), 375–379 [cit. 2021-03-20]. ISSN 0302-8933. Dostupné z: doi:10.1007/BF00276534
- RYCHLIK, W., W.J. SPENCER a R.E. RHOADS, 1990. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Research* [online]. **18**(21), 6409–6412 [cit. 2021-4-24]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/18.21.6409
- SAGONG, H.-Y. *et al.*, 2018. Structural Insights into Polyhydroxyalkanoates Biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. **43**(10), 790–805 [cit. 2021-4-27]. ISSN 09680004. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibs.2018.08.005

- SAITO, Y. a Y. DOI, 1994. Microbial synthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in *Comamonas acidovorans*. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. **16**(2), 99–104 [cit. 2021-04-03]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/0141-8130(94)90022-1
- SATOH, Y. *et al.*, 2005. Enzymatic synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) with CoA recycling using polyhydroxyalkanoate synthase and acyl-CoA synthetase. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. **99**(5), 508–511 [cit. 2021-04-03]. ISSN 13891723. Dostupné z: doi:10.1263/jbb.99.508
- SHAHID, S. *et al.*, 2013. Impact of carbon source and variable nitrogen conditions on bacterial biosynthesis of polyhydroxyalkanoates: Evidence of an atypical metabolism in *Bacillus megaterium* DSM 509. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. **116**(3), 302–308 [cit. 2021-03-07]. ISSN 13891723. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiosc.2013.02.017
- SHAKESPEARE, W., 2016. *Hamlet*. Přeložil Břetislav HODEK. Praha: Artur. D (Artur). ISBN 978-80-7483-045-7.
- SHARMA, S. K. a A. MUDHOO, ed., 2011. *Handbook of Applied Biopolymer Technology* [online]. Cambridge: Royal Society of Chemistry. RSC Green Chemistry. DOI: 10.1039/9781849733458. ISBN 978-1-84973-151-5.
- SHEN, C.–H., 2019. Amplification of Nucleic Acids. *Diagnostic Molecular Biology* [online]. Elsevier, s. 215–247 [cit. 2021-04-12]. ISBN 9780128028230. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-802823-0.00009-2
- SHOICHET, M. S., 2010. Polymer Scaffolds for Biomaterials Applications. *Macromolecules* [online]. **43**(2), 581–591 [cit. 2021-03-06]. ISSN 0024-9297. Dostupné z: doi:10.1021/ma901530r
- SCHLEGEL, H. G. a G. GOTTSCHALK, 1962. Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure, ihre Verbreitung, Funktion und Biosynthese. *Angewandte Chemie* [online]. **74**(10), 342–347 [cit. 2021-04-04]. ISSN 00448249. Dostupné z: doi:10.1002/ange.19620741003
- SCHLEGEL, H. G., G. GOTTSCHALK a R. VON BARTHA, 1961. Formation and Utilization of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyric Acid by Knallgas Bacteria (*Hydrogenomonas*). *Nature* [online]. **191**(4787), 463–465 [cit. 2021-04-04]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/191463a0
- SCHULTHEISS, D. *et al.*, 2005. The Presumptive Magnetosome Protein Mms16 Is a Poly(3-Hydroxybutyrate) Granule-Bound Protein (Phasin) in *Magnetospirillum*

- gryphiswaldense. *Journal of Bacteriology* [online]. **187**(7), 2416–2425 [cit. 2021-04-04]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.187.7.2416-2425.2005
- SIMON, L. S. *et al.*, 2009. Efficacy and safety of topical diclofenac containing dimethyl sulfoxide (DMSO) compared with those of topical placebo, DMSO vehicle and oral diclofenac for knee osteoarthritis. *Pain* [online]. **143**(3), 238–245 [cit. 2021-4-24]. ISSN 0304-3959. Dostupné z: doi:10.1016/j.pain.2009.03.008
- SINGH, A. K. *et al.*, 2017. Progress and challenges in producing polyhydroxyalkanoate biopolymers from cyanobacteria. *Journal of Applied Phycology* [online]. **29**(3), 1213–1232 [cit. 2019-11-14]. DOI: 10.1007/s10811-016-1006-1. ISSN 0921-8971. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10811-016-1006-1>
- SINGH, A. K. *et al.*, 2019. Biomedical applications of microbially engineered polyhydroxyalkanoates: an insight into recent advances, bottlenecks, and solutions. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **103**(5), 2007–2032 [cit. 2019-11-15]. DOI: 10.1007/s00253-018-09604-y. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-018-09604-y>
- SINGH, M. *et al.*, 2013. Production of Polyhydroxyalkanoate Co-polymer by *Bacillus thuringiensis*. *Indian Journal of Microbiology* [online]. **53**(1), 77–83 [cit. 2021-4-27]. ISSN 0046-8991. Dostupné z: doi:10.1007/s12088-012-0294-7
- SINGH, M., S. K. S. PATEL a V. C. KALIA, 2009. *Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates. *Microbial Cell Factories* [online]. **8**(1), 38 [cit. 2021-4-27]. ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/1475-2859-8-38
- SLATER, S. *et al.*, 1998. Multiple  $\beta$ -Ketothiolases Mediate Poly( $\beta$ -Hydroxyalkanoate) Copolymer Synthesis in *Ralstonia eutropha*. *Journal of Bacteriology* [online]. **180**(8), 1979–1987 [cit. 2021-04-03]. ISSN 1098-5530. Dostupné z: doi:10.1128/JB.180.8.1979-1987.1998
- SMITH, C. J. a A. M. OSBORN, 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* [online]. **67**(1), 6–20 [cit. 2021-04-12]. ISSN 01686496. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x
- SNELL, K. D. *et al.*, 2002. YfcX Enables Medium-Chain-Length Poly(3-Hydroxyalkanoate) Formation from Fatty Acids in Recombinant *Escherichia coli* fadB Strains. *Journal of Bacteriology* [online]. **184**(20), 5696–5705 [cit. 2021-04-02]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.184.20.5696-5705.2002



SONG, J. H. *et al.*, 2008. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production using waste vegetable oil by *Pseudomonas* sp. strain DR2. *Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. **18**(8), 1408–1415 [cit. 2021-4-26]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18756101/>

SONNLEITNER, B. *et al.*, 1979. Formal kinetics of poly-3-hydroxybutyric acid (PHB) production in *Alcaligenes eutrophus* H 16 and *Mycoplana rubra* R 14 with respect to the dissolved oxygen tension in ammonium-limited batch cultures. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **7**(1), 1–10 [cit. 2021-03-07]. ISSN 0171-1741. Dostupné z: doi:10.1007/BF00522473

SRIRANGAN, K. *et al.*, 2016. Engineering of *Escherichia coli* for direct and modulated biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer using unrelated carbon sources. *Scientific Reports* [online]. **6**(1) [cit. 2021-4-28]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep36470

STEINBÜCHEL, A. a S. HEIN, 2001. Biochemical and Molecular Basis of Microbial Synthesis of Polyhydroxyalkanoates in Microorganisms. BABEL, W. a A. STEINBÜCHEL, ed. *Biopolyesters* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, s. 81–123 [cit. 2019-11-15]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. DOI: 10.1007/3-540-40021-4\_3. ISBN 978-3-540-41141-3. Dostupné z: [http://link.springer.com/10.1007/3-540-40021-4\\_3](http://link.springer.com/10.1007/3-540-40021-4_3)

STEINBÜCHEL, A. *et al.*, 1995. Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions. *Canadian Journal of Microbiology* [online]. **41**(13), 94–105 [cit. 2021-04-04]. ISSN 0008-4166. Dostupné z: doi:10.1139/m95-175

STOKLASA, K., 2005. *Makromolekulární chemie I*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.

SUBRAMANIAN, M., M. MARUTHAMUTHU a D. A. BALTRUS, 2019. Draft Genome Sequences of Two *Bacillus* spp. and an *Oceanobacillus* sp. Strain Isolated from Marine Macroalgae. *Microbiology Resource Announcements* [online]. **8**(7), MRA.01417-18 [cit. 2021-4-28]. ISSN 2576-098X. Dostupné z: doi:10.1128/MRA.01417-18

SUDESH, K., H. ABE a Y. DOI, 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science* [online]. **25**(10), 1503-1555 [cit. 2021-02-25]. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/S0079-6700(00)00035-6

- SUTCLIFFE, I. C., 1995. The Lipoteichoic Acids and Lipoglycans of Gram-positive Bacteria: A Chemotaxonomic Perspective. *Systematic and Applied Microbiology* [online]. **17**(4), 467–480 [cit. 2021-03-20]. ISSN 07232020. Dostupné z: doi:10.1016/S0723-2020(11)80064-0
- SUTCLIFFE, I. C., A. K. BROWN a L. G. DOVER, 2010. The Rhodococcal Cell Envelope: Composition, Organisation and Biosynthesis. ALVAREZ, Héctor M., ed. *Biology of Rhodococcus* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, s. 29–71 [cit. 2021-03-07]. Microbiology Monographs. ISBN 978-3-642-12936-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-12937-7\_2
- TAGUCHI, K. *et al.*, 1999. Co-expression of 3-ketoacyl-ACP reductase and polyhydroxyalkanoate synthase genes induces PHA production in Escherichia coli HB101 strain. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **176**(1), 183–190 [cit. 2021-04-03]. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb13660.x
- TAGUCHI, S. *et al.*, 2008. A microbial factory for lactate-based polyesters using a lactate-polymerizing enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **105**(45), 17323–17327 [cit. 2021-04-03]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0805653105
- TAN, G.–Y. *et al.*, 2014. Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. *Polymers* [online]. **6**(3), 706–754 [cit. 2021-02-21]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym6030706
- THELLEN, C. *et al.*, 2008. A Processing, Characterization and Marine Biodegradation Study of Melt-Extruded Polyhydroxyalkanoate (PHA) Films. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. **16**(1), 1–11 [cit. 2021-02-25]. ISSN 1566-2543. Dostupné z: doi:10.1007/s10924-008-0079-6
- THIRUMALA, M. a S. VISHNUVARDHAN REDDY, 2012. Production of PHA by recombinant organisms. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research* [online]. **1**(2), 40–62 [cit. 2021-03-20]. Dostupné z: <http://www.ijlbpr.com/uploadfile/2015/0413/20150413044915354.pdf>
- THORAT GADGIL, B. S., N. KILLI a G. V. N. RATHNA, 2017. Polyhydroxyalkanoates as biomaterials. *MedChemComm* [online]. **8**(9), 1774–1787 [cit. 2021-04-12]. ISSN 2040-2503. Dostupné z: doi:10.1039/C7MD00252A
- TIAN, J., A. J. SINSKEY a J. STUBBE, 2005a. Class III Polyhydroxybutyrate Synthase: Involvement in Chain Termination and Reinitiation. *Biochemistry* [online]. **44**(23), 8369–8377 [cit. 2021-04-04]. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi050331u

- TIAN, J., A. J. SINSKEY a J. STUBBE, 2005b. Kinetic Studies of Polyhydroxybutyrate Granule Formation in *Wautersia eutropha* H16 by Transmission Electron Microscopy. *Journal of Bacteriology* [online]. **187**(11), 3814–3824 [cit. 2021-04-04]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.187.11.3814-3824.2005
- TSAY, J.T. *et al.*, 1992. Isolation and characterization of the beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III gene (*fabH*) from *Escherichia coli* K-12. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **267**(10), 6807–6814 [cit. 2021-04-03]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(19)50498-7
- TSUGE, T. *et al.*, 2000. Molecular cloning of two (R)-specific enoyl-CoA hydratase genes from *Pseudomonas aeruginosa* and their use for polyhydroxyalkanoate synthesis. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **184**(2), 193–198 [cit. 2021-04-02]. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.2000.tb09013.x
- TSUGE, T., M. HYAKUTAKE a K. MIZUNO, 2015. Class IV polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases and PHA-producing *Bacillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **99**(15), 6231–6240 [cit. 2021-4-27]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-015-6777-9
- VALAPPIL, S. P. *et al.*, 2007. Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek* [online]. **91**(1), 1–17 [cit. 2019-11-15]. DOI: 10.1007/s10482-006-9095-5. ISSN 0003-6072. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10482-006-9095-5>
- VALENTIN, H. E. a A. STEINBÜCHEL, 1994. Application of enzymatically synthesized short-chain-length hydroxy fatty acid coenzyme A thioesters for assay of polyhydroxyalkanoic acid synthases. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **40**(5), 699–709 [cit. 2021-04-03]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/BF00173332
- VALENTIN, H. E. *et al.*, 1994. Identification of 4-hydroxyhexanoic acid as a new constituent of biosynthetic polyhydroxyalkanoic acids from bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **40**(5), 710–716 [cit. 2021-03-07]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/BF00173333
- VERLINDEN, R. A. J. *et al.*, 2007. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology* [online]. **102**(6), 1437–1449 [cit. 2019-11-15]. 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>

- VIERKANT, M. A., D. W. MARTIN aj. R. STEWART, 1990. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate production in eight strains of the genus *Acinetobacter*. *Canadian Journal of Microbiology* [online]. **36**(9), 657–663 [cit. 2021-4-26]. ISSN 0008-4166. Dostupné z: doi:10.1139/m90-112
- VOLOVA, T. G., 2004. *Polyhydroxyalkanoates-plastic materials of the 21st century: production, properties, applications*. New York: Nova Biomedical. ISBN 1-59033-992-4.
- VROMAN, I. a L. TIGHZERT. Biodegradable Polymers. *Materials* [online]. 2009, **2**(2), 307–344 [cit. 2019-02-22]. DOI: 10.3390/ma2020307. ISSN 1996-1944. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1996-1944/2/2/307>
- WAMPFLER, B. *et al.*, 2010. Isolation and Purification of Medium Chain Length Poly(3-hydroxyalkanoates) (mcl-PHA) for Medical Applications Using Nonchlorinated Solvents. *Biomacromolecules* [online]. **11**(10), 2716–2723 [cit. 2021-03-07]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm1007663
- WANG, F. a S. Y. LEE, 1997. Poly(3-Hydroxybutyrate) Production with High Productivity and High Polymer Content by a Fed-Batch Culture of *Alcaligenes latus* under Nitrogen Limitation. *Applied and environmental microbiology* [online]. **63**(9), 3703–3706 [cit. 2021-03-07]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.63.9.3703-3706.1997
- WANG, Q. *et al.*, 2009. Complete PHB mobilization in *Escherichia coli* enhances the stress tolerance: a potential biotechnological application. *Microbial Cell Factories* [online]. **8**(1) [cit. 2021-4-28]. ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/1475-2859-8-47
- WARD, A.C. a E.A. DAWES, 1973. A disk assay for poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. *Analytical Biochemistry* [online]. **52**(2), 607–613 [cit. 2021-04-12]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/0003-2697(73)90067-5
- WEIER, H. U. a J. W. GRAY, 1988. A Programmable System to Perform the Polymerase Chain Reaction. *DNA* [online]. **7**(6), 441–447 [cit. 2021-04-12]. ISSN 0198-0238. Dostupné z: doi:10.1089/dna.1.1988.7.441
- WIECZOREK, R. *et al.*, 1995. Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of bacteriology* [online]. **177**(9), 2425–2435 [cit. 2021-04-04]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.177.9.2425-2435.1995
- WIECZOREK, R., A. STEINBLICHEL a B. SCHMIDT, 1996. Occurrence of polyhydroxyalkanoic acid granule-associated proteins related to the *Alcaligenes eutrophus*

- H16 GA24 protein in other bacteria. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **135**(1), 23–30 [cit. 2021-04-04]. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.1996.tb07961.x
- WILLIAMS, M. D., J. A. RAHN a D. H. SHERMAN, 1996. Production of a polyhydroxyalkanoate biopolymer in insect cells with a modified eucaryotic fatty acid synthase. *Applied and environmental microbiology* [online]. **62**(7), 2540–2546 [cit. 2021-03-20]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.62.7.2540-2546.1996
- WILLIAMS, S. F. a D. P. MARTIN, 2005. STEINBÜCHEL, A. *Biopolymers Online* [online]. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., s. 1–36 [cit. 2021-03-06]. ISBN 9783527600038. Dostupné z: doi:10.1002/3527600035.bpol4004
- WITHOLT, B. a B. KESSLER, 1999. Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. **10**(3), 279–285 [cit. 2021-04-02]. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/S0958-1669(99)80049-4
- WONG, P. A. L. *et al.*, 2004. Investigation of the effects of the types of food waste utilized as carbon source on the molecular weight distributions and thermal properties of polyhydroxybutyrate produced by two strains of microorganisms. *E-Polymers* [online]. **4**(1), 1–11 [cit. 2021-4-28]. ISSN 1618-7229. Dostupné z: doi:10.1515/epoly.2004.4.1.324
- WONG, P. A. L. *et al.*, 2005. Effects Of Types Of Food Waste As Carbon Source On The Molecular Weight Distributions And Thermal Properties Of The Biopolymer (Polyhydroxybutyrate) Produced By Two Strains Of Microorganisms. *Materials Research Innovations* [online]. **9**(1), 4–5 [cit. 2021-4-28]. ISSN 1432-8917. Dostupné z: doi:10.1080/14328917.2005.11784864
- YAMANE, T., M. FUKUNAGA a Y. W. LEE, 1996. Increased PHB productivity by high-cell-density fed-batch culture of *Alcaligenes latus*, a growth-associated PHB producer. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. **50**(2), 197–202 [cit. 2021-03-07]. ISSN 1097-0290. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19960420)50:2<197::AID-BIT8>3.0.CO;2-H
- YAMANE, T., X. CHEN a S. UEDA, 1996. Growth-Associated Production of Poly(3-Hydroxyvalerate) from n-Pentanol by a Methylotrophic Bacterium, *Paracoccus denitrificans*. *Applied and environmental microbiology* [online]. **62**(2), 380–384 [cit. 2021-03-07]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.62.2.380-384.1996

ZAPLETAL, M. a J. TREJBAL, 2016. Izolace polyhydroxyalkanoátů z mikrobiální biomasy. *Chemické listy* [online]. **110**, 860–867 [cit. 2019-11-15]. Dostupné z: [http://chemicke-listy.cz/docs/full/2016\\_12\\_860-867.pdf](http://chemicke-listy.cz/docs/full/2016_12_860-867.pdf)

ZINN, M. a R. HANY, 2005. Tailored Material Properties of Polyhydroxyalkanoates through Biosynthesis and Chemical Modification. *Advanced Engineering Materials* [online]. **7**(5), 408–411 [cit. 2019-11-13]. DOI: 10.1002/adem.200500053. ISSN 1438-1656. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/adem.200500053>

ZINN, M., B. WITHOLT a T. EGLI, 2001. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. **53**(1), 5–21 [cit. 2021-03-06]. ISSN 0169409X. Dostupné z: [doi:10.1016/S0169-409X\(01\)00218-6](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00218-6)

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

% CDM	Hmotnostní procenta z celkové hmotnosti vysušených buněk
4HbD	4-hydroxybutyrát dehydrogenáza
AccA	Acetyl-CoA karboxyláza
Acetyl-CoA	Acetylkoenzym A
ACP	Acylový nosný protein
AlkK	Acyl-CoA syntáza
AMP	Adenosinmonofosfát
ATP	Adenosintrifosfát
BHI	Mozko-srdcová infuze
BktB	Ketothioláza
bp	Páry bází
Cat1	4-hydroxybutyrylové kyseliny-CoA transferáza
Cat2	4-hydroxybutyrylové kyseliny-CoA transferáza
CCM	Česká sbírka mikroorganismů
CoA	Koenzym A
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
FabD	Malonyl-CoA:ACP transacyláza
FabG	3-ketoacyl-ACP reduktáza
FabG	3-ketoacylreduktáza
FabH	3-ketoacyl-ACP syntáza III
FadA	3-ketoacyl-CoA thioláza
FadB	Enoyl-CoA hydratáza
FadD	Acyl-CoA syntáza

FadE	Acyl-CoA dehydrogenáza
FadR	Transkripční faktor $\beta$ -oxidace
IlvA	3-hydroxyvalerát threonin deamináza
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci
lcl PHA	PHA s dlouhým postranním řetězcem (s více jak 15 uhlíky)
LDH	Laktátdehydrogenáza
LDPE	Nízkohustotní polyetylen
M17	M17 pevná půda
MALDI-TOF	Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem
MaoC	R-specifická enoyl hydratáza
mcl PHA	PHA se středně dlouhým postranním řetězcem (s 6-14 uhlíky)
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
P(3HB)	Poly(R-3-hydroxybutyrát)
P(3HB-co-3HV)	Poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát)
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PCT	Pronionyl-CoA transferáza
PGA	Polyglykolid
PHA	Polyhydroxyalkanoát
PhaA	3-ketothialáza
PhaB	NADPH acetoacetyl-CoA reduktáza
PhaC	PHA syntáza
PhaG	Hydroxyacyl-ACP specifická thioesteráza
PhaJ	R-specifická enoyl hydratáza
PhaR	Represor phasinů



---

PHB	Polyhydroxybutyrát
PHHD	Polyhydroxyhexadekanát
PHHx	Polyhydroxyhexanoát
PHO	Polyhydroxyoktanát
PHOD	Polygydroxyoktadekanát
PHV	Poyhydroxyvalerát
PLA	Polylaktid
PP	Polypropylen
PPi	Difosfát
RhlG	3-ketoacylreduktáza
RNA	Ribonukleová kyselina
Sbm	Koenzym B12 dependentní methylmalonyl CoA mutáza
scl PHA	PHA s krátkým postranním řetězcem (s 3-5 uhlíky)
scl-mcl PHA	kopolymery obsahující jednotky scl i mcl PHA
SucD	Sukcinát depolymeráza
T <sub>A</sub>	Teplota annealingu
TAE	Tris-acetát-EDTA
TCA cyklus	Cyklus trikarboxylových kyselin
TEM	Transmisivní elektronová mikroskopie
TesA	Thioesteráza
UV	Ultrafialová
YfgG	Methylmalonyl-CoA dekarboxyláza

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 PHA (upraveno dle Tan <i>et al.</i> , 2014) .....	13
Obrázek 2 Tvorba PHA pomocí $\beta$ -oxidace (AMP – adenosinmonofosfát, PP <sub>i</sub> – difosfát, NADH – nikotinamidadenindinukleotid, NADPH – nikotinamidadenindinukleotidfosfát) (upraveno dle Lu, Tappel a Nomura, 2009).....	24
Obrázek 3 Produkční dráhy scl PHA z glukózy (upraveno dle Lu, Tappel a Nomura, 2009) .....	26
Obrázek 4 Produkční dráhy pro tvorbu mcl PHA (upraveno dle Lu, Tappel a Nomura, 2009) .....	28
Obrázek 5 Polymerace PHA (Rehm, 2003).....	29
Obrázek 6 Model katolického mechanismu PHA syntázy (upraveno dle Rehm, 2007) .....	30
Obrázek 7 Struktura PHA granule (upraveno dle Maestro a Sanz, 2017).....	31
Obrázek 8 Vznik PHA granule – modelem micely (A), modelem pučení (B) (upraveno dle Rehm, 2007).....	32
Obrázek 9 Mechanismus PCR (upraveno dle Enzoklop, 2020) .....	36
Obrázek 10 Agarózový gel s produkty po gradientové PCR při optimalizaci teploty annealingu pro syntázu 3. třídy s primery phaSyn3 (vlevo) a pro gen <i>fabG</i> (vpravo) .....	50
Obrázek 11 Vliv přídavku 2 % (vlevo) a 5 % (vpravo) DMSO na tvorbu PCR produktů primerů phaG1 .....	51
Obrázek 12 PCR produkty primerů phaG3 při různých teplotách annealingu .....	52
Obrázek 13 PCR produkty všech pěti primerů pro PHA syntázy v multiplexu PCR (T <sub>A</sub> – teplota annealingu).....	53
Obrázek 14 PCR produkty čtveřice primerů pro PHA syntázy – s primery phaSyn2a (vlevo), s phaSyn2b (vpravo) .....	53
Obrázek 15 PCR produkty dvojic primerů – fabG + phaA (vlevo), fabG + phaB1 (vpravo) .....	54
Obrázek 16 PCR produkty dvojic primerů – phaB1 + phaJ (vlevo), fabG + phaJ (vpravo).....	55
Obrázek 17 PCR produkty trojic primerů – phaB1 + phaJ + phaG3 (vlevo), fabG + phaA + phaG3 (vpravo).....	56

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 Názvy PHA podle počtu uhlíku a navázaného substituentu (upraveno dle Tan <i>et al.</i> , 2014).....	13
Tabulka 2 Materiálové vlastnosti PHA (PHB – polyhydroxybutyrát, PHV – polyhydroxyvalerát, PHHD – polyhydroxyhexadekanát, PHOD – polyhydroxyoktadekanát, PHO – polyhydroxyoktanát, PHHx –polyhydroxyhexanoát, PHA – směs polyhydroxyalkanoátů) (upraveno dle Singh <i>et al.</i> , 2019) .....	15
Tabulka 3 Použité mikroorganismy, jejich původ a kultivační podmínky.....	41
Tabulka 4 Použité primery, jejich sekvence a velikost výsledného PCR produktu v počtu párů bází (bp).....	45
Tabulka 5 Složení PCR směsi s GoTaq® Hot Start .....	47
Tabulka 6 Průběh PCR .....	47
Tabulka 7 Složení PCR směsi s EliZyme™ HS Robust MIX Red.....	47
Tabulka 8 Složení PCR reakce s přidavkem DMSO .....	48
Tabulka 9 Výsledky screeningu genů podílejících se na produkci PHA (+ – přítomnost daného genu, - – neprokázána přítomnost daného genu) .....	57