



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**STUDIUM EXTRAKCE POLY(3-HYDROXYBUTYRÁTU) Z
BIOMASY**

EXTRACTION OF POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) FROM BIOMAS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Vojtěch Jašek

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Silvestr Figalla, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1450/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student: **Vojtěch Jašek**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Silvestr Figalla, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Studium extrakce poly(3-hydroxybutyrátu) z biomasy

Zadání bakalářské práce:

Vypracovat rešerši na téma extrakce polyhydroxyalkanoátů z biomasy.

Navrhnout koncept izolace bez využití chlorovaných rozpouštědel.

Ověřit postup izolace polymeru v laboratorním měřítku.

Vypracovat závěr a návrh na další postup.

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Vojtěch Jašek
student(ka)

Ing. Silvestr Figalla, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Polyhydroxyalkanoáty jsou skupina biopolymerů vyskytujících se uvnitř buněk mikroorganismů. Na základě jejich zjištěných fyzikálně-chemických vlastností je možné vnímat je jako alternativu běžně používaných materiálů petrochemického původu jako jsou polypropylen a polyethylen.

Bakalářská práce se zabývá izolací konkrétního druhu PHA z biomasy a obsahuje experimentální část a literární rešerši týkající se této problematiky. Pojednává o původu a využitelnosti PHA, úskalích jejich biotechnologické produkce a především se zabývá různými možnostmi jejich izolace. Předmětem experimentální části bylo srovnat výsledky extrakce PHA z biomasy pomocí dvou rozpouštědel na esterové bázi. Sledovanými parametry byla molekulová hmotnost polymeru, extrakční schopnost rozpouštědel a jejich odolnost proti hydrolýze. Cílem práce bylo ověřit koncept izolace PHB pomocí nehalogenovaného bio-rozpouštědla za vhodných podmínek.

KLÍČOVÁ SLOVA

PHA, nehalogenované rozpouštědlo, extrakce, PHB, biopolymery

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates are a group of biopolymers which occur in cells of microorganisms. These biopolymers can be considered as alternatives to commonly used petrochemical materials such as polypropylene and polyethylene due to their physical and chemical properties.

This bachelor thesis focuses on isolation of particular kind of PHA from biomass and contains both experimental and theoretical part. It consists of information about the origin and usage of PHA, challenges and problems of their biotechnological production and mainly various ways of downstream. Experimental part includes comparison of PHA extraction from biomass done by two ester solvents. Studied parameters were molecular weight of the polymer, solvent extraction ability and their resistance against hydrolysis. The main goal of this thesis was to verify the best process conditions of isolation done by nonhalogenated bio-solvent.

KEYWORDS

PHA, nonhalogenated solvent, extraction, PHB, biopolymers

JASEK, Vojtěch. *Studium extrakce poly(3-hydroxybutyrátu) z biomasy*. Brno, 2019. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ing. Silvestr Figalla, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce, panu Ing. Silvestrovi Figallovi, Ph.D., za odborné vedení, vstřícný přístup a spoustu cenných rad a připomínek v průběhu řešení mé bakalářské práce.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Charakterizace polyhydroxyalkanoátů	9
2.1.1	Fyzikální a chemické vlastnosti	9
2.1.2	Biologický význam	10
2.1.3	Producenti polymeru	11
2.1.4	Biotechnologická produkce	14
2.1.5	Praktické využití.....	18
2.2	Metody extrakce PHA z bakteriální biomasy	20
2.2.1	Extrakce rozpouštědlem	21
2.2.2	Chemické dezintegrační metody	22
2.2.3	Enzymatické dezintegrační metody	24
2.2.4	Mechanické narušení	25
2.2.5	Superkritická fluidní extrakce	26
2.2.6	Využití křehkosti buněk	28
2.2.7	Vzduchové třídění	29
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
3.1	Seznam chemikálií a pomůcek pro měření	30
3.1.1	Použité chemikálie	30
3.1.2	Použité přístroje a pomůcky	30
3.2	Použitá biomasa	31
3.3	Hydrolytická stabilita esterových rozpouštědel	31
3.4	Extrakce P3HB pomocí esterů	33
3.5	Analýza filtrátů pomocí UV-VIS spektrofotometrie	34
3.6	Degradace P3HB za zvýšené teploty	34
3.7	Gravimetrické stanovení sušiny extraktů obsahující P3HB	37
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	38
4.1	Hydrolytická stabilita esterových rozpouštědel	38
4.2	Degradace molekulové hmotnosti P3HB	39
4.3	UV-VIS spektrofotometrie filtrátů	41
4.4	Průběh extrakce P3HB.....	42

5	ZÁVĚR.....	45
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	47
7	SEZNAM ZKRATEK.....	58
8	PŘÍLOHY.....	60

1 ÚVOD

Jednou z nejdůležitějších surovin 20. století vůbec je bezesporu ropa. Většina pohonných hmot, asfaltové silnice nebo interiéry většiny automobilů mají původ právě v petrochemii. Zejména u polymerních materiálů petrochemického původu je jednou z nejcharakterističtějších vlastností jejich odolnost. Materiály polypropylen a polyethylen, které jsou v dnešní době produkovány ve značném množství, cca 400 Mt ročně, vydrží při běžném tlaku a teplotě zemského povrchu značnou dobu nepozměněné. Jejich odolnost je pro praktické využití velmi žádoucí, zároveň pro nakládání s jejich odpady se jedná o velice zrádnou vlastnost. Pokud polymery ropného původu nebudou bezezbytku recyklovány, opětovně využity nebo alespoň energeticky využity, je pravděpodobné, že skončí na skládkách či v oceánech. V tomto případě se pak požadovaná vlastnost odolnosti stává problémem.

Polyhydroxyalkanoáty jsou skupina biopolyesterů. Jde o produkty hospodaření mikroorganismů s živinami sloužící jako zásobní forma energie. K jejich syntéze je zásadní, aby na produkující mikroorganismy působily stresové faktory v určité fázi růstu. Příkladem takové situace je například prostředí s omezeným množstvím prvků jako je např. dusík a fosfor, nebo pokud je producent v přítomnosti konkrétní látky, která stres vyvolává.

PHA se v mikroorganismech vyskytuje ve formě amorfních granulí. Pokud jsou tyto granule odděleny od buněk jejich producentů a zpracovány, mají vlastnosti prakticky stejné jako již zmíněný polypropylen a polyethylen. Na rozdíl od polymerů petrochemického původu však disponují vlastností biodegradability, což znamená, že PHA mohou být rozloženy působením biologických činitelů. Tito činitelé (dekompozitoři) mohou být všudypřítomné bakterie, nacházející se v půdách a vodách kdekoli na Zemi. Jsou tedy příznivější variantou pro použití v souvislosti s nakládáním s jejich odpady. Biodegradovatelné polymery by však neměly být v žádném případě koncipovány jako materiály na jedno použití. Biodegradovatelnost je nutno vnímat jako pojistku pro případ úniku materiálu do životního prostředí.

Izolace PHA z buněk producentů však představuje další problém. Jelikož jsou polyhydroxyalkanoáty vzhledem ke své chemické struktuře nerozpustné ve vodě, je zapotřebí použít pro jejich oddělení např. organická rozpouštědla. Nejpoužívanějšími rozpouštědly byly halogenované sloučeniny (chloroform), které při velké produkci a používání pro izolaci znamenaly velkou zátěž pro životní prostředí. Jejich další nevýhodou je jejich toxicita.

Cílem této práce je zaměřit se na izolaci konkrétního zástupce PHA. Tímto zástupcem je poly(3-hydroxybutyrát). V této práci budou srovnány dvě konkrétní esterová rozpouštědla, která by mohla být variantou toxických halogenovaných rozpouštědel. Na základě výsledků experimentů bude navržen koncept izolace P3HB za vhodných podmínek.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Charakterizace polyhydroxyalkanoátů

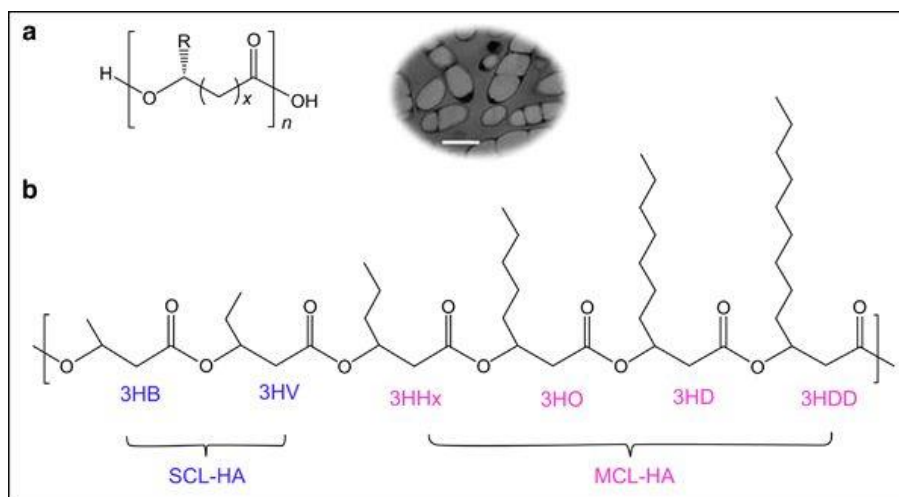
Polyhydroxyalkanoáty jsou skupinou biopolymerů produkovaných běžně v přírodě. Na základě jejich fyzikálních a chemických vlastností a způsobu jejich syntézy v mikroorganismech byla navržena jejich průmyslová produkce, která je předmětem biotechnologií. Výroba PHA je komplexní záležitostí, kterou charakterizuje několik úskalí. Své využití nalézá konečný produkt v nejrůznějších odvětvích [1].

2.1.1 Fyzikální a chemické vlastnosti

PHB je součástí přírodních polyesterů které se nazývají polyhydroxyalkanoáty (PHA). Z chemického hlediska jde o polyestery, které polymerují díky karboxylové skupině a hydroxylové skupině esterovou vazbou. Obě tyto skupiny jsou součástí jedné molekuly, přičemž hydroxylová skupina se může vyskytovat na jakémkoli uhlíku řetězce, kromě C1 a C2 [1]. Podle výskytu hydroxylové skupiny se pak objevuje jak v názvu, tak ve zkratce číslo lokantu, na kterém se skupina nachází.

Ve většině případů se v molekule na místě substituentu R- vyskytuje nasycený alkylový řetězec. V ojedinělých případech se pak na tomto místě mohou vyskytovat nenasycené a rozvětvené řetězce, popřípadě ještě takové, které obsahují další substituenty. PHA monomery můžeme rozdělit podle délky jejich řetězce na:

- Krátké: obsahují 3-5 atomů uhlíku (scl-PHA)
- Střední: obsahují 6-14 atomů uhlíku (mcl-PHA)
- Dlouhé: obsahují 14 a více atomů uhlíku [2]



Obrázek 1 a) obecný vzorec PHA, proměnná x nejčastěji nabývá hodnot 1-8, počet monomerních jednotek n se pohybuje v rozmezí 100-1000; b) je grafické znázornění rozdělení PHA podle délky řetězce. Součástí obrázku je také snímek organismu s intracelulárním PHA [80].

Pro syntézu scl-PHA (jako je například PHB) slouží mastné kyseliny a další jiné alifatické uhlíkové substráty a výsledná struktura PHA polymeru se pak liší podle konkrétních použitých substrátů. Navíc je známo, že intenzita syntézy PHA v producentech je nevyrovnaná a ovlivňují ji různé faktory, jako například nedostatek mikroživin, což může také ovlivnit vlastnosti výsledné molekuly [3]. Mcl-PHA mají charakteristické fyzikální vlastnosti, kterými se liší od PHA s krátkými řetězci. Mcl-PHA mají nízkou *krystalinitu* (podíl krystalické části struktury polymeru, která je závislá nejen na strukturních podmínkách, ale také na způsobu zpracování) a také nízkou *teplotou tání* a *teplotou skelného přechodu* (což jsou mezní teploty, kdy polymer zásadně mění své fyzikální vlastnosti, jako například modul pružnosti, celkovou tažnost) [5]. Naproti tomu scl-PHA jsou typicky velmi křehké a tuhé, vykazují vysokou krystalinitu [4].

Různé druhy aplikací vyžadují také změnu nebo úpravu charakteristických vlastností jednoho druhu polyhydroxyalkanoátu. Například PHB je tuhý a křehký a proto má omezené využití. Ke značné termodegradaci polymeru dochází již při teplotě tání, která se pohybuje okolo 180 °C, což komplikuje například proces vytlačení a formování polymeru v průmyslových závodech. Variantou, kterou se dají upravovat vlastnosti homopolymeru PHB je kopolymerace PHB s monomery hydroxyvalerátu (HV). Pokud je hydroxyvalerát integrován do struktury PHB, získává výsledný polymer tažnost, snižuje se jeho teplota tání a teplota skelného přechodu [7].

Polymer mikrobiálního původu je piezoelektrický (krystaly polymeru jsou schopny generovat elektrické napětí při jejich deformaci nebo naopak jsou deformovány v elektrickém poli [77]) a je dokonale izotaktický (obsahuje pouze (R)-konfiguraci substituentů). Dále je hydrofobní, nerozpustný ve vodě, biokompatibilní a v buňkách se vyskytuje bez příměsí (je čistý) [9].

Vlastnosti polyhydroxyalkanoátů jsou srovnatelné s vlastnostmi polymerů petrochemického průmyslu, což je činí potenciální konkurencí a alternativou na stále rostoucím trhu polymerů. Zejména scl-PHA vykazují vlastnosti typické pro termoplast polypropylen (PP) [7]. Nicméně důvodem malého povědomí a využívání této alternativy je její vysoká cena. Rozhodujícím faktorem ceny PHA jsou především nákladné substráty pro kultivaci. V současné době je snaha používání různých odpadních surovin z potravinářských výroby k produkci PHA [6].

2.1.2 Biologický význam

PHA jsou syntetizovány vybranými mikroorganismy a to za účelem zásobního zdroje energie a také zdroj k redoxním reakcím, které jsou v metabolismu nepostradatelné. Mikroorganismy pak PHA syntetizují typicky v nepříznivých životních podmínkách, kdy by hrozil nedostatek uhlíkatého zdroje, kyslíku, fosforu nebo dusíku [8]. Zásobní molekuly jsou pak syntetizovány intracelulárně jakožto nerozpustné cytoplazmatické konglomeráty a mohou se v buňce vyskytovat ve velkém množství, protože neovlivňují osmotickou rovnováhu [9].

Tvorba PHA a následná akumulace je závislá na genomu mikroorganismů a mnoho genů kóduje enzymy, které se přímo nebo nepřímo podílí na syntéze. Klíčové enzymy, které figurují při tvorbě polymeru jsou např. β -ketothioláza, NADPH-dependentní acetoacetyl-CoA reduktáza

a PHA syntetáza. Tyto enzymy jsou kódovány geny *phaA*, *phaB* a *phaC*, které se dohromady nacházejí v operonu a jejich exprese je konstantní během produkce PHA [9,10].

Biosyntéza byla velice přesně prostudována na modelovém organismu *Ralstonia eutropha*. Jedná se pouze o jednu z možných cest syntézy, která jako uhlíkový zdroj využívá sacharidy. Uhlíkový zdroj je konvertován na CoA-thioestery kyseliny (R)-hydroxyalkanové (obecně). První ze zmíněných enzymů β -ketothioláza pak katalyzuje kondenzaci dvou CoA-thioesterových monomerů. Následně probíhá stereo-specifická redukce ((R)-specifická redukce), jejíž produktem je (R)-3-hydroxybutyryl-CoA (v případě kondenzace dvou acetyl-CoA) popřípadě (R)-3-hydroxyvaleryl-CoA (v případě kondenzace acetyl-CoA a propionyl-CoA). Tento metabolický krok je katalyzovaný acetoacetyl-CoA reduktázou a jeho produkt je pomocí PHA syntetázy konvertován na PHA [9,10].

Regulace metabolismu PHA může proběhnout na několika úrovních:

- Aktivace genové exprese genů *phaA*, *phaB* a *phaC* na základě specifických signálů prostředí jako je strádání organismu
- Aktivace syntézy PHA specifickými buněčnými komponenty nebo metabolickými intermediáty
- Inhibice kompetitivních enzymů, které využívají stejný substrát, jako enzymy syntézy PHA
- Kombinace předešlých možností [11]

Příkladem je například inhibice β -ketothiolázy volným acetyl-CoA, který figuruje v Krebsově cyklu. V momentě, kdy má organismus omezený přístup k nutným prvkům (kromě uhlíku), je znemožněn přístup acetyl-CoA do Krebsova cyklu a buňka se začne orientovat na syntézu PHA [9].

Pokud je růstu organismu ovlivněn z jiného důvodu, než nedostatek potřebných prvků (může se jednat o nepříznivé podmínky okolí), zastaví se genová exprese a buňka přestane syntetizovat bílkoviny. Důsledkem je pak narůstající poměr NADH ku NADPH, což zpomalí Krebsův cyklus a acetyl-CoA se orientuje do metabolismu syntézy PHA [12].

2.1.3 Producenti polymeru

Více než 300 druhů Gram-pozitivních a Gram-negativních bakterií dokáže syntetizovat PHA, stejně jako někteří členové Archaea [8]. V mnoha případech však není jednoduché kontrolovat struktury syntetizovaných PHA. Pomocí mikrobiální produkce můžeme dostat homopolymery, statistické kopolymery a blokové kopolymery s různým množstvím strukturních jednotek [13].

Způsob kontrolované syntézy všech druhů PHA struktur byl však objeven u organismů *Pseudomonas putida* a *Pseudomonas entomophila*. Za předpokladu oslabení beta-oxidačního cyklu u těchto druhů organismů pak můžeme dostat polymery s požadovanou strukturou, jestliže jsou jako prekurzory syntézy zvoleny mastné kyseliny [13,14].

Velký potenciál pro nenákladnou produkci PHA mají halofilní bakterie. Nutnost kultivace tohoto organismu v médiích s vysokým obsahem soli o vysokém pH a velkým teplotním rozmezím poskytuje prevenci proti kontaminaci ostatními mikroorganismy. Média pro tyto druhy organismů pak nejsou potřeba sterilizovat. Výzkumníci se proto zaměřili na vývoj způsobů genetické manipulace halofilních bakterií za účelem realizace produkce kopolymeru PHB-HV s co nejmenší substrátovou specifitou. Výsledkem genetického inženýrství je rekombinantní druh *Halomonas spp.*, který kromě kopolymeru PHB-HV produkuje například 5-aminolevulovou kyselinu [15,16].



Obrázek 2 Betaproteobakterie *Cupriavidus necator* pěstované v kultivačním mediu [81].

Předmětem výzkumu se staly například zástupci kmenů *Pseudomonas*, *Azobacter* a jiní, kteří byli lokalizováni v arktických oblastech. Vzhledem k tomu, že cílem produkce PHA v organismech je zajištění zásobní energie během neoptimálních podmínek, dá se předpokládat, že akumulace PHA u organismů, které jsou nepřetržitě vystaveny extrémním podmínkám bude o to vyšší. Cílem experimentu tedy bylo vytvořit rekombinantní producenty PHA s geny organismů vyskytujících se v oblastech s nepříznivými podmínkami [18].

Tabulka 1: Srovnání různých způsobů biosyntézy scl-PHA pomocí rekombinantních bakterií [33]

scl-PHA homopolymer							
Kmen	Kultivace	Zdroj genů	Typ PHA	Zdroj uhlíku	CB [g/l]	PHA v biomase [%]	Výtěžek PHA [g/l]
<i>E. coli</i> K24KL	Fed-batch	<i>Cupriavidus necator</i>	P(3HB)	Glycerol	41,9	63	26,4
<i>E. coli</i> K24KP	Vzdušný batch	<i>Azobacter</i> sp. (FA8)	P(3HB)	Glycerol	9,43	37,2	3,5
<i>E. coli</i> K24KP	Batch	<i>Azobacter</i> sp. (FA8)	P(3HB)	Glycerol	12,23	27	3,3
<i>E. coli</i> JM109	Batch	<i>Bacillus megaterium</i> NBRC1530 8 T <i>Bacillus cereus</i> YB-4	P(3HB)	Glycerol	9,3	80	7,4
<i>E. coli</i>	Batch	<i>Ralstonia eutropha</i>	P(3HP)	Glycerol	5,35	18,41	1,0

Tabulka 2: Srovnání různých způsobů biosyntézy mcl-PHA pomocí rekombinantních bakterií [33]

mcl-PHA homopolymer							
Kmen	Kultivace	Zdroj genů	Typ PHA	Zdroj uhlíku	CB [g/l]	PHA v biomase [%]	Výtěžek PHA [g/l]
<i>E. coli</i>	Batch	<i>Pseudomonas</i> sp. LDC-5	mcl-PHA	Melasa	4,05	75,5	3,06
<i>E. coli</i>	Batch	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	mcl-PHA	Glukóza	-	15	-

Tabulka 3: Srovnání různých způsobů biosyntézy kopolymerů PHA pomocí rekombinantních bakterií [33]

Komopolymery							
Kmen	Kultivace	Zdroj genů	Typ PHA	Zdroj uhlíku	CB [g/l]	PHA v biomase [%]	Výtěžek PHA [g/l]
<i>E. coli</i> JM109	Batch	<i>Comamonas</i> sp. EB172	P(3HB-co-3HV)	Glukóza	1,6	46,1	0,7
<i>Burkholderia</i> sp. USM (JCM 15050)	Fed-batch	<i>Aeromonas caviae</i>	P(3HB-co-3HHx)	Surový palmojádrový olej	1,7	66	1,1
<i>Cupriavidus necator</i>	Fed-batch	<i>Burkholderia</i> sp. USM (JCM 15050)	P(3HB-co-4HB)	Surový palmojádrový olej	2,4	66	1,6
<i>Shimwellia blatae</i>	Dvoustupňový fed-batch	<i>Ralstonia eutropha</i>	P(3HB-co-3HP)	Glycerol	23,2	30,7	7,1

V souvislosti s kontaminací medií, kde probíhala kultivace producentů PHA byl proveden experiment s producentem *Pseudomonas fluorescens* týkající se monitorování koncentrace amoniaku v médiu. Amoniak v médiu slouží jako zdroj dusíku pro organismy. Zejména bakteriální mikroorganismy jsou obecně velmi nenáročné na zdroj dusíku a není zapotřebí do média přidávat například dusík v organické formě. Z pořízených dat koncentrace amoniaku během kultivace bylo zjištěno, že při všech sledovaných teplotách média (25, 30 a 35 °C) docházelo ke stejné situaci. V prvním kroku koncentrace amoniaku poklesla, protože organismus jej využil pro tvorbu potřebných bílkovinných struktur, následně se však jeho koncentrace opět zvýšila. K tomuto průběhu dochází, pokud je v buňce již velké množství intracelulárního PHA, nebo pokud má buňka nevhodné podmínky pro růst a vývoj jako je např. vysoká teplota, velké smykové napětí nebo přítomnost kompetitivních organismů [17].

2.1.4 Biotechnologická produkce

Polyhydroxyalkanoáty se začaly produkovat od roku 1980, avšak na trhu nezaznamenaly velký úspěch. Vzhledem k tomu, že PHA je produkováno kultivační (biotechnologickou) cestou, je výroba biopolymerů drahá a má i řadu dalších úskalí [13].

Tabulka 4: Porovnání vybraných parametrů chemických technologií a biotechnologií [13]

Srovnávací parametr	Biotechnologie	Chemická technologie
Vstupní surovina	Zemědělské produkty, popřípadě CO ₂	Ropa
Reakční podmínky	Atmosférický tlak, vodné prostředí a mírná teplota	Vysoký tlak a teplota, organická rozpouštědla
Průběh procesu	Většinou diskontinuální vsádkový proces	Kontinuální proces
Délka procesu	Od inokulace po downstream 1-2 týdny	Většinou v řádu dní
Spotřeba energie	Vysoká, vzhledem ke sterilizaci a nepřetržité aeraci	Závisí na produktu
Spotřeba vody	Vysoká	Nízká
Produkováná koncentrace	Obecně nízká, rozsah mg až 200 g/l	Přes 500 g/l
Cena zpracování produktu	Vysoká	Nízká
Potenciál pro kvantitativní konverzi substrát - produkt	Nízký	Vysoký
Riziko při výrobě	Nízké	Vysoké kvůli hořlavým a explozivním vlastnostem
Zpracování odpadní vody	Obtížné vzhledem k vysokému obsahu organického uhlíku po kultivaci	Obtížné vzhledem k toxicitě a příliš kyselému/zásaditému pH

Tabulka 5: Seznam problémů spojených s produkcí mikrobiálního PHA, jejich příčiny a možná řešení [19]

Problém	Důvod	Řešení
Vysoké energetické náklady	Sterilizace a intenzivní aerace	Nesterilní a mikro-aerobní proces
Diskontinuální proces	Zabránění kontaminace	Použití kmenů odolných vůči kontaminaci
Nízká substrátová konverze	Substrát je konzumován pro jiné účely, než je syntéza produktu	Přesměrování/omezení nežádoucích metabolických cest
Nestabilní PHA struktura	Více metabolických cest, různorodé vstupní substráty a prekursorů	Přesměrování/omezení nežádoucích metabolických cest
Nestabilní molekulová hmotnost (M_w)	Nestabilní aktivita PHA syntetázy	Kontrolovatelná aktivita PHA syntetázy
Pomalá kultivace	Binární dělení buněk	Vícenásobné dělení
Drahý downstream	Komplexní a nákladný proces extrakce a purifikace	Morfologické inženýrství

1) Nesterilní proces kultivace, použití odolných kmenů

Produkce PHA by se v budoucnu měla soustředit na kmeny odolné proti kontaminaci, zejména extremofily (mikrobiální organismy, které žijí v extrémních podmínkách [20]). Genetické inženýrství vztahující se na extremofilní organismy (nesoucí název "Next Generation Industry Biotechnology" nebo "NGIB") se zaměřuje zejména na rozšíření možných uhlíkových substrátů pro syntézu PHA, u kterých by zároveň bylo možné kontrolovat molekulovou hmotnost (M_r) polymeru [19]. O konkrétních extremofilních organismech, jejich výskytu a experimentech již bylo pojednáno v předcházející kapitole.

2) Přesměrování/omezení nežádoucích metabolických cest

Strukturu výsledného PHA přímo ovlivňuje použitý substrát. Mastné kyseliny jsou obecně metabolickou drahou beta-oxidace převedeny na acetyl-CoA, a pouze část mastných kyselin je použita pro tvorbu PHA. A právě příliš vysoká spotřeba acetyl-CoA v ostatních metabolických drahách (např. pro získání energie) opět navyšuje cenu PHA [21]. V beta-oxidaci figuruje celá řada enzymů katalyzujících mezikroky reakce, mezi které patří FadA a FadB. Při experimentu s organismy *Pseudomonas putida* a *Pseudomonas entomophila* byla provedena delece genů, kódujících FadA a FadB, což mělo za následek nárůst produkce PHA. Velká většina intermediátů beta-oxidace 3-hydroxyacyl-CoA byl totiž organismem použit pro dráhu PHA, nikoli pro oxidaci a následné odštěpení acetyl-CoA [22].

3) Kontrolovatelná aktivita PHA syntetázy

Kolísání aktivity PHA syntetázy a různé substráty mají za následek rozdílnou M_r produktů z každé jednotlivé kultivace. Nestabilní hodnota M_r je pak důsledkem produkce polymerů odlišných vlastností, což je pro zpracovatele problém. Organismus *Pseudomonas putida* (označen jako KT2442), který byl použit v předešlém experimentu posloužil jako modelový příklad pro syntézu polyhydroxyalkanoátů s předem určenou a pevnou skladbou monomerů. Principem experimentu bylo dosáhnout přesně kontrolovaného zastoupení druhů mastných kyselin v kultivačním médiu. Výsledkem pak byly kopolymery PHBHHx s přesným zastoupením monomerů 3-hydroxybutyrát (3HB) a 3-hydroxyhexanoát (3HHx) [23,24].

Aktivita (koncentrace) PHA syntetázy kolísá, protože tento enzym katalyzuje jak reakci syntézy, tak degradace zásobního polymeru v organismech. Celkového snížení molekulové hmotnosti v PHA může být dosaženo reakčními činidly - alifatickými alkoholy jako jsou methanol, ethanol, isopropanol, popřípadě polymerem poly(ethylen glykol) (PEG). Tyto sloučeniny jsou přidány do média a ovlivňují produkci a mutace N-konce PHA syntetázy, což obecně vede k větší degradaci PHA [25,26].

Mimo tento způsob může být M_r výsledného polymeru ovlivněna přímou úpravou aktivity PHA syntetázy. Aktivitu enzymu můžeme ovlivnit např. kontrolou transkripce genu kódujícího enzym, což je PhaC pomocí některé z metod genového inženýrství, například metodou CRISPR. Výsledkem manipulace genomu producenta bylo zjištění, že podíl PHB ve výsledném polymeru a také M_w byly téměř nepřímě úměrné aktivitě genu PhaA (respektive aktivitě PHA syntetázy). Experiment pak prokázal, že tímto způsobem lze zastoupení PHB ovlivnit v rozmezí 2 - 75 % z celkové hmotnosti sušiny polymeru. M_r se pak může pohybovat v rozmezí od 200 000 - 600 000 Daltonů. Stupeň polydisperzity určuje poměr hmotnostní a číselné molekulové hmotnosti polymeru. Výsledné fyzikální vlastnosti pak nejsou konstantní hodnoty a pohybují se v intervalu daném minimem a maximem M_r součástí polymeru [5,19,27].

4) Zrychlení růstu buněk

Většina bakterií se rozmnožuje binárním dělením. Wu Hong a kolektiv pak dokázali změnit binární dělení *E. coli* na vícenásobné díky delecí genů *minC* a *minD*, které regulují dělení buněk. Dále pak zvýšil četnost genové exprese mnoha genů, které podporují růst buněk a také PHA produkci (např. geny *ftsQ*, *ftsL*). Výsledky tohoto experimentu byly nárůst hmotnosti sušiny polymeru a nárůst akumulace PHB více než o 80 % oproti kultivaci organismu, který disponoval pouze binárním dělením [28].

5) Morfologické inženýrství

Velikost organismů, které produkují PHA významně ovlivňuje downstream. S přihlédnutím k faktu, že je třeba izolovat intracelulární produkt a s malými částicemi se v průmyslovém měřítku pracuje špatně (pomalá sedimentace, komplikovaná filtrace) nabízí se využití morfologického inženýrství. Tento obor se zabývá změnami velikostí a tvarů buněk pomocí metod genového inženýrství [29]. Geny *ftsZ* a *mreB* jsou zásadní pro růst buněk a zachování

tvaru bakteriálních buněk [30,31]. Pomocí metody genového inženýrství CRISPRi bylo dosaženo regulace genové exprese genů *ftsZ* a *mreB* v bakterii *E. coli*. Bylo zjištěno, že čím větší je represe aspoň jednoho, nebo obou genů, tím větší jsou výsledné buňky *E. Coli*. Spolu s dosažením větších buněk bakterií bylo také dosaženo většího množství syntetizovaného PHB. Nárůst buněk zvýšil syntézu PHB na konkrétním organismu o 40 %. Větší velikost buněk také umožnila snazší separaci biomasy od média [28,32].

2.1.5 Praktické využití

Polyhydroxyalkanoáty si zasluhují pozornost především díky podobnosti fyzikálních vlastností s petrochemickými polymery jako jsou polyethylen, polypropylen a polystyren. Vlastnosti mcl-PHA se pak odlišují od scl-PHA (tabulka 6). Vzhledem k tomu, se složení PHA je závislé na zvoleném producentovi, druhu substrátu, metabolické dráze atd. je potřeba fermentační proces, při kterém PHA vzniká, uzpůsobit podle požadovaných vlastností výsledného produktu [33].

Tabulka 6: Srovnání některých fyzikálních vlastností různých druhů PHA a PP [33,78,79]

	Homopolymer PHB	Homopolymer PHO	Kopolymer P(3HB-co-3HV)	Kopolymer P(3HB-co-6%3HD)	Polypropylen (PP)
T_t [°C]	179	53,6	137-170	130	176
T_g [°C]	4	-43,5	(-6)-10	-8	-10
E [GPa]	3,5	-	0,7-2,9	-	1,7
Δl [%]	5	300	15	680	38
R_m [MPa]	30-35	-	< 690	17	400

PHA jsou považovány za vhodnou alternativu petrochemických polymerů zejména pro tyto vlastnosti:

- Termoplasticita
- Biokompatibilita
- Biodegradabilita
- Kompostovatelnost

Ještě před pár lety viděli investoři potenciál PHA v oblasti obalové techniky. Avšak dnes je využití PHA zaměřuje hlavně v oblasti medicíny, popřípadě uplatnění v zemědělství. Cílem je hledat odbyt s co největší přidanou hodnotou. Polymery s vysokou molekulovou hmotností pak mohou najít uplatnění v rybářství pro vysoce pevná vlákna sítí [34].

Uplatnění PHA mohou být následující:

- Materiálový průmysl
 - Obalové materiály
 - Každodenní spotřební materiál
 - Chytré materiály - paměťový gel
 - Hygienické výrobky
- Medicínské účely
 - Bio-implantáty
 - Ortopedické potřeby
 - Nosiče léčiv
 - Materiály pro tkáňové inženýrství
 - Doplnky výživy
- Výroba pohonných hmot
 - Aditiva bio-paliv
- Průmyslová mikrobiologie
 - PHA syntéza v mikroorganismech jako metabolický regulátor [34]

S přihlédnutím k vlastnostem má PHA největší potenciál v biomedicině. Zejména pak kopolymer P(3HB-co-3HV) je cílem výzkumu pro využití v této oblasti. Studie zabývající se hybridními směsi kopolymerů PHA s kolagenem byla provedena za účelem vytvoření potenciálního produktu pro tkáňové inženýrství [35]. Za účelem zdokonalení vlastností, které by vyhovovaly biologickým požadavkům lidské tkáně jsou polyhydroxyalkanoáty obohacovány také o jiné složky, než již zmíněný kolagen. Dalšími příměsi mohou být hydroxyapatit (HA), želatina nebo hedvábí. Použití nano-částic keramiky spolu s PHA má pak potenciál pro aplikace v kostních tkáních [36]. Zmíněné směsi s hydroxyapatitem byly studovány v souvislosti s proliferací a diferenciací buněk in vitro. Směs P(3HB-co-3HV) a hydroxyapatitu sloužila jako substrát pro mezenchymální kmenové buňky (MSC). Výsledky experimentu prokázaly, že proliferace MSC probíhala lépe na statistickém kopolymeru P(3HB-co-3HV), který neobsahoval příměs HA. Zároveň bylo prokázáno, že po jednom až dvou týdnech vyvíjení MSC se ve směsi začaly objevovat osteoprogenitorové markery jako jsou například alkalická fosfatáza (ALP) a osteokalcin (OCN) což prokázalo iniciaci diferenciaci MSC na buňky kostní tkáně – osteoblasty [37]. Na základě těchto výsledků pak byly nano-vlákna P(3HB-co-3HV)/HA implantovány do králíka trpícího defektními kostmi. Bylo zaznamenáno signifikantní zlepšení kritických kostních poruch zkoumaného králíka [33,38].

Další studie, která se zabývala využitím směsí PHA, prokázala, že směsi o různých poměrech poly(3-hydroxyoktanoátu) a poly(3-hydroxybutyrátu) (P(3HO)/P(3HB)) mohou sloužit jako stavební materiál pro inženýrství nervových tkání. V provedené studii byly nervové buňky NG108-15 zavedeny do směsi P(3HO)/P(3HB) a to v poměrech 1:3, 1:1, 3:1. Přestože směsi všech poměrů byly biokompatibilní a tudíž vhodné pro vývoj buněk, směs P(3HO)/P(3HB) o poměru 1:3 podpořila růst a diferenciaci buněk značně lépe, než ostatní dvě směsi. Mechanické vlastnosti PHA směsi korespondovaly s vlastnostmi, které mají periferní nervy [39,40].

Farmacie je dalším cílovým odvětvím, kde se mohou polyhydroxyalkanoáty uplatnit. Byly produkovány 3-hydroxyalkanové kyseliny (3HA) pomocí geneticky modifikovaného organismu *Pseudomonas entomophila*, které slouží jako prekurzory pro syntézu různých chemických sloučenin jako jsou léčiva, antibiotika, potravinářská aditiva, aroma nebo vitamíny [41]. Bylo také prokázáno, že monomerní jednotky mcl-PHA (ve formě kyseliny) jako například 3-hydroxyoktanová kyselina (3OH) vykazují potenciální antimikrobiální aktivitu [42]. V posledních letech se výzkum PHA ubírá také směrem vývoje nano-částic, které by sloužily jako nosiče léčivých látek. Předpokládá se totiž, že PHA mohou být nosičem, který bude schopný uvolnit léčivé látky v lidském těle na principu mikroenkapsulace. Principem mikroenkapsulace je umístění, v tomto případě léčivé látky, do mikrokapsule, která se skládá z polopropustné, sférické, tenké a silné polymerní membrány, která obklopuje léčivo v kapalně formě. Průměr kapky léčivé látky se pak pohybuje od několika mikronů (mikrometrů) až po 1 mm [43]. Technologie mikroenkapsulace slouží pro přípravu nano-částic (NP) různého složení. Částice kopolymeru P(3HB-co-3HV) byly navrženy a následně úspěšně vyvinuty jako nosiče léčiv proti infekčním onemocněním. Tyto částicové komplexy mají zkratku PHBV-CEF. Funkce těchto částic byla potvrzena jako potenciální možnost léčby infekčních chorob u hospodářských zvířat [33,44].

Dále byly také částice tvořené stejným kopolymerem navrženy jako nosiče hydrofobních fotosenzibilizátorů (pTHPP) pro léčbu rakoviny. Autoři návrhu prokázali, že PHA nano-částice nesoucí pTHPP vystavily HT-29 rakovinné buňky vysoké fotocytotoxicitě a usuzují tedy, že by se tedy nano-částicové nosiče mohly stát alternativou klasických způsobů léčby rakoviny, která by fungovala na principu fotodynamické terapie [33,45].

Spekulovalo se o využití PHA jako o alternativě k běžně používaným chemickým sloučeninám zajišťující snížení bakteriální rezistence. Bylo prokázáno, že produkováné přírodní bakteriální modifikované polyhydroxyalkanoáty (PHACOS) inhibovaly růst organismu *Staphylococcus aureus*, který vykazuje rezistenci proti methicillinu. Autoři výzkumu taktéž uvedli, že čím více antimikrobiálních thioesterových ligandů bude připojeno k řetězci PHA, tím silnějším biocidem PHACOS bude [33,46].

2.2 Metody extrakce PHA z bakteriální biomasy

Downstream je nedílnou složkou biotechnologického procesu a je mnohdy náročnější, než samotná biotechnologická produkce požadované sloučeniny. Jde o proces oddělování a čištění produkováných sloučenin. Biotechnologicky produkt se může vyskytovat jak vně buněk producentů, tak přímo uvnitř buněk. U polyhydroxyalkanoátů se jedná o druhý případ. Je tedy zapotřebí fosfolipidovou dvojvrstvou, která tvoří cytoplazmatickou membránu všech organismů, narušit, abychom byly schopni z buněk oddělit ve vodě nerozpustné PHA. K downstreamu polyhydroxyalkanoátů se používá následujících způsobů.

2.2.1 Extrakce rozpouštědlem

Způsob oddělení PHA od biomasy pouze pomocí rozpouštědla je jeden z nejdéle používaných. Průběh izolace pomocí rozpouštědla se dělí na dvě fáze. V prvním kroku je rozpouštědlem narušena propustnost cytoplazmatické membrány buněk, ve kterých se PHA vyskytuje, v druhém kroku je polymer rozpuštěn v rozpouštědle [47]. Tento princip byl poprvé popsán v letech 1923-1951 a následně 1967 dvěma různými autory. První experimenty pak byly provedeny s organismy *Bacillus megaterium* a *Rhodospirillum rubrum*. Jako rozpouštědla v tomto případě posloužily sloučeniny chloroform, 1,2-dichlorethan, chlormethan a některé cyklické sloučeniny. Jednou z těchto cyklických sloučenin byl propylenkarbonát (4-methyl-1,3-dioxolan-2-on). Kromě použití čistých rozpouštědel byly také použity směsi například chloroform/methanol nebo dichlormethan/ethanol v různých poměrech. Izolace konkrétně P(3HB) pak byla realizována odpařením rozpouštědla [48,55].

Později byla problematika extrakce rozpouštědlem zkoumána s využitím organismu *Rhodospirillum eutropha* a kapalných chlorovaných rozpouštědel jako například chlorethan a chlorpropan. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití rozpouštědel, které ve své struktuře obsahují aspoň jeden atom chloru a jeden atom vodíku [49]. Dalším zjištěním byl fakt, že pokud nebylo dosaženo stoprocentní výtěžnosti polymeru, čistota polymeru byla velice vysoká. Kromě chlorovaných rozpouštědel byly studovány extrakčních schopnosti různých rozpouštědel. Výsledky studie jsou uvedeny v tabulce 7 [50].

Tabulka 7: Výsledky extrakce pomocí nehalogenovaných rozpouštědel [50]

	Výtěžnost [%]	Čistota [%]	Teplota extrakce [°C]
1,2-propandiol	79	99,1	140
Glycerol	85	99,7	120
Diethyl sukcinát	90	100	110
Butyrolakton	90	99,5	110

V patentu Procter & Gamble byl poprvé popsán další způsob izolace PHA. Metoda spočívá ve smíchání biomasy se směsí rozpouštědel. V jednom z nich je PHA rozpustné, v druhém polymer rozpustit nelze. PHA je odděleno od biomasy pomocí směsného rozpouštědla, pevné zbytky biomasy ochuzené o polymer jsou odstraněny a v posledním kroku se extrahovaná složka vysráží po oddělení (destilaci) dobrého rozpouštědla ze směsi. PHA se tedy vyskytuje v suspenzi sloučeniny, ve které je nerozpustný [51].

Tento způsob izolace PHA pomocí vysrážení byl pak využit pro další experimenty. Rakouská společnost Chemie Linz aplikovala metodu na buňky organismu *Alcaligenes latus* a jako rozpouštědlo zvolila dichlormethan. Obdobný princip také zvolila společnost Imperial Chemical Industries, nacházející se ve Velké Británii. Způsob byl však prohlášen příliš nákladným vzhledem k zjištění, že rozpouštědlo, které obsahovalo již 5 hm. % polymeru, bylo velice viskózní a odstranění nerozpustného podílu ochuzené biomasy bylo komplikované. To by znamenalo, že pro oddělení určitého množství PHA by v praxi bylo potřeba dvacetinásobné

množství rozpouštědla. Vysoké náklady spojené s množstvím použitého rozpouštědla je možné řešit recyklací. Po přidání vody je možno organické rozpouštědlo ze směsi oddestilovat [47].

Negativním dopadem použití organických rozpouštědel může být porušení přírodní morfologie částic PHA. Částice mohou být nedokonale vykrystalizované po izolaci z rozpouštědla a to může zásadně ovlivnit jejich vlastnosti. Výhodou je však fakt, že rozpouštědla nedegradují polymer (molekulová hmotnost se nezmenšuje) za předpokladu, že rozpouštědlo je použito v krátkém časovém intervalu a nemá příliš vysokou teplotu. A další výhodou použití rozpouštědel je eliminace endotoxinů, které produkují Gram negativní bakterie. Bylo prokázáno, že po extrakci P(3HB) pomocí chloroformu z biomasy organismu *Escherichia coli* polymer obsahoval přípustné množství endotoxinů, čili je bez problémů vhodný pro medicínské účely [47,52].

Izolace PHA z biomasy pomocí halogenovaných rozpouštědel s sebou nese významné dopady na životní prostředí. Vzhledem k tomu, že obecně halogenovaná rozpouštědla jsou v laboratorním měřítku používána nejčastěji, dostává se jim velká pozornost. Řada halogenovaných rozpouštědel jsou silné karcinogeny a také je jedná o těkavé látky, což je velice nežádoucí kombinace. Z toho a mnoha dalších důvodů vznikla iniciativa použití rozpouštědel neobsahující halogeny. K tomuto účelu byly studovány alifatické i cyklické alkoholy, estery, amidy a ketony, jejichž uhlíkatý řetězec byl tvořen 4-10 atomy uhlíku. Některé z nehalogenovaných rozpouštědel byly testovány již v minulosti z hlediska účinnosti extrakce PHA, viz tabulka 7 [47,53,54].

2.2.2 Chemické dezintegrační metody

Dezintegrační metody obecně pracují na principu rozložení, narušení nebo chemické interakce s buňkami mikrobiální biomasy za účelem uvolnění nakumulovaného PHA z buněk. Jedna z metod dezintegrace buňky je chemická. Principem je přidání různých chemických sloučenin, které jsou schopné reagovat s částmi buněk biomasy. Podle použitých chemikálií pak chemická dezintegrace zahrnuje následující konkrétní metody [47].

1) Povrchově aktivní látky

Povrchově aktivní látky (PAL), jako je například dodecylsulfát sodný (SDS) jsou schopny narušit strukturu buňky svým začleněním do fosfolipidové dvojvrstvy cytoplazmatické membrány. Ze strukturního hlediska jsou PAL skupinou organických látek, které je již při nízkých koncentracích hromadí na mezifázovém rozhraní a svým působením snižují energii, která se nachází na styku dvou různých fází. SDS je pak iontové povahy a disponuje ambivalentním charakterem. Dodecylsulfát sodný obsahuje dlouhý nepolární uhlíkový řetězec a zároveň polární sulfátovou skupinu, ke které je iontovou vazbou vázaný sodík [56]. Těchto vlastností se pak dá využít právě pro oddělení PHA z bakteriálních buněk. Na mezifázovém rozhraní se hromadí molekuly povrchově aktivní látky až do zaplnění kompletně celé mezifázové plochy. V okamžiku, kdy je mezifázová plocha buňky plně obsazena, dochází k porušení cytoplazmatické membrány a cytosol buňky je smíchán s okolním prostředím

v jednu fázi. Po narušení membrány se PAL již nemohou hromadit na rozhraní a tvoří agregáty tzv. micely. Výsledkem je pak roztok, ve kterém se nachází volné PHA a povrchově aktivní látky pak kromě rozrušení membrány také zajistí rozpuštění proteinů a ostatních buněčných součástí kromě samotného PHA [57].

K tomuto způsobu byly použity různé PAL a také různé metody jejich přidavku k biomase. Byl proveden experiment s karnitinovým esterem kyseliny palmitové, což je zástupce přírodních povrchově aktivních látek. Jedná se o palmitovou kyselinu, která je zdrojem dlouhého nepolárního řetězce uhlíků, na kterou je esterovou vazbou navázaný karnitin, což je sloučenina zajišťující transport acyl-CoA do matrix mitochondrie při metabolismu mastných kyselin. Nevýhodou při použití této povrchově aktivní látky je nutnost úpravy biomasy pro extrakci, výhodou je potom skutečnost, že tyto konkrétní PAL nezpůsobují degradaci polymeru [58].

Další testovanou metodou byly oddělení PHA z biomasy bez úprav média, ve kterém byly organismy kultivovány. V tomto případě byl pouze přidán SDS a směs byla promíchána při zvýšené teplotě. Hlavní výhodou této metody je možnost provádění izolace s velkými koncentracemi biomasy v roztoku. Nicméně použití PAL nezajistí vysokou čistotu PHA (<97 %) a další problém nastává při použití větší dávky PAL. Se zvyšujícím množstvím povrchově aktivních látek se zvyšují náklady na čištění odpadní vody [47].

Tabulka 8: Srovnání výsledků izolace PHA pomocí chemické dezintegrace různých PAL [47,58,59]

Název mikroorganismu	Druh PAL	Výtěžnost PHA	Čistota izolovaného PHA	Úpravy média
<i>R. eutropha</i>	Karnitinový ester kyseliny palmitové	70 %	<97 %	pH 7,0; 30 °C; 60 min
<i>A. latus</i>	Karnitinový ester kyseliny palmitové	>85 %	<97 %	pH 7,0; 30 °C; 60 min
<i>R. eutropha</i>	SDS	>90 %	95 %	žádné

2) Chlornan sodný (NaClO)

Dalším způsobem chemické dezintegrace bakteriálních buněk je použití chlornanu sodného. Tato metoda má však jeden zásadní problém a to je značná degradace izolovaného PHA, která v praxi znamená až 50% redukci molekulové hmotnosti. Tento jev byl pozorován již v roce 1963 a pozorované parametry byly absolutní molekulová hmotnost extrahované směsi a vnitřní viskozita. Bylo zjištěno, že amorfni forma PHA, která se nachází v buňkách biomasy je citlivá na alkalické zmýdelňování a snadno se rozpadá na menší oligomerní části [60]. Izolace PHA pomocí chlornanu sodného byla studována na organismu *Pseudomonas putidia* KT2442. K extrakci bylo použito 35 ml 4,1% roztoku NaClO a výsledek extrakce byl 78 % výtěžnost a 99% čistota získaného polymeru. Avšak molekulová hmotnost PHA byla 53 000 Da [61].

Vzhledem k vysoké čistotě extrahovaného polymeru vznikaly snahy o použití této metody za současného zmírnění degradace molekulové hmotnosti. Byl proto navrhnut koncept, který spojuje výhody extrakce pomocí NaClO a halogenovaných rozpouštědel. Tato navrhovaná metoda má tři fáze. V první fázi se využívá působení chlornanu, který dezintegruje buňky biomasy a uvolní PHA. Ve druhém kroku je shromážděna všechna ochuzená biomasa a ve třetí fázi přejde veškerý polymer do halogenovaného rozpouštědla (chloroformu). Výsledkem tohoto postupu je značné zachování molekulové hmotnosti, což je zdůvodněno bezprostředním přechodem PHA do chloroformu. Polymer je tedy vystaven působení NaClO jen velmi krátkou dobu [62].

3) Cheláty

Cheláty jsou sloučeniny, kterých se využívá při práci s kationty kovů například Ca^{2+} a Mg^{2+} . Tyto sloučeniny jsou schopny s těmito ionty reagovat a zabudovávat je do své struktury, čehož se využívá například při výrobě potravinových doplňků s vysokou vstřebatelností v lidském organismu. Dalším využitím pak může být chelatometrická titrace v analytické chemii například pro stanovení hořčnatých iontů ve vodě. Jedním z nejčastěji využívaným chelatačním činidlem je ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) [63]. V kontextu izolace PHA z biomasy se chelátů využívá například při extrakci pomocí povrchově aktivních látek. Přidáním těchto sloučenin se zvýší rychlost procesu. Účinek je pak přisuzován výskytu kationtů Ca^{2+} a Mg^{2+} na vnější membráně některých Gram-negativních bakterií. Cheláty reagují s těmito kationty, což vede k destabilizaci cytoplazmatické membrány a ta je pak náchylnější například vůči PAL. Přestože je metoda velice účinná a poskytuje produkt vysoké kvality, jejím hlavním problémem je vysoká produkce odpadních vod. Z toho důvodu byl navržen recyklační kontinuální proces výroby spočívající v opakovaném použití vody s doplněním potřebného množství PAL a chelátů. Voda, kterou již není možné použít je pak ošetřena kyselinou chlorovodíkovou za současného přidavku aktivního uhlí za účelem adsorpce polutantů [47,58,64].

2.2.3 Enzymatické dezintegrační metody

Extrakce pomocí enzymatické dezintegrace byly vyvinuty jako další alternativa k extrakci rozpouštědlem. V tomto případě se využívá zejména proteolytických enzymů, které zajistí rozpuštění proteinů buněk biomasy a PHA je tak snadněji přístupný k oddělení. Zároveň mají tyto proteolytické enzymy minimální efekt na degradaci PHA. Hlavním problémem pro provozní využití enzymů je však jejich vysoká cena [58,65].

Enzymy samy o sobě nelze k extrakci použít a je nutné je zapojit například do metod chemické dezintegrace. Při využití PAL je postup extrakce následující. Buněčná suspenze obsahující PHA je podrobena záhřevu volenému tak, aby se projeví aktivita zvolených enzymů. Následuje přidavek povrchově aktivních látek, které buňky biomasy oddělí od PHA a v posledním kroku je přidán peroxid vodíku, který sloužil jako bělidlo. Touto metodou byla provedena izolace PHA z organismu *R. eutropha*. Byly provedeny experimenty s různými enzymy a nejlepším

výsledkem byla 88% čistota PHA při použití 2% roztoku bromelainu (směs proteolytických enzymů izolovaných z ananasu [66]) za teploty 50 °C a pH 9,0 [67].

Další kombinací s chemickou dezintegrací je využití enzymů s povrchově aktivními látkami a cheláty. Konkrétně byly zvoleny sloučeniny SDS a EDTA. Enzymů bylo testováno více pro zvolení optimální kombinace. Zástupci testovaných enzymů byli alkaláza, lecitáza nebo lysozym. Experiment byl proveden na organismu *Pseudomonas putidia* s kombinací alkaláza, SDS a EDTA. Bylo zjištěno, že příspěvek enzymu na celkovou extrakci byl 71,5 %, čistota polymeru byla 92,6 %, výtěžnost 90 % [68].

2.2.4 Mechanické narušení

Mechanické narušování buněk je proces využívaný zejména za účelem zisku intracelulárních bílkovin, avšak byl aplikován také na izolaci PHA. Hlavními výhodami tohoto způsobu izolace PHA jsou nízké procesní náklady (avšak vysoká pořizovací cena strojů), nepatrné poškození či degradace produktů a v neposlední řadě minimalizace znečištění životního prostředí. Nevýhodou je pak časová náročnost procesu [58].

1) Perlový mlýn (smykové namáhání pevné fáze suspenze biomasy)

Perlový mlýn izoluje PHA na principu smykového namáhání pevné fáze. Což znamená, že perlový mlýn je přímo v kontaktu s buněčnou suspenzí obsahující PHA a na základě mechanického poškození z nich uvolňuje polymer [69]. Samotný mlýn je složen z vertikální válcovité mlecí komory s malými ocelovými nebo skleněnými kuličkami, v jejímž středu se nachází válcový rotor s regulovatelnou rychlostí otáčení. Buněčná suspenze je vpravena do mlýnu, buňky biomasy podlehnou mechanickému narušení a vychází otvorem na druhé straně válce. Při tomto mechanickém zásahu dochází k zahřívání mlýnu v důsledku tření, což je řešeno vodním chlazením pomocí chladicího pláště kolem komory, kudy může protékat chladicí voda. Koncentraci vstupní suspenze buněk je nutné volit v rozmezí 8-66 kg sušiny na 1 m³ suspenze. Experimentálně pak bylo také zjištěno, že průměr kuliček v mlecí komoře nezrychlí proces, avšak značně ovlivňuje kapacitu komory. Podle výsledků experimentu bylo ke kompletnímu narušení všech buněk potřeba osm průchodů jedné konkrétní suspenze za konkrétních podmínek:

- 52 800 otáček na minutu
- 85% plnění mlecí komory
- Kuličky o průměru 512 µm
- 90 ml za minutu průtoku suspenze [69,70]

2) Vysokotlaká homogenizace - HPH (smyk kapaln   fáze)

Vysokotlak   homogenizátor se skládá z jednoho nebo více objemových   rpadel. Suspenze buněk je vta  zena komory   rpadla. Na suspenzi je vyvíjen p  esn   určen   tlak objemov  m   rpadlem, kter   lze regulovat pomocí restriktoru [69]. Objemov     rpadlo funguje na principu uv  d  n   kapaliny do pohybu pomocí vn  j   i mechanick   síly [71]. Na rozdíl od perlového mlýnu v tomto p  r  pad   činnost izolace závisí na koncentraci suspenze (u mlýnu je dan   rozmezí koncentrace pro konstantní činnost). U HPH bylo zji   eno, že ide  ln   koncentrace suspenze je 45 kg sušiny na 1 m³ suspenze. Nevýhodou u vysokotlakého homogenizátoru je možnost ucpání nastavitelného   kr  c  ho ventilu pevnou fází suspenze [70]. Experiment  ln   byla provedena izolace P(3HB) z organismu *Methylobacterium* sp. V49 pomocí HPH za asistence SDS. Maxim  ln   dosa  en   čistota produktu byla 98 % při tlaku 40 MPa. Byly provedeny dva cykly a použit 5% roztok SDS [47].

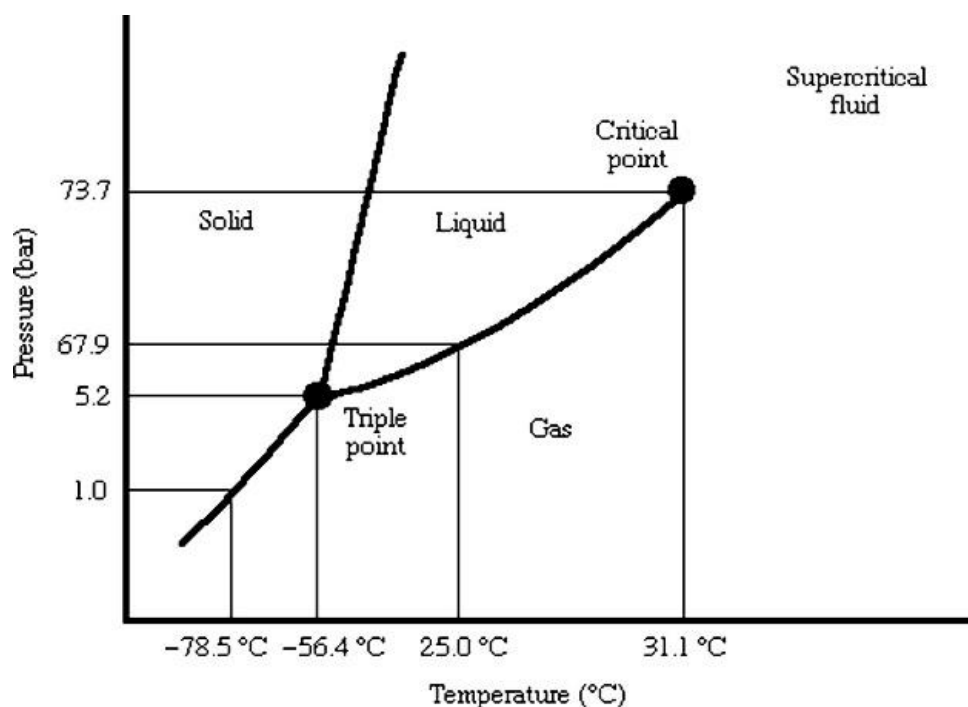
3) Rozru  en   ultrazvukem

Metoda využití ultrazvuku pro izolaci PHA byla testována na organismu *Haloferax mediterranei*. Pro tento postup je nutn   stanovit akustick   výkon, index narušení velikosti a dobu procesu. Suspenze buněk byla po zákroku ultrazvuku podrobena centrifugaci,   im   byly odstraněny zbytky buněk a odd  len polymer. Ultrazvuk byl takže použit jako p  r  pravn   krok pro izolaci pomocí chemick   dezintegrace [47].

2.2.5 Superkritick   fluidní extrakce

Superkritick   tekutiny mají jedine  n   fyzik  ln  -chemick   vlastnosti, které jsou velice vhodné pro extrakční účely. Nadkritickou tekutinou rozumíme sloučeninu, kterou j  i nelze zkapalnit změnou tlaku nebo teploty. Takov   fázi pak r  k  me superkritick   fluidum, kter  e m   následující vlastnosti:

- Stlačitelnost - lze měnit hustotu
- Ř  dov   men   i viskozita, než u kapalin
- Absence povrchového napětí
- Vysok   difuzivitě [72,73]



Obrázek 3 Fázový diagram oxidu uhličitého [82].

Pro SFE se nejčastěji využívá oxid uhličitý (CO₂). Výhodami jsou zejména malá toxicita a reaktivita, snadné podmínky pro převedení do stavu superkritického fluida (31 °C a 7,5 MPa), široká dostupnost, nízká cena a nehořlavost. Proces SFE probíhá v následujících krocích:

- 1) CO₂ v kapalném stlačeném stavu je odebírán pomocí čerpadla ze zásobní nádoby.
- 2) Následně je stlačen na nadkritický tlak (stále je v kapalném stavu).
- 3) Postupuje do extrakční komory, která je opatřena termostatem - dochází ke zvýšení teploty na nadkritickou.
- 4) Nástřík látky, která je extrahovaná je zpravidla prováděn do protiproudu extrakčního činidla.
- 5) Extrakt pokračuje z extrakční komory do zachytného rozpouštědla přes kapiláru (restriktor). Dochází tak k tlakovému gradientu extraktu a ten zůstává ve fázi nadkritického fluida.
- 6) Sběrná komora s rozpouštědlem je již vystavena atmosférickému tlaku - CO₂ je odpařeno a poté nasáto čerpadlem a opět zkapalněno, extrakt je zachycen ve sběrném tanku [72,73].

Superkritická fluidní extrakce která využívá jako extrakční činidlo oxid uhličitý má pak tyto specifiky:

- Extrakční podmínky je nutno precizně optimalizovat.
- Používání přídavných rozpouštědel - modifikátor. (CO_2 je zcela nepolárním extrakčním činidlem, za účelem extrakce polárních sloučenin se využívá modifikátor jako například metanol, acetonitril, voda)
- Obsah vody v extrahované matrici ovlivňuje účinnost extrakce.
- Během extrakce se mohou tvořit agregáty (hrudky).
- Zásadní je příprava vzorku pro extrakci - ideální je drcení částic na 10 - 50 μm .
- Účinnost extrakce je vyšší při teplotách do 200 $^{\circ}\text{C}$ [72,73].

SFE pak kromě izolace intracelulárních proteinů může posloužit také v extrakci PHA. Byla provedena studie tohoto způsobu oddělení konkrétně P(3HB) z organismu *R. eutropha*. Optimální podmínky procesu byly pak navrženy takto: proces trvající 100 minut, tlak 20 MPa, teplota 40 $^{\circ}\text{C}$, modifikátor metanolu (v důvodu vyšší polarity PHA), CO_2 jako extrakční činidlo. Výtěžnost tohoto procesu byla 89 %. Experiment byl dále předmětem dalších studií, které se zaměřovaly na využití NaOH a NaCl jako sloučenin pro přípravný krok SFE za účelem narušení buněčných stěn [74,75].

2.2.6 Využití křehkosti buněk

U některých vybraných organismů, jako například *Azotobacter vinelandii* a u rekombinantní *E. coli* lze využít porušení pevnostní buněčných membrán v důsledku vysokého obsahu intracelulárního PHA. Při procesu akumulace PHA se zvyšuje tzv. osmotická křehkost buněčné membrány, kterou způsobuje náročnější hospodaření s vodou. Vnitřní prostor buňky je totiž čím dál více zaplňován polymerem. Tento princip byl popsán jak u Gram-negativních, tak u Gram-pozitivních bakterií [47],[58]. Organismus *A. vinelandii* se stal předmětem testování tohoto způsobu extrakce. Biomasa se syntetizovaným PHA byla vystavena 1M roztoku NH_3 o pH 11,4 při teplotě 45 $^{\circ}\text{C}$ na 10 minut. Tímto zákrokem bylo odstraněno 10 % hmotnosti buněk z čehož bylo 0 % PHA a 60-77 % bílkovin. Tímto zákrokem došlo k porušení osmotické rovnováhy buňky s okolím a lyzi většiny hmoty biomasy. Výsledným produktem byla směs složená z 94 % P(3HB), 2 % bílkoviny a 4 % ostatní nebílkovinné hmoty [76].

Stejný princip byl použit v případě experimentu s rekombinantní *E. coli* jejíž obsah P(3HB) před extrakcí činil 77 %. Místo amoniaku byl použit 0,2M roztok NaOH, proces probíhal 60 minut při teplotě 30 $^{\circ}\text{C}$. Dosažená čistota polymeru byla 98,5 %. Při použití 1M roztoku NaOH a teplotě 50 $^{\circ}\text{C}$ bylo pak dosaženo 99% čistoty [47,58].

2.2.7 Vzduchové třídění

Metoda byla testována na organismu *R. eutropha*. V první fázi je suspenze biomasy vystavena působení ultrazvukových vln za účelem uvolnění PHA z buněk. Dále je tato suspenze vymražena a namleta na menší částice. Vzorek byl pak podroben vzduchovému třídění, jehož výsledek byl 38 % čistého podílu a 62 % hrubého podílu. Čistý podíl byl následně podroben rozpuštění v chloroformu, proběhla extrakce P(3HB) a následné vyvločkování pomocí metanolu. Výsledkem byl polymer o čistotě 95 %. Výtěžek byl 85 % [47].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Seznam chemikálií a pomůcek pro měření

3.1.1 Použité chemikálie

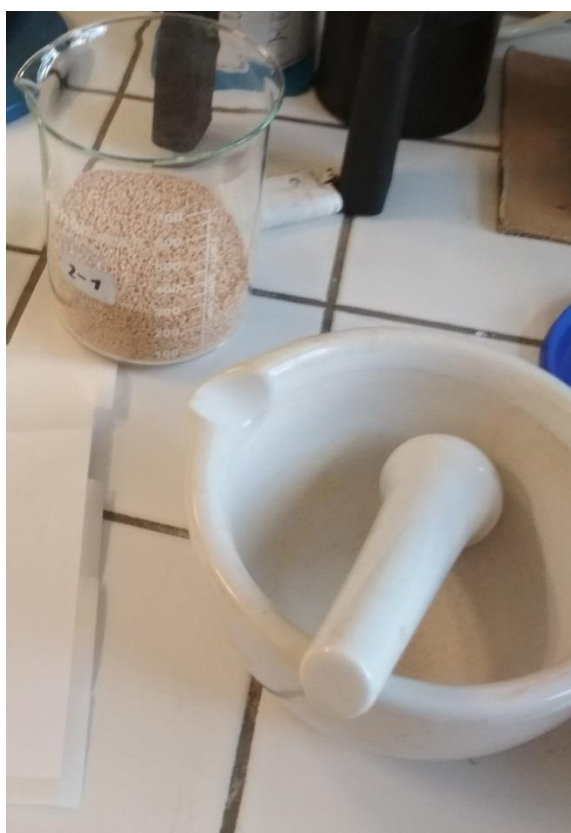
- Biomasa kultivovaná na MBÚ AV ČR, v. v. i.
- DEO (diethyloxalát)
- AETLA (ethyl 2-(acetyloxy)propionát)
- Chloroform (Lach-ner)
- Aceton (Lach-ner)
- EA (ethylacetát) (Lach-ner)
- Glycerol (Lach-ner)
- Vodík (SIAD Czech spol.)
- Destilovaná voda (FCH VUT)

3.1.2 Použité přístroje a pomůcky

- Předvážky OHAUS PRECISION (PIONEER)
- Analytické váhy OHAUS PA213 (PIONEER)
- Termočlánek TM-902C
- Termostat (JULABO GmbH)
- Membránová vývěva FB 65453 (FISHERBRAND)
- Magnetická míchačka IKA RCT basic (IKAMAG)
- Hřídelové míchadlo LLG-uniSTIRRER OH2 (LLG Labware)
- Sušárna (Memmert)
- Centrifuga C-28A (Boeco Germany)
- Plynový chromatograf Varian CP 3900
- Chromatograf HPLC – GPC Agilent 1260 infinity (HPST s.r.o.)
- UV-VIS spektrofotometr Spekol 211 (Carl Zeiss Jena)
- Mikropipeta (Fischer Scientific s.r.o.)
- Běžné laboratorní sklo a vybavení (SIMAX)

3.2 Použitá biomasa

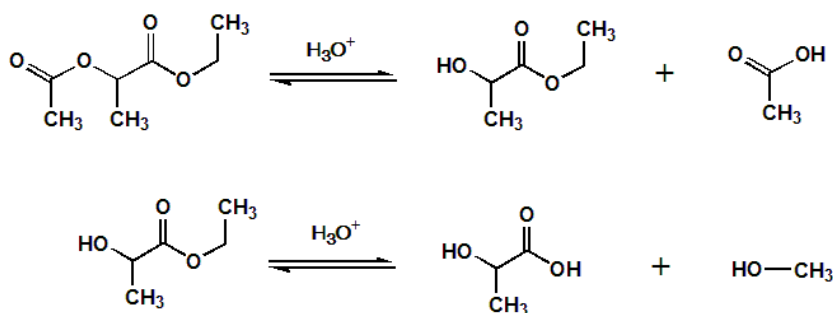
Biomasa použitá pro experimentální část pochází z Mikrobiologického ústavu AV. Kultivovaným organismem byla bakterie *Cupravidus necator* H16 (dříve *Ralstonia eutropha*) a jako substrát sloužil použitý fritovací olej. Biomasa byla uchovávána při teplotě $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Konkrétní používaná šarže biomasy obsahovala 65,9 % P3HB. Tento údaj je platný pouze pro studovaný vzorek, jelikož obsah polymeru se u každé biomasy liší. Před použitím bylo zapotřebí mraženou biomasu vysušit. Sušení bylo prováděno pomocí vakuové destilace a infračerveného záření po dobu osmi hodin, přičemž byla biomasa každou hodinu promíchávána. Usušená biomasa pak byla pomocí třecí misky s tloučkem rozdrcena na sypkou směs, která byla tříděna pomocí soustavy sít. Frakce byly rozděleny podle velikosti ok použitých sít na částice 2-4 mm, 1-2 mm, 0,5-1 mm, 0,25-0,5 mm.



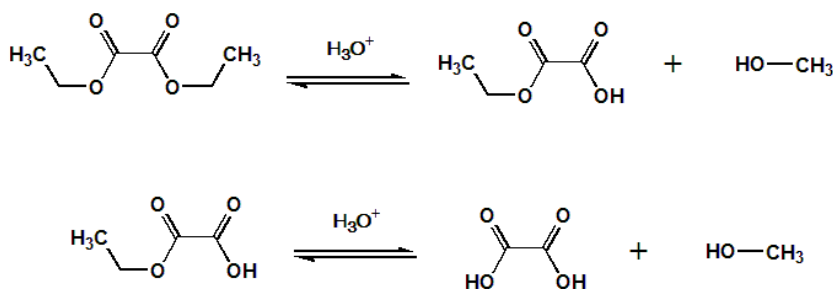
Obrázek 4 Frakce částic sušené biomasy o velikosti 1-2 mm. Biomasa byla drcena v třecí misce s tloučkem

3.3 Hydrolytická stabilita esterových rozpouštědel

Hydrolytická stabilita esterových rozpouštědel (dle jen esterů) je zásadním parametrem pro možnost jejich recyklace při jejich průmyslovém využití. Pokud je stabilita nízká, je nutné rozpouštědlo často měnit a nemůže být opětovně používáno. Parametr byl zjišťován u roztoku esteru a vody v nadstechiometrickém molárním poměru při teplotě $100\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Obrázek 5 Schéma hydrolýzy ethyl 2-(acetyloxy)propionátu.



Obrázek 6 Schéma hydrolýzy diethyloxalátu.

Nejprve byl navážen ester, který byl temperován v termostatu na 100 °C. Poté byla navážena voda v poměru 4:1 s esterem. Důvodem zvolení nadstechiometrického molárního poměru je potlačení vlivu chemické rovnováhy. Voda byla přilita k vytemperovanému esteru. Roztok byl intenzivně promícháván při teplotě 100 °C hřídelovým míchadlem, přičemž se jednalo o dvoufázový roztok z důvodu malé rozpustnosti esterů ve vodě. V případě DEO se po 100 minutách fáze spojily a začala se v roztoku srážet kyselina šťavelová. Vzorky byly odebrány v intervalech 10-20 minut. Analyzovaným parametrem byla kyselost roztoku vyjádřena číslem kyselosti. Číslo kyselosti je definováno jako množství hydroxidu draselného v miligramech k neutralizaci kyselin v 1 g vzorku.

Pro analýzu roztoku AETLA byla zvolena acidobazická titrace. Produktem hydrolýzy esteru je kyselina octová (viz obrázek 4) nebo 2-(acetyloxy)propionová, které jsou vhodné pro titrační stanovení. Organická fáze byla titrována odměrným roztokem 0,1M KOH v metanolu a jako indikátor byla použita bromthymolová modř. Tento indikátor byl použit z toho důvodu, že indikuje konec titrace při pH 7, což je v tomto případě žádoucí. Jakýkoli další přídavek odměrného roztoku může ovlivnit určení hydrolytické stability rozpouštědla.

Pro rozpouštědlo DEO byla zvolena strategie zjištění množství etanolu ve směsi metodou GC. Množství ethanolu bylo přepočítáno na množství hydroxidu draselného potřebného pro neutralizaci. Pro chromatografickou analýzu byla použita náplňová kolona (2 m dlouhá, průměr 2 mm, náplň Chromosorb AW 80-100 mesh smočený 10 % PEG 4000), nosný plyn vodík (10 ml/min) a detektor TCD. Důvodem použití této metody byl zejména rychlý průběh hydrolýzy DEO. Zároveň ethanol díky je bodu varu 78,37 °C vhodným analytem pro plynovou chromatografii. Po odebrání vzorku byl roztok ponechán při laboratorní teplotě, aby se oddělila

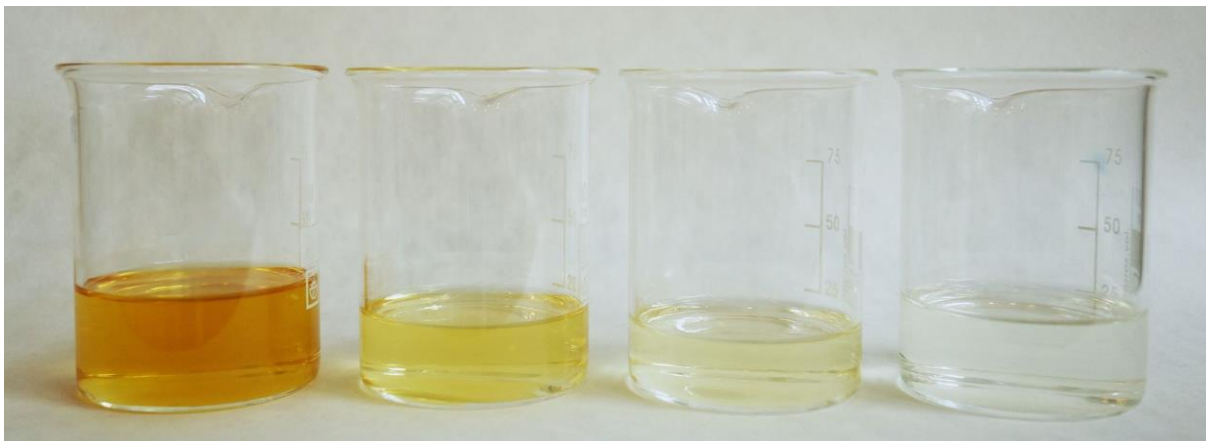
organická a vodná fáze. K analýze byla používána jen organická fáze. Analýza byla vyhodnocena metodou vnitřního standardu. Jako vnitřní standard byl zvolen aceton. Odebraný vzorek roztoku po hydrolýze byl smíchán s acetonem v hmotnostním poměru 2:1. Stejným způsobem byl upraven také standardní (kalibrační) roztok DEO a ethanolu o známém množství (10 % ethanolu v DEO). Roztok s acetonem byl ručně nastříknut (0,2 µl) na kolonu. Pík acetonu sloužil k normalizaci odezvy, která není stejná pro chybu způsobenou ručním nástříkem. Ethanolový pík vzorku byl porovnáván s ethanolovým píkem standardního roztoku. Z poměru ethanolových píků a známého množství ethanolu ve standardu bylo určeno množství ethanolu ve vzorku.

3.4 Extrakce P3HB pomocí esterů

Extrakce P3HB z biomasy pomocí esterů byla provedena za účelem další analýzy P3HB. Cílem extrakce bylo především převést polymer do roztoku a následně oddělit pevné zbytky biomasy filtrací. Pro extrakci byla použita frakce částic biomasy 1-2 mm (viz 3.2) a teplota 135 °C. Směs se za těchto podmínek dobře filtrovala a rozpouštědlo se tolik nevypařovalo. Pro studium degradace nepřečištěného P3HB sloužil surový roztok po filtraci, který reprezentuje reálný případ přirozeně se vyskytujících kontaminantů v roztoku během extrakce a následné rafinace roztoku. Pro studium modelového chování čistého P3HB byl vyextrahovaný polymer promýván EA a následně opětovně rozpuštěn v čistém esteru.

Nejprve byl navážen ester, který byl temperován v termostatu na 135 °C. Poté byla navážena biomasa v množství odpovídající hmotnostnímu poměru 1:10 vůči esteru a vpravena do roztoku. Extrakce probíhala 15 minut při teplotě 135 °C. Během extrakce se zvyšovala viskozita roztoku v důsledku přecházení polymeru do roztoku. Následně byla směs za horka filtrována za sníženého tlaku na Büchnerově nálevce s filtračním papírem. Biomasa po extrakci se dále nezpracovávala. Roztok polymeru byl ponechán při laboratorní teplotě. Při nižší teplotě má polymer menší rozpustnost a vysráží se z rozpouštědla. Nevzniká však suspenze, ale rozpouštědlo je vázáno do struktury polymeru. Výsledný surový roztok má strukturu podobnou želatině. Takto připravený surový roztok byl použit pro studium degradace nepřečištěného P3HB.

Pro přípravu roztoku přečištěného P3HB bylo nejprve odděleno esterové rozpouštědlo mechanickým vymačkáním surového roztoku. Vymačkaný polymer byl podroben promývání pomocí EA, kterého bylo stejné množství jako vymačkaného esterového rozpouštědla. Polymer byl smíchán s EA a opět vymačkan. Tento proces promývání byl proveden celkem třikrát. Oddělené filtráty esterového rozpouštědla a EA po promývání (viz obrázek 7) byly uchovány pro další studium. Přečištěný polymer byl sušen při 90 °C po dobu 2 dní.



Obrázek 7 Filtráty ethylacetátu a esterového rozpouštědla po vymývání polymeru, zleva: filtrát esterového rozpouštědla; filtrát po prvním promytí ethylacetátem; filtrát po druhém promytí ethylacetátem; filtrát po třetím promytí ethylacetátem.

3.5 Analýza filtrátů pomocí UV-VIS spektrofotometrie

Esterové rozpouštědlo a EA se po procesu promývání (viz 3.4) zbarvily do žluta. Důvodem zbarvení je přechod barevných látek z biomasy do roztoku spolu s polymerem, hlavně zbytkového oleje, který je substrátem fermentace (viz 3.2). Substrát se tak stává součástí sušené biomasy. Intenzita zbarvení dobře odpovídá úrovni kontaminace roztoku polymeru těmito látkami, a proto může sloužit ke studiu účinnosti promývání surového polymeru.

Intenzita zbarvení byla měřena ve skleněné kyvetě při vlnové délce 410 nm a délka optické dráhy byla 1 cm. Jako blank sloužilo esterové rozpouštědlo popřípadě EA.

3.6 Degradace P3HB za zvýšené teploty

Molekulová hmotnost P3HB se při extrakci snižuje v důsledku zvýšené teploty procesu. Jde zejména o termodegradační proces tzv. beta-eliminace a v menší míře o hydrolýzu způsobenou přítomností malého množství vody v biomase (viz 3.2). Dlouhé řetězce P3HB se štěpí na menší. Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, jak rychle probíhá snižování molekulové hmotnosti při 4 konkrétních teplotách.



Obrázek 9 Aparatura pro studium degradace polymeru.

3.7 Gravimetrické stanovení sušiny extraktů obsahujících P3HB

Parametry extrakce:

- Konstantní teplota (140 °C) a různé frakce biomasy (2-4 mm, 1-2 mm, 0,5-1mm, 0,25-0,5 mm)
- Jedna frakce biomasy (1-2 mm) a různé extrakční teploty (120°C, 140°C, 160 °C)

Extrakce probíhala stejně jako v případě 3.4. Interval odebírání extrakční směsi byl pro každou teplotu jiný:

- 10 minut pro 120 °C
- 5 minut pro 140 °C
- 3 minuty pro 160 °C

Odebraný vzorek byly za horka odstředěn při 4000 ot.min⁻¹ po dobu 2 minut. Důvodem odstředění bylo oddělení pevných zbytků biomasy, který byly odebrány se vzorkem roztoku. Odstředěný roztok byl ponechán k volnému vychladnutí na laboratorní teplotu za účelem vysrážení polymeru. Vychladlé vzorky roztoků pak byly navažovány na analytických vahách na samostatné Petriho misky. Navážené vzorky byly sušeny v sušárně při teplotě 90 °C po dobu 2 dní za účelem oddělení veškerého rozpouštědla. Po usušení byly misky opět zváženy na analytických vahách a z rozdílu hmotností byla zjištěna hmotnost vyextrahované sušiny. Vzhledem k žlutému zbarvení rozpouštědel během extrakce bude součástí sušiny kromě P3HB také různé příměsi biomasy jako je zbytkový substrát po kultivaci (viz 3.2).



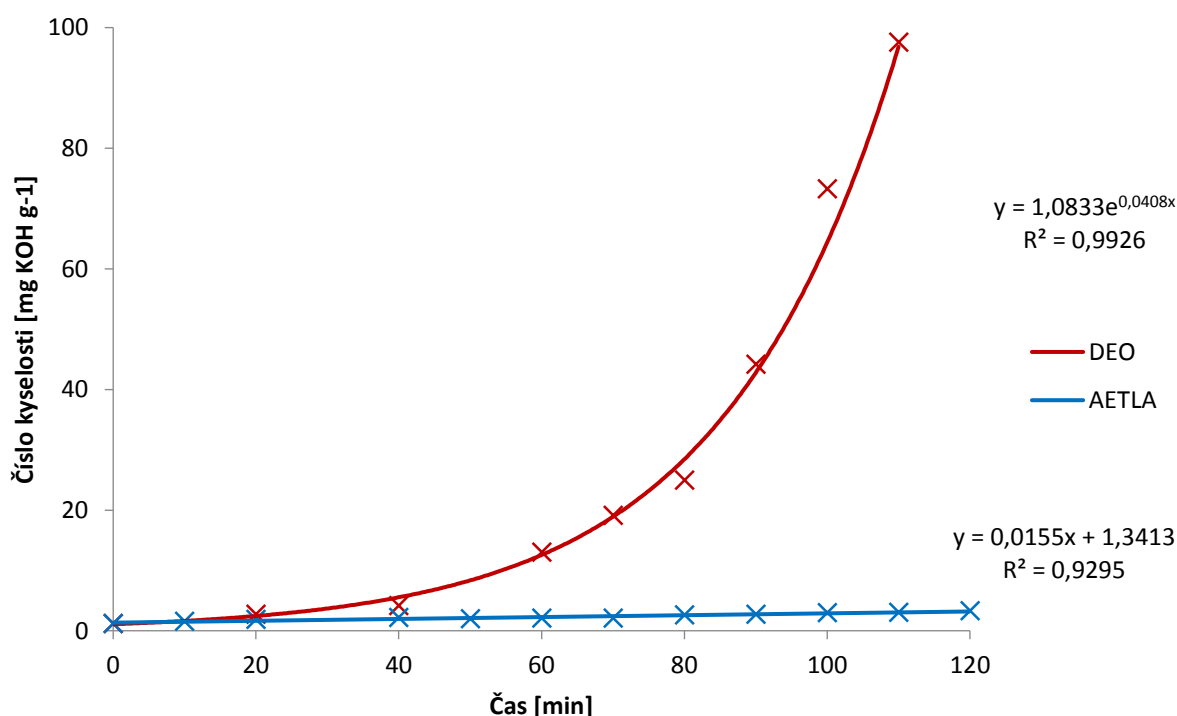
Obrázek 10 Průběh srážení polymeru z roztoku při ochlazování.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Z naměřených hodnot máme možnost posoudit, který ze dvou použitých esterů je vhodnější pro extrakci P3HB z biomasy. Kromě extrakce samotné byla posouzena hydrolytická stabilita použitých esterů. Hlavním srovnávaným parametrem během samotné extrakce je závislost rychlosti degradace molekulové hmotnosti na teplotě roztoku přečištěného i nepřečištěného P3HB. Tato vlastnost je důležitá zvláště pro následnou technologii průmyslového zpracování polymeru. Dalším srovnávaným parametrem je rychlost a výtěžnost extrakce.

4.1 Hydrolytická stabilita esterových rozpouštědel

Hydrolytická stabilita je zásadní pro zjištění použitelnosti rozpouštědel. Hydrolyzované rozpouštědlo není možné znovu použít pro extrakci. Během procesu hydrolyzy dochází ke změně vlastností rozpouštědla a vzniku vedlejších produktů (viz 3.3). Vedlejší produkty jako jsou alkoholy a karboxylové kyseliny mohou svými vlastnostmi dále zvyšovat hydrolytickou nestabilitu rozpouštědla a mohou ovlivňovat jeho extrakční schopnosti a způsobovat korozi výrobního zařízení. Kromě toho mohou urychlovat degradaci extrahovaného polymeru. Výsledkem studia hydrolytické stability esterů je závislosti změny čísla kyselosti v čase při teplotě 100 °C.



Graf 1 Závislost změny čísla kyselosti esterového rozpouštědla na délce hydrolyzy při 100 °C.

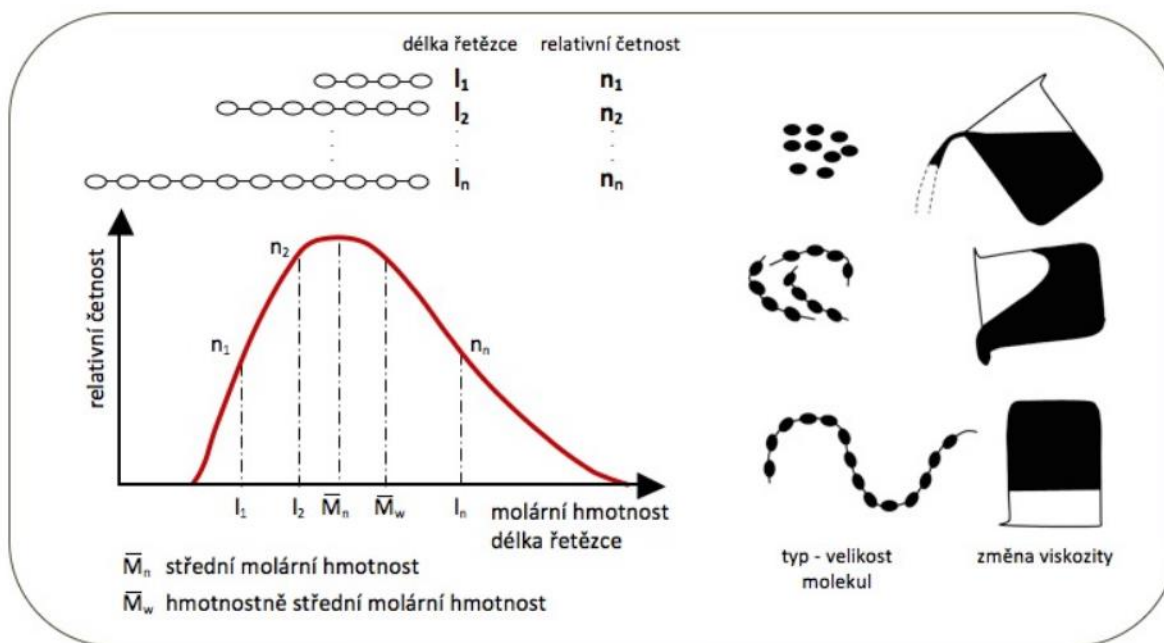
Z grafu 1 je patrné, že AETLA vykazuje vyšší hydrolytickou stabilitu, než DEO. Průběh změny kyselosti DEO je exponenciální, což má pravděpodobně za následek autokatalýza procesu.

U tohoto esteru také došlo ke spojení vodné a organické fáze a začaly se objevovat krystalky kyseliny šťavelové, což znamená, že hydrolyza proběhla z části do druhého stupně (viz obrázek 5). U DEO vzrostla kyselost stokrát, u AETLA bez mála třikrát. Průběh změny kyselosti u AETLA se dá v tomto případě považovat za lineární, nicméně jde patrně o počátek hydrolyzy, takže se je průběh pravděpodobně změnil na exponenciální.

4.2 Degradace molekulové hmotnosti P3HB

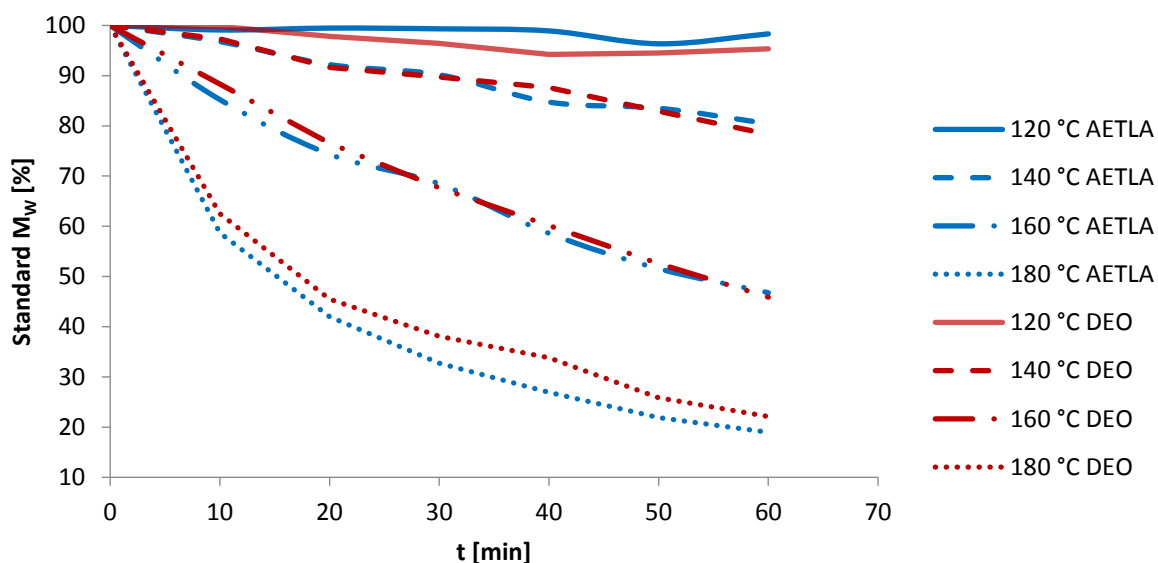
Při extrakci PHB pomocí rozpouštědla dochází v důsledku zvýšené teploty a přítomnosti vlhkosti ke snižování molekulové hmotnosti polymeru (viz obrázek 6). Zároveň mohou mít na degradaci vliv také různé příměsi jako je zbytkový kultivační substrát (viz 3.5) a také hydrolytická stabilita esterového rozpouštědla (viz 3.3). Příměsi přechází do rozpouštědla stejně, jako P3HB. Hydrolyzované rozpouštědlo uvolňuje vedlejší produkty jako je kyselina octová a ethanol, které mohou přispívat k degradaci. Roztok přečištěného i nepřečištěného P3HB byl vystaven zvýšené teplotě po dobu 60 minut. Odebírané vzorky byly analyzovány pomocí GPC. GPC nám poskytne informace o střední molekulové hmotnosti a na základě distribuce makromolekul získáme veličiny:

- **Hmotnost hmotnostně střední molekulová (M_w):** průměrná molekulová hmotnost polymeru vypočtená z molekulových hmotností jednotlivých makromolekul
- **Hmotnost číselně střední molekulová (M_n):** průměrná molekulová hmotnost polymeru vypočítaná z hmotnosti vzorku a počtu makromolekul v něm obsaženým



Obrázek 11 Distribuční křivka a srovnání vlastností degradovaného polymeru [5]

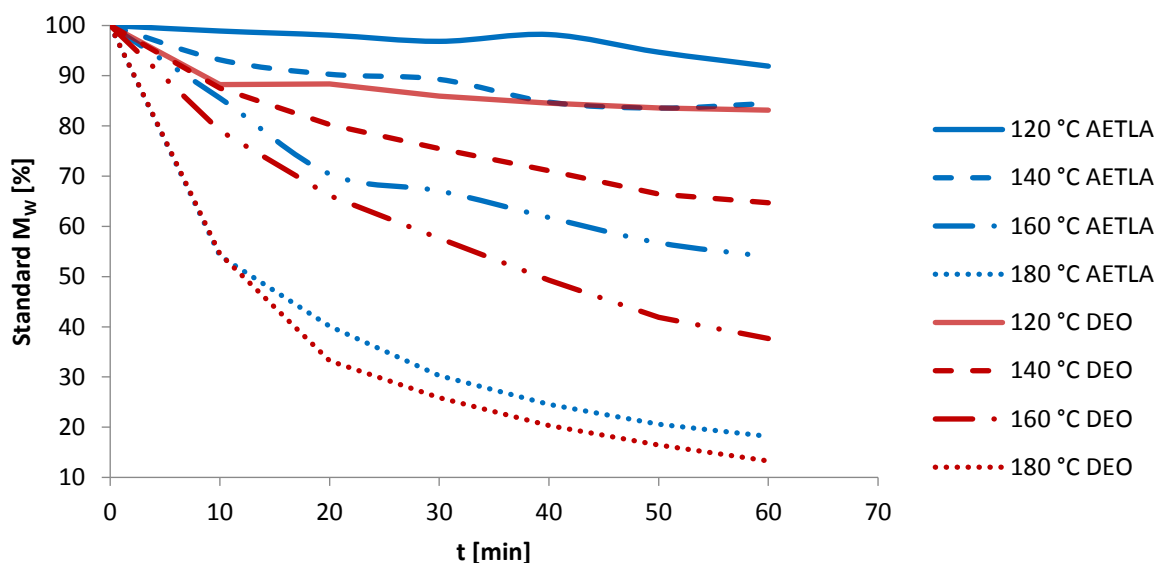
1) Přechištěný PHB



Graf 2 Závislost relativní změny M_w přechištěného P3HB v čase.

Průběh degradace molekulové hmotnosti přechištěného P3HB je prakticky totožný u obou esterových rozpouštědel pro danou studovanou teplotu. Zatímco při 120 °C se molekulová hmotnost nesnížila ani na 95 %, u teploty 180 °C byla jen 20% ve srovnání se standardem. U této teploty je taky ze začátku patrný rychlejší průběh, který byl následně zpomalen. To může být příčinou autokatalýzy popřípadě mohly rychlost degradace ovlivňovat příměsi obsažené jen v malém množství, které se postupující degradací vyčerpá.

2) Nepřechištěný PHB

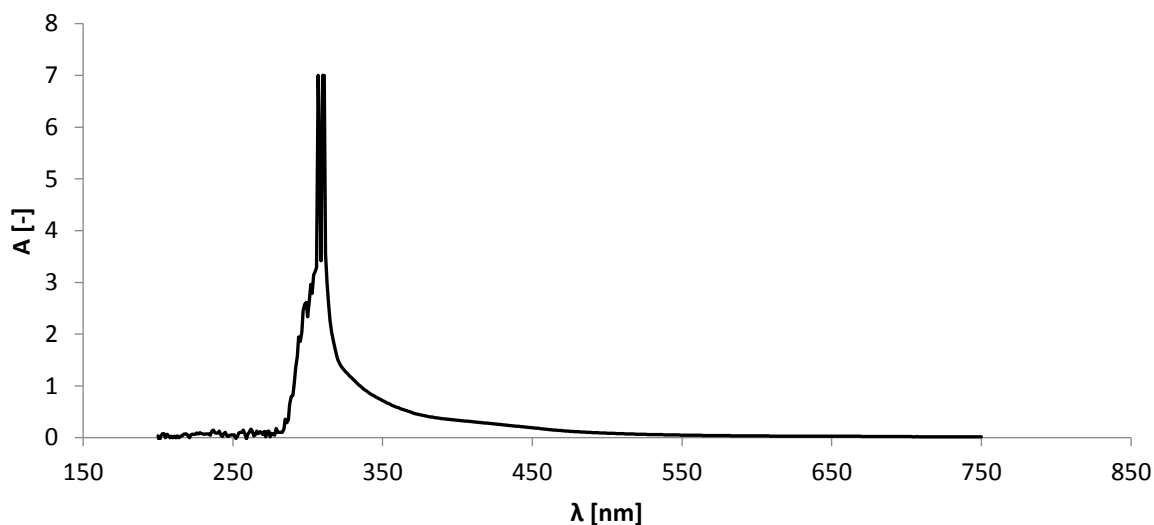


Graf 3 Závislost relativní změny M_w nepřechištěného P3HB v čase.

V případě nepřečištěného P3HB je patrná změna průběhu v porovnání s přečištěným polymerem. U nižších teplot jsou zjevné rozdíly v rychlosti degradace mezi esterovými rozpouštědly. Roztok AETLA vykazuje menší rychlost degradace. Pro srovnání: rychlost snižování molekulové hmotnosti je prakticky totožná pro roztok AETLA při 140 °C a roztok DEO při 120 °C (viz graf 2). Rozdíly mezi estery se snižují se zvyšující se teplotou. Při teplotě 180 °C je průběh prakticky stejný jako v případě přečištěného P3HB (viz graf 1). Rozdíly v rychlosti degradace polymeru mohou být příčinou vyšší hydrolytické stability AETLA. Do roztoku se tak uvolňuje menší množství vedlejších produktů hydrolýzy, které mohou podporovat degradaci. Dalším faktorem mohlo být větší množství příměsí v roztoku DEO, který vykazoval intenzivnější žluté zbarvení. Příměsi mohou katalyzovat proces snižování molekulové hmotnosti. Z obecného trendu závislosti lze však usuzovat, že samotné rozpouštědlo nemá na rychlost termodegradace P3HB zásadní vliv, a jedná se proto hlavně o vlastnost samotného polymeru.

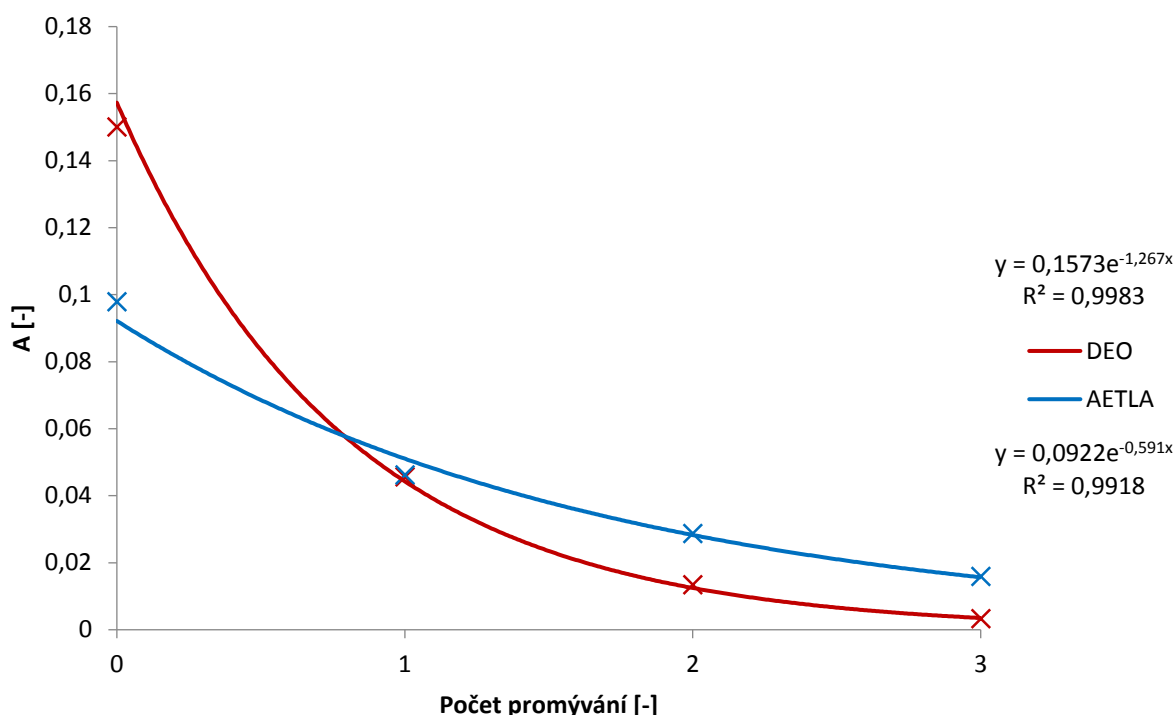
4.3 UV-VIS spektrofotometrie filtrátů

Spektrofotometrická analýza slouží ke zjištění intenzity žlutosti esterového rozpouštědla a EA po extrakci. Žlutost roztoku může být mírou obsahu příměsí, protože roztok připravený z čistého polymeru je bezbarvý a čirý. Při třístupňovém promývání se viditelně snižuje intenzita žlutosti EA i polymeru.



Graf 4 Absorpční spektrum vymačkaného EA.

Z důvodu žlutého zbarvení se absorpční maximum nachází v UV oblasti (310 nm). Pro spektrofotometrii byla zvolena vlnová délka 410 nm a to z důvodu relativně nízkých hodnot naměřených absorbancí. Pokud bychom měřili v oblasti absorpčního maxima, naměřené hodnoty absorbance by byly příliš vysoké a bylo by zapotřebí vzorek ředit. Lambert-Beerův zákon, kterým se řídí UV-VIS spektrofotometrie platí pro všechny hodnoty vlnových délek, při kterých se měří, proto je možné použít pro měření vlnovou délku mimo absorpční maximum.



Graf 5 Závislost změny absorbance na počtu promývání EA.

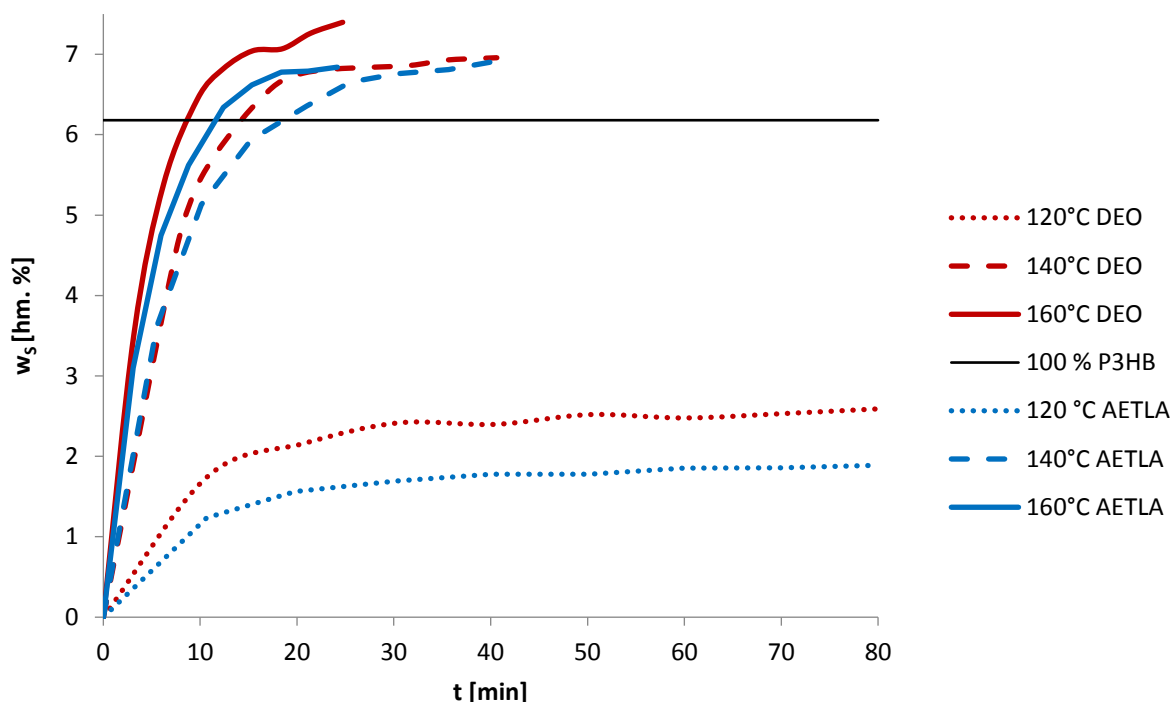
Z výsledků analýzy je patrné, že vymačkané esterové rozpouštědlo (počet promytí 0) AETLA vykazuje o 33 % nižší hodnotu absorbance, než DEO. Po prvním promytí vykazovaly oba estery stejnou absorbanci a dále je nižší hodnota zjevná u DEO. Z toho vyplývá, že AETLA je pro extrakci P3HB selektivnější, než DEO. Z průběhu změn absorbancí je evidentní, že žlutost se dá lépe odstranit z DEO. Tento trend naznačuje, že se jedná pouze o neselektivní ředění nečistot, které se při vymývání přechází do filtrátu. Rozhodujícím parametrem ovlivňující vymývatelnost nečistot je pravděpodobně afinita EA jako promývadla k polymeru, které tak může původní esterové rozpouštědlo spolu s nečistotami z polymeru vytěšňovat.

4.4 Průběh extrakce P3HB

Hlavním cílem gravimetrické analýzy bylo zjištění průběhu extrakce, který byl monitorován měřením sušiny extraktů odebíraných během extrakce. Vzorky byly v různých časových intervalech odebrány (podle teploty extrakce), odstředěny od pevných zbytků biomasy, ponechány při laboratorní teplotě pro vysrážení polymeru a zváženy. Rozpouštědlo bylo odpařeno a následně byla stanovena sušina extraktu. Z hodnot hmotnosti sušiny je možné určit rovnovážný stav extrakce, kdy se hmotnost sušiny už výrazně nezvyšuje. Tato analýza byla prováděna vždy s jedním proměnným parametrem: teplotou, nebo frakcí velikosti částic biomasy (viz 3.2).

1) Závislost rychlosti extrakce na teplotě

Zvýšení teploty extrakce je důležité zejména pro zajištění maximální difuzivity rozpouštědla a rozpouštěcích schopností polymeru. Tyto parametry jsou zásadní pro získání co nejvyššího množství extrahovaného polymeru. Pro každou teplotu byla zvolena jinak dlouhá doba měření a to z důvodu rozdílné rychlosti dosažení rovnovážného stavu extrakce.

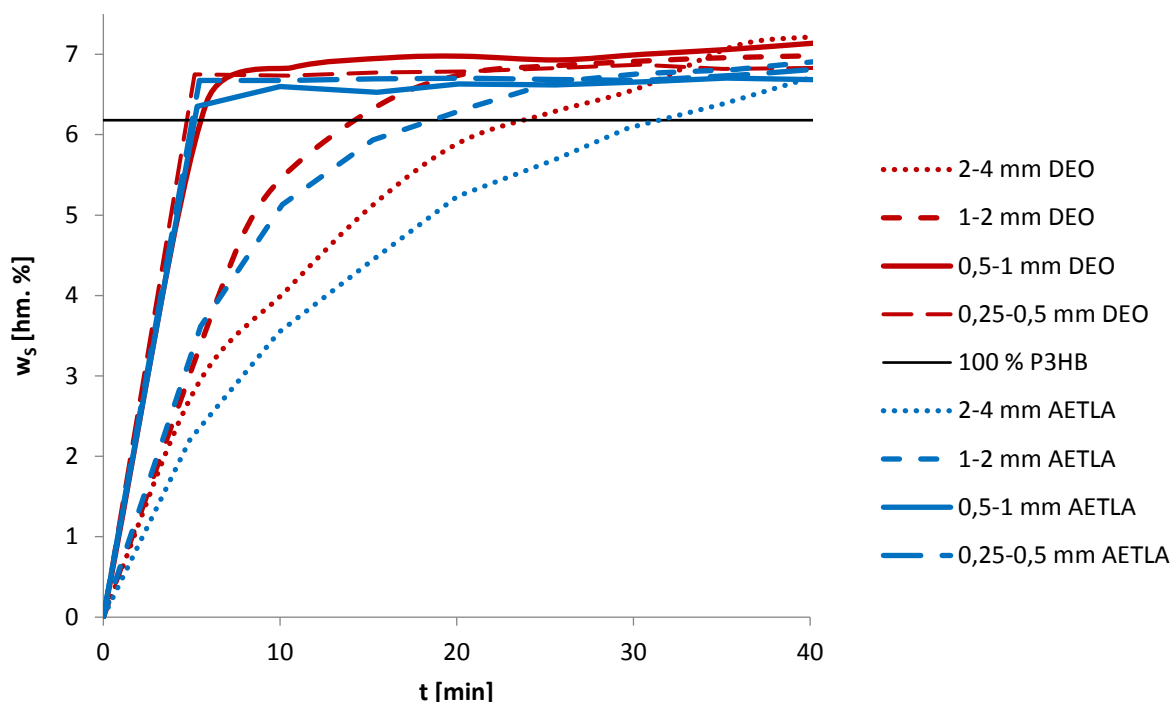


Graf 6 Závislost změny hmotnostního zlomku sušiny extraktu v roztoku na čase pro různé teploty extrakce pro frakci částic 1-2 mm.

V grafu 6 je uveden průběh extrakce esterovými rozpouštědly při konkrétních teplotách. V grafu se také nachází vodorovná čára, která označuje maximální teoretický hmotnostní zastoupení P3HB v roztoku pro danou biomasu a poměr biomasa-rozpouštědlo. Studovaná biomasa obsahuje 65,9 % P3HB a roztok byl tvořen biomasou a esterem v hmotnostní poměru 1:10. Nejvyšší hodnota hmotnostního zlomku samotného P3HB v roztoku je tedy zaokrouhleně 6,18 %. Rovnovážný stav extrakce při 120 °C se ustanovil přibližně v 30 % této nejvyšší hodnoty. Teplota 120 °C zřejmě není dostatečná pro dosažení potřebných rozpouštěcích vlastností. V případě teplot 140 °C a 160 °C nastal rovnovážný stav extrakce přibližně v 115 % hodnoty nejvyššího hmotnostního zlomku P3HB. U každého esteru a teploty se tento rovnovážný stav ustanovil za rozdílnou dobu. Je patrné, že tyto teploty již zajišťují vyšší difuzivitu rozpouštědla a potřebnou rozpustnost polymeru. Vyšší (nad 100%) hodnota hmotnostního zlomku je zřejmě zapříčiněna přechodem ostatních součástí biomasy do roztoku (viz 3.2). U všech studovaných teplot byl hmotnostní zlomek sušiny extraktu v roztoku vyšší u DEO. Intenzita žlutosti byla také vyšší u DEO (viz 4.3). DEO je tedy zřejmě schopné extrahovat větší množství příměsí biomasy.

2) Závislost rychlosti extrakce na velikosti částic biomasy

Velikosti částic ovlivňuje rychlost extrakce především z důvodu různé velikosti mezifázového rozhraní, na kterém dochází k extrakci. Rovnovážný stav extrakce nastává rychleji u extrakce částic o nejmenší velikosti. S menším objemem částic také narůstá difuzivita rozpouštědla. Difúze rozpouštědla do center malých částic probíhá rychleji.



Graf 7 Závislost změny hmotnostního zlomku sušiny extraktu v roztoku na čase pro různé velikosti extrahovaných částic při teplotě 140 °C.

Rovnovážný stav extrakce pro všechny frakce částic biomasy nastal nad maximální hodnotou hmotnostního zlomku P3HB v roztoku (viz 1) 4.4) zhruba na hodnotě 105 – 115 % maxima. Důvodem dosažení rovnováhy v tomto intervalu bude pravděpodobně rozdílná difuzivita rozpouštědla při extrakci různých frakcí částic biomasy. Pro frakce 0,5-1 mm a 0,25-0,5 mm nastala rovnováha už po 5 minutách, u ostatních frakcí byla tato doba delší (viz graf 7). Ve všech případech byl hmotnostní zlomek extraktu sušiny vyšší u DEO stejně jako v předchozím případě (viz 1) 4.4).

5 ZÁVĚR

V teoretické části práce byla vypracována literární rešerše týkající se vlastností, produkce a využití polyhydroxyalkanoátů a způsoby jejich extrakce. Předmětem experimentální části bylo provést experimenty týkající se extrakce polymeru s dvěma esterovými rozpouštědly a naměřené hodnoty porovnat.

Prvním provedeným experimentem bylo studium hydrolytické stability esterových rozpouštědel, o které vypovídá změna jejich kyselosti v čase. Zatímco u DEO vzrostla kyselost zhruba stokrát, u AETLA vzrostla pouze třikrát. U DEO navíc došlo ke spojení organické a vodné dvoufázového roztoku a začala se srážet kyselina šťavelová, která je indikací pokročilého stupně hydrolýzy. Po dvou hodinách měření kyselost DEO rostla exponenciálně, což naznačuje zapojení autokatalýzy. U AETLA byl průběh po stejně dlouhé době prakticky lineární.

Experiment týkající se degradace molekulové hmotnosti polymeru poskytl totožné výsledky průběhu u obou esterových rozpouštědel pro modelový případ přečištěného polymeru. V reálném případě nepřečištěného polymeru vykazoval roztok AETLA a polymeru menší pokles molekulové hmotnosti než roztok DEO u všech studovaných teplot extrakce. Důvodem je zřejmě vyšší hydrolytická stabilita AETLA. Změna rychlosti degradace vůči modelovému vzorku čistého polymeru byla pravděpodobně způsobena zbytkovou vlhkostí po sušení biomasy a jejími ostatními příměsmi. Jako hlavní termodegradační pochod nezávislý na typu použitého rozpouštědla lze však označit beta-štěpení. Tato teorie vychází z nezávislosti rychlosti degradace na typu rozpouštědla v případě degradace čistého polymeru.

Z měření žlutosti esterových rozpouštědel a promývacího rozpouštědla ethylacetátu bylo zjištěno, že žlutost DEO je o 33 % vyšší než u AETLA při zachování extrakčních podmínek. V případě promytého polymeru byla konečná žlutost u polymeru extrahovaného do AETLA. Tyto výsledky nasvědčují tomu, že AETLA je sice selektivnější pro extrakci polymeru z biomasy, ale příměsi jako substrát pro kultivaci producenta polyhydroxyalkanoátů přecházejí více do DEO. Promývání polymeru je podle výsledků účinnější u roztoku DEO.

Průběhu extrakce byl monitorován jako sušina extraktu gravimetricky. U teplot 140 °C a 160 °C bylo pravděpodobně dosaženo rovnovážného stavu, při kterém byl téměř veškerý polymer extrahován. U teploty 120 °C zřejmě nebylo dosaženo potřebné rozpouštěcí síly rozpouštědla. Vyšší sušiny bylo dosaženo u všech teplot v roztoku DEO pravděpodobně z důvodu většího množství koextrahovaných kontaminantů. U průběhu extrakce s různě velkými částicemi biomasy bylo dosaženo rovnovážného stavu u všech frakcí částic přibližně na stejné hodnotě extraktu sušiny. Pro dvě nejmenší frakce nastala tato rovnováha po 5 minutách, u ostatních frakcí byla tato doba vyšší. U největší frakce bylo extrakční rovnováhy dosaženo přibližně po 40 minutách. Důvodem rozdílné doby ustavení rovnováhy je zejména různá velikost mezifázového povrchu biomasy a rozpouštědla.

Na základě zjištěných informací z výsledků experimentů byl navržen způsob extrakce P3HB do esterových rozpouštědel. Vhodné rozpouštědlo je AETLA vzhledem ke své vyšší hydrolytické stabilitě a pravděpodobně vyšší extrakční selektivitě. Vhodná teplota extrakce se pohybuje okolo 140 °C z důvodu malého snížení molekulové hmotnosti polymeru za současného rychlého průběhu extrakce. Vhodná frakce velikosti částic sušené biomasy se pohybuje v rozmezí 1-2 mm. Tyto částice již lze snadno oddělit filtrací a dochází k rychlému ustanovení rovnovážného stavu extrakce a přechodu většiny polymeru do rozpouštědla v krátkém čase.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] TAGUCHI, Seiichi. Bioengineering of Polyhydroxyalkanoates. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2002, 2017-05-15, s. 1-9 [cit. 2019-03-17]. DOI: 10.1002/0471440264.pst655. ISBN 9780471440260. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471440264.pst655>
- [2] ISIKGOR, Furkan H. a C. Remzi BECER. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry* [online]. 2015, **6**(25), 4497-4559 [cit. 2019-02-26]. DOI: 10.1039/C5PY00263J. ISSN 1759-9954. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5PY00263J>
- [3] ANDLER, Rodrigo, Robin VIVOD a Alexander STEINBÜCHEL. Synthesis of polyhydroxyalkanoates through the biodegradation of poly(cis-1,4-isoprene) rubber. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. 2019, **127**(3), 360-365 [cit. 2019-03-04]. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2018.08.015. ISSN 13891723. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172318306352>
- [4] GOPI, Salim, Marianna KONTOPOULOU, Bruce A. RAMSAY a Juliana A. RAMSAY. Manipulating the structure of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate (MCL-PHA) to enhance thermal properties and crystallization kinetics. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2018, **119**, 1248-1255 [cit. 2019-03-05]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.08.016. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813018330885>
- [5] BĚHÁLEK, Luboš. *Polymery*. Česká republika: Code Creator, 2016. ISBN 978-80-88058-68-7.
- [6] DIETRICH, Karolin, Marie-Josée DUMONT, Luis F. DEL RIO a Valérie ORSAT. Sustainable PHA production in integrated lignocellulose biorefineries. *New Biotechnology* [online]. 2019, **49**, 161-168 [cit. 2019-03-05]. DOI: 10.1016/j.nbt.2018.11.004. ISSN 18716784. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678418302176>
- [7] KOLLER, Martin, SALEMO, Anna, DE SOUSA DIAZ, Miguel, REITERER, Angelika, BRAUNEGG, Gerhart. (2010). *Modern Biotechnological Polymer Synthesis: A Review*. Food Technology and Biotechnology. 48. 255-269. ISSN 1330-9862.
- [8] SAGONG, Hye-Young, Hyeoncheol Francis SON, So Young CHOI, Sang Yup LEE a Kyung-Jin KIM. Structural Insights into Polyhydroxyalkanoates Biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 2018, **43**(10), 790-805 [cit. 2019-03-10]. DOI: 10.1016/j.tibs.2018.08.005. ISSN 09680004. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000418301531>

- [9] LAYCOCK, Bronwyn, Peter HALLEY, Steven PRATT, Alan WERKER a Paul LANT. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Progress in Polymer Science* [online]. 2014, **39**(2), 397-442 [cit. 2019-03-10]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2013.06.008. ISSN 00796700. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670013000798>
- [10] REHM, Bernd H.A. a Alexander STEINBÜCHEL. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 1999, **25**(1-3), 3-19 [cit. 2019-03-10]. DOI: 10.1016/S0141-8130(99)00010-0. ISSN 01418130. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813099000100>
- [11] KESSLER, Birgit a Bernard WITHOLT. Synthesis, recovery and possible application of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates: A short overview. *Macromolecular Symposia* [online]. 1998, **130**(1), 245-260 [cit. 2019-03-10]. DOI: 10.1002/masy.19981300122. ISSN 10221360. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/masy.19981300122>
- [12] HENDERSON, Robin A. a C. W. JONES. Poly-3-hydroxybutyrate production by washed cells of *Alcaligenes eutrophus* ; purification, characterisation and potential regulatory role of citrate synthase. *Archives of Microbiology* [online]. 1997, **168**(6), 486-492 [cit. 2019-03-10]. DOI: 10.1007/s002030050526. ISSN 0302-8933. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s002030050526>
- [13] CHEN, Guo-Qiang, Xiao-Ran JIANG a Yingying GUO. Synthetic biology of microbes synthesizing polyhydroxyalkanoates (PHA). *Synthetic and Systems Biotechnology* [online]. 2016, **1**(4), 236-242 [cit. 2019-03-10]. DOI: 10.1016/j.synbio.2016.09.006. ISSN 2405805X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405805X16300448>
- [14] MENG, De-Chuan, Rui SHEN, Hui YAO, Jin-Chun CHEN, Qiong WU a Guo-Qiang CHEN. Engineering the diversity of polyesters. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2014, **29**, 24-33 [cit. 2019-03-10]. DOI: 10.1016/j.copbio.2014.02.013. ISSN 09581669. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166914000445>
- [15] TAN, Dan, Qiong WU, Jin-Chun CHEN a Guo-Qiang CHEN. Engineering *Halomonas* TD01 for the low-cost production of polyhydroxyalkanoates. *Metabolic Engineering* [online]. 2014, **26**, 34-47 [cit. 2019-03-10]. DOI: 10.1016/j.ymben.2014.09.001. ISSN 10967176. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096717614001153>
- [16] CHEN, Guo-Qiang a Xiao-Ran JIANG. Engineering bacteria for enhanced polyhydroxyalkanoates (PHA) biosynthesis. *Synthetic and Systems Biotechnology* [online]. 2017, **2**(3), 192-197 [cit. 2019-03-10]. DOI: 10.1016/j.synbio.2017.09.001. ISSN 2405805X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405805X17300819>

- [17] OCAMPO-LÓPEZ, Carlos, Santiago COLORADO-ARIAS a Margarita RAMÍREZ-CARMONA. Modeling of microbial growth and ammonia consumption at different temperatures in the production of a polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolymer. *Journal of Applied Research and Technology* [online]. 2015, **13**(5), 498-503 [cit. 2019-03-11]. DOI: 10.1016/j.jart.2015.10.001. ISSN 16656423. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1665642315000528>
- [18] GOH, Yuh Shan a Irene Kit Ping TAN. Polyhydroxyalkanoate production by antarctic soil bacteria isolated from Casey Station and Signy Island. *Microbiological Research* [online]. 2012, **167**(4), 211-219 [cit. 2019-03-11]. DOI: 10.1016/j.micres.2011.08.002. ISSN 09445013. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944501311000796>
- [19] CHEN, Guo-Qiang a Xiao-Ran JIANG. Engineering bacteria for enhanced polyhydroxyalkanoates (PHA) biosynthesis. *Synthetic and Systems Biotechnology* [online]. 2017, **2**(3), 192-197 [cit. 2019-03-11]. DOI: 10.1016/j.synbio.2017.09.001. ISSN 2405805X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405805X17300819>
- [20] HORIKOSHI, Kōki. *Extremophiles handbook*. New York: Springer, 2011. Springer reference. ISBN 978-4-431-53897-4.
- [21] CHUNG, Ah-Leum, Hong-Liang JIN, Long-Jian HUANG, Hai-Mu YE, Jin-Chun CHEN, Qiong WU a Guo-Qiang CHEN. Biosynthesis and Characterization of Poly(3-hydroxydodecanoate) by β -Oxidation Inhibited Mutant of *Pseudomonas entomophila* L48. *Biomacromolecules* [online]. 2011, **12**(10), 3559-3566 [cit. 2019-03-12]. DOI: 10.1021/bm200770m. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm200770m>
- [22] LIU, Qian, Ge LUO, Xin Rong ZHOU a Guo-Qiang CHEN. Biosynthesis of poly(3-hydroxydecanoate) and 3-hydroxydodecanoate dominating polyhydroxyalkanoates by β -oxidation pathway inhibited *Pseudomonas putida*. *Metabolic Engineering* [online]. 2011, **13**(1), 11-17 [cit. 2019-03-12]. DOI: 10.1016/j.ymben.2010.10.004. ISSN 10967176. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096717610000893>
- [23] TRIPATHI, Lakshmi, Lin-Ping WU, Meng DECHUAN, Jinchun CHEN, Qiong WU a Guo-Qiang CHEN. *Pseudomonas putida* KT2442 as a platform for the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates with adjustable monomer contents and compositions. *Bioresource Technology* [online]. 2013, **142**, 225-231 [cit. 2019-03-12]. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.05.027. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852413007876>

- [24] TRIPATHI, Lakshmi, Lin-Ping WU, Jinchun CHEN a Guo-Qiang CHEN. Synthesis of Diblock copolymer poly-3-hydroxybutyrate -block-poly-3-hydroxyhexanoate [PHB-b-PHHx] by a β -oxidation weakened *Pseudomonas putida* KT2442. *Microbial Cell Factories* [online]. 2012, **11**(1) [cit. 2019-03-12]. DOI: 10.1186/1475-2859-11-44. ISSN 1475-2859. Dostupné z: <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-11-44>
- [25] BRENNER, Sydney, Jeffrey H. MILLER a William BROUGHTON. *Encyclopedia of genetics*. San Diego: Academic Press, c2002. ISBN 978-0-12-227080-2.
- [26] THOMSON, Nicholas M., Ayaka HIROE, Takeharu TSUGE, David K. SUMMERS a Easan SIVANIAH. Efficient molecular weight control of bacterially synthesized polyesters by alcohol supplementation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* [online]. 2014, **89**(7), 1110-1114 [cit. 2019-03-12]. DOI: 10.1002/jctb.4198. ISSN 02682575. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.4198>
- [27] LI, Dan, Li LV, Jin-Chun CHEN a Guo-Qiang CHEN. Controlling microbial PHB synthesis via CRISPRi. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2017, **101**(14), 5861-5867 [cit. 2019-03-12]. DOI: 10.1007/s00253-017-8374-6. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-017-8374-6>
- [28] WU, Hong, Jinchun CHEN a Guo-Qiang CHEN. Engineering the growth pattern and cell morphology for enhanced PHB production by *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2016, **100**(23), 9907-9916 [cit. 2019-03-12]. DOI: 10.1007/s00253-016-7715-1. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-016-7715-1>
- [29] JIANG, Xiao-Ran, Huan WANG, Rui SHEN a Guo-Qiang CHEN. Engineering the bacterial shapes for enhanced inclusion bodies accumulation. *Metabolic Engineering* [online]. 2015, **29**, 227-237 [cit. 2019-03-12]. DOI: 10.1016/j.ymben.2015.03.017. ISSN 10967176. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096717615000439>
- [30] BI, E a J LUTKENHAUS. Cell division inhibitors Sula and MinCD prevent formation of the FtsZ ring. *Journal of Bacteriology* [online]. 1993, **175**(4), 1118-1125 [cit. 2019-03-12]. DOI: 10.1128/jb.175.4.1118-1125.1993. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <http://jb.asm.org/lookup/doi/10.1128/jb.175.4.1118-1125.1993>
- [31] DOMINGUEZ-ESCOBAR, J., A. CHASTANET, A. H. CREVENNA, V. FROMION, R. WEDLICH-SOLDNER a R. CARBALLIDO-LOPEZ. Processive Movement of MreB-Associated Cell Wall Biosynthetic Complexes in Bacteria. *Science* [online]. 2011, **333**(6039), 225-228 [cit. 2019-03-12]. DOI: 10.1126/science.1203466. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1203466>

- [32] ELHADI, Dina, Li LV, Xiao-Ran JIANG, Hong WU a Guo-Qiang CHEN. CRISPRi engineering *E. coli* for morphology diversification. *Metabolic Engineering* [online]. 2016, **38**, 358-369 [cit. 2019-03-16]. DOI: 10.1016/j.ymben.2016.09.001. ISSN 10967176. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096717616301240>
- [33] MOŽEJKO-CIESIELSKA, Justyna a Robert KIEWISZ. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous?. *Microbiological Research* [online]. 2016, **192**, 271-282 [cit. 2019-03-17]. DOI: 10.1016/j.micres.2016.07.010. ISSN 09445013. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S094450131630043X>
- [34] BUGNICOURT, E., P. CINELLI, A. LAZZERI a V. ALVAREZ. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters* [online]. 2014, **8**(11), 791-808 [cit. 2019-03-17]. DOI: 10.3144/expresspolymlett.2014.82. ISSN 1788618X. Dostupné z: <http://www.expresspolymlett.com/letolt.php?file=EPL-0005219&mi=c>
- [35] LOMAS, Alex J., William R. WEBB, JianFeng HAN, Guo-Qiang CHEN, Xun SUN, Zhirong ZHANG, Alicia J. EL HAJ a Nicholas R. FORSYTH. Poly (3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyhexanoate)/Collagen Hybrid Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Tissue Engineering Part C: Methods* [online]. 2013, **19**(8), 577-585 [cit. 2019-03-17]. DOI: 10.1089/ten.tec.2012.0457. ISSN 1937-3384. Dostupné z: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.tec.2012.0457>
- [36] GOONOO, Newsheen, Archana BHAW-LUXIMON, Pearl PASSANHA, Sandra R. ESTEVES a Dhanjay JHURRY. Third generation poly(hydroxyacid) composite scaffolds for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* [online]. 2017, **105**(6), 1667-1684 [cit. 2019-03-17]. DOI: 10.1002/jbm.b.33674. ISSN 15524973. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.b.33674>
- [37] LOWE, J. S., Peter G. ANDERSON a Alan STEVENS. *Stevens & Lowe's human histology*. 4th ed. Philadelphia: Elsevier Mosby, c2015. ISBN 978-0-7234-3502-0.
- [38] LÜ, Lan-Xin, Xiao-Feng ZHANG, Yan-Yan WANG, Lazarus ORTIZ, Xi MAO, Zan-Li JIANG, Zhong-Dang XIAO a Ning-Ping HUANG. Effects of Hydroxyapatite-Containing Composite Nanofibers on Osteogenesis of Mesenchymal Stem Cells In vitro and Bone Regeneration In vivo. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. 2012, **5**(2), 319-330 [cit. 2019-03-17]. DOI: 10.1021/am302146w. ISSN 1944-8244. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/am302146w>

- [39] ARLE, Jeffrey E. a Jay L. SHILS. *Essential neuromodulation*. Burlington, MA: Academic Press, 2011. ISBN 978-0-12-381409-8.
- [40] LIZARRAGA-VALDERRAMA, Lorena R., Rinat NIGMATULLIN, Caroline TAYLOR, John W. HAYCOCK, Frederik CLAEYSENS, Jonathan C. KNOWLES a Ipsita ROY. Nerve tissue engineering using blends of poly(3-hydroxyalkanoates) for peripheral nerve regeneration. *Engineering in Life Sciences* [online]. 2015, **15**(6), 612-621 [cit. 2019-03-17]. DOI: 10.1002/elsc.201400151. ISSN 16180240. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elsc.201400151>
- [41] CHUNG, Ah-Leum, Guo-Dong ZENG, Hong-Liang JIN, Qiong WU, Jin-Chun CHEN a Guo-Qiang CHEN. Production of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids by β -oxidation and phaC operon deleted *Pseudomonas entomophila* harboring thioesterase gene. *Metabolic Engineering* [online]. 2013, **17**, 23-29 [cit. 2019-03-17]. DOI: 10.1016/j.ymben.2013.02.001. ISSN 10967176. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096717613000128>
- [42] RUTH, Katinka, Andreas GRUBELNIK, René HARTMANN, Thomas EGLI, Manfred ZINN a Qun REN. Efficient Production of (R)-3-Hydroxycarboxylic Acids by Biotechnological Conversion of Polyhydroxyalkanoates and Their Purification. *Biomacromolecules* [online]. 2007, **8**(1), 279-286 [cit. 2019-03-17]. DOI: 10.1021/bm060585a. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm060585a>
- [43] YANG, Shang-Tian. *Bioprocessing for value-added products from renewable resources: new technologies and applications*. Boston: Elsevier, 2007. ISBN 978-0-444-52114-9.
- [44] FAVEAU, Christelle, Martine MONDON, Jean-Pierre GESSON, Tobias MAHNKE, Sandra GEBHARDT a Ulrich KOERT. Synthetic studies on a phenyl-laulimalide analogue. *Tetrahedron Letters* [online]. 2006, **47**(47), 8305-8308 [cit. 2019-03-17]. DOI: 10.1016/j.tetlet.2006.09.104. ISSN 00404039. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040403906019125>
- [45] PRAMUAL, Sasivimon, Apinya ASSAVANIG, Magnus BERGKVIST, Carl A. BATT, Panya SUNINTABOON, Kriengsak LIRDPRAPAMONGKOL, Jisnuson SVASTI a Nuttawee NIAMSIRI. Development and characterization of bio-derived polyhydroxyalkanoate nanoparticles as a delivery system for hydrophobic photodynamic therapy agents. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 2016, **27**(2) [cit. 2019-03-17]. DOI: 10.1007/s10856-015-5655-4. ISSN 0957-4530. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10856-015-5655-4>

- [46] DINJASKI, Nina, Mar FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, Shivaram SELVAM, et al. PHACOS, a functionalized bacterial polyester with bactericidal activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biomaterials* [online]. 2014, **35**(1), 14-24 [cit. 2019-03-17]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.09.059. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961213011599>
- [47] JACQUEL, Nicolas, Chi-Wei LO, Yu-Hong WEI, Ho-Shing WU a Shaw S. WANG. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2008, **39**(1), 15-27 [cit. 2019-03-28]. DOI: 10.1016/j.bej.2007.11.029. ISSN 1369703X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X07004433>
- [48] BAPTIST, James Noel. *Process for preparing poly-beta-hydroxybutyric acid*. USA. US3044942A.
- [49] KSHAMA, Lakhsman a Ramachandriah Shamala TAMKUR. *A process for the extraction of polyhydroxyalkanoates from bacteria*. WO2006103699A1. Uděleno 5. 10. 2006.
- [50] TRAUSSNIG, Heinz, Engelbert KLOIMSTEIN, Hans KROATH a Robert ESTERMANN. *Extracting agents for poly-D(-)-3-hydroxybutyric acid*. USA. 4968611. Uděleno 6. 11. 1990.
- [51] NODA, Isao. *Solvent extraction of polyhydroxy-alkanoates from biomass facilitated by the use of marginal nonsolvent*. USA. 5821299. Uděleno 13. 10. 1998.
- [52] *Removal of endotoxin during purification of poly(3-hydroxybutyrate) from gram-negative bacteria*. *Applied and environmental microbiology*, 1999, **65**(6). ISSN 2762–2764.
- [53] KURDIKAR, Devdatt L., Fred E. STRAUSSER, A. John SOLODAR, Mark D. PASTER a Jawed ASRAR. *Methods of PHA extraction and recovery using non-halogenated solvents*. USA. US6043063A. Uděleno 20. 3. 2000.
- [54] ISRANI, Neetu, Surabhi THAPA a Srividya SHIVAKUMAR. Biolytic extraction of poly(3-hydroxybutyrate) from *Bacillus megaterium* Ti3 using the lytic enzyme of *Streptomyces albus* Tia1. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* [online]. 2018, **16**(2), 265-271 [cit. 2019-03-31]. DOI: 10.1016/j.jgeb.2018.07.004. ISSN 1687157X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1687157X18300714>
- [55] OJUMU, T. V., J. YU a B. O. SOLOMON. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology* [online]. 2004, **3**(1), 18-24 [cit. 2019-03-31]. DOI: 10.5897/AJB2004.000-2004. ISSN 1684-5315. Dostupné z: <http://academicjournals.org/journal/AJB/article-abstract/F1BA0DF31754>

- [56] ŠTEFKA, M. Tenzidy v povrchových a odpadních vodách. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 98 s. Vedoucí dizertační práce prof. Ing. Josef Čáslavský, CSc..
- [57] RAMSAY, J. A., E. BERGER, B. A. RAMSAY a C. CHAVARIE. Recovery of poly-3-hydroxyalkanoic acid granules by a surfactant-hypochlorite treatment. *Biotechnology Techniques* [online]. 1990, 4(4), 221-226 [cit. 2019-04-02]. DOI: 10.1007/BF00158833. ISSN 0951-208X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00158833>
- [58] KUNASUNDARI, B. a K. SUDESH. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Express Polymer Letters* [online]. 2011, 5(7), 620-634 [cit. 2019-04-02]. DOI: 10.3144/expresspolymlett.2011.60. ISSN 1788618X. Dostupné z: <http://www.expresspolymlett.com/letolt.php?file=EPL-0002230&mi=c>
- [59] KIM, Mia, Kyung-Suk CHO, Hee Wook RYU, Eun Gyo LEE a Yong Keun CHANG. *Biotechnology Letters* [online]. 25(1), 55-59 [cit. 2019-04-02]. DOI: 10.1023/A:1021734216612. ISSN 01415492. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1021734216612>
- [60] BERGER, E., B. A. RAMSAY, J. A. RAMSAY, C. CHAVARIE a G. BRAUNEGG. PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass. *Biotechnology Techniques* [online]. 1989, 3(4), 227-232 [cit. 2019-04-02]. DOI: 10.1007/BF01876053. ISSN 0951-208X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF01876053>
- [61] MOHAMMADI, Mitra, Mohd Ali HASSAN, Yoshihito SHIRAI, et al. Separation and Purification of Polyhydroxyalkanoates from Newly Isolated Comamonas sp. EB172 by Simple Digestion with Sodium Hydroxide. *Separation Science and Technology* [online]. 2012, 47(3), 534-541 [cit. 2019-04-06]. DOI: 10.1080/01496395.2011.615788. ISSN 0149-6395. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01496395.2011.615788>
- [62] HAHN, Sei Kwang, Yong Keun CHANG, Beom Soo KIM a Ho Nam CHANG. Optimization of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recover using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 1994, 44(2), 256-261 [cit. 2019-04-06]. DOI: 10.1002/bit.260440215. ISSN 0006-3592. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.260440215>
- [63] OVIEDO, Claudia a Jaime RODRÍGUEZ. EDTA: the chelating agent under environmental scrutiny. *Química Nova* [online]. 2003, 26(6), 901-905 [cit. 2019-04-07]. DOI: 10.1590/S0100-40422003000600020. ISSN 0100-4042. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422003000600020&lng=en&nrm=iso&tlng=en

- [64] CHEN, Yinguang, Jian CHEN, Cairong YU, Guocheng DU a Shiyi LUN. Recovery of poly-3-hydroxybutyrate from *Alcaligenes eutrophus* by surfactant–chelate aqueous system. *Process Biochemistry* [online]. 1999, **34**(2), 153-157 [cit. 2019-04-07]. DOI: 10.1016/S0032-9592(98)00082-X. ISSN 13595113. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003295929800082X>
- [65] KAPRITCHKOFF, Fernanda M., Alexandre P. VIOTTI, Rita C.P. ALLI, Marisa ZUCCOLO, José G.C. PRADELLA, Alfredo E. MAIORANO, Everson A. MIRANDA a Antonio BONOMI. Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*. *Journal of Biotechnology* [online]. 2006, **122**(4), 453-462 [cit. 2019-04-08]. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.09.009. ISSN 01681656. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016816560500619X>
- [66] LENNARD, Ted A. *Pain procedures in clinical practice*. 3rd ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, c2011. ISBN 978-1-4160-3779-8.
- [67] KAPRITCHKOFF, Fernanda M., Alexandre P. VIOTTI, Rita C.P. ALLI, Marisa ZUCCOLO, José G.C. PRADELLA, Alfredo E. MAIORANO, Everson A. MIRANDA a Antonio BONOMI. Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*. *Journal of Biotechnology* [online]. 2006, **122**(4), 453-462 [cit. 2019-04-08]. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.09.009. ISSN 01681656. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016816560500619X>
- [68] YASOTHA, K., M.K. AROUA, K.B. RAMACHANDRAN a I.K.P. TAN. Recovery of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) through enzymatic digestion treatments and ultrafiltration. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2006, **30**(3), 260-268 [cit. 2019-04-08]. DOI: 10.1016/j.bej.2006.05.008. ISSN 1369703X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X06001203>
- [69] *Enzyme Microbial Technologies: Disruption of microbial cells for intracellular products* [online]. Butterworth & Co. (Publishers), 1986, (8) [cit. 2019-04-09]. ISSN 0141-0229.
- [70] TAMER, I. Melih, Murray MOO-YOUNG a Yusuf CHISTI. Disruption of *Alcaligenes latus* for Recovery of Poly(β -hydroxybutyric acid): Comparison of High-Pressure Homogenization, Bead Milling, and Chemically Induced Lysis. *Industrial & Engineering Chemistry Research* [online]. 1998, **37**(5), 1807-1814 [cit. 2019-04-09]. DOI: 10.1021/ie9707432. ISSN 0888-5885. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ie9707432>
- [71] FANG, Huacan a Menglan DUAN. Marine Petroleum (Gas) Engineering and Equipment. *Offshore Operation Facilities* [online]. Elsevier, 2014, 2014, s. 341-536 [cit. 2019-04-09]. DOI: 10.1016/B978-0-12-396977-4.00003-2. ISBN 9780123969774. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123969774000032>

- [72] PRADO, Juliana M., Renata VARDANEGA, Isabel C.N. DEBIEN, Maria Angela de Almeida MEIRELES, Lia Noemi GERSCHENSON, Halagur Bogegowda SOWBHAGYA a Smain CHEMAT. Conventional extraction. *Food Waste Recovery* [online]. Elsevier, 2015, 2015, s. 127-148 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1016/B978-0-12-800351-0.00006-7. ISBN 9780128003510. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128003510000067>
- [73] VICHI, Stefania. Extraction Techniques for the Analysis of Virgin Olive Oil Aroma. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* [online]. Elsevier, 2010, 2010, s. 615-623 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1016/B978-0-12-374420-3.00066-8. ISBN 9780123744203. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123744203000668>
- [74] HEJAZI, P., E. VASHEGHANI-FARAHANI a Y. YAMINI. Supercritical Fluid Disruption of *Ralstonia eutropha* for Poly(β -hydroxybutyrate) Recovery. *Biotechnology Progress* [online]. 2003, **19**(5), 1519-1523 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1021/bp034010q. ISSN 8756-7938. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1021/bp034010q>
- [75] KHOSRAVI-DARANI, K., E. VASHEGHANI-FARAHANI, S.A. SHOJAOSADATI a Y. YAMINI. Effect of Process Variables on Supercritical Fluid Disruption of *Ralstonia eutropha* Cells for Poly(β -hydroxybutyrate) Recovery. *Biotechnology Progress* [online]. 2004, **20**(6), 1757-1765 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1021/bp0498037. ISSN 8756-7938. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1021/bp0498037>
- [76] PAGE, J, Willian & Cornish ANTHONY. Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in Fish Peptone Medium and Simplified Extraction of Poly- β -Hydroxybutyrate. *Applied and environmental microbiology*, 1994, 59. ISSN 4236-44.
- [77] LOUSSERT, A., J.-C. DEBUS a G. VANDERBORCK. Studying the behavior of piezoelectric single crystals for sonar using ATILA. *Applications of ATILA FEM Software to Smart Materials* [online]. Elsevier, 2013, 2013, 203-230e [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.1533/9780857096319.2.203. ISBN 9780857090652. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780857090652500102>
- [78] BUGNICOURT, E., P. CINELLI, A. LAZZERI a V. ALVAREZ. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters* [online]. 2014, **8**(11), 791-808 [cit. 2019-04-27]. DOI: 10.3144/expresspolymlett.2014.82. ISSN 1788618X. Dostupné z: <http://www.expresspolymlett.com/letolt.php?file=EPL-0005219&mi=c>
- [79] MUHR, Alexander, Eva Maria RECHBERGER, Anna SALERNO, et al. Biodegradable latexes from animal-derived waste: Biosynthesis and characterization of mcl-PHA accumulated by *Ps. citronellolis*. *Reactive and Functional Polymers* [online]. 2013, **73**(10), 1391-1398 [cit. 2019-04-27]. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2012.12.009. ISSN 13815148. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1381514812003185>

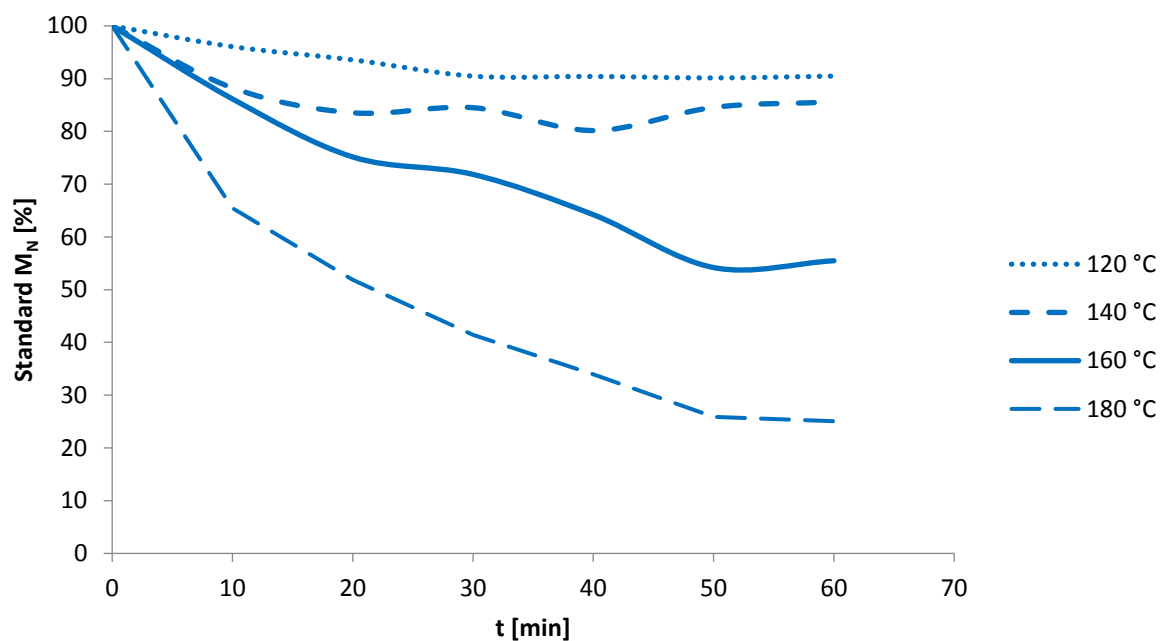
- [80] LI, Zibiao, Jing YANG a Xian Jun LOH. Polyhydroxyalkanoates: opening doors for a sustainable future. *NPG Asia Materials* [online]. 2016, **8**(4), e265-e265 [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.1038/am.2016.48. ISSN 1884-4049. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/am201648>
- [81] SEDLACEK, Petr, Eva SLANINOVA, Martin KOLLER, Jana NEBESAROVA, Ivana MAROVA, Vladislav KRZYZANEK a Stanislav OBRUCA. PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances. *New Biotechnology* [online]. 2019, **49**, 129-136 [cit. 2019-05-10]. DOI: 10.1016/j.nbt.2018.10.005. ISSN 18716784. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678418305119>
- [82] *Supercritical Fluid Extraction* [online]. Elsevier, 1994 [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.1016/C2009-0-26919-4. ISBN 9780080518176.

7 SEZNAM ZKRATEK

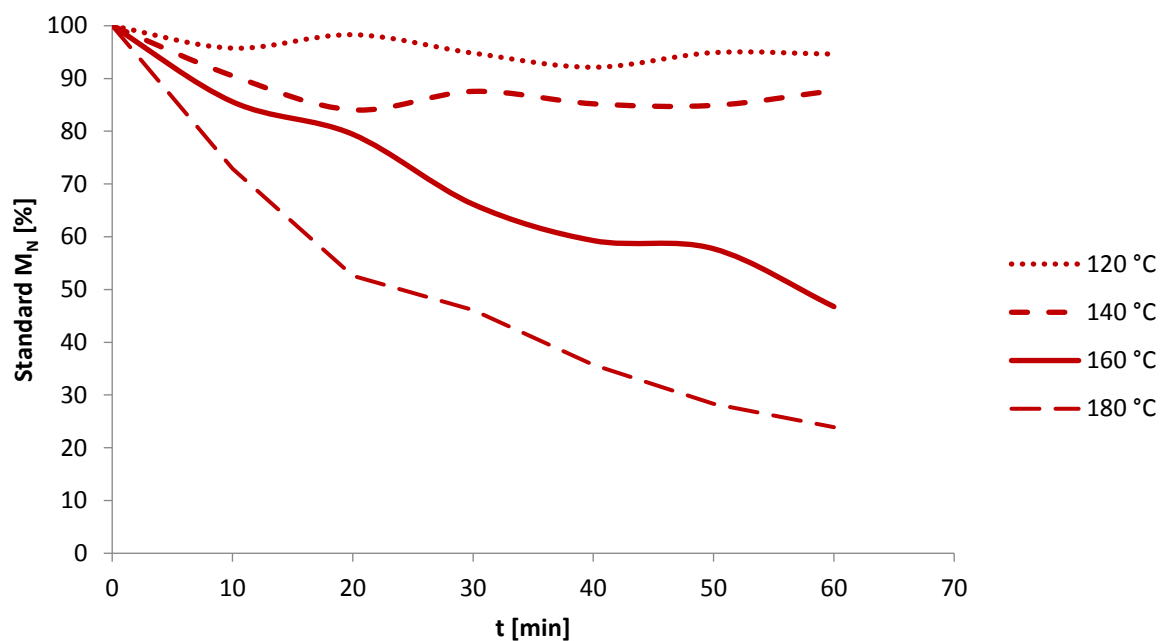
PHA	Polyhydroxyalkanoáty (polyhydroxyalkanoates)
Scl-PHA	Polyhydroxyalkanoáty s krátkým řetězcem (short chain polyhydroxyalkanoates)
Mcl-PHA	Polyhydroxyalkanoáty se středně dlouhým řetězcem (medium chain polyhydroxyalkanoates)
PHB	Polyhydroxybutyrát (polyhydroxybutyrate)
HV	Hydroxyvalerát (hydroxyvalerate)
PP	Polypropylen (polypropylene)
PE	Polyethylen (polyethylene)
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
NADH	Nikotinamidadeninnukleotidfosfát (nicotinamide adenine nucleotide phosphate)
P3HB	Poly(3-hydroxybutyrát) (poly(3-hydroxybutyrate))
P3HP	Poly(3-hydroxypentanoát) (poly(3-hydroxypentanoate))
P3HHx	Poly(3-hydroxyhexanoát) (poly(3-hydroxyhexanoate))
M _w	Hmotnost hmotnostně střední molekulová
M _n	Hmotnost číselně střední molekulová
CRISPR	Segmenty nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetit (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)
HD	Hydroxydekanoát (hydroxydecanoate)
PHO	Polyhydroxyoktanoát (polyhydroxyoctanoate)
MSC	Mezenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cells)
PAL	Povrchově aktivní látky
SDS	Dodecylsulfát sodný (sodium dodecylsulfate)
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina (ethylenediaminetetraacetic acid)
HPH	Vysokotlaká homogenizace (high pressure homogenization)
SFE	Superkritická fluidní extrakce (supercritical fluid extraction)
DEO	Diethyloxalát (diethyloxalate)

AETLA	Ethyl 2-(acetyloxy)propionát (ethyl 2-(acetyloxy)propanoate)
C_B	Koncentrace biomasy
T_t	Teplota tání
T_g	Teplota skelného přechodu
E	Youngův modul pružnosti
Δl	Délkové prodloužení
R_m	Pevnost v tahu
MBÚ	Mikrobiologický ústav
AV ČR	Akademie věd České republiky
TCD	Tepelně vodivostní detektor (thermal conductivity detector)
EA	Ethylacetát (ethylacetate)
A	Absorbance
λ	Vlnová délka
w_s	Hmotnostní zlomek

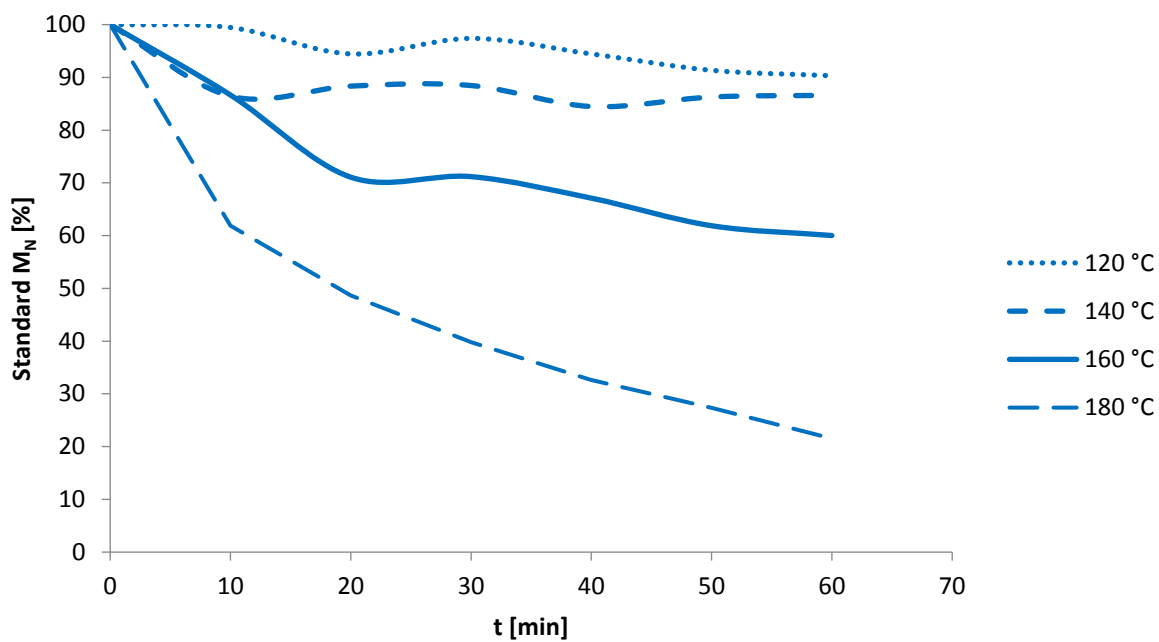
8 PŘÍLOHY



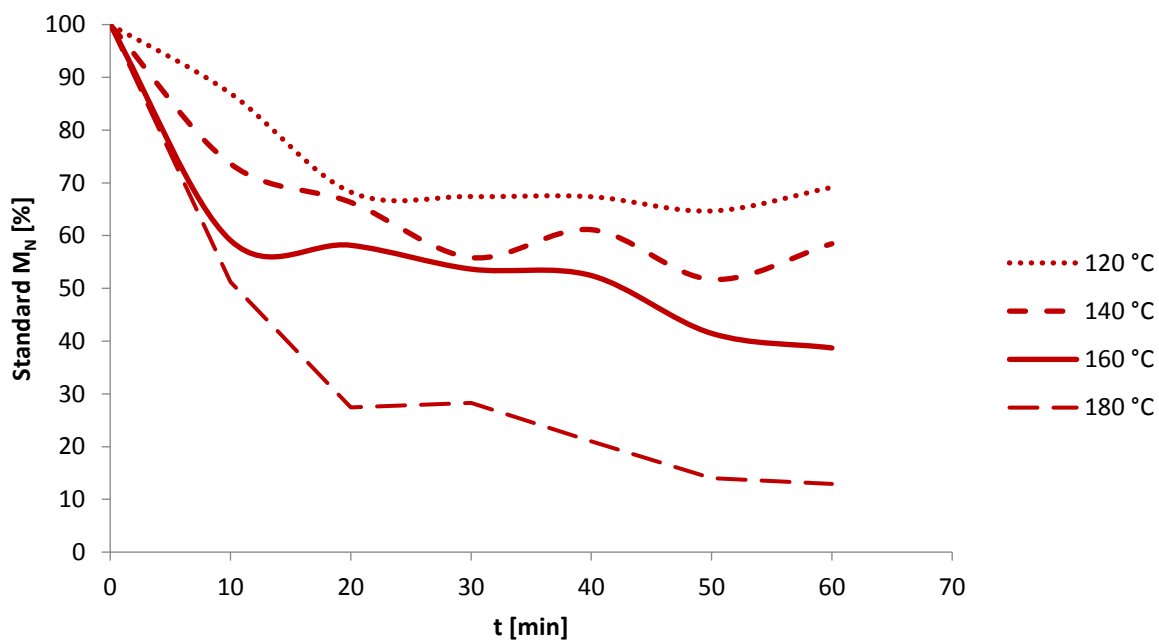
Graf 8 Závislost relativní změny M_n přečištěného P3HB v čase u ethyl 2-(acetyloxy)propionátu.



Graf 9 Závislost relativní změny M_n přečištěného P3HB v čase u diethyloxylátu.



Graf 10 Závislost relativní změny M_n nepřečištěného P3HB v ethyl 2-(acetyloxy)propionátu v čase.



Graf 11 Závislost relativní změny M_n přečištěného P3HB v čase u diethyloxylátu.