

# 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

# BIODEGRADACE BIOPLASTŮ V PROSTŘEDÍ KOMPOSTU

BIODEGRADATION OF BIOPLASTS IN COMPOST ENVIRONMENT

### DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Juraj Vodička

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2020

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1453/2019 Akademický rok: 2019/20  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student: **Bc. Juraj Vodička**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Biodegradace bioplastů v prostředí kompostu

### Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Studium bidegradačního potenciálu vybraných termofilních kultur
3. Studium biodegradace biopolymerů v prostředí kompostu

### Termín odevzdání diplomové práce: 29.5.2020:

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

-----  
Bc. Juraj Vodička  
student(ka)

-----  
doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **Abstrakt**

Předmětem této diplomové práce je studium biodegradace polyhydroxybutyrátu (PHB) a polyesteru kyseliny mléčné (PLA). Teoretická část práce pojednává o původu studovaných biopolyesterů, jejich vlastnostech a využití, a také enzymologii jejich biodegradace. Experimentální část práce je zaměřena na biodegradaci těchto polymerů v submerzním mediu využitím termofilních kmenů a na kompostování těchto bioplastů. Ze šesti použitých kmenů termofilních bakterií projevily významnou PHB-biodegradační aktivitu pouze jeden – kmen *Schlegelella thermodepolymerans*. Rezistenci vůči submerzní degradaci vykazovala amorfni i semi-krystalická forma PLA. V prostředí kompostu docházelo především k rozpadu obou forem PLA, proto byl dedukován primárně abiotický mechanismus degradace. Během 4 týdnů kompostování došlo ke ztrátě hmotnosti amorfniho PLA o 99 % a semi-krystalického PLA o 63 hmot. %. Hmotnostní úbytek PHB po stejné době kompostování dosahoval 36 %, navíc bylo pozorováno snížení molekulové hmotnosti na zhruba polovinu hodnoty využitím SEC. Pro tento polymer byl potvrzen mechanismus biodegradace formou povrchové enzymatické eroze využitím SEM. Monitoring aktivity esteráz, lipáz a proteáz během celého experimentu neprokázal statisticky významné ovlivnění kompostu přítomností biopolymerů.

## **Abstract**

This master's thesis focuses on biodegradation of polyhydroxybutyrate (PHB) and polylactic acid (PLA). The theoretical part discusses an origin, properties and applications of investigated biopolyesters, and so the enzymology of their biodegradation. The experimental part deals with biodegradation of these polymers in liquid medium using several pure thermophilic bacterial strains and controlled composting of these bioplastics. Amongst six tested thermophilic bacterial strains only one showed PHB-biodegradation activity – strain *Schlegelella thermodepolymerans*. No degradation degree of amorphous or semi-crystalline PLA was observed. Mainly disintegration of both forms of PLA articles was observed in compost environment, thus the abiotic mechanism of its decomposition was indicated. After 4 weeks of composting, the relative weight loss of 99 % and 63 % was detected in amorphous and semi-crystalline PLA respectively. On the contrary, the weight loss of PHB after 4 weeks of composting reached 36 %, moreover, a half decrease of molar mass was observed using SEC. The surface erosive mechanism of PHB-biodegradation was stated using SEM. By monitoring of esterase, lipase and protease activities, no influence on the compost by polymer presence was concluded at statistical significance.

## **Klíčová slova**

Polyhydroxyalkanoáty, polyester kyseliny mléčné, biodegradace, kompost, *Schlegelella thermodepolymerans*

## **Key words**

Polyhydroxyalkanoates, polylactic acid, biodegradation, compost, *Schlegelella thermodepolymerans*

VODIČKA, Juraj. *Biodegradace bioplastů v prostředí kompostu*. Brno, 2020. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Stanislav Obruča.

### **Prohlášení**

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

.....  
podpis studenta

### **Poděkování**

Rád bych poděkoval především vedoucímu mojí diplomové práce doc. Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D. za inspiraci ke studiu, za dizajn a odborné vedení práce, a velkou trpělivost. Můj velký vděk patří také Ing. Ivaně Nováčkové, konzultantce této práce, za doprovod teoretickou i praktickou částí mojí práce a za pomoc s organizací a uskutečněním experimentů. Děkuji i své nejbližší rodině a přátelům za velkou podporu a motivaci během celého studia. V neposlední řadě patří můj vděk také akademikům a vyučujícím na FCH VUT za předané znalosti, které jsou k nezaplacení.

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část .....	8
	2.1 Přehled studovaných biopolymerů .....	8
	2.1.1 Polyhydroxyalkanoáty .....	8
	2.1.2 Polyester kyseliny mléčné (PLA) .....	14
	2.2 Degradace biopolyesterů .....	15
	2.2.1 Mikrobiální rozklad .....	15
	2.2.2 Enzymologie rozkladu polyhydroxyalkanoátů .....	15
	2.2.3 Enzymologie rozkladu polylaktátu .....	17
	2.2.4 Abiotický rozklad biopolyesterů.....	17
	2.2.5 Degradace v prostředí kompostu .....	18
	2.3 Průmyslová výroba vybraných biopolymerů .....	19
	2.3.1 Průmyslová výroba PHA .....	20
	2.3.2 Výroba kyseliny mléčné a PLA .....	21
	2.4 Aplikace vybraných biopolymerů .....	24
	2.5 Současný stav řešené problematiky.....	24
3	Experimentální část.....	27
	3.1 Materiály a metody.....	27
	3.1.1 Mikroorganismy .....	27
	3.1.2 Chemikálie .....	27
	3.1.3 Použité polymery .....	28
	3.1.4 Suroviny a chemikálie použité pro kompost.....	28
	3.1.5 Přístroje a vybavení.....	28
	3.2 Kultivace mikroorganismů.....	29
	3.2.1 Skladování bakteriálních kultur .....	29
	3.2.2 Příprava a kultivace inokul .....	29
	3.2.3 Kultivace bakterií polymerním substrátu.....	30
	3.3 Postup práce .....	31
	3.3.1 Analýza submerzního biodegradačního děje .....	31
	3.3.2 Biodegradace biopolymerů v kompostu .....	34
4	Výsledky měření a diskuze .....	39
	4.1 Analýza submerzního biodegradačního děje.....	39
	4.1.1 Turbidimetrické stanovení obsahu biomasy .....	39

4.1.2	Gravimetrické stanovení obsahu biomasy .....	42
4.1.3	Gravimetrické stanovení hmotnostního úbytku polymeru.....	43
4.1.4	Stanovení aktivity lipáz, esteráz a proteáz .....	45
4.1.5	Stanovení množství laktátu v mediích po kultivaci na PLA pomocí IC .....	49
4.1.6	Stanovení PHB-biodegradační aktivity vybraných kmenů.....	49
4.1.7	Snímání povrchu polymerů pomocí SEM.....	52
4.2	Biodegradace biopolymerů v kompostu.....	53
4.2.1	Popis parametrů kompostovacího experimentu .....	53
4.2.2	Hodnocení údržby a režimu kompostování .....	54
4.2.3	Vizuální hodnocení kompostu .....	56
4.2.4	Sledování hmotnostních úbytků polymerů během kompostování .....	59
4.2.5	Sledování změn molekulové hmotnosti PHB během kompostování.....	62
4.2.6	Stanovení aktivit vybraných skupin hydroláz.....	63
4.2.7	Hodnocení vzhledu bioplastů během biodegradace.....	67
5	Závěr .....	73
6	Seznam použitých zkratk .....	75
7	Seznam použité literatury .....	77

# 1 ÚVOD

Biologicky rozložitelné plasty poutají pořád větší a větší pozornost současné společnosti. Tento pojem je s oblibou používán v různých kontextech pro zveličení ekologických vlastností různých materiálů či předmětů, avšak téměř stejně často popsán značně nekomplexně. Osud odpadních biopolymerů není vždy tak jednoznačný a zaslouží si speciální pozornost. Studie degradačních procesů různých polymerů se ale nejčastěji zaměřují pouze na degradovaný materiál, nikoliv na prostředí, ve kterém děj probíhá. Vzniká tak perspektiva práce sledující rozkladné procesy z jiného úhlu pohledu, který v širším kontextu popisuje rozkladné procesy bioplastů ve více či méně přirozeném prostředí. Přístupy této práce propojují děje probíhající v prostředí kompostu s degradačním procesem vybraných bioplastů, a to způsobem, který považujeme za relevantní ke studované problematice.

Kompost představuje směs biologického odpadu, který podléhá rozkladným procesům vlivem zejména biologických činitelů. Svým komplexním obsahem živin poskytuje optimální prostředí pro růst pestrého mikrobiálního konsorcia. Tento mikrobiom se v čase dynamicky mění a v určitém čase se některým mikrobiálním druhům daří více než ostatním díky jejich lepším adaptačním schopnostem na dané podmínky. Kompost tedy představuje prakticky ideální prostředí pro studium biodegradace polymerů a v současné době se kompostování polymerních látek věnuje řada studií a norem. Pro hodnocení biodegradačního potenciálu čistých kultur je však nutné zajistit izolované prostředí, jakým je například kapalné živné médium. To však neumožňuje tak vysokou frekvenci podrobnějších analýz a pro hodnocení rozložitelnosti materiálů je vhodnějším přístupem právě kompostování.

Biodegradabilitou se rozumí schopnost materiálu podléhat dekompozici biologickými vlivy a produkty těchto procesů jsou nízkomolekulární látky zpravidla rozpustné ve vodě. V konečném důsledku jsou tyto látky pak prodýchány nebo také využity ke kompozici buněčné biomasy, celý proces by neměl trvat déle než rok. Zde se již dostáváme k novému pojmu, a sice kompostovatelnosti. Tato vlastnost dále zaručuje, že časový sled uvedených procesů biodegradace je výrazně dynamičtější a k úplnému prodýchání materiálu by mělo dojít v maximálně 90 dnech procesu kompostování. V neposlední řadě je důležité zmínit, že kompostování zaručuje cílené zpřístupnění živin a jejich přeměnu na intermediáty využitelné dalšími organizmy pro biosyntetické děje.

V současnosti je zkoumaná celá řada polymerů pro svou biologickou rozložitelnost. Tato práce se věnuje biodegradovatelnosti a kompostovatelnosti polyhydroxybutyrátu, zástupce skupiny biopolyesterů produkovaných bakteriemi. Naši pozornost upoutal taky polyester kyseliny mléčné, který je veřejností více známý než polyhydroxyalkanoáty a v současnosti hodně diskutován. Uvedené polymery jsou si chemicky značně podobné, avšak jejich vlastnosti vykazují odlišnosti. Tudíž předpokládáme, že rozdílná bude také jejich biodegradabilita, a to vnímáme za předmět hodný podrobnějšího prozkoumání.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

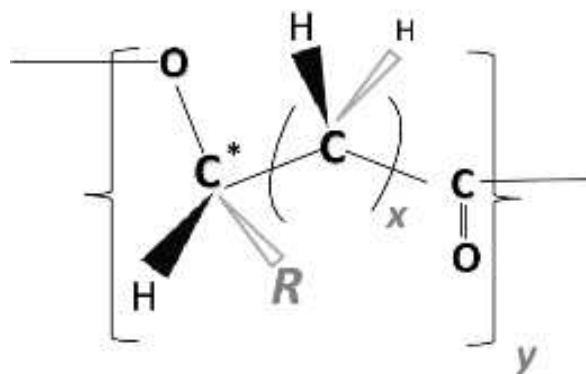
### 2.1 Přehled studovaných biopolymerů

Pojem biopolymery obecně zahrnuje celou řadu makromolekulárních látek produkovaných živými systémy za různými účely. Mezi tyto polymery řadíme od těch nejjednodušších struktur se zásobní nebo stavební funkcí (například glykogen nebo celulóza) až po sofistikované makromolekuly s vysokou biologickou aktivitou, jako jsou například enzymy nebo nukleové kyseliny. Z technologického hlediska jsou nejzajímavější biomakromolekuly mající v organizmech strukturní nebo zásobní funkci, jež jsou často využívány k výrobě různých komerčních materiálů. V současnosti je pro výrobu materiálů z biopolymerů velkou motivací ekologie zpracování odpadů z těchto materiálů, respektive možnost kompostování recyklovaných odpadů s potřebou minimální úpravy. V těchto ohledech se jako vhodné biopolymery jeví polyhydroxyalkanoáty (PHA), bakteriální polymery sloužící jejich producentům jakožto zásobní zdroj uhlíku k oxidaci pro získání energie v nepříznivých podmínkách. Jejich biologický rozklad je podmíněn výskytem vhodných extracelulárních hydrolytických enzymů produkovaných různými mikroorganismy v jejich prostředí. Mezi biologicky rozložitelné polyestery patří také kyselina polymlečná (PLA), tento polymer však není biologického původu. I přes vysoké výrobní náklady nachází polylaktát neustále více aplikací [1].

#### 2.1.1 Polyhydroxyalkanoáty

Již zmíněné polyhydroxyalkanoáty jsou polyestery hydroxylovaných kyselin produkované širokou paletou mikroorganismů. Jejich řetězec je buď homopolymerní nebo heteropolymerní, což závisí na zdroji uhlíku využívaném producentem a schopnosti producenta tento zdroj využívat. Poloha hydroxylové skupiny v monomerech je rovněž závislá na vstupním substrátu pro biosyntézu polymeru, nejčastěji je však umístěna na třetím uhlíku. Tento hydroxylovaný uhlík je chirální a je nosičem postranního řetězce polymeru. V závislosti na počtu uhlíků v monomeru jsou PHA biologického původu děleny na SCL PHA (krátký řetězec) s 3 až 5 uhlíky a MCL PHA (středně dlouhý řetězec) s obsahem 6 až 14 uhlíků [2]. Struktura polyhydroxyalkanoátů je znázorněna na Obrázku 1. V přírodě se nejčastěji vyskytují SCL PHA, konkrétně poly-3-hydroxybutyrát je nejrozšířenějším biopolyesterem. Kopolymer 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu je nejzastoupenějším heteropolymerelem. Molekulová hmotnost polyhydroxyalkanoátů se pohybuje v rozmezí 200 až 3 000 kDa s počtem monomerů 1 000 až 30 000 jednotek [3].





SCL PHA  $R = H / CH_2 / C_2H_5$

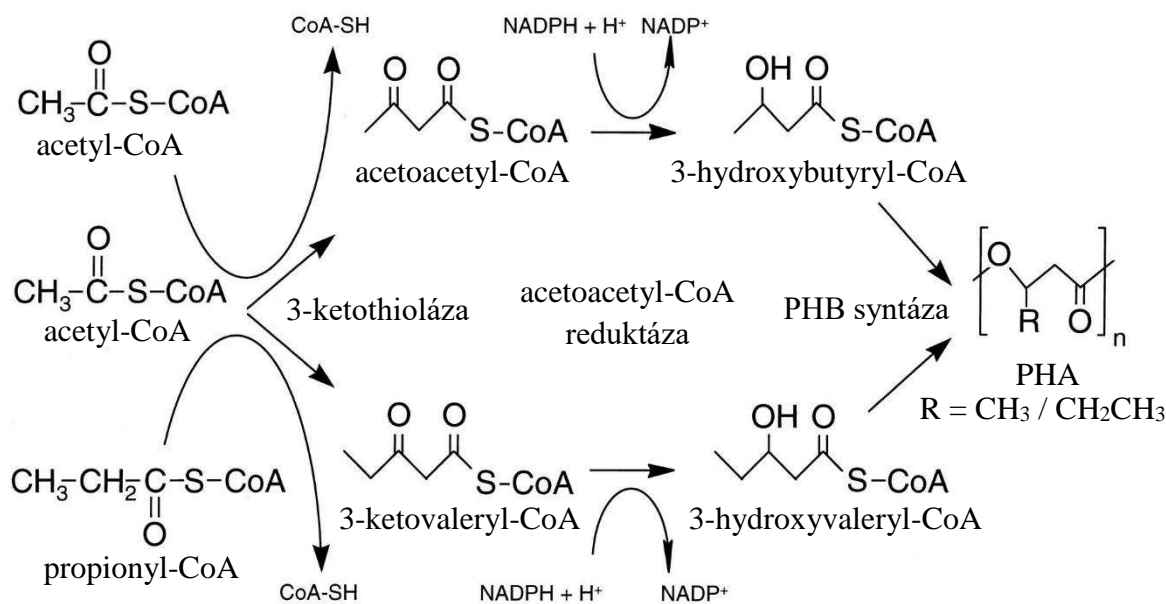
MCL PHA  $R = C_3H_7 - C_{11}H_{23}$

$x = 1 / 2 / 3$

Obrázek 1 – obecná struktura PHA biologického původu (převzato z [4])

### 2.1.1.1 Metabolismus polyhydroxyalkanoátů

K biologické tvorbě polyhydroxyalkanoátů jsou producenti nejčastěji stimulováni dostatečným množstvím uhlíkatého substrátu v prostředí a zároveň limitním množstvím některé z dalších živin, jako je například dusík nebo fosfor. Genetická predispozice producentů PHA spočívá v přítomnosti příslušného operonu, který obsahuje 3 geny – phaC pro PHA syntázu, phaA kódující 3-ketothiolázu a phaB pro NADPH dependentní acetoacetyl-CoA reduktázu [5]. Tyto enzymy jsou využívány k biosyntéze PHA tzv. tříkrokovou cestou, která byla popsána u celé řady mikroorganismů. Vstupním metabolitem pro tuto dráhu jsou dvě jednotky acetyl-CoA, které v prvním kroku kondenzují (katalyzuje 3-ketothioláza), intermediát je dále redukován na  $\beta$ -uhlíku acetoacetyl-CoA reduktázou a vzniklá jednotka 3-hydroxybutyrátu je připojena k rostoucímu řetězci polymeru pomocí PHA syntázy [6–10]. Tímto způsobem je syntetizován polyhydroxybutyrát (viz Obrázek 2). Syntéza heteropolymerů nebo jiných homopolyhydroxyalkanoátů závisí také na přítomnosti vhodného substrátu v prostředí. Kopolymer poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) je produkován některými bakteriemi v přítomnosti propionátu jakožto prekurzoru pro propionyl-CoA kondenzující s acetyl-CoA (viz Obrázek 2). Tuto kondenzaci katalyzuje  $\beta$ -ketothioláza kódovaná genem bktB, který je často vzdálen od phaCAB operonu [11]. Na metabolismu polyhydroxyalkanoátů se podílejí také další enzymy metabolismu mastných kyselin, jako například enoyl-CoA hydratáza nebo 3-hydroxyacyl-ACP-CoA transferáza kódované geny phaJ respektive phaG [5].



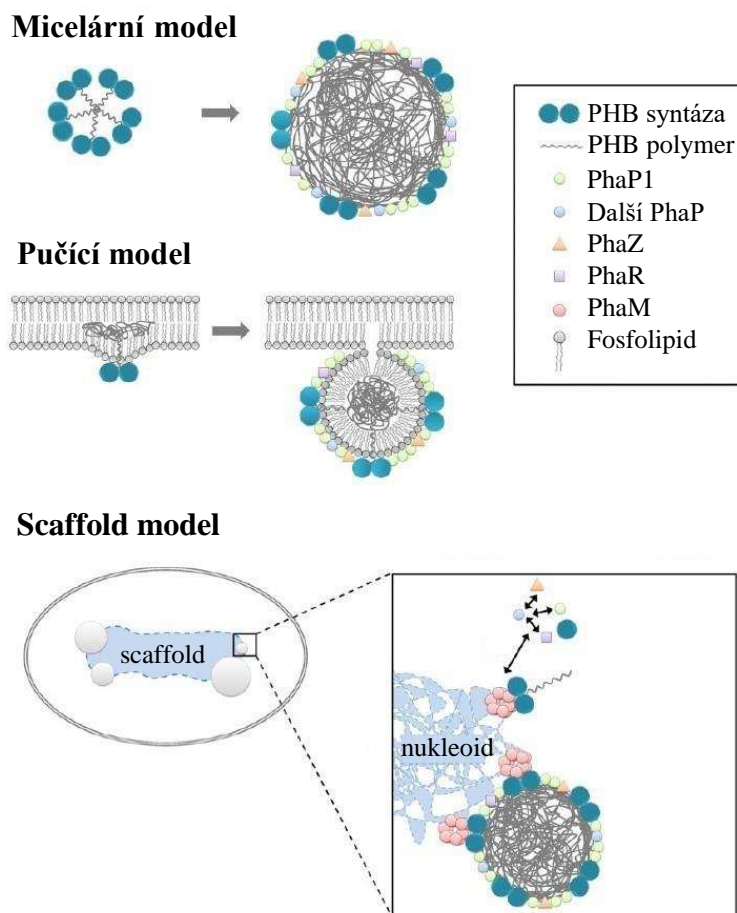
Obrázek 2 – schéma biosyntézy 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu pro syntézu PHA [11]

### 2.1.1.2 Intracelulární forma polyhydroxyalkanoátů

Vysoká hydrofobicita polyhydroxyalkanoátů komplikuje jejich nitrobuněčnou kumulaci. Buňky jsou nuceny vytvářet efektivní skladovací granule – karbozomy, již při samotné polymeraci, protože substrát pro reakci je na rozdíl od produktu rozpustný ve vodě. Syntázy pracují na fázovém rozhraní a účastní se stabilizace polymeru v karbozomu. Celá granule je obalena množstvím stabilizačních proteinů PhaP, tzv. phasinů. Tyto proteiny slouží jako prevence před krystalizací PHA (což by značně snižovalo rychlost degradace při mobilizaci zásob), ovlivňují strukturu granule a zamezují agregaci granul, dále se také podílejí na regulaci syntézy a degradace polymeru [12–14]. Povrch granulí obsahuje i proteiny PhaR, které regulují množství phasinů v granulích na transkripční úrovni. Doposud byla identifikována celá řada phasinů s řadou rozmanitých funkcí [13].

Formování karbozomů v buňkách bylo dosud popsáno třemi odlišnými teoriemi. První z nich pojednává o tvorbě micel na libovolných místech v cytosolu. Tato teorie se označuje jako micelární model. Principem tvorby micely je počáteční agregace dimerů syntáz propojených řetězci PHB a následná tvorba polymeru do narůstajícího jádra micely [14, 15]. Pro tento průběh je požadována vysoká dostupnost 3-hydroxybutyryl-CoA v okolí granule [16]. Zvětšující se povrch granule postupně saturují phasiny, rychlost saturace je ovlivněna syntézou phasinů [14]. Druhý model, tzv. pučící model, navrhuje tvorbu PHA v cytoplasmatické membráně mezi dvěma fosfolipidovými vrstvami. Syntázy jsou přitom soustředěny na povrchu membrány a PHA řetězec roste do membrány. Růstem množství polymeru granule takřka pučí z membrány obalena fosfolipidovou monovrstvou a na její povrch přisedají další výše zmíněné komponenty. Po dosažení určité velikosti se granule oddělí od membrány [14]. Vzhledem k represí genů pro syntézu lipidů při expresi genů pro syntézu PHA je však tento model vysoce nepravděpodobný pro tvorbu zásobních karbozomů v cytosolu [17]. Navíc by bylo možné pozorovat signifikantní množství

fosfolipidů na povrchu granule. Třetí model navrhuje syntézu PHA na biologickém lešení (z angličtiny „Scaffold model“). Na tomto lešení jsou vázány PHA syntázy a polymer je syntetizován směrem od lešení, takže granule roste v cytoplazmatické membráně imobilizovaná na této matici. Tento jev zkoumali J. Tian a spol. v buňkách *C. necator* H16 pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) a zjistili, že v počáteční (iniciační) fázi růstu se granule nachází v blízkosti středu buňky a v její blízkosti se vždy vyskytuje tmavé mediační tělísko, které bylo považováno za zmíněné lešení [18]. Některé další studie dokázaly, že mediační tělíska nejsou přítomna při formaci granule pravidelně (například studie procesu pomocí vysokorozlišovací kryotomografie, viz [19]). I přesto není scaffoldový mechanismus tvorby karbozomů vyloučen a v současnosti je považován za nejpravděpodobnější. Všechny tři uvedené modely jsou ilustrovány na Obrázku 3.



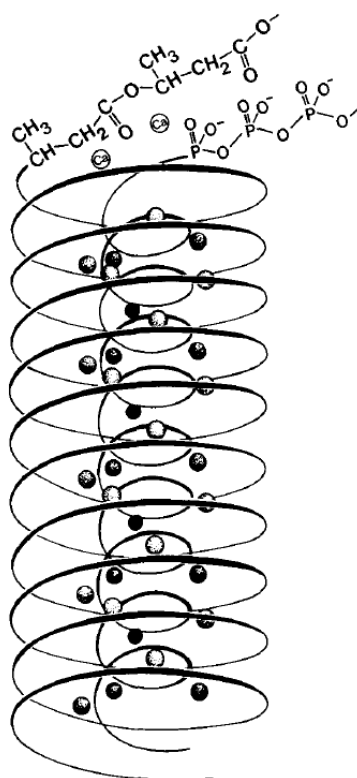
Obrázek 3 – popisované modely tvorby karbozomu v bakteriálních buňkách (převzato z [13])

### 2.1.1.3 Biologický význam polyhydroxyalkanoátů

Primární význam produkce polyhydroxyalkanoátů je tvorba zásobního endogenního uhlíkového zdroje v bakteriálních buňkách. V případě nedostatku uhlíku v exogenním prostředí jsou hydroxykyseliny vzniklé depolymerací PHA snadno a rychle oxidovány za zisku energie pro jejich producenta. Mikrobiální polyhydroxyalkanoáty však poskytují svým producentům řadu dalších výhod. Již starší studie ukázaly potenciální spojitost degradace zásobního PHA pro dotaci sporulace v bakteriálních buňkách [20–22].

Známé je i zapojení polyhydroxyalkanoátů v dalších stresových odpovědích. PHA můžou zvyšovat odolnost vůči teplotám, a to jak vysokým, tak nízkým, dokonce i vůči mrazu [23–25]. Význam polyhydroxyalkanoátů byl prokázán také při odpovědi na oxidační stres, byla pozorována zvýšená produkce po přidavku peroxidu vodíku a ethanolu [26, 27]. Samotný proces degradace intracelulárních PHA je spřažen se zvýšením hladiny ATP a guanosin tetrafosfátu (ppGpp) v buňkách, což indukuje expresi genů spojených se stresovou odpovědí na různé formy stresu [28]. V neposlední řadě byly také monomery 3HB pozorovány při stresové odpovědi na osmotický stres. Tyto monomery rozpustné ve vodním prostředí byly detekovány při zvýšených koncentracích solí v růstových mediích *Pseudomonas* sp. CT13. Čím vyšší byla intenzita osmotického stresu, tím větší bylo pozorované množství intracelulárního 3HB [29].

Polyhydroxyalkanoáty byly doposud pozorovány v celé řadě prokaryotních buněk. Později byl však výskyt prokázán také v mitochondriálních membránách nižších a vyšších rostlin, dokonce i v buňkách živočichů. Kratší oligomerní řetězce se v přírodě vyskytují téměř ubikvitně v podobě komplexů s polyfosfáty a vápenatými ionty. Komplex je tvořen šroubovicí PHB obalujícím polyfosfátovou šroubovicí,  $\text{Ca}^{2+}$  jsou chelatovány mezi těmito šroubovicemi, jak je ilustrováno na Obrázku 4. Funkce těchto komplexů nejsou zcela známé, avšak vzhledem k umístění skrz membránu můžou sloužit jako kanály selektivní pro  $\text{Ca}^{2+}$  a umožňovat tak regulaci množství těchto iontů v intracelulárním prostředí nebo sloužit k vápníkové signalizaci [30].



Obrázek 4 – tvar komplexu PHB s polyfosfátovým řetězcem a  $\text{Ca}^{2+}$  ionty (převzato z [30])

#### 2.1.1.4 Vlastnosti polyhydroxyalkanoátů

Polyhydroxyalkanoáty obecně vynikají vysokou mírou biodegradability, velkou biokompatibilitou a nízkou cytotoxicitou, což jsou vlastnosti směřující PHA k výrobě různých nanokompozitů [31]. Tyto vlastnosti jsou zajištěny prakticky čistým zastoupením monomerů v R-konfiguraci, což je zdůvodněno vysokou stereospecifitou celého enzymatického aparátu pro metabolismus polyhydroxyalkanoátů. To má významný vliv také na jejich fyzikální vlastnosti, protože PHA s kratšími postranními řetězci následně vykazují vysoký stupeň krystalinity často dosahující až 80 % [32].

Fyzikální vlastnosti PHA jsou značně rozmanité a odvíjí se od typu monomerů v řetězci, což popisuje Tabulka 1. Vlastnosti SCL PHA jsou výrazně odlišné od vlastností MCL PHA. Pro SCL PHA obecně platí, že díky vysokým stupňům krystalinity dosahují vysoké pevnosti v tahu a tuhosti, ale také křehkosti [32, 33]. MCL PHA naopak představují flexibilní elastomery s výrazně nižší krystalinitou a hustotou, jejichž předností oproti PHA s krátkými řetězci je velké relativní prodloužení [34]. Vzhledem k jejich nižším teplotám tání se jejich zpracování jeví mnohem jednodušší než zpracování SCL PHA [32]. Pro zlepšení mechanických vlastností homopolymerů PHA je snaha vytvářet heteropolymery s optimálním poměrem jednotlivých monomerů. Nejčastěji zkoumaným heteropolymerem PHA je kopolymer 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu – P(3HB-co-3HV). Zvýšení obsahu 3-hydroxyvalerátu způsobí snížení obsahu krystalických regionů způsobených hydroxybutyrátem, v důsledku čehož klesne teplota tání a zvýší se rázová houževnatost polymeru [32]. Výrazně se také zvýší relativní prodloužení polymeru [35]. P(3HB-co-3HV) je aktuálně významný komerčně vyráběný kopolymer PHA [32].

Tabulka 1 – typické vlastnosti PHA ve srovnání s vlastnostmi polypropylenu (převzato z [36, 37])

Vlastnost	SCL PHA	MCL PHA	PP
Krystalinita [%]	40–80	20–40	60–75
Bod tání [°C]	80–180	30–80	170–176
Bod skelného přechodu [°C]	-148–4	-40–150	-10
Hustota [g·cm <sup>-3</sup> ]	~1,25	~1,05	0,91
Pevnost v tahu [MPa]	~40	~20	~34
Relativní prodloužení [%]	6–10	300–450	~400
Rezistence vůči UV záření	Dobrá	Dobrá	Slabá
Rezistence vůči rozpouštědlům	Slabá	Slabá	Dobrá
Biodegradabilita	Dobrá	Dobrá	Žádná

## 2.1.2 Polyester kyseliny mléčné (PLA)

Dalším zajímavým biologicky rozložitelným polymerem je polyester kyseliny mléčné neboli polylaktát. Stejně jako v případě polyhydroxyalkanoátů se jedná o polyester hydroxykyseliny, avšak hydroxylová skupina se na monomeru vyskytuje na  $\alpha$ -uhlíku. Postranní řetězce skeletu jsou tvořeny methylovými skupinami. Konfigurace asymetrického uhlíku je závislá na způsobu produkce kyseliny mléčné. Samotný polymer totiž není zcela přírodním produktem, polymeraci je nutné provést chemicky, a k tomu účelu je možné použít oba enantiomery laktátu [38]. Díky biokompatibilitě, vysokým bioabsorbčním schopnostem a bezpečnosti (GRAS status) je PLA aplikovatelné v technologiích balení potravin i tkáňovém inženýrství [38, 39].

Dobrá biologická rozložitelnost není jedinou motivací pro výrobu a aplikace tohoto polymeru. Další výhodou PLA je jeho relativně vysoká pevnost v tahu a pružnost (Youngův modul) ve srovnání s dalšími termopolyestery [40]. Polylaktát s vysokou molekulovou hmotností je bezbarvý, průhledný, tuhý termoplast s vlastnostmi obdobnými polystyrenu [38]. Další vlastnosti PLA jsou závislé na strukturním uspořádání polymeru, především na stupni krystalinity, který se odvíjí od zastoupení L- a D-laktátu v polymeru. Vybrané vlastnosti polylaktátů jsou uvedeny v Tabulce 2. Amorfni polylaktát je rozpustný v běžných organických rozpouštědlech, především v tetrahydrofuranu, benzenu, dioxanu, méně také v acetonitrilu a některých chlorovaných rozpouštědlech. Se stoupající krystalinitou rozpustnost PLA značně klesá a více krystalický polylaktát je možné rozpustit pouze za vyšších teplot v chlorovaných rozpouštědlech nebo v benzenu [38].

Tabulka 2 – typické vlastnosti PLA ve srovnání s polypropylenem (převzato z [38, 41, 42, 43])

Vlastnost	L-PLA	D,L-PLA	PP
Krystalinita [%]	0–40	~0	60–75
Bod tání [°C]	170–200	Netaje (amorfní)	170–176
Bod skelného přechodu [°C]	55–65	50–60	-10
Hustota [g·cm <sup>-3</sup> ]	1,24–1,30	1,25–1,27	0,91
Pevnost v tahu [MPa]	15–150	27–50	~34
Modul pružnosti v tahu [GPa]	2,7–4,1	1–3,5	~1,7
Relativní prodloužení [%]	4–7	5–6	~400
Rezistence vůči UV záření	Slabá	-	Slabá
Biodegradabilita	Dobrá	Výborná	Žádná

## 2.2 Degradace biopolyesterů

### 2.2.1 Mikrobiální rozklad

Na rozdíl od intracelulárních polyhydroxyalkanoátů, které jsou využívány všemi producenty, extracelulární polyestery mohou pro svůj růst využívat pouze některé mikroorganismy. Základní podmínkou utilizace je samozřejmě genetické (enzymové) vybavení mikroorganismu. Degradace PHA za aerobních podmínek vede přes Krebsův cyklus k tvorbě CO<sub>2</sub>, vody a mikrobiální biomasy. Za anaerobních podmínek je finálním produktem degradace uhlíkové kostry methan, voda a biomasa. V obou případech celý proces začíná rozpoznáním potenciálního energetického a uhlíkového zdroje (PHA) v prostředí uvažovaným mikroorganizmem. Tento následně produkuje extracelulární depolymerázy, které štěpí hydrofobní polymerní strukturu na vodě rozpustné oligomerní jednotky. Menší jednotky jsou buňkami absorbovatelné přes buněčnou stěnu a membránu. V nitrobuněčném prostoru vstupují do procesu intracelulární štěpící enzymy, a ty štěpí oligomery na samostatné monomery – hydroxykyseliny. Po jejich oxidaci pomocí dehydrogenáz na acetoacetyl-CoA a jeho následným štěpením β-ketothiolázou vzniká acetyl-CoA. Biodegradace tedy probíhá bez tvorby toxických meziproductů a všechny její produkty jsou běžné metabolity [44].

### 2.2.2 Enzymologie rozkladu polyhydroxyalkanoátů

Pro schopnost využít zásobní uhlík ve formě polyhydroxyalkanoátů jsou mikroorganismy produkující tento polymer vybaveny speciálními depolymerázami, které se obecně řadí do skupiny esteráz. Dosud byla izolována a charakterizována celá řada jak intracelulárních, tak i extracelulárních PHA depolymeráz z různých mikrobiálních druhů a kmenů [45]. Všechny zkoumané depolymerázy disponují obdobnými vlastnostmi: vysoká stabilita v širokém rozsahu pH, iontových sil a teplot; relativně malá molekulová hmotnost (do 70 kDa) s častým obsahem stejného polypeptidu; pH optimum v alkalické oblasti (7,5 až 9,8), velká část dPHA<sub>SCL</sub> depolymeráz inhibována redukčními činidly a inhibitory serinové hydrolázy; většina z nich se neváže na aniontové iontoměniče a vykazuje vysokou afinitu k hydrofobním materiálům [44]. Značná část izolovaných depolymeráz je závislá na přítomnosti Ca<sup>2+</sup>. Častou modifikací jednotlivých izoform je glykosylace [45]. Přehled některých charakterizovaných depolymeráz, jejich producentů a vlastností je uveden v Tabulce 3. Vzhledem k zaměření této práce na prostředí kompostu jsou v tomto přehledu uvedeny pouze depolymerázy s teplotním optimem nad 40 °C.

Esterovou vazbu mezi monomery ale dokážou štěpit také některé lipázy [46]. Substráty pro lipázy (acylglyceroly) jsou silně hydrofobní, a proto tyto enzymy pracují na fázovém rozhraní stejně jako PHA depolymerázy, tudíž mohou rozkládat i PHA. Tento fakt rozšiřuje spektrum organismů schopných degradace polyhydroxyalkanoátů, v důsledku čeho se zvyšuje aplikační potenciál těchto polymerů [47].

Tabulka 3 – přehled vybraných depolymeráz, jejich producentů a biochemických charakteristik (převzato z [45]); \*kmeny použité v této práci

Kmen	Purifikovaná depolymeráza	M [kDa]	T <sub>opt</sub> [°C]	pH <sub>opt</sub>	Poznámka	Reference
<i>Aureobacterium saepe</i>	Poly(3HB) depol.	43	45	8,0	Izolováno z půdy	[48]
<i>Comamonas testosteroni</i> ATSU	Poly(3HB) depol.	49	70	8,5	Depolymeráza s vysokým T <sub>opt</sub> , ale při 70 °C rychle ztrácí stabilitu	[49]
	Poly(3HB) depol. A	59	65	-	Reklasifikován na <i>Pseudomonas</i>	
<i>Paucimonas lemoignei</i>	Poly(3HV) depol.	54	55	8,0	Poly(HA <sub>SCL</sub> ) depol. s vysokou poly(3HV) depol. aktivitou	[50]
	Pha Z1 Ple-rec <sup>a</sup>	44	61,5	-	Pro aktivaci nevyžadují glykosylaci	[51]
	Pha Z2 Ple-rec <sup>a</sup>	46,5	54,5	-		
	Pha Z4 Ple-rec <sup>a</sup>	65,5	50	-		
	Pha Z5 Ple-rec <sup>a</sup>	49	51	-		
<i>Pseudomonas pickettii</i>	Poly(3HB) depol.	40	40	5,5	Depolymeráza s kyselým pH optimem	[52]
<i>Pseudomonas stutzeri</i> YM1414	Poly(3HB) depol.	48	55	9,5	Kmen izolován z jezerní vody	[53]
<i>Streptomyces exfoliatus</i> K10	Poly(3HB) depol.	49	40	8,5–9,0	K10 hydrolyzuje poly(3HB) a poly(3HO)	[54]
<i>Paecilomyces lilacinus</i> (plíseň)	Poly(3HB) depol.	48	45	7,0	Depolymeráza plísnového původu	[55]
<i>Aspergillus fumigatus</i> (plíseň)	Pdf1 PHB depol.	40	45–60	8,5	Tendence enzymu agregovat, purifikován PHB afinitní chromatografií	[56]
<i>Pseudomonas fluorescens</i> GK13	Poly(3HO) depol.	25	45	8,5	Hydrolyzuje poly(3HO), ale ne poly(3HB)	[57]
<i>Xanthomonas</i> sp. JS02	Poly(HA <sub>MCL</sub> ) depol.	41,7	60	8,0–9,0	Hydrolyzuje poly(HA <sub>MCL</sub> ) s aromatickým postranním řetězcem	[58]
<i>Schlegella thermodepolymerans</i> *	Poly(3HB) depol.	40	75–80	8,2	Štěpí těžce rozložitelný kopolymer P(3HB-co-3MP)	[59]
<i>Caldimonas manganoxidans</i> *	Poly(3HB) depol.	46	70	8,0	Zrychlení produkce enzymu produktem enzymatické reakce (3HB v prostředí)	[60]



### **2.2.2.1 Substrátová specifita PHA depolymeráz**

Míra substrátové specifity se může značně lišit u intracelulárních a extracelulárních PHA depolymeráz. Zatímco intracelulární depolymerázy obecně vykazují vysokou specifitu k amorfním formám polymeru a jsou téměř neschopné štěpit krystalické polyhydroxyalkanoáty, některé extracelulární depolymerázy rozkládají relativně rychle i částečně krystalické PHA. Dokonce některé z nich vykazují také aktivitu vůči více krystalickým polyhydroxyalkanoátům. O vysoké substrátové specifitě vypovídá neschopnost většiny extracelulárních PHA depolymeráz rozkládat běžné přírodní estery, triacylglyceroly, jako například triolein [47].

### **2.2.2.2 Regulace produkce PHA depolymeráz**

Syntéza PHA depolymeráz je řízena klasickým principem katabolické represe. Exprese genů pro tyto specifické esterázy je v první řadě podmíněna přítomností polymeru v prostředí a jeho rozeznáním využívajícím organizmem. Je-li v prostředí dostupný také rozpustný a snadněji využitelný substrát (například glukóza nebo organická kyselina), syntéza depolymeráz je potlačena. Sekrece těchto enzymů do prostředí je tedy regulována jak derepresí vyvolanou absencí využitelného substrátu, tak katabolickou represí za přítomnosti snadněji využitelného substrátu [61].

## **2.2.3 Enzymologie rozkladu polylaktátu**

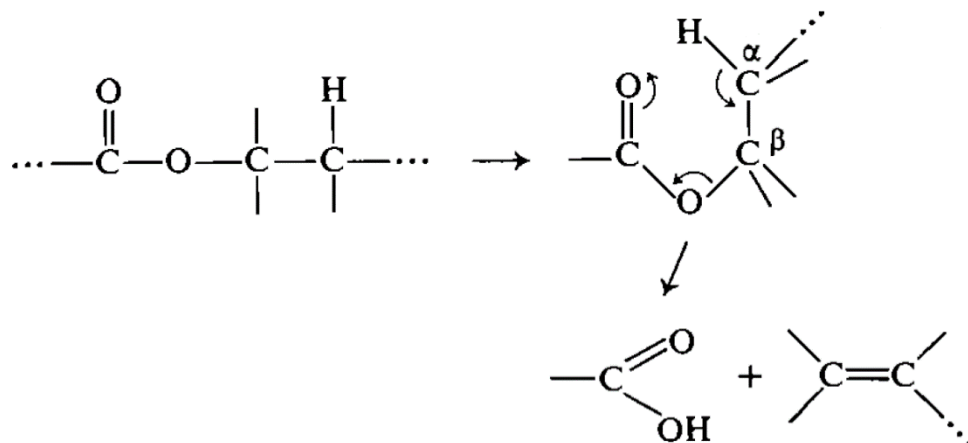
Jelikož v přírodě neexistuje enzymatický aparát pro polymeraci kyseliny mléčné, není výskyt PLA v přírodě přirozený, a neexistují tak ani specifické depolymerizační enzymy. L-laktát je strukturním analogem L-alaninu, proto může být PLA buňkou rozpoznán jako polypeptid tvořený touto aminokyselinou. Existují tedy proteázy, které jsou schopné depolymerace PLA [62]. Proteináza K byla předmětem mnoha studií degradace PLA v různých formách [63–65]. Při zkoumání degradace PLA pomocí proteinázy K bylo zjištěno, že polylaktát je rozkládán daleko rychleji v amorfních regionech a obecně platí, že rychlost enzymatické degradace PLA klesá se stoupajícím stupněm krystalinity [64, 66].

## **2.2.4 Abiotický rozklad biopolyesterů**

### **2.2.4.1 Pyrolýza polyesterů**

Polyestery můžou být rozloženy také řadou abiotických mechanismů v různých nestandardních podmínkách (například při vysokých teplotách). Míra odolnosti biopolyesterů v těchto podmínkách může poskytovat jak výhody, tak i nevýhody při výrobě, využití nebo likvidaci výrobků z nich. Obecně známý problém se zpracováním polyhydroxyalkanoátů je tepelná odolnost – bod tepelné dekompozice polyhydroxybutyrátu (asi 200 °C) je blízký jeho bodu tání (přibližně 175 °C) [67]. Rozkladem polyhydroxyalkanoátů vznikají kratší úseky (oligomery, monomery) s dvojnou vazbou mezi  $\alpha$ -uhlíkem a  $\beta$ -uhlíkem, tedy v místě původně

hydroxylové skupiny na patě vzniklého řetězce (viz Obrázek 5). Tato pyrolýza probíhá cis-eliminačním mechanismem, který je znázorněn na Obrázku 5 [68]. Degradací řetězců až na monomery vznikají příslušné alkenové kyseliny [69]. Zpracování PLA naráží na obdobný problém. Dekompoziční teplota polylaktátu se pohybuje kolem 190 °C v závislosti na poměru L- a D-izomerů, bod tání zase kolem 180 °C [70].



Obrázek 5 – schéma pyrolýzy polyesterů [68]

#### 2.2.4.2 Chemická hydrolyza esterové vazby

Ve vodném prostředí podléhá esterová vazba spíše chemické hydrolyze, která může být katalyzovaná kyselé nebo bazicky. Kyselá hydrolyza polyesterů má autokatalytický charakter – vzrůstající koncentrace kyselin jakožto produktů hydrolyzy zvyšuje rychlost reakce. Kinetika kyselé hydrolyzy byla dobře popsána u PLA. Vzhledem k hydrofobicitě PLA musí reakce probíhat v přítomnosti organického rozpouštědla, které je dobře mísitelné s vodou a zároveň rozpouští polymer. Studium hydrolyzy PLA v acetonitrilu pomocí kyseliny chlorovodíkové bylo zjištěno, že rychlost reakce závisí na pH, dostupnosti vody a koncentraci rozpouštědla [71]. Rychlost reakce je ovlivněna také poměrem jednotlivých enantiomerů teplotou a v případě nerozpuštěných částic polymeru je dále závislá na velikosti a tvaru polymerního materiálu [38]. Studium kyselá a bazické hydrolyzy PHB bylo zjištěno několik jevů: bazická hydrolyza je mnohem účinnější než hydrolyza kyselá; amorfni PHB granule podléhají hydrolyze zhruba 30-krát rychleji než granule krystalické; hydrolyza PHB na 3HB monomery je energeticky výhodnější než dehydratace jednotek za vzniku kyseliny krotonové (vznik dvojné vazby) a rychlost reakce stoupá s teplotou [72]. Průběh dehydratace hydroxybutyrátu je možný až po hydrolytickém jeho odštěpení, tato  $\beta$ -eliminace však probíhá trochu odlišným mechanismem jako pyrolýza PHB [73].

#### 2.2.5 Degradace v prostředí kompostu

K určení biologické rozložitelnosti polymeru bývá často sledováno jeho chování v prostředí kompostu. Kompost je organický prostředek pro zlepšení stavu půd vzniklý biodegradací směsi biologického odpadu, jako jsou části rostlin a plody rostlin s dalšími organickými složkami a limitním obsahem minerálů [74]. Tato směs je zdrojem pestrého

mikrobiálního konsorcia, které využívá jednoduché i polymerní složky směsi, proto je tohle prostředí vhodné pro rozklad celé řady polymerů. Uhlík získaný tímto způsobem může být prodýchán mikroorganismy na oxid uhličitý a tento děj je označován jako biodegradace. Pojem kompostování je však mnohem širší a využívá biologického koloběhu uhlíku k tvorbě živin pro další aplikace. V prostředí kompostu dochází k rozkladu polymeru biologickými a nebiologickými činiteli současně. Proto je rychlost rozkladu polymeru při kompostování ovlivněna jak biologickými faktory (přítomností extracelulárních štěpících enzymů, hydrofobicitou biosféry, přítomností biosurfaktantů apod.), tak i abiotickými faktory (teplota, vlhkost, pH, UV záření) [75]. Mechanizmy rozkladu se mění s velice dynamickými změnami podmínek. V neposlední řadě je degradace polymerů ovlivněna také jejich vlastnostmi, jako například krystalinitou, morfologií, molekulovou hmotností, kompozicí nebo zesíťováním [75].

### 2.3 Průmyslová výroba vybraných biopolymerů

Přestože se tato práce věnuje biologické degradaci různých polymerů a materiálů, pro celkové zhodnocení jejich šetrnosti k životnímu prostředí a rozložitelnosti je nutno zohlednit také jejich výrobu. I při biotechnologické produkci biopolymerů jsou často prováděny kroky, které mohou představovat ekologické riziko nebo komplikují zpracování odpadů z těchto materiálů. Samotné polymery přitom neztrácí své biologicky významné vlastnosti, vznikají však materiály, vedlejší produkty nebo odpady, které již mohou vykazovat rizikové vlastnosti.

Finalizace materiálů z polymerů často zahrnuje přidavek různých aditiv za účelem zlepšení jejich vlastností, jako například zvýšení tvrdosti či houževnatosti, zvýšení odolnosti vůči teplu nebo chemikáliím, změna optických vlastností apod. Aditiva jsou zpravidla nízkomolekulární látky organického nebo anorganického charakteru, nejčastěji jsou to karboxylové kyseliny a jejich estery, kovy, uhličitany, oxidy, fosforečnany nebo soli organických kyselin [76]. Všechna tato aditiva se z polymerních materiálů uvolňují a migrují do prostředí, kde mohou významně ovlivňovat efektivitu biologických procesů. Tento faktor může tedy významně ovlivnit i kompostovatelnost biopolymerů.

Biotechnologický producent je vybírán na základě celé řady požadavků. Mezi obecné požadavky na producenta patří vysoká výtěžnost a schopnost stabilní produkce, vysoká schopnost produkce biomasy, bezpečnost aplikovaných organismů, nízké nároky na živiny, rychlá adaptace na nové prostředí a živiny, robustnost kmene vůči kontaminacím, nízká tvorba nežádoucích vedlejších produktů a vysoká odolnost vůči vysokým koncentracím produktu [3]. Vzhledem k růstové fázi, ve které je tvořen produkt, je žádoucí, aby ostatní fáze růstu producenta byly co nejkratší a produkční fáze naopak co nejdelší. Pro snížení náchylnosti systému k nežádoucím kontaminacím se jako producent často volí extremofilní organismus, jako například termofilní nebo halofilní bakterie. V neposlední řadě je také důležitá možnost maximálně efektivní regulace metabolismu producenta tak, aby produkt nebyl dále metabolizován. Tyto obecné rysy biotechnologických produkcí platí také pro výrobu biopolymerů, produkce konkrétních produktů však mají svoje další specifika, a to jak v up-stream procesu, fermentaci nebo down-stream procesu [3].

### 2.3.1 Průmyslová výroba PHA

V současnosti jsou známy desítky až stovky bakteriálních producentů PHA, ne všechny však vyhovují technologickým požadavkům pro velkoobjemovou produkci. Vedle obecných požadavků kladených na producenty pro jejich biotechnologické aplikace jsou na producenty PHA kladeny také speciální nároky, jako například snadná extrahovatelnost polymeru, akumulace PHA o vhodné molekulové hmotnosti nebo schopnost produkce kopolymerů [77]. Široce používaný PHA produkující kmen je *Cupriavidus necator* (dříve *Ralstonia eutropha*), další využívání mikrobiální producenti jsou uvedeny v Tabulce 4.

Současná světová výroba PHA v komerčním měřítku je zajištěna čtrnácti společnostmi na šestnácti místech světa. Produkční kapacity dosahují až 200 tisíc tun PHA ročně [78]. Mezi největší producenty patří společnosti ADM (Metabolix) (USA) produkující až 50 tisíc tun různých PHA ročně, Meredian (USA) a Bio-On (Itálie) produkující obě po 10 tisíc tun PHA za rok, a společnost Tianjin Green Bio-Science (Čína) vyrábějící kopolymer P(3HB-co-4HB) v množství asi 10 tisíc tun ročně [78]. Další společnosti vyrábějící PHA v průmyslném a pilotním měřítku jsou uvedeny v Tabulce 4. Vyráběny jsou různé druhy PHA, převážně však PHB a jeho kopolymery [78].

Tabulka 4 – produkce PHA v roce 2009 (převzato z [78]); \*geneticky modifikovaný kmen

Kmen	Substrát	Typ PHA [t/rok]	X [g/l]	PHA [%]	Společnost
<i>Cupriavidus necator</i>	Glukóza	PHB (10)	>200	>80	Tianjin Northern Food, Čína
	Glukóza + kys. propionová	P(3HB-co-3HV) (300–2k)	>160	>75	ICI, Velká Británie
<i>Cupriavidus necator</i> *	Mastné kyseliny	P(3HB-co-3HHx) (1)	>100	>80	Kaneka a P&G, Japonsko
<i>Cupriavidus necator</i> , <i>Escherichia coli</i> *	Glukóza + 1,4-butadiol	P(3HB-co-4HB) (>10k)	>100	>75	Tianjin Green Bioscience, Čína
<i>Alcaligenes latus</i>	Glukóza / sacharóza	PHB (10–300)	>60	>75	Biomers, Německo
<i>Escherichia coli</i> *	Glukóza	PHB (10)	>150	>80	Jiang Su Nan Tian, Čína
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Kyselina laurová	P(3HB-co-3HHx) (1)	<50	<50	Jiangmen Biotech Ctr, Čína
<i>Bacillus</i> spp.	Sacharóza	PHB (5)	>90	>50	Biocycles, Brazílie

Dalšími potenciálními producenty biopolyesterů jsou rostliny. První pokusy o vytvoření eukaryotních producentů byly uskutečněny na kvasinkách *Sacharomyces cerevisiae* a *Pichia pastoris*, výtěžnost PHA byla však příliš nízká [79]. Vzhledem k velice nízkým nárokům rostlin na zdroj uhlíku a prakticky neomezené schopnosti množení a tvorby biomasy se rostliny jeví jako vhodná alternativa k bakteriálním producentům. V 90. letech minulého století přišla společnost Monsanto (USA) s pilotními pokusy o produkci PHB a P(3-HB-co-3HV) pomocí geneticky upravených rostlin rodu *Arabidopsis* (huseníček) a *Brassica* (řepka), přičemž byly dosaženy výtěžky 12–13 %, respektive 7 % [80]. Dnes již existuje řada studií sledujících výhody i nevýhody zapojení rostlin do velkoobjemové biotechnologické produkce PHA [81].

Náročnou operací při biotechnologické produkci PHA je jejich purifikace z intracelulárního prostoru, k čemu jsou při komerční produkci nejčastěji používána organická rozpouštědla. V současné době je nejpoužívanější chloroform, v kterém jsou PHA relativně dobře rozpustné. Tato purifikace dále vyžaduje odstranění dalších buněčných komponent hydroxidem sodným. Purifikace PHA je tedy značně neekologická [82].

### **2.3.2 Výroba kyseliny mléčné a PLA**

Jak již bylo zmíněno, produkce polymeru kyseliny mléčné má ve srovnání s produkcí PHB jednu velkou nevýhodu – nelze ji vést pouze fermentačně. Enzymatický aparát mikroorganismů lze využít pouze pro výrobu monomeru, tedy kyseliny mléčné, polymeraci je však nutné vykonat chemicky. Samotnou kyselinu mléčnou je přitom možné vyrobit i chemickou cestou, a to hned několika způsoby, přičemž nejznámějším z nich je kyselá hydrolyza laktonirilu připraveného reakcí acetaldehydu s kyanovodíkem [83]. Avšak tento proces vede k výrobě racemické směsi obou optických izomerů laktátu, která se pro výrobu PLA nevyužívá. V současné době je většina světové produkce kyseliny mléčné vedena fermentačně nejen kvůli možnosti zisku opticky čistých forem, ale také kvůli využitelnosti potravinářských a zemědělských odpadů. Využitelné jsou odpady bohaté na sacharidy, jako například melasa, syrovátka, škrobové odpady nebo lignocelulózoové materiály. Biotechnologická produkce laktátu má také svoje nevýhody, z nichž největší spočívá v down-stream procesu, přesněji v purifikaci produktu. Tato operace markantně zvyšuje výrobní náklady samotné kyseliny mléčné a tedy i PLA [1].

#### **2.3.2.1 Bakteriální produkce LA**

Bakterie mléčného kvašení jsou obecně nejpoužívanějšími mikroorganismy pro výrobu kyseliny mléčné. Jejich kultivace je relativně jednoduchá a produkce kyseliny je poměrně rychlá. Produkce laktátu pomocí bakterií s sebou nese i řadu komplikací, které začínají již volbou substrátu a vhodného producenta. Principiálně je možné použít široké spektrum bakterií k produkci laktátu. Producent je vybírán nejen s ohledem na vysokou výtěžnost a efektivitu produkce, ale také na základě schopnosti kmenů zkvašovat cukry homofermentativně. Navíc bakterie disponují dvěma typy laktátdehydrogenázy (L-LDH i D-LDH) takže optický charakter produktu je nespecifický. Další komplikace spočívá v neschopnosti většiny bakterií produkovat amylázy a celulózy, proto je použití

polysacharidových substrátů komplikované a vyžaduje hydrolýzu polysacharidů na jednoduché sacharidy (mono- a disacharidy). Výroba kyseliny mléčné pro další technické účely by přitom neměla konkurovat potravinářské výrobě, a proto se v současné době hledají nové substráty [84, 85]. Vhodnými jsou zdroje bohaté na hexózy. Ty vstupují do glykolýzy a jsou oxidovány za vzniku dvou molů pyruvátu a dvou molů ATP z jednoho molu monosacharidu. Tímto způsobem získává producent energií velice rychle, a to je motivací tuto dráhu zachovat a opakovat i za nedostatku kyslíku, kdy je potřeba hledat alternativní reoxidační činidlo pro kofaktory dehydrogenáz (NADH) samotné glykolýzy. A právě pyruvát se stává akceptorem vodíku a elektronů od redukované formy NADH, a je tak redukován na  $\alpha$  uhlíku za vzniku laktátu. Teoretická výtěžnost je tedy 2 moly laktátu z jednoho molu glukózy, resp. jiné hexózy. Pentózy se do glykolýzy připojují skrze transaldolační a transketolační reakce – ze tří pentóz vstupujících do dráhy jsou vytvořeny dvě fruktózy-6-fosfát a jeden glyceraldehyd-3-fosfát. Ziskem je tedy pět molekul laktátu a energie ve formě pěti molekul ATP. V praxi je však nějaká část uhlíku ze substrátu využita k tvorbě biomasy a výtěžnost se při ideálním potlačení kyslíkového efektu pohybuje kolem 90 % (laktátu ze substrátu) [38]. K velkoobjemové produkci laktátu se využívají homofermentativní bakterie mléčného kvašení, kam se řadí především zástupci rodu *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, některé druhy rodu *Lactobacillus* a další. Obecně jsou bakterie mléčného kvašení považovány za bezpečné pro biotechnologické i potravinářské aplikace [84]. Bakterie mléčného kvašení však vyžadují pro svůj růst komplexní zdroj dusíku a vitamíny, takže samotná media již zvyšují náklady produkce. Navíc nároky na sterilitu celého procesu jsou vysoké, protože tyto bakterie jsou náchylné na fágové infekce a bakteriální kontaminace [85].

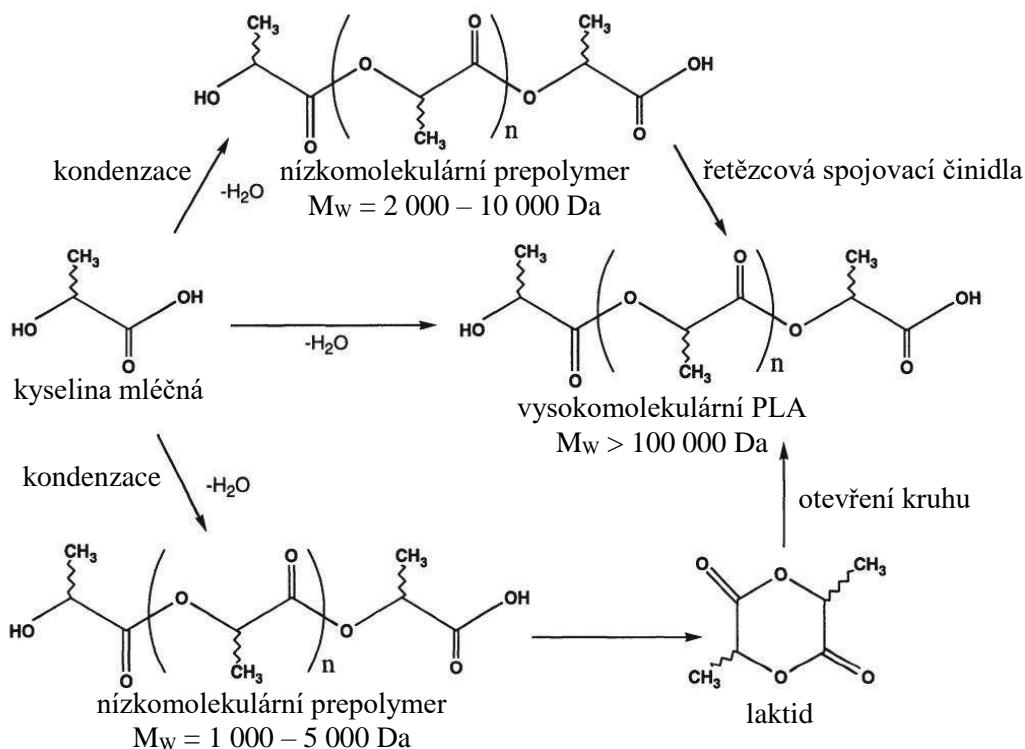
### **2.3.2.2 Eukaryotní producenti LA**

Pro výrobu kyseliny mléčné lze využít také kvasinky nebo plísně. Výhoda jejich aplikace spočívá zejména v nižších nutričních nárocích, což umožňuje použití minerálních médií, z kterých je produkt snadno izolovatelný. Plísně navíc disponují amylytickou aktivitou, takže lze jako substrát použít suroviny bohaté na polysacharidy bez předchozí sacharifikace. Některé kmeny plísní dokonce produkují opticky čisté formy laktátu. Izolace produktu je jednodušší než v případě bakteriálních a kvasinkových produkcí díky vláknitému nebo kuličkovitému růstu [84]. Avšak laktát není jediným kvasným produktem plísní, do hry vstupují také relevantní množství ethanolu a kyseliny fumarové [84, 85]. Využití kvasinek je komplikovanější. Jelikož kvasinky za nedostatku kyslíku upřednostňují ethanolové kvašení, je potřebné posílit aktivitu laktátdehydrogenázy a snížit aktivitu pyruvátdekarboxylázy, eventuálně také pyruvátdehydrogenázy pro podporu mléčného kvašení. Toho lze dosáhnout delecí samotných genů a například u kvasinky *Kluyveromyces lactis*. Dodatečnou transformací genu pro heterologní laktátdehydrogenázu bylo dosaženo výtěžku až 85 hm. % laktátu z glukózy [86].

### 2.3.2.3 Polymerace kyseliny mléčné

Světová výroba PLA rok od roku stoupá. Již v roce 2013 činily produkční kapacity zhruba 200 tisíc tun PLA [87]. Od tohoto roku existuje 28 společností vyrábějících PLA na 34 místech světa, z nichž největším producentem je společnost NatureWorks (USA) produkující 140 tisíc tun ročně [87, 88]. Další větší PLA produkční společnosti jsou Toyobo (Japonsko), Dai Nippon Printing Company (Japonsko), Mitsui Chemicals (Japonsko), Shimadzu (Japonsko), PURAC Biomaterials (Holandsko), Hycail (Holandsko), Galactic (Belgie), Cereplast (USA), FkuR (Německo), Biomer (Německo), Stanelco (Německo) či Snamprogetti (Čína), všechny produkující od 1,5 do 10 tisíc tun PLA ročně [87, 89]. Plány existujících producentů byly v této dekádě zvýšit produkci PLA na 800 tisíc tun ročně [87]. Podle European Bioplastics byla v roce 2019 produkční kapacita PLA asi 290 tisíc tun [90].

Polymeraci laktátu je možné provést několika způsoby: přímou polykondenzací (v pevném skupenství), azeotropní dehydratační polykondenzací anebo polymerací s otevřením kruhu cyklických dimerů (laktidů, tzv. ring-opening polymerace) [91]. Přímá polykondenzace je sice nejjednodušší cestou k zisku PLA, avšak pouze nízkomolekulárního, pro další dosažení vysokomolekulárního polymeru je nutné přidání spojovacích činidel nebo látek podporujících esterifikaci, což markantně zvyšuje výrobní náklady [92]. K velkoobjemové výrobě PLA se používá nejčastěji polymerace s otevřením kruhu laktidů vedoucí k zisku polymerů o vysoké molekulové hmotnosti a čistotě [43]. Mechanismus tohoto způsobu polymerace LA spočívá v počáteční přípravě nízkomolekulárního polylaktátu přímou polykondenzací, následnou depolymerací za vzniku cyklických dimerů a finální polymerací s otevřením dimerního kruhu (viz Obrázek 6). Vysokomolekulárního PLA lze dosáhnout také azeotropickou dehydratací, avšak s nižší čistotou [92].



Obrázek 6 – mechanismy polymerace kyseliny mléčné [92]

## 2.4 Aplikace vybraných biopolymerů

Vzhledem k dobré rozložitelnosti a nízké odolnosti vůči fyzikálním a chemickým činitelům mají biopolyestery menší aplikační potenciál. Také náročnost výroby, zpracování a náklady na tyto úkony obecně zhoršují postavení biopolymerů na trhu. Tyto faktory omezují aplikovatelnost PHA a PLA na spotřební segment. S výhodou lze tyto polymery využít pro výrobu obalů potravin, kosmetiky a spotřebních materiálů, nebo také pro výrobu pytlů a fólií. Avšak biodegradabilita a biokompatibilita přímo předurčují biopolyestery pro medicínské a potravinářské aplikace. Následující seznam uvádí nejčastější aplikace PHA [78]:

- Spotřební průmysl – obaly a fólie;
- Chemický průmysl – adheziva, gely, latex;
- Zpracování plastů – suroviny a pomocná činidla;
- Textilní průmysl – vlákna a nylony;
- Medicína – implantáty, cílená distribuce léčiv, tkáňové inženýrství;
- Potravinářský průmysl – zdravá aditiva;

Kyselina polymléčná nachází uplatnění v zemědělství a technologiích životního prostředí, kde obnova materiálu a jeho opětovné využití není praktické. Zde se PLA využívá pro výrobu mulčovacích fólií a pytlů, kompostovacích pytlů nebo systémů pro uvolňování a údržbu [91]. Dále je PLA využíván k výrobě speciálních textilií (např. jednorázové oděvy, čalounění) a pojivových vláken, markýz nebo kosmetických výrobků (dámské hygienické potřeby, pleny) [91]. V oblasti potravinářství je polylaktát využíván pro balení čerstvých výrobků a potravin, které nejsou znehodnoceny kyslíkem (vysoká propustnost kyslíku) [91]. Největší pozornost je věnována medicínským aplikacím PLA. V této sféře nachází polylaktát tato využití [91]:

- Stenty, kotvy a klece;
- Chirurgické stehy;
- Desky a šrouby pro fixaci;
- Interferenční šrouby v kloubech končetin;
- Cvočky a špendlíky pro přichycení vaziv;
- Kraniofaciální augmentace;
- Tkáňové matrice a řebríčky (scaffoldy);

## 2.5 Současný stav řešené problematiky

Pro laboratorní testy kompostovatelnosti byla vytvořena celá řada norem, například IS/ISO 20200 nebo ISO 14855–1, resp. ISO 14855–2 (viz [74, 93, 94]). Tyto normy popisují různé metody analýzy dekompozice zkoumaných materiálů – norma IS/ISO 20200 navrhuje stanovení hmotnostního úbytku sušiny, těkavých organických látek a poměru C/N; norma ISO 14855 popisuje metody sledování degradace analýzou uvolněného oxidu uhličitého. Kompostovací testy ve větším – pilotním měřítku navrhuje ISO 16929 (viz [95]).

Kompostovací testy se staly populárním způsobem hodnocení biodegradability materiálů. Tímto způsobem jsou zkoumány různé druhy jak čistých polymerů, tak kopolymerů a kompozitů. Ve většině testů je objektem analýz právě polymer a míra jeho



dezintegrace, zatímco kompost není předmětem studie. Sledovanými parametry jsou často mechanické vlastnosti polymeru v různých stádiích rozkladu a, samozřejmě, také hmotnostní úbytek rozkládaných materiálů. Častým výstupem testů bývají snímky polymeru získané z rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM) nebo FT-IR spektra, ze kterých lze rozeznat funkční skupiny reziduí. Tyto práce se věnují konkrétním polymerům převážně z materiálového hlediska nebo se jim věnují v různých rovinách zájmu, přičemž hodnotí biodegradační potenciál polymerů pouze okrajově.

Weng a spol. (viz [96]) zkoumali závislost biodegradability kopolymerů PHB na složení polymeru podle ISO 14855–1. Pro tyto testy využili tenké fólie PHB, P(3HB-co-4HB) a P(3HB-co-3HV) o různých obsazích 3HV. Zjistili, že polymery s nejvyšším obsahem monomeru 4HB nebo 3HV v kopolymeru podléhají biodegradaci nejrychleji [96]. Tento děj je pravděpodobně zapříčiněn nižším stupněm krystalinity kopolymerů, přičemž je obecně předpokládáno, že krystalické oblasti polymeru podléhají biodegradaci pomaleji. U všech sledovaných vzorků došlo k 50 % degradaci mezi 30. a 35. dnem experimentu. Na základě snímků ze skenovacího elektronového mikroskopu autoři dále dedukují, že biodegradace použitých polymerů probíhá jako eroze od povrchu do středu [96].

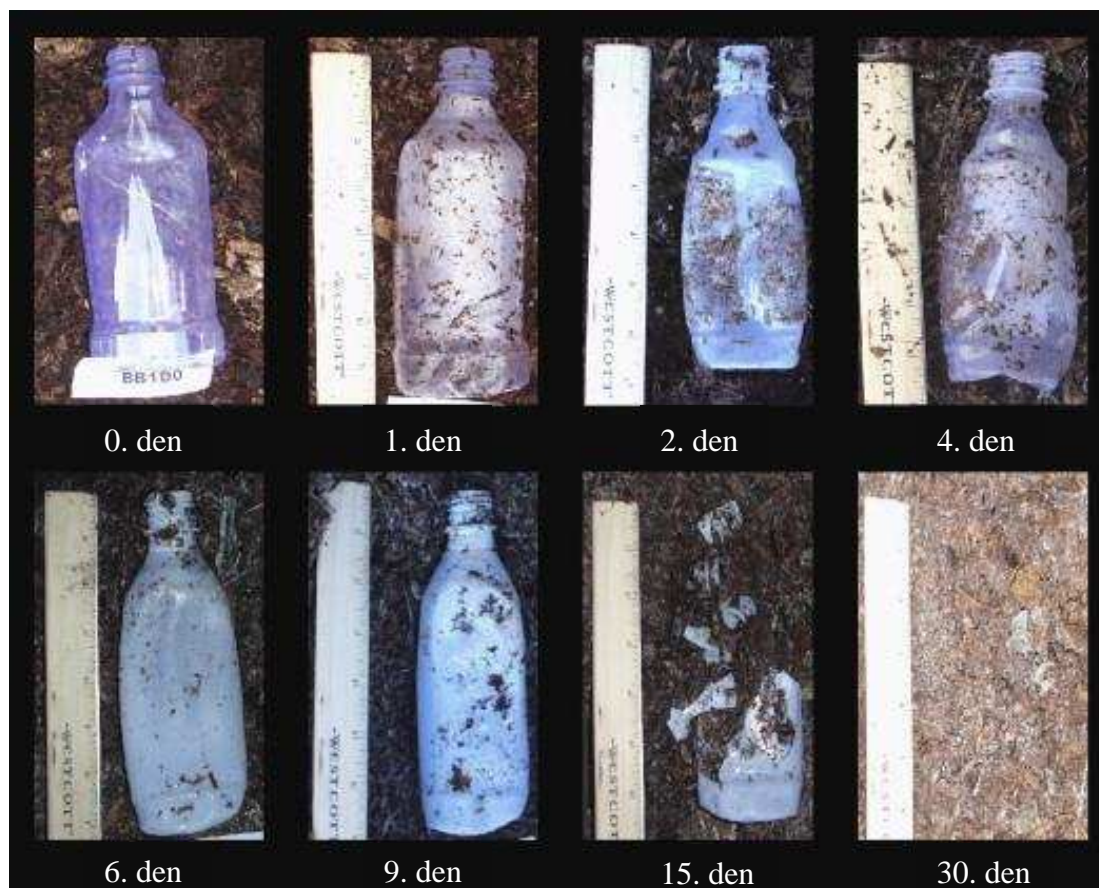
Anaerobní biodegradaci PHA fólií se věnoval Abou-Zeid a spol. (viz [97]). Tímto způsobem byly simulovány podmínky skládky odpadů a přírodních anaerobních sedimentů nebo anaerobní způsob zpracování odpadů. Překvapivě bylo zjištěno, že PHB podléhá biodegradaci v nepřítomnosti kyslíku rychleji než kopolymer P(3HB-co-3HV) [97]. Autoři předpokládají, že 3HV vznikající při depolymeraci komplikuje růst anaerobních mikroorganismů [97]. I v tomto případě byla pozorována povrchová eroze, po 10 týdnech experimentu bylo ztraceno 23 % hmotnosti PHB a 22,5 % hmotnosti kopolymeru [97].

Funabashi a spol. kompostovali polylaktát podle normy ISO 14855–2 (viz [98]). Jako testovaný materiál autoři zvolili PLA prášek, řezy kelímku z PLA, řezy PLA fólie a celulózový prášek jako referenci, vše inkubováno při 58 °C. Stupeň biodegradace byl určen na základě stanovení uvolněného CO<sub>2</sub>, který dosáhl 80 % po méně než 30 dnech inkubace v případě fólií, po 50 dnech inkubace v případě prášku (výsledek obdobný referenčnímu vzorku) a po 100 dnech v případě řezů z kelímku [98]. Z těchto výsledků autoři definovali závislost rychlosti biodegradace na velikosti částic artiklů, přičemž konstatují, že prášek s částicemi o distribuci velikostí 0-125 μm je nevhodný pro kompostovací testy kvůli nepřesnosti získaných výsledků (stupeň degradace více než 100 %) [98].

Biodegradabilitu tenkých fólií směsi PHB/PLA/plastifikátor (hm. poměr 60/25/15) podle normy IS/ISO 20200 zkoumal Menčík a spol. okrajově ve své studii (viz [99]). V prvních 30 dnech experimentu nebyl pozorován žádný úbytek fólie. V následujících dvou týdnech ubylo z fólie zhruba 5 %, posléze byl však průběh rozkladu velice rychlý – v 55. den experimentu byla nalezena pouhá čtvrtina fólie a k úplné degradaci došlo v 65. den kompostování [99].

Sarasa a spol. sledovali dezintegraci cylindrických a kónických kousků PLA kompozitů obsahujících 10 % kukuřice, a PLA napěněného PS podle IS/ISO 20200 (viz [100]). Bylo zjištěno, že napěněné PLA dosáhlo průměrně 63,6 % dezintegrace a kompozit PLA dosáhl 79,7 % průměrného stupně degradace, přičemž stupeň degradace byl popsán jako nezávislý na velikosti, tloušťce i tvaru artiklů [100].

Rozklad PLA láhví zkoumal Kale a spol. využitím ASTM D5338 a ISO 14855–1 norem, kde biodegradabilita byla vyjádřena jako stupeň mineralizace vypočtený na základě množství uvolněného CO<sub>2</sub> [101]. Po 58 dnech kompostování byl pozorován 84,2 % stupeň mineralizace [101]. Při vizuálním vyhodnocení výsledků experimentu je však zřejmé, že pro rozklad láhve postačovalo 30 dnů (viz Obrázek 7).



Obrázek 7 – snímky PLA láhve v průběhu kompostování (převzato z [101])

Cílem této práce je sledování biodegradčního děje v kompostu v širším kontextu. Sledovány jsou změny nejen v polymerní struktuře jednotlivých artiklů, ale také změny probíhající v biodegradčním prostředí (v biosféře kompostu). Navíc se tato práce snaží simulovat reálné podmínky kompostování v komerčním měřítku – na skládkách odpadů nebo velkoobjemových kompostárnách. Ve výše uvedených normách a jimi inspirovaných pracích jsou degradační testy prováděny při nízkém zatížení kompostu materiálem, kde hmotnost polymeru dosahuje maximálně 10 % hmotnosti kompostu. V experimentech popsanych v této práci je systém přesycen a přetížen testovaným polymerem. Neméně důležitý rozdíl mezi touto prací a uvedenými studiemi je také v geometrii testovaných artiklů. Téměř všechny uvedené studie využívají k testům biodegradability fólie polymerů nebo tenké materiály, které jsou díky většímu specifickému povrchu degradovány rychleji. V této práci jsou aplikovány polymerní materiály ve formě granulátů, u kterých je předpoklad pomalejšího rozkladu vzhledem k uváděnému mechanismu rozkladu (eroze od povrchu dovnitř).

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiály a metody

#### 3.1.1 Mikroorganismy

Pro ověření biodegradačního potenciálu submerzními kultivacemi byly vybrány termofilní bakteriální kmeny (viz Tabulka 5). V prostředí kompostu lze díky jeho vysokým teplotám očekávat přítomnost mikroorganismů s vysokým teplotním optimem růstu (45–65 °C). S ohledem na tento fakt byly vybrány bakteriální kmeny s maximální růstovou schopností kolem 50 °C. Neméně podstatným kritériem výběru byla také schopnost metabolizovat polyhydroxyalkanoáty, všechny vybrané kmeny tedy disponují genetickou výbavou pro metabolismus PHA.

Tabulka 5 – použité bakteriální kmeny a sbírky, ze kterých byly pořízeny

Kmen	Sbírka
Caldimonas taiwanensis LMG 22827	Belgian Coordinated Collections of Microorganisms/Ghent University, Laboratory for Microbiology, Gent, Belgie
Schlegelella aquatica LMG 23380	
Tepidimonas fonticaldi LMG 26746	
Tepidimonas taiwanensis LMG 22826	
Schlegelella thermodepolymerans DSM 15344	Leibnitz Institute, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Německo
Caldimonas manganoxidans JCM 10698	Japan Collection of Microorganisms, Cukuba, Japonsko

#### 3.1.2 Chemikálie

- Nutrient Broth (HiMedia)
- Yeast Extract (HiMedia)
- Chlorid sodný (Lach-Ner)
- Chlorid draselný (Lach-Ner)
- Chlorid amonný (Lach-Ner)
- Hydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich)
- Dihydrát dihydrogenfosforečnan sodný (Lach-Ner)
- Dihydrát hydrogenfosforečnan sodný (Lach-Ner)
- Dodekahydrát hydrogenfosforečnan sodný (Lach-Ner)
- Síran amonný (Sigma-Aldrich)
- Heptahydrát síran horečnatý (Lach-Ner)
- Dihydrát chlorid vápenatý (Lach-Ner)
- Citronan amonno-železitý (PENTA)
- Hydroxid sodný (Lach-Ner)

- Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner)
- Chloroform (Lach-Ner)
- Kyselina trichloroctová (Sigma-Aldrich)
- p-nitrofenyl palmitát (Sigma-Aldrich)
- p-nitrofenyl acetát (Sigma-Aldrich)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma-Aldrich)
- Triton X-100 BioChemica (PanReac AppliChem)
- Dodecylsulfát sodný (Sigma-Aldrich)
- Azoalbumin (Sigma-Aldrich)

Všechny použité chemikálie byly v čistotě p.a. nebo vyšší.

### 3.1.3 Použité polymery

- Polyhydroxybutyrát – granule, Biomer<sup>®</sup> 310 (Biomer)
- Polyhydroxybutyrát, amorfní – pasta, dodáno Ústavem chemie materiálů, FCH VUT
- Polyhydroxybutyrát, krystalický – pasta, dodáno Ústavem chemie materiálů, FCH VUT
- Polylaktát, amorfní – granule, Ingeo<sup>™</sup> Biopolymer 4060D (NatureWorks)
- Polylaktát, semi-krystalický – granule, Ingeo<sup>™</sup> Biopolymer 4043D (NatureWorks)

### 3.1.4 Suroviny a chemikálie použité pro kompost

- Dřevěné piliny
- Krmivo pro králíky
- Zralý kompost rostlinného původu (Kompostárna Fertia Blansko)
- Kukuřičný škrob (Amylon)
- Kukuřičný olej (Olitalia)
- Sacharóza, p.a. (Lach-Ner)
- Močovina, p.a. (Sigma-Aldrich)

### 3.1.5 Přístroje a vybavení

- Analytické váhy PA224C (Ohaus)
- Váhy EW 620-3NM (Kern)
- Centrifuga vysokorychlostní chlazená – HERMLE Z 36 HK (HERMLE)
- Centrifuga Hettich EBA 20 (Hettich)
- Vortex TK3S (Kartell)
- Rotátor Multi-Bio RS-24 (BioSan)
- Termoblok SBH130D (Stuart)
- Temperovaná orbitální třepačka – Incubator 1000 (Heidolph)
- Temperovaný biologický inkubátor BD 115 (Binder)

- Vodní lázeň BL4/150 (WSL)
- ELISA Synergy HTX multi mode reader (Biotek)
- Laminární box Aura mini BioAir (Euroclone)
- Magnetická míchačka bez ohřevu – model TKO (Kartell)
- Nanofotometr P300 (Implen)
- pH metr pHTestr (Thermo Scientific)
- SEC chromatograf, kolona: PLgel mixed-C 5  $\mu\text{m}$ , 300 by 7,5 mm (Agilent Technologies)  
detektor: MALS – DAWN HELEOS II, diferenční refraktometr OPTILAB T-REX (Wyatt Technology)
- Iontový chromatograf 850 Professional IC (Metrohm)  
kolona: Metrosep Organic Acid-250/7.8  
detektor: vodivostní detektor 850 Professional IC (Metrohm)
- Rastrovací elektronový mikroskop EVO LS 20 (ZEISS)
- Plastové dózy pro kultivaci, objem 3 l, rozměry 19,5×30×7,5 cm (Tontarelli)
- Běžné laboratorní sklo a vybavení

## 3.2 Kultivace mikroorganismů

### 3.2.1 Skladování bakteriálních kultur

Bakteriální kultury byly zakoupeny v lyofilizovaném stavu, jejich oživení bylo provedeno podle návodu dodavatele. Kultury byly uchovány 10 % glycerolu v kryozkumavkách při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.2 Příprava a kultivace inokul

Pro všechny použité kultury byla připravena stejná inokulační média, a to kapalná média NB o koncentraci  $25\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Kultivace inokul probíhala v Erlenmeyerových baňkách o objemu 100 ml, přičemž objem inokula v baňce tvořil 50 ml. Každá bakteriální kultura byla kultivována ve dvou paralelních inokulačních médiích.

Složení inokulačního média NB:

- |                    |          |
|--------------------|----------|
| • Pepton           | 10,00 g  |
| • Beef Extract     | 10,00 g  |
| • NaCl             | 5,00 g   |
| • Destilovaná voda | 1 000 ml |

Potřebné množství práškového media bylo naváženo a rozpuštěno v destilované vodě za neustálého míchání na magnetické míchačce. Sterilizace inokul v baňkách byla provedena v tlakových hrncích s uzavřeným ventilem. Po sterilaci byla inokula mírně ochlazená a do každé baňky byl přelit celý objem kryozkumavky s kulturami o laboratorní teplotě. Zaočkováná inokulační média byla kultivována po dobu 24 h na temperované orbitální třepačce při teplotě  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  a frekvenci třepání 180 rpm.

### 3.2.3 Kultivace bakterií polymerním substrátu

Inokula s narostlými kulturami byla převedena na minerální média s polymerním substrátem za účelem ověření biodegradačního potenciálu těchto kultur. Kultivace probíhala v 100 ml minerálního média v Erlenmeyerových baňkách o objemu 250 ml.

Složení minerálního média pro bakterie rodu *Caldimonas* (M2):

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_2$  3 g
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2,6 g
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  0,13 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,2 g
- Yeast Extract 0,1 g
- Biopolymer 10 g
- TES II\* 1 ml
- Destilovaná voda 1 000 ml

Složení minerálního média pro bakterie rodu *Tepidimonas* a *Schlegelella* (CH):

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  9 g
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 g
- $\text{NH}_4\text{Cl}$  1 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,2 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  0,02 g
- $\text{NH}_4\text{Fe}^{\text{III}}\text{citrát}$  0,0012 g
- Yeast Extract 0,5 g
- Biopolymer 10 g
- TES II\* 1 ml
- Destilovaná voda 1 000 ml

\*Složení roztoku stopových prvků (TES II):

- EDTA 50 g
- $\text{FeCl}_3$  8,3 g
- $\text{ZnCl}_2$  0,84 g
- $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  0,13 g
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  0,1 g
- $\text{MnCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  0,016 g
- $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,1 g
- Destilovaná voda 1 000 ml

Jako zdroj uhlíku byly použity granule vybraných biopolymerů – polyhydroxybutyrát, amorfni polyaktát a semi-krystalický polyaktát. Všechny vybrané bakteriální kmeny byly kultivovány na každém z uvedených biopolymerů. Paralelně s kultivacemi byla vedena také kontrolní media pro každou kombinaci medium – substrát (polymer). Všechna media byla sterilována s polymerním substrátem v baňkách umístěných v tlakovém hrnci s uzavřeným ventilem. Po sterilaci byla media mírně ochlazena a následně asepticky zaočkovaná 10 ml inokula s narostlými kulturami do media (inokulační poměr 1:10). Tato připravená media

s kulturami byla inkubována na temperované orbitální třepačce po dobu 168 hodin (7 dní) při teplotě 50 °C a frekvenci míchání 180 rpm.

### **3.3 Postup práce**

#### **3.3.1 Analýza submerzního biodegradačního děje**

Pro hodnocení míry využití biopolymerů jakožto zdroje uhlíku a energie pro růst bakteriálních kultur bylo provedeno turbidimetrické stanovení obsahu biomasy, gravimetrické stanovení obsahu biomasy, stanovení hmotnostního úbytku polymeru a stanovení aktivity vybraných skupin hydrolytických enzymů. Pro hodnocení míry schopnosti utilizace polyhydroxybutyrátu bylo dále provedeno stanovení PHB-biodegradační aktivity použitých kmenů. V rámci hodnocení míry utilizace polylaktátu bylo také provedeno stanovení množství laktátu v médiu po kultivaci pomocí iontové chromatografie.

##### **3.3.1.1 Turbidimetrické stanovení obsahu biomasy**

Stanovení obsahu biomasy bylo prováděno ve 24-hodinových intervalech po celou dobu kultivace. Z promíchané kultury byl sterilně odebrán 1 ml vzorek, který byl po vychlazení na laboratorní teplotu převeden do kyvety s optickou délkou 10 mm, a následně byla na nanofotometru změřena absorbance tohoto vzorku při vlnové délce 630 nm proti destilované vodě. Vzorky byly dle potřeby vhodně zředěné tak, aby hodnota absorbance nepřekročila hodnotu 1,000.

##### **3.3.1.2 Gravimetrické stanovení obsahu biomasy**

Pro stanovení obsahu biomasy v médiu bylo na konci kultivace odebráno 10 ml kultury. Kultura byla centrifugována při 6 000 ot/min po dobu 10 minut, supernatant byl nahrazen 10 ml destilované vody. Směs byla homogenizována na vortexu a následně znovu centrifugována při 6 000 ot/min po dobu 10 min. Supernatant byl posléze odlit a získaná biomasa byla sušena při 60 °C po dobu 24 hodin. Suchá biomasa byla zvážena s přesností na 4 desetinná místa.

##### **3.3.1.3 Gravimetrické stanovení hmotnostního úbytku polymeru**

Hmotnostní úbytek polymeru byl stanoven vážením s přesností na 4 desetinná místa před a po kultivaci. Vážení před kultivací proběhlo již před sterilací. Po ukončení kultivace byl polymer separován od media filtrací a následně byl polymer opakovaně promyt destilovanou vodou. Po usušení při 70 °C byl polymer zvážen.

##### **3.3.1.4 Stanovení aktivity lipáz**

Principem stanovení lipolytické aktivity je štěpení p-nitrofenylpalmitátu lipolytickými enzymy za vzniku žlutě zbarveného p-nitrofenolu, který absorbuje světlo o vlnové délce

410 nm a lze ho tedy detekovat spektrofotometricky. Lipolytická aktivita je pak definována jako množství enzymů katalyzujících přeměnu substrátu, která je doprovázena nárůstkem absorbance o hodnotu 0,001 za jednu minutu a za podmínek testu (podle [102]).

Pro stanovení lipolytické aktivity kultur bylo na konci kultivace odebráno 10 ml promíchaného media, odebraný vzorek byl centrifugován při 6 000 ot/min po dobu 10 minut. Následně byl odebrán 1 ml supernatantu do zkumavky, k tomuto množství bylo přidáno 2,5 ml 0,1 M Tris-HCl pufru o pH 8,2 a 2,5 ml připraveného substrátu. Zkumavky se směsí byly inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 30 min a následně byla změřena absorbance při 410 nm proti blanku.

Složení substrátu:

- |                        |                    |
|------------------------|--------------------|
| • p-nitrofenylpalmitát | 0,0135 g           |
| • Triton X-100         | 0,9345 ml          |
| • SDS (10 % roztok)    | 0,17 ml            |
| • Destilovaná voda     | doplnění na 100 ml |

Po smíchání všech komponent byl roztok substrátu inkubován ve vodní lázni při teplotě 65 °C po dobu 15 minut.

### 3.3.1.5 Stanovení aktivity esteráz

Stanovení esterázové aktivity spočívá ve stejném principu jako stanovení lipolytické aktivity, avšak jako substrát pro reakci je použit p-nitrofenylacetát. Při reakci opět vzniká žlutě zbarvený p-nitrofenol, který je detekovatelný spektrofotometricky při 410 nm. Jednotka esterázové aktivity opět definuje množství enzymů štěpících esterové vazby substrátu za vzniku množství produktu způsobujícího nárůst absorbance o hodnotu 0,001 za 1 min a za podmínek testu (podle [102]).

Z promíchaného media bylo po kultivaci odebráno 10 ml, vzorek byl centrifugován při 6 000 ot/min po dobu 10 min. Ze vzniklého supernatantu byl odebrán objem 1 ml do čisté zkumavky, k tomuto objemu bylo přidáno 2,5 ml 0,1 M Tris-HCl pufru o pH 8,2 a 2,5 ml připraveného substrátu. Po inkubaci 30 min při laboratorní teplotě byla změřena absorbance při 410 nm proti slepému vzorku.

Složení substrátu:

- |                      |                    |
|----------------------|--------------------|
| • p-nitrofenylacetát | 0,0065 g           |
| • Triton X-100       | 0,9345 ml          |
| • SDS (10 % roztok)  | 0,17 ml            |
| • Destilovaná voda   | doplnění na 100 ml |

Roztok substrátu byl po přidavku všech komponent inkubován ve vodní lázni při 65 °C po dobu 15 min.

### 3.3.1.6 Stanovení aktivity proteáz

Principem stanovení proteolytické aktivity je hydrolyza azoalbuminu jakožto substrátu proteáz za vzniku azopeptidů, které jsou detekovatelné spektrofotometricky při 440 nm. Přebytečný azoalbumin je na konci reakce vysrážen kyselinou trichloroctovou a odstředěn,



zatímco vzniklé produkty proteolýzy zůstávají v supernatantu. Proteolytická aktivita je definována jako množství enzymů potřebných k takovému rozkladu substrátu, který způsobí nárůst absorbance o hodnotu 0,001 za 1 minutu a za podmínek reakce (podle [102]).

Z narostlých medií bylo na konci kultivace odebráno 10 ml dobře promíchaného vzorku a zcentrifugováno při 6 000 ot/min po dobu 10 minut. 100  $\mu$ l supernatantu bylo smícháno se 100  $\mu$ l a tato směs byla inkubována po dobu 30 min při teplotě 37 °C. K zastavení reakce bylo použito 410  $\mu$ l 10 % roztoku kyseliny trichloroctové, následně byla směs centrifugována při 6 000 ot/min po dobu 5 minut. K 500  $\mu$ l odebraného supernatantu bylo v kyvetě přidáno 700  $\mu$ l 1 M roztoku NaOH a nakonec byla změřena absorbance této směsi při 440 nm proti blanku.

### **3.3.1.7 Stanovení množství laktátu v mediích po kultivaci na PLA pomocí IC**

Ke stanovení množství laktátu v mediích byly využity supernatanty získané centrifugací medií na konci kultivace, stejně jako supernatanty pro stanovení lipolytické aktivity (viz kapitola 3.3.1.4). Získané supernatanty byly přelity do zkumavek o objemu zhruba 15 ml, ty byly vloženy do autosampleru a následně byla spuštěna analýza.

### **3.3.1.8 Stanovení PHB-biodegradační aktivity použitých kmenů**

Principem této analýzy je spektrofotometrické měření úbytku zákalu směsi polyhydroxybutyrátu a enzymů s depolymerizační aktivitou obsažených v mediu po kultivaci. Působením těchto enzymů dochází k štěpení hydrofobního polymerního řetězce, což vede k uvolňování kratších – oligomerních fragmentů, které jsou rozpustné ve vodě. To se projeví úbytkem zakalení směsi.

Tato analýza byla provedena pouze pro srovnání PHB-biodegradačních potenciálů použitých kmenů mezi sebou, purifikace specifických depolymeráz a stanovení jejich aktivit provedeno nebylo. K analýze byly využity supernatanty získané centrifugací medií po kultivaci na PHB, stejně jako supernatanty pro stanovení lipolytické aktivity (viz kapitola 3.3.1.4). Jako substrát pro depolymerizační enzymy byl použit amorfnní a krystalický PHB, obě ve formě pasty.

Celý experiment proběhl ve dvou fázích. V první fázi byl použit jako substrát pouze amorfnní PHB, a to ve dvou různých poměrech zastoupení v reakční směsi. Pasta PHB byla nejdříve 1 000-krát zředěna reakčním pufrem (příprava substrátu), následně byla do mikrotitrační destičky připravena reakční směs A (45  $\mu$ l substrátu, 180  $\mu$ l reakčního pufru a 25  $\mu$ l supernatantu) a reakční směs B (112,5  $\mu$ l substrátu, 112,5  $\mu$ l reakčního pufru a 25  $\mu$ l supernatantu). Každý ze vzorků byl připraven ve dvou paralelních provedeních. Bezprostředně po zahájení reakce přidávkem posledního reakční komponentu (supernatantu) byla destička umístěna do ELISA readeru a bylo spuštěno měření absorbance při 650 nm se snímacím intervalem 30 sekund. Reakce probíhala při teplotě 40 °C po dobu 10 minut.

V druhé fázi byly použity obě formy PHB (amorfnní i krystalické). Substráty byly nejdříve naředěny reakčním pufrem (1 mM CaCl<sub>2</sub> v 100 mM Tris-HCl o pH 8,0) tak, aby absorbance jejich směsí při 650 nm byla zhruba 1,500 (amorfnní: A = 1,671; krystalické: A = 1,521). Takto připravené substráty byly použity pro přípravu reakční směsi sestávající

z 50  $\mu$ l substrátu, 150  $\mu$ l reakčního pufru a 50  $\mu$ l supernatantu. Směsi byly připraveny do jamek mikrotitrační destičky, každý vzorek ve dvou paralelních provedeních. Destička se směsí byla umístěna do ELISA readeru a měření absorbance při 650 nm bylo spuštěno bezprostředně po zahájení reakce přidávkem supernatantu. Reakce probíhala při teplotě 40 °C po dobu 10 minut, snímací interval měření byl 30 sekund.

### 3.3.1.9 Snímání povrchu polymerů pomocí SEM

Vzorky polymerů po kultivaci vybraného kmene, který vykazoval největší schopnost utilizace těchto bioplastů byly snímány využitím rastrovacího elektronového mikroskopu. Tímto způsobem byly analyzovány vzorky PHB, amorfního i semi-krytalického PLA, ale také kontrolních vzorků (inkubace bez kultur). Vzorky byly přilepeny k matici pomocí oboustranné uhlíkové pásky, následně byly pokovovány (Au s příměsí Pd) a nasnímány pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu. Urychlovací napětí elektronů bylo nastaveno na 5 kV,

### 3.3.2 Biodegradace biopolymerů v kompostu

Parametry, na základě kterých byl kompost založen, byly převzaty z normy IS/ISO 20200. Kompostovací experiment proběhl ve dvou testech – v rámci prvního testu byla provedena optimalizace podmínek kompostování a starostlivosti o kompost; v druhém testu byl zkoumán samotný degradační děj. V obou testech bylo vedeno 12 separovaných kompostů, z nichž 3 obsahovaly granule polyhydroxybutyrátu, 3 obsahovali granule amorfního polylaktátu, 3 obsahovaly granule semi-krytalického polylaktátu a zbylé 3 byly prázdné a plnily úlohu blanku. Kompostovací směs byla namíchána podle Tabulky 6.

Tabulka 6 – složení suchého kompostu:

<b>Komponent</b>	<b>Hmotnostní zastoupení [%]</b>
Dřevěné piliny	40
Krmivo pro králíky	30
Zralý kompost	10
Kukuřičný škrob	10
Sacharóza	5
Kukuřičný olej	4
Močovina	1

Krmivo pro králíky ve formě granulí bylo rozdrčeno a proseto přes síta s průměrem 2 mm. Do víka 3 l plastové dózy bylo vyvrtáno 8 aeračních otvorů o průměru 5 mm. Takto připravený reaktor byl naplněn množstvím zhruba 200 g suché kompostovací směsi. Každá směs byla zalita 244 ml destilované vody, tedy tak, aby vlhkost vsádky činila 55 %. Připravené kompostovací reaktory byly umístěny do inkubátoru temperovaného na 58 °C. Pozice reaktorů v inkubátoru byly střídány (přibližně každý druhý den). Inkubátor byl na dně opatřen Petriho miskami plnými destilovanou vodou plnící úlohu odparníků.

Po 3 dnech inkubace bylo do každého reaktoru vloženo celkem 20 g granul polymeru. Zatížení kompostu polymerním materiálem bylo tedy 10 %, což je větší než navrhuje norma IS/ISO 20200. Účelem takového přesycení kompostu polymery je simulace prostředí skládky bioodpadu. Pro navážky polymerů byly vytvořeny pytlíky ze síťového materiálu, do každého pytlíku byly umístěny 2 g granulí (navážky s přesností na dvě desetinná místa). Důvodem umístění polymerů do pytlíku byl záměr pravidelných odběrů těchto vzorků za účelem mapování osudu materiálu během degradace. Pytlíky byly uzavřeny zatavením protějších stran otvoru. V každém pytlíku bylo kromě granulí polymeru umístěno také označení vzorku (číslo na laminovaném papírku). Pytlíky s polymerem byly mírně zasunuty do vsádek kompostů dále inkubovaných stejným způsobem při teplotě 58 °C. Celá vsádka s polymerem na počátku experimentu je znázorněna na Obrázku 8.



Obrázek 8 – kompost s polyhydroxybutyrátem v pytlících (počátek experimentu)

V prvním kompostovacím testu (optimalizaci) byly komposty intenzivně zavlažovány destilovanou vodou pomocí rozprašovače, zvlhčení bylo prováděno téměř každý den. Tímto způsobem byl optimalizován úkon přídatku vody. Aerace vsádek byla zajištěna mícháním kompostu kovovou lžičkou, tato operace byla prováděna jednou za týden. V tomto kompostovacím testu byly provedeny celkem 2 odběry polymeru (pytlíku) pro stanovení hmotnostního úbytku, a to 10 a 17 dnů po umístění polymeru do kompostu. Po této době byl první kompostovací test ukončen. Celkově lze první kompostovací test považovat za pilotní experiment, kterého pozorování posloužilo k potvrzení funkčnosti tohoto modelu ve zvolených podmínkách, a potvrzení schopnosti zajistit a udržet podmínky uvedené v normě IS/ISO 20200. Zároveň byla provedena organizace analýzy a její postupů.

Druhý kompostovací test byl založen využitím zralého kompostu z prvního testu (kompost připraven stejně – dle Tabulky 6, zralý kompost z prvního testu). Tento test byl prováděn 4 týdny, kompostovací procedura byla provedena dle Tabulky 7.

Tabulka 7 – operační procedura kompostování v druhém testu

Den č.	Operace
0	Založení kompostu, zalití destilovanou vodou a promíchání
1, 2, 3, 4, 7, 9, 11, 14	Přídavek vody, promíchání
8, 10, 16, 18, 21, 23, 25, 28	Zvlhčení destilovanou vodou
7, 14, 21, 28	Odběr vzorku kompostu a pytlíku s polymerem, analýza

V rámci analýz procesu kompostování byl v tomto testu sledován hmotnostní úbytek polymerů, aktivity vybraných skupin hydroláz (lipázy, esterázy a proteázy), dále byly sledovány změny molekulové hmotnosti polyhydroxybutyrátu pomocí gelové permeační chromatografie (SEC-MALS) a povrch polymeru na konci kompostovacího experimentu využitím rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM).

### 3.3.2.1 Stanovení hmotnostního úbytku biopolymerů v kompostu

Z každého reaktoru byl vybrán 1 vzorek polymeru v pytlíku. Celý pytlík byl několikrát promyt destilovanou vodou, umístěn na Petriho misku a uložen do sušárny temperované na 60 °C do druhého dne. Pytlík byl následně rozstřížen a polymer zvážen s přesností na dvě desetinná místa. Polymery byly následně uchovány ve zkumavkách Eppendorf.

### 3.3.2.2 Stanovení lipolytické aktivity

Pro stanovení lipolytické aktivity kompostu byl odebrán vzorek kompostu z více míst reaktoru. Ze směsi odběrů (v rámci jednoho reaktoru) byl odebrán 1 g, ke kterému byl přidán extrakční pufr (5 hm. % Triton X-100 v 400 mM Tris-HCl s 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8,0) o objemu 10 ml. Směs byla míchaná na rotátoru po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Následně byla směs centrifugována při 6 000 ot./min při laboratorní teplotě po dobu 10 minut. Takto získaný supernatant byl použit ke stanovení lipolytické aktivity podle stejného postupu, jaký byl

použit ke stanovení lipolytické aktivity při submerzní biodegradaci (viz kapitola 3.3.1.4). Analýza byla provedena na ELISA readeru v menším objemu (300  $\mu$ l reakční směsi) při stejném poměru komponent. Jako referenční vzorek byla použita směs s reakčním pufrem místo substrátu (p-nitrofenolpalmitátu). Každý vzorek byl analyzován ve dvou paralelních provedeních.

### 3.3.2.3 Stanovení aktivity esteráz

Stanovení aktivity esteráz bylo prováděno paralelně se stanovením lipolytické aktivity analogickým postupem (viz kapitola 3.3.2.2). Při reakci byl však použit rozdílný substrát, stejný jako při stanovení aktivity esteráz při submerzní biodegradaci (viz kapitola 3.3.1.5). Jako referenční vzorek byla použita směs bez substrátu (substituován reakčním pufrem).

### 3.3.2.4 Stanovení proteolytické aktivity

Pro stanovení proteolytické aktivity byl odebrán vzorek kompostu z více míst reaktoru, ze směsi těchto vzorků byl odebrán 1 g pro další postup (reprezentativní vzorek). Ke vzorku bylo přidáno 10 ml extrakčního pufru (0,2 hm. % Triton X-100 ve fosfátovém pufru). Vzniklá směs byla následně míchaná na rotátoru při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Poté byla směs centrifugována při 6 000 ot./min při laboratorní teplotě po dobu 10 minut. Získaný supernatant byl následně použit k analýze stejným způsobem, jako je uvedeno u stanovení proteolytické aktivity při submerzní biodegradaci (viz kapitola 3.3.1.6). Jako referenční vzorek (blank) byla použita směs, do které byl přidán supernatant denaturovaný varem ve vodní lázni po dobu 10 minut (získaný supernatant i substrát pro reakci jsou zbarveny, proto je nelze substituovat reakčním pufrem).

Složení fosfátového pufru:

- |   |          |
|---|----------|
| • NaCl  | 8 g      |
| • KCl   | 0,2 g    |
| • Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O | 1,44 g   |
| • KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 0,24 g   |
| • Destilovaná voda                                      | 1 000 ml |

### 3.3.2.5 Sledování změn v molekulové hmotnosti PHB pomocí SEC

Molekulová hmotnost byla stanovena gelovou permeační chromatografií (SEC) s detektorem statického rozptylu světla ve více úhlech (MALS). Do šroubovacích vialek byly připraveny 2–3 ml směsi vzorku suchých granulí a chloroformu tak, aby koncentrace PHB po rozpuštění v chloroformu činila přibližně 4 mg·ml<sup>-1</sup>. Směsi byly následně zahřívány na termobloku při 70 °C do maximálního možného rozpuštění PHB a poté byly ochlazeny na laboratorní teplotu. Zbytky nerozpuštěného polymeru byly přefiltrovány pomocí stříkaček přes stříkačkové filtry s porozitou 0,45  $\mu$ m do šroubovacích vialek, které byly vloženy do autosampleru chromatografu a byla provedena analýza.

### **3.3.2.6 *Snímání povrchu bioplastů pomocí SEM***

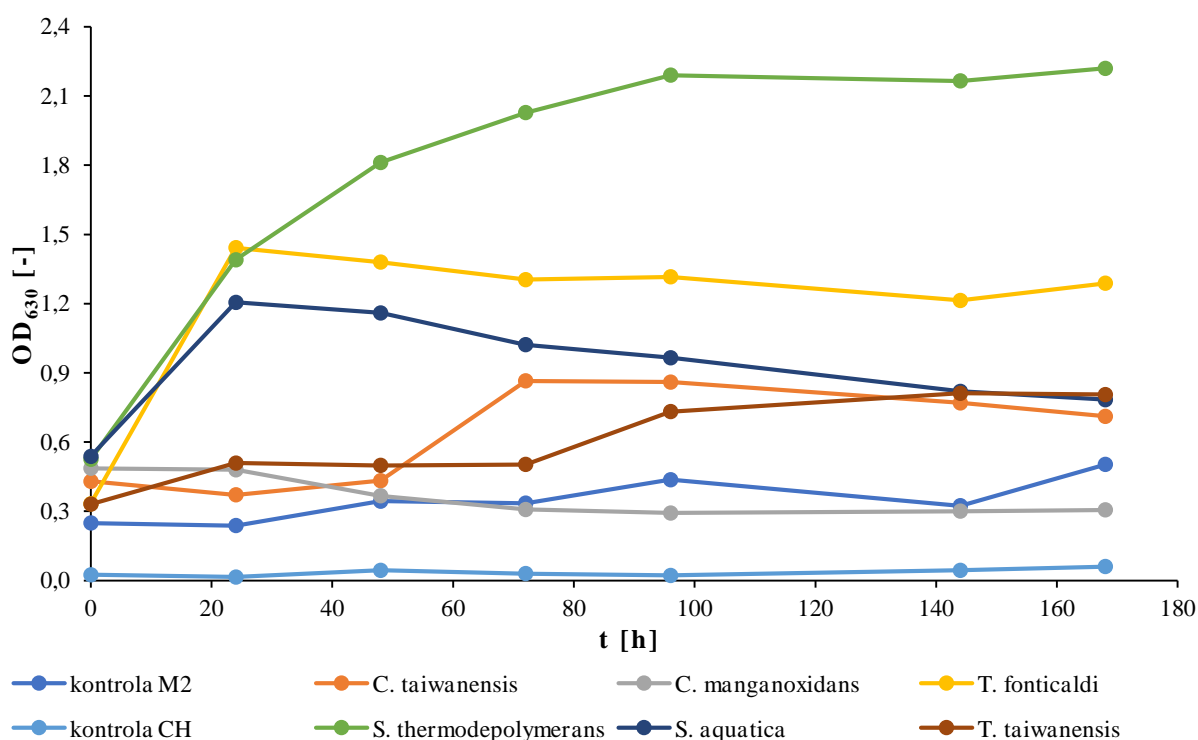
Pro tuto analýzu byly vybrány vzorky před kompostováním a po 4 týdnech kompostování. Vzorky granul byly připevněny k matrici pomocí oboustranné uhlíkové pásky, následně byly pokovovány (Au s příměsí Pd) a nasnímány pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu. Urychlovací napětí elektronů bylo nastaveno na 5 kV.

## 4 VÝSLEDKY MĚŘENÍ A DISKUZE

### 4.1 Analýza submerzního biodegradačního děje

#### 4.1.1 Turbidimetrické stanovení obsahu biomasy

Stanovení obsahu biomasy turbidimetricky není kvantitativním ukazatelem růstu mikroorganismů v submerzním mediu, je však vhodným orientačním vodítkem pro rychlé ověření stavu (stádia růstu), ve kterém se kultury nacházejí. Grafické znázornění naměřené absorbance (zákalu) v čase je analogické k růstové křivce a umožňuje tedy sledování průběhu růstu. Výsledky této analýzy jsou uvedeny v Grafu 1, Grafu 2 a Grafu 3.



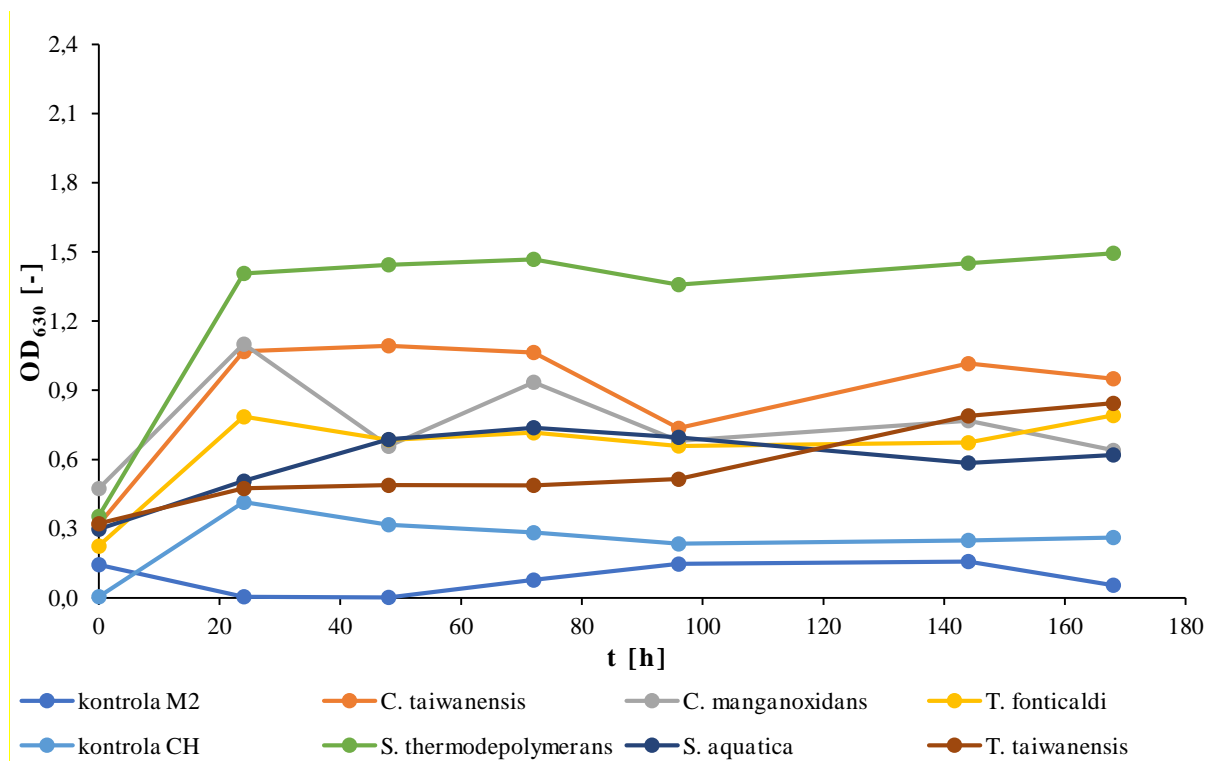
Graf 1 – výsledky submerzní kultivace na PHB

Z Grafu 1 je evidentní, že nejvyšší růst při kultivaci na polyhydroxybutyrátu dosahovala bakterie kmene *Schlegelella thermodepolymerans*. Jak již z názvu kmene plyne, schopnosti této termofilní bakterie spočívají v utilizaci polymerních substrátů. Tato termofilní bakterie byla poprvé izolována z aktivovaného kalu v roce 2004 skupinou profesora Alexandra Steinbüchela (viz [103]). Velkou pozornost si zasloužila díky schopnosti rozkládat kopolymer poly-3-hydroxybutyrát-co-3-merkaptopropionát, který byl do této doby považován za nerozložitelný biopolymer.

Relativně vysoké optické hustoty v maximu dosahují také media s kmeny *T. fonticaldi* a *S. aquatica*. U všech třech zmíněných kmenů lze pozorovat poměrně prudké zvýšení zakalení media po prvních 24 hodinách kultivace, jakoby byla přeskočena adaptační fáze. Důvodem může být velice rychlá adaptace na polymerní substrát na úrovni genové exprese.

Vzhledem k rychlému odeznění fáze prudkého zvýšení zákalu je však možné, že kmeny nejprve spotřebovávaly jinou ze složek média, jako například některou složku extraktu z kvasnic (YE). Je však pravděpodobné, že v takovém případě by byl průběh zakalení medií stejný u všech použitých kmenů. Důležitým aspektem je také vysoká teplota kultivace (50 °C), v důsledku které docházelo k odpařování vody z medií a následně částečnému zakoncentrování medií, tudíž mohlo dojít k zvýšení absorbance touto cestou. Míra odparu vody z medií je však závislá na utěsnění kultivačních baněk použitím špuntů, proto ji nelze generalizovat.

Určitý růst s delší adaptační fází lze pozorovat také v případě kmenů *C. taiwanensis* a *T. taiwanensis*, avšak tento růst není dostačující na to, aby byl očekáván markantní úbytek hmotnosti substrátu (polymeru). Křivky kmene *S. thermodepolymerans* a *T. taiwanensis* vykazují rostoucí trend během celé doby kultivace. Tyto kmeny by tedy teoreticky mohly degradovat polyhydroxybutyrát ve větší míře při delších kultivacích. U ostatních kmenů docházelo po dosažení maxima k pozvolnému úbytku zakalení, což je pravděpodobně zapříčiněno lýzí buněk ve fázi odumírání.



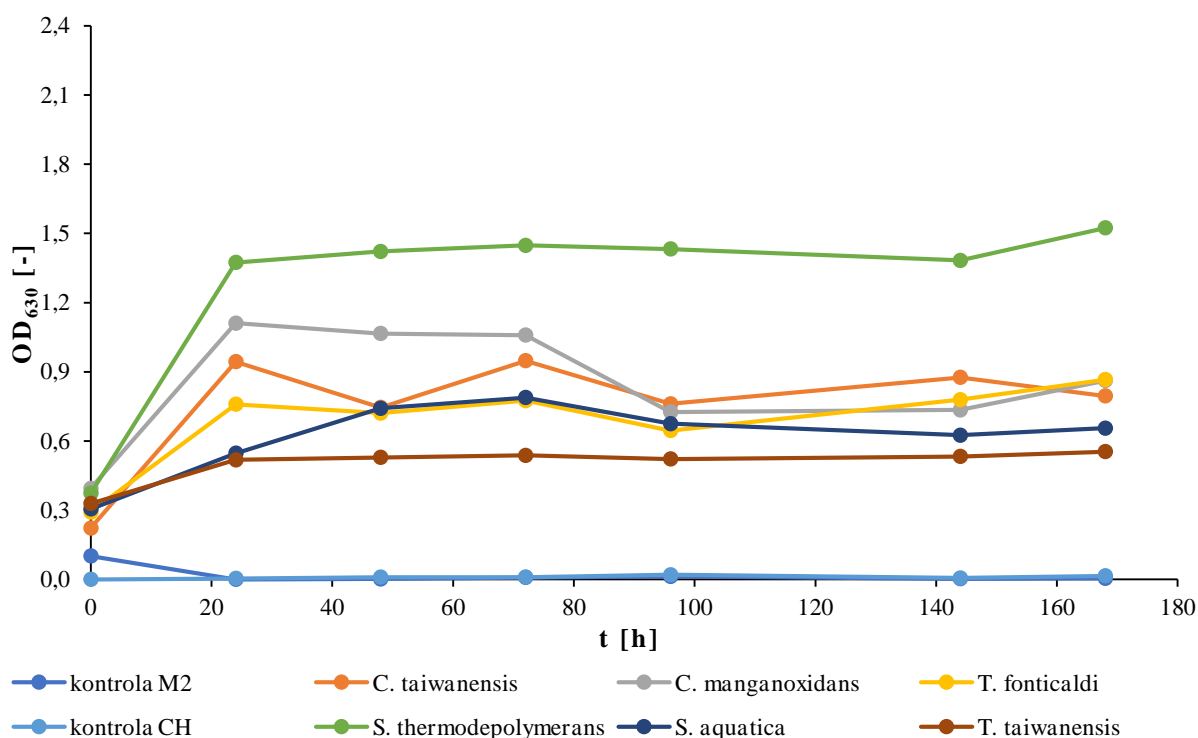
Graf 2 – výsledky submerzní kultivace na amorfním PLA

Výsledky kultivace bakteriálních kmenů na amorfním polylaktátu (Graf 2) ukazují, že nejlepší růst na tomto substrátu vykazuje opět kmen *S. thermodepolymerans*. Znovu lze pozorovat rychlý nástup růstu zákalu bez adaptační fáze a s velice krátkým průběhem této fáze. Avšak absorpční maxima nedosahují tak vysoké hodnoty, jako v případě kultivace na polyhydroxybutyrátu. Navíc se některé hodnoty nejeví spolehlivě, například zákal media s kmenem *C. manganoxidans* po 48 h kultivace nebo *C. taiwanensis* v 96. h kultivace.



U těchto kmenů tedy nelze odhadnout, do jaké míry byl substrát rozložen. V případě kmene *T. taiwanensis* je opět pozorovatelný sice mírný, ale rostoucí trend zakalení po celou dobu.

Při sterilizaci medií s amorfním PLA došlo ke slepení a zakalení původně průhledných granulí polymeru. Vzhledem k teplotám skelného přechodu PLA (viz kapitola 2.1.2, Tabulka 2) je možné konstatovat, že polymer byl sterilací deformován a ztratil své funkční mechanické vlastnosti. Zmenšil se také specifický povrch granulí polymeru, a to mohlo vést ke zpomalení jejich rozkladu.

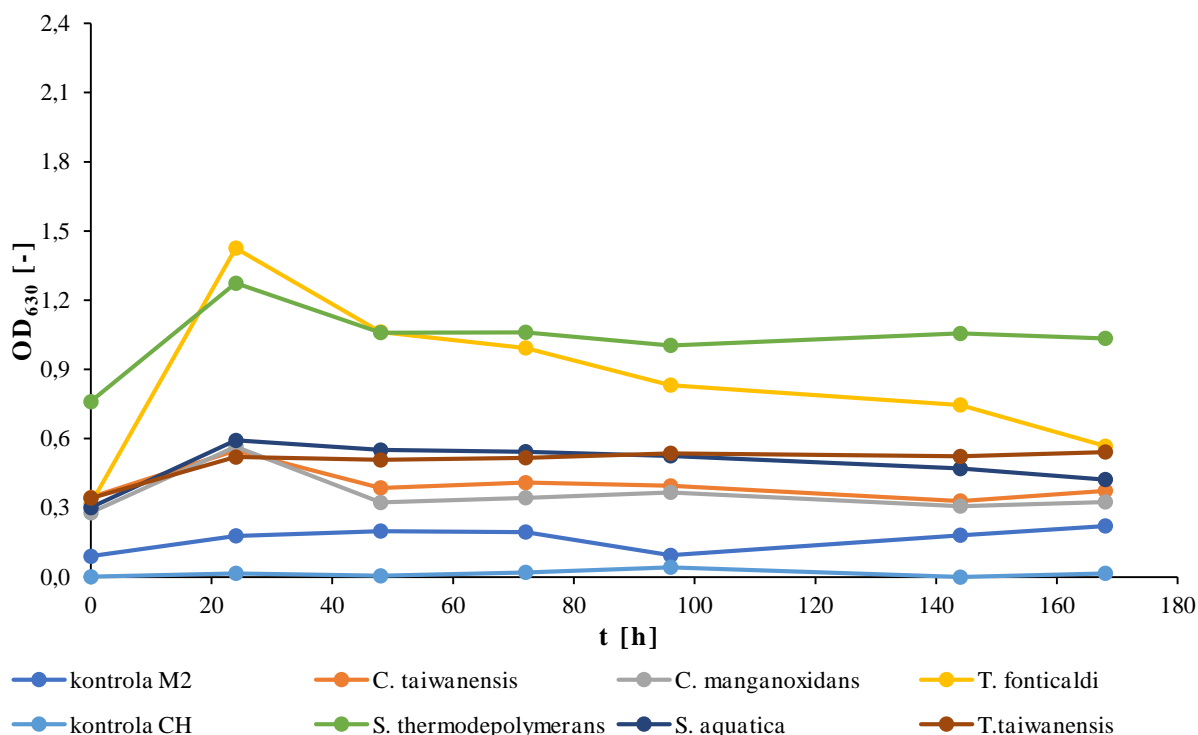


Graf 3 – výsledky submerzní kultivace na semi-krytalickém PLA

Submerzní kultivace na semi-krytalickém polylaktátu (viz Graf 3) probíhala obdobně jako kultivace na amorfním PLA. Průběh nárůstu zákalu media s kmenem *S. thermodepolymerans* je analogický pro kultivace na obou typech PLA, stejný trend lze pozorovat také u kmene *S. aquatica* a *T. fonticaldi*. Prakticky konstantní zákal lze pozorovat u media s *T. taiwanensis*, u kterého zřejmě probíhá dlouhá adaptační fáze. V případě odumírání (lyze) buněk *T. taiwanensis* by se pravděpodobně projevil pokles turbidity. Pro bakterie rodu *Caldimonas* není z uvedených výsledků možné spolehlivě popsat schopnost degradace semi-krytalického PLA.

Pro turbidimetrické stanovení obsahu biomasy byly vedeny také slepé vzorky medií s kulturami (bez polymerního substrátu) při stejných kultivačních podmínkách. Výsledky stanovení turbidity slepých vzorků ilustruje Graf 4. Z těchto výsledků je zřejmé, že nedošlo k žádným relevantním nárůstům použitých kultur bez přítomnosti polymerního substrátu v prostředí. U všech vzorků byl zaznamenán malý nárůst v prvních 24 hodinách kultivace, což mohlo být způsobeno utilizací zbytků inokula. Dále jsou úrovně zakalení medií prakticky konstantní. Hodnoty jsou zároveň jen mírně nižší než hodnoty zákalů medií při kultivacích

na polymerních substrátech a je tedy jasné, že pro zhodnocení míry degradace těchto polymerů je potřebné je dále analyzovat.



Graf 4 – výsledky kultivací slepých vzorků

#### 4.1.2 Gravimetrické stanovení obsahu biomasy

Spolehlivější obraz o růstu kultur poskytují výsledky gravimetrického stanovení obsahu biomasy, které lze interpretovat jako koncentrace biomasy jak je uvedeno v Tabulce 8. Tyto koncentrace biomasy se pohybují v řádech desetin gramů na litr media, což je ve srovnání s kultivací bakterií na snadno utilizovatelných (nízkomolekulárních) substrátech nízká finální výtěžnost. Avšak vzhledem k povaze substrátu a celkovému nastavení testu lze tyto výtěžky biomasy považovat za zajímavé.

Tabulka 8 – koncentrace biomas po kultivacích na polymerních substrátech

Vzorek	Biomasa [g·l <sup>-1</sup> ]		
	Kultivace PHB	Kultivace amorfní PLA	Kultivace semi-krytalické PLA
C. taiwanensis	0,17	0,16	0,25
C. manganoxidans	0,10	0,19	0,25
T. fonticaldi	0,23	0,23	0,22
T. taiwanensis	0,19	0,25	0,20
S. thermodepolymerans	0,86	0,23	0,38
S. aquatica	0,14	0,14	0,18

Výsledky stanovení obsahu biomasy potvrzují, že nejintenzivnější růst ze všech zkoumaných termofilních bakterií vykazuje *S. thermodepolymerans*. Při kultivaci tohoto kmene na PLA je výtěžek výrazně nižší než v případě kultivace na PHB, což může být zdůvodněno přirozeným výskytem PHB v přírodě na rozdíl od PLA.

Některé výsledky naznačují, že se bakteriální buňky na minerálních mediích s polymerním zdrojem uhlíku nemnožili vůbec nebo se množili nepatrně a jejich koncentrace v mediu je tvořena převážně přeživšími buňkami od inokulace. Jako příklad lze uvést koncentraci buněk *C. manganoxidans* při kultivaci na PHB, *C. taiwanensis* při kultivaci na PHB a amorfním PLA nebo *S. aquatica* ve všech provedených kultivacích. Uvedeným kulturám použité substráty zjevně nevyhovují (nebo jim v případě PHB nevyhovuje extracelulární umístění tohoto zásobního polymeru).

#### 4.1.3 Gravimetrické stanovení hmotnostního úbytku polymeru

Výsledky této analýzy lze interpretovat jako procentuální úbytek hmotnosti polymeru, který je vypočítán podle Rovnice 1. Tato hodnota na rozdíl od absolutního hmotnostního úbytku zohledňuje původní hmotnost polymeru.

Rovnice 1 – výpočet procentuálního hmotnostního úbytku polymeru

$$\Delta m_{\%} = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \cdot 100$$

kde  $m_0$  je počáteční hmotnost polymeru,  $m_1$  je hmotnost polymeru po kultivaci a koeficient 100 představuje převedení zlomku na procenta.

Tabulka 9 – výsledky stanovení hmotnostního úbytku PHB po submerzní kultivaci

vzorek	absolutní úbytek [g]	hm. úbytek [%]
<i>C. taiwanensis</i>	0,0233	2,32
<i>C. manganoxidans</i>	0,0172	1,72
kontrola M2	0,0099	0,98
<i>T. fonticaldi</i>	0,0143	1,43
<i>T. taiwanensis</i>	0,0137	1,35
<i>S. thermodepolymerans</i>	0,2245	22,20
<i>S. aquatica</i>	0,0148	1,46
kontrola CH	0,0109	1,07

Hmotnostní úbytek PHB (viz Tabulka 9) jakožto substrátu pro růst bakterie *S. thermodepolymerans* je signifikantně vyšší než úbytek obou použitých PLA (viz Tabulka 10 a Tabulka 11). Je tedy pravděpodobné, že *S. thermodepolymerans* disponuje enzymy schopnými štěpit esterové vazby polyhydroxyalkanoátů s vysokou substrátovou specifitou, neschopné štěpit esterovou vazbu jiného substrátu. Hmotnostní úbytky ostatních vzorků nejsou tak markantní, pohybují se v řádu jednotek procent. Je zjevné, že i ostatní mikroorganismy projevují určitou PHA-depolymerační aktivitou, avšak pravděpodobně

k tomuto účelu využívají méně efektivní enzymy. Je tedy možné, že nedisponují genetickým vybavením potřebným pro utilizaci extracelulárních polyhydroxyalkanoátů anebo nejsou schopny rychlé a efektivní adaptace na tento typ substrátu. V důsledku toho je pravděpodobné, že v přirozeném prostředí bude jejich růst potlačen růstem mikrobiálních kmenů s lepšími adaptačními schopnostmi.

Tabulka 10 – výsledky stanovení hmotnostního úbytku amorfního PLA po submerzní kultivaci

Vzorek	absolutní úbytek [g]	hm. úbytek [%]
C. taiwanensis	0,0023	0,22
C. manganoxidans	0,0023	0,23
kontrola M2	0,0023	0,23
T. fonticaldi	0,0024	0,24
T. taiwanensis	0,0021	0,20
S. thermodepolymerans	0,0025	0,25
S. aquatica	0,0023	0,22
kontrola CH	0,0024	0,24

Z výsledků stanovení hmotnostního úbytku amorfního PLA po kultivaci (viz Tabulka 10) je zřejmé, že tento polymer byl během kultivace rozložen minimálně. Vzhledem k téměř stejnému úbytku hmotnosti u všech kultur i kontrolních vzorků je pravděpodobnější, že substrát se rozkládá bez ohledu na přítomnost bakterií a pro tento děj jejich přítomnost není vyžadována. Stejný efekt je možné pozorovat také na výsledcích stanovení úbytku PLA z kontrolních medií bez zaočkovaných kultur. S ohledem na nerozpustnost PLA ve vodě [91] lze předpokládat, že úbytek jeho hmotnosti je způsoben spíše uvolňováním aditiv z granulí polymeru.

Tabulka 11 – výsledky stanovení hmotnostního úbytku semi-krystalického PLA po submerzní kultivaci

Vzorek	absolutní úbytek [g]	hm. úbytek [%]
C. taiwanensis	0,0014	0,14
C. manganoxidans	0,0021	0,21
kontrola M2	0,0021	0,21
T. fonticaldi	0,0020	0,20
T. taiwanensis	0,0022	0,22
S. thermodepolymerans	0,0012	0,12
S. aquatica	0,0019	0,19
kontrola CH	0,0018	0,18

Ještě menší hmotnostní úbytek byl pozorován u semi-krystalické formy PLA (viz Tabulka 11). Tento výsledek je vzhledem ke hmotnostnímu úbytku amorfního PLA vysvětlitelný tak, že krystalické oblasti polymeru jsou hustější, řetězce polymeru vzájemně sousedí těsněji než v případě amorfních oblastí. V důsledku vyšších Londonových sil je polymer soudržnější a má nižší tendenci ztrácet příměsi. Uvolňování aditiv do media probíhá pomaleji.

Polymery s vyšším obsahem krystalických oblastí obecně představují problém pro depolymerační enzymy, a to kvůli jejich nízké přirozené přítomnosti v přírodě. Z tohoto důvodu lze předpokládat také rychlejší biodegradaci u více amorfních polymerů.

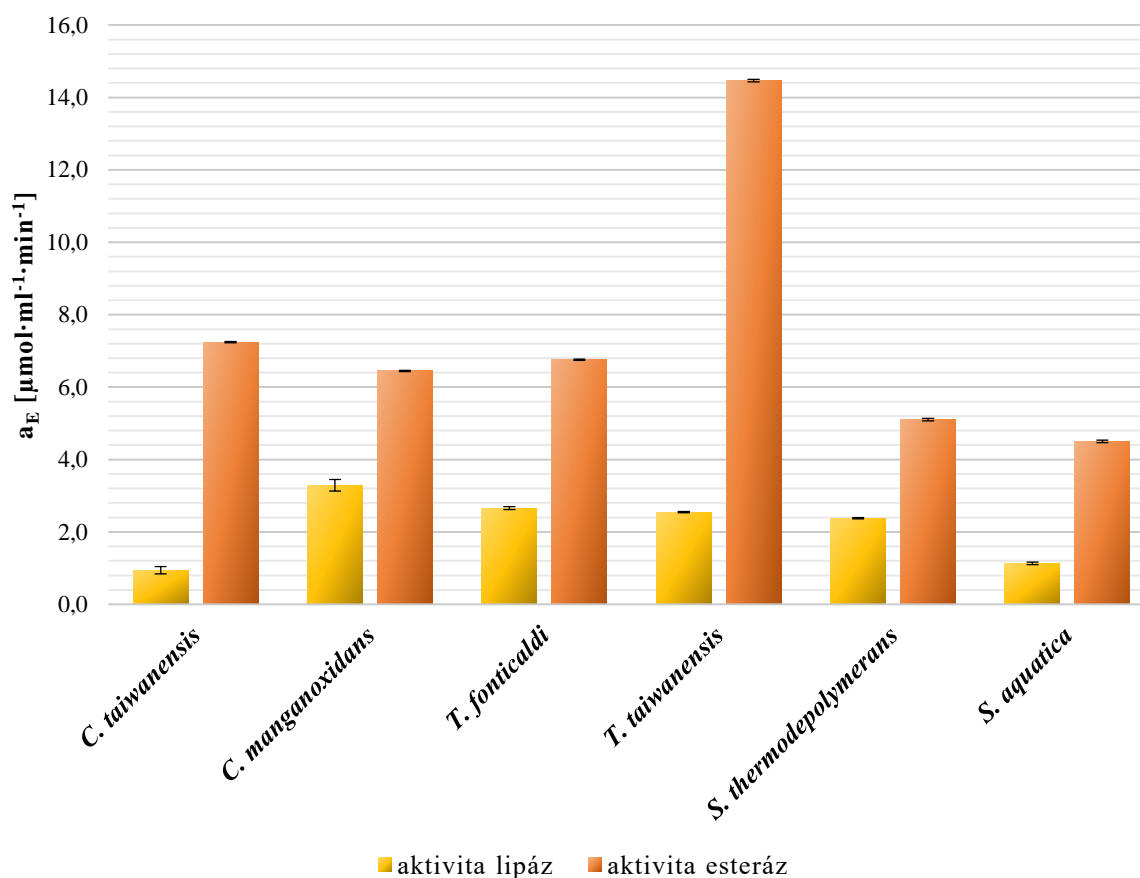
Kontrolní vzorky dosáhly v některých případech většího úbytku než vzorky s kulturami – to může být důsledek menšího uvolňování aditiv do media s kulturami v důsledku vyšší osmotické síly těchto medií, kterou zvyšují mikrobiální produkty a složky inokula, které byly do medií přeneseny během inokulace.

#### **4.1.4 Stanovení aktivity lipáz, esteráz a proteáz**

Schopnost utilizace polymerních substrátů je podmíněna schopností produkce vhodných extracelulárních hydrolytických enzymů. Tyto enzymy mohou disponovat různou specifitou, proto jsou často produkovány různé druhy enzymů současně. V této práci byly jako substráty použity polyestery, proto lze očekávat produkci různých esteráz. Jak již bylo zmíněno, polyhydroxyalkanoáty mohou být štěpeny také některými lipázami (viz kapitola 2.2.2), proto lze očekávat zvýšenou bakteriální produkci extracelulárních lipolytických enzymů při kultivaci na PHB. Vzhledem k povaze vazby mezi jednotkami laktátu v polymerní struktuře je možné, že bakterie produkují lipázy i v přítomnosti PLA v prostředí. Do skupiny esteráz se kromě lipáz řadí také depolymerázy polyhydroxyalkanoátů. Na rozdíl od lipáz PHA-depolymerázy vykazují výrazně vyšší substrátovou specifitu a nejsou schopny štěpit esterovou vazbu lipidů (triacylglycerolů) [47]. Z tohoto důvodu byly očekávány rozdílné výsledky stanovení aktivity esteráz a lipáz. V testovaných systémech dále existují polymerní vazby geometricky značně podobné vazbám esterovým – amidové vazby v polypeptidových řetězcích, a proto lze očekávat také určitou aktivitu proteolytických enzymů při kultivaci na polyesterech.

Získané výsledky poskytují náhled nejen na schopnost utilizace konkrétních substrátů, ale také vypovídají o schopnosti kultur rozeznat povahu nebo typ substrátu v submerzním prostředí. Pro popsání těchto jevů jsou výsledky aktivit všech tří skupin enzymů seskupeny pro jednotlivé kultivace (viz Graf 5, Graf 6 a Graf 7).

#### 4.1.4.1 Stanovení aktivit hydrolytických enzymů po kultivaci na PHB



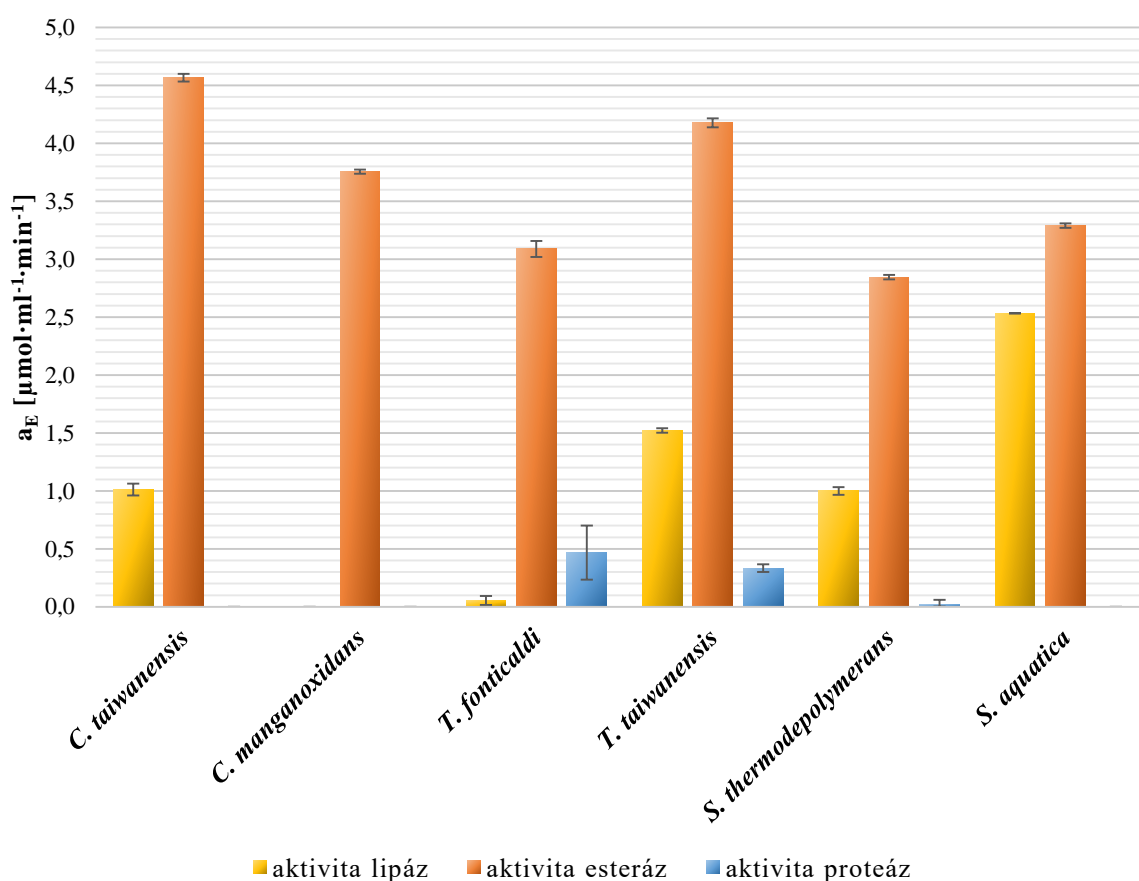
Graf 5 – výsledky stanovení aktivit lipáz a esteráz v mediích s PHB

Z Grafu 5 je patrné, že aktivita lipáz tvoří pouze část celkové esterázové aktivity. Je tedy možné, že některé použité kmeny jsou producenty extracelulárních PHA-depolymeráz, avšak nelze říct, že rozdíl mezi aktivitou lipáz a esteráz tvoří výhradně aktivita těchto enzymů. Esterázy tvoří širokou paletu enzymů s různou specifitou. V některých případech tvoří aktivita lipáz až polovinu z celkové esterázové aktivity. To může být důsledek rozeznání lipofilní povahy substrátu producentem. Proteázová aktivita nebyla ve vzorcích z kultivace na PHB detekována. Monomer 3HB není analogem žádné z kódovaných aminokyselin, což je nevhodným předpokladem pro produkci proteáz v přítomnosti PHB.

Paradoxně k předchozím výsledkům lze pozorovat nejvyšší aktivitu esteráz u kmene *T. taiwanensis* a obou bakterií rodu *Caldimonas*. Tyto bakterie vykazovali nejnižší schopnost růstu na PHB a nezpůsobily ani markantní úbytek hmotnosti substrátu. Je však zřejmé, že se těmito kmenům podařilo rozeznat povahu substrátu a následně začaly produkovat extracelulární esterázy, které však nebyly vhodné pro efektivní hydrolýzu daného substrátu. Naopak, kmen *S. thermodepolymerans* zřejmě produkoval menší množství vysoce specifických esteráz schopných depolymerovat polyhydroxybutyrát, a proto neplýtval energií k produkci nespecifických enzymů pro zvýšení celkové esterázové aktivity.

#### 4.1.4.2 Stanovení aktivit hydroláz po kultivaci na amorfním PLA

Velice rozmanité aktivity esteráz, lipáz a proteáz byly pozorovány u vzorků medií s amorfním polylaktátem (viz Graf 6). Ze zkoumaných skupin enzymů lze opět pozorovat nejvyšší aktivitu esteráz, ve srovnání s kultivací na PHB je však jejich aktivita výrazně nižší. U některých vzorků byla již pozorována malá proteolytická aktivita. Její hodnoty však nejsou významné a jsou zatíženy velkou odchylkou.



Graf 6 – aktivity lipáz, esteráz a proteáz v mediích s amorfním PLA

Obecně pro všechny zkoumané kmeny lze říct, že přítomnost amorfního PLA indukuje produkci extracelulárních esteráz, přičemž lipázy tvoří pouze malý podíl těchto esteráz. Výjimku tvoří kmen *S. aquatica*, kterého lipázová aktivita tvoří zhruba 75 % celkové esterázové aktivity. Po uvážení předešlých výsledků je zřejmé, že *S. aquatica* rozeznává pouze lipofilní povahu amorfního PLA, avšak není schopna produkce extracelulárních hydroláz, které by štěpili tento substrát.

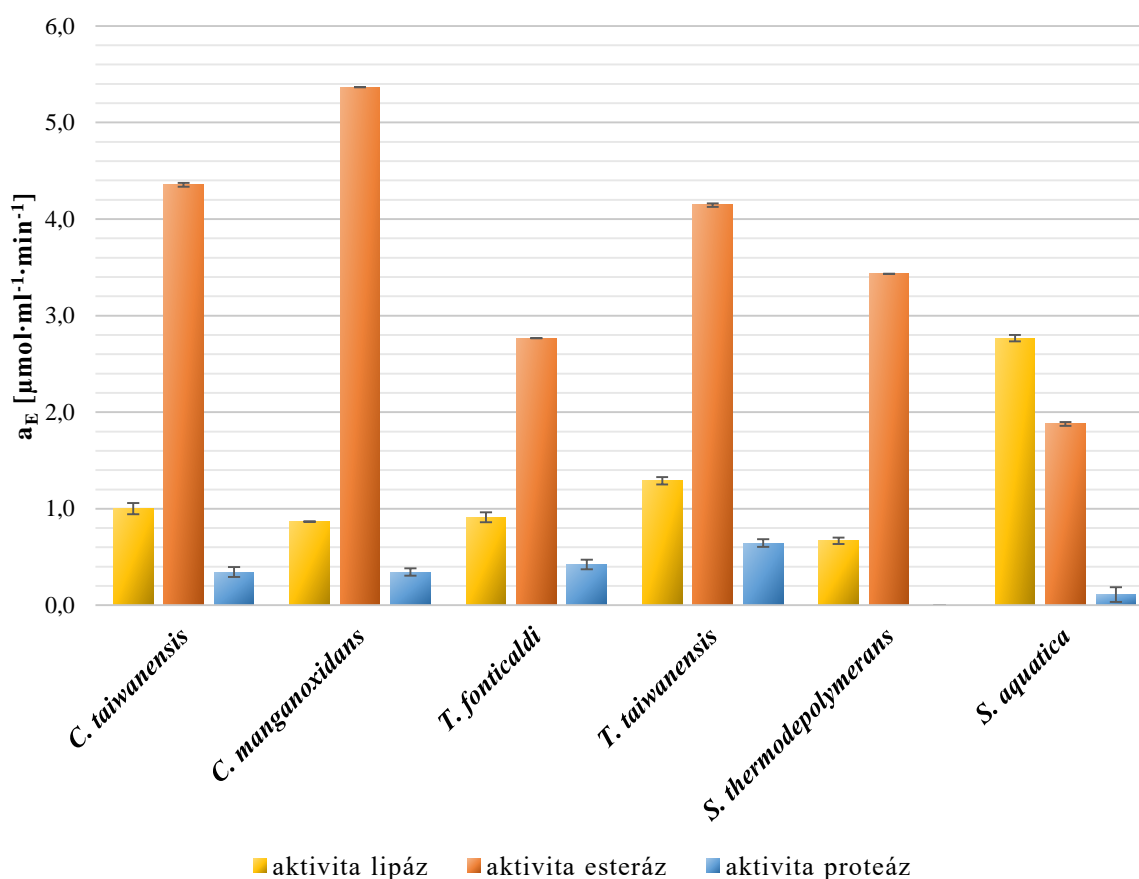
Výsledky aktivit hydroláz produkovaných při kultivaci na amorfním PLA jsou značně překvapivé, očekávána byla vyšší proteolytická aktivita, jak naznačují výsledky dosavadních studií (viz například [63–66]). L-laktát je totiž strukturálním analogem L-alaninu a PLA je častokrát buňkou rozeznán jako polypeptid složený z jednotek této kódované aminokyseliny. Je však možné, že rozeznání tohoto polymeru je značně závislé na jeho vlastnostech (hustota, specifický povrch, podíl krystalických regionů apod.) nebo charakteru aditiv. Další možné

vysvětlení této odchylky od dosavadních studií spočívá v použitých kmelech a jejich rozmanitosti, resp. odlišnosti od ostatních kmenů. Společnými znaky kmenů použitých v této práci jsou nároky na podmínky kultivace. Ani z tohoto důvodu však nelze chování použitých kmenů v přítomnosti stejného substrátu generalizovat.

#### 4.1.4.3 Stanovení aktivit hydroláz po kultivaci na semi-krystalickém PLA

Zajímavější výsledky poskytly stanovení aktivit vybraných hydroláz v mediích se semi-krystalickým polylaktátem. Dosavadní studie se zaměřili především na srovnání stupňů degradace amorfního a částečně krystalického PLA, ne však na stanovení aktivit enzymů produkovaných v jejich přítomnosti (viz [104]).

Výsledky tohoto stanovení (viz Graf 7) naznačují, že při kultivaci termofilních kmenů na částečně krystalickém PLA byla aktivita enzymů mírně vyšší než při kultivaci na zcela amorfním PLA. Lze tedy očekávat stejnou nebo velice podobnou katabolickou represi za přítomnosti obou forem PLA v prostředí. Schopnost vyprodukovaných enzymů štěpit tyto substráty je však minimální (jak naznačují výsledné úbytky polymerů – viz kapitola 4.1.3).



Graf 7 – aktivity lipáz, esteráz a proteáz v mediích se semi-krystalickým PLA

Poměrně vysokou esterázovou aktivitu vykazovalo medium s *C. manganoxidans*. Tomuto kmeni se podařilo dosáhnout také relativně vysokého zakalení media při kultivaci na semi-krystalickém PLA. Vzhledem k nízkému hmotnostnímu úbytku PLA při této



kultivaci (viz Tabulka 11) je zřejmé, že tyto esterázy nejsou vhodnými hydrolázami pro utilizaci semi-krystalického polylaktátu.

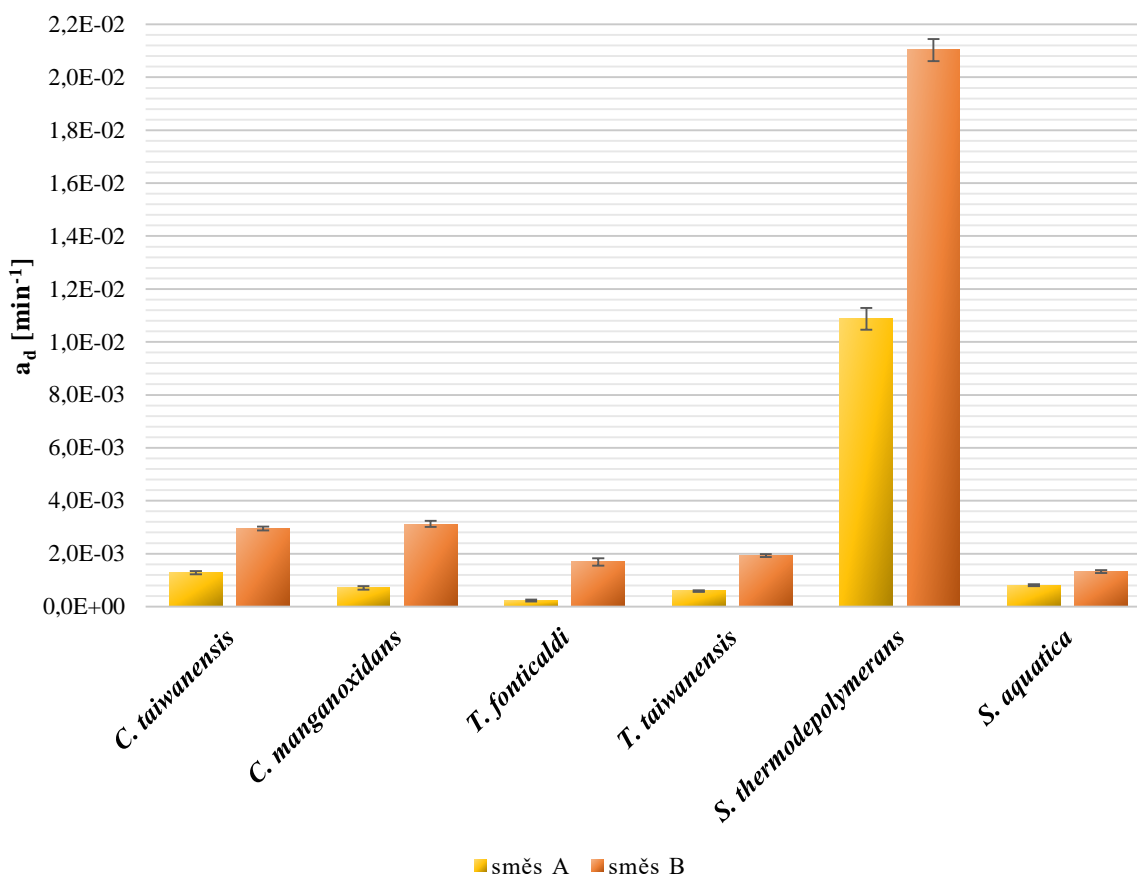
Při kultivaci na semi-krystalickém PLA tvoří opět aktivita lipáz menší část z celkové esterázové aktivity, výjimkou je však kuriózně vyšší aktivita lipáz než aktivita esteráz v případě *S. aquatica*. Je pravděpodobné, že při stanovení jedné z těchto dvou hodnot došlo k chybě. Je však také možné, že veškeré esterázy vyprodukované touto bakterií byly lipázy, kterých aktivita vůči p-nitrofenylacetátu je nižší než vůči p-nitrofenylpalmitátu.

#### **4.1.5 Stanovení množství laktátu v mediích po kultivaci na PLA pomocí IC**

V mediích po kultivacích na obou formách PLA nebyl detekován žádný laktát. Je však pravděpodobné, že i přes možnou PLA-depolymerační aktivitu zkoumaných bakteriálních kmenů by byla spotřeba laktátu buňkami tak rychlá, že by nedocházelo k akumulaci tohoto produktu hydrolýzy PLA ve větších množstvích v prostředí media.

#### **4.1.6 Stanovení PHB-biodegradační aktivity vybraných kmenů**

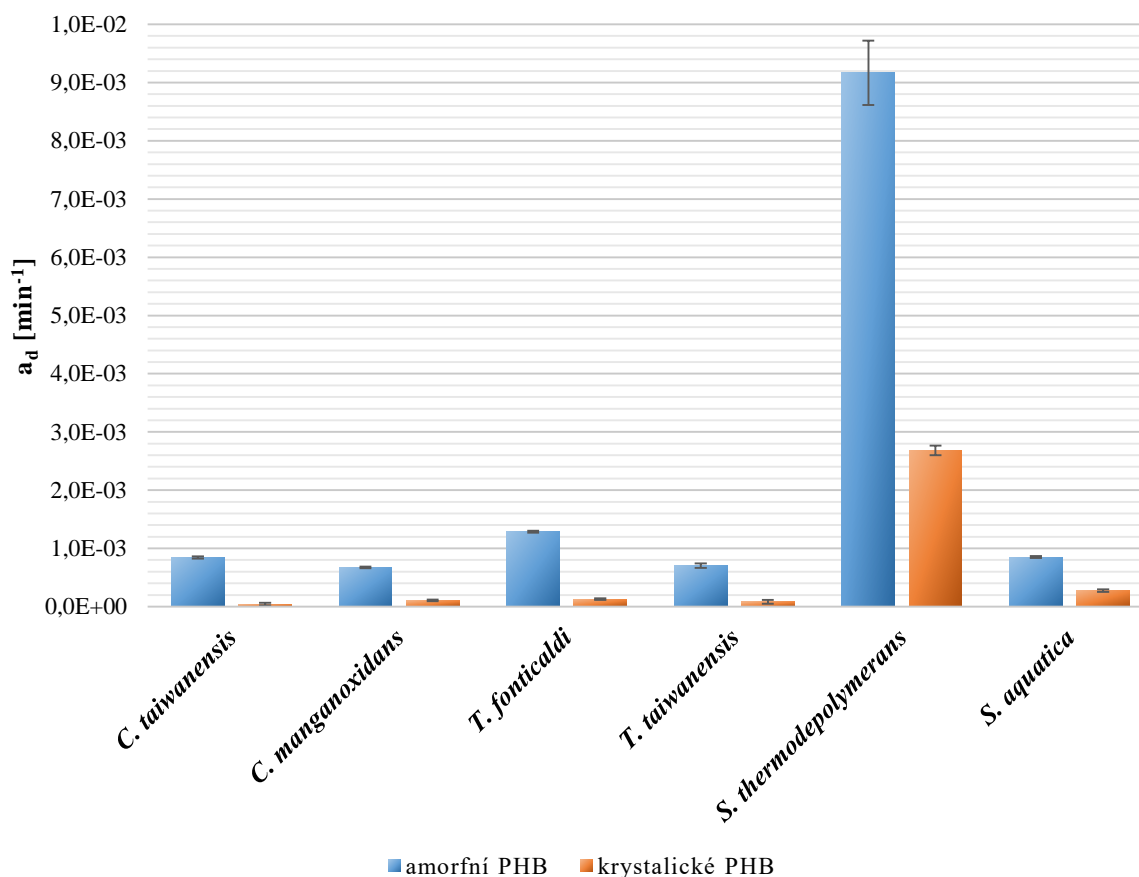
Stanovením rychlosti rozkladu polyhydroxybutyrátu při enzymatické reakci lze také určit aktivitu PHA depolymeráz [105]. Pro tento účel je však nutné depolymerázy purifikovat. V provedeném experimentu byl použit supernatant z medií obsahující pestrou enzymatickou směs, která pravděpodobně obsahuje i více enzymů rozkládajících PHB. Záměrem této práce je prozkoumání biodegradability použitých materiálů v pokud možno co nejreálnějším prostředí a také prozkoumání biodegradačního potenciálu vybraných bakteriálních kmenů. Proto omezení degradačního děje aktivitou výhradně PHA depolymeráz v této práci není relevantní a použitý supernatant bez jakékoliv úpravy byl vnímán jako vhodný zdroj enzymů degradujících PHB. Výsledky této analýzy jsou shrnuty v Grafu 8 a Grafu 9, degradační aktivita je vyjádřena jako změna absorbance za 1 min reakce a za podmínek testu.



Graf 8 – výsledky stanovení PHB-biodegradační aktivity vůči amorfnímu PHB (směr A – 5 555-krát ředěn; směr B – 2 222-krát ředěn)

Celým provedeným experimentem je možné pozorovat hned několik dějů. Již z prvního z provedených testů (viz Graf 8) je zřejmé, že mezi zkoumanými kmeny disponuje největším PHB-biodegradačním potenciálem *S. thermodepolymerans*, které degradační aktivita zhruba devítinásobně přesahuje degradační aktivitu ostatních zkoumaných kmenů. Vzhledem k výsledkům dosavadních studií o PHB-degradační aktivitě tohoto kmene (viz [59, 106]) lze předpokládat, že pozorovaný děj byl zapříčiněn převážně specifickými PHA-depolymerázami.

Uvedené výsledky dále evidentně naznačují, že stanovení přesné hodnoty depolymerační aktivity je ovlivněno dostupností substrátu. Směr A představuje více ředěný substrát a degradující enzymy tedy nebyly plně saturovány tímto substrátem. Popsaná situace představuje obecnou mezeru této metody stanovení depolymerační aktivity [105]. Pro přesnější určení takového parametru by bylo nutno hlouběji studovat kinetiku těchto procesů, což však není předmětem této práce. Pro komparativní hodnocení biodegradačního potenciálu zkoumaných bakteriálních kmenů tyto přístupy plně postačují.



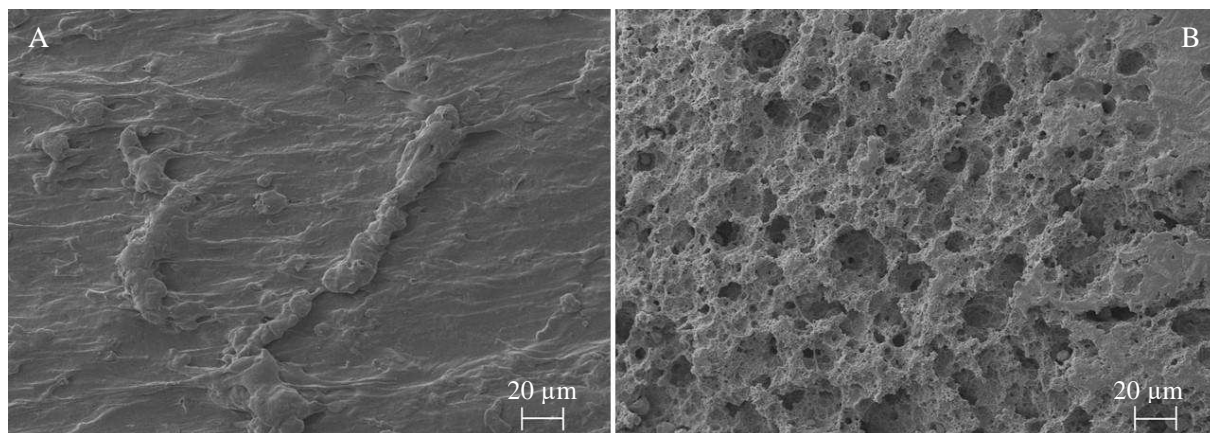
Graf 9 – výsledky stanovení PHB-biodegradační aktivity vůči amorfnímu a krystalickému PHB

Další význam této analýzy spočívá v porovnání biodegradability odlišných forem extracelulárního polyhydroxybutyrátu. Výsledky uvedené v Grafu 9 indikují, že zkoumané kmeny přednostně rozkládají amorfni formu PHB, zatímco krystalická forma PHB je vůči biologické degradaci stabilnější. V případě extracelulárního polyhydroxybutyrátu je očekáván větší výskyt krystalických regionů než v intracelulární formě, která je bakteriemi produkována v amorfni formě. Předpokládá se, že extracelulární depolymerázy jsou schopny degradovat i PHA s vyššími stupni krystalinity [107]. Bylo však také zjištěno, že vyšší stupně krystalinity PHA potlačují jejich biodegradaci [107]. Dále Iwata a spol. zjistili, že degradace krystalického PHB probíhá exogenně, což omezuje degradaci na konce řetězců krystalických regionů [108]. To by mohlo vysvětlovat získané výsledky. Také se domníváme, že krystalické PHB je obtížně degradovatelné jinými esterázami, které však vůči amorfni PHB mohou být aktivnější. Je tedy zřejmé, proč byla v tomto experimentu detekována nižší degradační aktivita vůči krystalickému PHB.

Srovnáním jednotlivých výsledků tohoto stanovení lze dále konstruovat stejné závěry jako v předešlých analýzách submerzního experimentu – z použitých bakteriálních kmenů je pro submerzní biodegradaci PHB nejvhodnější kmen *S. thermodepolymerans*. Ostatní zkoumané kmeny nevykazují významnější biodegradační potenciál polyhydroxybutyrátu.

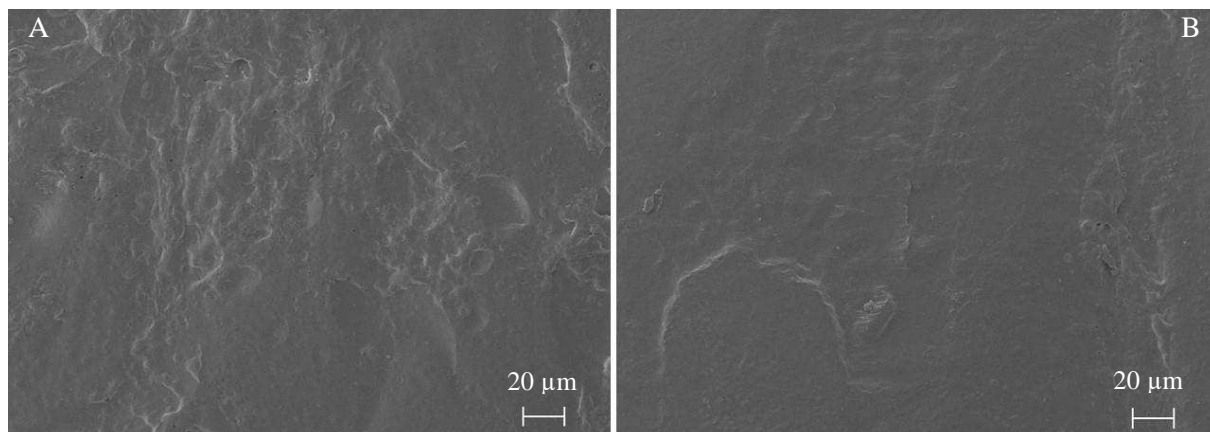
#### 4.1.7 Snímání povrchu polymerů pomocí SEM

Pro analýzu povrchu polymerů po kultivaci byly vybrány pouze vzorky z kultivací kmene *S. thermodepolymerans*. Výsledky jsou uvedeny v následujících snímcích (viz Obrázek 9, Obrázek 10 a Obrázek 11), jako porovnání kontrolního vzorku (kultivován bez kultur) a vzorku po kultivaci uvedeného kmene.



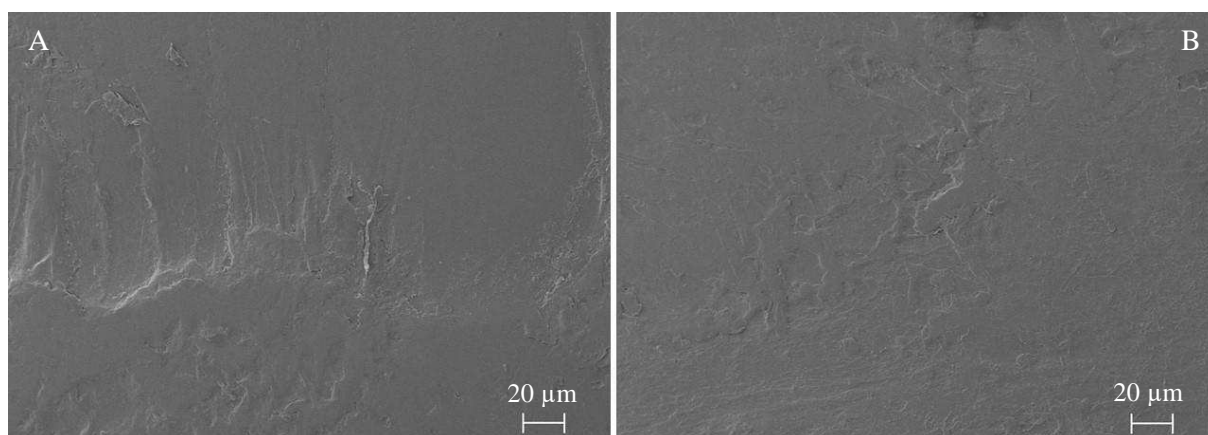
Obrázek 9 – snímky povrchu PHB kontrolního vzorku (A) a vzorku po kultivaci (B), přibližení 1 000x

Ze snímku povrchu PHB je patrné, že došlo k částečné degradaci materiálu. Dezintegrace povrchu polymeru naznačuje mechanismus biodegradace – povrchovou enzymatickou erozi, jaká již byla popsána v několika studiích (viz například [96, 97]).



Obrázek 10 – snímky povrchu amorfního PLA kontrolního vzorku (A) a vzorku po kultivaci (B), přibližení 1 000x

Povrch amorfního PLA je očividně neporušený (viz Obrázek 10), což naznačuje, že nedochází k biodegradaci tohoto materiálu v submerzním prostředí za přítomnosti *S. thermodepolymerans*. Tento výsledek koreluje s výsledky stanovení hmotnostního úbytku polymeru po kultivaci.



Obrázek 11 – snímky povrchu semi-krystalického PLA kontrolního vzorku (A) a vzorku po kultivaci (B), přiblížení 1 000x

Stejného závěru, jaký byl vyvozen pro amorfní formu PLA lze diskutovat také v případě semi-krystalické formy tohoto polymeru. Svědčí o tom snímky uvedené na Obrázku 11, na kterých nelze pozorovat žádné změny v povrchu materiálu po kultivaci. Je zřejmé, že tento materiál je rezistentní vůči činnosti specifických enzymů produkovaných kmenem *S. thermodepolymerans* pro depolymeraci PHB. Druhou variantou vysvětlení těchto výsledků je neschopnost *S. thermodepolymerans* adaptace na PLA, respektive rozpoznání polyesterového charakteru tohoto substrátu.

## 4.2 Biodegradace biopolymerů v kompostu

### 4.2.1 Popis parametrů kompostovacího experimentu

Celý kompostovací experiment byl navržen za účelem simulace prostředí skládky odpadu biologického původu, jednotlivé kompostovací reaktory reprezentují samostatně vedené hromady, které nejsou na sobě vzájemně závislé. Zavedení těchto reaktorů lze považovat za downscale proces vhodný pro charakterizaci a popis dějů probíhajících samovolně také v makroměřítku. Pro tento účel existuje celá řada norem navrhuje různé postupy a metody analýzy procesu kompostování. V rámci této práce byl zvolen jiný přístup ke studované problematice, a to jak z pohledu analytických metod, tak z pohledu inženýrských postupů.

V první řadě je nutno poukázat na rozdílnou formu polymerních artiklů použitých pro studium degradace biopolymerů. Dosud publikované studie využívají k popisu biodegradčního procesu převážně tenké filmy a fólie studovaných polymerů (viz [96–99]) nebo dokonce výrobky z těchto materiálů, jako například láhve (viz [101]). Všechny tyto zmíněné formy polymerů představují téměř ideální artikly pro povrchovou biodegradaci (erozi) díky svým velkým poměrům povrchu a objemu.

Proto byl v této práci použit granulát polymerních materiálů reprezentující určitou formu dezintegrovaného odpadu prakticky jednotné velikosti. Díky tomu lze vzájemně srovnávat biodegradaci zkoumaných biopolymerů bez ohledu na rozdílné hodnoty jejich

specifických povrchů. Na druhou stranu je zřejmé, že tento faktor signifikantně ovlivňuje biodegradaci a znevýhodňuje tak výsledky této práce.

Dále je nutné poukázat na způsob umístění polymerních artiklů do prostředí kompostu ve formě propustných pytlíků. To je poměrně netradiční forma aplikace, která limituje větší distribuci degradovaného materiálu do celého objemu kompostu. Avšak je možné materiál kdykoliv odebrat a analyzovat, což umožňuje mapování průběhu degradace. Částečné zanoření pytlíků s polymery do vsádky kompostu zlepšovalo kontakt materiálu s kompostovací hmotou, a tím byla částečně kompenzována nedostatečná distribuce artiklů v kompostu.

V neposlední řadě je důležitým faktorem biodegradace také počáteční stupeň zatížení kompostu degradovaným materiálem, který byl v této práci nastaven na 10 hmot. %, což je řádově vyšší zatížení, než je navrhováno normou IS/ISO 20200. Z těchto důvodů je srovnání výsledků interpretovaných v této práci s výsledky dostupných studií poněkud komplikované, což je však vzhledem k pilotnímu charakteru provedeného experimentu očekávané.

## **4.2.2 Hodnocení údržby a režimu kompostování**

Pozorování a hodnocení vlastností kompostu je klíčovou částí péče usměřující veškeré exekutivní kompostovací operace. Tyto operace následně ovlivňují podstatné vlastnosti kompostu, jako například vlhkost nebo vzdušnost hmoty, což významně ovlivňuje degradační procesy. Stav a průběh kompostování se odvíjí od zkušeností operátora, které lze získat pouze prakticky. Proto mají tato pozorování pro nás vysokou relevanci, považujeme je také za zajímavé a klíčové pro zhodnocení biodegradačního procesu.

Všechny tyto prováděné operace odlišují kompostovací experimenty od běžného domácího kompostování, které lze vzhledem k častému vynechání těchto operací označit spíše za skladování biologického odpadu.

### **4.2.2.1 Zavlažování kompostu**

Je bezpochyby zřejmé, že pro realizaci biologických procesů je nezbytná dostupnost vody jakožto přirozeného prostředí. Při kompostování je právě vlhkost nejčastěji podceněným nebo úplně zanedbaným parametrem, proto byla zavlažování věnována velká pozornost. V rámci prvního kompostovacího testu byl kompost nejdříve zavlažen tak, aby přidaná voda tvořila 55 % hmotnosti vsádky dle pokynů normy IS/ISO 20200. Po dobu týdne byl kompost zavlažován pomocí stříčky téměř každý den. Během tohoto týdne nedocházelo k větším změnám zbarvení nebo pachu kompostu a kompost se lokálně vysušoval. Proto byl dále používán rozprašovač, který umožnil preciznější zavlažení celého povrchu vsádky. Pach bylo možné popsat jako kyselý zápach podobný vlhkému senu a také bylo cítit krmivo pro králíky. Během dalšího týdne se podařilo zintenzivnit biologické procesy, což se projevilo na změnách v pachu a zbarvení vsádky. Zápach začínal připomínat hnilobné procesy, pozorovatelné byly pachy odpadní vody nebo kalu. Ve třetím týdnu byl kompost přelit, to znamená, že se na dně reaktoru vyskytovala volná voda a stlačením části kompostu docházelo k uvolnění dalšího množství vody. To může mít negativní vliv na přístup kyslíku k některým částem vsádky. Na druhé straně se však zvýšila aktivita vody a zlepšila se také přístupnost živin pro

mikrobiom, což mělo za následek zintenzivnění veškerých biologických procesů včetně nežádoucích anaerobních dějů. Následkem toho došlo k zintenzivnění zápachu a ztmavnutí kompostu. Zápach bylo možné popsat jako pach odpadní podestýlky, odpadní vody nebo kalu, kyselost mírně ustoupila a nahradili ji nepříjemné pachy sirných sloučenin. To může indikovat přítomnost sulfát redukujících bakterií. Rovněž bylo možné pozorovat výrazný rozvoj plísňových kultur, a to jak v pachu, tak vizuálně na povrchu vsádky (popsáno dále). Zbarvení bylo tmavě zelené až hnědé, připomínající bahno.

Vývoj druhého kompostovacího experimentu byl pozvolnější. Ze začátku byl kompost zvlhčen stejným způsobem dle pokynů normy. Dále byl kompost zavlažován dle pokynů normy (viz Tabulka 7). V prvním týdnu byla vlhkost optimální, tedy kompost nebyl vysušen ani nedocházelo k hromadění volné vody na dně reaktoru. V druhém týdnu došlo k lehkému vysušení kompostu, což zpomalilo biologické procesy. Zápach nebyl tak intenzivní ani nepříjemný jako v případě kompostu ve druhém týdnu prvního testu, bylo cítit krmivo pro králíky. Ve třetím týdnu se však zápach zvýraznil a objevily se v něm náznaky plísní. Přítomnost plísní je v prvních týdnech kompostování velice důležitá poněvadž jsou tyto mikroorganismy významnými producenty extracelulárních hydroláz štěpících polymerní struktury jako polysacharidy (celulózu, lignocelulózy, škroby) nebo bílkoviny. Po zpřístupnění této formy uhlíku nastupuje rozvoj bakteriálních kultur využívajících štěpné produkty nebo jiné nízkomolekulární látky dostupné z dezintegrované hmoty. V tomto ohledu se druhý kompostovací experiment vyvíjel správně. Ve čtvrtém týdnu testu došlo k mírnému přelití, které však nemělo dopad na pozorovatelné vlastnosti kompostu.

#### **4.2.2.2 Aerace kompostu**

Zpracování biologického odpadu kompostováním je obecně aerobní proces a vyžaduje tedy přítomnost velkého množství kyslíku. Veškeré hnilobné procesy způsobené nedostatkem kyslíku jsou považovány za nežádoucí a projevují se uvolňováním nepříjemných pachů. Pro jejich zamezení je potřebné zajistit dostatečnou aeraci vsádky, to se v praxi provádí přehazováním hromad kompostu, pro laboratorní kompostovací testy je tato operace zajištěna mícháním. To zajišťuje také homogenizaci vsádky, respektive hromady.

V provedeném experimentu byla aerace zajištěna mícháním kovovou lžičkou, během této operace došlo k zpřístupnění spodních – vlhčích částí kompostu pro vzduch a došlo též k distribuci přítomné vláhly (vody) napříč celé vsádky. Frekvence této operace tedy měla vliv také na vlhkost určitých částí kompostu, ale dále také na dostupnost polymerního materiálu pro příslušné hydrolázy. Častým mícháním také dochází k distribuci a smíchání různých mikrobiálních kultur, což také ovlivňuje degradaci zkoumaných materiálů. V prvním kompostovacím testu byla aerace (míchání) prováděna pouze jednou za týden. Tento postup byl shledán za nesprávný, protože vedl k nepříjemnému zápachání kompostu, které bylo pozorováno již od druhého týdne. Z tohoto důvodu byl pro druhý kompostovací experiment zvolen postup popsáný v normě IS/ISO 20200 (viz Tabulka 7). Během druhého kompostovacího experimentu byl pozorovatelný nepříjemný zápach pouze u některých reaktorů (například kontrolní reaktory bez polymeru), a to pouze v malé míře. Je nutné poznamenat, že míchání kontrolních reaktorů bylo snadnější než míchání vsádek s polymerem,

proto lze předpokládat, že aerace proběhla ve větší míře. V důsledku toho se zrychlily biologické procesy, které vyžadovaly pořád více kyslíku, který však byl dostupný pořád ve stejné míře. Dále proto mohly nastoupit anaerobní procesy ve větší míře než v případě kompostů s polymery, v rámci kterých ještě probíhala adaptace na polymerní substrát.

Celkově lze zhodnotit druhý kompostovací experiment za lépe provedený z hlediska aerace i zavlažování. Dostupnost kyslíku a vlhkost kompostu spolu vzájemně souvisejí a vzájemně se ovlivňují. Zanedbání jednoho z uvedených faktorů má za následek narušení druhého, což vede k obtížné udržitelnosti systému.

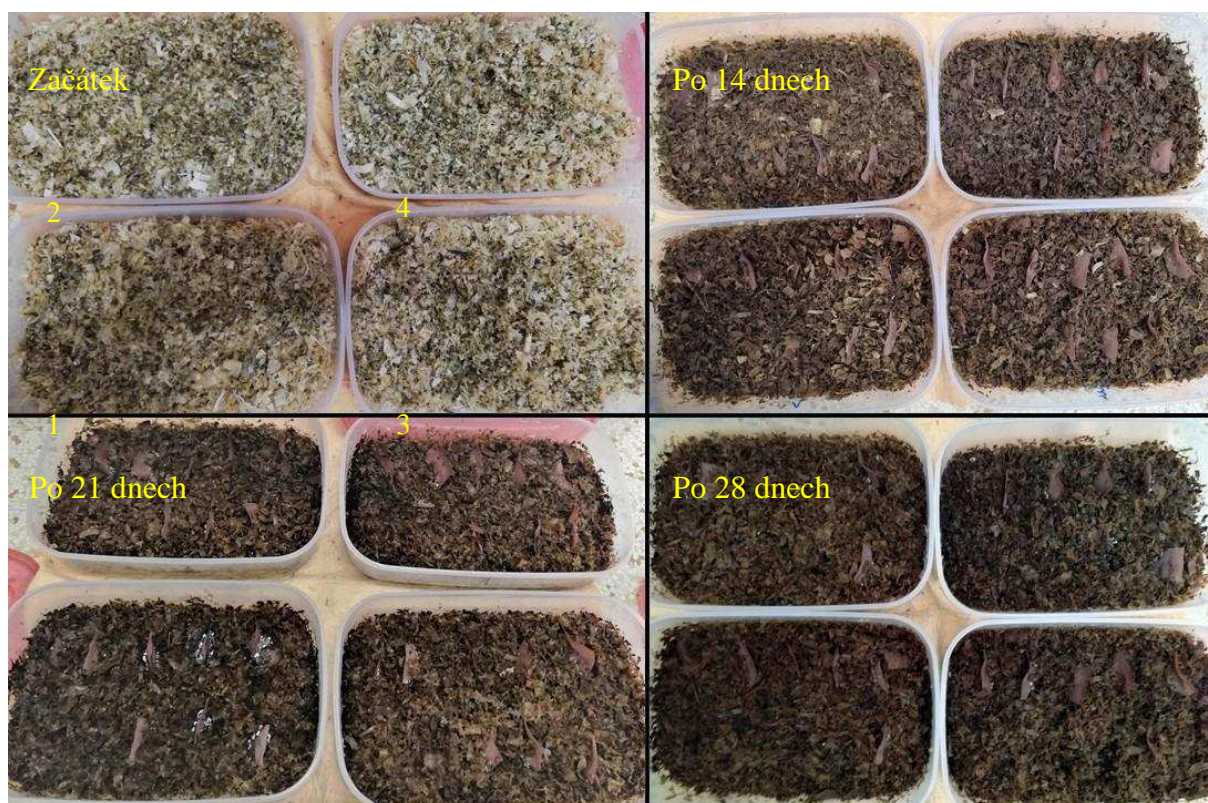
#### **4.2.2.3 Pozice kompostovacího reaktoru v inkubátoru**

Tento faktor je záležitostí výhradně laboratorního kompostování, ve velkoobjemovém kompostování, které probíhá zpravidla v exteriéru, hrají úlohu jiné povětrnostní podmínky, kterým jsou hromady vystaveny. Rozdílné pozice reaktorů v inkubátoru zajišťují různé lokální podmínky, které se od sebe mohou vzájemně lišit v malé míře. Inkubátor byl složen z 3 pater, které byly plně obsazeny – každé patro čtyřmi reaktory. Inkubátor byl vyhříván zespodu (dnem inkubátoru), na kterém byly umístěny odparníky vody pro zvlhčení celého prostoru. V zadní stěně reaktoru byl otvor pro zajištění přívodu vzduchu, pro větší zavzdušnění byl však inkubátor ponechán otevřený po dobu provedení zavlažování a míchání (tyto operace byly provedeny mimo inkubátoru). Je tedy zřejmé, že vlhkost a teplota se mohla napříč prostorem inkubátoru lišit, obzvláště v době, kdy byl inkubátor otevřený. V důsledku toho mohlo docházet k rozdílné intenzitě odpařování vody z reaktoru, vysušování jeho vsádky nebo jeho zahřátí. Pozice reaktorů byly pravidelně střídané, jednou za týden byl proveden posun reaktorů na vyšší patro (reaktory z nejvyššího patra pak přesunuty na spodní) a každý druhý den byly vyměněny pozice reaktorů v rámci patra. I přes tyto změny pozic reaktorů byly pozorované rozdíly ve výše popsaných jevech, a to zejména intenzivnější odpar vody (vysychání) v reaktorech umístěných na středním a vrchním patru nebo také vysychání reaktorů při dveřích inkubátoru. Objektivní zhodnocení dynamiky těchto jevů a míry jejich dopadu na biologické procesy probíhající uvnitř reaktorů je poměrně náročné a vyžaduje samostatný experiment. Pro hodnocení dalších výsledků této práce je důležité uvědomit si, že i tento faktor má vliv na výsledky studovaného procesu, tedy samotné biodegradace.

#### **4.2.3 Vizuální hodnocení kompostu**

Pozorováním vzhledu kompostu lze do určité míry také hodnotit intenzitu biologických procesů, které ve vsádce probíhají. Vzhled nebo především zbarvení kompostu může naznačovat stádium oxidace některých složek kompostu. Během kompostování lze pozorovat zejména hnědnutí v důsledku enzymatické oxidace polyfenolů, tento jev je známý jako enzymatické hnědnutí. Jak již bylo naznačeno, změny vzhledu kompostu, se odvíjejí také od jeho celkové údržby. V této kapitole jsou uvedeny snímky kompostů v zajímavých momentech experimentu.





Obrázek 12 – vizuální průběh druhého kompostovacího experimentu, reaktory 1–4

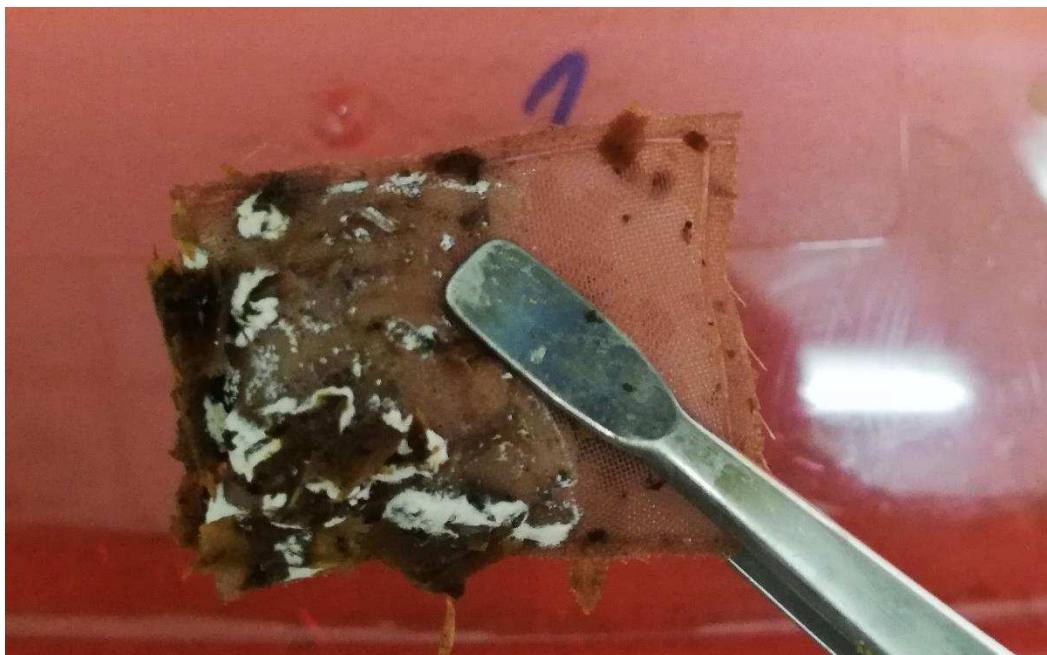
Průběh změny zbarvení kompostu je ilustrován na Obrázku 12. Po 7 dnech kompostování se zbarvení nelišilo od začátku experimentu, proto není snímek z této doby uveden. Tyto reaktory reprezentují jedno patro, v rámci kterého byl vzhled kompostů prakticky stejný.

Na dalším snímku (viz Obrázek 13) je možné pozorovat další zajímavý jev, a to rozvoj plísňových kultur ve vsádce kompostu v reaktoru s PHB. Rozvoj se projevil vytvořením bílých map na povrchu vsádky, jakoby byla vsádka bílou poprášena. K tak intenzivnímu projevu růstu plísní došlo pouze v jediném reaktoru ve třetím týdnu prvního kompostovacího experimentu. V důsledku tohoto děje došlo ke zvýraznění plísňového zápachu této vsádky.



*Obrázek 13 – rozvoj plísňových kultur v reaktoru 1 (prvního kompostovacího testu) ve 3. týdnu testu*

K projevům růstu plísní došlo také na některých pytlících s polymerem v průběhu obou testů. Lze tedy předpokládat, že tyto plísně byly schopné růstu na degradovaných polymerních materiálech. Rozvoj plísní informuje o dobrém stavu kompostu, respektive o průběhu biologických procesů ve správném (požadovaném) pořadí. V posledním týdnu experimentu bylo již možné pozorovat plísňový růst na povrchu téměř všech pytlíků s PHB a několika pytlíků s oběma formy PLA napříč všemi reaktory. Tento jev je možné pozorovat na Obrázku 14.



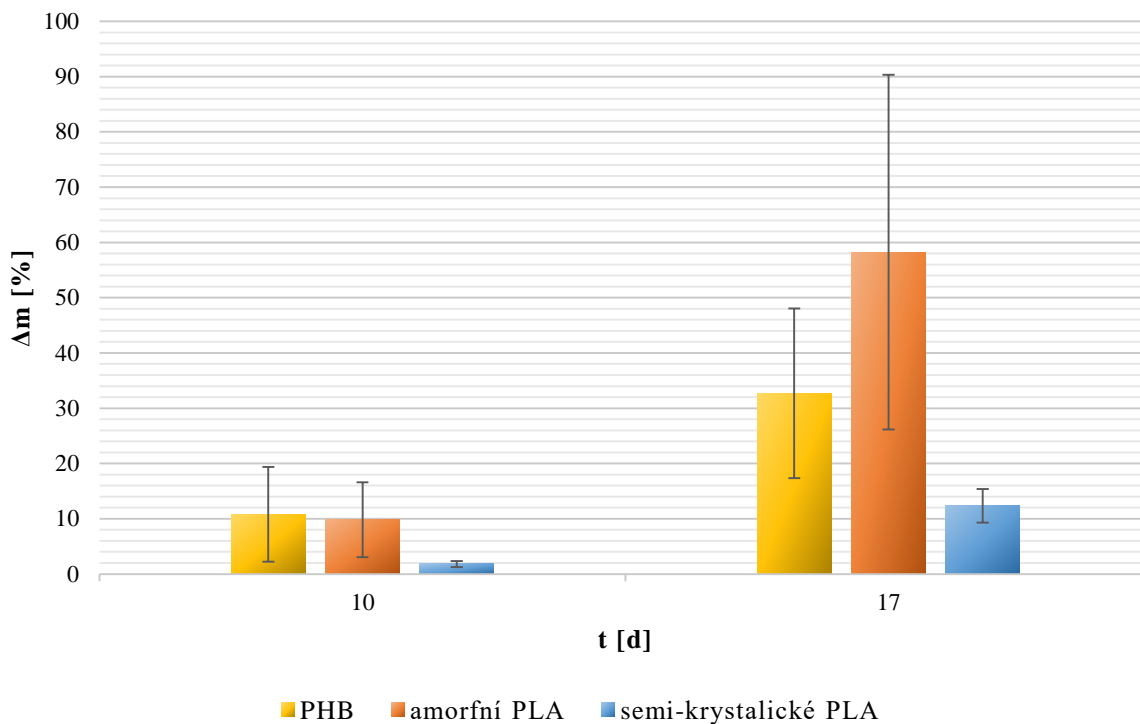
Obrázek 14 – rozvoj plísni na povrchu pytlíku s PHB v první polovině 3. týdne (druhý kompostovací test, reaktor 2)

#### 4.2.4 Sledování hmotnostních úbytků polymerů během kompostování

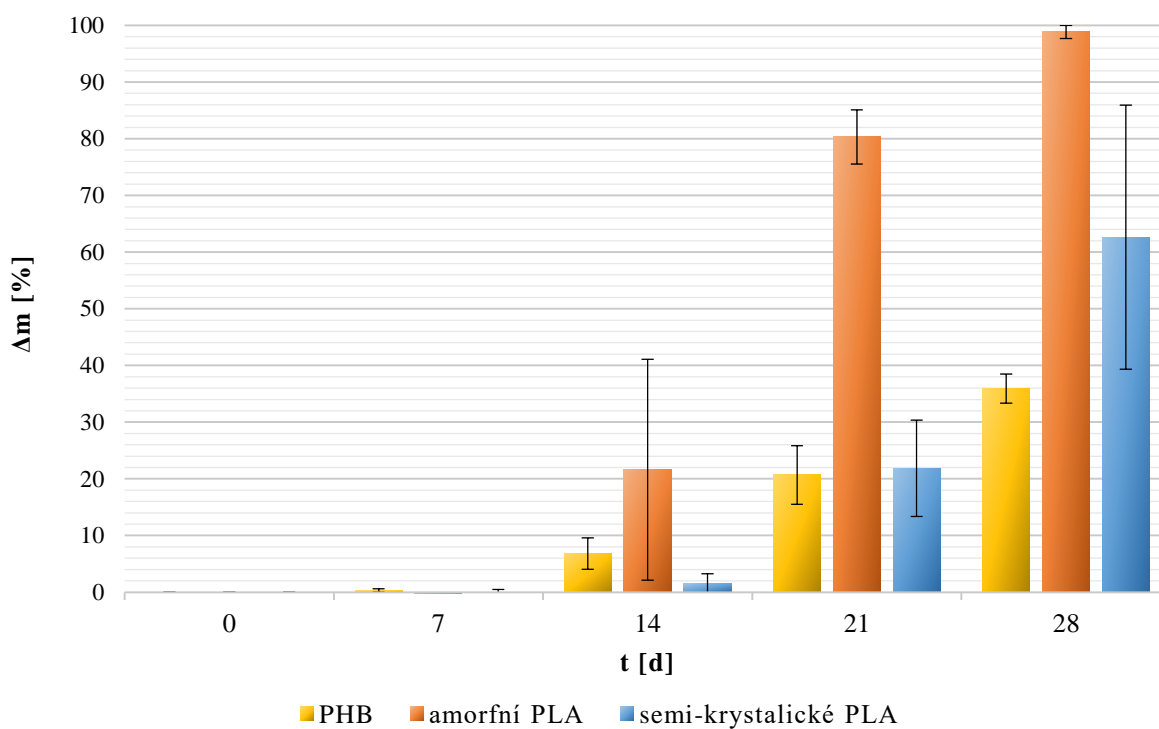
Výsledky této analýzy odrážejí aktuální stupeň degradace zkoumaných materiálů. Časový průběh degradace jednotlivých polymerů je však mnohem zajímavější pohled pro monitoring celého procesu. Dílčími odběry vzorků lze sledovat vybrané parametry artiklů a hodnotit úspěšnost degradace, a to jak v průběhu kompostování, tak i makroskopicky na jeho konci. Tímto způsobem je možné optimalizovat podmínky kompostování za chodu a bez nutnosti zastavit či zpomalit tento proces, porovnávat průběh rozkladu více materiálů současně, nebo predikovat další osud rozkládaných materiálů. K hodnocení těchto aspektů významně pomohly síťkové pytlíky, které poskytly snadný a spolehlivý způsob získání experimentálních dat.

Výsledky této analýzy jsou uvedeny ve formě sloupcového grafu, který se jevil kvůli vysokým odchylkám jako nepřehlednější (viz Graf 10 a Graf 11). Uvedené hmotnostní úbytky jsou vyjádřeny v procentech a byly spočteny jako průměrné hodnoty hmotnostních úbytků daného polymeru v každém reaktoru. Hodnoty jsou tedy průměry tří stanovených hodnot ze tří nezávislých vsádek, které mohou vykazovat značnou diverzitu. Je nutné uvědomit si, že každý kompost představuje samostatný biologický systém. Analytické postupy prováděné v rámci těchto experimentů jsou tedy zatíženy velkou odchylkou. Avšak právě tyto informace považujeme také za důležité výsledky provedených experimentů, protože umožňují nejen další postup této práce, ale také obecný vývoj metodologie přistupující k dané problematice.

V prvním kompostovacím testu byl potvrzen úbytek hmotnosti u všech sledovaných artiklů (viz Graf 10). Díky značné variabilitě vzorků je odchylka tohoto stanovení vysoká a nelze z těchto dvojic dat formulovat závěry. Bylo však potvrzeno, že v týdenním intervalu dochází k pozorovatelným změnám v hmotnosti polymerů, a to svědčí o funkčnosti testu.



Graf 10 - výsledky sledování úbytku hmotnosti polymerů vyjádřené jako procentuální hmotnostní úbytek (1. kompostovací test)



Graf 11 – výsledky sledování úbytku hmotnosti polymerů vyjádřené jako procentuální hmotnostní úbytek (2. kompostovací test)

Z výsledků druhého kompostovacího testu uvedených v Grafu 11 je na první pohled možné usoudit, že nejvyšší stupeň degradace v případě vykazuje ve všech relevantních bodech amorfní polylaktát. První týden experimentu představuje adaptační fázi, během které došlo jen k nepatrnému úbytku hmotnosti polymerů. V případě PHB a semi-krystalického PLA lze považovat i druhý týden testu za lag-fázi biodegradace. Je pravděpodobné, že úbytek amorfního PLA již po 14 dnech testu přesahoval 20 %, avšak směrodatná odchylka je díky variabilitě analyzovaných vzorků příliš vysoká pro formulaci jistějších závěrů. Vzhledem ke skokovému vývoji degradace této formy PLA je úbytek pětiny hmotnosti ve dvou týdnech adekvátní. Naopak, biodegradace PHB se jeví jako pozvolnější.

Během celého experimentu docházelo k rozpadu obou forem PLA na menší – ostřejší částice až dosahovaly prachové podoby. Tento jev byl konstatován jako důsledek působení zvýšené teploty v kombinaci s vlhkostí. Je tedy velmi pravděpodobné, že k degradaci PLA významně přispěly tyto abiotické faktory. To vysvětluje rozdíly v průběhu degradace PLA a PHB, přičemž PHB je vůči fyzikálnímu rozkladu relativně stabilnější.

Po 4 týdnech kompostování tedy došlo k přibližně 99 % degradaci amorfního PLA a zhruba 63 % degradaci semi-krystalické formy tohoto polymeru. Z výsledků plyne, že vyšší stupeň krystalinity polylaktátu negativně ovlivňuje jeho rozklad. Ke stejnému závěru došli Pantani a spol. ve své studii (viz [109]). Výsledky studie také dokazují, že biodegradace práškové semi-krystalické formy PLA probíhá rychleji a dosahuje obdobné rychlosti jako v případě amorfního PLA [109]. Dále však zjistili, že amorfní PLA dosáhlo 60 % degradace za asi 5 týdnů a semi-krystalické PLA bylo rozloženo pouze z 30 % po 60 dnech kompostování [109]. Teplota kompostování byla v uvedené studii stejná, jako v této práci, avšak celý experiment byl postaven na odlišných normách (ISO 14855 a ASTM D5338), což může vysvětlovat rozdíly v získaných výsledcích. Také byl použit mírně odlišný polymerní materiál (Ingeo™ Biopolymer 4043D, NatureWorks), který byl před testy lisován. Míra degradace byla stanovena metodou měření uvolněného oxidu uhličitého. Tyto rozdíly mohou stát za odlišnostmi v získaných výsledcích.

Zajímavé jsou výsledky kompostovacích testů, které provedli Sarasa a spol. (viz [100]) podle stejné normy (IS/ISO 20200) byl zjištěn stupeň biodegradace 63,6 %, avšak PLA podrobené těmto testům bylo směsí obsahující 35 hmot. % pěnového PLA [100]. Obdobné studie provedli i Kunioka a spol. (viz [110]), kteří na základě postupů normy ISO 14855–1 dosáhli 90 % stupně biodegradace PLA (Mitsui Chemicals) o neznámém stupni krystalinity po 35 dnech [110]. Tohoto výsledku bylo dosaženo po dezintegraci pelet PLA na prášek. V našem experimentu docházelo k rozpadu pelet na prach až při samotném kompostování, osud prášku jsme ale nebyli schopni dále pozorovat, protože byl skrze síť pytlíku uvolněn do prostředí kompostu. Z tohoto ohledu se jeví metoda určení stupně biodegradace stanovením uvolněného CO<sub>2</sub> (jako popisuje norma ISO 14855–1) vhodnější ke studiu této problematiky, na druhou stranu v našich experimentech byly do kompostu aplikovány větší artikly, kterých malý specifický povrch značně omezuje reakční plochu ve srovnání s práškem.

Tabasi a spol. (viz [111]) zkoumali biodegradaci PLA (10 % D-monomerní formy, NatureWorks) a PHB (Biomer® P209, Biomer) upravených do tenkých filmů využitím normy ASTM D5338. Metodou stanovení uvolněného oxidu uhličitého zjistili stupně degradace PLA 70 % a PHB 80 % po 28 dnech kompostování [111]. Opět lze konstatovat, že

poměr povrchu a objemu byl mnohem příznivější pro biodegradaci ve srovnání s naší studií, což se projevilo na vyšším stupni degradace PHB. V naší studii lze těžko odhadnout, kdy došlo k úplné degradaci PLA prášku po jeho uvolnění do kompostu. V dalších obdobných studiích byly dosaženy podobně vysoké stupně biodegradace PHB (zhruba 80 % degradace po 110 dnech kompostování dle ISO 14855–1, viz [96]; apod.), všechny však zkoumali biodegradabilitu fólií.

#### 4.2.5 Sledování změn molekulové hmotnosti PHB během kompostování

Při hydrolytickém štěpení polymeru dochází ke zkracování jeho řetězce, což se, samozřejmě, projeví na jeho molekulové hmotnosti. Tato analýza tedy poskytuje informaci o účinnosti hydroláz při depolymeraci PHB. Vhodným ukazatelem změny délky řetězců polymeru se jeví hmotnostně střední molekulová hmotnost  $M_w$ . Při enzymatickém štěpení však často dochází k přednostnímu štěpení řetězců na povrchu materiálu, polymer tak zůstává v jádru artiklu nedotčen. Důsledkem tohoto jevu může být pozorováno dokonce zvýšení molekulové hmotnosti. V takovém případě je nutno zhodnotit také početně střední molekulovou hmotnost  $M_n$  (pracuje s početním zastoupením jednotlivých dělek) a dále stanovit index polydisperzity  $D$  (výpočet viz Rovnice 2), který vyjadřuje distribuci velikosti částic (neboli míru uniformity velikostí řetězců polymeru).

Rovnice 2 – výpočet indexu polydisperzity  $D$ :

$$D = \frac{M_w}{M_n}$$

kde  $M_w$  je hmotnostně střední molekulová hmotnost a  $M_n$  je početně střední molekulová hmotnost. V ideálním případě uniformity je tento index roven 1, se zvyšující se hodnotou indexu roste rozmanitost molekulových hmotností polymeru. Z časového hlediska by tedy výsledky této analýzy měly doplňovat výsledky stanovení hmotnostního úbytku PHB. Pro toto stanovení byly vybrány vzorky získané v druhém kompostovacím testu.

Tabulka 12 – výsledky stanovení molekulových hmotností PHB během druhého kompostovacího testu

Den	$M_w$ [kDa]	$M_n$ [kDa]	$D$ [-]
0	183,22 ± 2,80	137,64 ± 8,84	1,34 ± 0,10
7	153,00 ± 5,11	120,24 ± 8,04	1,28 ± 0,10
14	118,06 ± 8,62	93,32 ± 7,78	1,27 ± 0,06
21	101,98 ± 3,83	81,31 ± 8,26	1,26 ± 0,09
28	86,84 ± 3,65	65,68 ± 3,37	1,32 ± 0,06

Výsledky uvedené v Tabulce 12 vypovídají o zkracování řetězců polymeru během provedeného testu. Ztráta molekulové hmotnosti je patrná již po 7 dnech kompostování, a to v případě obou sledovaných hodnot molekulové hmotnosti. Během celého testu také dochází k mírnému snižování indexu polydisperzity, což naznačuje, že štěpné produkty nabývají stejné délky. Tento fenomén může být způsoben přednostní utilizací kratších řetězců, které

jsou pro enzymy dostupnější. Pokles hodnot indexu polydisperzity je však velice malý, proto lze pravděpodobněji konstatovat lokální degradace polymerních řetězců až na krátké oligomery rozpustné ve vodě a jejich uvolňování do prostředí kompostu.

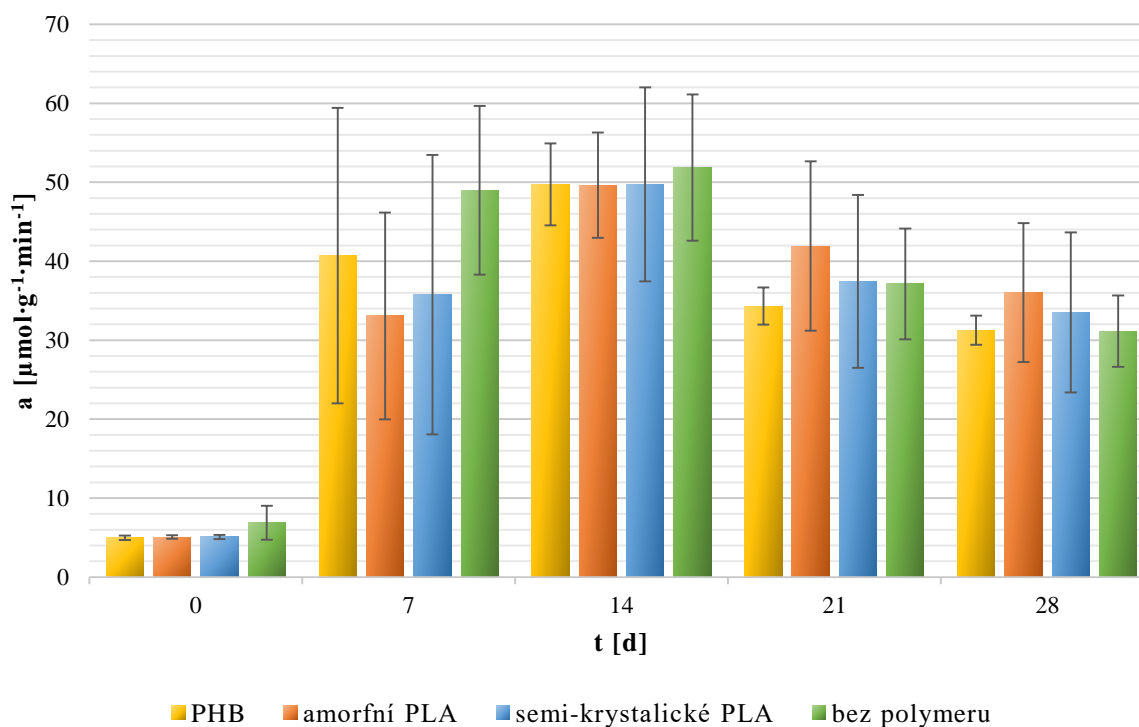
Změny molekulové hmotnosti PHB v kompostu zkoumali také Weng a spol. (viz [96]), zaměřili se pouze na stanovení početně střední molekulové hmotnosti. Ve své studii pozorovali stejný jev, jaký byl pozorován v našem experimentu. Během 30 dní kompostování však pozorovali menší úbytek  $M_n$  – přibližně 25 %, což je zhruba polovina úbytku pozorována v této práci. Rozdíl v hodnotách  $M_n$  je však pozorovatelný již v počátečních hodnotách, ve studii Wenga a spol. byla stanovena na 404 kDa, tedy asi třikrát vyšší než molekulová hmotnost PHB použitého v těchto experimentech [96].

Na základě získaných výsledků lze tvrdit, že evidentně dochází k rozkladu polyhydroxybutyrátu během kompostování. Pro stanovení molekulové hmotnosti PLA zatím nemáme standardizovanou metodu, kvůli omezené rozpustnosti tohoto polymeru.

#### **4.2.6 Stanovení aktivit vybraných skupin hydroláz**

Časté předsudky, které jsou kladeny zpracovateli biologického odpadu, odsuzují bioplasty na pouhé skládkování. Ve většině případů kompostárny ani nejsou schopny formulovat racionální důvody odmítání zpracovat tuto formu bioodpadu. Důvody, že přítomnost bioplastů v kompostu narušuje dynamiku procesů v něm probíhajících, považujeme za studiem nepodložené. Proto byla vykonána tato studie zaměřující se na porovnání kompostu bez a s obsahem bioplastů. Aktivita vybraných hydrolytických enzymů je důležitá i v samotném kompostu neobsahující bioplasty, protože dochází k degradaci jiných biopolymerů, které se v biologických systémech vyskytují. Je možné předpokládat, že se aktivita hydroláz štěpících biopolymery jejich přidavkem zvýší, což ale nelze považovat za negativní vliv. Pro hodnocení těchto aspektů byly vybrány samozřejmě ty skupiny enzymů, které souvisejí s degradací použitých polymerů. Výsledky této analýzy jsou uvedeny ve formě sloupcových grafů (viz Graf 12, Graf 13 a Graf 14), které umožňují srovnání uvedených aktivit kompostů obsahující bioplasty s kompostem bez přidaných polymerů. Výsledky umožňují takový náhled na každý týden druhého kompostovacího testu. Hodnoty aktivity jsou uvedeny jakožto specifické aktivity vztažené na 1 g vlhkého kompostu.

Stanovené aktivity byly srovnány v rámci každého týdne analýzou rozptylu (ANOVA) využitím Tukeyova HSD testu pro normální distribuci dat a Kruskal-Wallisovým testem pro neparametrická data. K zhodnocení normality dat byl použit Shapiro-Wilkův test. Konfidenční hladina byla ve všech testech zvolena 95 %. Celá analýza dat byla provedena v softwaru Statistica.



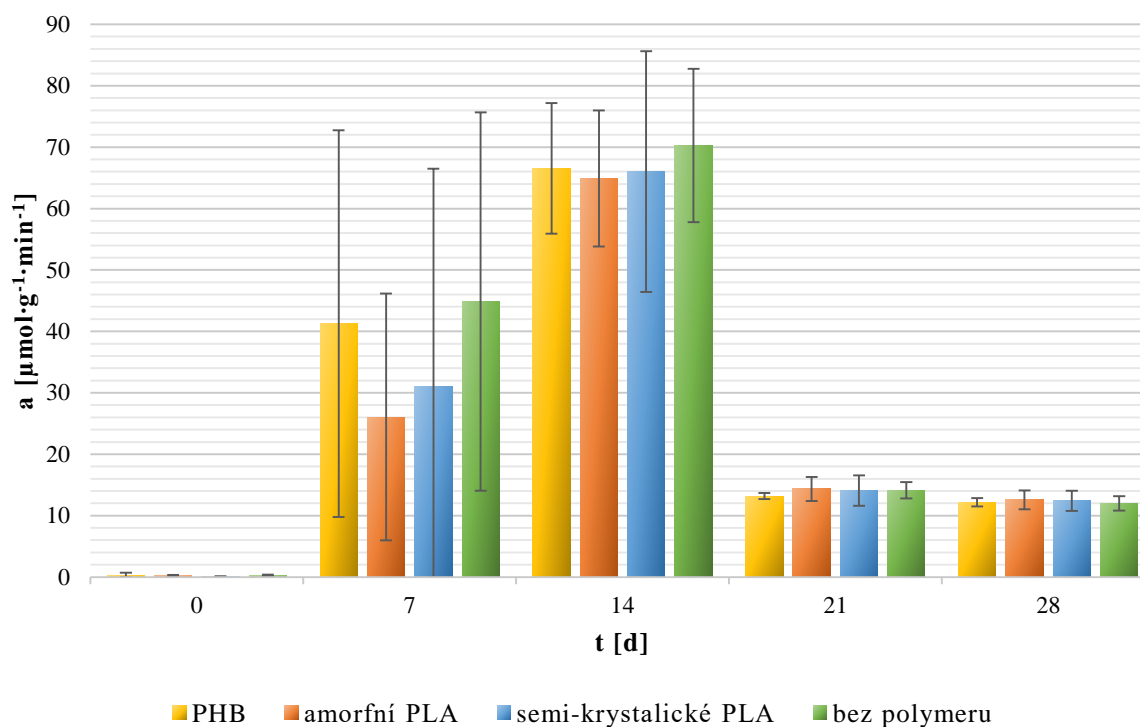
Graf 12 – výsledky stanovení aktivit esteráz během druhého kompostovacího testu

Již na první pohled je výsledků monitorování aktivity esteráz (viz Graf 12) patrné, že nedošlo k markantnímu ovlivnění aktivity esteráz přidavkem bioplastů do kompostu. Zpracování dat analýzou rozptylu také nepotvrdilo statisticky významné rozdíly mezi naměřenými hodnotami. Na jedné straně je tedy zřejmé, že přítomnost PHB ani použitých PLA neindukuje tvorbu esteráz, na druhé straně je však velmi pozitivní, že tyto bioplasty neovlivňují tuto dynamiku. Odchylky stanovení jsou opět poněkud vyšší, což svědčí o velké diverzitě vedených kompostů. Velký vliv na stanovení má odběr vzorku. Tento krok byl v celé analýze nejobtížnější. Klíčem k zisku objektivních dat je reprezentativnost odebraného vzorku, což bylo v praxi zajištěno odebráním malého množství kompostu z několika různých míst vsádky, jejich homogenizace a následný odběr potřebného množství vzorku k analýze. Tento způsob zajišťuje náhled na celý systém, avšak negativně ovlivňuje spolehlivost výsledných hodnot.

Z uvedených výsledků je dále evidentní, že produkce specifických PHA-depolymeráz probíhá buď ve všech sledovaných kompostech jakožto součást enzymatického koktejlu sloužícího k zisku živin, nebo neprobíhá vůbec. Je však také možné, že adaptace na tento typ substrátu zahrnuje potlačení aktivity jiných esteráz, což je logické vzhledem k tomu, že produkce enzymů vyžaduje velké množství energie. Pro hlubší analýzu procesu adaptace na PHB jakožto substrát je dále nevyhnutné sledovat aktivitu specifických depolymeráz.

Esterázy jsou velice obecnou skupinou hydrolytických enzymů vzhledem k plošnému výskytu esterových vazeb v biosféře. Očekává se tedy, že hodnota jejich aktivit bude vyšší než aktivita lipáz, která je uvedena v Graf u13.

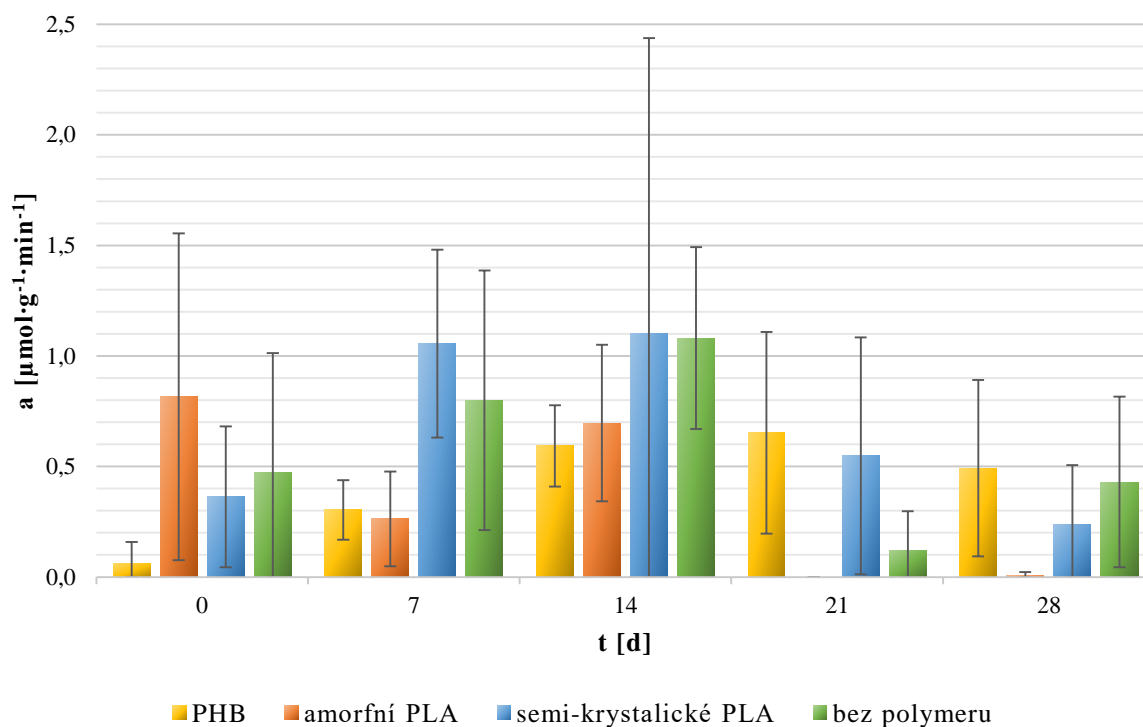




Graf 13 – výsledky stanovení aktivit lipáz během druhého kompostovacího testu

Výsledky sledování aktivity lipáz naznačují obdobné závěry – dynamika produkce rozkladných enzymů není ovlivněna přítomností bioplastů v kompostu. To bylo potvrzeno také statistickým zpracováním těchto výsledků. Zajímavé je však srovnání aktivit lipáz a esteráz v jednotlivých časech stanovení. Lipázové aktivity kompostů v 14. den testu přesahují aktivity esteráz v té samé době. Je možné, že rychlost hydrolýzy esterů s krátkým nepolárním řetězcem lipázami je nižší než rychlost odštěpování řetězců mastných kyselin z jejich esterů. Aktivita lipáz je pravděpodobně vyšší vůči specifitějšímu substrátu (p-nitrofenylpalmitátu) než vůči obecnějšímu substrátu, jakým je p-nitrofenylacetát. Je potřebné vzít v úvahu také fakt, že lipázy pracují na fázovém rozhraní, což nemusí nutně platit pro všechny esterázy.

Dále je zajímavý obrovský pokles aktivity lipáz ve třetím týdnu experimentu, zatímco v případě esteráz byl zaznamenán výrazně menší pokles. To může naznačovat produkci specifitějších esteráz, které nejsou produkovány pro štěpení lipidů (například PHA-depolymeráz). Stanovené aktivity lipáz v 21. a 28. den experimentu jsou již spolehlivější, a to může vypovídat o ustálení a homogenitě systému.



Graf 14 – výsledky stanovení aktivit proteáz během druhého kompostovacího testu

Z výsledků stanovení aktivity proteáz uvedených v Grafu 14 nelze formulovat jasné závěry, protože tyto hodnoty dosahují velice malých rozměrů. Odchytky stanovení často přesahují samotné hodnoty, což vypovídá o nízké spolehlivosti metody. Pro další studium těchto enzymatických procesů je nutné najít citlivější způsob stanovení proteolytické aktivity. Alespoň minimální činnost proteáz je v prostředí kompostu očekávaná vzhledem k jejich širokému výskytu v přírodě (obzvláště u plísní). Větší činnost proteáz byla očekávaná v kompostech s polyaktátem, jelikož byla jejich aktivita při rozkladu PLA popsána velkým množstvím studií (viz [112]). Tento jev byl popsán jako důsledek analogie L-laktátu a L-alaninu, na který se zaměřují některé serinové proteázy [113].

Závěrem této kapitoly bychom rádi konstatovaly, že dodržením vhodného režimu lze tedy očekávat normální průběh kompostovacího procesu i za přítomnosti těchto studovaných bioplastů. Ani v jedné z provedených analýz enzymatických aktivit nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi čistým kompostem a komposty s obsahem bioplastů. Tyto výsledky by měli sloužit k snížení obecné obavy z kompostování bioplastů. To je pro zpracování odpadu tohoto charakteru velice důležité, poněvadž při jejich skládkování dochází v důsledku nedokonalé aerace skládky k tvorbě produktů anaerobní degradace, jejichž nečíslená (neřízená) produkce negativně ovlivňuje životní prostředí. Příkladem takového produktu je například methan, jakožto antropogenní skleníkový plyn.

#### 4.2.7 Hodnocení vzhledu bioplastů během biodegradace

K získání prvotní informace o míře rozkladu materiálu může snadno posloužit hodnocení jeho vzhledu. Toto hodnocení bývá s oblibou provedeno automaticky, ihned po odběru vzorku jako součást běžného vnímání operátora. Výhodou takového hodnocení je jeho rychlé a snadné provedení, avšak je značně subjektivní a nepřesné, proto na jeho základě nelze formulovat striktní kvantitativní závěry. Pro tento experiment je hodnocení vzhledu doplňkem k provedeným analýzám mapující dezintegraci artiklů během kompostování, což může napovědět, jakým způsobem byl daný materiál degradován.

Hodnocení tohoto aspektu bylo rozděleno do dvou úrovní – makroskopické, pozorovatelné volným okem; a mikroskopické pozorování povrchu využitím elektronové mikroskopie (SEM). Výstupem obou částí experimentu jsou výhradně snímky.

##### 4.2.7.1 Makroskopické pozorování změn vzhledu bioplastů

Změny ve vzhledu jednotlivých materiálů byly značně odlišné, zejména změny ve vzhledu PHB byly úplně vzdálené změnám vzhledu kterékoli formy PLA. Zatímco u PHB se tvar artiklů prakticky neměnil, PLA podléhalo makroskopické dezintegraci. Postup změn vzhledu PHB během druhého kompostovacího experimentu lze pozorovat na Obrázku 15, změny vzhledu amorfního a semi-krystalického vzhledu ilustruje Obrázek 17, respektive Obrázek 19. Podrobněji lze sledovat vzhled posledních vzorků na Obrázku 16 (PHB), Obrázku 18 (amorfní PLA) a na Obrázku 20 (semi-krystalické PLA).



Obrázek 15 – průběh degradace PHB druhého testu (v prvních 7 dnech nebyla pozorovatelná změna)

Na uvedeném snímku je možné pozorovat, že použité pelety PHB se během degradace v kompostu pouze zmenšovaly, jejich tvar se měnil nepatrně. Místy se v oblasti hran pelet objevilo mléčné zakalení, a to převážně u vzorků z posledních dvou týdnů experimentu. Tohoto jevu lze lépe pozorovat na detailním snímku (Obrázek 16). Žádné další změny ve vzhledu PHB nebyly pozorovány.

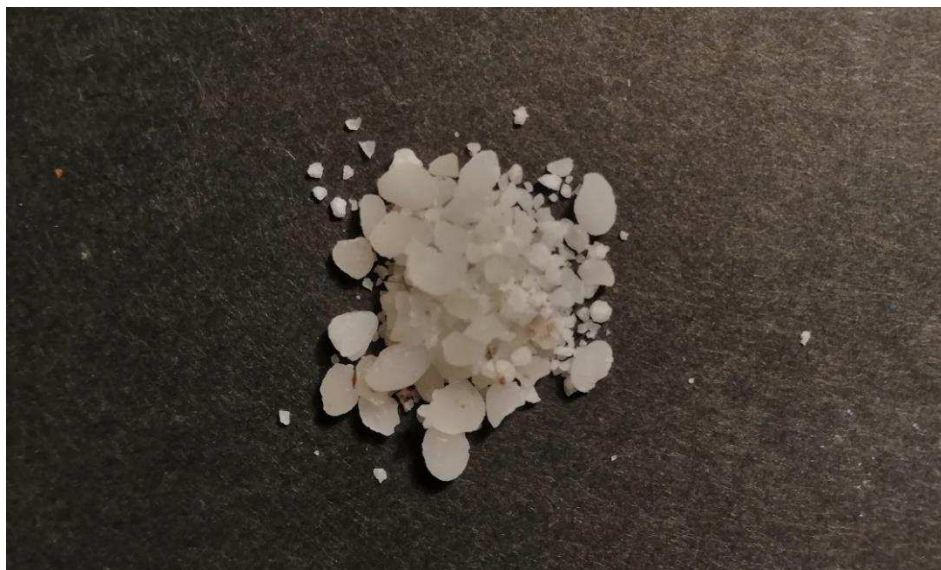


Obrázek 16 – detailní snímek PHB po 28 dnech kompostování (2. kompostovací test)

Pozorované změny PHB naznačují, že se skutečně jedná o rozklad biologickými činiteli a mechanismus degradace má povrchový nebo exogenní charakter. Zcela jiný závěr lze vyvodit z pozorování geometrických změn PLA, jak ilustruje Obrázek 17. Z tohoto snímku je evidentní, že zkoumaný materiál se spíše rozpadá na menší fragmenty, což indikuje spíše abiotický rozklad tohoto materiálu. Navíc docházelo k mléčnému zakalení celé granule, což naznačuje morfologické změny ve struktuře polymerního materiálu. Tento jev je možné pozorovat na detailnějším snímku (viz Obrázek 18).



Obrázek 17 – průběh degradace amorfního PLA druhého testu (v prvních 7 dnech nepozorována žádná změna vzhledu materiálu, v 28. den již žádný materiál nezbyl)



Obrázek 18 – detailní snímek amorfního PLA po 21 dnech (2. kompostovací test)

Makroskopické strukturální změny semi-krystalického PLA se principiálně neodlišovaly od změn pozorovaných u amorfnní formy téhož polymeru, pouze nastávaly pomaleji (viz Obrázek 19). V prvních dvou týdnech kompostování docházelo k většímu zakalení PLA granulí, postupně až k úplnému vyblednutí granulí (bílá barva granulí v 21. den, Obrázek 19). Po následném popraskání granulí byl rozpad poměrně rychlý. Během praskání došlo k tvorbě prachu a částic s ostrými hranami. Opět lze konstatovat, že tento rozpad je zapříčiněn fyzikálními nebo obecně abiotickými činiteli. Detailní záběr na granule semi-krystalického PLA zbylých po posledním týdnu testu a malých částic vzniklých jejich rozpadem lze detailněji pozorovat na Obrázku 20.



Obrázek 19 – průběh degradace semi-krystalického PLA v druhém kompostovacím testu (po prvních 7 dnech nebyla pozorována žádná změna vzhledu materiálu)

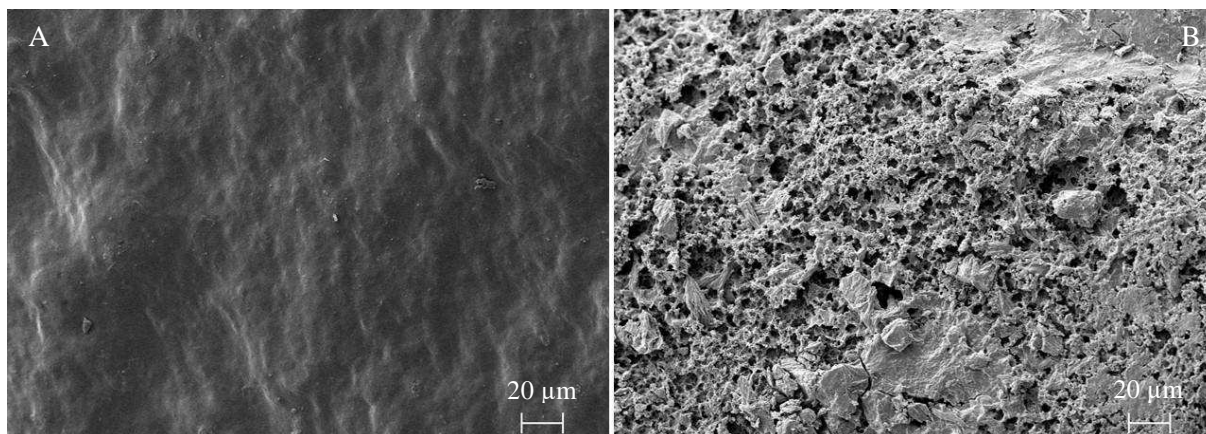


Obrázek 20 – detailní snímek semi-krytalického PLA po 28 dnech (2. kompostovací test)

U všech sledovaných artiklů byla zaznamenána určitá lag-fáze, během které nedošlo k významným změnám vzhledu granulí. Tato charakteristika byla variabilní nejen napříč polymery, ale také v rámci jednotlivých reaktorů. Ve všech případech tato doba trvala minimálně týden, jak již indikují uvedené makroskopické snímky. Lag-fáze je typická charakteristika biologických procesů. Vzhledem k tomuto faktu nelze určit striktní mechanismus rozkladu polylaktátu z dosavadních výsledků. Vzniká zde požadavek na pohled do mikroskopické struktury studovaných materiálů.

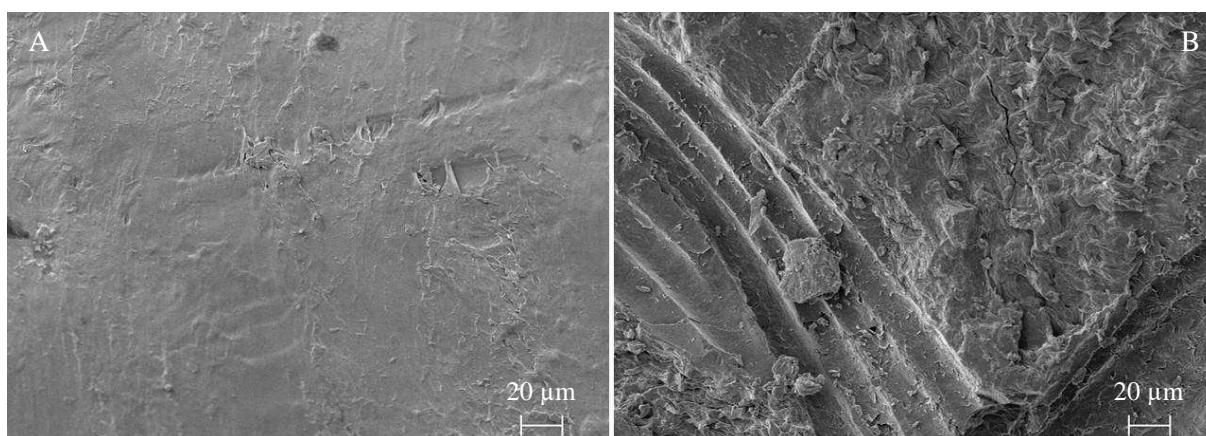
#### **4.2.7.2 Mikroskopické sledování povrchu bioplastů pomocí SEM**

Elektronová mikroskopie je oblíbenou metodou sledování degradačních a erozivních procesů na povrchu různých materiálů. I v případě studia biodegradace PHB nebo PLA byla tato technika již několikrát použita a významně přitom přispěla k vysvětlení některých jevů (viz například [96, 99, 108, 111]). Za velkou výhodou této analýzy lze považovat snadnou orientaci v získaných datech (snímcích), jejich snadné pochopení a rychlé odvození závěrů. V tomto smyslu lze diskutovat i zde interpretované výsledky, které jsou uvedeny na Obrázku 21, Obrázku 22 a Obrázku 23.



Obrázek 21 – snímky povrchu PHB před kompostováním (A) a po kompostování (B), vzorek z druhého kompostovacího testu (přibližně 1 000x)

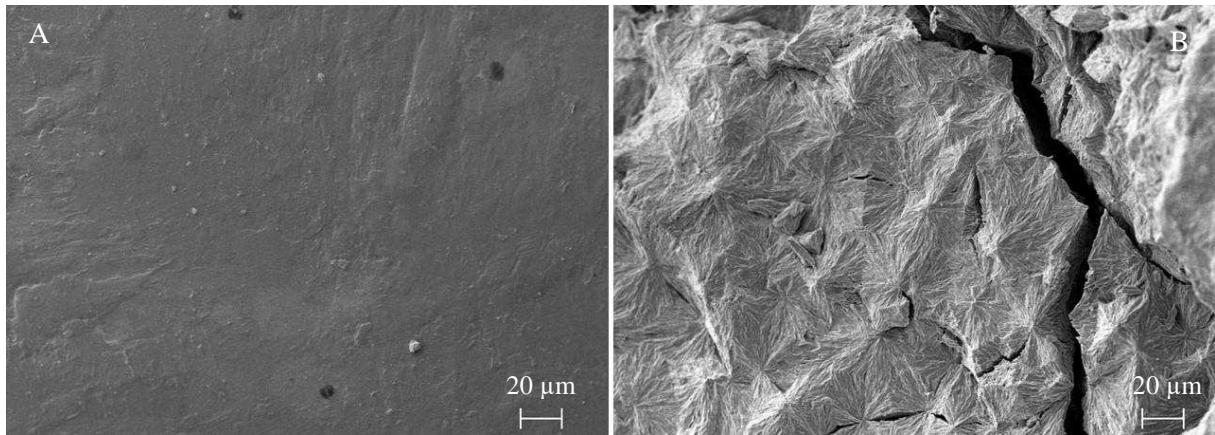
Z Obrázku 21 je jasně pozorovatelná eroze povrchu granule polyhydroxybutyrátu po 28 dnech kompostování. Některá místa jsou narušena méně, což je důsledek rozdílné dostupnosti ploch granule pro hydrolytické enzymy (například místo kontaktu 2 granulí). Ze snímku je však zřejmé, že PHB podléhá biodegradaci, a to formou enzymové eroze od povrchu dovnitř materiálu, což je výsledek shodující se se závěry dalších studií (viz [96, 114]).



Obrázek 22 – povrch amorfního PLA před kompostováním (A) a po kompostování (B), vzorek z druhého kompostovacího testu (přibližně 1 000x)

Výsledky skenování povrchu amorfního PLA elektronovým mikroskopem uvedeny na Obrázku 22 naznačují, že tato forma PLA je degradována spíše abioticky. Tento výsledek koreluje s makroskopickým hodnocením dezintegrace granul. Povrch odštěpků granul je zvrásněný a členitý, bez náznaku kavitace. Není však vyloučeno, že další osud menších částic PLA určují enzymy nebo se alespoň podílejí na jejich rozkladu, to však touto analýzou není možné určit.

Kale a spol. a Tabasi a spol. také navrhují a popisují dvoustupňový mechanismus degradace PLA během kompostování, přičemž popisují stejné změny vzhledu a struktury, jaké byly pozorovány v experimentech této práce [98, 101]. Dvoustupňový proces biodegradace amorfního PLA tedy považujeme za nejpravděpodobnější.



Obrázek 23 – povrch semi-krystalického PLA před kompostováním (A) a po kompostování (B), vzorek z druhého kompostovacího testu (přibližení 1 000x)

Analogický jev byl konstatován z výsledků skenování povrchu semi-krystalické formy polylaktátu. Z předešlých analýz již víme, že jediný rozdíl v degradaci dvou forem PLA byla rychlost tohoto procesu. Na snímku povrchu semi-krystalického PLA (Obrázek 23) po kompostování je možné pozorovat trhlinu a zvrásněný povrch granule. To naznačuje abiotický průběh degradace, což koreluje s výsledky předešlých analýz. Celkově lze tento rozkladný proces popsat stejně, jako byl popsán v případě amorfního PLA, rozdíly budou spočívat pouze v rychlosti. Na základě těchto výsledků tedy konstatujeme, že zkoumané formy polylaktátu se v prostředí kompostu primárně rozpadají.



## 5 ZÁVĚR

Veškeré experimenty provedené v této práci byly navrženy s dojmem nedostatečného prozkoumání tematiky z tohoto úhlu pohledu dosavadními studii. Použité kompostovací parametry se jeví originálně vzhledem k ostatním dostupným studiím (například stupeň nasycení kompostu materiály nebo geometrie použitých materiálů). Submerzní degradační testy také zasahují do určité mezery v literatuře. Celková logika použitých postupů a analýz je prakticky unikátní. Z tohoto důvodu je obtížné porovnat získané výsledky s jinými publikacemi či dostupnou literaturou a provedené experimenty je nutné považovat spíše za pilotní.

V první části experimentální činnosti byl zkoumán PHA-biodegradační potenciál vybraných termofilních bakterií, jejichž růst lze očekávat právě v kompostech s přidanými biopolyestery. Ze šesti kmenů projevila výraznější degradační schopnosti pouze jeden kmen, *Schlegelella thermodepolymerans*, a to pouze vůči PHB. Tato bakterie je známá svou robustní depolymerační aktivitou. Během týdne kultivace *S. thermodepolymerans* na granulích PHB byl zaznamenán úbytek hmotnosti polymeru přes 22 %. Biodegradační schopnost tohoto kmene byla také potvrzena při stanovení PHB-depolymerační aktivity a zajímavý pohled na povrchovou erozi granulí poskytly snímky z elektronového mikroskopu. Potenciální využití kmene *S. thermodepolymerans* vidíme například v inokulaci kompostu bohatém na odpadní polyhydroxyalkanoáty.

Druhá polovina práce byla zaměřena na biodegradaci biopolyesterů v prostředí kompostu. Za cenný výsledek této práce lze považovat již samotnou metodologii, respektive technické parametry a analytické přístupy použité ke studiu kompostovatelnosti biopolymerů. Celkový design studia této problematiky vnímáme jako funkční a navrhuje tyto přístupy k další aplikaci.

Během 4 týdnů kompostování došlo k redukci hmotnosti granulí polyhydroxybutyrátu o 36 % jejich původní hmotnosti, přičemž ztráta hmotnosti vykazuje lineární průběh v čase. Hmotnostně střední a početně střední molekulová hmotnost klesla na zhruba polovinu původní hodnoty. Amorfni PLA bylo během 4 týdnů kompostovacího testu prakticky úplně degradováno na malé částice, které nebylo možné z kompostu preparovat. Relativní hmotnostní úbytek na konci testu činil 99 %. Tento úbytek rostl v čase spíše exponenciálně, což naznačuje rozpad granulí této formy PLA. V případě semi-krystalického PLA byla pozorována 63 % redukce hmotnosti, průběh rozkladu těchto granulí byl analogický rozpadu amorfni granulí, avšak mírně opožděný. Prozatím nejsme schopni stanovit molekulovou hmotnost PLA, což lze vnímat jako perspektivu další práce.

Sledování biodegradace bioplastů monitoringem enzymatických aktivit vybraných skupin hydroláz nemá velký význam pro studium tohoto procesu. Získané výsledky indikují, že použité biopolyestery nezpůsobují statisticky významné změny v aktivitách esteráz, lipáz ani proteáz během celé doby kompostování.

Hodnocení míry degradace PHB a obou použitých forem PLA sledováním makroskopických změn v jejich vzhledu se jeví jako vhodný doplněk analytických postupů. Toto pozorování naznačuje primárně abiotický charakter degradace PLA, pro formulaci závěrů však nepostačuje. Velice vhodnou metodou určení rozkladného mechanismu

biopolyesterů je rastrovací elektronová mikroskopie. Pomocí této metody bylo potvrzeno, že biodegradace PHB probíhá formou povrchové eroze. Rovněž snímky z této techniky potvrdily, že PLA, nezávisle na krystalické morfologii, primárně degraduje vlivem abiotických vlivů.

Ke studiu této problematiky může být použita řada dalších přístupů, o čemž vypovídá existence množství norem navrhuje různé kompostovací parametry, technická uspořádání a metody analýzy všech složek kompostu. Perspektivní se jeví například infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IR), která umožňuje sledování změn složek kompostu na chemické úrovni metodou otisku palce. Ke studiu biologických změn je vhodné zaměřit se na aktivitu více skupin enzymů nebo specifitějších enzymů zajišťující konkrétní biologické přeměny. Dále je vhodné zabývat se biologií kompostu také na úrovni mikrobiomu, respektive genomu. K tomuto účelu slouží různé molekulárně-biologické techniky (například PCR, sekvenování) nebo komerčně dostupné kity umožňující plošnou analýzu mikrobiálního konsorcia. Všechny tyto přístupy jsou vhodné pro pokročilou analýzu procesu kompostování a představují tak potenciál další odborné práce.

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

PHA	Polyhydroxyalkanoáty
SCL PHA	Polyhydroxyalkanoáty s krátkými postranními řetězci
MCL PHA	Polyhydroxyalkanoáty se středně dlouhými postranními řetězci
dPHA <sub>SCL</sub>	Denaturované polyhydroxyalkanoáty s krátkými řetězci
PHB	Polyhydroxybutyrát (obecně)
Poly(3HB)	Poly-3-hydroxybutyrát
Poly(3HV)	Poly-3-hydroxyvalerát
Poly(3HO)	Poly-3-hydroxyoktanoát
P(3HB-co-3HV)	Poly-3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát
P(3HB-co-4HB)	Poly-3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát
P(3HB-co-3HHx)	Poly-3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyhexanoát
P(3HB-co-3MP)	Poly-3-hydroxybutyrát-co-3-merkaptopropionát
PLA	Kyselina polymléčná
PP	Polypropylen
PS	Polystyren
3HB	3-hydroxybutyrát
3HV	3-hydroxyvalerát
LA	Kyselina mléčná
Poly(3HB) depol.	Poly-3-hydroxybutyrát depolymeráza
Poly(3HV) depol.	Poly-3-hydroxyvalerát depolymeráza
Poly(3HO) depol.	Poly-3-hydroxyoktanoát depolymeráza
Poly(HA <sub>SCL</sub> ) depol.	Depolymeráza polyhydroxyalkanoátů s krátkými postranními řetězci
Poly(HA <sub>MCL</sub> ) depol.	Depolymeráza polyhydroxyalkanoátů se středně dlouhými postranními řetězci
L-LDH	L-laktátdehydrogenáza
D-LDH	D-laktátdehydrogenáza
CoA	Koenzym A
ATP	Adenosintrifosfát
NADH	Redukovaný nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
YE	Extrakt z kvasnic (z angličtiny: „Yeast Extract“)
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
SEM	Rastrovací elektronová mikroskopie
FT-IR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
SEC	Gelová permeační chromatografie (z angličtiny: „Size-Exclusion Chromatography“)
MALS	Detektor statického rozptylu světla ve více úhlech (z angličtiny: „Multi-Angle Light Scattering“)
GC-FID	Plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem
IC	Iontová chromatografie

ELISA	Imunologická metoda stanovení protilátek/antigenů využitím enzymatického značení (z angličtiny: „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“)
UV	Ultrafialové (záření)
GRAS	Obecně považován za bezpečný (z angličtiny: „Generally Recognised As Safe“)

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] WEE, Young-Jung, Jin-Nam KIM a Hwa-Won RYU. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *FOOD TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*. 2006, **44**(2), 163-172. ISSN 1330-9862.
- [2] STEINBÜCHEL, A., E. HUSTEDE, M. LIEBERGESELL, U. PIEPER, A. TIMM a H. VALENTIN. Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 1992, **103**(2-4), 217-230. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1992.tb05841.x. ISSN 03781097.
- [3] KESSLER, Birgit a Bernard WITHOLT. Poly(3-Hydroxyalkanoates). *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation* [online]. 1. Ann Arbor (Michigan): Wiley, 1999, s. 2024-2040 [cit. 2020-04-13]. ISBN 9780471138228.
- [4] KOLLER, Martin, Denis VADLJA, Gerhart BRAUNEGG, Aid ATLIĆ a Predrag HORVAT. Formal- and high-structured kinetic process modelling and footprint area analysis of binary imaged cells: Tools to understand and optimize multistage-continuous PHA biosynthesis. *The EuroBiotech Journal*. 2017, **1**(3), 203-211. DOI: 10.24190/ISSN2564-615X/2017/03.01. ISSN 2564-615X.
- [5] 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*. 1999, **25**(1-3), 3-19. DOI: 10.1016/S0141-8130(99)00010-0. ISSN 01418130.
- [6] PEOPLES, Oliver P. a Antony J. SINSKEY. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) Biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16 - IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE PHB POLYMERASE GENE (phbC). *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 1989, **264**(26), 15298-15303.
- [7] PEOPLES, Oliver P. a Antony J. SINSKEY. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate Biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16 - Characterization of the genes encoding  $\beta$ -ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 1989, **264**(26), 15293-15297.
- [8] MOSKOWITZ, Gerard Jay a Joseph M. MERRICK. Metabolism of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. II. Enzymic synthesis of D-(-)- $\beta$ -hydroxybutyryl coenzyme A by an enoyl hydratase from *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemistry*. 2002, **8**(7), 2748-2755. DOI: 10.1021/bi00835a009. ISSN 0006-2960.
- [9] FUKUI, Tetsuya, Akio YOSHIMOTO, Mamoru MATSUMOTO, Shunji HOSOKAWA, Terumi SAITO, Hiroko NISHIKAWA a Kenkichi TOMITA. Enzymatic synthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in *Zoogloea ramigera*. *Archives of Microbiology*. 1976, **110**(2-3), 149-156. DOI: 10.1007/BF00690222. ISSN 0302-8933.
- [10] SCHUBERT, P, A STEINBÜCHEL a H G SCHLEGEL. Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly-beta-hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1988, **170**(12), 5837-5847. DOI: 10.1128/JB.170.12.5837-5847.1988. ISSN 0021-9193.

- [11] SLATER, Steven, Kathryn L. HOUMIEL, Minh tien TRAN, Timothy A. MITSKY, Nancy B. TAYLOR, Stephen R. PADGETTE a Kenneth J. GRUYS. Multiple  $\beta$ -Ketothiolases Mediate Poly( $\beta$ -Hydroxyalkanoate) Copolymer Synthesis in *Ralstonia eutropha*. *Journal of Bacteriology*. 1998, **180**(8), 1979-1987. DOI: 10.1128/JB.180.8.1979-1987.1998. ISSN 1098-5530.
- [12] KUCHTA, Kenny, Lifeng CHI, Harald FUCHS, Markus PÖTTER a Alexander STEINBÜCHEL. Studies on the Influence of Phasins on Accumulation and Degradation of PHB and Nanostructure of PHB Granules in *Ralstonia eutropha* H16. *Biomacromolecules*. 2007, **8**(2), 657-662. DOI: 10.1021/bm060912e. ISSN 1525-7797.
- [13] JENDROSSEK, Dieter a Daniel PFEIFFER. New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). *Environmental Microbiology*. 2014, **16**(8), 2357-2373. DOI: 10.1111/1462-2920.12356. ISSN 14622912.
- [14] STUBBE, JoAnne a Jiamin TIAN. Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis: the role of the PHA synthase. *Natural Product Reports*. 2003, **20**(5). DOI: 10.1039/b209687k. ISSN 0265-0568.
- [15] GERNGROSS, T. U., K. D. SNELL, O. P. PEOPLES, A. J. SINSKEY, E. CSUHAI, S. MASAMUNE a J. STUBBE. Overexpression and Purification of the Soluble Polyhydroxyalkanoate Synthase from *Alcaligenes eutrophus*: Evidence for a Required Posttranslational Modification for Catalytic Activity. *Biochemistry*. 2002, **33**(31), 9311-9320. DOI: 10.1021/bi00197a035. ISSN 0006-2960.
- [16] GRIEBEL, R., Z. SMITH a J. M. MERRICK. Metabolism of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate). I. Purification, composition, and properties of native poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) granules from *Bacillus megaterium*. *Biochemistry*. 2002, **7**(10), 3676-3681. DOI: 10.1021/bi00850a047. ISSN 0006-2960.
- [17] BRIGHAM, Christopher J., Charles F. BUDDE, Jason W. HOLDER, Qiandong ZENG, Alison E. MAHAN, ChoKyun RHA a Anthony J. SINSKEY. Elucidation of  $\beta$ -Oxidation Pathways in *Ralstonia eutropha* H16 by Examination of Global Gene Expression. *Journal of Bacteriology*. 2010, **192**(20), 5454-5464. DOI: 10.1128/JB.00493-10. ISSN 0021-9193.
- [18] TIAN, Jiamin, Anthony J. SINSKEY a JoAnne STUBBE. Kinetic Studies of Polyhydroxybutyrate Granule Formation in *Wautersia eutropha* H16 by Transmission Electron Microscopy. *Journal of Bacteriology*. 2005, **187**(11), 3814-3824. DOI: 10.1128/JB.187.11.3814-3824.2005. ISSN 0021-9193.
- [19] BEEBY, M., M. CHO, J. STUBBE a G. J. JENSEN. Growth and Localization of Polyhydroxybutyrate Granules in *Ralstonia eutropha*. *Journal of Bacteriology*. 2012, **194**(5), 1092-1099. DOI: 10.1128/JB.06125-11. ISSN 0021-9193.
- [20] SLEPECKY, Ralph A. a John H. LAW. SYNTHESIS AND DEGRADATION OF POLY- $\beta$ -HYDROXYBUTYRIC ACID IN CONNECTION WITH SPORULATION OF *BACILLUS MEGATERIUM*. *Journal of Bacteriology*. 1961, **82**(1), 37-42. DOI: 10.1128/JB.82.1.37-42.1961. ISSN 0021-9193.

- [21] KOMINEK, Leo A. a H. Orin HALVORSON. Metabolism of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate and Acetoin in *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology*. 1965, **90**(5), 1251-1259. DOI: 10.1128/JB.90.5.1251-1259.1965. ISSN 0021-9193.
- [22] WU, Qiong, Honghua HUANG, Guohong HU, Jinchun CHEN, KP HO a Guo-Qiang CHEN. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media. *Antonie van Leeuwenhoek*. **80**(2), 111-118. DOI: 10.1023/A:1012222625201. ISSN 00036072.
- [23] WU, Dandan, Jin HE, Yuhua GONG, et al. Proteomic analysis reveals the strategies of *Bacillus thuringiensis* YBT-1520 for survival under long-term heat stress. *PROTEOMICS*. 2011, **11**(13), 2580-2591. DOI: 10.1002/pmic.201000392. ISSN 16159853.
- [24] AYUB, Nicolás D., Paula M. TRIBELLI a Nancy I. LÓPEZ. Polyhydroxyalkanoates are essential for maintenance of redox state in the Antarctic bacterium *Pseudomonas* sp. 14-3 during low temperature adaptation. *Extremophiles*. 2009, **13**(1), 59-66. DOI: 10.1007/s00792-008-0197-z. ISSN 1431-0651.
- [25] PAVEZ, P., J. L. CASTILLO, C. GONZÁLEZ a Miguel MARTÍNEZ. Poly- $\beta$ -Hydroxyalkanoate Exert a Protective Effect Against Carbon Starvation and Frozen Conditions in *Sphingopyxis chilensis*. *Current Microbiology*. 2009, **59**(6), 636-640. DOI: 10.1007/s00284-009-9485-9. ISSN 0343-8651.
- [26] AYUB, Nicolas D., M. Julia PETTINARI, Jimena A. RUIZ a Nancy I. LOPEZ. A Polyhydroxybutyrate-Producing *Pseudomonas* sp. Isolated from Antarctic Environments with High Stress Resistance. *Current Microbiology*. 2004, **49**(3). DOI: 10.1007/s00284-004-4254-2. ISSN 0343-8651.
- [27] OBRUCA, S., I. MAROVA, Z. SVOBODA a R. MIKULIKOVA. Use of Controlled Exogenous Stress for Improvement of Poly(3-hydroxybutyrate) Production in *Cupriavidus necator*. *Folia Microbiologica*. 2010, **55**(1), 17-22. DOI: 10.1007/s12223-010-0003-z. ISSN 0015-5632.
- [28] RUIZ, J. A., N. I. LOPEZ, R. O. FERNANDEZ a B. S. MENDEZ. Polyhydroxyalkanoate Degradation Is Associated with Nucleotide Accumulation and Enhances Stress Resistance and Survival of *Pseudomonas oleovorans* in Natural Water Microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001, **67**(1), 225-230. DOI: 10.1128/AEM.67.1.225-230.2001. ISSN 0099-2240.
- [29] SOTO, Gabriela, Lorena SETTEN, Christian LISI, Camila MAURELIS, Matteo MOZZICAFREDDO, Massimiliano CUCCIOLONI, Mauro ANGELETTI a Nicolás Daniel AYUB. Hydroxybutyrate prevents protein aggregation in the halotolerant bacterium *Pseudomonas* sp. CT13 under abiotic stress. *Extremophiles*. 2012, **16**(3), 455-462. DOI: 10.1007/s00792-012-0445-0. ISSN 1431-0651.
- [30] REUSCH, R. N. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate/Calcium Polyphosphate Complexes in Eukaryotic Membranes. *Experimental Biology and Medicine*. 1989, **191**(4), 377-381. DOI: 10.3181/00379727-191-42936. ISSN 1535-3702.

- [31] LEMES, A. P., T. L. A. MONTANHEIRO, F. R. PASSADOR a N. DURÁN. Nanocomposites of Polyhydroxyalkanoates Reinforced with Carbon Nanotubes: Chemical and Biological Properties. *Eco-friendly Polymer Nanocomposites*. Springer India, 2015, 2015-6-23, **75**(1), 79-108. *Advanced Structured Materials*. DOI: 10.1007/978-81-322-2470-9\_3. ISBN 978-81-322-2469-3.
- [32] LEE, Sang Yup. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*. 1996, **49**(1), 1-14. ISSN 0006-3592.
- [33] PHILIP, S., T. KESHAVARZ a I. ROY. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2007, **82**(3), 233-247. DOI: 10.1002/jctb.1667. ISSN 02682575.
- [34] GAGNON, K. D., R. W. LENZ, R. J. FARRIS a R. C. FULLER. Crystallization behavior and its influence on the mechanical properties of a thermoplastic elastomer produced by *Pseudomonas oleovorans*. *Macromolecules*. 1992, **25**(14), 3723-3728. DOI: 10.1021/ma00040a018. ISSN 0024-9297.
- [35] ARCOS-HERNANDEZ, Monica V., Bronwyn LAYCOCK, Bogdan C. DONOSE, Steven PRATT, Peter HALLEY, Salah AL-LUAIBI, Alan WERKER a Paul A. LANT. Physicochemical and mechanical properties of mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHBV). *European Polymer Journal*. 2013, **49**(4), 904-913. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2012.10.025. ISSN 00143057.
- [36] ZINN, M. a R. HANY. Tailored Material Properties of Polyhydroxyalkanoates through Biosynthesis and Chemical Modification. *Advanced Engineering Materials*. 2005, **7**(5), 408-411. DOI: 10.1002/adem.200500053. ISSN 1438-1656.
- [37] AKARAONYE, Everest, Tajalli KESHAVARZ a Ipsita ROY. Production of polyhydroxyalkanoates the future green materials of choice. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2010, **85**(6), 732-743. DOI: 10.1002/jctb.2392. ISSN 02682575.
- [38] GARLOTTA, Donald. A Literature Review of Poly(Lactic Acid). *Journal of Polymers and the Environment*. **9**(2), 63-84. DOI: 10.1023/A:1020200822435. ISSN 15662543.
- [39] CONN, R.E., J.J. KOLSTAD, J.F. BORZELLECA, D.S. DIXLER, L.J. FILER, B.N. LADU a M.W. PARIZA. Safety assessment of polylactide (PLA) for use as a food-contact polymer. *Food and Chemical Toxicology*. 1995, **33**(4), 273-283. DOI: 10.1016/0278-6915(94)00145-E. ISSN 02786915.
- [40] ENGELBERG, Israel a Joachim KOHN. Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: A comparative study. *Biomaterials*. 1991, **12**(3), 292-304. DOI: 10.1016/0142-9612(91)90037-B. ISSN 01429612.
- [41] VAN DE VELDE, K a P KIEKENS. Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications. *Polymer Testing*. 2002, **21**(4), 433-442. DOI: 10.1016/S0142-9418(01)00107-6. ISSN 01429418.
- [42] ZHANG, Chunmei, Changzhen MAN, Weiwei WANG, Long JIANG a Yi DAN. Degradation of Poly( L -lactide) Films under Ultraviolet Irradiation and Water Bath. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*. 2011, **50**(8), 810-817. DOI: 10.1080/03602559.2011.551970. ISSN 0360-2559.



- [43] CASTRO-AGUIRRE, E., F. IÑIGUEZ-FRANCO, H. SAMSUDIN, X. FANG a R. AURAS. Poly(lactic acid)—Mass production, processing, industrial applications, and end of life. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, **107**, 333-366. DOI: 10.1016/j.addr.2016.03.010. ISSN 0169409X.
- [44] JENDROSSEK, Dieter a René HANDRICK. Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates. *Annual Review of Microbiology*. 2002, **56**(1), 403-432. DOI: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160838. ISSN 0066-4227.
- [45] JENDROSSEK, Dieter. Extracellular Polyhydroxyalkanoate Depolymerases: The Key Enzymes of PHA Degradation. *Biopolymers Online* [online]. 2005, 41-75 [cit. 2020-04-13]. DOI: 10.1002/3527600035.bpol3b03.
- [46] SHARMA, Parveen K., Nisha MOHANAN, Ravinder SIDHU a David B. LEVIN. Colonization and degradation of polyhydroxyalkanoates by lipase-producing bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 2019, **65**(6), 461-475. DOI: 10.1139/cjm-2019-0042. ISSN 0008-4166.
- [47] JAEGER, K E, A STEINBÜCHEL a D JENDROSSEK. Substrate specificities of bacterial polyhydroxyalkanoate depolymerases and lipases: bacterial lipases hydrolyze poly(omega-hydroxyalkanoates). *Applied and environmental microbiology*. 1995, **61**(8), 3113-3118. DOI: 10.1128/AEM.61.8.3113-3118.1995. ISSN 0099-2240.
- [48] SADOCCO, Patrizia, Silvia NOCERINO, Ernestina DUBINI-PAGLIA, Alberto SEVES a Graziano ELEGIR. Characterization of a Poly(3-hydroxybutyrate) Depolymerase from *Aureobacterium saepe*: Active Site and Kinetics of Hydrolysis Studies. *Journal of Environmental Polymer Degradation*. 1997, **5**(1), 57-65. DOI: 10.1007/BF02763569.
- [49] KASUYA, Ken-ichi, Yoshiharu DOI a Tadashi YAO. Enzymatic degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] by *Comamonas testosteroni* ATSU of soil bacterium. *Polymer Degradation and Stability*. 1994, **45**(3), 379-386. DOI: 10.1016/0141-3910(94)90208-9. ISSN 01413910.
- [50] MÜLLER, Beate a Dieter JENDROSSEK. Purification and properties of poly(3-hydroxyvaleric acid) depolymerase from *Pseudomonas lemoignei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1993, **38**(4). DOI: 10.1007/BF00242943. ISSN 0175-7598.
- [51] JENDROSSEK, D, A FRISSE, A BEHREND, M ANDERMANN, H D KRATZIN, T STANISLAWSKI a H G SCHLEGEL. Biochemical and molecular characterization of the *Pseudomonas lemoignei* polyhydroxyalkanoate depolymerase system. *Journal of bacteriology*. 1995, **177**(3), 596-607. DOI: 10.1128/JB.177.3.596-607.1995. ISSN 0021-9193.
- [52] YAMADA, Kenji, Katsuyuki MUKAI a Yoshiharu DOI. Enzymatic degradation of poly(hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas pickettii*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1993, **15**(4), 215-220. DOI: 10.1016/0141-8130(93)90040-S. ISSN 01418130.

- [53] MUKAI, Katsuyuki, Kenji YAMADA a Yoshiharu DOI. Efficient hydrolysis of polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas stutzeri* YM1414 isolated from lake water. *Polymer Degradation and Stability*. 1994, **43**(3), 319-327. DOI: 10.1016/0141-3910(94)90002-7. ISSN 01413910.
- [54] KLINGBEIL, Britta, Reiner M. KROPPENSTEDT a Dieter JENDROSSEK. Taxonomic identification of *Streptomyces exfoliatus* K10 and characterization of its poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase gene. *FEMS Microbiology Letters*. 1996, **142**(2-3), 215-221. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1996.tb08433.x. ISSN 03781097.
- [55] ODA, Yuji, Hidekazu OSAKA, Teizi URAKAMI a Kenzo TONOMURA. Purification and Properties of Poly(3-Hydroxybutyrate) Depolymerase from the Fungus *Paecilomyces lilacinus* D218. *Current Microbiology*. 1997, **34**(4), 230-232. DOI: 10.1007/s002849900174. ISSN 0343-8651.
- [56] IYER, Srividya, Ruchir SHAH, Ashima SHARMA, Dieter JENDROSSEK a Anjana DESAI. *Journal of Polymers and the Environment*. **8**(4), 197-203. DOI: 10.1023/A:1015249811314. ISSN 15662543.
- [57] ANDREAS, Schrimmer, Jendrossek DIETER a Schlegel HANS G. Degradation of poly(3-hydroxyoctanoic acid) [P(3HO)] by bacteria: purification and properties of a P(3HO) depolymerase from *Pseudomonas fluorescens* GK13. *Applied and Environmental Microbiology*. 1993, **59**(4), 1220-1227.
- [58] KIM, H., H.-S. JU a J. KIM. Characterization of an extracellular poly(3-hydroxy-5-phenylvalerate) depolymerase from *Xanthomonas* sp. JS02. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2000, **53**(3), 323-327. DOI: 10.1007/s002530050028. ISSN 0175-7598.
- [59] ELBANNA, Khaled, Tina LÜTKE-EVERSLOH, Dieter JENDROSSEK, Heinrich LUFTMANN a Alexander STEINBÜCHEL. Studies on the biodegradability of polythioester copolymers and homopolymers by polyhydroxyalkanoate (PHA)-degrading bacteria and PHA depolymerases. *Archives of Microbiology*. 2004, **182**(2-3). DOI: 10.1007/s00203-004-0715-z. ISSN 0302-8933.
- [60] TAKEDA, Minoru, Jun-Ichi KOIZUMI, Kenji YABE a Kenji ADACHI. Thermostable poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase of a thermophilic strain of *Leptothrix* sp. isolated from a hot spring. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1998, **85**(4), 375-380. DOI: 10.1016/S0922-338X(98)80080-9. ISSN 0922338X.
- [61] JENDROSSEK, Dieter, Ingrid KNOKE, Rahim Bahodjb HABIBIAN, Alexander STEINBÜCHEL a Hans Günter SCHLEGEL. Degradation of poly(3-hydroxybutyrate), PHB, by bacteria and purification of a novel PHB depolymerase from *Comamonas* sp. *Journal of Environmental Polymer Degradation*. 1993, **1**(1), 53-63. DOI: 10.1007/BF01457653. ISSN 1064-7564.
- [62] TOKIWA, Yutaka a Buenaventurada P. CALABIA. Biodegradability and biodegradation of poly(lactide). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006, **72**(2), 244-251. DOI: 10.1007/s00253-006-0488-1. ISSN 0175-7598.

- [63] MACDONALD, Renée T., Stephen P. MCCARTHY a Richard A. GROSS. Enzymatic Degradability of Poly(lactide): Effects of Chain Stereochemistry and Material Crystallinity. *Macromolecules*. 1996, **29**(23), 7356-7361. DOI: 10.1021/ma960513j. ISSN 0024-9297.
- [64] TSUJI, Hideto a Shinya MIYAUCHI. Poly(L-lactide): VI Effects of crystallinity on enzymatic hydrolysis of poly(L-lactide) without free amorphous region. *Polymer Degradation and Stability*. 2001, **71**(3), 415-424. DOI: 10.1016/S0141-3910(00)00191-9. ISSN 01413910.
- [65] MOON, Sung-Il, Hiroshi URAYAMA a Yoshiharu KIMURA. Structural Characterization and Degradability of Poly(L-lactic acid)s Incorporating Phenyl-Substituted -Hydroxy Acids as Comonomers. *Macromolecular Bioscience*. **3**(6), 301-309. DOI: 10.1002/mabi.200390038. ISSN 16165187.
- [66] CAI, Hua, Vipul DAVE, Richard A. GROSS a Stephen P. MCCARTHY. Effects of physical aging, crystallinity, and orientation on the enzymatic degradation of poly(lactic acid). *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. 1996, **34**(6), 2701-2708. DOI: 10.1002/(SICI)1099-0488(19961130)34:16<2701::AID-POLB2>3.0.CO;2-S.
- [67] LEE, Sang Yup. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*. 1996, **49**(1), 1-14. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19960105)49:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-P ISSN 0006-3592.
- [68] MORIKAWA, Hiromichi a Robert H. MARCHESSAULT. Pyrolysis of bacterial polyalkanoates. *Canadian Journal of Chemistry*. 1981, **59**(15), 2306-2313. DOI: 10.1139/v81-334. ISSN 0008-4042.
- [69] MARTELLI, Silvia Maria, Matteo PIETRINI, Elizabeth Grillo FERNANDES a Emo CHIPELLINI. Poly[(R)-3-hydroxy butyrate] Melt Processing: Strategy for Prevention of Degradation Reactions. *Journal of Polymers and the Environment*. 2013, **21**(1), 39-45. DOI: 10.1007/s10924-012-0550-2. ISSN 1566-2543.
- [70] JAMSHIDI, K., S.-H. HYON a Y. IKADA. Thermal characterization of polylactides. *Polymer*. 1988, **29**(12), 2229-2234. DOI: 10.1016/0032-3861(88)90116-4. ISSN 00323861.
- [71] SIPARSKY, Georgette L., Kent J. VOORHEES a Fudu MIAO. Hydrolysis of Polylactic Acid (PLA) and Polycaprolactone (PCL) in Aqueous Acetonitrile Solutions: Autocatalysis. *Journal of Polymers and the Environment*. **6**(1), 31-41. DOI: 10.1023/A:1022826528673. ISSN 15662543.
- [72] YU, Jian, David PLACKETT a Lilian X.L. CHEN. Kinetics and mechanism of the monomeric products from abiotic hydrolysis of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] under acidic and alkaline conditions. *Polymer Degradation and Stability*. 2005, **89**(2), 289-299. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2004.12.026. ISSN 01413910.
- [73] YU, Ga-er a R.H. MARCHESSAULT. Characterization of low molecular weight poly( $\beta$ -hydroxybutyrate)s from alkaline and acid hydrolysis. *Polymer*. 2000, **41**(3), 1087-1098. DOI: 10.1016/S0032-3861(99)00230-X. ISSN 00323861.

- [74] PLASTICS - DETERMINATION OF THE DEGREE OF DISINTEGRATION OF PLASTIC MATERIALS UNDER SIMULATED COMPOSTING CONDITIONS IN A LABORATORY-SCALE TEST. 1. New Delhi: BUREAU OF INDIAN STANDARDS, 2004.
- [75] KIJCHAVENGKUL, Thitisilp a Rafael AURAS. Compostability of polymers. *Polymer International*. 2008, **57**(6), 793-804. DOI: 10.1002/pi.2420. ISSN 09598103.
- [76] CHAPTER 1: Introduction. BART, Jan C. J. Additives in polymers: Industrial analysis and applications. 1. Chichester (England): Wiley, 2005, s. 1-27. ISBN 0-470-85062-0.
- [77] BYROM, David. Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate: poly- $\beta$ -hydroxyvalerate copolymers. *FEMS Microbiology Letters*. 1992, **103**(2-4), 247-250. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1992.tb05844.x. ISSN 03781097.
- [78] CHEN, Guo-Qiang. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio-and materials industry. *Chemical Society Reviews*. 2009, **38**(8). DOI: 10.1039/b812677c. ISSN 0306-0012.
- [79] SURIYAMONGKOL, Pornpa, Randall WESELAKE, Suresh NARINE, Maurice MOLONEY a Saleh SHAH. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants — A review. *Biotechnology Advances*. 2007, **25**(2), 148-175. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.11.007. ISSN 07349750.
- [80] VALENTIN, Henry E., Debra L. BROYLES, Laura A. CASAGRANDE, et al. PHA production, from bacteria to plants. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1999, **25**(1-3), 303-306. DOI: 10.1016/S0141-8130(99)00045-8. ISSN 01418130.
- [81] POIRIER, Yves. Production of Polyesters in Transgenic Plants. *Biopolyesters*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2001, 2001-5-18, **71**, 209-240. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. DOI: 10.1007/3-540-40021-4\_7. ISBN 978-3-540-41141-3.
- [82] RAMSAY, J. A., E. BERGER, R. VOYER, C. CHAVARIE a B. A. RAMSAY. Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents. *Biotechnology Techniques*. 1994, **8**(8), 589-594. DOI: 10.1007/BF00152152. ISSN 0951-208X.
- [83] CASTILLO MARTINEZ, Fabio Andres, Eduardo Marcos BALCIUNAS, José Manuel SALGADO, José Manuel DOMÍNGUEZ GONZÁLEZ, Attilio CONVERTI a Ricardo Pinheiro de Souza OLIVEIRA. Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2013, **30**(1), 70-83. DOI: 10.1016/j.tifs.2012.11.007. ISSN 09242244.
- [84] ABDEL-RAHMAN, Mohamed Ali, Yukihiko TASHIRO a Kenji SONOMOTO. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*. 2013, **31**(6), 877-902. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.04.002. ISSN 07349750.
- [85] LITCHFIELD, John H. *Microbiological Production of Lactic Acid*. *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier, 1996, 1996, **42**, 45-95. DOI: 10.1016/S0065-2164(08)70372-1. ISBN 9780120026425.

- [86] BIANCHI, M. M., L. BRAMBILLA, F. PROTANI, C.-L. LIU, J. LIEVENSE a D. PORRO. Efficient Homolactic Fermentation by *Kluyveromyces lactis* Strains Defective in Pyruvate Utilization and Transformed with the Heterologous LDH Gene. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001, **67**(12), 5621-5625. DOI: 10.1128/AEM.67.12.5621-5625.2001. ISSN 0099-2240.
- [87] DAMMER, Lara, Michael CARUS, Achim RASCHKA a Lena SCHOLZ. Market Developments of and Opportunities for biobased products and chemicals [online]. Hürth (Germany) [cit. 2020-04-13].
- [88] AESCHELMANN, Florence a Michael CARUS. Biobased Building Blocks and Polymers in the World: Capacities, Production, and Applications—Status Quo and Trends Towards 2020. *Industrial Biotechnology*. 2015, **11**(3), 154-159. DOI: 10.1089/ind.2015.28999.fae. ISSN 1550-9087.
- [89] JAMSHIDIAN, Majid, Elmira Arab TEHRANY, Muhammad IMRAN, Muriel JACQUOT a Stephane DESOBRY. Poly-Lactic Acid: Production, Applications, Nanocomposites, and Release Studies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2010, **9**(5), 552-571. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2010.00126.x. ISSN 15414337.
- [90] BIOPLASTICS MARKET DEVELOPMENT UPDATE 2019. In: European Bioplastics e.V. [online]. Berlin, 2019 [cit. 2020-04-13].
- [91] FARAH, Shady, Daniel G. ANDERSON a Robert LANGER. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, **107**, 367-392. DOI: 10.1016/j.addr.2016.06.012. ISSN 0169409X.
- [92] HARTMANN, M. H. High Molecular Weight Polylactic Acid Polymers. *Biopolymers from Renewable Resources*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1998, 1998, 367-411. DOI: 10.1007/978-3-662-03680-8\_15. ISBN 978-3-642-08341-9.
- [93] Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials under controlled composting conditions — Method by analysis of evolved carbon dioxide — Part 1: General method. 1. Geneva: ISO, 2005.
- [94] Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials under controlled composting conditions — Method by analysis of evolved carbon dioxide — Part 2: Gravimetric measurement of carbon dioxide evolved in a laboratory-scale test. 2. Geneva: ISO, 2018.
- [95] Plastics — Determination of the degree of disintegration of plastic materials under defined composting conditions in a pilot-scale test. 3. Geneva: ISO, 2019.
- [96] WENG, Yun-Xuan, Xiu-Li WANG a Yu-Zhong WANG. Biodegradation behavior of PHAs with different chemical structures under controlled composting conditions. *Polymer Testing*. 2011, **30**(4), 372-380. DOI: 10.1016/j.polymeresting.2011.02.001. ISSN 01429418.
- [97] ABOU-ZEID, Dunja-Manal, Rolf-Joachim MÜLLER a Wolf-Dieter DECKWER. Degradation of natural and synthetic polyesters under anaerobic conditions. *Journal of Biotechnology*. 2001, **86**(2), 113-126. DOI: 10.1016/S0168-1656(00)00406-5. ISSN 01681656.

- [98] FUNABASHI, Masahiro, Fumi NINOMIYA a Masao KUNIOKA. Biodegradability Evaluation of Polymers by ISO 14855-2. *International Journal of Molecular Sciences*. 2009, **10**(8), 3635-3654. DOI: 10.3390/ijms10083635. ISSN 1422-0067.
- [99] MENČÍK, Přemysl, Radek PŘIKRYL, Ivana STEHNOVÁ, Veronika MELČOVÁ, Soňa KONTÁROVÁ, Silvestr FIGALLA, Pavol ALEXYS a Ján BOČKAJ. Effect of Selected Commercial Plasticizers on Mechanical, Thermal, and Morphological Properties of Poly(3-hydroxybutyrate)/Poly(lactic acid)/Plasticizer Biodegradable Blends for Three-Dimensional (3D) Print. *Materials*. 2018, **11**(10). DOI: 10.3390/ma11101893. ISSN 1996-1944.
- [100] SARASA, Judith, Jose M. GRACIA a Carlos JAVIERRE. Study of the biodegradation of a bioplastic material waste. *Bioresource Technology*. 2009, **100**(15), 3764-3768. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.11.049. ISSN 09608524.
- [101] KALE, Gaurav, Rafael AURAS, Sher Paul SINGH a Ramani NARAYAN. Biodegradability of polylactide bottles in real and simulated composting conditions. *Polymer Testing*. 2007, **26**(8), 1049-1061. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2007.07.006. ISSN 01429418.
- [102] MATOUŠKOVÁ, Petra. *Produkce a charakterizace extracelulárních hydroláz z vybraných druhů plísní*. Brno, 2011. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce Prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
- [103] ELBANNA, Khaled, Tina LÜTKE-EVERSLOH, Stefanie VAN TRAPPEN, Joris MERGAERT, Jean SWINGS a Alexander STEINBÜCHEL. Schlegelella thermodepolymerans gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic bacterium that degrades poly(3-hydroxybutyrate-co-3-mercaptopropionate). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003, **53**(4), 1165-1168. DOI: 10.1099/ijs.0.02562-0. ISSN 1466-5026.
- [104] TOKIWA, Yutaka a Amnat JARERAT. Biodegradation of poly(L-lactide). *Biotechnology Letters*. 2004, **26**(10), 771-777. DOI: 10.1023/B:BILE.0000025927.31028.e3. ISSN 0141-5492.
- [105] JENDROSSEK, Dieter. Peculiarities of PHA granules preparation and PHA depolymerase activity determination. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007, **74**(6), 1186-1196. DOI: 10.1007/s00253-007-0860-9. ISSN 0175-7598.
- [106] ROMEN, Fabian, Simone REINHARDT a Dieter JENDROSSEK. Thermotolerant poly(3-hydroxybutyrate)-degrading bacteria from hot compost and characterization of the PHB depolymerase of Schlegelella sp. KB1a. *Archives of Microbiology*. 2004, **182**(2-3). DOI: 10.1007/s00203-004-0684-2. ISSN 0302-8933.
- [107] TOKIWA, Yutaka a Buenaventurada P. CALABIA. Review Degradation of microbial polyesters. *Biotechnology Letters*. 2004, **26**(15), 1181-1189. DOI: 10.1023/B:BILE.0000036599.15302.e5. ISSN 0141-5492.
- [108] IWATA, Tadahisa, Yoshiharu DOI, Ken-ichi KASUYA a Yoshio INOUE. Visualization of Enzymatic Degradation of Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] Single Crystals by an Extracellular PHB Depolymerase. *Macromolecules*. 1997, **30**(4), 833-839. DOI: 10.1021/ma961352m. ISSN 0024-9297.

- [109] PANTANI, Roberto a Andrea SORRENTINO. Influence of crystallinity on the biodegradation rate of injection-moulded poly(lactic acid) samples in controlled composting conditions. *Polymer Degradation and Stability*. 2013, **98**(5), 1089-1096. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2013.01.005. ISSN 01413910.
- [110] KUNIOKA, Masao, Fumi NINOMIYA a Masahiro FUNABASHI. Biodegradation of poly(lactic acid) powders proposed as the reference test materials for the international standard of biodegradation evaluation methods. *Polymer Degradation and Stability*. 2006, **91**(9), 1919-1928. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2006.03.003. ISSN 01413910.
- [111] TABASI, Ramin Yousefzadeh a Abdellah AJJI. Selective degradation of biodegradable blends in simulated laboratory composting. *Polymer Degradation and Stability*. 2015, **120**, 435-442. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2015.07.020. ISSN 01413910.
- [112] QI, Xiang, Yiwei REN a Xingzu WANG. New advances in the biodegradation of Poly(lactic) acid. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2017, **117**, 215-223. DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.01.010. ISSN 09648305.
- [113] JARERAT, Amnat, Yutaka TOKIWA a Hideo TANAKA. Microbial Poly(L-Lactide)-Degrading Enzyme Induced by Amino Acids, Peptides, and Poly(L-Amino Acids). *Journal of Polymers and the Environment*. 2004, **12**(3), 139-146. DOI: 10.1023/B:JOOE.0000038545.69235.f2. ISSN 1566-2543.
- [114] MOLITORIS, H. P., S. T. MOSS, G. J. M. DE KONING a D. JENDROSSEK. Scanning electron microscopy of polyhydroxyalkanoate degradation by bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1996, **46**(5-6), 570-579. DOI: 10.1007/s002530050863. ISSN 0175-7598.