

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2019-631

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C12P 7/02 (2006.01)
C12P 7/42 (2006.01)
C12P 7/62 (2006.01)
C12N 1/32 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **10.10.2019**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13.01.2021**

(Věstník č. 2/2021)

- (71) Přihlašovatel:
Vysoké učení technické v Brně, Brno, CZ
- (72) Původce:
doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D., Drásov, CZ
Ing. Iva Pernicová, Třebíč, Nové Dvory, CZ
Ing. Dan Kučera, Brno, Staré Brno, CZ
Ing. Ivana Nováčková, Mokrá-Horákov, CZ
Ing. Petr Sedláček, Ph.D., Doubravník, CZ
- (74) Zástupce:
INPROCHES Patentová a známková kancelář,
Mgr. Alžběta Jurtíková, patentová zástupkyně,
Mezírka 775/1, 602 00 Brno

- (54) Název přihlášky vynálezu:
**Způsob výroby polyhydroxyalkanoátů
pomocí isolátu termofilního bakteriálního
kmene Aneurinibacillus sp. H1**

- (57) Anotace:
Vynález se týká využití isolátu původního Gram-
pozitivního termofilního bakteriálního kmene
identifikovaného a označeného jako
Aneurinibacillus sp. H1 k termofilní
biotechnologické produkci polyhydroxyalkanoátů,
zejména poly(3-hydroxybutyrátu), kopolymeru
poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerátu) a
kopolymeru poly(3-hydroxybutyrát-co-4-
hydroxybutyrátu) v kultivačním médiu obsahujícím
uhlíkatý substrát, komplexní zdroj dusíku a
anorganický zdroj dusíku. Způsob podle vynálezu
je vhodný pro produkci polyhydroxyalkanoátů v
průmyslovém měřítku.

Způsob výroby polyhydroxyalkanoátů pomocí isolátu termofilního bakteriálního kmene *Aneurinibacillus* sp. H1

5 Oblast techniky

Vynález se týká využití isolátu původního Gram-pozitivního termofilního bakteriálního kmene identifikovaného a označeného jako *Aneurinibacillus* sp. H1 k termofilní biotechnologické produkci polyhydroxyalkanoátů.

10

Dosavadní stav techniky

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou mikrobiální polyestery, které ve formě intracelulárních granulí akumuluje řada prokaryotických mikroorganismů jako zásobní formu uhlíku, energie a redukční síly. Po chemické stránce se jedná o polyestery hydroxykyselin, přičemž karboxylová skupina se obvykle nachází v poloze 3 případně 4. Podle délky monomerní jednotky rozlišujeme dva základní typy PHA - polymery s krátkou délkou řetězce (short-chain-length) tzv. *scl*-PHA a materiály se střední délkou řetězce (medium-chain-length) tzv. *mcl*-PHA. Obecně platí, že PHA jsou velice často uvažovány jako potenciální náhrada za polymery petrochemického původu, a to z několika hlavních důvodů. Mechanické, termické a technologické vlastnosti PHA jsou velice podobné některým petrochemickým polymerům, nicméně na rozdíl od petrochemických materiálů jsou PHA *i.* kompletně připraveny biotechnologickou cestou s využitím obnovitelných případně i odpadních surovin, *ii.* jedná se o přirozeně a kompletně biodegradovatelné a kompostovatelné materiály, a to prakticky ve všech relevantních prostředích, a *iii.* PHA vykazují vysokou míru biokompatibility s lidským tělním prostředím. Tyto jejich vlastnosti z nich činí zajímavou materiálovou základnu pro velice širokou paletu aplikací.

Obecně platí, že PHA jsou termoplasty a je tedy možné upravovat standardními postupy. Vlastnosti PHA jsou závislé především na monomerním složení, základní parametry některých zástupců PHA jsou uvedeny v tabulce 1 [1].

Tabulka 1. Parametry vybraných vlastností některých PHA a jejich srovnání s polypropylenem [1].

	P(3HB)	P(3HB/3HV) 90:10	P(3HB/3HV) 20:80	P(4HB)	P(3HB/4HB) 90:10	P(3HB/4HB) 10:90	PP
Bed. tání (°C)	179	150	135	53	159	50	170
Youngův modul pružnosti (GPa)	3,5	1,2	0,8	149	-	100	1,7
Průtažnost (%)	3	20	100	1000	242	1000	400

35

P(3HB) -poly(3-hydroxybutyrát), *P(3HB/3HV)* - poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát), *P(4HB)* - poly(4-hydroxybutyrát), *P(3HB/4HB)* - poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát), *PP* - polypropylen

40

Nejčastějším a nejlépe prostudovaným PHA polymerem je homopolymer 3-hydroxybutyrátu (3HB), poly(3-hydroxybutyrát) - P(3HB). Materiál izolovaný z bakteriálních buněk vykazuje vysokou míru krystalinity - je tedy pevný, křehký a málo elastický. Teplota tání polymeru je přibližně 179 °C, přičemž teplota degradace materiálu (200 °C) je nepříjemně blízko teplotě tání, což významně komplikuje jeho tavení.

45

- Mechanické i technologické vlastnosti materiálu je však možné významně zlepšit, pokud je do struktury materiálu inkorporována další monomerní jednotka. Velice často je to 3-hydroxyvalerát (3HV). Vzniká tak kopolymer poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) (P3HB-co-3HV).
- 5 Vlastnosti polymeru jsou potom závislé na obsahu 3HV, celkově je možné konstatovat, že se snižuje krystalinita a Youngův modul, a naopak narůstá jeho průtažnost a elasticita. Zároveň vykazuje polymer nižší teplotu tání než homopolymer PHB při zachování téže hodnoty teploty degradace, což je samozřejmě z pohledu tavení polymeru velice pozitivní.
- 10 Dalším velice zajímavým materiálem je kopolymer obsahující 4-hydroxybutyrát (4HB), poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát) P(3HB-co-4HB). Tento materiál vykazuje vysoce amorfní strukturu a rostoucím obsahem 4HB výrazně klesá teplota degradace až téměř k hodnotě 50 °C a výrazně roste flexibilita, průtažnost a také Youngův modul. Není bez zajímavosti, že kopolymery P(3HB-co-4HB) vykazují také zvýšenou biodegradabilitu, a to i v prostředí tělních tekutin [2].
- 15 Díky svým vlastnostem má tedy P(3HB-co-4HB) vysoký aplikační potenciál především v oblasti biomedicíny. V roce 2007 americký úřad Food and Drug Administration (FDA) schválil použití P4HB pro medicínské využití (Tepha FLEX® Absorbable Suture a “BioTREK™ Bioabsorbable Septal Repair”) a také byla publikována řada úspěšných studií využívajících P(3HB-co-4HB) v klinických aplikacích, jako transportní systém pro léčiva nebo scaffoldy pro proliferaci buněk a
- 20 tkáňové inženýrství [3 - 5].

Schopnost produkce P(3HB-co-4HB) indukované přidávkou strukturního prekurzoru 4HB jako jsou například gama-butyrolakton (GBL), 1,4-butandiol (1,4-BD), nebo přímo 4-hydroxybutyrátu byla pozorována pro několik přirozených bakteriálních producentů PHA, jako jsou například

25 *Cupriavidus necator* [6], *Cupriavidus malaysiensis* [7], *Comamonas acidovorans* [8] nebo *Burkholderia sacchari* [9]. Schopnost inkorporace 4HB do struktury polymeru je možné posílit například náhodnou mutagenézou tak, jak ve svém experimentu demonstrovali Kitamura a Doi, kteří zvýšenou schopnost inkorporace 4HB do struktury polymeru pozorovali u mutantních kmenů *C. necator* H16 neschopných růstu na 4HB jako jediném zdroji uhlíku [10]. Schopnost produkce

30 P(3HB-co-4HB), a to i bez nutnosti aplikace strukturních prekurzorů 4HB, je do vhodného producenta také možno vnést pomocí nástrojů genového inženýrství, jak o tom pojednávají patenty US 6689589 B2 [11], US 006117658 A [12], US 8546125 B2 [13] případně další literární zdroje [14].

35 Při medicínských aplikacích polyhydroxyalkanoátů je klíčovou vlastností materiálů jejich čistota a spektrum potenciálních kontaminantů. Pokud je polymerní materiál produkován a následně izolován z Gram-negativních bakterií, je velice často kontaminován endotoxiny na bázi lipopolysacharidů, které jsou lokalizovány na vnější membráně buněčné stěny Gram-negativních bakterií, a proto jsou spolu s PHA ko-isolovány z bakteriální biomasy. Tyto kontaminanty

40 způsobují velice silnou imunitní odpověď, která může v extrémních případech končit až smrtí, jsou tedy při uvažované aplikaci PHA v oblasti medicíny extrémně nežádoucí. Proto je obsah endotoxinů monitorován, u zdravotního vybavení nesmí obsah endotoxinů obvykle přesáhnout hodnotu 20 Endotoxin Units (EU) nicméně například u materiálů které mají být v kontaktu cerebrosiálními tekutinami nesmí obsah endotoxinů přesáhnout hodnotu 2,5 EU [15]. Nicméně

45 komerčně dostupné PHA materiály obvykle vykazují obsahy endotoxinů na úrovni 100 EU i více. Obsah endotoxinů může být u PHA biomateriálů snížen použitím vhodné isolační techniky [16], případně mohou být endotoxiny selektivně degradovány pomocí oxidačního činidla, jak to popisuje patent US 6245537 B1 [17], nicméně úplné odstranění je obtížné ne-li nemožné. Možné řešení skýtá využití Gram-pozitivních bakterií, které endotoxiny obsahují jen v minimálním množství, a

50 PHA materiály připravené pomocí Gram-pozitivních bakterií proto prakticky nejsou endotoxiny kontaminovány.

Extrémofilové jsou schopni přežít a růst v podmínkách, které jsou daleko od podmínek vhodných pro život většiny organismů. V moderních mikrobiálních biotechnologiích jsou v současné době

55 procesy založené na využití extrémofilních mikroorganismů považovány za velice perspektivní,

protože extrémofily přináší řadu výhod. Předně je to výrazné zvýšení robustnosti procesu vůči kontaminaci, což umožňuje například využít kontinuální kultivační mód nebo redukovat případně úplně eliminovat nároky na sterilizaci zařízení a kultivačního média. Další výhodou extrémofilů jako produkčních jednotek je obvykle jejich vysoká růstová rychlost, schopnost utilizovat širokou paletu substrátů, a to včetně odpadů, možnost využití levnějších zdrojů fermentační vody, a to včetně mořské a snížení energetických nároků na kultivace. Další výhody často vyplývají z využití konkrétní skupiny extrémofilů [18]. Z těchto důvodů jsou v současné době procesy založené na extrémofilních mikroorganismech často označovány jako průmyslové biotechnologie nové generace (Next Generation Industrial Biotechnologies, NGIB) [19]. Pochopitelně je tedy i snaha využít výhod plynoucích ze zapojení extrémofilů při biotechnologické produkci PHA [20]. Z tohoto pohledu je velice zajímavá skupina halofilních mikroorganismů, tedy mikroorganismů, které se adaptovaly na vysokou salinitu prostředí. Schopnost produkce PHA byla popsána u řady halofilů, ať už jsou to středně halofilní Gram-negativní bakterie, jako jsou *Halomonas halophila* [21], *Halomonas boliviensis* [22] nebo *Halomonas bluephagenesis* [23], středně halofilní Gram-pozitivní *Bacillus megaterium uyuni* S29 [24] nebo extrémně halofilní Archea *Haloflex mediterranei* [25]. Bylo prokázáno, že schopnost akumulace PHA představuje účinnou ochrannou strategii vůči negativním efektům hyperosmotického prostředí [26] a výrazným fluktuacím osmolarity prostředí [27], což je pravděpodobně důvodem častého výskytu schopnosti biosyntézy PHA mezi halofilními prokaryoty. Produkce PHA pomocí halofilních mikroorganismů je popsána také v patentové literatuře, je to například patent AT 513449 A1 [28] který popisuje možný způsob výroby PHA a dalších hodnotných metabolitů s využitím odpadu po výrobě bioplynu za využití halofilních mikroorganismů, patent DE 102008045237 B4 [29] se věnuje možné ko-produkci PHA a kompatibilních látek v rámci jednoho biotechnologického procesu pomocí halofilní kultury, patent JP 5164182 B2 [30] deklaruje, že izolát označený jako *Halomonas* sp. HM-1 je velice slibný producent PHA, obdobně i patent JP 2011083204 A věnuje pozornost konkrétnímu kmenu rodu *Halomonas* [31].

Kromě halofilních kmenů jsou za slibné producenty PHA považovány také termofily - mikroorganismy vykazující optimální růst při teplotách 45 °C a více. Jejich využití nabízí celou řadu výhod, předně je třeba zmínit, že procesy využívající termofily jsou často překvapivě energeticky výhodné. To je dáno minimalizací nákladů na chlazení a také tím, že k výhřevu reaktoru je možné do velké míry využít metabolické teplo rychle rostoucí termofilní kultury a energii míchadla [18, 20]. Vysoká kultivační teplota pochopitelně snižuje riziko kontaminace a je možné zvážit snížení sterility procesu. Například Ibrahim a Steinbuchel využili k produkci PHA termofilní kultury *Chelatococcus* sp. a i bez sterilizace zařízení byl proces veden asepticky i po dlouhou kultivační dobu [32]. Nicméně termofilních kmenů schopných produkce PHA nebylo doposud popsáno tolik jako halofilů. Biosyntéza PHA byla popsána především u Gram-negativních kultur jako například u bakterie *Thermus thermophilus* HB8. Tato bakterie je podle literárních údajů schopna růst při 75 °C, obsah PHA v biomase dosahuje 30 až 40 % hmotn. a samotný polymer se skládá ze zajímavých monomerních jednotek, jako je například 3-hydroxydekanoát, 3-hydroxyoktanoát, ale také 3HB a 3HV [33-34]. Dalším Gram-negativním producentem PHA popsaným v literatuře je *Caldimonas taiwanensis*, která je schopna produkce P(3HB) a P(3HB-co-3HV) při teplotě 55 °C [35]. Ibrahim a Steinbuchel isolovali PHA produkující termofilní bakterie z čistíren odpadů a získali několik isolátů, které se dle sekvenace 16S rRNA genu a podle fyziologických a biochemických testů řadily do skupiny *Chelatococcus*, izoláty klasifikovali jako *Chelatococcus themostellatus*. Tato Gram-negativní bakterie je schopna produkce PHA při teplotách okolo 50 až 55 °C, přičemž jako substrát preferuje glycerol nebo glukózu [36]. V následujících experimentech výzkumná skupina okolo prof. Steinbuchela testovala biotechnologický potenciál tohoto producenta s využitím různých pokročilých kultivačních módů (batch, fed-batch, repeated batch), zároveň byla úspěšně ověřena robustnost procesu vůči mikrobiální kontaminaci při snížených nárocích na sterilizaci zařízení [32]. Gram-pozitivních termofilních producentů PHA bylo doposud popsáno výrazně méně. *Bacillus shackletonii* izolovaný v prostředí čínské uhelné elektrárny je schopen produkce P(3HB) při teplotách 35 až 50 °C [37]. Schopnost produkce P(3HB) byla také popsána u kmene *Geobacillus* sp. AY 946034, který je schopen růstu a produkce PHA při 60 °C [38], a nakonec byla schopnost produkce PHA

popsána u kmene *Aneurinibacillus* sp. XH2, který byl vyislován v Číně na ropném ložisku, nicméně výtěžky popsané v literatuře jsou i přes použití bohatého a finančně náročného kultivačního média spíše nízké – 111,6 mg/L [39], kmen je patentově chráněn patentem CN 103667153 B [40].

5

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je termofilní Gram-pozitivní kmen *Aneurinibacillus* sp. H1. Tento bakteriální kmen byl izolován speciálním způsobem z kompostu a je uložen v České sbírce mikroorganismů (CCM) pod sbírkovým číslem 8960.

Kmen byl izolován z kompostu odebraného v Brněnské kompostárně, odběr vzorku kompostu byl realizován dne 15. 10. 2018. Cílem bylo vyislovat termofilní producenty PHA. Podle

15

zkušeností vynálezců není možné při práci s termofilními kmeny využít standardní postup aplikace Nilské červeně do agarů tak, jak je popsáno v literatuře, protože termofily často vykazují pozitivní barvení Nilskou červení bez ohledu na jejich schopnost akumulace PHA viz. obr. 1.

Při standardním isolačním postupu je možné PHA produkující kmeny odlišit od PHA neprodukcujících pomocí aplikace Nilské červeně do agarů, kolonie producentů PHA pak pod UV zářením vykazují typickou oranžovou fluorescenci. Nicméně pokud je postup využit k izolaci termofilních kultur (kultivační teplota 50 °C a více) vykazuje pozitivní barvení Nilskou červení velká část kolonií bez ohledu na schopnost produkce PHA. Proto nebylo možné isolační postup s využitím Nilské červeně aplikovat na termofilní kultury a bylo nutno zvolit odlišnou strategii na základě předchozích poznatků o tom, že schopnost akumulace PHA zvyšuje odolnost bakterií vůči prudké změně osmolarity prostředí.

Byl vyvinut isolační protokol, kdy byla směsná kultura bakterií potenciálně obsahující PHA producenty vystavena nejdříve silně hypertonickému (100 až 200 g/L NaCl) a následně silně hypotonickému prostředí (destilovaná voda). Následně byly buňky vysety na misku, přičemž bylo možné předpokládat, že většina přeživších bakterií schopných tvořit kolonie je schopná produkce PHA. Schéma originálního isolačního postupu je uvedeno na obrázku 2.

Při izolaci termofilních PHA producentů byl jako startovací kultura využit kompost odebraný 15. 10. 2018 v podniku Centrální kompostárna Brno, provozovatel SUEZ Využití zdrojů a.s. Cca 1 g kompostu byl rozsuspendován ve 100 ml minerálního kultivačního média M1 o následujícím složení:

Složení minerálního média M1:

40

Glycerol	20 g/L
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	9 g/L
KH_2PO_4	1,5 g/L
NH_4Cl	1 g/L
Yeast Extract	0,5 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,02 g/L
$\text{Fe}^{\text{III}}\text{NH}_4$ – citrát	0,0012 g/L

* Roztok stopových prvků 1 mL/L

- 5 Úprava pH pomocí 1 M H_2SO_4 nebo NaOH na hodnotu 7,0

* Složení roztok stopových prvků:

EDTA	50 g/L
FeCl_3	8,3 g/L
ZnCl_2	0,84 g/L
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,13 g/L
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,1 g/L
$\text{MnCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,016 g/L
H_3BO_3	0,1 g/L

10

Vzorek byl následně submerzně kultivován při 50 °C po dobu 48 h. Následně byla takto připravená směsná kultura převedena (inokulační poměr 10 % obj.) do čerstvého kultivačního média a opět kultivována při teplotě 50 °C po dobu 48 h. Takto připravená směsná kultura byla vystavena působení hypertonického prostředí a následně hypotonickému prostředí tak, jak je schematicky uvedeno na obrázku 2. Po expozici hypertonickému a hypotonickému šoku byla buněčná suspenze vyseta na misky obsahující totožné médium, které bylo využito k její submerzní kultivaci a inkubována při 50 °C po dobu 48 h. Na miskách se objevily dva typy kolonií - matné ploché béžové kolonie s nepravidelným plazivým okrajem, které významně dominovaly (cca 90 % všech kolonií na miskách) a pak menší podíl drobných bílých kolonií s jasně ohraničeným okrajem. Oba typy kolonií byly vyšetřeny co do přítomnosti PHA pomocí metody infračervené spektroskopie využívající techniky zeslabeného úplného odrazu (ATR- FTIR) a přítomnost PHA byla prokázána pouze u dominantního typu kolonií, což jednoznačně prokazuje efektivitu použitého isolačního postupu. V rámci PHA produkujícího typu kolonií byl vybrán dominantní typ kolonie, která byla označena jako isolát H1.

25

Průkaz přítomnosti PHA granul u získaných isolátů byl proveden nejen pomocí FTIR

spektroskopie, ale také mikroskopickým vyšetřením isolátů pomocí Transmisní Elektronové Mikroskopie (TEM), výsledky pro isolát H1 jsou zobrazeny na obrázku 3.

Bakteriální izolát byl následně identifikován pomocí standardních mikrobiologických testů.

5

Výsledky fenotypové identifikace isolátu H1 (provedeno Českou sbírkou mikroorganismů):

Mikroskopie: Gram-negativní tyčky (gram-pozitivní stěna potvrzena KOH testem), jednotlivě, v nepravidelných shlucích, spory oválné, zduřující buňku, umístěné centrálně

10

Morfologie kolonií: matné, ploché, béžové, okraj nepravidelný, plazivý

Pozitivní testy: kataláza, anaerobní růst, hydrolýza želatiny, kaseinu, ONPG a lecithinu, ureáza, kyselina z glukózy, xylózy a laktózy, růst v přítomnosti 7 % NaCl, růst při 60 °C, hemolýza

15

Negativní testy: hydrolýza škrobu, Tweenu 80, eskulinu, tyrosinu a DNA, acetoin, redukce nitrátů, kyselina z mannitolu, celobiózy, fruktózy a inositolu, růst v přítomnosti 10% NaCl, růst při 30 °C, růst při 65 °C Simmons citrát, arginin dihydroláza.

20

Kromě standardní fenotypové charakterizace byla také provedena identifikace kmene pomocí systému BIOLOG - v obou případech byla kultura identifikována jako *Aneurinibacillus* sp., bližší taxonomické zařazení nebylo na základě výsledků možné.

25

Dalším přístupem pro taxonomické zařazení isolátu byla parciální sekvenace 16S rRNA genu pomocí primerů 16S-F (5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') a 16S-R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Při srovnání sekvence byla nejvyšší podobnost nalezena pro *Aneurinibacillus thermoaerophilus*.

30

Byl tedy získán termofilní Gram-pozitivní izolát *Aneurinibacillus* sp. H1, který může být s výhodou využit k biotechnologické produkci PHA. Kmen byl uložen jako patentová kultura v České sbírce mikroorganismů a bylo mu uděleno sbírkové číslo CCM 8960, doklady o uložení ve sbírce jsou přílohou patentové žádosti.

35

Předmětem vynálezu je způsob biotechnologické výroby polyhydroxyalkanoátů, které jsou produkovány mikroorganismem termofilního Gram-pozitivního kmene *Aneurinibacillus* sp. H1, nebo jeho přirozeně se vyskytujícími mutanty, geneticky modifikovanými buňkami tohoto kmene, které mají stejné vlastnosti, získanými metodami mutagenese nebo technikami rekombinantní DNA v kultivačním médiu obsahujícím uhlikatý substrát, komplexní zdroj dusíku a anorganický zdroj dusíku.

40

Uhlikatým substrátem je výhodně čistý glycerol, odpadní glycerol, glukóza, případně jejich směs, kdy vyrobeným polyhydroxyalkanoátem je homopolymer poly(3-hydroxybutyrát); počáteční koncentrace glycerolu je ve výhodném provedení 20 g/L.

45

V případě, že kultivační médium obsahuje kromě uhlikatého substrátu prekurzor s lichým počtem uhlíkových atomů, jako například propionát, kyselinu propionovou, valerát, kyselinu valerovou nebo jejich směs, vyrobeným polyhydroxyalkanoátem je kopolymer poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát).

50

V případě, že kultivační médium obsahuje jako uhlikatý substrát a/nebo přídavek 1,4-butandiolu nebo gamabutyrolaktonu nebo jejich strukturních analogů obsahujících obdobný strukturní motiv - hydroxylovou skupinu na posledním uhlikatém atomu čtyř případně šesti- uhlíkatého skeletu, vyrobeným polyhydroxyalkanoátem je kopolymer poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát).

55

Kultivační médium obsahuje jako uhlikatý substrát výhodně 1,4-butandiol, nejlépe v počáteční

koncentraci 4 až 6 g/L. Uhlikatým substrátem může být výhodně také 1,4-butandiol v kombinaci s glycerolem, nejvýhodněji v koncentraci glycerolu 2 až 8 g/L.

- 5 Kultivační teplota při výrobě polyhydroxyalkanoátů se pohybuje v rozmezí 45 °C až 65 °C, nejlépe v rozmezí 45 °C až 50 °C.

- Podle výhodného provedení je komplexním zdrojem dusíku v kultivačním médiu při výrobě polyhydroxyalkanoátů Trypton, nejlépe v koncentraci 0,5 g/L, anorganickým zdrojem dusíku v kultivačním médiu při výrobě polyhydroxyalkanoátů je výhodně dusičnan amonný, nejlépe v koncentraci 1,0 g/L.

- 10 Kultivační médium (dále označeno jako M2) pro provedení způsobu podle vynálezu v baňkovém měřítku i laboratorním bioreaktoru obsahuje výhodně následující složky v uvedených koncentracích:

15

Glycerol	20 g/L
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	9 g/L
KH_2PO_4	1,5 g/L
NH_4NO_3	1 g/L
Trypton	0,5 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,02 g/L
$\text{Fe}^{\text{III}}\text{NH}_4$ – citrát	0,0012 g/L
Roztok stopových prvků	1 mL/L,
Uhlikatý substrát	

kde roztok stopových prvků obsahuje následující složky v uvedených koncentracích:

EDTA	50 g/L
FeCl_3	8,3 g/L
ZnCl_2	0,84 g/L
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,13 g/L
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,1 g/L
$\text{MnCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,016 g/L
H_3BO_3	0,1 g/L

20

přičemž pH kultivačního média je 7.

- 25 Objasnění výkresů

Obr. 1: Misky termofilních kultur barveny pomocí aplikace Nilské červeně do agaru, žádná z fluoreskujících kolonií nevykazovala schopnost produkce PHA.

- 30 Obr. 2: Postup obohacení směsné kultury o producenty PHA pomocí vystavení původní kultury silně hypertonickému a následně silně hypotonickému prostředí.

Obr. 3: Snímky z Transmisní Elektronové Mikroskopie isolátu H1, šipky poukazují na přítomnost PHA granulí v bakteriálních buňkách.

Obr. 4: Záznam základních parametrů vsádkové produkce P(3HB) s využitím isolátu *Aneurinibacillus* sp. H1 a odpadního glycerolu jako substrátu v laboratorním bioreaktoru Sartorius B-Plus o maximálním pracovním objemu 5 L.

Obr. 5: Záznam základních parametrů vsádkové produkce P(3HB-co-4HB) s využitím isolátu *Aneurinibacillus* sp. H1 a 1,4-budtandiolu jako substrátu v laboratorním bioreaktoru Sartorius B-Plus o maximálním pracovním objemu 5 L.

Příklady uskutečnění vynálezu

Kultivace byly prováděny v Erlenmeyerových baňkách o objemu 250 ml obsahujících 100 mL kultivačního média. Jako inokulum pro samotné produkční experimenty byla využita kultura kultivovaná po dobu 24 h v komplexním NB médiu, použitý inokulační poměr byl 5 %. Pokud není uvedeno jinak, kultivace probíhala po dobu 72 h na termostátované třepačce (180 rpm) při teplotě 45 °C. Po ukončení kultivace byly buňky z 10 mL suspenze centrifugovány (6000 x g, 5 minut), promyty a následně vysušeny do konstantní hmotnosti při 105 °C. Koncentrace biomasy byla stanovena gravimetricky a obsah PHA a monomerní složení polymeru bylo stanoveno pomocí plynové chromatografie s plamenově-ionizační detekcí (GC-FID). Pro analýzu molekulové hmotnosti byl polymer vyextrahován pomocí chloroformu, přebytečné rozpouštědlo bylo odpařeno a molekulová hmotnost získaného polymeru byla stanovena pomocí vylučovací chromatografie (SEC-MALS).

Příklad 1

Produkce polymeru poly(3-hydroxybutyrátu)

Isoláty mohou být využity k produkci PHA s využitím různých základních uhlikatých substrátů, kdy bakteriální kultura produkovala výhradně homopolymer 3-hydroxybutyrátu P(3HB), jak dokládá tabulka 2.

Tabulka 2. Produkce PHA s využitím různých uhlikatých substrátů. Doba kultivace 72 h, 50 °C, 180 rpm, médium M1, zdroje uhlíku byly aplikovány v koncentraci 20 g/L.

Substrát	Biomasa [g/L]	P(3HB) [%]	P(3HB) [g/L]
Sacharosa	0,41 ± 0,10	16,52 ± 0,31	0,07 ± 0,02
Manosa	0,19 ± 0,08	14,85 ± 0,05	0,03 ± 0,01
Galaktosa	0,22 ± 0,04	8,94 ± 0,13	0,02 ± 0,00
Glukosa	2,00 ± 0,36	27,74 ± 0,18	0,55 ± 0,10
Fruktosa	0,24 ± 0,01	14,32 ± 0,21	0,03 ± 0,00
Laktosa	0,20 ± 0,01	9,06 ± 0,20	0,02 ± 0,00
Glycerol	2,19 ± 0,07	45,95 ± 0,10	1,00 ± 0,04
Olej	0,01 ± 0,00	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>

Z výsledků v tabulce 2 je patrné, že nejlepším substrátem je glycerol, na kterém isolát H1 vykazoval dobrý růst a významnou produkci polymeru. Významného výtěžku bylo dosaženo také s využitím glukózy, u ostatních substrátů je možné růst biomasy a produkci polymeru hodnotit spíše jako slabé, při použití oleje jako jediného testovaného uhlikatého substrátu pak nebyla kultura H1 schopna růstu ani produkce P(3HB).

Dále byla testována schopnost produkce P(3HB) při různých teplotách, jak uvádí tabulka 3.

Tabulka 3. Produkce PHA s využitím různých kultivačních teplot. Doba kultivace 72 h, 50 °C, 180 rpm, médium M1, zdroj uhlíku glycerol 20 g/L.

Teplota [°C]	Biomasa		P(3HB)
	[g/L]	P(3HB) [%]	[g/L]
45°C	3,68 ± 0,63	55,31 ± 5,81	2,03 ± 0,41
50°C	3,23 ± 0,03	46,01 ± 3,55	1,49 ± 0,37
55°C	1,46 ± 0,05	50,18 ± 1,35	0,73 ± 0,03
60°C	0,80 ± 0,01	30,60 ± 1,35	0,24 ± 0,01
65°C	0,89 ± 0,06	32,66 ± 0,24	0,29 ± 0,02

Jak dokládá tabulka 3, je isolát *Aneurinibacillus* sp. H1 schopen produkce P(3HB) v širokém rozmezí teplot, solidní produktivita byla dosažena i při teplotě 65 °C, nicméně teplotní optimum bakterie se pohybuje v rozmezí 45 až 50 °C, což už je teplota dostatečně vysoká k tomu, aby bránila růstu nejčastějším kontaminantům - běžným mesofilním bakteriím. Proces založený na využití isolátu *Aneurinibacillus* sp. H1 je tedy robustní vůči mikrobiální kontaminaci.

Produkční parametry procesu je dále možno výrazně zvýšit optimalizací základních kultivačních podmínek, především pak složením kultivačního média, jak dokládají tabulky 4, 5 a 6, ve kterých jsou demonstrovány výsledky výběru a optimalizace použitých komplexních a anorganických zdrojů dusíku.

Tabulka 4. Výsledky baňkového experimentu optimalizace počáteční koncentrace kvasničného extraktu (komplexní zdroj dusíku) a chloridu amonného (anorganický zdroj dusíku). Doba kultivace 72 h, 50 °C, 180 rpm, médium M1, zdroj uhlíku glycerol 20 g/L.

Kvasničný extrakt [g/L]	NH ₄ Cl [g/L]	Biomasa [g/L]	P(3HB) [%]	P(3HB) [g/L]
0	3	1,48 ± 0,04	48,38 ± 0,01	0,71 ± 0,02
3	1	1,91 ± 0,09	31,35 ± 0,24	0,60 ± 0,03
3	0	1,57 ± 0,16	21,01 ± 1,01	0,33 ± 0,04
0,5	1	1,95 ± 0,18	51,86 ± 1,28	1,01 ± 0,09

Tabulka 5. Výsledky baňkového experimentu identifikace optimálního anorganického zdroje dusíku. Doba kultivace 72 h, 50 °C, 180 rpm, médium M1, zdroj uhlíku glycerol 20 g/L.

Anorganický zdroj N	Biomasa [g/L]	P(3HB) [%]	P(3HB) [g/L]
NH ₄ Cl	1,86 ± 0,04	42,08 ± 0,39	0,78 ± 0,02
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,26 ± 0,07	51,29 ± 1,62	1,67 ± 0,06
NH ₄ NO ₃	3,67 ± 0,06	58,88 ± 0,85	2,16 ± 0,05
močovina	1,48 ± 0,11	44,75 ± 0,25	0,66 ± 0,05

Tabulka 6. Výsledky baňkového experimentu identifikace optimálního komplexního zdroje dusíku. Doba kultivace 72 h, 50 °C, 180 rpm, médium M1, zdroj uhlíku glycerol 20 g/L.

Komplexní zdroj			
N	Biomasa [g/L]	P(3HB) [%]	P(3HB) [g/L]
Kvasničný extrakt	1,86 ± 0,04	42,08 ± 0,39	0,78 ± 0,02
Masový pepton	2,89 ± 0,06	52,07 ± 3,39	1,50 ± 0,10
Sójový pepton	1,98 ± 0,06	48,71 ± 0,93	0,96 ± 0,03
Trypton	3,46 ± 0,09	53,61 ± 1,74	1,85 ± 0,08
Hovězí extrakt	2,90 ± 0,02	50,49 ± 4,20	1,46 ± 0,12

Jako optimální zdroj komplexního dusíku byl identifikován Trypton, anorganický zdroj dusíku pak NH_4NO_3 , optimální koncentrace komplexního zdroje dusíku je 0,5 g/L a anorganického zdroje pak 1 g/L.

Výstupem optimalizačních experimentů je kultivační médium M2 o následujícím složení:

Glycerol	20 g/L
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	9 g/L
KH_2PO_4	1,5 g/L
NH_4NO_3	1 g/L
Trypton	0,5 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,02 g/L
$\text{Fe}^{\text{III}}\text{NH}_4$ – citrát	0,0012 g/L

*Roztok stopových prvků 1 mL/L

Úprava pH pomocí 1M H_2SO_4 nebo NaOH na hodnotu 7,0

*Složení roztoku stopových prvků:

EDTA	50 g/L
FeCl_3	8,3 g/L
ZnCl_2	0,84 g/L
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,13 g/L
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,1 g/L
$\text{MnCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,016 g/L
H_3BO_3	0,1 g/L

Jako zdroj uhlíku pro produkci P(3HB) byl testován čistý glycerol i odpadní glycerol, který vzniká jako vedlejší produkt při výrobě bionafty, viz tabulka 7.

- 5 Tabulka 7. Výsledky baňkového experimentu možnosti využití odpadního glycerolu jako substrátu pro produkci P(3HB). Doba kultivace 72 h, 50 °C, 180 rpm, médium M2.

Substrát	Koncentrace [g/L]	Biomasa [g/L]	P(3HB) [%]	P(3HB) [g/L]
glycerol	10	1,60 ± 0,50	13,00 ± 1,20	0,21 ± 0,03
	20	3,27 ± 0,13	51,97 ± 2,28	1,70 ± 0,11
	30	2,72 ± 0,07	53,40 ± 4,82	1,45 ± 0,19
odpadní glycerol	10	1,08 ± 0,08	10,78 ± 1,33	0,12 ± 0,02
	20	2,88 ± 0,13	49,45 ± 0,65	1,42 ± 0,03
	30	1,67 ± 0,32	46,10 ± 5,55	0,77 ± 0,13

- 10 Jak dokládají výsledky presentované v tabulce 7, kromě čistého glycerolu je jako substrát pro produkci P(3HB) možné využít také levný odpadní glycerol, který vzniká jako vedlejší produkt při výrobě bionafty. I přes přítomnost řady toxických látek (metanol, těžké kovy, volné mastné kyseliny atd.) je bakteriální kultura *Aneurinibacillus* sp. H1 schopna využívat odpadní glycerol s podobnou efektivitou jako glycerol čistý, optimální počáteční koncentrace jak čistého tak odpadního glycerolu je 20 g/L, při nižší koncentraci je kultura vystavena limitaci zdrojem uhlíku,
- 15 což se negativně projeví na růstu i produkci P(3HB), při vyšší dávce glycerolu je kultura částečně inhibována substrátem, což je patrné na růstu biomasy především u odpadního glycerolu.

- Proces produkce PHA byl kromě baňek otestován také v laboratorním bioreaktoru. Kultivace v laboratorním reaktoru byly provedeny ve fermentoru Biostat B-plus od firmy Sartorius. Maximální
- 20 pracovní objem fermentoru byl 5 L, fermentor obsahoval 3,5 L kultivačního média média M2 s 20 g/L glycerolu a byl inokulován 350 mL inokula kultivovaného 24 hodin v médiu Nutrient Broth (popsáno níže). Během kultivace byla teplota regulována na hodnotě 45 °C, pH bylo regulováno přidávkem 1 M H₂SO₄ nebo 30 % hmotn. NaOH na hodnotě 7, aerace byla nastavena na hodnotu 1,5 vvm a míchání bylo pomocí řídicí jednotky regulováno tak, aby koncentrace
- 25 rozpuštěného kyslíku dosahovala hodnoty 10 až 30 % saturace. V pravidelných intervalech byly odebírány vzorky na stanovení biomasy, PHA tak, jak je popsáno výše, zbytkový glycerol byl stanoven spektrofotometricky.

30 Nutrient Broth

Hovězí extrakt	10 g/L
Pepton	10 g/L
NaCl	5 g/L

Záznam základních parametrů tohoto kultivačního postupu je předmětem obrázku 4.

- 35 Během vsádkové kultivace kultura vykazovala silný růst až cca do 8 hodiny kultivační, kdy se z kultivačního média vyčerpal dusík, což je patrné především z prudkého poklesu nároků na kyslík, který se projevil poklesem otáček míchadla. Následně byl primárně spotřebováván glycerol především za účelem biosyntézy P(3HB), obsah polymeru biomasy v následující kultivační periodě narostl na hodnotu cca 25 % hmotn. V 17 h kultivační byla zastavena spotřeba báze, což
- 40 pravděpodobně koreluje s vyčerpáním glycerolu. V tomto kultivačním čase bylo pravděpodobně

nejvýhodnější kultivaci ukončit. Po 21 h kultivace bylo dosaženo relativně vysokého výtěžku biomasy 5,7 g/L obsah P(3HB) v biomase dosáhl cca 26 % hmotn. a výtěžek polymeru pak hodnoty 1,5 g/L. Pro navýšení výtěžku bylo proto potřeba jiné kultivační strategie umožňující nadávkovat vyšší množství uhlíkatého i dusíkatého substrátu a zároveň precizněji využít limitaci dusíkem jako nástroje pro iniciaci syntézy polymeru.

Příklad 2

Produkce kopolymeru poly(3-hydroxybutyrátu-co-3-hydroxyvalerátu)

Isolát *Aneurinibacillus* sp. H1 je kromě produkce P(3HB) homopolymeru schopen také produkce kopolymeru poly(3-hydroxybutyrátu-co-3-hydroxyvalerátu) (P(3HB-co-3HV)), pokud je do kultivačního média aplikován vhodný prekurzor obsahující lichý počet uhlíkových atomů, tato schopnost je demonstrována v tabulce 8, kde byly jako prekurzory 3HV využity kyselina levulinová, propionát, propanol a valerát.

Tabulka 8. Výsledky baňkového experimentu pro posouzení vhodnosti různých prekurzorů 3HV pro produkci kopolymeru P(3HB-co-3HV). Doba kultivace 72 h, 50 °C, 180 rpm, médium M2, glycerol 20 g/L, prekurzor aplikován ve 24 h kultivační hodině, a to v koncentraci 2 g/L.

Isolát	Prekurzor	Biomasa		3HV [mol %]	
		[g/L]	PHA [%]	PHA [g/L]	
H1	Levulinová	1,08 ± 0,06	36,70 ± 0,72	0,39 ± 0,02	<i>nd.</i>
H1	Propionát	1,11 ± 0,04	28,15 ± 0,27	0,31 ± 0,01	32,10 ± 0,02
H1	Propanol	1,47 ± 0,04	45,11 ± 0,05	0,66 ± 0,02	3,66 ± 0,04
H1	Valerát	1,90 ± 0,02	36,29 ± 0,01	0,69 ± 0,01	66,62 ± 0,83

Všechny testované prekurzory částečně inhibovaly růst mikrobiální kultury a tím také snižovaly výtěžek polymeru. Na druhou stranu především při použití propionátu a valerátu dokázala bakteriální kultura syntetizovat kopolymer P(3HB-co-3HV) s velice vysokým obsahem 3HV.

Příklad 3

Produkce kopolymeru poly(3-hydroxybutyrátu-co-4-hydroxybutyrátu)

Dalším velice zajímavým PHA polymerem, jehož biosyntézy je izolát *Aneurinibacillus* sp. H1 schopen, je kopolymer P(3HB-co-4HB). Za účelem indukce syntézy kopolymeru musí být obvykle bakteriální kultury kultivovány na 1,4-butandiolu, γ -butyrolaktonu a 1,6-hexandiolu případně jejich strukturních analogích, tedy látkách obsahujících obdobný strukturní motiv - hydroxylovou skupinu na posledním uhlíkatém atomu čtyř případně šesti- uhlíkatého skeletu, viz tabulka 9.

Tabulka 9. Výsledky baňkového experimentu pro posouzení možnosti produkce P(3HB-co-4HB) kopolymeru s využitím různých substrátů sloužících jako prekurzory 4HB. Doba kultivace 72 h, 50 °C, 180 rpm, médium M2, jednotlivé substráty byly aplikovány jako jediný zdroj uhlíku v počáteční koncentraci 8 g/L.

Prekurzor	Biomasa [g/L]	PHA [%]	PHA [g/L]	4HB [mol %]
1,6-hexandiol	0,37 ± 0,08	9,08 ± 0,31	0,03 ± 0,01	<i>nd.</i>
γ -butyrolakton	0,52 ± 0,00	85,84 ± 1,99	0,45 ± 0,01	63,35 ± 3,27
1,4-butandiol	1,02 ± 0,04	75,48 ± 2,36	0,77 ± 0,04	79,91 ± 1,84

Z výsledků uvedených v tabulce 9 je patrné, že nejvhodnějším substrátem pro produkci P(3HB-co-4HB) je 1,4-butandiol, jehož využití umožňuje jednak dosažení nejvyššího výtěžku kopolymeru a zároveň nejvyššího obsahu 4HB v kopolymeru. Dalším možným vhodným substrátem je γ -butyrolakton, i když v tomto případě jsou výtěžky i obsah 4HB v kopolymeru nižší, navíc obecně platí, že γ -butyrolakton je cenově náročnější substrát než 1,4-butandiol.

Dále byla testována vhodná počáteční koncentrace 1,4-butandiolu, viz tabulka 10.

Tabulka 10. Výsledky optimalizace počáteční koncentrace 1,4-butandiolu. Doba kultivace 72 h, 50 °C, 180 rpm. Médium M2.

1,4-BD [g/L]	Biomasa [g/L]	PHA [%]	PHA [g/L]	4HB [mol %]	Mw [kDa]	PDI
3	1,22 ± 0,11	50,14 ± 2,65	0,61 ± 0,07	90,56 ± 0,70	115,61 ± 7,58	1,05
4	1,67 ± 0,02	54,78 ± 1,21	0,91 ± 0,02	90,89 ± 1,19	128,97 ± 3,85	1,12
5	1,60 ± 0,23	45,73 ± 0,65	0,73 ± 0,11	88,31 ± 0,29	101,13 ± 6,68	1,16
6	1,23 ± 0,15	56,32 ± 0,56	0,69 ± 0,08	92,81 ± 0,04	130,69 ± 2,32	1,13
7	1,13 ± 0,01	51,80 ± 0,71	0,58 ± 0,01	88,02 ± 0,48	120,81 ± 17,9	1,26
8	0,96 ± 0,00	44,00 ± 2,76	0,42 ± 0,03	86,87 ± 1,32	88,40 ± 2,39	1,11
12	0,72 ± 0,06	43,90 ± 2,28	0,32 ± 0,03	83,61 ± 0,94	41,28 ± 2,28	1,19
16	0,56 ± 0,05	43,38 ± 1,26	0,24 ± 0,02	85,99 ± 4,40	37,86 ± 3,53	1,18

Jak dokládají data uvedená v tabulce 10, optimální počáteční koncentrace 1,4-butandiolu je v rozmezí 4 až 6 g/L, vyšší koncentrace mají negativní vliv na výtěžek, ale také na molekulovou hmotnost polymeru.

Proces produkce P(3HB-co-4HB) byl kromě baněk otestován také v laboratorním bioreaktoru Sartorius B-Plus o maximálním pracovním objemu 5 L ve vsádkovém režimu, za podmínek stejných jako v příkladu 1 při testování produkce PHA v laboratorním bioreaktoru (viz výše).

Obrázek 5 je demonstrací průběhu vsádkové produkce P(3HB-co-4HB) s využitím 1,4-butandiolu jakožto jediného substrátu a isolátu bakteriální kultury *Aneurinibacillus* sp. H1, jakožto produkčního kmene. Také v bioreaktoru bylo dosaženo produkce kopolymeru s vysokým obsahem 4-hydroxybutyrátu.

Nicméně, jak naznačují data prezentovaná v tabulkách 9 a 10 a také na obrázku 5, použití 1,4-butandiolu jakožto jediného substrátu vede spíše k nižší produkci biomasy, a to ve svém důsledku také limituje možné výtěžky polymeru. Zdá se, že 1,4-butandiol je pomocí mikrobiální kultury *Aneurinibacillus* sp. H1 velice efektivně inkorporován do struktury kopolymeru, nicméně je to nepříliš vhodný substrát pro pokrytí energetických a dalších metabolických potřeb bakteriální kultury.

Pro nejvýhodnější počáteční koncentraci 1,4-butandiolu byla testována produkce P(3HB-co-4HB) v kombinaci s různou koncentrací glycerolu, viz tabulka 11.

Tabulka 11. Výsledky optimalizace počáteční koncentrace 1,4-butandiolu a glycerolu. Doba kultivace 72 h, 50 °C, 180 rpm. Médium M2, použitý isolát H1.

1,4-BD [g/L]	Glycerol [g/L]	Biomasa [g/L]	PHA [%]	PHA [g/L]	4HB [mol %]	Mw [kDa]	PDI
4	2	2,69 ± 0,15	68,25 ± 0,62	1,83 ± 0,10	83,56 ± 1,48	125,79 ± 3,06	1,66
4	4	2,79 ± 0,03	65,23 ± 2,64	1,82 ± 0,08	74,43 ± 1,70	64,00 ± 1,66	1,08
4	6	2,28 ± 0,26	50,37 ± 0,87	1,15 ± 0,13	42,45 ± 7,88	57,72 ± 4,51	1,72
4	8	2,43 ± 0,01	40,74 ± 3,35	0,99 ± 0,08	36,42 ± 1,63	48,28 ± 4,22	1,72
4	20	2,56 ± 0,11	44,69 ± 1,23	1,14 ± 0,06	4,59 ± 0,01	9,61 ± 0,59	1,03

Jak demonstrují data uvedená v tabulce 11, je tedy výhodné kombinovat 1,4-butandiol s glycerolem, který dokáže izolovaná bakteriální kultura efektivně využít. Současná aplikace glycerolu a 1,4-butandiolu má výrazně pozitivní vliv na výtěžky biomasy i polymeru a zároveň je pomocí volby poměrů obou substrátů možné regulovat poměr 3HB a 4HB v kopolymeru, nicméně je třeba mít na paměti, že vysoký poměr glycerol/1,4-butandiol má překvapivě negativní vliv na molekulovou hmotnost polymeru.

Průmyslová využitelnost

Způsob podle vynálezu umožňuje průmyslovou výrobu polyhydroxyalkanoátů s využitím nově izolované termofilní bakteriální kultury *Aneurinibacillus* sp. H1. Biotechnologický proces může být operován za zvýšené teploty, což má pozitivní dopad především na robustnost procesu vůči nežádoucí mikrobiální kontaminaci. Jako substrát pro produkci polyhydroxyalkanoátů je možné využít glycerol, a to včetně odpadního glycerolu vzniklého při výrobě biodieselu.

Reference:

1. Kessler B and B. WITHOLT. Encyclopedia of bioprocess technology fermentation, biocatalysis, and bioseparation: Poly(3-hydroxyalkanoates). New York: J. Wiley, 1999, s. 20242040. ISBN 15912-44579.
2. Alejandra RC et al. 2012. Enzymatic degradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by commercial lipases. Polymer Degradability and Stability 97, 597-604.
3. Shrivastav A et al. 2013. Advances in the applications of polyhydroxyalkanoate nanoparticles for novel drug delivery system. BioMed Research International Article ID 581684:12
4. Turesin F et al. 2001. Biodegradable polyhydroxyalkanoate implants for osteomyelitis therapy: *in vitro* antibiotic release. Journal of Biomaterial Science 12, 195-207.
5. Ma X-H et al. 2016. Myocardial patch formation by three-dimensional 3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate cultured with mouse embryonic stem cells. Journal of Biomaterials and Tissue Engineering 6, 629-634.
6. Cavalheiro JMBT et al. 2012. Effect of cultivation parameters on the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. Bioresource Technology 111, 391-397.
7. Huong K-H et al. 2018. Production of high molecular weight poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxybutyrate) copolymer by *Cupriavidus malaysiensis* USMAA1020 utilising substrate with longer carbon chain. International Journal of Biological Macromolecules 116, 217-223.
8. Lee W-H et al. 2004. Effects of culture conditions on the composition of poly(3-

- hydroxybutyrate-*co*-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Comamonas acidovorans*. *Polymer Degradation and Stability* 84, 129-134.
9. Raposo RS et al. 2017. Feeding strategies for tuning poly (3-hydroxybutyrate-*co*-4-hydroxybutyrate) monomeric composition and productivity using *Burkholderia sacchari*. *International Journal of Biological Macromolecules* 105, 825-833.
 10. Kitamura S and Y. Doi 1994. *Biodegradable Plastics and Polyesters: Production of copolyesters from organic acids by mutant strains of Alcaligenes eutrophus*, p. 373-378. ISBN 9780444817082
 11. US 6689589 B2 Biological systems for manufacture of polyhydroxyalkanoate polymers containing 4-hydroxyacids.
 12. US 006117658A METHODS OF MAKING POLYHYDROXYALKANOATES COMPRISING 4-HYDROXYBUTYRATE MONOMER UNITS
 13. US 8546125 B2 Recombinant hosts and methods for manufacturing polyhydroxyalkanoates
 14. Lv L et al. 2015. Application of CRISPRi for prokaryotic metabolic engineering involving multiple genes, a case study: Controllable P(3HB-*co*-4HB) biosynthesis. *Metabolic Engineering* 29, 160-168.
 15. Singh AK et al. 2019. Biomedical applications of microbially engineered polyhydroxyalkanoates: an insight into recent advances, bottlenecks, and solutions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103, 2007-2032.
 16. Kunasundari B and Sudesh K. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *eXPRESS Polymer Letters*. 5, 620-634.
 17. US 6245537 B1 Removing endotoxin with an oxidizing agent from polyhydroxyalkanoates produced by fermentation.
 18. Krüger A et al. 2018. Towards a sustainable biobased industry - highlighting the impact of extremophiles. *New Biotechnology* 40, 144-153.
 19. Chen G-Q and Jiang X-R. 2018. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 50, 94-100.
 20. Koller M 2017. Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters by Extremophiles. *MOJ Polymer Science* 1, 00011.
 21. Kucera D et al. 2018. Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*. *Bioresource Technology* 256, 552-556.
 22. Garcia-Torreiro M et al. 2017. Application of flow cytometry for monitoring the production of poly(3-hydroxybutyrate) by *Halomonas boliviensis*. *Biotechnology Progress* 33, 276-284.
 23. Ye J et al. 2018. Pilot Scale-up of Poly(3-hydroxybutyrate-*co*-4-hydroxybutyrate) Production by *Halomonas bluephagenesis* via Cell Growth Adapted Optimization Process. *Biotechnology Journal* 13, 1800074.
 24. Rodriguez-Contreras, A et al. 2016. Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] production under different salinity conditions by a novel *Bacillus megaterium* strain. *New Biotechnology* 33, 7377.

25. Melanie et al. 2018. Production of biopolymer polyhydroxyalkanoates (PHA) by extreme halophilic marine archaea *Haloferax mediterranei* in medium with varying phosphorus concentration. *Journal of Engineering and Technological Sciences* 50), 255-271.\
- 5 26. Obruca et al. 2017. The presence of PHB granules in cytoplasm protects non-halophilic bacterial cells against the harmful impact of hypertonic environments. *New Biotechnology* 39, 68-80.
27. Sedlacek et al. 2019. PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances. *New Biotechnology* 49, 129-136.
- 10 28. AT 513449 A1 Use halophilic microorganisms for the production of valuable materials.
29. DE 102008045237 B4 Method for the simultaneous production of PHA and compatible solutes in halophilic bacteria.
- 15 30. JP 5164182 B2 Polyhydroxyalkanoate according halobacterium (PHAs) method of production and halophilic.
31. JP 2011083204 A Method for highly efficiently producing polyhydroxyalkanoate (phas) or the like with halophilic bacterium.
- 20 32. Ibrahim MH and Steinbüchel A 2010 High-cell-density cyclic fedbatch fermentation of a poly (3-hydroxybutyrate)-accumulating thermophile, *Chelatococcus* sp. strain MW10. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 7890-7895.
- 25 33. Pantazaki et al. 2003. Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis in *Thermus thermophilus*: purification and biochemical properties of PHA synthase. *Molecular and Cellular Biochemistry* 254, 173-183.
- 30 34. Papi et al. 2008. Identification of PHA loci in *Thermus thermophilus* HB8 genome. *The FEBS Journal* 275, 422-422.
- 35 35. Sheu et al. 2009. Thermophilic bacterium *Caldimonas taiwanensis* produces poly (3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) from starch and valerate as carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology* 44, 289-294.
36. Ibrahim et al. 2010. Isolation and characterization of new poly (3HB)-accumulating star-shaped cell aggregates forming thermophilic bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 109, 1579-1590.
- 40 37. Liu et al. 2014. Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus shackletonii* K5 from a biotrickling filter for the production of polyhydroxybutyrate. *Journal of Environmental Science in China* 26, 1453-1462.
- 45 38. Giedraityte G and Kalediene L. 2015. Purification and characterization of polyhydroxybutyrate produced from thermophilic *Geobacillus* sp. AY 946034 strain. *Chemija* 26, 38-45.
- 50 39. Xiao et al. 2015. Thermophilic production of polyhydroxyalkanoates by a novel *Aneurinibacillus* strain isolated from Gudao oilfield, China. *Journal of Basic Microbiology* 55, 1125-1133.
40. CN 103667153 B Poly(3-hydroxybutyrate) generating thermophiles.
- 55

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Termofilní Gram-pozitivní bakteriální kmen *Aneurinibacillus species* H1, uložený v České sbírce mikroorganismů pod označením CCM 8960, produkující polyhydroxyalkanoáty.
2. Způsob biotechnologické výroby polyhydroxyalkanoátů pomocí termofilního Gram-pozitivního bakteriálního kmene *Aneurinibacillus species* H1 podle nároku 1 nebo jeho přirozeně se vyskytujících mutantů, geneticky modifikovanými buňkami tohoto kmene, které mají stejné vlastnosti, získanými metodami mutagenese nebo technikami rekombinantní DNA v kultivačním médiu obsahujícím uhlikatý substrát, komplexní zdroj dusíku a anorganický zdroj dusíku.
3. Způsob výroby podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že uhlikatým substrátem je čistý glycerol, odpadní glycerol a/nebo glukóza, kde vyrobeným polyhydroxyalkanoátem je homopolymer poly(3-hydroxybutyrát).
4. Způsob výroby podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že počáteční koncentrace čistého glycerolu nebo odpadního glycerolu je 20 g/L.
5. Způsob podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že kultivační médium obsahuje také prekurzor s lichým počtem uhlíkových atomů, jako například propionát, kyselinu propionovou, valerát, kyselinu valerovou nebo jejich směs, kdy vyrobeným polyhydroxyalkanoátem je kopolymer poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát).
6. Způsob podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že uhlikatým substrátem a/nebo prekurzorem v kultivačním médiu je 1,4-butandiol nebo gamabutyrolakton nebo strukturní analog těchto sloučenin obsahující hydroxylovou skupinu na posledním uhlikatém atomu čtyř- nebo šesti-uhlikatého skeletu, kdy vyrobeným polyhydroxyalkanoátem je kopolymer poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát).
7. Způsob podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že kultivační médium obsahuje jako uhlikatý substrát 1,4-butandiol v počáteční koncentraci 4 až 6 g/L.
8. Způsob podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že kultivační médium obsahuje jako uhlikatý substrát glycerol v koncentraci 2 až 8 g/L a 1,4-butandiol.
9. Způsob výroby podle nároků 2 až 8, **vyznačující se tím**, že kultivační teplota je v rozmezí 45 °C až 65 °C, nejlépe 45 °C až 50 °C.
10. Způsob výroby podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že komplexním zdrojem dusíku v kultivačním médiu je Trypton.
11. Způsob výroby podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že koncentrace Tryptonu v kultivačním médiu je 0,5 g/L.
12. Způsob výroby podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že anorganickým zdrojem dusíku v kultivačním médiu je dusičnan amonný.
13. Způsob výroby podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že koncentrace dusičnanu amonného v kultivačním médiu je 1,0 g/L.
14. Kultivační médium pro provedení způsobu podle nároku 2 obsahující následující složky v uvedených koncentracích:

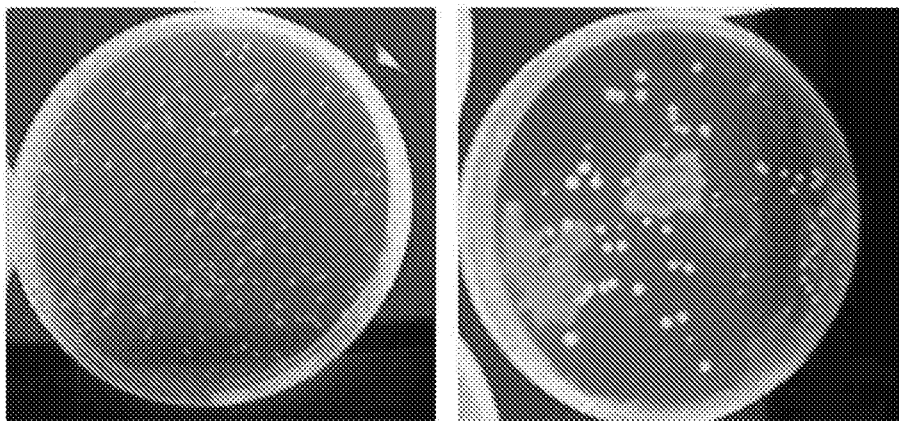
	Glycerol	20 g/L
	Na ₂ HPO ₄ • 12 H ₂ O	9 g/L
	KH ₂ PO ₄	1,5 g/L
5	NH ₄ NO ₃	1 g/L
	Trypton	0,5 g/L
	MgSO ₄ • 7 H ₂ O	0,2 g/L
	CaCl ₂ • 2 H ₂ O	0,02 g/L
	Fe ^{III} NH ₄ - citrát	0,0012 g/L
10	roztok stopových prvků	1 mL/L,
	uhlíkatý substrát,	

kde roztok stopových prvků obsahuje následující složky v uvedených koncentracích:

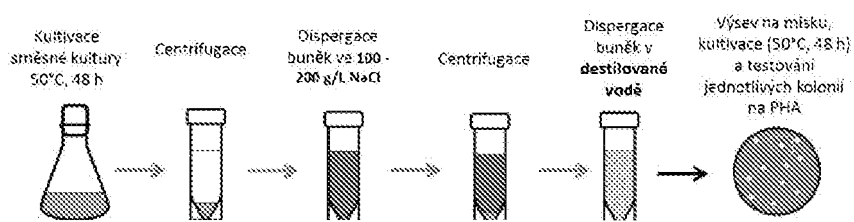
15	EDTA	50 g/L
	FeCl ₃	8,3 g/L
	ZnCl ₂	0,84 g/L
	CuCl ₂ • 2 H ₂ O	0,13 g/L
	CoCl ₂ • 6 H ₂ O	0,1 g/L
20	MnCl ₂ • 6 H ₂ O	0,016 g/L
	H ₃ BO ₃	0,1 g/L,
	přičemž pH kultivačního média je 7.	

3 výkresy

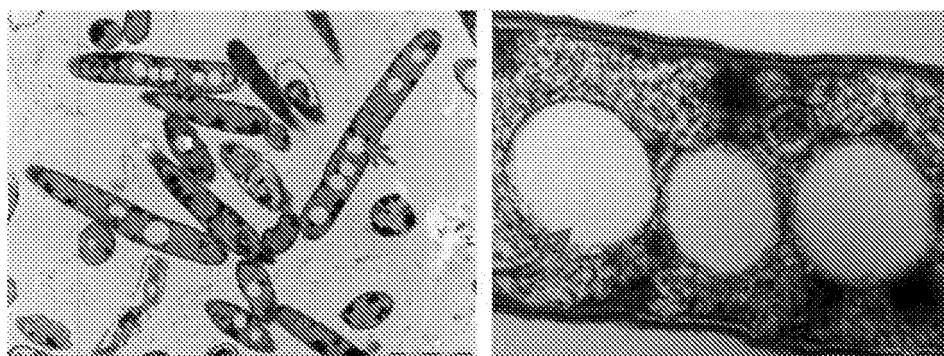
25



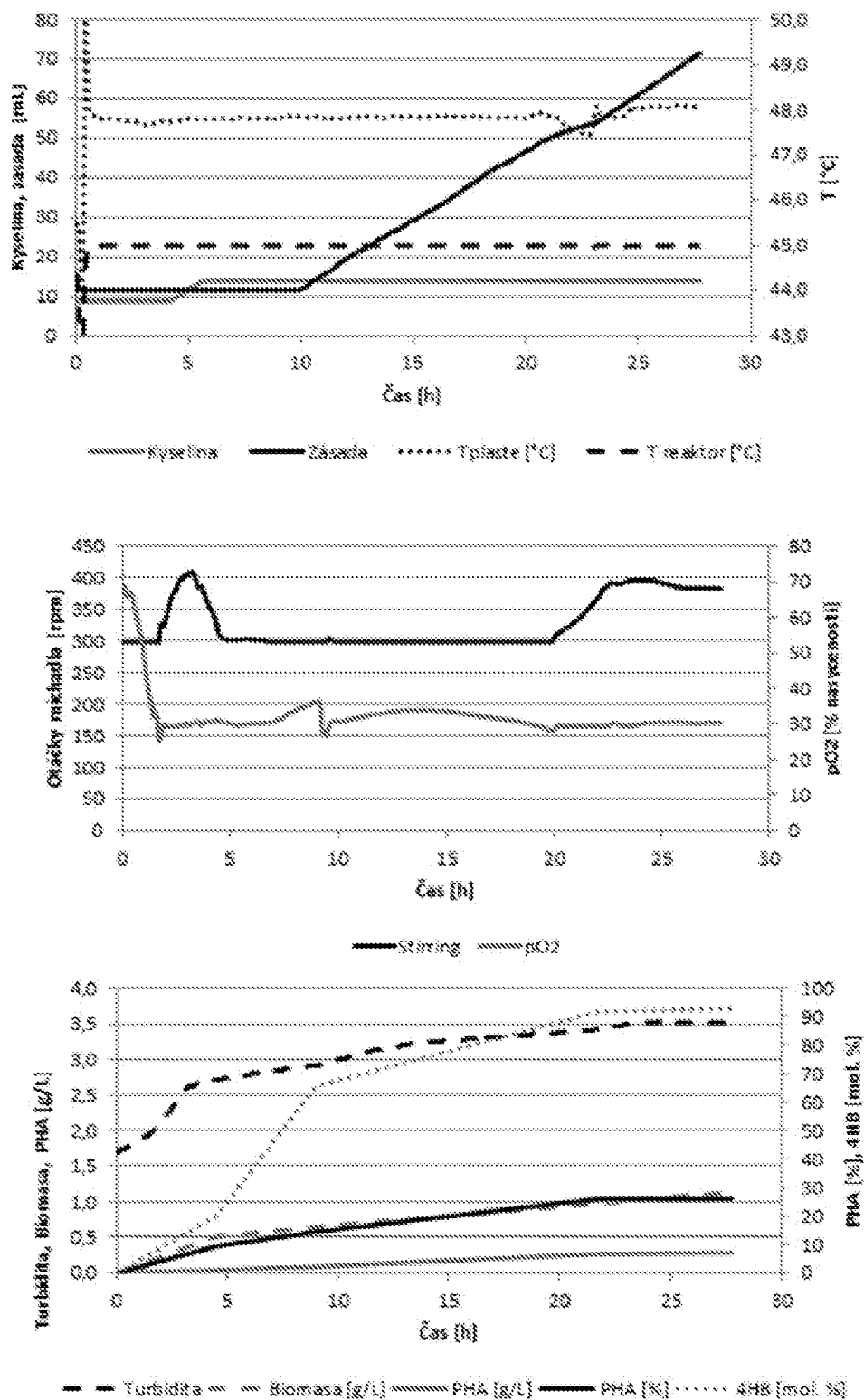
Obr. 1



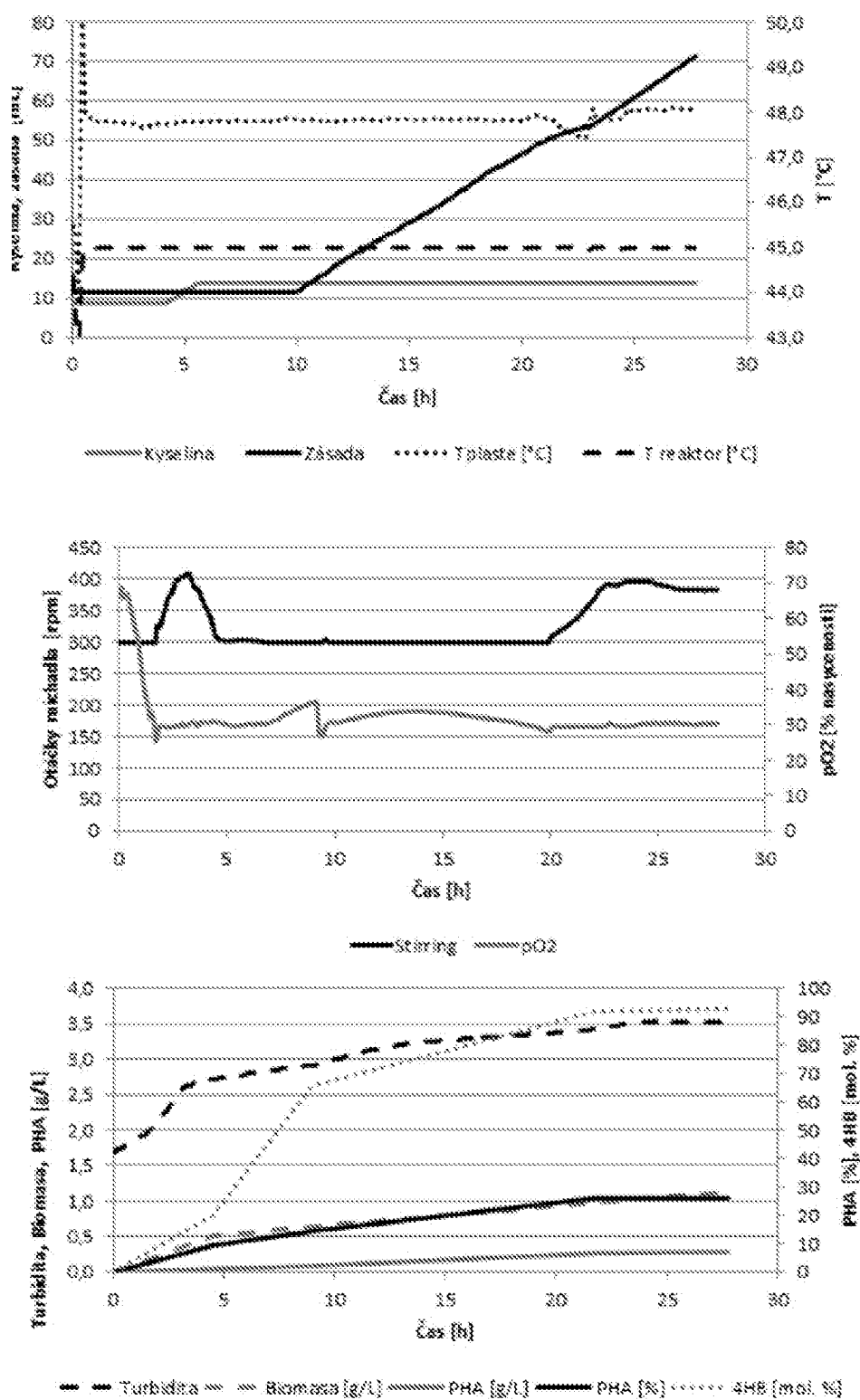
Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5