

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2012-571

(13) Druh dokumentu: **A3**

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **27.08.2012**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11.12.2013**
(Věstník č. 50/2013)

(51) Int. Cl.:

C12P 7/62 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

C12R 1/05 (2006.01)

(71) Přihlašovatel:

Vysoké učení technické v Brně, Brno - Veverčí, CZ

(72) Původce:

Márová Ivana Doc. RNDr. CSc., Brno 35 - Bystrc, CZ

Obruča Stanislav Ing. Ph.D., Valašské Meziříčí, CZ

Přikryl Radek Mgr. Ph.D., Brno, CZ

(74) Zástupce:

Ing. Dobroslav Musil, patentová kancelář, Ing.

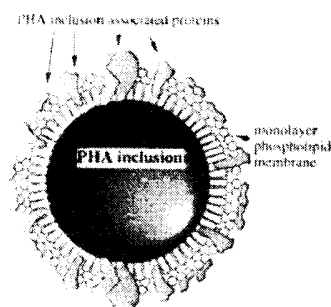
Dobroslav Musil, Cejl 38, Brno, 60200

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob produkce polyhydroxyalkanoátů
(PHA) na olejovém substrátu**

(57) Anotace:

Způsob produkce polyhydroxyalkanoátů (PHA), při kterém se na olejovém substrátu obsahujícím rostlinný olej a/nebo jedlý olej a/nebo odpadní jedlý olej, s výhodou fritovací olej, kultivuje kmen bakterií *Cupriavidus necator* H16, který přetváří olej na PHA při současné produkci vlastních extracelulárních lipolytických enzymů, které se z kultivačního média alespoň částečně izolují v průběhu fermentačního procesu před ukončením produkce a izolace PHA. Lipolytické enzymy izolované z *C. necator* v průběhu kultivace se použijí k úpravě olejového substrátu tak, že se přidají k produkčnímu médiu před zahájením kultivace, případně též v průběhu kultivace společně s příkrmovou dávkou oleje. Při izolaci PHA vyprodukovaných způsobem podle vynálezu se po ukončení fermentace obsah produkčního reaktoru zahřeje na teplotu 80 °C po dobu alespoň 30 minut, následně se zchladí na teplotu 60 °C a přidají se lytická činidla obsahující směs detergentu, například SDS, a proteolytického enzymu, čímž se získá surový homogenát, případně lyzát.



Způsob produkce polyhydroxyalkanoátů (PHA) na olejovém substrátu**Oblast techniky**

- Vynález se týká způsobu produkce polyhydroxyalkanoátů (PHA), u něhož se na olejovém substrátu obsahujícím rostlinný olej a/nebo jedlý olej a/nebo odpadní jedlý olej, s výhodou fritovací olej, kultivuje kmen bakterií *Cupriavidus necator* H16, který přetváří olej na PHA při současné produkci extracelulárních lipolytických enzymů, které se z kultivačního média alespoň částečně izolují v průběhu fermentačního procesu před ukončením produkce a izolace PHA.

Dosavadní stav techniky

- Jednou z nejefektivnějších možností výroby biomateriálu je využití přirozených procesů probíhajících v mikroorganismech. Některé bakterie vytváří z látek v prostředí, které jim slouží jako potrava, zásobní polymer PHA. Tento polymer si bakterie ukládají na horší časy a v době hladovění jej pak mohou využít jako vnitřní potravu.

- Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou skupina opticky aktivních polyesterů syntetizovaných některými bakteriálními kmeny jako zásobní forma energie. Monomerem PHA jsou (R)-3-hydroxykyseliny. Všechny monomerní jednotky jsou v R konfiguraci díky stereospecifitě enzymu, který je za syntézu PHA zodpovědný – PHA syntáze. Pouze v několika málo případech bylo zjištěno malé množství S monomeru v polyesteru. Molekulová hmotnost PHA se pohybuje v rozmezí od 200 000 Da do 3 000 000 Da v závislosti na mikroorganismu a kultivačních podmínkách. PHA se v buňce nachází v cytoplazmě ve formě granulí o rozměrech $0,2 \times 0,5 \mu\text{m}$ [1].

- PHA mohou představovat až 90 % hmotnosti buňky. Na rozdíl od ostatních biopolymerů, jako jsou například polysacharidy, bílkoviny nebo DNA, jsou PHA termoplasty. Díky svým mechanickým a technologickým vlastnostem jsou PHA velmi zajímavé z hlediska svého použití a mohou představovat alternativu k plastům připravovaným synteticky z ropy [2].

V závislosti na počtu atomů v monomerní jednotce se PHA dělí na PHA s krátkým řetězcem (short-chain-length - SCL) o délce 3 až 5 atomů uhlíku a na PHA se středně dlouhým řetězcem (medium-chain-length - MCL) o délce 6 až 14 atomů uhlíku v monomeru. Struktura PHA je znázorněna na Obr.1, přičemž pro PHA s krátkým řetězcem je $R = CH_3 - C_5H_{11}$ a pro PHA se středním řetězcem je $R = C_6H_{13} - C_{14}H_{29}$.

Už v roce 1926 izoloval Lemoigne polyhydroxybutyrát (PHB) z bakterie *Bacillus megaterium*. Na konci 50-tých let minulého století byla prokázána přítomnost PHB jako zásobní formy energie a uhlíku u řady Gram-negativních bakterií. V roce 1974 byly kromě PHB izolovány také kopolymery obsahující 3-hydroxyvalerát a 3-hydroxyhexanoát. Od té doby byla identifikována řada mikroorganismů schopných syntézy PHA včetně průmyslových kmenů. Jsou to jak Gram-pozitivní, tak Gram-negativní bakterie (autotrofní, heterotrofní, fototrofní; aerobní i anaerobní – viz patent WO2009156950A2), ale také některé kmeny archaebakterií. Mikroorganismy syntetizují PHA jako zásobní formu energie a uhlíku při dostatku uhlíkatého zdroje a limitaci ostatními živinami. Po vyčerpání uhlíkatého zdroje jsou pak PHA využívány jako zdroj energie a uhlíku. PHA představují ideální zásobní formu jak uhlíku, tak energie, což je dáno jejich nízkou rozpustností a vysokou molekulární hmotností. Díky těmto vlastnostem se výrazně nepodílí na osmotickém tlaku v buňce [1].

V roce 1976 britská společnost Imperial Chemical Industrie (ICI) rozpoznala potenciál PHB nahradit syntetické polymery připravované většinou z ropy. Přestože bakteriální produkce PHB byla drahá, předpokládalo se, že prudký růst cen ropy umožní rentabilní bakteriální výrobu PHB. Protože k očekávanému růstu cen ropy nedošlo, nachází PHB uplatnění především jako biodegradabilní a biokompatibilní materiál. Kvůli vysoké ceně však PHB a P(HB-co-HV) (kopolymer hydroxybutyrátu a hydroxyvalerátu), které se objevují pod obchodní značkou Biopol, nacházejí spíše sporadické uplatnění na trhu. V roce 1990 německá firma Wella použila obaly z Biopolu pro nový šampón. V roce 1996 odkoupila americká firma Monsanto Biopol od firmy ZENECA BioProducts, dceřiné společnosti ICI. I v současné době jsou prezentovány

patenty k produkci PHA pomocí transgenních rostlin, což by mělo snížit náklady na výrobu (př. **US 2003/0017576 A1**, **US 2004/0101865 A1**).

- Biochemická stránka biosyntézy PHB je velmi dobře prostudována. U většiny bakterií, např. *Alcaligenes eutrophus* (též *Ralstonia eutropha*; nyní 5. *Cupriavidus necator*) je PHB syntetizován reakcí, která se skládá ze tří kroků. Nejprve dvě molekuly acetyl-CoA reagují za vzniku acetoacetyl-CoA, tato reakce je katalyzována 3-ketothiolázou. Acetoacetyl-CoA je stereo selektivně redukován na (R)-3-hydroxybutyryl-CoA reakcí katalyzovanou NADPH-dependentní acetoacetyl-CoA reduktázou. Nakonec je PHB syntetizován 10. polymerizací (R)-3-hydroxybutyryl-CoA, která je realizována enzymem PHB syntázou [1].

Schéma biosyntézy PHB je znázorněno na Obr.2

- K biosyntéze PHB dochází při dostatku uhlíkatého zdroje a při limitaci například dusíkem, železem, fosforem, sírou, draslíkem anebo kyslíkem. 15. Syntéza PHB je regulována na enzymové úrovni. Z hlediska regulace syntézy PHB je zásadní intracelulární koncentrace acetyl-CoA a volného HSCoA. Při podmínkách vyrovnaného růstu je acetyl-CoA oxidován v Krebsově cyklu. Během této oxidace je produkováno NADH, které je dále využíváno pro biosyntetické účely. Při zastavení růstu kultury koncentrace NADH roste a 20. dochází ke snížení aktivity citrátsyntázy a isocitrátdehydrogenázy. Acetyl-CoA pak nemůže být oxidován v Krebsově cyklu a vstupuje do biosyntetické dráhy PHB. 3-ketothioláza je inhibována volným HSCoA, který je produkován během oxidace acetyl-CoA v Krebsově cyklu během normálního růstu kultury [4].

- Některé kmeny bakterií produkují různé typy kopolymerů PHA. 25. Kopolymer PHB a PHV může být syntetizován například kmenem *Alcaligenes eutrophus* nebo jinými typy mikroorganismů, a to při růstu na substrátu obsahujícím glukózu a propionovou kyselinu, případně přímo prekurzor 3-hydroxyvalerát. Pokud je použita propionová kyselina, je syntéza podobná syntéze PHB jen s tím rozdílem, že acetyl-CoA kondenzuje s propionyl-CoA za 30. vzniku 3-ketovaleryl-CoA, což vede k inkorporaci 3-hydroxyvalerátu do struktury polymeru. Pokud je uhlíkatým zdrojem kyselina s lichým počtem atomů uhlíku, pochází 3-hydroxyvalerát přímo z β -oxidace mastných kyselin. U *Alcaligenes eutrophus* také nízká hladina rozpuštěného kyslíku v médiu zvyšuje inkorporaci

3-hydroxyvalerátu do struktury polymeru [1]. Schéma struktury PHB a P(HB-co-HV) je znázorněno na Obr.3

Některé mikroorganismy jsou schopny syntetizovat P(HB-co-HV) při růstu v médiu, které neobsahuje prekuzory 3-hydroxyvalerátu, např. i některé mutanty *Alcaligenes eutrophus*. Kopolymer 3-hydroxybutyrátu a 4-hydroxybutyrátu může být syntetizován u *Alcaligenes eutrophus* z kyseliny 4-hydroxybutyrové, 1,4-butandiolu, butyrolaktonu a 4-chlorbutyrátu [1].

PHA jsou uloženy v buňkách ve formě granulí. Počet a velikost granulí závisí na kultivačních podmínkách a také se liší v rámci různých bakteriálních kultur. Hustota PHB granulí se pohybuje okolo $1,18 \times 1,24 \text{ g.cm}^{-3}$, hustota granulí MCL PHA je pak přibližně $1,05 \text{ g.cm}^{-3}$. Granule se skládají z polyesterů, proteinů a lipidů. Polyestery jsou obsaženy uvnitř objemu granulí, povrch je tvořen fosfolipidovou vrstvou, do které jsou zabudovány proteiny plnící různé funkce. PHA obecně mají hydrofobní charakter, proto fosfolipidy a proteiny vytvářejí rozhraní mezi PHA a okolním prostředím [1].

Jedním z proteinů PHA granulí je PHA syntáza. Pravděpodobně existují tři typy PHA syntáz, které se liší substrátovou specifitou a primární strukturou. Společným rysem je aktivní místo obsahující cystein. První typ PHA syntázy katalyzuje syntézu SCL PHA (short-chain-length) z 3-5 uhlíkatých hydroxykyselin. Druhý typ inkorporuje delší hydroxykyseliny (6 až 14 uhlíků) do struktury PHA (MCL PHA). Třetí typ se od prvních dvou odlišuje svou strukturou. Zatímco předcházející PHA syntázy jsou tvořeny jednou podjednotkou o velikosti $60 \times 70 \text{ kDa}$, třetí typ PHA syntázy je tvořeny dvěma podjednotkami: C-podjednotkou ($\sim 40 \text{ kDa}$) a E-podjednotkou ($\sim 40 \text{ kDa}$). Pro syntézu PHA tímto typem enzymu jsou nutné obě podjednotky. Substrátová specifita není tak striktní jako u předcházejících PHA syntáz, ale spíše je preferovaná syntéza SCL PHA [5].

Schéma struktury granule PHA je znázorněno na Obr. 4.

Dalším proteinem, který je možno nalézt v granuli PHA, je intracelulární PHA depolymeráza. Ta je zodpovědná za využívání PHA jako zdroje energie a uhlíku v případě limitace C zdrojem z prostředí. Dosavadní studie naznačují, že proces degradace PHA intracelulárními depolymerázami je přibližně 10krát

pomalejší než jejich syntéza. Regulace intracelulárních depolymeráz však ještě není zcela vysvětlena. Ve struktuře PHA granulí se nacházejí také nekatalytické proteiny, které se nazývají phasiny. Předpokládá se, že se podílí na stabilizaci hydrofobních PHA ve vodním prostředí buněčné cytoplasmy [6].

- 5 Homopolymer PHB je polyester se všemi asymetrickými uhlíkatými atomy v R konfiguraci. Vykazuje poměrně vysokou krystaličnost (asi 50-80%), což ho činí tuhým a křehkým. Teplota skelného přechodu je 5-9°C, teplota tání 173-180°C. PHB se rozkládá při 200°C, což je blízko bodu tání. V chloroformovém roztoku vytváří pravotočivou šroubovici. Mechanickými
10 vlastnostmi PHB (např. Youngův modul pružnosti (3,5 GPa), pružnost v tahu (40 MPa)) připomíná polypropylen. Průtažnost je však jen okolo 3%, což je výrazně méně, než je tomu u polypropylenu [1].

Některé vlastnosti derivátů PHA jsou uvedeny následující tabulce 1.

Tabulka 1

Parameter	PHB	P(3HB-HV)	P(3HB-4HO)	P(3HO-3HH)	Polypropylene
T _m (°C)	179	145	150	61	176
T _g (°C)	-4	-1	-7	-36	-10
Crystallinity (%)	70	56	45	30	60
Rupture extension (%)	5	50	444	300	400
Young Module (GPa)	3.5	2.9	–	--	1.7

15.

- Pokud je do struktury polymeru zabudován 3-hydroxyvalerát, mechanické vlastnosti se výrazně zlepší. Youngův modul pružnosti klesne pod 0,7 GPa a pružnost v tahu klesne na 30 MPa. Průtažnost materiálu roste
20 s rostoucím podílem 3-hydroxyvalerátu. Bod tání kopolymeru klesá na přibližně 130°C, mírně však klesne i teplota rozkladu. Díky těmto vlastnostem může být kopolymer taven bez toho, aby došlo k jeho rozkladu. Jak již bylo zmíněno, poly-(HB-co-HV) s obsahem 3-hydroxyvalerátu od 0 do 30 % je komerčně dostupný pod názvem Biopol [1].

Kopolymer 3-hydroxybutyrátu a 4-hydroxybutyrátu nevytváří krystalické struktury. Teplota skelného přechodu klesá od 5 do -50°C , teplota tání také klesá od 180 do 54°C s rostoucím obsahem 4-hydroxybutyrátu (0×100 %) v polymeru. Pro 94 % 4-hydroxybutyrát je Youngův modul pružnosti přibližně 55 MPa, pružnost v tahu 39 MPa a průtažnost 500 % [1].

Přestože existuje řada bakteriálních kmenů schopná produkce PHA, k průmyslovému využití je možno aplikovat jen několik málo z nich. Použitelnost bakteriálního kmene ovlivňuje řada faktorů. Především je to stabilita a bezpečnost, růstové a akumulační schopnosti, dosažitelné množství biomasy a množství PHA. Dále to jsou míra extrahovatelnosti PHA, molekulová hmotnost PHA, množství použitelných substrátů a finanční náročnost jednotlivých komponent média [1].

Firma ZENECA Bioproducts využívala k produkci PHB a P(HB-co-HV) mutantní kmeny *Alcaligenes eutrophus*. Proces byl veden jako dvoufázový fed-batch systém. V prvním kroku byla kultivována biomasa v minerálním médiu obsahujícím glukózu jako zdroj uhlíku a energie a přesně stanovené množství fosfátu. Po nárůstu kultury došlo k vyčerpání fosfátu a v druhém kroku pak docházelo k limitaci fosforem, což vedlo k akumulaci PHA. V druhém kroku byla kultuře dodávána glukóza tak dlouho, dokud nedošlo k biosyntéze požadovaného množství PHA. Každá fáze probíhala přibližně 48 hodin a konečná koncentrace suché hmotnosti biomasy byla přibližně 100 g/l. Kopolymer P(HB-co-HV) byl syntetizován přidavkem směsi glukózy a propionové kyseliny ve druhé fázi kultivace. Obsah 3-hydroxyvalerátu v polymeru byl kontrolován poměrem glukózy a propionové kyseliny [7].

Jiný proces byl vyvinut rakouskou firmou Biotechnologische Forschungsgesellschaft. Ta k produkci homopolymeru PHB použila kmen *Alcaligenes latus* DSM 1124, který byl schopen produkce PHB v množství až 80% buněčné sušiny. Proces byl veden jako jednokrokový fed-batch a jako zdroj uhlíku byla použita sacharóza [8].

Produkční náklady lze snížit, pokud by byl jako substrát využíván např. metanol, který je jedním z nejlevnějších uhlíkatých zdrojů. Kmen *Methylobacterium extorquens* produkoval PHB při diskontinuální fed-batch kultivaci na metanolu. Optimální koncentrace metanolu byla 1,7 g/l. Byla

dosažena koncentrace biomasy 9×10 g/l a množství PHB dosahovala 30-33% biomasy. Ani použití levného uhlíkatého zdroje ovšem nesníží provozní náklady, protože malé množství produkovaného PHB prodražuje a znesnadňuje následný separační proces.

- 5 Velký potenciál v sobě skrývá geneticky modifikovaná bakterie *Escherichia coli*. Ta je schopna produkce PHA v extrémně velkých intracelulárních množstvích (až 80-90% sušiny), pomocí metod genového inženýrství je možno připravit také kmeny produkující kopolymer P(HB-co-HV), případně jiné kopolymery. Syntéza PHA pomocí rekombinantní *E. coli* není
10 spojena s limitací, ale závisí na množství dostupného acetyl-CoA. Výhodou je také rychlý růst, schopnost využít ekonomicky nenáročné zdroje uhlíku, vysoká hustota buněk narostlé kultury a snadná purifikace produktu (př. patenty **KR20030070790 (A) — 2003-09-02, KR20030070789 (A) — 2003-09-02, KR20070097883 (A) — 2007-10-05, KR20070097884 (A) — 2007-10-05, US**
15 **2003/0004299 A1** atd.).

- Hlavní slabinou PHA v souboji se syntetickými polymery připravovanými z nafty jsou prozatím vysoké produkční náklady. Díky tomu je bakteriálně produkovaný PHA asi 5×10 krát dražší než například polypropylen nebo polyethylen. Naším cílem je najít efektivní způsob řízení produkce PHA
20 v baktériích tak, aby bakterie produkovaly co nejvíce polymeru. Výslednou cenu polymeru ovlivňuje zejména cena vstupních surovin pro kultivaci a náročné oddělení polymeru z buněk. Naše strategie počítá se snížením ceny vstupů využitím vhodných odpadních surovin jako krmiva pro bakterie, a to na bázi odpadních olejů. Dále počítáme s optimalizací purifikačního procesu a
25 s využitím doprovodného produktu fermentace – extracelulární lipázy k předzpracování substrátu v médiu, případně jako samostatný doprovodný produkt s řadou průmyslových aplikací.

- Lipolytické enzymy řadíme mezi esterové hydrolázy, katalyzující ve dvoufázovém systému voda – lipid, rozklad mono-, di- a triacylglycerolů na
30 vyšší mastné kyseliny, alkohol a glycerol komplexním mechanismem závislým na mnoha faktorech. Lipolytické enzymy jsou definovány jako karboxylesterázy, které hydrolyzují acylglyceroly. Lipolytické enzymy, které hydrolyzují acylglyceroly s uhlíkatým řetězcem mastných kyselin kratším než 10 C, jsou

považovány za esterázy nebo karboxylázy (EC 3.1.1.1). Enzymy, které hydrolyzují acylglyceroly obsahující řetězce mastných kyselin s počtem uhlíků ≥ 10 , jsou označovány jako lipázy nebo také jako triacylglycerolacylhydrolázy (EC 3.1.1.3). Esterázy jsou aktivní ve vodných roztocích, zatímco „pravé“ lipázy jsou aktivnější spíše na rozhraní voda-lipid než ve vodní fázi [20].

Lipolytické enzymy jsou děleny do tří skupin:

- *První skupina je nespecifická.* Lipolytické enzymy této skupiny uvolňují mastné kyseliny ze všech tří pozic acylglycerolu a kompletně hydrolyzují triacylglyceroly na mastné kyseliny a glycerol.
- 10. • *Druhá skupina lipolytických enzymů je 1,3-specifická.* Uvolňuje mastné kyseliny z vnějších pozic triacylglycerolu a dává vznik 1,2-diacylglycerolům, 2,3-diacylglycerolům a 2- monoacylglycerolům za uvolnění mastných kyselin. Dlouhá inkubace triacylglycerolu s 1,3-specifickými lipázami vede většinou k úplné hydrolyze triacylglycerolů na
- 15. • *Třetí skupina zahrnuje lipolytické enzymy, které preferují jen určité mastné kyseliny.*

Většina lipáz patří mezi extracelulární enzymy, které jsou uvolňovány do prostředí během pozdní exponenciální a časně stacionární růstové fáze.

20. Produkce lipáz je ovlivněna řadou různých faktorů, jako je teplota, pH, zdroj dusíku, uhlíku a lipidů, stres, a koncentrace rozpuštěného kyslíku a anorganických solí. Optimum lipázové aktivity je většinou kolem pH 6-9. Lipázy z *A. niger* a *Rhizopus* sp. jsou však aktivní i v kyselém prostředí při pH 4. Naopak alkalická lipáza aktivní při pH 11 byla izolována od *P. nitroreducens*. Také

25. teplotní optimum a tepelná stabilita se různí. U mezofilních MO je maximální aktivita lipáz při teplotě 30-35 °C. U termofilních MO je to většinou 60°C. U psychofilních mikroorganismů jsou lipázy produkovány již při nízkých teplotách okolo 5°C. Většina mikroorganismů může také produkovat více než jeden typ extracelulárních lipáz s různou specifikou [21].

30. Mechanismus lipázové aktivity je znázorněn na Obr. 5.

Lipolytické enzymy řadíme mezi tzv. serinové hydrolázy. Trojrozměrná 3D struktura těchto enzymů vykazuje charakteristické α/β -ohyby – α -helixy a β -listy. Katalytická triáda je složena ze tří aminokyselinových zbytků, a to serinu,

asparaginu a histidinu; u některých lipáz se vyskytuje glutamin namísto asparaginu. Lipolytická reakce probíhá pouze na rozhraní fází lipid – voda, koncentrace substrátu na rozhraní fází tedy přímo ovlivňuje rychlost reakce. V jedné fázi mohou tak existovat molekuly substrátu v rozdílném stavu bez
5 přímého vlivu na reakční rychlost [22].

Aktivita esteráz je funkcí koncentrace substrátu a řídí se kinetikou Michaelis-Mentenové, maximální reakční rychlost je dosažena při koncentraci substrátu, která je mnohonásobně menší než je saturační koncentrace. Naopak lipázy nevykazují žádnou aktivitu, dokud je substrát (lipid) ve stavu jednotlivých
10 molekul ve vodě. Když koncentrace substrátu převyší ~~rozpuštěnou~~ rozpustnost, začíná se formovat emulze, a reakční rychlost výrazně narůstá. Aktivita lipáz pak přímo závisí na přítomnosti rozhraní fází. Objasněním prostorové struktury lipáz se potvrdilo, že aktivní centrum enzymu je chráněno polypeptidovým řetězcem znemožňujícím napojení samotné molekuly lipidu na enzym a následnou tvorbu
15 aktivního komplexu. Pokud však lipáza přichází do přímého styku s lipidovou fází, začínají konformační změny, které posunou chránící polypeptidový řetězec a umožní přístup lipidu do aktivního centra enzymu. V důsledku hydrofobní interakce s lipidovou fází se zvyšuje síla vazby enzym-substrát. Tato skutečnost vysvětluje fenomén aktivace lipáz v přítomnosti fázového rozhraní. Pokud
20 enzym působící na triacylglyceroly nevykazuje tento typ aktivace, měl by být považován za esterázu. Kinetika lipolytické reakce se na rozdíl od esteráz neřídí rovnicí Michaelis-Mentenové, předpokládá se dvoukrokový mechanismus zahrnující fyzikální adsorpci lipázy na povrch lipidové fáze probíhající souběžně s aktivací enzymu a posunem ochranné polypeptidové pokličky a následně
25 vytvoření komplexu enzym-substrát, který je poté hydrolyzován na produkt a regenerovaný enzym [20 - 22].

Mechanismus hydrolyzy esterové vazby je v podstatě stejný jak pro lipázu, tak i esterázu, je složen ze čtyř kroků, jak vyplývá z Obr. 6, na němž je znázorněno schéma mikrobiální degradace lipidů. Porovnáním
30 aminokyselinových sekvencí a 3D struktury lipáz a esteráz bylo navrženo, aby jejich rozlišení bylo provedeno na základě pH; aktivní místo lipázy disponuje negativním potenciálem v rozmezí pH spojeným s maximem lipázové aktivity

(typicky při pH 8,0), zatímco aktivní místo esterázy vykazuje podobné chování při hodnotách pH 6,0, což souvisí s obvyklým nižším pH optimem aktivity.

Většina známých mikroorganismů je schopna produkovat lipázy, ale jen některé druhy jsou průmyslově využívány. Důvodem je nedostatečná produkce enzymů, nežádoucí fyzikálně chemické vlastnosti lipáz, omezené možnosti izolace z kultivačního média, atd. Komerčně nejvyužívanější plísňe jsou rody *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* a *Rhizopus*. Hlavními producenty komerčních lipáz jsou *Aspergillus niger*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Rhizopus arrhizus*, *R. delemar*, *R. japonicus*, *R. niveus* a *R. oryzae* [20].

10 Lipolytické enzymy přitahují v dnešní době značnou pozornost kvůli svému biotechnologickému potenciálu. Představují nejvýznamnější skupinu biokatalyzátorů pro biotechnologické aplikace, které se úspěšně využívají při syntézách biopolymerů, bionafty, při produkci agrochemikálií a aromatických sloučenin. Poptávka po průmyslových enzymech, především mikrobiálního
15 původu, je tak stále větší. Enzymy nachází využití v potravinářském a farmaceutickém průmyslu, textilním a kosmetickém průmyslu a při výrobě detergentů. Lipázy se používají v pivovarnictví a vinařství, při výrobě sýrů a potravinových doplňků. Jsou významné i ve farmacii při transesterifikacích a hydrolýzách hrají primární roli v produkci speciálních lipidů. Mají význam při
20 modifikacích monoglyceridů a jejich následném využití jako emulgátorů. Některé průmyslově významné chemikálie vyráběné chemickými procesy z tuků a olejů mohou být produkovány i lipázami s mnohem větší a lepší specifikou. Lipázy se také využívají při výrobě náhražky kakaového másla a výrobě esterů pro použití v kosmetickém průmyslu. V mlékárenském průmyslu jsou používány
25 pro hydrolýzu mléčného tuku. Aktuální aplikace jsou zvýšení chuti sýrů, zrychlení zrání sýrů, výrobu sýrů, přísada do jiných výrobků. Využití v pracích prášcích má lipáza z *Aspergillus oryzae*. Lipázy se používají při úpravě olejů a tuků, jako kosmetická změkčovadla, dále jako průmyslové katalyzátory při přípravě některých prostaglandinů, steroidů, karbocyklických analogů
30 nukleosidů a farmaceuticky významných polyfenolických sloučenin [21].

Rovněž využití PHA se nabízí v řadě oblastí. Předpokládá se, že jeho hlavní využití bude v oblasti obalového průmyslu, zejména k produkci kojeneckých a dětských lahví, plastů pro dětské a ekologické výrobky (např.

hračky), obalů pro kosmetický průmysl, tzv. inteligentních potravinářských obalů. Zajímavá je aplikace pro výrobu nádob (př. kelímky) pro jednorázové použití, např. pro řetězce rychlého občerstvení, které mohou zase poskytovat odpadní olej jako substrát pro produkci bioplastu.

- 5 Polymer PHA lze však využít i k jiným aplikacím: lze z něj připravit nanovlákná a nanočástice pro cílený transport léčiv, dají se z něj vyrobit biokompatibilní implantáty použitelné v lékařství jako vlákna, cévní náhrady apod.

- 10 Je třeba konstatovat, že produkce bioplastů je v současné době poměrně nízká, protože jejich cena je prozatím vyšší než u syntetických plastů, což značně omezuje poptávku. V nejbližších letech však lze očekávat podstatně přísnější regulace pro použití ekologických plastů a tím rozvoj výroby bioplastů.

- 15 V současné době je produkce PHA z olejových substrátů pomocí bakterií známá, ale ve srovnání s klasickou výrobou plastů z ropy je příliš nákladná, takže se obtížně prosazuje.

Cílem vynálezu je navrhnout způsob produkce PHA z olejového substrátu, který by byl ekonomický a produkoval velké množství PHA.

Podstata vynálezu

- 20 Cíle vynálezu je dosaženo způsobem produkce polyhydroxyalkanoátů (PHA) na olejovém substrátu obsahujícím rostlinný olej a/nebo jedlý olej a/nebo odpadní jedlý olej, s výhodou fritovací olej, na němž se kultivuje kmen bakterií *Cupriavidus necator* H16, který přetváří olej na PHA při současné produkci extracelulárních lipolytických enzymů, které se z kultivačního média alespoň
- 25 částečně izolují v průběhu fermentačního procesu před ukončením produkce a izolace PHA, přičemž podstata vynálezu spočívá v tom, že před zahájením kultivace se do olejového substrátu přidají extracelulární lipolytické enzymy vyprodukované *Cupriavidus necator* H16, čímž se urychlí růst bakteriální kultury.

- 30 Souběžná produkce PHA a extracelulárních lipolytických enzymů, při níž se před zahájením kultivace do olejového substrátu přidají extracelulární lipolytické enzymy vyprodukované *Cupriavidus necator* H16, představuje

novinku v produkci PHA, přičemž extracelulární lipolytické enzymy jsou indukovány přítomností olejového substrátu a bakterie *Cupriavidus necator* H16 produkují účinnou molekulární formu schopnou efektivně zpřístupnit olejový substrát k utilizaci. Přitom je výhodné, že enzymy jsou extracelulární produkt a PHA je intracelulární produkt, což usnadňuje separaci obou produktů.

Vzhledem k tomu, že maximální produkce extracelulárních lipolytických enzymů předchází maximální produkci PHA o několik hodin, byl navržen nový technologický postup pro izolaci extracelulárních lipolytických enzymů v průběhu produkce PHA pomocí sterilní nebo nesterilní ultrafiltrace.

10. Optimální prostředí pro kultivaci se vytváří udržováním pH kultivačního média na hodnotě 7 nebo hodnotě blízké, přidavkem NaOH nebo H₂SO₄ a řízeným vzdušením se koncentrace rozpuštěného kyslíku v průběhu fermentace udržuje v rozmezí hodnot 20-30 %.

Vzdušením se reguluje růst kultury, produkce PHA a obsah 3-hydroxyvalerátu v kopolymeru.

Pro podporu růstu bakterií na olejovém substrátu se po izolaci extracelulárních lipolytických enzymů tyto enzymy přidávají alespoň částečně zpět do kultivačního média společně s doplňkovou dávkou oleje/olejového substrátu.

20.

Objasnění výkresů

Na přiložených výkresech znázorňuje Obr. 1 strukturu PHA, Obr. 2 schéma biosyntézy PHB, Obr. 3 schéma struktury PHB a P(HB-co-HV), Obr. 4 schéma struktury PHA granule, Obr. 5 mechanismus lipázové aktivity, Obr. 6 schéma mikrobiální degradace lipidů, Obr. 7 srovnání indukce aktivity extracelulární lipázy na různých typech uhlíkatého substrátu, Obr. 8 výtěžek metabolitů v průběhu typického fermentačního procesu, Obr. 9 charakterizaci průběhu centrifugace polymerního produktu metodou analytické centrifugace (4000 rpm, 2 hodiny, 5°C), Obr. 10 vliv přidavku lipázy na průběh kultivace *Cupriavidus necator* H16 při použití oleje jako zdroje uhlíku, Obr. 11 Příklad GC-FID chromatogramu PHA, Obr. 12 příklad GPC chromatogramu PHA, Obr. 13 TGA analýza PHB, Obr. 14 DSC analýza PHB, Obr. 15 pH optimum

extracelulární lipázy, Obr. 16 vliv iontové síly na aktivitu lipázy a Obr. 17 záznam separace – barvení stříbrem.

Příklady uskutečnění vynálezu

5. Produkční kmen

- K souběžné produkci extracelulárních lipolytických enzymů a PHA byl používán kmen bakterie *Cupriavidus necator* H16; Czech Collection of Microorganisms (CCM 3726). Jedná se o sbírkový kmen povolený k produkci PHA určených pro styk s potravinami, u kmene nebyla provedena žádná genetická modifikace.

Kultivace bakterií na odpadním oleji

15. Odpadní substráty jsou využívány k produkci PHA v řadě patentů. Jeden z nejobecnějších postupů zpracování zřejmě většiny typů odpadů je uveden v patentu **US 2009/0317879 A1**, kde však jsou odpady vesměs zpracovány methanotrofními bakteriemi na nižší karboxylové kyseliny (propionová, octová) a na methan, čímž se odpad zpřístupní produkčnímu kmeni. V jiném patentu (US 2010/0190221 A1) jsou využívány dokonce substráty, které mohou být toxické pro mikroorganismy nebo životní prostředí. Pomocí enzymu methanomonooxygenázy jsou převáděny organické sloučeniny na utilizovatelné substráty.
25. Rovněž vlastní produkce PHA na odpadních olejích nejrozličnějšího druhu je součástí řady různých patentů. Autoři využívali např. skládkový odpad obsahující olej (**CN101255227 (A) — 2008-09-03**), dále jedlý odpadní olej k produkci PHA pomocí vodíkových bakterií (**JP2004254668 (A) — 2004-09-16**), různé typy rostlinných olejů – uvedeno obecně (**WO 2009/156950 A2 —** jmenovitě slunečnicový, řepkový, konopný a další bez bližšího upřesnění; neuvádějí odpadní fritovací olej). Dalším možným substrátem je olej z *Brassica carinata* utilizovaný bakteriemi rodu *Pseudomonas* (**WO 2010/0441180A1**). Dále existuje několik publikací zabývajících se produkcí PHA z olejů a příbuzných substrátů [9-19]. V žádném z dostupných zdrojů se nevyskytuje

možnost využití odpadního fritovacího oleje předem hydrolyzovaného enzymem indukovaným v průběhu kultivace samotným produkčním kmenem.

Souběžná produkce dvou průmyslově významných metabolitů (PHA a extracelulárních lipolytických enzymů), z nichž jeden (extracelulární lipolytický enzym) je indukován výhradním typem substrátu o konkrétním chemickém složení (rostlinný olej), přičemž tento substrát je s výhodou navíc odpadní a specifický (fritovací olej, který nemá další využití), je odbouratelný druhým z produktů (lipolytickými enzymy) a současně poskytuje nejvyšší výtěžky druhého z metabolitů (na oleji byly dosaženy u produkčního kmene absolutně nejvyšší výtěžky PHA – až 96 % biomasy) nebyla dosud v případě produkce PHA popsána v literatuře odborné ani patentové.

V některých patentech se vyskytuje popis produkce doprovodných produktů (př. **WO 02/070659 A2**), většinou se však jedná o alespoň částečně anaerobní proces zpracování substrátu (výjimečně olej, který však musí být utilizován aerobně) a jedná se většinou o malé molekuly – produkty typicky kvasných procesů (kyselina octová, propionová apod.), které mohou být dále nějakým způsobem využity. Jeden publikovaný patent popisuje simultánní produkci intracelulárních PHA a extracelulárních polysacharidů, avšak za využití geneticky modifikovaných kmenů (**WO 95/33838**).

Aktivity extracelulárních lipolytických enzymů na různých typech uhlíkatého substrátu jsou uvedeny v **Tabulce 2**

	Relativní aktivita [%]	U/ml	U/mg
Olej	100.0 ± 1.1	34.37±0.37	72.23±0.77
Fruktóza	5.3±1.4	1.83±0.49	0.21±0.06
NB	38.7±7.1	13.29±2.46	0.26±0.05
Glycerol	38.1±4.1	13.11±1.40	10.15±1.09
Propionát	23.9±5.4	8.23±1.85	25.68±5.77
Palmitát	54.3±3.5	18.67±1.20	37.92±2.44

a srovnání indukce aktivity extracelulárních lipolytických enzymů na různých typech uhlíkatého substrátu je znázorněna na Obr. 7.

Složení médií: inokulační; produkční; přídavek prekurzoru

Dosud nejběžnějším druhem PHA akumulovaným v bakteriích produkčních kmenů je homopolymer PHB. Vzhledem k nízké krystalinitě a flexibilitě byly postupně vyvíjeny procesy k produkci kopolymerů P(3HB-co-3HHx), kde byl produkován zejména kopolymer s kyselinou 3-hydroxyvalerovou, obvykle s využitím transgenního kmene *Ralstonia eutropha* nebo transgenních kmenů s geny z některého druhu *Pseudomonas* sp. (japonské patenty **Kokai 57-150393, 59-220192**). Nedávno byly přihlášeny patenty na produkci p(3HB-co-3-HHx) obsahující kyselinu 3-hydroxyhexanovou (patenty **Kokai 5-93049, 7-93049**) pomocí půdní bakterie *Aeromonas caviae*. Zavedením 3-HH bylo dosaženo vysoké flexibility polymeru. Rovněž byly přihlášeny práce zaměřené na produkci kopolymeru s 3-hydroxyalkanovými kyselinami se zavedenou methylovou skupinou, nejčastěji s využitím rekombinantních kmenů. (př. **US 2011/0081692 A1**). Také byl prezentován patent na produkci PHA u vybraných druhů rodu *Pseudomonas* s řízeným složením kopolymeru regulovaným pomocí složení média (C-zdroj – mastné kyseliny) a přídavků vhodných prekurzorů (**US 2011/0166318 A1**), případně patent na přípravu blokových kopolymerů pomocí řízení enzymových aktivit a složení média (**WO 0006762 A1**).

Vzhledem k širokému použití a rovněž souladu složení kopolymeru 3-HB-HV s evropskou legislativou pro použití v potravinářství (tj. na potenciální aplikace) jsme se zaměřili na produkci kopolymeru 3-HB-HV s obsahem HV od 4 do 10%.

Složení médií

Médium pro úchovu a inokulum I

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

Médium pro další inokulační kroky a produkční médium:

	Olej (odpadní, rostlinný)	20 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	3 g
5	Na ₂ PO ₄	11,1 g
	KH ₂ PO ₄	1,02 g
	Micro element solution*	1 ml
	Destilovaná voda	1000 ml*Micro element solution
	FeCl ₃	9,7 g
10	CaCl ₂	7,8 g
	CuSO ₄	0,156 g
	CoCl ₂	0,119 g
	NiCl ₂	0,118 g
	CrCl ₂	0,062 g
15	Destilovaná voda	1 000 ml

Kultivace bakterií, produkce biomasy a její řízení

Bylo připraveno inokulum I o celkovém objemu 2000 ml (obvykle v Erlenmeyerových baňkách), pak zaočkovací inokulum II ve fermentoru o objemu 25 l a po 23 h od kultivace bylo inokulem zaočkováno 200 l kultivačního média v produkčním tanku.

Kultivace v produkčním médiu probíhala po dobu 32 ¹²/₃ 38 hodin. V 8. ¹²/₃ 12. hodině bylo přidáno 10 g/l prekurzoru (propionát sodný), 3 g/l (NH₄)₂SO₄ a 20 g/l oleje (příkrm). V čase 8 ¹²/₃ 21,5 h bylo obvykle dosaženo maximální aktivity extracelulárních lipolytických enzymů, část média (10 ¹²/₃ 50%) byla tedy odčerpána, biomasa byla odseparována pomocí ultrafiltrace a následně (i) sterilně vrácena zpět do procesu nebo (ii) přidána do reaktoru nesterilně před izolací PHA. Permeát obsahující extracelulární lipolytické enzymy byl dále zakoncentrován na ultrafiltraci (vylučovací limit molekulové hmotnosti, tzv. „cut-off“ 10 kDa). V čase 20-25 h byla přidána další dávka oleje (20 g/l).

Výtěžky metabolitů v průběhu typického fermentačního procesu jsou znázorněny na Obr. 8 a popsány v **Tabulce 3**:

Čas	Biomasa[g/l]	PHA [g/l]	PHA %	3HV [%]	Lipáza[U/ml]
8	6.23 ± 0.04	4.08 ± 0.04	65.45 ± 0.72	0.00 ± 17.20	17.20 ± 2.70
14.5	11.52 ± 0.09	8.89 ± 0.25	77.15 ± 2.17	0.51 ± 18.68	18.68 ± 0.91
21.5	16.14 ± 0.49	10.85 ± 0.41	67.23 ± 2.54	1.32 ± 16.40	16.40 ± 1.27
24.5	37.65 ± 0.74	31.23 ± 0.20	82.95 ± 0.53	2.43 ± 5.22	5.22 ± 0.72
29.5	43.79 ± 0.18	36.19 ± 1.89	82.65 ± 4.31	4.01 ± 7.04	7.04 ± 1.82
32	53.90 ± 0.70	49.94 ± 1.73	92.66 ± 3.21	6.37 ± 9.27	9.27 ± 1.38

Výtěžnostní koeficient $Y_{PHA/S} = 0.7$ (do kalkulace byl zahrnut olej i prekurzor).

5. V průběhu kultivace bylo pH kultivačního média udržováno na hodnotě 7 přidavkem 1 M NaOH nebo 0,5 M H₂SO₄, vzdušnění bylo regulováno tak, aby hodnota koncentrace rozpuštěného kyslíku („dissolved oxygen“, DO) byla v průběhu fermentace 20-30 %.

10. **Jednokroková ekologická izolace polymeru z buněk přímo v průmyslovém reaktoru bezprostředně po ukončení kultivace**

15. Buňky se od média obvykle nejprve oddělují centrifugací nebo filtrací. Poté musí být narušeny, aby došlo k uvolnění polymeru. Nejčastěji používanou metodou je extrakce polymeru pomocí vhodného rozpouštědla (chloroform, methylen chlorid propylen karbonát, dichloretylen). Tento proces je však na spotřebu rozpouštědla velmi náročný, a to jej prodražuje. Jiná metoda využívá chlornanu sodného, ten ovšem způsobuje částečnou degradaci PHB a snižuje jeho molekulovou hmotnost. Byla publikována řada patentů využívajících snad
20. všechny typy dostupných organických rozpouštědel – i těch, v nichž se PHA prokazatelně nerozpouští. Postupy izolace polymeru PHA pomocí organických rozpouštědel lze najít v řadě publikací i v patentech, př. **RU 2199 587 C2, US 2002/0081646 A1** a další.

25. Byly ale rovněž popsány procesy (obvykle obecně), které mohou být použity při komerční produkci PHB a P(HB-co-HV) jako alternativa k extrakci rozpouštědly. Jednou z možností je lyofilizace (mrazové sušení; **WO**

2006103699 A1, WO 2010/082810 A1), dále byly popsány postupy používající směsi enzymů a detergentů bez bližšího upřesnění složení lytické směsi (př. **WO2010116681 (A1) — 2010-10-14**),

- V předložené přihlášce nejsou buňky předem oddělovány, polymer je
5. izolován přímo ve fermentačním reaktoru bezprostředně po ukončení kultivace (obvykle 32 až 38 hodin). Buňky v kultivačním médiu jsou nejprve vystaveny zahřátí, kdy se kultivační médium ohřeje na teplotu 80°C (30 min) a po následném ochlazení na 60°C je přidána směs obsahující proteolytický enzym (tj. enzym hydrolyzující bílkoviny, např. alkalázu) a detergent (př. dodecylsulfát
10. sodný) s optimalizovanou koncentrací (0,04 g SDS/1 g CDW; Alcojet – neutrální průmyslový detergent). Většina buněčných komponent je působením těchto dvou činidel hydrolyzována, zatímco polymer zůstane nedotčen. Poté se polymer oddělí frakční membránovou ultrafiltrací, promyje vodou a vysuší lyofilizací.
15. Centrifugace jakožto běžně používaná technika k oddělení buněk od média, případně polymeru od zbytku buněk se ukázala být obtížně použitelnou. Zejména centrifugace produktu je docela obtížná, protože zbytkový olej unáší relativně velkou část (cca 1/4 až 1/3) centrifugovaného vzorku k hladině, což představuje značnou ztrátu, jak vyplývá z Obr. 9, na němž je znázorněna
20. charakterizace průběhu centrifugace polymerního produktu metodou analytické centrifugace (4000 rpm, 2 hodiny, 5°C).

Proto byla v předložené přihlášce optimalizována frakční membránová ultrafiltrace za použití filtračních kazet s „cut-off“ vylučovacím limitem 200-400 kDa.

25. Finální produkt může být ještě promyt za účelem zvýšení čistoty. V následující tabulce (Tabulka 5) je uveden přehled možných purifikačních podmínek a jejich vliv na čistotu produktu PHA.

Tabulka 5

	PHA %
H ₂ O 25°C	92.39 ± 6.15
H ₂ O 40°C	93.79 ± 9.78

H ₂ O 60°C	101.64±0.86
H ₂ O 80°C	102.44±5.91
0,1 M NaOH	100.55±1.92
0.1 M HCl	91.73±1.42
3% H ₂ O ₂	58.36±1.42
1% EtOH	91.34±1.43
kontrola	91.72±2.49

Produkce, izolace a využití extracelulárních lipolytických enzymů

- Pokud se bakterie kultivuje na oleji (a to výhradně na oleji), kterým může
5. být rostlinný olej a/nebo jedlý olej a/nebo odpadní jedlý olej, s výhodou fritovací olej, produkuje extracelulární lipolytické enzymy, které jí pomáhají olej rozkládat a využít. Extracelulární lipolytické enzymy jsou průmyslově významné enzymy a v průběhu této kultivace jsou produkovány ve velkém, tedy průmyslově zajímavém množství. Proto navrhujeme celkové technologické řešení zahrnující
10. společnou produkci PHA (intracelulární polymer; výtěžek 93,96 %) a lipázy (extracelulární enzym; aktivita cca 100 U/ml). Při společné produkci je potřeba předřadit finální lýze buněk a izolaci PHA krok zahrnující izolaci extracelulárních lipolytických enzymů z kultivačního média.

- Navrhli jsme efektivní technologické řešení izolace extracelulárních
15. lipolytických enzymů v průběhu fermentačního procesu metodou frakcionované membránové filtrace. Maximální produkce extracelulárních lipolytických enzymů předchází maximální produkci PHA o několik hodin, v průběhu produkce PHA se tedy odčerpá, buď sterilně všechno kultivační médium, nebo nesterilně část kultivačního média i s buňkami (záleží na vybavení biotechnologické linky). A
20. následně jsou technicky možné dva způsoby izolace extracelulárních lipolytických enzymů:

- a) sterilní ultrafiltrace kultivačního média od buněk ve vhodném čase (obvykle po 24. hodině kultivace), doplnění nového kultivačního média se substrátem a prekurzorem k rostoucím buňkám. Prekurzor se přidává do
25. kultivačního média společně s doplňkovou dávkou oleje (příkrm) a s extracelulárními lipolytickými enzymy.

b) nesterilní odčerpání části kultury (př. 1/3 buněk v kultivačním médiu), izolace buněk a následná purifikace extracelulárních lipolytických enzymů ultrafiltrací; poté návrat buněk s cca 70% obsahem polymeru zpět do reaktoru těsně před finální izolací PHA.

- 5 Extracelulární lipolytické enzymy je dále možné využít v následující kultivaci jako faktor navyšující produkci biomasy a tím zrychlující celý proces. Pokud jsou do média obsahujícího olej přidány extracelulární lipolytické enzymy izolované dle postupu popsaného výše v množství $0,5 \pm 3$ U na ml kultivačního média (tj. cca 2%) a následně je médium inokulováno kulturou *Cupriavidus*
10 *necator*, roste bakteriální kultura o cca 20-30% více. Extracelulární lipolytické enzymy produkované *C. necator* se pro tento účel jeví vhodnější než např. komerčně dodávaná lipáza produkovaná mikroorganismem *Rhizopus oryzae*. Vliv přídavku extracelulárních lipolytických enzymů na průběh kultivace *Cupriavidus necator* H16 při použití oleje jako zdroje uhlíku je znázorněn na Obr.
15 10.

Charakterizace polymeru PHA

Stanovení obsahu a struktury produkovaného PHA

- 20 Koncentrace a složení PHA se nejčastěji stanovuje metodou plynové chromatografie (GC) s detekcí FID (plamenově ionizační detektor). Před vlastní analýzou je polymer podroben kyselé hydrolýze a následné methylaci za vzniku
25 těkavých methylesterů 3-hydroxykyselin. Tyto estery jsou následně separovány a detekovány pomocí GC. Na Obr. 11 je uveden typický chromatogram polymeru složeného z 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu. Integrací píků a posléze metodou kalibrační křivky (Tab. 6) lze odečíst obsah každé ze složek a vyjádřit jejich poměr, tedy zastoupení 3-HV v kopolymeru PHB-HV.

Tabulka 6 Vztah mezi plochou píku a koncentrací 3HB (3HV)

3HB (mg·ml ⁻¹)	3HB plocha (-)	3HV (mg·ml ⁻¹)	3HV plocha (-)
2,0592	16133,8	0,2808	3076,1
4,1272	31629,3	0,5628	6159,2
6,1952	44894,3	0,8448	8801,3
8,2632	65493,6	1,1268	12837,5
10,296	77344,3	1,4040	15265,1

Stanovení molekulové hmotnosti produkovaného PHA

Molekulová hmotnost PHA je velmi důležitým parametrem zejména z hlediska aplikačního využití. Důležitá je její hodnota jak při zpracování PHA např. na bioplazmy, nanovlákná nebo částice, ale i při řadě farmaceutických aplikací, zejména v souvislosti s biodegradabilitou použitých materiálů. Proto je důležité charakterizovat produkovaný mikrobiální polymer co nejdělněji, případně objektivizovat podmínky pro produkci polymeru o definované molekulové hmotnosti.

Molekulová hmotnost produkovaného PHA polymeru byla stanovována metodou gelové permeační chromatografie (GPC). Příklad GPC chromatogramu PHA je znázorněn na Obr. 12. V průběhu řady testovacích experimentů bylo zjištěno, že pouhou modifikací kultivačních podmínek (např. nutriční stres) a volbou kultivačního média lze ovlivnit molekulovou hmotnost výsledného polymeru. Někteří autoři k tomuto účelu používali enzymové preparáty, chemické látky nebo radiaci (viz př. **US 2006/0183205 A1**).

V našem případě bylo dosaženo produkce polymeru s molekulovou hmotností v rozmezí $1,85 \cdot 10^5$ až $2,41 \cdot 10^5$, přičemž na sacharidovém substrátu bylo dosaženo více než dvojnásobné hodnoty.

Molekulová hmotnost vybraných vzorků PHA je uvedena v tabulce 7

	Mn	Mw	D
Biomer PHB (komerčně dostupný materiál)	$1.75 \cdot 10^5$	$5.15 \cdot 10^5$	2.94
Sigma P(HB-co-HV); 5 % HV (komerčně dostupný materiál)	$1.84 \cdot 10^5$	$5.51 \cdot 10^5$	2.99
Sigma P(HB-co-HV); 12 % HV (komerčně dostupný materiál)	$1.36 \cdot 10^5$	$2.95 \cdot 10^5$	2.17
PHB, kultivace <i>C. necator</i> H16, substrát fruktóza	$6.94 \cdot 10^5$	$1.81 \cdot 10^6$	2.61
PHB, kultivace <i>C. necator</i> H16, substrát olej	$3.84 \cdot 10^5$	$1.15 \cdot 10^6$	3.00
P(HB-co-HV), 6 % HV; kultivace <i>C. necator</i> H16, substrát olej, prekursor propionát sodný	$2.41 \cdot 10^5$	$6.60 \cdot 10^5$	2.74

Tepelná stabilita

Tepelné vlastnosti PHA závisí na zastoupení jednotlivých monomerů (viz. tab. 1). Jednotlivé parametry jako teplota degradace materiálu, bod tání atd. se rutinně stanovují pomocí TGA (termogravimetrická analýza), která je znázorněna na Obr. 13, a DSC (diferenciální skenovací kalorimetrie), která je znázorněna na Obr. 14.

Teplota bodů tání a bodu degradace vybraných vzorků PHA je uvedena v Tabulce 8

	Teplota degradace [°C]	Teplota tání [°C]
Biomer PHB (komerčně dostupný materiál)	264	168.52
Sigma P(HB-co-HV); 5 % HV (komerčně dostupný materiál)	264	144,87
Sigma P(HB-co-HV); 12 % HV (komerčně dostupný materiál)	278	146,36
PHB, kultivace <i>C. necator</i> H16, substrát fruktóza	281	172.36
PHB, kultivace <i>C. necator</i> H16, substrát olej	281	171.05
P(HB-co-HV), 6 % HV; kultivace <i>C. necator</i> H16, substrát olej, prekurzor propionát sodný	256	166,40

Rozpustnost PHA

PHA není rozpustné v jednoznačně polárních nebo jednoznačně nepolárních rozpouštědlech. Schopnost polymer zčásti rozpustit nebo vytvořit gel mají rozpouštědla ze střední oblasti elutopní řady. Rozpustnost PHA ve vybraných organických rozpouštědlech ukazuje Tabulka 9:

Rozpustnost Barva kapaliny	Dichlormetha			
	Hexan HX nr.	n DCM mr.	Xylen XYL mr. + gel	Toluen TOL gel
	slabě nažl.	slabě nažl.	slabě nažl.	slabě nažl.
Rozpustnost Barva kapaliny	Dimethylsulfoxi			
	Dioxan DOX mr.	Chloroform CHL gel	d DMSO gel	Butylacetát BuAc mr. + gel
	slabě nažl.	slabě nažl.	slabě nažl.	slabě nažl.
Rozpustnost Barva kapaliny				
	Ethylacetát EthAc nr.	Aceton ACE nr.	2-propylalkohol 2PrOH nr.	Ethanol EtOH nr.
	slabě nažl.	slabě nažl.	slabě nažl.	slabě nažl.

R – dobře rozpustný; *r* – rozpustný; *mr* – málo rozpustný; *nr* – nerozpustný; *gel* – tvoří gel

Charakterizace extracelulárních lipolytických enzymů

- 5 K základním molekulárním charakteristikám patří pH optimum, jehož hodnoty jsou shrnuty v Obr. 15 a uvedeny v **Tabulce 10**, která uvádí změny aktivity extracelulárních lipolytických enzymů při různém pH hodnocené v % ve srovnání s nejvyšší hodnotou 100 %.

pH	Aktivita (%)
3,0	7,42 ± 2,22
4,0	6,52 ± 1,96
4,8	9,59 ± 0,31
5,8	18,80 ± 1,13
6,6	27,49 ± 1,48
7,0	37,21 ± 2,36
7,4	76,60 ± 9,89
8,0	79,28 ± 5,69
8,3	54,6 ± 1,78
9,0	10,1 ± 2,66
9,4	16,88 ± 2,49
9,8	68,54 ± 3,49
10,6	100 ± 17,47
11,0	60,23 ± 8,70
11,5	2,05 ± 0,96
12,0	6,14 ± 5,04
13,0	11,13 ± 6,93

- 10 Průběh pH optima vykazuje dvě maxima, což odpovídá dvěma molekulárním formám extracelulárních lipolytických enzymů. U mikroorganismů je podobný typ sekrece lipolytických enzymů obvyklý; vzhledem k hodnotě pH optima lze předpokládat, že obě formy štěpí acylglyceroly a jde zřejmě o enzymy s odlišnou preferencí esterové vazby v triacylglycerolech.
- 15 Vliv iontové síly (NaCl, 0 – 5 mol/l) na aktivitu extracelulárních lipolytických enzymů je uveden na Obr. 16. Z průběhu závislosti je patrné, že aktivita extracelulárních lipolytických enzymů klesá s rostoucí iontovou silou, což je významné z hlediska složení kultivačního média.

Parciální purifikace extracelulárních lipolytických enzymů

- 20 Kultivační médium obsahuje po separaci buněk kromě extracelulárních lipolytických enzymů i řadu jiných proteinů a dalších látek. Navíc jsou všechny tyto látky včetně cílového enzymu značně zředěny. Za účelem zahuštění a

bližší charakterizace extracelulárních proteinů byly provedeny některé následující experimenty zaměřené na ověření levné a efektivní izolace a současné purifikace enzymu.

5 Srážení acetonem vedlo ke značným ztrátám aktivity, výtěžek představoval cca 1%. Při srážení síranem amonným v rozmezí koncentrací 60–80% bylo nasycení úspěšnější, avšak následná dialýza vedla k prakticky kompletní ztrátě aktivity, výtěžky se pohybovaly kolem 3%. Další metodou použitou na purifikaci extracelulárních lipolytických enzymů byla frakcionovaná ultrafiltrace. V první fázi byly odstraněny buňky (na filtru s cut-off 1 mil. kDa) a
10 dále byly izolovány extracelulární lipolytické enzymy na ultrafiltru s „cut-off“ vylučovacím limitem 10 kDa. Došlo k 8-násobnému zkoncentrování a výtěžku cca 91 U/ml kultury, viz **Tabulka 11**. Ultrafiltrace byla tedy navržena jako optimální součást technologie.

Tabulka 11

	Aktivita (U·ml ⁻¹)	Koncentrace proteinů (mg·ml ⁻¹)	Aktivita (U·mg ⁻¹)	objem (ml)	výtěžek (-)
Supernatant	29,92 ± 3,24	0,30 ± 0,01	99,74 ± 10,83	400	1,00
Ultrafiltration	90,68 ± 1,47	0,44 ± 0,01	206,11 ± 3,36	50	0,38

15

**Molekulová hmotnost extracelulárních proteinů a čistota preparátů
extracelulárních lipolytických enzymů stanovená pomocí
PAGE/SDS**

20 Za účelem charakterizace proteinového složení a tedy i čistoty zahuštěného preparátu extracelulárních lipolytických enzymů byla využita metoda polyakrylamidové gelové elektroforézy (PAGE) v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS), kde se proteiny separují na základě pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli. Pohyblivost je dána poměrem hmotnosti a
25 náboje částice. Poněvadž všechny proteiny mají za těchto podmínek stejný náboj i tvar, separace probíhá v podstatě na základě rozdílů molekulové hmotnosti. Záznam separace (barvení stříbrem) je na Obr. 17. Legenda k Obr. 17 je v následující **Tabulce 12**

linie	Vzorek – purifikační krok
1	Standard
2	Dialýza
3	Dialýza
4	Ultrafiltrace
5	Aceton- precipitace
6	(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitace 60%
7	(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitace 70%
8	(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitace 80%

a Tabulce 13, která popisuje proteinové frakce elektroforézy

Zóna	relativní molekulová hmotnost (Da·10 ³)
Proteinová frakce 1	15,95
Proteinová frakce 2	18,80
Proteinová frakce 3	24,34
Proteinová frakce 4	47,54
Proteinová frakce 5	64,52

Extracelulární frakce *C. necator* H16 obsahuje 5 hlavních proteinových frakcí o molekulové hmotnosti 15,95 kDa; 18,80 kDa; 24,34 kDa a 47,54 kDa a 64,52 kDa. Z nich první čtyři byly viditelné i po dialýze. Po aplikaci ultrafiltrace (membránový filtr s 10 kDa „cut-off“ vylučovacím limitem) byly majoritními frakcemi proteiny s Mr 18,80 kDa a 24,34 kDa , frakce 15,95 kDa byla viditelná pouze slabě. Současně bylo metodou PAGE/SDS potvrzeno, že preparát extracelulárních lipolytických enzymů získaný frakcionovanou ultrafiltrací je sice poměrně málo koncentrovaný, ale obsahuje minimum příměsí a lze jej použít k přímé aplikaci – buď jako přídavek do kultivačního média k průmyslové produkci PHA, k předzpracování olejového substrátu, nebo k jiným průmyslovým aplikacím.

15.

Reference

1. Flickinger, Michael C.; Drew, Stephen W. *Encyclopedia of Bioprocess Technology – Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation, Volumes 1-5*. John Wiley & Sons, 1999. 2024-2133 s. ISBN 1-59124-457-9.
2. Sudech K., Abe H., Doi Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters, *Progress in Polymeric Science*, 2000, vol. 25. 1503-1555 p. ISSN 0079-6700.
3. Steinbüchel A, Valentin H. E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids: minireview, *FEMS Microbiology Letters*, 1995, vol. 125. 219-228 p. ISSN 0378-1097.

20

25

4. Kessler B., Wilholt B. Factors involved in the regulatory network of Polyhydroxyalkanoate metabolism: review, *Journal of Biotechnology*, 2001, vol. 86, 97- 104p., ISSN 0168-1656.
5. Rehm, B.H.A.: Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *The Biochemical Journal* 2003, vol. 376, 15 – 33 p., ISSN 0264-6021.
6. Rehm B. H. A. Genetics and biochemistry of polyhydroxyalkanoates granule self-assembly: The key role of polyester synthase, *Biotechnology Letters*, 2006, vol. 28, 207-213 p. ISSN 1573-6776
10. 7. Byrom D. *Novel Biodegradable Microbial Polymers*. Springer, 1990. 113-117 p. ISBN 978-0792309499.
8. Hrabak O. Industrial production of poly- β -hydroxybutyrate, *FEMS Mikrobiology Reviews*, 1992, vol. 103, 251-255 p. ISSN 0168-6445.
15. 9. Taniguchi I., Kagotani K., Kimura Y. Microbial production of poly(hydroxyalkanoates)s from waste edible oils. *Green Chemistry*, 2003, vol. 5, 545-548 p., ISSN 1463-9270.
10. Chan P.-L., Yu V., Wai L., Yu H.-F. Production of medium-chain-length polyhydroxy alkanoates by *Pseudomonas aeruginosa* with fatty acids and alternative carbon sources. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2006, vol. 129, 933-941 p. ISSN 0273-2289.
20. 11. Bhubalan K., Lee W.-H., Loo C.-Y., Yamamoto T., Tsuge T., Doi Y., Sudesh K. Controlled biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) from mixtures of palm kernel oil and 3HV-precursors. *Polymer Degradation and Stability*, 2008, vol. 93, 17-23 p. ISSN 0141-3910.
25. 12. Kimura H., Takahashi T., Hiraka H., Iwana M., Takeishi M. Effective biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) from plant oils by *Chromobacterium* sp. *Polymer Journal*, 1999, vol. 31, 210-212 p. ISSN 0032-3896.
30. 13. Fukui T., Doi Y. Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, vol. 49, 333-336 p. ISSN 1432-0614.
35. 14. Kek Y.-K., Chang C.-W., Amirul A.-A., Sudesh K. Heterologous expression of *Cupriavidus* sp. USMAA2-4 PHA synthase gene in PHB⁴ mutant for the production of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymers. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, on-line first, DOI 10.1007/s11274-010-0335-5.
40. 15. Alias Z., Tan I.K.P. Isolation of palm oil-utilizing, polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacteria by an enrichment technique. *Bioresource Technology*, 2005, vol. 96, 1229-1234 p. ISSN 0960-8524.
16. Marsudi S., Unno H., Hori K. Palm oil utilization for the simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, vol. 78, 955-961 p. ISSN 1432-0614.
45. 17. Akiyama M., Taima Y., Doi Y. Production of poly(3-hydroxyalkanoates) by bacterium of the genus *Alcaligenes* utilizing long-chain fatty acids.

Applied Microbiology and Biotechnology, 1992, vol. 37, 698-701 p.
ISSN 1432-0614.

5. 18. Obruca S., Marova I., Snajdar O., Mravcova L., Svoboda Z.
Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by
Cupriavidus necator from waste rapeseed oil using propanol as a
precursor of 3-hydroxyvalerate, *Biotechnology Letters*, 2010, vol. 32,
1925-1932 p. ISSN 0141-5492
10. 19. Verlinden R. A. J., Hill DJ, Kenward MA, Williams CG, Piotrowska-
Seget Z., Radecka IK. Production of polyhydroxyalkanoates from waste
frying oil by *Cupriavidus necator*. *AMB Express*, 2011, vol. 1,
DOI:10.1186/2191-0855-1-11
20. 20. Hasan F, Shah AA, Hameed A: Industrial applications of microbial
lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 2006, vol. 39, 35-251 p.
15. 21. Joseph, B., Ramteke P. W., Thomas, G., Shrivastava, N.: Standard
Review Cold-active microbial Lipases: a versatile tool for industrial
applications. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, June 2007,
vol. 2, pp. 39-48. ISSN 1538/2273.
20. 22. Bornscheuer U.T.: Microbial carboxylesterases: classification,
properties and application in biocatalysis; *FEMS Microbiology Reviews*
26 (2002) 73-81.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob produkce polyhydroxyalkanoátů (PHA), u něhož se na olejovém substrátu obsahujícím rostlinný olej a/nebo jedlý olej a/nebo odpadní
5 jedlý olej, s výhodou fritovací olej, kultivuje kmen bakterií *Cupriavidus necator* H16, který přetváří olej na PHA při současné produkci extracelulárních lipolytických enzymů, které se z kultivačního média alespoň částečně izolují v průběhu fermentačního procesu před ukončením produkce a izolace PHA,
vyznačující se tím, že před zahájením kultivace se do olejového substrátu
10 přidají extracelulární lipolytické enzymy vyprodukované *Cupriavidus necator* H16, čímž se urychlí růst bakteriální kultury.

2. Způsob produkce PHA podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** extracelulární lipolytické enzymy se z kultivačního média izolují sterilní
ultrafiltrací kultivačního média, při níž se oddělí buňky bakterií *Cupriavidus*
15 *necator* H16 a vrátí se zpět do produkčního zařízení.

3. Způsob produkce PHA podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** extracelulární lipolytické enzymy se z kultivačního média izolují nesterilním
odčerpáním části fermentovaného kultivačního média, načež se z odčerpané
části fermentovaného kultivačního média oddělí buňky bakterií, které se před
20 izolací PHA vrátí do fermentovaného kultivačního média, a ze zbytku se izolují extracelulární lipolytické enzymy.

4. Způsob produkce PHA podle nároků 1 nebo 2, **vyznačující se tím, že** po izolaci extracelulárních lipolytických enzymů se tyto do kultivačního média
alespoň částečně vrací společně s doplňkovou dávkou olejového substrátu pro
25 podporu růstu bakterií *Cupriavidus necator* H16.

5. Způsob produkce PHA podle libovolného z předcházejících nároků,
vyznačující se tím, že během kultivace se pH kultivačního média udržuje na
hodnotě 7 přidávkem NaOH nebo H₂SO₄ a koncentrace rozpuštěného kyslíku
se řízeným vzdušněním v průběhu fermentace udržuje v rozmezí hodnot 20-30
30 %.

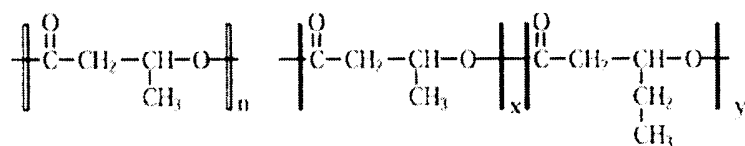
6. Způsob produkce PHA podle libovolného z předcházejících nároků, **vyznačující se tím, že** olejový substrát obsahuje přídavek látky ze skupiny propionát sodný, n-propanol, levulinová kyselina.
7. Způsob produkce PHA podle libovolného z předcházejících nároků, **vyznačující se tím, že** po ukončení fermentace se obsah produkčního reaktoru zahřeje na teplotu 80 °C po dobu alespoň 30 minut, následně se zchladí na teplotu 60 °C a přidají se lytická činidla obsahující směs detergentu, například SDS, a proteolytického enzymu, čímž se získá surový homogenát, případně lyzát.
8. Způsob produkce PHA podle nároku 7, **vyznačující se tím, že** surový homogenát/lyzát se čistí frakcionovanou membránovou filtrací a promytím vodou o teplotě 20 až 60 °C, přičemž konečná výtěžnost PHA je až 96 % z původní biomasy buněk.
9. Způsob produkce PHA podle nároků 2 nebo 3, **vyznačující se tím, že** extracelulární lipolytické enzymy se zahustí ultrafiltrací, čímž se dosáhne jejich čistoty v intervalu 100 až 200 U/mg.



Legenda: Obecný vzorec polymeru PHA



Legenda: Biosyntéza PHB v bakteriích; převzato z: Kessler B., Wilholt B. Factors involved in the regulatory network of Polyhydroxyalkanoate metabolism: review, *Journal of Biotechnology*, 2001, vol. 86, 97- 104 p., ISSN 0168-1656.

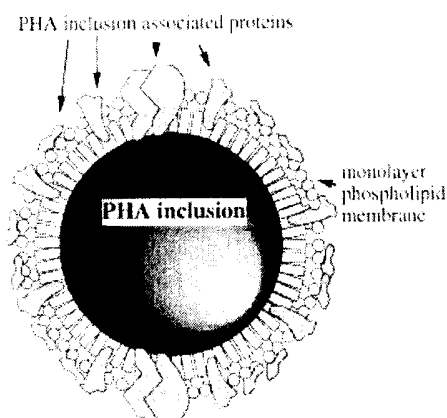


Poly(3HB)

Poly(3HB-co-3HV)

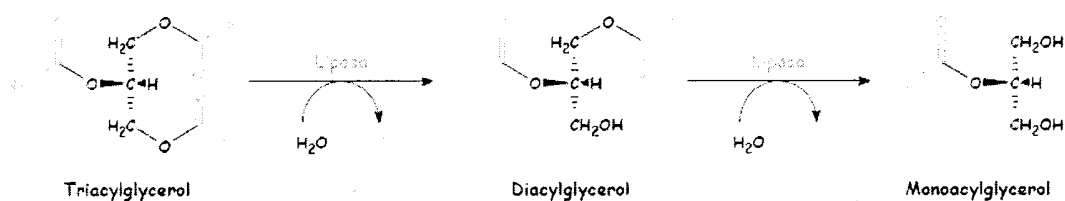
Obr. 3

Legenda: Srovnání struktury homopolymeru poly(3-hydroxybutyrát) (poly(3HB) a kopolymeru poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát)



Obr. 4

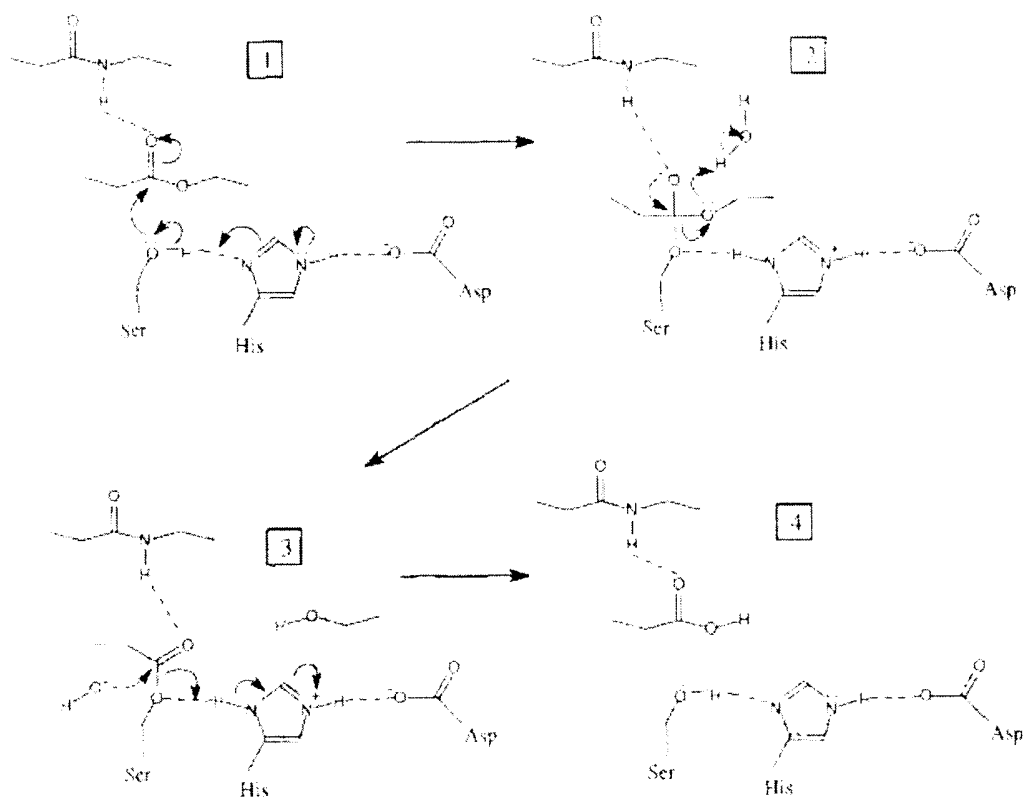
Legenda: PHA inclusion associated proteins – proteiny vázané na PHA granule; monolayer phospholipid membrane – jednovrstvá fosfolipidová membrána



Obr. 5

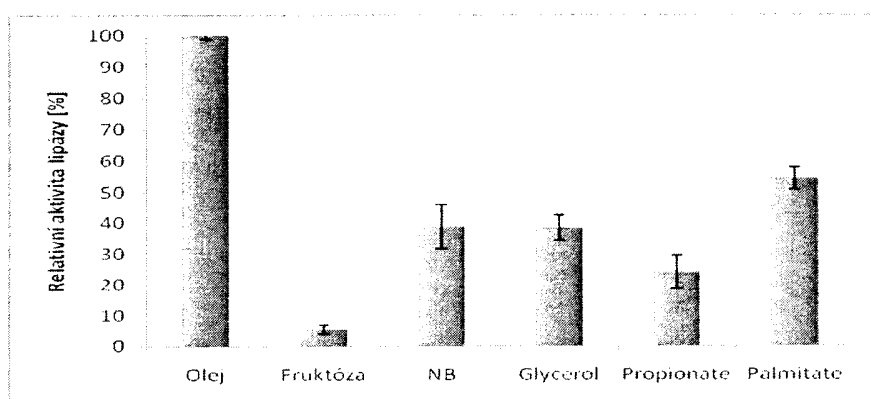
Legenda: Schéma postupné hydrolytické degradace triacylglycerolů pomocí lipázy

3/8



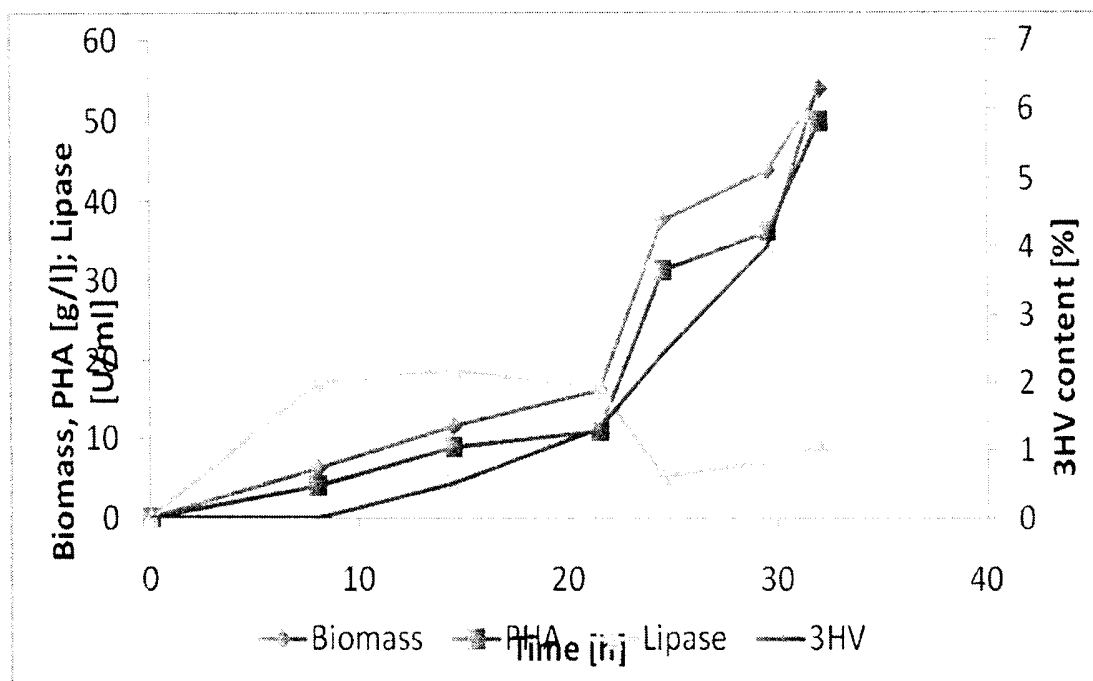
Obr. 6

Legenda: Schéma aktivního centra a katalytického účinku lipázy



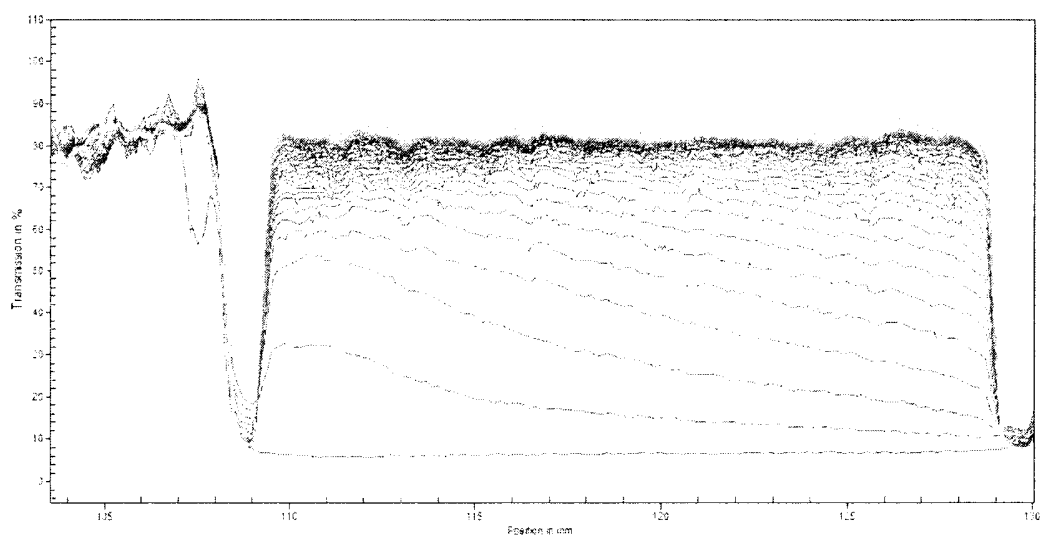
Obr. 7

Legenda: Srovnání relativní aktivity lipázy z bakterií *Cupriavidus necator* kultivovaných na různých substrátech (propionate – kyselina propionová, palmitate – kyselina palmitová)



Obr. 8

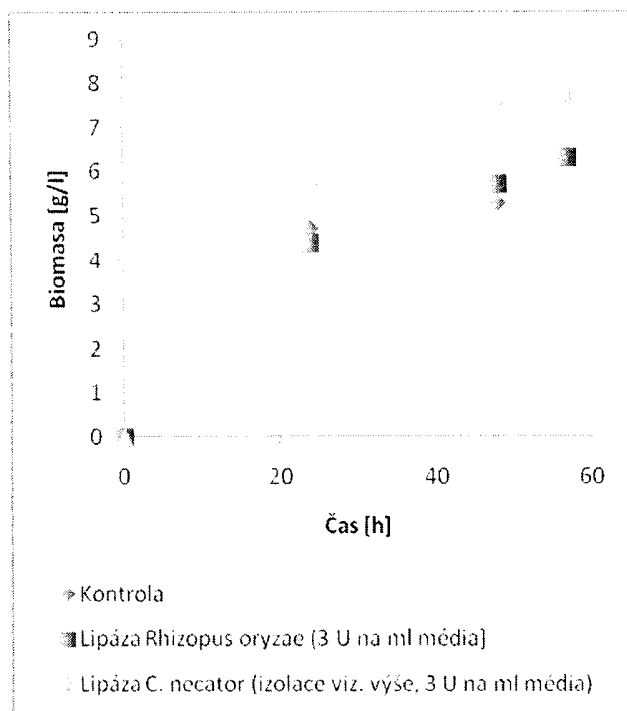
Legenda: Produkce biomasy (biomass), PHA, lipázy (lipase) a zastoupení hydroxyvalerátu v kopolymeru (3HV content, %) v průběhu kultivace *C. necator*



Obr. 9

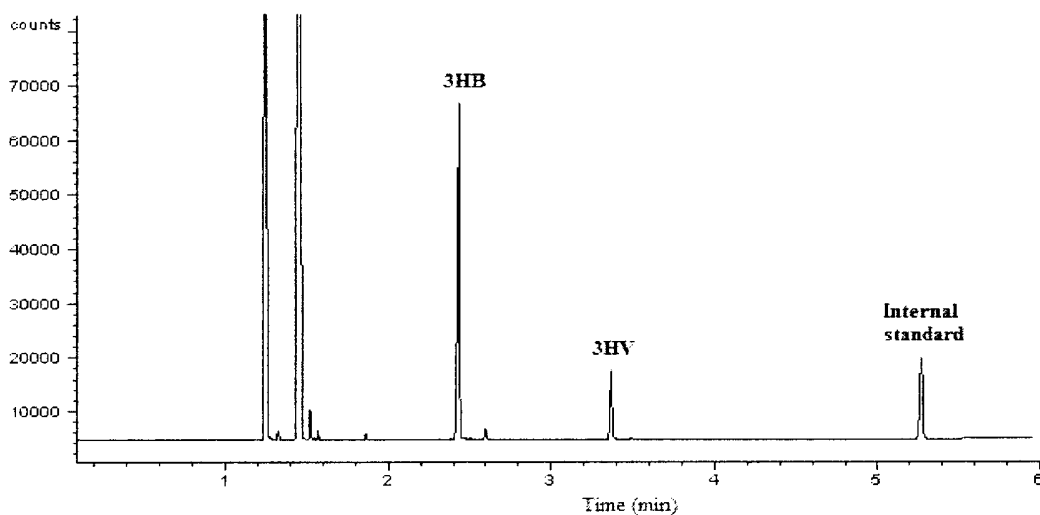
Legenda: Záznam sedimentace izolovaného PHA získaný metodou analytické centrifugace

5 / 8



Obr. 10

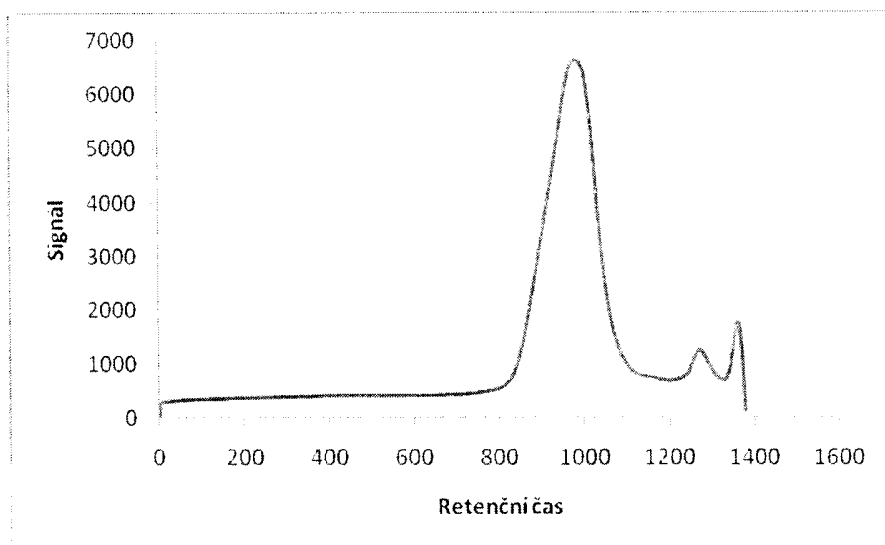
Legenda: Produkce biomasy *C. necator* v přítomnosti lipázy o stejné aktivitě izolované z *Rhizopus oryzae* a *Cupriavidus necator* – srovnání efektu různých enzymů s kontrolou v průběhu kultivace



Obr. 11

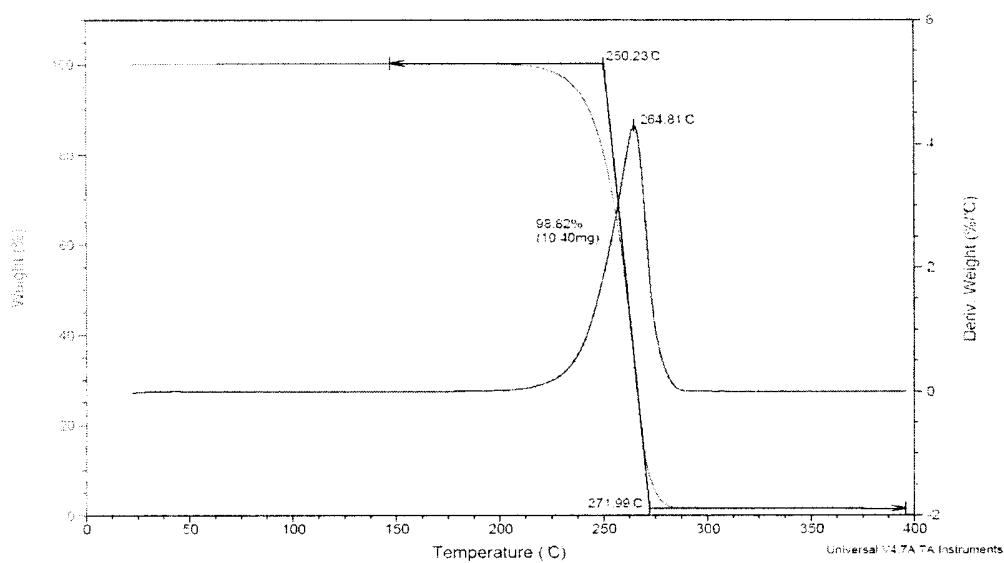
Legenda: Příklad chromatogramu získaného analýzou složení typického vzorku PHA plynovou chromatografií.

6 / 8



Obr. 12

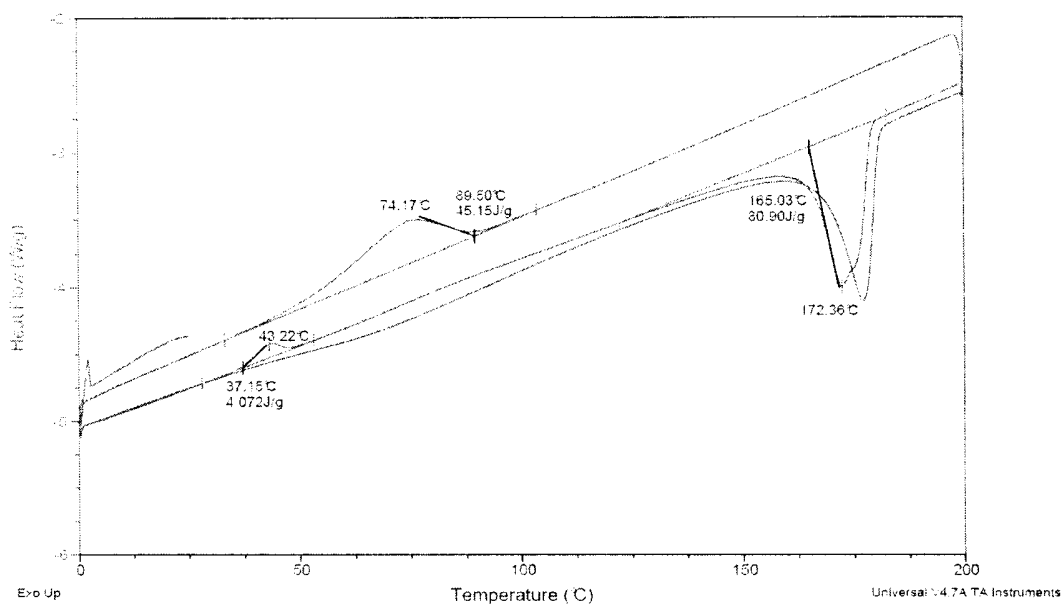
Legenda: Záznam analýzy molekulové hmotnosti PHA metodou gelové permeační chromatografie.



Obr. 13

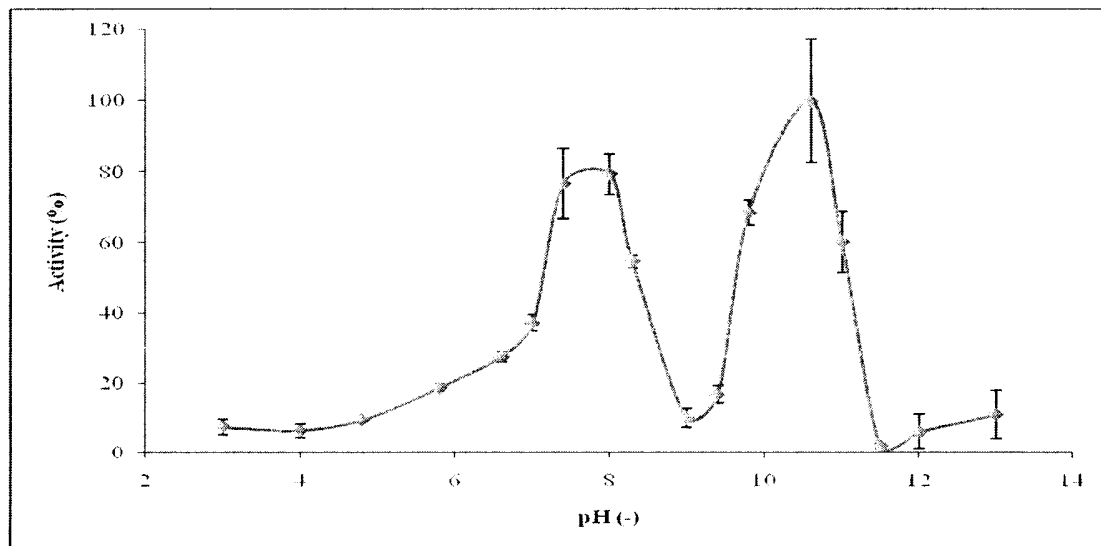
Legenda: Teplotní stabilita PHA měřená pomocí termogravimetrické analýzy.

7 / 8



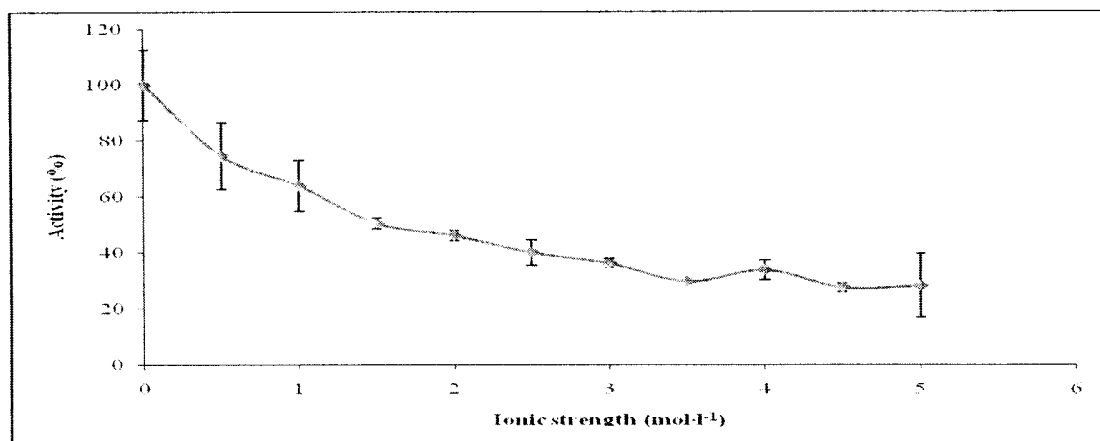
Obr. 14

Legenda: Teplotní stabilita PHA – záznam získaný metodou diferenciální skenovací kalorimetrie.



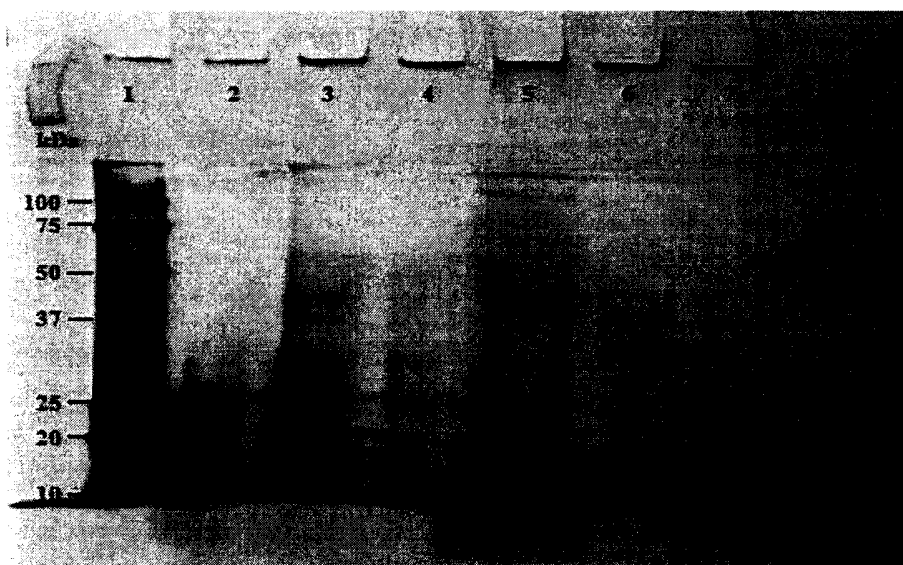
Obr. 15

Legenda: Analýza aktivity lipázy z *C. necator* (activity, %) v závislosti na pH – pH optimum.



Obr. 16

Legenda: Závislost aktivity lipázy z *C. necator* (activity, %) na iontové síle



Obr. 17

Legenda: Záznam analýzy proteinových frakcí získaných z *C. necator* pomocí polyakrylamidové elektroforézy v přítomnosti SDS.