

Celulóza jako potenciální zdroj uhlíku pro biotechnologickou syntézu polyhydroxyalkanoátů

Bc. Martina Brožová

Bakalářská práce
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Martina Brožová**
Osobní číslo: **T21251**
Studijní program: **B0721A210002 Technologie a hodnocení potravin**
Specializace: **Potravinářské biotechnologie a aplikovaná mikrobiologie**
Forma studia: **Kombinovaná**
Téma práce: **Celulóza jako potencionální zdroj uhlíku pro biotechnologickou syntézu polyhydroxyalkanoátů**

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část

1. Charakteristika celulózy a mikroorganismy schopné rozkladu celulózy
2. Charakteristika polyhydroxyalkanoátů (PHA)
3. Mikroorganismy schopné produkce PHA a jejich biosyntetické dráhy
4. Detekce produkce PHA

II. Praktická část

1. Cíl práce
2. Screening produkce PHA
3. Vyhodnocení výsledků
4. Formulace závěrů

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

Seznam doporučené literatury:

1. SAWANT, Shailesh S., Tuan Kiet TRAN, Bipinchandra K. SALUNKE a Beom Soo KIM. Potential of Saccharophagus degradans for production of polyhydroxyalkanoates using cellulose. *Process Biochemistry* [online]. 2017, **57**, 50-56 [cit. 2023-07-26]. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2017.03.016
2. TAYLOR, L. E., B. HENRISSAT, P. M. COUTINHO, N. A. EKBORG, S. W. HUTCHESON a R. M. WEINER. Complete Cellulase System in the Marine Bacterium Saccharophagus degradans Strain 2-40 T. *Journal of Bacteriology* [online]. 2006, **188**(11), 3849-3861 [cit. 2023-07-26]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.01348-05
3. CIBICHAKRAVARTHY, B., S. ABINAYA a S. R. PRABAGARAN. Syntrophic association of termite gut bacterial symbionts with bifunctional characteristics of cellulose degrading and polyhydroxyalkanoate producing bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2017, **103**, 613-620 [cit. 2023-07-26]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.05.100
4. Databáze Web of Science
5. Doporučení dle vedoucího

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Daniela Máčalová**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce: **2. ledna 2024**
Termín odevzdání bakalářské práce: **17. května 2024**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Jaroslav Filip, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 6. února 2024

PROHLÁŠENÍ AUTORKY BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou 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 – bakalářskou 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 bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské 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 na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studentky:

.....
podpis studentky

ABSTRAKT

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou přírodní polymery, které se staly zajímavou alternativou k petrochemickým polymerům především díky svým vlastnostem, jako je schopnost biodegradace a biokompatibilita. Tyto biopolymery jsou vytvářeny mikroorganismy za nutričně nevyvážených podmínek a mohou vznikat ze široké škály substrátů. Celulóza, jako nejrozšířenější biopolymer a zároveň největší zdroj organického uhlíku na světě, představuje atraktivní možnost pro syntézu PHA. Využití celulózy jako zdroje uhlíku pro výrobu PHA má potenciál otevřít nové cesty pro rozvoj biotechnologií a udržitelné výroby polymerů.

V této práci byla zkoumána celulolytická schopnost bakteriálních izolátů z potravin využívat různé formy celulózy pro biosyntézu polyhydroxyalkanoátů. Celulolytická aktivita byla prokázána u *Acinetobacter calcoaceticus* (D171), *Bacillus* sp. (D31), *Bacillus velezensis* (D11), *Lysinibacillus fusiformis* (D117), *Priestia megaterium* (D32, D199, D201) a *Pseudomonas oryzae* (D37). Tvorba PHA z glukózy, karboxymethylcelulózy a mikrokrytalické celulózy byla pak pozorována pouze u bakteriálních kmenů *P. megaterium* (D32, D199, D201) a *L. fusiformis* (D117). Tyto bakterie se tak jeví jako vhodní adepti pro biotechnologickou syntézu PHA z celulózy.

Klíčová slova: celulolytické bakterie, karboxymethylcelulóza, mikrokrytalická celulóza, polyhydroxyalkanoáty

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are natural polymers that have become an interesting alternative to petrochemical polymers, mainly due to their properties such as biodegradability and biocompatibility. These biopolymers are produced by microorganisms under nutritionally imbalanced conditions and can be formed from a wide range of substrates. Cellulose, as the most widely used biopolymer and the largest source of organic carbon in the world, represents an attractive option for the synthesis of PHAs. The use of cellulose as a carbon source for PHA production has the potential to open new avenues for the development of biotechnology and sustainable polymer production.

In this work, the cellulolytic ability of bacterial isolates from food was investigated to utilize different forms of cellulose for the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates. Cellulolytic activity was demonstrated in *Acinetobacter calcoaceticus* (D171), *Bacillus* sp. (D31), *Bacillus velezensis* (D11), *Lysinibacillus fusiformis* (D117), *Priestia megaterium* (D32, D199, D201) and *Pseudomonas oryzae* (D37). The formation of PHA from carboxymethylcellulose, glucose and microcrystalline cellulose was then observed only in the bacterial strains *P. megaterium* (D32, D199, D201) and *L. fusiformis* (D117). These bacteria thus appear to be suitable candidates for the biotechnological synthesis of PHA from cellulose.

Keywords: cellulolytic bacteria, carboxymethylcellulose, microcrystalline cellulose, polyhydroxyalkanoates

Tímto bych chtěla poděkovat své vedoucí Ing. Daniele Máčalové za její vstřícný přístup, za ochotu a trpělivost, za cenné a odborné rady. Dále mé díky patří zaměstnancům z Ústavu ochrany životního prostředí za pomoc při práci v laboratoři a vytvoření příjemného pracovního prostředí. Nakonec bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu.

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

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 CELULÓZA	11
1.1 STRUKTURA CELULÓZY	11
1.2 VLASTNOSTI CELULÓZY	12
1.3 VYUŽITÍ CELULÓZY	12
1.4 CELULOLYTICKÉ MIKROORGANISMY	13
2 POLYHYDROXYALKANOÁTY	17
2.1 STRUKTURA POLYHYDROXYALKANOÁTŮ.....	17
2.2 VLASTNOSTI POLYHYDROXYALKANOÁTŮ	18
2.3 VYUŽITÍ POLYHYDROXYALKANOÁTŮ.....	19
2.4 BIOSYNTETICKÉ DRÁHY PRODUKCE POLYHYDROXYALKANOÁTŮ.....	20
2.5 ORGANISMY SCHOPNÉ PRODUKCE POLYHYDROXYALKANOÁTŮ	23
2.6 METODY DETEKCE POLYHYDROXYALKANOÁTŮ.....	24
II PRAKTICKÁ ČÁST	26
3 CÍL PRÁCE	27
4 MATERIÁL	28
4.1 LABORATORNÍ PŘÍSTROJE.....	28
4.2 CHEMIKÁLIE.....	28
4.3 KULTIVAČNÍ MÉDIA.....	29
4.4 MIKROORGANISMY	31
5 METODIKA	34
5.1 CELULOLYTICKÁ AKTIVITA	34
5.2 DETEKCE POLYHYDROXYALKANOÁTŮ METODOU BARVENÍ.....	34
6 VÝSLEDKY A DISKUSE	35
6.1 CELULOLYTICKÁ AKTIVITA	35
6.2 DETEKCE BIOSYNTÉZY POLYHYDROXYALKANOÁTŮ	40
ZÁVĚR	44
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	45
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	60
SEZNAM OBRÁZKŮ	62
SEZNAM TABULEK	63
SEZNAM ROVNIC	64

ÚVOD

Podle údajů Statistického úřadu Evropské unie (EU, Eurostat, 2023) v roce 2021 bylo v EU vyprodukováno 84,3 milionu tun odpadu z obalových materiálů, z nichž 19 % tvořily plasty. Využití biologicky odbouratelných polymerů, jako jsou polyhydroxyalkanoáty (PHA), má potenciál snížit ekologickou zátěž. Tyto materiály se jeví jako vhodná alternativa k běžně používaným polymerům petrochemického původu, zejména pro výrobu jednorázových plastových obalů.

Hlavní překážkou pro začlenění do průmyslu je však jejich vysoká cena. PHA jsou produkovány mikroorganismy jako zásobní látka z různých substrátů (např. glukóza, mastné kyseliny) za nevyvážených nutričních podmínek. Vstupní suroviny však představují více než 50 % výrobních nákladů, proto je nutné hledat dostupnější zdroje. Jednou z možností je využití celulózy. Jako nejrozšířenější biopolymer na světě, je přirozenou součástí také hospodářského nebo potravinářského odpadu, jejichž cena je v porovnání s jinými zemědělskými surovinami velmi nízká.

Nezbytným krokem při zpracování lignocelulózové biomasy je její hydrolýza na zkvasitelné cukry, za což jsou zodpovědné celulolytické enzymy. Případné využití celulolyticky aktivních kmenů pro produkci PHA, by mohlo cenu biopolymeru značně redukovat (Zytner *et al.*, 2023).

V této práci bude zkoumána celulolytická schopnost bakteriálních izolátů z potravin s následným screeningem PHA producentů za využití různých forem celulózy jako jediného zdroje uhlíku

I. TEORETICKÁ ČÁST

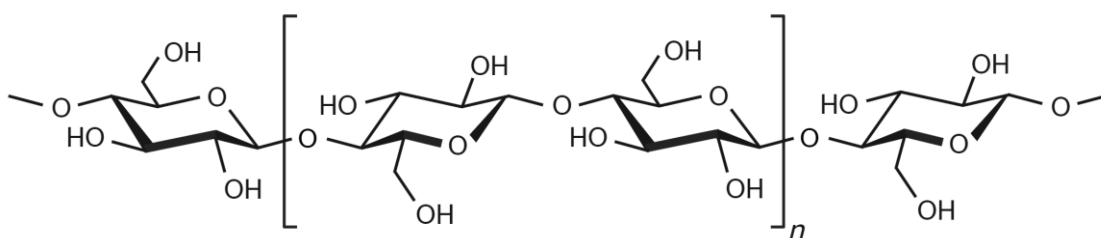
1 CELULÓZA

Celulóza je nejrozšířenějším biopolymerem a zároveň největším zdrojem organického uhlíku na světě. Je syntetizována především vyššími rostlinami, u kterých tvoří hlavní stavební látku jejich buněčných stěn, společně s hemicelulózou a ligninem (Rudin a Choi, 2013). Poskytuje rostlinám mechanickou podporu proti okolním fyzikálním vlivům a umožňuje jim růst proti gravitaci (Brett, 2000). Produkce celulózy jsou schopné také řasy, houby a některé bakterie (McNamara *et al.*, 2015).

Celulóza je považovaná obnovitelný zdroj biomasy. Proto je důležitá pro produkci biodegradabilních produktů, obzvláště v dnešní době, kdy je kladen důraz na využívání materiálů nezatežující životní prostředí (Klemm *et al.*, 2005).

1.1 Struktura celulózy

Celulóza (Obrázek 1) je lineární homopolymer skládající se z D-anhydroglukózových opakujících se jednotek, které jsou spojeny β -1,4 glykosidickou vazbou. Jako monomerní jednotku lze považovat monosacharid glukózu (Rudin a Choi, 2013). Polymerační stupeň řetězce celulózy může dosahovat hodnot 500 až 15 000 (Brett, 2000). Každá glukózová jednotka je pootočená o 180° . Hydroxylové skupiny interagují mezi sebou v řetězci nebo s jiným celulózovým řetězcem tvorbou vodíkových můstků, čímž je formována nadmolekulární struktura polymeru (Heinze, 2015).



Obrázek 1 Struktura celulózy; upraveno dle Heinze (2015)

Intramolekulární vodíkové můstky jsou společně s kovalentní glykosidickou vazbou zodpovědné za rigiditu a pevnost celulózy. To také vede k tendenci polymeru krystalizovat, případně tvořit fibrilární struktury. Heinze (2015) rozlišuje několik typů celulózy podle uspořádání intermolekulárních vodíkových můstků:

- a) **Celulóza I** je nejrozšířenější krystalickou formou vyskytující se přirozeně v rostlinách, kdy jsou řetězce vysoce paralelně organizované. Tento typ celulózy je metastabilní.
- b) **Celulóza II** je uspořádána antiparalelně a je termodynamicky stabilnější. Toto uspořádání vzniká procesem mercerace z celulózy I.
- c) **Celulóza III** je krystalická struktura, která se připravuje zpracováním typu I nebo II v kapalném amoniaku, tato změna je reverzibilní.
- d) **Celulóza IV** vzniká z celulózy III v glycerolu za vysokých teplot.

Celulóza se vyskytuje v několika formách a rozměrech, které mohou být klasifikovány jako celulózová vlákna, mikro a nanovlákna, a jako krystalická celulóza. Celulózová vlákna jsou morfologií, která je syntetizována přirozeně rostlinami. Mikrovlákna jsou organizována do vláken o délce od 1 mm až do 100 cm. Nanovlákna vznikají mechanickou desintegrací vláken. Jejich šířka se pohybuje v rozmezí 2 až 100 nm, délka je typicky vyšší než 1 μm . Krystalická celulóza se získává z mikrovláken extrakcí regionů s vysokou krystalinitou. Mikrokrystalická celulóza (MCC) a nanokrystalická celulóza (CNC) jsou tuhé tyčinkovité částice (Seddiqi *et al.*, 2021).

1.2 Vlastnosti celulózy

Celulóza disponuje řadou vlastností, které z ní tvoří univerzální materiál. Mezi ně patří její biokompatibilita, vysoká tepelná stabilita, možnost chemické modifikace, vysoká hygroskopicitá, dobrá mechanická pevnost a vysoký modul pružnosti. Typické hodnoty Youngova modulu rostlinných celulózových vláken se pohybují v rozmezí 20-30 GPa, ale u vysoce krystalické celulózy dosahují až 138 GPa (Quesada Cabrera *et al.*, 2011). Vlivem těsnosti uspořádání mezi jednotlivými propletenými řetězci je celulóza ve vodě a ve většině běžných rozpouštědel nerozpustná, je ovšem dobře rozpustná v některých iontových roztocích jako je například 1-ethyl-3-methylimidazolium diethylfosfát (Vitz *et al.*, 2009).

1.3 Využití celulózy

Celulóza tvoří hlavní stavební složku buněčné stěny u rostlin, některých řas, hub a bakterií. Je také důležitou složkou potravy u mnohých živočichů, zejména přežvýkavců a termitů, ti ji mohou trávit pomocí symbiotických mikroorganismů přítomných v jejich střevech (Niwiska, 2012). Jelikož monomerní jednotkou celulózy je glukóza, lze ji využívat

k produkci ethanolu (Aunina *et al.*, 2010). Jako neaktivní plnivo se také přidává do léků (Kumar Gupta *et al.*, 2019). Nejčastěji se však používá celulóza pro produkci lepenky a papíru. Průmyslově důležitá je i výroba textilních vláken. Bavlna je skvělým zdrojem celulózy, její vlákna jí obsahují přibližně z 94 %, obsah celulózy ve lněných vláknech je mezi 70–84 % a v konopných vláknech v rozsahu 64–70 % (Zommere *et al.*, 2013).

Hojně jsou využívány také deriváty celulózy. Regenerace celulózy je proces, při kterém je rozpuštěný celulózový derivát znovu převeden do pevné formy (vlákna, fólie) a jsou tak tvořeny nové funkční materiály. Příkladem může být viskóza, která je pro svou měkkost, absorpční schopnosti, dobrou propustnost a lesklý vzhled oblíbeným materiálem v textilním průmyslu pro výrobu oděvů (Niaounakis, 2017). Z regenerované celulózy je vyráběn současně i celofán, který nachází díky nízké permeabilitě vůči vzduchu, tukům a vodě, transparentnosti a flexibilitě využití jako obalový materiál (Jewkes *et al.*, 1969).

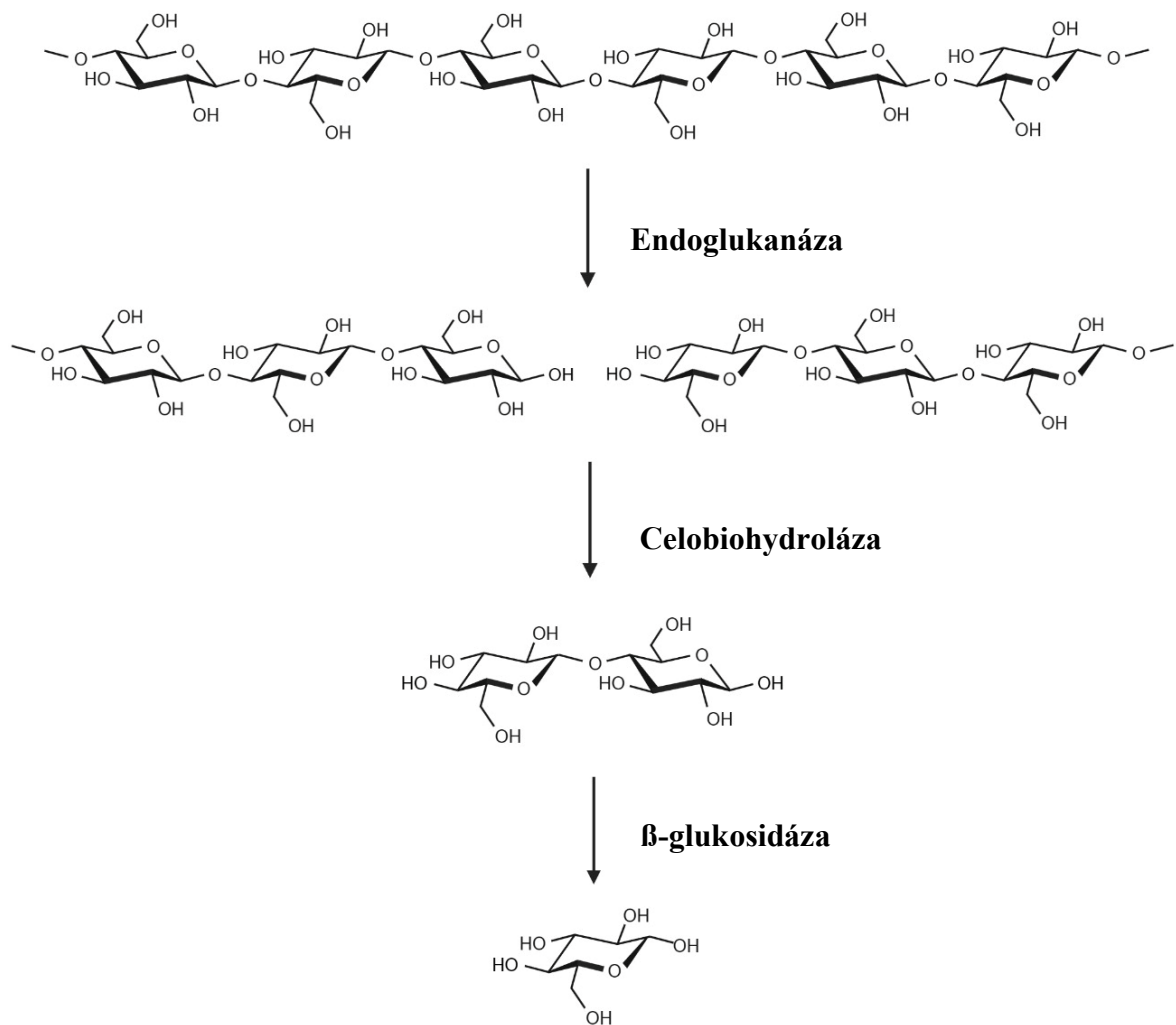
Přítomné hydroxylové skupiny z celulózy dělají atraktivní materiál pro různé chemické modifikace. Nitrací celulózy je vyráběna nitrocelulóza, která se používá při výrobě výbušnin nebo laků. Reakcí s kyselinou chloroctovou je syntetizována karboxymethylcelulóza (CMC), která je užívána jako zahušťovadlo a stabilizátor v potravinářství, kosmetice a farmacii. Široce průmyslově vyráběným derivátem celulózy je také acetátcelulóza, jejíž vlastnosti jsou podobné přírodnímu hedvábí (Seddiqi *et al.*, 2021).

1.4 Celulolytické mikroorganismy

Schopnost mikroorganismů štěpit celulózu je obvykle podmíněna přítomností celulolytických enzymů, tzv. celuláz. Ty souhrnně označují skupinu tří enzymů, které se společně podílejí na hydrolýze celulózy na glukózu, celobiózu a další oligosacharidy (Singhania, 2009):

- a) **Endoglukanáza** náhodně štěpí vnitřní vazby v amorfní celulóze. To vede k odhalení redukujících a neredukujících konců polymeru.
- b) **Celobiohydroláza** je exoceluláza, která odštěpuje celobiózu z konců celulózy hydrolýzou 1,4-β-D-glykosidické vazby.
- c) **β-glukosidáza** hydrolyzuje vzniklý disacharid na monosacharidy.

Účinnost rozkladu struktury je silně ovlivněna synergickým působením jednotlivých enzymů (Datta, 2024). Mechanismus enzymatické hydrolýzy celulózy je pak zobrazen na Obrázku 2.



Obrázek 2 Enzymatická hydrolýza celulózy; upraveno dle Xie *et al.* (2007)

Celulolýza může probíhat několika různými mechanismy:

- a) **Nekomplexní celulolýza** je pozorována většinou u aerobních organismů, které vylučují rozpustné extracelulární celulytické enzymy. To vede k uvolňování jednoduchých sacharidů, které jsou eventuálně organismem přijímány a metabolizovány. Systém enzymů se skládá ze šesti až deseti celuláz a tvoří nestabilní komplexy (Lakhundi *et al.*, 2015).
- b) **Komplexní celulolýza** je obvykle využívána anaerobními mikroorganismy a její systém je složen z velkých bílkovinných komplexů (tzv. celulosomů), které jsou nejčastěji připojeny k povrchu organismu. Celulosomy obsahují velké množství celulytických enzymů a umožňují organismu ukotvení na celulóze. Produkty hydrolýzy jsou tedy uvolňovány v blízkosti buněk, takže je mohou okamžitě přijmout a metabolizovat (Lakhundi *et al.*, 2015).

- c) **Celulolýza bez procesivních celuláz** je způsob hydrolytické ortogonální degradace jejíž mechanismus stále nebyl zcela objasněn. Například u bakterie *Fibrobacter succinogenes* S85 nebyla objevena žádná procesivní celuláza a přítomné celulázy vykazují nízkou enzymatickou aktivitu, přesto byl na celulóze pozorován rapidní růst. Dle Raut *et al.* (2019) se na buněčném obalu *F. succinogenes* během růstu na celulóze tvoří celulólytické multiproteinové komplexy, které usnadňují synergické působení degradačních enzymů, což způsobuje degradaci lignocelulózy.
- d) **Nehydrolytická celulolýza** byla pozorována převážně u hub. Na rozdíl od předchozích způsobů se na degradaci podílí oxidoreduktázy, nikoliv hydrolázy. Ty oxidují redukující konce celobiózy a/nebo dextriny na odpovídající laktony, které jsou pak využívány jako zdroj uhlíku (Lakhundi *et al.*, 2015).

1.4.1 Eukaryota

Mezi nejvíce prozkoumané celulólytické mikroorganismy patří vřeckovýtrusná vláknitá houba *Trichoderma reesei*. Její celulázový systém se skládá z 5 endoglukanáz, dvou exoglukanáz a dvou β -glukosidáz. Celulóza je degradována nekomplexním mechanismem (Lakhundi *et al.*, 2015). *T. reesei* dokáže produkovat enzymy s vysokými výtěžky, je tedy široce průmyslově využívaná například v textilním a papírenském průmyslu, nebo při syntéze ethanolu z celulózy (Martzy *et al.*, 2021). Produkce celuláz byla pozorována také u dalších mikroskopických hub například z rodu *Aspergillus*. U *A. terreus* jako zdroj uhlíku byl použit Avicel, CMC, filtrační papír, Salicin a Sigmacell (Sohail *et al.*, 2016).

1.4.2 Prokaryota

Saccharophagus degradans kmen 2-40 je zástupcem mořských bakterií degradujících komplexní sacharidy. Jedná se o pleomorfní, gramnegativní, aerobní, pohyblivou γ -proteobakterii, která je jedinečná svou metabolickou variabilitou (Ekborg *et al.*, 2005). *S. degradans* je schopen rozkládat nejméně 10 různých komplexních sacharidů, včetně celulózy a dalších složek buněčné stěny rostlin jako jsou arabinany, glukany, manany, pektin a xylany. Většina složek celulázového systému je volně vylučována do prostředí, některé celulázy se však zadají být ukotvené na povrchu buňky. To značí využití jak komplexního, tak nekomplexního mechanismu celulolýzy. Může růst za využití Avicelu, CMC, filtračního papíru a rostlinné biomasy jako jediného zdroje uhlíku a energie, přičemž růst probíhá současně s viditelnou degradací substrátů (Taylor *et al.*, 2006).

Celulolytickou aktivitou se vyznačují také některé bakterie z rodu *Bacillus*. Chen *et al.* (2018) izoloval grampozitivní bakterii *B. velezensis*, u které byly objeveny geny kódující enzymy extracelulární α -amylázu, celulázu, pektinázu a xylanázu. U *B. subtilis* byla pozorována produkce avicelázy, CMCázy, xylanázy a β -glukosidázy. Zatím co první tři zmíněné enzymy jsou sekretovány extracelulárně, tak β -glukosidáza je vázaná na buněčnou stěnu (Kim *et al.*, 2012). Produkce extracelulární celulázy byla zkoumána i u bakterie *Priestia megaterium*, která degradovala stélku řasy *Sargassum* (Shobharani *et al.*, 2013). Shakoor *et al.* (2013) uvádí, že *P. megaterium* je schopná produkce jak extracelulárních, tak intracelulárních celulolytických enzymů, ovšem nekomplexní mechanismus celulózy se prokázal jako dominantní. *Lysinibacillus* sp. jsou dalším celulolyticky aktivními zástupci z rodu *Bacillus*, kteří dokáží využít celobíou a škrob, jak popisuje Mahalik *et al.* (2018).

Přítomnost celulolytických bakterií rodu *Fibrobacter* a *Ruminococcus* byla detekována v trávicím traktu několika býložravých (koňovití, slonovití, zajícovití) a všežravých (myšovití, hominidé) čeledí (Froidurot a Julliard, 2022). Celulóza tvoří také potravu termitů, proto i z jejich trávicího ústrojí byly izolovány některé celulolytické bakterie jako například *Bacillus cereus* (Cibichakravarthy *et al.*, 2017).

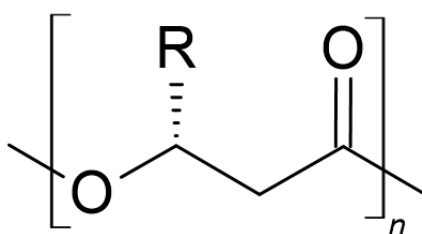
2 POLYHYDROXYALKANOÁTY

Biopolymery představují atraktivní alternativu k polymerním materiálům petrochemického původu, protože některé vykazují podobné chemicko-fyzikální vlastnosti jako některé konvenčně používané plasty. Oproti nim vynikají především svou dobrou biodegradabilitou a biokompatibilitou (Anjum *et al.*, 2016). Mezi tyto biopolymery patří i polyhydroxyalkanoáty (PHA), které jsou přirozeně syntetizovány mnohými bakteriemi a některými druhy archeí, jako intracelulární zásobní látka (Goswami *et al.*, 2021). Jako první byly PHA objeveny u bakterie *Priestia megaterium* (dřívější pojmenování *Bacillus megaterium*), která produkuje poly-(R)-3-hydroxybutyrát (PHB), polyester kyseliny β -hydroxymáselné (Lemoigne, 1926).

Jejich využití je v současné době omezeno vysokými pořizovacími náklady, které závisí na mnoha faktorech jako je použitý produkční mikroorganismus, substrát či extrakční postup. Pro srovnání, ke dni 22.4.2024 lze pořídit 100 g PHB (Merck, Darmstadt, Německo) za 29 700 Kč a 1 kg polypropylenu (Merck, Darmstadt, Německo) za 3 710 Kč.

2.1 Struktura polyhydroxyalkanoátů

Polyhydroxyalkanoáty jsou polyestery (R)-3-hydroxy mastných kyselin, obecná struktura je vyobrazená na Obrázku 3. Boční skupina (R) může být nasycená, nenasycená, alifatická, rozvětvená, substituovaná (Bugnicourt *et al.*, 2014).

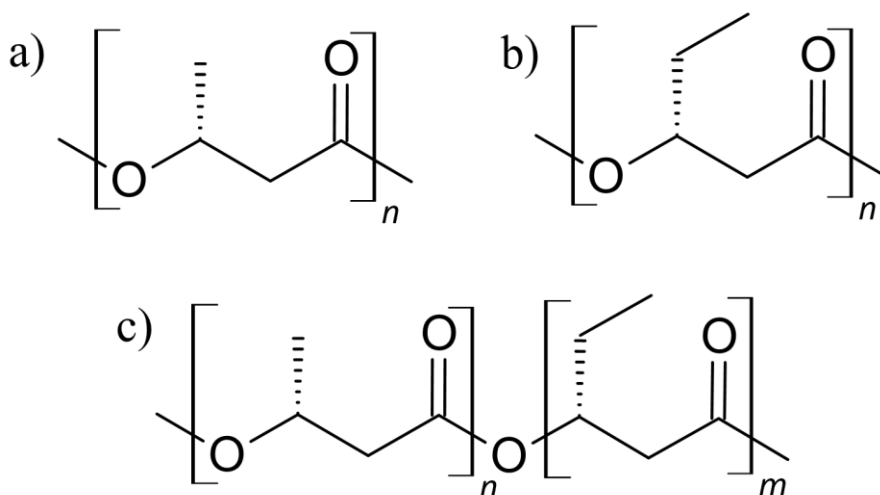


Obrázek 3 Struktura polyhydroxyalkanoátu; upraveno dle Emaimo *et al.* (2022)

Molekulární hmotnost polymeru může dosahovat hodnot od 50 000 až po miliony kg/mol (Bugnicourt *et al.*, 2014). V dnešní době je známo přes 150 druhů monomerních jednotek. Podle počtu uhlíků v monomeru lze pak PHA rozdělit do následujících tří skupin (Visakh., 2014):

- PHA_{sel}** s krátkým řetězcem, obsahující 3-5 atomů uhlíku,
- PHA_{mcl}** se středně dlouhým řetězcem, které obsahující 6-14 atomů uhlíku,
- PHA_{lcl}** s dlouhým řetězcem, které obsahují více než 14 atomů uhlíku.

Jako zástupce některých známých a běžně využívaných lze jmenovat, kromě již zmíněného PHB, také poly(3-hydroxyvalerát) (PHV), jehož postranní řetězec je tvořen etylovou skupinou, nebo také jeho kopolymer s PHB, poly(3-hydroxybutyrát-*co*-3-hydroxyvalerát) (PHBV). Chemická struktura zmíněných polymerů je na Obrázku 4.



Obrázek 4 Struktura některých polyhydroxyalkanoátů; upraveno dle Emaimo *et al.* (2022):

- a) poly(3-hydroxybutyrát), b) poly(3-hydroxyvalerát),
 c) poly(3-hydroxybutyrát-*co*-3-hydroxyvalerát)

2.2 Vlastnosti polyhydroxyalkanoátů

Polyhydroxyalkanoáty lze charakterizovat jako polymery nerozpustné ve vodě, odolné vůči UV záření, poměrně rezistentní vůči hydrolytické degradaci, zároveň jsou biokompatibilní a nepůsobí toxicky. Vlastnosti jednotlivých biopolymerů jsou však ovlivněny chemickou strukturou. PHA se středně dlouhým řetězcem se řadí mezi elastomery, PHA s krátkým řetězcem jsou krystalické a chovají se jako termoplasty (Bugnicourt *et al.*, 2014).

Polyhydroxybutyrát je často porovnáván s polypropylenem (PP), kvůli vlastnostem jako je vysoká teplota tání nebo relativně vysoká pevnost v tahu. Nevýhodou je však to, že při teplotě blízké jeho teplotě tání začíná degradovat, a oproti PP je PHB křehký. Pro dosažení požadovaných vlastností jsou často syntetizovány různé kopolymery s dalšími 3-hydroxyalkanoátovými jednotkami jako je PHBV (Bugnicourt *et al.*, 2014). Další modifikací může být přidavek plastifikátorů, kde lze jmenovat například estery kyseliny citronové, polyetylglykol, glycerol, 4-nonylfenol, estery kyseliny acetylsalicylové nebo mastné alkoholy (Emaimo *et al.*, 2022). V Tabulce 1 je uvedeno porovnání vybraných mechanických vlastností PHA s polypropylenem.

Tabulka 1 Porovnání vlastností vybraných polyhydroxyalkanoátů s polypropylenem; upraveno dle Rodriguez-Contreras (2019)

	PHB	PHBV (3%)*	PHB4HB (16%)**	PP
Teplota tání [°C]	177	145	152	176
Teplota skelného přechodu [°C]	4	-1	-8	-10
Pevnost v tahu [MPa]	40	32	26	38
Modul pružnosti v tahu [GPa]	3,5	1,2	-	1,7
Prodloužení při přetržení [%]	6	50	444	400

* procentuální zastoupení 3-hydroxyvalerátu v kopolyměru; ** procentuální zastoupení 4-hydroxybutyrátu v kopolyměru
Zkratky: poly(3-hydroxybutyrát) (PHB), poly(hydroxy-3-butyát-co-4-hydroxybutyrát) (PHB4HB),
poly(3-hydroxy-co-3-hydroxyvalerát) (PHBV), polypropylen (PP)

2.3 Využití polyhydroxyalkanoátů

Polyhydroxyalkanoáty jsou díky svým dobrým mechanickým vlastnostem, biokompatibilitě a biodegradabilitě považovány za atraktivní materiál pro mnohá odvětví, mezi něž patří především potravinářský průmysl nebo různé biomedicínské aplikace.

2.3.1 Potravinářský průmysl

Dle Statistického úřadu Evropské unie (Eurostat, 2023) bylo v roce 2021 v EU generováno celkově 84,3 milionu tun odpadu tvořeného obaly. Ty jsou však nezbytnou součástí potravinářského průmyslu, bez kterých by nebylo možné bezpečně a efektivně s potravinami manipulovat a distribuovat je (Clark *et al.*, 2014). Proto jsou biodegradabilní PHA pokládány za atraktivní alternativu k běžně užívaným polymerům petrochemického původu v oblasti jednorázových obalových materiálů.

Ve studii Haugaard *et al.* (2003) byly porovnávány obalové materiály z vysoko hustotního polyethylenu (HDPE) a PHB pro majonézu a pro simulant pomerančového džusu, kdy byl zkoumán vliv obalu na kvalitu výrobku. Výsledky ukázaly, že v obou případech vykazovalo PHB chování srovnatelné s HDPE. PHB je tedy vhodným kandidátem pro výzkum při použití jako obalu pro pasterizované i nepasterizované kyselé nápoje a potraviny s vysokým obsahem tuku. Obdobné mechanické vlastnosti vykazoval PHB vůči polypropylenu i v práci Bucci *et al.* (2005). Zde byl zkoumán i vliv na organoleptické kontaminace materiálem u margarínu, majonézy a taveného sýru. U potravin s vyšším obsahem vody bylo při sensorické analýze pozorováno zhoršení organoleptických vlastností. Ovšem jak vyplývá i z předchozí studie, jedná se o materiál vhodný pro potraviny s vysokým obsahem tuku. V další studii bylo zjištěno, že PHB a PHBV disponuje srovnatelnými

bariérovými vlastnostmi (propustnost vlhkosti, oxid uhličitý, organická rozpouštědla) jako polyethylentereftalát (PET) (Mishra, 2018). Xavier *et al.* (2015) sledovali antimikrobní vlastnosti vanilinu, který byl inkorporovaný do PHB filmu. Bylo zjištěno, že vanilin byl efektivní vůči plísním a bakteriím, které se běžně vyskytují v konzervovaných potravinách. Přídavkem vanilinu však došlo ke zhoršení mechanických vlastností a snížení teploty tání filmu. Tento materiál tak může být použit jako sekundární fólie přes primární polymerní obalovou vrstvu.

2.3.2 Biomedicínské aplikace

Pro biomedicínské aplikace je nutné, aby byl materiál biokompatibilní. Technická norma o biologickém hodnocení zdravotních prostředků (ČSN EN ISO 10993-1) definuje biokompatibilitu jako schopnost materiálu být při specifické aplikaci snášen živým systémem, přičemž musí dojít k odpovídající reakci příjemce. Tento předpoklad PHA splňují, což z nich dělá vhodný materiál pro tkáňové inženýrství a pro farmaceutické aplikace. Monomery PHB a PHBV jsou přirozeným metabolitem lidského organismu a mohou být štěpeny až na oxid uhličitý. Po implantaci *in vivo* u nich nebyla pozorovaná zánětlivá reakce, kalcifikace, nekróza okolní tkáně ani tvorba abscesů či tumorigeneze (Pulingam *et al.*, 2022). Na rozdíl od jiných polymerů využívaných v tkáňovém inženýrství, jako je například poly(ϵ -kaprolakton) nebo poly(mléčná kyselina), si PHA udržují lokálně konstantní pH i při degradaci, která probíhá kontrolovaně (Rodriguez-Contreras, 2019).

PHA mohou být použity k tvorbě scaffoldů a dalších medicínských prostředků, mezi které patří implantáty pojivové, srdeční, cévní či nervové tkáně, ale také sutury, stenty, náplasti, chirurgické sítě nebo biosenzory (Pulingam *et al.*, 2022). V současné době je také zkoumán jejich účinek při léčbě rakoviny, viru HIV nebo Alzheimerově chorobě (Ray a Kalia, 2017).

2.4 Biosyntetické dráhy produkce polyhydroxyalkanoátů

Polyhydroxyalkanoáty jsou v prokaryotických buňkách ukládány ve formě nerozpustných intracelulárních inkluzí, o velikosti mezi 100 až 500 nm. Ty jsou složeny z polymerního jádra a povrchové vrstvy strukturních a funkčních proteinů, které jsou označovány jako tzv. Granule-Associated proteins (GAPs) (Bresan *et al.*, 2016). Mezi GAPs patří například:

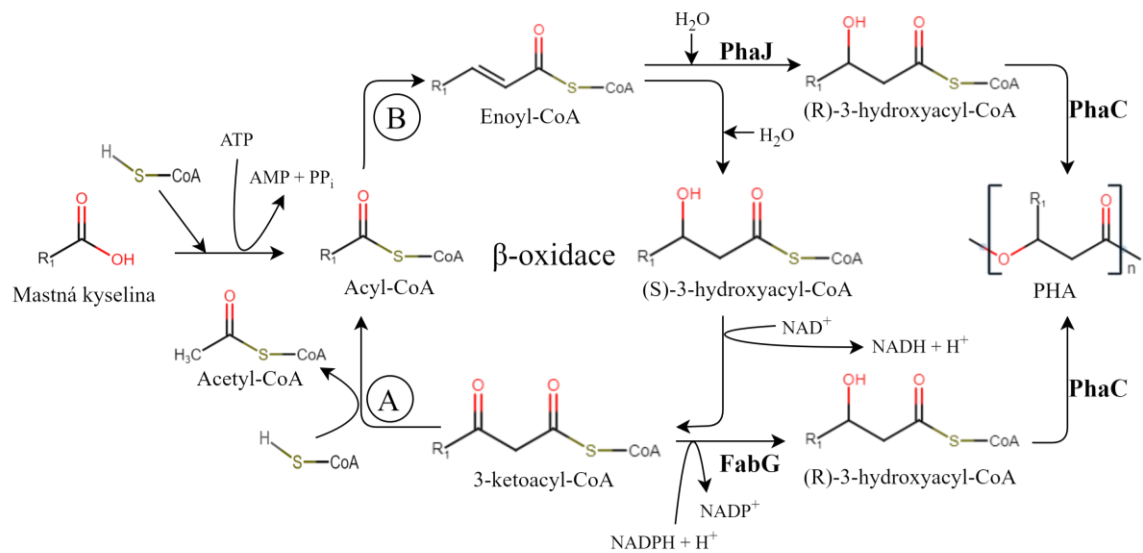
- a) **PHA syntáza** (PhaC) je enzym, který katalyzuje polymeraci PHA. Podle primární sekvence, substrátové specifity a kompozice jsou syntázy rozděleny do čtyř tříd. Třídy I, III a IV syntetizují PHA_{scI} a třída II je asociována s produkcí PHA_{mcI} (Zher Neoh *et al.*, 2022).
- b) **PHA depolymeráza** (PhaZ) je enzym, který je zodpovědný za degradaci inkluzí (Zher Neoh *et al.*, 2022).
- c) **Phasiny** (PhaP) jsou amfifilní strukturní proteiny, které stabilizují jednotlivé granule a brání tak jejich koalescenci (Grage *et al.*, 2009).
- d) **Regulační proteiny** (PhaR) přímo ovlivňují produkci phasinů a syntézu PHA (Maestro a Sanz, 2017).

Jejich biosyntéza představuje komplexní proces, jehož průběh úzce souvisí s dalšími metabolickými drahami, a je výrazně ovlivněn nutričními podmínkami. V prostředí, které je bohaté na živiny, je produkováno velké množství koenzymu A (CoA), čímž dochází k inhibici enzymu 3-ketothiolázy (PhaA). Díky tomu je acetyl-CoA přednostně směřován do Krebsova cyklu, kde je využíván k produkci energie a růstu buňky. Naopak, při nadbytku uhlíku a nedostatku živin, jako jsou dusík a fosfor, k inhibici PhaA nedochází, což umožňuje využití acetyl-CoA k tvorbě PHA (Tan *et al.*, 2014).

Dráhy pro syntézu prekurzoru (R)-3-hydroxyacyl-CoA lze rozdělit dle výchozího substrátu následovně:

- a) **Biosyntéza ze souvisejících zdrojů**, kde výchozí substrát je prekurzorem monomeru (např. mastná kyselina).
- b) **Biosyntéza z nesouvisejících zdrojů**, kde výchozí substrát není prekurzorem monomeru (např. glukóza).

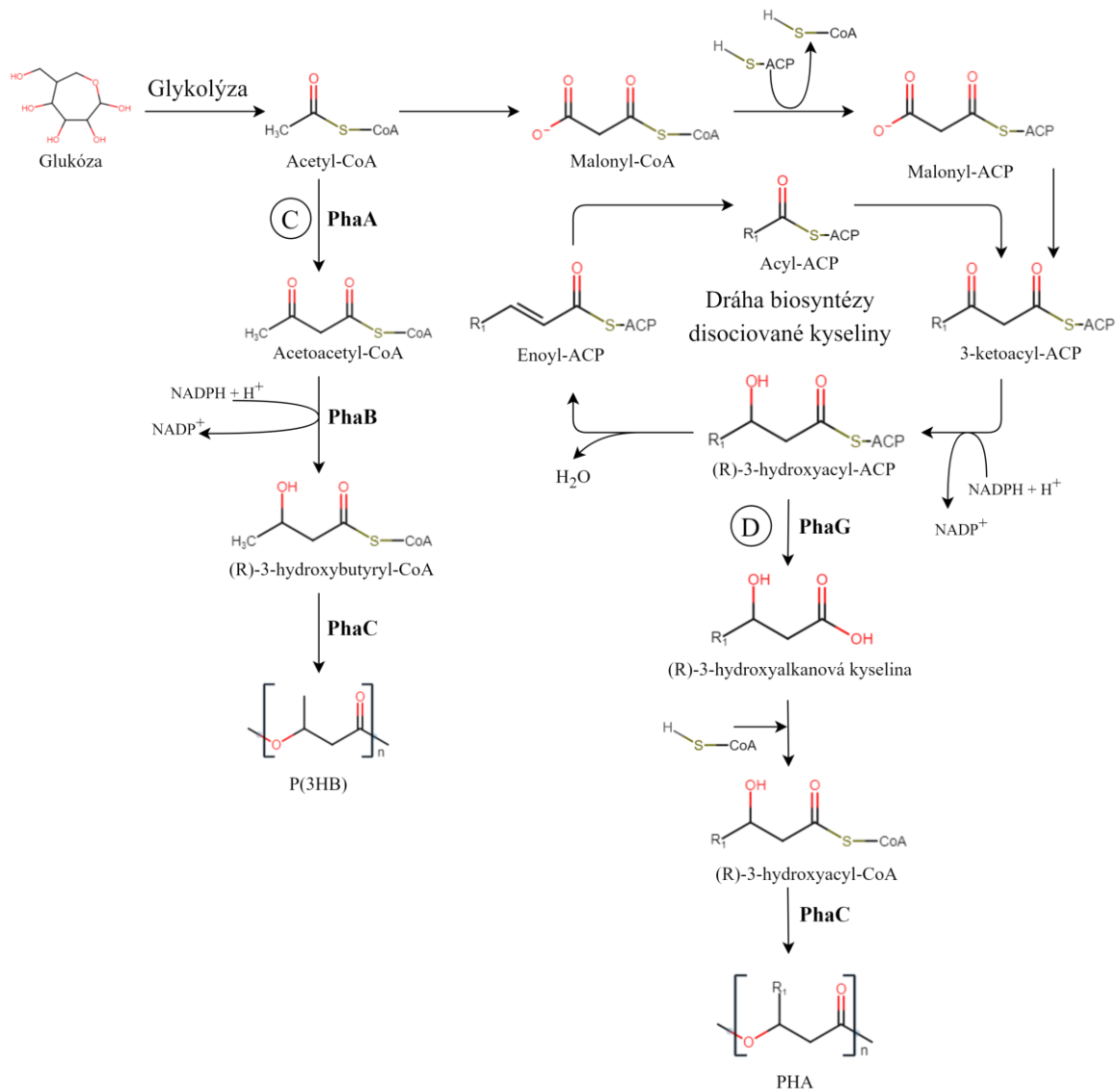
Jeden ze způsobů syntézy PHA z mastných kyselin je schematicky znázorněna na Obrázku 5. Mastná kyselina je aktivována acyl-CoA syntázou za spotřeby adenosintrifosfátu (ATP) a CoA. Acyl-CoA vstupuje do metabolické dráhy β -oxidace, vzniklé meziprodukty mohou být směřovány do syntézy PHA. V případě cesty A dochází k redukci 3-ketoacyl-CoA na (R)-3-hydroxyacyl-CoA za pomoci 3-ketoacyl reduktázy (FabG) (Nomura *et al.*, 2008). Cesta B popisuje hydrataci enoyl-CoA opět na (R)-3-hydroxyacyl-CoA za přítomnosti R-specifické enoyl hydratázy (PhaJ). PhaC poté katalyzuje polymeraci a vzniká příslušný polyhydroxyalkanoát (Tsuge *et al.*, 2000).



Obrázek 5 Biosyntéza ze souvisejících zdrojů; upraveno dle Máčalové *et al.* (2023).

Zkratky: adenosinmonofosfát (AMP), adenosintrifosfát (ATP), difosfát (PP_i), koenzym A (CoA), 3-ketoacyl reduktáza (FabG), nikotinamidadenindinukleotid (NAD^+), redukovaný nikotinamidadenindinukleotid (NADH), nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADPH), PHA syntáza (PhaC), R-specifická enoyl hydratáza (PhaJ)

Další možná syntetická dráha je popsána na Obrázku 6. Zdrojem uhlíku je glukóza, která je procesem glykolýzy přeměněna na acetyl-CoA. Cesta C zobrazuje přeměnu na acetoacetyl-CoA působením enzymu 3-ketothiolázy (PhaA). Následuje jeho redukce za přítomnosti NADPH (redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát) acetoacetyl-CoA reduktázou (PhaB) na (R)-3-hydroxybutyryl-CoA. PhaC katalyzuje polymeraci na PHB. Cesta D zahrnuje meziproducty syntézy disociované kyseliny. Před vstupem do této metabolické cesty je acetyl-CoA aktivován acetyl-CoA karboxylázou za spotřeby ATP na malonyl-CoA. Biosyntézy PHA se pak účastní meziproduct (R)-3-hydroxyacyl-ACP (acyl carrier protein, acyl přenášející protein), a působením hydroxyacyl-ACP specifické thioesterázy (PhaG) dochází ke vzniku (R)-3-hydroxyalkanové kyseliny. Kondenzací s acyl-CoA vzniká (R)-3-hydroxyacyl-CoA, který následně vlivem PhaC polymeruje na výsledný produkt (Nomura *et al.*, 2008).



Obrázek 6 Biosyntéza PHA z nesouvisejících zdrojů; upraveno dle Máčalové *et al.* (2023)

Zkratky: acyl-carrier protein (ACP), koenzym A (CoA), redukovaný nikotinamadeninukleotid (NADH), nikotinamadeninukleotidfosfát (NADPH), 3-ketothioláza (PhaA), acetoacetyl-CoA reduktáza (PhaB), PHA syntáza (PhaC), hydroxyacyl-ACP specifická thioesteráza (PhaG)

2.5 Organismy schopné produkce polyhydroxyalkanoátů

Syntéza PHA byla pozorována u více jak 300 druhů mikroorganismů při nadbytku zdroje uhlíku a nedostatku ostatních prvků jako jsou dusík či fosfor. Nejvíce známých producentů patří mezi gramnegativní bakterie. Kromě nich PHA využívají i některé grampozitivní bakterie nebo halofilní *Archaea* (Anjum *et al.*, 2016).

2.5.1 Prokaryota

Vnější membrána buněčné stěny gramnegativních bakterií obsahuje lipopolysacharidy (LPS), které se mohou během extrakce dostat i do polymeru. LPS mohou vyvolat zánětlivé

reakce, proto je pro aplikace v tkáňovém inženýrství nutné PHA následně purifikovat. Naopak buněčná stěna grampozitivních bakterií LPS, což je pro tyto aplikace výhodné (Raetz a Whitfield, 2002).

Produkce PHA_{sel} byla pozorována u rodů *Azohydeomonas*, *Burkholderia* a *Cupriavidus*. *C. necator* může jako substrát pro PHB lze využít například glukózu, fruktózu nebo různé oleje s výtěžkem PHB 67 až 88,9 %CDM (cell dry mass = hmotnost buněčné sušiny) (Tan *et al.*, 2014). U *Burkholderia* sp. byla sledována produkce až PHB 69 %CDM při metabolismu mastných kyselin (Chee *et al.*, 2010). Bakterie rodu *Pseudomonas* jsou typičtí producenti PHA_{mcl}. U *P. putida* byla detekována syntéza PHA_{mcl} z kyseliny kaprylové s výtěžkem PHA 83 %CDM (Fontaine *et al.*, 2017). Produkce PHB je schopný i *Saccharophagus degradans*, kdy jako zdroje uhlíku byl použitý Avicel, celulóza, CMC a Sigmacell s výtěžky PHB 11,8-14,6 %CDM (Sawant *et al.*, 2017). Degradaci celulózy byla syntéza PHA zjištěna také u *Bacillus cereus* (Cibichakravarthy *et al.*, 2017b).

Mezi známé producenty PHA patří i zástupci z domény *Archaea*, výhradně se jedná o halofily. U většiny haloarcheí je dosaženo velmi nízkých výtěžků, ovšem průmyslově zajímavou je *Haloferax mediterranei*, která je při koncentraci 2 až 5 M NaCl schopna utilizace PHA 50 až 76 %CDM (Bhattacharyya *et al.*, 2012).

Metodami genového inženýrství byl zvýšený výtěžek PHB například u *Cupriavidus necator* delecí genu kódující enzymy degradující PHA (Povolo *et al.*, 2010). Významným rekombinantním producentem PHA je také *Escherichia coli*, u které bylo dosaženo až 95 %CDM PHB a také produkce PHBV (Fidler, 1992).

2.5.2 Eukaryota

Pro produkci PHA byly geneticky modifikovány také některé kvasinky či rostliny. Z kvasinek lze zmínit rekombinantní *Saccharomyces cerevisiae*, u které byla detekována akumulace 2,68 %CDM PHB (Abd-El-haleem *et al.*, 2007). Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) byl upraven pomocí genů získaných z *Pseudomonas* sp., a produkoval kopolymery z PHB, PHV a poly(3-hydroxyhexanoátu) (PHHx) (Matsumoto *et al.*, 2006).

2.6 Metody detekce polyhydroxyalkanoátů

Pro primární screening je často využívána jednoduchá fenotypová metoda – barvení lipofilními barvivy. Jak již bylo dříve zmíněno, PHA jsou produkovány bakteriemi za nevyvážených nutričních podmínek, proto jsou typicky kolonie barveny na Petriho miskách

s médiem bohatým na zdroj uhlíku a deficitní na prvky jako fosfor, dusík či síra (Higuchi-Takeuchi *et al.*, 2016). Pro tyto účely jsou využívány barviva Nile Blue a Sudan Black. Granule PHA barvivo zadržují a po promytí přebytečného barviva z misky je lze vizuálně identifikovat. Po barvení Nile Blue jsou pozorované PHA inkluze pod UV zářením růžové. Při použití Sudan Black zůstávají kolonie producentů po opláchnutí ethanolem zbarvené černě (Solaiman a Ashby, 2005). Barevní bakterii může být provedeno také na podložním sklíčku a výsledek může být pozorován pod optickým mikroskopem (Mesquita *et al.*, 2015).

Při hledání nových potenciální producentů polyhydroxyalkanoátů jsou využívány i genotypové metody jako je polymerázová řetězová reakce (PCR). Obvykle jsou primery designovány specificky pro amplifikaci genu *PhaC*, který byl popsán v kapitole 2.4 (Solaiman a Ashby, 2005). Výhodou barvení a PCR je, že umožňují analýzu velkého počtu vzorků v krátkém časovém intervalu s relativně snadnou přípravou vzorků. Pokročilejší metodou je transmisní elektronová mikroskopie, která přímo vizualizuje granule PHA. Avšak tato technika vyžaduje časově náročnou přípravu vzorků a použití radioaktivních látek (Tan *et al.*, 2014).

Zmíněné metody však neposkytují detailní informace o množství ani o kvalitativním složení PHA. Pro tyto účely se využívají moderní analytické techniky, jako je infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR), kapalinová chromatografie a plynová chromatografie (Tan *et al.*, 2014).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce byl provést screening celulolytické aktivity u bakteriálních izolátů z potravin, a následně u celulolytických bakterií otestovat schopnost produkce polyhydroxyalkanoátů z glukózy, karboxymethylcelulózy (CMC) a mikrokrystalické celulózy (Avicel, MCC).

Jednotlivé části práce zahrnovaly:

- literární rešerši;
- screening celulolytické aktivity;
- mikroskopickou detekci produkce PHA pomocí lipofilního barviva Sudan Black.

4 MATERIÁL

4.1 Laboratorní přístroje

Běžné laboratorní pomůcky a laboratorní sklo

Biohazard box EUROFLOW	Schoeller, Brno, Česká republika
Fotoaparát Canon EOS 1100D	Canon, Tokio, Japonsko
Optický mikroskop Olympus CX41	Olympus, Tokio, Japonsko
Software QuickPHOTO Micro 3.2	Promicra, Praha, Česká republika

4.2 Chemikálie

Aceton	Penta, Chrudim, Česká republika
Agar	Himedia, Mumbai, Indie
Avicel	Merck, Darmstadt, Německo
Bacto Marine Broth	Merck, Darmstadt, Německo
Brain Heart Infusion Broth	Merck, Darmstadt, Německo
CMC	Merck, Darmstadt, Německo
Sudan Black	Penta, Chrudim, Česká republika
Ethanol	Penta, Chrudim, Česká republika
Glukóza	Merck, Darmstadt, Německo
K_2HPO_4	Lach:ner, Neratovice, Česká republika
KCl	Lach:ner, Neratovice, Česká republika
KH_2PO_4	Lach:ner, Neratovice, Česká republika
Krystalová violet'	Penta, Chrudim, Česká republika
Lugolův roztok	Lach:ner, Neratovice, Česká republika
M-17 Broth	Merck, Darmstadt, Německo
$MgSO_4$	Lach:ner, Neratovice, Česká republika
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	Lach:ner, Neratovice, Česká republika
$Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$	Lach:ner, Neratovice, Česká republika
$NaNO_3$	Lach:ner, Neratovice, Česká republika
$(NH_4)_2SO_4$	Lach:ner, Neratovice, Česká republika
Pepton	Merck, Darmstadt, Německo
Safranin	Himedia, Mumbai, Indie
Xylen	Penta, Chrudim, Česká republika

4.3 Kultivační média

Zamražené bakteriální kultury byly inokulovány do bujónu mozково-srdečné infuze (Brain Heart Infusion, BHI), respektive do bujónu M-17, dle kultivačních podmínek pro daný kmen, které jsou uvedeny v Tabulce 8. Složení médií je uvedeno v Tabulkách 2 a 3. Finální pH pro BHI odpovídá $7,4 \pm 0,2$ a pro M-17 je $7,1 \pm 0,2$.

Po 48 h kultivace byly mikroorganismy zaočkovány na příslušnou pevnou půdu (s přídatkem agaru 15 g/l) na které byly po celou dobu experimentu uchovávány.

Tabulka 2 Složení BHI bujónu

Složení	Množství [g/l]
Pepton	10
Výtažek z hovězího srdce	10
Výtažek z telecího mozku	7,5
NaCl	5
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	2,5
Glukóza	2
Destilovaná voda	do 1000 ml

Tabulka 3 Složení M-17 bujónu

Složení	Množství [g/l]
Glycerofosfát sodný	19
Laktóza	5
Masový extrakt	5
Sójový pepton	5
Pepton	2,5
Trypton	2,5
Kvasnicový extrakt	2,5
Kyselina askorbová	0,5
MgSO_4	0,25
Destilovaná voda	do 1000 ml

Saccharophagus degradans byl po celou dobu uchováván na půdě poloviční Bacto Marine (Half strength Bacto Marine, ½ MB) určené pro kultivaci heterotrofních mořských bakterií. Její složení je popsáno v Tabulce 4 a výsledné pH bylo $7,6 \pm 0,2$.

Tabulka 4 Složení Half strength Bacto Marine (½ MB) agar

Složení	Množství [g/l]
NaCl	9,725
Bacto pepton	2,5
MgCl ₂	2,95
Na ₂ SO ₄	1,62
CaCl ₂	0,9
Kvasnicový extrakt	0,5
KCl	0,275
NaHCO ₃	0,08
Citronan železitý	0,05
KBr	0,04
SrCl ₂	0,017
H ₃ BO ₃	0,011
Na ₂ HPO ₄	0,004
Na ₂ SiO ₃	0,002
NaF	0,0012
(NH ₄)NO ₃	0,0008
Agar	15
Destilovaná voda	do 1000 ml

Pro screening celulolytické aktivity potravinových izolátů byl připraven agar s obsahem CMC, jehož složení je uvedeno v Tabulce 5. Výsledné pH půdy bylo $7,4 \pm 0,2$.

Tabulka 5 Složení CMC agaru

Složení	Množství [g/l]
CMC	2
NaNO ₃	2
K ₂ HPO ₄	1
KCl	0,5
MgSO ₄	0,5
Pepton	0,2
Agar	17
Destilovaná voda	do 1000 ml

Minerální CN agar byl využíván pro screening PHA produkujících bakterií. Jako zdroje uhlíku byl testován Avicel, CMC a glukóza, složení je popsáno v Tabulce 6, finální pH odpovídalo $7,2 \pm 0,2$. Součástí CN agaru byl také roztok stopových prvků (Tabulka 7).

Tabulka 6 Složení minerálního CN agaru

Složení	Množství [g/l]
Avicel/CMC/glukóza	20
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	11,1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3
KH_2PO_4	1,05
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2
Roztok stopových prvků (MES)	1 ml/l
Agar	15
Destilovaná voda	do 1000 ml

Tabulka 7 Složení roztoku stopových prvků (MES)

Složení	Množství [g/l]
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	9,7
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	7,8
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,156
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,119
$\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,118
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,1
0,1 M HCl	do 1000 ml

4.4 Mikroorganismy

Pro praktickou část bakalářské práce byly použity izoláty z potravin poskytnuté Ing. Danielou Máčalovou. Ty byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF). Kmeny, jejichž skóre z MALDI-TOF odpovídalo ≤ 2 , byly identifikovány pomocí sekvence ribozomální ribonukleové kyseliny, která je součástí malé podjednotky prokaryotického ribozomu (16S rRNA) a porovnáním s knihovnou (Máčalová *et al.*, 2023). *Saccharophagus degradas* sloužil jako pozitivní kontrola a jako negativní kontrola byl použit transgenní kmen *Escherichia coli* DH5 α . Testované mikroorganismy, včetně jejich označení, původu, způsobu kultivace, skóre z MALDI a BLAST shody, jsou uvedeny v Tabulce 8.

Tabulka 8a Seznam testovaných mikroorganismů, včetně jejich původu, způsobu kultivace a identifikace

Mikrobiální druh	Označení kultur	Původ	Způsob kultivace			MALDI skóre	BLAST podobnost
			Teplota [°C]	Půda	Vztah ke kyslíku		
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	-	37	BHI	aerobní	-	-
<i>Saccharophagus degradans</i>	SD	-	30	½ MB	aerobní	-	-
<i>Bacillus velezensis</i>	D11	cibule	37	BHI	aerobní	≤2	100%
<i>Pseudomonas</i> sp.	D28	kedlubna	30	M17	aerobní	≤2	99,92%
<i>Bacillus</i> sp.	D31	římský salát	30	BHI	anaerobní	≤2	100,00%
<i>Priestia megaterium</i>	D32	římský salát	30	BHI	anaerobní	≤2	99,92%
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	D37	římský salát	37	BHI	aerobní	2,176	-
<i>Staphylococcus succinus</i>	D55	bílé zelí	30	M17	aerobní	≤2	99,92%
<i>Pseudomonas putida</i>	D68	chilli paprička	37	BHI	aerobní	≤2	99,91%
<i>Pseudomonas</i> sp.	D100	okurka	30	BHI	aerobní	≤2	99,92%
<i>Mammaliococcus sciuri</i>	D111	okurka	37	BHI	aerobní	≤2	99,77%
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	D117	česnek	30	BHI	aerobní	≤2	100,00%
<i>Pseudomonas marginalis</i>	D124	česnek	30	M17	aerobní	2,001	-
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	D171	salát	37	BHI	aerobní	≤2	100,00%
<i>Pseudomonas</i> sp.	D183	broskev	30	BHI	aerobní	≤2	99,24%
<i>Priestia megaterium</i>	D199	ředkev	30	BHI	anaerobní	≤2	99,92%
<i>Priestia megaterium</i>	D201	ředkev bílá	30	BHI	anaerobní	≤2	99,77%
<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	D214	ředkev bílá	30	BHI	aerobní	2,023	-

Tabulka 8b Seznam testovaných mikroorganismů, včetně jejich původu, způsobu kultivace a identifikace

Mikrobiální druh	Označení kultur	Původ	Způsob kultivace			MALDI skóre	BLAST podobnost
			Teplota [°C]	Půda	Vztah ke kyslíku		
<i>Pseudomonas</i> sp.	D220	kopr	30	M17	aerobní	≤2	99,53%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	D221	ředkev bílá	30	M17	aerobní	≤2	100,00%
<i>Pseudomonas</i> sp.	D228	pórek	30	BHI	aerobní	≤2	99,91%
<i>Escherichia coli</i>	F77	jarní cibulka	37	BHI	aerobní	≤2	99,91%
<i>Escherichia coli</i>	II/2	bažant	37	BHI	aerobní	2,229	-

5 METODIKA

5.1 Celulolytická aktivita

Metodou dle Kasana *et al.* (2008) byl proveden screening celulolytické aktivity u mikroorganismů izolovaných z potravin.

Bylo připraveno kultivační médium s obsahem karboxymethylcelulózy o složení podle Tabulky 5. Mikroorganismy byly kultivovány po dobu 7 dní při podmínkách uvedených v Tabulce 8.

Plotna s CMC agarem byla zalita Lugolovým roztokem, který tvoří fialovo-černý komplex s celulózą, nikoliv však s hydrolyzovanou celulózą. Po 5 minutách působení byl přebytek barviva spláchnutý destilovanou vodou. Následně byla odečtena velikost (průměr) výsledné zóny a velikost nárůstu inokulovaného mikroorganismu. Poté byl stanoven enzymatický index (E_i) podle Ferbiyanto *et al.* (2015) dle Rovnice 1:

$$E_i = \frac{\text{průměr zóny} - \text{průměr biomasy}}{\text{průměr zóny}} \quad (1)$$

Test byl proveden celkem ve čtyřech opakováních.

5.2 Detekce polyhydroxyalkanoátů metodou barvení

Celulolyticky aktivní mikroorganismy byly kultivovány 72h na minerálním CN agaru se zdrojem uhlíku Avicelm, CMC nebo glukózou (Tabulka 6) za podmínek uvedených v Tabulce 8. Metodou dle (Mesquita *et al.*, 2015) byla sledována produkce inkluzí PHA pomocí lipofilního barviva Sudan Black.

Na podložním skličku byla v kapce destilované vody rozsuspendována a rozetřena bakteriální biomasa, ta se nechala na vzduchu vysušit a poté byla protažením kahanem zafixována. Preparát byl zakápnutý 3% roztokem Sudan Black v 96% ethanolu, barvivo se nechalo působit po dobu 10 minut, následně bylo propláchnuto xylenem a opět se nechalo na vzduchu oschnout. Dále byl preparát barven 5% roztokem safraninu ve 42% vodném roztoku ethanolu. Přebytečné barvivo bylo smyto destilovanou vodou. Vysušený vzorek byl poté pozorován při použití 100x objektivu s imerzním olejem pomocí optického mikroskopu Olympus CX41 a kamery Canon EOS 1100D. Obrazová analýza byla provedena v programu QuickPHOTO Micro 3.2.

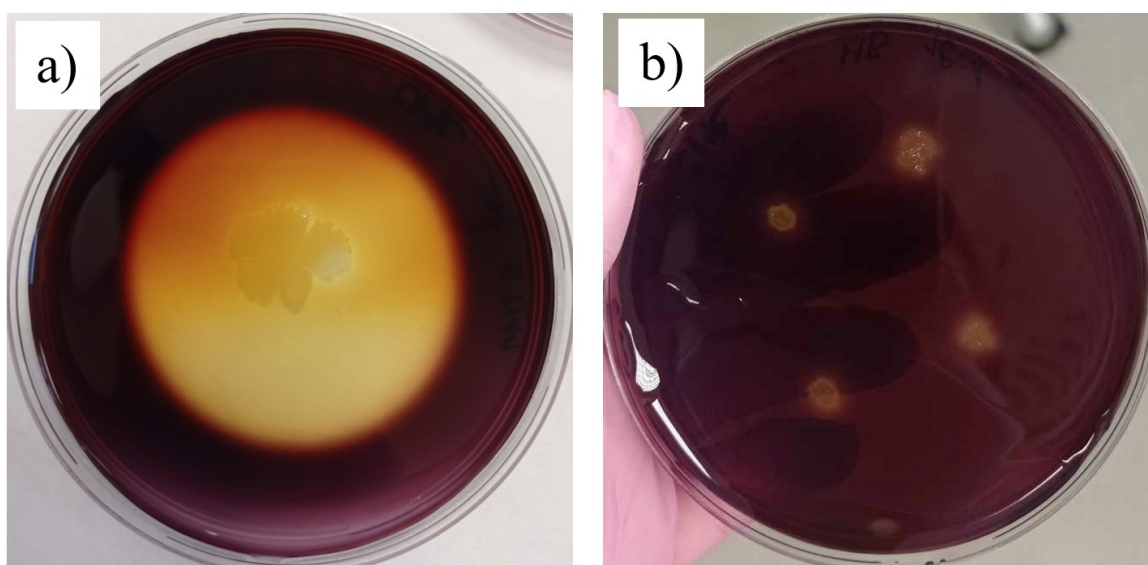
Test byl proveden ve dvou opakováních.

6 VÝSLEDKY A DISKUSE

6.1 Celulolytická aktivita

Z celkem 21 testovaných bakteriálních izolátů byla celulolytická aktivita pozorována u 8 z nich. Konkrétně se jedná o následující kmeny: *Acinetobacter calcoaceticus* (D171), *Bacillus* sp. (D31), *Bacillus velezensis* (D11), *Lysinibacillus fusiformis* (D117), *Priestia megaterium* (D32, D199, D201) a *Pseudomonas oryzae* (D37).

Na Obrázku 7 je zobrazený pozitivní výsledek zkoušky u bakterie *Bacillus velezensis* (D11), kde je patrná zóna, která značí hydrolyzu celulózy. Dále je na obrázku také negativní výsledek pozorovaný u *Escherichia coli* DH5 α .



Obrázek 7 Výsledky měření celulolytické aktivity na CMC agaru pro
a) *Bacillus velezensis* D11 (+), b) *Escherichia coli* DH5 α (-)

Výše zmíněné bakterie produkují celulázy schopné rozkládat karboxymethylcelulózu. Přítomné enzymy se tak řadí mezi endoglukanázy a β -glukosidázy, které jsou aktivní vůči ve vodě rozpustným formám celulózy, jako je právě CMC (Sharma *et al.*, 2016). Je také patrné, že enzymy jsou sekretovány extracelulárně a jsou zodpovědné za hydrolyzu celulózy na monosacharidy, které již s Lugolovým roztokem netvoří fialovo-červený komplex (Kasana *et al.*, 2008).

Celulázy se řadí mezi induktivní enzymy, což znamená, že jejich aktivita se zvyšuje, když je organismus vystaven prostředí bohatému na celulózu, jako je například rostlinný materiál (Kasana *et al.*, 2008). Produkci celuláz lze tedy vysvětlit adaptací bakterií na biotop, kdy v tomto případě jde o izoláty ze zeleniny, a to konkrétně z cibule, česneku, ředkve a salátu.

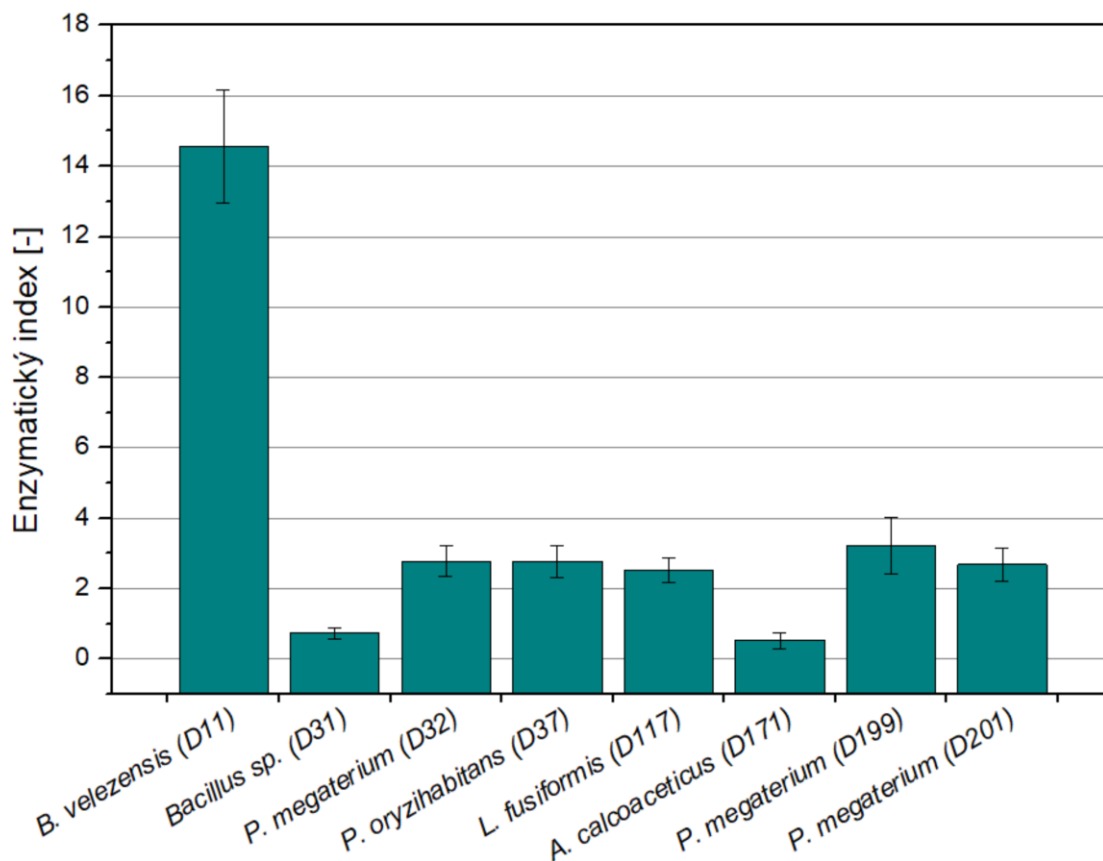
Reddy a Rhim (2018) uvádí obsah celulózy ve slupce cibule jako 45 % a ve slupce česneku jako 50 %. Dle práce Sanchez-Salvador *et al.* (2022) bylo procentuální zastoupení celulózy v salátu určeno jako 17,7 %. Přesné složení zeleniny je však silně ovlivněno odrůdou a podmínkami pěstování.

Průměrné velikosti biomasy a zón pro všechny testované bakterie s prokázanou celulolytickou aktivitou jsou uvedeny v Tabulce 9. Pro vyjádření celulolytické aktivity byl vypočten enzymatický index (Rovnice 1), jehož výsledky jsou také zaznamenány v Tabulce 9. Všechny hodnoty jsou psány jako průměr \pm směrodatná odchylka průměru ze všech čtyř měření.

Tabulka 9 Výsledky měření celulolytické aktivity, enzymatický index

Mikrobiální druh	Označení	Průměr biomasy [mm]	Průměr zóny [mm]	Enzymatický index [-]
<i>B. velezensis</i>	D11	6,0 \pm 0,7	90,0 \pm 0,1	14,6 \pm 1,6
<i>Bacillus</i> sp.	D31	8 \pm 1	14 \pm 2	0,73 \pm 0,14
<i>P. megaterium</i>	D32	8,0 \pm 0,4	30 \pm 3	2,8 \pm 0,4
<i>P. oryzihabitans</i>	D37	5,7 \pm 1,0	20,3 \pm 1,6	2,8 \pm 0,5
<i>L. fusiformis</i>	D117	10,0 \pm 0,7	34,5 \pm 0,7	2,5 \pm 0,3
<i>A. calcoaceticus</i>	D171	41 \pm 6	59,0 \pm 2,0	0,5 \pm 0,2
<i>P. megaterium</i>	D199	8,0 \pm 1,1	31,5 \pm 2,0	3,2 \pm 0,8
<i>P. megaterium</i>	D201	8,8 \pm 1,6	30,3 \pm 1,7	2,7 \pm 0,5

Na Obrázku 8 je graficky znázorněna hodnota enzymatického indexu pro všechny testované mikroorganismy s celulolytickou aktivitou, které budou dále v textu podrobněji diskutovány.



Obrázek 8 Enzymatický index celulolytických bakterií

6.1.1 Čeleď *Bacillaceae*

Bacillaceae jsou čeleď grampozitivních, aerobních nebo fakultativně anaerobních, heterotrofních, tyčinkovitých bakterií, které mohou tvořit endospory. Aby se přizpůsobily různým ekologickým nikám, produkují široké spektrum enzymů, včetně těch, které jsou zodpovědné za hydrolýzu celulózy (Arsov *et al.*, 2021). Do této čeledi spadají izoláty *Bacillus* sp. (D31), *Bacillus velezensis* (D11), *Lysinibacillus fusiformis* (D117) a *Priestia megaterium* (D32, D199, D201).

Nejvyšší celulolytickou aktivitu ($E_i = 14,6$) vykazoval *Bacillus velezensis* (D11), který je široce rozšířený v životním prostředí. Bylo pozorováno, že podporuje růst rostlin, dále také řada kmenů potlačuje růst rostlinné patogenní mikroflóry, díky produkci biologicky aktivních sekundárních metabolitů (Rabbee *et al.*, 2019). Zhang *et al.* (2023) izoloval z trávicího ústrojí termitů *B. velezensis* a podrobil jej analýze genomu. Byly objeveny geny,

kteří se podílejí na degradaci celulózy, které zahrnují 6-fosfo- β -glukosidázu, β -glukosidázu, 6-fosfo- α -glukosidázu, endo-1,4- β -glukanázu a β -1,3(4)-glukanázu. Sekvenací genomu byly identifikovány u *B. velezensis* enzymy 6-fosfo- β -glukosidáza, 6-fosfo- α -glukosidáza, endo-1,4- β -glukanáza a β -1,3(4)-glukanáza také v práci Chen *et al.* (2023). U izolátu získaného z termálního pramene sledoval Sarangthem *et al.* (2023) na CMC agaru s kongo červení tvorbu zón o velikosti 15–22 mm.

Srovnatelný enzymatický index v rozmezí 2,5–3,2 mají bakterie *Lysinibacillus fusiformis* (D117), *Priestia megaterium* (D32, D199, D201) a *Pseudomonas oryzae* (D37). Poslední zmíněný však nepatří do čeledi *Bacillaceae*, proto bude diskutován až v následující podkapitole.

Lysinibacillus fusiformis je považována za přirozeně se vyskytující bakterii, izolovaná byla například z odpadních vod, zemědělské půdy nebo rostlin. Patří také mezi podmíněně patogenní mikroorganismy (Sulaiman *et al.*, 2018). Přítomnost genů kódující celulólytické enzymy u *L. fusiformis* popisuje Pudova *et al.* (2018). Mahalik *et al.* (2018) uvádí tvorbu zón na CMC agaru *Lysinibacillus* sp. po barvení Kongo červení. Ve studii skupiny Safika *et al.* (2018) byla sledována zóna 20 mm u izolátu *L. fusiformis* z hovězího bachoru. Celulólytickou aktivitu popisuje také Silva *et al.* (2015), která uvádí u ovocného izolátu *L. fusiformis* zónu o velikosti 1,3–2,1 mm. Tentokrát byl však pro screening použitý Lugolův roztok, tedy stejná metoda která byla testována v této práci.

Priestia megaterium je ubikvitní bakterie, typicky je izolována z půdy, vody a rostlin (Biedendieck *et al.*, 2021). V důsledku toho je její metabolismus přizpůsoben různým zdrojům uhlíku, včetně cellobiosy a lignocelulózy (Youngster *et al.*, 2017). U *P. megaterium* pocházející z odpadních vod byla pozorována tvorba projasněné zóny v rozmezí 10–15 mm při použití plotnové metody s CMC (Al-Gheethi, 2015). Stejným způsobem byla sekrece celulólytických enzymů u *P. megaterium* pozorována i v práci Shakoor *et al.* (2013). Ti také provedli kvantitativní analýzu aktivity enzymů, která je definována jako množství enzymu potřebného na uvolnění 1 μ m glukózy za minutu. Výsledná aktivita celulólytických enzymů odpovídala 216 U/ml.

Nejnižší aktivitou ($E_i = 0,5–0,73$) se vyznačovali *Acinetobacter calcoaceticus* (D171) a *Bacillus* sp (D11). *A. calcoaceticus* bude blíže diskutován v kapitole 6.1.3.

V případě rodu *Bacillus* byla přítomnost celuláz, kromě již zmíněného *B. velezensis*, pozorována také u *B. cereus*. Při použití CMC byla aktivita vyhodnocena jako 1,8 U/ml,

z Avicelu jako 0,048 U/ml. Z tohoto srovnání vyplývá, že *B. cereus* produkuje endoglukanázu, ale sekrece exoglukanázy a β -glukosidázy je minimální, jinak řečeno, enzymy téměř nerozkládaly krystalické formy celulózy (Chantarasiri, 2015).

6.1.2 Rod *Pseudomonas*

Jak již bylo zmíněno výše, enzymatický index *Pseudomonas oryzae* (D37) byl srovnatelný s *L. fusiformis* (D117) a *P. megaterium* (D32, D199, D201), konkrétně s hodnotou 2,8. *P. oryzae* je gramnegativní, aerobní, půdní a saprofytická tyčinka, která je vzácnou příčinou lidských infekcí (Panagopoulos *et al.*, 2016). Qin *et al.* (2013) z *P. oryzae* purifikoval synergický nehydrolytický protein POEP1, který podporuje rozklad celulózy. Dle databáze UniProt (2016) také produkuje endoglukanázu.

Barvením Kongo červení byla hydrolýza celulózy pozorována u *P. medocina* (Zhang *et al.*, 2016). Stejně tak byla pozitivně testována i *P. stutzeri*, u které byly také identifikovány geny kódující endoglukanázu a glykosidázu (Al Makishah a Elfarash, 2022).

6.1.3 Rod *Acinetobacter*

Acinetobacter patří do skupiny gramnegativních, striktně aerobních bakterií tyčinkového tvaru. V životním prostředí je široce rozšířený, izolován byl například z půdy, vody, odpadních vod, živých organismů a z potravin (Poduch a Kotra, 2007; Bergogne-Bérézin, 2014; Barbe, 2004). *A. calcoaceticus* je podmíněně patogenní a je původce nozokomiálních nálezů u hostitelů s citelně oslabeným organismem (Libich *et al.*, 1990).

Enzymatický index *A. calcoaceticus* (D171) odpovídal 0,5 a jeho aktivita byla porovnatelná s tou, kterou vykazoval *Bacillus* sp. (D11). V literatuře nebyla u tohoto kmenu doposud přítomnost celuláz popsána. Proto se pravděpodobně jedná o první práci dokazující jeho celulolytickou aktivitu. Ovšem Karthika *et al.* (2020) pozorovali celulázovou aktivitu u *A. baumannii*, který byl izolován z kompostovatelného papírového kelímku. Na CMC agaru uvádí tvorbu zóny o velikosti 13 mm, při použití barviva Kongo červení. Produkce celuláz byla v této práci také popsána kvantitativně. Hodnoty byly následující: exoglukanázu 2,14 U/ml, pro endoglukanázu 1,68 U/ml a pro β -glukosidázu 1,72 U/ml. Pozitivně testovaným druhem byl také *A. anitratus*, jehož β -glukosidázová aktivita nabývala hodnot 0,48 U/ml (Epkeringin, 2007).

6.2 Detekce biosyntézy polyhydroxyalkanoátů

Mikroorganismy s prokázanou celulólytickou aktivitu, byly kultivovány na minerálních půdách s glukózou, karboxymethylcelulózou a mikrokrytalickou celulózou jako jedinými zdroji uhlíku. Po 72 h inkubace byly pozorovány kolonie na všech typech půd u *Acinetobacter calcoaceticus* (D171), *Bacillus velezensis* (D11), *Lysinibacillus fusiformis* (D117) a *Priestia megaterium* (D32, D199, D201). Bakterie *Pseudomonas oryzae* (D37) rostla pouze v přítomnosti glukózy a MCC, nikoliv však CMC. *Bacillus* sp. (D31) nerostl na žádném ze zvolených substrátů. Pravděpodobně tedy *Bacillus* sp. (D31) a *P. oryzae* (D37) tyto substráty nedokáží využívat jako jediný zdroj uhlíku.

Intracelulární inkluze PHA obarvené Sudan Black byly sledovány u všech tří izolátů *Priestia megaterium* (D32, D199, D201) a u *Lysinibacillus fusiformis* (D117). Tyto bakterie jako zdroj uhlíku pro syntézu PHA využívají glukózu, karboxymethylcelulózu i mikrokrytalickou celulózu a budou více diskutovány v následujících podkapitolách.

Je také důležité zmínit, že hlavní výhodou čeledi *Bacillaceae* je nepřítomnost endotoxinů ve vnější membráně, díky čemuž je takto získaná PHA vhodná pro lékařské aplikace (Tan *et al.*, 2014).

Máčalová *et al.* (2023) popisuje vhodnou genetickou vybavenost *A. calcoaceticus* pro syntézu PHA_{scl} jak ze souvisejících, tak z nesouvisejících zdrojů. To bylo také v práci ověřeno fenotypovým testem, kde se jako vhodný zdroj uhlíku prokázala fruktóza, kyselina propionová a slunečnicový olej. Dále byl také testován substrát z glukózy, kdy produkce PHA nebyla pozorována, což odpovídá i výsledkům v této práci.

Pro PHA produkující zástupce čeledi *Pseudomonadaceae* je typická přítomnost PHA syntázy II třídy, která je spojována s metabolismem PHA_{mcl} obvykle z mastných kyselin (Sikkema *et al.*, 2023). Na základě výsledků našeho měření a srovnáním s literaturou se však kmen *P. oryzae* (D37) patrně řadí do skupiny PHA neprodukcujících pseudomonád.

6.2.1 Rod *Lysinibacillus*

Černě obarvené granule polyhydroxyalkanoátů u *Lysinibacillus fusiformis* (D117) jsou vyobrazené na Obrázku 9, šipkami jsou některé z nich zvýrazněné. Za nepříznivých podmínek může docházet k tvorbě endospor, které jsou pozorovatelné u *L. fusiformis* (D117) ze substrátu s CMC (b) a MCC (c) (Sulaiman *et al.*, 2018). Endospory velmi špatně přijímají

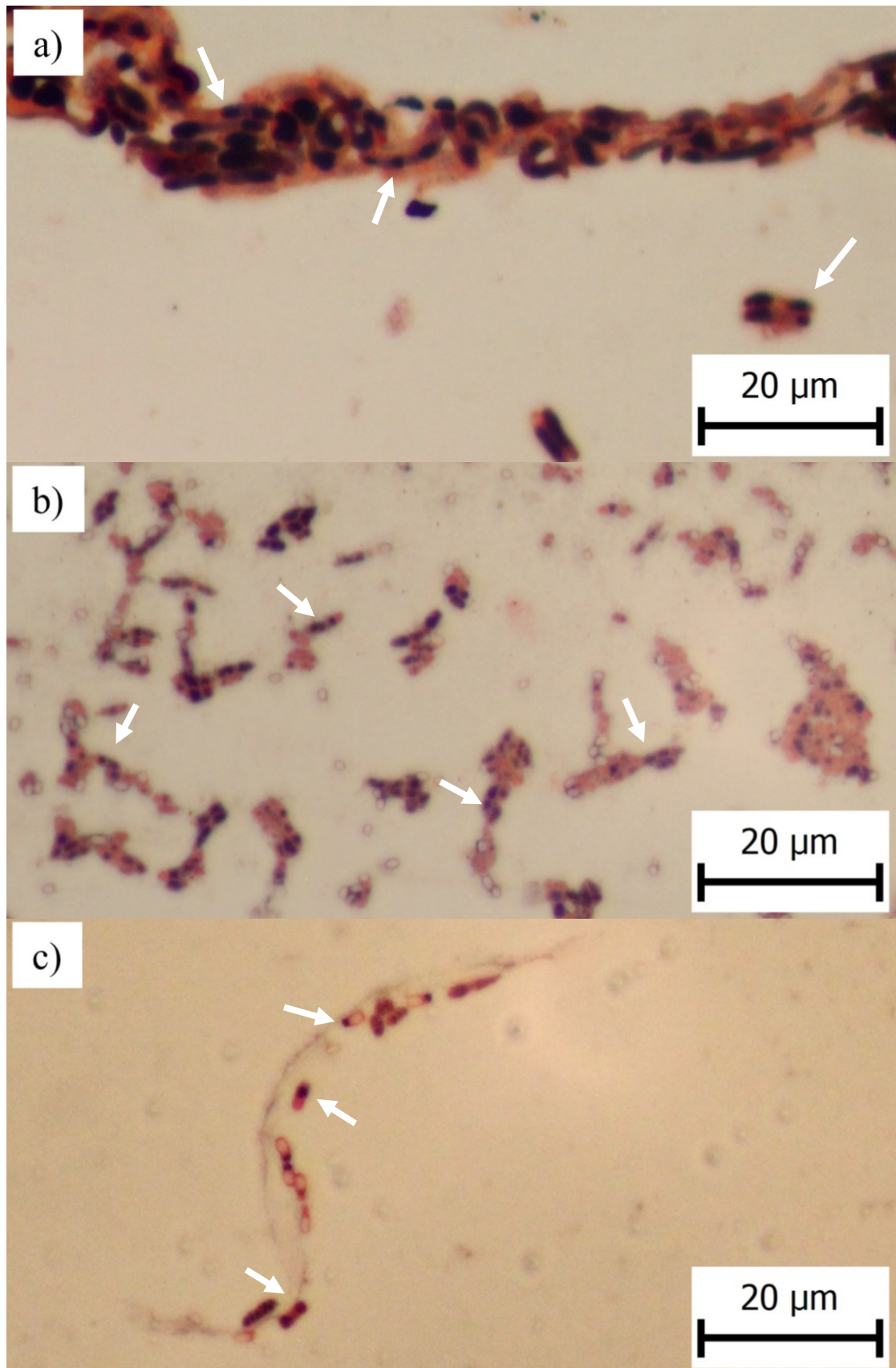
barviva, proto je na následujících snímcích patrný rozdíl mezi safraninem obarvenou buněčnou stěnou a sporou (Kopecká a Rotková, 2017).

Syntéza PHB u *L. fusiformis* z glukózy byla zaznamenána již v práci Edilane *et al.* (2016). Užití glukózy, a dalších sacharidů jako je celobióza, laktóza a sacharóza, byla popsána i Shokr *et al.* (2023). Adebajo *et al.* (2021) potvrdil u *Lysinibacillus* sp. přítomnost PHA syntázy a genotypově pozoroval produkci kopolymeru PHA z cukrové třtiny (Saratale *et al.*, 2021).

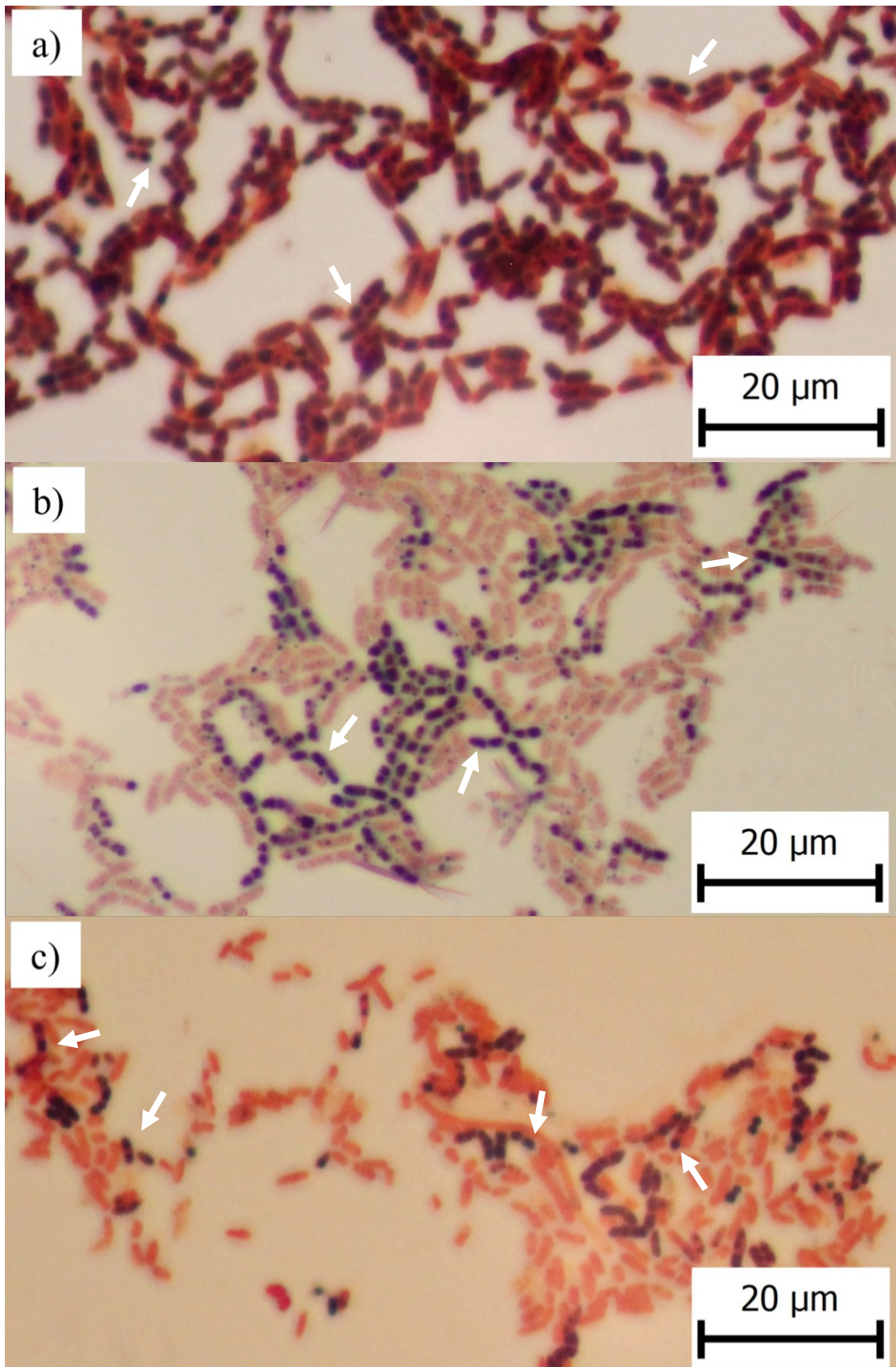
6.2.2 *Priestia megaterium*

Priestia megaterium patří mezi známé producenty polyhydroxyalkanoátů. U *P. megaterium* byl kromě klíčové PHA syntázy, objeven také gen *PhaB*, který se podílí na metabolismu PHA z nesouvisejících zdrojů (Obrázek 6) (Lee *et al.*, 2004; McCool a Cannon, 2001). To koresponduje s výsledky měření v této práci, kdy u všech tří izolátů *P. megaterium* (D32, D199, D201) byly pod mikroskopem pozorovány intracelulární granule PHA syntetizované z glukózy, CMC i MCC (Obrázek 10). Některé inkluze jsou na obrázku zvýrazněné šipkami. Užití CMC a MCC byla možná díky schopnosti bakterie tyto substráty hydrolyzovat až na glukózu, jak již bylo popsáno v podkapitole 6.1.1.

Literatura uvádí, že *P. megaterium* produkuje PHB ze sacharidů a PHBV například z kyseliny propionové a valerové (Tsuge *et al.*, 2015). Zároveň byla pozorována syntéza PHB z lignocelulózy biomasy (Khomlaem *et al.*, 2023). Kumar *et al.* (2023) popisují využití různých polysacharidů, včetně celulózy konsorciem *P. megaterium* a *Streptomyces* sp., na tvorbu PHA.



Obrázek 9 Intracelulární inkluze PHA obarvené Sudan Black u *Lysinibacillus fusiformis* (D117) se zdrojem uhlíku: a) glukóza, b) CMC, c) MCC. Vybrané granule PHA jsou zvýrazněny šipkou.



Obrázek 10 Intracelulární inkluze PHA obarvené Sudan Black u *Priestia megaterium* (D32) se zdrojem uhlíku a) glukóza, b) CMC, c) MCC. Vybrané granule PHA jsou zvýrazněny šipkou.

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo z 21 potravinových izolátů vybrat bakterie s celulolytickou aktivitou, a u těchto mikroorganismů testovat, zda jsou schopné biosyntézy polyhydroxyalkanoátů z glukózy, karboxymethylcelulózy a mikrokrystalické celulózy.

Celkem u 8 izolátů byla pozorována produkce celulolytických enzymů. Nejvyšší aktivitou ($E_i = 14,6$) se vyznačoval *Bacillus velzensis* (D11). Výrazně nižší sekrecí celuláz ($E_i = 2,5-3,2$) se prokázaly *Lysinibacillus fusiformis* (D117), *Priestia megaterium* (D32, D199, D201) a *Pseudomonas oryzae* (D37). Nejnižší aktivita pak byla sledována u *Acinetobacter calcoaceticus* (D171) a *Bacillus* sp. (D37) ($E_i = 0,73-0,5$).

U bakterií *Lysinibacillus fusiformis* (D117) a *Priestia megaterium* (D32, D199, D201) byla metodou barvení Sudan Black potvrzena schopnost produkovat polyhydroxyalkanoáty z glukózy, CMC i MCC.

Pro budoucí zkoumání by bylo vhodné využití PHA v mikroorganismech ověřit i dalšími metodami, jako je například infračervená spektroskopie, a následně se zaměřit na izolaci inkluzí, optimalizaci kultivačních podmínek pro dosažení vyššího výtěžku a charakterizaci materiálových vlastností produkovaného biopolymeru.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ABD-EL-HALEEM, D.; AMARA, A.; ZAKI, S.; ABULHAMD, A. a ABULREESH, G., 2007. Biosynthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates biopolymers in genetically modified yeasts. Online. *International Journal of Environmental Science & Technology*. Roč. 4, č. 4, s. 513–520. ISSN 1735-1472. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF03325988>. [cit. 2023-05-10].

AL MAKISHAH, H. a ELFARASH, E., 2022. Molecular characterization of cellulase genes in *Pseudomonas stutzeri*. Online. *Electronic Journal of Biotechnology*. Roč. 59, s. 55–61. ISSN 07173458. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2022.07.004>. [cit. 2024-05-11].

AL-GHEETHI, A. A. S., 2015. Recycling of sewage sludge as production medium for cellulase by a *Bacillus megaterium* strain. Online. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*. Roč. 4, č. 2, s. 105–119. ISSN 2195-3228. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s40093-015-0090-6>. [cit. 2024-05-08].

ANJUM, A.; ZUBER, M.; ZIA, K. M.; NOREEN, A.; ANJUM, M. N. *et al.*, 2016. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. Roč. 89, s. 161–174. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069>. [cit. 2022-11-17].

ARSOV, A.; PETROV, K. a PETROVA, P., 2021. Enhanced Activity by Genetic Complementarity: Heterologous Secretion of Clostridial Cellulases by *Bacillus licheniformis* and *Bacillus velezensis*. Online. *Molecules*. Roč. 26, č. 18. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules26185625>. [cit. 2024-05-08].

AUNINA, Z.; BAZBAUERS, G. a VALTERS, K., 2010. Feasibility of Bioethanol Production From Lignocellulosic Biomass. Online. *Scientific Journal of Riga Technical University. Environmental and Climate Technologies*. 2010-01-1, roč. 4, č. -1, s. 11–15. ISSN 1691-5208. Dostupné z: <https://doi.org/10.2478/v10145-010-0011-x>. [cit. 2024-02-22].

BARBE, V., 2004. Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium. Online.

Nucleic Acids Research. 2004-10-28, roč. 32, č. 19, s. 5766–5779. ISSN 1362-4962. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/nar/gkh910>. [cit. 2024-05-08].

BERGOGNE-BÉRÉZIN, E., 2014. Bacteria: *Acinetobacter*. Online. In: *Encyclopedia of Food Safety*. Elsevier, s. 337–341. ISBN 9780123786135. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00084-6>. [cit. 2024-05-08].

BHATTACHARYYA, A.; PRAMANIK, A.; MAJI, S. K.; HALDAR, S.; MUKHOPADHYAY, U. K. *et al.*, 2012. Utilization of vinasse for production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. Online. *AMB Express*. Roč. 2, č.1. ISSN 2191-0855. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-34>. [cit. 2023-05-15].

BIEDENDIECK, R.; KNUUTI, T.; MOORE, S. J. a JAHN, D., 2021. The “beauty in the beast”—the multiple uses of *Priestia megaterium* in biotechnology. Online. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Roč. 105, č. 14–15, s. 5719-5737. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11424-6>. [cit. 2024-05-08].

BRESAN, S.; SZNAJDER, A.; HAUF, W.; FORCHHAMMER, K.; PFEIFFER, D. *et al.*, 2016. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids. Online. *Scientific Reports*. 2016-05-31, roč. 6, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/srep26612>. [cit. 2023-02-01].

BRETT, C. T., 2000. Cellulose microfibrils in plants: Biosynthesis, deposition, and integration into the cell wall. Online. *International Review of Cytology*. Elsevier, s. 161–199. ISBN 9780123646033. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(00\)99004-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(00)99004-1). [cit. 2024-02-22].

BUCCI, D.Z.; TAVARES, L.B.B. a SELL, I., 2005. PHB packaging for the storage of food products. Online. *Polymer Testing*. Roč. 24, č. 5, s. 564–571. ISSN 01429418. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2005.02.008>. [cit. 2023-03-21].

BUGNICOURT, E.; CINELLI, P.; LAZZERI, A. a ALVAREZ, V., 2014. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. Online. *Express Polymer Letters*. Roč. 8, č. 11, s. 791–808. ISSN 1788618X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2014.82>. [cit. 2022-12-06].

CIBICHAKRAVARTHY, B.; ABINAYA, S. a PRABAGARAN, S. R., 2017. Syntrophic association of termite gut bacterial symbionts with bifunctional characteristics of cellulose degrading and polyhydroxyalkanoate producing bacteria. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. Roč. 103, s. 613–620. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.100>. [cit. 2024-04-22].

CLARK, S.; JUNG, S. a LAMSAL, B., 2014. *Food Processing*. Online. Wiley. ISBN 9780470671146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9781118846315>. [cit. 2024-04-22].

DATTA, R., 2024. Enzymatic degradation of cellulose in soil: A review. Online. *Heliyon*. Roč. 10, č. 1. ISSN 24058440. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24022>. [cit. 2024-03-26].

EDILANE, M. F.; ALDO, R. L. P.; RAIMUNDO, C. P. J.; SANDRA, P. Z. a RUDI, E. L., 2016. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by *Lynisibacillus* sp. strain UEA-20.171. Online. *African Journal of Biotechnology*. 2016-08-24, roč. 15, č. 34, s. 1827–1834. ISSN 1684-5315. Dostupné z: <https://doi.org/10.5897/AJB2016.15329>. [cit. 2024-05-11].

EKBORG, N. A.; GONZALEZ, J. M.; HOWARD, M. B.; TAYLOR, L. E.; HUTCHESON, S. W. *et al.*, 2005. *Saccharophagus degradans* gen. nov., sp. nov., a versatile marine degrader of complex polysaccharides. Online. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2005-07-01, roč. 55, č. 4, s. 1545–1549. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63627-0>. [cit. 2024-04-22].

EMAIMO, A. J.; OLKHOV, A. A.; IORDANSKII, A. L. a VETCHER, A. A., 2022. Polyhydroxyalkanoates Composites and Blends: Improved Properties and New Applications. Online. *Journal of Composites Science*. Roč. 6, č. 7. ISSN 2504-477X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/jcs6070206>. [cit. 2022-12-04].

EPKERIGIN, 2007. Preliminary studies of cellulase production by *Acinetobacter anitratus* and *Branhamella* sp. Online. *African Journal of Biotechnology*. Roč. 6, č. 1, s. 28–33. Dostupné z: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/56088>. [cit. 2024-05-11].

EUROSTAT, 2023. *Packaging waste statistics*. Online. EUROSTAT. Eurostat Statistic Explained. Dostupné z: <https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/SEPDF/cache/10547.pdf>. [cit. 2024-04-23].

FERBIYANTO, A.; RUSMANA, I. a RAFFIUDIN, R., 2015. Characterization and Identification of Cellulolytic Bacteria from gut of Worker *Macrotermes gilvus*. Online. *HAYATI Journal of Biosciences*. Roč. 22, č. 4, s. 197–200. ISSN 19783019. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.hjb.2015.07.001>. [cit. 2024-05-08].

FIDLER, S, 1992. Polyhydroxyalkanoate production in recombinant *Escherichia coli*. Online. *FEMS Microbiology Letters*. Roč. 103, č. 2–4, s. 231-235. ISSN 03781097. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90314-E](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90314-E). [cit. 2023-05-08].

FONTAINE, P.; MOSRATI, R. a CORROLER, D., 2017. Medium chain length polyhydroxyalkanoates biosynthesis in *Pseudomonas putida* mt-2 is enhanced by co-metabolism of glycerol/octanoate or fatty acids mixtures. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. Roč. 98, s. 430–435. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.115>. [cit. 2023-05-15].

FROIDUROT, A. a JULLIAND, V., 2022. Cellulolytic bacteria in the large intestine of mammals. Online. *Gut Microbes*. 2022-12-31, roč. 14, č. 1. ISSN 1949-0976. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2031694>. [cit. 2024-04-22].

GOSWAMI, M.; REKHI, P.; DEBNATH, M. a RAMAKRISHNA, S., 2021. Microbial Polyhydroxyalkanoates Granules: An Approach Targeting Biopolymer for Medical Applications and Developing Bone Scaffolds. Online. *Molecules*. Roč. 26, č. 4. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules26040860>. [cit. 2022-12-06].

GRAGE, K.; JAHNS, A. C.; PARLANE, N.; PALANISAMY, R.; RASIAH, I. A. *et al.*, 2009. Bacterial Polyhydroxyalkanoate Granules: Biogenesis, Structure, and Potential Use as Nano-/Micro-Beads in Biotechnological and Biomedical Applications. Online. *Biomacromolecules*. 2009-04-13, roč. 10, č. 4, s. 660–669. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/bm801394s>. [cit. 2023-02-01].

HAUGAARD, V. K.; DANIELSEN, B. a BERTELSEN, G., 2003. Impact of polylactate and poly(hydroxybutyrate) on food quality. Online. *European Food Research and Technology*. Roč. 216, č. 3, s. 233–240. ISSN 1438-2377. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00217-002-0651-6>. [cit. 2024-04-22].

HEINZE, T., 2015. Cellulose: Structure and Properties. Online. *Cellulose Chemistry and Properties: Fibers, Nanocelluloses and Advanced Materials*. *Advances in Polymer Science.*,

2016, s. 1–52. ISBN 978-3-319-26013-6. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/12_2015_319. [cit. 2024-03-26].

HIGUCHI-TAKEUCHI, M.; MORISAKI, K. a NUMATA, K., 2016. A Screening Method for the Isolation of Polyhydroxyalkanoate-Producing Purple Non-sulfur Photosynthetic Bacteria from Natural Seawater. Online. *Frontiers in Microbiology*. 2016-09-21, roč. 7. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01509>. [cit. 2023-05-16].

CHANTARASIRI, A., 2015. Aquatic *Bacillus cereus* JD0404 isolated from the muddy sediments of mangrove swamps in Thailand and characterization of its cellulolytic activity. Online. *Egyptian Journal of Aquatic Research*. Roč. 41, č. 3, s. 257–264. ISSN 16874285. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2015.08.003>. [cit. 2024-05-11].

CHEE, J.; TAN, Y.; SAMIAN, M. a SUDESH, K., 2010. Isolation and Characterization of a *Burkholderia* sp. USM (JCM15050) Capable of Producing Polyhydroxyalkanoate (PHA) from Triglycerides, Fatty Acids and Glycerols. Online. *Journal of Polymers and the Environment*. Roč. 18, č. 4, s. 584–592. ISSN 1566-2543. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10924-010-0204-1>. [cit. 2023-05-15].

CHEN, L.; GU, W.; XU, H.; YANG, G.; SHAN, X. *et al.*, 2018. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* 157 isolated from *Eucommia ulmoides* with pathogenic bacteria inhibiting and lignocellulolytic enzymes production by SSF. Online. *3 Biotech*. Roč. 8, č. 2. ISSN 2190-572X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1125-2>. [cit. 2024-04-22].

JEWKES, J.; SAWERS, D.; STILLERMAN, R.; JEWKES, J.; SAWERS, D. *et al.*, 1969. Cellophane. Online. *The Sources of Invention*. London: Palgrave Macmillan UK, s. 237–238. ISBN 978-1-349-00017-3. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-349-00015-9_15. [cit. 2024-03-26].

KARTHIKA, A.; SEENIVASAGAN, R.; KASIMANI, R.; BABALOLA, O.O. a VASANTHY, M., 2020. Cellulolytic bacteria isolation, screening and optimization of enzyme production from vermicompost of paper cup waste. Online. *Waste Management*. Roč. 116, s. 58–65. ISSN 0956053X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.06.036>. [cit. 2024-05-08].

KASANA, R. C.; SALWAN, R.; DHAR, H.; DUTT, S. a GULATI, A., 2008. A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. Online. *Current Microbiology*. Roč. 57, č. 5, s. 503–507. ISSN 0343-8651. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9276-8>. [cit. 2024-05-08].

KHOMLAEM, C.; ALOUI, H.; SINGHVI, M. a KIM, Beom Soo, 2023. Production of polyhydroxyalkanoates and astaxanthin from lignocellulosic biomass in high cell density membrane bioreactor. Online. *Chemical Engineering Journal*. Roč. 451. ISSN 13858947. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.138641>. [cit. 2024-05-11].

KIM, Y.; LEE, S.; CHO, Y.; OH, H. a KO, Y. H., 2012. Isolation of Cellulolytic *Bacillus subtilis* Strains from Agricultural Environments. Online. *ISRN Microbiology*. 2012-02-29, roč. 2012, s. 1–9. ISSN 2090-7486. Dostupné z: <https://doi.org/10.5402/2012/650563>. [cit. 2024-04-22].

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H. a BOHN, A., 2005. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. Online. *Angewandte Chemie International Edition*. 2005-05-30, roč. 44, č. 22, s. 3358–3393. ISSN 1433-7851. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/anie.200460587>. [cit. 2024-02-22].

KOPECKÁ, J. a ROTKOVÁ, G., 2017. Pozorování bakteriálních endospor a jejich barvení, negativní barvení: Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity. Online. *Skripta ke cvičení z Obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií*. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/bakterialni_endospory.html. [cit. 2024-05-11].

KUMAR GUPTA, P.; SAI RAGHUNATH, S.; VENKATESH PRASANNA, D.; VENKAT, P.; SHREE, V. *et al.*, 2019. An Update on Overview of Cellulose, Its Structure and Applications. Online. *Cellulose*. IntechOpen, 2019-12-18. ISBN 978-1-83968-056-4. Dostupné z: <https://doi.org/10.5772/intechopen.84727>. [cit. 2024-03-26].

KUMAR, V.; FOX, B. G. a TAKASUKA, T. E., 2023. Consolidated bioprocessing of plant biomass to polyhydroxyalkanoate by co-culture of *Streptomyces* sp. SirexAA-E and *Priestia megaterium*. Online. *Bioresource Technology*. Roč. 376. ISSN 0960-8524. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128934>. [cit. 2024-05-11].

LAKHUNDI, S.; SIDDIQUI, R. a KHAN, N. A., 2015. Cellulose degradation: a therapeutic strategy in the improved treatment of *Acanthamoeba* infections. Online. *Parasites & Vectors*. Roč. 8, č. 1. ISSN 1756-3305. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0642-7>. [cit. 2024-03-26].

LEE, T.; LIN, J.; WANG, S. a SHAW, G., 2004. PhaQ, a New Class of Poly- β -Hydroxybutyrate (PHB)-Responsive Repressor, Regulates phaQ and phaP (Phasin) Expression in *Bacillus megaterium* through Interaction with PHB. Online. *Journal of Bacteriology*. 2004-05-15, roč. 186, č. 10, s. 3015–3021. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/JB.186.10.3015-3021.2004>. [cit. 2024-05-11].

LEMOIGNE, M., 1926. Produits de déshydratation et de polymérisation de l'acide β -oxybutyrique. Online. *Bulletin de la Société de Chimie Biologique*. S. 770–782. Dostupné z: [ISSN 0037-9042](https://doi.org/10.1002/cb.10042). [cit. 2023-05-13].

LIBICH, J.; RYCHNA, K. a PAROUBEK, M., 1990. Význam polyrezistentních kmenů *Acinetobacter calcoaceticus* v problematice nozokomiálních nákaz. *Vojenské Zdravotnické Listy*. Roč. 59, č. 1, s. 16–19. [cit. 2024-05-11].

MÁČALOVÁ, D.; JANALÍKOVÁ, M.; SEDLAŘÍKOVÁ, J.; REKTOŘÍKOVÁ, I.; KOUTNÝ, M. *et al.*, 2023. Genotypic and Phenotypic Detection of Polyhydroxyalkanoate Production in Bacterial Isolates from Food. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. Roč. 24, č. 2. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms24021250>. [cit. 2023-02-11].

MAESTRO, B. a SANZ, J. M., 2017. Polyhydroxyalkanoate-associated phasins as phylogenetically heterogeneous, multipurpose proteins. Online. *Microbial Biotechnology*. 2017-08-22, roč. 10, č. 6, s. 1323–1337. ISSN 1751-7915. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12718>. [cit. 2023-02-01].

MAHALIK, S.; MOHAPATRA, D. a KUMAR, D., 2018. Cellulase production in *Lysinibacillus* sp isolated from the estuaries of Odisha. Online. *Bioscience Biotechnology Research Communications*. 2018-12-25, roč. 11, č. 4, s. 743–753. ISSN 09746455. Dostupné z: <https://doi.org/10.21786/bbrc/11.4/27>. [cit. 2024-04-22].

MARTZY, R.; MELLO-DE-SOUSA, T. M.; MACH, R. L.; YAVER, D. a MACH-AIGNER, A. R., 2021. The phenomenon of degeneration of industrial *Trichoderma reesei*

strains. Online. *Biotechnology for Biofuels*. Roč. 14, č. 1. ISSN 1754-6834. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13068-021-02043-4>. [cit. 2024-02-22].

MATSUMOTO, K.; ARAI, Y.; NAGAO, R.; MURATA, T.; TAKASE, K. *et al.*, 2006. Synthesis of Short-chain-length/Medium-chain-length Polyhydroxyalkanoate (PHA) Copolymers in Peroxisome of the Transgenic *Arabidopsis Thaliana* Harboring the PHA Synthase Gene from *Pseudomonas* sp. 61-3. Online. *Journal of Polymers and the Environment*. Roč. 14, č. 4, s. 369–374. ISSN 1566-2543. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10924-006-0035-2>. [cit. 2023-05-10].

MCCOOL, G. J. a CANNON, M. C., 2001. PhaC and PhaR Are Required for Polyhydroxyalkanoic Acid Synthase Activity in *Bacillus megaterium*. Online. *Journal of Bacteriology*. 2001-07-15, roč. 183, č. 14, s. 4235–4243. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/JB.183.14.4235-4243.2001>. [cit. 2024-05-11].

MCNAMARA, J. T.; MORGAN, J. L.W. a ZIMMER, J., 2015. A Molecular Description of Cellulose Biosynthesis. Online. *Annual Review of Biochemistry*. 2015-06-02, roč. 84, č. 1, s. 895–921. ISSN 0066-4154. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033930>. [cit. 2024-02-22].

MESQUITA, D. P.; AMARAL, A. L.; LEAL, C.; OEHMEN, A.; REIS, M. A.M. *et al.*, 2015. Polyhydroxyalkanoate granules quantification in mixed microbial cultures using image analysis: Sudan Black B versus Nile Blue A staining. Online. *Analytica Chimica Acta*. Roč. 865, s. 8–15. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.01.018>. [cit. 2024-04-23].

NIAOUNAKIS, M., 2017. The Problem of Marine Plastic Debris. Online. In: *Management of Marine Plastic Debris*. Elsevier, s. 1–55. ISBN 9780323443548. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44354-8.00001-X>. [cit. 2024-03-26].

NIWISKA, B., 2012. Digestion in Ruminants. Online. *Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*. InTech, 2012-11-21. ISBN 978-953-51-0864-1. Dostupné z: <https://doi.org/10.5772/51574>. [cit. 2024-02-22].

NOMURA, C. T.; TANAKA, T.; EGUEN, T. E.; APPAH, A. S.; MATSUMOTO, K. *et al.*, 2008. FabG Mediates Polyhydroxyalkanoate Production from Both Related and Nonrelated Carbon Sources in Recombinant *Escherichia coli* LS5218. Online. *Biotechnology Progress*.

Roč. 24, č. 2, s. 342–351. ISSN 8756-7938. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/bp070303y>. [cit. 2024-04-23].

PANAGOPOULOS, G. N.; MEGALOIKONOMOS, P. D.; LIONTOS, M.; GIANNITSIOTI, E.; DROGARI-APIRANTHITOU, M. *et al.*, 2016. *Pseudomonas oryzihabitans* Infected Total Hip Arthroplasty. Online. *Journal of Bone and Joint Infection*. Roč. 1, č. 1, s. 54–58. ISSN 2206-3552. Dostupné z: <https://doi.org/10.7150/jbji.16967>. [cit. 2024-05-11].

PODUCH, E. a KOTRA, L. P., 2007. *Acinetobacter* Infections. Online. *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Elsevier, s. 1–9. ISBN 9780080552323. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.60871-2>. [cit. 2024-05-08].

POVOLO, S.; TOFFANO, P.; BASAGLIA, M. a CASELLA, S., 2010. Polyhydroxyalkanoates production by engineered *Cupriavidus necator* from waste material containing lactose. Online. *Bioresource Technology*. Roč. 101, č. 20, s. 7902–7907. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.029>. [cit. 2023-05-10].

PUDOVA, D. S.; LUTFULLIN, M. T.; SHAGIMARDANOVA, E. I.; HADIEVA, G. F.; SHIGAPOVA, L. *et al.*, 2018. Draft genome sequence data of *Lysinibacillus fusiformis* strain GM, isolated from potato phyllosphere as a potential probiotic. Online. *Data in Brief*. Roč. 21, s. 2504–2509. ISSN 23523409. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.11.107>. [cit. 2024-05-11].

PULINGAM, T.; APPATURI, J. N.; PARUMASIVAM, T.; AHMAD, A. a SUDESH, K., 2022. Biomedical Applications of Polyhydroxyalkanoate in Tissue Engineering. Online. *Polymers*. Roč. 14, č. 11. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym14112141>. [cit. 2023-03-20].

QIN, Y.; TAO, H.; LIU, Y.; WANG, Y.; ZHANG, J. *et al.*, 2013. A novel non-hydrolytic protein from *Pseudomonas oryzihabitans* enhances the enzymatic hydrolysis of cellulose. Online. *Journal of Biotechnology*. Roč. 168, č. 1, s. 24–31. ISSN 01681656. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.07.028>. [cit. 2024-05-11].

QUESADA CABRERA, R.; MEERSMAN, F.; MCMILLAN, P. F. a DMITRIEV, V., 2011. Nanomechanical and Structural Properties of Native Cellulose Under Compressive Stress.

Online. *Biomacromolecules*. 2011-06-13, roč. 12, č. 6, s. 2178–2183. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/bm200253h>. [cit. 2024-03-26].

RABBEE, M.; ALI, M.; CHOI, J.; HWANG, B.; JEONG, S. *et al.*, 2019. *Bacillus velezensis*: A Valuable Member of Bioactive Molecules within Plant Microbiomes. Online. *Molecules*. Roč. 24, č. 6. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules24061046>. [cit. 2024-05-08].

RAETZ, C. R. H. a WHITFIELD, C., 2002. Lipopolysaccharide Endotoxins. Online. *Annual Review of Biochemistry*. Roč. 71, č. 1, s. 635–700. ISSN 0066-4154. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414>. [cit. 2023-03-26].

RAUT, M. P.; COUTO, N.; KARUNAKARAN, E.; BIGGS, C. A. a WRIGHT, P. C., 2019. Deciphering the unique cellulose degradation mechanism of the ruminal bacterium *Fibrobacter succinogenes* S85. Online. *Scientific Reports*. Roč. 9, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52675-8>. [cit. 2024-03-26].

RAY, S. a KALIA, V. C., 2017. Biomedical Applications of Polyhydroxyalkanoates. Online. *Indian Journal of Microbiology*. Roč. 57, č. 3, s. 261–269. ISSN 0046-8991. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12088-017-0651-7>. [cit. 2023-03-04].

REDDY, J. P. a RHIM, J., 2018. Extraction and Characterization of Cellulose Microfibers from Agricultural Wastes of Onion and Garlic. Online. *Journal of Natural Fibers*. 2018-04-06, roč. 15, č. 4, s. 465–473. ISSN 1544-0478. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/15440478.2014.945227>. [cit. 2024-05-08].

RODRIGUEZ-CONTRERAS, A., 2019. Recent Advances in the Use of Polyhydroxyalkanoates in Biomedicine. Online. *Bioengineering*. Roč. 6, č. 3. ISSN 2306-5354. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/bioengineering6030082>. [cit. 2022-12-06].

RUDIN, A. a CHOI, P., 2013. Biopolymers. Online. In: *The Elements of Polymer Science & Engineering*. Elsevier, s. 521–535. ISBN 9780123821782. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382178-2.00013-4>. [cit. 2024-02-22].

SAFIKA; DARMAWI; FAHRIMAL a SARI, 2018. Isolation and identification of a cellulolytic bacillus from Rumen of Aceh's cattle. Online. *Asian Journal of Microbiology Biotechnology and Environmental Sciences*. Roč. 20, č. 3, s. 789–804. Dostupné z:

https://www.researchgate.net/publication/329376267_Isolation_and_identification_of_a_cellulolytic_bacillus_from_Rumen_of_Aceh's_cattle. [cit. 2024-05-11].

SANCHEZ-SALVADOR, J. L.; MARQUES, M. P.; BRITO, M. S. C. A.; NEGRO, C.; MONTE, M. C. *et al.*, 2022. Valorization of Vegetable Waste from Leek, Lettuce, and Artichoke to Produce Highly Concentrated Lignocellulose Micro- and Nanofibril Suspensions. Online. *Nanomaterials*. Roč. 12, č. 24. ISSN 2079-4991. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nano12244499>. [cit. 2024-05-08].

SARANGTHEM, I.; RAJKUMARI, L.; NGASHANGVA, N.; NANDEIBAM, J.; YENDREMBAM, R. B. S. *et al.*, 2023. Isolation and Characterization of Bacteria from Natural Hot Spring and Insights into the Thermophilic Cellulase Production. Online. *Current Microbiology*. Roč. 80, č. 2. ISSN 0343-8651. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00284-022-03168-x>. [cit. 2024-05-08].

SARATALE, R. G.; CHO, S. K.; SARATALE, G. D.; GHODAKE, G. S.; BHARAGAVA, R. N. *et al.*, 2021. Efficient bioconversion of sugarcane bagasse into polyhydroxybutyrate (PHB) by *Lysinibacillus* sp. and its characterization. Online. *Bioresource Technology*. Roč. 324. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124673>. [cit. 2024-05-11].

SAWANT, S. S.; TRAN, T. K.; SALUNKE, B. K. a KIM, B. S., 2017. Potential of *Saccharophagus degradans* for production of polyhydroxyalkanoates using cellulose. Online. *Process Biochemistry*. Roč. 57, s. 50–56. ISSN 13595113. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.03.016>. [cit. 2024-05-06].

SEDDIQI, H.; OLIAEI, E.; HONARKAR, H.; JIN, J.; GEONZON, L. C. *et al.*, 2021. Cellulose and its derivatives: towards biomedical applications. Online. *Cellulose*. Roč. 28, č. 4, s. 1893–1931. ISSN 0969-0239. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03674-w>. [cit. 2024-03-26].

SHAKOOR, S.; AFTAB, S. a REHNAN, A., 2013. Characterization of Cellulose Degrading Bacterium, *Bacillus megaterium* S3, Isolated from Indigenous Environment. Online. *Zoological Society of Pakistan*. Roč. 45, č. 6, s. 1655–1662. Dostupné z: https://www.zsp.com.pk/pdf45/1655-1662%20_24_%20PJZ-1388-13%205-12-13%20.pdf. [cit. 2024-05-11].

SHARMA, A.; TEWARI, R.; RANA, S. S.; SONI, R. a SONI, S. K., 2016. Cellulases: Classification, Methods of Determination and Industrial Applications. Online. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Roč. 179, č. 8, s. 1346–1380. ISSN 0273-2289. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2070-3>. [cit. 2024-05-08].

SHOBHARANI, P.; YOGESH, D.; HALAMI, P. M. a SACHINDRA, N. M., 2013. Potential of Cellulase From *Bacillus megaterium* for Hydrolysis of Sargassum. Online. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 2013-09-03, roč. 22, č. 5, s. 520–535. ISSN 1049-8850. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10498850.2012.670836>. [cit. 2024-04-22].

SHOKR, A.; ABD-ELSALAM, O.; HAMEDO, H. a ELSHAFFEY, N., 2023. Isolation and identification of Polyhydroxybutyrate (PHB)-producing microorganisms from various sources in North Sinai. Online. *Catrina: The International Journal of Environmental Sciences*. 2023-03-01, roč. 27, č. 1, s. 23–31. ISSN 2090-2786. Dostupné z: <https://doi.org/10.21608/cat.2023.295260>. [cit. 2024-05-11].

SIKKEMA, W. D.; CAL, A. J.; HATHWAIK, U. I.; ORTS, W. J.; LEE, C. C. *et al.*, 2023. Polyhydroxyalkanoate production in *Pseudomonas putida* from alkanolic acids of varying lengths. Online. *PLOS ONE*. 2023-7-20, roč. 18, č. 7. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0284377>. [cit. 2024-05-11].

SILVA, C. F.; REIS, K. C.; LOPES, N. A.; BATISTA, L. R. a SCHAWN, R. F., 2015. Enzymatic and antagonistic potential of bacteria isolated from typical fruit of Cerrado in Minas Gerais State, Brazil. Online. *Acta Scientiarum. Agronomy*. 2015-08-03, roč. 37, č. 3, s. 367–374. ISSN 1807-8621. Dostupné z: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v37i3.19057>. [cit. 2024-05-11].

SINGHANIA, R. R., 2009. Cellulolytic Enzymes. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*. Dordrecht:Springer Netherlands, s.371–381. ISBN 978-1-4020-9941-0. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9942-7_20. [cit. 2024-02-22].

SOHAIL, M.; AHMAD, A. a KHAN, S. A., 2016. Production of cellulase from *Aspergillus terreus* MS105 on crude and commercially purified substrates. Online. *3 Biotech*. Roč. 6, č. 1. ISSN 2190-572X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0420-z>. [cit. 2024-02-22].

SOLAIMAN, D. K. Y. a ASHBY, R. D., 2005. Rapid Genetic Characterization of Poly(hydroxyalkanoate) Synthase and Its Applications. Online. *Biomacromolecules*. 2005-03-01, roč. 6, č. 2, s. 532–537. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/bm0493640>. [cit. 2023-03-31].

SULAIMAN, I. M; HSIEH, Y.; JACOBS, E.; MIRANDA, N.; SIMPSON, S. *et al.*, 2018. Identification of *Lysinibacillus fusiformis* Isolated from Cosmetic Samples Using MALDI-TOF MS and 16S rRNA Sequencing Methods. Online. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 2018-11-01, roč. 101, č. 6, s. 1757–1762. ISSN 1060-3271. Dostupné z: <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0092>. [cit. 2024-05-08].

TAN, G.; CHEN, C.; LI, L.; GE, L.; WANG, L. *et al.*, 2014. Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. Online. *Polymers*. Roč. 6, č. 3, s. 706–754. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym6030706>. [cit. 2023-02-12].

TAYLOR, L. E.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P. M.; EKBORG, N. A.; HUTCHESON, S. W. *et al.*, 2006. Complete Cellulase System in the Marine Bacterium *Saccharophagus degradans* Strain 2-40 T. Online. *Journal of Bacteriology*. Roč. 188, č. 11, s. 3849–3861. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/JB.01348-05>. [cit. 2024-04-22].

TSUGE, T.; FUKUI, T.; MATSUSAKI, H.; TAGUCHI, S.; KOBAYASHI, G. *et al.*, 2000. Molecular cloning of two (R)-specific enoyl-CoA hydratase genes from *Pseudomonas aeruginosa* and their use for polyhydroxyalkanoate synthesis. Online. *FEMS Microbiology Letters*. Roč. 184, č. 2, s. 193–198. ISSN 03781097. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09013.x>. [cit. 2024-04-23].

TSUGE, T.; HYAKUTAKE, M. a MIZUNO, K., 2015. Class IV polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases and PHA-producing *Bacillus*. Online. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Roč. 99, č. 15, s. 6231–6240. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6777-9>. [cit. 2024-05-11].

UNIPROT, 2016. *Pseudomonas oryzae* *USDA-ARS-USMARC-56511*. Online. UniProt. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A0U4WUR0/entry>. [cit. 2024-05-12].

VISAKH P. M., 2014. CHAPTER 1. Polyhydroxyalkanoates (PHAs), their Blends, Composites and Nanocomposites: State of the Art, New Challenges and Opportunities.

Online. *Polyhydroxyalkanoate (PHA) based Blends, Composites and Nanocomposites*. Green Chemistry Series. Cambridge: Royal Society of Chemistry, s. 1–17. ISBN 978-1-84973-946-7. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/9781782622314-00001>. [cit. 2022-11-17].

VITZ, J.; ERDMENGER, T.; HAENSCH, C. a SCHUBERT, U. S., 2009. Extended dissolution studies of cellulose in imidazolium based ionic liquids. Online. *Green Chemistry*. Roč. 11, č. 3. ISSN 1463-9262. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/b818061j>. [cit. 2024-03-26].

XAVIER, J. R.; BABUSHA, S. T.; GEORGE, J. a RAMANA, K. V., 2015. Material Properties and Antimicrobial Activity of Polyhydroxybutyrate (PHB) Films Incorporated with Vanillin. Online. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Roč. 176, č. 5, s. 1498–1510. ISSN 0273-2289. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1660-9>. [cit. 2024-04-22].

XIE, G.; BRUCE, D. C.; CHALLACOMBE, J. F.; CHERTKOV, O.; DETTER, J. C. *et al.*, 2007. Genome Sequence of the Cellulolytic Gliding Bacterium *Cytophaga hutchinsonii*. Online. *Applied and Environmental Microbiology*. Roč. 73, č. 11, s. 3536–3546. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/AEM.00225-07>. [cit. 2024-02-22].

YOUNGSTER, T.; WUSHENSKY, J. A. a ARISTILDE, L., 2017. Profiling glucose-induced selective inhibition of disaccharide catabolism in *Bacillus megaterium* QM B1551 by stable isotope labelling. Online. *Microbiology*. 2017-10-01, roč. 163, č. 10, s. 1509–1514. ISSN 1350-0872. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/mic.0.000540>. [cit. 2024-05-08].

ZHANG, J.; HOU, H.; CHEN, G.; WANG, S. a ZHANG, J., 2016. The isolation and functional identification on producing cellulase of *Pseudomonas mendocina*. Online. *Bioengineered*. 2016-10-06, roč. 7, č. 5, s. 382–391. ISSN 2165-5979. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/21655979.2016.1227143>. [cit. 2024-05-11].

ZHANG, X.; HE, X.; CHEN, J.; LI, J.; WU, Y. *et al.*, 2023. Whole-Genome Analysis of Termite-Derived *Bacillus velezensis* BV-10 and Its Application in King Grass Silage. Online. *Microorganisms*. Roč. 11, č. 11. ISSN 2076-2607. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112697>. [cit. 2024-05-08].

ZHER NEOH, S.; FEY CHEK, M.; TIANG TAN, H.; LINARES-PASTÉN, J. A.; NANDAKUMAR, A. *et al.*, 2022. Polyhydroxyalkanoate synthase (PhaC): The key enzyme for biopolyester synthesis. Online. *Current Research in Biotechnology*. Roč. 4, s. 87–101. ISSN 25902628. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2022.01.002>. [cit. 2023-02-02].

ZOMMERE, G.; VILUMSONE, A.; KALNINA, D.; SOLIZENKO, R. a STRAMKALE, V., 2013. Comparative Analysis of Fiber Structure and Cellulose Contents in Flax and Hemp Fibres. Online. *Materials Science. Textile and Clothing Technology*. Roč. 8, s. 96–104. ISSN 16913132. Dostupné z: <https://doi.org/10.7250/mstct.2013.016>. [cit. 2024-02-22].

ZYTNER, P.; KUMAR, D.; ELSAYED, A.; MOHANTY, A.; RAMARAO, B. V. *et al.*, 2023. A review on polyhydroxyalkanoate (PHA) production through the use of lignocellulosic biomass. Online. *RSC Sustainability*. 2023-11-30, roč. 1, č. 9, s. 2120–2134. ISSN 2753-8125. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/D3SU00126A>. [cit. 2024-05-14].

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

%CDM	hmotnost buněčné sušiny
½ MB	half strength Marine Bacto
ACP	acyl carrier protein
AMP	adenosinmonofosfát
ATP	adenosintrifosfát
CMC	karboxymethylcelulóza
CNC	nanokrystalická celulóza
CoA	koenzym A
BHI	mozkovo-srdečná infuze
E _i	enzymatický index
EU	Evropská unie
FabG	3-ketoacyl reduktáza
FTIR	infračervená mikroskopie s Fourierovou transformací
GAPs	Granule-Associated proteins
HDPE	vysokohustotní polyethylen
LPS	lipopolysacharidy
MCC	mikrokrystalická celulóza
MES	roztok stopových prvků
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid
NADH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	fosforylovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
PCR	polymerázová řetězová reakce
PET	polyetylentereftalát
PHA	polyhydroxyalkanoáty
PhaA	3-ketothioláza
PhaB	acetoacetyl-CoA reduktáza
PhaC	PHA syntáza
PhaJ	(R)-specifická enoyl hydratáza
PHA _{lcl}	polyhydroxyalkanoáty s dlouhým řetězcem
PHA _{mcl}	polyhydroxyalkanoáty se středně dlouhým řetězcem
PhaP	phasiny
PhaR	regulační proteiny PHA

PHA _{scI}	polyhydroxyalkanoáty s krátkým řetězcem
PhaZ	PHA depolymeráza
PHB	poly(3-hydroxybutyrát)
PHB4HB	poly(3-hydroxybutyrát- <i>co</i> -4-hydroxybutyrát)
PHBV	poly(3-hydroxybutyrát- <i>co</i> -hydroxyvalerát)
PHV	poly(3-hydroxyvalerát)
PP	polypropylen
PP _i	difosfát
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1	Struktura celulózy; upraveno dle Heinze (2015).....	11
Obrázek 2	Enzymatická hydrolýza celulózy; upraveno dle Xie <i>et al.</i> (2007)	14
Obrázek 3	Struktura PHA; upraveno dle Emaimo <i>et al.</i> (2022)	17
Obrázek 4	Struktura některých polyhydroxyalkanoátů; upraveno dle Emaimo <i>et al.</i> (2022): a) poly(3-hydroxybutyrát), b) poly(3-hydroxyvalerát), c) poly(3-hydroxybutyrát-co-3- hydroxyvalerát)	18
Obrázek 5	Biosyntéza ze souvisejících zdrojů; upraveno dle Máčalové <i>et al.</i> (2023).	22
Obrázek 6	Biosyntéza PHA z nesouvisejících zdrojů; upraveno dle Máčalové <i>et al.</i> (2023)	23
Obrázek 7	Výsledky měření celulolytické aktivity na CMC agaru pro a) <i>Bacillus velezensis</i> D11 (+), b) <i>Escherichia coli</i> DH5α (-)	35
Obrázek 8	Enzymatický index celulolytických bakterií	37
Obrázek 9	Intracelulární inkluze PHA obarvené Sudan Black u <i>Lysinibacillus fusiformis</i> (D117) se zdrojem uhlíku: a) glukóza, b) CMC, c) MCC.	42
Obrázek 10	Intracelulární inkluze PHA obarvené Sudan Black u <i>Priestia megaterium</i> (D32) se zdrojem uhlíku a) glukóza, b) CMC, c) MCC	43

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Porovnání vlastností vybraných polyhydroxyalkanoátů s polypropylenem; upraveno dle Rodriguez-Contreras (2019)	19
Tabulka 2 Složení BHI bujónu	29
Tabulka 3 Složení M-17 bujónu	29
Tabulka 4 Složení Half strength Bacto Marine (½ MB) agar.....	30
Tabulka 5 Složení CMC agaru.....	30
Tabulka 6 Složení minerálního CN agaru.....	31
Tabulka 7 Složení roztoku stopových prvků (MES).....	31
Tabulka 8 Seznam testovaných mikroorganismů, včetně jejich původu, způsobu kultivace a identifikace	32–33
Tabulka 9 Výsledky měření celulólytické aktivity, enzymatický index.....	36

SEZNAM ROVNIC

Rovnice 1 Enzymatický index	34
-----------------------------------	----