

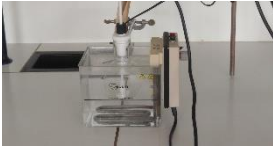
# Návod experimentu: Syntéza PHB (polyhydroxybutyrátu)

## 1. Plnění fermentoru

- 1.1 V odměrném válci odměřte 200 ml roztoku A.
- 1.2 Odměřte 20 $\mu$ l roztoku B (použij mikropipetu)
- 1.3 Oba roztoky nalijte do fermentoru (250ml), a přidejte 2 ml kultury (použij pipetu)

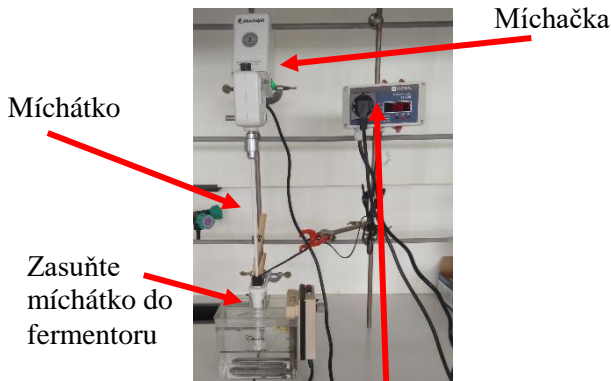
## 2. Příprava vodní lázně

- 2.1 Připravte vodní lázeň se systémem zahřívání a systémem kontroly teploty.



- 2.2 Fermentor vložte do vodní lázně a upevněte ho svorkou.

Nad fermentor upevněte mechanickou míchačku. Zvolte nejnižší rychlost rotace.



Termostat nastavte následovně:

Minimum: 36 °C

Maximum: 38 °C

### 2.1.2.3. Fermentace

Fermentace by měla probíhat za stálého míchání při konstantní teplotě po dobu 45 hod.

## 3. Extrakce PHB

### 3.1. Proces centrifugace

Vyjměte fermentor z vodní lázně.

Nechte ho na 15 min odležet – sedimentace.

Pozvolna pipetou odejměte 150 ml supernatantu – kalové tekutiny (uložte do kádinky).

Zbytek, který zůstal na dně fermentoru, je třeba centrifugovat po dobu 15 min. při 10000 rpm (otáček za minute).

### 3.2. Zpracování chlornanem.

Po dokončení centrifugace:

Nechte sediment (pevné částičky) v kyvetě (nádobce z centrifugy), odejměte supernatant

K sedimentu přidejte 10ml chlornanu sodného (odměřte odměrným válcem).

Inkubujte směs při 60 °C po dobu 45 min.

Centrifugujte po dobu 10 min při 5000 rpm

### 3.3. Omývání vodou

Nechte sediment v kyvetě, odejměte supernatant.

Omyjte 5 ml vody (odměřte odměrným válcem).

Centrifugujte po dobu 5 min při 5000 rpm

### 3.4. Omývání acetonem.

Nechte sediment v kyvetě, odejměte supernatant.

Omyjte 5 ml acetonu (odměřte odměrným válcem).

Centrifugujte po dobu 5 min při 5000 rpm

### 3.5. Omývání methanolem

Nechte sediment v kyvetě, odejměte supernatant.

Omyjte 5 ml methanolu (odměřte odměrným válcem).

Centrifugujte po dobu 5 min při 5000 rpm

### 3.6. Zpracování chloroformem

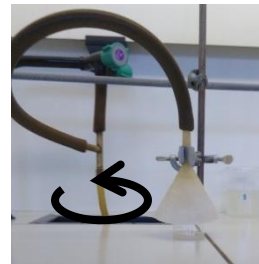


Nechte sediment v kyvetě, odejměte supernatant.

Přemístěte sediment do skleněné Petriho misky.

Pod digestoří odměřte 5 ml chloroformu.

Nalijte do skleněné Petriho misky (pod digestoří).



Umístěte Petriho misku pod převrácenou nálevku připojenou k vakuové vývěvě.

Míchejte směs otáčivým pohybem.

## 4. Získání PHB



Až chloroform zcela vyprchá, můžete odejmout plastovou folii.