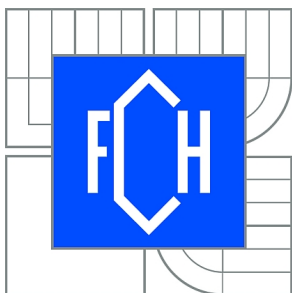




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM BIODEGRADACE POLYHYDROXYALKANOÁTŮ.

STUDY OF BIODEGRADATION OF POLY(HYDROXY ALKANOATES).

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. AGÁTA WURSTOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. STANISLAV OBRUČA, Ph.D.

BRNO 2014



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0845/2013	Akademický rok: 2013/2014
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Agáta Wurstová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Studium biodegradace polyhydroxyalkanoátů.

Zadání diplomové práce:

1. Rešerše na téma biodegradabilita polymerních materiálů se zaměřením na polyestery
2. Zavedení experimentálních testů pro posouzení biodegradability materiálu
3. Ověření biodegradability polyhydroxyalkanoátů s ohledem na způsob jejich technologického zpracování

Termín odevzdání diplomové práce: 9.5.2014

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Agáta Wurstová
Student(ka)

Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Diplomová práce je zaměřena na studium biodegradace polyhydroxyalkanoátů, konkrétně polymeru polyhydroxybutyrátu. První část práce se zabývá studiem biodegradace polyhydroxybutyrátu ve formě PHB prášku a PHB fólie pomocí vybraných druhů mikroorganismů z řad bakterií, kvasinek a plísní. Jako zástupce bakterií byl vybrán mikroorganismus *Delftia acidovorans*, z řad kvasinek *Aureobasidium pullulans* a ze zástupců plísní *Aspergillus fumigatus*. Aktivita extracelulární PHB depolymerázy byla analyzována turbidimetrickým měřením suspenze PHB granulí. Zároveň byla stanovena hodnota pH a teplotního optima jednotlivých PHB depolymeráz. Z výsledků vyplývá, že bakterie *D. acidovorans* dokáže částečně degradovat PHB, naopak kvasinka *A. pullulans* nedokáže PHB účinně degradovat. Nejvýraznější degradační schopnost vykazovala plíseň *A. fumigatus*, která PHB kompletně degradovala v rámci daného testu. Extracelulární enzymy exprimované těmito mikroorganismy při kultivaci na PHB jako jediném zdroji uhlíku byly analyzovány pomocí SDS-PAGE.

Druhá část práce se zabývá biodegradací PHB ve formě PHB fólie, PHB tvrzené fólie a PHB Nanoul textilie v rámci standardního kompostovacího testu. Polosuchá kultivace podávala pozitivní výsledky, kdy v intervalu od 14. dnů do dvou měsíců byly zcela biodegradovány všechny formy použitých PHB. Co se týče polosuché kultivace, byla touto metodou ještě studována míra biodegradace polyuretanových elastomerů, kde část polyesterového polyolu byla nahrazena PHB (PU-PHB). Testovány byly vzorky obsahující komerční PHB od firmy Sigma a vzorky s PHB připravené na Fakultě chemické VUT v Brně. Jednotlivé vzorky se navíc lišily rozdílnou koncentrací dispergovaného PHB (1 %, 5 % a 10 %) v polyuretanu. Na konci kultivace, která trvala dva měsíce, byly zjišťovány mechanické změny materiálu v tahu, účinnost biodegradace vážkovou analýzou a změna povrchu materiálu analýzou mikroskopickou.

Klíčová slova:

Biodegradace, polyestery, PHA, PHB, PU-PHB, *Delftia acidovorans*, *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus fumigatus*

ABSTRACT

The master's thesis is focused on the study of biodegradation of polyhydroxyalkanoates, namely polymer polyhydroxybutyrate. The first part of the thesis is focused on the study of biodegradation of polyhydroxybutyrate in the form of crystalline granules of PHB and PHB films using selected species of microorganisms from bacteria, yeasts and fungi. As a representative of bacteria was chosen microorganism *Delftia acidovorans*, as yeast was selected *Aureobasidium pullulans* and *Aspergillus fumigatus* as fungi. PHB depolymerase activity was measured employing turbidimetric method with suspension of PHB granules as substrate. The results showed that *D. acidovorans* can partially degrade PHB. On the contrary *A. pullulans* cannot effectively degrade PHB. The most significant degradation ability revealed *A. fumigatus*, which was able to degrade PHB completely. Extracellular enzymes excreted by these microorganisms when cultivated on PHB materials as sole carbon sources were analyzed by SDS-PAGE.

The second part of the thesis deals with the biodegradation of PHB in the form of PHB film, PHB hardened foil and PHB Nanofabric using standard composting test. Semi-solid cultivation showed positive results. In the interval from 14 days to two months were all forms of the PHB completely biodegraded. With semi-solid cultivation was also studied biodegradation rate of the polyurethane elastomeric films which were modified by partial replacement of polyester polyol by PHB. The test samples were prepared using PHB from Sigma and the PHB samples prepared at the Faculty of chemistry VUT. Samples with different concentrations of the dispersed PHB (1 %, 5 % and 10 %) in the polyurethane were also object of the study. At the end of the cultivation (after 2 months) were measured mechanical properties in tension of the material, then efficiency of biodegradation by gravimetric analysis and modification of the material surface by microscopic analysis.

Keywords:

Biodegradation, polyesters, PHA, PHB, PU-PHB, *Delftia acidovorans*, *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus fumigatus*

WURSTOVÁ, A. *Studium biodegradace polyhydroxyalkanoátů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 110 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat mému vedoucímu diplomové práce Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D. a Ing. Pavle Benešové za všestrannou pomoc a rady při práci v laboratoři. Dále také paní doc. RNDr. Ivaně Márové Csc. za inspiraci a přívětivý přístup.

Obsah

Obsah.....	9
1 Úvod.....	11
2 Teoretická část	12
2.1 Polyestery	12
2.1.1 PHA – polyestery mikrobiálního původu.....	13
2.1.2 Struktura a vlastnosti PHA.....	14
2.1.3 Biosyntéza PHA	14
2.1.4 Využití PHA.....	16
2.2 Biodegradace	17
2.2.1 Abiotické vlivy při biodegradaci.....	18
2.2.2 Biologické znehodnocení	19
2.2.3 Depolymerizace.....	20
2.2.4 Asimilace.....	21
2.2.5 Metody zjišťování biodegradační účinnosti	21
2.3 Biodegradace PHB	22
2.3.1 Extracelulární a intracelulární biodegradace PHB	22
2.3.2 PHA _{SCL} depolymerázy	22
2.3.3 Metody pro zjišťování aktivity PHB depolymerázy	23
2.3.4 Metody kultivace mikroorganismů pro produkci PHB depolymeráz	24
2.3.5 Submerzní kultivace	24
2.3.6 Polosuchá kultivace.....	25
2.3.7 Povrchová kultivace	25
2.4 Bakterie <i>Delftia acidovorans</i>	25
2.5 Kvasinka <i>Aureobasidium pullulans</i>	26
2.6 Plíseň <i>Aspergillus fumigatus</i>	27
3 Cíl práce.....	29
4 Experimentální část.....	30
4.1 Použité chemikálie, přístroje, bakteriální kultury a typy PHB	30
4.1.1 Kultury mikroorganismů	30
4.1.2 Typy PHB.....	30
4.1.3 Přístroje	30
4.2 Příprava PHB materiálů.....	30
4.2.1 Příprava krystalických PHB granulí.....	31
4.2.2 Příprava PHB fólie	31
4.2.3 Příprava PHB tvrzené fólie	31
4.2.4 Příprava Nanoul textilie	31
4.2.5 Příprava kopolymeru PU-PHB.....	31
4.3 Submerzní kultivace za použití vybraných druhů mikroorganismů	31
4.3.1 Submerzní kultivace bakterie <i>Delftia acidovorans</i>	31
4.3.2 Submerzní kultivace kvasinky <i>Aureobasidium pullulans</i>	32
4.3.3 Submerzní kultivace plísně <i>Aspergillus fumigatus</i>	33
4.4 Stanovení enzymové aktivity pomocí měření úbytku hmotnosti	34
4.5 Spektrofotometrické stanovení enzymové aktivity	34
4.5.1 Metoda stanovení enzymové aktivity I	34

4.5.2	Metoda stanovení enzymové aktivity II	35
4.6	Charakterizace extracelulárních enzymů pomocí SDS-PAGE	35
4.6.1	Ultrafiltrace vzorků obsahující extracelulární depolymerázu	36
4.6.2	Vertikální SDS-PAGE elektroforéza Laemmli	36
4.7	Stanovení molekulové hmotnosti použitých PHB materiálů	39
4.8	Biodegradace pomocí simulace kompostovacích podmínek	39
4.8.1	Použité druhy PHB pro testování biodegradability	39
4.8.2	Podmínky experimentu	40
4.8.3	Experiment – termofilní inkubace	42
4.8.4	Stanovení počtu kultur v kompostu	43
4.9	Studium změn mechanických vlastností PU-PHB v průběhu kultivace	44
5	Výsledky	45
5.1	Biodegradace PHB pomocí kultivace bakterie <i>Delftia acidovorans</i>	45
5.1.1	Zavedení testu stanovení enzymové aktivity PHB depolymerázy	45
5.1.2	Stanovení enzymové aktivity PHB depolymerázy v průběhu kultivace bakterie <i>D. acidovorans</i>	47
5.1.2	Stanovení hmotnostního úbytku PHB	50
5.1.3	Diskuse výsledků enzymové aktivity bakterie <i>Delftia acidovorans</i>	51
5.2	Biodegradace PHB pomocí kultivace kvasinky <i>Aureobasidium pullulans</i>	53
5.2.1	Zavedení testu stanovení enzymové aktivity PHB depolymerázy	53
5.2.2	Stanovení enzymové aktivity PHB depolymerázy v průběhu kultivace kvasinky <i>A. pullulans</i>	56
5.2.3	Stanovení hmotnostního úbytku PHB	58
5.2.4	Diskuse výsledků enzymové aktivity kvasinky <i>Aureobasidium pullulans</i> ...	60
5.3	Biodegradace PHB pomocí kultivace plísně <i>Aspergillus fumigatus</i>	61
5.3.1	Zavedení testu stanovení enzymové aktivity PHB depolymerázy	61
5.3.2	Stanovení enzymové aktivity PHB depolymerázy v průběhu kultivace plísně <i>A. fumigatus</i>	64
5.3.3	Stanovení hmotnostního úbytku PHB	65
5.3.4	Diskuse výsledků enzymové aktivity plísně <i>Aspergillus fumigatus</i>	66
5.4	Vizualizace extracelulárních enzymů pomocí SDS-PAGE	68
5.5	Biodegradace za simulovaných podmínek kompostovacího procesu	70
5.5.1	Biodegradace PHB fólie	71
5.5.2	Biodegradace PHB tvrzené fólie	73
5.5.3	Biodegradace PHB Nanoul textilie	75
5.5.4	Izolace bakteriálních kultur z kompostu	77
5.5.5	Diskuse výsledků biodegradace PHB simulací kompostovacího procesu	80
5.5.6	Biodegradace kopolymeru PU-PHB	81
5.6	Stanovení mechanických vlastností PU-PHB v tahu	91
5.7	Diskuze k výsledkům biodegradace PU-PHB	98
6	Závěr	100
7	Seznam použitých zkratk	102
8	Literatura	103

1 Úvod

Na celém světě se každý rok vyrobí přibližně 140 milionů tun syntetických polymerů, které jsou extrémně stabilní a perzistentní, nelze je účinně degradovat a hromadí se v ekosystému. [1; 2] Tyto materiály jsou vyráběné z petrochemických zdrojů a vykazují vynikající mechanické, chemické a fyzikální vlastnosti. Dále jim jejich struktura umožňuje dosáhnout široké škály úprav, co se týče síly, elasticity a tvarů. Proto také našly využití téměř ve všech oblastech lidské činnosti, jako jsou různé oblasti průmyslu, zemědělství, medicíny, životního prostředí, atd. Nicméně mnoho syntetických polymerů se používá pouze na krátkodobé aplikace, jako jsou obalové materiály, komoditní a hygienické výrobky, čisticí prostředky a chemikálie, z čehož zhruba 30 % všech plastů jsou používány jako obalový materiál. Z tohoto hojného využívání syntetických polymerů vyplývá nevýhoda v hromadění odpadů těchto plastů. Je velmi obtížné snížit spotřebu plastových výrobků vzhledem k jejich všestranným vlastnostem, jedinou možností je buďto recyklace či spalování, které je ale značně nákladné a nebezpečné, co se týče uvolňování škodlivých látek do prostředí, jako chlorovodík či kyanovodík. Dalším řešením je možnost náhrady syntetických plastů alternativními polymerními materiály, které mají podobné vlastnosti, a které jsou biodegradovatelné. [3; 4; 5]

Takovouto alternativou jsou mikrobiální polyestery, jejichž nejprozkoumanějším odvětvím jsou polyhydroxyalkanoáty, které jsou zcela biosyntetické, biodegradovatelné a netoxické a dají se vyrobit z obnovitelných zdrojů. Mikrobiální polyestery jsou vyráběny velkou škálou různých mikroorganismů jako intracelulární zásoba uhlíku a energie. PHA jsou skupinou polyesterů s více než 150 různými typy monomerů, které pak poskytují různé vlastnosti a funkce. PHA dokážou být degradovány mikrobiologicky aktivním prostředím, jako je kompost, půda, komunální odpad či skládky. Jelikož mikroorganismy dokážou vylučovat depolymerázy, které hydrolyzují esterové vazby v polymeru pro produkci monomerů a oligomerů, které jsou dále metabolizovány na vodu a oxid uhličitý. Nevýhodou těchto polymerů je jejich vysoká výrobní cena, která je v porovnání se syntetickými plasty mnohem vyšší. [3; 4; 2]

Cílem práce je studium biodegradability PHB, neboli polyhydroxybutyrátu pomocí vybraných druhů mikroorganismů z řad bakterií, kvasinek a plísní, kdy jako jediný zdroj uhlíku byl poskytnut PHB materiál. Druhou částí práce bylo studium biodegradability PHB pomocí simulace komponovacího procesu za přítomnosti mikroorganismů přirozeně se vyskytujících v půdě při termofilních podmínkách.

2 Teoretická část

2.1 Polyestery

Alifatické polyestery patří mezi důležité, biokompatibilní a biodegradabilní materiály, kterým se v posledních letech dostává náležité pozornosti. Současné výzkumné činnosti jsou u alifatických polyesterů zaměřeny spíše na syntézu a charakterizaci, dále také na vývoj polymerů o ideálních vlastnostech. [6]

Díky jejich netoxickým, dobrým izolačním vlastnostem a dobré termoplasticitě jsou valně využívány v různých oblastech, jako jsou např. izolační materiály, tmely, nátěrové hmoty či adheziva. [6]

Polyestery jsou polymery, ve kterých jsou monomerní jednotky spojené esterovou vazbou, která je relativně snadno enzymaticky hydrolyzovatelná. Enzymy, které jsou schopny hydrolyzovat esterovou vazbu, se nazývají esterázy. [1]

Alifatické polyestery jsou syntetizovány buďto pomocí chemické syntézy, tedy nejčastěji polykondenzace nebo pomocí bakteriální fermentace a následné produkce polymeru daným bakteriálním druhem.

U chemické struktury polyesterů je charakteristickým znakem přítomnost esterové skupiny v řetězci. Polyestery mohou být rozděleny do čtyř skupin na základě jejich výskytu nebo metody přípravy.

- a) Přirozeně se vyskytující polyestery – rostlinný kutin (voskový polymer) nebo šelak (pryskyřice obsahující směs monoesterů)
- b) Mikrobiální polyestery – polymery, známé pod pojmem PHA, tedy polyhydroxyalkanoáty, které používá buňka jako zdroj energie a zásobárnu uhlíku, hromadí se v buňce intracelulárně za nepříznivých podmínek
- c) Kondenzované polyestery – polyestery připravené polykondenzací
- d) Polyestery syntetizované pomocí otevírání kruhu cyklického monomeru (ROP – v angličtině ring-opening polymerization) – např. polymery β -butyrolaktonu či δ -valerolaktonu [6]

Biodegradabilita alifatických polyesterů závisí na základním řetězci polyesteru, opakující se jednotce, složení a sekvenci, morfologii a přítomnosti dalších aditiv. [6; 5; 7] Většina studií je zaměřena na biodegradaci simulujících podmínek v lidském těle, kdy se předpokládá biodegradace jednoduchou hydrolýzou ovlivněnou přítomností enzymů a iontů. [6] Další výzkum biodegradace polyesterů je zaměřen na vlhkou půdu [8; 9; 10; 11; 2; 12] či sladkou [13; 2; 12; 5; 14] nebo slanou vodu. [2; 12; 5; 14]

Díky možnosti biodegradace alifatických polyesterů jsou tyto materiály používány v mnoha odvětvích, jimiž nejzákladnějšími jsou biomedicínské aplikace, kdy se polyestery na bázi kyseliny mléčné používají jako biologicky resorbovatelné chirurgické stehy, protézy, kostní šrouby či zubní implantáty, nebo také jako obalový materiál pro kontrolované uvolňování léčiv, atd. Další stále se rozvíjející odvětví je výzkum ekologických polymerů, které by mohly najít uplatnění i v potravinářském průmyslu jako obalové materiály či materiály pro každodenní použití ve formě např. nákupních tašek. [12; 5; 3; 15]

I přes rozsáhlé studie biosyntézy, fyzikálních vlastností, biodegradace je limitujícím faktorem polyesterů jejich cena, což se negativně odráží v jejich použití v praktických aplikacích. [6; 16; 17; 15; 4]

2.1.1 PHA – polyestery mikrobiálního původu

Mikrobiální polyestery vyvolaly velký zájem hlavně díky možnosti biologické degradace a biokompatibilitě. Polyestery vznikají činností bakterií, které jsou schopny při zhoršených podmínkách produkovat polyestery jako zásobu uhlíku a energie. [16; 1; 14; 18; 7] Mezi nejvíce studované alifatické polyestery patří bezesporu polyhydroxyalkanoáty (PHA).

PHA jsou polyestery různých hydroxyalkanoátů, které mohou být syntetizovány mnoha gram-pozitivními i gram-negativními bakteriemi, z nichž je známo na více než 75 druhů. Hlavní výhodou PHA je ochrana životního prostředí, jelikož dokážou být rychle biodegradovány za aerobních i anaerobních podmínek. [5; 17; 15; 14] Jak již bylo řečeno, PHA jsou rozsáhlou škálou opticky aktivních biologických polyesterů obsahujících (R)-3HA monomerní jednotky. Všechny 3-hydroxyl alkanové kyseliny jsou v konfiguraci R, díky stereospecifitě PHA syntézy, což je enzym katalyzující polymeraci PHA. [12; 7] PHA jsou přírodní biologicky rozložitelné termoplasty, které jsou syntetizovány a kumulovány intracelulárně a při stresových podmínkách mohou dosahovat až 90 % hmotnosti v sušině, jakožto zásobu uhlíku a energie. [5; 17; 15; 14; 19] Již bylo identifikováno více než 150 různých monomerních jednotek a PHA, což vytváří možnosti pro výrobu různých biologicky odbouratelných polymerů s velkým rozsahem odlišných vlastností. [5; 16; 15; 20] Nejznámější člen PHA je polyhydroxybutyrát P(3HB), kdy se v polymerním řetězci opakují monomerní jednotky 3-hydroxybutyrátu (R)-3HB. Monomery jsou polymerizovány v závislosti na mikroorganismu a růstových podmínkách do vysokomolekulárních polymerů s molekulovou hmotností v rozmezí od 200 – 3 000 kDa, mohou nastat ale i případy, kdy se pomocí rekombinantního kmene *E. coli* získávají i PHB o molekulové hmotnosti až 20 000 kDa. [12; 21] Další často studované PHA jsou kopolymer [P(3HB-3HV)], neboli kopolymer 3HB s 3-hydroxyvalerátem 3HV. [12; 16; 15]

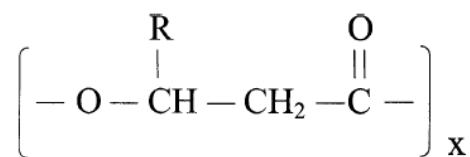
PHA se tvoří v buňce jako samostatné částice obvykle s průměrem okolo 0,2 – 0,5 µm lokalizované v cytoplasmě a bývají jasně viditelné světelným i elektronovým mikroskopem.

PHA jsou produkovány ze široké škály substrátů, jako jsou např. obnovitelné zdroje (škrob, sacharóza, celulóza, triacylglyceroly) nebo fosilní zdroje (metan, minerální olej, hnědé uhlí, černé uhlí) či vedlejší produkty potravinářského průmyslu (melasa, syrovátka, glycerol) nebo také chemikálie (kyselina propionová, 4-hydroxy máselná) atd. [5; 14]

Existuje mnoho typů monomerních složek PHA, které bývají rozděleny do dvou skupin, a to na přírodního a nepřírodního původu. Přírodní PHA se vyskytují nahromaděné v mikroorganismech nalezených v environmentálním prostředí. Jako nejčastějším typem přírodních PHA je PHB, proto se často obecný název PHA odkazuje čistě na mikrobiální polymer PHB. Pátrání po nových PHA s unikátními vlastnostmi materiálu má za následek tvorby PHA nepřírodního původu, které jsou produkovány mikroorganismy v laboratoři za pomoci specifických chemických látek jako krmného substrátu. [20]

Jak již bylo zmíněno, hlavním negativem polyhydroxyalkanoátů je jejich vysoká cena, z tohoto důvodu jsou často syntetizovány kopolymery buďto obsahující hydroxyalkanoátové monomerní jednotky jiné, než (R)-3HB nebo mísením P3HB s jinými polymery. [16; 6; 17; 1; 15; 4; 7]

2.1.2 Struktura a vlastnosti PHA



Obr. 1: Obecná struktura PHA [5, 7]

PHA jsou netoxické, biokompatibilní a biologicky odbouratelné termoplasty, které mohou být vyrobeny z obnovitelných zdrojů. Mají vysoký stupeň polymerace, jsou vysoce krystalické, opticky aktivní, izotaktické a nerozpustné ve vodě. Dále disponují piezoelektrickými vlastnostmi. [12; 19; 3; 15]

Podle počtu uhlíků obsažených v monomeru se PHA rozdělují do dvou skupin, a to PHA_{SCL} (small chain-length), který obsahuje řetězec o 3-5 atomech uhlíku v monomeru a PHA_{MCL} (medium chain-length), který obsahuje 6 - 18 atomů uhlíku. [20] Co se tedy týče PHB, patří do skupiny PHA_{SCL}, jelikož ve své monomerní struktuře obsahuje 4 uhlíky.

PHB izolované z bakterií mají 55-80 % krystalinity, molekuly uvnitř bakterie jsou amorfni a existují jako ve vodě nerozpustné částice. [12; 22]

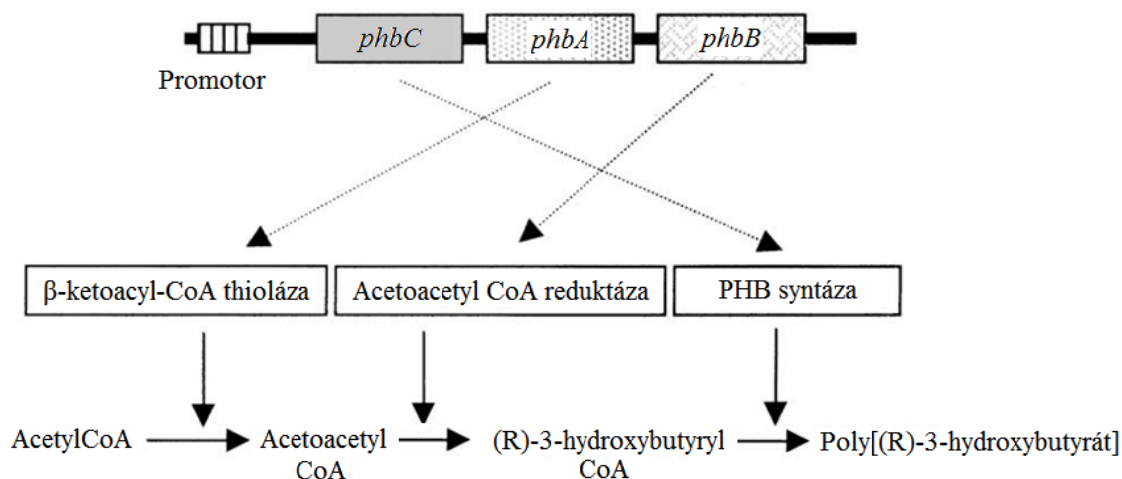
Co se týče fyzikálních vlastností, teplota skelného přechodu PHB je okolo 4 °C, teplota tání je kolem 180 °C. Hustota krystalické formy PHB je 1,26 g/cm³, u formy amorfni je to 1,18 g/cm³. [12; 7]

Mechanické vlastnosti, jako Youngův modul pružnosti v tahu (poměr napětí a jím vyvolané deformace) je 3,5 GPa, pevnost v tahu 43 MPa, což naznačuje že PHB materiály jsou svými mechanickými vlastnostmi podobné polypropylenu (PP), PHB je ale tužší a křehčí než PP (roztlačnost PHB je 5 % u polypropylenu je to až 400 %). [12; 5; 19; 22; 18] Z důvodu křehkosti PHB je kladen důraz na vylepšování jeho fyzikálních vlastností mnoha způsoby jako jsou např. biosyntéza PHA za pomoci rekombinačních mikroorganismů, nejčastěji *E.coli* nebo syntéza kopolymerů, jako je např. [P(3HB-3HV)]. [12; 21; 5; 23]

2.1.3 Biosyntéza PHA

2.1.3.1 Přírodní produkce PHA

Příroda vyvinula několik různých cest ke vzniku PHA. Genetické studie potvrdili, že regulace tvorby PHA v buňce souvisí s podmínkami růstu bakterie. Biosyntetická dráha PHB se skládá ze tří enzymatických reakcí katalyzované třemi různými enzymy, viz obr. 2. První reakce se skládá z kondenzace dvou molekul acetylkoenzymu A (acetyl-CoA) při tvorbě acetoacetylkoenzymu A pomocí enzymu β -ketoacyl-CoA thiolázy kódované genem *phbA*. Druhá reakce je redukce acetoacetyl-CoA na monomerní jednotky (R)-3-hydroxybutyryl-CoA za pomoci NADPH dependentní acetoacetyl-CoA dehydrogenázy kódované genem *phbB*. Třetí reakcí je polymerizace monomerních jednotek (acyl-CoA) na PHB pomocí P(3HB) polymerázy (PHB syntázy), kódované genem označovaným jako *phbC*. [5]



Obr. 2: Schéma přírodní biosyntézy PHA [5]

2.1.3.2 Produkce PHA rekombinantní bakterií

Některé bakterie přirozeně produkující PHA mají spoustu nevýhod, co se týče dlouhé generační doby či relativně nízkého teplotního optima pro růst, špatně lyzují a disponují enzymy k degradaci PHA. Naopak bakterie, jakou je např. *E. coli*, která sice není schopna syntézy PHA, má ale schopnost rychlého růstu, a to i při vyšší teplotě, což ji umožní akumulovat velké množství polymeru. Navíc je snadno lyzovatelná, což šetří náklady na čištění PHA granulí. Proto je kladen velký důraz na intenzivní zkoumání nových metabolických cest a rozšiřování možností k využitelnosti nových substrátů, aby došlo k co největšímu navýšení syntézy PHA či produkci nových typů PHA. [5] Pro vysokou produktivitu PHA byly přeneseny vysoce stabilní plazmidy obsahující geny nutné pro biosyntézu PHA z *Alcaligenes eutrophus* do *E. coli*. Vzhledem k tomu, že je *E. coli* schopna využít různé zdroje uhlíku včetně glukózy, sacharózy, laktózy či xylózy, je možné snížit náklady i na použitím substrátu, který může být např. melasa, syrovátka či hemicelulózové hydrolyzáty. Tato strategie může být samozřejmě rozšířena na téměř jakékoliv bakterie, které by produkci PHA mohli vylepšit. [5; 21; 24] Dále jsou používány dva přístupy k vývoji rekombinačních kmenů produkujících PHA. Prvním je zavedení genu pro využívání levných substrátů do kmenů, které již dokážou syntetizovat PHA, druhou variantou je zavedení biosyntetických genů do kmenů, které PHA syntetizovat nedokážou. V současné době převládá možnost druhá. [5]

2.1.3.3 Produkce PHA geneticky modifikovanými rostlinami

Plodiny jsou schopny produkovat velké množství užitečných chemických látek při nákladech výrazně nižších, než je tomu u bakterií nebo kvasinek. Pro produkci PHA pomocí rostlin je nutné vytvoření takové transgenní plodiny, která vedle vysokých výtěžků bude mít normální rostlinné fenotypy stabilní po několik generací. Výroba PHA pomocí modifikovaných plodin by umožnila syntézu biologických plastů v milionovém tonážním měřítku ve srovnání s postupy mikrobiální biotechnologie, které umožňují syntézu v tisíci tunovém měřítku. Na rozdíl od bakterií jsou rostlinné buňky vysoce členěné, musí proto být geny zodpovědné za syntézu PHA zavedeny tam, kde je vysoká koncentrace acetyl-CoA. Za dobré plodiny schopné biosyntézy PHA jsou považovány olejniné, jako je řepka, slunečnice

či sójové boby. [5] Nicméně doposud se nepodařilo připravit transgenní rostliny schopné ekonomicky rentabilní produkce PHA.

2.1.4 Využití PHA

Vzhledem ke svým vynikajícím mechanickým a tepelným vlastnostem našly PHA polymery široké spektrum aplikací, které lze zaměřit na tři hlavní oblasti, a to medicínské aplikace, zemědělské aplikace a balení spotřebního zboží. [7; 15; 4]

2.1.4.1 Medicínské aplikace

V poslední době se termín biomateriál definuje jako neživotaschopný materiál používaný v medicínských aplikacích, který je určen k interakci s biologickým systémem. Důležitá je ale také jeho biokompatibilita, která určuje, jak bude tkáň na tento materiál reagovat. [7]

Vývoj biologicky rozložitelných plastů byl zaměřen, co se týče medicínských aplikací na:

- a) Náhradu nefunkční či nemocné tkáně (kloubní náhrady, umělé srdeční chlopně a cévy, rekonstrukce zubů, náhrady oční čočky atd.) [7; 5; 6]
- b) Pomocný materiál pro opravu tkáně (stehy, desky pro fraktury kostí, materiál pro opravu šlach a vazů atd.) [7; 5; 6]
- c) Náhrada funkcí hlavních orgánů (hemodialýza – ledviny, kyslíková bilance – plíce, komory srdce, perfuze – játra atd.) [7; 5; 6]
- d) Dodávka léčiv do těla, buďto přímo na místo určení (tzv. targeted delivery) nebo řízené uvolňování (tzv. controlled release) [7; 5; 6]

2.1.4.2 Zemědělské aplikace

Biodegradabilní materiály jsou v současné době používány v aplikacích, které zahrnují řízené uvolňování pesticidů či živin, dále na gelové výsadby, potahy semen a také na ochranu rostlin. [7; 5] Velkému zájmu se dostává biodegradabilním polymerům v problematice zemědělských hnojiv a nádob pro pěstování rostlin.

Použití mulčovacích fólií a plastových nádob může pomoci pěstitelům s růstem a množením rostlin, jelikož díky degradaci materiálu v půdě se výrazně sníží náklady na odstraňování těchto materiálů. Dále jsou plastové fólie a nádoby ideální k zachování vlhkosti, zvýšení teploty půdy, čímž se zrychluje růst rostlin a dalším pozitivem je také zabránění rozšiřování plevelů a sekundárnímu poškození rostlin. Následné odstraňování materiálu a jeho likvidace je značně pracná, což při použití biodegradabilního plastu odpadá. [7]

Dalším odvětvím použití biodegradabilních polymerů v zemědělství je pro řízené uvolňování biologicky aktivních chemických látek k cílovému druhu rostliny a tento polymer pak slouží k řízení rychlosti dodání a dobu účinnosti chemické látky. Hlavní výhodou je možnost použití menšího množství chemikálií a tím i snížení vlivu na ostatní druhy rostlin, omezení jejich vypařování či degradaci atd. Polymerní systémy s řízeným uvolňováním lze rozdělit do dvou skupin, a to buďto dispergací, rozpuštěním či zapouzdřením chemické látky do polymeru. K uvolňování pak dochází pomocí difuze či pomocí biologického nebo chemického porušení materiálu. V druhém případě polymery obsahují účinnou látku v rámci své struktury, tedy buďto přímo v řetězci, či na postranním řetězci polymeru. K uvolnění pak dochází pomocí biologického či chemického štěpení vazeb polymerového materiálu. [7] Tento typ aplikace byl konkrétně studován při řízeném uvolňování herbicidu ametrynu v PHB. [25]

2.1.4.3 *Obalový materiál*

Fyzikální vlastnosti obalových polymerů jsou značně ovlivněny chemickou strukturou, molekulární hmotností, stupněm krystalinity a podmínkami zpracování těchto polymerů. Fyzikální vlastnosti požadované k balení závisí hlavně na baleném předmětu a na prostředí, ve kterém bude předmět skladován. Hlavním cílem ve vývoji biologicky rozložitelných obalů je tedy ideální kombinace polymerů s ideálními vlastnostmi pro konkrétní obalovaný předmět či potravinu. V potravinářství to může být například potahování potravin pullulanem, který je jedlý a má velmi nízkou propustnost pro kyslík a jako vnější obal využít např. P(3HB-3HV), který má dobrou pružnost a je výbornou bariérou co se týče vlhkosti. [7; 26; 27; 30]

2.2 **Biodegradace**

Jsou známy tři typy biologicky odbouratelných plastů, a to fotodegradovatelné, semi-biodegradovatelné a zcela biodegradovatelné materiály. Fotodegradovatelné plasty mají ve své struktuře začleněny fotoreaktivní skupiny citlivé na světlo, kde se pomocí ultrafialového světla v rozmezí týdnů až měsíců rozpadají polymerní struktury, které mohou být dále degradovány přítomnými mikroorganismy. K semi-biodegradovatelným plastům se řadí takové, které mají ve své struktuře zakomponovány části plně biodegradovatelného materiálu např. škrobu, kdy bakterie primárně biodegradují v kopolymeru škrob a uvolní tak fragmenty materiálu, který již zůstává nerozložitelný. Třetím případem jsou zcela biodegradovatelné polymery, mezi něž se řadí polysacharidy, alifatické polyestery, polyhydroxyalkanoáty, či jejich kopolymery a mnoho dalších. [5]

Biodegradace je přírodní složitý a komplexní jev. Je definována jako rozklad látek působením mikroorganismů, což vede k recyklaci uhlíku z organických sloučenin, takzvanou mineralizací na CO_2 , H_2O a soli. Samotná biodegradace je ale komplikovaný proces zahrnující několik kroků, kde se může proces zastavit v jakékoliv fázi. Termín biodegradace navozuje, že by měla převažovat biologická činnost, nicméně ale v přírodě k rozkladu organické hmoty spolu biotické a abiotické faktory působí synergicky. Proto je velmi obtížné tyto podmínky realizovat v laboratoři, kvůli obrovskému množství parametrů, které na materiál působí a dají se jen předvídat. Nicméně je nutné schopnost biologické rozložitelnosti aspoň co nejlépe odhadnout. [28; 29; 4; 7]

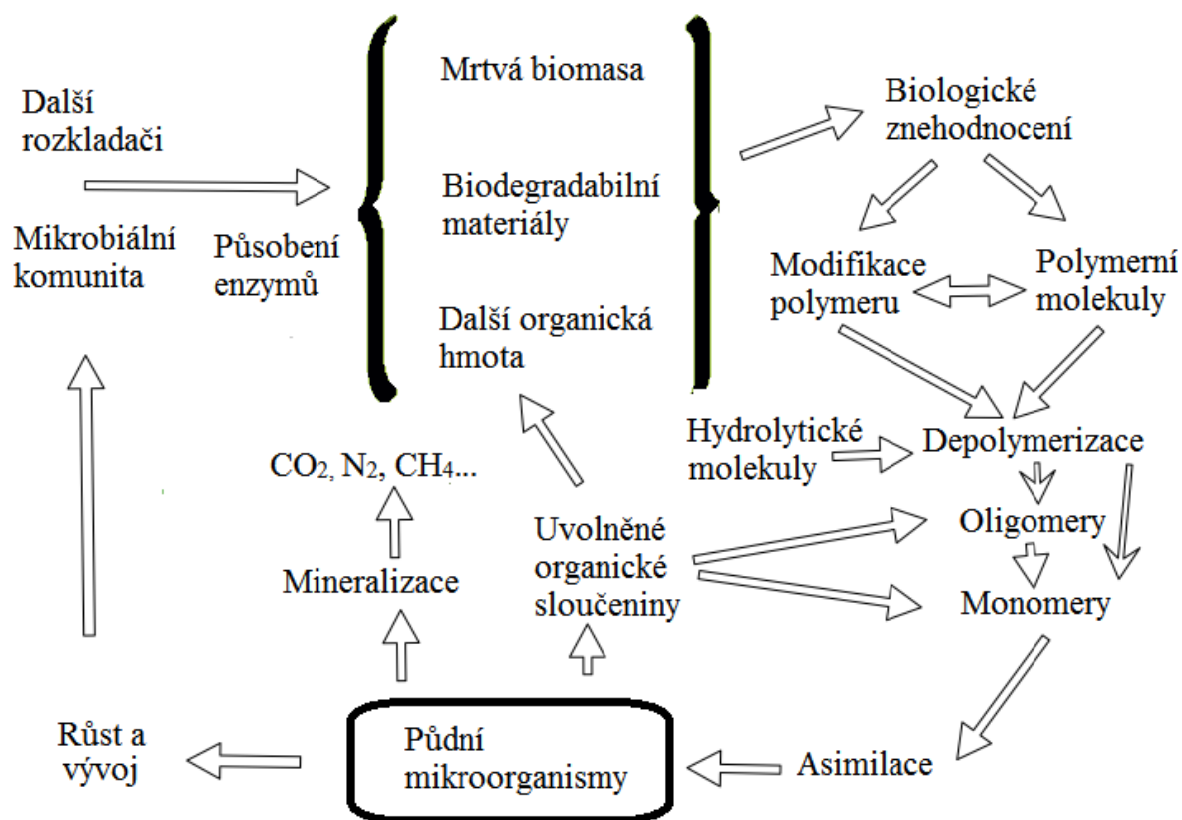
Prvním krokem biodegradace je tzv. biologické znehodnocení, což je kombinovaný účinek mikrobiálních kultur a abiotických faktorů, kdy se ze studovaného materiálu odštěpují malé částičky. [28; 2]

Dalším krokem je depolymerizace, kdy působením katalytických prostředků vylučovaných mikroorganismy, jako jsou enzymy a volné radikály, které dokážou štěpit polymerní molekuly a snižují tak jejich molekulovou hmotnost. Tento proces vede ke vzniku oligomerů a monomerů. [28; 2]

Třetím krokem biodegradace je tzv. asimilace, kdy jsou některé molekuly materiálu rozpoznány receptory mikrobiálních buněk a mohou tak přejít přes buněčné obaly a plazmatickou membránu. V cytoplasmě se transportované molekuly začlení do mikrobiálního metabolismu, ze kterých pak buňka získává buďto energii, nebo je schopna produkce nové biomasy či kumuluje primární nebo sekundární metabolity. Ostatní molekuly materiálu zůstávají v extracelulárním prostoru a mohou být jinak modifikovány. [28; 2; 12]

Posledním krokem je fáze mineralizace, kdy některé jednoduché či komplexní metabolity mohou být vyloučeny zpět do extracelulárního prostoru (často to bývají aldehydy, terpeny,

antibiotika, atd.). Jednoduché molekuly jako CO_2 , N_2 , CH_4 , H_2O a různé soli, vzniklé metabolismem buňky jsou uvolněny do prostředí. [28; 2; 4]



Obr. 3: Schéma biodegradace polymeru [7]

2.2.1 Abiotické vlivy při biodegradaci

Polymerní materiály, jež jsou vystaveny venkovním podmínkám, jsou podrobovány transformacím, jejichž expozicí se mění jejich biodegradabilita. Ve většině případů abiotické parametry přispívají k oslabení polymerní struktury a napomáhají tak samotné biodegradaci. Tyto parametry slouží buďto synergicky s biotickými vlivy nebo jako iniciace biodegradčního procesu. Pro dobrý odhad trvanlivosti a schopnosti biodegradace je nutné tyto abiotické vlivy taktéž zahrnout do celkového biodegradčního procesu. [28; 2; 29; 4]

2.2.1.1 Mechanická degradace

K mechanické degradaci může dojít při expozici materiálu tlaku, tahu, či smykovým silám. Často na makroskopické úrovni nemusí být mechanická degradace znát, stačí ale, aby se projevila na úrovni molekulární. Mechanické faktory jako zástupce abiotických vlivů při biodegradaci nepřevládají, mohou jí ale iniciovat, či urychlit. V polních podmínkách je mechanické namáhání materiálu většinou v souladu s ostatními abiotickými parametry, jako jsou teplota, sluneční záření nebo expozice materiálu chemickým látkám. [28]

2.2.1.2 Fotodegradace

Pokud je materiál rozložitelný pomocí světla, hovoří se o tomto materiálu, jako o fotosenzibilním. Energie fotonů slunečního záření tak může vytvářet nestabilitu různých molekul v materiálu. Přenos energie může být uskutečněn fotoionizací, luminiscencí, fluorescencí či tepelným zářením. Kvůli této schopnosti biodegradace jsou často fotosenzibilní molekulární struktury přidávány do materiálu záměrně, např. kopolymerací, kdy tuto strategii používají výrobci polyolefinů ke zvýšení degradace plastových obalů a tašek. [28; 31; 32] V abiotické degradaci je působení světelného záření jedním z nejdůležitějších faktorů. [28; 2; 29]

2.2.1.3 Teplotní degradace

Tepelná degradace termoplastických polymerů nastává při teplotě tání, kdy se z pevného polymeru stává polymer kapalný. Tato hodnota teploty je samozřejmě závislá na molekulární hmotnosti polymeru. Obecně ale platí, že je okolní teplota nižší, než teplota tání materiálu. Teplota také může ovlivnit uspořádání polymerního řetězce. Např. u semikrystalických polymerů mohou nabývat při různých teplotách buďto krystalické či amorfni struktury. Tyto strukturální změny probíhají při teplotách skelného přechodu T_g , nad touto teplotou je materiál elastický a usnadňuje chemickou a biologickou degradaci, pod teplotou T_g je materiál velmi křehký. [28; 2; 29]

2.2.1.4 Chemická degradace

Chemická přeměna je dalším z důležitých abiotických faktorů při degradaci materiálu. Nejčastějšími látkami jsou atmosférické polutanty a agrochemikálie. Asi nejsilnější chemikálií navozující degradaci polymerů je kyslík. Atmosférické formy kyslíku, tedy O_2 a O_3 napadá kovalentní vazby, vznikají tak volné radikály. Míra oxidační degradace závisí na struktuře polymeru. Tato oxidace může synergicky spolupracovat na produkci volných radikálů se světelnou degradací. [28; 2]

Dalším způsobem chemické degradace je hydrolýza. Pro uskutečnění degradace pomocí hydrolýzy musí mít studovaný polymer ve své struktuře ester, éter, anhydrid, amid atd. Parametry nutné ke správné degradaci jsou optimální vodní aktivita, teplota a pH. Materiál, který je amorfni má vyšší náchylnost k oxidační a hydrolytické degradaci, naopak u krystalických materiálů s dobře organizovanou strukturou tyto struktury zabraňují šíření O_2 a H_2O a tak značně omezují chemickou degradaci. [28; 2; 12]

2.2.2 Biologické znehodnocení

Biologické znehodnocení je povrchová degradace upravující mechanické, fyzikální a chemické vlastnosti daného materiálu. Biologické znehodnocení je především výsledek činnosti mikroorganismů rostoucích na povrchu či uvnitř daného materiálu. Mikroorganismy degradují materiál mechanicky nebo chemicky, či především pomocí enzymů. Mikrobiální zastoupení a růst závisí na vlastnostech materiálu a na konkrétních podmínkách prostředí. Mikroorganismy podílející se na biologickém znehodnocení jsou velmi různorodé od bakterií, kvasinek a plísní přes prvoky nebo také řasy. Často se shlukují a vytváří tak strukturu zvanou biofilm, který zvyšuje biologické znehodnocení materiálu. [28; 29; 2]

2.2.2.1 Fyzikální změny

Mikrobiální druhy mohou přilnout k povrchu materiálu pomocí sekrece adheziva, což je komplexní matice z polymerů na bázi polysacharidů a proteinů, která mění velikost a rozdělení pórů a mění tak stupeň vlhkosti a teplotní přenos v materiálu. Odolnost a trvanlivost materiálu jsou tedy oslabeny. Funkcí tohoto adheziva je primárně ochrana mikroorganismů proti nepříznivým vlivům prostředí. Vláknité mikroorganismy tvoří za nepříznivých podmínek mycelia. [28; 2]

2.2.2.2 Chemické změny

Každý druh mikroorganismu přispívá k celkovému chemickému znehodnocení materiálu. Některé mikroorganismy používají k degradaci anorganické sloučeniny jako amoniak, dusitany, sirovodík, thiosířany, nebo uvolňují chemikálie jako kyselina dusičná, kyselina sírová. Chemoorganotrofní mikroorganismy uvolňují organické kyseliny jako kyselinu jantarovou, šťavelovou, citronovou, glukonovou, glutarovou, fumarovou, adipovou, mléčnou, atd. Tyto kyseliny mají různé způsoby účinku. Některé reagují se součástmi materiálu a zvyšují tak narušení povrchu, další mohou vázat kationty z matrice za vzniku stabilních komplexů, všeobecně jsou pro tvorbu komplexů účinnější organické kyseliny, než kyseliny minerální, neboli anorganické. [28] Některé mikroorganismy jsou schopny využívat tyto kyseliny jako zdroj uhlíku, aby byly schopny rozšířit micelární komplexy. [28; 33]

2.2.2.3 Enzymatické změny

Některé obtížně rozložitelné polymery, jako např. polyuretan, polyvinylchlorid nebo polyamid jsou předmětem mikrobiálního enzymatického biologického znehodnocení, pravděpodobně příčinou lipáz, esteráz, ureáz a proteáz. Enzymy podílející se na biologickém znehodnocení ale vyžadují přítomnost kofaktorů pro degradaci specifických vazeb. [28; 2; 29; 12]

Biologické znehodnocení probíhá dvěma různými mechanismy, a to buďto celkovým, či povrchovým narušením. V případě celkového narušení jsou fragmenty materiálu degradovány v celém objemu polymeru a molekulární hmotnost se mění v závislosti na množství rozštěpených vazeb. Tato lýza je iniciována chemickými sloučeninami jako jsou voda, různé kyseliny a zásady, či záření, nikoli však enzymy, jelikož jsou příliš velké k proniknutí do struktury polymeru. V případě narušení povrchového je také pozorovatelný úbytek hmotnosti, ale molekulární hmotnost matrice není výrazně změněna. Jestli je difuze chemikálií v materiálu rychlejší než štěpení vazeb polymeru, jde o celkové narušení, pokud se štěpí vazby rychleji, než difundují chemické látky do materiálu, jedná se o povrchové znehodnocení. [28; 34]

2.2.3 Depolymerizace

Depolymerace je jev nezbytný pro následnou asimilaci. Polymery s vysokou molekulovou hmotností nejsou schopné se dostat do buňky přes cytoplasmatickou membránu, je tedy nezbytné, aby v této fázi vznikly z polymerů oligomery nebo dokonce monomery. K dosažení depolymerace opět závisí na různých faktorech, a to podmínkám tepelným, světelným, chemickým, mechanickým nebo biologickým. [28; 2; 29; 12]

U biotických faktorů mikroorganismy štěpí polymery různými způsoby. Buďto vylučují specifické hydrolytické enzymy, nebo enzymy, které generují volné radikály. Při enzymatické depolymerizaci je výhodou velká rozmanitost a specifita, mezi jejich nevýhody

ale patří snadná denaturace, ať už jde o tepelnou či světelnou nebo působením povrchově aktivních látek, nebo řady dalších faktorů. [28; 2]

Enzymy se dělí na endoenzymy (endopeptidázy, endoesterázy) a exoenzymy. Endoenzymy katalyzují rozklad polymerního řetězce podél celého materiálu, exoenzymy katalyzují reakce především po okrajích polymerního řetězce. Dále se enzymy dělí na konstitutivní, přičemž ty se tvoří v buňce v průběhu celého jejího života bez ohledu na přítomnost specifického substrátu, a na indukované enzymy, které se začnou tvořit pouze, je-li přítomen specifický substrát. Enzymy tedy nejsou syntetizovány okamžitě a je zde nutné určit latentní období. [28; 2]

Enzymatická depolymerizace se nejčastěji uskutečňuje jako buďto enzymatická hydrolýza (pomocí celuláz, amyláz a kutináz), enzymatická oxidace (oxygenázy, peroxidázy, oxidázy) nebo radikálová oxidace (mikroorganismy schopné produkovat H_2O_2). [28]

2.2.4 Asimilace

Asimilace je jev, kdy už se fragmenty materiálu vzniklé předchozími postupy dostávají do buňky a začleňují se do jejího metabolismu, ze kterého buňka dostává energii, elektrony a základní prvky nutné pro vytvoření buněčné struktury, jako jsou uhlík, dusík, kyslík, fosfor a síra. Asimilace taktéž umožňuje buňce růst a dále se rozmnožovat. Aby mohly být monomery asimilovány, musí se nejdříve dostat přes buněčnou membránu. Některé monomery se přes membránu dostávají pomocí specifických membránových přenašečů, jiné molekuly, které nejsou obvykle přes membránu propustné, nemohou být asimilovány. Proto musí podstoupit biotransformaci, po které již mohou být přes membránu přeneseny. [28; 12]

V buňce jsou molekuly oxidovány pomocí katabolických drah, produkujících ATP (adenosintrifosfát). V závislosti na mikroorganismu existují tři katabolické dráhy pro výrobu ATP. Jsou jimi aerobní dýchání, anaerobní dýchání a fermentace. [28; 2]

2.2.5 Metody zjišťování biodegradační účinnosti

Je známo několik metod, podle kterých může být posouzena biodegradační účinnost studovaného materiálu. Mezi nejzákladnější metody patří:

- a) Hodnocení makroskopických změn v materiálech – neboli zdrsnění povrchu nebo tvorba děr a trhlin, změna barvy nebo také dle obsahu mikroorganismů na povrchu materiálu.
- b) Měření míry úbytku hmotnosti – tato metoda je standardizovaná pro zkoušku biologické rozložitelnosti *in situ* (NF EN ISO 13432), tato metoda míry úbytku hmotnosti ale není příliš reprezentativní, jelikož ztrátu hmotnosti mohou způsobovat i části materiálu, jako jsou např. biodegradovatelné nečistoty.
- c) Zhodnocení změn v reologických vlastnostech materiálu – studium pevnosti v tahu, elastičnosti, pružnosti atd.
- d) Tvorba produktů – jako indikátor degradační účinnosti může být také tvorba produktů, např. produkce glukózy dokáže potvrdit degradaci polymerních materiálů obsahující celulózu. [28]

2.3 Biodegradace PHB

2.3.1 Extracelulární a intracelulární biodegradace PHB

Biodegradace PHB je hydrolytická enzymová biodegradace. Hydrolýza je dvoustupňový proces. Prvním stupněm je navázání enzymu na polymerní materiál, druhým stupněm je katalýza hydrolytického štěpení. PHB může být degradováno buďto působením intracelulárních nebo extracelulárních depolymeráz z bakterií, kvasinek, či plísní. Intracelulární degradace je hydrolýza endogenní zásoby uhlíku, který je naakumulován uvnitř buňky. Extracelulární degradace je využití vnějšího zdroje uhlíku. V průběhu degradace extracelulární enzymy rozrušují vazby polymeru při tvorbě krátkých řetězců, jako jsou oligomery, dimery a monomery, pro které je pro svoji velikost mnohem snazší se dostat do buňky přes cytoplasmatickou membránu. Molekuly jsou pak v buňce mineralizovány na konečné produkty jako CO_2 , H_2O nebo CH_4 . [17; 2; 28; 19; 18]

Existují dva typy PHB polymerů, a to nativní a denaturované granule PHB. Nativní PHB granule jsou rychle a efektivně hydrolyzovány intracelulární PHB depolymerázou. Denaturované granule PHB, které jsou částečně krystalické, se těžko hydrolyzují intracelulárně, mohou být ale degradovány extracelulární PHB depolymerázou. [17; 12]

V této práci byl kladen důraz na biodegradaci PHB pomocí extracelulárních depolymeráz.

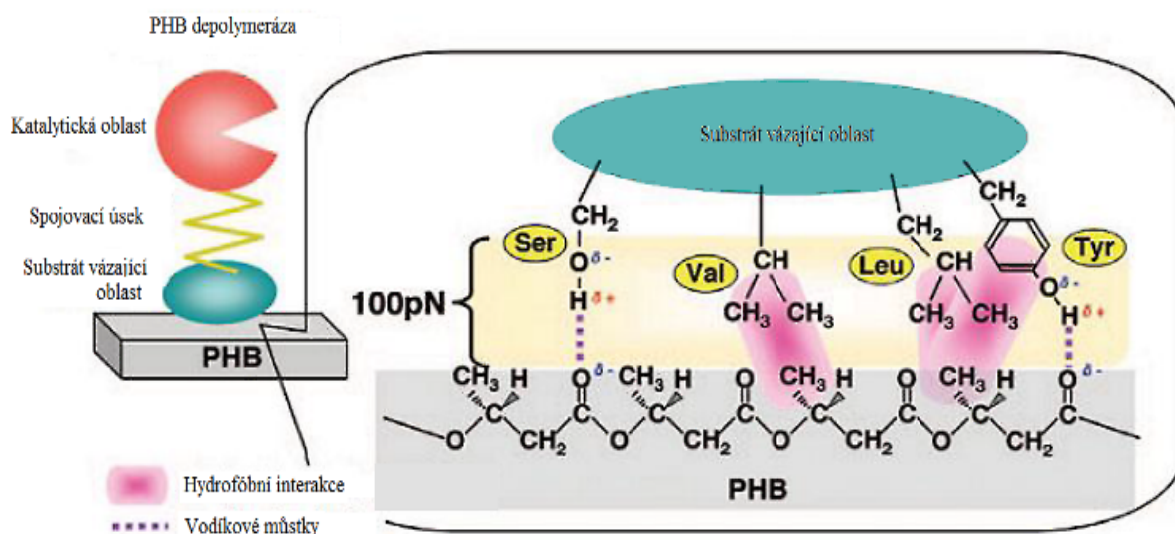
Extracelulární PHB depolymerázy jsou vylučovány řadou různých mikroorganismů a hrají tak velmi důležitou roli v problematice životního prostředí. [2; 12; 18] PHB depolymerázy již byly izolovány z mnoha druhů mikroorganismů, jako jsou např. *Alcaligenes* [35; 18], *Comamonas* [13; 18] a *Pseudomonas* [36; 1; 18], což poukazuje na fakt, že jsou v životním prostředí všudypřítomně obsaženy mikroorganismy schopny PHB biodegradovat. [17; 2; 37]

Mezi důležité vlastnosti PHB depolymeráz patří jejich poměrně malou molekulovou hmotností, která sahá pod 100 kDa, dále vykazují silnou afinitu k hydrofobním materiálům, vykazují poměrně velký rozsah, co se týče jejich stability při určitých parametrech jako pH (od 5,5 – 9,8) nebo teplota či iontová síla. [17; 2; 37; 19]

PHB depolymerázy jsou inhibovány serin esterázovými inhibitory, které se váží na aktivní místo enzymu a zabraňují tak navázání substrátu. [17; 2]

2.3.2 PHA_{SCL} depolymerázy

Vzhledem k tomu, že PHB je pevný polymer o vysoké molekulové hmotnosti a není tak schopen transportu přes buněčnou stěnu, musí mikroorganismy umět vylučovat extracelulární PHB depolymerázu, která je schopna hydrolyzovat PHB na ve vodě rozpustné oligomery a monomery. PHB depolymeráza je složena z jediného polypeptidového řetězce s molekulovou hmotností od 37 – 60 kDa. Všechny enzymy jsou tvořeny z katalytické oblasti na N-konci, zesubstrát vázající oblasti na C-konci a spojovacího úseku, který tyto dvě oblasti spojuje. Katalytická oblast obsahuje peptidový lipázový box, jako aktivní místo pro serinovou hydrolázu. Extracelulární depolymerázy jsou klasifikovány do dvou typů podle rozdílu v poloze lipázového boxu v katalytické oblasti. Enzymy typu A se lipázový box nachází ve středu katalytické oblasti, zatímco enzymy B mají lipázový box přilehlý k N-konci (produkuje např.: *C. acidovorans*). C-koncová oblast působí jako substrát vázající ve vodě nerozpustné PHB. Adsorpce depolymerázy na povrch PHB je ukázána na obr. 4. Bez C-konce by PHB depolymeráza ztratila hydrolytickou aktivitu směrem k ve vodě nerozpustnému PHB, přičemž by byla zachována aktivita ve vodě rozpustných oligomerů. [12; 38]



Obr. 4: Schéma PHB depolymerázy [38]

PHB depolymeráza již byla potvrzena u velkého počtu různých mikroorganismů, ať už se jedná o G^+ či G^- bakterie nebo aerobní či anaerobní bakterie. Jsou známy i druhy plísní, které jsou schopny produkce extracelulárních PHA_{SCL} depolymeráz. Shrnutí nejdůležitějších druhů mikroorganismů vylučujících PHA_{SCL} depolymerázu je obsaženo v tab. 1. [37; 15]

Tab. 1: Přehled druhů mikroorganismů syntetizujících PHA_{SCL} depolymerázu

Charakteristika mikroorganismu	Druh mikroorganismu
G^- aerobní bakterie	<i>Alcaligenes sp.</i> , <i>Comamonas sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i>
G^+ aerobní bakterie	<i>Streptomyces exfoliatus</i>
Anaerobní bakterie	<i>Ilyobacter delafieldi</i>
Plísně	<i>Amycolatopsis</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Penicilium sp.</i>

2.3.3 Metody pro zjišťování aktivity PHB depolymerázy

Existuje několik možností stanovení aktivity PHB depolymerázy [19], z nichž největší zastoupení mají metody měření zákalu suspenze PHB granulí. Průměr granule se kvůli hydrolyze zmenšuje, což způsobí pokles optické hustoty suspenze PHB. Tato metoda je citlivá a snadno proveditelná. Nicméně testy pomocí měření turbidity jsou limitovány ředěním roztoku PHB granulí. Jako důsledek nízké koncentrace PHB granulí je změna koncentrace substrátu velmi vysoká a může tak docházet k nepřesnému zjištění PHB polymerázové aktivity. [19]

Druhou metodou stanovení enzymové aktivity již není měření úbytku substrátu, nýbrž nárůst produktu, který je opět detekovaný spektrofotometricky. Principem stanovení aktivity je štěpení esterových vazeb *p*-nitrofenylalkanoátu za vzniku 4-nitrofenolu, který má žluté zbarvení a absorbuje při 410 nm. Tato metoda je snadno proveditelná a citlivá. [39; 40; 41; 42; 19]

Alternativou k měření zákalu je měření úbytku hmotnosti. Tato metoda je vhodná pro makroskopické vzorky, nevýhodou této metody je delší časový horizont od hodin až po dny, není proto tato metoda vhodná k rychlému stanovení obsahu PHB depolymerázové činnosti.

Uvolněný monomer 3HB je možné měřit spektrofotometricky při 210 nm. Tato metoda má ale nízkou citlivost, neumožňuje on-line detekci aktivity, nebo může být omezena pouze na určitou oblast povrchu materiálu. Dále také citlivost snižují nečistoty, které také absorbují světlo o vlnové délce 210 nm. [19]

Další metodou je kvantifikace monomeru 3HB pomocí NADPH dependentní acetoacetyl-CoA dehydrogenázy, tato metoda je ale časově náročná, umožňuje pouze detekci monomerních jednotek a opět neposkytuje on-line informace o hydrolýze. 3HB oligomery mohou být nepřímo stanoveny buďto chemickým štěpením oligomerů za pomoci alkálií nebo enzymatickou hydrolýzou pomocí 3HB oligomerní hydrolázy. [19; 23; 43]

Další vhodnou metodou přímého stanovení obsahu PHA depolymerázové aktivity je stanovení uvolněné kyseliny v testovacím systému bez použití pufru. Pro každou hydrolyzovanou esterovou vazbu se odštěpí karboxylová kyselina, která snižuje pH roztoku, které se pomocí automatického titrátoru udržuje při konstantní hodnotě pH přidávkem NaOH. Spotřebovaný objem NaOH je přímo úměrný činnosti depolymerázové aktivity pokud je pH výrazně vyšší než pK_a produkované kyseliny. Metoda je velmi citlivá a odhaluje i velmi pomalé hydrolýzy. Další výhodou je možnost poskytování on-line informací. Nevýhodou je nutnost vlastnit zařízení pro udržení pH v roztoku a k tomu určený software. [19]

Některé metody používají pro záznam degradace elektronový mikroskop, 1H -NMR, ^{13}C -NMR, nicméně pro běžné testování nejsou tyto metody příliš vhodné. [19]

Pro stanovení aktivity PHB depolymerázy existují i metody nepřímé, kde se sleduje kvalitativní depolymerázová aktivita, jako např. barvení kolonií hydrofobními barviv. Tato metoda ale není vhodná na rutinní testy na PHB depolymerázovou činnost. [19]

2.3.4 Metody kultivace mikroorganismů pro produkci PHB depolymeráz

Jsou známy tři různé metody kultivace mikroorganismů, které se liší hlavně tím, jestli probíhají v homogenním, či heterogenním prostředí. Jsou to kultivace submerzní, polosuchá a povrchová.

2.3.5 Submerzní kultivace

Kultivace, která bývá označována jako „homogenní“ kultivace. Ve skutečnosti však nikdy nelze dosáhnout homogenního prostředí, už jen přítomností mikroorganismů. Tato kultivace se vyznačuje dobrým promícháváním kapalného média, často se proto používá k aerobní kultivaci, kdy je mícháním podpořena aerace média.

Submerzní kultivace probíhá v malém laboratorním měřítku na třepáčkách, kdy je po celou dobu kultivace médium promícháváno, a tak dosaženo nejen dobré aerace, ale také dispergace živin v celém médiu a dále je eliminována sedimentace narostlé kultury, což jsou ideální podmínky pro růst mikroorganismů. Při použití termostatované třepáčky je dále možné nastavit teplotu, při které má daný mikroorganismus ideální podmínky pro růst.

Submerzní kultivace dále umožňuje testování produkce mikrobiálních metabolitů kvalitativně i kvantitativně, lze velmi efektivně a rychle regulovat případné změny např. změny pH, aerace, přísady potřebných činidel, induktorů, opakované využití biomasy, atd. Hojně je submerzní kultivace využívána pro přípravu inokula.

Nevýhody submerzní kultivace jsou hlavně vysoké náklady, jak energetické, tak i na média či zařízení. [44]

2.3.6 Polosuchá kultivace

Heterogenní kultivace, která se vyznačuje růstem mikroorganismů na tuhém, organickém, téměř bezvodém substrátu. Tento typ kultivace je tradičně používán v Asii, např. pro produkci sýrů, hub, atd.

U polosuché kultivace nelze efektivně promíchávat médium. Z čehož vyplývají hlavní negativa této metody. Je zde problém udržet konstantní teplotu a vlhkost, či zajistit kontrolu teploty, co se týče zahřívání média či kontrolu vlhkosti. Z důvodu nepromíchávání média není možné v průběhu kultivace provádět radikální změny, např. změnu pH, či přidavek živin či jiných potřebných činidel. Dále je velmi obtížné zajistit dobrou aeraci média. Další nevýhodou této kultivace je pomalejší růst biomasy, velké problémy může způsobovat náchylnost k mikrobiální kontaminaci. Další nevýhodou je nutnost použití kultur, které jsou tolerantní k nižší vodní aktivitě a rychlým změnám prostředí, jako je např. teplota. Nejčastěji jsou u polosuché kultivace používány kultury směsné.

Výhody polosuché kultivace jsou vysoké produktivity, nízká cena média a nízké náklady, co se týče zařízení, dále také nízké energetické nároky a jednoduchá technologie.

Polosuchá kultivace se využívá pro simulaci kompostu či siláží v laboratorním měřítku. Nejznámější aplikace polosuché kultivace je pro pěstování Hlívy ústříčné, či žampionů. [44]

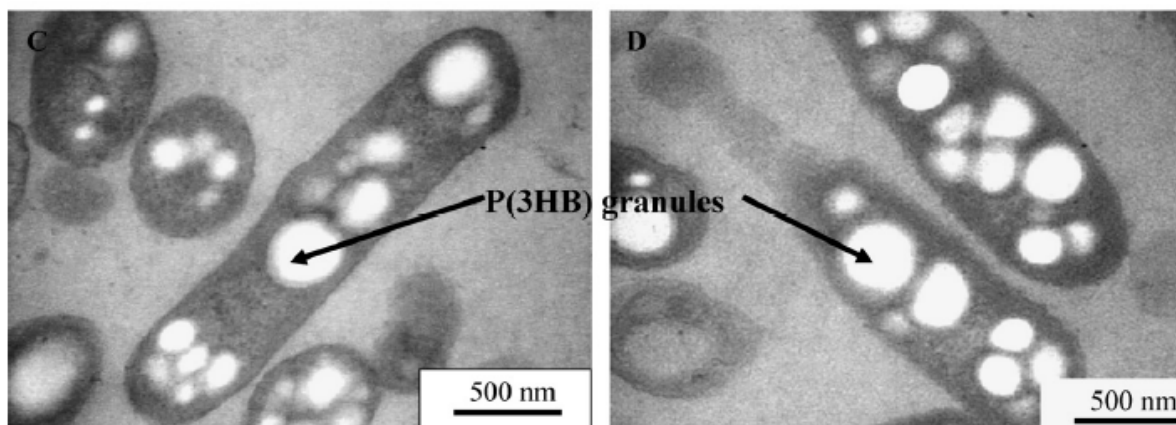
2.3.7 Povrchová kultivace

Kultivace na tuhých médiích představuje růst mikroorganismu nejčastěji na výživném tuhém médiu obsahující jako zesíťovadlo agar. Stejně jako u polosuché kultivace není možné médium promíchávat, ani provádět radikální změny v průběhu kultivace. Povrchová kultivace se ale nejčastěji používá pro izolaci čistých kultur. Nejčastěji používanou metodou pro množení, izolaci i úchovu je tzv. křížový roztěr, kdy se kultura nanáší pomocí mikrobiální kličky na agarovou plotnu. Také tato metoda umožňuje makroskopickou detekci vyselektovaných kultur. Dále se povrchová kultivace velmi hojně používá pro uchovávání kultur při teplotách pod 4 °C. Dále se účinně používá pro testování produkce mikrobiálních metabolitů makroskopickou detekcí (např. acid zóny).

Mezi výhody této metody patří její nenáročnost, rychlost a nízké náklady. [44]

2.4 Bakterie *Delftia acidovorans*

Delftia acidovorans, dříve nazývána *Pseudomonas acidovorans* nebo také *Comamonas acidovorans* je gram-negativní bakterie. Je striktně aerobní, nefermentativní a chemo-organotrofní. Kolonie tvoří kulovité s hladkým či drsným povrchem, tvar buněk je tyčinkovitý. Je typicky nepigmentovaná, kolonie jsou tedy obvykle bezbarvé, ale zřídka vykazují tmavě hnědou barvu. Optimální podmínky pro růst jsou 30 °C. *D. acidovorans* je považována za nepatogenní mikroorganismus. [45; 46; 47]



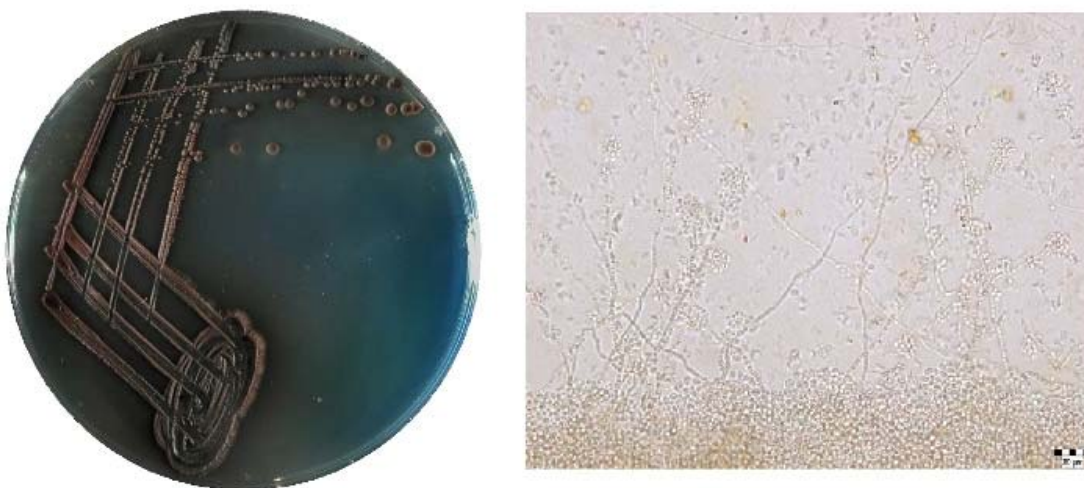
Obr. 5: Buňky *D. acidovorans* s intracelulárními PHB granulemi [47]

D. acidovorans je neobvyklá v tom, že není schopna růst na jednoduchých cukrech, jako substrátu, jelikož nemá schopnost produkce enzymu glukosadehydrogenasa. Místo toho jsou pro optimální růst důležité substráty jako aminokyseliny, pepton či jiné organické kyseliny. Kvůli této neschopnosti růstu na jednoduchých cukrech, vyžaduje selektivní obohacené médium. [45]

D. acidovorans je všudypřítomná bakterie vyskytující se běžně v půdě, blátě a vodě dokonce i v oleji, ropě či odpadních vodách. Izolována byla i z dřevěných třísek a poté studována pro schopnost biodegradace ligninu. Dále byla potvrzena degradační účinnost nenasycených karboxylových kyselin, aromatických kyselin či sterolu a PHB, kdy speciálně u PHB je bakterie schopna jej intracelulárně akumulovat a dále je schopna i extracelulární produkce PHB degradujících enzymů, tzv. PHB depolymeráz. [45; 46; 13; 18]

2.5 Kvasinka *Aureobasidium pullulans*

Aureobasidium pullulans je kvasinka, která svými vlastnostmi připomíná vláknitou houbu. Je také známá jako černá kvasinka, kvůli produkci melaninu. U této kvasinky jsou známy tři charakteristické formy, a to buďto jako prodloužené rozvětvené vlákna, nebo jako chlamydospory a jako třetí menší eliptické kvasinkové buňky. V počáteční fázi růstu bývají kolonie zbarveny do žluta, nebo jsou krémové, světle růžové, či světle hnědé. V pozdější fázi růstu kolonie začínají černat kvůli produkci chlamydospor, které jsou svým černým zbarvením charakteristické. [48; 49; 50; 51]



Obr. 6: *A. pullulans* na agarové plotně a pod mikroskopem [52]

Z ekologického hlediska jsou kmeny *A. pullulans* téměř všudypřítomné. Vyskytuje se především v potravinách, půdě, a to i včetně Antarktidy, dále také ve vodě, dřevu, v rostlinách, na skalách a její výskyt byl potvrzen i na vápenci. Dále bylo zjištěno, že se nachází i v podmínkách s vysokým obsahem soli, jako jsou hluboké moře i pobřežní vody. [48; 50; 53]

V biotechnologii se používá hlavně k produkci pullulanu. Dále se používá jako indikátor kvality ovzduší, neboť může být obsažena i v prachu. [48; 50; 53]

Kvasinka roste při 2-35 °C, kdy optimální teplota je 25 °C, některé kmeny mohou být schopné růstu ale i při -8 °C, což je potvrzeno izolací *A. pullulans* ze zmražených potravin, kdy při těchto teplotách stále docházelo ke znehodnocení. Co se týče pH, *A. pullulans* při nízkém pH roste do mycelia, při vyšším pH okolo 6 roste jako kvasinka. Výroba pullulanu se obvykle provádí u pH 2. [50]

A. pullulans může u citlivých jedinců vyvolávat respirační problémy, které mohou vyústit až v zánětlivé onemocnění zápal plic či při dlouhodobější expozici až v astma. [50]

2.6 Plíseň *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus je vláknitá houba, která tvoří sametové, namodralé kolonie tvořící charakteristické sloupce kulovitých konidií o průměru 2,5-3 µm, které se bez problému šíří vzduchem. *A. fumigatus* je termofilní plíseň, kdy jeho minimální teplota růstu je okolo 12 °C, optimální teplota se pohybuje okolo 40-42 °C, růst této plísně byl ale potvrzen i při 55 °C. Ke svému růstu potřebuje nižší vodní aktivitu okolo 0,78 - 0,88. [49; 50; 54]



Obr. 7: *A. fumigatus* na agarové plotně a pod mikroskopem [55]

Z ekologického hlediska je hlavním výskytem opět všudypřítomné plísně *A. fumigatus* hnilý vegetace, ve které způsobuje spontánní zahřívání, či v produktech, které byly podrobeny ohřevu nebo jinému tepelnému poškození. Jako potravinové zdroje obsahující *A. fumigatus* byly potvrzeny kakaové boby v průběhu fermentace a po fermentaci, olejnatá semena, obilí, koření a ve vejcích či ořechách, dále také na masných výrobcích. Největší výskyt je zejména v tropech kvůli jeho termofilu. *A. fumigatus* byl také označen jako důvod „Rio“ off-flavouru kávy. [49; 50; 56]

A. fumigatus je důležitým primárním spotřebitelem v procesu kompostování, ve kterém hraje hlavní roli v recyklaci uhlíku a dusíku. V tomto nehostinném prostředí je plíseň vystavena různým stresorům, jako nutriční omezení, výkyvy teplot nebo pH. V souvislosti s přizpůsobením se získal *A. fumigatus* četné metabolické a fyziologické vlastnosti, které mu pomáhají v adaptaci. Například termotolerance plísně způsobuje rychlý a silný růst i v teplejších podmínkách, což přispívá k jeho výskytu jako příležitostný patogen a způsobovat onemocnění u jedinců s imunodeficitem, kdy poté způsobuje infekci v plicích. Rozmnožuje se bezpohlavními výtrusy zvanými konidie. [56]

3 Cíl práce

- 1) Rešerše na téma biodegradabilita polymerních materiálů se zaměřením na polyestery
- 2) Zavedení experimentálních testů pro posouzení biodegradability materiálu
- 3) Ověření biodegradability polyhydroxyalkanoátů s ohledem na způsob jejich technologického zpracování

4 Experimentální část

4.1 Použité chemikálie, přístroje, bakteriální kultury a typy PHB

Pro diplomovou práci byly všechny použité chemikálie v čistotě p.a. nebo vyšší.

4.1.1 Kultury mikroorganismů

Delftia acidovorans CCM 283 z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně

Aureobasidium pullulans CCM 8182 z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně

Aureobasidium pullulans CCM F-148 z české sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně

Aureobasidium pullulans CCY 027-001-115 ze Slovenské sbírky mikroorganismů Culture Collection of Yeasts

Aspergillus fumigatus izolovaný na Fakultě chemické VUT v Brně

4.1.2 Typy PHB

PHB prášek

PHB fólie

PHB tvrzená fólie

PHB textilie Nanoul

PU-PHB od firmy Sigma Aldrich

PU-PHB připravený na fakultě chemické VUT v Brně

4.1.3 Přístroje

ELISA Reader BioTek ELx808 Biotek (DE)

Elektroforetická aparatura P9DS (Owel Separation Systems, USA)

Laminární box Aura mini (Bioair Instruments, UK)

Mikroskop Intraco Micro LM 666 PC/∞ 40x-1600x LED (ČR)

Termostatovaná třepačka, Heidolph Unimax 1010, Labicom s.r.o. (ČR)

Ultrazvukový homogenizátor Sonopuls HS3200, Bandeline

Ultrazvuková lázeň PS02000 (ČR)

Mikrocentrifuga Mikro 200 Hettich Zentrifugen (SRN)

Centrifuga Boeco U-32R, Hettich Zentrifugen, (DE)

Centrifuga Laboratortzentrifugen 3-15, Sigma (DE)

Vortex, TK3S, Kartell spa (USA)

Analytické váhy, Boeco (Německo)

pH metr SENSODIRECT pH200, Lovibond (UK)

Termostat IP 60, LTE Scientific, (Německo)

Běžné laboratorní sklo a vybavení

4.2 Příprava PHB materiálů

Pro experimentální část diplomové práce bylo použito pět druhů PHB materiálů. Pro degradaci za použití známých druhů mikroorganismů bylo pracováno s PHB práškem a PHB

fólií, u studia biodegradace pomocí přirozeně se vyskytujících mikroorganismů v kompostu byly použity PHB fólie, PHB tvrzená fólie, PHB textilie Nanoul a kopolymer PU-PHB.

4.2.1 Příprava krystalických PHB granulí

Krystalické granule PHB byly používány z komerčně dostupného PHB (Biomer) ve formě prášku. Tento PHB prášek byl podle potřeby dispergován v náležitém pufru (20 mM fosfátovém o pH 4, 6, 7, 8 nebo 10 či 50 mM Tris-HCl při stejných hodnotách pH) a homogenizace probíhala pomocí ultrazvuku po dobu 1 minuty, při vložené energii okolo 10 kJ.

4.2.2 Příprava PHB fólie

1 g PHB prášku byl přidán ke 40 ml chloroformu a ponechán ve vodní lázni při 60 °C do úplného rozpuštění PHB. Poté bylo vždy 5 ml roztoku napipetováno do čistých Petriho misek a ponecháno přes noc v digestoři pro odpaření rozpouštědla. Po dokonalém odpaření byly fólie zváženy a vyfoceny a použity k testování enzymové aktivity.

4.2.3 Příprava PHB tvrzené fólie

Tvrzená fólie byla připravena metodou extruze pracovníky Ústavu chemie materiálů Fakulty chemické VUT v Brně. Jako vstupní surovina posloužil PHB materiál naprodukovaný bakteriální kulturou *Cupriavidus nestor* H16 s využitím odpadního fritovacího oleje jako substrátu.

4.2.4 Příprava Nanoul textilie

Textilie na bázi nanovláken byla připravena ve spolupráci s Technickou univerzitou v Liberci na přístroji Nanospider. Vstupní surovinou byl taktéž materiál naprodukovaný bakteriální kulturou *Cupriavidus necator* H16 s využitím odpadního fritovacího oleje jako substrátu.

4.2.5 Příprava kopolymeru PU-PHB

Poslední testovaný materiál byl připraven pracovníky Ústavu chemie materiálů Fakulty chemické VUT v Brně. Jednalo se o polyuretan, kdy část polyesterového polyolu byla nahrazena PHB. Detailní popis syntézy materiálů a stejně tak i jejich mechanických vlastností je shrnut v publikaci. [57]

4.3 Submerzní kultivace za použití vybraných druhů mikroorganismů

Jako první část experimentálního výzkumu byla studována schopnost biodegradace PHB za pomoci submerzní kultivace specifických druhů mikroorganismů, konkrétně vždy jeden zástupce z bakterií, kvasinek a plísní. Jako zástupce bakterií byla vybrána *Delftia acidovorans*, za kvasinky tři různé kmeny *Aureobasidia pullulans* a za plísně *Aspergillus fumigatus*, kdy jako zásobní látky uhlíku byly použity PHB fólie, či PHB prášek.

4.3.1 Submerzní kultivace bakterie *Delftia acidovorans*

Při submerzní kultivaci bakterie *D. acidovorans* byly použity jako zásobní látky uhlíku jak PHB fólie, tak PHB prášek. Média určená ke kultivaci byla zaočkována z inokula obsahující adaptovanou kulturu bakterie *D. acidovorans*.

Pro přípravu inokula bylo připraveno médium viz tab 2.

Tab. 2: Složení živného média pro přípravu inokula bakterie *D. acidovorans*

Chemikálie	c [g/l]
KH ₂ PO ₄	2,5
Tryptone water	10
Sójový pepton	3
Glukóza	2,5
Destilovaná voda	1000 ml

Kultura bakterie *D. acidovorans* byla dlouhodobě uchovávána v lednici na Petriho miskách obsahující pevné médium Tryptone Soya broth. Inokulum bylo připraveno tak, že do 250 ml Erlenmayerových baněk bylo přidáno 100 ml živného média pro přípravu inokula, takto připravené médium bylo vysterilováno v páře po dobu minimálně 30 minut a po sterilizaci bylo médium zaočkováno z agarové plotny obsahující bakterii *D. acidovorans* CCM 283 3krát bakteriologickou kličkou. Médium s kulturou bylo následně kultivováno 24 hodin při 30 °C na rotační třepačce při 130 ot./min. Z takto připraveného inokula bylo zaočkováno minerální živné médium (viz tab. 3) 2 ml inokula, již s PHB jako jediným zdrojem uhlíku.

Tab. 3: Složení živného média pro kultivaci bakterie *D. acidovorans*

Chemikálie	c [g/l]
KH ₂ PO ₄	4,6
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	11,6
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	0,1
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,05
NH ₄ Cl	1
Destilovaná voda	1000 ml

Pro kultivaci bakteriální kultury byla připravena kontrola. První kontrolní vzorek obsahoval místo živného média pouze destilovanou vodu s PHB fólií. Druhý kontrolní vzorek obsahoval živné médium, které neobsahovalo bakteriální kulturu a jako zásoba uhlíku byla použita PHB fólie a třetí kontrolou byla opět destilovaná voda s 0,5 g PHB prášku. Kultivace probíhala v Erlenmayerových baňkách o objemu 250 ml se 100 ml média při 30 °C a 130 ot./min. po dobu 22 dnů. Přibližně každý třetí den bylo odebráno 1,5 ml média a u tohoto vzorku určována enzymová aktivita pomocí ELISA Readeru. Po ukončení kultivace byl zjišťován hmotnostní úbytek PHB materiálu, tedy PHB fólie a PHB prášku a molekulové hmotnosti použitých materiálů.

4.3.2 Submerzní kultivace kvasinky *Aureobasidium pullulans*

U submerzní kultivace kvasinky *A. pullulans* byla použita jako zásobní látka uhlíku jen PHB fólie, pro kultivaci ale byly studovány tři různé druhy kvasinky *A. pullulans* a byly zkoumány rozdíly v enzymové aktivitě mezi zaočkováním mikroorganismů z inokula a přímo z agarové plotny.

Pro uchování a přípravu inokula bylo použito médium YPD (Yeast extract-peptone-dextrose broth) [58] a kultura byla taktéž uchovávána v lednici při 4° C.

Inokulum bylo připraveno identickým způsobem jako u bakterie *D. acidovorans*, médium bylo použito minerální, s živinami uvedenými v tab. 4.

Tab. 4: Složení minerálního média pro přípravu inokula kvasinky *A. pullulans* a plísně *A. fumigatus*

Chemikálie	c [g/l]
NaNO ₃	2
KH ₂ PO ₄	0,1
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,1
KCl	0,5
Glukóza	80
Peptone	0,5
Yeast extract	0,5
Destilovaná voda	1000 ml

Inokulum bylo kultivováno identicky jak u předchozího případu, tedy po dobu 24 hodin při 30 °C a 130 ot./min.

Médium ke kultivaci kvasinky bylo připraveno podle tab. 5. Zaočkováno bylo 2 ml inokula.

Tab. 5: Složení minerálního média pro kultivaci kvasinky *A. pullulans* a plísně *A. fumigatus*

Chemikálie	c [g/l]
NaNO ₃	2
KH ₂ PO ₄	0,1
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,1
KCl	0,5
Destilovaná voda	1000 ml

Pro kultivaci kultur *A. pullulans* byly připraveny kontroly. První kontrolní vzorek obsahoval místo minerálního média destilovanou vodu s PHB fólií a druhý kontrolní vzorek obsahoval minerální médium bez mikrobiální účasti a jako zásoba uhlíku byla použita taktéž PHB fólie. Kultivace probíhala v Erlenmayerových baňkách o objemu 250 ml se 100 ml média při 30 °C a 130 ot./min. po dobu 24 dnů. Přibližně každý třetí den bylo odebráno 1,5 ml média a u tohoto vzorku určována enzymová aktivita pomocí ELISA Readeru. Po ukončení kultivace byl zjišťován hmotnostní úbytek použitých PHB fólií a molekulové hmotnosti použitých materiálů.

4.3.3 Submerzní kultivace plísně *Aspergillus fumigatus*

U submerzní kultivace plísně *A. fumigatus* byla použita jako zásobní látka uhlíku jak PHB fólie, tak PHB prášek. Média určená ke kultivaci byla zaočkována z inokula obsahující adaptovanou kulturu *A. fumigatus*.

Pro uchování a přípravu inokula bylo použito médium YPD (Yeast extract-peptone-dextrose broth) [58] a kultura byla stejně jako v předchozích případech uchovávána v lednici.

Inokulum bylo připraveno identickým způsobem jako u bakterie *A. pullulans*, médium bylo použito taktéž minerální, s živinami uvedenými v tab. 4.

Inokulum bylo kultivováno obdobně jak v předchozích případech, tedy 24 hodin při 30 °C a 130 ot./min. Médium ke kultivaci plísňě bylo připraveno podle tab. 5. Zaočkováno bylo 2 ml inokula.

Pro kultivaci kultury *A. fumigatus* byly připraveny 3 kontroly. První kontrolní vzorek obsahoval destilovanou vodu s PHB fólií a druhý kontrolní vzorek obsahoval minerální médium bez mikrobiální účasti a jako zásoba uhlíku byla použita PHB fólie a třetí kontrolou byla destilovaná voda s 0,5 g PHB prášku. Kultivace probíhala v Erlenmayerových baňkách o objemu 250 ml se 100 ml média při 30 °C a 130 ot./min. po dobu 14 dnů. Každý den bylo odebráno 1,5 ml média a u tohoto vzorku určována enzymová aktivita pomocí příslušné metody stanovení enzymatické aktivity s využitím ELISA Readeru. Po ukončení kultivace byl zjišťován hmotnostní úbytek PHB fólie a PHB prášku.

4.4 Stanovení enzymové aktivity pomocí měření úbytku hmotnosti

Po přípravě PHB fólií viz kap. 4.2.2. byly fólie zváženy na analytických vahách s přesností na 4 desetinná místa a poté vloženy do kádinky a po pečlivém utěsnění alobalem ponechány sterilaci v horké páře po dobu minimálně 30 minut. Poté byly opatrně přeneseny do Erlenmayerových baněk s již vysterilizovanými médii. V laminárním boxu pro zachování sterility byly vzorky zaočkovány inokulem s kýženou kulturou. Takto připravené Erlenmayerovy nádoby byly ponechány kultivaci. Po ukončení kultivace byly velké části PHB fólie opatrně vyjmuty a menší části zfiltrovány a vysbírány. Fólie byly důkladně opláchnuty destilovanou vodou a vysušeny při 80 °C do konstantní hmotnosti.

U PHB prášku byl postup nepatrně odlišný, nejprve bylo naváženo na analytických vahách s přesností na 4 desetinná místa 0,5 g PHB prášku, poté byl přenesen do kádinky a utěsněn alobalem. Takto připravený PHB materiál byl sterilován horkou parou opět minimálně 30 minut. V laminárním boxu byl kvalitativně převeden do Erlenmayerových baněk s vysterilovanými médii. Poté bylo k médiím přidáno 2 ml inokula s adaptovanou kulturou mikroorganismů. Po ukončení kultivace byl zbytkový PHB prášek zfiltrován a několikrát promyt destilovanou vodou a vysušen v sušárně při 80 °C do konstantní hmotnosti.

Hodnoty hmotnostního úbytku byly zaznamenány a přepočítány na úbytek procentuální.

4.5 Spektrofotometrické stanovení enzymové aktivity

Stanovování enzymové aktivity bylo provedeno v rámci příslušné metody stanovení enzymatické aktivity za pomoci přístroje ELISA Reader, kdy byla vždy měřena změna absorbance vzorku, obsahujícího pufr o určité koncentraci a pH, substrát a příslušný extracelulární enzym, v závislosti na čase. U každého použitého mikroorganismu bylo stanoveno pH a teplotní optimum, kdy měla daná extracelulární depolymeráza největší účinnost, tedy největší rozdíl absorbance v průběhu měření. Pro studium enzymové aktivity byly použity dvě metody stanovení.

4.5.1 Metoda stanovení enzymové aktivity I

V prvním případě stanovování enzymové aktivity byly použit jako substrát krystalické PHB granule a depolymerázová aktivity byla měřena změnou absorbance suspenze PHB v 20 mM fosfátovém pufru v průběhu 15 minut. Principem stanovení depolymerázové aktivity je degradace PHB granulí pomocí přidaného enzymu. V průběhu stanovení je v

časových intervalech měřena absorbance, která se při přítomnosti extracelulární depolymerázy snižuje. Podle míry poklesu absorbance je následně vypočtena enzymová aktivita, která je vyjádřena jako míra úbytku substrátu za čas vztažená na 1 ml.

Byl připraven 20 mM fosfátový pufr o pH navozujícím pH optimum konkrétního enzymu který byl touto metodou také stanoven. Poté byl přichystán roztok se substrátem, který byl připraven smícháním fosfátového pufru a PHB prášku tak, aby koncentrace PHB v roztoku činila 0,4 mg/ml. Tento roztok byl následně sonifikován po dobu 1 minuty při vložené energii okolo 10 kJ. Roztok obsahující enzym byl připraven následovně. V určitých časových intervalech kultivace dané kultury bylo vždy odebráno do zkumavek typu Eppendorf 1,5 ml média obsahující extracelulární depolymerázu. Pro odstranění biomasy byl vzorek centrifugován 2 minuty při 14 000 ot./min. Kýžený enzym byl obsažen v supernatantu, u kterého byla stanovována depolymerázová aktivita. Takto připravené roztoky byly napipetovány na mikrotitrační destičku v poměru 3:1 (substrát:enzymu), tedy 190 μ l roztoku se substrátem a 60 μ l enzymu. Přidavkem enzymu byl započat experiment a tato hodnota absorbance, měřená při vlnové délce 630 nm, byla brána jako čas t_0 . Časový interval měření absorbance byl po 1 minutě a vzorek byl vždy těsně před odečtem absorbance 3 sekundy protřepáván. Celkový čas měření byl 15 minut. [36]

4.5.2 Metoda stanovení enzymové aktivity II

V druhém případě stanovování enzymové aktivity byly taktéž použity jako substrát krystalické PHB granule a depolymerázová aktivita byla měřena změnou absorbance suspenze PHB. Hlavními rozdíly oproti první metodě jsou v použitém pufru, a to 50 mM Tris-HCl pufru s 2 mM CaCl_2 a dále probíhalo měření 1 hodinu. Principem stanovení depolymerázové aktivity je identicky jako v předchozím případě degradace PHB granulí pomocí přidaného enzymu a podle míry poklesu absorbance je následně vypočtena enzymová aktivita, která je vyjádřena jako míra úbytku substrátu (absorbance) za čas vztažená na 1 ml.

Byl připraven 50 mM fosfátový pufr o pH navozujícím pH optimum konkrétního enzymu, který byl tímto stanovením také zjišťován. Poté byl přichystán roztok se substrátem, který byl připraven smícháním Tris-HCl pufru a PHB prášku tak, aby koncentrace PHB v roztoku činila 0,4 mg/ml. Tento roztok byl následně sonifikován po dobu 1 minuty při vložené energii okolo 10 kJ. Roztok obsahující enzym byl použit ten samý, jako v případě předchozího stanovení. Připravené roztoky byly napipetovány na mikrotitrační destičku v poměru 3:1 (substrát:enzymu). Přidavkem enzymu byla započata reakce a tato hodnota absorbance, měřená při vlnové délce 630 nm, byla brána jako čas t_0 . Časový interval měření absorbance byl po 5 minutách a vzorek byl vždy těsně před odečtem absorbance 3 sekundy protřepáván. Celkový čas měření byl 1 hodina. [39; 59; 13; 60; 61]

4.6 Charakterizace extracelulárních enzymů pomocí SDS-PAGE

Pro charakterizaci extracelulárních enzymů ze submerzních kultivací (*D. acidovorans*, *A. pullulans* a *A. fumigatus*) byla vybrána metoda SDS-PAGE. Jelikož měly vzorky z kultivací velmi malý obsah extracelulárních enzymů, musely být zakoncentrovány pomocí ultrafiltrace. Zakoncentrované a rozdělené vzorky byly poté vizualizovány jak pomocí Coomassie Brilliant Blue G250, tak i pomocí barvení stříbrem.

4.6.1 Ultrafiltrace vzorků obsahující extracelulární depolymerázu

Kvůli nízkému obsahu extracelulárních depolymeráz ve vzorku nebylo možné vizualizovat původní množství enzymu pomocí SDS-PAGE. Zakoncentrování vzorku bylo provedeno pomocí ultrafiltrace, která byla realizována ve dvou obměnách.

Prvním případem pro ultrafiltraci byly vybrány vzorky, kdy po ukončení kultivace určitého mikroorganismu bylo zbylé médium centrifugováno při 10 000 ot./min, kdy se v supernatantu nacházely extracelulární depolymerázy. Ze supernatantu byly odebrány 3 ml a ultrafiltrovány přes membránu o 10 kDa.

Jako druhý případ pro ultrafiltraci byly použity takové vzorky, kde byla naměřena pomocí stanovení enzymové aktivity I, II a III nejvyšší aktivita enzymů. Z těchto vzorků bylo odebráno takové množství, aby se opět ultrafiltovaly 3 ml roztoku. Ultrafiltrace opět proběhla přes 10 kDa membránu.

Konečné vzorky byly 10x zakoncentrovány, tedy na objem cca 0,3 ml. Ultrafiltrace byla provedena na chlazené centrifuze při teplotě 5 °C při 7000 ot./min po dobu minimálně 1 hodiny. Poté byly vzorky podrobeny analýze pomocí SDS-PAGE.

4.6.2 Vertikální SDS-PAGE elektroforéza Laemmli

Pro vertikální elektroforetickou separaci proteinů byla použita aparatura P9DS o parametrech 16x14 cm. Jako nosič byl použit polyakrylamidový gel. K detekci enzymů bylo použito barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue G250 i barvení stříbrem. Jako standard byla použita komerční směs rekombinačních proteinů BioRad Dual Color.

4.6.2.1 Příprava elektroforetických pufrů

Pro Laemmli SDS-PAGE bylo nutné připravit různé roztoky elektroforetických pufrů, viz tab. 6. Elektrodotový pufť připravený podle tab. 6 je nutno pro potřeby elektroforézy ještě 10krát zředit na objem cca 1 l, jelikož pro naplnění elektroforetické aparatury je potřeba asi 800 ml. U gelového separačního pufru je nutné ještě ověřit konečné pH pufru, které má mít hodnotu pH 8,8. [62, 63]

Tab. 6: Tabulka přípravy elektroforetických pufrů

Elektrodotový pufť		Gelový separační pufť	
Chemikálie	Množství	Chemikálie	Množství
Tris	3,0 g	Tris	18,1 g
Glycin	14,4 g	HCl (35%)	2,7 ml
SDS	1,0 g	Deionizovaná voda	100 ml
Deionizovaná voda	1000 ml		

4.6.2.2 Příprava polyakrylamidového gelu

Pro 10% polyakrylamidový gel bylo nutno připravit 40 ml roztoku (na 1 gel), viz tab. 7. Po smíchání akrylamidu, gelového separačního pufru a destilované vody byl roztok ultrazvukován v ultrazvukové lázni kvůli odstranění rozpuštěného kyslíku ze směsi, jelikož inhibuje polymeraci gelu. Poté byl přidán 10% SDS a velmi rychle přidán TEMED a 10% APS, který byl připraven vždy čerstvý (0,1 g a 1 ml deionizované vody) a zabalen v alobalu kvůli jeho fotosenzibilitě. Směs byla následně opatrně zamíchána a napipetována mezi dvě skla v nalévacím stojanu a mezi skla byl opatrně vložen plastový hřeben pro vytvoření jamek pro aplikaci vzorků. Gel byl ponechán 1 hodinu k úplné polymeraci. [62; 63]

Tab. 7: Tabulka přípravy 10% polyakrylamidového gelu

10% polyakrylamidový gel	
Chemikálie	Množství [ml]
Akrylamid (AA) Rothiphorese 30% AA	13,3
Gelový separační pufr	10,0
Deionizovaná voda	16,3
SDS 10%	0,40
TEMED	0,06
APS 10%	0,20

4.6.2.3 Příprava vzorků

Vzorky určené k rozdělení pomocí Laemmli SDS-PAGE byly smíchány se vzorkovacím pufrům viz tab. 8 v poměru 1:1 a ve vodní lázni povařeny po dobu 4 minut. Na gel bylo nanášeno vždy 25 μ l takto připravených vzorků. Uchovávání vzorků pro případné další použití bylo při -18 °C. [62; 63]

Tab. 8: Tabulka přípravy vzorkovacího pufru

Vzorkovací pufr	
Chemikálie	Množství
Glycerol	5,0 ml
Puf Tris-HCl o pH 6,8	2,13 ml
β -merkaptoethanol	2,56 ml
Bromfenolová modř	1,0 mg
SDS	1,0 g
Deionizovaná voda	10 ml

4.6.2.4 Provedení elektroforézy

Po polymeraci gelu a úplném ztuhnutí byl odstraněn plastový hřeben a skla s gelem upevněny do aparatury a utěsněny. Poté byl nalit 10krát zředěný elektroodový pufr. Vzorky byly nanášeny do drážek a aparatura byla přikryta víkem, utěsněna, připojena ke zdroji napětí. Podmínky elektroforézy byly nastaveny na 100 V, 400 mA a doba rozdělování se pohybovala od 4-5 hodin. [62; 63]

4.6.2.5 Barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue G250

Rozdělený gel byl vyjmut ze skel a opatrně přenesen do nádoby k barvení. Poté byl převrstven barvicím roztokem, viz tab. 9 a byl ponechán k barvení po dobu 20-30 minut na třepačce při 90 ot./min. Poté byl gel promyt několikrát odbarvovacím roztokem a poté ponechán odbarvování přes noc do druhého dne. Druhý den byl gel opatrně vyjmut, vložen do eurofólie a naskenován.

Velikost fragmentů byla určena pomocí standardů se známou molekulovou hmotností.

Tab. 9: Tabulka přípravy barvicího a odbarvovacího roztoku

Barvicí roztok		Odbarvovací roztok	
Chemikálie	Množství	Chemikálie	Množství
Metanol	50 ml	Metanol	200 ml
Kyselina octová 99,8%	10 ml	Kyselina octová 99,8%	50 ml
Coomassie Brilliant Blue G250	0,25 g	Destilovaná voda	250 ml
Destilovaná voda	40 ml		

4.6.2.6 Barvení stříbrem

Rozdělený gel byl opět vyjmut ze skel a přenesen do nádoby na barvení identicky jako v předchozím případě. Důležité během přenosu bylo, aby za žádných okolností nepřišel gel do kontaktu s kovovým předmětem. Samotné barvení stříbrem bylo realizováno modifikací tří zavedených postupů a protokolů. Roztoky pro barvení za pomoci stříbra byly připraveny podle tab. 10. [64; 65; 66]

Tab. 10: Tabulka přípravy roztoků potřebných k barvení stříbrem

Chemikálie	Množství	Chemikálie	Množství
Fixační roztok		Promývací roztok	
Metanol	250 ml	Metanol	100 ml
Kyselina octová 99,8%	60 ml	Deionizovaná voda	400 ml
Formaldehyd 37%	0,24 ml	Senzibilizační roztok	
Deionizovaná voda	190 ml	Thiosíran sodný	63,7 mg
Barvicí činidlo		Deionizovaná voda	500 ml
Dusičnan stříbrný	0,5 g	Vyvíjecí roztok	
Formaldehyd 37%	0,18 ml	Uhličitan sodný	30 g
Deionizovaná voda	250 ml	Formaldehyd 37%	0,24 ml
Terminační roztok		Senzibilizační činidlo	2 ml
Kyselina octová 99,8%	60 ml	Deionizovaná voda	500 ml
Deionizovaná voda	440 ml		

Gel byl přenesen do barvicí nádoby s fixačním roztokem a ještě převrstven fixačním roztokem. Takto byl gel ponechán po dobu minimálně 1 hodiny na třepačce při 90 ot./min. Po odstranění fixačního roztoku byl gel promyt deionizovanou vodou a převrstven promývacím roztokem. Opět byl gel ponechán na třepačce při 90 ot./min. Po 10 minutách byl promývací roztok obměněn za nový a proces byl ještě 2krát zopakován. Celková doba promývání tedy činila 30 minut. Po odstranění promývacího roztoku byl gel propláchnut deionizovanou vodou a převrstven senzibilizačním roztokem a promícháván po dobu 1 minuty. Poté byl gel propláchnut deionizovanou vodou a převrstven barvicím činidlem. Gel byl barven na třepačce při 90 ot./min. po dobu 20 minut. Poté byl gel důkladně několikrát propláchnut deionizovanou vodou a krátce propláchnut vyvíjecím roztokem a po jeho odstranění převrstven vyvíjecím roztokem. K vyvinutí proteinového obrazu došlo během 2 minut a po dosažení kýžené intenzity byla redukce zastavena přidáním terminačního roztoku. Poté byl ještě gel propláchnut samotným terminačním roztokem po dobu asi 5 minut. Po ukončení barvení byl gel opatrně přenesen mezi eurofólie a naskenován. [64; 65; 66]

Velikost fragmentů byla určena pomocí standardů se známou molekulovou hmotností.

4.7 Stanovení molekulové hmotnosti použitých PHB materiálů

Po degradaci byly použité PHB materiály rozpuštěny v HPLC chloroformu, kdy navážky PHB materiálu se pohybovaly okolo 3 - 5 mg na ml. Rozpouštění se uskutečnilo při 60°C po 24 h. Molekulová hmotnost byla stanovena pracovníky Ústavu chemie a technologie ochrany životního prostředí Fakulty chemické VUT v Brně pomocí gelové permeační chromatografie na přístroji Agilent 1100 Series s využitím chromatografické kolony PL gel Mixed B (300 9 7.5 mm; 10 lm) dle publikace. [67]

4.8 Biodegradace pomocí simulace kompostovacích podmínek

Biodegradace za podmínek simulujících kompostovací proces byla provedena dle normy IS/ISO 20200 (2004). [8]

Polosuchá kultivace za použití přirozeně se vyskytujících mikroorganismů v kompostu je mezinárodní standardizovaná metoda určování stupně biodegradability plastových materiálů v laboratorních podmínkách simulujících intenzivní aerobní proces kompostování. Testování biodegradability plastů má dvě formy, a to inkubaci termofilní, či mezofilní. Pro diplomovou práci byla vybrána inkubace termofilní, tedy při 58 °C. [8; 9; 10]

Hlavním principem metody je simulace ideálních podmínek kompostování, tedy příprava pevné matrice, která obsahuje vhodný poměr odpadu zaočkovaného kompostem získaného z klasických podmínek. Do této matrice je vložen studovaný polymer, v našem případě různé druhy PHB a kopolymer PHB s polyuretanem. Stupeň rozkladu se stanovuje pomocí úbytku hmotnosti polymeru před testováním a po jeho ukončení. [8; 9; 10]

4.8.1 Použité druhy PHB pro testování biodegradability

- a) PHB fólie – viz obr. 8



Obr. 8: PHB fólie pro biodegradační test

b) PHB tvrzená fólie – viz obr. 9



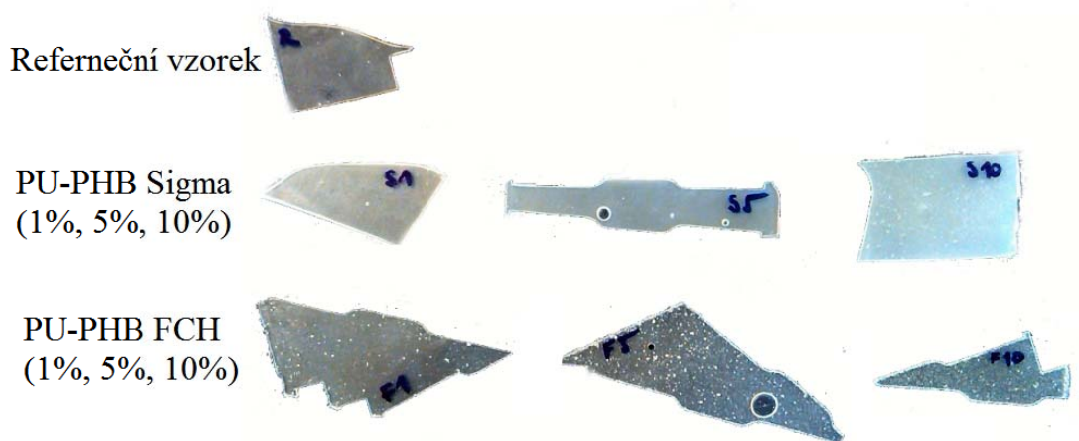
Obr. 9: PHB tvrzená fólie pro biodegradační test

c) PHB textilie – viz obr. 10



Obr. 10: PHB Nanoul textilie pro biodegradační test

d) Kopolymer PHB a polyuretanu (PU-PHB) – jednalo se o polyuretan, kdy část polyesterového polyolu byla nahrazena PHB (1, 5 a 10 % hm.) – viz obr. 11



Obr. 11: Referenční vzorek a vzorky PU-PHB pro biodegradační test

4.8.2 Podmínky experimentu

Ke správnému průběhu testu bylo nutné zabezpečit vhodné podmínky. Ty musely splňovat jak syntetický odpad, tak použitý reaktor, tak i samotný testovaný materiál.

4.8.2.1 *Syntetický odpad*

Jako inokulum byl použit domácí kompost jako zástupce klasických podmínek pro mírné pásmo. Dále byl kompost manuálně zbaven veškerých větších inertních objektů, jako jsou kusy dřeva, kamení atd. Použitý kompost by měl být čerstvý, tedy ne starší, než 4 měsíce.

Syntetický odpad byl připraven smícháním různých komponent v určitých poměrech, viz tab. 11.

Krmivo pro králíky by mělo obsahovat cca 15 % celulózy a okolo 20 % proteinů.

Celková hmotnost syntetického odpadu má být zalita takovým množstvím vody, aby výsledná hmotnost vody v odpadu byla 55 %. [8]

Tab. 11: Tabulka komponent a jejich procentuálního zastoupení v syntetickém odpadu [8]

Materiál	Hmotnost sušiny [%]
Piliny	40
Krmivo pro králíky	30
Zralý kompost	10
Kukuřičný škrob	10
Sacharóza	5
Kukuřičný olej	4
Močovina	1

4.8.2.2 *Reaktor*

Ideálním reaktorem k testování biodegradace polymeru pomocí kompostování by měl být box z polypropylenu s parametry v poměru 3:2:1 (délka:šířka:výška). Pro testování biodegradace byla jako reaktor použita potravinová dóza o parametrech 17,5x15x6,5 cm.

Jelikož je nutné, aby při testování byl obsah reaktoru aerován, ale přitom nedocházelo k velkému odpařování vody, je potřeba podélně reaktor perforovat. Např. při délce boxu 20 cm je z obou dvou stran proděravěna část dlouhá 6,5 cm o šířce 5 mm.

Takto připravený kontejner je zcela naplněn a pečlivě zavřen víkem pro zamezení odpařování vody. [8]

4.8.2.3 *Příprava testovaného materiálu*

Parametry testovaného materiálu závisí na velikosti použitého boxu, nejlépe by testovaný materiál měl být co největší, v našem případě byly použity PHB fólie, PHB tvrzená fólie a PHB textilie o parametrech 10x15 cm. U kopolymeru PU-PHB byly parametry dány předem, bylo ale na box použito větší množství materiálu.

Testovaný materiál byl vysušen, zvážen a těsně před vložením do boxů se syntetickým odpadem na 30 s namočen v destilované vodě – viz obr. 12. [8]



Obr. 12 Příprava boxů a PHB Nanoul textilie k experimentu

4.8.3 Experiment – termofilní inkubace

Boxy byly naplněny z poloviny syntetickým odpadem a byla vytvořena souvislá vrstva. Na tuto vrstvu byl položen namočený testovaný materiál v destilované vodě. Na takto připravený testovaný materiál byla položena další vrstva syntetického odpadu. Obsah nebyl nijak stlačován, jelikož bylo nutné zajistit dobrou přístupnost vzduchu do celého média. Box byl zalit destilovanou vodou, aby celková hmotnost vody v médiu byla 55 %. Box byl zvážen a uzavřen víkem. [8; 9]

4.8.3.1 Průběh termofilní inkubace

Ihned po uzavření byl box inkubován při 58 °C – viz obr. 13. Pro zabezpečení dobrého kompostovacího procesu bylo nutné zachovat vhodné podmínky prostředí, hlavně množství vody přítomné v médiu, promíchávání média, atd. viz tab. 12.

Při každém zásahu byl box zvážen a voda byla doplněna na objem buďto 100 %, 80 % nebo 70 % původní hmotnosti dle tab. 12

Pokud se médium mělo promíchávat, bylo nutné dbát vysoké opatrnosti a vyhnout se jakémukoliv mechanickému poškození testovaného materiálu. [8]

Tab. 12: Operace v průběhu termofilní inkubace kompostovacího procesu [8]

Čas [dny]	Operace
0	Zaznamenat původní hmotnost reaktoru
1, 2, 3, 4, 7, 9, 11, 14	Vážit reaktor a přidávat vodu na 100 % původní hmotnosti, promíchávat médium
8, 10, 16, 18, 21, 23, 25, 28	Vážit reaktor a přidávat vodu na 100 % původní hmotnosti, nepromíchávat médium
30, 45	Vážit reaktor a přidávat vodu na 80 % původní hmotnosti, promíchávat médium
30 – 60 (2x týdně)	Vážit reaktor a přidávat vodu na 80 % původní hmotnosti, nepromíchávat médium
60 – 90 (2x týdně)	Vážit reaktor a přidávat vodu na 70 % původní hmotnosti, nepromíchávat médium



Obr. 13: Termofilní inkubace testovaných materiálů v syntetickém odpadu

4.8.3.2 Monitorování experimentu

Monitorování experimentu bylo prováděno průměrně jedenkrát týdně, a to:

- a) vyjmutím a vyfocení testovaného materiálu
- b) kontrola barvy média
- c) kontrola změny oděru

4.8.3.3 Ukončení experimentu

Jakmile v médiu nebyla nalezena žádná rezidua testovaného materiálu, test byl ukončen.

Pokud by stále po 90 dnech kultivace nebyl viditelný biodegradační efekt, mohl by experiment dále pokračovat mezofilní inkubací.

Pokud by při pozitivním biodegradačním efektu byly zbytky zkoumaného materiálu objeveny, musela by být zjištěna míra biodegradability. Materiál by byl důkladně očištěn, promyt destilovanou vodou, vysušen a zvážen a hmotnost by byla odečtena od původní hmotnosti zkoumaného materiálu. Výsledná hodnota by byla vyjádřena v procentech. [8]

4.8.4 Stanovení počtu kultur v kompostu

Po ukončení experimentu bylo zjišťováno, jaké bakteriální druhy se nacházely v médiu používaném pro testování nejhojněji. Z každého boxu bylo odebráno část vzorku, který byl namočen do kádinky s destilovanou vodou. V průběhu luhování média byly přichystány 3 druhy agarových ploten s rozdílnými živinami, a to YPD médium (Yeast extract-peptone-dextrose broth), NB médium (Nutrient broth) a minerální médium viz tab. 13.

Tab. 13: Tabulka přípravy médií na agarové plotny

YPD médium		NB médium		Minerální médium	
Látka	Množství	Látka	Množství	Látka	Množství
Yeast extrakt	10 g	NB extrakt	25 g	NaNO ₃	2,0 g
Pepton	20 g	Agar	20 g	KH ₂ PO ₄	0,1 g
Glukóza	20 g	Destilovaná voda	1000 ml	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
Agar	15 g			KCl	0,5 g
Destilovaná voda	1000 ml			Glukóza	60 g
				Agar	20 g
				Destilovaná voda	1000 ml

Takto připravená média byla vysterylována v horké páře po dobu minimálně 30 minut. Poté byla rozlita v laminárním boxu do sterilních Petriho misek. Po dokonalém ztuhnutí byly na každou plotnu kápnuty tři kapky vyluhovaného média a rozetřeny hokejkou po celém povrchu agarové plotny. Poté byla Petriho miska utěsněna a ponechána inkubaci při 60 °C po dobu 24 hodin.

Po nárůstu biomasy byly různé kolonie kultivovány již jen na YPD médiu. Kultivace probíhala vždy odběrem jedné kolonie pomocí mikrobiální kličky a křížovým roztěrem převedeno na sterilní YPD agarovou plotnu. Po utěsnění Petriho misky byla kultura opět ponechána inkubaci při 60 °C po dobu 24 hodin. Pokud na agarové plotně narostlo více kultur, byl proces izolace opakován.

Po izolaci byly různé druhy bakteriálních mikroorganismů zkoumány pod mikroskopem při zvětšení 40krát.

4.9 Studium změn mechanických vlastností PU-PHB v průběhu kultivace

Studium mechanických vlastností v tahu bylo testováno na vzorcích PU-PHB obsahující PHB od firmy Sigma a na vzorcích s PHB připravených na Fakultě chemické VUT v Brně. Tahové zkoušky byly provedeny u vzorků, kde vliv biodegradace studován nebyl, poté u všech vzorků po 19 dnech biodegradačního testu a nakonec po ukončení biodegradačního testu.

Rozměry vzorků, tzv. dog-bones, byly v souladu s normou ISO 527-2/5B [68], tedy 35 mm dlouhé, v nejužší, tedy střední části dlouhé 10 mm, 2 mm široké a tloušťka byla 1 mm. Délka mezi svorkami byla 20 mm. Pro měření tloušťky a šířky bylo použito posuvné měřítko s přesností na 0,02 mm.

Tahové zkoušky byly provedeny na přístroji Zwick Z010/Roell. Měřicí hlava byla použita 500 N, rychlost testování bylo 10 mm/min s předpětím 0,1 N. Všechny testy probíhaly při laboratorní teplotě. Celé měření probíhalo v souladu s normou ISO 527-2/5A/50 [68]. Vzorky naměřené na začátku a po degradaci po 19 dnech biodegradačního testu byly testovány 5krát, po 2 měsících testu 4krát. Údaje byly zprůměrovány a vyhodnoceny se směrodatnou odchylkou.

5 Výsledky

5.1 Biodegradace PHB pomocí kultivace bakterie *Delftia acidovorans*

Stanovení probíhalo u bakterie *Delftia acidovorans* CCM 283 z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

Pro biodegradační stanovení enzymové aktivity byl studován rozdíl mezi biodegradací PHB fólie a PHB prášku. Pro studium bylo pracováno s 5 různými médii, z čeho 3 byly vzorky kontrolní, a to K1 obsahující vodu s PHB fólií, K2 obsahující médium s PHB fólií a K3 obsahující vodu s PHB práškem. Další dva vzorky už v sobě zahrnovaly bakterii *D. acidovorans* zaočkovanou z inokula, konkrétně vzorek M1 obsahující médium, PHB fólii a bakterii *D. acidovorans* a vzorek M2 obsahujícím médium, PHB prášek a bakterii *D. acidovorans*.

Studovány byly rozdíly v biodegradaci PHB fólie a PHB prášku a vhodnost použitých metod pro detekci enzymové aktivity.

5.1.1 Zavedení testu stanovení enzymové aktivity PHB depolymerázy

Stanovování enzymové aktivity PHB depolymerázy se uskutečnilo pomocí dvou metod, lišících se použitým pufrům a jejich koncentrací, dobou měření a výskytem Ca^{2+} iontů. První metodou (dále již jen metoda I) bylo měření uskutečněno s 20 mM fosfátovým pufrům o optimálním pH, bez přítomnosti Ca^{2+} iontů. Doba testování byla 15 minut s intervalem měření absorbance po 1 minutě. Druhým způsobem (dále již metoda II) bylo měření prováděno s 50 mM Tris-HCl pufrům s přítomností Ca^{2+} iontů a doba trvání testu byla 1 hodina s intervalem měření absorbance 5 minut.

Metoda I

Pro stanovení aktivity extracelulárních depolymeráz vylučovaných bakterií *D. acidovorans* bylo nutné nejdříve stanovit teplotní a pH optimum, při které má tento enzym největší účinnost. Byly vybrány teploty 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C a 50 °C, u pH optima byly měřené hodnoty pH 4, 6, 7, 8 a 10. Ve výsledcích jsou hodnoty teplotního optima poskytnuty pouze při 50 °C, jelikož jedině u této teploty měly měřené absorbance snižující se tendenci.

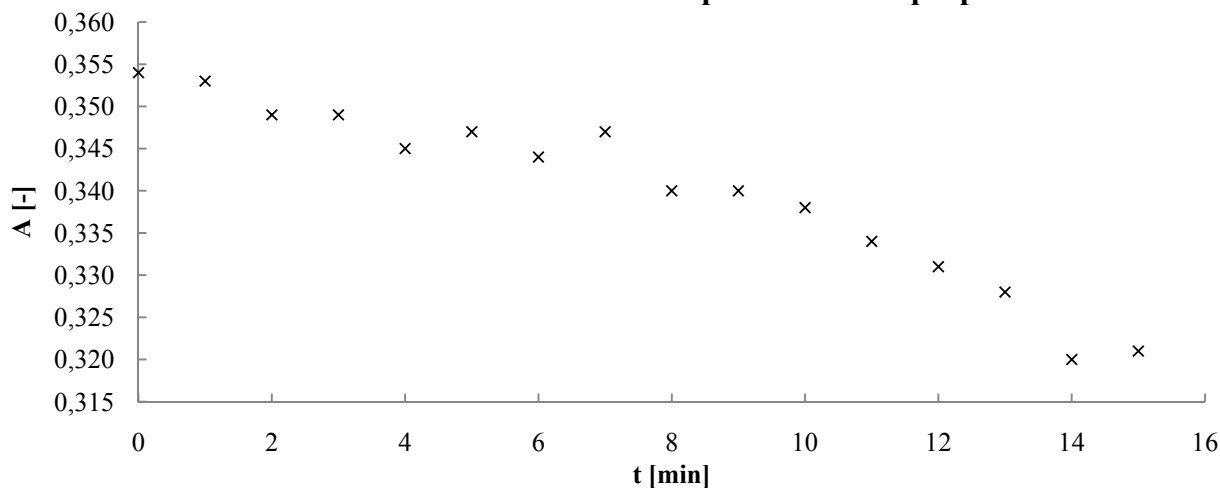
Tab. 14 obsahuje data naměřená pomocí ELISA Readeru pro vzorek M1, tedy média s PHB fólií a bakterií. Stejným způsobem byly měřeny i kontroly K1, K2 a K3, přičemž žádná nevykazovala enzymovou aktivitu, nebyl tedy u nich naměřen žádný pokles absorbance. Pokud byl u vzorku M1 naměřen nárůst absorbance, brala se tato hodnota jako nulová aktivita.

Tab. 14: Stanovení pH optima vzorku M1 při 50 °C

t [min]	pH 4		pH 6		pH 7		pH 8		pH 10	
	A	ΔA	A	ΔA	A	ΔA	A	ΔA	A	ΔA
0	0,298	0,000	0,376	0,026	0,354	0,033	0,474	0,008	0,335	0,000
1	0,294		0,378		0,353		0,478		0,334	
2	0,294		0,379		0,349		0,477		0,336	
3	0,290		0,378		0,349		0,473		0,340	
4	0,292		0,376		0,345		0,473		0,340	
5	0,294		0,374		0,347		0,470		0,341	
6	0,293		0,374		0,344		0,468		0,336	
7	0,292		0,373		0,347		0,466		0,340	
8	0,294		0,372		0,340		0,464		0,341	
9	0,297		0,373		0,340		0,465		0,339	
10	0,307		0,375		0,338		0,464		0,340	
11	0,302		0,373		0,334		0,461		0,341	
12	0,310		0,364		0,331		0,464		0,343	
13	0,310		0,362		0,328		0,465		0,344	
14	0,310		0,355		0,320		0,465		0,345	
15	0,314		0,350		0,321		0,466		0,346	

Nejvyšší pokles absorbance byl zjištěn u pH 7, a to o 0,033. U pH 4 a 10 byl stanoven nárůst absorbance, což indikuje, že nejen že při tomto pH nedocházelo k degradaci, byla ale i pravděpodobně měřena sedimentace či agregace PHB granulí v průběhu testu. Grafické znázornění měření při optimálních podmínkách je patrné z grafu 1.

Graf závislosti absorbance na čase pro vzorek M1 při pH 7



Graf 1: Závislost absorbance u vzorku M1 při optimálních podmínkách

Identické měření probíhalo i u vzorku M2, který obsahoval médium, 0,4995 g PHB prášku a bakterii *D. acidovorans*. Výsledky pH optima jsou patrné z tab. 15.

Tab. 15: Stanovení pH optima u vzorku M2 při 50 °C

t [min]	pH 4		pH 6		pH 7		pH 8		pH 10	
	A	ΔA	A	ΔA	A	ΔA	A	ΔA	A	ΔA
0	0,28	0,000	0,442	0,002	0,457	0,011	0,466	0,000	0,327	0,000
1	0,275		0,445		0,463		0,473		0,326	
2	0,274		0,444		0,449		0,466		0,324	
3	0,275		0,443		0,447		0,471		0,317	
4	0,271		0,442		0,448		0,470		0,319	
5	0,273		0,441		0,445		0,466		0,324	
6	0,278		0,440		0,446		0,469		0,33	
7	0,283		0,441		0,436		0,464		0,337	
8	0,281		0,442		0,440		0,467		0,336	
9	0,279		0,442		0,438		0,463		0,34	
10	0,284		0,441		0,438		0,467		0,341	
11	0,283		0,440		0,440		0,472		0,342	
12	0,287		0,441		0,442		0,472		0,341	
13	0,287		0,440		0,440		0,476		0,345	
14	0,289		0,440		0,439		0,477		0,347	
15	0,296		0,440		0,446		0,481		0,347	

V případě vzorku M2 bylo pH 7 jako optimální pH pro extracelulární depolymerázu bakterie *D. acidovorans* potvrzeno. U pH 4, 8 a 10 nebyla aktivita detekována žádná, opět byl naměřen nárůst absorbance, pravděpodobně způsobený sedimentací, a nebo agregací PHB granulí.

Metoda II

Pro stanovení aktivity extracelulárních depolymeráz vylučovaných bakterií *D. acidovorans* bylo nutné opět nejdříve stanovit teplotní a pH optimum, při které má tento enzym největší účinnost. Jako optimální hodnota teploty bylo určeno 50 °C, identicky, jako v případě minulém. U pH optima byly měřené hodnoty pH již pouze 6, 7 a 8, jelikož v závislosti na minulé metodě se potvrdilo, že pH 4 a 10 byly extrémní a degradace PHB při nich v žádném případě neprobíhala.

Výsledky potvrdily identické optimální podmínky, jako metoda I.

5.1.2 Stanovení enzymové aktivity PHB depolymerázy v průběhu kultivace bakterie *D. acidovorans*

Po stanovení pH optima pro vzorky M1 a M2 byla na ELISA Readeru při optimálních podmínkách měřena absorbance všech vzorků postupně odebíraných při kultivaci bakterie *D. acidovorans*.

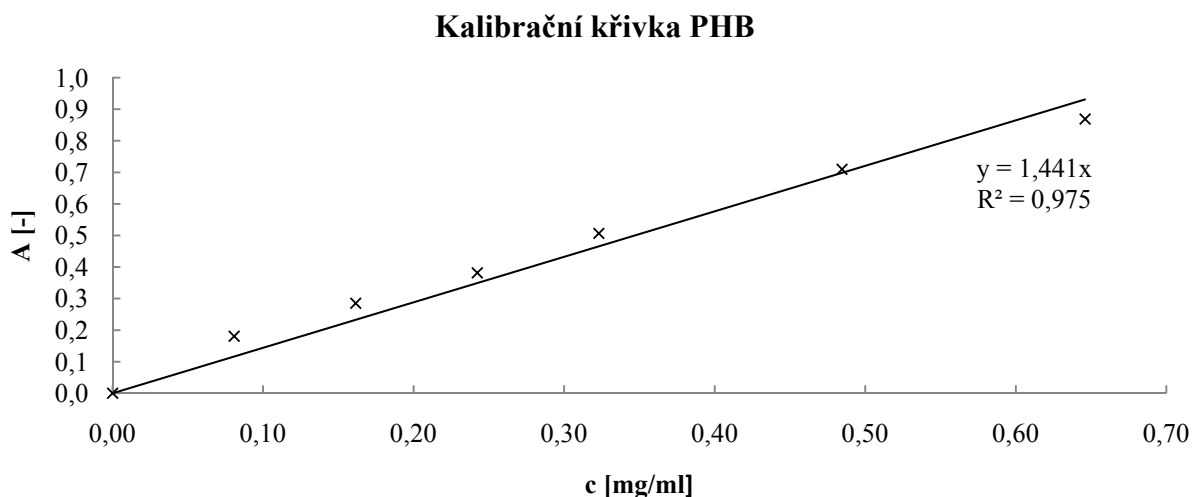
Pro výpočet depolymerázové aktivity z rozdílu absorbancí musela být nejprve stanovena kalibrační křivka závislosti koncentrace suspenze PHB granulí na absorbanci při 630 nm. Zásobní roztok byl připraven o koncentraci 0,8 mg/ml.

Navážka PHB prášku činila 0,0170 g, doplněna byla na 20 ml příslušným pufrům. Následným ředěním byl připraven rozsah koncentrací PHB v pufru od 0-0,8 mg/ml.

Z takto připravených roztoků bylo odebráno 190 μl do titrační jamky a přidáno 60 μl fosfátového pufru (náhrada za roztok enzymu). Celková koncentrace byla přepočítána na koncentraci PHB ve 250 μl , viz tab. 16:

Tab. 16: Kalibrační křivka PHB

c	A
[mg/ml]	[-]
0,00	0,000
0,08	0,181
0,16	0,285
0,24	0,382
0,32	0,507
0,48	0,710
0,65	0,869



Graf 2: Kalibrační křivka PHB pro výpočet aktivity bakterie *D. acidovorans*

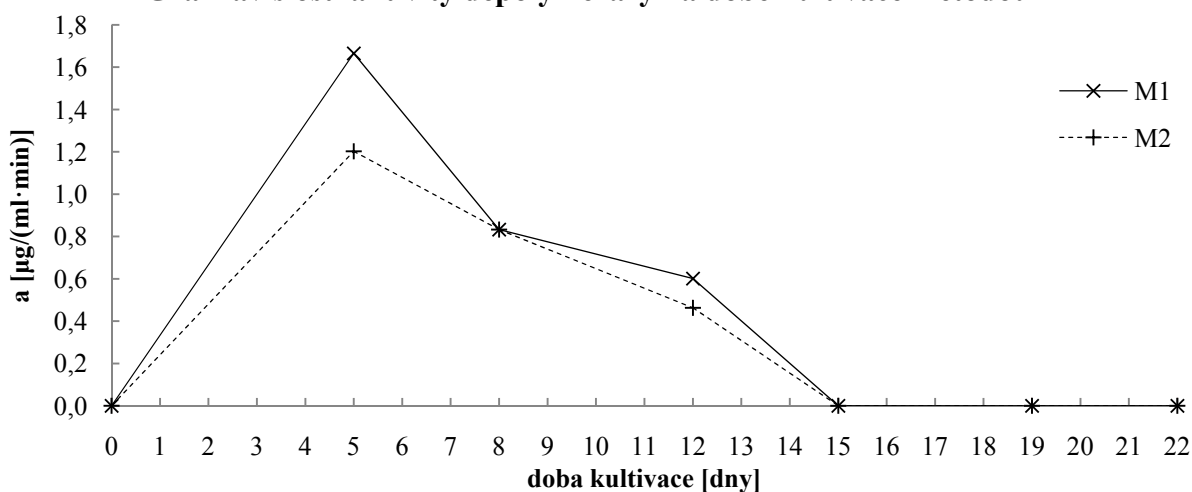
Metoda I

Kultivace bakterie *D. acidovorans* trvala 22 dnů, vzorky byly odebírány v intervalu cca 4 dnů, celkově bylo odběrů 6, viz tab. 17. U naměřených hodnot byl vypočítán rozdíl absorbance za měřený časový úsek 15 minut. Aktivita extracelulární depolymerázy bakterie *D. acidovorans* byla vypočítána jako rozdíl hmotnosti PHB (vypočítané pomocí regresní přímky $y=1,441x$) v roztoku při t_0 a na konci měření, tedy po 15 minutách. Výsledná koncentrace byla vztáhnuta na 1 ml. Aktivita depolymerázy je udaná jako úbytek PHB v $\mu\text{g/ml}$ za 1 minutu, tedy $[\mu\text{g}/(\text{ml} \cdot \text{min})]$.

Tab. 17: Hodnoty naměřených aktivit pro vzorky M1 a M2 v průběhu kultivace bakterie *D. acidovorans* pomocí metody I

		M1		M2	
Odběr:		ΔA	a	ΔA	a
[-]	[den]	[-]	[$\mu\text{g}/(\text{ml} \cdot \text{min})$]	[-]	[($\mu\text{g}/\text{ml} \cdot \text{min})$]
0	0	0,000	0,000	0,000	0,000
1	5	0,036	1,666	0,026	1,203
2	8	0,018	0,833	0,018	0,833
3	12	0,013	0,601	0,010	0,463
4	15	0,000	0,000	0,000	0,000
5	19	0,000	0,000	0,000	0,000
6	22	0,000	0,000	0,000	0,000

Graf závislosti aktivity depolymerázy na době kultivace metodou I



Graf 3: Aktivita depolymerázy pro vzorek M1 a M2 v průběhu kultivace bakterie *D. acidovorans*

Z naměřených hodnot je patrné, že bakterie *D. acidovorans* vylučovala extracelulární depolymerázu v počáteční fázi kultivace, konkrétně od počátku kultivace po dobu zhruba dvou týdnů. Nejvyšší aktivita enzymu byla naměřena v obou případech vzorku M1 i M2 5. den kultivace, další dny kultivace měly již aktivitu nižší, až do úplného vymizení enzymové aktivity. Průběh enzymové aktivity v závislosti na čase a stejně tak i naměřené hodnoty enzymové aktivity byly u obou vzorků velice podobné.

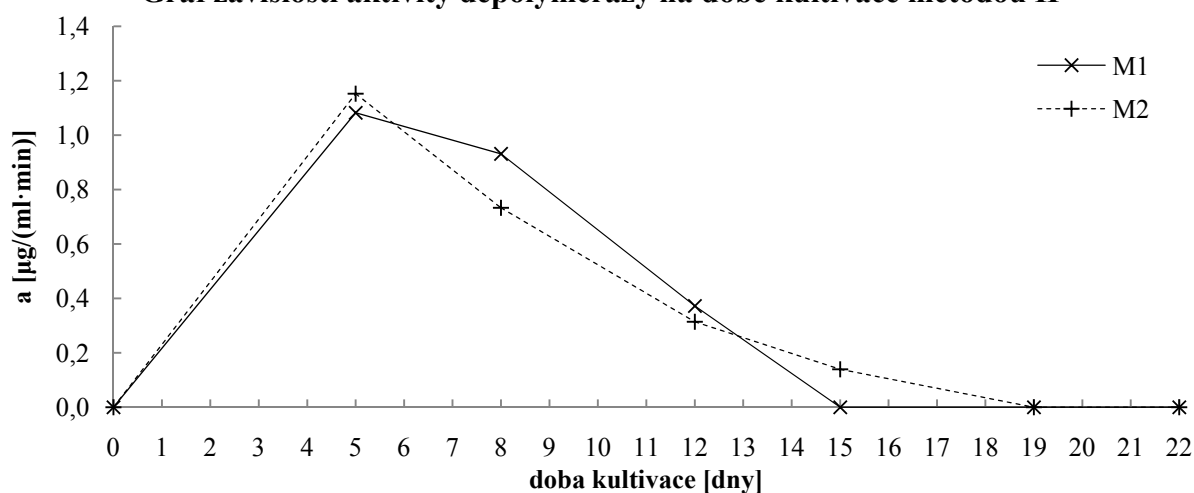
Metoda II

U naměřených hodnot, viz tab. 18 byl vypočítán rozdíl absorbance za měřený časový úsek 1 hodiny. Aktivita extracelulární depolymerázy bakterie *D. acidovorans* byla vypočítána jako rozdíl hmotnosti PHB (vypočítané pomocí regresní přímky, která byla sestrojena pro každý systém, a to $y=1,432x$) v roztoku při t_0 a na konci měření, tedy po 1 hodině. Výsledná koncentrace byla vztáhnuta na 1 ml. Aktivita depolymerázy je udána jako úbytek PHB v $\mu\text{g}/\text{ml}$ za 1 minutu, tedy [$\mu\text{g}/(\text{ml} \cdot \text{min})$].

Tab. 18: Hodnoty naměřených aktivit pro vzorky M1 a M2 v průběhu kultivace bakterie *D. acidovorans* pomocí metody II

		M1		M2	
Odběr		ΔA	a	ΔA	a
[–]	[den]	[–]	[$\mu\text{g}/(\text{ml} \cdot \text{min})$]	[–]	[$\mu\text{g}/(\text{ml} \cdot \text{min})$]
0	0	0,000	0,000	0,000	0,000
1	5	0,093	1,082	0,099	1,152
2	8	0,080	0,931	0,063	0,733
3	12	0,032	0,372	0,027	0,314
4	15	0,000	0,000	0,012	0,140
5	19	0,000	0,000	0,000	0,000
6	22	0,000	0,000	0,000	0,000

Graf závislosti aktivity depolymerázy na době kultivace metodou II



Graf 4: Aktivita depolymerázy pro vzorek M1 a M2 v průběhu kultivace bakterie *D. acidovorans*

Z naměřených hodnot je patrné, že metoda II potvrzuje, že bakterie *D. acidovorans* vylučovala extracelulární depolymerázu od počátku kultivace po dobu zhruba dvou týdnů. Nejvyšší aktivita enzymu byla naměřena v obou případech 5. den kultivace. U vzorku M2 byla detekována aktivita ještě 15. den kultivace. Vzorek M1 již v tento den neměl aktivitu žádnou.

5.1.2 Stanovení hmotnostního úbytku PHB

Kromě aktivity extracelulární PHB depolymerázy byl jako další parametr stanoven hmotnostní úbytek materiálu po ukončení kultivace. Kromě vzorků M1 a M2 bylo toto měření paralelně provedeno také u vzorků K1, K2 (PHB fólie) a K3 (PHB prášek), u nichž nebyla stanovena enzymová aktivita. Přesná hmotnost PHB fólií (K1, K2 a M1) a PHB prášku (K3 a M2) byla zjištěna před začátkem kultivace a po jejím ukončení. Rozdíl hmotností je uveden v tab. 19:

Tab. 19: Hmotnostní a procentuální úbytek PHB po ukončení kultivace bakterie *D. acidovorans*

Vzorek		Hmotnost před kultivací	Hmotnost po kultivaci	Úbytek hmotnosti	Úbytek hmotnosti
		[g]			[%]
K1	Kontrola (H ₂ O)	0,1109	0,1089	0,0020	1,8
K2	Kontrola (médium)	0,1213	0,1204	0,0009	0,7
M1	Vzorek s PHB fólií	0,1185	0,1172	0,0013	1,1
M2	Vzorek s PHB práškem	0,4995	0,3963	0,1032	20,7
K3	Kontrola (H ₂ O) s PHB práš.	0,5068	0,4048	0,1020	20,1



Obr. 14: PHB fólie použité pro kultivaci bakterie *D. acidovorans* (zleva K1, K2 a M1)



Obr. 15: PHB fólie po ukončení kultivace bakterie *D. acidovorans* (zleva K1, K2 a M1)

Z výsledků je patrné, že hmotnostní úbytek po kultivaci je celkově docela malý, po odečtu hodnot od kontrol jsou hodnoty hmotnostního úbytku pro PHB fólii 0,3 % a pro PHB prášek 0,6 %. U kontroly K1, tedy vody s PHB došlo při manipulaci s PHB fólií k mechanickému poškození, hmotnostní úbytek tedy činil větší procentuální hodnotu a od vzorku M1 byla odečítána kontrola M2, tedy médium s PHB fólií. Hmotnostní úbytky materiálů způsobené aktivitou bakterie *D. acidovorans* jsou tedy velice nízké a experimentálně stanovené hodnoty se pravděpodobně kryjí s experimentální chybou. Bakterie tedy sice dokáže využít PHB ve formě prášku i fólie, byl pozorován zákal média způsobený růstem kultury a také byla prokázána enzymová aktivita PHB depolymeráz. Nicméně za podmínek testu je proces degradace pomalý a neefektivní, takže jej pomocí tak hrubého parametru jako je hmotnostní úbytek materiálu nebylo možné zachytit.

5.1.3 Diskuse výsledků enzymové aktivity bakterie *Delftia acidovorans*

Bakterie *D. acidovorans* a její schopnost biodegradace PHB byla studována pomocí tří metod, a to dvěma odlišnými způsoby turbidimetrického stanovení a metodou hmotnostního úbytku. V tab. 20 je uvedeno porovnání všech tří metod. Dále byla stanovována molekulová

hmotnost vzorků po kultivaci. Výsledky jsou patrné z tab. 21, kdy M_n udává číselný střed molekulové hmotnosti, M_w je hmotnostní střed molekulové hmotnosti a PDI značí index polydisperzity, který se vypočítá jako podíl M_w/M_n .

Tab. 20: Porovnání výsledků enzymové aktivity I a II a hmotnostního úbytku pro vzorky M1 a M2

		M1 I	M1 II	M1 HÚ	M2 I	M2 II	M2 HÚ
Odběr:		a	a	m	a	a	m
[-]	[den]	[$\mu\text{g}/(\text{ml} \cdot \text{min})$]	[$\mu\text{g}/(\text{ml} \cdot \text{min})$]	[%]	[$\mu\text{g}/(\text{ml} \cdot \text{min})$]	[$\mu\text{g}/(\text{ml} \cdot \text{min})$]	[%]
0	0	0,000	0,000	0,3	0,000	0,000	0,6
1	5	1,666	1,082		1,203	1,152	
2	8	0,833	0,931		0,833	0,733	
3	12	0,601	0,372		0,463	0,314	
4	15	0,000	0,000		0,000	0,140	
5	19	0,000	0,000		0,000	0,000	
6	22	0,000	0,000		0,000	0,000	

Tab. 21: Studium molekulové hmotnosti po ukončení kultivace

Vzorek		M_n	M_w	PDI
1	Referenční	156900	271400	1.73
2	M1	132800	259300	1.95
3	M2	18230	49570	2.72

Z výsledků vyplývá, že metoda stanovení enzymové aktivity I je vhodná spíše pro zachycení vyšších hodnot aktivity PHB depolymerázy, než stanovení enzymové aktivity II. Bohužel, stanovení enzymové aktivity I již nedokázalo zjistit nižší aktivitu PHB depolymerázy, co se týče 15. dne kultivace u vzorku M2, kdy pro tak malé aktivity je doba měření 15 minut nedostatečná a pro detekci aktivity je nutná delší časová prodleva, kterou již ale dokáže detekovat metoda II. Celkově je pro stanovení depolymerázové aktivity u bakterie *D. acidovorans* vhodnější metoda II, jelikož tato bakterie vykazuje spíše nízkou depolymerázovou aktivitu, dává tak tato metoda přesnější výsledky.

Co se týče hmotnostního úbytku, jsou u této metody jistá negativa, která tuto metodu řadí ke spíše kontrolní metodě než metodě kvalitativně průkazné o PHB depolymerizační aktivitě. Hlavním negativem je u metody hmotnostního úbytku manipulace s PHB práškem. Při manipulaci s materiálem je velmi problematické a není možno reprodukovat identické zacházení s materiálem, už jen díky prostředí, ve kterém se nachází. Co se týče kontrol K1 a K2, zde je hlavními nesrovnalostmi absence mikrobiální aktivity, kdežto u vzorku M2 mikrobiální aktivita je a při ukončení kultivace je velice obtížné dokonale odseparovat zbylé kultury z PHB prášku, který se tak při gravimetrické analýze zdá těžší a celkový úbytek je poté nižší. Dalším negativem je nutnost odběru stejného množství PHB prášku při každé manipulaci, což je velmi obtížné hlavně díky nestejnorodé homogenitě dvou odlišných roztoků. Ovšem toto potenciální omezení se netýká PHB fólie, a tak v případě tohoto stanovení bude metoda při zamezení mechanického poškození fólie poskytovat kvalitativně lepší výsledky.

Výsledky analýzy molekulové hmotnosti prokázaly, že u vzorku exponovaných bakteriální kultury *D. acidovorans* je patrný pokles molekulové hmotnosti oproti

referenčnímu vzorku ($M_n = 156\,900$, $M_w = 271\,400$, $PDI = 1,73$) ze kterého byly materiály připraveny. Především tedy u vzorku M2 ($M_n = 18\,230$, $M_w = 49\,570$, $PDI = 2,72$) tedy u PHB prášku. Naproti tomu u fólie (vzorek M1, $M_n = 132\,800$, $M_w = 259\,300$, $PDI = 1,95$) byl pokles molekulové hmotnosti výrazně nižší. Je velice pravděpodobné, že rozdíl je dán odlišnou velikostí povrchů vzorků. PHB depolymeráza je schopna degradovat pouze povrch PHB materiálu, který byl u PHB prášku mnohonásobně vyšší než u PHB fólie.

Celkově lze shrnout, že bakterie *D. acidovorans* je schopna částečně degradovat PHB, což je potvrzeno jak turbidimetrickým stanovením enzymové aktivity, tak hmotnostním úbytkem a nakonec i analýzou změn molekulových hmotností.

5.2 Biodegradace PHB pomocí kultivace kvasinky *Aureobasidium pullulans*

Stanovení probíhalo u tří kmenů kvasinky *A. pullulans*, a to vždy ve dvou obměnách, prvním případem bylo zaočkování médium z připraveného inokula a druhé zaočkování médium přímo z agarové plotny.

První druh kvasinky byl použit *A. pullulans* CCM 8182, jehož zkratka se v této práci vyskytuje jako Ia (pro zaočkování z inokula) a Ib (pro zaočkování z agarové plotny), druhým případem je *A. pullulans* CCM F-148 s označením IIa a IIb a jako třetí bylo použito *A. pullulans* CCY 027-001-115 s označením IIIa a IIIb. Dále byly pro stanovení nutné kontroly, celkem byly připraveny dvě, první K1 obsahující vodu a PHB fólii, druhá K2 obsahující médium s PHB fólií.

Pro biodegradaci stanovení enzymové aktivity byla použita pouze PHB fólie. A studovány byly rozdíly v biodegradaci PHB fólie při zaočkování média inokulem či z agarové plotny.

5.2.1 Zavedení testu stanovení enzymové aktivity PHB depolymerázy

Metoda I

Pro stanovení aktivity extracelulárních depolymeráz vylučovaných kvasinkou *A. pullulans* bylo nejdříve stanovováno teplotní a pH optimum, za kterých má potenciální PHB depolymeráza největší aktivitu. Jako zástupce teplot byly vybrány teploty 30 °C, 40 °C, a 50 °C, u pH optima byly měřené hodnoty pH 4, 6, 7, 8 a 10. Pomocí této metody nebylo možné určit pH ani teplotní optimum. Tato metoda byla tedy označena jako nedostatečně citlivá pro stanovení aktivity extracelulárních depolymeráz kvasinky *A. pullulans*.

Metoda II

Pro druhou zvolenou metodu stanovení aktivity extracelulárních depolymeráz vylučovaných kvasinkou *A. pullulans* bylo nutné stanovit teplotní a pH optimum, při které má tento enzym největší účinnost. Jako optimální hodnota teploty bylo určeno 50 °C. U pH optima byly měřené hodnoty při pH 6, 7 a 8. Stanovení probíhalo u všech tří druhů kvasinky *A. pullulans*, v obou dvou obměnách, tedy vzorky Ia, Ib, IIa, IIb, IIIa a IIIb (a = zaočkováno z inokula, b = zaočkováno z agarové plotny). Identickým způsobem byly měřeny i kontroly K1 a K2.

Data naměřená pomocí ELISA Readeru pro vzorek Ia, tedy média, PHB fólie a kvasinky *A. pullulans* zaočkovány z inokula jsou zaznamenány v tab. 22. Měření probíhalo s 50 mM pufrům Tris-HCl s kationty Ca^{2+} a doba měření byla 1 hodina s intervalem měření absorbance 5 minut. Identicky byly měřeny i kontroly K1 a K2, přičemž ani jedna kontrola

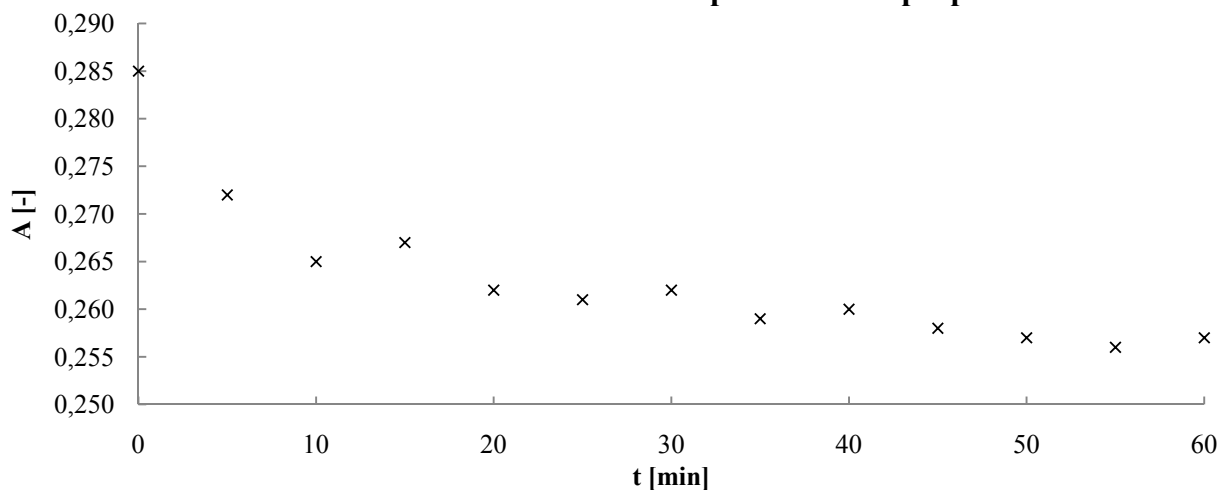
nevykazovala enzymovou aktivitu. Pokud byl u vzorků naměřen nárůst absorbance, brala se tato hodnota jako nulová aktivita.

Tab. 22: Stanovení pH optima vzorku Ia při 50 °C:

	pH 6		pH 7		pH 8	
t	A	ΔA	A	ΔA	A	ΔA
[min]	[-]					
0	0,285	0,028	0,268	0,001	0,332	0,000
5	0,272		0,275		0,340	
10	0,265		0,265		0,334	
15	0,267		0,270		0,341	
20	0,262		0,266		0,342	
25	0,261		0,260		0,345	
30	0,262		0,244		0,348	
35	0,259		0,260		0,355	
40	0,260		0,250		0,360	
45	0,258		0,249		0,366	
50	0,257		0,259		0,368	
55	0,256		0,252		0,379	
60	0,257		0,267		0,380	

V případě vzorku Ia bylo optimální pH při pH 6. Měření vzorku Ia při optimálních podmínkách je znázorněno v grafu 5.

Graf závislosti absorbance na čase pro vzorek Ia při pH 6



Graf 5: Závislost absorbance u vzorku Ia při optimálních podmínkách

Z důvodu velkého množství dat z pH optim jednotlivých vzorků jsou pH optima ostatních vzorků představena pouze ve formě tabulky s hodnotami absorbancí a vypočítaným rozdílem absorbancí určujícím optimum, viz tab.: 23, 24 a 25.

Tab. 23: Stanovení pH optima vzorku Ib při 50 °C:

t	pH 6		pH 7		pH 8	
	A	ΔA	A	ΔA	A	ΔA
[min]	[-]					
0	0,276	0,019	0,282	0,013	0,375	0,000
5	0,282		0,280		0,362	
10	0,273		0,270		0,351	
15	0,276		0,265		0,349	
20	0,265		0,265		0,362	
25	0,261		0,266		0,375	
30	0,264		0,269		0,381	
35	0,257		0,267		0,392	
40	0,254		0,267		0,406	
45	0,253		0,268		0,419	
50	0,248		0,268		0,433	
55	0,249		0,269		0,440	
60	0,257		0,269		0,453	

V případě vzorku Ib bylo optimální pH při pH 6, což potvrzuje správnost měření vzorku I, který se liší pouze způsobem zaočkování média.

Tab. 24: Stanovení pH optima vzorku IIa a IIb při 50 °C

Tab. 27. Stanovení pH optimálního vzorku Na a Ks pH 50 °C													
IIa	pH 6		pH 7		pH 8		IIb	pH 6		pH 7		pH 8	
t	A	ΔA	A	ΔA	A	ΔA		A	ΔA	A	ΔA	A	ΔA
[min]	[-]							[-]					
0	0,279	0,039	0,254	0,000	0,381	0,000	0,311	0,007	0,358	0,000	0,345	0,000	
5	0,283		0,255		0,378		0,310		0,340		0,353		
10	0,274		0,261		0,370		0,319		0,337		0,359		
15	0,270		0,254		0,360		0,318		0,343		0,374		
20	0,254		0,265		0,366		0,310		0,357		0,365		
25	0,254		0,270		0,377		0,294		0,364		0,376		
30	0,264		0,275		0,383		0,298		0,371		0,381		
35	0,241		0,280		0,391		0,297		0,368		0,374		
40	0,242		0,282		0,400		0,304		0,364		0,384		
45	0,238		0,278		0,399		0,303		0,374		0,368		
50	0,237		0,285		0,404		0,306		0,382		0,381		
55	0,237		0,282		0,409		0,291		0,386		0,376		
60	0,240		0,287		0,418		0,304		0,380		0,387		

Tab. 25: Stanovení pH optima vzorku IIIa a IIIb při 50 °C

IIIa	pH 6		pH 7		pH 8		IIIb	pH 6		pH 7		pH 8	
t	A	ΔA	A	ΔA	A	ΔA		A	ΔA	A	ΔA	A	ΔA
[min]	[-]												
0	0,262	0,022	0,232	0,006	0,354	0,000		0,254	0,063	0,305	0,055	0,372	0,062
5	0,248		0,230		0,362			0,223		0,275		0,369	
10	0,244		0,230		0,363			0,242		0,272		0,360	
15	0,238		0,226		0,360			0,232		0,280		0,344	
20	0,234		0,223		0,364			0,202		0,288		0,346	
25	0,242		0,222		0,367			0,219		0,270		0,338	
30	0,248		0,219		0,377			0,206		0,259		0,337	
35	0,245		0,222		0,391			0,204		0,256		0,335	
40	0,238		0,231		0,395			0,204		0,274		0,329	
45	0,251		0,231		0,378			0,208		0,268		0,326	
50	0,244		0,234		0,379			0,199		0,278		0,319	
55	0,254		0,227		0,371			0,195		0,277		0,317	
60	0,240		0,226		0,358			0,191		0,250		0,310	

V případě všech vzorků kvasinky *A. pullulans* bylo změřeno pH optimum při pH 6. U vzorků I a II byla naměřena menší rozdíl absorbancí u vzorků zaočkovaných z agarové plotny, což se dá vysvětlit tím, že kvasinky neměli dostatek živin k růstu, kdežto při zaočkování z inokula měly kvasinky alespoň na počátku kultivace zásobu živin pocházející z inokula a byly schopny tak lépe růst a produkovat větší množství enzymu. U druhu III byla situace opačná, tedy větší rozdíl absorbance byl naměřen u vzorku zaočkovaného z agarové plotny.

5.2.2 Stanovení enzymové aktivity PHB depolymerázy v průběhu kultivace kvasinky *A. pullulans*

Po stanovení pH optima pro vzorky I, II a III byla na ELISA Readeru při optimálních podmínkách měřena absorbance všech vzorků postupně odebíraných při kultivaci.

Pro výpočet depolymerázové aktivity z rozdílu absorbancí byla opět stanovena kalibrační křivka, identicky, jako v předchozím případě.

Kultivace kvasinky *A. pullulans* probíhala 24 dnů s průběžnými odběry po 2-3 dnech. Celkový počet odběrů byl 8, viz tab. 26 a 27. U naměřených hodnot byl vypočítán rozdíl absorbance za měřený časový úsek 1 hodiny, viz tab. 26 a 27. Aktivita extracelulární depolymerázy kvasinky *A. pullulans* byla vypočítána jako rozdíl hmotnosti PHB (vypočítané pomocí regresní přímky $y = 1,444x$) v roztoku při t_0 a na konci měření po 1 hodině. Výsledná koncentrace byla vztažena na 1 ml. Aktivita depolymerázy je udána jako úbytek PHB v $\mu\text{g/ml}$ za 1 minutu, tedy $[\mu\text{g}/(\text{ml} \cdot \text{min})]$. Graficky znázorněný průběh enzymové aktivity je viditelný v grafech 6, 7 a 8.

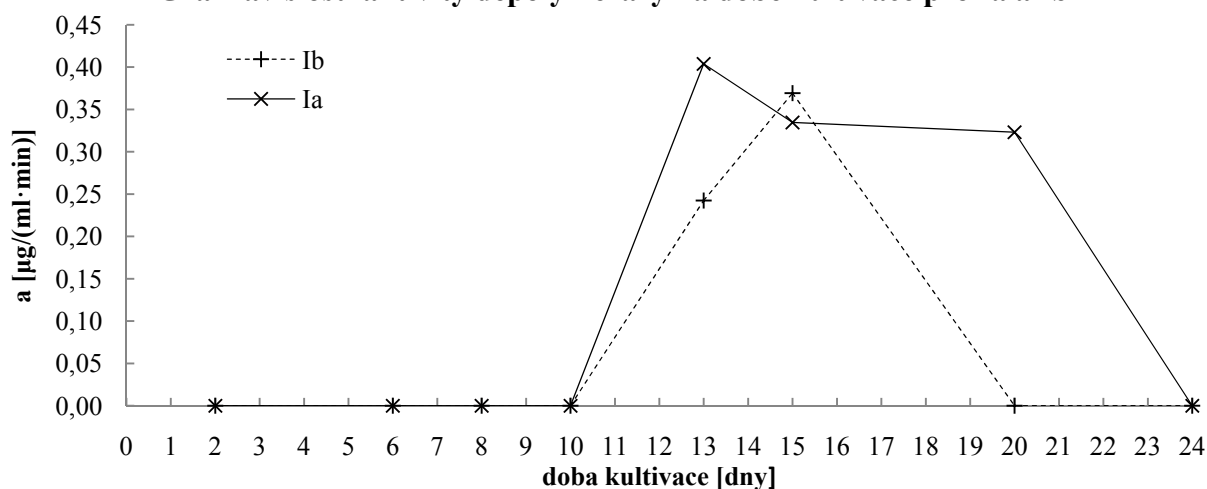
Tab. 26: Hodnoty naměřených aktivit pro vzorky Ia, Ib a IIa v průběhu kultivace kvasinky *A. pullulans* pomocí metody stanovení enzymové aktivity II

		Ia		Ib		IIa	
Odběr		ΔA	a	ΔA	a	ΔA	a
[-]	[den]	[-]	[$\mu\text{g}/(\text{ml} \cdot \text{min})$]	[-]	[$\mu\text{g}/(\text{ml} \cdot \text{min})$]	[-]	[$\mu\text{g}/(\text{ml} \cdot \text{min})$]
1	2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	6	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	10	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
5	13	0,035	0,404	0,021	0,242	0,037	0,427
6	15	0,029	0,335	0,032	0,369	0,017	0,196
7	20	0,028	0,323	0,000	0,000	0,000	0,000
8	24	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Tab. 27: Hodnoty naměřených aktivit pro vzorky IIb, IIIa a IIIb v průběhu kultivace kvasinky *A. pullulans* pomocí metody stanovení enzymové aktivity II

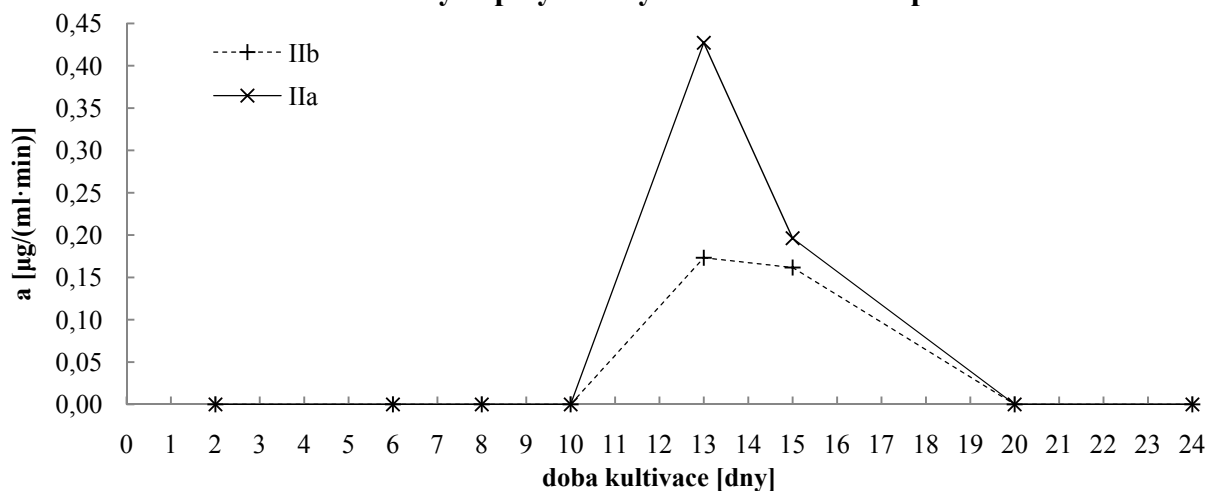
		IIb		IIIa		IIIb	
Odběr		ΔA	a	ΔA	a	ΔA	a
[-]	[den]	[-]	[$\mu\text{g}/(\text{ml} \cdot \text{min})$]	[-]	[$\mu\text{g}/(\text{ml} \cdot \text{min})$]	[-]	[$\mu\text{g}/(\text{ml} \cdot \text{min})$]
1	2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	6	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	10	0,000	0,000	0,000	0,000	0,052	0,600
5	13	0,015	0,173	0,041	0,473	0,044	0,508
6	15	0,014	0,162	0,026	0,300	0,073	0,843
7	20	0,000	0,000	0,025	0,289	0,068	0,785
8	24	0,000	0,000	0,000	0,000	0,059	0,681

Graf závislosti aktivity depolymerázy na době kultivace pro Ia a Ib



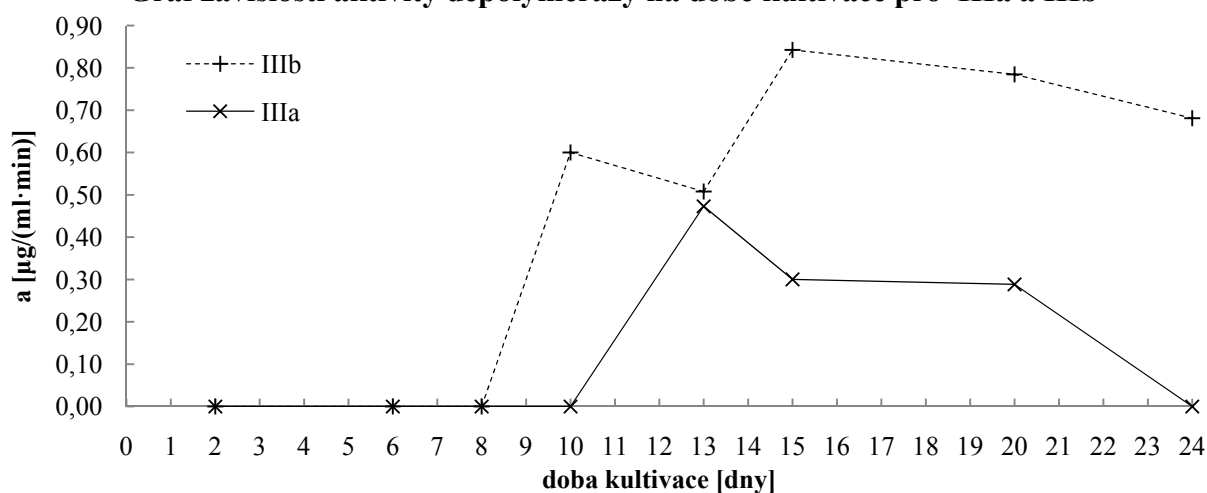
Graf 6: Aktivita depolymerázy vzorku Ia a Ib v průběhu kultivace

Graf závislosti aktivity depolymerázy na době kultivace pro IIa a IIb



Graf 7: Aktivita depolymerázy pro vzorek IIa a IIb v průběhu kultivace

Graf závislosti aktivity depolymerázy na době kultivace pro IIIa a IIIb



Graf 8: Aktivita depolymerázy pro vzorek IIIa a IIIb v průběhu kultivace

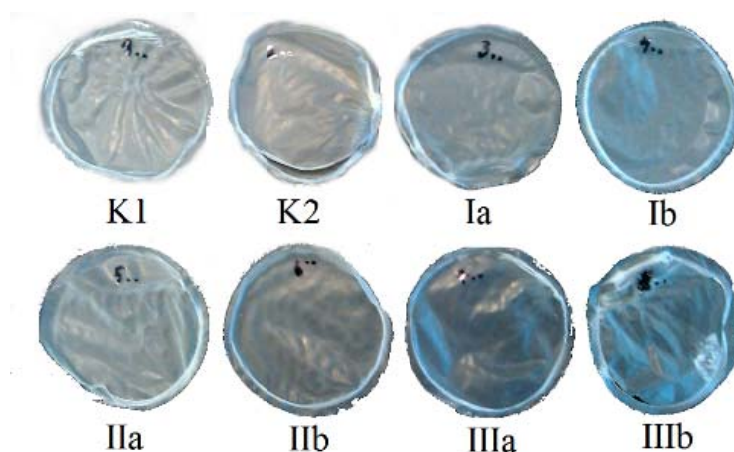
Z naměřených hodnot je patrné, že metoda stanovení enzymové aktivity II potvrzuje, že kvasinka *A. pullulans* vylučovala extracelulární depolymerázu v největším množství mezi 13-15. dny kultivace. Vzorky zaočkované z inokula vykazovaly vyšší aktivitu depolymeráz než vzorky zaočkované přímo z agarové plotny až na vzorek IIIb.

5.2.3 Stanovení hmotnostního úbytku PHB

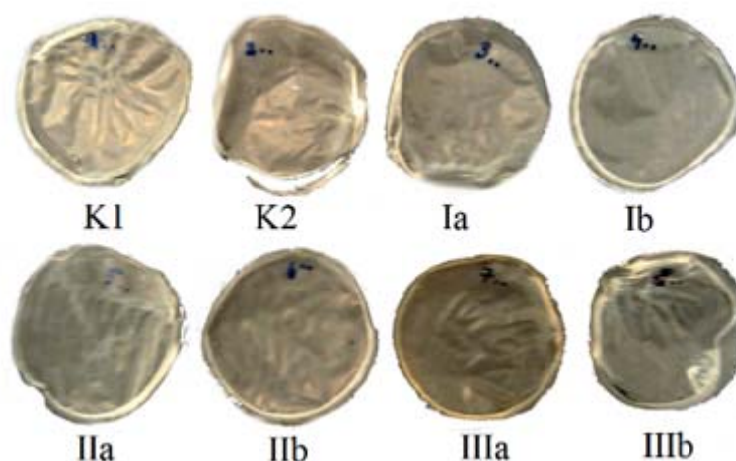
Přesná hmotnost PHB fólií byla zjištěna před začátkem kultivace a po jejím ukončení. Hmotnostní úbytek je uveden v tab. 28:

Tab. 28: Hmotnostní a procentuální úbytek PHB po ukončení kultivace kvasinky *A. pullulans*

Vzorek	Hmotnost před kultivací	Hmotnost po kultivaci	Úbytek hmotnosti	Úbytek hmotnosti	Úbytek po odečtu kontrol
	[g]		[%]		
K1	0,1116	0,1112	0,0004	0,4	
K2	0,1123	0,1111	0,0012	1,1	
I a	0,1130	0,1084	0,0046	4,1	3,4
I b	0,1119	0,1080	0,0039	3,5	2,8
II a	0,1286	0,1230	0,0056	4,4	3,6
II b	0,1321	0,1272	0,0049	3,7	3,0
III a	0,1213	0,1167	0,0046	3,8	3,1
III b	0,1231	0,1213	0,0018	1,5	0,7



Obr. 16: PHB fólie použité pro kultivaci kvasinky *A. pullulans*



Obr. 17: PHB fólie po ukončení kultivace kvasinky *A. pullulans*

Z výsledků je patrné, že hmotnostní úbytek po kultivaci je celkově malý, po odečtu zprůměrovaných hodnot kontrol jsou hodnoty hmotnostního úbytku vždy vyšší u kultury zaočkované z inokula, což podporuje teorii, že zaočkované kultury rovnou z agarové plotny neměly dostatek živin ke svému růstu, a tak nebyly schopny tak účinně degradovat PHB fólii.

5.2.4 Diskuse výsledků enzymové aktivity kvasinky *Aureobasidium pullulans*

Kvasinka *A. pullulans* a její schopnost biodegradace PHB byla studována pomocí dvou metod, a to turbidimetrickým stanovením enzymové aktivity PHB depolymerázy a metodou hmotnostního úbytku. V tab. 29 a 30 je uvedeno porovnání těchto metod. Dále byla stanovována molekulová hmotnost vzorků po kultivaci. Výsledky jsou patrné z tab. 31, kdy zkratka M_n udává číselný střed molekulové hmotnosti, M_w je hmotnostní střed molekulové hmotnosti a PDI značí index polydisperzity, který se vypočítá jako podíl M_w/M_n .

Tab. 29: Porovnání výsledků metody II a hmotnostního úbytku pro vzorky Ia, Ib, IIa a IIb

Odběr		Ia		Ib		IIa		IIb	
[-]	[dny]	a	m	a	m	a	m	a	m
		[$\mu\text{g}/(\text{ml}\cdot\text{min})$]	[%]	[$\mu\text{g}/(\text{ml}\cdot\text{min})$]	[%]	[$\mu\text{g}/(\text{ml}\cdot\text{min})$]	[%]	[$\mu\text{g}/(\text{ml}\cdot\text{min})$]	[%]
1	2	0,000	3,4	0,000	2,8	0,000	3,6	0,000	3,0
2	6	0,000		0,000		0,000		0,000	
3	8	0,000		0,000		0,000		0,000	
4	10	0,000		0,000		0,000		0,000	
5	13	0,404		0,242		0,427		0,173	
6	15	0,335		0,369		0,196		0,162	
7	20	0,323		0,000		0,000		0,000	
8	24	0,000		0,000		0,000		0,000	

Tab. 30: Porovnání výsledků metody II a hmotnostního úbytku pro vzorky IIIa a IIIb

Odběr		IIIa		IIIb	
[-]	[dny]	a	m	a	m
		[$\mu\text{g}/(\text{ml}\cdot\text{min})$]	[%]	[$\mu\text{g}/(\text{ml}\cdot\text{min})$]	[%]
1	2	0,000	3,1	0,000	0,7
2	6	0,000		0,000	
3	8	0,000		0,000	
4	10	0,000		0,600	
5	13	0,473		0,508	
6	15	0,300		0,843	
7	20	0,289		0,785	
8	24	0,000		0,681	

Tab. 31: Studium molekulové hmotnosti po ukončení kultivace

Vzorek		M_n	M_w	PDI
1	Referenční	156900	271400	1.73
2	Ia	117200	222800	1.90
3	Ib	187280	373920	2.00
4	IIa	170900	353800	2.07
5	IIb	145740	278180	1.91
6	IIIa	142550	254600	1.79
7	IIIb	202680	261200	1.29

Z výsledků vyplývá, že metoda stanovení enzymové aktivity I je nevhodná, jelikož doba měření 15 minut je pro velmi malé aktivity nedostatečná. Co se týče stanovení enzymové

aktivity II, depolymerázová aktivita je již zaznamenána díky době měření, která trvá 1 hodinu. Celkově je pro stanovení depolymerázové aktivity *A. pullulans* vhodná metoda II, jelikož kvasinka *A. pullulans* vykazuje nízkou depolymerázovou aktivitu. Aktivní enzym byl detekován až od 13. dne kultivace a tato aktivita se udržela až do dne 15., u některých vzorků i do 20. Po této době již zase žádná aktivita detekována nebyla a je pravděpodobné, že mikroorganismus již nebyl na konci kultivace životaschopný.

Co se týče hmotnostního úbytku, došlo u každého vzorku ke snížení hmotnosti PHB fólie na konci kultivace. Metoda hmotnostního úbytku je ale značně nepřesná v případě velmi malého rozdílu hmotností, jelikož v průběhu kultivace může docházet k různým mechanickým namáháním materiálu, které nakonec nemusely mít souvislost s degradací materiálu pomocí enzymů. U každého druhu kvasinky byl pokles větší u vzorku zaočkovaného inokulem. U vzorku IIb je možné, že se vyskytla kontaminace.

Na rozdíl od bakteriální kultury nebyl u žádného vzorku PHB materiálu exponovaného kvasince *A. pullulans* pozorovaný výrazný úbytek molekulové hmotnosti materiálu. Tady skutečnost společně s nízkou aktivitou PHB depolymerázy dokládá nízkou biodegradční aktivitu kvasinky vůči materiálům na bázi PHB.

V porovnání s bakterií *D. acidovorans* dosahuje kvasinka mnohem nižších hodnot naměřených aktivit a nebyl také u žádného vzorku PHB materiálu exponovaného kvasince *A. pullulans* pozorovaný výrazný úbytek molekulové hmotnosti materiálu. Celkově lze tedy shrnout, že *A. pullulans* má velmi nízkou aktivitu depolymeráz, je tedy diskutabilní, jestli se dá tato aktivita považovat za schopnost částečné degradace PHB nebo je-li aktivita tak nízká, že kvasinka není schopna PHB degradovat.

5.3 Biodegradace PHB pomocí kultivace plísně *Aspergillus fumigatus*

Stanovení probíhalo u plísně druhu *A. fumigatus* izolované na Fakultě chemické VUT v Brně.

Pro biodegradční stanovení enzymové aktivity byl studován rozdíl mezi biodegradací PHB fólie a PHB prášku. Pro studium bylo pracováno s 5 různými médii, z čeho 3 byly vzorky kontrolní, a to K1 obsahující vodu s PHB fólií, K2 obsahující médium s PHB fólií a K3 obsahující vodu s PHB práškem. Další dva vzorky v sobě zahrnovaly ještě plíseň *A. fumigatus* zaočkovanou z inokula, konkrétně vzorek P1 obsahující médium, PHB fólii a plíseň *A. fumigatus* a vzorek P2 obsahujícím médium, PHB prášek a plíseň *A. fumigatus*.

Studovány byly rozdíly v biodegradaci PHB fólie a PHB prášku a vhodnost použitých metod pro detekci enzymové aktivity.

5.3.1 Zavedení testu stanovení enzymové aktivity PHB depolymerázy

Metoda I

Pro stanovení aktivity extracelulárních depolymeráz vylučovaných plísní *A. fumigatus* bylo nutné nejdříve stanovit pH optimum, při kterém má tento enzym nejvyšší účinnost. Jako zástupce pH optima byly měřeny hodnoty pH 4, 6, 7, 8 a 10. Jako optimální teplota bylo opět zvoleno 50 °C.

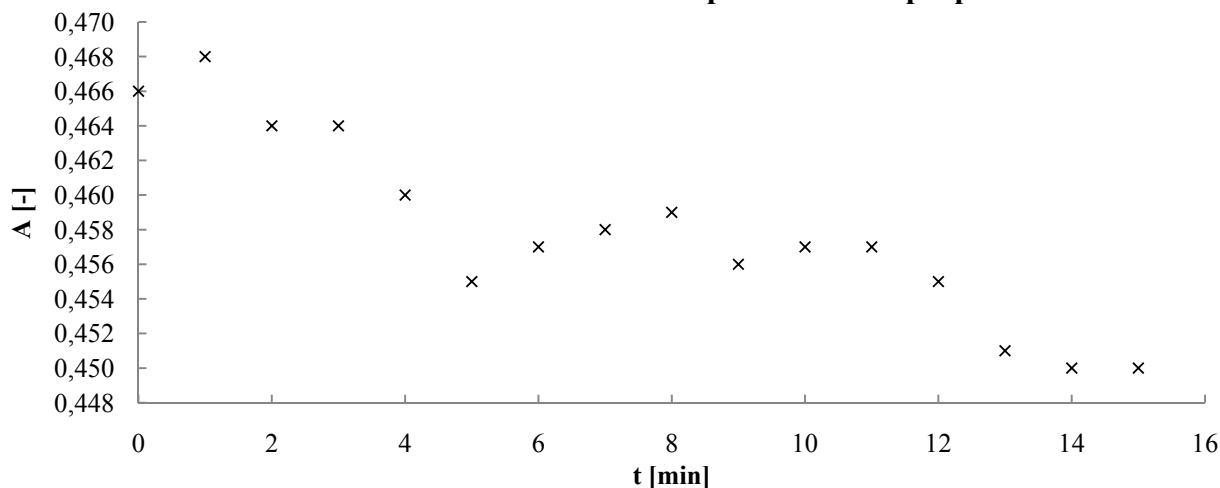
Tab. 32 obsahuje data naměřená pomocí ELISA Readeru pro vzorek P1, tedy média s PHB fólií a plísní *A. fumigatus*. Stejným způsobem byly měřeny i kontroly K1, K2 a K3, přičemž žádná nevykazovala enzymovou aktivitu. Pokud byl u vzorků naměřen nárůst absorbance, brala se tato hodnota jako nulová aktivita.

Tab. 32: Stanovení pH optima vzorku P1 při 50 °C

t	pH 4		pH 6		pH 7		pH 8		pH 10	
	A	ΔA	A	ΔA	A	ΔA	A	ΔA	A	ΔA
[min]	[-]									
0	0,270		0,479		0,476		0,466		0,316	
1	0,271		0,477		0,474		0,468		0,329	
2	0,272		0,476		0,470		0,464		0,333	
3	0,273		0,474		0,471		0,464		0,324	
4	0,272		0,471		0,473		0,460		0,332	
5	0,275		0,471		0,473		0,455		0,336	
6	0,272		0,474		0,470		0,457		0,330	
7	0,277		0,473		0,470		0,458		0,325	
8	0,279		0,475		0,465		0,459		0,328	
9	0,282		0,471		0,469		0,456		0,324	
10	0,289		0,468		0,468		0,457		0,321	
11	0,281		0,470		0,465		0,457		0,319	
12	0,280		0,471		0,466		0,455		0,319	
13	0,281		0,470		0,465		0,451		0,321	
14	0,284		0,468		0,465		0,450		0,319	
15	0,278		0,468		0,464		0,450		0,319	

Nejvyšší pokles absorbance byl zjištěn u pH 8, a to o 0,016. U pH 4 a 10 byl stanoven nárůst absorbance, což může být způsobeno sedimentací, a nebo agregací PHB granulí v průběhu testu, k degradaci PHB tedy nedocházelo. Grafické znázornění měření při optimálních podmínkách je patrné z grafu 9.

Graf závislosti absorbance na čase pro vzorek P1 při pH 8



Graf 9: Závislost absorbance u vzorku P1 při optimálních podmínkách

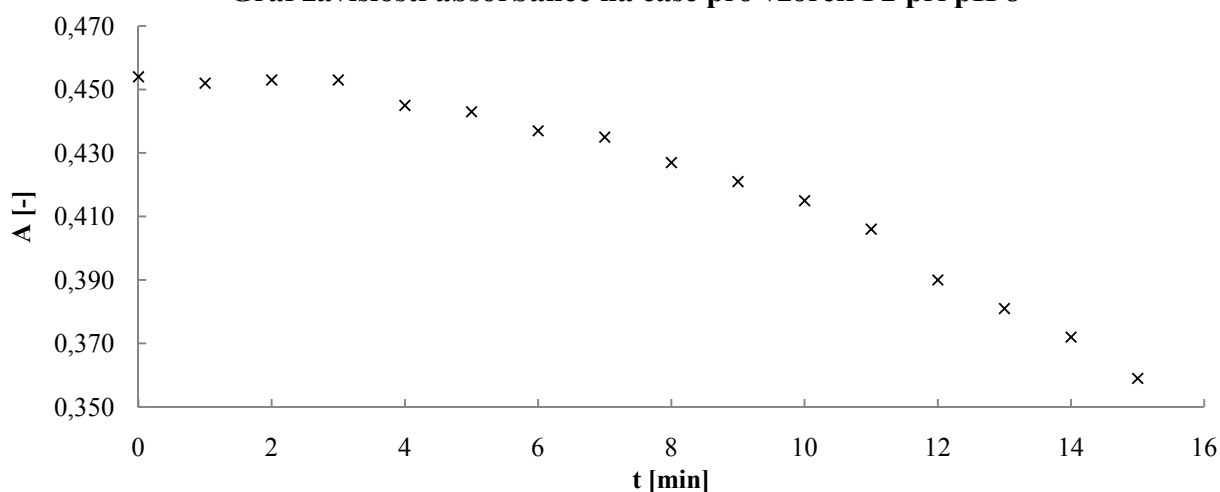
Identické měření probíhalo i u vzorku P2, který obsahoval médium, 0,5160 g PHB prášku a plíseň *A. fumigatus*. Výsledky pH optima jsou patrné z tab. 33.

Tab. 33: Stanovení pH optima u vzorku P2 při 50 °C

t	pH 4		pH 6		pH 7		pH 8		pH 10	
	A	ΔA	A	ΔA	A	ΔA	A	ΔA	A	ΔA
[min]	[-]									
0	0,254	0,000	0,462	0,048	0,462	0,060	0,454	0,095	0,293	0,039
1	0,260		0,456		0,454		0,452		0,299	
2	0,269		0,453		0,458		0,453		0,298	
3	0,268		0,458		0,455		0,453		0,300	
4	0,268		0,458		0,450		0,445		0,298	
5	0,265		0,454		0,443		0,443		0,297	
6	0,267		0,450		0,448		0,437		0,296	
7	0,265		0,454		0,444		0,435		0,296	
8	0,263		0,443		0,439		0,427		0,289	
9	0,264		0,446		0,430		0,421		0,287	
10	0,260		0,443		0,430		0,415		0,285	
11	0,256		0,448		0,425		0,406		0,276	
12	0,257		0,434		0,416		0,390		0,273	
13	0,261		0,412		0,410		0,381		0,270	
14	0,258		0,403		0,408		0,372		0,261	
15	0,261		0,414		0,402		0,359		0,254	

V případě vzorku P2 bylo pH 8 jako optimální pH potvrzeno pro extracelulární depolymerázu plísně *A. fumigatus*. U pH 4 nebyla aktivita detekována žádná, opět byl naměřen nárůst absorbance, pravděpodobně způsobený sedimentací PHB. Jednotlivá měření vzorku P2 při různých hodnotách pH jsou znázorněna v grafu 10.

Graf závislosti absorbance na čase pro vzorek P2 při pH 8



Graf 10: Závislost absorbance u vzorku P2 při optimálních podmínkách

Metoda II

Druhou metodou bylo opět stanovováno pH optimum. Hodnoty pH byly měřené pH již pouze 6, 7 a 8, jelikož v závislosti na minulé metodě se potvrdilo, že pH 4 a 10 byly opět extrémní a degradace PHB při nich neprobíhala.

Tato metoda potvrdila optimální podmínky PHB depolymerázy, jako metoda I.

5.3.2 Stanovení enzymové aktivity PHB depolymerázy v průběhu kultivace plísně *A. fumigatus*

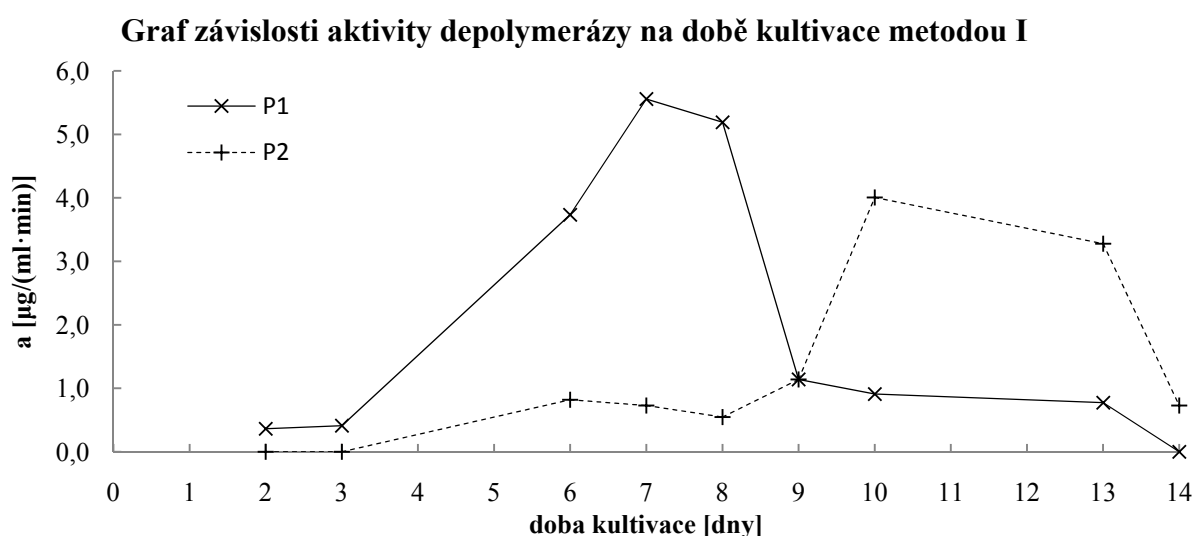
Po stanovení pH optima pro vzorky P1 a P2 byla na ELISA Readeru při optimálních podmínkách měřena absorbance všech vzorků postupně odebíraných při kultivaci bakterie *D. acidovorans*.

Pro výpočet depolymerázové aktivity z rozdílu absorbancí byla stanovena kalibrační křivka identicky, jako v minulých případech.

Kultivace plísně *A. fumigatus* trvala 14 dnů, vzorky byly odebírány v intervalu 1 dne, celkově bylo odběrů 9, viz tab. 34. U naměřených hodnot byl vypočítán rozdíl absorbance za měřený časový úsek 15 minut (1 hodiny). Aktivita extracelulární depolymerázy plísně *A. fumigatus* byla vypočítána jako rozdíl hmotnosti PHB (vypočítané pomocí regresní přímky $y = 1,454x$) v roztoku při t_0 a na konci měření, tedy po 15 minutách (1 hodině). Výsledná koncentrace byla vztažena na 1 ml. Aktivita PHB depolymerázy je udána jako úbytek PHB v $\mu\text{g/ml}$ za 1 minutu, tedy $[\mu\text{g}/(\text{ml}\cdot\text{min})]$.

Tab. 34: Hodnoty naměřených aktivit pro vzorky P1 (PHB fólie) a P2 (PHB prášek) v průběhu kultivace plísně *A. fumigatus* pomocí metody I

		P1		P2	
Odběry		ΔA	a	ΔA	a
[-]	[den]	[-]	$[\mu\text{g}/(\text{ml}\cdot\text{min})]$	[-]	$[\mu\text{g}/(\text{ml}\cdot\text{min})]$
1	2	0,008	0,476	0,000	0,000
2	3	0,009	0,536	0,000	0,000
3	6	0,082	4,881	0,018	1,071
4	7	0,122	7,262	0,016	0,952
5	8	0,114	6,786	0,012	0,714
6	9	0,025	1,488	0,025	1,488
7	10	0,020	1,190	0,088	5,238
8	13	0,017	1,012	0,072	4,286
9	14	0,000	0,000	0,016	0,952

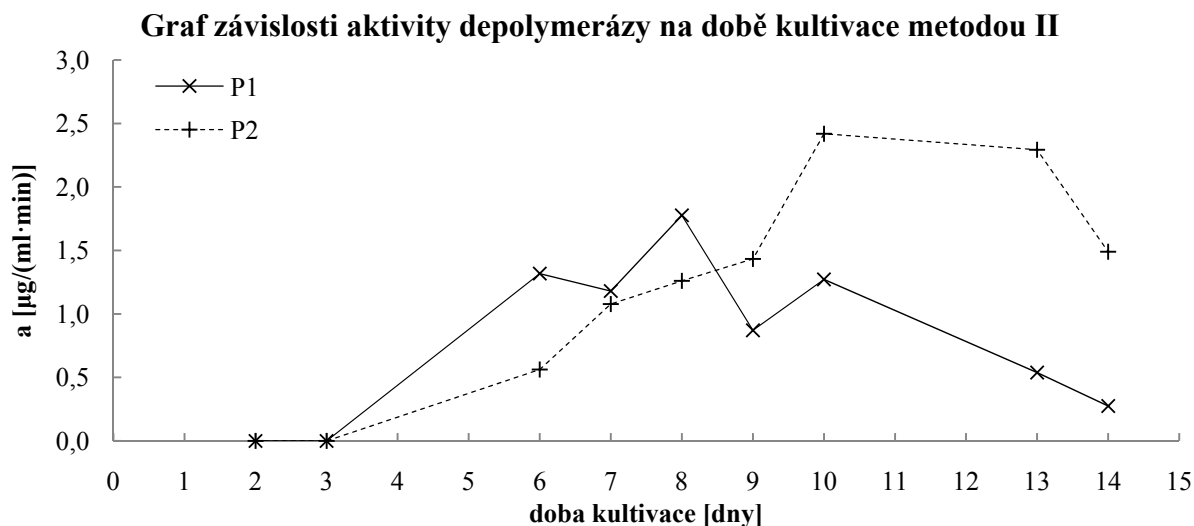


Graf 11: Aktivita depolymerázy pro vzorek P1 a P2 v průběhu kultivace metodou I

Z naměřených hodnot je patrné, že plíseň *A. fumigatus* vylučovala extracelulární depolymerázu po celou dobu kultivace do doby úplného degradování veškerého PHB. Nejvyšší aktivita enzymu byla naměřena u vzorku P1, 7. den kultivace, u vzorku P2 to bylo až 10. den kultivace kvůli odlišnému časovému profilu exprese depolymerázy v závislosti na formě PHB materiálu. Rychlejší nástup píku aktivity u práškového vzorku je důsledkem odlišného mechanismu degradace.

Tab. 35: Hodnoty naměřených aktivit pro vzorky P1 (PHB fólie) a P2 (PHB prášek) v průběhu kultivace plísně *A. fumigatus* pomocí metody II

		P1		P2	
Odběry		ΔA	a	ΔA	a
[-]	[den]	[-]	[$\mu\text{g}/(\text{ml} \cdot \text{min})$]	[-]	[$\mu\text{g}/(\text{ml} \cdot \text{min})$]
1	2	0,000	0,000	0,000	0,000
2	3	0,000	0,000	0,000	0,000
3	6	0,115	1,756	0,049	0,562
4	7	0,103	1,573	0,094	1,077
5	8	0,155	2,367	0,110	1,261
6	9	0,076	1,160	0,125	1,433
7	10	0,111	1,695	0,211	2,419
8	13	0,047	0,718	0,200	2,293
9	14	0,024	0,366	0,130	1,490



Graf 12: Aktivita depolymerázy pro vzorek P1 a P2 v průběhu kultivace metodou II

Stanovení aktivity PHB depolymerázy metodou II potvrzuje, že plíseň *A. fumigatus* má odlišný časový profil exprese PHB depolymerázy podle formy PHB materiálu.

5.3.3 Stanovení hmotnostního úbytku PHB

Přesná hmotnost PHB fólií ze vzorků K1, K2 a P1 a PHB prášku ze vzorků K3 a P2 byla zjištěna před začátkem kultivace a po jejím ukončení. Rozdíl hmotností je uveden v tab. 36:

Tab. 36: Hmotnostní a procentuální úbytek PHB po ukončení kultivace plísně *A. fumigatus*

Vzorek		Hmotnost před kultivací	Hmotnost po kultivaci	Úbytek hmotnosti	Úbytek hmotnosti
		[g]			[%]
K1	Kontrola (H ₂ O)	0,1173	0,1166	0,0007	0,60
K2	Kontrola (médium)	0,1207	0,1198	0,0009	0,75
K3	Kontrola (H ₂ O) s PHB práškem	0,5152	0,3550	0,1602	31,1
P1	Vzorek s PHB fólií	0,1087	0,0000	0,1087	100
P2	Vzorek s PHB práškem	0,5160	0,0000	0,5160	100



Obr. 18: PHB fólie použité pro kultivaci plísně *A. fumigatus* (zleva K1, K2, P1)



Obr. 19: PHB fólie po ukončení kultivace plísně *A. fumigatus* (zleva již jen K1, K2), fólie inkubovaná v přítomnosti plísně byla kompletně rozložena

Z výsledků je jasné, že hmotnostní úbytek po kultivaci je zcela kompletní, tedy byl degradován celý hmotnostní obsah PHB fólie i PHB prášku bez zbytkových reziduí.

5.3.4 Diskuse výsledků enzymové aktivity plísně *Aspergillus fumigatus*

Plíseň *A. fumigatus* a její schopnost biodegradace PHB byla studována pomocí tří metod, a to dvěma odlišnými způsoby turbidimetrického stanovení a metodou hmotnostního úbytku. V tab. 37 je uvedeno porovnání všech tří metod.

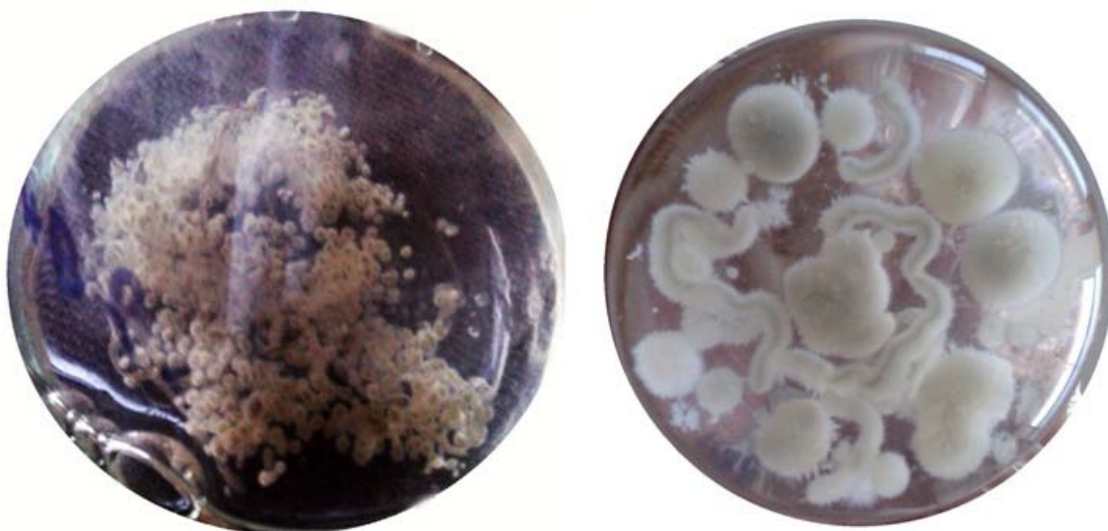
Tab. 37: Porovnání výsledků enzymové aktivity I a II a hmotnostního úbytku pro vzorky P1 a P2

Odběry:		P1 I	P1 II	P1 HÚ	P2 I	P2 II	P2 HÚ
		a	a	m	a	a	m
[-]	[dny]	[$\mu\text{g}/(\text{ml} \cdot \text{min})$]		[%]	[$\mu\text{g}/(\text{ml} \cdot \text{min})$]		[%]
1	2	0,364	0,000	100	0,000	0,000	100
2	3	0,410	0,000		0,000	0,000	
3	6	3,734	1,318		0,820	0,562	
4	7	5,556	1,181		0,729	1,077	
5	8	5,191	1,777		0,546	1,261	
6	9	1,138	0,871		1,138	1,433	
7	10	0,911	1,272		4,007	2,419	
8	13	0,774	0,539		3,279	2,293	
9	14	0,000	0,275		0,729	1,490	

Z výsledků vyplývá, že metoda stanovení enzymové aktivity I dává ve většině případů větší hodnotu aktivity, než stanovení enzymové aktivity II. Tento jev je pravděpodobně způsoben strmějším poklesem absorbance při měření po dobu 15 minut, než 1 hodiny, kde se absorbance po delším časovém úseku ustaluje, respektive kdy je v jamce titrační destičky stále zmenšující se množství PHB. V některých případech byl veškerý substrát degradován a hodnota absorbance klesla až na hodnotu blanku. V případě velmi efektivní degradace je tedy vhodnější použít metodu stanovení aktivity I, jelikož není substrát limitujícím faktorem reakce. Celkově je pro stanovení depolymerázové aktivity vhodnější metoda I, jelikož plíseň *A. fumigatus* velmi účinně degraduje PHB v obou použitých formách a tato metoda tedy podává mnohem přesnější výsledky.

Co se týče hmotnostního úbytku, byla zde jasná i makroskopicky viditelná úplná degradace.

Při porovnání výsledků enzymatické degradace PHB fólie a PHB prášku je značně rozdílný mechanismus samotné degradace, viz obr. 20. U degradace PHB fólie tvořil *A. fumigatus* malé kulovité shluky kolonií, které se naadsorbovaly na povrch PHB fólie a postupně ji degradovaly. Co se týče PHB prášku, kultura nejprve narostla do velkých kulovitých shluků. A teprve poté začala na sebe PHB prášek navazovat a degradovat, což vysvětluje opoždění nárůstu depolymerázové aktivity v případě PHB prášku oproti degradaci PHB fólie.

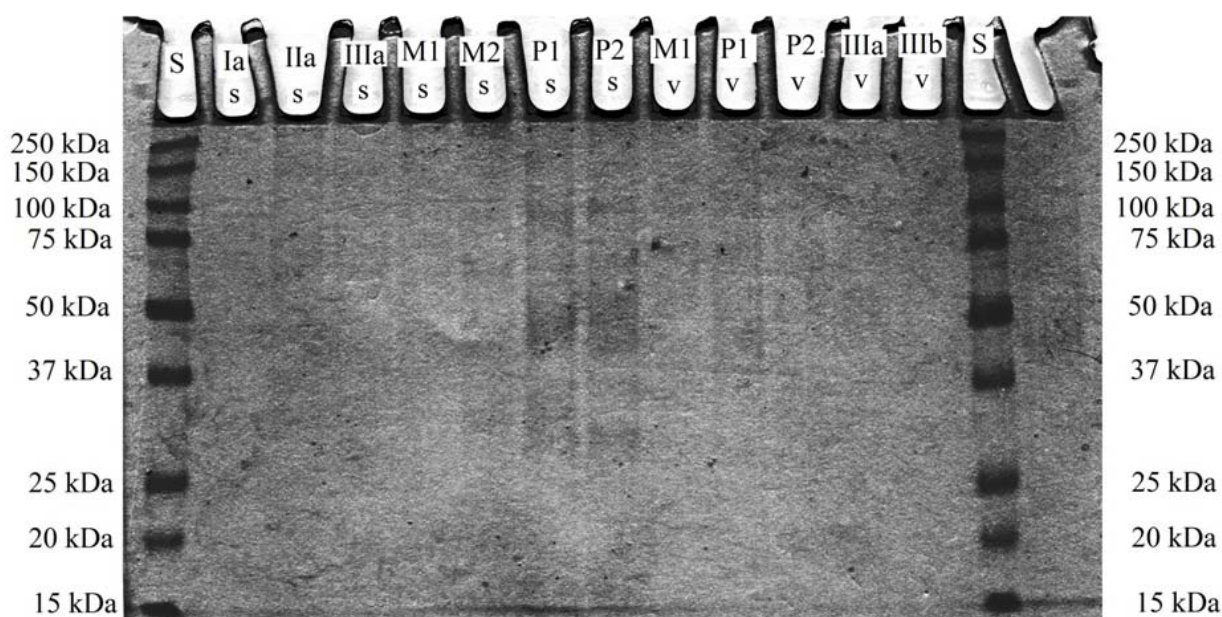


Obr. 20: Mechanismus biodegradace plísně *A. fumigatus* (vlevo *A. fumigatus* s PHB fólií, vpravo *A. fumigatus* s krystalickým PHB)

Celkově lze shrnout, že plíseň *A. fumigatus* je schopna zcela degradovat PHB, což je potvrzeno jak turbidimetrickým stanovením, hmotnostním úbytkem, tak i makroskopicky.

5.4 Vizualizace extracelulárních enzymů pomocí SDS-PAGE

Po skončení kultivací bylo zbylé médium uchováno a z nich odebrány 3 ml na ultrafiltraci. Po 10ti násobném zakoncentrování pomocí ultrafiltrace byly vzorky nanášeny na gel a separovány SDS-PAGE na 10% gelu a vizualizovány pomocí barvení Coomassie Brilliant Blue, viz obr. 21 a pomocí stříbra viz obr. 22. Pro porovnání byly připraveny ty samé vzorky ještě z průběžných odběrů, kde dosahovala aktivita PHB depolymeráz nejvyšší hodnoty. Tyto vzorky byly identicky zakoncentrovány ultrafiltrací, jako u předchozího případu a nanášeny k vizualizaci na gel. Pokud se jednalo o vzorky odebrané po kultivaci, jsou označeny symbolem s, pokud jsou vzorky nanášené na gel z průběžných odběrů, mají symbol v. Symbol S označuje standard Biorad Dual Color.



Obr. 21: Vizualizace vzorků z kultivací zkoncentrované ultrafiltrací barvené pomocí Coomassie Brilliant Blue G250

Použité vzorky:

S – Standard BioRad Dual Color

I, II a II – tři různé kmeny kvasinky *A. pullulans* (a = zaočkováno z inokula, b = zaočkováno z agarové plotny)

M1 – kultivace *D. acidovorans* s PHB fólií

M2 – kultivace *D. acidovorans* s PHB práškem

P1 – kultivace *A. fumigatus* s PHB fólií

P2 – kultivace *A. fumigatus* s PHB práškem

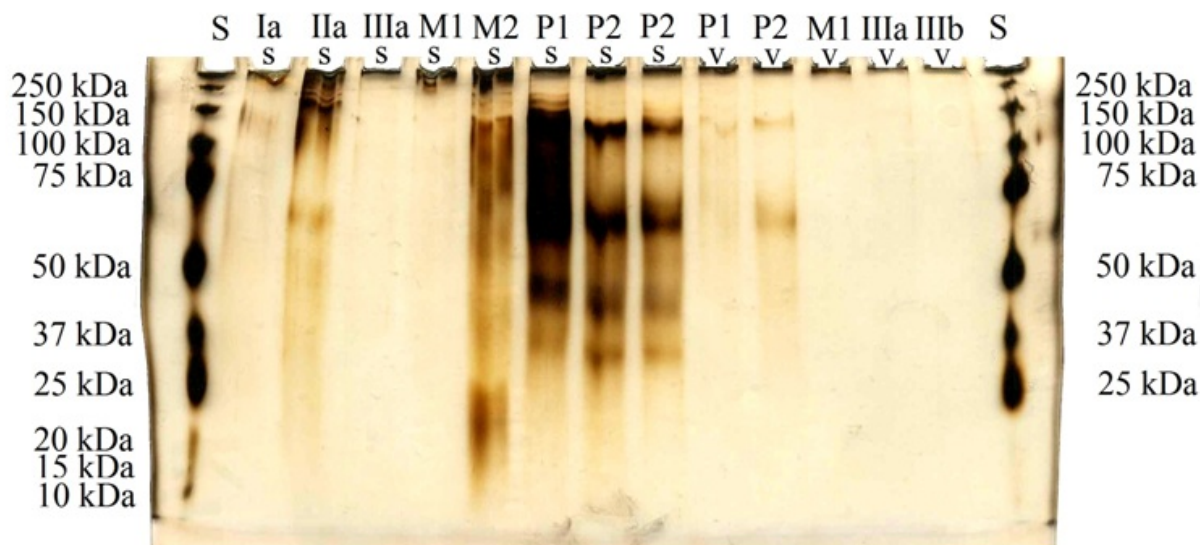
Všechny mikroorganismy byly v průběhu testů kultivovány v minerálních médiích, které neobsahovali žádné komplexní zdroje, jako je například pepton nebo kvasničný extrakt. Proto můžeme předpokládat, že všechny proteiny detekované pomocí SDS-PAGE byly extracelulární proteiny/enzymy produkované jednotlivými mikroorganismy. Vzhledem k tomu, že jediný zdroj uhlíku v médiu byl materiál na bázi PHB, můžeme předpokládat, že detekované enzymy jsou zapojeny do metabolismu tohoto zdroje uhlíku.

Barvení gelu pomocí Coomassie Brilliant Blue G250 potvrdilo přítomnost extracelulárních depolymeráz u vzorků M1, M2 (z kultivace bakterie *D. acidovorans*), P1 a P2 (z kultivace plísňe *A. fumigatus*). Ani jeden vzorek z kultivace kvasinky *A. pullulans* vizualizován nebyl, pravděpodobně z důvodu velmi malého množství enzymu, které nebylo schopné barvení Coomassie Brilliant Blue G250 detekovat, jelikož detekční limity tohoto způsobu barvení jsou 10 – 100 ng. [69; 62]

U plísňe *A. fumigatus*, konkrétně u vzorků P1 a P2 byly zjištěny 4 zóny, a to o velikosti odpovídající cca 100 kDa, 60 kDa, 40 kDa a 20 kDa. V největší míře byla zastoupena zóna o molekulové hmotnosti okolo 40 kDa, což odpovídá molekulové hmotnosti PHB depolymerázy, která se pohybuje okolo 40 kDa. [70; 12]

U bakterie *D. acidovorans*, konkrétně u vzorků M1 a M2 byly tyto zóny taktéž, jen v menším množství, což podporuje předchozí výsledky, že na rozdíl od plísňe *A. fumigatus*, která účinně PHB degraduje, ho bakterie *D. acidovorans* degraduje pouze částečně.

V největší míře byl detekován fragment o molekulové hmotnosti okolo 70 kDa. Molekulová hmotnost PHB depolymerázy vylučované bakterií *D. acidovorans* je okolo 45 kDa. [70; 12]



Obr. 22: Vizualizace vzorků z kultivací zkoncentrované ultrafiltrací barvené pomocí stříbra

Pro zlepšení citlivosti vizualizace jednotlivých zón po separaci pomocí SDS-PAGE bylo provedeno barvení stříbrem. Barvení gelu pomocí stříbra potvrdilo přítomnost potenciálních extracelulárních depolymeráz u vzorků M1, M2 (z kultivace bakterie *D. acidovorans*), P1 a P2 (z kultivace plísně *A. fumigatus*).

U plísně *A. fumigatus*, konkrétně u vzorků P1 a P2 byly potvrzeny 4 zóny, a to o velikosti okolo 120 kDa, 60 kDa, 40 kDa a 30 kDa. U bakterie *D. acidovorans* byly taktéž potvrzeny podobné zóny, bohužel kvůli přítomnosti vzduchové bubliny v jamce nebyla separace jednotlivých zón přesná, ale z výsledků pomocí barvení Coomassie se dá usuzovat, že bakterie produkovala enzymy o podobné velikosti jako plíseň *A. fumigatus*.

Na rozdíl od barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue G250 byly vizualizovaný i zóny potenciální extracelulární depolymerázy u kultury *A. pullulans*, jelikož detekční limity tohoto způsobu barvení jsou 2-4 ng. [69; 62]

Konkrétně byly detekovány fragmenty u vzorků Ia (*A. pullulans* CCM 8182), u které byl vizualizován pouze zóny o molekulové hmotnosti okolo 130 kDa a vzorku IIa (*A. pullulans* CCM F-148), kde byly vizualizovaný fragmenty dva, a to o molekulové hmotnosti okolo 120 kDa a 60 kDa.

Z výsledků je dále patrné, že vizualizace vzorků proběhla výrazně lépe při použití zkoncentrovaných vzorků ze supernatantu po ukončení kultivací, jelikož médium obsahovalo větší množství enzymů. I přesto, že byly tyto enzymy při ukončení kultivací neaktivní, bylo je schopné pomocí SDS-PAGE vizualizovat.

5.5 Biodegradace za simulovaných podmínek kompostovacího procesu

Kromě biodegradčních testů s čistými kulturami byl v rámci této diplomové práce také zaveden standardní (viz Norma IS/ISO 20200 (2004) [8]) biodegradční test simulující kompostovací podmínky. U biodegradčního testu bylo v intervalech viz tab. 38 zjišťován

stupeň biodegradace použitého materiálu. Dále byly zjišťovány parametry změny média, jako odér, barva a další vizuální změny.

Tab. 38: Testování určitých druhů PHB materiálů

	PHB fólie	PHB tvrzená fólie	PHB Nanoul textilie	Referenční PU	PU-PHB (Sigma)	PU-PHB (FCH)
1. den	Počátek biodegradačního testu					
5. den	Zjišťování stupně degradace			-		
10. den	Zjišťování stupně degradace					
15. den	Zjišťování stupně degradace		Plně degradován	-		
19. den	Plně degradován	Zjišťování stupně degradace		Zjišťování stupně degradace		
23. den				Studium mechanických vlastností		
24. den				-		
30. den				Zjišťování stupně degradace		
38. den				-		
46. den	Plně degradován	Zjišťování stupně degradace				
57. den	Ukončení testu			Ukončení testu, studium mechanických vlastností, měření úbytku hmotnosti		

5.5.1 Biodegradace PHB fólie

Stupeň biodegradace byl zjišťován od počátku biodegradačního testu u PHB fólie 5., 10., 15. a 19. den testu, přičemž 19. den již byla fólie zcela degradována. Na počátku testování byla PHB fólie zcela průhledná a pevná o hmotnosti 1,3700 g, viz obr. 23. Na počátku experimentu byly všechny média světlé žluté a nijak nezapáchaly.



Obr. 23: PHB fólie před biodegradačním testem a 1. den biodegradačního testu

Při první kontrole stupně biodegradace, tedy 5. dne biodegradačního testu byla fólie stále průhledná a pevná, jako na počátku testování. Byl na ní ale již obsažen film vlhkého média. Změna média doposud nebyla nijak markantní, co se týče barvy ani oděru.

U druhé kontroly stupně biodegradace, tedy 10. den biodegradačního testování byla fólie ve značném stupni rozkladu. Film ulpěného média na povrchu fólie již byl značný a samotná fólie byla velmi křehká na mechanické zacházení. Dále byla značně zažloutlá a daly se u ní detekovat drobné perforace materiálu po celém povrchu, viz obr. 24 a 25. Změna média již byla také detekována, a to jak barvou, která byla od původní nažloutlé žlutohnědá, tak i oděrem, kde byl patrný silný amoniakální zápach, a na povrchu média byly detekovány malé kolonie bílé plísně.

Třetí kontrola byla studována 15. den biodegradačního testu, kdy bylo v médiu nalezeno jen velmi malé množství testovaného materiálu značně rozloženého a bylo velmi obtížné materiál vyjmout z média, aniž by nebyl mechanicky poškozen. Perforace povrchu byla již značná a soudržnost materiálu tak byla velmi malá. Změna média byla opět v barvě, která se stále více ztmavovala až k tmavě hnědé, amoniakální zápach byl výraznější, kolonie bílé plísně byly zastoupeny ve větší míře.

Při čtvrté kontrole 19. dne biodegradačního testu již nebyly nalezeny žádné stopy studovaného materiálu, PHB fólie tedy mohla být označena, jako zcela degradována a kultivace ukončena. Médium bylo, co se týče barvy a zápachu, obdobné předchozí kontrole.

Změny materiálu v průběhu jednotlivých kontrol jsou znázorněny na obr. 24.



Obr. 24: PHB fólie v průběhu biodegradačního testování

Mechanismus degradace materiálu je viditelný na obr. 25. Z tohoto detailního pohledu je patrné, že se velké struktury materiálu rozpadají kvůli velkému počtu malých, stále se po okrajích zvětšujících děr.



Obr. 25: Detail PHB fólie při 2. kontrole biodegradace, tedy 10. den biodegradačního testu

Od počátku biodegradačního testu bylo k úplnému rozpadu materiálu potřeba minimálně 19. dnů. Nejrychleji byla degradována střední část materiálu, pravděpodobně z důvodu nejvyšší vodní aktivity, kde byly podmínky pro mikroorganismy rozkládající PHB nejideálnější.

5.5.2 Biodegradace PHB tvrzené fólie

Stupeň biodegradace byl zjišťován od počátku biodegradačního testu u PHB tvrzené fólie 5., 10., 15. a 19. den, přičemž 19. den již byla prostřední část tvrzené fólie zcela degradována, zbylé dvě byly dále pozorovány a kontroly byly prováděny dále 24., 30., 38. a 46. den kultivace. Úplná biodegradace materiálu byla stanovena na 46. den testování.

Materiál použitý k biodegradačnímu testu byl tmavě hnědý a velmi pevný (klasickou mechanickou manipulací nemohl být nijak poškozen). Pro testování byly použity tři různé velké části PHB tvrzené fólie, viz obr. 26, největší část o hmotnosti 3,9116 g, prostřední část o hmotnosti 1,9260 g a nejmenší část o hmotnosti 1,3454 g.



Obr. 26: PHB tvrzená fólie před biodegradačním testem a 1. den biodegradačního testu

U první kontroly stupně biodegradace, tedy 5. dne biodegradačního testu byla tvrzená fólie mikrobiálně nedotčena. Jejich povrch byl pevný stejně jako na počátku testu. Na jediné prostřední části tvrzené fólie byl větší nános média, než na ostatních dvou. Změna média byla obdobná, jako u PHB fólie, tedy, barva nažloutlá, odér minimální.

Druhá kontrola stupně biodegradace, neboli 10. den biodegradačního testování byl materiál hustě obalen vlhkým médiem, na povrchu tvrzené fólie byla ve velkém množství obsažena bílá plíseň, nejvíce však na prostředním dílu materiálu, který byl od první kontroly mnohem více měkký a pružný. Bylo nutné u tohoto dílu dbát na opatrnější mechanické zacházení. Zbylé dvě části si zanechaly původní pevnost. Perforace materiálu zatím nebyla rozpoznána ani v jednom případě. Změna média byla detekována žlutohnědým zbarvením a silným amoniakálním zápachem a v celém objemu média byly odhaleny kolonie bílé plísně, nejvíce jich bylo akumulováno na studovaném materiálu.

Třetí kontrola byla studována 15. den biodegradačního testu, kdy bylo na materiálu již přichyceno velké množství média až trojnásobek jejich počáteční tloušťky. Bílé kolonie plísně byly po celém povrchu materiálu. Krajní dvě části byly podobné, jak v hustotě osídlení plísní, tak svojí pevností. Materiál byl od poslední kontroly měkký a pružnější. Prostřední část materiálu byla mnohem hustěji obalena vrstvou plísně a její pevnost již byla velmi nízká a hrozilo zde mechanické poškození, bylo tedy nutné velmi opatrné zacházení. Perforaci povrchu nebylo možné účinně detekovat z důvodu velkého množství nánosů média a plísně na materiálu. Změny média byly v barvě, kdy odstín sahal k tmavě hnědé, amoniakální zápach byl výraznější a kolonie bílé plísně byly zastoupeny ve větší míře.

Při čtvrté kontrole 19. dne biodegradačního testu již nebyla nalezena prostřední část PHB tvrzené fólie, ostatní dvě části vypadaly obdobně jako u předchozí kontroly, byly ale výrazněji křehčí a náchylnější na mechanické poškození. Médium bylo, co se týče barvy a zápachu, obdobné předchozí kontrole.

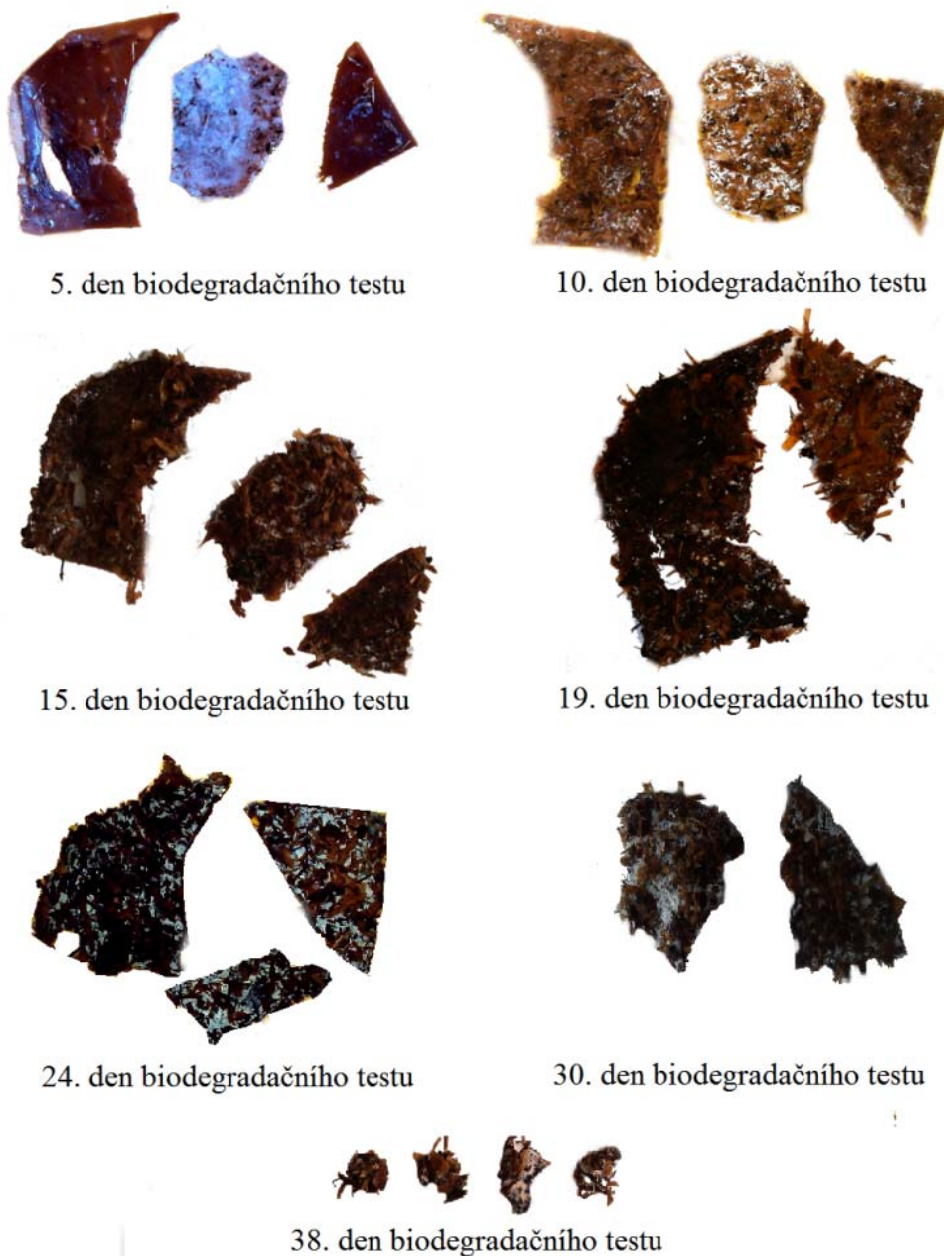
U páté kontroly 24. den biodegradačního testu byly zbylé dvě části PHB tvrzené fólie zase křehčí a náchylnější, v médiu se již nacházelo více menších fragmentů, PHB tvrzená fólie se tedy již začínala rozpadat. Médium ztmavlo v jistých částech až do černého zbarvení, amoniakální zápach média již ale nebyl tak výrazný.

30. den biodegradačního testu byla provedena kontrola šestá, kdy PHB tvrzená fólie již byla výrazně menší, než u kontroly páté. Pro velký nános plísně a média ale nebylo možné posoudit mechanismus biodegradace, ale z důvodu zmenšování materiálu se dá předpokládat, že se postupně fólie rozpadá po okrajích. Perforace materiálu totiž nebyla detekována. Médium si zachovalo stejné vlastnosti jako u předchozí kontroly.

Sedmá kontrola 38. den biodegradačního testu již měla blízko k plné degradaci, bylo ale stále nalezeno malé množství reziduí z PHB tvrzené fólie. Přes velký nános média už byly tyto nepatrné části obtížně detekovány, rozpoznány byly pouze díky nánosům bílé plísně, která se jinak v médiu neobjevovala, pouze na PHB tvrzené fólii. Nalezené části měly v průměru maximálně 1 cm. Médium si opět zachovalo původní vlastnosti, jen odér byl méně výrazný.

Osmá kontrola provedená 46. biodegradačního testu byla PHB tvrzená fólie považována za plně degradovanou, jelikož nebyly k nalezení již žádné stopy studovaného materiálu. Médium, co se týče barvy, bylo identické předchozí kontrole, zápach byl opět o něco menší.

Změny PHB tvrzené fólie v průběhu jednotlivých kontrol jsou znázorněny na obr. 27.



Obr. 27: PHB tvrzená fólie v průběhu biodegradačního testování

Od počátku biodegradačního testu bylo k úplnému rozpadu materiálu potřeba minimálně 46 dnů. Nejrychleji byla degradována střední část materiálu, a to již 19. den od počátku testu, což mohlo být způsobeno, identicky jako u PHB fólie, větším množstvím vody ve středu biodegradačního boxu, kde měly mikroorganismy rozkládající PHB vhodnější podmínky pro biodegradaci, než na okrajích nádoby.

5.5.3 Biodegradace PHB Nanoul textilie

Stupeň biodegradace byl zjišťován od počátku biodegradačního testu u PHB Nanoul textilie 5., 10. a 15. den, přičemž již 15. den byl materiál zcela degradován.

Materiál použitý k biodegradačnímu testu byl bílý, neprůhledný, velmi jemný a nepříliš pevný. Bylo tedy nutné dbát zvýšené opatrnosti při manipulaci s tímto materiálem již od

počátku testu. Pro testování byla použita PHB Nanoul textilie o parametrech 15x10 cm a hmotnosti 0,1531 g, viz obr. 28.



Obr. 28: PHB Nanoul textilie před biodegradačním testem a 1. den biodegradačního testu

U první kontroly stupně biodegradace 5. dne biodegradačního testu byla textilie již znatelně změněna. Textilie měla ve své struktuře obsažené části média a na jistých místech byla viditelná perforace materiálu. Povrch materiálu začínal mít nahnědlé zbarvení. Samotná textilie byla extrémně křehká a hrozilo zde mechanické poškození. Změna média byla nepatrná, odstíny barvy tmavší, než na počátku testování, odér nepříliš znatelný.

10. den biodegradačního testování proběhla druhá kontrola, přičemž byly v médiu pozorovány jen fragmenty zbylé z PHB textilie. Fragmenty se nicméně zdály pocitově mechanicky odolnější, než u předchozí kontroly, pravděpodobně z důvodu manipulace s menším povrchem. Textilie byla v tento den testování ve značném stupni rozkladu. Barva textilie byla po celém povrchu zežloutlá až hnědá. Po celém povrchu fragmentů byly detekovatelné malé perforace, viz obr. 29. Změna média již byla taktéž detekována, a to jak barvou, která byla od původní nažloutlé žlutohnědá, tak i oděrem, kde byl znatelný amoniakální zápach.

Třetí kontrola byla studována 15. den biodegradačního testu, kdy již nebyly nalezeny žádné fragmenty studovaného materiálu, PHB textilie tedy mohla být označena, jako zcela degradována a kultivace byla ukončena. Médium bylo, co se týče barvy a zápachu, obdobné předchozí kontrole.

Změny materiálu při první a druhé kontrole jsou znázorněny na obr. 29.



5. den biodegradačního testu



10. den biodegradačního testu

Obr. 29: PHB Nanoul textilie v průběhu biodegradačního testování

Od počátku biodegradačního testu bylo k úplnému rozpadu materiálu potřeba minimálně 15 dnů. Nejrychleji byla opět degradována střední část materiálu, kvůli nejideálnějším podmínkám pro mikroorganismy rozkládající PHB.

5.5.4 Izolace bakteriálních kultur z kompostu

Po ukončení polosuché kultivace bylo odebráno z každého reaktoru část média, které bylo následně rozmícháno v destilované vodě. Takto připravené vzorky byly ponechány ke kultivaci na agarových plotnách obsahující 3 různé média obsahující odlišné živiny. Kultivace na agarových plotnách probíhala 24 hodin a narostlé kultury byly dále izolovány pro zjištění počtu kultur způsobujících biodegradaci PHB, viz obr. 30 a 31



YPD - vzorek z
média s PHB textilií



YPD - vzorek z
média s PHB fólií



YPD - vzorek z média s
PHB tvrzenou fólií

Obr. 30: Narostlé kultury po zaočkování YPD média z polosuché kultivace pomocí hokejky

Z výsledků je patrné, že míra zastoupení mikroorganismů závisela na použitém PHB materiálu. Největší počet mikroorganismů byl zaregistrován u PHB fólie, jakožto nejtěžším a nejpevnějším použitém materiálu, kdy bylo pro degradaci nutný větší počet mikroorganismů. U YPD média, u vzorku s PHB tvrzenou fólií tvořily kolonie souvislou vrstvu a nebylo možné určit, kolik různých druhů mikroorganismů bylo zastoupeno. V případě druhých dvou vzorků, tedy PHB textilie a PHB fólie, byly zde jasně viditelné dvě kultury, jedna tvořila větší kolonie, druhá tvořila kolonie znatelně menší.

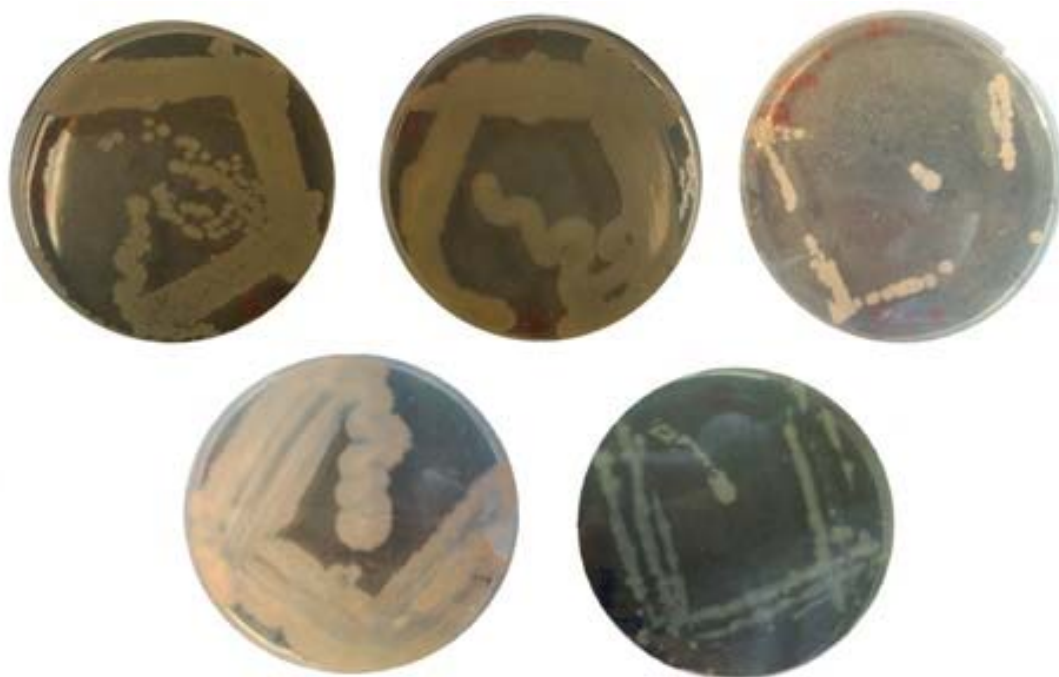


Obr. 31: Narostlé kultury po zaočkování NB média a minerálního média z polosuché kultivace pomocí hokejky

Při použití NB média byl díky vysoké míře zastoupení detekován taktéž pouze jeden druh mikroorganismu. Opět byl detekován nárůst mikroorganismů u vzorku z biodegradace PHB tvrzené fólie. Nejméně jich obsahoval vzorek s PHB textilií, jakožto co se týče váhy, nejlehčí použitý materiál.

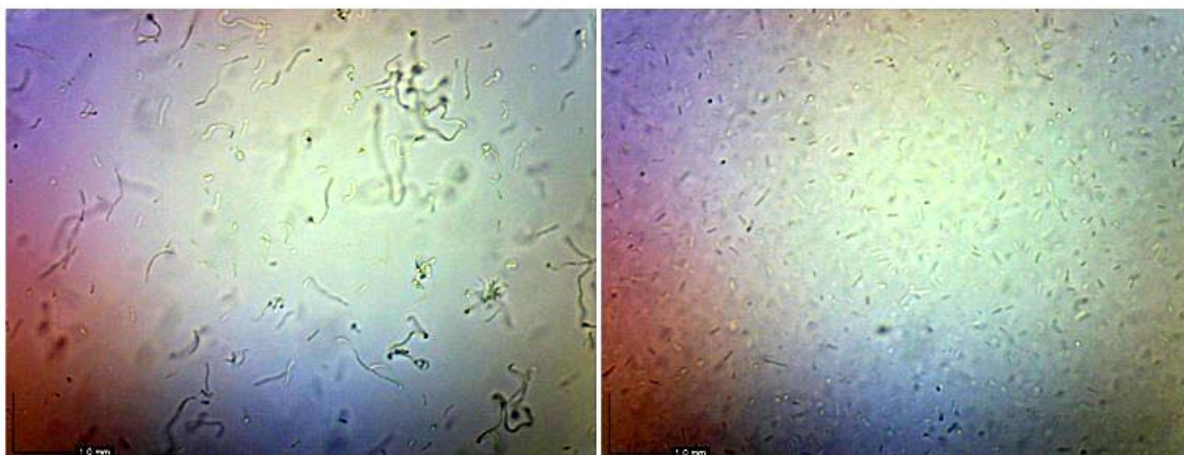
U minerálního média byl nárůst biomasy minimální, byla zde detekována pouze jedna kultura, která tvořila malé kulovité kolonie.

Všechny rozpoznané kultury byly dále izolovány pomocí křížového roztěru na agarovou plotnu obsahující YPD médium. Výsledky jsou viditelné na obr. 32.



Obr. 32: Izolované kultury z polosuché kultivace

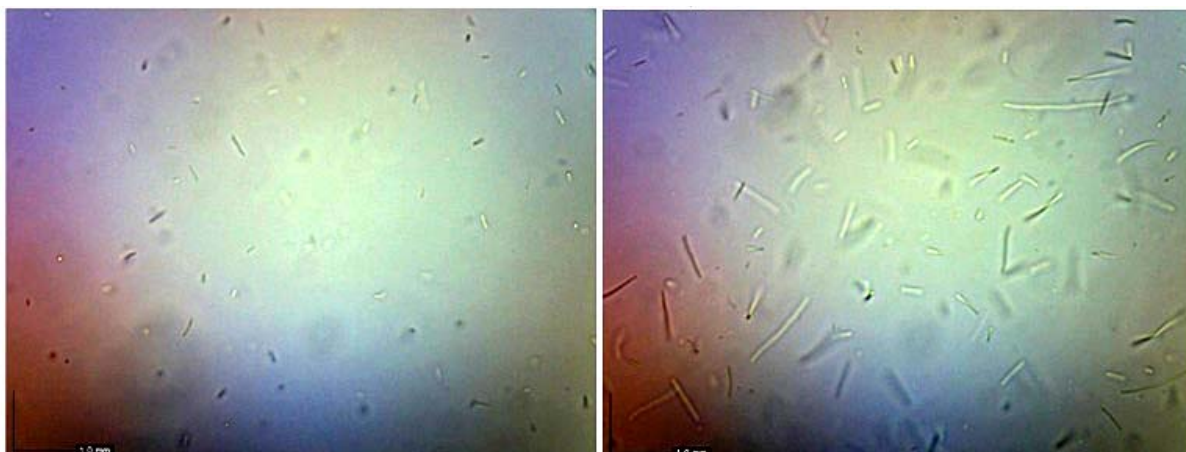
Z výsledků lze tvrdit, že po kultivaci bylo izolováno 5 různých druhů mikroorganismů, které za podmínek testu výrazně převažovali v přirozené kultuře a je možné, že se podíleli na biodegradaci všech použitých forem PHB. Jestli tyto kmeny byly schopny biodegradace PHB, či nikoliv, se nedá s určitostí potvrdit. Dalším testováním těchto izolátů, co do schopnosti degradovat PHB bude cílem další práce. Izolované vzorky byly následně analyzovány mikroskopicky, viz obr. 33, 34 a 35.



Obr. 33: Izolované kultury pod mikroskopem při zvětšení 40x

První izolovaná kultura měla buňky velmi dlouhé a tyčinkovité, které vykazovaly spirálovitý tvar. Délka buněk byla průměrně okolo 0,5 mm.

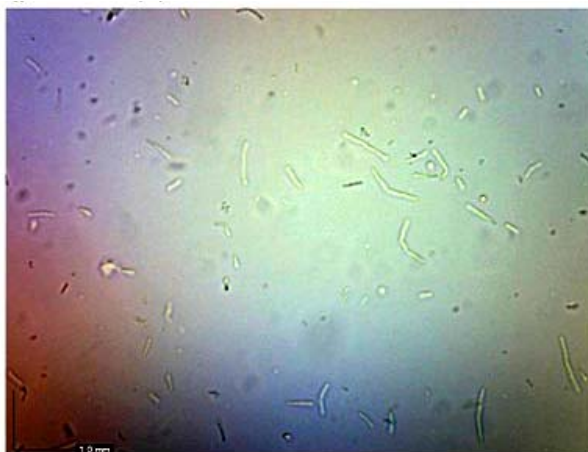
Druhá izolovaná kultura měla buňky válcovitého tvaru v průměru okolo 20 µm.



Obr. 34: Izolované kultury pod mikroskopem při zvětšení 40x

Třetí izolovaná kultura měla buňky válcovité až tyčinkovité. Délka buněk byla průměrně okolo 30 μm .

Čtvrtá izolovaná kultura měla buňky tyčinkovité dlouhé v průměru okolo 1 mm.



Obr. 35: Izolovaná kultura pod mikroskopem při zvětšení 40x

Pátá izolovaná kultura měla buňky tyčinkovitého tvaru, které tvořily řetízky. Buňky byly dlouhé průměrně 0,6 mm.

5.5.5 Diskuse výsledků biodegradace PHB simulací kompostovacího procesu

Biodegradace pomocí přirozeně se vyskytujících mikroorganismů v kompostu byla provedena u tří druhů PHB materiálu, a to PHB fólie, PHB tvrzené fólie a PHB Nanoul textilie, viz tab. 39.

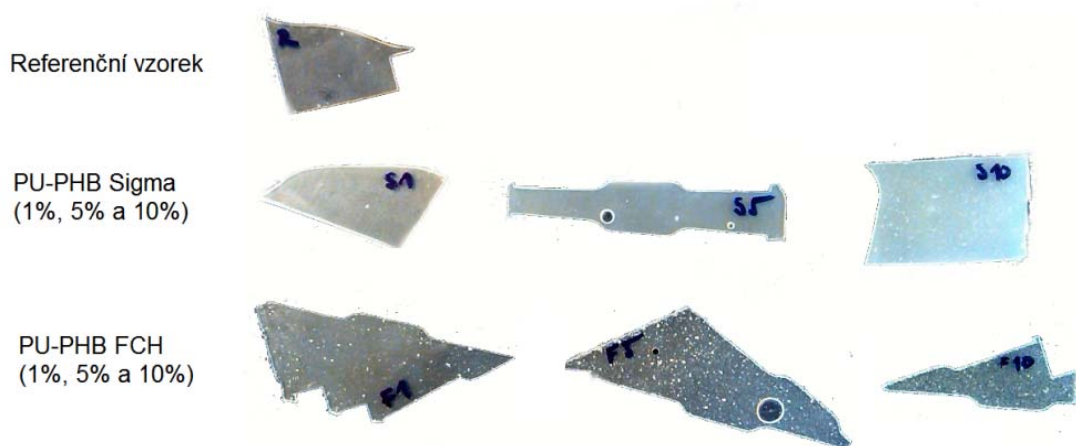
Tab. 39: Porovnání degrační účinnosti použitých PHB materiálů

Forma PHB	Hmotnost materiálu	Doba biodegradace
[-]	[g]	[dny]
PHB fólie	1,3700	19
PHB tvrzená fólie	7,1830	46
PHB textilie	0,1531	15

Z hodnot z tab. 39 vyplývá, že doba degradace je primárně závislá na hmotnosti degradovaného materiálu, poměru plochy a hmotnosti a také pevnosti materiálu. U PHB fólie a PHB textilie, které byly několikanásobně lehčí, než PHB tvrzená fólie, byla doba úplné degradace mnohem menší. Co se týče porovnání degradovaných materiálů, má nejlepší výsledky Nanoul textilie, poté PHB fólie a nakonec PHB tvrzená fólie, což je pravděpodobně způsobeno množstvím PHB depolymeráz obsažených v médiu. Při krátkodobé kultivaci nejsou schopny mikroorganismy vylučovat takové množství PHB depolymeráz, které by degradovaly velké množství PHB. Čím déle ale kultivace trvá, tím více mikroorganismů je v médiu obsaženo, a tím více depolymeráz je schopno rozkládat PHB materiál. Při nízkých hmotnostech PHB stačí malé množství enzymu k degradaci, a tak i celkový čas kultivace bývá nižší. Naopak u PHB tvrzené fólie byla doba nutná k úplné biodegradaci 46 dnů, kdy se mikroorganismy byly schopny pomnožit do takového množství, aby jejich depolymerázy rozložily veškerý obsah biodegradovatelného materiálu. Výsledky biodegradačních experimentů jednoznačně potvrdily tvrzení, že PHB je zcela biodegradabilní materiál. Podle normy IS/ISO 20200 (2004) [8] je možné za biodegradabilní materiál považovat takový, který se během testu rozloží během 90 dnů, což všechny vzorky bezpochyby splnily. Zavedený test byl následně využit na posouzení biodegradability více rezistentních materiálů (polyuretanových filmů obsahující PHB) a může být v budoucnu použit jako standardní test posouzení biodegradability rozličných materiálů případně pro posouzení vlivu technologických úprav respektive modifikací na biodegradabilitu PHA materiálů.

5.5.6 Biodegradace kopolymeru PU-PHB

Jako kopolymer PHB byl testován PU-PHB ve dvou variantách. První varianta jsou tři koncentrace PHB dispergované v polyuretanu od firmy Sigma, který byl použit jako náhrada polyesterového polyolu v podílu odpovídající 1, 5 a 10 hm. % polyolu, druhou variantou jsou stejné koncentrace PHB v polyuretanu, použitý PHB byl v tomto případě připraven na Fakultě Chemické v Brně (taktéž 1 %, 5 % a 10 %). Referenčním vzorkem byl čistý PU bez PHB. Stupeň biodegradace byl zjišťován od počátku biodegradačního testu u referenčního vzorku PU a všech variant PU-PHB 10., 19., 30., 46 a 57. den kultivace, přičemž 57. den byla kultivace ukončena a všechny varianty PU-PHB i referenčního vzorku podrobeny analýze pod mikroskopem, vážkové analýze a studiu mechanických vlastností.



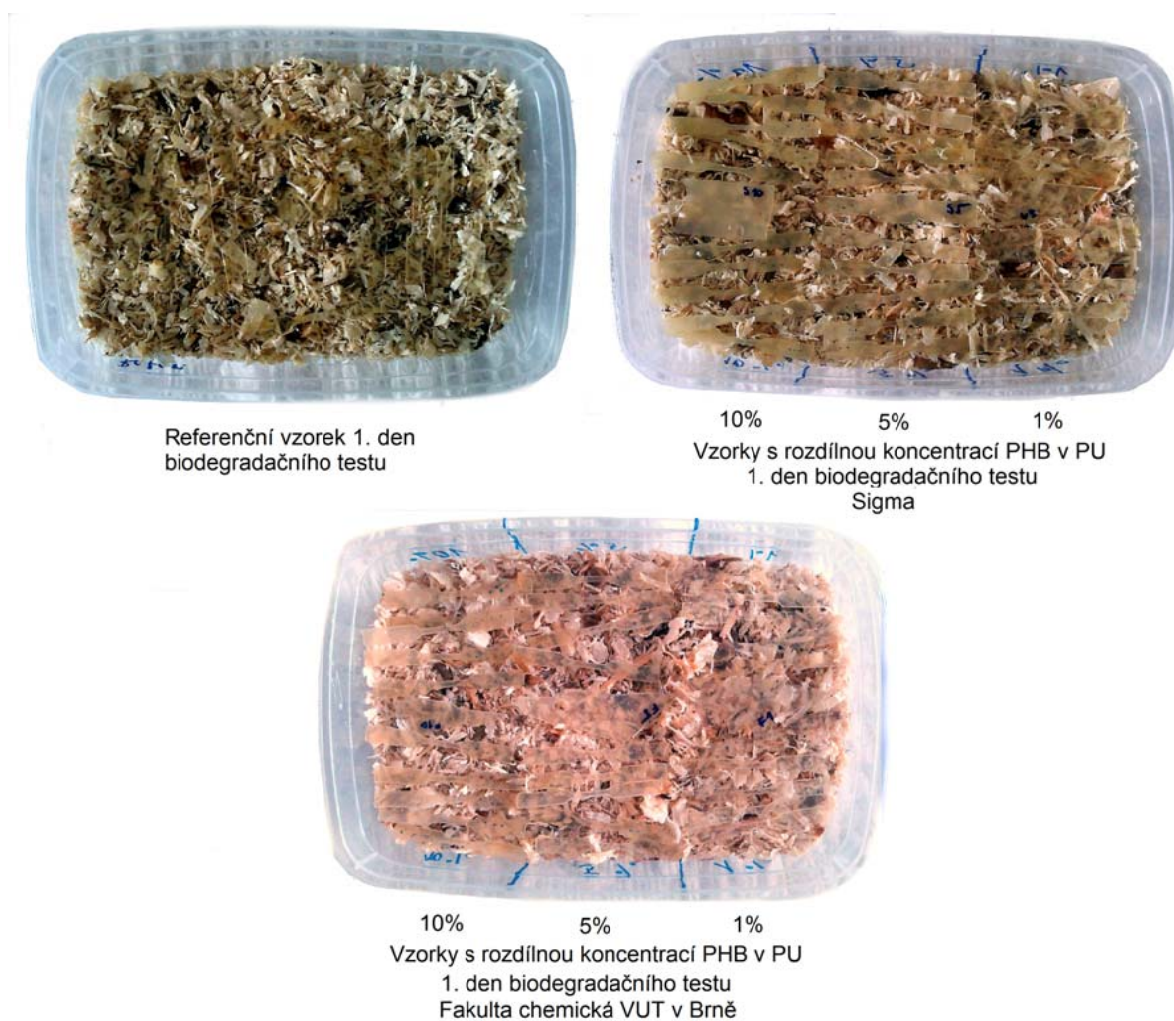
Obr. 36: Vzorky PU-PHB a referenční vzorek PU použité na biodegradační test

Referenční vzorek a PU-PHB z obr. 36 byly před biodegradačním testem a zváženy. Hodnoty navážek jsou viditelné v tab.40.

Tab. 40: Navážky použitých vzorků PU-PHB

Vzorek	Navážka
[-]	[g]
Ref. vzorek	0,5035
1 % PHB od firmy Sigma v PU	0,4868
5 % PHB od firmy Sigma v PU	0,6703
10 % PHB od firmy Sigma v PU	0,8765
1 % PHB z FCH v PU	0,8430
5 % PHB z FCH v PU	0,9489
10 % PHB z FCH v PU	0,3848

Vzorky byly vloženy do reaktoru z půli naplněného médiem, viz obr. 37. Takto připravený materiál byl převrstven médiem, zalit vodou, uzavřen a ponechán dobře aerované inkubaci při 58 °C.



Obr. 37: Vzorky PU-PHB a referenční vzorek PU 1. den biodegradačního testu

Při první kontrole stupně biodegradace, tedy 10. dne biodegradačního testu byly vzorky materiálu značně odlišné od prvního dne biodegradačního testu hlavně, co se týče barvy vzorků. Ze zcela průhledného materiálu se v průběhu 10 dnů stal žlutě zakalený materiál, nejméně koncentrované PHB v PU byly stále průhledné, jen zbarvení bylo žluté, u nejkonzentrovanejších vzorků byla transparentnost mnohem více snížena a odstín žluté barvy sytější. U každého vzorku byly dále viditelné malé tmavší místa, která byla rozmístěná náhodně po celém povrchu materiálu. Dle koncentrace PHB v PU se zakalení zvyšovalo a zbarvení tmavlo. Největší rozdíl zbarvení měly vzorky PU obsahující PHB z Fakulty chemické. Změna média byla jak v barvě, které přešlo do tmavě žluté barvy, tak i oděrem, který měl amoniakální zápach.

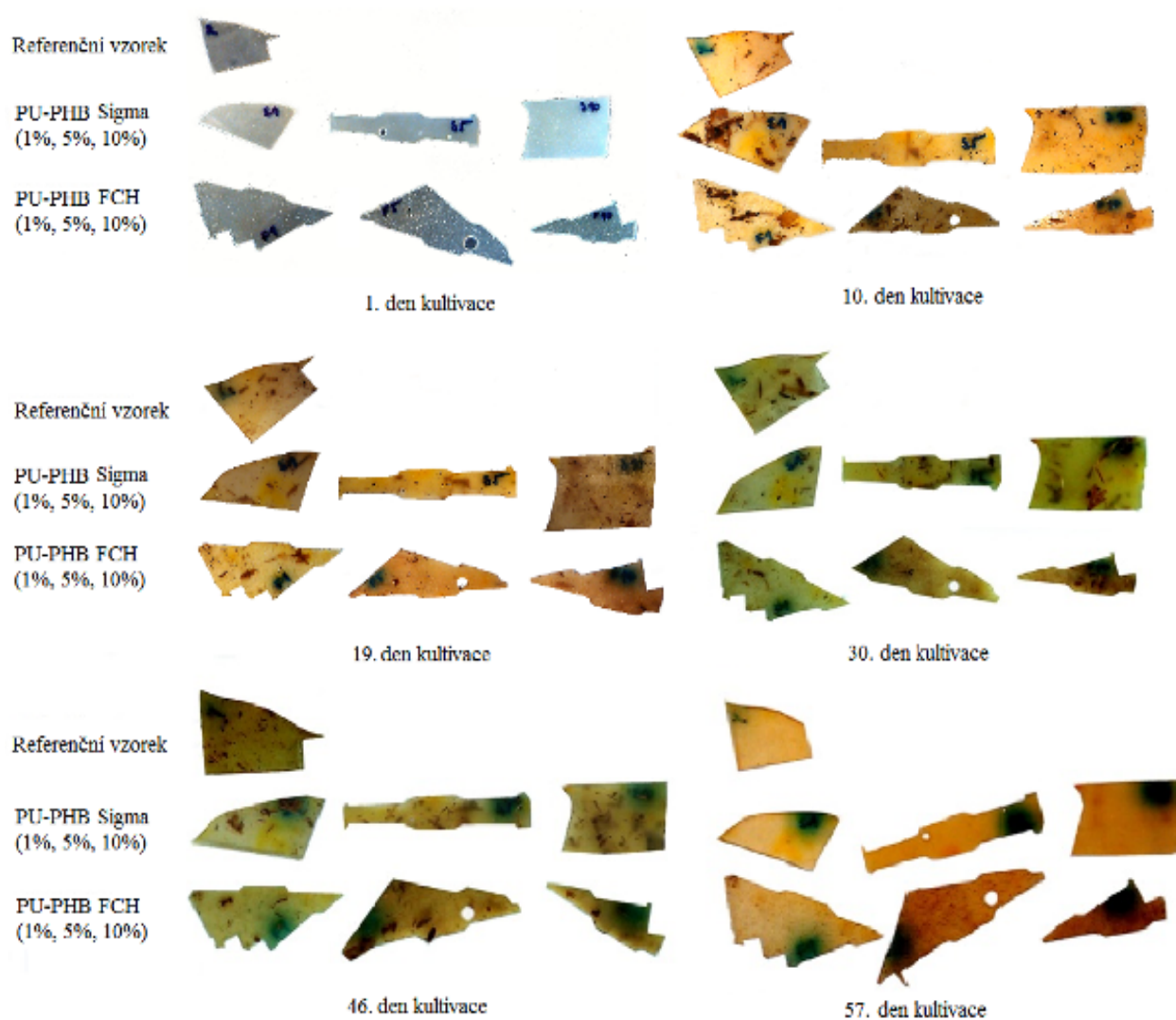
U druhé kontroly stupně biodegradace, tedy 19. den biodegradačního testování byly vzorky, co se týče barvy, tmavší. U referenčního vzorku byla jediná změna, a to v barvě. U vzorků s PHB od firmy Sigma byla taktéž indikována pouze změna zbarvení materiálu, nebylo možné přesně určit, zdali se mění zbarvení podle koncentrace zastoupení PHB v PU. Největší rozdíly byly detekovány u vzorků s PHB připraveným na Fakultě chemické (dále jen FCH). Zde již bylo makroskopicky detekovatelné malé perforace materiálu na povrchu. Perforován byl nejvíce vzorek s největším zastoupením PHB v polyuretanu. Díky biodegradaci došlo k znatelné změně všech tří vzorků, které byly na dotek lepkavé, což indikuje změnu molekulové hmotnosti polymeru. Další změnou u těchto vzorků byly viditelné rozdíly zakalení materiálu, kdy nejméně koncentrovaný vzorek byl nejvíce průhledný, nejkonzentrovanejší nebyl průhledný vůbec. Co se týče mechanických vlastností, vykazovaly všechny vzorky stejné vlastnosti jako před počátkem testování. Změna média byla opět v barvě, která byla stále tmavší a dosahovala barvy až k tmavě hnědé, amoniakální zápach byl velmi výrazný. Nebylo možné makroskopicky detekovat žádné shluky mikroorganismů.

Třetí kontrola byla studována 30. den biodegradačního testu. Subjektivně se zdály být vzorky identické předchozí kontrole, jak z pohledu mechanických vlastností, barvy, či u případu vzorků obsahující PHB z FCH i lepkavosti. Změna média byla opět v barvě, která se stále více ztmavovala od tmavě hnědé až místy po černou, amoniakální zápach byl ustálený.

Při čtvrté kontrole 46. dne biodegradačního testu byly vzorky subjektivně opět velmi podobné kontrole předcházející. U vzorků PU-PHB s PHB od firmy Sigma se zdály být tmavě žluté skvrny na povrchu tmavší, než v případech předchozích. U této kontroly již byl viditelný rozdíl vzorků podle míry zastoupení PHB v polyuretanu, kdy nejkonzentrovanejší vzorek byl mnohem více zakalen. U vzorků obsahujících PHB z FCH byl materiál velmi lepkavý a manipulace s nimi byla náročnější, opět byly jasně detekovatelné rozdíly mezi vzorky s různou koncentrací PHB v PU, kdy dispergovaný PHB (bílé krystaly) vykazoval sytě žluté zbarvení dispergovaných částic, pomocí barvy tak byl snadno detekován obsah PHB v PU. Médium bylo obdobné jako u předchozí kontroly.

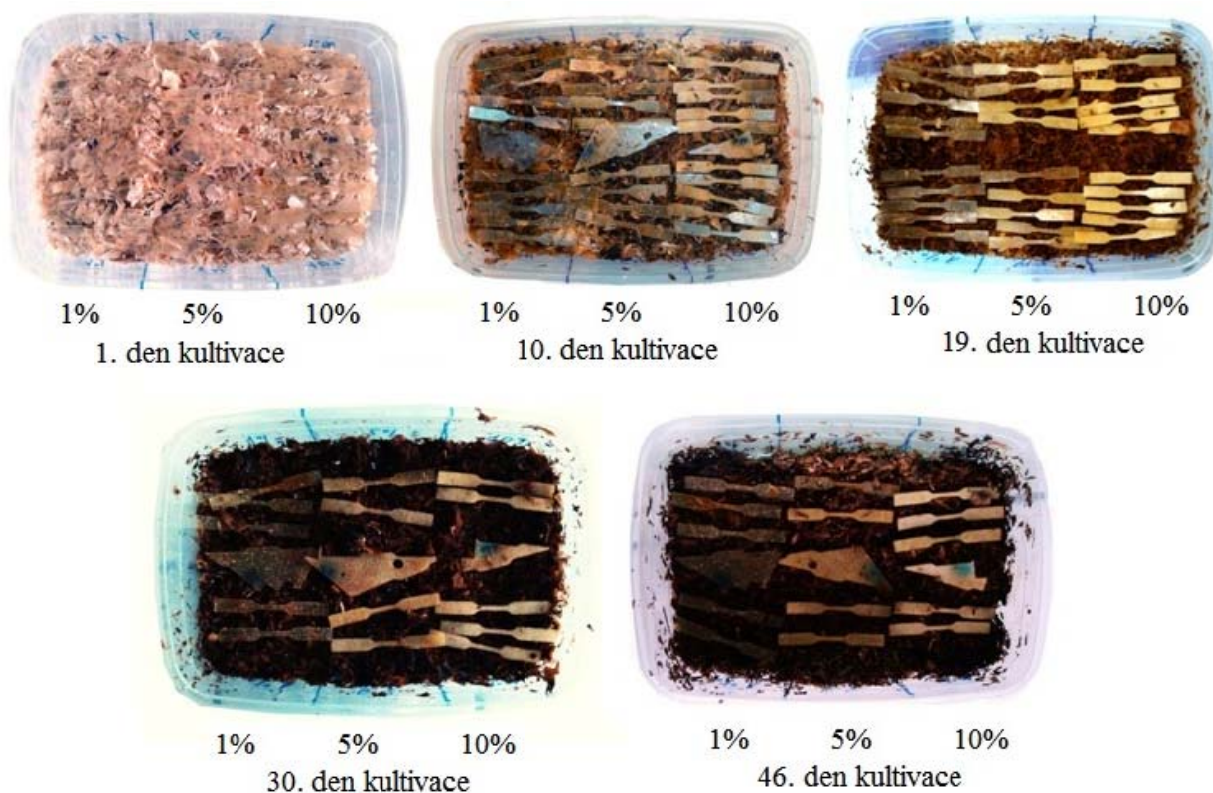
Poslední kontrola byla provedena 57. den, po které byla kultivace ukončena. Vzorky vykazovaly podobné vlastnosti jako u kontroly předchozí. Následně byly vzorky důkladně omyty destilovanou vodou a ponechány vyschnout. Poté byly vzorky zváženy a byla vypočítána procentuální ztráta hmotnosti. Vzorky byly taktéž podrobeny analýze pod mikroskopem a dále u nich byly stanoveny mechanické vlastnosti v tahu.

Změny materiálu v průběhu jednotlivých kontrol jsou znázorněny na obr. 38.



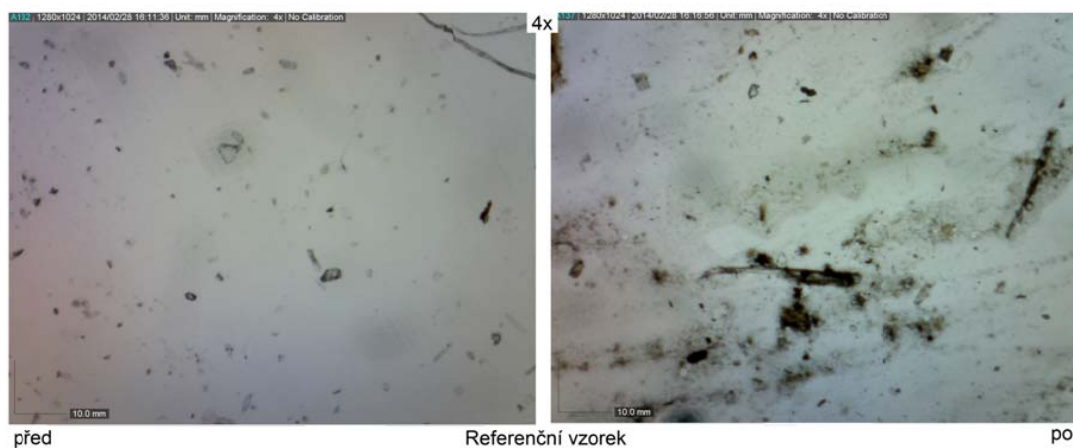
Obr. 38: Referenční PU a vzorky PU-PHB v průběhu biodegradačního testování

Na obr. 39 je znázorněn průběh biodegradace pro vzorky PU-PHB obsahující PHB připravené na FCH, změny co se týče barvy a transparentnosti. Na obrázku jsou taktéž viditelné barevné změny média v průběhu celé kultivace.

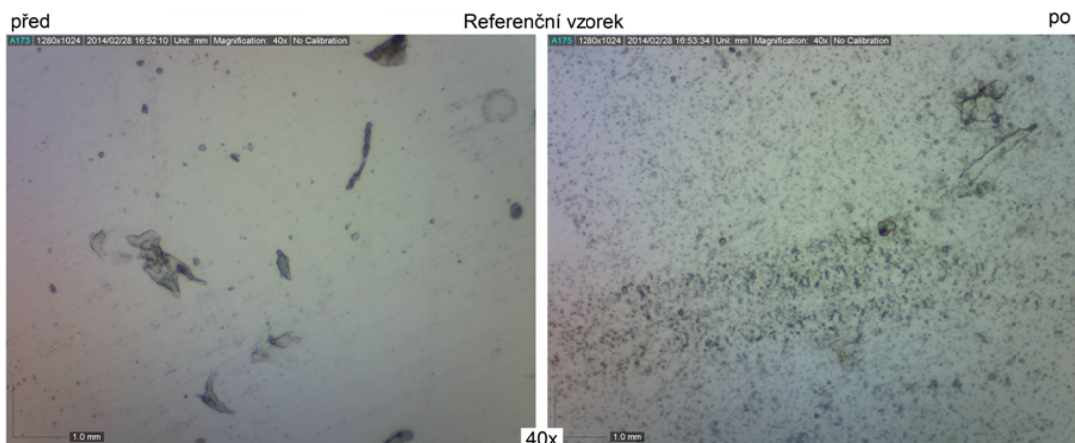


Obr. 39: Průběh biodegradace pro PU-PHB (FCH)

Všechny vzorky byly analyzovány pod mikroskopem vždy v porovnání se vzorkem před biodegradací (vlevo) a po skončení kultivace (vpravo). Snímky byly foceny při zvětšení 4krát a poté 40krát.



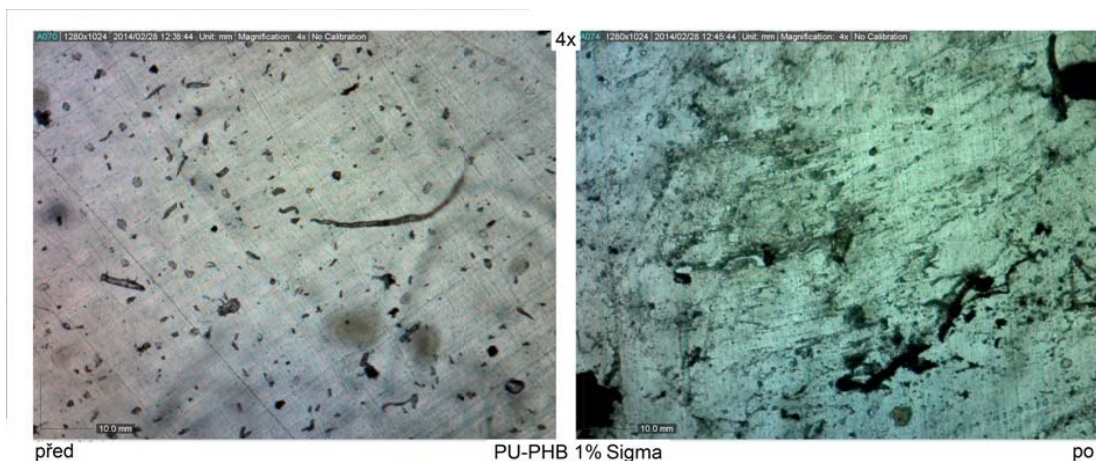
Obr. 40: Referenční vzorek při zvětšení 4x před a po biodegradčním testu



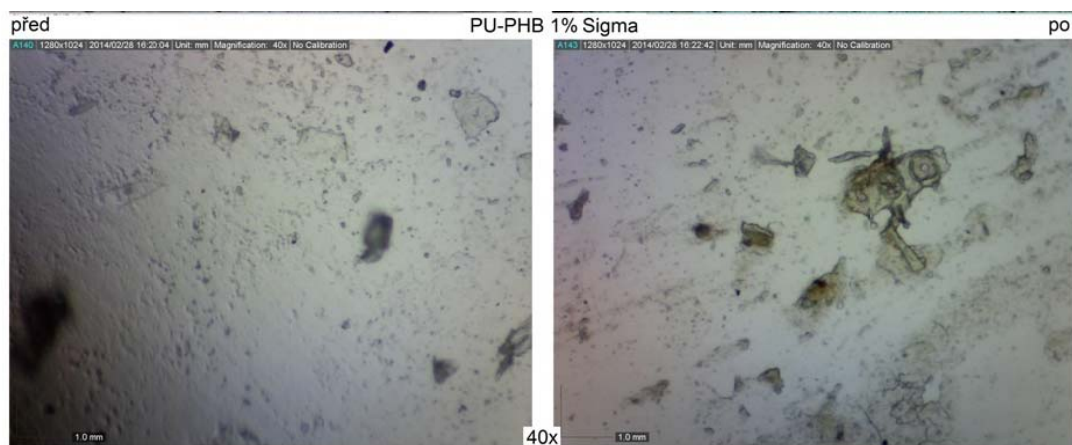
Obr. 41: Referenční vzorek při zvětšení 40x před a po biodegradačním testu

U mikroskopické analýzy referenčního vzorku PU nebyly před kultivací ani při jednom zvětšení znatelné perforace povrchu materiálu. Lze vidět, že vzorek nebyl dokonale čistý, ale obsahovat drobné nečistoty.

Po kultivaci byl vzorek více znečištěn, při zvětšení 4x nebyly změny na povrchu materiálu příliš znatelné, při zvětšení 40x jsou již viditelné drobné perforace povrchu.



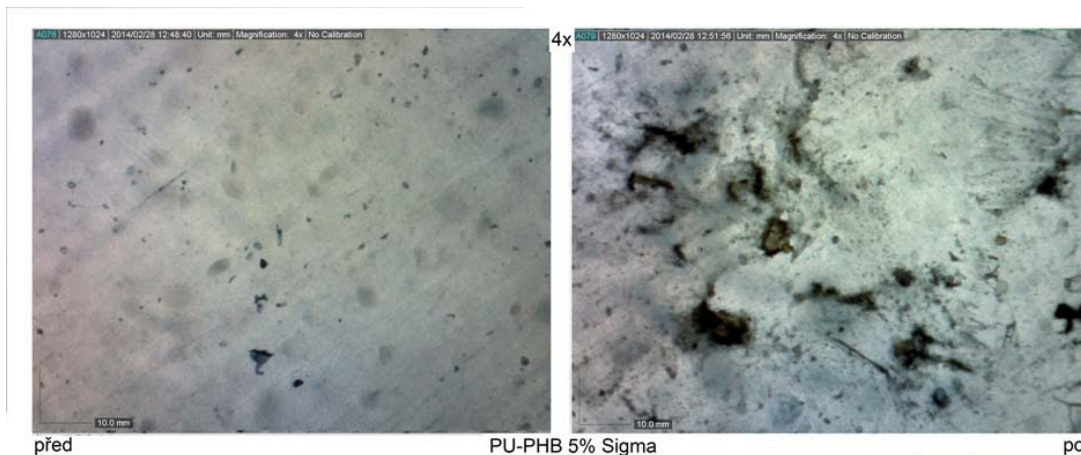
Obr. 42: 1 % PHB od firmy Sigma v PU při zvětšení 4x před a po biodegradačním testu



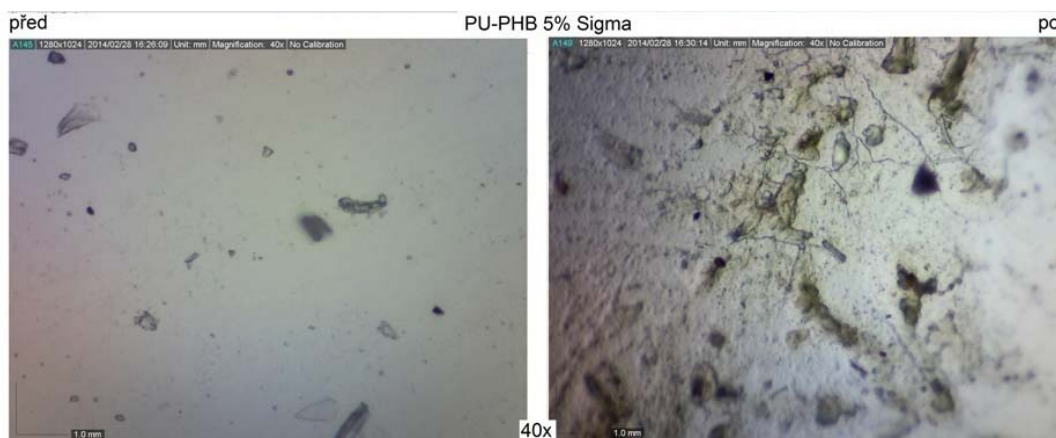
Obr. 43: 1 % PHB od firmy Sigma v PU při zvětšení 40x před a po biodegradačním testu

U vzorku obsahující ve své struktuře polyuretanu 1 % PHB od firmy Sigma jsou částčky PHB v materiálu dobře viditelné, hlavně u zvětšení 40x. Při zvětšení 4x jsou viditelné pouze nečistoty v materiálu.

Po kultivaci lze pozorovat velké znečištění povrchu, ani ale při zvětšení 40x nejsou pozorovány změny na povrchu materiálu.



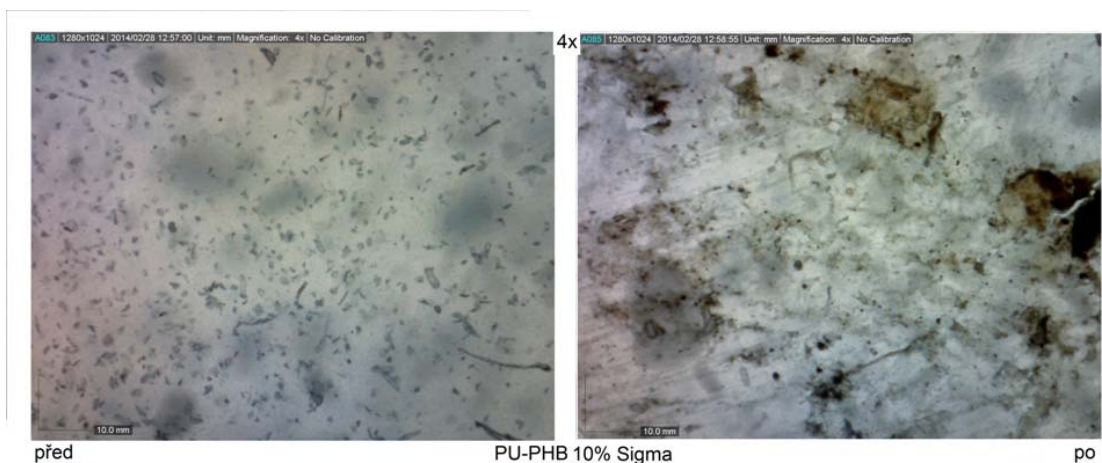
Obr. 44: 5 % PHB od firmy Sigma v PU při zvětšení 4x před a po biodegradačním testu



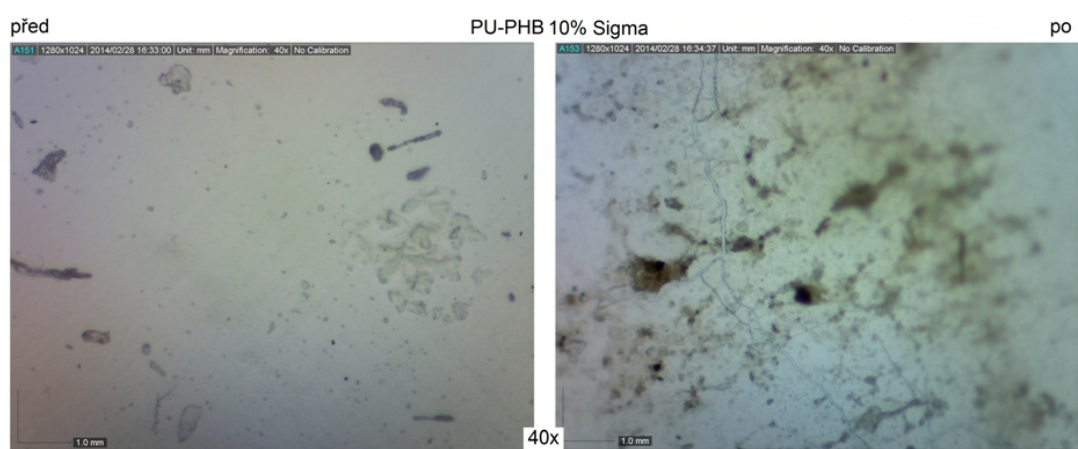
Obr. 45: 5 % PHB od firmy Sigma v PU při zvětšení 40x před a po biodegradačním testu

U vzorku obsahující ve své struktuře polyuretanu 5 % PHB od firmy Sigma jsou částčky PHB v materiálu dobře viditelné, opět při zvětšení 40x.

Po kultivaci lze pozorovat velké znečištění povrchu, kvůli němuž nelze pozorovat změny na povrchu materiálu. Při zvětšení 40x jsou již znatelné trhlinky v materiálu a lehké perforace.



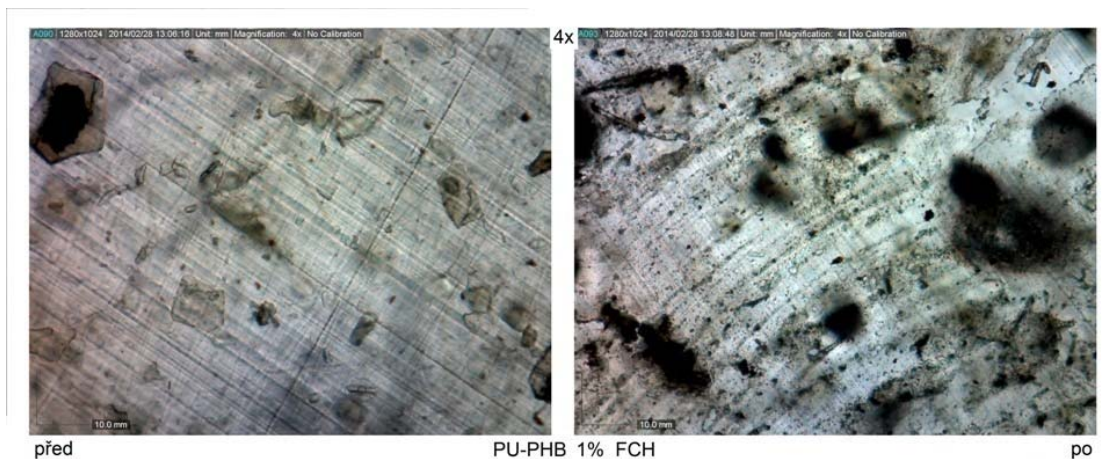
Obr. 46: 10 % PHB od firmy Sigma v PU při zvětšení 4x před a po biodegradačním testu



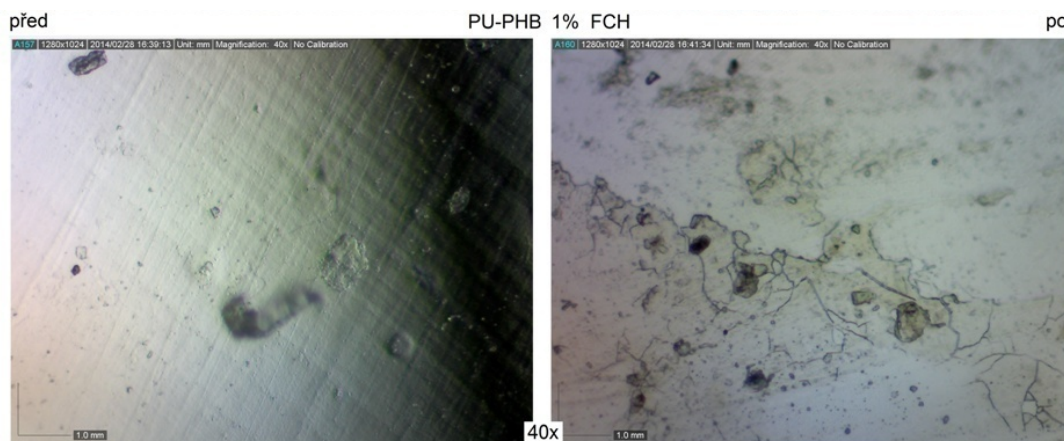
Obr. 47: 10 % PHB od firmy Sigma v PU při zvětšení 40x před a po biodegradačním testu

U vzorku obsahující ve své struktuře polyuretanu 10 % PHB od firmy Sigma jsou částičky PHB v materiálu dobře viditelné již i při zvětšení 4x, jelikož se zde nachází už velká míra PHB. U vzorku před kultivací není ani při zvětšení 40x vidět perforaci.

Po kultivaci lze pozorovat velké znečištění povrchu, kvůli němuž nelze pozorovat změny na povrchu materiálu při zvětšení 4x. Při zvětšení 40x jsou již znatelné drobné trhlinky v materiálu.



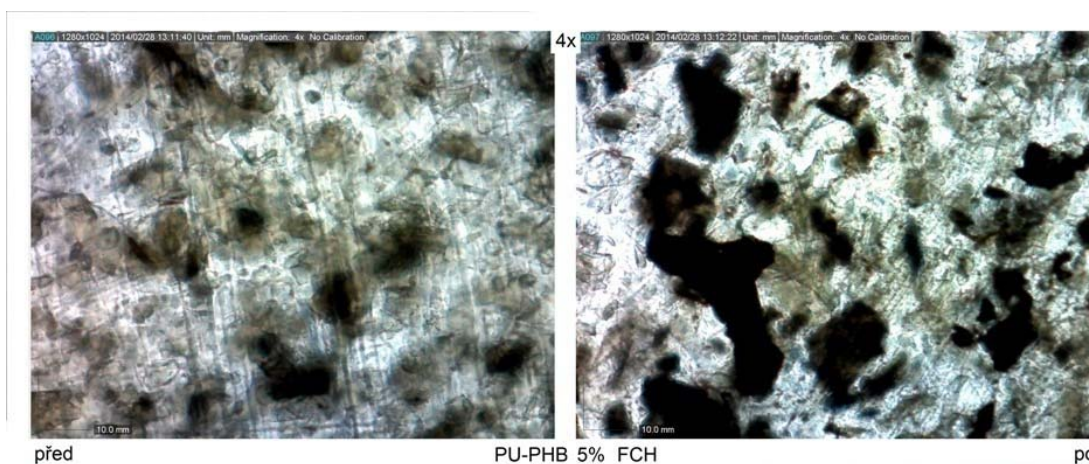
Obr. 48: 1 % PHB z FCH v PU při zvětšení 4x před a po biodegradačním testu



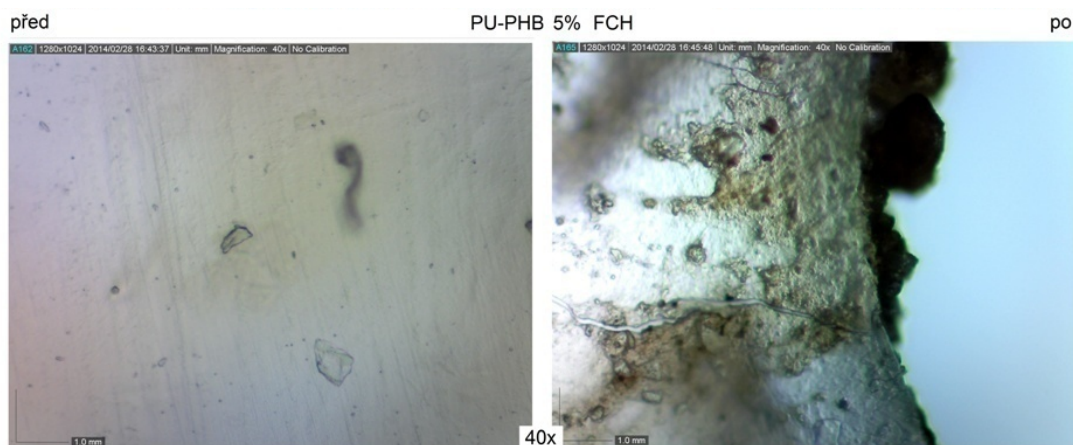
Obr. 49: 1 % PHB z FCH v PU při zvětšení 40x před a po biodegradačním testu

U vzorku obsahující ve své struktuře polyuretanu 1 % PHB z Fakulty chemické jsou částčky PHB v materiálu dobře viditelné i při zvětšení 4x, jelikož jsou dispergované částčky PHB mnohem větší, než jak to bylo u vzorků s použitým PHB od firmy Sigma. U vzorku před kultivací při zvětšení 40x jsou vidět lehké defekty na povrchu.

Po kultivaci lze pozorovat velké znečištění povrchu, ale i při 4násobném zvětšení jdou pozorovat perforace na materiálu. Při zvětšení 40x jsou již dobře viditelné trhlinky v materiálu.



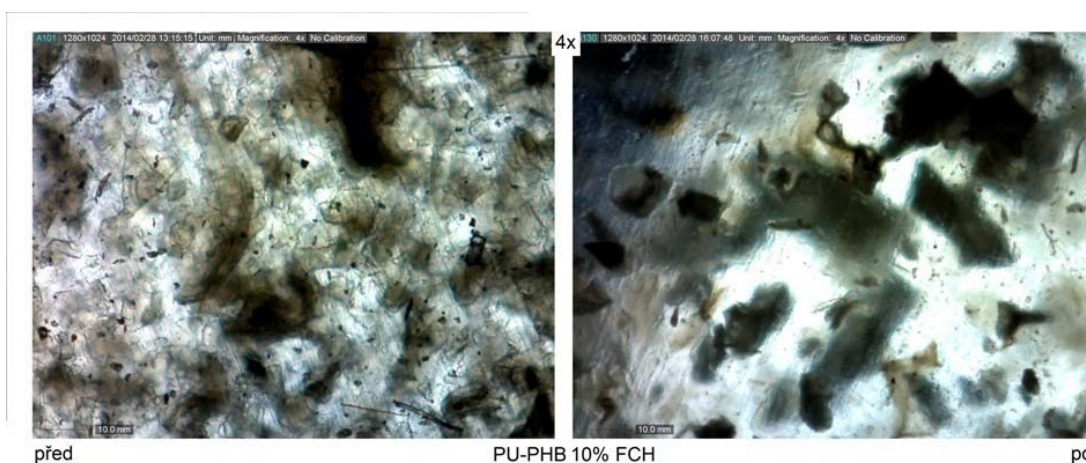
Obr. 50: 5 % PHB z FCH v PU při zvětšení 4x před a po biodegradačním testu



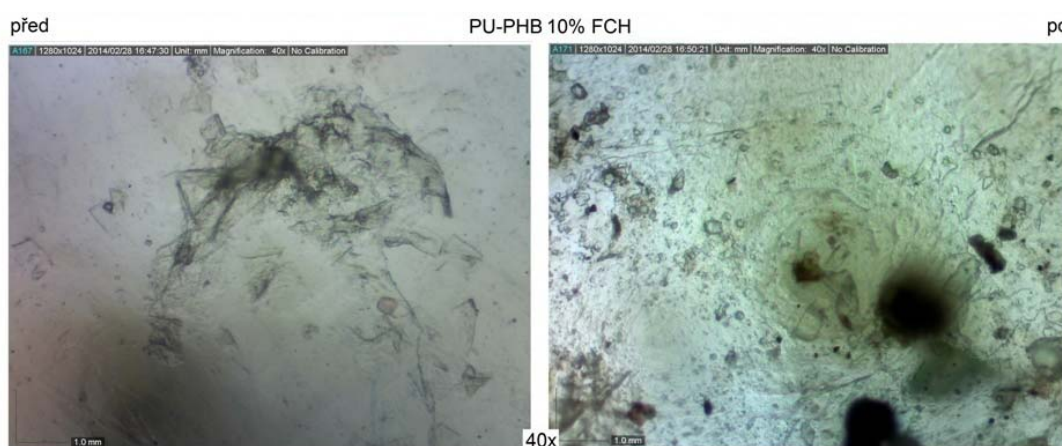
Obr. 51: 5 % PHB z FCH v PU při zvětšení 40x před a po biodegradačním testu

U vzorku obsahující ve své struktuře polyuretanu 5 % PHB z Fakulty Chemické jsou částčky PHB v materiálu hustě zastoupeny při zvětšení 4x opět z důvodu jejich velikosti. U vzorku před kultivací nejsou u žádného zvětšení viditelné defekty na povrchu materiálu.

Po kultivaci lze při čtyřnásobném přiblížení pozorovat téměř identický obraz, ale i při čtyřicetinásobném zvětšení je dobře viditelná perforace a opět jsou přítomny trhliny materiálu.



Obr. 52: 10 % PHB z FCH v PU při zvětšení 4x před a po biodegradačním testu



Obr. 53: 10 % PHB z FCH v PU při zvětšení 40x před a po biodegradačním testu

U vzorku obsahující ve své struktuře polyuretanu 10% PHB z Fakulty Chemické jsou částčky PHB v materiálu tak hustě zastoupeny, že téměř nelze vidět při zvětšení 4x nic jiného, než krystaly PHB. Nicméně při zvětšení 40x nejsou žádné defekty viditelné.

Po kultivaci lze při 4násobném přiblížení pozorovat obdobný profil, při zvětšení 40x dobře viditelná značná perforace povrchu a opět jsou přítomny i trhliny materiálu.

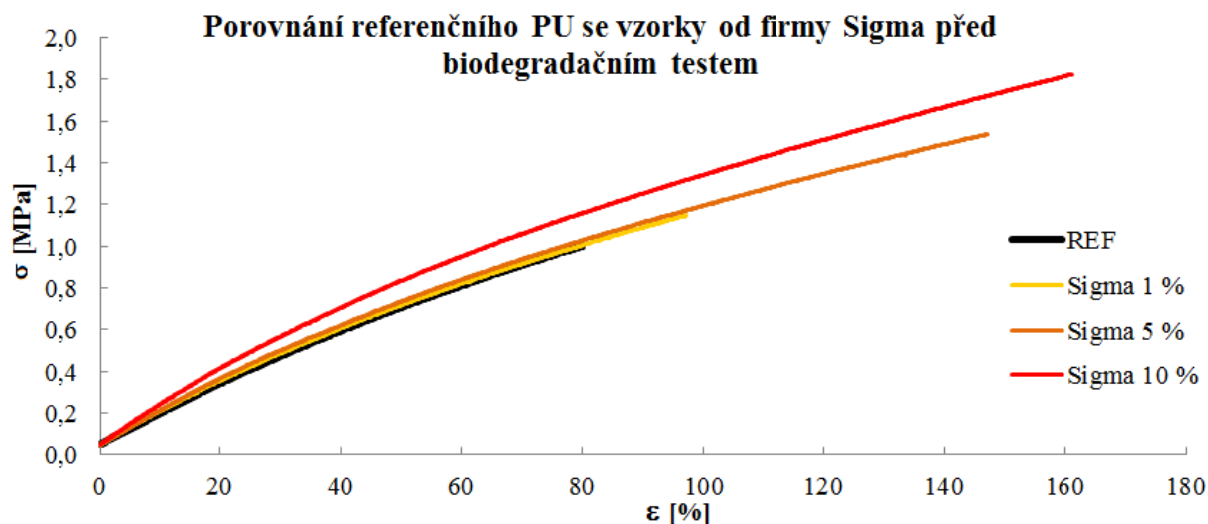
5.6 Stanovení mechanických vlastností PU-PHB v tahu

Studium mechanických vlastností v tahu bylo testováno na vzorcích PU-PHB obsahující PHB od firmy Sigma a na vzorcích s PHB připraveným na Fakultě chemické VUT v Brně. Tahové zkoušky byly provedeny u vzorků před biodegradačním testem, poté u vzorků po 19 dnech biodegradačního testu a nakonec po ukončení biodegradace.

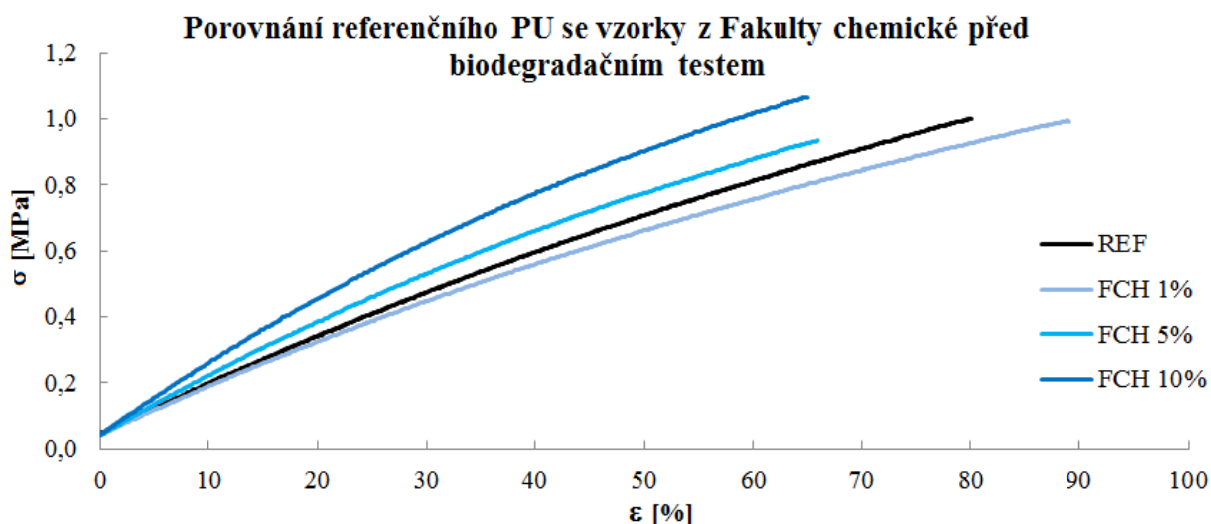
Z naměřených dat je možné vyčíst E_y – Youngův modul pružnosti, σ_B – napětí v tahu při přetržení a ε_B – deformace při přetržení.

Tab. 41: Údaje z tahové zkoušky u vzorků před biodegradačním testem

Vzorek	E_y	σ_B	ε_B
[-]	[MPa]	[MPa]	[%]
REF (PU)	1.6 ± 0.1	1.0 ± 0.1	80 ± 8
Sigma 1 %	1.7 ± 0.1	1.1 ± 0.1	97 ± 11
Sigma 5 %	1.7 ± 0.1	1.50 ± 0.04	147 ± 9
Sigma 10 %	2.0 ± 0.04	1.8 ± 0.2	161 ± 25
FCH PHB 1 %	1.6 ± 0.1	1.0 ± 0.1	87 ± 5
FCH PHB 5 %	1.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	66 ± 10
FCH PHB 10 %	2.4 ± 0.1	1.1 ± 0.1	65 ± 7



Obr. 54: Křivky napětí a protažení pro referenční vzorek PU a vzorky s PHB od firmy Sigma v PU před biodegradačním testem



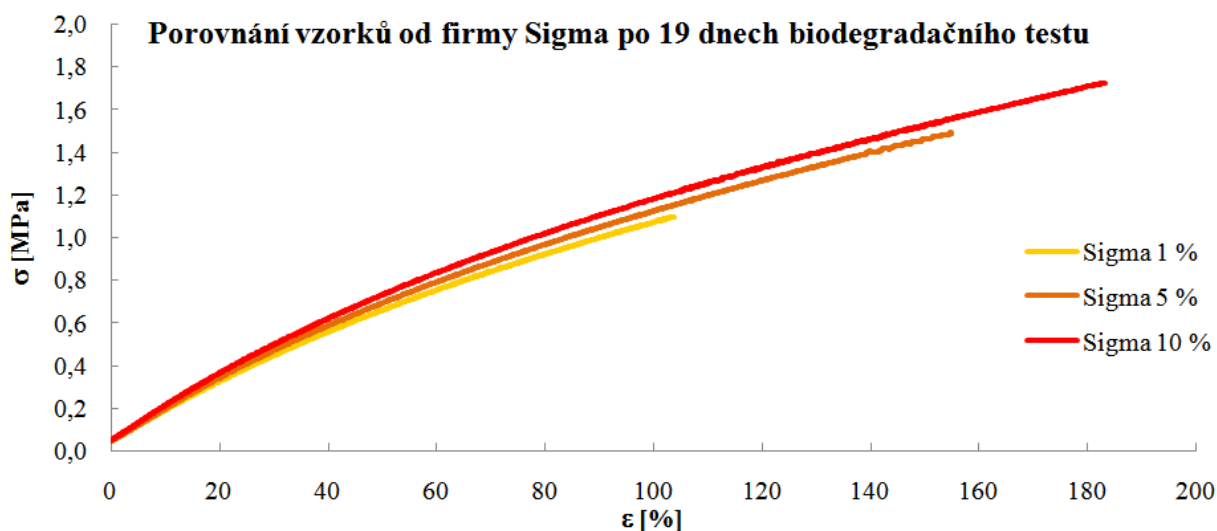
Obr. 55: Křivky napětí a protažení pro referenční vzorek PU a vzorky s PHB z Fakulty chemické v PU před biodegradačním testem

Naměřené hodnoty dokazují, že PHB začleněný do polymeru PU má na mechanické vlastnosti materiálu velký vliv. Hodnoty Youngova modulu pružnosti se v porovnání vzorků PU-PHB (PHB od firmy Sigma) s referenčním vzorkem čistého polyuretanu zvyšují, materiál je tedy tužší. Největší tuhost materiálu vykazuje 10% přídavek PHB do PU. Tento jev může být způsoben vazbou koncových OH skupin polymeru PHB s isokyanátovými skupinami přidávanými do PU v nadbytku. [71] Napětí v tahu při přetržení se také zvyšuje se zvyšující se koncentrací PHB v PU. Hodnoty dále potvrzují i zvýšení elasticity materiálu opět vzestupnou tendencí k míře PHB v PU.

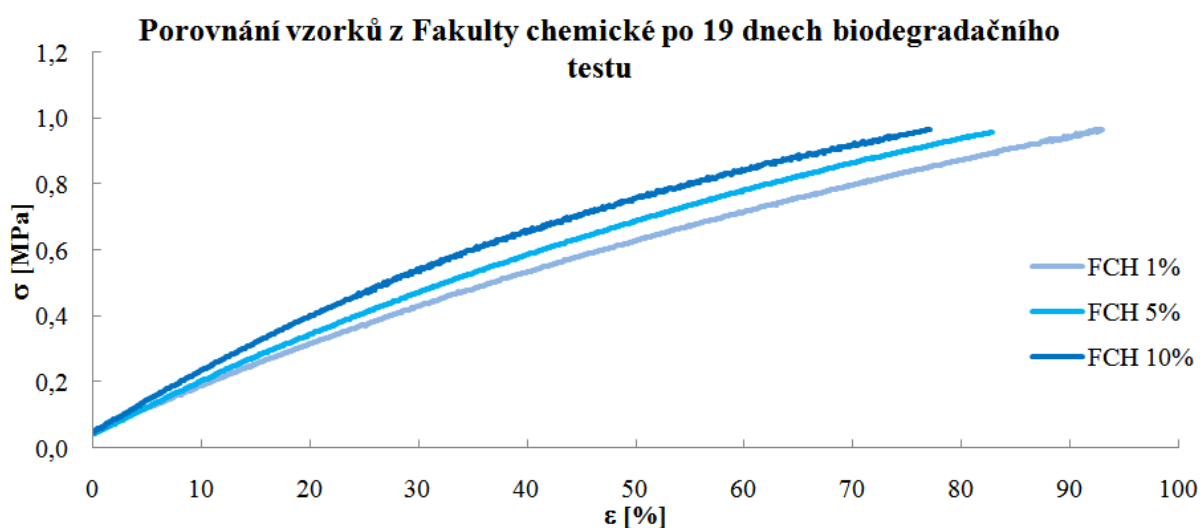
Při porovnání PU-PHB vzorků s PHB připraveným na Fakultě chemické VUT v Brně a referenčního vzorku (samotné PU) mají hodnoty Youngova modulu pružnosti opět zvyšující se tendenci, PHB tedy také působí na materiál pozitivně z hlediska tuhosti. Napětí v tahu při přetržení dosahuje podobných hodnot jako referenční vzorek. Co se týče elasticity, největší elasticitu vykazuje vzorek s 1 % PHB v PU. Tento jev může být způsoben nehomogenitou použitých částic PHB do matrice polymeru. I když může mít materiál teoreticky elasticitu větší (porovnáním se vzorky při použití PHB od firmy Sigma), nehomogenní částice mohou obsahovat kavity, které pak snáze iniciují přetržení materiálu.

Tab 42: Údaje z tahové zkoušky u vzorků po 19. dnech biodegradačního testu

Vzorek	E_y	σ_B	ϵ_B
[-]	[MPa]	[MPa]	[%]
Sigma 1 %	1.4 ± 0.2	1.1 ± 0.1	104 ± 8
Sigma 5 %	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.1	155 ± 18
Sigma 10 %	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	184 ± 25
FCH PHB 1 %	1.4 ± 0.3	1.0 ± 0.1	93 ± 7
FCH PHB 5 %	1.6 ± 0.2	0.9 ± 0.1	83 ± 8
FCH PHB 10 %	1.7 ± 0.2	0.9 ± 0.1	77 ± 17



Obr. 56: Křivky napětí a protažení pro vzorky s PHB od firmy Sigma v PU po 19 dnech biodegradačního testu

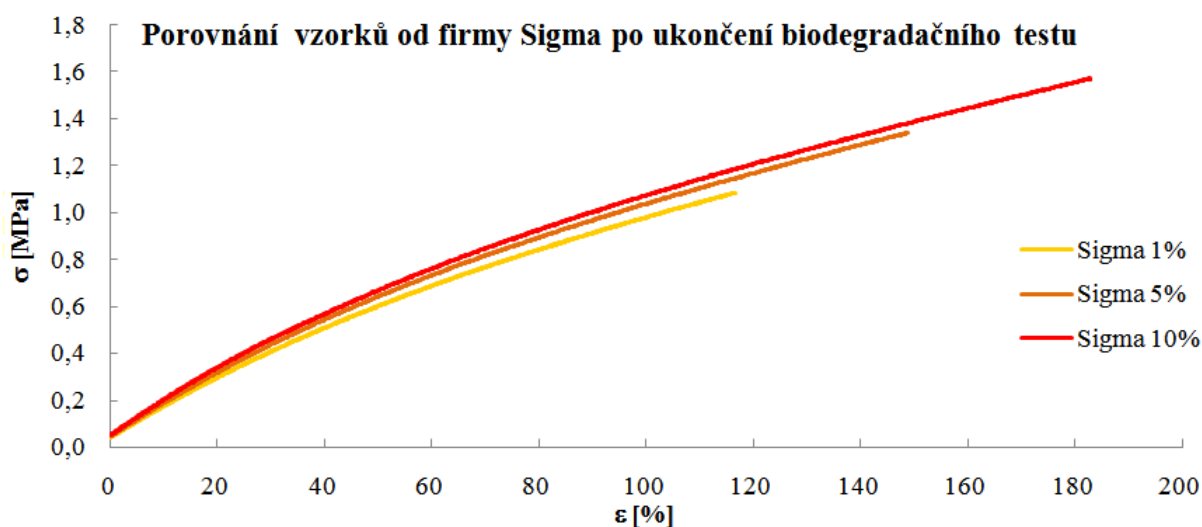


Obr. 57: Křivky napětí a protažení pro vzorky s PHB z Fakulty chemické v PU po 19 dnech biodegradačního testu

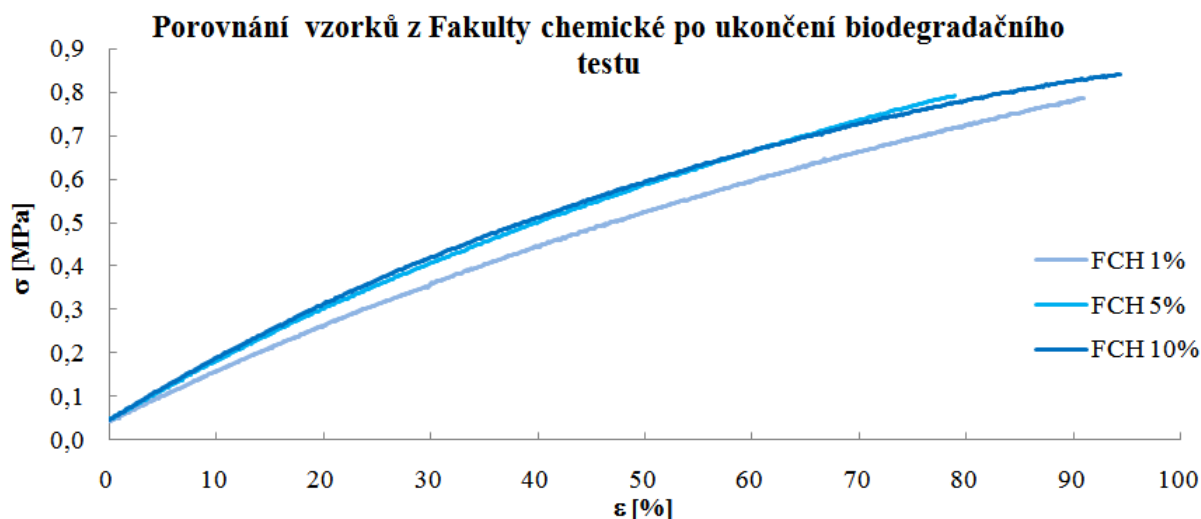
Vzorky po 19 dnech biodegradace vykazují ve všech případech snížení Youngova modulu pružnosti, hodnoty napětí v tahu při přetržení jsou velmi podobné, jako před biodegradací, nicméně byla zaznamenána větší elasticita. Největší rozdíl elasticity dosáhly vzorky s PHB od firmy Sigma se vzrůstající elasticitou ke zvyšující se koncentraci PHB v PU. U vzorků s PHB připraveným na FCH, byly hodnoty elasticity výrazně nižší a byl zaznamenán opačný trend, tedy největší elasticitu měl opět vzorek s 1 % PHB, nejmenší pak s 10 % PHB. Opět to může být způsobeno přítomností nehomogenních částic ve struktuře, kdy 1 % PHB je stále ještě malá koncentrace k vytvoření většího množství trhlin v materiálu.

Tab 43: Údaje z tahové zkoušky u vzorků po ukončení biodegradačního testu

Vzorek	E_y	σ_B	ε_B
[-]	[MPa]	[MPa]	[%]
Sigma 1 %	1.35 ± 0.09	1.09 ± 0.12	115 ± 12
Sigma 5 %	1.41 ± 0.08	1.38 ± 0.04	149 ± 12
Sigma 10 %	1.52 ± 0.05	1.50 ± 0.16	183 ± 26
FCH PHB 1 %	1.2 ± 0.2	0.79 ± 0.08	91 ± 6
FCH PHB 5 %	1.4 ± 0.1	0.79 ± 0.08	79 ± 9
FCH PHB 10 %	1.5 ± 0.1	0.85 ± 0.03	94 ± 7



Obr. 58: Křivky napětí a protažení pro vzorky s PHB od firmy Sigma v PU po ukončení biodegradačního testu



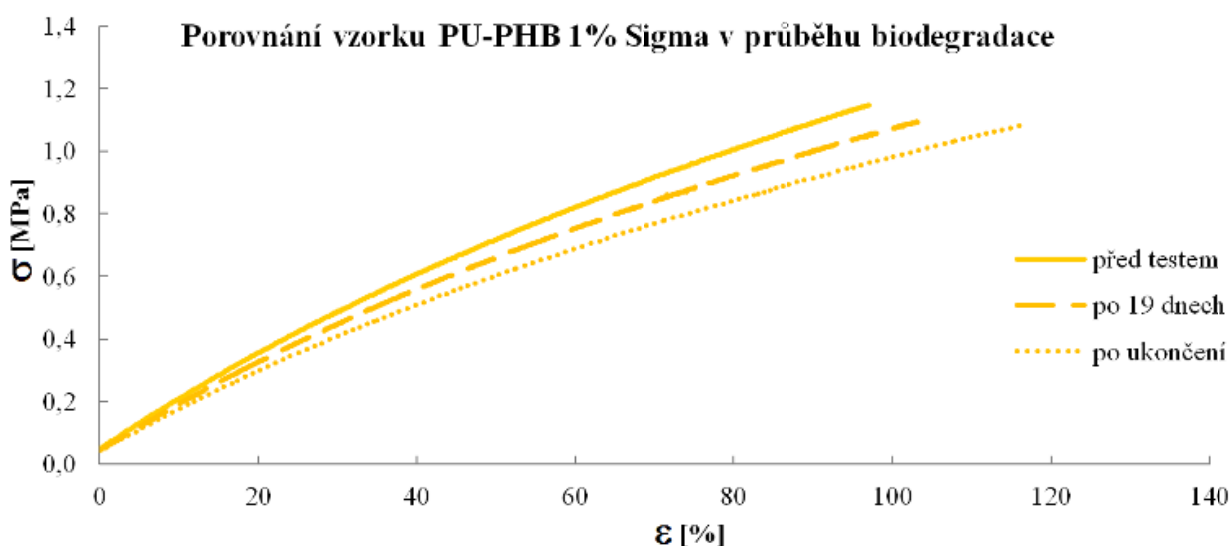
Obr. 59: Křivky napětí a protažení pro vzorky s PHB z Fakulty chemické v PU po ukončení biodegradačního testu

Po ukončení biodegradačního testu bylo u všech vzorků zaznamenán další pokles Youngova modulu pružnosti. Zaznamenán byl taktéž pokles hodnot napětí v tahu při přetržení. Míra elasticity se od předchozí kontroly opět zvětšila.

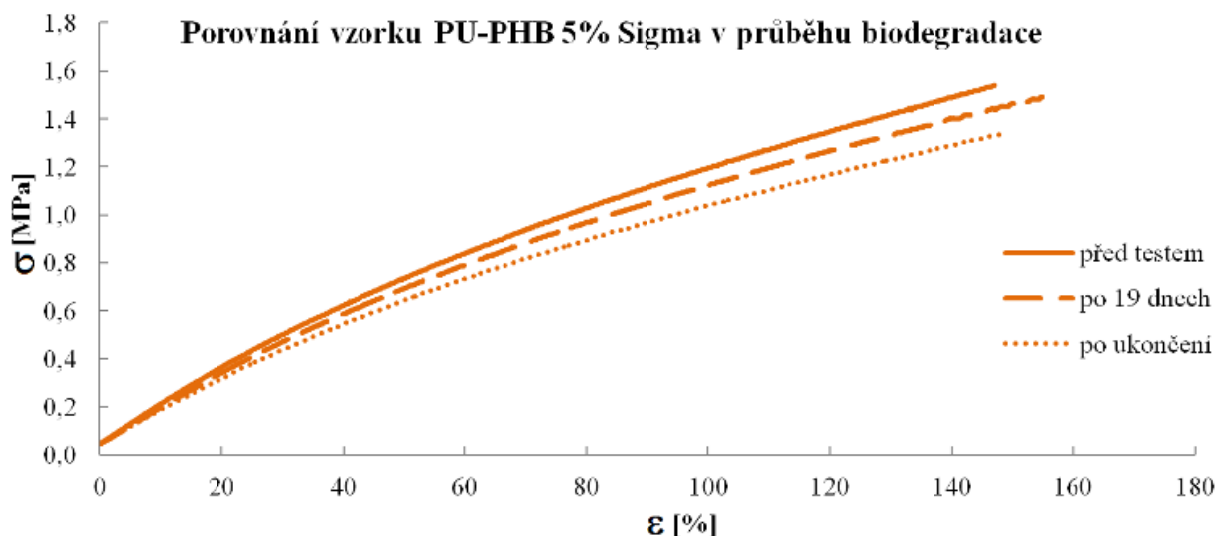
Co se týče vzorků obsahující PHB od firmy Sigma, měly vzorky v průběhu biodegradace obdobný trend. Vzorek 1 % PHB měl vždy nejnižší napětí v tahu při přetržení a elasticitu. Vzorek s 10 % PHB v PU měl hodnoty vždy nejvyšší. Celkově se v průběhu biodegradace snižoval Youngův modul pružnosti, materiál byl tedy po biodegradaci mnohem méně tuhý, než před testováním. Hodnoty napětí v tahu při přetržení si udržely svoji původní hodnotu. Hodnota elasticity materiálu se v průběhu biodegradace zvýšila. Celkově byl studovaný materiál po biodegradaci elastičtější a méně tuhý. Biodegradace pravděpodobně způsobila rozpad kratších řetězců polymeru PHB, což vedlo ke snížení Youngova modulu pružnosti. Zbylé dlouhé řetězce, které jsou pravděpodobně schopny relaxace, degradovány nebyly, ve výsledku jsou tedy zodpovědné za zvyšování elasticity.

U vzorků obsahující PHB z Fakulty chemické došlo biodegradací k velkému poklesu Youngova modulu pružnosti. Dále byl už znatelný i pokles napětí v tahu při přetržení a opět zvýšení elasticity. Vzorky měly podobný charakter před a po 19 dnech biodegradačního testu, a to opačný, jak v případě vzorků s PHB od firmy Sigma. Tedy největší elasticitu vykazoval vzorek s 1 % PHB a nejmenší s 10 % PHB v PU. Převrat nastal až po ukončení kultivace, kdy vzorek s 10 % PHB vykazoval elasticitu nejvyšší. U těchto vzorků pravděpodobně docházelo ke kolizi dvou faktorů, a to trhliny materiálu způsobené velkými granulemi použitého PHB, které snižovaly elasticitu a biodegradace krátkých řetězců PHB, kdy přítomnost dlouhých řetězců zase elasticitu zvyšovala.

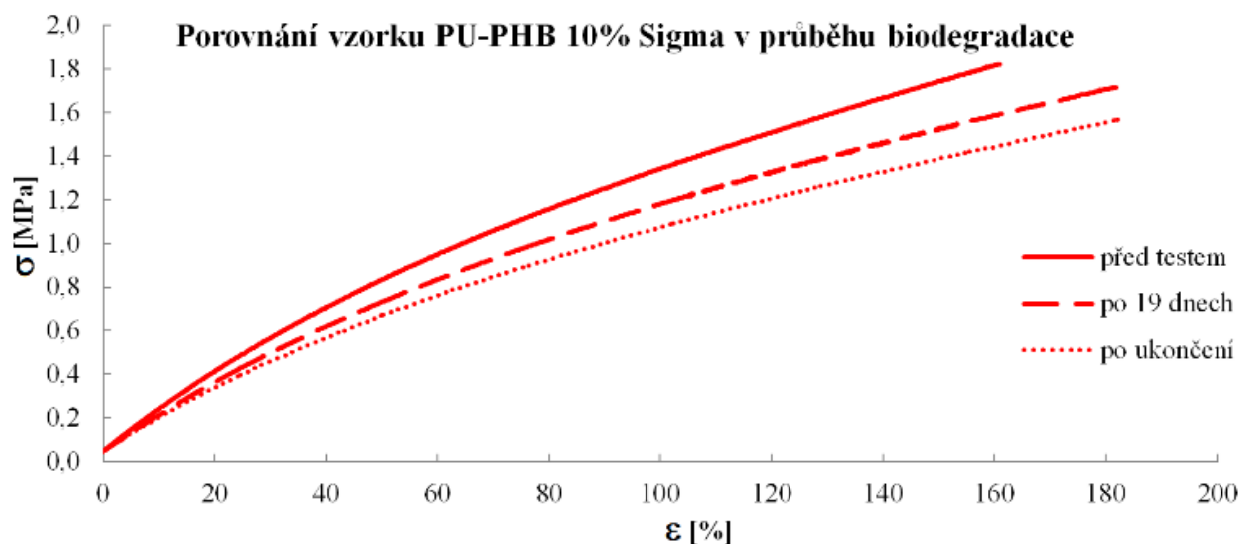
Co se týče naměřených hodnot, byly porovnány i změny mechanických vlastností v tahu jednotlivých vzorků v průběhu testování, viz obr. 60, 61, 62, 63, 64 a 65.



Obr. 60: Pevnosti v tahu u vzorku PU-PHB 1 % (Sigma)



Obr. 61: Pevnosti v tahu u vzorku PU-PHB 5 % (Sigma)

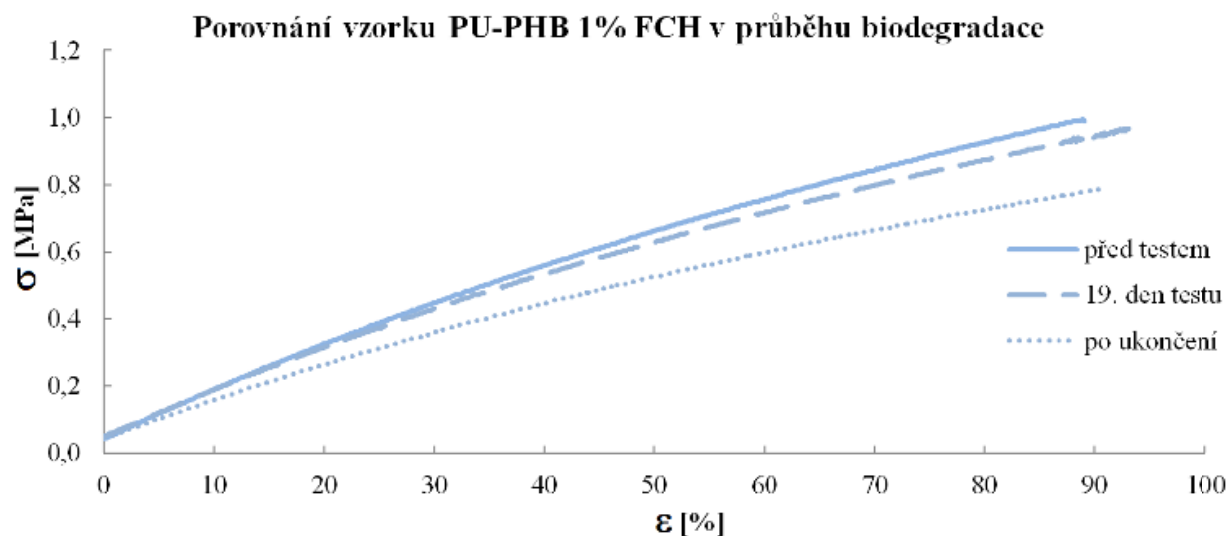


Obr. 62: Pevnosti v tahu u vzorku PU-PHB 10 % (Sigma)

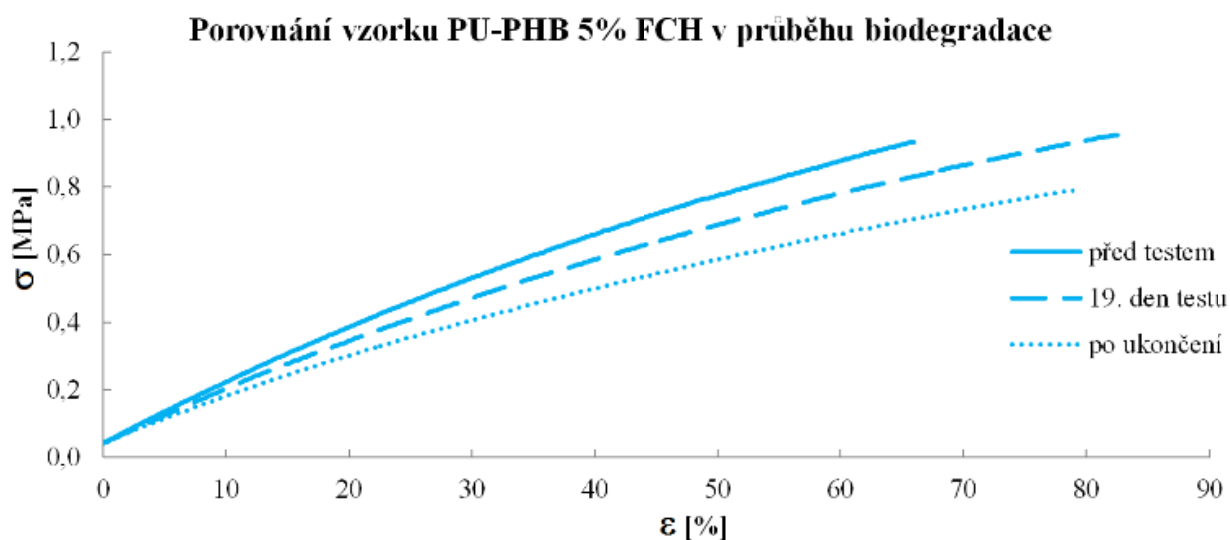
Vzorek s 1 % PHB od firmy Sigma v PU vykazoval v průběhu biodegradace snižování napětí v tahu při přetržení a zvyšování elasticity.

Druhý vzorek (5 % PHB v PU) vykazoval v průběhu biodegradace lehké snižování napětí v tahu při přetržení a téměř konstantní elasticitu. Zvýšená hodnota elasticity po 19 dnech kultivace je stále v intervalu spolehlivosti dané směrodatnou odchylkou.

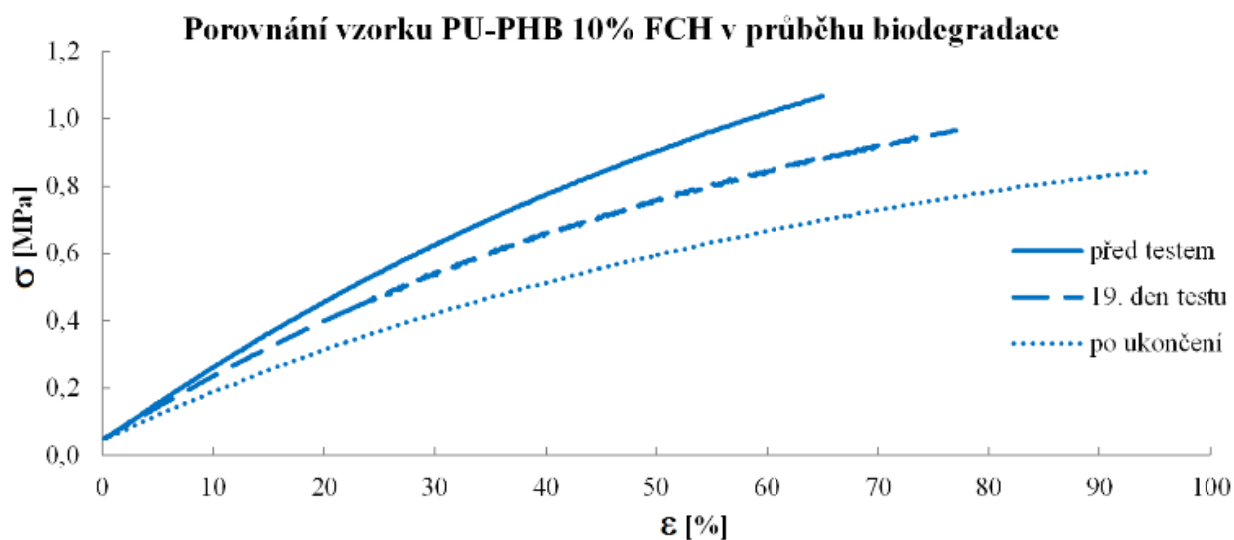
Poslední studovaný vzorek (10 % PHB od firmy Sigma v PU) vykazoval největší snížení napětí v tahu. Po 19 dnech kultivace byla hodnota elasticity téměř identická.



Obr. 63: Pevnosti v tahu u vzorku PU-PHB 1 % (FCH)



Obr. 64: Pevnosti v tahu u vzorku PU-PHB 5 % (FCH)



Obr. 65: Pevnosti v tahu u vzorku PU-PHB 10 % z (FCH)

Vzorky obsahující PHB z FCH vykazovaly v průběhu biodegradace větší snižování napětí v tahu při přetržení, než u vzorků obsahující PHB od firmy Sigma. Naopak hodnoty elasticity byly mnohem menší.

Všechny vzorky vykazovaly trend snížení napětí v tahu při přetržení a zvyšování elasticity.

5.7 Diskuze k výsledkům biodegradace PU-PHB

Pro studium biodegradace kopolymeru PU-PHB byla provedena polosuchá kultivace trvající přesně 57. dní. V průběhu kultivace byly zkoumány makroskopické změny materiálu. Po kultivaci byla stanovovaná vázková analýza. Výsledky jsou uvedeny v tab. 44.

Tab. 44: Porovnání úbytku hmotnosti před a po kultivaci

	Materiál	Hmotnost před biodegradačním testem	Hmotnost po biodegradačním testu	Rozdíl hmotností	
		[g]	[g]	[g]	[%]
	Referenční vzorek	0,5035	0,4902	0,0133	2,6
Sigma	PU-PHB 1%	0,4868	0,4832	0,0036	0,7
	PU-PHB 5%	0,6703	0,6663	0,0040	0,6
	PU-PHB 10%	0,8765	0,8713	0,0052	0,6
FCH	PU-PHB 1%	0,8430	0,8374	0,0056	0,7
	PU-PHB 5%	0,9489	0,9291	0,0198	2,1
	PU-PHB 10%	0,3848	0,3720	0,0128	3,3

Z výsledků vyplývá, že materiál PU-PHB byly přidavkem PHB od firmy Sigma v porovnání s referenčním vzorkem pouze PU více odolnější k biodegradaci. Jelikož byl ale referenční vzorek nepatrně mechanicky poškozen (viditelné na obr. 33), nebude rozdíl hmotností před a po kultivaci tak markantní. Jelikož byla ztráta jen nepatrná, nelze předpokládat procentuální rozdíl více než 0,5 %. I tak ale vychází PU-PHB (Sigma) značně odolnější, než samotný PU. Při porovnání vzorků obsahující PHB od firmy Sigma je zajímavé, že bez ohledu na koncentraci dispergovaného PHB byl procentuální úbytek hmotnosti téměř identický. Důvodem může být velmi dobrá dispergace malých částic PHB v PU, kdy se depolymerázy vylučované bakteriemi nemohly efektivně dostat přes polyuretanový materiál, PHB tedy pouze zvýšil pevnost polymeru. Z výsledků mechanických vlastností materiálu v tahu bylo potvrzeno, že PU-PHB je oproti referenčnímu vzorku tužší. V průběhu biodegradace se tato tuhost prezentovaná jako Youngův modul pružnosti snižovala, naproti tomu se elasticita výrazně zvyšovala.

U vzorků PU-PHB (FCH) je již znatelný rozdíl v porovnání jak vzorků mezi sebou, tak i vzorků s referenčním PU. Opět bylo u vzorku 1 % PHB dokázáno, že přítomnost PHB v PU zhoršuje biodegradační účinnost. Při porovnání vzorků mezi sebou, je zde jasný trend zvyšování procentuálního úbytku v závislosti na koncentraci PHB v PU. Důvodem může být dispergace velkých (makroskopicky viditelných) částic PHB v PU, PHB depolymerázy tak měly větší možnost dostat se k částicím a účinně je degradovat. Důkazem je i značná lepivost vzorků, která se objevila v průběhu kultivace, což je potvrzení snižování molekulové hmotnosti materiálu. Studium mechanických vlastností ukázalo, že PHB v PU je opět polymer zlepšující mechanické vlastnosti materiálu, co se týče tuhosti. Nicméně velikost

PHB granulí v PU umožnila lepší přístup k biodegradaci a tím jsou potvrzeny hodnoty, které ukazují větší snížení Youngova modulu pružnosti a napětí v tahu při přetržení u vzorků obsahující PHB z FCH, než u vzorků s PHB od firmy Sigma. Dále vykazují také horší elastické vlastnosti materiálu, než vzorky s PHB od firmy Sigma.

- V rámci předložené práce byly studovány možnosti biodegradace polyhydroxybutyrátu (PHB). Při studiu za kontrolovaných podmínek byla posuzovaná biodegradabilita PHB a jeho různých forem (PHB prášku a PHB fólie) pomocí tří druhů mikroorganismů, vždy jednoho zástupce za bakterie (*Delftia acidovorans*), kvasinky (*Aureobasidium pullulans*) a plísně (*Aspergillus fumigatus*). Materiály byly při kultivaci jednotlivých mikroorganismů použity jako jediný dostupný zdroj uhlíku.
- Jako zástupce bakterií byla studována *D. acidovorans* CCM 283. Aktivita extracelulárních PHB depolymeráz byla stanovována v průběhu celé kultivace pomocí turbidimetrické metody. Pomocí této metody byly stanoveny optimální podmínky pro aktivitu extracelulární PHB depolymerázy jako 50 °C a pH 7. Největší enzymatická aktivita byla naměřena 5. den kultivace. Maximální hodnoty aktivit se pohybovaly okolo 1,3 µg/ml·min. Hmotnostní úbytek PHB fólie činil 0,3 %, u PHB prášku to bylo 0,6 %. Vzhledem k malým hmotnostem úbytku materiálu se stanovení hmotnostního úbytku nejeví být jako optimální způsob studia degradace PHB materiálu za podmínek testu. Stanovena byla také molekulová hmotnost materiálů po expozici bakteriální kultuře. Pokles molekulové hmotnosti byl výrazný především u materiálu ve formě prášku, což je pravděpodobně důsledkem výrazně většího povrchu.
- Jako zástupce kvasinek byl studován *A. pullulans*, konkrétně tři druhy, a to CCM 8182, CCM F-148 a CCY 027-001-115. Zde byly studovány rozdíly ve schopnosti biodegradace mezi zaočkováním kultury z inokula a přímo z agarové plotny. Aktivita extracelulárních depolymeráz byla stanovována v průběhu celé kultivace opět pomocí turbidimetrické metody a bylo také provedeno gravimetrické stanovení úbytku materiálu. Obdobně jako u bakterie, i zde byly stanoveny optimální podmínky pro aktivitu extracelulární PHB depolymerázy jako 50 °C a pH 6. V průběhu kultivace se u všech druhů zaočkovaných z inokula pohybovaly aktivity okolo 0,42 µg/ml·min. Při zaočkování kultury z agarové plotny byly maximální hodnoty naměřeny 15. den kultivace, zde byly již větší rozdíly v naměřených aktivitách použitých kmenů, hodnoty byly tedy v rozmezí od 0,17-0,37 µg/ml·min. Gravimetrie ukázala, že hmotnostní úbytek byl pokaždé menší, co se týče kultury zaočkované z agarové plotny, což dokazuje, že způsob zaočkování kultury *A. pullulans* má vliv na degradaci PHB. Při zaočkování z agarové plotny neměly pravděpodobně buňky dostatek živin pro růst a výsledná aktivita extracelulárních depolymeráz tak byla menší, než v případě zaočkování z inokula. Průměrný hmotnostní úbytek při zaočkování kultur z inokula se pohyboval okolo 3,5 %, v případě zaočkování z agarové plotny okolo 2,9 %.
- Zástupcem plísní byl *A. fumigatus* izolovaný na Fakultě chemické VUT v Brně. Při kultivaci plísně byly použity jako zdroj uhlíku PHB prášek a PHB fólie. Aktivita extracelulárních depolymeráz byla stanovována v průběhu celé kultivace opět pomocí turbidimetrické metody a po kultivaci byla použita metoda gravimetrická. První metodou byly měřeny optimální podmínky enzymu, které byly 50 °C a pH 8. Největší enzymatická aktivita byla naměřena 7. den kultivace, kdy byla hodnota aktivity enzymu 5,556 µg/ml·min při použití PHB fólie jako zdroje uhlíku, při použití PHB prášku byla maximální aktivita naměřena den 10., a to 1,777 µg/ml·min. Gravimetrie podala jasné výsledky, a to v obou dvou případech 100 % hmotnostní úbytek.

- U plísně *A. fumigatus* byl zaznamenán odlišný mechanismus degradace PHB při porovnání PHB prášku a PHB fólie. V případě přítomnosti PHB prášku jako jediného zdroje uhlíku vykazovala kultura nárůst velkých kulovitých shluků kultury, které poté začaly absorbovat PHB granule. Z tohoto důvodu jsou maximální hodnoty aktivit o pár dnů opožděny, na rozdíl od kultury s PHB fólií, které narostly jen do drobných kuliček a ihned PHB degradovaly.
- Extracelulární proteiny všech tří kultur byly analyzovány pomocí SDS-PAGE, kde byly detekovány zóny odpovídající PHB depolymeráze u bakterie *D. acidovorans* a plísně *A. fumigatus*.
- Z první části experimentální části práce vyplývá, že bakterie *D. acidovorans* dokáže částečně degradovat PHB, kvasinka *A. pullulans* degradoje PHB v tak malé míře, že se dá diskutovat, jestli je PHB degradace schopná. Naopak u plísně *A. fumigatus* je schopnost degradovat PHB nevyvratitelná.
- Druhá část experimentální práce se zabývala biodegradací PHB materiálů v podmínkách simulujících komponovací proces v laboratorním měřítku. Použitými materiály byly PHB fólie, PHB tvrzená fólie a PHB Nanoul textilie. Nejlepší výsledky vykazovala PHB textilie, díky své nízké hmotnosti a relativně velkému povrchu byla zcela degradována za pouhých 15. dní. U PHB fólie bylo k úplné degradaci zapotřebí dnů 19., jako nejpomaleji degradovaným materiálem byla PHB tvrzená fólie, jakožto nejtěžší použitý materiál. K jeho úplné degradaci byla nutná kultivace po dobu 46 dnů.
- Dalším směrem druhé části experimentální práce bylo testování vlivu kompostovacího procesu na polyuretanové materiály obsahující PHB jako částečnou náhradu (1, 5 a 10 %) polyesterového polyolu. K modifikaci polyuretanových materiálů bylo jednak použito komerčně dostupné PHB od firmy Sigma a také PHB připravené na FCH VUT. Samotné PU-PHB materiály byly připraveny pracovníky Ústavu chemie materiálů.
- Po kultivaci bylo zjištěno, že PU-PHB obsahující PHB od firmy Sigma vykazoval nižší míru biodegradability, než referenční PU a rozdíly ve vzorcích obsahující různé podíly PHB byly málo průkazné. PU-PHB obsahující PHB vyrobený na FCH taktéž vykazoval vyšší rezistenci vůči biodegradaci, než samotný PU, pouze ale u vzorku s nejnižším obsahem PHB, tedy 1 %. Gravimetrickou metodou bylo zjištěno, že míra degradace se zvyšovala s rostoucím obsahem PHB v PU. Nejvyšší hmotnostní úbytek tedy vykazoval 10 % PU-PHB, s úbytkem hmotnosti 3,3 %.
- Mechanické vlastnosti v tahu PU-PHB ukázaly zvýšení tuhosti materiálu v závislosti na přidaném PHB. V průběhu biodegradačního testu byl u vzorků obsahujících PHB od firmy Sigma pozorován pokles Youngova modulu pružnosti a nárůst elasticity. Tento trend pak koreloval s obsahem PHB v materiálu. Vysvětlením tohoto jevu může být přednostní degradace kratších řetězců PHB, které jsou zodpovědné za tuhost materiálu, v materiálu pak zůstaly řetězce dlouhé, schopné relaxace, které způsobovaly větší elasticitu materiálu. Biodegradace vzorků obsahujících PHB z Fakulty chemické vykazovaly podobný trend, až na hodnoty elasticity, kdy shluky velkých PHB granulí mohou mít mikrotrhliny iniciující přetržení materiálu při určité hodnotě napětí (okolo 1 MPa na počátku a po 19 dnech testu a okolo 0,8 MPa na konci testu). Nejvyšší elasticitu tedy vykazoval vzorek s 1 % PHB v PU. Na konci kultivace již měl největší míru elasticity 10 % PU-PHB.

PHA	polyhydroxyalkanoáty
PHB	polyhydroxybutyrát
P3HB	poly[(R)-3-hydroxybutyrát]
PHV	polyhydroxyvalerát
P3HV	poly-3-hydroxyvalerát
[P(3HB-3HV)]	kopolymer poly-3-hydroxyvalerátu a poly-3-hydroxybutyrátu
PHBV	poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát)
PHASCL	polyhydroxyalkanoáty s krátkou délkou řetězce (3–5 atomů uhlíku)
PHAMCL	polyhydroxyalkanoáty se střední délkou řetězce (5–16 atomů uhlíku)
PU	polyuretan
PU-PHB	kopolymer polyuretanu a polyhydroxybutyrátu
FCH	Fakulta chemická
YPD	yeast extract-peptone-dextrose broth
NB	nutrient Broth
T _g	teplota skelného přechodu
ATP	adenosintrifosfát
Acetyl-CoA	acetyl koenzymA
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát

8 Literatura

- [1] SHIMAO, Masayuki. Biodegradation of plastics. *Current Opinion in Biotechnology*. 2001, vol. 12, issue 3, s. 242-247. DOI: 10.1016/S0958-1669(00)00206-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166900002068>
- [2] SHAH, Aamer Ali, Fariha HASAN, Abdul HAMEED a Safia AHMED. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*. 2008, vol. 26, issue 3, s. 246-265. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.12.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975008000141>
- [3] CHANPRATEEP, Suchada. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2010, vol. 110, issue 6, s. 621-632. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172310002525>
- [4] MARTEN, Elke, Rolf-Joachim MÜLLER a Wolf-Dieter DECKWER. Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters I. Low molecular mass model esters and aliphatic polyesters. *Polymer Degradation and Stability*. 2003, vol. 80, issue 3, s. 485-501. DOI: 10.1016/S0141-3910(03)00032-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391003000326>
- [5] REDDY, C.S.K, R GHAI, RASHMI a V.C KALIA. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*. 2003, vol. 87, issue 2, s. 137-146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852402002122>
- [6] DOI, Y. a A. STEINBÜCHEL. *Biopolymers. Volume 4, Polyesters III : applications and commercial products*. Editor Susheel Kalia, Luc Averous. Weinheim: Wiley-VCH, 2002, 398 s. ISBN 35-273-0225-5.
- [7] CHANDRA, R. Biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science*. vol. 23, issue 7, s. 1273-1335. DOI: 10.1016/S0079-6700(97)00039-7. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670097000397>
- [8] IS/ISO 20200. *Plastics - Determination of disintegration of plastic materials under simulated compositing conditions in a laboratory-scale test*. India: Bureau of Indian Standards (BIS), 2004. Dostupné z: <https://archive.org/details/gov.in.is.iso.20200.2004>
- [9] WENG, Yun-Xuan, Xiu-Li WANG a Yu-Zhong WANG. Biodegradation behavior of PHAs with different chemical structures under controlled composting conditions. *Polymer Testing*. 2011, vol. 30, issue 4, s. 372-380. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2011.02.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142941811000195>
- [10] SIRACUSA, Valentina, Pietro ROCCULI, Santina ROMANI a Marco Dalla ROSA. Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science*. 2008, vol. 19, issue 12, s. 634-643. DOI: 10.1016/j.tifs.2008.07.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224408002185>
- [11] ROSA, D.S, R.P FILHO, Q.S.H CHUI, M.R CALIL a C.G.F GUEDES. The biodegradation of poly- β -(hydroxybutyrate), poly- β -(hydroxybutyrate-co- β -valerate) and poly(ϵ -caprolactone) in compost derived from municipal solid waste. *European*

- Polymer Journal*. 2003, vol. 39, issue 2, s. 233-237. DOI: 10.1016/S0014-3057(02)00215-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001430570200215X>
- [12] SUDESH, K, H ABE a Y DOI. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*. 2000, vol. 25, issue 10, s. 1503-1555. DOI: 10.1016/S0079-6700(00)00035-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670000000356>
- [13] KASUYA, K., Y. INOUE, T. TANAKA, T. AKEHATA, T. IWATA a T. FUKUI. Biochemical and molecular characterization of the polyhydroxybutyrate depolymerase of *Comamonas acidovorans* YM1609, isolated from freshwater. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1997, vol. 63, no. 12, 4844–4852 [cit. 2014-05-04]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168810/>
- [14] VOLOVA, T.G., A.N. BOYANDIN, A.D. VASILIEV, V.A. KARPOV, S.V. PRUDNIKOVA, O.V. MISHUKOVA, U.A. BOYARSKIKH, M.L. FILIPENKO, V.P. RUDNEV, Bùi BÁ XUÂN, Vũ VIỆT DŨNG a I.I. GITELSON. Biodegradation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) in tropical coastal waters and identification of PHA-degrading bacteria. *Polymer Degradation and Stability*. 2010, vol. 95, issue 12, s. 2350-2359. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2010.08.023. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391010003642>
- [15] SAVENKOVA, L, Z GERBERGA, V NIKOLAEVA, A DZENE, I BIBERS a M KALNIN. Mechanical properties and biodegradation characteristics of PHB-based films. *Process Biochemistry*. 2000, vol. 35, issue 6, s. 573-579. DOI: 10.1016/S0032-9592(99)00107-7. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959299001077>
- [16] Williams, Peter A. (2011). Renewable Resources for Functional Polymers and Biomaterials - Polysaccharides, Proteins and Polyesters. Royal Society of Chemistry. Online version available at: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpRRFPBPP2/renewable-resources-functional>
- [17] TOKIWA, Yutaka a Buenaventurada P. CALABIA. Review Degradation of microbial polyesters. *Biotechnology Letters*. 2004, vol. 26, issue 15, s. 1181-1189. DOI: 10.1023/B:BILE.0000036599.15302.e5. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/B:BILE.0000036599.15302.e5>
- [18] NUMATA, Keiji, Hideki ABE a Tadahisa IWATA. Biodegradability of Poly(hydroxyalkanoate) Materials. *Materials*. 2009, vol. 2, issue 3, s. 1104-1126. DOI: 10.3390/ma2031104. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1996-1944/2/3/1104/>
- [19] JENDROSSEK, Dieter. Peculiarities of PHA granules preparation and PHA depolymerase activity determination. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007-3-29, vol. 74, issue 6, s. 1186-1196. DOI: 10.1007/s00253-007-0860-9. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-007-0860-9>
- [20] Sudesh, Kumar Abe, Hideki (2010). Practical Guide to Microbial Polyhydroxyalkanoates. Smithers Rapra Technology. Online version available at: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpPGMP0001/practical-guide-microbial>

- [21] KUSAKA, S., H. ABE, S. Y. LEE a Y. DOI. Molecular mass of poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] produced in a recombinant Escherichia coli. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1997-2-21, vol. 47, issue 2, s. 140-143. DOI: 10.1007/s002530050902. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s002530050902>
- [22] LI, Zhenguo, Hao LIN, Nariaki ISHII, Guo-Qiang CHEN a Yoshio INOUE. Study of enzymatic degradation of microbial copolyesters consisting of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates. *Polymer Degradation and Stability*. 2007, vol. 92, issue 9, s. 1708-1714. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2007.06.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391007001851>
- [23] LEE, S. Y. a Y. LEE. Metabolic Engineering of Escherichia coli for Production of Enantiomerically Pure (R)-(-)-Hydroxycarboxylic Acids. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003-06-01, vol. 69, issue 6, s. 3421-3426. DOI: 10.1128/AEM.69.6.3421-3426.2003. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.69.6.3421-3426.2003>
- [24] ZHANG, H., V. OBIAS, K. GONYER a D. DENNIS. Production of polyhydroxyalkanoates in sucrose-utilizing recombinant Escherichia coli and Klebsiella strains. 1994, Vol.60(4), pp.1198-205. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC201459/>
- [25] GRILLO, Renato, Anderson do Espirito Santo PEREIRA, Nathalie Ferreira Silva DE MELO, Raquel Martins PORTO, Leandro Oliveira FEITOSA, Paulo Sergio TONELLO, Newton L. Dias FILHO, André Henrique ROSA, Renata LIMA a Leonardo Fernandes FRACETO. Controlled release system for ametryn using polymer microspheres: Preparation, characterization and release kinetics in water. *Journal of Hazardous Materials*. 2011, vol. 186, 2-3, s. 1645-1651. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2010.12.044. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389410016249>
- [26] Lagarón, José-María (2011). Multifunctional and Nanoreinforced Polymers for Food Packaging. Woodhead Publishing. Online version available at: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpMNPFP003/multifunctional-nanoreinforced>
- [27] RHIM, Jong-Whan, Hwan-Man PARK a Chang-Sik HA. Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Progress in Polymer Science*. 2013, vol. 38, 10-11, s. 1629-1652. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2013.05.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S007967001300049X>
- [28] LUCAS, Nathalie, Christophe BIENAIME, Christian BELLOY, Michèle QUENEUDEC, Françoise SILVESTRE a José-Edmundo NAVA-SAUCEDO. Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques – A review. *Chemosphere*. 2008, vol. 73, issue 4, s. 429-442. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.06.064. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653508008333>
- [29] SIVAN, Alex. New perspectives in plastic biodegradation. *Current Opinion in Biotechnology*. 2011, vol. 22, issue 3, s. 422-426. DOI: 10.1016/j.copbio.2011.01.013. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166911000292>
- [30] Farmer, Neil (2013). Trends in Packaging of Food, Beverages and Other Fast-Moving Consumer Goods (FMCG) - Markets, Materials and Technologies.

WoodheadPublishing. Online versionavailableat:
<http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpTPFBOFMC/trends-in-packaging-food>

- [31] WEILAND, M., A. DARO a C. DAVID. Biodegradation of thermally oxidized polyethylene. *Polymer Degradation and Stability*. 1995, vol. 48, issue 2, s. 275-289. DOI: 10.1016/0141-3910(95)00040-S. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/014139109500040S>
- [32] SHYICHUK, A.V., D.Y. STAVYCHNA, a J.R. WHITE. Effect of tensile stress on chain scission and crosslinking during photo-oxidation of polypropylene. *Polymer Degradation and Stability*. 2001, vol. 72, issue 2, s. 279-285. DOI: 10.1016/S0141-3910(01)00015-5. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391001000155>
- [33] HAKKARAINEN, M. Rapid (bio)degradation of polylactide by mixed culture of compost microorganisms—low molecular weight products and matrix changes. *Polymer*. vol. 41, issue 7, s. 2331-2338. DOI: 10.1016/S0032-3861(99)00393-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386199003936>
- [34] PEPIC, Dragana, Ema ZAGAR, Majda ZIGON, Andrej KRZAN, Matjaz KUNAVER a Jasna DJONLAGIC. Synthesis and characterization of biodegradable aliphatic copolyesters with poly(ethylene oxide) soft segments. *European Polymer Journal*. 2008, vol. 44, issue 3, s. 904-917. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2007.11.035. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305707006192>
- [35] BACHMANN, Beat M. a Dieter SEEBACH. Investigation of the Enzymatic Cleavage of Diastereomeric Oligo(3-hydroxybutanoates) Containing Two to Eight HB Units. A Model for the Stereoselectivity of PHB Depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T 1. *Macromolecules*. 1999, vol. 32, issue 6, s. 1777-1784. DOI: 10.1021/ma981496w. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma981496w>
- [36] MAO, Hailong, Husheng JIANG, Tingting SU a Zhanyong WANG. Purification and characterization of two extracellular polyhydroxyalkanoate depolymerases from *Pseudomonas mendocina*. *Biotechnology Letters*. 2013, vol. 35, issue 11, s. 1919-1924. DOI: 10.1007/s10529-013-1288-1. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-013-1288-1>
- [37] JENDROSSEK, Dieter. Microbial degradation of polyesters: a review on extracellular poly(hydroxyalkanoic acid) depolymerases. *Polymer Degradation and Stability*. 1998, vol. 59, 1-3. DOI: 10.1016/S0141-3910(97)00190-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391097001900>
- [38] HIRAISHI, T., Y. HIRAHARA, Y. DOI, M. MAEDA a S. TAGUCHI. Effects of Mutations in the Substrate-Binding Domain of Poly[(R)-3-Hydroxybutyrate] (PHB) Depolymerase from *Ralstonia pickettii* T1 on PHB Degradation. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006-11-06, vol. 72, issue 11, s. 7331-7338. DOI: 10.1128/AEM.01187-06. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.01187-06>
- [39] PAPANEOPHYTOU, Christos P., Anastasia A. PANTAZAKI a Dimitrios A. KYRIAKIDIS. An extracellular polyhydroxybutyrate depolymerase in *Thermus thermophilus* HB8. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009, vol. 83, issue 4, s.

- 659-668. DOI: 10.1007/s00253-008-1842-2. Dostupné z:
<http://link.springer.com/10.1007/s00253-008-1842-2>
- [40] SCHIRMER, A., D. JENDROSSEK a H. G. SCHLEGEL. Degradation of poly(3-hydroxyoctanoic acid) [P(3HO)] by bacteria: purification and properties of a P(3HO) depolymerase from *Pseudomonas fluorescens* GK13. *Appl Environ Microbiol.* 1993, Apr 1993, 59(4): 1220–1227. Dostupné z:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC202264/>
- [41] ALLEN, Adrian Douglas, W.A. ANDERSON, F. AYORINDE a B.E. ERIBO. Isolation and characterization of an extracellular thermoalkanophilic P(3HB-co-3HV) depolymerase from *Streptomyces* sp. IN1. *International Biodeterioration.* 2011, vol. 65, issue 6, s. 777-785. DOI: 10.1016/j.ibiod.2011.02.010. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830511001016>
- [42] PAPANEOPHYTOU, Christos P., Ekaterini E. VELALI a Anastasia A. PANTAZAKI. Purification and characterization of an extracellular medium-chain length polyhydroxyalkanoate depolymerase from *Thermus thermophilus* HB8. *Polymer Degradation and Stability.* 2011, vol. 96, issue 4, s. 670-678. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2010.12.015. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391011000097>
- [43] SAEGUSA, H., M. SHIRAKI, C. KANAI a T. SAITO. Cloning of an Intracellular Poly[D()-3-Hydroxybutyrate] Depolymerase Gene from *Ralstonia eutropha* H16 and Characterization of the Gene Product. *Journal of Bacteriology.* 2001-01-01, vol. 183, issue 1, s. 94-100. DOI: 10.1128/JB.183.1.94-100.2001. Dostupné z:
<http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.183.1.94-100.2001>
- [44] FLICKINGER, Michael C a Stephen W DREW. The encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation. New York: Wiley, c1999, 5 v. (xvii, 2756 p.). ISBN 04711666851. Dostupné z: <http://worldtracker.org/media/library/Reference/Encyclopedia's/Encyclopedia%20of%20Bioprocess%20Technology.pdf>
- [45] JORGENSON, Lynsey. *Comamonas acidovorans*. MISSOURI UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY. *Missouri ST* [online]. 2014, 2014 [cit. 2014-04-13]. Dostupné z: http://web.mst.edu/~microbio/bio221_2007/C_acidovorans.htm
- [46] HOROWITZ, H., S. GILROY, S. FEINSTEIN a G. GILARDI. Endocarditis associated with *Comamonas acidovorans*. *Journal of clinical microbiology.* Washington: American Society for Microbiology, 1975-1990, 28(1). Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC269557/>
- [47] LOO, Ching-Yee a Kumar SUDESH. Biosynthesis and native granule characteristics of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in *D. acidovorans*. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2007, vol. 40, issue 5, s. 466-471. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2006.11.003. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813006003230>
- [48] CHI, Zhenming, Fang WANG, Zhe CHI, Lixi YUE, Guanglei LIU a Tong ZHANG. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2009, vol. 82, issue 5, s. 793-804.

DOI: 10.1007/s00253-009-1882-2. Dostupné z:
<http://link.springer.com/10.1007/s00253-009-1882-2>

- [49] Blackburn, Clive de, W. (2006). Food Spoilage Microorganisms. Woodhead Publishing. Online version available at:
<http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpFSM00001/food-spoilage-microorganisms>
- [50] Wareing, Peter Stuart, Felicity Fernandes, Rhea (2010). Micro-Facts - The Working Companion for Food Microbiologists (7th Edition). Royal Society of Chemistry. Online version available at:
<http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpMFTWCFM1/micro-facts-working-companion>
- [51] Oller, A. R. (2005). Aureobasidium pullulans morphology: Two adapted polysaccharide stains. *Canadian Journal of Microbiology*, 51(12), 1057-60. Retrieved from <http://search.proquest.com/docview/219576231?accountid=17115>
- [52] Aureobasidium pullulans. FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ. Fnplzen.cz [online]. [cit. 2014-04-13]. Dostupné z: http://www.fnplzen.cz/mykoatlas/vlaknite/A_pullulans_ma_1b.jpg
- [53] SLEPECKY, R. A. a W. T. STARMER. Phenotypic plasticity in fungi: a review with observations on Aureobasidium pullulans. *Mycologia*. 2009-11-03, vol. 101, issue 6, s. 823-832. DOI: 10.3852/08-197. Dostupné z:
<http://www.mycologia.org/cgi/doi/10.3852/08-197>
- [54] BHATT, Rachana, K. C. PATEL a Ujjval TRIVEDI. Purification and Properties of Extracellular Poly(3-hydroxybutyrate) Depolymerase Produced by Aspergillus fumigatus 202. *Journal of Polymers and the Environment*. 2010, vol. 18, issue 2, s. 141-147. DOI: 10.1007/s10924-010-0176-1. Dostupné z:
<http://link.springer.com/10.1007/s10924-010-0176-1>
- [55] Aspergillus fumigatus. *Fungi of Great Britain and Ireland* [online]. [cit. 2014-04-13]. Dostupné z: <http://fungi.myspecies.info/non-lichenized-ascomycota/aspergillus-fumigatus>
- [56] Borkovich, Katherine A. Ebbole, Daniel J. (2010). Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi. American Society for Microbiology (ASM). Online version available at: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpCMBFF00V/cellular-molecular-biology>
- [57] VOJTOVÁ, L.; KUPKA, V.; ŽÍDEK, J.; WASSERBAUER, J.; SEDLÁČEK, P.; JANČÁŘ, J. Biodegradable polyhydroxybutyrate as a polyol for elastomeric polyurethanes. *Chemical Papers*, 2012, roč. 66, č. 9, s. 869-874. ISSN: 0366- 6352.
- [58] AL., Ed. Mary Jo Zimbro ... [et]. *Difco: Manual of microbiological culture media*. Sparks, Md: Becton, Dickinson and Company, 2009. ISBN 978-097-2720-717. Online vision available at:
http://www.bd.com/ds/technicalCenter/misc/difcobb1manual_2nded_lowres.pdf
- [59] HORMIGO, Daniel, Javier GARCÍA-HIDALGO, Carmen ACEBAL, Isabel DE LA MATA a Miguel ARROYO. Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of recombinant poly-3-hydroxybutyrate depolymerase from *Streptomyces exfoliatus*. *Bioresource Technology*. 2012, vol. 115, s. 177-182. DOI:

- 10.1016/j.biortech.2011.09.035. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852411013046>
- [60] SCHERER, Thomas M, R.Clinton FULLER, Robert W LENZ a Steve GOODWIN. Hydrolase activity of an extracellular depolymerase from *Aspergillus fumigatus* with bacterial and synthetic polyesters. *Polymer Degradation and Stability*. 1999, vol. 64, issue 2, s. 267-275. DOI: 10.1016/S0141-3910(98)00201-8. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391098002018>
- [61] SHAH, Aamer Ali, Fariha HASAN, Abdul HAMEED a Safia AHMED. Isolation and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) degrading bacteria and purification of PHBV depolymerase from newly isolated *Bacillus* sp. AF3. *International Biodeterioration*. 2007, vol. 60, issue 2, s. 109-115. DOI: 10.1016/j.ibiod.2007.01.004. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830507000169>
- [62] BIO-RAD LABORATORIES, Inc. A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection. Berkeley California, USA, 2014. Dostupné z: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040A.pdf
- [63] BIO-RAD LABORATORIES, Inc. Mini-PROTEAN 3 Cell: Instruction Manual. Berkeley California, USA, 2008. Dostupné z:
http://www.proteomicsnijmegen.nl/FTMS_pages/Documents/protean3.pdf
- [64] Protocol for Silver Staining: Science for the benefit of humanity. THE ROCKEFELLER UNIVERSITY. Proteomics.rockefeller [online]. New York, 2004, 5.4.2014 [cit. 2014-04-05]. Dostupné z:
http://proteomics.rockefeller.edu/ms_silverStaining
- [65] Celis J. E., Carter N., Hunter T., Simoes K., Small J. V. and Shotton D.: *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, 3rd Eds, Elsevier, Academic Press, 2006.
- [66] LEBENDIKER, Mario. Silver Stain Protocol. THE PROTEIN PURIFICATION FACILITY. The Wolfson centre for applied structural biology [online]. 2006 [cit. 2014-04-05]. Dostupné z:
<http://wolfson.huji.ac.il/purification/Protocols/Silver%20Stain.html>
- [67] OBRUČA, S.; MÁROVÁ, I.; STAŇKOVÁ, M.; MRAVCOVÁ, L.; SVOBODA, Z. Effect of Ethanol and Hydrogen Peroxide on Poly(3-hydroxybutyrate) Biosynthetic Pathway in *Cupriavidus necator* H16. *WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY*, 2010, roč. 26, č. 10, s. 1-7. ISSN: 0959- 3993.)
- [68] ISO 527-2. *Plastics - Determination of tensile properties Part 2: Test conditions for moulding and extrusion plastics*. 2012. Dostupné z:
http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=56046
- [69] PANFOLI, Isabella, Giovanni CANDIANO, Daniela CALZIA, Silvia RAVERA, Laura SANTUCCI a Maurizio BRUSCHI. A Comparative Overview of Staining Methods for In-Gel Proteomics. *Medscape* [online]. 2012, 2014 [cit. 2014-04-12]. Dostupné z: http://www.medscape.com/viewarticle/777078_2
- [70] JENDROSSEK, Dieter, Yoshiharu DOI a Alexander STEINBÜCHEL. Extracellular Polyhydroxyalkanoate (PHA) Depolymerases. *Biopolymers Online*. Weinheim,

Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2005-01-15. DOI:
10.1002/3527600035.bpol3b03. Dostupné z:
<http://doi.wiley.com/10.1002/3527600035.bpol3b03>

- [71] VOJTOVÁ, Lucy, Vojtěch KUPKA, Jan ŽÍDEK, Jaromír WASSERBAUER, Petr SEDLÁČEK a Josef JANČÁŘ. Biodegradable polyhydroxybutyrate as a polyol for elastomeric polyurethanes. *Chemical Papers*. 2012, vol. 66, issue 9, s. 869-874. DOI: 10.2478/s11696-012-0176-9. Dostupné z:
<http://www.springerlink.com/index/10.2478/s11696-012-0176-9>