

Abstrakt

V zájmu udržitelné budoucnosti se stupňuje tlak na zvýšení podílu biotechnologií a biomateriálů na trhu. Mikrobiální biotechnologie mají potenciál a schopnost na mnoha úrovních podstatně přispět k tomuto celosvětovému úsilí o dosažení udržitelnosti. Vývoj a využití mikrobiálních technologií je však komplexní proces zahrnující řadu kroků, včetně objevování nových technologií a vývoje průmyslově realizovatelných výrobních systémů. V předložené práci byly řešeny jednotlivé kroky vývoje mikrobiální biotechnologie.

V první části studie byla využita řada metodických přístupů ke studiu vlivu antropogenní aktivity (tj. desetiletí trvající produkce penicilinu G) na strukturu půdních mikrobiálních společenstev. Kultivovatelné i nekultivovatelné frakce těchto populací byly zároveň podrobeny funkčnímu screeningu za účelem odhalení biotechnologického potenciálu mikroorganismů ve smyslu produkce enzymů podílejících se na biotrasformaci beta-laktamových antibiotik: penicilin G acylázy (PGA) a esterázy alfa-aminokyselin (AEH). Naše výsledky ukázaly, že společenstva zasažených půd ukrývají mikrobiální komunitu se zvýšenou biodiverzitou a druhovou bohatostí. Na úrovni složení se však tyto komunity významně liší od kontrolních vzorků, což je důkazem zásadního dopadu průmyslové činnosti na tato společenstva. Následné analýzy biotechnologického potenciálu prokázaly, že toto prostředí je však bohatým zdrojem mikroorganismů s aktivitou podobnou enzymům PGA a AEH, které by mohly mít potenciál k rozšíření portfolia těchto průmyslově významných enzymů.

Druhá část studie se zabývala dalšími kroky vývoje biotechnologie: tzv. upstream development. Experimentální plán byl zacílen na konstrukci kmene *Pichia pastoris* produkujícího PGA, se zvláštním zaměřením na stanovení optimální kultivační strategie vedoucí k maximálním extracelulárním koncentracím PGA, jakož i na identifikaci fyziologických a genetických limitací produkčního systému. Fedbatch kultivace (tj. kultivace s postupným přidáváním dávek živin) s konstruovaným kmenem ukázaly potenciál extracelulární produkce plně aktivní PGA v *P. pastoris*, současně však byla také pozorována výrazná limitace v sekreci. Následné experimenty ukázaly, že tuto limitaci lze připsat buněčnému stresu způsobenému intracelulární akumulací produkovaného enzymu vedoucí k podstatné upregulaci UPR dráhy, která představuje buněčnou odpověď na nesbalené nebo špatně sbalené proteiny, které se hromadí v lumenu endoplazmatického retikula. Tato upregulace vedla k translačnímu arestu, který na jedné straně zmírnil buněčný stres, načež systém mohl dosáhnout maxima sekrece, současně však také významně snížil celkovou specifickou produktivitu systému.

V souhrnu výsledky této práce znamenají, že i přes veškeré pokusy o optimalizaci kultivace se konstruovanému kmeni nepodařilo dosáhnout požadovaného biotechnologického potenciálu. Konstrukci kmene je tedy třeba zopakovat se zohledněním poznatků získaných v této práci.

Pro usnadnění budoucího výzkumu zaměřeného na odhalení skutečného potenciálu systému PGA-*P. pastoris* byla provedena dodatečná pilotní studie týkající se racionalizace designu produkčního kmene. Tato studie ukázala, že omezení produkce a sekrece PGA lze překonat optimální konstrukcí produkčního kmene a vhodnou strategií kultivace, a prokázala, že produkční platforma PGA-*P. pastoris* má skutečně velký potenciál pro průmyslovou biotechnologii.