

# PlastoCyan

STUDIE K ZÁVĚREČNÉMU SETKÁNÍ  
TOM G

**Interreg**   
EVROPSKÁ UNIE  
**Rakousko-Česká republika**  
Evropský fond pro regionální rozvoj

# ÚVOD

Vážení přátelé,

Mikrobiologický ústav AV ČR – Algatech v Třeboni ve spolupráci s Technickou univerzitou ve Vídni a Univerzitou aplikovaných věd ve Welsu v Horním Rakousku si Vám dovoluje představit projekt Produkce biologicky rozložitelného polymeru, polyhydroxybutyrátu (PHB), ze sinic cestou kultivace v odpadních vodách, zkráceně **Plastocyan**, který vznikl v rámci programu INTERREG V-A Rakousko – Česká republika.

Společnost označuje současnost jako dobu plastovou. Plasty jsou univerzální a odolný materiál používaný po celém světě ve všech průmyslových odvětvích. Plasty vyráběné na bázi ropy způsobují vážné ekologické problémy kvůli jejich nerozložitelné povaze. Jakkoli bylo navrženo mnoho strategií pro kontrolu plastového odpadu, mikroplasty, nanoplasty a likvidace plastů stále způsobují obrovskou kontaminaci, která zatěžuje půdu i vodní prostředí. Navzdory vyčerpání neobnovitelných fosilních zdrojů, rostoucímu tempu cen ropy a negativnímu dopadu na životní prostředí je celosvětová poptávka po plastech stále na vzestupu. Tato alarmující situace vede k hledání alternativ. Biologicky odbouratelné plasty vyrobené mikroorganismy, jako jsou polyhydroxyalkanoáty (PHA), se ukazují jako nejlepší řešení, jak nahradit konvenční plasty a chránit tak životní prostředí.

Projekt Plastocyan přichází s novou technologií výroby 100% biodegradovatelného bioplastu - polyhydroxybutyrátu (PHB), přírodní cestou, a to pěstováním sinic v odpadní vodě.

# EINFÜHRUNG

Liebe Freunde,

Das Institut für Mikrobiologie des CAS – Algatech Centre in Třeboň, in Zusammenarbeit mit der Technischen Universität Wien und der Fachhochschule Wels, Oberösterreich, möchte das Projekt Produktion von biologisch abbaubarem Polymer Polyhydroxybutyrat (PHB) aus Cyanobakterien durch Kultivierung in Abwasser, kurz Plastocyan, vorstellen, das im Rahmen des INTERREG V-A Programms Österreich - Tschechische Republik eingerichtet wurde.

Das Unternehmen bezeichnet die Gegenwart als das Plastikzeitalter. Kunststoffe sind ein vielseitiges und langlebiges Material, das weltweit in allen Branchen eingesetzt wird. Kunststoffe auf Erdölbasis verursachen ernsthafte Umweltprobleme, da sie nicht abbaubar sind. Obwohl viele Strategien zur Eindämmung von Kunststoffabfällen vorgeschlagen wurden, stellen Mikroplastik, Nanoplastik und die Entsorgung von Kunststoffen nach wie vor eine enorme Belastung für den Boden und die aquatische Umwelt dar. Trotz der Erschöpfung der nicht erneuerbaren fossilen Ressourcen, der steigenden Ölpreise und der negativen Auswirkungen auf die Umwelt steigt die weltweite Nachfrage nach Kunststoffen weiter an. Diese alarmierende Situation führt zu einer Suche nach Alternativen. Biologisch abbaubare Kunststoffe, die von Mikroorganismen hergestellt werden, wie z. B. Polyhydroxyalkanoate (PHA), erweisen sich als die beste Lösung, um herkömmliche Kunststoffe zu ersetzen und so die Umwelt zu schützen.

Im Rahmen des Plastocyan-Projekts wurde eine neue Technologie zur Herstellung von 100 % biologisch abbaubarem Biokunststoff - Polyhydroxybutyrat (PHB) - auf natürliche Weise durch das Wachstum von Cyanobakterien in Abwässern entwickelt.

# INTRODUCTION

Dear friends,

The Institute of Microbiology of the CAS – Algatech Centre in Třeboň, in cooperation with the Technical University of Vienna and the University of Applied Sciences in Wels, Upper Austria, would like to introduce the project Production of biodegradable polymer polyhydroxybutyrate (PHB) from cyanobacteria by cultivation in wastewater, abbreviated as Plastocyan, which was established within the INTERREG V-A Austria - Czech Republic programme.

The company refers to the present as the plastic age. Plastics are versatile and durable materials used worldwide in all industries. Petroleum-based plastics cause serious environmental problems due to their non-degradable nature. Although many strategies have been proposed to control plastic waste, microplastics, nanoplastics, and plastic disposal still cause enormous contamination which affects soil as well as aquatic environments. Despite the depletion of non-renewable fossil resources, rising oil prices and the negative impact on the environment, the global demand for plastics is still on the rise. This alarming situation is leading to a search for alternatives. Biodegradable plastics produced by microorganisms, such as polyhydroxyalkanoates (PHAs), are proving to be the best solution to replace conventional plastics and thus protect the environment.

The Plastocyan project has come up with a new technology to produce 100% biodegradable bioplastic - polyhydroxybutyrate (PHB) - naturally by growing cyanobacteria in wastewater.

# POSLÁNÍ PROJEKTU

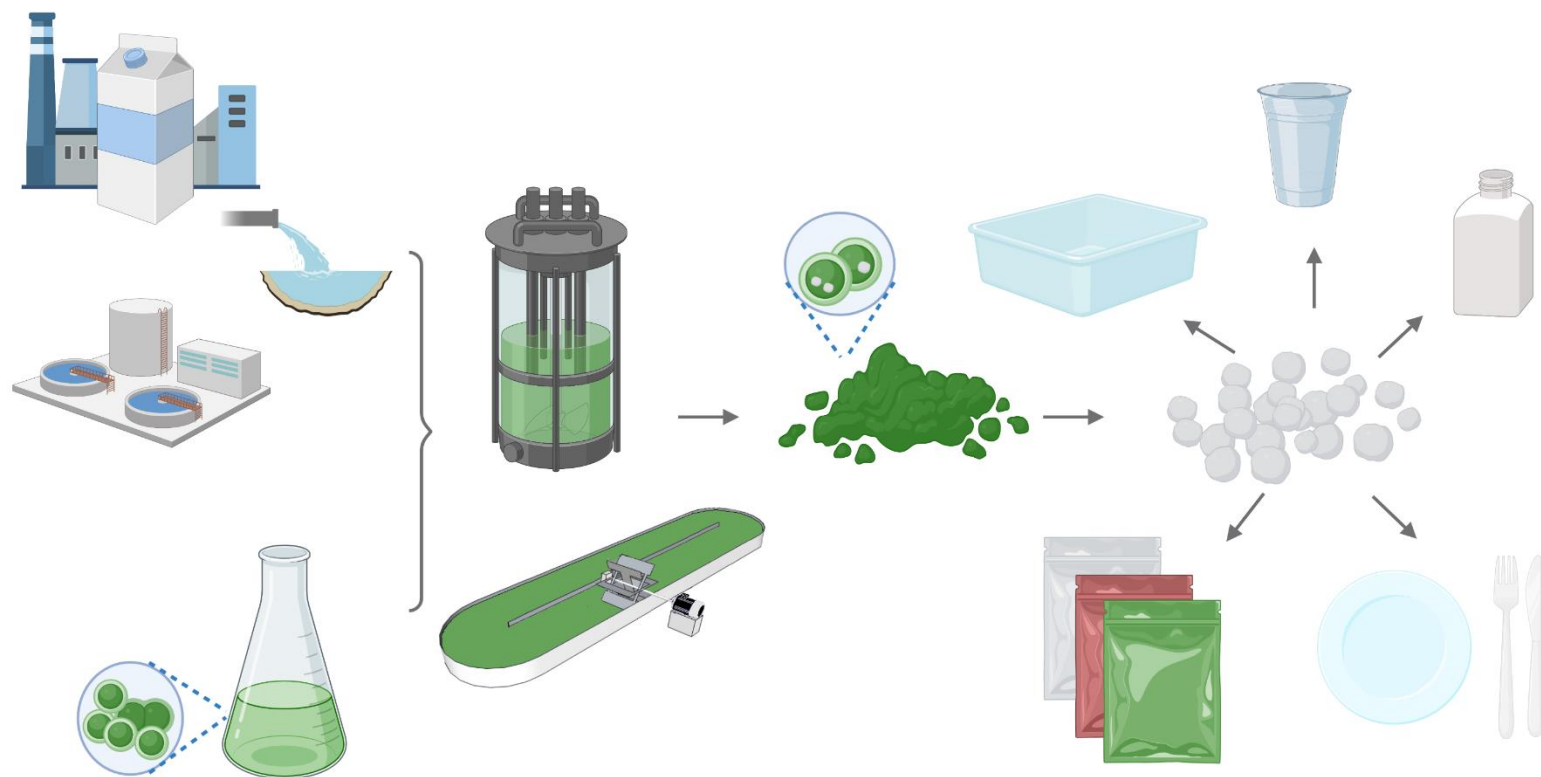
Hlavním cílem projektu je vyvinout ekologicky inovativní technologii pro výrobu bioplastů ze sinic, které využívají komunální odpadní vody a odpadní vody z mlékárenského průmyslu jako zdroj živin pro svůj růst.

## PHB A JEHO PRODUKCE V MIKROORGANISMECH

Polyhydroxybutyrát (PHB) je termoplast, odpuzující vodu, dobře rezistentní proti ultrafialovému záření s vlastnostmi, které mu umožňují nahradit konvenční plasty jako polypropylen anebo polyetylén.

Některé mikroorganismy jsou za určitých podmínek schopny vytvářet granule PHB, které slouží jako zásoba uhlíku. V současnosti se k produkci přírodního PHB využívají chemotrofní bakterie, schopné produkovat až 80 % PHB jejich buněčné hmoty v průběhu několika dnů. Přesto je výrobní cena PHB mnohem vyšší v porovnání s cenou výroby konvenčních plastů. Při produkci PHB tvoří až 50 % nákladu prekurzorový substrátový materiál, zejména zdroj uhlíku. Většina sinic přirozeně produkuje přibližně 20 % PHB své buněčné hmoty. Sinice nemohou obsahem PHB ani rychlostí růstu biomasy konkurovat chemotrofním bakteriím. Jelikož se však jedná o fotosyntetizující organismy, zdrojem uhlíku je oxid uhličitý získaný ze vzduchu. Na rozdíl od bakteriálních producentů PHB, fotoautotrofní sinice nespotřebovávají cukry, a proto nejsou závislé na zemědělských plodinách, což z nich činí zelený alternativní produkční systém.

# PROJEKT PLASTOCYAN



V projektu se podařilo vyvinout pěstební proces sinic, kde je substrátem odpadní voda. Pro růst sinicové biomasy byly použity dva typy odpadních vod i) odpadní voda z komunální čističky z procesu pročišťování a ii) odpadní voda z mlékárenské produkce. Oba tyto substráty jsou zdrojem dusíku (250 mg/L pro oba substráty) a fosforu (150 mg/L městská odpadní voda a 25 mg/L mlékárenské odpady), tedy hlavních komponentů, potřebných k růstu sinic.

Pro účely pěstování byl použit kmen sinice *Synechocystis* vyšlechtěný UV mutagenézou s vyšší produkcí PHB. K pěstování v odpadní vodě z městské čističky se použilo tenkovrstvé venkovní kultivační zařízení. Pěstování v odpadní vodě z mléčné produkce probíhalo v uzavřeném anulárním fotobioreaktoru. Důvodem byla optimalizace podmínek pro pozdější testování geneticky upraveného kmene s vyšší produkcí PHB a schopností zpracovávat laktózu. Pěstování vyšlechtěného kmene v obou pilotních kultivačních jednotkách trvalo 4-6 týdnů, aby se dosáhlo maximální množství PHB. V den sklizení biomasy tvořilo PHB 23 % sušiny v odpadní vodě z komunální čističky a 10 % v odpadní vodě z mléčné produkce. Pro srovnání s dostupnými údaji je produkce PHB ve fototrofním režimu (bez organického zdroje uhlíku) geneticky neupravených sinic 4-25 % v optimálních podmínkách kultivačního média pro pilotní zařízení. Jedině vyšlechtěný kmen, který se používá v projektu Plastocyan, dosáhl v laboratorních podmínkách v malém měřítku v optimálním růstovém substrátu 37 % PHB buněčné sušiny. Hlavním přínosem projektu je však recyklace odpadní vody. I z tohoto hlediska jsou výsledky projektu nadprůměrné. V obou typech odpadní vody se podařilo vypěstovat biomasu do hustoty 2-2,5 g/L, přičemž průměrné hodnoty pěstování sinic v odpadní vodě jsou podle dostupných údajů 0,6 - 3,15 g/L. PHB granule lze z buněk dostat různými extrakčními metodami, většinou pomocí organických rozpouštědel jako například chloroform, které mohou být nebezpečné pro životní prostředí. Projekt řeší i ekologickou a ekonomicky přátelskou alternativu extrakce PHB z biomasy pomocí tzv. iontových kapalin, které patří do kategorie tzv. zelených rozpouštědel. V mnoha případech je získávání produktu pomocí iontových kapalin jednodušší, lze je recyklovat, a tedy opětovně použít. Projekt se také věnuje vývoji geneticky modifikovaného kmene, který bude schopen nadprodukovat PHB a využívat laktózu jako zdroj uhlíku. Tím by se mohla zefektivnit produkce PHB v uzavřených kultivačních jednotkách s využitím odpadní vody z mlékárenské výroby. Genetické vylepšení kmene *Synechocystis* sp. PCC 6714 Mt\_a24 bylo dosaženo eliminací dvou genů (*spsA* a *glgC*) souvisejících s produkcí glykogenu. Zároveň byly nadexprimované geny pro zvýšení produkce PHB (*phaA* a *phaB*) a využití laktózy (*beta-Gal*) jako zdroje uhlíku.

K hlavním výsledkům dosaženým v projektu patří:

- a) optimalizace pěstování sinic v odpadní vodě (městské odpadní vody, odpadní vody z mlékárenské produkce) za účelem produkce bioplastu – polyhydroxybutyrátu (PHB) v pilotním měřítku.
- b) ekologická extrakce PHB ze sinicové biomasy pomocí iontových kapalin.
- c) vytvoření geneticky vylepšených kmenů s vyšší produkcí PHB a schopností využívat laktózu pro svůj růst.

Na projektu spolupracují tři instituce, Mikrobiologický ústav AV ČR – Centrum Algatech v Třeboni (MBÚ), Univerzita aplikovaných věd ve Welsu v Horním Rakousku (FH OOE) a Technická Univerzita ve Vídni (TU Wien). Každý z partnerů koordinuje specifický pracovní balíček se zohledněním své expertízy.

Níže uvedené aktivity popisují výsledky a výstupy, kterých se podařilo v rámci projektu dosáhnout.

## Aktivity A.T1.1 Kultivace sinic produkujících PHB v médiích obsahujících odpadní vodu

**Koordinátor:** MBU

V rámci této aktivity byla testována odpadní voda ze dvou různých zdrojů (i) odpadní voda z komunální čističky odpadních vod v Třeboni a (ii) odpadní voda z mléčné produkce poskytnutá společností Madeta a.s. Cílem této aktivity bylo vytvořit z odpadní vody vhodný substrát, tak aby se získala sinicová biomasa, která by zároveň vytvářela biodegradovatelný plast – polyhydroxybutyrát (PHB).

Podařilo se nastavit kultivační parametry tak, aby se eliminovala přítomnost predátorů sinic, které se při velkoobjemových kultivacích mohou vyskytnout. Proběhly kultivace sinice *Synechocystis* sp. v odpadní vodě v pilotním měřítku. Podařilo se zoptimalizovat růst sinice *Synechocystis* sp. PCC6714 Mt\_a24 v pilotním kultivačním zařízení tzv. TL-RWP (thin-layer raceway pond) v médiu s odpadní vodou z komunální čističky odpadních vod v Třeboni jakož i v uzavřeném anulárním fotobioreaktoru s odpadní vodou z mlékárenské produkce pro produkci PHB, což je základem pro úspěšné zavedení technologie. Z této kultivace se získala biomasa (110 g TL-RWP; 18 g PBR), která obsahovala biodegradovatelný polymer PHB. V den sklizení biomasy tvořilo PHB 23 % sušiny v odpadní vodě z komunální čističky a 10 % v odpadní vodě z mléčné produkce. Biomasa byla poskytnuta partnerovi TU Wien pro další rozборы.

**Dílčí výstup A.T1.1.1** Zpráva o výběru a analýze různých odpadních vod jako zdroje živin pro kultivaci sinic

Tzv. centrát z čističky odpadních vod byl odstředěn tak, aby se získala odpadní voda vhodná pro kultivaci. Ta byla analyzována externě společností Povodí Vltavy, státní podnik, vodohospodářská laboratoř České Budějovice (Tab. 1). V rámci této aktivity proběhl test, jehož cílem bylo stanovit účinky odpadní vody na inhibici růstu a nevhodnější opracování odpadní vody pro kultivaci (obr. 1). V rámci tohoto testu se testoval vliv ošetření odpadní vody (tepelně, UV ošetření, ředění atd.) pro potlačení inhibitorů růstu a přítomných mikroorganismů (Tab. 2). Během ověření se určoval fyziologický stav kultury pomocí měření fotosyntézy, přítomnost kontaminantů, a přírůstek biomasy, odbourávání nutrientů v odpadní vodě během růstu sinice a obsah PHB u vybraných vzorků (analýza v rámci výjezdu pracovníka k projektovému partnerovi). Na základě výsledků byla použita sterilizace UV jako nevhodnější ošetření odpadní vody, pro kultivace v pilotním měřítku. Také byly analyzovány 4 typy odpadních vod z mlékárenské produkce poskytnuté společností Madeta a.s. (v tabulce 1 označeno M1, M2, M3, M4) Na základě prvotních testů byla vybrána nevhodnější mlékárenská odpadní voda (označeno M1) s dostatkem živin a minimem inhibitorů pro růst sinic za účelem produkce PHB. Tato odpadní voda byla použita pro pilotní kultivaci ve fotobioreaktoru.

**Tab 1** Chemická analýza odpadních vod., CWW (clean wastewater) odpadní voda po úplném pročištění na ČOV, WW (wastewater) centráť odebrán z aktivovaného kalu, HT WW (heat treatment) centráť ošetřen teplem UV WW centráť ošetřen UV, M1 odpadní voda z kanalizace mlékárenské produkce, M2 odpadní voda ze sýrašské produkce, M3 čistící odpadní voda z nádrží na smetanu, M4 odpadní voda z maslové produkce.

Rozbor odpadní vody [mg L <sup>-1</sup> ]	CWW	WW	HT WW	UV WW	M1	M2	M3	M4	BG-11médium
BOD*	6.5	150	190	170	1400	4000	15000	450	-
COD**	34	740	720	730	2700	4700	32000	1900	-
TOC***	15	310	300	300	1100	1800	8200	520	-
Nitrates	-	-	-	-	320	22	8.7	6.2	-
N-NO <sub>3</sub>	7.5	<0,15	<0,15	<0,15	72	5.0	2.0	1.4	250
N-NO <sub>2</sub>	0.006	0.005	0,005	0.003	0,07	0.01	0.002	0.004	-
N-NH <sub>4</sub>	0.02	180	170	170	3.0	1.7	0.47	0.2	-
<b>Total N</b>	<b>8.7</b>	<b>250</b>	<b>240</b>	<b>250</b>	<b>260</b>	<b>120</b>	<b>120</b>	<b>16</b>	<b>250</b>
P-PO <sub>4</sub>	2.3	150	130	140	12	21	8.0	1.1	7
<b>Total P</b>	<b>2.8</b>	<b>160</b>	<b>140</b>	<b>150</b>	<b>24</b>	<b>30</b>	<b>17</b>	<b>2.0</b>	<b>7</b>

\*Biologická spotřeba kyslíku; \*\*Chemická spotřeba kyslíku; \*\*\* Celkový organický uhlík

**Tab 2** Stanovení počtu bakterií po různých ošetřeních odpadní vody.

ošetření	Počet bakterií (Colony forming units) [CFU/ml]
CWW	6800
WW	18000
50% ředená WW	9000
HT WW	260
UV WW	0



**Obr 1** Kultivace ve válečkách pro analýzu různých typů odpadních vod.

**Dílčí výstup A.T1.1.2 Standardní operační postup (SOP) pěstování sinic v pilotním měřítku v médiích obsahujících odpadní vodu**

**Standardní operační postup pro kultivační zařízení**

**A) tenkovrstvá oběhová nádrž (TL-RWP)**



Tenkovrstvá oběhová nádrž (thin-layer raceway pond) umístěna ve skleníku s kultivační plochou 5 m<sup>2</sup> a pracovním objemem 100–600 L, tloušťkou kultivační vrstvy mezi 15 a 60 mm a rychlostí proudění asi 0,2 m/s. Míchání zajišťuje lopatkové koleso.

**B) Anulární fotobioreaktor (PBR)**



Anulární fotobioreaktor s objemem 30 L o celkové výšce 100 cm, vnějším průměru 30 cm a vnitřním průměru 18 cm; s nastavitelným vnitřním LED osvětlením. Kultura je promíchávaná vzduchem trubkami umístěnými ve spodní části fotobioreaktora. Optimální tloušťka kultivační vrstvy (světelná dráha) je 5,5 cm.



## Standardní operační protokol:

**Sinicový kmen:** *Synechocystis* sp. PCC6714 Mt\_a24

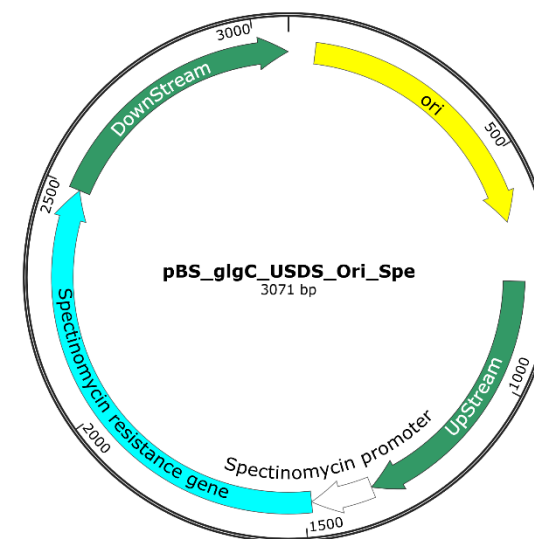
1. rozpěstování kmene sinice *Synechocystis* z Petriho misky v kultivační láhvi o objemu 5-15 L.
2. Podmínky kultivace inokula: sterilní anorganické médium –BG-11, pH 8.0; teplota 26-30 °C; nepřetržité osvětlení o intenzitě světla 100  $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; promíchávání vzduchem + 1 %  $\text{CO}_2$  (v/v). Doba kultivace – do pozdní exponenciální růstové fáze (10-14 dní).
- 3.a Kultivace ve venkovní tenkovrstvé oběhové nádrži (TL-RWP) s použitím odpadní vody z komunální čistíčky. Pro kultivace v TL-RWP zařízení je potřeba zhruba 90 L odstředěného aktivovaného kalu tzv. centrát. Sediment představuje 10-20 %, stáčí se při 4000 g, 5 min. Optimální podmínky: teplota ve skleníku 15-34 °C. Maximum denního slunečního záření  $\leq 1000 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .
- 4.a Ostředění odpadní voda se částečně sterilizuje ponornou UV lampou. Sterilizace celého objemu po dobu 1 h je zajištěna bubláním vzduchem.
- 5.a Substrát, tedy odpadní voda se nasadí do TL-RWP a přidá se inokulum kultury do finální optické hustoty  $\text{OD}_{750} = 0.4$ . (Objem se vypočítá kalkulací na základě směšovací rovnice:  $\text{OD}_{750} \text{inokula} \times X \text{ litrů} = 0,4 \times 100 \text{ litrů}$ ).
- 3.b Kultivace v uzavřeném anulárním fotobioreaktoru s použitím odpadní vody (ozn. M1 Dílčí výstup A.T1.1.1) z mléčné výroby. Pro kultivaci v 30 litrovém PBR je potřeba 25-27 L odpadní vody z mléčné výroby.
- 4.b Odpadní voda se částečně sterilizuje UV lampou. Sterilizace celého objemu po dobu 1 h je zajištěna bubláním vzduchem.
- 5.b Substrát, tedy odpadní voda se nasadí do TL-RWP a přidá se inokulum kultury do finální optické hustoty  $\text{OD}_{750} = 0.4$ . (Objem se vypočítá kalkulací na základě směšovací rovnice:  $\text{OD}_{750} \text{inokula} \times X \text{ litrů} = 0,4 \times 30 \text{ litrů}$ ). Kultivační podmínky: teplota 26-30 °C; osvětlení s 12/12h světelným cyklem a světelnou dráhou 5,5 cm; promíchávání vzduchem.
6. Vzorek kultury se denně sleduje, kvůli výskytu predátorů (nejčastěji bičíkovců), které se objeví až když se kultura rozroste (2-4 den).
7. Okamžitě při pozorování prvních predátorů se upraví  $\text{pH} \approx 10.5$  pomocí 1M hydroxidu sodného.
8.  $\text{pH} \approx 10.5$  se udržuje po celou dobu kultivace t.j. 26-30 dní.
9. Kultura se odstředí při 17,000g; 7 min. a biomasa se lyofilizuje pro následnou extrakci PHB.

## Aktivity A.T1.2 Generování a výběr transformantů se zvýšenou produkcí PHB

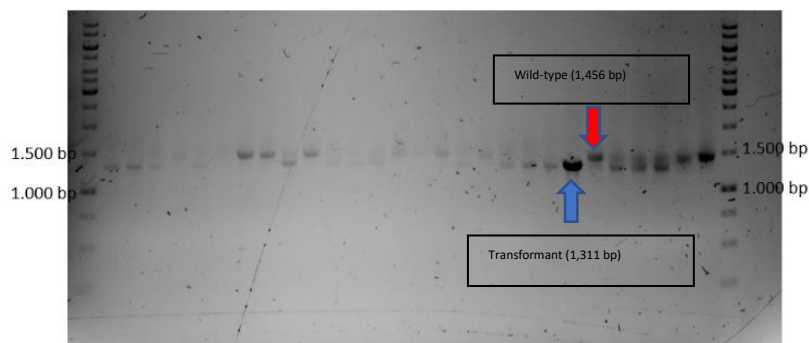
**Koordinator:** FH OOE.

### Dílčí výstup A.T1.2.1 List transformantů se zvýšenou produkcí PHB

Buněčné složky, které slouží jako primární výchozí materiál pro PHB, mohou být uloženy ve formě glykogenu. Za účelem zpřístupnění většího množství výchozího materiálu pro produkci PHB a zlepšení její metabolické dráhy u mutanta sinicového kmene *Synechocystis* PCC6714 Mt\_a24 (dále jen Mt\_a24), byla genetickou manipulací inhibována dráha produkce glykogenu. Tím se metabolický tok posunul více ve prospěch produkce PHB. Za účelem inhibice produkce glykogenu byl molekulárně biologickými metodami vyřazen jeden z hlavních odpovědných genů, glgC. Za tímto účelem byly vytvořeny plazmidy, které místo genu glgC integrují kopii genu rezistence k antibiotiku spektinomycinu (obr. 2). Tento plazmid byl sekvenován a transformován do kmene Mt\_a24. Přítomnost genu byla ověřena PCR po izolaci genomové DNA.



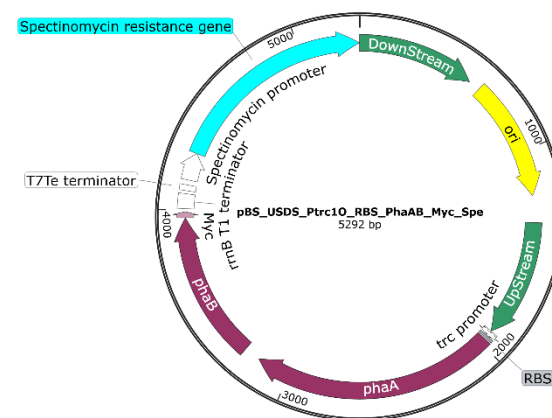
**Obr 2** Plazmidová mapa vytvořeného glgC knock-out plazmidu pBS\_k.o.glgC pBS\_k.o.glgC.



**Obr 3** Segregace *Synechocystis* PCC6714 Mt\_a24 transformované glgC knock-out plazmidem pBS\_k.o.glgC.

Vzhledem k tomu, že sinice mohou mít v každé buňce více genomových kopií, je třeba je kultivovat několik týdnů pod selekčním tlakem antibiotik, aby se plně segregovaly na stabilní a čisté klony, které obsahují pouze vnesený gen a žádnou kopii původního genu, který má být vyřazen (odstraněn). Transformované kultury byly několik týdnů segregovány pod rostoucím selekčním tlakem antibiotik. Segregace kultur byla pravidelně analyzována, u mnoha klonů bylo možné knock-out potvrdit pomocí PCR (obr. 3). Také kultury se v průběhu času do jisté míry segregovaly, ale nedošlo k jejich úplné segregaci. To by mohlo naznačovat, že vyřazený gen je pro sinice nezbytný a že ke svému přežití potřebují alespoň několik kopií.

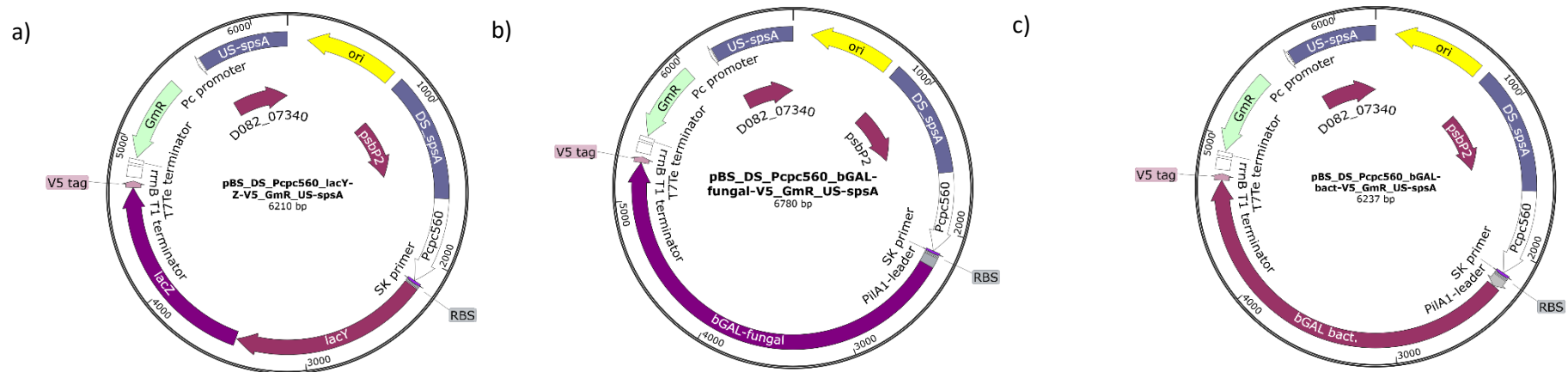
Nadprodukce PHB je docílena zvýšením počtu kopií dvou genů, které jsou zodpovědné za produkci PHB (PhaA a PhaB). Tyto dva geny byly izolovány a amplifikovány pomocí PCR z genomu kmene sinice *Synechocystis* sp. PCC6714. Geny byly poté klonovány nejmodernější metodou (Gibson assembly) do dříve popsáného *glgC* knock-out plasmidu pBS\_k.o.glgC (obr. 4). Pomocí různých sad Gibsonových primerů bylo vytvořeno několik mírně odlišných DNA-fragmentů, které pak byly použity pro tento klonovací krok. Sekvenování vytvořených plazmidů však ukázalo, že gen PhaA a PhaB nebyl nikdy začleněn do plasmidu. Proto byly tyto dva geny synteticky fúzované s genem rezistence vůči spektinomycinu, aby bylo dosaženo konečného cíle jejich nadměrné exprese v kmeni sinic *Synechocystis* sp. PCC6714 Mt\_a24. Tento fragment DNA byl klonován do *glgC* knock-out plasmidu pBS\_k.o.glgC rovněž pomocí Gibsonovy klonovací metody. Předběžná sekvenční analýza ukázala, že nyní se klonování PhaAB-overexpresního plasmidu konečně podařilo. Následný krok k jejich nadexpresi, transformace v sinicích, v současné době stále probíhá a očekává se, že do konce projektového období budou vytvořeni transformanti.



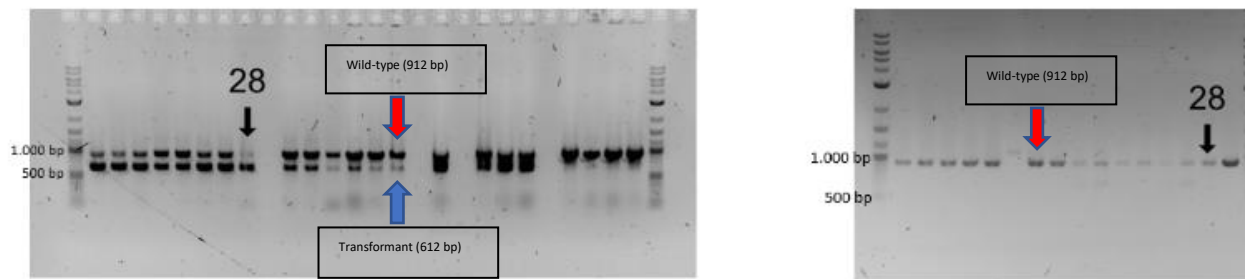
**Obr 4** Plazmidová mapa navrženého expresního plasmidu pBS\_glgC::PhaAB.

#### Dílčí výstup A.T1.2.2 List transformantů schopných zpracovávat laktózu

Protože sinice nejsou schopny štěpit laktózu, která je součástí mléčného odpadu, byl do nich vnesen gen pro  $\beta$ -galaktosidázu, která štěpí laktózu na glukózu a galaktózu. Pro tento přístup byly do sinicového plazmidového vektoru naklonovány vždy tři varianty genu pro  $\beta$ -galaktosidázu: 1. geny LacY a LacZ z bakterie *Escherichia coli*, 2.  $\beta$ -gal geny pocházející z houby *Trichoderma reesei* (BGA1) a 3. bakterie *Bacillus circulans* (BgaD-D). Navržené plazmidy jsou vidět na obr. 5. Aminokyselinové sekvence genů byly kodonově optimalizovány pro expresi cyanobakteriálních proteinů a příslušná DNA byla fúzovaná s vhodnými exportními sekvencemi, které umožňují vylučování produkovaných enzymů do okolního vnějšího prostředí. Syntetizované fragmenty DNA byly poté klonovány do expresních vektorů sinic. Plazmidy pBS\_spsA::bGAI-bact a pBS\_spsA::bGAI-fungal byly úspěšně naklonovány a sekvenovány. Vzhledem k tomu, že již dvě verze genu pro  $\beta$ -galaktosidázu byly úspěšně naklonovány do požadovaného plasmidu, byla snaha o vytvoření třetí verze (pBS\_spsA::lacYZ) zastavena. Následně byl kmen *Synechocystis* sp. PCC6714 Mt\_a24 transformován oba plazmidy. Přítomnost genu pro  $\beta$ -galaktosidázu byla potvrzena pomocí colony PCR (obr. 6).



**Obr 5** Plazmidová mapa vytvořených expresních plazmidů  $\beta$ -galaktosidázy a) pBS\_spsA::lacYZ b) pBS\_spsA::bGAL-bact c) pBS\_spsA::bGAL-fungal.



**Obr 6** Segregace kmene *Synechocystis* sp. PCC6714 Mt\_a24 transformovaného expresními plazmidy  $\beta$ -galaktosidázy pBS\_spsA::bGAL-bact (vlevo) a pBS\_spsA::bGAL-fungal (vpravo).

Vytvořené plazmidy jsou navrženy tak, aby se geny  $\beta$ -galaktosidázy integrovaly v místě genu *spsA* v genomu sinice *Synechocystis* sp. PCC6714. Tím se současně s expresí  $\beta$ -galaktosidázy, respektive s její integrací, vypne kompetitivní metabolická dráha. Také v tomto případě je třeba kultury sinic kultivovat několik týdnů pod selekčním tlakem antibiotik, aby se plně segregovaly na stabilní a čisté klony, které obsahují pouze  $\beta$ -galaktosidázu a žádnou kopii původního genu *spsA*. Tento proces stále probíhá a transformované kultury jsou pravidelně analyzovány. Jak je vidět na obr. 6, jeden klon (č. 28) byl téměř plně segregován (a), ale o několik dní později se poměr původního genu *spsA* k genu  $\beta$ -galaktosidázy opět obrátil (b). Dosud se nepodařilo získat plně segregované a stabilní kultury. Proces segregace však stále probíhá.

## Aktivity A.T1.3 Selektce transformantů produkujících PHB a purifikace PHB z biomasy

**Koordinator:** TU Wien.

### **Dílčí výstup A.T1.3.1** Zpráva postupu selektce transformantů v laboratorním měřítku

V této fázi projektu nejsou použitelné žádné transformanty pro metabolismus laktózy (Aktivity A.T1.2).

### **Dílčí výstup A.T1.3.2** Standardní operační postup (SOP) purifikace PHB ze sinic.

Pro studii byly vybrány iontové kapaliny (IL), EMIM chlorid, EMIM acetát a EMIM diethylfosfát, protože jsou vysoce korozivní, mohou rozpouštět biomasu mikrořas, jsou velmi polární (PHB tedy není rozpuštěno), mají dobré rozpouštěcí vlastnosti a jsou částečně schopny štěpit esterové vazby (závisí na bazicitě příslušných skupin: Acetáty > diethylfosforečnany > chloridy; platí pravidlo: čím zásaditější, tím více se štěpí esterové vazby).

Na základě předběžných výsledků prvních experimentů byl jako nejvhodnější IL vybrán diethylfosfát EMIM. Úplné rozpuštění biomasy bylo pozorováno při následujících parametrech: 10 g IL zcela rozpustí 1 g biomasy.

PHB by se neměl rozpouštět kvůli své vysoké polaritě. Směs IL a biomasy lze proto oddělit od vzniklého PHB odstředěním/filtrací. Bylo však zjištěno, že viskozita směsi biomasy a IL je velmi vysoká, takže úplné oddělení od vysrážené PHB a kapalná fáze není možné.

Lze ředit IL vodou (až do 5 % hm.), než se sníží rozpouštěcí schopnost. To závisí na volných akceptorech vodíkových vazeb donorů IL. Kosolvent nesmí tvořit vodíkovou vazbu s IL; existují však kosolventy, které by mohly snížit viskozitu směsi IL a biomasy, aniž by se změnila její rozpouštěcí vlastnosti.

Potenciální kosolventy s neměnnými Kamlettovými Taftovými parametry by byly:

- DMSO
- acetonitril
- gama-valerolakton
- Cyren – dihydrolevoglukosenon

Vzhledem k tomu, že cyren byl zjištěn jako nejtrvalejší chemická látka v rozmezí těchto dříve uvedených kosolventů, byla tato chemická látka zvolena jako vhodná metoda ke snížení viskozity.

Po snížení viskozity je nutné vyzkoušet, zda lze při srážení směsi vodou získat 100 % rozpuštěné biomasy. Po přidání vody bylo možné PHB ze směsi IL a biomasy opět dobře oddělit. Pro další zvýšení čistoty vysrážených peletů byla vyzkoušena různá srážecí a promývací činidla:

- opakované promývání pelety PHB čistým methanolem.
- opakované promývání pelety PHB čistým acetonem.
- opakované promývání pelety PHB čistým cyrenem.
- opakovaný promývací krok pelety PHB s čistým IL.

- opakovaný promývací krok pelety PHB s čistým hexanem.
- opakovaný promývací krok pelety PHB čistým chloroformem.

Jakmile bude tato optimalizace dokončena, můžeme se v rámci projektu Plastocyan těšit na ekologičtější metodu extrakce PHB ve srovnání se současnou metodou extrakce (chloroformová extrakce), která může v budoucnu dále posunout výrobu bioplastů.

## Aktivity A.T1.4 Sdílení znalostí a zlepšování spolupráce

### Dílčí výstup A.T1.4.1 Zpráva o výměně zaměstnanců

#### Výměna zaměstnanců 1

V období 21.11.-25.11.2021 se zaměstnankyně Mikrobiologického ústavu, Romana Beloše zúčastnila výměnného pobytu zaměstnanců, u projektová partnera 3 (TU Wien), za účelem osvojení si metodiky extrakce polyhydroxybutyrátu (PHB) z biomasy sinic. V rámci této krátké stáže se R. Beloše naučila analyzovat PHB pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie, zkráceně HPLC, (angl. high-performance liquid chromatography). HPLC se používá k separaci složek vzorku za účelem stanovení jejich přítomnosti a koncentrace ve vzorku. Zaměstnankyně si s sebou přivezla vzorky lyofilizované biomasy sinic pěstovaných v odpadní vodě z komunální čističky odpadních vod v Třeboni. Testovaly se především vzorky po různém oprocessingu odpadní vody (nesterilizovaná odpadní voda, sterilizace UV, sterilizace teplem porovnání s růstovým médiem BG-11) a vzorky z pilotní kultivace. TU Wien disponuje moderním vybavením pro analytické stanovení obsahu různých látek a stanovení obsahu PHB zde patří mezi standardizované metody. Doktorandi Ricarda Kriechbaum a Julian Kopp detailně seznámili Romanu Beloše se zpracováním a analýzou vzorků. Před samotnou analýzou byly vzorky hydrolyzovány pomocí kyseliny (příp. zásady), a následně bylo PHB ve formě trans-krotonové kyseliny detekováno na HPLC. Následná analýza, porovnání hodnot se standardem a kalkulace PHB koncentrace byla provedena analytickém programu Chromeleon. Výsledky z těchto měření zároveň pomohly optimalizovat zpracování substrátu (odpadní vody) z komunální čističky odpadních vod před jeho použitím (Tab. 3). Účelem tohoto pobytu bylo prohloubení spolupráce, provedení důležitých analýz v rámci projektu a přenos know-how pro stanovení obsahu PHB s využitím HPLC na české pracoviště. Tento výměnný pobyt byl přínosný pro CZ partnera z hlediska osvojení nové metodiky, kterou bude možné na pracovišti aplikovat. Na základě předávání know-how mohlo pracoviště MBU následně zakoupit potřebné vybavení (PHB standard, kolona pro HPLC), aby mohly analýzy z dalších testů pro optimalizaci produkce PHB sinicemi v odpadní vodě probíhat na pracovišti MBU. Metodika byla úspěšně zavedena na Mikrobiologickém ústavu v Třeboni.

**Tab 3** Analýza PHB vzorků sinice *Synechocystis* sp. PCC6714 Mt\_a24 rostoucích 10 dní v odpadní vodě po různém oprocessingu.

vzorek	Obsah PHB [% sušiny]
Odpadní voda oprocessingovaná teplem	9.2
Odpadní voda bez oprocessingu	5.8
Odpadní voda oprocessingovaná UV zářením	8.4
BG-11 médium	5.1





## Výměna zaměstnanců 2

V období od 2.11 do 4.11.2022 se Tomáš Grivalský z Mikrobiologického ústavu AV ČR, Centra Algatech (MBÚ) zúčastnil výměnného pobytu v partnerské organizaci Univerzity aplikovaných věd ve Welsu (FH OO). V rámci krátké stáže měl možnost pracovat na detekci stupně segregace u transformantů kmene *Synechocystis* sp. PCC6714 Mt\_a24 a také na optimalizaci protokolu pro stanovení  $\beta$ -galaktosidázové aktivity u vylepšeného kmene schopného zpracovat laktózu. *Synechocystis* je jednobuněčný organismus, který má několik kopií genomu na buňku. Po transformaci je proto potřeba, aby se cizorodá DNA v procesu homologické rekombinace integrovala na všechny kopie, čímž se zajistí stabilita integrované cizorodé DNA. V určitých případech však buňka není schopna segregace na všechny kopie. Stupeň segregace, a tedy přítomnost cizorodé DNA se detekuje pomocí PCR. V rámci tohoto pobytu si zaměstnanec osvojil PCR metodu detekce přítomnosti genů pro nadprodukcí PHB, a bude schopen tuto metodu aplikovat i na českém pracovišti (MBÚ). Metodu bude třeba použít při pilotní kultivaci, aby v krajním případě nedošlo ke ztrátě vylepšených vlastností transformovaného kmene. Kromě toho společně se zaměstnancem projektového partnera 2 – Kevinem Trenzingerem, pracovali na optimalizaci protokolu pro měření beta-galaktosidázové aktivity u transformantů schopných využít laktózu jako svůj substrát. Tento protokol je důležitým nástrojem pro selekci nejvhodnějšího kmene pro růst v odpadní vodě z mléčné produkce. Na základě tohoto protokolu byl proveden screening kmenů schopných produkce beta-galaktosidázy (Tab. 4) a vybrané kmeny byly převezeny na české pracoviště pro další testování. Kevin Trenzinger převedl zaměstnance MBÚ celým pracovištěm FH OO, které disponuje množstvím moderního laboratorního vybavení se zaběhnutými operačními postupy. To může mít pozitivní vliv při budování další spolupráce. Cílem i výsledkem této stáže bylo prohloubení vzájemné spolupráce a přenos know-how detekce přítomnosti genů pro nadprodukcí PHB a zpracování laktózy pomocí PCR.

**Tab 4** Měření fluorescence pro stanovení beta-galaktosidázové aktivity u vybraných transformantů *Synechocystis* sp. PCC6714 Mt\_a24. Měřila se fluorescence z peletu i ze supernatantu. UV mutant bez  $\beta$ -galaktosidázového genu slouží jako kontrola (blank).

Kmen / Hodnoty fluorescence	#56	#67	#75	#86	#79	#39	Mt_a24 (blank)
Pelet	13911	17559	109753	16221	72194	9984	261
Supernatant	303	434	697	418	560	392	338



## Výměna zaměstnanců 3

Ricarda Kriechbaum z Technické univerzity ve Vídni (pracovní skupina: Integrovaný vývoj bioprocusů) byla po dobu tří dnů (9.11.-11.11.2022) v partnerské organizaci FH OÖ Wels v rámci výměnného programu zaměstnanců. Během této výměny se diskutovalo o softwaru Snapgene, prováděly se PCR-postupy a konsektivní elektroforéza na agarosovém gelu a měřila se aktivita  $\beta$ -Galaktosidázy pomocí enzymatického testu a porovnávala se s měřením aktivity prováděným na TU Wien.

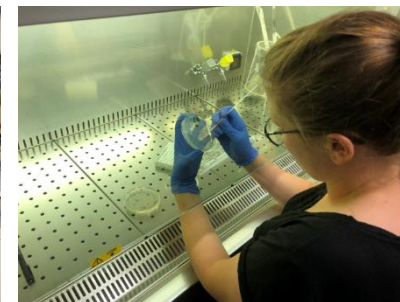
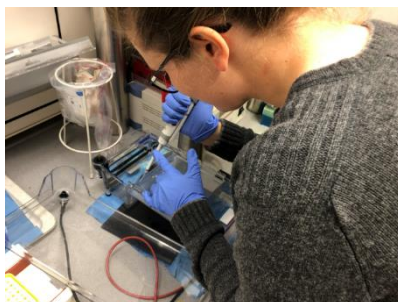
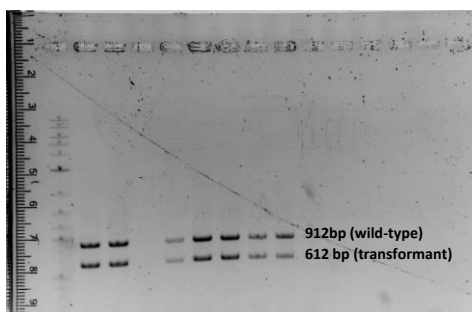


## Workflow

### 1. Osvojení si programu Snapgene + podrobná diskuse o klonovací strategii a optimalizaci kodonů u *Synechocystis* sp. PCC6714

Během výměny byl pozorován proces segregace transformantů kmenů *Synechocystis* sp. PCC6714 Mt\_a24, který byl vizualizován pomocí elektroforézy na agarosovém gelu provedené metodou PCR. *Synechocystis* sp. je jednobuněčný organismus s více kopiemi genomu na buňku. Proto se po transformaci musí vnesená hostitelská DNA integrovat do všech kopií genomu prostřednictvím procesu homologní rekombinace. To se později kontroluje pomocí multiplexní PCR, která se skládá ze tří různých primerů. Ricarda Kriechbaumová byla seznámena s programem Snapgene, který FH OÖ používá k návrhu plazmidů. Nyní je schopna použít popsanou metodu PCR, zkontrolovat proces segregace, na TU Wien a reprodukovat výsledky.

### 2. PCR Skrínig – Multiplex PCR (použití tří primerů)



### 3. Test aktivity $\beta$ -galaktosidázy pomocí fluorescein-di- $\beta$ -D-galaktopyranosidu (FDG)

Cíl: Srovnání SOP TU Wien a FH OÖ

Aktivity  $\beta$ -gal transformantů byly porovnány s aktivitou kmene *Synechocystis* sp. PCC6714 Mt\_a24 a kvantifikovány pomocí standardní kalibrační křivky. Tato metoda byla porovnána s metodou TU Wien a optimalizována.

Regresní rovnice založená na kalibrační křivce pro spojení naměřené intenzity fluorescence (absorpce; y) s produkovaným množstvím aktivity  $\beta$ -gal (x) [ng/ml]:

$$y = 14,57x + 291,76$$

**Tab 5**  $\beta$ -galaktosidázové aktivity zkoumaných transformantů. 7 Transformanti s genem  $\beta$ -gal houbového nebo bakteriálního původu a Mt\_a24 jako kontrola. Absorpce byla měřena ve třech opakováních a  $\beta$ -gal byl vypočten viad regresní rovnicí.

$\beta$ -gal host	kmen	1. měř	2. měř	měř	Ar. průměr $\pm$ STDV	ng/mL
Bez $\beta$ -gal	Mt 24	22,33	-9,67	-9,67	1,00 $\pm$ 15,08	0
fungál	79	10,33	-6,67	-12,67	-3,00 $\pm$ 9,74	0
fungál	86	-2,67	-8,67	-7,67	-6,33 $\pm$ 2,62	0
fungál	75	-7,67	-8,67	-7,67	-8,00 $\pm$ 0,47	0
bakteriál	28	-7,67	-8,67	-10,67	-9,00 $\pm$ 1,25	0
fungál	67	-8,67	-9,67	-7,67	-8,67 $\pm$ 0,82	0
fungál	39	-7,67	-9,67	-7,67	-8,33 $\pm$ 0,94	0
fungál	50	-11,67	-8,67	-9,67	-10,00 $\pm$ 1,25	0

Kmeny nevykazovaly žádné aktivity  $\beta$ -gal ve srovnání s předchozím experimentem a je třeba je dále ověřit a analyzovat.

#### 4. Den otevřených dveří FH Wels – prezentace projektu s Roll-Up:

Dne 11. listopadu 2022 se na FH OÖ konal den otevřených dveří, který měl potenciálním studentům představit různé studijní obory, které lze na FH Wels studovat. Kevin Trenzinger (FH OÖ) a Ricarda Kriechbaum (TU Wien) představili studentům projekt a možný obor činnosti po ukončení studia.



#### Výměna zaměstnanců 4

Od 28. listopadu do 1. prosince 2022 se Kevin Trenzinger (FH OÖ) účastní výměnného pobytu zaměstnanců v partnerské organizaci Mikrobiologický ústav AV ČR, Centrum Algotech (MBÚ) v Třeboni. Probíhá zde kultivace transformantu KO glgc #5 v odpadních vodách z mlékárenského průmyslu ve fotobiorektoru (PBR) o objemu 30 L. Transformant byl generován z kmene *Synechocystis* sp. PCC6714 Mt\_a24, u kterého byl vyřazen jeden gen (glgC – glukóza-1-fosfát adenyltransferáza). To by mělo vést ke zvýšení výtěžku PHB. V důsledku přidávání odpadních vod z mlékárenského průmyslu se mění různé parametry, jako je pH a přísun živin. V souladu s tím je třeba přizpůsobit kultivaci. Kultivace v tomto pilotním měřítku také umožní získat nové poznatky, a především nové metody, které se uplatní na pracovišti Hornorakouské univerzity aplikovaných věd (FH Wels). To je důležité, protože doposud bylo pěstování prováděno pouze v malém měřítku ve FH OÖ a v důsledku rozšiřování se objeví nové výzvy. Proto je velmi důležité přizpůsobit postup kultivace během tohoto procesu novým podmínkám. Pobyt v Třeboni také umožňuje pracovníkům ve Welsu provádět pokusy v pilotním měřítku, a tím zlepšit budoucí projekty nebo spolupráci. Během výměny pracovníků bude také ověřen segreganční stav tohoto transformantu pomocí PCR. To je nezbytné, protože je třeba zajistit, aby geny zůstaly knocked-down. To také umožní potvrdit metodu v Třeboni a provést případné optimalizace.





## PARTNEŘI A KONTAKTNÍ INFORMACE

### **Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Centrum Algatech**

Centrum Algatech Třeboň je jedním z pracovišť Mikrobiologického ústavu (MBU) a od svého založení v roce 1962 získalo rozsáhlé zkušenosti ve všech oblastech mikrobiálního výzkumu. V současnosti je jednou z nejkompetentnějších institucí v regionu Jižní -Západní Čechy provádějící výzkum v kulturách řas. MBU má dlouholeté zkušenosti s pěstováním různých kmenů mikrořas a sinic používaných k produkci biomasy a izolaci a identifikaci bioaktivních látek, jakož i s vývojem a testováním různých kultivačních jednotek v laboratorním a pilotním měřítku. K optimalizaci kultivačního procesu se používají různé fyziologické, biochemické a biofyzikální techniky. V rámci MBU byla také vyvinuta řada analytických technik k detekci různých sloučenin přítomných v biomase.

**Adresa:** Novohradská 237, 379 01 Třeboň, Česká republika

**Web:** [www.alga.cz](http://www.alga.cz)

**Koordinátor projektu za MBÚ:** Tomáš Grivalský, [grivalsky@alga.cz](mailto:grivalsky@alga.cz)

### **Fachhochschule Oberösterreich Forschungs- und Entwicklungs GmbH, AG Biosciences**

AG Biosciences úzce spolupracuje se studijním programem Bio- and Environmental Technology (FH OOE) a má dobře vybavené laboratoře molekulární biologie využívající řadu zavedených technik pro genetické inženýrství sinic a kvasinek. Zaměřuje se na udržitelnou produkci cenných látek v různých mikroorganismech: využití odpadních produktů kvasinkami v rámci projektu IWB Combined Agro Forest Biorefinery, biodiverzita sněhových řas v projektech financovaných FWF a zavedení sinic jako udržitelného produkčního systému. Metody genetického inženýrství sinic byly stanoveny v projektu INTERREG ATCZ15 i v projektu FFG a byly získány rozsáhlé znalosti o jejich kultivaci a produkci PHB.

**Adresa:** Roseggerstrasse 15, 4600 Wels, Rakousko

**Web:** [www.fh-ooe.at/campus-wels](http://www.fh-ooe.at/campus-wels)

**Koordinátor projektu za FH OOE:** Alexander Zwirzitz, [alexander.zwirzitz@fh-wels.at](mailto:alexander.zwirzitz@fh-wels.at)

### **Technische Universität Wien - Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und technische Biowissenschaften, Integrierte Bioprozessentwicklung**

Výzkumná skupina Integrierte Bioprozessentwicklung na Ústavu procesního inženýrství, environmentálních technologií a biologických věd Fakulty technické chemie TU Wien má více než 10 let zkušeností s vývojem mikrobiálních bioprocusů různých měřítek. V této vědecké skupině jsou mikrobiální bioproceny vyvíjeny a optimalizovány integrovaným způsobem, tj. Jsou generovány kmeny, bioreaktorové kultury jsou navrhovány a prováděny v měřítku 0,1 - 30 L, různé produkty jsou izolovány a čištěny v komplexních čistících krocích a také je charakterizována a testována jejich aplikovatelnost. Následně jsou tyto procesy přeneseny do průmyslového měřítku. Za poslední 3 roky tato skupina také pracuje s mikrořasami a sinicemi a vyvíjí nové technologie pro řízené pěstování. Dále jsou vyvinuty metody pro izolaci a charakterizaci cenných produktů (např. karotenoidů, glykogenu, lipidů) z mikrořas.

**Adresa:** Getreidemarkt 9, 1060 Vídeň, Rakousko

**Web:** [www.vt.tuwien.ac.at/biochemical\\_engineering/integrierte\\_bioprozessentwicklung/](http://www.vt.tuwien.ac.at/biochemical_engineering/integrierte_bioprozessentwicklung/)

**Koordinátor projektu za TU Wien:** Oliver Spadiut, [oliver.spadiut@tuwien.ac.at](mailto:oliver.spadiut@tuwien.ac.at)

# SOUHRNNÉ INFORMACE

## Název projektu

Produkce biologicky rozložitelného polymeru polyhydroxybutyrátu PHB ze sinic cestou kultivace v odpadních vodách.

## Číslo projektu, zkratka

ATCZ260, PlastoCyan

## Program

Program Interreg V-A Rakousko-Česká republika, Evropský fond pro regionální rozvoj

## Prioritní osa

Životní prostředí a zdroje

## Doba trvání projektu

01. 06. 2021 – 31. 12. 2022

## Vedoucí partner

Mikrobiologický ústav AV ČR v.v.i.

## Partneři projektu

- Fachhochschule Oberösterreich Forschungs- und Entwicklungs GmbH
- Technische Universität Wien - Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und technische Biowissenschaften

## Alokované prostředky EFRR

€ 335 365.62

## WEB:

[https://www.at-cz.eu/cz/ibox/po-2-zivotni-prostredi-a-zdroje/atcz260\\_plastocyan](https://www.at-cz.eu/cz/ibox/po-2-zivotni-prostredi-a-zdroje/atcz260_plastocyan)  
[www.at-cz.eu/cz](http://www.at-cz.eu/cz)



# BASIS INFORMATIONEN

## Projektname

Herstellung von biologisch abbaubarem Polymer Polyhydroxybutyrat PHB aus Cyanobakterien durch Kultivierung in Abwasser.

## Projektnummer, Akronym

ATCZ260/ PlastoCyan

## Programm

Programm Interreg V-A Österreich – Tschechische Republik, Der Europäische Fonds für regionale Entwicklung

## Prioritätsachse

Umwelt und Ressourcen

## Projektdauer

01. 06. 2021 – 31. 12. 2022

## Lead Partner

Mikrobiologický ústav AV ČR v.v.i.

## Projektpartner

- Fachhochschule Oberösterreich Forschungs- und Entwicklungs GmbH
- Technische Universität Wien - Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und technische Biowissenschaften

## Genehmigte EFRE-Mittel

€ 335 365.62

## WEB:

[https://www.at-cz.eu/cz/ibox/po-2-zivotni-prostredi-a-zdroje/atcz260\\_plastocyan](https://www.at-cz.eu/cz/ibox/po-2-zivotni-prostredi-a-zdroje/atcz260_plastocyan)  
[www.at-cz.eu/cz](http://www.at-cz.eu/cz)



# BASIC INFORMATION

## Project name

Production of the biodegradable polymer polyhydroxybutyrate PHB from cyanobacteria via wastewater cultivation.

## Project number/Acronym

ATCZ260/PlastoCyan

## Program

Interreg V-A program Austria-Czech Republic, European Regional Development Fund

## Priority axis

Life environment and sources

## Project duration

01. 06. 2021 – 31. 12. 2022

## Lead partner

Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences

## Project partners

- University of Applied Sciences Upper Austria
- Vienna University of Technology - Institute for Process Engineering, Environmental Engineering and Technical Biosciences

## Budget from ERDF

€ 335 365.62

## WEB:

[https://www.at-cz.eu/cz/ibox/po-2-zivotni-prostredi-a-zdroje/atcz260\\_plastocyan](https://www.at-cz.eu/cz/ibox/po-2-zivotni-prostredi-a-zdroje/atcz260_plastocyan)  
[www.at-cz.eu/cz](http://www.at-cz.eu/cz)

