



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VYUŽITÍ KOPOLYMERNÍCH PHA PŘI VÝVOJI INTELIGENTNÍCH OBALŮ

USE OF COPOLYMER POLYHYDROXYALKANOATES IN DEVELOPMENT OF INTELLIGENT PACKAGING

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Monika Kreuzerová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1672/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Monika Kreuzerová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Využití kopolymerních PHA při vývoji inteligentních obalů

Zadání bakalářské práce:

1. Zpracovat literární rešerši se zaměřením na i. moderní trendy ve vývoji obalových materiálů a ii. materiálové vlastnosti a aplikační potenciál kopolymerních PHA.
2. Realizovat sérii kultivačních experimentů za účelem produkce kopolymerních PHA materiálů.
3. Připravit modelové vrstvy kopolymerních PHA a stanovit jejich relevantní vlastnosti dle požadavků na moderní obalové materiály.
4. Na základě získaných experimentálních dat zhodnotit potenciál využitelnosti kopolymerních PHA materiálů při vývoji a výrobě inteligentních obalových materiálů.

Termín odevzdání bakalářské práce: 27.5.2022:

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

Monika Kreuzerová
studentka

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

Abstrakt

Táto bakalárska práca sa zaoberá prípravou a charakterizáciou kopolymérov P(3HB-*co*-4HB). Teoretická časť pojednáva o polyhydroxyalkanoátoch (PHA), kde je opísaná ich štruktúra, vlastnosti a syntéza a následne sú v práci uvedené vybrané kopolyméry, ktoré obsahujú monomérmé jednotky 3HB. Ďalej je spracovaná rešeršná časť na súčasný stav danej problematiky, ktorá uvádza využitie kopolymérnych PHA a aktuálne výskumné práce o inkorporácii aktívnych látok do kopolymérov. Cieľom tejto práce bolo charakterizovať a porovnať vytvorené fólie P(3HB) a P(3HB-*co*-4HB) s obsahom monomérmé jednotky 4HB 65,25 % a 43,61 % a následne určiť potenciál využiteľnosti fólii ako inteligentných obalových materiálov. Najprv boli PHA podrobené plynovej chromatografii, SEC-MALS, FTIR a DSC analýze. V druhej časti práce bola študovaná priepustnosť fólii pre vodnú paru a uvoľňovanie modelových aktívnych látok z PHA fólii. Za týmto účelom boli zvolené dve aktívne látky (kurkumín a kyselina salicylová), ktoré boli inkorporované do fólii homopolyméru P(3HB) a dvoch kopolymérov so zastúpením 4HB 65,25 % a 43,61 %. Pri fóliách pripravených z kopolymérov prebiehala difúzia aktívnych látok rýchlejšie ako pri P(3HB). V rámci kopolymérov uvoľňoval látky vyššou rýchlosťou P(3HB-*co*-43,61%4HB), a to z dôvodu väčšej kryštalinity kopolyméru s obsahom 65,25 % 4HB.

Kľúčové slová

Polyhydroxyalkanoáty, homopolymér, kopolymér, fólie, aktívne látky, kurkumín, kyselina salicylová

Abstract

This bachelor thesis deals with the preparation and characterization of copolymers P(3HB-*co*-4HB). The theoretical part discusses polyhydroxyalcanolates (PHA), where their structure, properties and synthesis are described and subsequently the selected copolymers, which contain monomeric units 3HB, are listed. Furthermore, the review part is processed for the current state of the issue, which states the use of copolymers PHA and current research work on the incorporation of active substances into copolymers. The aim of this work was to characterize and compare the created P(3HB) and P(3HB-*co*-4HB) foils with a 4HB monomeric unit of 65,25 % and 43,61 % and subsequently determine the potential of foil usability as intelligent packaging materials. First, PHA were subjected to gas chromatography, SEC-MALS, FTIR and DSC analysis. In the second part of the thesis, the permeability of foils to water vapor and the release of model active substances from PHA foils was studied. For this purpose, two active substances (curcumin and salicylic acid) were selected, which were incorporated into a film of homopolymer P(3HB) and two copolymers with a proportion of 4HB of 65,25 % and 43,61 %. In foils prepared from copolymers, the active substances diffusion was faster than in P(3HB). Within the copolymers, P(3HB-*co*-43,61%4HB) released substances at a higher speed, due to the greater crystallinity of a copolymer containing 65,25 % 4HB.

Keywords

Polyhydroxyalkanoates, homopolymer, copolymer, foils, active substances, curcumin, salicylic acid

KREUZEROVÁ, Monika. Využití kopolymerních PHA při vývoji inteligentních obalů [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-05-27]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139079>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Petr Sedláček.

Prehlásenie

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom iba so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekanom FCH VUT.

.....

Monika Kreuzerová

Pod'akovanie

Týmto by som rada poďakovala môjmu vedúcemu Ing. Petrovi Sedláčkovi, Ph.D. za jeho čas, ochotu, odbornú pomoc a ďalšie cenné rady pri spracovaní experimentálnej časti bakalárskej práce. Ďalej by som chcela poďakovať Ing. Eve Slaninovej, Ph.D. za konzultácie, pomoc pri práci v laboratóriu a za korektúru mojej práce. Poďakovanie patrí aj Ing. Monike Trudičovej za venovaný čas pri analýze hrúbky fólii. Nakoniec by som chcela poďakovať mojej sestre za dôkladnú gramatickú korektúru a rodičom za podporu.

Obsah

1.	ÚVOD	8
2.	TEORETICKÁ ČASŤ.....	9
2.1	POLYHYDROXYALKANOÁTY	9
2.1.1	Štruktúra a zloženie	9
2.1.2	Fyzikálne vlastnosti	9
2.1.3	Klasifikácia polyhydroxyalkanoátov	10
2.1.4	Syntéza polyhydroxyalkanoátov	11
2.2	VYBRANÉ PARAMETRE OBALOVÝCH MATERIÁLOV	13
2.2.1	Permeabilita kyslíka.....	13
2.2.2	Permeabilita vodnej pary	14
2.3	MODELOVÉ KOPOLYMÉRY POLYHYDROXYALKANOÁTOV.....	15
2.3.1	P(3HB-co-4HB).....	15
2.3.2	P(3HB-co-3HV).....	16
2.3.3	P(3HB-co-3HHx).....	17
3.	SÚČASNÝ STAV DANEJ PROBLEMATIKY	18
3.1	APLIKÁCIA KOPOLYMÉRNÝCH POLYHYDROXYALKANOÁTOV	18
3.1.1	Obalové materiály	18
3.1.2	Medicínske aplikácie	18
3.1.3	Poľnohospodárstvo	19
3.2	SÚČASNÝ STAV VÝVOJA INTELIGENTNÝCH OBALOV	20
4.	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	22
4.1	POUŽITÉ MIKROORGANIZMY	22
4.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	22
4.3	POUŽITÉ PRÍSTROJE.....	22
4.4	KULTIVÁCIA	23
4.4.1	Príprava inokula.....	23
4.4.2	Príprava minerálneho média.....	23
4.4.3	Príprava sušenej biomasy	25
4.5	EXTRAKCIA POLYHYDROXYALKANOÁTOV	25
4.6	ANALÝZA BIOMASY A VYEXTRAHOVANÝCH KOPOLYMÉRNÝCH POLYHYDROXYALKANOÁTOV.....	26
4.6.1	Spektrofotometrická a gravimetrická analýza.....	26
4.6.2	Analýza pomocou plynovej chromatografie	26
4.6.3	Charakterizácia pomocou SEC-MALS	27
4.6.4	Štúdium molekulárnej štruktúry	27
4.6.5	Analýza diferenciálnou skenovacou kalorimetriou.....	27
4.7	PRÍPRAVA FILMOV A ICH CHARAKTERIZÁCIA	28
4.7.1	Nanášanie polyhydroxyalkánových filmov	28
4.7.2	Stanovenie hrúbky filmov.....	28
4.8	ŠTÚDIUM PRESTUPU VODNEJ PARY	28
4.9	INKORPORÁCIA A UVOLNENIE AKTÍVNYCH LÁTOK Z FÓLII.....	29
4.9.1	Príprava fólii s aktívnymi látkami	29
4.9.2	Meranie absorpcie pomocou UV-VIS spektroskopie.....	30

5.	VÝSLEDKY A DISKUSIA	32
5.1	KULTIVÁCIA BAKTÉRII.....	32
5.2	CHARAKTERIZÁCIA BIOMASY	32
5.2.1	Spektrofotometrická a gravimetrická analýza.....	32
5.2.2	Stanovenie obsahu PHA	33
5.2.3	FTIR analýza	34
5.3	IZOLÁCIA POLYHYDROXYALKANOÁTOV	35
5.4	CHARAKTERIZÁCIA FÓLII.....	35
5.4.1	Stanovenie molekulovej hmotnosti.....	35
5.4.2	FTIR analýza	36
5.4.3	DSC analýza	37
5.5	ANALÝZA VÝŠKY PRIPRAVENÝCH FILMOV.....	38
5.6	PERMEABILITA FÓLII VOČI VODNEJ PARE	39
5.7	OPTIMALIZÁCIA UVOĽŇOVANIA MODELOVÝCH AKTÍVNYCH LÁTOK	41
5.8	UVOĽŇOVANIE MODELOVÝCH AKTÍVNYCH LÁTOK	44
6.	ZÁVER	48
7.	ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV	50
8.	ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK	57
8.1	POUŽITÉ SKRATKY	57
8.2	POUŽITÉ SYMBOLY	58
9.	ZOZNAM PRÍLOH.....	59
10.	PRÍLOHY.....	60

1. ÚVOD

Plasty sa stali dôležitou komoditou na zvýšenie pohodlia a kvality života a sú nevyhnutnou súčasťou takmer všetkých priemyselných odvetví, kde napríklad v obalovom priemysle nahradili sklo a papier. Avšak ich veľmi žiaduce vlastnosti (pevnosť, ľahkosť, trvanlivosť a odolnosť voči degradácii) sú v súčasnosti draho vykúpené ekologickými dopadmi spojenými s hromadením odolných plastov v prírode. Zostávajú napríklad vo vodných plochách, pôde a na skládkach desiatky až stovky rokov. Za posledné roky obavy zo škodlivých účinkov týchto petrochemických plastov zo strany verejných a environmentálnych orgánov vzrástli. Toto povedomie iniciovalo globálnu vedeckú snahu o vývoj alternatívnych ekologických a biologicky odbúrateľných polyesterov a iných náhrad plastov.

Medzi tieto udržateľné polyméry patria aj polyhydroxyalkanoáty. Polyhydroxyalkanoáty (PHA) sú biopolyméry, ktoré sú produkované veľkým množstvom baktérii v prírode, napríklad *Cupriavidus necator* H16 alebo *Pseudomonas putida*, ako intracelulárna uhlíková a energetická rezerva. Homopolymér poly(3-hydroxybutyrát) (P3HB) je najdôležitejším predstaviteľom týchto biopolymérov. Už v roku 1925 francúzsky mikrobiológ Maurice Lemoigne objavil a charakterizoval P(3HB) extrahovaný z *Bacillus megaterium*. Od objavu P(3HB) bolo založených veľa spoločností na komercializáciu PHA ako biodegradovateľných plastov. PHA boli predávané ako bioplasty šetrné k životnému prostrediu s nižšími emisiami CO₂ a udržateľnosťou, ako aj nezávislosťou od ropných zdrojov. Avšak ani rozsiahly marketing doteraz nebol úspešný, a to konkrétne z dôvodu vysokých výrobných nákladov týchto bioplastov, nejednotných vlastností a aj ťažkostí pri spracovaní v porovnaní s konvenčnými plastmi z ropných zdrojov. V budúcnosti je potrebné vynaložiť viac úsilia na to, aby boli PHA konkurencieschopné konvenčným plastom, najmä pokiaľ ide o výrobné náklady (využitie odpadných substrátov a iné).

Aj napriek tomu, že je výroba spojená s vysokou cenou, polyhydroxyalkanoáty si našli súčasné uplatnenie napríklad v medicíne (vďaka ich biokompatibilite a biodegradabilite), farmácii a poľnohospodárstve. Ďalšou sľubnou oblasťou budúceho využitia PHA by mohli byť obalové materiály obsahujúce aktívne látky, tzv. aktívne obaly. Aktívne látky v obaloch môžu byť využité hlavne ako lapače kyslíka, absorbéry etylénu, uvoľňujúce/absorbujúce arómu, antioxidanty, antibakteriálne látky a regulátory vlhkosti. Aj keď sa nová technológia aktívnych obalov začína uplatňovať v potravinárskom priemysle, aktívne materiály v kombinácii so širokou škálou aktívnych látok sú predmetom neustáleho výskumu.

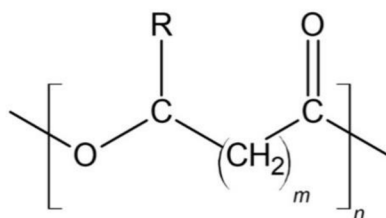
2. TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) sú termoplastické polyestery monomérov kyseliny R-hydroxyalkánovej (HA). Tieto polyméry sú syntetizované mikroorganizmami ako zásobné látky uhlíka a energie vo forme intracelulárnych granúl [1]. Granule sú dobre organizované komplexné útvary, tiež označované ako karbonozómy, dosahujúce priemer 0,2 – 0,4 μm v závislosti od typu organizmu produkujúceho PHA. Obsah PHA môže dosiahnuť až 90 % hmotnosti suchej biomasy [2, 3].

2.1.1 Štruktúra a zloženie

Štruktúrne sú PHA klasifikované na základe počtu atómov uhlíka monomérnej jednotky a jej typu (pozri obrázok 1). Tak môžu tvoriť buď homopolyméry (iba jeden typ monomérnej jednotky, ktorá sa opakuje) alebo heteropolyméry (najmenej dva rôzne druhy monomérnej jednotky) [1]. Doposiaľ bolo identifikovaných 150 odlišných monomérov polyhydroxyalkanoátov [4]. To vytvára možnosť výroby rôznych typov PHA so širokým rozsahom vlastností. Molekulová hmotnosť PHA sa pohybuje v rozmedzí 50 000 – 1 000 000 Da v závislosti na mikroorganizme a rastových podmienkach. Všetky monomérne jednotky sa nachádzajú v D (–) konfigurácii v dôsledku stereospecificity biosyntetických enzýmov [5].



Obrázok 1: Obecná štruktúra PHA [6]

2.1.2 Fyzikálne vlastnosti

Polyhydroxyalkanoáty sú nerozpustné vo vode a majú dobrú odolnosť voči hydrolytickému tlaku a UV žiareniu. Zároveň sú rozpustné v chloroforme a iných chlórových rozpúšťadlách. Medzi najpoprednejšie vlastnosti PHA patrí biokompatibilita a biodegradabilita (napríklad podliehajú degradácii v pôde). Ďalšími vlastnosťami sú nízka teplota skleneného prechodu (T_g), ktorá sa pohybuje od $-50\text{ }^\circ\text{C}$ do $4\text{ }^\circ\text{C}$ a teplota topenia (T_m) v rozmedzí od $40\text{ }^\circ\text{C}$ do $180\text{ }^\circ\text{C}$. Ako už bolo zmienené vyššie (pozri kapitola 2.1.1), PHA sa môžu deliť na homopolyméry a heteropolyméry v závislosti na zastúpení daných monomérnych jednotiek. Chemické zloženie PHA tak priamo ovplyvňuje fyzikálno-chemické vlastnosti samotných polymérov. Z toho dôvodu fyzikálno-chemické a materiálové parametre (ukazuje tabuľka 1) ako teplota skleneného prechodu a topenia, pevnosť v ťahu, Youngov modul, rýchlosť prenosu vodnej pary a kyslíka odpovedajú rôznym hodnotám [4].

Tabuľka 1: Mechanické vlastnosti PHA polymérov [7]

Polymér	Teplota topenia [°C]	Teplota skleného prechodu [°C]	Youngov modul [GPa]	Pevnosť v ťahu [MPa]	Ťažnosť [%]
P(3HB)	179	4	3,5	40	5
P(3HB-co-9%3HV)	162	-	1,9	37	-
P(3HB-co-25%3HV)	137	-	0,7	30	-
P(4HB)	53	-	149	104	1000
P(3HB-co-10%4HB)	159	-	-	24	242
P(3HB-co-90%4HB)	50	-	100	65	1080
P(3HB-co-3HHx)	52	-4	-	20	850
P(3HHx-co-3HO)	61	-	-	10	300

Najvýznamnejším predstaviteľom polyhydroxyalkanoátov je homopolymér poly(3-hydroxybutyrát) P(3HB), ktorý je špecifický vysokým stupňom kryštalinity (55 – 80 %) a tvorí tenké kryštály s teplotou topenia 179 °C. Je zrejme, že P(3HB) je podobný izotaktickému polypropylénu (iPP), čo dokazujú malé rozdiely hodnôt vlastností ako ťažnosť, teplota topenia, pevnosť v ťahu a aj dobrá odolnosť oboch polymérov voči UV žiareniu. Ťažnosťou sa líšia iba o 3 %, teplotou topenia o 16 °C a pevnosťou v ťahu o 12 MPa. To ukazuje potenciál pre P(3HB) v oblasti obalových materiálov [8].

2.1.3 Klasifikácia polyhydroxyalkanoátov

V podkapitole 2.1.1 bolo spomenuté, že PHA sú klasifikované na základe dĺžky monoméneho reťazca. Konkrétne ich je možné rozdeliť do 3 typov: scl-PHA, mcl-PHA a lcl-PHA.

Scl-PHA označuje skratku pre *short chain lenght* alebo tiež polymér s krátkym reťazcom, kedy monoména jednotka obsahuje 3 – 5 atómov uhlíka. Takýto polymér môže byť syntetizovaný napríklad baktériami *Cupriavidus necator* a *Alcaligenes latus*. Najznámejším zástupcom z homopolymérnej skupiny je poly(3-hydroxybutyrát) P(3HB) a z heteropolymérnej skupiny poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) P(3HB-co-3HV). Tieto polyméry sú kryštalické, sú dosť krehké a tuhé, s vysokými T_m a nízkymi T_g . Naproti tomu P(4HB), ďalší homopolymérny scl-PHA, je pevný a poddajný termoplastický polyester. Niektoré polyméry s krátkym reťazcom majú vyššiu pevnosť v ťahu ako polypropylén, čo je možné vidieť v tabuľke 2 [5, 9].

Polymér so strednou dĺžkou reťazca, označovaný aj ako mcl-PHA (*medium chain lenght*) pozostáva z monomérnych reťazcov, ktorých dĺžka je v rozmedzí 6 – 14 atómov uhlíka. Tento druh polyhydroxyalkanoátov je syntetizovaný napríklad baktériami *Pseudomonas putida* a *Pseudomonas mendocina*. Mcl-PHA sú termoplastické elastoméry s nízkou kryštalinitou a pevnosťou v ťahu, ale s vysokou ťažnosťou pri pretrhnutí. Majú nižšie T_m a T_g v porovnaní s scl-PHA a polypropylénom (tabuľka 2). Medzi zástupcov mcl-PHA patria poly(3-hydroxyoktanoát) P(3HO), poly(3-hydroxyhexanoát) P(3HHx), ich kopolymér poly(3-hydroxyhexanoát-co-3-hydroxyoktanoát) P(3HHx-co-3HO) a ďalšie [9].

Lcl-PHA je skratkou pre polymér s dlhou dĺžkou reťazca (*long chain lenght*), ktorý obsahuje monomérene jednotky s 15 a viac atómami uhlíka. Tieto PHA sú v prírode zriedkavé a sú obzvlášť menej časté v procese vývoja bioplastov [10]. Vedcom sa podarilo syntetizovať kopolymér scl-lcl-PHA pomocou baktérie *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 7925, ktorá bola kultivovaná na syrovej srvátke. Tento kopolymér pozostával z 3HB, 3HV, 3HHD a 3HOD, kde 3-hydroxyhexadekanoát (3HHD) a 3-hydroxyoktadekanoát (3HOD) patria pod lcl-PHA [11].

Tabuľka 2: Mechanické vlastnosti podľa dĺžky bočného reťazca PHA [9, 12-14]

Vlastnosti	Scl-PHA	Mcl-PHA	Lcl-PHA	Polypropylén
Kryštalinita [%]	40 – 80	20 – 40	-	70
Teplota topenia [°C]	80 – 180	30 – 80	-	176
Teplota skleného prechodu [°C]	(-48) – 4	(-39) – (-53)	-	-10
Hustota [g/cm ³]	1,25	1,05	-	0,91
Ťažnosť [%]	6 – 10	300 – 450	-	400
Pevnosť v ťahu [MPa]	24 – 104	10 – 21	-	34,5
Odolnosť voči UV	dobrá	dobrá	dobrá	zlá
Odolnosť voči rozpúšťadlám	zlá	zlá	zlá	dobrá
Biodegradabilita	dobrá	dobrá	dobrá	žiadna

2.1.4 Syntéza polyhydroxyalkanoátov

Ako bolo uvedené v podkapitole 2.1.1, polyhydroxyalkanoáty sa líšia svojimi fyzikálnymi a chemickými vlastnosťami v dôsledku ich rôzneho obsahu monomérov. Tieto odlišnosti sú spôsobené faktormi ako typ mikroorganizmu (napríklad gram-negatívne alebo gram-pozitívne), zložky média, výber substrátu, podmienky fermentácie, spôsoby fermentácie (batch, fed-batch, kontinuálna) a regenerácia [1].

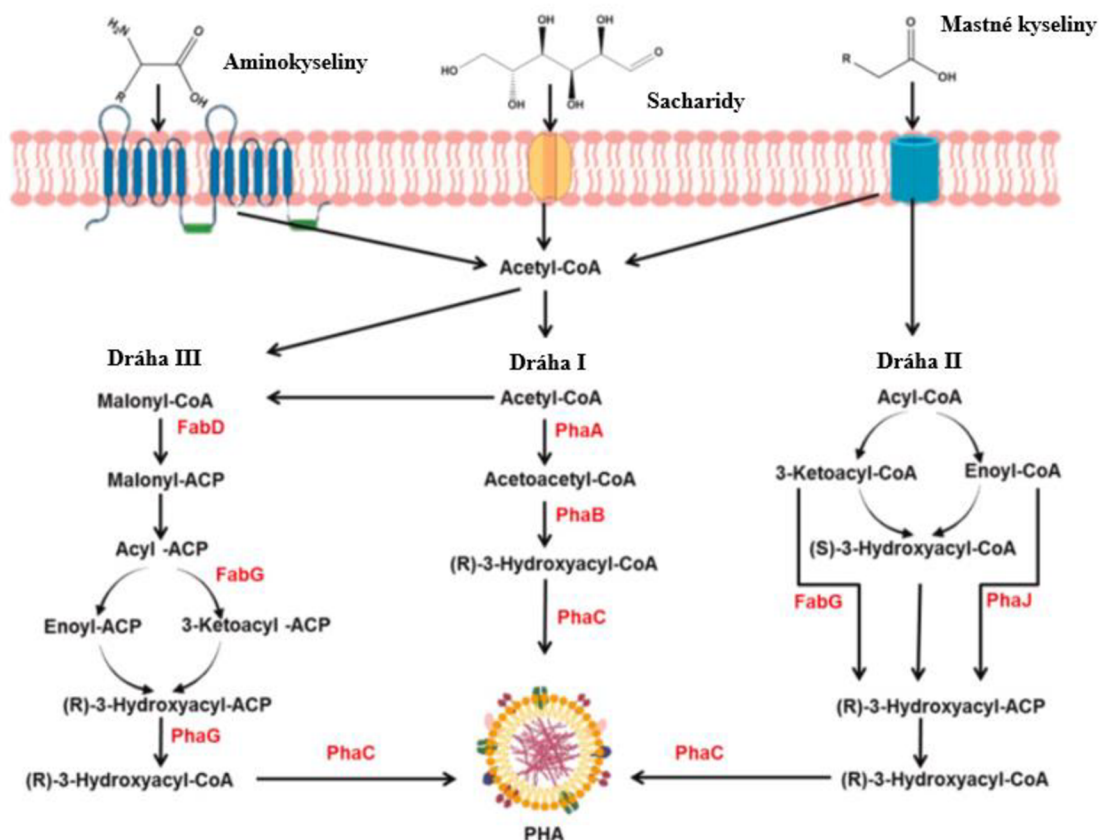
Viac ako 300 druhov gram-pozitívnych a gram-negatívnych baktérii má metabolickú schopnosť syntézy PHA. Tie môžu byť rozdelené do dvoch skupín podľa produkcie PHA. Prvá skupina baktérii vyžaduje obmedzenie živín fosforu, dusíka alebo kyslíka a neakumuluje PHA počas fázy rastu. Do tejto skupiny patria napríklad *Pseudomonas oleovorans* a *Pseudomonas putida*. Druhá skupina baktérii, *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes Latus* a rekombinantná *Escherichia coli*, nepotrebuje obmedziť živiny na produkciu PHA počas fázy rastu. Dôležitý faktor, ktorý spôsobuje odlišnosti v zložení PHA, je aj typ dostupného zdroja uhlíka, respektíve substrátu (napr. glukóza, sacharóza, metanol, oxid uhličitý a ďalšie) [1, 4, 5].

Štúdie zahrňujúce biosyntézu polyhydroxyalkanoátov odhalili 3 najčastejšie biochemické dráhy mikrobiálnej syntézy PHA (pozri obrázok 2). Za najbežnejšiu biochemickú dráhu v mikroorganizmoch sa považuje využitie glukózy kvôli tomu, že je to dráha na syntézu P(3HB), najbežnejší typ PHA [15].

Táto dráha sa označuje ako dráha I a premieňa molekuly cukru na polyhydroxyalkanoáty pomocou troch hlavných enzýmov: β -ketotiolázy, NADPH závislej acetoacetyl-CoA reductázy a PHA syntázy. Tieto enzýmy sú kódované ako PhaA, PhaB a PhaC. Uvádza sa, že baktéria *Cupriavidus necator* syntetizuje PHA touto dráhou [8, 15].

Na rozdiel od dráhy I, dráha II sa týka využitia mastných kyselín mikroorganizmami. Produkovaný acyl-CoA po β -oxidácii mastnej kyseliny syntetizuje monoméry PHA. V tejto dráhe sú zahrnuté enzýmy ako 3-ketoacyl-CoA reductáza, epimeráza, (R)-enoyl-CoA hydratáza a acyl-CoA oxidáza, zatiaľ čo 3-hydroxyacyl-CoA funguje ako prekursorová molekula pre syntézu PHA. Pomocou tejto dráhy rôzne mikroorganizmy, vrátane *Pseudomonas putida* a *Aeromonas hydrophila*, syntetizujú mcl-PHA [15, 7].

Tretia dráha (III) pre syntézu polyhydroxyalkanoátov vyžaduje dva kľúčové enzýmy, 3-hydroxyacyl-ACP-CoA transferázu (PhaG) a malonyl-CoA-ACP transacylázu (FabD). Tieto enzýmy dodávajú prekursor (3-hydroxyacyl-ACP), ktorý sa ďalej premieňa na 3-hydroxyacyl-CoA [15].



Obrázok 2: Hlavné dráhy biosyntézy PHA v mikroorganizmoch [15]

Ako je možné vidieť na obrázku 2, PHA syntáza (PhaC) je zásadný enzým potrebný vo všetkých troch dráhach na tvorbu PHA. Okrem týchto troch základných dráh sa nachádzajú v rôznych mikroboch aj ďalšie dráhy na syntézu PHA, ktoré zahŕňujú širokú škálu enzýmov (napr. alkohol dehydrogenáza, laktonáza, hydroxyacyl-CoA syntáza, sukcinát semialdehyddehydrogenáza (SucD) a ďalšie) [15].

2.2 Vybrané parametre obalových materiálov

V podkapitole 2.1.2 boli spomenuté fyzikálne vlastnosti PHA, ktoré, ako bolo možné vidieť, sú veľmi variabilné. Práve tieto vlastnosti sú kľúčové pri posudzovaní daného plastu a jeho následné využitie ako obalový materiál. Pri navrhovaní plastových obalov sú najdôležitejšími vlastnosťami hustota, stupeň polymerizácie, tepelné vlastnosti (teplota skleného prechodu, teplota topenia, kryštalizačná teplota, entalpia topenia, tepelná rozťažnosť a ďalšie), chemická odolnosť, fyzikálne vlastnosti (napr. koeficient trenia, pevnosť v ťahu, ťažnosť, viskozita, elasticita a ďalšie), morfológické vlastnosti a priepustnosť kyslíka a vodnej pary [16].

2.2.1 Permeabilita kyslíka

Permeabilita kyslíka je jednou z najčastejšie študovaných transportných vlastností obalových fólií. Molekulový priemer kyslíka je $2,98 \cdot 10^{-10}$ m, čo umožňuje plynnému

kyslíku ľahko prejsť fóliami s väčšou veľkosťou pórov. Kyslíková bariéra sa kvantifikuje pomocou koeficientu priepustnosti kyslíka (OP) (pozri rovnicu 1), ktorý udáva množstvo preniknutého kyslíka na jednotku povrchu obalového materiálu za jednotku času [$\text{kg} \cdot \text{m}/\text{m}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{Pa}$].

$$OP = \frac{OTR \cdot l}{\Delta P} \quad (1)$$

Kde *OTR* (z angl. *oxygen transmission rate*) je rýchlosť prenosu kyslíka [$\text{ml}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$], *l* je hrúbka filmu [m] a ΔP je rozdiel parciálneho tlaku kyslíka [Pa] [17, 18].

Zmeny v priepustnosti kyslíka medzi rôznymi filmami na báze polymérov sa vyskytujú v dôsledku rôznej veľkosti pórov, chemickej štruktúry a kryštalinity. Zároveň permeabilita kyslíka závisí od testovacích podmienok vrátane relatívnej vlhkosti a teploty [16].

2.2.2 Permeabilita vodnej pary

Rýchlosť prenosu vodnej pary (WVTR) je miera objemu vodnej pary, ktorá môže preniknúť do oblasti materiálu v danom časovom období, uvedená v jednotkách hmotnosti na plochu a čas. Pochádza zo všeobecnej rýchlosti prenosu pár (VTR), ktorá pokrýva všetky druhy výparov. Poskytuje celkový pohľad na to, ako fungujú bariérové vlastnosti tenkej vrstvy materiálu. Z toho dôvodu je najviac použiteľná pre obalové materiály, kde je relevantná pre zapuzdrené objekty, aby sa zabránilo vniknutiu vody [19]. *WVTR* je možné vypočítať z rovnice 2 po dosiahnutí ustáleného stavu.

$$WVP = \frac{WVTR \cdot l}{\Delta P} \quad (2)$$

Kde *WVP* (z angl. *water vapor permeability*) je koeficient priepustnosti vodnej pary [$\text{g}/\text{m} \cdot \text{s} \cdot \text{Pa}$], *WVTR* je miera priepustnosti vodnej pary [$\text{g}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$], *l* je hrúbka filmu [m] a ΔP je rozdiel parciálneho tlaku vodnej pary [Pa] [18].

Podľa štúdie z roku 2012, ktorá porovnávala priepustnosť kyslíka a vodnej pary komerčných polymérov (pozri tabuľku 3) je zrejmé, že polyamid (PA) spolu s kopolymérom P(3HB-co-3HV) preukázali najlepšie bariérové vlastnosti. Naproti tomu polylaktid (PLA), ako ďalší biopolymér, vykazuje horšie bariérové vlastnosti oproti polyhydroxyalkanoátom. V porovnaní P(3HB) a jeho kopolymérov, hodnoty ukazujú, že inkorporovanie iba malého množstva 3-hydroxyvalerátu (3HV) znižuje priepustnosť kyslíka a vodnej pary. Naopak začlenenie 4-hydroxyvalerátu (4HB) do reťazca P(3HB) znamená zvyšovanie priepustnosti. Nedá sa však povedať s akou účinnosťou, pretože autori neuviedli percentuálne zastúpenie 4HB v kopolymére. Na druhú stranu syntetické plasty, polypropylén (PP) a polystyrén (PS), vykazovali približne desaťkrát vyššiu priepustnosť kyslíka oproti spomenutým biopolymérom [18].

Tabuľka 3: Priepustnosť kyslíka (OP) a vodnej pary (WVP) rôznych komerčných polymérov [18]

Polymér	OP [cm ³ · μm · m ⁻² · deň ⁻¹ · atm ⁻¹]	WVP [g · m ⁻¹ · s ⁻¹ · Pa ⁻¹]
P(3HB-co-8%3HV)	0,26	2,7 · 10 ⁻¹²
P(3HB-co-4HB)	1,51	5,6 · 10 ⁻¹²
P(3HB)	1,16	1,6 · 10 ⁻¹¹
PA	0,01	6,2 · 10 ⁻¹³
PLA	2,95	1,6 · 10 ⁻¹²
PP	11,50	7,0 · 10 ⁻¹²
PS	12,85	1,8 · 10 ⁻¹¹

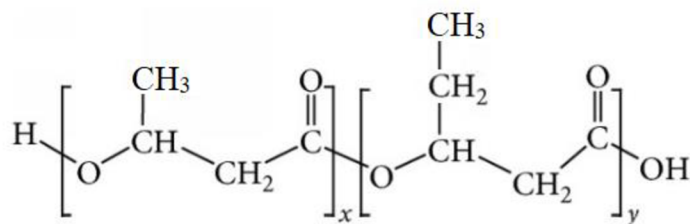
2.3 Modelové kopolyméry polyhydroxyalkanoátov

Ako už bolo spomenuté v podkapitolách 2.1.1 a 2.1.2, poly(3-hydroxybutyrát) P(3HB) homopolymér je najbežnejším typom PHA. Jeho hodnoty Youngovho modulu a pevnosti v ťahu sú podobné polypropylénu (PP). Avšak P(3HB) je krehkejší a tuhší v porovnaní s PP. Na prekonanie týchto dvoch nedostatkov sa kombinujú dva alebo viac monomérov, ako napríklad 3-hydroxyhexanoát, 3-hydroxyvalerát a 4-hydroxybutyrát, aby vytvorili kopolymér alebo terpolymér (obsahuje tri rôzne druhy monomérov) [20]. Ich syntéza môže prebiehať bakteriálnou alebo chemickou cestou. Bežnou metódou modifikácie chemickými cestami je kopolymerácia. Tá je najlepšia spomedzi niekoľkých riešení, pretože monoméry sú spojené chemickými väzbami a ich pomer sa môže meniť podľa požiadaviek. Medzi ďalšie chemické cesty syntézy môže patriť transesterifikácia, chemický proces štiepenia, polymerizácia za pomoci otvorenia kruhu a ďalšie [21]. Vzhľadom na zadanie mojej bakalárskej práce som sa zamerala na nasledujúce kopolymérne PHA (podkapitoly 2.3.1-2.3.3).

2.3.1 P(3HB-co-4HB)

Kopolymér poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát), ktorý sa označuje ako P(3HB-co-4HB), vzniká po začlenení monomérovej jednotky 4HB do reťazca P(3HB). Všeobecnú štruktúru je možné vidieť na obrázku 3. P(3HB-co-4HB) disponuje relatívne dobrou húževnatosťou a procesnými vlastnosťami v porovnaní s inými PHA, vďaka prítomnosti 4HB monoméru, ktorý znižuje kryštalinitu a teplotu topenia. Zároveň môže tento kopolymér vykazovať široký rozsah materiálových vlastností, od tvrdého kryštalického plastu až po veľmi elastickú gumu v závislosti od zastúpenia 4HB v kopolymére (pozri tabuľku 4). Kvôli tomu P(3HB-co-4HB) preukazuje vysoký potenciál na širokú škálu využití, napríklad hojenie rán, podávanie liekov, tkanivové

za predpokladu, že mikrobiálna aktivita a podmienky prostredia sú vhodné. Úplná biodegradácia iných PHA, ako je P(3HB) a P(3HB-*co*-4HB), trvá o niečo dlhšie (približne 0,5 – 4× dlhšie v závislosti na podmienkach prostredia) [28].



Obrázok 4: Chemická štruktúra P(3HB-*co*-3HV) [29]

2.3.3 P(3HB-*co*-3HHx)

Tento kopolymér obsahuje dve charakteristické monomérmé jednotky 3HB a 3HHx, ktoré sa líšia tepelnými a mechanickými vlastnosťami. Kombináciou týchto dvoch monomérov môžeme dosiahnuť výrazného zlepšenia materiálových vlastností. Kopolymér môže byť usporiadaný v náhodnej forme (najbežnejšie používaná) alebo blokovej forme. Preto sa jeho vlastnosti líšia v závislosti od typu kopolymerácie. Keďže P(3HHx) je v natívnej forme amorfný, teplota topenia kopolyméru je daná podľa zastúpenia 3HB. V porovnaní s vlastnosťami P(3HB) (so 42 mol % 3HHx) je zrejme, že Youngov modul sa znížil z 1470 MPa na približne 7,6 MPa, ťažnosť sa zlepšila z 3 % na 207 % a pevnosť v ťahu sa znížila z 18 MPa na 1,4 MPa. Ako je možné vidieť, zatiaľ čo flexibilita sa dramaticky zvyšuje, Youngov modul a pevnosť sa výrazne znižujú [29].

3. SÚČASNÝ STAV DANEJ PROBLEMATIKY

3.1 Aplikácia kopolymérnych polyhydroxyalkanoátov

Polyhydroxyalkanoáty sú polyestery, ktoré sú mimoriadne dôležité vďaka svojim jedinečným vlastnostiam. Pomocou nich sa môžu tieto polyméry stať ekologickou náhradou za syntetické polyméry, teda plasty. Polyhydroxyalkanoáty sa ukázali ako udržateľný zdroj na výrobu bioplastov. Mikrobiálne PHA sú netoxické a ekologické, čo znamená, že ich použitie nemá negatívny vplyv na životné prostredie. Ako už bolo zmienené vyššie (pozri podkapitolu 2.1.2), fyzikálne a chemické vlastnosti PHA sú dosť podobné plastom na petrochemickej báze. Existuje široká škála aplikácií, kde PHA pôsobia ako biomateriály na rôzne použitie, napríklad obalové materiály, poľnohospodárske mulčovacie fólie, materiály na 3D tlač, textil, lekárske implantáty, nosiče liekov a nové typy biopalív [10, 15].

3.1.1 Obalové materiály

Používanie plastov ako obalového materiálu je pomerne rozšírené. Avšak balenie potravinárskeho materiálu si vyžaduje špecifické požiadavky, ktoré zahŕňajú ochranu pred prachom, kontaminantmi a dehydratáciou, stabilitu potravín, degradáciu v priebehu a uchovanie vône počas dlhej doby skladovania. PHA majú potenciál splniť požiadavky na obalový materiál potravinárskej kvality, pričom ich prednosti sú najmä materiálové vlastnosti a priepustnosť [31]. P(3HB-*co*-3HV) je možné použiť ako fľaše na nápoje, povlak na papieri a aj na výrobu biofilmov na zadnú stranu plienok [10]. Obalové materiály sa ďalej dajú vylepšiť inkorporáciou širokej škály aktívnych látok, ktoré vedú k zlepšeniu antioxidantných (rastlinné extrakty zo zázvoru, zeleného čaju a z listov ginkga, anthokyány alebo esenciálne oleje karvakrolu, škoric, tymianu) a antimikrobiálnych (esenciálne oleje oregana, rozmarínu a rastlinný extrakt z čučoriedky, jahody alebo cesnaku) vlastností [32]. V štúdiu *Sanchez-Garcia a kol.* (2007) použili limonén, bežne používaný na testovanie straty arómy počas skladovania, a zistili, že sa v kopolymére P(3HB-*co*-3HV) zadržiava dlhší čas [33].

3.1.2 Medicínske aplikácie

V medicínskej oblasti sa polyhydroxyalkanoáty používajú vďaka svojim vynikajúcim vlastnostiam, akými sú biokompatibilita (tvar, povrchová pórovitosť a chemické zloženie materiálov), biologická odbúrateľnosť a nízka cytotoxicita v bunkách. Takéto zlúčeniny sa používajú najmä ako biodegradovateľné nosiče na dodávanie liečiv. PHA sa tiež používajú ako materiály na osteosyntézu pri stimulácii rastu kostí vďaka svojim piezoelektrickým vlastnostiam a ďalej pri produkcii chirurgických stehov a pri náhrade krvných ciev [34].

Kopolymér P(3HB-*co*-4HB) (pozri podkapitolu 2.3.1), je schopný mať nastaviteľnú elasticitu a pevnosť podľa percentuálneho zastúpenia monomérskej jednotky 4HB.

Jeho ďalším predpokladom je, že môže vyvolať v organizme tvorbu elastínu, vďaka čomu je sľubným materiálom na stavbu umelých krvných ciev [35]. V druhom výskume z roku 2016 vedci *Vigneswari a kol.* vytvorili nanovláknennú štruktúru P(3HB-co-4HB), ktorá obsahovala kolagénový peptid. Na produkciu tohto materiálu použili technológiu elektrostatického zvlákňovania, vďaka ktorej má daný materiál zvýšenú povrchovú zmäčavosť a podporu rastu buniek a zároveň má požadované vlastnosti biodegradovateľných obvazov na rany. Táto štúdia ukázala, že tento kopolymér môže podporovať proliferáciu myších fibroblastov (L929) *in vitro* a vykazuje dobrý účinok na uzatvorenie rany (hojenie dosiahlo 79 %) [36].

Medzi ďalší materiál, ktorý študoval *Galego a kol.* patrí zmes P(3HB-co-8%3HV) a hydroxyapatitu (30% hm./hm.), ktorá má mechanickú pevnosť v tlaku ako ľudské kosti (62 MPa), vyvoláva nižšiu zápalovú odpoveď a spôsobuje vyššiu mineralizáciu [37]. Vo výskume vedci *Shishatskaya a kol.* (2004) implantovali potkanom stehy P(3HB) a P(3HB-co-3HV) a pozorovali ich v dlhodobých štúdiách, aby zistili, že vlákna PHA zostávajú aktívne a nevykazujú žiadne nepriaznivé účinky [38]. *Vardhan a kol.* (2017) zistili, že mikrosféry tvorené PHA, konkrétne P(3HB-co-3HV), v kombinácii s rifampicínom sa správajú ako nosiče liečiv a hemoembolizačné činidlá. V štúdiu je spomenuté, že implantáty, akými sú napríklad tyčinky vyrobené z kopolymérov PHA, majú účinnú schopnosť dodávať antibiotiká. Na jeho farmakokinetické vyhodnotenie použili nanočastice na báze docetaxelu s obsahom kopolyméru P(3HB-co-3HV). Uvádza sa, že nanočastice sú stabilné vzhľadom na ich fyzikálne vlastnosti. Spomenuté nanočastice pomohli zlepšiť cirkulačný čas s riadeným uvoľňovaním pri liečbe rakoviny prsníka [39].

V ďalšom výskume *Grigore a kol.* (2019) použili P(3HB-co-3HHx) ako materiál skeletov, na ktoré boli nasadené stromálne bunky ľudskej kostnej drene (hBMSC) na opravu poškodenia nervov. Vedci uvádzajú, že tento skelet podporoval bunkovú adhéziu, proliferáciu a diferenciáciu [34].

3.1.3 Poľnohospodárstvo

Veľká pozornosť výskumníkov je venovaná lekárskej a farmaceutickej oblasti kvôli biokompatibilite PHA. Z toho dôvodu sa polyhydroxyalkanoáty v poľnohospodárstve využívajú len v malej miere (napríklad na mulčovanie, siete a vrecia) [40].

Jedným z produktov na trhu je NodaxTM, ktorý je na bázy biodegradovateľného kopolyméru P(3HB-co-3HHx) a je používaný na prípravu poľnohospodárskeho mulča. Tento produkt patrí medzi komerčne dostupné poľnohospodárske mulče [40]. Ďalšie využitie našli PHA nanomateriály, špecificky P(3HB-co-3HV) mikrogulôčky, ako nanoherbicidy, ktoré majú nižšiu genotoxicitu, vysokú biologickú odbúrateľnosť a zvyšujúcu účinnosť herbicidu [31]. P(3HB-co-3HV) má tiež využitie riadenom uvoľňovaní insekticídov. Insekticidy môžu byť integrované do peliet kopolyméru

a zasaie spolu s poľnohospodárskymi plodinami. Následne sa insekticíd uvoľňuje rýchlosťou v závislosti na aktivite škodcov [41].

3.2 Súčasný stav vývoja inteligentných obalov

Ako už bolo načrtnuté v podkapitole 3.1, v súčasnej dobe plasty aj naďalej zostávajú preferovaným materiálom, lenže po tom, čo poslúžia svojmu účelu, veľká časť skončí v prírode, kde pretrvávajú stáročia. Obalový priemysel patrí k najväčším a stále rastúcim spotrebiteľom syntetických plastov získaných z fosílnych palív. Z toho plasty z obalov potravín tvoria väčšinu plastového odpadu, ktorý znečisťuje životné prostredie. Ďalším, a tak isto zásadným problémom je, že zásoby ropy sú obmedzené a čelia vyčerpaniu. Preto existuje potreba vývoja alternatívnych materiálov, ktoré môžu slúžiť rovnakému účelu ako bežné plasty. Biopolyméry sa ukázali ako sľubné a ekologicky priaznivé materiály, ktoré sú v súčasnosti jedny z najviac skúmaných materiálov s ohľadom na svoj veľký aplikačný potenciál [42].

Zvyšujúce sa požiadavky na neustále sledovanie kvality potravín a predlžovanie potravinárskych výrobkov viedli k vzniku typov baliacich metód ako aktívne a inteligentné obaly. Aktívne obalové materiály obsahujú zložky, ktoré zvyšujú ich funkčnosť, ako sú antibakteriálne látky, antioxidanty, blokátory svetla alebo poskytujú kyslíkové bariéry. Inteligentné obalové materiály obsahujú navyše snímacie komponenty, ktoré poskytujú indikáciu zmien v atribútoch potravín ako sú zmeny v ich kvalite, zrelosti alebo bezpečnosti [43].

Inkorporáciou aktívnej látky sa zaoberali aj *Marra a kol.* (2016). Použili filmy kyseliny polymliečnej (PLA) a pridali ZnO v troch rôznych hmotnostných zastúpeniach (1, 3 a 5 hm. %) . Na základe tejto štúdie zistili, že biokompozitné filmy sa vyznačujú dobrou disperzitou častíc ZnO v matrici PLA. PLA s inkorporovanou zložkou vykazovala dobré mechanické vlastnosti, pokles priepustnosti CO₂ a O₂ a len mierne zvýšené hodnoty pre vodnú paru. Zvlášť dôležitým zistením bolo, že biokompozit s 5 hm. % ZnO dosiahol 99,99% zníženie populácie *Escherichia Coli* už po 24 h [44]. Vedci *Swaroop a Shukla* (2018) posilnili biofilmy PLA nanočasticami MgO, vďaka čomu vykazovali maximálne zlepšenie ťažnosti, vlastnosti kyslíkovej bariéry a vynikajúcu antibakteriálnu účinnosť proti *E. Coli*. Avšak v dôsledku prítomnosti voľných objemov v blízkosti aglomerovaných nanočastíc MgO a polymérnej matrice, ktoré viedli k ľahšej permeácii, sa bariérové vlastnosti filmu proti vodnej pare znížili takmer o 25 % [45]. Vedci *Qin a kol.* (2017) a *Roy a Rhim* (2020) použili aktívne látky na báze esenciálnych olejov (bergamot, citrónová tráva, rozmarín a klinček) a kurkumínu. Všetky aktívne látky dokázali zlepšiť mechanické vlastnosti a antibakteriálnu účinnosť PLA. Po použití esenciálnych olejov ukazovalo WVP vyšší nárast (približne dvojnásobne), avšak po pridaní kurkumínu sa iba mierne zvýšilo. Zároveň použitím kurkumínu filmy vykazovali vynikajúcu antioxidačnú aktivitu [46, 47].

Ako ďalší sa zaoberali inkorporáciou aktívnych látok do PHA filmov vedci *Castro-Mayorga a kol.* (2017), ktorý sa zamerali na vyvinutie antibakteriálneho viacvrstvého systému nanočastíc PHA-Ag (P(3HB-co-3HV)). Uvádzajú, že významné zníženie populácie *Salmonella enterica* sa dosiahlo už pri veľmi nízkej koncentrácii striebra (0,002 – 0,0005 hm. %). Táto štúdia preukázala inovatívny antibakteriálny materiál na účinnú prevenciu bakteriálnej kontaminácie na obaloch potravín a kontaktných povrchoch [48]. *Salama a kol.* (2017) skúmali antibakteriálnu aktivitu chitosanu biguanidínu hydrochloridu (ChG) a vrúbľovaný polymér na bázy P(3HB) (ChG – vrúbľovaný P(3HB)). Deriváty chitosanu vykazovali vynikajúcu antibakteriálnu aktivitu proti testovacím baktériám, čo znamená, že sa dajú použiť ako účinný biomedicínsky materiál [49]. P(3HB) študovali aj *Xavier a kol.* (2015) za použitia širokej škály koncentracii vanilínu (4-hydroxy-3-metoxymetanaldehyd) ako aktívnej látky. Vedci zistili, že vanilín je proti plesniam účinnejší ako proti baktériám, ktoré sa bežne vyskytujú v konzervovaných potravinách. Pridanie vanilínu do potravinových stimulantov pre masné potraviny viedlo k rýchlemu uvoľňovaniu na vyvolanie jeho antibakteriálneho účinku. Avšak skúmanie tepelných vlastností týchto aktívnych biofilmov ukázalo zníženie teploty maximálnej rýchlosti tepelného rozkladu a pevnosti v ťahu oproti čistému P(3HB). Z toho dôvodu by sa mohli tieto aktívne biofilmy použiť ako sekundárne filmy na primárnych obalových polymérnych vrstvách [50].

Kopolymér P(3HB-co-4HB) je tiež možné využiť v rámci inteligentných obalových materiálov. Tomuto kopolyméru sa venuje napríklad štúdia od autorov *Sharma a kol.* (2022), kde použili ako aktívnu látku tymianový esenciálny olej. Na základe zníženej pevnosti v ťahu a kryštalinity bol dokázaný plastifikačný účinok inkorporovaného oleja a ďalšie merania preukázali zvýšenie ťažnosti a priepustnosti vodných pár pri tomto materiáli. Nakoniec bola charakterizovaná antibakteriálna aktivita týchto materiálov voči všetkým plesniam na chlieb a zistili, že keď bol chlieb zabalený do P(3HB-co-4HB) s inkorporovaným tymianovým olejom, jeho skladnosť sa predĺžila najmenej na 5 dní, v porovnaní s 1 – 4 dňami pri čistom PHA kopolymére [51]. V ďalšej štúdiu od *Requena a kol.* (2017) bol použitý kopolymér P(3HB-co-3HV) do ktorého autori inkorporovali karvakrol a eugenol. Výsledky ukázali, že v 50% etanole došlo k rovnováhe a takmer k úplnému uvoľneniu karvakrolu a eugenolu. Vedci zistili, že eugenol sa uvoľňoval rýchlejšie ako karvakrol v menej polárnych simulatoch, ale pomalšie vo vodnatejších systémoch [52].

Implementácia metód aktívnych obalov do komerčnej sféry bude rásť a predĺži sa skladovateľnosť potravinárskych produktov. Tieto technológie založené na aktívnych obaloch chránia kvalitu a zároveň zlepšujú bezpečnosť potravín. Hlavným problémom zostáva navrhnutie funkčných materiálov schopných zachovať svoje pôvodné vlastnosti počas distribúcie a skladovania [53].

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použité mikroorganizmy

V bakalárskej práci boli využité dva bakteriálne kmene *Aneurinibacillus sp.* H1 CCM 8960, ktorý je patentovaný na Fakulte chemickej Vysokého učenia technického v Brne, a *Cupriavidus necator* H16 CCM 3726. Oba kmene sú uložené v Českej zbierke mikroorganizmov.

4.2 Použité chemikálie

1,4 – butándiol	(Sigma Aldrich)
Glycerol	(Lachner)
Nutrien Broth	(Himedia)
Trypton	(Sigma Aldrich)
Dodekahydrát hydrogénfosforečnanu sodného	(Lachema)
Dihydrogénfosforečnan draselný	(Lachner)
Dusičnan amónny	(Lachner)
Heptahydrát síranu horečnatého	(Lachner)
Dihydrát chloridu vápenatého	(Lachner)
Citran železito-amónny	(Fluka)
Hydroxid sodný	(Lachema)
Síran amónny	(Lachner)
Fruktóza	(Lachner)
Chloroform	(VWR)
Izopropylalkohol	(VWR)
Etanol	(VWR)
Kurkumín	(Sigma Aldrich)
Kyselina salicylová	(Sigma Aldrich)
Poly(3-hydroxybutyrát)	(Biomer)

4.3 Použité prístroje

Vortex, Heidolph Reax Top
Laminárny box Aura mini, Bio Air Instruments
Laboratórne váhy, Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH
Plynový chromatograf, GC-FID, Thermo, TRACE 1300
Analytické váhy, Boeco
Automatický aplikátor filmu TQC
Centrifuga, Boeco U-32R
Centrifuga, Hettich MIKRO 200
ATR-FTIR, Thermo Scientific, Waltham iS50
Nanofotometer, IMPLIN

Soxtherm, Gerhard
Temperovaná trepačka, Heidolph1000, Labicom s.r.o
Profilometer Detak XT, Bruker
Termostat, LS-35
SEC-MALS-dRI, Wyatt Technology
Magnetická miešačka, Lavat
Autokláv
DSC Q2000, TA Instruments

4.4 Kultivácia

Na kultiváciu bakteriálneho kmeňa *Aneurinibacillus sp.* H1 CCM 8960 a *Cupriavidus necator* H16 CCM 3726 bolo potrebné pripraviť inokulum a produkčné médium.

4.4.1 Príprava inokula

Na vytvorenie inokula bolo použité médium Nutrien Broth o koncentrácii 25 g/l a jeho následné rozliatie do 100 ml Erlenmeyerových baniek po 50 ml. Takto pripravené inokulum bolo sterilizované v tlakových hrncoch. Následne bolo inokulum zaočkované daným bakteriálnym kmeňom v sterilnom prostredí laminárneho boxu a kultivované 24 hodín. Kmeň *Aneurinibacillus sp.* H1 pri 45 °C na temperovanej trepačke pri 180 rpm a kmeň *Cupriavidus necator* H16 pri 30 °C na temperovanej trepačke pri 170 rpm.

Zloženie Nutrient Broth:

Beef extract	10 g/l
Pepton	10 g/l
NaCl	5 g/l
Agar	20 g/l

4.4.2 Príprava minerálneho média

Aneurinibacillus sp. H1

Na produkciu bakteriálneho kmeňa *Aneurinibacillus sp.* H1 bolo vytvorené minerálne médium, ktoré na 1 l destilovanej vody obsahovalo tieto látky:

Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	9 g
NH ₄ NO ₃	1,5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
Trypton	0,5 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,02 g
FeNH ₄ -citrát	0,0012 g
Roztok stopových prvkov TES II*	1 ml

*Roztok stopových prvkov TES II obsahuje látky:

ZnSO ₄	0,1 g
MnCl ₂	0,03 g
H ₃ BO ₃	0,3 g
CoCl ₂	0,02 g
NiCl ₂	0,02 g
Na ₂ MoO ₄	0,03 g
HCl (0,1M)	1 000 ml

Následne bolo minerálne médium rozdelené po 100 ml do Erlenmeyerových baniek o objeme 250 ml. Ďalším krokom bolo pridanie substrátov k pripravenému médiu, konkrétne glycerol a 1,4-butándiol v závislosti od požadovaného zloženia kopolyméru P(3HB-*co*-4HB) v biomase. Pridané množstvo substrátov ukazuje tabuľka 5.

Tabuľka 5: Množstvo substrátov

Glycerol [g/l]	1,4-butándiol [g/l]
2	4
4	4
6	4
8	4

Takto pripravené produkčné média boli sterilizované v autokláve. Po sterilácii prebehlo ich zaočkovanie danou bakteriálnou kultúrou v laminárnom boxe 10 obj. % inokula a 0,1 ml roztoku stopových prvkov TES II. Kultivácia prebiehala 72 hodín na temperovanej trepačke pri 45 °C a 180 rpm.

***Cupriavidus necator* H16**

Na produkciu bakteriálneho kmeňa *Cupriavidus necator* H16 bolo vytvorené produkčné médium, ktoré obsahovalo nasledujúce látky na 1 l destilovanej vody:

(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g
KH ₂ PO ₄	1,02 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	11,1 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g
Roztok stopových prvkov MES*	1 ml
Fruktóza	20 g

Produkčné médium bolo rozdelené po 100 ml do Erlenmeyerových baniek o objeme 250 ml a potom sterilované v autokláve. Medzitým bol samostatne vytvorený a vysterilizovaný zásobný roztok fruktózy o koncentrácii 400 g/l, ktorý sa následne použil pri očkovaní v laminárnom boxe, kde bolo do produkčných médií pridané 10 obj. % inokula, 0,1 ml roztoku stopových prvkov MES** a 5 ml fruktózy. Kultivácia prebiehala 72 hodín pri 30 °C na temperovanej trepačke pri 170 rpm.

**Roztok stopových prvkov MES obsahuje látky:

FeCl ₃	9,7 g
CaCl ₂	7,8 g
CuSO ₄	0,156 g
CoCl ₂	0,119 g
NiCl ₂	0,118 g
CrCl ₂	0,062 g
HCl (0,1M)	1000 ml

4.4.3 Príprava sušenej biomasy

Po dokončení kultivácie bola prevedená spektrofotometrická analýza (podkapitola 4.6.1) a následne bolo 10 ml bakteriálnej suspenzie odobrané a napipetované do plastových skúmaviek, ktoré boli odstredené pri 5000 rpm na 5 minút. Po odstredení bol supernatant zliaty, pelet bol premytý 10 ml destilovanej vody a znovu zcentrifugovaný za rovnakých podmienok. Po opätovnom odstredení boli skúmavky s biomasou umiestnené do termostatu o teplote 70 °C a po následnom vysušení biomasy bola uskutočnená gravimetrická analýza (podkapitola 4.6.1). Zvyšná časť bakteriálnej suspenzie bola podrobená rovnakému spracovaniu, ale pri väčších objemoch.

4.5 Extrakcia polyhydroxyalkanoátov

Z vysušenej biomasy bolo následne potrebné extrahovať PHA na vytvorenie filmov, prostredníctvom prístroja Soxtherm (na obrázku 5) . Najprv bola navážená vysušená biomasa, konkrétne 0,8 – 0,9 g, do každej extrakčnej patróny a tie boli potom umiestnené do extrakčných nádob s varným kamienkom, kde boli zaliate 150 ml chloroformu. V software prístroja bola zvolená metóda, ktorá odpovedala požadovaným podmienkam na extrakciu chloroformom. Po dokončení extrakcie boli jednotlivé obsahy nádob prevedené na Petriho misky, kde bol zbytok rozpúšťadla odparený v digestory a následne boli vytvorené filmy zvážené.



Obrázok 5: Prístroj soxtherm pri extrakcii PHA z biomasy

4.6 Analýza biomasy a vyextrahovaných kopolymérnych polyhydroxyalkanoátov

Ďalším krokom bola charakterizácia vyprodukovanej biomasy jednotlivých kultivácií a PHA filmov, ktoré boli vyextrahované pomocou extraktora Soxtherm (pozri podkapitolu 4.5).

4.6.1 Spektrofotometrická a gravimetrická analýza

V priebehu kultivácie bola bakteriálna kultúra v kultivačnom médiu podrobená spektrofotometrickej analýze v dvoch paralelných meraniach na spektrofotometri IMPLEN pri vlnovej dĺžke 630 nm. Ako blank bola použitá destilovaná voda.

Na gravimetrickú analýzu bola vysušená biomasa (podkapitola 4.4.3) v plastových skúmavkách zvážená na analytických váhach.

4.6.2 Analýza pomocou plynovej chromatografie

Na získanie informácií ohľadom množstva, zloženia a percentuálneho zastúpenia jednotlivých monomérnych jednotiek vo vyextrahovaných PHA filmov a biomás, bola využitá plynová chromatografia, kde je princípom vytvorenie prchavých metylesterov, ktoré sú následne separované a detekované plameňovým ionizačným detektorom (FID).

Prvým krokom bolo naváženie vzorku do krimpovacích vialiek. Biomasa bola navážená v rozmedzí 8 – 12 mg, zatiaľ čo fólie s vyextrahovaným PHA 2 – 3 mg. K vzorke bol vždy pridaný 1 ml chloroformu a 0,8 ml vnútorného štandardu ISTD (5 mg/ml kyseliny benzoovej v 5% kyseline sírovej v metanole). Na vialku bolo nasadené viečko, zakrimpované kliešťami a vialka bola vložená do termobloku, kde prebiehala esterifikácia, ktorá trvala 3 hodiny pri teplote 94 °C. Po uplynutí tejto doby bola vialka ochladená a krimpovacie viečko bolo odstránené. Obsah esterifikovanej vzorky bol prevedený do 0,5 ml 50 mM hydroxidu sodného v 4 ml vialke a roztok bol potom riadne pretrepaný. Následne došlo k oddeleniu fází a bola odobratá spodná organická fáza o objeme 50 µl, ktorá bola napipetovaná do novej vialky s 0,9 ml izopropylalkoholu. Takto pripravené vzorky boli podrobené plynovej chromatografii v dvoch paralelných prevedeniach. Po skončení analýzy bolo nutné ručne vyhodnotiť výsledky pomocou vytvorenej kalibračnej priamky pre danú analýzu a zapísaných plôch píkov pre 3HB, 4HB a vnútorný štandard. Potom bolo pomocou programu Excel vyhodnotené zastúpenie celkového obsahu PHA v biomase a percentuálne zastúpenia jednotlivých monomérov vo vyextrahovaných PHA filmoch.

4.6.3 Charakterizácia pomocou SEC-MALS

Táto metóda bola použitá na stanovenie molekulovej hmotnosti a polydisperzity PHA filmov. Najprv boli jednotlivé vzorky rozpustené v chloroforme o koncentrácii 1,5 mg/ml pri 70 °C v termobloku. Po rozpustení vzoriek v chloroforme boli roztoky prefiltrované cez nylónový filter o veľkosti 0,45 µm do jednotlivých vialiek. Následne boli vzorky podrobené analýze SEC-MALS.

4.6.4 Štúdium molekulárnej štruktúry

Analýza spektier PHA biomasy a fólii prebiehala pomocou ATR-FTIR, technikou zoslabeného úplného odrazu infračervenej spektrometrie s Fourierovou transformáciou. Spektrá boli namerané z povrchu vzorkou pri laboratórnej teplote na zabudovanom krištále. Individuálne absorpčné spektrum bolo zobrazené ako priemer 16 skenov s rozlíšením 1 cm⁻¹. Každá vzorka bola zmeraná na 10 rôznych miestach na jej povrchu.

4.6.5 Analýza diferenciálnou skenovacou kalorimetriou

Vzorky PHA polymérov boli analyzované na DSC kalorimetri Q2000 (TA Instruments). Navážka približne 5 mg vzorku bola uzavretá v hliníkovej meracej panvičke. Vzorka bola najprv zahrievaná rýchlosťou 2 °C/min na teplotu 200 °C, potom rovnakou rýchlosťou ochladená na -50 °C a nakoniec znovu zahrievaná rovnakou rýchlosťou na 200 °C. Na vyhodnotenie kryštalinity vzorku sa využíval tretí cyklus merania, zahrievanie ochladenej taveniny z -50 °C na 200 °C. V priebehu merania bola teplota modulovaná harmonickou funkciou (amplitúda modulácie 0,3 °C, perióda modulácie 60 °C).

4.7 Príprava filmov a ich charakterizácia

Ďalšie analýzy boli prevedené na homopolyméry P(3HB) a dvoch kopolymérov P(3HB-co-4HB) o percentuálnom zastúpení 65,25 % a 43,61 % 4HB, na základe ktorých boli porovnané ich fyzikálno-chemické vlastnosti.

4.7.1 Nanášanie polyhydroxyalkánových filmov

Najprv boli fólie rozpustené v chloroforme za vytvorenia 5 hm. % roztoku. Kvôli horšej rozpustnosti homopolyméru P(3HB) bol v tomto prípade zvolený 2 hm. % roztok v chloroforme. Celé rozpúšťanie prebiehalo v termostate cez noc pri 50 °C. Ďalším krokom bolo prefiltrovanie roztokov cez nylonový filter o veľkosti 0,45 μm do Pyrex skúmaviek. Z takto prefiltrovaných roztokov boli vytvorené filmy, a to konkrétne na automatickom aplikátore filmu TQC so špeciálnym nanášacím pravítkom. Pripravené roztoky boli nanášané na vyčistené mikroskopické podložné sklíčko, na ktoré potom bolo položené pravítko o zvolenej výške kvapalnej vrstvy 120 nm. Po spustení prístroja prešlo pravítko sklíčkom, čím sa vytvorila tenká vrstva PHA. Je nutné podotknúť, že kvôli nezrovnalosti informácii boli kopolymérne filmy s obsahom 4HB 65,25 % navrstvené trikrát, zatiaľ čo zvyšok filmov iba dvakrát. Takto pripravené filmy boli využité na štúdium prestupu vodnej pary (WVP) (pozri podkapitolu 4.8).

4.7.2 Stanovenie hrúbky filmov

Pred začatím experimentu zabývajúcim sa prestupom vodnej pary bolo nutné zmerať hrúbku filmov kvôli variabilite nanášania roztokov PHA pri tvorení filmov. Po odparení rozpúšťadla a uschnutí filmov bol tento parameter stanovený následným postupom.

Analýza hrúbky pripravených filmov bola uskutočnená na profilometri Beker, kedy podmienky nastavenia merania boli prispôsobené na danú vzorku. Profilometer funguje na princípe kontaktného merania, kde sa pod určitým prítlakom stylus pohyboval po povrchu sklíčka, na ktorom bol navrstvený film PHA. Najprv bolo sklíčko umiestnené tak, aby stylus na začiatku merania zaznamenal časť skla, ktorá neobsahovala film PHA. Tak bola získaná referenčná hodnota na spracovanie výsledkov.

4.8 Štúdium prestupu vodnej pary

Rýchlosť prenosu vodnej pary (WVTR) bola stanovená gravimetrickou metódou za použitia pripravených filmov s odmeranou hrúbkou. Prvým krokom bolo naváženie vopred vysušeného silikagélu do nádobiek s primeraným hrdlom na zafixovanie fólie. Hmotnosť silikagélu sa pohybovala medzi 8 – 9 g. Filmy boli opatrne odlúpnuté od mikroskopického sklíčka a upevnené na hrdlo nádoby pomocou plastových gumičiek. Takto pripravené vzorky boli umiestnené do exsikátoru so 100% relatívnou vlhkosťou (pozri obrázok 6). V určitých časových intervaloch boli nádoby vážené na analytických váhach, kde sa sledoval prírastok hmotnosti vodnej pary na silikagél.

Celé meranie bolo uskutočnené v 5 opakovaníach pre homopolymér P(3HB) a kopolymér P(3HB-co-4HB) o dvoch percentuálnych zastúpeniach 4HB.



Obrázok 6: Exsikátor so vzorkami pri meraní WVTR

4.9 Inkorporácia a uvoľnenie aktívnych látok z fólii

Cieľom tejto práce bolo aj stanovenie uvoľňovania aktívnych látok z polymérnych PHA filmov. Popísaný experiment v tejto kapitole sa venuje transportným vlastnostiam aktívnych látok, a to konkrétne kurkumínu a kyseliny salicylovej. Najprv bola nutná optimalizácia inkorporácie aktívnych látok a následne uvoľňovania do roztokov, kedy bol použitý komerčný práškový homopolymér P(3HB) a kopolymér P(3HB-co-4HB) s monomérou jednotkou 4HB v zastúpení 50,63 % (z dôvodu šetrenia kopolymérnych materiálov).

4.9.1 Príprava fólii s aktívnymi látkami

Prvým krokom pri optimalizácii bolo rozpustenie PHA v chloroforme za vytvorenia 4 hm. % roztoku. Potom bolo nutné vytvoriť zásobné roztoky kurkumínu a kyseliny salicylovej, pričom rozpustnosť kyseliny salicylovej v chloroforme bola vopred známa (22,2 mg/ml), rozpustnosť kurkumínu v chloroforme bolo potrebné zistiť. Po vyskúšaní rôznych variantov koncentrácií bola najlepšia koncentrácia 10 mg/ml. Takto pripravené zásobné roztoky vo vialkách boli zahriate v termobloku na 45 °C po dobu 15 minút, pričom sa aktívne látky rozpustili a boli vytvorené homogénne roztoky. V rámci

experimentu boli zvolené 4 rôzne koncentrácie, vzťahnuté na hmotnosť PHA, pre kurkumín (0,25; 0,5; 1,0; 1,5 hm. %) a kyselinu salicylovú (2,5; 5,0; 7,5; 10 hm. %). Každá koncentrácia bola pridaná do jednotlivých vialiek s 1 ml modelových PHA. Takto pripravené roztoky boli zahriate v termobloku na 45 °C po dobu 15 minút. Ďalej boli vzorky vyliate na Petriho misky, kým nevytekal všetok chloroform. Po následnom odparení chloroformu boli vytvorené fólie opláchnuté destilovanou vodou, aby sa zbavili nerozpustenej aktívnej látky na povrchu.

Po úspešnej optimalizácii inkorporácie aktívnych látok do PHA bola zvolená jedna koncentrácia pre kurkumín (0,5 hm. %, vzťahnutá na hmotnosť suchej fólie) a jedna pre kyselinu salicylovú (10 hm. %, vzťahnutá na hmotnosť suchej fólie). Znovu boli pripravené 4 hm. % roztoky s rozpustenými PHA v chloroforme, ktoré boli napipetované vždy po 1 ml do vialiek. Následne do jednotlivých vialiek s rôznymi roztokmi PHA (P(3HB), P(3HB-co-65,25%4HB) a P(3HB-co-43,61%4HB)) bolo pridané 20 µl zásobného roztoku kurkumínu v chloroforme (tak, aby bola získaná požadovaná finálna koncentrácia v suchej fólii 0,5 hm. %) a 220 µl roztoku kyseliny salicylovej v chloroforme (požadovaná koncentrácia 10 hm. %). Takto pripravené vialky boli zahriate v termobloku na 45 °C po dobu 15 minút a následne boli vzorky vyliate na Petriho misky a okamžite zvážené. Po čase vznikli, odparením chloroformu, fólie s inkorporovanými aktívnymi látkami, ktoré boli na záver opláchnuté vodou. Celkom bolo takýmto postupom pripravených 12 fólii (z každej aktívnej látky 6 z toho po 2 z použitých PHA, konkrétne P(3HB), P(3HB-co-65,25%4HB) a P(3HB-co-43,61%4HB) (pozri kapitolu 4.7)).

4.9.2 Meranie absorbcie pomocou UV-VIS spektroskopie

V rámci optimalizácie uvoľňovania aktívnych látok bolo potrebné určiť vhodný roztok, v ktorom by bolo možné sledovať dané uvoľňovanie kurkumínu a kyseliny salicylovej. Z toho dôvodu boli najprv všetky modelové fólie vložené do vialiek s 20 ml destilovanej vody, pričom bola meraná absorbcia na spektrofotometri IMPLÉN v časoch 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 hodín a následne po 1 a 2 dňoch. Absorbancia kurkumínu bola meraná pri 420 nm a kyseliny salicylovej pri 233 nm. Fólie s kurkumínom boli po 48 hodinách vybraté a znovu zložené do 20 ml destilovanej vody. Potom po 5 dňoch boli zmerané celé absorpčné spektrá (200 – 800 nm), čo ukázalo uvoľňovanie kyseliny salicylovej do destilovanej vody, na rozdiel od kurkumínu, ktorý sa neuvoľňoval. Z toho dôvodu boli dve fólie s kurkumínom, o koncentrácii 0,5 hm. %, vložené do roztoku 50% etanolu a dve fólie s kurkumínom, o koncentrácii 1,5 hm. %, do 10% etanolu. Už po 24 hodinách bolo spektrofotometricky potvrdené uvoľňovanie kurkumínu do roztokov etanolu.

Po optimalizácii boli zvolené roztoky, do ktorých sa budú aktívne látky uvoľňovať, a to pre kurkumín 50% etanol a pre kyselinu salicylovú destilovaná voda. Pripravené fólie boli vložené do vialiek s 20 ml spomenutých roztokov. Ďalším krokom bolo meranie celých absorpčných spektier (200 – 800 nm) v daných časoch. V prvých dvoch hodinách

boli fólie s kyselinou salicylovou merané po 15 minútach a fólie s kurkumínom po 30 minútach. Potom boli všetky vzorky merané po 1 hodine až do celkového času uvoľňovania 10 hodín. V priebehu nasledujúceho dňa prebehlo meranie po 24, 27 a 30 hodinách. Potom boli vzorky zmerané po 2, 3, 4 a 5 dňoch. Na záver boli zmerané kalibračné roztoky oboch aktívnych látok.

5. VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1 Kultivácia baktérii

Bakteriálne kmene *Aneurinibacillus sp.* H1 a *Cupriavidus necator* H16 boli kultivované celkom trikrát. Z nedostatočného percentuálneho zastúpenia monomérických jednotiek 4HB pri kultiváciách *Aneurinibacillus sp.* H1, bola zvolená kultivovaná biomasa z druhého pokusu pre následné spracovanie a analýzu.

5.2 Charakterizácia biomasy

V experimentálnej časti bola kultivácia bakteriálnych kmeňov, ich biomasa a obsah PHA charakterizovaná pomocou spektrofotometrickej a gravimetrickej analýzy, plynovej chromatografie a FTIR analýzy.

V tejto práci bol použitý glycerol a 1,4-butándiol ako zdroj uhlíka pri kultivácii *Aneurinibacillus sp.* H1. Z toho dôvodu následné tabuľky uvádzajú výsledky vzťahované voči pomeru glycerolu a 1,4-butándiolu (2:4, 4:4, 6:4, 8:4), kedy sa menila iba koncentrácia glycerolu.

5.2.1 Spektrofotometrická a gravimetrická analýza

Pomocou spektrofotometrickej analýzy bolo možné určiť optickú hustotu (OD) bakteriálnej suspenzie (podkapitola 4.6.1). Z každej sady boli dvakrát zmerané dve vzorky kultúry pri vlnovej dĺžke 630 nm. Tieto hodnoty boli spriemerované a vynásobené príslušným riedením (ukazuje tabuľka 6).

Následne bola prevedená gravimetrická analýza kultúry po vysušení (podkapitola 4.4.3). Množstvo vysušenej biomasy bolo prepočítané na 10 ml buncenej suspenzie, aby bolo možné získať koncentráciu PHA v [g/l] a nakoniec boli výsledné hodnoty spriemerované (uvádza tabuľka 6).

Tabuľka 6: Optická hustota a koncentrácia biomasy

Kmeň	Pomer substrátov [g/l]	OD ₆₃₀	Odchýlka	Biomasa [g/l]	Odchýlka [g/l]
<i>Aneurinibacillus sp.</i> H1	2:4	2,73	0,57	6,49	0,43
	4:4	2,76	0,39	5,81	0,31
	6:4	3,41	0,50	6,39	0,70
	8:4	3,48	0,77	5,29	0,37
<i>Cupriavidus necator</i> H16	-	7,61	1,84	63,16	1,61

Najvyššiu optickú hustotu vykazoval kmeň *Cupriavidus necator* H16, čo bol predpoklad na vysoké zastúpenie biomasy. To bolo potvrdené gravimetrickou analýzou, kedy biomasa dosahovala hodnotu 63,16 g/l, približne desaťkrát väčšiu ako v prípade bakteriálneho kmeňa *Aneurinibacillus sp.* H1. Z toho sa dá predpokladať, že kultivácia *Aneurinibacillus sp.* H1 by musela prebiehať v oveľa väčšom množstve ako kultivácia *Cupriavidus necator* H16 na dosiahnutie rovnakej hmotnosti biomasy. Ďalšou dôležitou charakteristikou biomasy v rámci tejto práce je percentuálne zastúpenie PHA a pomer ich monomérnych jednotiek, čo viedlo k analýze pomocou plynovej chromatografie.

5.2.2 Stanovenie obsahu PHA

Podľa postupu v podkapitole 4.6.2 bol pomocou plynovej chromatografie stanovený obsah PHA v biomase a percentuálne zastúpenie daných monomérnych jednotiek v PHA. Kalibračná krivka na prepočet chromatografického píku, ktorý odpovedá obsahu 3HB a 4HB, bola poskytnutá softwarom, čomu nadväzovalo ručné vyhodnocovanie poskytnutých hodnôt v Exceli. Tabuľky 7 a 8 zobrazujú vypočítané percentuálne zastúpenie PHA v biomase a zastúpenie jednotlivých monomérov.

V tabuľke 7 je možné vidieť percentuálny obsah PHA v biomase. V prípade kopolyméru, v porovnaní s rôznym pomerom substrátov, sa percentuálne zastúpenie PHA veľmi nelíšilo. Ako už bolo spomenuté v predošlej kapitole, homopolymér vykazuje väčšiu produkciu biomasy (tabuľka 6) a pomocou plynovej chromatografie bol zistený aj dvakrát väčší obsah PHA v biomase ako pri kopolyméroch, vďaka čomu bolo dosiahnuté dostatočné množstvo materiálu na celú experimentálnu časť. Oproti tomu oveľa menej biomasy bolo získané pri produkcii kopolymérov, čo znamenalo, že bolo potrebné šetriť materiálom. Z toho dôvodu bol pri optimalizácii uvoľňovania aktívnych látok použitý kopolymér P(3HB-co-50,63%4HB), ktorý bol pripravený v dostatočnom množstve v predchádzajúcich kultiváciách H1 ako rezerva (pozri kapitolu 4.9).

Tabuľka 7: Percentuálne zastúpenie PHA v biomase

Polymér	Pomer substrátov [g/l]	Kultivácia č.	PHA [hm. %]	Odchýlka [hm. %]
P(3HB-co-4HB)	2:4	I.	41,1	1,3
		II.	40,0	0,3
		III.	41,0	1,1
	4:4	I.	39,7	0,7
	6:4	I.	43,9	5,9
	8:4	I.	36,7	2,6
P(3HB)	-	I.	85,2	1,8

Tabuľka 8 ukazuje zastúpenie monomérnych jednotiek v PHA, kde je zjavné, že kopolymér vykazuje značné rozdiely v monomérskej kompozícii (obsah 4HB v rozmedzí 0,91 – 60,25 hm. %) podľa pomeru substrátov. Z uvedeného vyplýva závislosť zloženia kopolyméru na množstve zdroja uhlíka, konkrétne glycerolu, pri kultivácii. Zároveň je možné vidieť, že so stúpajúcou koncentráciou glycerolu sa percentuálne zastúpenie 4HB v kopolymére znižuje.

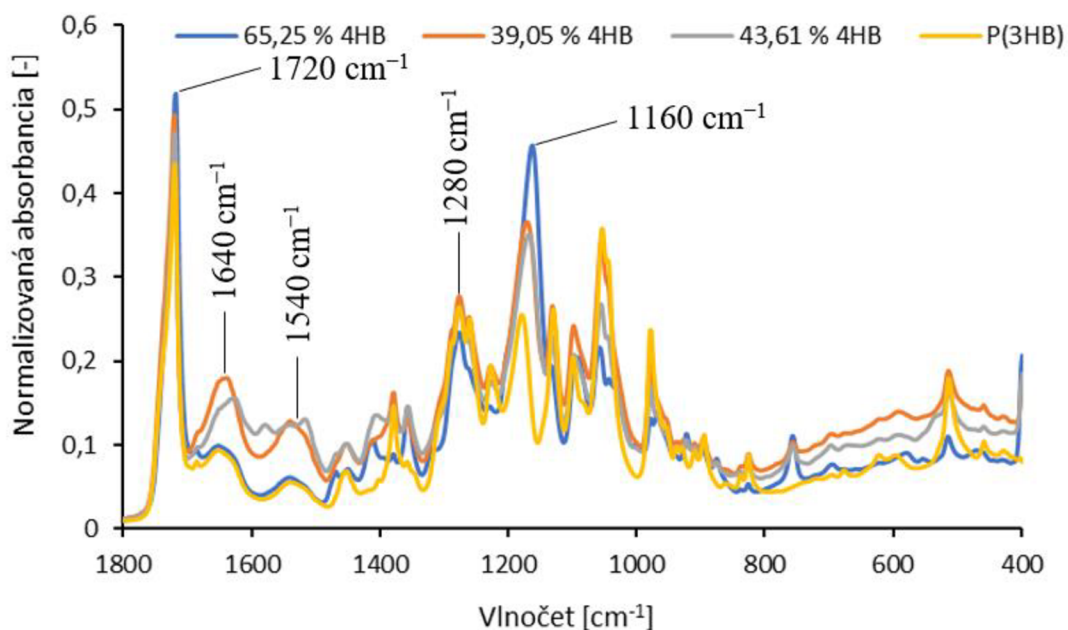
V ďalších analýzach v experimentálnej časti boli použité fólie P(3HB-*co*-4HB), a to z pomeru substrátov 2:4 (II. kultivácia) a 6:4. Cieľom tejto práce bolo vytvoriť a stanoviť vlastnosti P(3HB-*co*-4HB) s najväčším zastúpením 4HB, čo odpovedá pomeru 2:4. Pri pomere substrátov 4:4 nebolo dosiahnuté požadované percentuálne zastúpenie 4HB v kopolymére (pozri tabuľku 8) a z toho dôvodu bol zvolený pomer 6:4 na ďalšie analýzy.

Tabuľka 8: Percentuálne zastúpenie monomérskej jednotky 4HB v kopolymére

Polymér	Pomer substrátov [g/l]	Kultivácia č.	4HB [hm. %]	Odchýlka [hm. %]
P(3HB- <i>co</i> -4HB)	2:4	I.	50,63	6,02
		II.	65,25	-
		III.	56,72	5,81
	4:4	I.	39,05	1,57
	6:4	I.	43,61	2,25
	8:4	I.	0,91	0,12

5.2.3 FTIR analýza

V podkapitole 4.6.4 boli získané spektrá pomocou metódy ATR-FTIR. Hodnoty z analýzy biomasy kopolymérov P(3HB-*co*-4HB) a P(3HB) zobrazuje obrázok 7. Konkrétne pri analýze PHA dochádza k intenzívnej absorpcii žiarenia v pásoch okolo 1720 cm⁻¹, kde dochádza k absorpcii spôsobenej valenčnou vibráciou C=O skupín, ktoré sú pre polyestery charakteristické. Pásky v okolí 1280 cm⁻¹ a 1160 cm⁻¹ definujú esterové väzby, ktoré v danom poradí hovoria o kryštalických alebo amorfných polymérnych doménach. Z toho dôvodu má kryštalický homopolymér P(3HB) najmenší pík v páse 1160 cm⁻¹ oproti amorfnejším kopolymérom P(3HB-*co*-4HB) vo všetkých troch percentuálnych zastúpeniach 4HB. Zároveň je možné vidieť v charakterizovaných biomasách proteíny, a to v pásoch okolo 1640 cm⁻¹ a 1540 cm⁻¹.



Obrázok 7: Normalizované ATR-FTIR spektrá biomasy kopolymérov (P3HB-*co*-4HB) a P(3HB)

5.3 Izolácia polyhydroxyalkanoátov

Vysušená biomasa polyhydroxyalkanoátov bola vyextrahovaná pomocou prístroja Soxtherm a po odparení chloroformu boli vytvorené fólie (kapitola 4.5). V teoretickej časti bolo spomenuté, že percentuálny obsah monomérnych jednotiek ovplyvňuje vlastnosti kopolyméru, hlavne zníženie kryštalinity pomocou 4-hydroxybutyrátu (pozri podkapitulu 2.3.1). Fólie s rôznym percentuálnym zastúpením 4HB sa už od pohľadu líšili svojou štruktúrou a čírosťou. Zatiaľ čo P(3HB) fólie boli pevné a mali mierne žltkastý zákal, kopolymérne fólie P(3HB-*co*-4HB) so zvyšujúcim zastúpením monomérskej jednotky 4HB boli postupne čírejšie a elastickejšie.

5.4 Charakterizácia fólii

Ako je spomenuté v kapitole 4.7, na ďalšie analýzy boli zvolené P(3HB-*co*-4HB) fólie s monomérnym zastúpením 65,25 % a 43,61 % 4HB a ako referenčný materiál homopolymér P(3HB). Fólie z pomeru substrátov 4:4 neboli použité z dôvodu nedostatočného obsahu monomérskej jednotky 4-hydroxybutyrátu. Zároveň neboli zúžitkované ani fólie z pomeru 8:4 kvôli veľkej krehkosti.

Fólie je možné charakterizovať rôznymi analytickými metódami. V tejto práci boli dané fólie podrobené SEC-MALS, FTIR a DSC analýze.

5.4.1 Stanovenie molekulovej hmotnosti

Pomocou postupu v podkapitole 4.6.3 boli pripravené vzorky na analýzu. Tabuľka 9 zobrazuje molekulovú hmotnosť a index polydisperzity. Zároveň je možné vidieť,

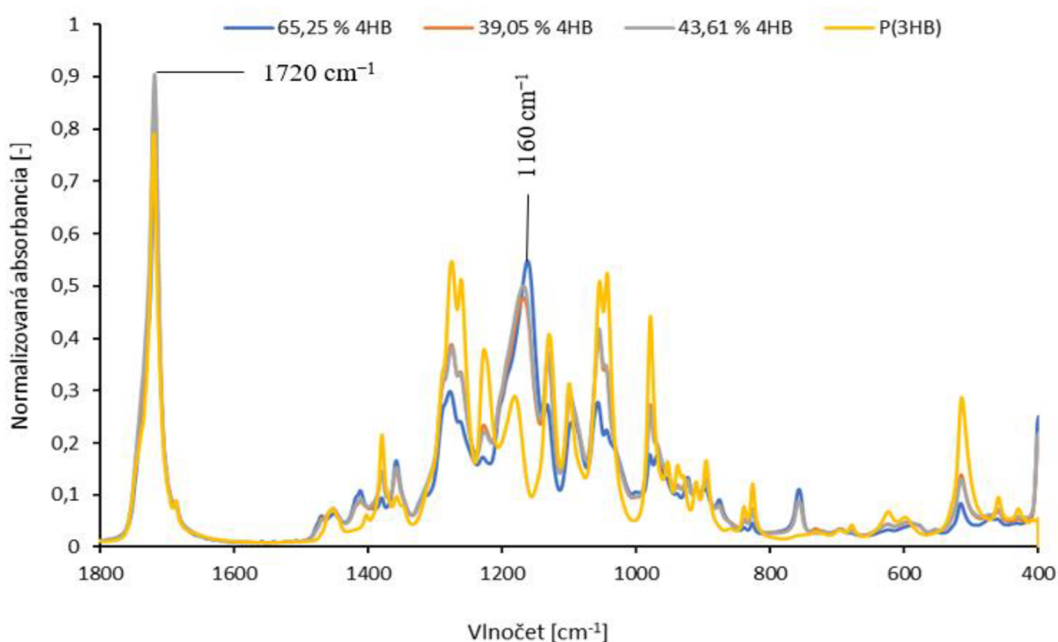
že v rámci kopolyméru má väčšiu veľkosť reťazcov a menšiu polydisperzitu kopolymér s 65,25% 4HB, čiže s menším množstvom glycerolu a väčším zastúpením monomérskej jednotky 4HB. Pri porovnaní kopolyméru a homopolyméru je jednoznačné, že P(3HB) má 4 – 6× väčšiu molekulovú hmotnosť ako P(3HB-co-4HB).

Tabuľka 9: Výsledky SEC-MALS z fólii udávajúce molekulovú hmotnosť (M_w) a polydisperzitu (\mathcal{D})

Polymér	4HB [hm. %]	M_w [kDa]	Odchýlka [kDa]	\mathcal{D}	Odchýlka
P(3HB-co-4HB)	65,25	187,40	2,77	1,33	0,02
	43,61	115,34	3,56	1,52	0,09
P(3HB)	-	792,68	45,60	1,25	0,07

5.4.2 FTIR analýza

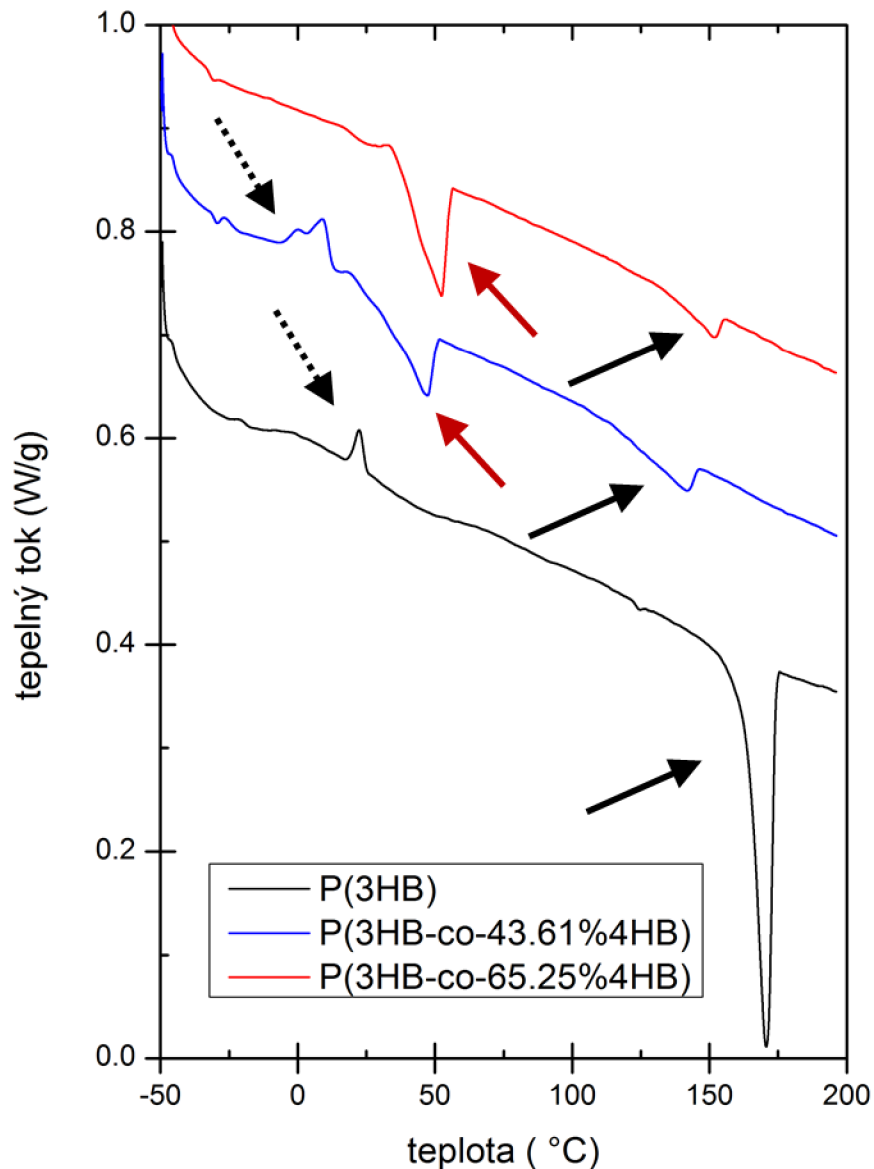
V podkapitole 4.6.4 boli získané spektrá pomocou metódy ATR-FTIR. Hodnoty z analýzy fólii kopolymérov P(3HB-co-4HB) zobrazuje obrázok 8. Ako už bolo spomenuté pri FTIR analýze biomasy (podkapitola 5.2.3), v pásoch okolo 1720 cm^{-1} dochádza k absorpcii spôsobenej valenčnou vibráciou C=O skupín (charakteristické pre polyestery). Zároveň je zjavné, že extrakcia kopolymérov nemala vplyv na amorficitu, čo ukazujú podobné hodnoty v páse 1160 cm^{-1} . Kým štruktúra po extrakcii zostala rovnaká, zloženie proteínov sa zmenilo, a to z dôvodu zaniknutia píkov v pásoch od 1700 cm^{-1} do 1500 cm^{-1} .



Obrázok 8: Normalizované ATR-FTIR spektrá fólii kopolymérov (P3HB-co-4HB) a P(3HB)

5.4.3 DSC analýza

Podľa postupu v podkapitole 4.6.5 boli termogramy získané zahrievaním ochladenej taveniny vzoriek PHA. Na obrázku 9 je zrejmé, že so stúpajúcim obsahom monomérskej jednotky 4HB klesal signál tavenia kryštalinitov P(3HB) okolo 170 °C a naopak rástlo zastúpenie kryštalinitov P(4HB) s podstatne nižšou teplotou topenia (pod 50 °C). Pomocou integrácie jednotlivých píkov, čo bolo prevedené v SW Universal Analysis od TA Instruments, je možné určiť celkovú entalpiu topenia 3HB, ktorá klesá od homopolyméru ku kopolyméru (65,25 % 4HB) nasledovne: 87,9 J/g (P(3HB)), 13,6 J/g (P(3HB-co-43,61%4HB)) a 8,9 J/g (P(3HB-co-65,25%4HB)). Ďalej celková entalpia topenia 4HB rastie takto: 0 J/g (P(3HB)), 28,3 J/g (P(3HB-co-43,61%4HB)) a 36,5 J/g (P(3HB-co-65,25%4HB)). Rovnako sa danou integráciou dá určiť teplo uvoľnené pri studenej kryštalizácii: -5,354 J/g (P(3HB)) a -13,6 J/g (P(3HB-co-43,61%4HB)). Z dôvodu, že to čo v priebehu zahrievania skryštalizuje sa potom musí roztaviť a zvyšuje to tak plochu píku tavenia P(3HB), bolo teplo studenej kryštalizácie odčítané od tepla topenia kryštalinitov P(3HB). Následným porovnaním s publikovanými hodnotami špecifických tepeľ pre 100% kryštalické P(3HB) (146 g/J) a P(4HB) (110 g/J) [56], je možné určiť celkovú percentuálnu kryštalinitu PHA: 57 % (P(3HB)), 26 % (P(3HB-co-43,61%4HB)) a 39 % (P(3HB-co-65,25%4HB)). Z výsledkov je zrejmé, že vo vzorkách celková kryštalinita s množstvom 4HB najprv klesá (ako klesá zastúpenie kryštalinitov P(3HB)), ale následne sa tento trend obráti a zase naopak stúpa (ako pribúda zastúpenie kryštalinitov typu P(4HB)).



Obrázok 9: DSC termogramy získané pri zahrievaní ochladenej taveniny PHA. V termogramoch sú naznačené endotermické signály odpovedajúce taveniu kryštálov P(3HB) (čierna plná šípka) a P(4HB) (červená šípka) a ďalej exotermický signál studenej kryštalizácie (čiarkovaná šípka)

5.5 Analýza výšky pripravených filmov

Pred použitím filmov na analýzu priepustnosti vodnej pary bolo potrebné zmerať ich hrúbku, resp. výšku. Meranie nanosených vrstiev kopolymérov a homopolyméru bolo prevedené na profilometri Brucker. Postup tohto merania je popísaný v podkapitole 4.7.2. Výsledky boli vyhodnotené v programe Vision 64, kde sa zobrazila krivka hneď po dokončení merania vzorky. Krivka znázorňovala vertikálnu polohu stylusu pri jeho pohybe po povrchu tenkého filmu. Na krivke boli ručne nastavené intervaly merania a referenčná hodnota. Následne bol program schopný vyhodnotiť výšku analyzovanej vrstvy, ktorú ukazuje tabuľka 10. Pri tvorení fólií a aplikovaní roztokov PHA

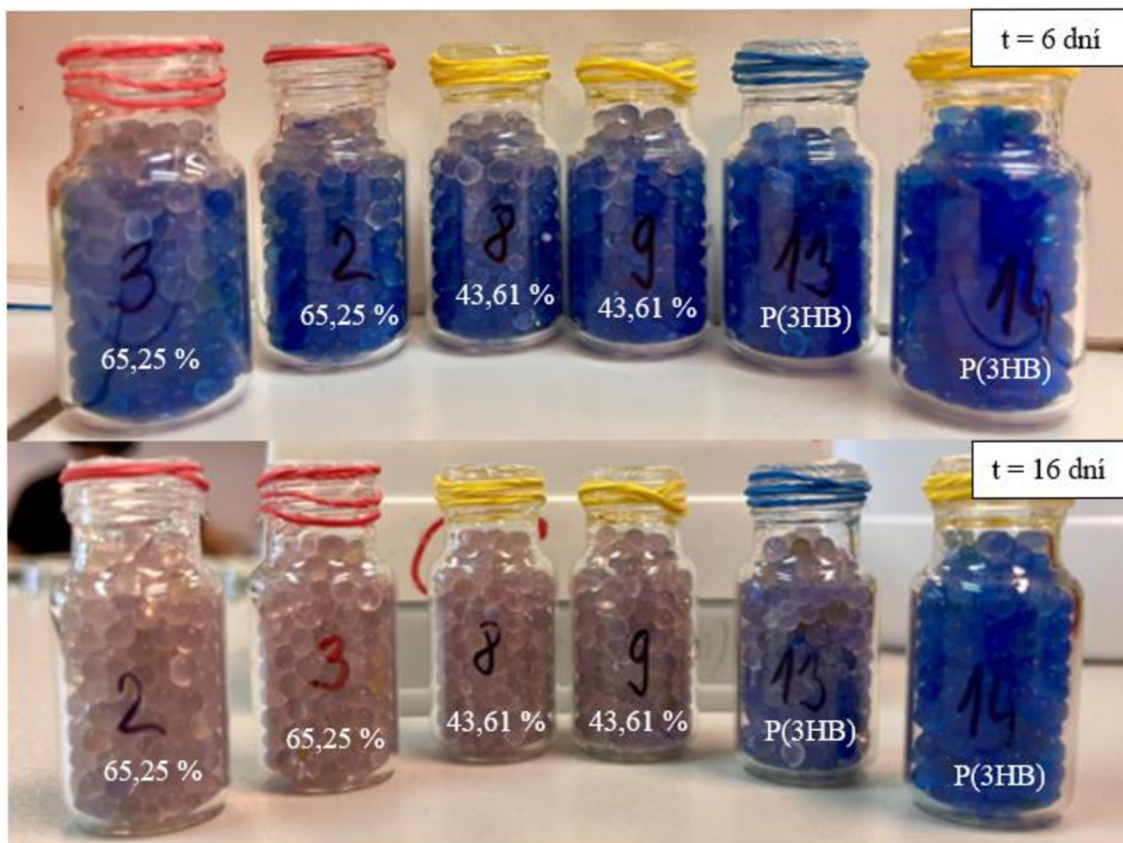
na mikroskopické sklíčko dochádzalo k variabilite nanášania kvôli rôznej rýchlosti práce, kedy nanosená vrstva už začínala schnúť ešte pred zapnutím pravítka, resp. pred vytvorením filmu. Hodnoty v tabuľke 10 boli rozhodujúce pri analýze permeability vodnej pary, pretože cez hrubšiu membránu prenikne menej vodnej pary a naopak.

Tabuľka 10: Výšky filmov PHA

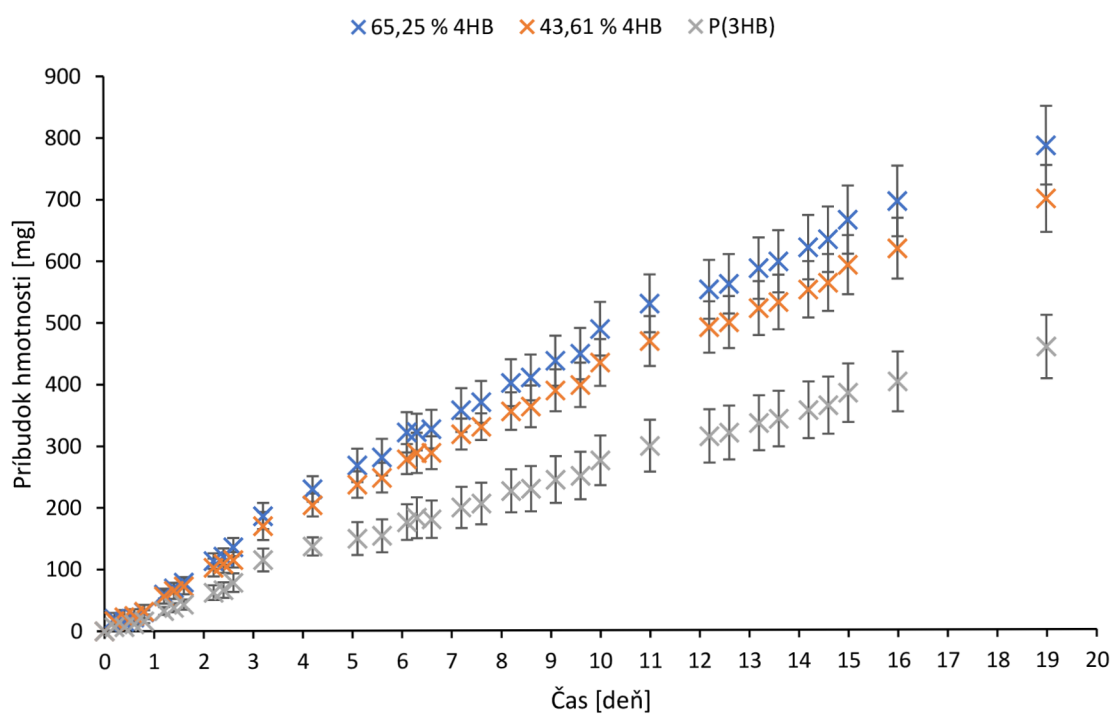
Polymér	4HB [hm. %]	Výška [μm]	Polymér	4HB [hm. %]	Výška [μm]
P(3HB-co-4HB)	65,25	14,98	P(3HB-co-4HB)	43,61	12,68
	65,25	15,85		43,61	12,07
	65,25	16,94	P(3HB)	-	7,50
	65,25	11,70		-	6,87
	65,25	16,20		-	7,03
	43,61	12,02		-	6,84
	43,61	12,95		-	7,19
	43,61	13,66			

5.6 Permeabilita fólii voči vodnej pare

Jedným z cieľov tejto práce bolo porovnať bariérové vlastnosti pripravených filmov. Všetky fólie, pri ktorých bola zmeraná výška (okrem jednej), boli následne použité na stanovenie permeability proti vodnej pare. Fólia P(3HB-co-43,61%4HB) s hrúbkou 12,95 μm bola pretrhnutá pri nanášaní na hrdlo nádoby. Počas experimentu bol použitý silikagél, ktorý pri sorpcii vodnej pary pribúda na hmotnosti. Vďaka tomu bolo možné vážením na analytických váhach sledovať priepustnosť fólii voči vodnej pare. Analýza bola prevedená v 5 sériách súčasne (v 4 sériách pri P(3HB-co-43,61%4HB)) a prebiehala celkovo 19 dní. Obrázok 10 ukazuje viditeľnú zmenu za 10 dní s dvomi zvolenými vzorkami z každého PHA. Aj napriek tomu, že kopolymérne fólie sú značne hrubšie (tabuľka 10), vykazujú vyššiu priepustnosť vodnej pary, a to zmenou farby silikagélu z modrej na bielu. Výsledky permeačnej rýchlosti vodnej pary zobrazuje obrázok 11, kde boli spriemerované hodnoty z celej série, ktoré boli prepočítané voči pôvodnej navážke silikagélu. Zároveň je možné vidieť, že so zvyšujúcim časom rástol prírastok hmotnosti silikagélu, ktorá by sa zvyšovala až dokým by nedošlo k úplnému nasýteniu vodnou parou. Podľa očakávania kryštalický homopolymér prepúšťal menej vodnej pary ako použité kopolyméry. Z toho vyplýva, že kopolymér vykazuje nižšie bariérové vlastnosti zapríčinené menej hustým usporiadaním molekúl oproti kryštalickému P(3HB).



Obrázok 10: Vzorky pri WVP v priebehu 10 dní (pri vzorkách z kopolymérnych fólií je uvedené percentuálne zastúpenie 4HB)



Obrázok 11: Graf v závislosti prírastku hmotnosti za čas porovnávajúci 2 kopolyméry P(3HB-co-4HB) a jeden homopolymér P(3HB)

5.7 Optimalizácia uvoľňovania modelových aktívnych látok

V kapitole 3.2 bol spomenutý dôvod výskumu aktívnych obalov v potravinárskom priemysle. Tieto obalové materiály obsahujú aktívnu látku, ktorá zvyšuje ich funkčnosť, tzv. vedú k zlepšeniu antioxidantných a antibakteriálnych vlastností obalov. Ďalej môžu poskytovať kyslíkové bariéry alebo byť blokátory svetla. Takto vylepšené aktívne obaly vedú k predĺženiu životnosti potravín.

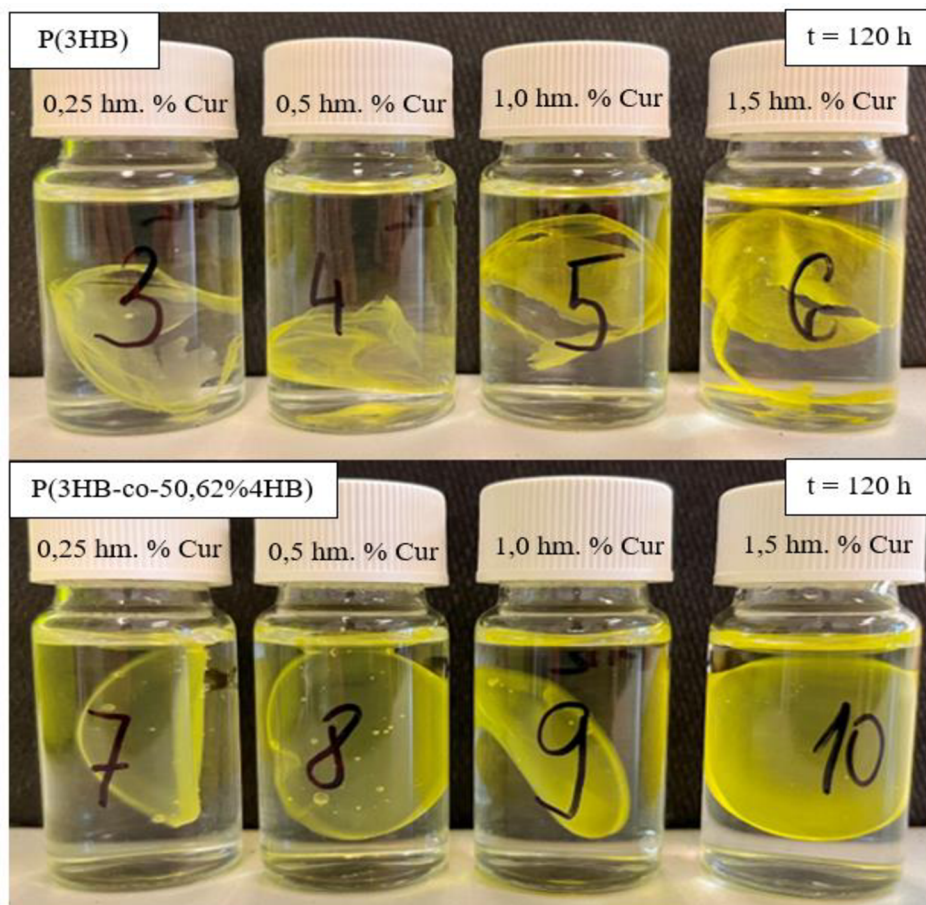
Pripraviť a charakterizovať aktívne obalové materiály bolo jedným z hlavných cieľov tejto práce. V rámci experimentálnej časti boli zvolené dve aktívne látky, a to kurkumín a kyselina salicylová. Obe tieto aktívne látky majú antibakteriálne účinky a zároveň kurkumín disponuje aj antioxidantnými vlastnosťami. Okrem toho sú obe tieto látky rozpustné v chloroforme a je možné ich uvoľňovanie do roztokov sledovať spektrofotometricky. Na druhú stranu sa obe látky líšia svojou rozpustnosťou vo vode. Kurkumín bol použitý ako model aktívnej látky silno hydrofóbnej povahy, zatiaľ čo kyselina salicylová ako model aktívnej látky dobre rozpustnej vo vode. Ako už bolo spomenuté v podkapitole 5.2.2, bolo potrebné šetriť materiálom kvôli nedostatočnému množstvu biomasy kopolyméru. Z toho dôvodu bol na optimalizáciu použitý referenčný zásobný kopolymér P(3HB-co-4HB) so zastúpením monomérnych jednotiek 4HB 50,62 % a komerčný P(3HB). Cieľom experimentu bolo inkorporovať aktívne látky do PHA a sledovať ich uvoľňovanie do roztoku.

Podľa postupu v podkapitole 4.9.1 boli aktívne látky (kurkumín a kyselina salicylová) úspešne inkorporované a boli vytvorené homogénne fólie. Koncentrácia kurkumínu vo fóliách zodpovedala 0,25; 0,5; 1,0 a 1,5 hm. %, ktoré boli použité z článku *Roy a Rhim* (2020) [47]. Následne bolo možné vypočítať pridaný objem zásobného roztoku na vytvorenie požadovaných koncentrácií, ktoré boli vzťahované na hmotnosť PHA. Druhá aktívna látka, kyselina salicylová, bola použitá v koncentráciách 2,5; 5; 7,5 a 10 hm. %. Tieto koncentrácie boli použité a upravené podľa výskumu *Yin a kol.* (2018) [54]. Následný výpočet objemu zásobného roztoku kyseliny salicylovej na dané koncentrácie bol podobný ako pri kurkumíne.

V podkapitole 4.9.2 je spomenutý optimalizačný postup, podľa ktorého prebiehalo uvoľňovanie aktívnych látok z PHA. Najprv boli fólie vložené do destilovanej vody a v priebehu 3 dní bola meraná absorbanca roztokov pri daných vlnových dĺžkach (kurkumín pri 420 nm a kyselina salicylová pri 233 nm).

Fólie s kurkumínom v destilovanej vode neukazovali ani po 48 hodinách žiadny nárast absorbancie a namerané hodnoty nevykazovali žiadny záver. Z toho dôvodu boli fólie znovu vložené do čistej destilovanej vody, aby bolo možné sledovať celé absorpčné spektrá predpokladaného uvoľňovania. Ani po 120 hodinách absorpčné spektrá neukazovali žiadny pík. To zobrazuje obrázok 12, kde fólie zostali plné kurkumínu

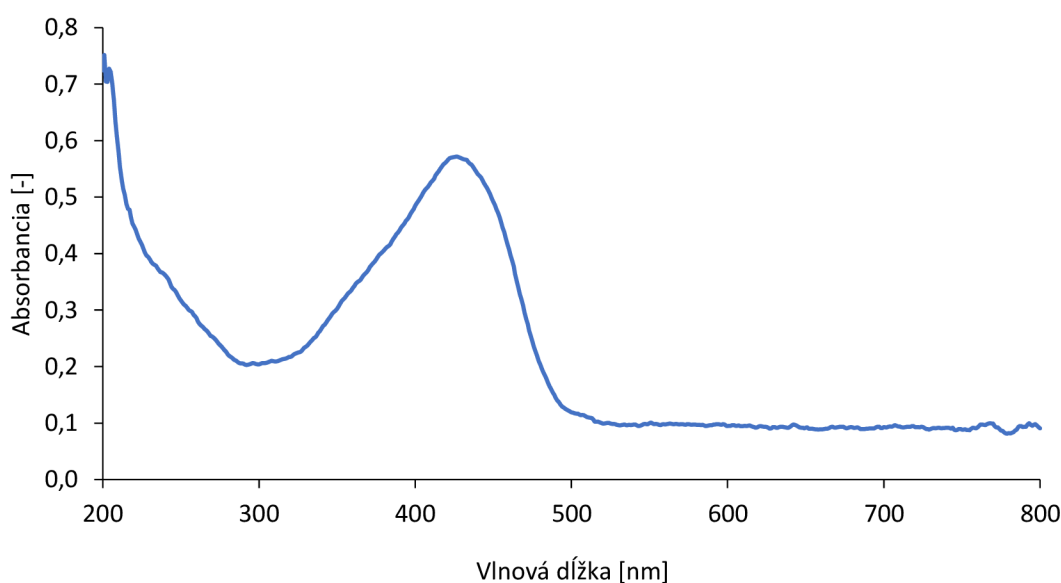
a destilovaná voda bola nezafarbená. V dôsledku toho, že kurkumín je skoro nerozpustný vo vode, čo dokázali aj zmienené výsledky vyššie, bolo nutné zmeniť charakter roztoku použitého na uvoľňovacie experimenty. Za týmto účelom bola použitá zmes etanol-voda. Dôvodom zvolenia tohto roztoku bol článok *Suresh a Nangia (2018)*, kde bola dokázaná rozpustnosť kurkumínu v etanole [55]. Fólie s koncentráciou 0,5 hm. % kurkumínu boli vložené do 50% etanolu a fólie s koncentráciou 1,5 hm. % kurkumínu do 10% etanolu. Roztok 10% etanolu bol zvolený z dôvodu snahy použiť čo najmenej etanolu, aby charakter uvoľňovania najlepšie simuloval difúziu do vodného prostredia (v prípade reálnych aplikácií podporeného napr. prítomnosťou emulgátorov). Zatiaľ čo roztok 50% etanolu bol použitý kvôli razantnému uvoľňovaniu a sledovaniu prvého absorpčného spektra kurkumínu. Po 24 hodinách bola vidieť výrazná zmena farby roztoku v prípade fólii v 50% etanole (pozri obrázok 13), a to potvrdilo aj absorpčné spektrum P(3HB-co-50,62%4HB) na obrázku 14, kde je zrejmé, že kurkumín absorbuje pri vlnovej dĺžke 420 nm. Roztoky s fóliami v 10% etanole nejavili známky zafarbenia a zmerané absorpčné spektrum bolo deformované s veľmi miernym náznakom píku pri 420 nm. Z uvedených výsledkov je zrejmé, že rozpustnosť hrá kľúčovú úlohu pri uvoľňovaní aktívnych látok, kvôli čomu bol po optimalizácii zvolený roztok 50% etanolu na uvoľňovanie 0,5 hm. % kurkumínu z PHA.



Obrázok 12: Fólie P(3HB) a P(3HB-co-50,62%4HB) s inkorporovaným kurkumínom v koncentráciách 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 hm. % vo vode po 120 hodinách

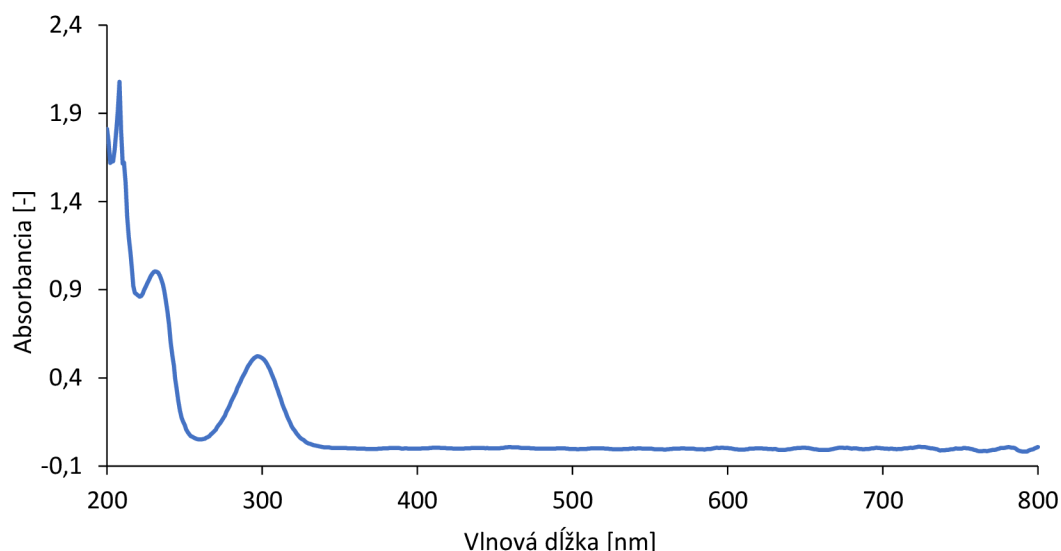


Obrázok 13: Fólie P(3HB) (vľavo) a P(3HB-co-4HB) (vpravo) s inkorporovaným kurkumínom 0,5 hm. % v 50% etanole po 24 hodinách



Obrázok 14: Absorpčné spektrum P(3HB-co-50,62%4HB) s 0,5 hm. % kurkumínu v 50% etanole po 24h

Po vložení fólii s inkorporovanou kyselinou salicylovou do destilovanej vody, bolo možné už po 1 hodine spektrofotometricky sledovať nárast absorbancie pri vlnovej dĺžke 233 nm. Aby boli dané výsledky potvrdené, po 5 dňoch uvoľňovania boli zmerané celé absorpčné spektrá. Pre príklad je znázornené absorpčné spektrum kopolyméru s 10 hm. % kyseliny salicylovej na obrázku 15, ktoré ukazuje presné absorpčné spektrum kyseliny salicylovej. Vďaka dostatočnej rozpustnosti kyseliny salicylovej v destilovanej vode, nebolo potrebné meniť roztok na uvoľňovanie aktívnej látky z PHA. Z dôvodu optimálnej intenzity spektrálneho signálu boli na nasledujúce experimenty vybrané fólie s 10 hm. % kyseliny salicylovej.



Obrázok 15: Absorpčné spektrum P(3HB-*co*-50,62%4HB) s 10 hm. % kyseliny salicylovej vo vode po 5 dňoch

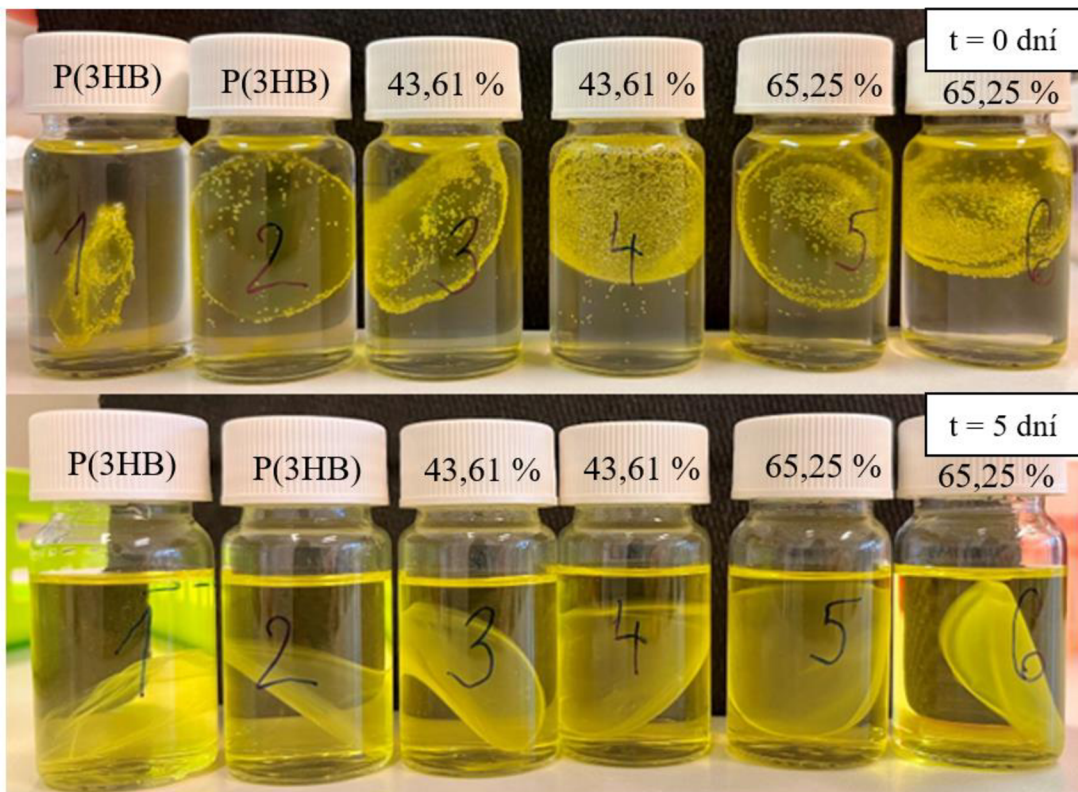
5.8 Uvoľňovanie modelových aktívnych látok

Na základe optimalizácie v predchádzajúcej kapitole bolo možné začať s experimentom s homopolymérnymi P(3HB) a kopolymérnymi fóliami P(3HB-*co*-65,25%4HB), P(3HB-*co*-43,61%4HB), do ktorých boli pomocou postupu v podkapitole 4.9.1 pridané aktívne látky kurkumínu a kyseliny salicylovej. Podľa optimalizácie boli fólie s 0,5 hm. % kurkumínom vložené do roztoku 50% etanolu a fólie s 10 hm. % kyseliny salicylovej do destilovanej vody. Meranie prebiehalo v dvoch sériách pre každé, už vyššie zmienené, PHA.

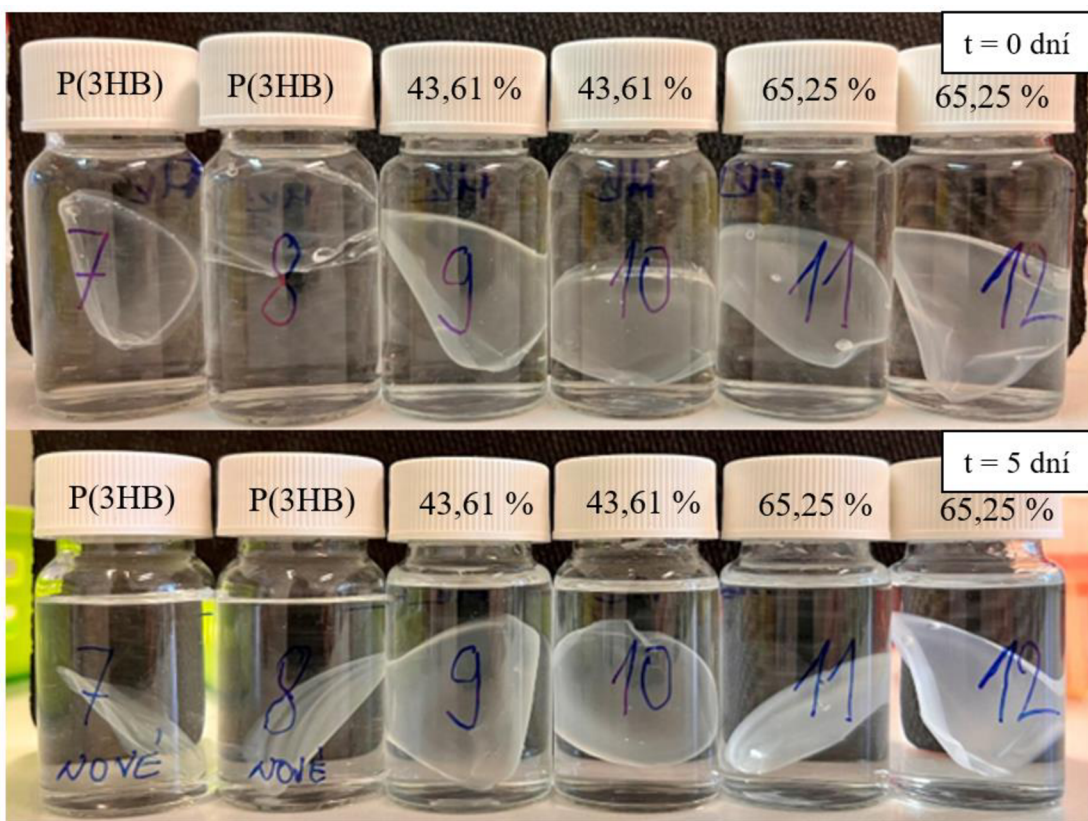
Podľa postupu v podkapitole 4.9.2 boli zmerané absorpčné spektrá v stanovených intervaloch. Zatiaľ čo obrázok 16 zobrazuje fólie hneď po vložení do 50% etanolu a potom po 5 dňoch od vloženia, zafarbenie roztoku bolo možné sledovať už po 1 hodine pri všetkých použitých PHA. Uvoľňovanie kyseliny salicylovej v priebehu 5 dní ukazuje obrázok 17, kde vizuálne neprebehla žiadna zmena kvôli bielej farbe aktívnej látky. Naproti tomu difúzia bola potvrdená pri spektrofotometrickom meraní oboch aktívnych látok, ktorú je možné vidieť na obrázku 18 a 19. Najprv bol nutný prepočet z hodnôt absorbancie meraných vzoriek pomocou kalibračných priamok kurkumínu a kyseliny salicylovej, do podoby hmotnostnej koncentrácie v roztoku.

Na obrázkoch 18 a 19 je možné vidieť, že kurkumín aj kyselina salicylová sa uvoľnili už v priebehu 10 hodín a z toho dôvodu nebolo možné sledovať kinetiku uvoľňovania. V teoretickej časti bola spomenutá vyššia kryštalinita homopolyméru P(3HB), ktorá ovplyvnila difúziu aktívnych látok kvôli tesnejšiemu usporiadaniu molekúl. Preto je zrejmé, že koncentrácia uvoľnených látok je nižšia v porovnaní s P(3HB-*co*-4HB). V rámci kopolymérov P(3HB-*co*-43,61%4HB) a P(3HB-*co*-

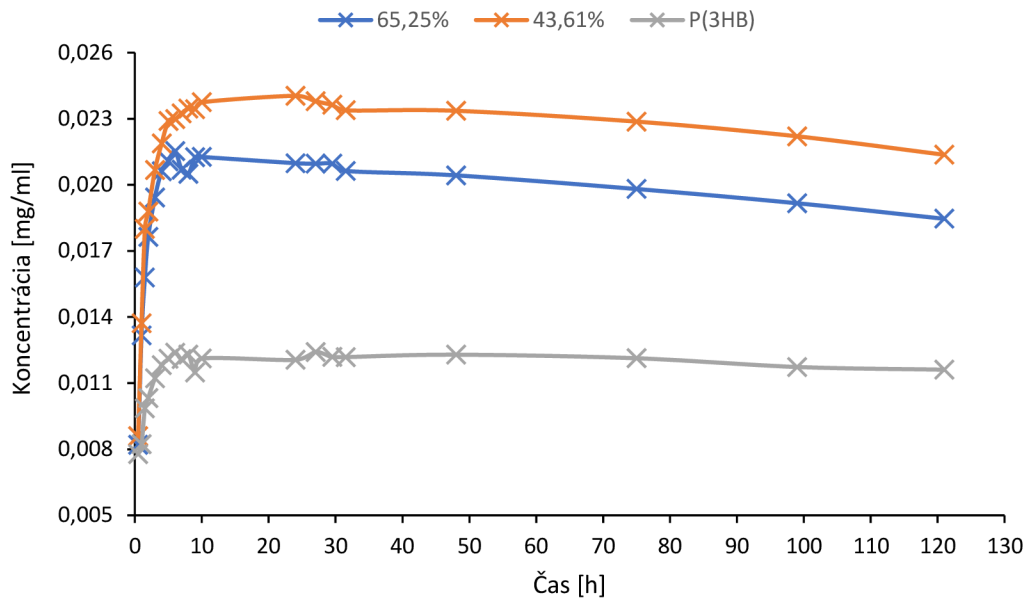
65,25%4HB) bolo možné sledovať, že kopolymér s menším zastúpením monomérnych jednotiek 4HB (43,61 %) uvoľňoval aktívne látky o niečo rýchlejšie. Dôvodom bola už spomenutá (pozri podkapitolu 5.4.3) vyššia kryštalinita kopolyméru P(3HB-co-65,25%4HB), kde monoméne jednotky 4HB tvoria väčší podiel kryštalických domén ako pri kopolymére s menším obsahom 4HB (43,61 %).



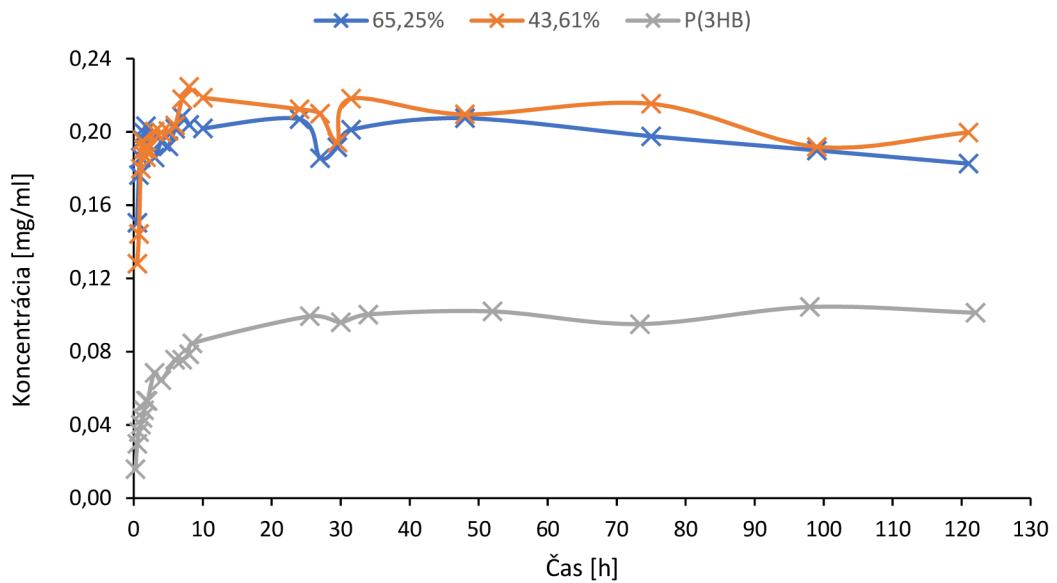
Obrázok 16: P(3HB) a P(3HB-co-4HB) fólie (pri vzorkách z kopolymérnych fólií je uvedené percentuálne zastúpenie 4HB) s 0,5 hm. % kurkumínu v priebehu 5 dní



Obrázok 17: P(3HB) a P(3HB-co-4HB) fólie (pri vzorkách z kopolymérnych fólií je uvedené percentuálne zastúpenie 4HB) s 10 hm. % kyseliny salicylovej v priebehu 5 dní



Obrázok 18: Graf v závislosti koncentrácie na čase pre fólie s 0,5 hm. % kurkumínu porovnávajúci 2 kopolyméry P(3HB-co-4HB) a jeden homopolymér P(3HB)



Obrázok 19: Graf v závislosti koncentrácie na čase pre fólie s 10 hm. % kyseliny salicylovej porovnávajúci 2 kopolyméry P(3HB-co-4HB) a jeden homopolymér P(3HB)

6. ZÁVER

Cieľom tejto bakalárskej práce bola produkcia, charakterizácia a porovnanie materiálových vlastností polyhydroxyalkanoátov, s ohľadom na ich možné využitie v oblasti inteligentných obalov. Konkrétne bol použitý homopolymér P(3HB) a kopolyméry P(3HB-co-4HB) s rôznymi percentuálnymi zastúpeniami monomérnych jednotiek 4HB. Tieto PHA boli získané prostredníctvom kultivácie bakteriálnych kmeňov *Aneurinibacillus* sp. H1 CCM 8960 a *Cupriavidus necator* H16 CCM 3726. V rámci produkcie P(3HB-co-4HB) boli vytvorené kopolyméry o rôznom obsahu 4HB v závislosti na koncentrácii glycerolu (zdroj uhlíka) v produkčnom médiu. Z biomasy boli PHA izolované pomocou Soxthermu, kde bol použitý chloroform ako extrakčné činidlo a následne jeho odparovaním boli vytvorené fólie. Takto získaná biomasa a fólie boli podrobené rôznym charakterizačným technikám, konkrétne plynovej chromatografii s FID, diferenčnej skenovacej kalorimetrii (DSC), SEC-MALS a FTIR analýze.

Charakterizácia PHA pomocou plynovej chromatografie ukázala, že produkciou homopolyméru P(3HB) bola získaná biomasa s približne dvakrát väčším percentuálnym zastúpením PHA oproti kopolymérom, konkrétne 85,2 hm. %. Z toho vyplýva, že kultivácia baktérie, ktorá produkuje kopolymér, by musela prebiehať v oveľa väčšom rozsahu na dosiahnutie rovnakého množstva PHA. Tento poznatok otvára v budúcnosti ďalšie možnosti optimalizácie a výskumu produkcie P(3HB-co-4HB). Ďalej bol v rámci zloženia kopolymérov potvrdený rôzny obsah monomérnej jednotky 4HB, a to v rozmedzí 0,91 – 65,25 %. V následných experimentálnych meraniach boli použité kopolymérne fólie o zložení 65,25 % a 43,61 % 4HB.

FTIR analýza zobrazovala rozdiel v molekulárnej štruktúre homopolyméru a kopolymérov, kedy P(3HB) vykazoval najmenšie hodnoty absorpcie v páse charakteristickom pre amorfné polymérne domény (1160 cm^{-1}), čo naznačuje jeho vyššiu kryštalinitu oproti všetkým trom kopolymérom P(3HB-co-4HB). Rozdiely v kryštalinite vzoriek boli následne potvrdené pomocou DSC kalorimetrickej analýzy. Tou bola zistená odlišnosť v štruktúre kopolymérov P(3HB-co-4HB) so zložením 65,25 % a 43,61 % 4HB. Predpoklad, že P(3HB-co-65,25%4HB) bude amorfnejší kvôli väčšiemu zastúpeniu 4HB bol vyvrátený. Analýza ukázala, že z dôvodu vyššieho obsahu 4HB, začali tieto monomérne jednotky tvoriť väčší podiel kryštalických domén typu P(4HB). SEC-MALS analýza následne ukázala rozdiel medzi homopolymérom a kopolymérom vo veľkosti reťazcov, z dôvodu 4 – 6× väčšej molekulovej hmotnosti P(3HB), zatiaľ čo hodnoty indexu polydisperzity boli podobné pri všetkých PHA.

V druhej časti experimentálnej práce boli PHA vo forme fólii podrobené ďalším analýzám, relevantným vzhľadom k ich plánovaným aplikáciám. Konkrétne profilometrii, štúdiu prestupu vodnej pary a uvoľňovaniu aktívnych látok. Najprv boli pripravené filmy z vybraných polyhydroxyalkanoátov pomocou aplikátoru TQC

a následne bola zmeraná výška vrstvy filmov na profilometri, keďže tieto hodnoty boli rozhodujúce pri interpretácii ich bariérových vlastností. Výsledky prestupu vodnej pary cez filmy PHA spĺňali očakávanie. Bolo dokázané, že skrz membránu P(3HB) prešlo menšie množstvo vody oproti kopolymérnym vzorkám, kvôli hustejšiemu usporiadaniu molekúl v homopolymére, čo dokazuje jeho lepšie bariérové vlastnosti.

Pred následným uvoľňovaním aktívnych látok (kurkumínu a kyseliny salicylovej), bola nutná optimalizácia experimentálnej procedúry z hľadiska inkorporácie a zvolenia roztoku na ich uvoľňovanie. Z dôvodu šetrenia materiálom boli pri optimalizácii použité fólie pripravené zo zásobného kopolyméru s obsahom 4HB 50,62 %. V rámci optimalizácie sa podarilo úspešne inkorporovať obe aktívne látky do PHA fólii. Z dôvodu nízkej rozpustnosti kurkumínu vo vode, nedochádzalo (na rozdiel od kyseliny salicylovej) k uvoľňovaniu tejto aktívnej látky do čistej vody. Preto bol na následné uvoľňovacie experimenty zvolený, ako prijímací roztok kurkumínu, 50% etanol, zatiaľ čo uvoľňovanie kyseliny salicylovej bolo aj naďalej pozorované v destilovanej vode. Charakterizácia spočívala v spektrofotometrickom stanovení uvoľneného množstva aktívnych látok do prijímacích roztokov vo vybraných časových intervaloch. Výsledky dokázali efekt vyššej kryštalinity P(3HB), ktorá viedla k spomaleniu difúzie aktívnych látok z dôvodu tesnejšieho usporiadania molekúl. Zároveň bola potvrdená aj vyššia kryštalinita kopolyméru P(3HB-co-65,25%4HB), pretože druhý kopolymér P(3HB-co-4HB), s menším zastúpením monomérnych jednotiek 4HB (43,61 %), uvoľňoval aktívne látky o niečo rýchlejšie. Pri danom experimente prebiehala difúzia kurkumínu a kyseliny salicylovej rýchlejšie ako bolo predpokladom, a preto nebolo možné podrobnejšie analyzovať kinetiku difúzie. Táto skutočnosť poskytuje nadväzujúcim prácam možnosť preskúmať iné zloženie roztoku na uvoľňovanie kyseliny salicylovej a kurkumínu. Z daných výsledkov je zrejmé, že hlavnou charakteristikou PHA je pomer amorfných a kryštalických domén, na základe čoho sa odvíjajú ich vlastnosti.

7. ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] KESHAVARZ, Tajalli a Ipsita ROY. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current opinion in microbiology* [online]. England: Elsevier, 2010, 13(3), 321-326 [cit. 2022-02-09]. ISSN 1369-5274. Dostupné z: doi:10.1016/j.mib.2010.02.006
- [2] DWIVEDI, Ruby, Rahul PANDEY, Sumit KUMAR a Divya MEHROTRA. Polyhydroxyalkanoates (PHA): Role in bone scaffolds. *Journal of oral biology and craniofacial research (Amsterdam)* [online]. Netherlands: Elsevier B.V, 2020, 10(1), 389-392 [cit. 2022-02-09]. ISSN 2212-4268. Dostupné z: doi:10.1016/j.jobcr.2019.10.004
- [3] GOSWAMI, Moushmi, Pavni REKHI, Mousumi DEBNATH a Seeram RAMAKRISHNA. Microbial polyhydroxyalkanoates granules: An approach targeting biopolymer for medical applications and developing bone scaffolds. *Molecules (Basel, Switzerland)* [online]. Switzerland: MDPI, 2021, 26(4), 860 [cit. 2022-02-09]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules26040860
- [4] RAZA, Zulfiqar Ali, Sharjeel ABID a Ibrahim M BANAT. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International biodeterioration & biodegradation* [online]. Elsevier, 2018, 126, 45-56 [cit. 2022-02-09]. ISSN 0964-8305. Dostupné z: doi:10.1016/j.ibiod.2017.10.001
- [5] REDDY, C.S.K, R GHAI a V.C KALIA. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology* [online]. Oxford: Elsevier, 2003, 87(2), 137-146 [cit. 2022-02-09]. ISSN 0960-8524. Dostupné z: doi:10.1016/S0960-8524(02)00212-2
- [6] GOMES GRADÍSSIMO, Diana, Luciana PEREIRA XAVIER a Agenor VALADARES SANTOS. Cyanobacterial Polyhydroxyalkanoates: A Sustainable Alternative in Circular Economy. *Molecules (Basel, Switzerland)* [online]. Switzerland: MDPI, 2020, 25(18), 4331 [cit. 2022-02-09]. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25184331
- [7] KHANNA, Shilpi a Ashok K SRIVASTAVA. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process biochemistry (1991)* [online]. Elsevier, 2005, 40(2), 607-619 [cit. 2022-02-12]. ISSN 1359-5113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2004.01.053
- [8] WINNACKER, Malte. Polyhydroxyalkanoates: Recent Advances in Their Synthesis and Applications. *European journal of lipid science and technology* [online]. 2019, 121(11), 1900101-n/a [cit. 2022-02-12]. ISSN 1438-7697. Dostupné z: doi:10.1002/ejlt.201900101
- [9] AKARAONYE, Everest, Tajalli KESHAVARZ a Ipsita ROY. Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. *Journal of chemical technology and biotechnology (1986)* [online]. Chichester, UK: John Wiley,

- 2010, 85(6), 732-743 [cit. 2022-02-09]. ISSN 0268-2575. Dostupné z: doi:10.1002/jctb.2392
- [10] MUNEEER, Faizan, Ijaz RASUL, Farrukh AZEEM, Muhammad Hussnain SIDDIQUE, Muhammad ZUBAIR a Habibullah NADEEM. Microbial Polyhydroxyalkanoates (PHAs): Efficient Replacement of Synthetic Polymers. *Journal of polymers and the environment* [online]. New York: Springer US, 2020, 28(9), 2301-2323 [cit. 2022-02-09]. ISSN 1566-2543. Dostupné z: doi:10.1007/s10924-020-01772-1
- [11] SINGH, Akhilesh Kumar a Nirupama MALLICK. Exploitation of inexpensive substrates for production of a novel SCL–LCL-PHA co-polymer by *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 7925. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* [online]. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2008, 36(3), 347-354 [cit. 2022-02-09]. ISSN 1367-5435. Dostupné z: doi:10.1007/s10295-008-0503-x
- [12] DARTIAILH, Christopher, Warren BLUNT, Parveen K SHARMA, Song LIU, Nazim CICEK a David B LEVIN. The Thermal and Mechanical Properties of Medium Chain-Length Polyhydroxyalkanoates Produced by *Pseudomonas putida* LS46 on Various Substrates. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* [online]. Switzerland: Frontiers Media S.A, 2020, 8, 617489-617489 [cit. 2022-02-10]. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2020.617489
- [13] LEE, Sang Yup. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and bioengineering* [online]. Hoboken: Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 1996, 49(1), 1-14 [cit. 2022-02-10]. ISSN 0006-3592. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19960105)49:11::AID-BIT13.0.CO;2-P
- [14] ZINN, M a R HANY. Tailored Material Properties of Polyhydroxyalkanoates through Biosynthesis and Chemical Modification. *Advanced engineering materials* [online]. Weinheim: WILEY-VCH Verlag, 2005, 7(5), 408-411 [cit. 2022-02-10]. ISSN 1438-1656. Dostupné z: doi:10.1002/adem.200500053
- [15] BEHERA, Shivananda, Monika PRIYADARSHANEE a Surajit DAS. Polyhydroxyalkanoates, the bioplastics of microbial origin: Properties, biochemical synthesis, and their applications. *Chemosphere (Oxford)* [online]. England: Elsevier, 2022, 294, 133723-133723 [cit. 2022-02-12]. ISSN 0045-6535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2022.133723
- [16] TECK KIM, Young, Byungjin MIN a Kyung WON KIM. Chapter 2 - General Characteristics of Packaging Materials for Food System. *Innovations in Food Packaging*. Second Edition. Elsevier, 2014, s. 13-35. ISBN 9780123948359. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-394601-0.00002-3
- [17] ABDUL KHALIL, H.P.S., Chaturbhuj K. SAURABH, M.I. SYAKIR, et al., JAWAID, Mohammad, Mohamed THARIQ a Naheed SABA, ed. Barrier properties of biocomposites/hybrid films. *Mechanical and Physical Testing of Biocomposites, Fibre-Reinforced Composites and Hybrid Composites*. Woodhead Publishing, 2018, s. 241-258. ISBN 9780081022924. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/C2016-0-04437-6

- [18] CORRE, Yves-marie, Stéphane BRUZAUD, Jean-luc AUDIC a Yves GROHENS. Morphology and functional properties of commercial polyhydroxyalkanoates: A comprehensive and comparative study. *Polymer testing* [online]. Kindlington: Elsevier, 2012, 31(2), 226-235 [cit. 2022-02-13]. ISSN 0142-9418. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymertesting.2011.11.002
- [19] KELLER, Paul E. a Richard KOUZES. *Water Vapor Permeation in Plastics*. United States, 2017. <https://doi.org/10.2172/1411940>.
- [20] AL-KADDO, Khansaa Badie, Faisal MOHAMAD, Paramasivam MURUGAN, Joo Shun TAN, Kumar SUDESH a Mohd Razip SAMIAN. Production of P(3HB-co-4HB) copolymer with high 4HB molar fraction by *Burkholderia contaminans* Kad1 PHA synthase. *Biochemical engineering journal* [online]. Elsevier B.V, 2020, 153, 107394 [cit. 2022-02-15]. ISSN 1369-703X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2019.107394
- [21] SAMUI, Asit Baran a Tapan KANAI. Polyhydroxyalkanoates based copolymers. *International journal of biological macromolecules* [online]. Netherlands: Elsevier B.V, 2019, 140, 522-537 [cit. 2022-02-16]. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.08.147
- [22] NORHAFINI, Hambali, Kai-hee HUONG a A.A AMIRUL. High PHA density fed-batch cultivation strategies for 4HB-rich P(3HB-co-4HB) copolymer production by transformant *Cupriavidus malaysiensis* USMAA1020. *International journal of biological macromolecules* [online]. Netherlands: Elsevier B.V, 2019, 125, 1024-1032 [cit. 2022-02-16]. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.12.121
- [23] HAN, Lijing, Changyu HAN, Huiliang ZHANG, Shan CHEN a Lisong DONG. Morphology and properties of biodegradable and biosourced polylactide blends with poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Polymer composites* [online]. Hoboken: Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 2012, 33(6), 850-859 [cit. 2022-02-16]. ISSN 0272-8397. Dostupné z: doi:10.1002/pc.22213
- [24] CAO, Lidong, Yajing LIU, Chunli XU, Zhaolu ZHOU, Pengyue ZHAO, Shujun NIU a Qiliang HUANG. Biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) microcapsules for controlled release of trifluralin with improved photostability and herbicidal activity. *Materials Science & Engineering C* [online]. Netherlands: Elsevier B.V, 2019, 102, 134-141 [cit. 2022-02-16]. ISSN 0928-4931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2019.04.050
- [25] SAITO, Yuji, Shigeo NAKAMURA, Masaya HIRAMITSU a Yoshiharu DOI. Microbial Synthesis and Properties of Poly3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate. *Polymer international* [online]. 1996, 39(3), 169-174 [cit. 2022-02-16]. ISSN 0959-8103. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1097-0126(199603)39:3169::AID-PI4533.3.CO;2-Q
- [26] ANJUM, Anbreen, Mohammad ZUBER, Khalid Mahmood ZIA, Aqdas NOREEN, Muhammad Naveed ANJUM a Shazia TABASUM. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International journal of biological macromolecules* [online].

- Netherlands: Elsevier B.V, 2016, 89, 161-174 [cit. 2022-02-16]. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069
- [27] YU, Jian. Chapter 23 - Microbial Production of Bioplastics from Renewable Resources. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*. Elsevier B.V, 2007, s. 585-610. ISBN 9780444521149. Dostupné z: doi:10.1016/B978-044452114-9/50024-4
- [28] MEEREBOER, Kjeld W, Akhilesh K PAL, Erick O CISNEROS-LÓPEZ, Manjusri MISRA a Amar K MOHANTY. The effect of natural fillers on the marine biodegradation behaviour of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV). *Scientific reports* [online]. England: Nature Publishing Group, 2021, 11(1), 911-911 [cit. 2022-02-16]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-78122-7
- [29] LIU, Qingsheng, Hongxia ZHANG, Bingyao DENG a Xiaoyan ZHAO. Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate): Structure, Property, and Fiber. *International journal of polymer science* [online]. New York: Hindawi Publishing Corporation, 2014, 2014, 1-11 [cit. 2022-05-24]. ISSN 1687-9422. Dostupné z: doi:10.1155/2014/374368
- [30] ERASLAN, Kerim, Clizia AVERSA, Mohammadreza NOFAR, Massimiliano BARLETTA, Annamaria GISARIO, Reza SALEHIYAN a Yonca Alkan GOKSU. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBH): Synthesis, properties, and applications - A review. *European Polymer Journal* [online]. 2022, (167) [cit. 2022-02-24]. ISSN 0014-3057. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111044
- [31] KALIA, Vipin Chandra, Subhasree RAY, Sanjay K. S PATEL, Mamtesh SINGH a Gajendra Pratap SINGH. The Dawn of Novel Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates*. Singapore: Springer Singapore, 2019, s. 1-11. ISBN 9811337586. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-13-3759-8_1
- [32] SANI, Mahmood Alizadeh, Maryam AZIZI-LALABADI, Milad TAVASSOLI, Keyhan MOHAMMADI a David Julian MCCLEMENTS. Recent Advances in the Development of Smart and Active Biodegradable Packaging Materials. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* [online]. Basel: MDPI, 2021, 11(5), 1331 [cit. 2022-04-24]. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano11051331
- [33] SANCHEZ-GARCIA, M.D, E GIMENEZ a J.M LAGARON. Novel PET Nanocomposites of Interest in Food Packaging Applications and Comparative Barrier Performance With Biopolyester Nanocomposites. *Journal of plastic film & sheeting* [online]. London, England: Sage Publications, 2007, 23(2), 133-148 [cit. 2022-02-22]. ISSN 8756-0879. Dostupné z: doi:10.1177/8756087907083590
- [34] GRIGORE, Mădălina Elena, Ramona Marina GRIGORESCU, Lorena IANCU, Rodica-mariana ION, Cătălin ZAHARIA a Elena Ramona ANDREI. Methods of synthesis, properties and biomedical applications of polyhydroxyalkanoates: a review. *Journal of biomaterials science. Polymer ed* [online]. Abingdon: Taylor & Francis, 2019, 30(9), 695-712 [cit. 2022-02-22]. ISSN 0920-5063. Dostupné z: doi:10.1080/09205063.2019.1605866

- [35] ZHANG, Junyu, Ekaterina I SHISHATSKAYA, Tatiana G VOLOVA, Luiziana Ferreira DA SILVA a Guo-qiang CHEN. Polyhydroxyalkanoates (PHA) for therapeutic applications. *Materials Science & Engineering C* [online]. Netherlands: Elsevier B.V, 2018, 86, 144-150 [cit. 2022-02-22]. ISSN 0928-4931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2017.12.035
- [36] VIGNESWARI, S, V MURUGAIYAH, G KAUR, H.P.S ABDUL KHALIL a A.A AMIRUL. Simultaneous dual syringe electrospinning system using benign solvent to fabricate nanofibrous P(3HB-co-4HB)/collagen peptides construct as potential leave-on wound dressing. *Materials Science & Engineering C* [online]. Netherlands: Elsevier B.V, 2016, 66, 147-155 [cit. 2022-02-22]. ISSN 0928-4931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2016.03.102
- [37] GALEGO, Norma, Chavati ROZSA, Rubén SÁNCHEZ, Juan FUNG, Analía VÁZQUEZ a Julio SANTO TOMÁS. Characterization and application of poly(β -hydroxyalkanoates) family as composite biomaterials. *Polymer testing* [online]. Oxford: Elsevier, 2000, 19(5), 485-492 [cit. 2022-04-24]. ISSN 0142-9418. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9418(99)00011-2
- [38] SHISHATSKAYA, E I, T G VOLOVA, A P PUZYR, O A MOGILNAYA a S N EFREMOV. Tissue response to the implantation of biodegradable polyhydroxyalkanoate sutures. *Journal of materials science. Materials in medicine* [online]. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2004, 15(6), 719-728 [cit. 2022-02-22]. ISSN 0957-4530. Dostupné z: doi:10.1023/B:JMSM.0000030215.49991.0d
- [39] VARDHAN, Harsh, Pooja MITTAL, Sandeep K. Reddy ADENA, Mansi UPADHYAY a Brahmeshwar MISHRA. Development of long-circulating docetaxel loaded poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) nanoparticles: Optimization, pharmacokinetic, cytotoxicity and in vivo assessments. *International journal of biological macromolecules* [online]. Netherlands: Elsevier B.V, 2017, 103, 791-801 [cit. 2022-02-23]. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.05.125
- [40] AMELIA, Tan Suet May, Sharumathiy GOVINDASAMY, Arularasu Muthaliar TAMOTHRAN, Sevakumaran VIGNESWARI a Kesaven BHUBALAN. Applications of PHA in Agriculture. *Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates*. Singapore: Springer Singapore, 2019, s. 347-361. ISBN 9811337586. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-13-3759-8_13
- [41] PHILIP, S, T KESHAVARZ a I ROY. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of chemical technology and biotechnology (1986)* [online]. Chichester, UK: John Wiley, 2007, 82(3), 233-247 [cit. 2022-02-22]. ISSN 0268-2575. Dostupné z: doi:10.1002/jctb.1667
- [42] NCUBE, Lindani Koketso Lindani Koketso, Albert Uchenna Albert Uchenna UDE, Enoch Nifise Enoch Nifise OGUNMUYIWA, Rozli Rozli ZULKIFLI a Isaac Nongwe Isaac Nongwe BEAS. Environmental Impact of Food Packaging Materials: A Review of Contemporary Development from Conventional Plastics to Polylactic Acid Based Materials. *Materials* [online]. MDPI, 2020, 13(21), 4994 [cit. 2022-02-27]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma13214994

- [43] SANI, Mahmood Alizadeh, Maryam AZIZI-LALABADI, Milad TAVASSOLI, Keyhan MOHAMMADI a David Julian MCCLEMENTS. Recent Advances in the Development of Smart and Active Biodegradable Packaging Materials. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* [online]. MDPI, 2021, 11(5), 1331 [cit. 2022-02-27]. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano11051331
- [44] MARRA, Antonella, Clara SILVESTRE, Donatella DURACCIO a Sossio CIMMINO. Polylactic acid/zinc oxide biocomposite films for food packaging application. *International journal of biological macromolecules* [online]. Netherlands: Elsevier B.V, 2016, 88, 254-262 [cit. 2022-02-27]. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.03.039
- [45] SWAROOP, Chetan a Mukul SHUKLA. Nano-magnesium oxide reinforced polylactic acid biofilms for food packaging applications. *International journal of biological macromolecules* [online]. Netherlands: Elsevier B.V, 2018, 113, 729-736 [cit. 2022-02-27]. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.02.156
- [46] QIN, Yuyue, Wenhui LI, Dong LIU, Minglong YUAN a Lin LI. Development of active packaging film made from poly (lactic acid) incorporated essential oil. *Progress in organic coatings* [online]. Elsevier B.V, 2017, 103, 76-82 [cit. 2022-02-27]. ISSN 0300-9440. Dostupné z: doi:10.1016/j.porgcoat.2016.10.017
- [47] ROY, Swarup a Jong-whan RHIM. Preparation of bioactive functional poly(lactic acid)/curcumin composite film for food packaging application. *International journal of biological macromolecules* [online]. Netherlands: Elsevier B.V, 2020, 162, 1780-1789 [cit. 2022-02-27]. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.08.094
- [48] CASTRO-MAYORGA, Jinneth Lorena, Maria Jose FABRA, Luis CABEDO a Jose Maria LAGARON. On the Use of the Electrospinning Coating Technique to Produce Antimicrobial Polyhydroxyalkanoate Materials Containing In Situ-Stabilized Silver Nanoparticles. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* [online]. Switzerland: MDPI, 2016, 7(1), 4 [cit. 2022-02-27]. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano7010004
- [49] SALAMA, Hend E, Gamal R SAAD a Magdy W SABAA. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of biguanidinylated chitosan-g-poly[(R)-3-hydroxybutyrate]. *International journal of biological macromolecules* [online]. Netherlands: Elsevier B.V, 2017, 101, 438-447 [cit. 2022-02-27]. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.03.075
- [50] XAVIER, Janifer Raj, Sudalaimuthu Thangaraj BABUSHA, Johnsy GEORGE a Karna Venkata RAMANA. Material Properties and Antimicrobial Activity of Polyhydroxybutyrate (PHB) Films Incorporated with Vanillin. *Applied biochemistry and biotechnology* [online]. New York: Springer US, 2015, 176(5), 1498-1510 [cit. 2022-02-28]. ISSN 0273-2289. Dostupné z: doi:10.1007/s12010-015-1660-9
- [51] SHARMA, Palak, Arihant AHUJA, Ansari Mohammed DILSAD IZRAYEEL, Pieter SAMYN a Vibhore Kumar RASTOGI. Physicochemical and thermal characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) films

- incorporating thyme essential oil for active packaging of white bread. *Food control* [online]. Elsevier, 2022, 133, 108688 [cit. 2022-02-27]. ISSN 0956-7135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2021.108688
- [52] REQUENA, Raquel, María VARGAS a Amparo CHIRALT. Release kinetics of carvacrol and eugenol from poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV) films for food packaging applications. *European polymer journal* [online]. Elsevier, 2017, 92, 185-193 [cit. 2022-02-27]. ISSN 0014-3057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2017.05.008
- [53] SOLTANI FIROUZ, Mahmoud, Khaled MOHI-ALDEN a Mahmoud OMID. A critical review on intelligent and active packaging in the food industry: Research and development. *Food research international* [online]. Canada: Elsevier, 2021, 141, 110113 [cit. 2022-02-28]. ISSN 0963-9969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2021.110113
- [54] YIN,, Xing, Cheng SUN, Mingyue TIAN a Yuan WANG. Preparation and Characterization of Salicylic Acid/Poly(lactic Acid) Composite Packaging Materials. *Applied Sciences in Graphic Communication and Packaging. Lecture Notes in Electrical Engineering*. 477. Singapore: Springer, Singapore, 2018, s. 811-818 [cit. 2022-05-18]. ISBN 978-981-10-7629-9. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1007/978-981-10-7629-9_100
- [55] SURESH, Kuthuru a Ashwini NANGIA. Curcumin: pharmaceutical solids as a platform to improve solubility and bioavailability. *CrystEngComm* [online]. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2018, 20(24), 3277-3296 [cit. 2022-05-18]. ISSN 1466-8033. Dostupné z: doi:10.1039/C8CE00469B
- [56] SEDLÁČEK, Petr, Iva PERNICOVÁ, Ivana NOVÁČKOVÁ, et al. Introducing the Newly Isolated Bacterium *Aneurinibacillus* sp. H1 as an Auspicious Thermophilic Producer of Various Polyhydroxyalkanoates (PHA) Copolymers-2. Material Study on the Produced Copolymers. *Polymers* [online]. MDPI, 12(6), 1-18 [cit. 2022-05-24]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym12061298

8. ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

8.1 Použité skratky

PHA	polyhydroxyalkanoát
HA	kyselina R-hydroxyalkánová
P(3HB)	poly(3-hydroxybutyrát)
P(3HO)	poly(3-hydroxyoktanoát)
P(4HB)	poly(4-hydroxybutyrát)
P(3HHx)	poly(3-hydroxyhexanoát)
4HB	4-hydroxybutyrát
3HB	3-hydroxybutyrát
3HV	3-hydroxyvalerát
3HHD	3-hydroxyhexadekanoát
3HOD	3-hydroxyoktadekanoát
P(3HB-co-4HB)	poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát)
P(3HB-co-3HV)	poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát)
P(3HB-co-3HHx)	poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyhexanoát)
P(3HHx-co-3HO)	poly(3-hydroxyhexanoát-co-3-hydroxyoktanoát)
UV	ultrafialové
PP	polypropylén
iPP	izotaktický polypropylén
PS	polystyrén
PA	polyamid
PLA	kyselina polymliečna
OTR	oxygen transmission rate
WVTR	water vapor transmission rate
VWP	vater vapor permeability
ZnO	oxid zinočnatý
MgO	oxid horečnatý
OD	optical density
SEC-MALS	size exclusion chromatography with multiple angle light scattering

8.2 Použité symboly

<i>Symbol</i>	<i>Význam symbolu</i>	<i>Jednotka</i>
T_g	teplota skleného prechodu	°C
T_m	teplota topenia	°C
M_w	priemerná molekulová hmotnosť	Da
\mathcal{D}	polydisperzita	-

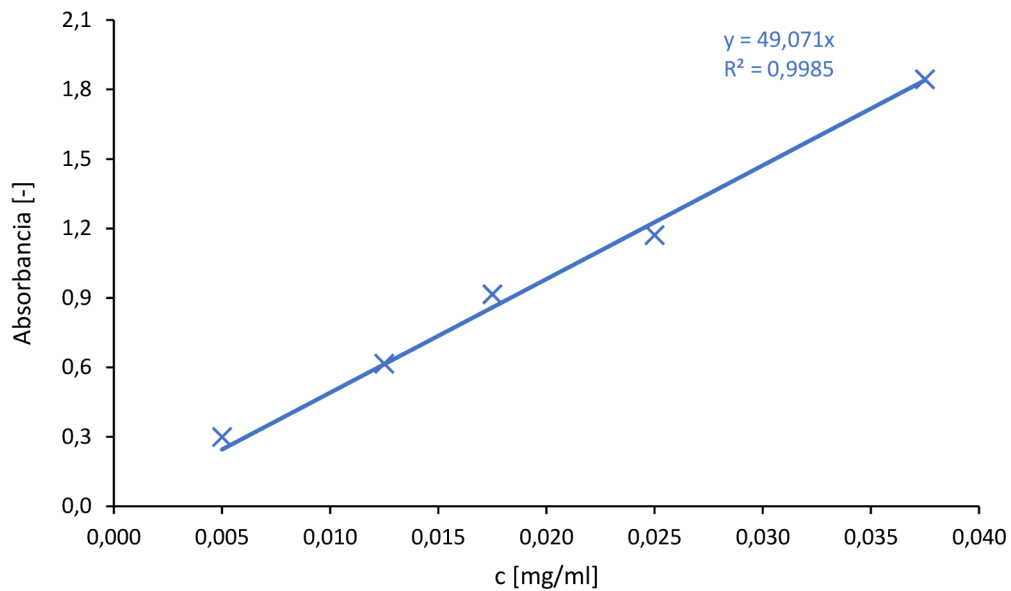
9. ZOZNAM PRÍLOH

Príloha 1: Kalibračná priamka kurkumínu na výpočet koncentrácie

Príloha 2: Kalibračná priamka kyseliny salicylovej na výpočet koncentrácie

10. PRÍLOHY

Príloha 1: Kalibračná priamka kurkumínu na výpočet koncentrácie



Príloha 2: Kalibračná priamka kyseliny salicylovej na výpočet koncentrácie

