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

VZNIK A OSUD MIKROČÁSTIC BIOPLASTŮ V PŘÍRODĚ

THE ORIGIN AND FATE OF BIOPLASTIC MICRO- AND NANO- PARTICLES IN NATURE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE Lada Fusková

AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE doc. Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

SUPERVISOR

BRNO 2025

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ

Zadání bakalářské práce

Číslo práce:	FCH-BAK2056/2024	Akademický rok: 2024/25
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Studentka:	**Lada Fusková**	
Studijní program:	Chemie pro medicínské aplikace	
Studijní obor:	bez specializace	
Vedoucí práce:	**doc. Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**	

Název bakalářské práce:

Vznik a osud mikročástic bioplastů v přírodě

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracovat literární rešerši na téma: i. ekologické a ekonomické dopady využití biodegradabilních polymerů jako náhrady konvenčních syntetických plastů, ii. vznik a osud mikro– a nano– častic z konvenčních a biodegradabilních plastů.
2. Vybrat vhodný soubor polymerů zahrnující zástupce konvenčních syntetických materiálů i jejich relevantních přírodních resp. biodegradabilních syntetických alternativ.
3. Navrhnout a realizovat experiment zaměřený na studium rychlosti uvolňování mikro– a nano– částic mechanických (abiotickým) namáháním vybraných polymerních materiálů ve vodném prostředí. Provést komplexní koloidní charakterizaci záskaných mikro– a nano– částicových disperzí.
4. Navrhnout (případně realizovat) následný experiment, zahrnující vliv biotických mechanismů při vzniku, případně zániku polymerních mikro– a nano– částic.
5. Na základě výsledků literární rešerše a realizovaných experimentů diskutovat ekologická rizika a benefity využití biodegradabilních polymerů jako náhrady perzistentních syntetických polymerů.

Termín odevzdání bakalářské práce: 26.5.2025:

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

Lada Fusková studentka	doc. Ing. Petr Sedláček, Ph.D. vedoucí práce	prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc. vedoucí ústavu

V Brně dne 3.2.2025

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zaměřuje na návrh a provedení experimentu umožňujícího studium vzniku mikro- a nanočástic z biodegradabilních polymerních materiálů ve vodném prostředí. Studované polymery – polyhydroxybutyrát (PHB) a kyselina polymléčná (PLA) – byly vystaveny abiotickému (mechanickému) a biotickému (enzymatickému) namáhání s cílem simulovat podmínky reálné degradace v přírodě. Práce si kladla za cíl vytvořit modelový systém, který by byl schopen reprodukovat uvolňování těchto částic v laboratorních podmínkách a zároveň poskytoval dostatečně charakterizovaný materiál pro další environmentální testování. Navržený experiment zahrnoval přípravu polymerních fólií a jejich vystavení různým degradačním podmínkám s kontrolou pH, enzymatického složení a intenzity třepání. Uvolněné částice byly analyzovány pomocí UV-VIS spektroskopie, dynamického rozptylu světla (DLS) a polymerní folie před a po degradaci byly foceny na skenovacím elektronovém mikroskopu (SEM). Výsledky prokázaly, že i čistě mechanické namáhání vede k významnému uvolnění částic, přičemž jejich velikostní rozložení a koncentrace závisí na typu polymeru, pH prostředí a způsobu zatížení. Enzymatické působení (proteáza a lipáza) pak v některých případech proces výrazně urychlilo. Vyvinutý experiment se ukázal jako efektivní nástroj pro laboratorní produkci disperzí bioplastových mikročástic. Tato práce tak poskytuje základní rámec pro jejich další využití v testech ekotoxicity a přispívá k lepšímu pochopení environmentálního chování biodegradabilních materiálů.

KLÍČOVÁ SLOVA

bioplasty, biodegradabilní polymery, mikroplasty, polyhydroxybutyrát (PHB), kyselina polymléčná (PLA), degradace, DLS, UV-VIS, SEM

ABSTRACT

This bachelor thesis focuses on the design and implementation of an experiment enabling the study of micro- and nanoparticle formation from biodegradable polymeric materials in aqueous environments. The investigated polymers – polyhydroxybutyrate (PHB) and polylactic acid (PLA) – were subjected to abiotic (mechanical) and biotic (enzymatic) stress to simulate realistic degradation conditions found in nature. The aim was to create a model system capable of reproducibly generating such particles under laboratory conditions while also providing sufficiently characterized material for further environmental testing. The proposed experimental setup included the preparation of polymer films and their exposure to various degradation conditions with controlled pH, enzymatic composition, and shaking intensity. The released particles were analyzed using UV-VIS spectroscopy and dynamic light scattering (DLS), while the polymer films before and after degradation were imaged using scanning electron microscopy (SEM). The results demonstrated that even purely mechanical stress led to significant particle release, with their size distribution and concentration depending on the type of polymer, environmental pH, and the applied stress. Enzymatic activity (protease and lipase) further accelerated the process in some cases. The developed experimental method proved to be an effective tool for the laboratory-scale production of bioplastic microparticle dispersions. This work thus provides a foundational framework for their further use in ecotoxicity testing and contributes to a better understanding of the environmental behavior of biodegradable materials.

KEYWORDS

bioplastics, biodegradable polymers, microplastics, polyhydroxybutyrate (PHB), polylactic acid (PLA), degradation, DLS, UV-VIS, SEM

BIBLIOGRAFICKÁ CITACE

FUSKOVÁ, Lada. *Vznik a osud mikročástic bioplastů v přírodě.* Brno, 2025. Dostupné také z: https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/162240. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Sedláček Petr.

PROHLÁŠENÍ

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

Lada Fusková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu práce, doc. Ing. Petru Sedláčkovi, Ph.D., za jeho odborné vedení, cenné rady, připomínky a čas, který mi věnoval při vypracovávání této práce. Dále bych chtěla moc poděkovat Ing. Pavlíně Guziurové za její ochotu, trpělivost a pomoc při měření, za cenné rady, připomínky a všechen čas, který mi věnovala. Velké díky patří i mé rodině a přátelům za podporu během studia.

OBSAH

1 ÚVOD 5
2 TEORETICKÁ ČÁST 6
2.1 Biodegradabilní polyestery 6
2.2 Polyhydroxyalkanoáty 6
2.2.1 Struktura polyhydroxyalkanoátů 7
2.2.2 Vlastnosti polyhydroxyalkanoátů 8
2.2.3 Biosyntéza polyhydroxyalkanoátů 9
2.2.4 Využití polyhydroxyalkanoátů 10
2.2.5 Socioekonomické faktory produkce PHA 11
2.3 Kyselina polymléčná (PLA) 12
2.3.1 Struktura PLA 12
2.3.2 Vlastnosti PLA 12
2.3.3 Syntéza PLA 13
2.3.4 Využití PLA 15
2.4 Degradace 16
2.4.1 Abiotická degradace 16
2.4.2 Biodegradace 17
2.5 Současný stav řešené problematiky 19
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 21
3.1 Cíl práce 21
3.2 Použité chemikálie, materiály a přístroje 21
3.3 Návrh experimentu 22
3.4 Příprava fólií 22
3.5 Simulace mechanického namáhání polymerních fólií 23
3.6 Popis experimentů a časy odběrů 24
3.7 Analýza vzorků 25
3.7.1 Dynamický rozptyl světla (DLS) 25
3.7.2 UV-VIS spektroskopie 25
3.7.3 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) 25
4 DISKUZE A VÝSLEDKY 26
4.1 Pilotní experiment: mechanické namáhání polymerních fólií 26
4.2 Druhý experiment: optimalizace přípravy PHB fólií 28
4.3 Třetí experiment: zkoumání vlivu pH na polymerní fólie 32
4.4 Čtvrtý experiment: optimalizace kvality výstupů DLS analýzy 35
4.5 Pátý experiment: vliv rychlosti třepání na degradaci 38

4.6 Šestý experiment: vliv enzymů (biotická degradace) 42
5 ZÁVĚR 47
6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK 49
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 50
8 Přílohy 58
8.1 Data z prvního experimentu 58
8.2 Data z druhého experimentu 60
8.3 Data z třetího experimentu 61
8.4 Data ze čtvrtého experimentu 62
8.5 Data z pátého experimentu 63
8.6 Data z šestého experimentu 64

1 ÚVOD

Plasty hrají v moderní společnosti klíčovou roli díky své univerzálnosti, nízké ceně a širokým možnostem využití. Díky těmto vlastnostem našly uplatnění ve všech oblastech lidské činnosti od průmyslové výroby, přes zdravotnictví a potravinářství, až po spotřební zboží. Jejich masová produkce a nízká míra recyklace však vedou k závažným ekologickým problémům, zejména v podobě znečištění životního prostředí. Tyto problémy jsou dále umocněny dlouhodobou akumulací mikro- a nanočástic vznikajících jejich degradací, jež mají potenciál negativně ovlivnit ekosystémy i lidské zdraví.

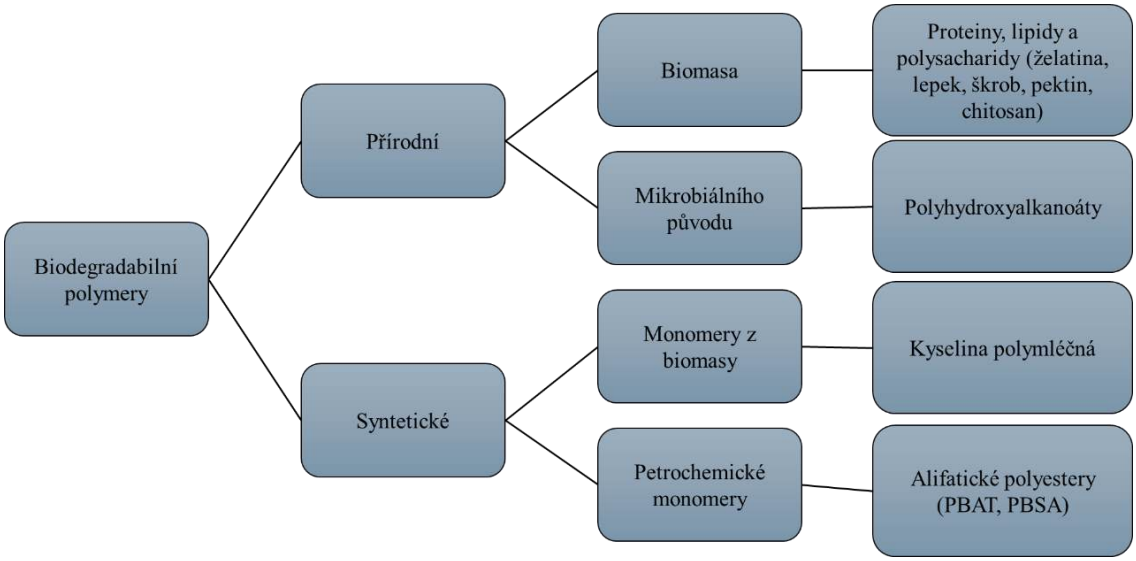
V reakci na tato rizika se vědecká pozornost stále více zaměřuje na biodegradabilní polymery jako potenciální udržitelnou alternativu. Tyto materiály nabízejí možnost snížení environmentální zátěže díky schopnosti rozkládat se za přítomnosti biotických i abiotických faktorů. Navzdory pozitivům je však nutné zkoumat i možné negativní dopady, zejména ve spojitosti s uvolňováním mikro- a nanočástic, které také mohou mít toxické účinky na živé organismy. Problematika má rovněž ekonomický rozměr, protože rozšíření biodegradabilních polymerů vyžaduje nejen technologické inovace, ale také udržitelný model jejich produkce a zahrnutí do současných průmyslových procesů. Z ekonomického hlediska představuje výzvu dosažení konkurenceschopnosti těchto materiálů vůči tradičním plastům, které jsou často levnější díky masové produkci a zavedené výrobní infrastruktuře.

Tato práce se proto zaměřuje na experimentální studium rychlosti uvolňování mikro- a nanočástic z vybraných biodegradabilních polymerních materiálů vlivem mechanického (abiotického) namáhání ve vodném prostředí. Součást je také komplexní koloidní charakterizace získaných disperzí těchto částic a posouzení možného vlivu biotických faktorů na jejich uvolňování. Na základě literární rešerše i provedených experimentů jsou diskutována ekologická rizika i potenciální přínosy využití biodegradabilních polymerů. Výsledky této práce mohou přispět k hlubšímu porozumění chování bioplastů v životním prostředí.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Biodegradabilní polyestery

Biopolymery představují skupinu polymerních materiálů vyráběných z obnovitelných zdrojů [1]. Biodegradabilní polymery jsou naproti tomu polymerní materiály schopné biodegradace, tedy rozkladu působením mikroorganismů, jako jsou bakterie, houby či řasy. Na základě původu se biodegradabilní polymery dělí na přírodní a syntetické, viz Obrázek 1. Přírodní biodegradabilní polymery jsou přirozeně součástí biomasy a zahrnují proteiny, lipidy a polysacharidy (např. škrob a celulóza). Do této skupiny patří také polyhydroxyalkanoáty (PHA) – přírodní polyestery akumulované některými mikroorganismy jako zásobní látky. Syntetické biodegradabilní polymery mohou být vyráběny jak z obnovitelných, tak z fosilních zdrojů. Mezi syntetické biodegradabilní biopolymery patří například polylaktid (PLA), který je vyráběn polymerací kyseliny mléčné získané fermentací sacharidů z rostlinných zdrojů, jako je kukuřice. Syntetické biodegradabilní polymery vyráběné z ropných zdrojů jsou například PBAT (polybutylen-adipát-tereftalát) a PBSA (polybutylen-sukcinát-adipát) [2].



Obrázek 1: Klasifikace biologicky rozložitelných polymerů [2]

Některé tyto materiály jsou považovány za velmi slibnou náhradu konvenčních syntetických polymerů pocházejících z petrochemického průmyslu. Jejich klíčové vlastnosti zahrnují biodegradabilitu a biokompatibilitu, díky čemuž jsou využívány jako environmentálně šetrné materiály, nebo k terapeutickým aplikacím v lidském těle [3]. Dalšími klady jsou nízká uhlíková stopa a obnovitelnost, což jsou hlavními hnacími silami pro jejich vývoj a rozšíření [4].

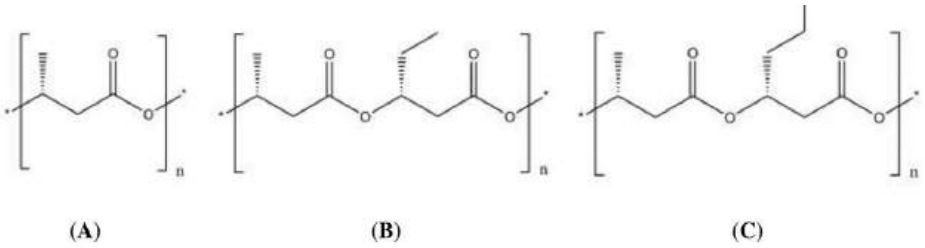
2.2 Polyhydroxyalkanoáty

Mikrobiálně produkované polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou plně biologicky rozložitelné polyestery, které v posledních letech vzbudily značný zájem jako alternativní polymerní materiály, jež lze produkovat z obnovitelných biologických zdrojů a odpadu [5].

2.2.1 Struktura polyhydroxyalkanoátů

Polymery PHA jsou tvořeny 600 až 35 000 monomerními jednotkami (R)-hydroxy mastných kyselin. Tyto monomery ve struktuře obsahují hydroxylovou a karboxylovou funkční skupinu, které při polymerizaci kondenzují za vzniku esterové vazby [3]. Každý z monomerů obvykle obsahuje postranní nasycený alkylový řetězec, ale může to být také rozvětvená, nenasycená nebo substituovaná alkylová skupina, které jsou spíše vzácné [7].

Hydroxylová a karboxylová funkční skupina v PHA umožňují polyesterifikaci – reakci, při níž mezi nimi vznikají esterové vazby. Touto reakcí dochází k tvorbě různě dlouhých polymerních řetězců. Struktura různých druhů PHA se liší podle počtu uhlíkových atomů v jejich monomerech, což zároveň ovlivňuje jejich fyzikální vlastnosti. Podle počtu uhlíkových atomů v monomerech jsou PHA klasifikovány do tří hlavních kategorií: PHA s krátkými řetězci (scl-PHA, 3–5 atomů uhlíku), které mají vysoký stupeň krystalinity, ale jsou křehké. Dále PHA se středními řetězci (mcl-PHA, 6–14 atomů uhlíku), které mají nižší krystalinitu, ale jsou pružnější. Nakonec PHA s dlouhým řetězcem (lcl-PHA, 15 a více atomů uhlíku), které jsou méně časté [3, 5]. Struktura některých uvedených PHA je vyobrazena na Obrázku 2:



Obrázek 2: Struktura (A) Poly(3-hydroxybutyrát) P3HB, (B) Poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) PHBV, (C) Poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyhexanoát) PHBHx [2]

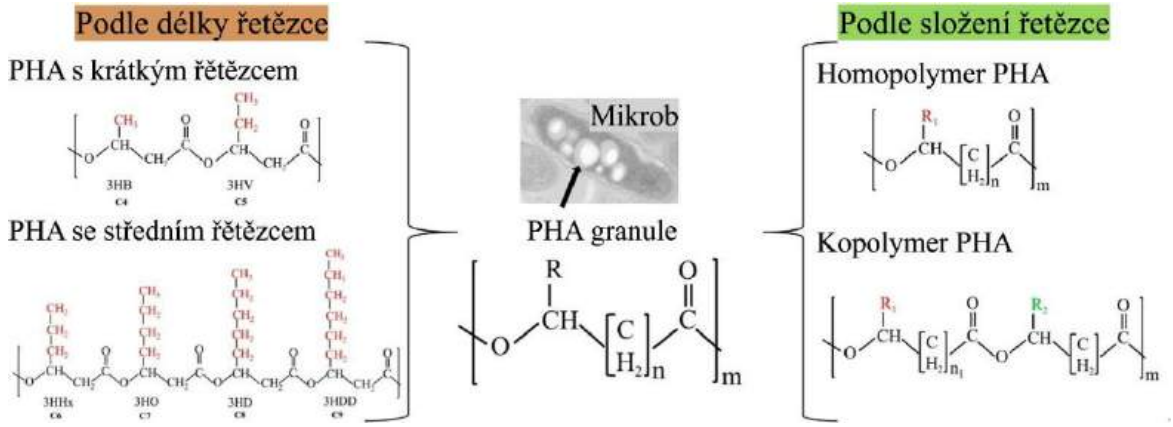
PHA lze také dělit podle složení řetězce na homopolymery, obsahující jeden typ monomeru, a kopolymery, které jsou složeny ze dvou nebo více různých monomerů [2]. Monomerní složení polymerů PHA může být ovlivněno několika faktory, včetně typu organismu produkujícího polymer PHA, zdroje uhlíku, na kterém jsou buňky pěstovány, jak je tento zdroj uhlíku metabolizován v buňkách, typem použitých enzymů dodávajících monomer a typem PHA syntázy použité k syntéze polymeru [7].

Příklady vybraných PHA a jejich rozdělení jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1: Příklady PHA a jejich rozdělení podle typu a délky řetězce [2]

Název PHA	Typ polymeru	Délka řetězce
Poly(3-hydroxybutyrát) P3HB (PHB)	Homopolymer	scl-PHA
Poly(4-hydroxybutyrát) P4HB	Homopolymer	scl-PHA
Poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) PHBV	Kopolymer	scl-PHA
Poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyhexanoát) PHBHx	Kopolymer	Kombinace scl- a mcl-PHA
Poly(hydroxybutyrát-co-hydroxyoctanoát) PHBO	Kopolymer	mcl-PHA
Poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát-co-3-hydroxyhexanoát) P3HB3HV3HHx	Kopolymer	Kombinace scl- a mcl-PHA

Obrázkové schéma rozdělení PHA podle délky a typu řetězce je na Obrázku 3:



Obrázek 3: Schéma rozdělení PHA podle délky a typu řetězce [9]

Tato různorodost v monomerním složení poskytuje PHA jedinečné vlastnosti a umožňuje jejich využití v různých aplikacích [2].

2.2.2 Vlastnosti polyhydroxyalkanoátů

Fyzikální vlastnosti PHA jsou srovnatelné s běžnými ropnými plasty, což z nich činí jejich potenciální alternativy [3]. V Tabulce 2 je srovnání vlastností PHA s krátkými a středně dlouhými řetězci s ropným plastem polypropylenem.

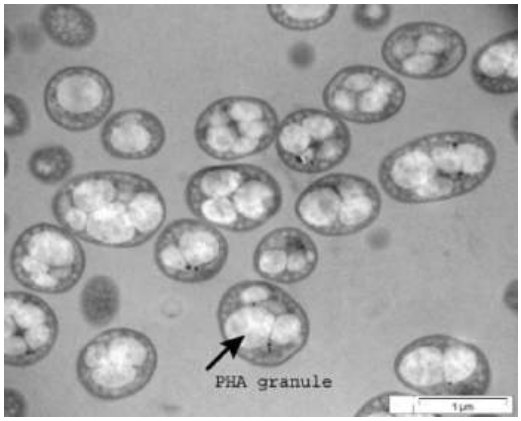
Tabulka 2: Srovnání základních vlastností PHA a polypropylenu [8, 13]

Vlastnost	scl-PHA	mcl-PHA	Polypropylen
Krystalinita [%]	40–80	20–40	70
Teplota tání [°C]	80–180	30–80	176
Hustota [g/cm^3]	1,25	1,05	0,91
Pevnost v tahu [MPa]	5	10	38
Prodloužení při přetržení [%]	40	300	400
Teplota skelného přechodu [°C]	4	-35	-10

Mezi důležité vlastnosti PHA patří termoplasticita a biologická rozložitelnost. Jsou nerozpustné ve vodě a relativně odolné vůči hydrolytické degradaci. Vykazují dobrou stabilitu vůči ultrafialovému záření, ale nízkou odolnost vůči kyselinám a zásadám. Jsou rozpustné v chloroformu a jiných chlorovaných rozpouštědlech. Díky své biokompatibilitě a netoxické povaze jsou mimo jiné vhodné pro lékařské účely. Materiálové vlastnosti PHA se významně liší v závislosti na chemickém složení. Například PHB vykazuje vysokou krystalinitu, což vede k horší zpracovatelnosti ve srovnání s PHA, které obsahují větší podíl amorfních oblastí. U materiálů s vyšším podílem krystalických oblastí se také dá očekávat vyšší tuhost, pevnost, křehkost a teplota tání v porovnání s plně amorfním materiálem. Některé typy aditivovaného PHB mají materiálové vlastnosti podobné polypropylenu (PP) a nabízejí dobrou odolnost vůči vlhkosti a dobré bariérové vlastnosti proti kyslíku a aromatickým látkám [1].

2.2.3 Biosyntéza polyhydroxyalkanoátů

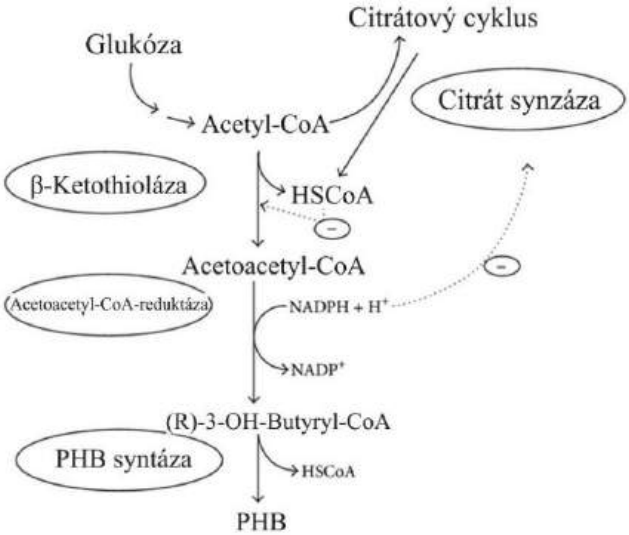
Schopnost produkovat PHA má přibližně 500 mikroorganismů patřících k 90 různým rodům. Jsou intracelulárně syntetizovány ve formě lipofilních cytoplazmatických inkluzí (viz Obrázek 4), které slouží jako zásobárna energie a uhlíku. Jejich syntéza je spuštěna stresovými podmínkami, zejména přebytkem uhlíku při současném omezení jiných esenciálních živin, jako jsou kyslík, fosfor, nebo dusík. PHA se mohou v buňce hromadit ve vysokých koncentracích, aniž by výrazně narušily její osmotickou rovnováhu [6, 13].



Obrázek 4: Pseudomonas putida obsahující PHA granule [29]

2.2.3.1 Biosyntetické dráhy PHA

Mezi hlavní biosyntetické dráhy patří: přímá syntetická dráha, β-oxidační dráha a dráha syntézy mastných kyselin. Přímou syntetickou dráhou jsou mikroorganismy produkovány scl-PHA, přičemž běžnými biosyntetickými bakteriemi jsou *Cupriavidus necator* a *Azotobacter beijerinckii*. Glykolytický produkt, acetyl-CoA, je při této dráze nejprve přeměněn na acetoacetyl-CoA působením enzymu PhaA (*β*-ketothioláza neboli acetyl-CoA acetyltransferáza). Získaný acetoacetyl-CoA je dále přeměněn na (R)-3-hydroxyacyl-CoA enzymem PhaB (acetoacetyl-CoA reduktáza). Nakonec enzym PhaC (PHA-syntáza) katalyzuje přeměnu (R)-3-hydroxyacyl-CoA na scl-PHA [13, 30, 31]. Celkově je tato syntetická dráha nejprozkoumanější a nejkomplexnější, a proto se v průmyslové produkci scl-PHA využívá nejvíce [32]. Přímou syntetickou dráhu můžeme vidět na Obrázku 5.



Obrázek 5: Metabolická dráha syntézy PHB u C. necator [17]

β-oxidační dráha je spojena s metabolismem bakteriálních mastných kyselin a často se vyskytuje při biosyntéze mcl-PHA [33]. Reprezentativní bakterií je *Pseudomonas aeruginosa*. Enzym PhaJ přeměňuje Enoyl-CoA na (R)-3-hydroxyacyl-CoA, který je následně polymerizován na PHA [34, 35].

Třetí biosyntetickou cestou je dráha syntézy mastných kyselin, kterou využívají bakterie rodu *Pseudomonas sp.* Cukry jsou zde přeměněny na 3-ketoacyl-ACP, který je dále transformován na (R)-3-hydroxyacyl-CoA enzymem PhaG a následně polymerizován na mcl-PHA. Některé bakterie, jako *Pseudomonas putida* a *Pseudomonas oleovorans,* mohou syntetizovat mcl-PHA jak β-oxidační dráhou, tak dráhou syntézy mastných kyselin [13].

2.2.3.2 Průmyslová biosyntéza PHA

Polyhydroxyalkanoáty se v průmyslovém měřítku běžně syntetizují prostřednictvím mikrobiálního metabolismu. Mezi hlavní metody patří fermentace divokými kmeny bakterií (*Azotobacter, Pseudomonas, Alcaligenes, Bacillus, Halobacterium* aj.), fermentace geneticky modifikovanými (rekombinantními) bakteriemi, metoda aktivovaného kalu a produkce pomocí transgenních rostlin. Nejčastěji se využívají fermentační postupy, přičemž jako zdroj uhlíku slouží glukóza, fruktóza, kyselina octová nebo rostlinný olej (viz Tabulka 3) [13].

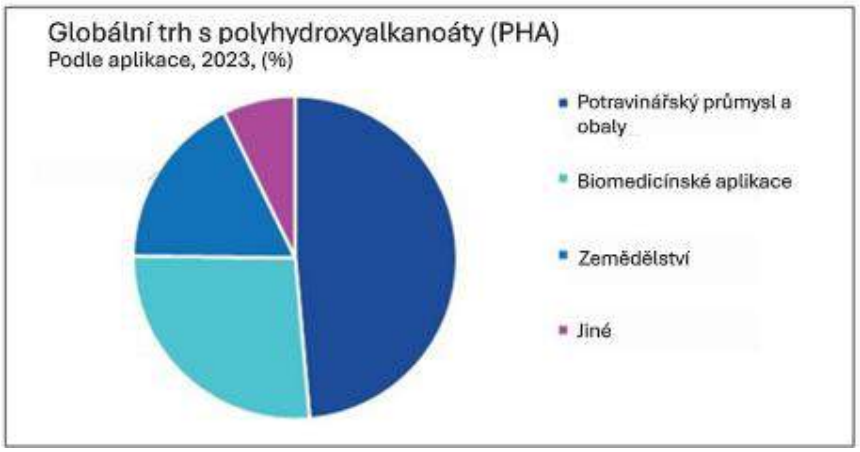
Po dokončení biosyntézy je třeba PHA z buněk izolovat a purifikovat. Proces extrakce zahrnuje narušení buněk, separaci PHA od buněčné hmoty a následnou purifikaci polymeru. Poté následuje úprava polymerních vlastností a konečná výroba plastového granulátu, který je připraven k dalšímu zpracování.

Tabulka 3: Ekonomické zdroje uhlíku při biosyntéze PHA [*13, 34*]

Typ PHA	Kmen	Zdroj uhlíku	Výtěžek PHA [g/l]	Obsah PHA v sušině [% hm.]	Zdroj
PHB	*Caulobacter segnis* DSM 29236	Syrovátka	1,500	31,5	[36]
PHB	*Aeromonas* sp. AC01	Glycerol	0,098	3,6	[37]
mcl-PHA	*Pseudomonas putida* KT2440	Glycerol	1,460	34,5	[38]
PHA	*Bacillus* sp. CFR-67	Kukuřičný škrob	5,900	5,9	[39]
PHA	*Haloferax mediterranei* ATCC33500	Rýžové otruby	77,800	55,6	[40]
PHA	*Cupriavidus necator* NCIMB11599	Rýžové otruby	5,200	97,2	[41]
PHA	*Escherichia coli* XL1-Blue	Rýžové otruby	2,680	90,1	[42]

2.2.4 Využití polyhydroxyalkanoátů

Polyhydroxyalkanoáty vykazují značný biotechnologický potenciál v různých průmyslových odvětvích – v potravinářském průmyslu, zemědělství, odpadovém hospodářství, v medicíně a částečně také v kosmetickém a textilním průmyslu. Přestože jsou v současnosti dražší než tradiční plasty, postupné zefektivňování výrobních procesů otevírá cestu k jejich širšímu uplatnění v průmyslu i běžném životě. Grafické rozdělení využití PHA znázorňuje Obrázek 6.



Obrázek 6: Globální trh s PHA (2023), rozdělení podle využití [67]

V potravinářském průmyslu se PHA používají jako obalové materiály, které přispívají ke zlepšení kvality a prodloužení trvanlivosti potravin [23]. V kombinaci s dalšími příměsmi (např. škrobem, polylaktidem, polykaprolaktonem aj.) vykazují odolnost vůči různým vlivům a oxidačním procesům, což je činí vhodnými pro balení jednorázových potravin, potravin bohatých na tuky, nápojů, zeleniny, pro potahování sýrů i balení výrobků s krátkou dobou spotřeby [24, 25]. Výhodou je také to, že potravinářský průmysl generuje velké množství odpadu (odpadní rostlinné oleje, obilné odpady), který mohou mikroorganismy produkující PHA využít jako levný substrát [26, 27].

V biomedicíně a terapeutických aplikacích se PHA uplatňuje například v tkáňovém inženýrství nebo jako nosiče pro cílené podávání léčiv. Biodegradabilita, biokompatibilita, elasticita a pevnost v tahu z nich činí vhodný implantační materiál, který při degradaci udržuje stabilní pH a je dobře tolerován imunitním systémem [28].

PHA se rovněž využívají v environmentálních aplikacích, např. při odstraňování znečištění z odpadních vod, zpracování aktivovaného kalu, využití potravinového a zemědělského odpadu, případně i jako biopalivo [23].

2.2.5 Socioekonomické faktory produkce PHA

Navzdory mnoha výhodám mikrobiálních plastů oproti konvenčním plastům na bázi ropy zůstávají jejich hlavní nevýhodou vysoké výrobní náklady, zejména kvůli fermentačnímu procesu. Klíčovými faktory ovlivňujícími cenu výroby jsou typ použitého uhlíkového substrátu, provozní náklady fermentace, nízká produktivita procesu, relativně nízká výtěžnost a náročnost následného zpracování [53, 52]. Obsah PHA v buněčné biomase je velmi důležitý pro ekonomiku extrakčního procesu, stejně tak je pro nákladově efektivní produkci důležitý výběr hyperproduktivního mikroorganismu. Například průměrné náklady na produkci PHB při ročním objemu 100 000 tun se liší podle druhu organismu:

- *Alcaligenes latus* – 2,6 USD/kg,
- *E. coli* – 5,37 USD/kg,
- *Methylobacterium organophilum* – 6,69 USD/kg [54].

Ve srovnání s běžnými plasty je produkce PHA finančně náročnější. Cena PHB se pohybuje mezi 1,5– 5 EUR/kg, zatímco cena polypropylenu (PP) činí pouze 0,2–0,4 EUR/kg [55, 56]. Tento rozdíl je způsoben nejen dražšími surovinami, ale i nižším objemem výroby – u PHB se pohybuje mezi 1 000 a 20 000 tun ročně, zatímco u polyethylenu přesahuje 300 000 tun ročně [55, 57].

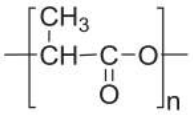
Substrát tvoří obvykle až 50 % celkových nákladů na produkci [58]. Významné úspory lze dosáhnout využitím levných a dostupných odpadních surovin, jako jsou např. syrovátka, pšeničné otruby, melasa nebo použité rostlinné oleje [59].

Navzdory vyšším nákladům je o PHA rostoucí zájem v oblastech, kde jejich biodegradabilita a biokompatibilita přinášejí přidanou hodnotu, zejména v lékařství – např. pro výrobu implantátů a nosičů léčiv [58]. Klíčem ke snížení nákladů je vývoj efektivnějších výrobních a extrakčních metod, využití odpadních substrátů a zavádění koprodukce, kdy se během výroby PHA zároveň získává i jiný cenný produkt [59].

2.3 Kyselina polymléčná (PLA)

Kyselina polymléčná (PLA) je biologicky odbouratelný alifatický polyester, který je syntetizovaný z obnovitelných surovin, jako jsou kukuřičný škrob, brambory nebo cukrová třtina [12]. Patří do skupiny syntetických polyesterů, konkrétně mezi poly(α-hydroxykyseliny). Struktura PLA je znázorněna na Obrázku 7.

Skupina poly(α-hydroxykyselin) patří mezi nejvíce zkoumané polyesterové materiály, zejména díky své biokompatibilitě, biodegradabilitě a laditelným degradačním vlastnostem, což ji činí velmi perspektivní pro biomedicínské aplikace [14].

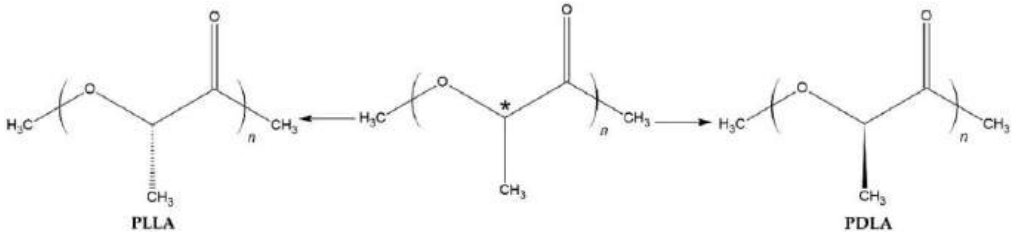


Obrázek 7: Struktura kyseliny polymléčné [*14*]

2.3.1 Struktura PLA

PLA je lineární alifatický polyester, který je tvořen monomery kyseliny mléčné (LA) [15]. Kyselina mléčná, známá také jako 2-hydroxypropanoová kyselina či α-hydroxypropanoová kyselina, je jediným monomerem přítomným v řetězci PLA a lze ji získat buď biotechnologickou fermentací, nebo chemickou syntézou.

Kyselina mléčná existuje ve dvou optických izomerech, L-(+)-kyselina mléčná a D-(-)-kyselina mléčná. Tyto stereoizomery, které mají odlišnou konfiguraci chirálního uhlíku, výrazně ovlivňují vlastnosti výsledného polymeru. Jejich uspořádání je znázorněno na Obrázku 8 [12].



*Obrázek 8: Chirální molekula PLA – uhlík označený * je chirální* (*PDLA: D-laktid; PLLA: L-laktid*) [*14*]

2.3.2 Vlastnosti PLA

Kyselina polymléčná (PLA) je díky své biokompatibilitě, biologické odbouratelnosti, mechanické pevnosti a dobré zpracovatelnosti široce využívána především v biomedicínských aplikacích. PLA vykazuje relativně dobrou pevnost a tuhost, avšak má nízkou rázovou houževnatost a tepelnou odolnost, což limituje její využití v některých procesech.

Jednou z výrazných nevýhod PLA je nízká pevnost taveniny, která komplikuje využitelnost v technologii vytlačovacího vyfukování, často používané v obalovém průmyslu. Pro zlepšení vlastností PLA se často využívá mísení s jinými polymery, což umožňuje zlepšení vlastností bez nutnosti vývoje zcela nových materiálů [22, 48].

Fyzikální, tepelné a mechanické vlastnosti PLA jsou úzce závislé na molekulárním složení, molekulární hmotnosti a stereochemii. V závislosti na těchto parametrech může PLA existovat ve formě amorfní nebo semikrystalické struktury [14]. Polymerizací čistých izomerů laktidu (L-laktidu, resp. D-laktidu) vznikají krystalické polymery s přibližně 40 % krystalinitou. Naproti tomu polymerizace racemické směsi DL-kyseliny mléčné vede ke vzniku amorfních polymerů s nižší mechanickou pevností [21].

PLLA (poly-L-laktid) je opticky aktivní a transparentní polymer s krystalinitou přibližně 37 %, teplotou tání 170–183 °C, teplotou skelného přechodu 55–65 °C a pevností v tahu 45–70 MPa. PDLA (poly-D-laktid) je opticky neaktivní a vykazuje výrazně nižší mechanické vlastnosti [15]. Oba polymery jsou semikrystalické, přičemž míra krystalinity závisí na poměru použitých stereoizomerů. Nejlepších mechanických vlastností je dosaženo při obsahu 95–99 % L-laktidu. Vyšší obsah L-laktidu přispívá k vyšší krystalinitě, což se promítá do vyšší teploty tání i teploty skelného přechodu [48].

Některé fyzikální vlastnosti těchto dvou forem PLA ve srovnání s ropným plastem polypropylenem jsou uvedeny v Tabulce 4.

Tabulka 4: Fyzikální vlastnosti PLA a polypropylenu [*13, 19, 22*]

Vlastnost	PLA	Polypropylen
Krystalinita (%)	PDLA, PLLA: semikrystalický PDLLA: amorfní	50-70
Teplota tání [°C]	145–160	176
Hustota [g.cm^{-3}]	1,25–1,29	0,91
Pevnost v tahu [MPa]	28–50	38
Prodloužení při přetržení (%)	2-6	400
Teplota skelného přechodu [°C]	55-60	-10
Teplota rozkladu [°C]	200	300
Modul pružnosti (GPa)	1,2-3,6	1,5-2

2.3.3 Syntéza PLA

Základní stavební jednotka PLA – kyselina mléčná (LA), je nejčastěji produkován bakteriální fermentací sacharidů. Tento proces může probíhat buď homofermentativní nebo heterofermentativní cestou, v závislosti na zvoleném kmeni rodu *Lactobacillus* [16]. V průmyslové praxi se upřednostňuje homofermentativní fermentace, jelikož poskytuje vyšší výtěžnost LA a nižší množství vedlejších produktů [12].

Velkou výhodou PLA je možnost syntézy z obnovitelných surovin, jako jsou cukrová třtina, brambory nebo kukuřice [18].

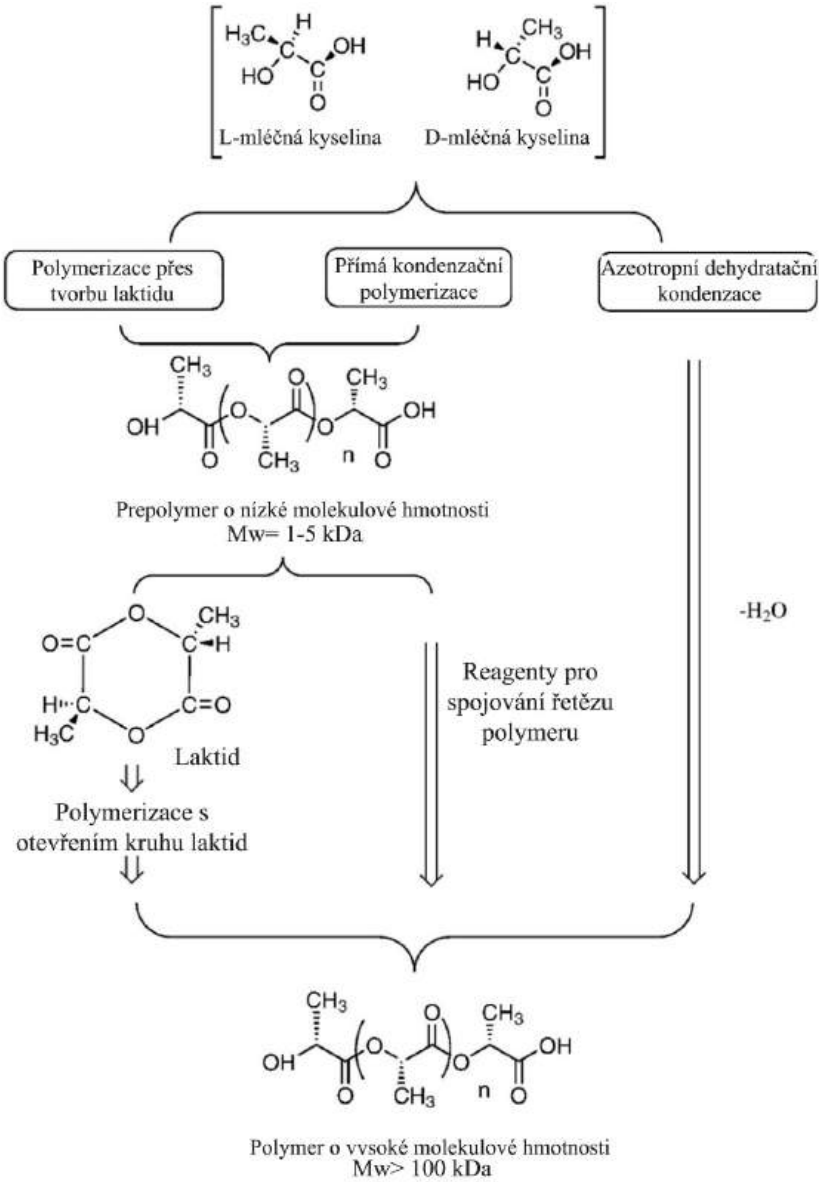
Průmyslová výroba kyseliny mléčné probíhá převážně fermentací spíše než chemickou syntézou. Chemická syntéza trpí řadou nevýhod, mezi které patří nízká výtěžnost, vysoké výrobní náklady a nemožnost selektivní produkce požadovaného stereoizomeru (zejména L-kyseliny mléčné), což je pro výrobu vysoce kvalitní PLA klíčové [19].

Získaná kyselina mléčná se dále používá k výrobě PLA s různou molekulovou hmotností, přičemž PLA s vyšší molekulovou hmotností má větší komerční význam a širší využití [12]. Výroba PLA se realizuje třemi hlavními způsoby:

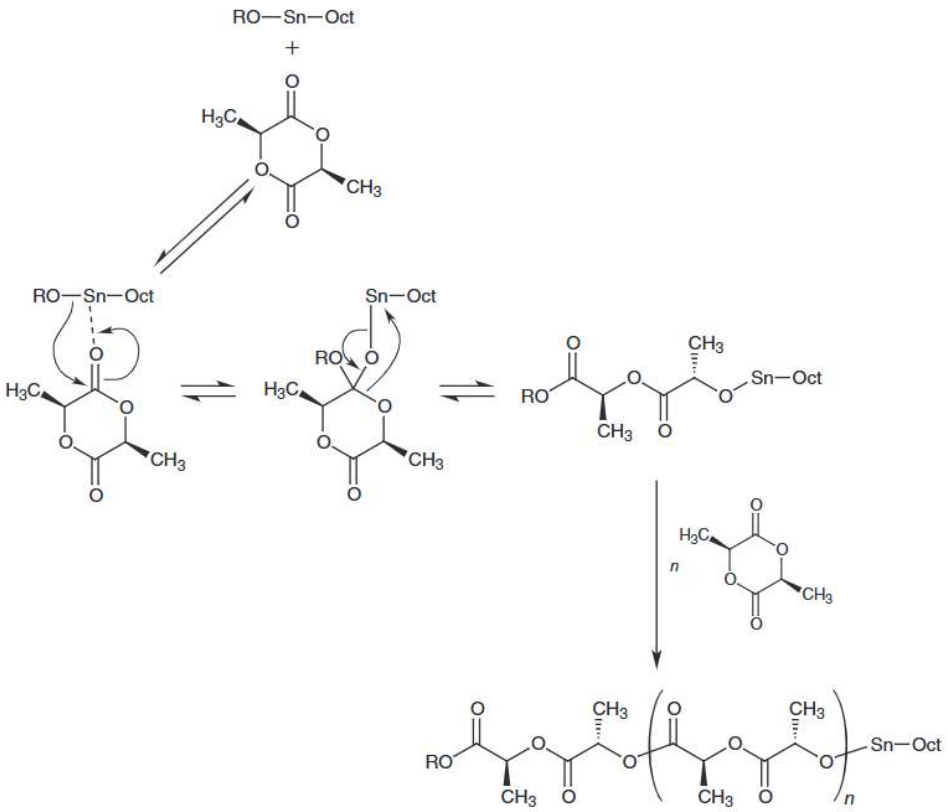
1. přímou kondenzační polymerací kyseliny mléčné,
2. přímou polykondenzací v azeotropním roztoku,
3. polymerací prostřednictvím tvorby laktidu a následným otevřením kruhu (*ring-opening polymerization*, ROP), vyobrazenou na Obrázku 10 [46].

Laktid, cyklický diester kyseliny mléčné, se připravuje z LA za přítomnosti kovových nebo bimetalických katalyzátorů (např. Sn, Zn a Al) nebo organických katalyzátorů ve vhodném rozpouštědle [18]. Metoda ROP je v průmyslu preferována díky vyšší kontrole nad molekulovou hmotností a stereochemií výsledného polymeru [19].

Schéma výrobního procesu PLA je znázorněno na Obrázku 9.



Obrázek 9: Výrobní procesy vedoucí k syntéze PLA s vysokou molekulovou hmotností [46]



Obrázek 10: Mechanismus ring-opening polymerace, kde alkoxidová skupina atakuje karbonylový uhlík, čímž vzniká tetraedrický intermediát. Tento intermediát kolabuje přerušením acylové vazby v kruhové struktuře [44]

Za nejúčinnější a zároveň flexibilní metodu modifikace vlastností PLA je považována kopolymerizace. Přidáním jiných polyesterových řetězců lze snížit krystalinitu a teplotu tání, zatímco mechanické vlastnosti výsledného materiálu lze přizpůsobit širokému spektru aplikací – od pružných a měkkých plastů po pevné a strukturně odolné materiály. Typickým příkladem je poly(ε-kaprolakton-co-laktid) (PCLA), který vzniká kopolymerizací laktidu s ε-kaprolaktamem a nachází uplatnění v biomedicíně díky své elasticitě a biodegradabilitě [20].

2.3.4 Využití PLA

PLA se v oblasti medicíny používá již od 60. let 20. století, především jako materiál pro implantáty a lékařská zařízení. Velkou výhodou PLA je její postupná degradace, což znamená, že implantáty z ní vyrobené není třeba z těla odstraňovat. Konečným degradačním produktem je kyselina mléčná, přirozeně se vyskytující metabolit lidského těla, a tudíž netoxická [12]. Typickými aplikacemi PLA v medicíně jsou podpora růstu tkání, kostní štěpy, systémy pro fixaci zlomenin a dočasné stehy a chirurgické šrouby [65].

V oblasti zemědělství (*plasticulture*) se PLA využívá na výrobu biodegradabilních mulčovacích folií, které chrání půdu a rostliny, potlačují růst plevele a regulují vlhkost půdy. V oblasti textilu má PLA díky své relativně polární povaze schopnost absorbovat vlhkost i organické sloučeniny. To se využívá při výrobě jednorázových hygienických výrobků, jako jsou antibakteriální ubrousky, vodní filtry na bázi PLA směsí nebo jednorázové antimikrobiální kryty na manžety. V automobilovém průmyslu se PLA testuje pro použití v interiérových dílech, jako jsou koberce, obložení dveří nebo čalounění sedadel. Mezi další aplikace PLA patří 3D tisk, výroba cigaretových filtrů, vodou ředitelných barev a třeba i součástek pro vesmírný průzkum [12].

2.4 Degradace

Degradace biopolymerů je komplexní proces, při kterém dochází ke změnám jejich strukturních, chemických a mechanických vlastností, vedoucím až k jejich úplnému rozkladu. Konečnými produkty degradace jsou především voda, oxid uhličitý, metan, anorganické soli, minerály, a také meziprodukty, jako je biomasa nebo huminové kyseliny.

V přirozeném prostředí probíhá degradace za působení celé řady chemických, biologických a fyzikálních faktorů, zejména teploty, vlhkosti, pH prostředí, přítomnosti kyslíku, a především mikrobiální aktivity [22, 49]. Nejefektivněji dochází k rozkladu biopolymerů v prostředí půdy a kompostu, kde je zajištěna vysoká diverzita mikroorganismů schopných enzymatického štěpení polymerních řetězců [49, 51].

Orientační doby degradace vybraných polymerních materiálů jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5: Doba degradace některých polymerů [*14*]

Polymer	Doba degradace	Reference
Polyetylentereftalát (PET)	400 až tisíce let	[60]
Kyselina polymléčná (PLA)	1 týden až 24 měsíců	[61]
Polypropylen (PP)	30 let	[62]
Polystyren (PS)	> 400 let	[63]
Polyhydroxybutyrát (PHB)	1 měsíc až 3 roky	[64]

2.4.1 Abiotická degradace

Abiotická degradace zahrnuje soubor nebiologických procesů, které vedou k narušení a předběžnému rozpadu polymerní struktury, čímž připravují materiál na následnou biologickou degradaci. Tyto mechanismy připravují polymerní strukturu pro účinnější působení mikroorganismů a enzymů. Mezi hlavní mechanismy abiotické degradace patří hydrolytické, termické, mechanické, fotochemické a ozonové působení [10].

U alifatických polyesterů, jako jsou PLA a PHB, je klíčová zejména hydrolytická degradace. Ta probíhá štěpením esterových vazeb reakcí s vodou, což vede k poklesu molární hmotnosti a postupné degradaci materiálu. U PLA je tento proces výrazně urychlen při teplotách nad 55 °C (např. v průmyslovém kompostu). PLA je méně reaktivní než PHB, mimo jiné kvůli přítomnosti methylové skupiny, která stericky brání přístupu vody k esterovým vazbám. PHB je naopak k hydrolytické degradaci náchylnější již při nižších teplotách. Vysoká krystalinita PHB snižuje difuzi vody do struktury materiálu, zatímco amorfní oblasti jsou snadno přístupné a představují počáteční místa rozkladu. Oba polymery se degradují mechanismem bulk eroze, kdy voda difunduje do vnitřní struktury a štěpí polymer zevnitř [10].

Termická degradace nastává při teplotách nad teplotou tání polymeru (PLA přibližně 155 °C a PHB přibližně 175 °C). Ačkoliv nebývá dominantním mechanismem degradace v běžném prostředí, významně se uplatňuje při zpracování materiálu a v průmyslovém kompostování. PHB se přitom rozkládá na 3-hydroxybutyrát, PLA na kyselinu mléčnou [10].

Mechanická degradace, vyvolaná například napětím, smykem či kompresí, přispívá k tvorbě mikrotrhlin, pórů a fragmentů, čímž zvyšuje povrchovou plochu materiálu. Tím se urychluje hydrolytická i biologická degradace, což je zásadní zejména při expozici polymerů náročným podmínkám, jako jsou půda nebo vodní prostředí [10].

Fotodegradace a ozonová degradace vedou k tvorbě volných radikálů a změnám struktury polymeru. Působení atmosférického ozonu vede k oxidaci polymerních řetězců, tvorbě ketonických a karboxylových skupin a ke změnám krystalinity. U PLA lze pozorovat zvýšení krystalinity a drsnosti povrchu, což může mít vliv na lepší adhezi biofilmu a následné zrychlení biologického rozkladu. U PHB zatím existuje méně údajů, ale vzhledem k přítomnosti oxidovatelných skupin lze očekávat obdobné mechanismy [10].

2.4.2 Biodegradace

Biodegradace je mikrobiální proces, při kterém dochází k enzymatickému rozkladu polymerů na jednodušší sloučeniny. Oba biopolymery, PHB i PLA, jsou schopny degradace působením bakterií a hub v půdě, kompostu nebo vodních ekosystémech [70, 71]. Biodegradace může probíhat v aerobních i anaerobních podmínkách, přičemž nevznikají toxické produkty [69].

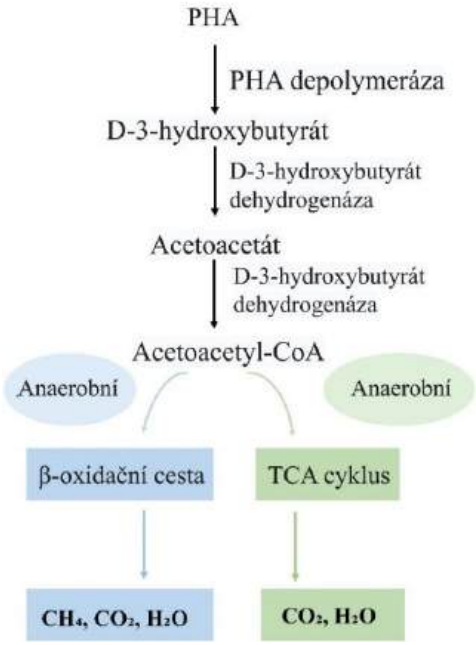
Biodegradace probíhá ve třech krocích:

1. Biodeteriorace – mikroorganismy mění fyzikální strukturu polymeru (např. tvorbou biofilmu, produkcí organických kyselin).
2. Biofragmentace – štěpení polymeru na oligomery a monomery, často pomocí specifických enzymů jako jsou PHA depolymerázy.
3. Asimilace – mikroorganismy využívají fragmenty jako zdroj uhlíku a energie [49, 50].

Obrázek 11: Biologicky odbouratelné láhve z PHA se v půdě rozpadají do 2 měsíců [*47*]

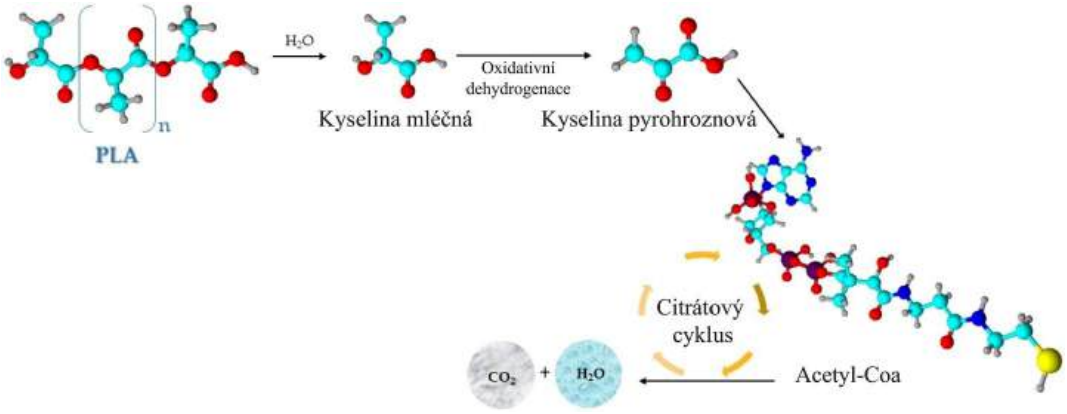
PHB je biodegradován širokou škálou gram-pozitivních i gram-negativních mikroorganismů [72]. Byly identifikovány druhy degradující PHB v půdě (např. *Pseudomonas lemoigne*, *Comamonas sp.*, *Acidovorax faecalis*, *Aspergillus fumigatus* a *Variovorax paradoxus*), v aktivovaném kalu (např. *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas*, *Illyobacter delafieldi*) i ve vodních prostředích (např. *Comamonas testosteronii*, *Pseudomonas stutzeri*) [74]. Podíl těchto mikroorganismů v prostředí se odhaduje na 0,5– 9,6 % z celkového počtu kolonií [73]. Většina z nich je aktivní při pokojových nebo mezofilních teplotách. Kompostování při vyšších teplotách patří mezi nejperspektivnější technologie recyklace biodegradovatelných plastů, protože termofilní mikroorganismy jsou schopny degradovat polymery mnohem rychleji [75]. Například kmen termotolerantního *Aspergillus* dokázal degradovat 90 % PHB fólie během pěti dnů při 50 °C [76].

Degradace PHA může probíhat aerobně za vzniku CO_2 a vody nebo anaerobně za vzniku CO_2 a metanu. Předpokládaná dráha degradace PHA je znázorněna na Obrázku 12.



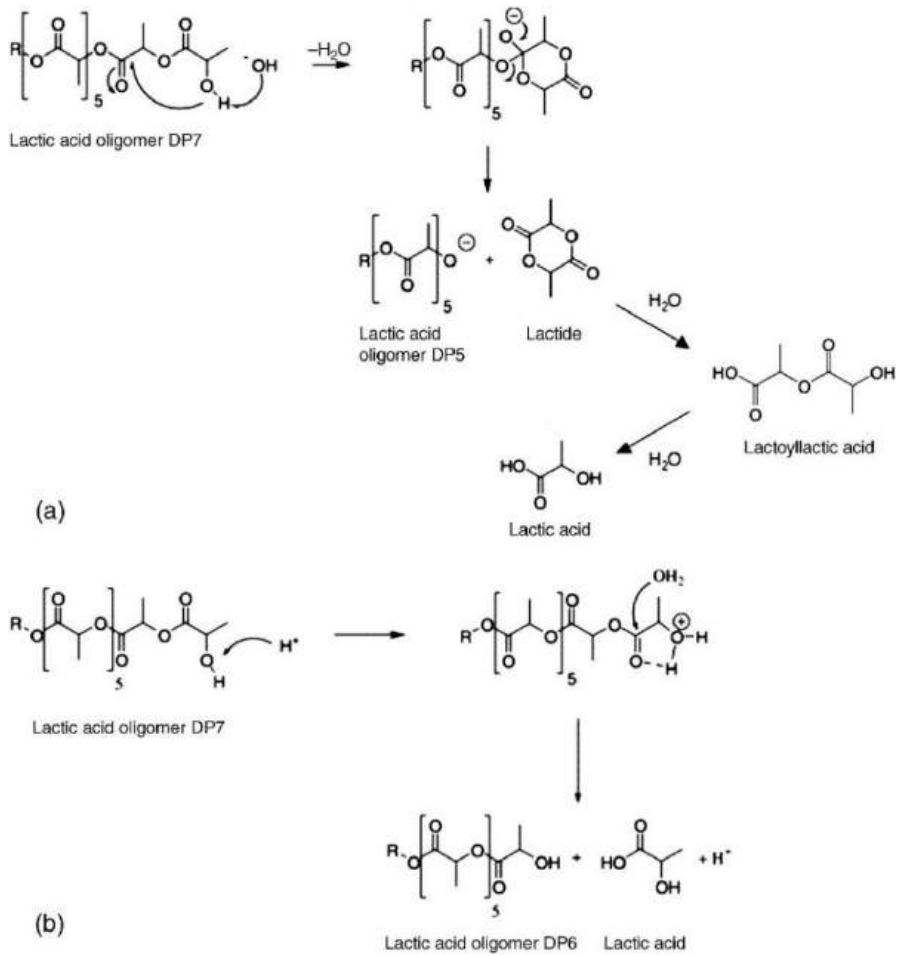
Obrázek 12: Extracelulární degradace PHA za anaerobních a aerobních podmínek [9]

U PLA je degradace pomalejší, zejména při nízkých teplotách, což je způsobeno jeho vyšší krystalinitou a sterickým efektem methylové skupiny. V přírodním prostředí dochází spíše k neenzymatické hydrolýze na kyselinu mléčnou, kterou pak mikroorganismy dále zpracovávají. Optimální podmínky pro biodegradaci PLA jsou teplota kolem 60 °C a vlhkost nad 90 %. Za těchto podmínek se PLA rozkládá během 10 až 12 týdnů [78]. Při kompostování se PLA rozkládá působením mikroorganismů ve vlhkém prostředí za vzniku biomasy a oxidu uhličitého. K degradaci PLA dochází na jeho základní monomer, kyselinu mléčnou. LA je vedlejším produktem metabolismu, k její degradaci dochází neenzymatickou hydrolýzou, viz Obrázek 13 [14, 79, 80].



Obrázek 13: Metabolická dráha degradace PLA [86]

Na rychlost degradace PLA má významný vliv i pH prostředí. V silně kyselém nebo zásaditém prostředí dochází k rychlejšímu hydrolytickému štěpení polymerních řetězců, neboť reakce jsou katalyzovány hydroniovými nebo hydroxidovými ionty (viz Obrázek 14) [12]. Například při použití PLA pro balení citrusových nápojů (pH < 4) dochází k hydrolytickému štěpení řetězců od jejich konců [68]. V případě kontaktu PLA s ethanolem (např. u obalů na alkoholické nápoje) dochází ke změkčení matrice a zvýšení mobility řetězců, což podporuje tzv. *solvent-induced crystallizati*on (SIC) [77].



Obrázek 14: Mechanismy hydrolytického štěpení řetězce PLA v alkalických (*a*) *a kyselých* (*b*) *médiích* [*68*]

2.5 Současný stav řešené problematiky

V reakci na rostoucí znečištění planety syntetickými polymery se vědecká komunita i průmysl zaměřují na hledání ekologických alternativ. Jednou z nich jsou právě bioplasty, které se za určitých podmínek mohou zcela rozložit a nezanechávat trvalé ekologické dopady. Nicméně se objevují studie, které upozorňují na potenciální rizika spojená s jejich použitím.

Například GONZÁLEZ-PLEITER zjistili, že i biologicky rozložitelné polymery během degradace produkují mikro- a nanočástice, které mohou mít obdobné negativní dopady jako tradiční plasty. Ve studii autoři zkoumali vliv sekundárních nanoplastů polyhydroxybutyrátu (PHB) na tři reprezentativní organismy sladkovodních ekosystémů. Bylo zjištěno, že při expozici nanoplastům došlo k významnému poklesu buněčného růstu a změně fyziologických parametrů těchto organismů [81].

URIBE se zaměřili na toxické účinky bioplastů na mořské organismy. Ve studii hodnotili vliv polyhydroxybutyrátu (PHB), polymléčné kyseliny (PLA) a směsi PLA/PHA v porovnání s polyvinylchloridovou (PVC) hračkou na larvy mořského ježka *Paracentrotus lividus*. Zatímco hračka z PVC byla nejtoxičtější (pravděpodobně kvůli přidaným změkčovadlům), PHB vykazoval neočekávanou mírnou toxicitu, což autoři přisuzují přísadám detekovaným metodou plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC-MS). Naopak PLA kelímky a PLA/PHA filamenty byly pro larvy neškodné, což podporuje jejich použití jako ekologické alternativy [85].

Další studie (SINTIM) kvantifikovala degradaci biologicky rozložitelných plastových mulčovacích folií v kompostu a v půdě různých klimatických oblastí (Tennessee a Washington). Zjistilo se, že biologicky rozložitelné mulče se v kompostu rozkládají rychleji (85-99 % za 18 týdnů) než v půdě (26-83 % po 36 měsících v závislosti na lokalitě). Tyto výsledky naznačují, že podmínky prostředí mohou hrát klíčovou roli v degradaci bioplastů [82].

SERRANO-RUÍZ testovali ekotoxicitu extraktů z biologicky odbouratelných mulčovacích folií obsahujících PBAT, PLA, PHB a obilnou mouku na zemědělské plodiny (salát *Lactuca sativa L.* a rajče *Lycopersicon esculentum Mill.*). Studie ukázala, že některé vzorky negativně ovlivňovaly klíčení, růst kořenů a nadzemní vývoj rostlin, což poukazuje na možné riziko pro půdní ekosystémy [83].

ZIMMERMANN zkoumal in vitro toxicitu 43 spotřebních výrobků a surovin, včetně 27 bioplastů (PLA, PHA, PBS, PBAT) a přírodních materiálů (celulóza, škrob, bambus). V testu Microtox (test akutní toxicity využívající bioluminiscenční bakterie) se bioplastové vzorky ukázaly jako podobně toxické jako konvenční plasty. Navíc v testu AREc32, zkoumajícím reakci na oxidační stres, 42 % vzorků aktivovalo dráhu Nrf2/ARE (signální dráha regulující ochrannou reakci buněk na oxidační stres), přičemž Bio-PET2 a PLA vykazovaly nejsilnější účinek. Testy hormonální aktivity odhalily, že PLA byl jediný materiál aktivující lidský estrogenový receptor α, což může naznačovat potenciál pro hormonálně narušující účinky [84].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Cíl práce

Cílem této práce je realizace experimentu zaměřeného na studium rychlosti uvolňování mikro- a nanočástic z vybraných biopolymerních materiálů vlivem mechanického (abiotického) namáháním ve vodném prostředí. Součástí je také komplexní koloidní charakterizace získaných disperzí těchto částic. Na základně literární rešerše a provedených experimentů jsou dále diskutována ekologická rizika i přínosy využití biodegradabilních polymerů jako alternativy k perzistentním ropným plastům.

3.2 Použité chemikálie, materiály a přístroje

Seznam chemikálií a materiálů použitých v experimentech je uveden v Tabulce 6.

Tabulka 6: Použité chemikálie a materiály

Látka	**Výrobce**
Běžné laboratorní sklo a vybavení	-
Skleněné kuličky, průměr 1 mm	-
Chloroform	Lach-ner, s. r. o.
Azid sodný	PENTA s.r.o.
PLA semikrystalické granule	NatureWorks LLC
PLA amorfní granule	NatureWorks LLC
PHB prášek	Ningbo Tianan Biologic Material Co., Ltd
Hydroxid sodný	Lach-ner, s. r. o.
Kyselina chlorovodíková	Lach-ner, s. r. o.
Lipáza z *Rhizopus oryzae*	Sigma-Aldrich
Proteáza z *Bacillus licheniformis*	Sigma-Aldrich
Kyvety skleněné PCS 1115	Starna Scientific Ltd
Kyvety křemenné	Hellma Analytics
Stříkačkové filtry CHS, 0,45 µm Nylon	Chromservis s.r.o.

Všechny použité chemikálie byly v analytické čistotě (p.a.) nebo vyšší.

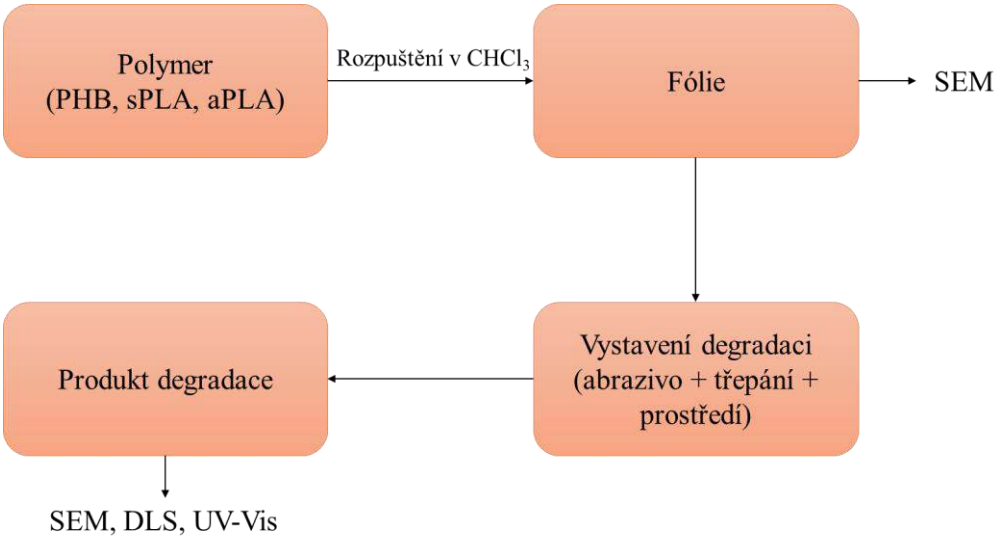
Použité přístroje jsou uvedeny v Tabulce 7.

Tabulka 7: Použité přístroje

Přístroj	Výrobce
Automatický aplikátor	TQC Sheen
Magnetická míchačka bez ohřevu MMS-3000	Biosan SIA
Třepačka termostatovaná KS 4000 i control	IKA – werke GmbH and co. KG
Třepačka digitální, orbitální SHO-2D	Witeg Labortechnik GmbH
Zetasizer ULTRA	Malvern Panalytical
Zetasizer NANO ZS	Malvern Panalytical
Nanofotometr PEARL	IMPLEN
Spektrofotometr U-3900H	HITACHI
Skenovací elektronový mikroskop EVO LS 10	ZEISS
Analytické váhy PA224C	Pioneer
Váha EW 620-3NM	Kern and Sohn GmbH
pH metr pH 50 DHS kompl. s pH sondou	Chemflex
Centrifuga EBA 200	Hettich

3.3 Návrh experimentu

Cílem experimentu bylo simulovat mechanickou abiotickou degradaci polymerních materiálů ve vodném prostředí, ke které běžně dochází v přírodě. Degradace je zde indukována abrazivními částicemi při stálém třepání, což by mělo vést k uvolňování mikro- a nanočástic z povrchu polymerních fólií. Vzniklé produkty degradace, tedy částice uvolněné do vodného roztoku a zdegradované fólie, jsou následně analyzovány pomocí metod UV-VIS spektroskopie, měřením dynamického rozptylu světla (DLS) na přístroji Zetasizer a zároveň bude provedena analýza folií před a po abiotickém namáhání na skenovacím elektronovém mikroskopu SEM. Schéma experimentu je vidět na Obrázku 15.

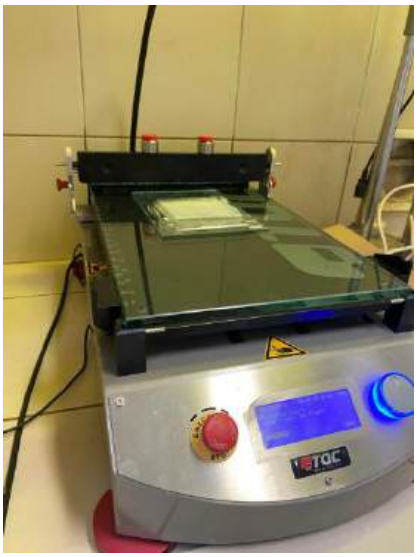


Obrázek 15: Schéma experimentu

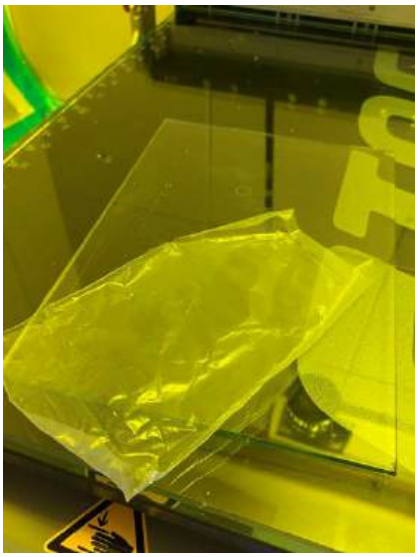
3.4 Příprava fólií

Pro experiment byly zvoleny tři typy polymerních materiálů: PHB a PLA v semikrystalické (sPLA) a amorfní (aPLA) formě. Z polymerů byly připraveny polymerní roztoky (5 hm.%) rozpuštěním přesného množství polymeru v chloroformu za stálého míchání na magnetické míchačce.

Fólie z PHB byly připraveny postupným nanášením vrstev polymerního roztoku pomocí automatického aplikátoru. Každá fólie byla tvořena dvěma vrstvami nanesenými v opačném směru. Po vysušení byly fólie vystřiženy do tvaru odpovídajícího dnu Petriho misek či Erlenmeyerových baněk.



Obrázek 16: Příprava PHB fólií pomocí TQC Sheen automatického aplikátoru



Obrázek 17: PHB fólie připravená pomocí automatického aplikátoru

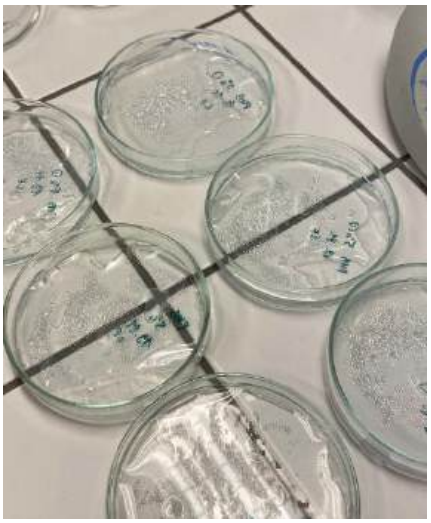
PLA fólie byly připraveny přímým pipetováním 2x 8ml polymerního roztoku do Petriho misek či Erlenmeyerových baněk, kde došlo k volnému odpaření rozpouštědla a vytvoření souvislé vrstvy.

Obrázek 18: PHB fólie v Petriho misce

Obrázek 19: PLA fólie v Petriho misce

3.5 Simulace mechanického namáhání polymerních fólií

Do nádob s fóliemi byl přidán 1 ml roztoku azidu sodného (0,3 g/l) pro prevenci mikrobiální kontaminace, 20 ml destilované vody (nebo roztoků s upraveným pH/ enzymem) a skleněné kuličky o průměru 1 mm, které sloužily jako abrazivo. Nádoby byly utěsněny parafilmem a umístěny na třepačku, kde probíhalo mechanické namáhání.



Obrázek 20: Vzorky pro test mechanického namáhání (fólie ve vodném prostředí s přídavkem azidu a abraziva)

Obrázek 21: Průběh testu mechanického namáhání

3.6 Popis experimentů a časy odběrů

Roztoky z nádob byly po definovaném čase třepání odebrány a analyzovány. Bylo provedeno celkem šest experimentů, jejichž podrobnosti uvádí Tabulka 8.

Tabulka 8: Popis experimentů

Experiment	Cíl	Časy odběru [hod.]	Modifikace
1	Pilotní test – ověření použitelnosti	24, 48 a 96	Fólie v Petriho miskách, třepání 100 rpm
2	Optimalizace přípravy PHB fólií	96, 168 a 336	PHB roztok pipetován přímo do misek
3	Abiotická degradace - vliv pH	PLA: 24, 48 a 120; PHB: 24, 48, 72 a 96	Roztoky o pH 2, 4, 9 a 12 místo vody
4	Optimalizace kvality výstupů DLS analýzy	48, 96, 168 a 216	Vzorky před DLS filtrovány, centrifugovány a ředěny
5	Abiotická degradace - vliv rychlosti třepání	24, 48, 72, 168 a 216	Fólie v Erlenmeyerových baňkách, třepání ve dvou rychlostech (100 a 150 rpm)
6	Biotická degradace - vliv enzymů	24, 48, 96 a 216	Fólie v Erlenmeyerových baňkách, třepání při150 rpm v enzymatickém roztoku (proteáza, lipáza)

Byly provedeny také kontrolní experimenty zahrnující pouze Petriho misky s destilovanou vodou a různým množstvím abraziva (1 g a 3 g) pro posouzení vlivu samotného abraziva na naměřené hodnoty. Zároveň byly pro kontrolu analyzovány původní roztoky pH a enzymů.

3.7 Analýza vzorků

Komplexní koloidní charakterizace získaných mikro- a nanočásticových disperzí byla provedena pomocí UV-VIS spektroskopie a měřením dynamického rozptylu světla (DLS) na přístroji Zetasizer. Byla také provedena analýza fólií před a po degradaci na skenovacím elektronovém mikroskopu SEM.

3.7.1 Dynamický rozptyl světla (DLS)

Dynamický rozptyl světla (DLS) byl použit k určení distribuce a průměrných hodnot velikosti částic uvolněných z polymerních fólií do vodného prostředí. Tato technika umožňuje měření hydrodynamického průměru částic na základě analýzy jejich Brownova pohybu.

Před analýzou byly vzorky důkladně homogenizovány a v případě potřeby filtrovány pro odstranění velkých agregátů, které by znemožňovaly DLS analýzu. Měření probíhalo při teplotě 25 °C s využitím laseru o vlnové délce 633 nm. Detekce rozptýleného světla byla prováděna pod úhlem 173°, což umožnilo citlivou analýzu nanočástic. Každý vzorek byl měřen dvanáctkrát ve třech opakováních, jedno měření trvalo 10 sekund. Výsledná data byla vyhodnocena pomocí kumulantní analýzy k určení střední velikosti částic.

3.7.2 UV-VIS spektroskopie

UV-VIS spektroskopie byla použita k analýze optických vlastností vzorků a k nepřímému zhodnocení koncentrace částic uvolněných do roztoku na základě posouzení jeho zákalu. Tato metoda umožnila sledování absorpčních charakteristik polymerních částic v závislosti na vlnové délce dopadajícího světla.

Bylo provedeno měření zdánlivé absorbance vzorků na UV-VIS spektrofotometru celého spektra, tedy v rozsahu vlnových délek 200–900 nm, při rychlosti 600 nm/min. Pro každé měření byla použita křemenná kyveta s optickou drahou 10 mm. Jako slepý vzorek byla použita destilovaná voda.

3.7.3 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) byla použita k detailnímu zkoumání povrchové morfologie polymerních folií. Tato analytická technika umožnila pozorování změn povrchové struktury filmu v důsledku mechanického namáhání.

Před analýzou byly vzorky povrchově upraveny tak, aby byla zajištěna jejich vodivost, což zahrnovalo jejich rozlomení na menší části a následné pokrytí vrstvou zlata ve vakuovém prostředí. Zobrazování bylo umožněno emisí elektronů z wolframového vlákna pracujícího při napětí 5 kV.

Snímky byly pořízeny při zvětšeních 5 000×, 2 000×, 1 000×, 500× a 100× pro komplexní vizualizaci a analýzu.

4 DISKUZE A VÝSLEDKY

Tato kapitola shrnuje výsledky šesti navazujících experimentů, jejichž společným cílem bylo nalézt optimální metodu pro zkoumání, zda a jakým způsobem dochází k uvolňování částic z biodegradabilních polymerních materiálů (PLA a PHB) za různých podmínek. Jednotlivé experimenty se lišily typem zatížení – mechanickým, chemickým i enzymatickým – a byly navrženy tak, aby docházelo k postupnému zpřesnění a ověření výsledků.

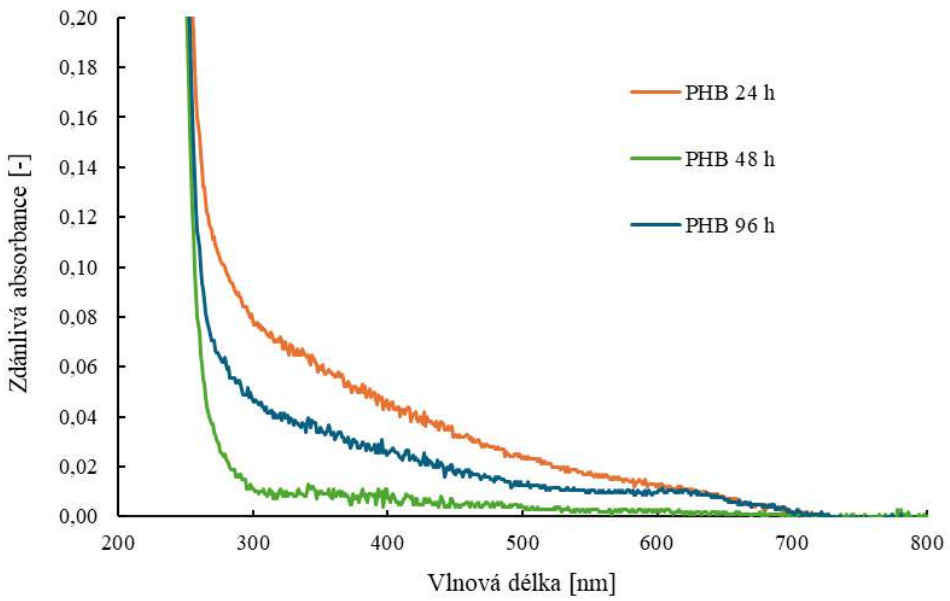
4.1 Pilotní experiment: mechanické namáhání polymerních fólií

Cílem prvního experimentu bylo ověřit, zda již při jednoduchém mechanickém abiotickém namáhání (třením abraziva o povrch polymerní fólie) dochází k uvolňování částic do vodného prostředí, a tedy zda samotný mechanický kontakt stačí ke vzniku zákalu, který by mohl indukovat přítomnost uvolněných částic. Cílem navržené a testované metody není pouze poskytnout základní charakteristiky uvolněných částic tak, jak se na to experimentálně zaměřuje tato práce. Motivací práce bylo vyvinout metodu, která by zároveň mohla v budoucnu sloužit k produkci disperzí mikro-, příp. nanočástic použitých biodegradabilních polymerů pro studium jejich ekologických dopadů při aplikaci na různé modelové ekosystémy.

Již vizuální pozorování některých vzorků polymerů (viz Obrázek 22) ukázalo, že k uvolňování částic skutečně dochází, a to i bez dalšího chemického nebo biologického působení. Tento výsledek potvrzuje základní předpoklad práce – že i čistě abiotické mechanické působení může vést ke vzniku částic z biodegradabilních polymerů, které je následně možné kvantifikovat a charakterizovat.

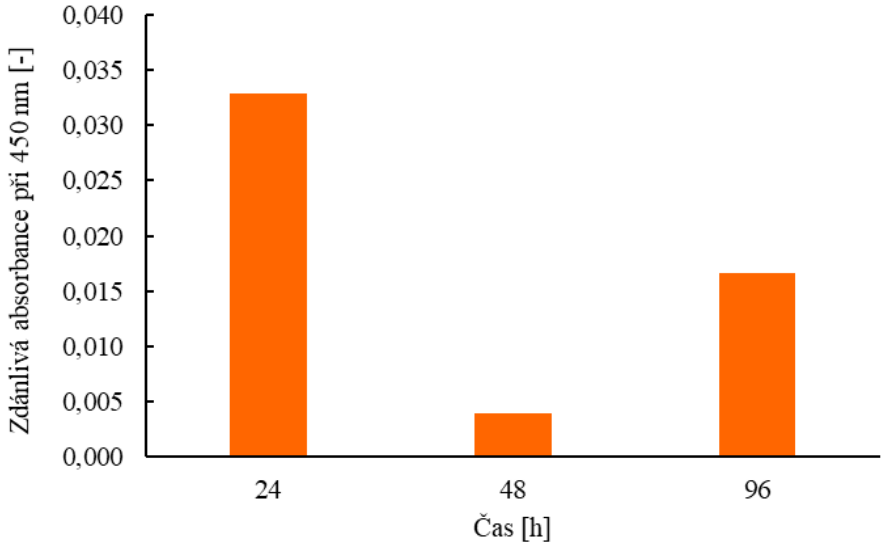
Obrázek 22: Viditelný zákal vzorku získaného po 96 hodinách mechanického namáhání PHB fólie

Pomocí UV-VIS spektroskopie bylo naměřeno postupné zvyšování zdánlivé absorbance zejména v oblasti 600–300 nm, které je typickým důsledkem přítomnosti nerozpuštěných částic ve vodném roztoku, jak je vidět u PHB v Grafu 1. Absorpční spektra pro PLA jsou v příloze 8.1.



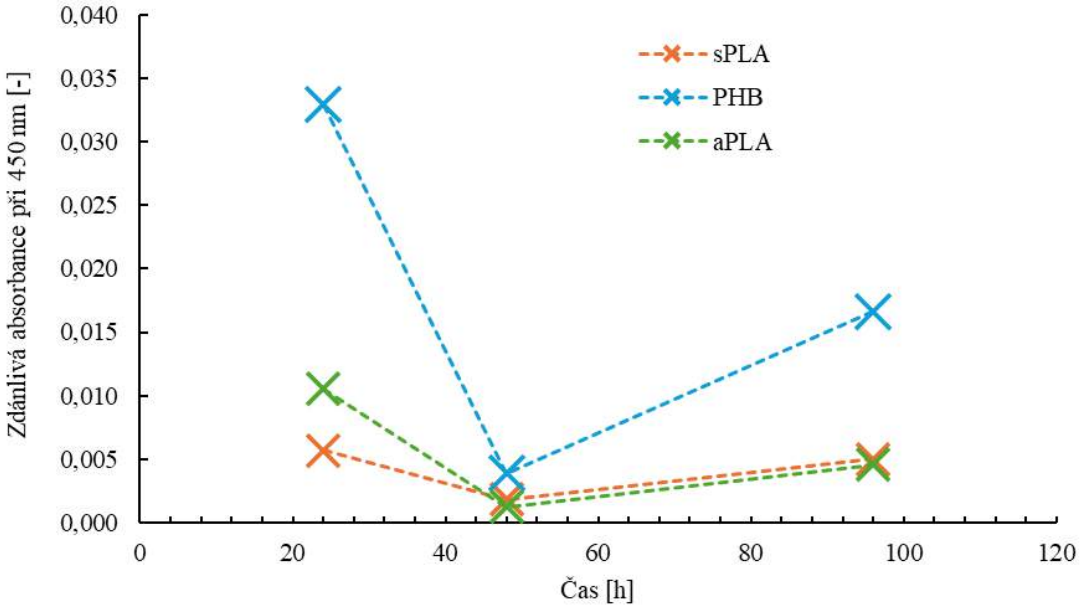
Graf 1: Absorpční spektrum vzorků vody po mechanickém namáhání PHB fólie v rámci pilotního experimentu

Při zobrazení časového vývoje hodnot zdánlivé absorbance při vlnové délce 450 nm ve formě sloupcového grafu (viz Graf 2) lze pozorovat, že pro u vzorků PHB nastává nejvyšší zákal po 24 hodinách namáhání. Poté hodnota ve 48 hodinách klesá, po 96 hodinách však opět stoupá. Pokles zákalu ve 48 hodinách může být způsoben sedimentací větších částic, případně agregátů, na dno kyvety. Grafy charakterizující zákal roztoků po namáhání ostatních materiálů jsou v příloze 8.1.



Graf 2: Vývoj zdánlivé absorbance při 450 nm vzorků vody po mechanickém namáhání PHB fólie

Míra zdánlivé absorbance při 450 nm se lišila v závislosti na typu polymeru (Graf 3). Ani jeden z typů PLA nevykazoval výrazný nárůst zdánlivé absorbance ve 24 hodinách a zároveň hodnoty po prvotním uvolnění během 24 hodin zůstaly v čase relativně konstantní. Naproti tomu PHB vykazovalo výrazně vyšší zákal na začátku, ten ale vlivem sedimentace větších částic rychle klesl. To by mohlo naznačovat odlišnou odolnost vůči mechanickému namáhání, případně vypovídat o rozdílné tloušťce polymerních fólií.



Graf 3: Vývoj zdánlivé absorbance při 450 nm vzorků vody po mechanickém namáhání všech materiálů

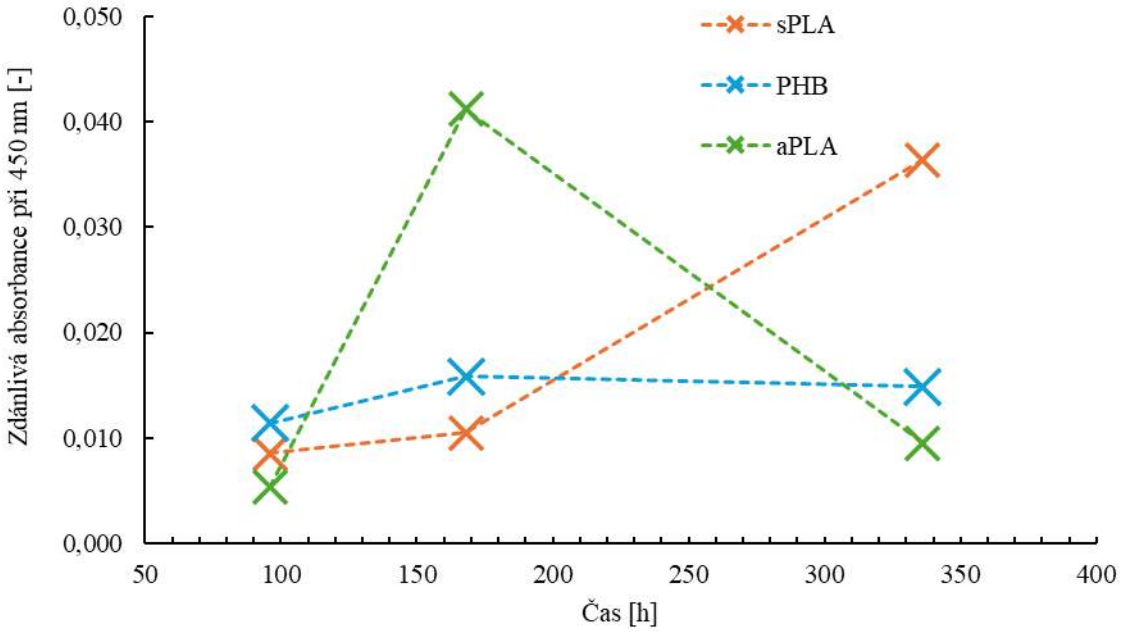
Na základě výsledků tohoto experimentu lze konstatovat, že samotné mechanické tření abraziva o polymerní folii vede k uvolňování částic. Tento jev lze detekovat nejen vizuálně, ale také kvantifikovat pomocí měření zákalu na UV-VIS spektrofotometru. Pozorování potvrzuje smysluplnost navrženého přístupu a poskytuje výchozí bod pro podrobnější analýzy v následujících experimentech.

4.2 Druhý experiment: optimalizace přípravy PHB fólií

V rámci snahy o sjednocení tloušťky fólií proběhl experiment, ve kterém byl polymerní roztok PHB pipetován přímo do Petriho misek, stejně jako v případě PLA. Tento způsob přípravy vedl ke zkroucení PHB fólií, jak je patrné z Obrázku 23. Současně bylo cílem experimentu sledování chování zákalu při delších časech degradace.

Obrázek 23: PHB fólie připravené pipetováním polymerního roztoku

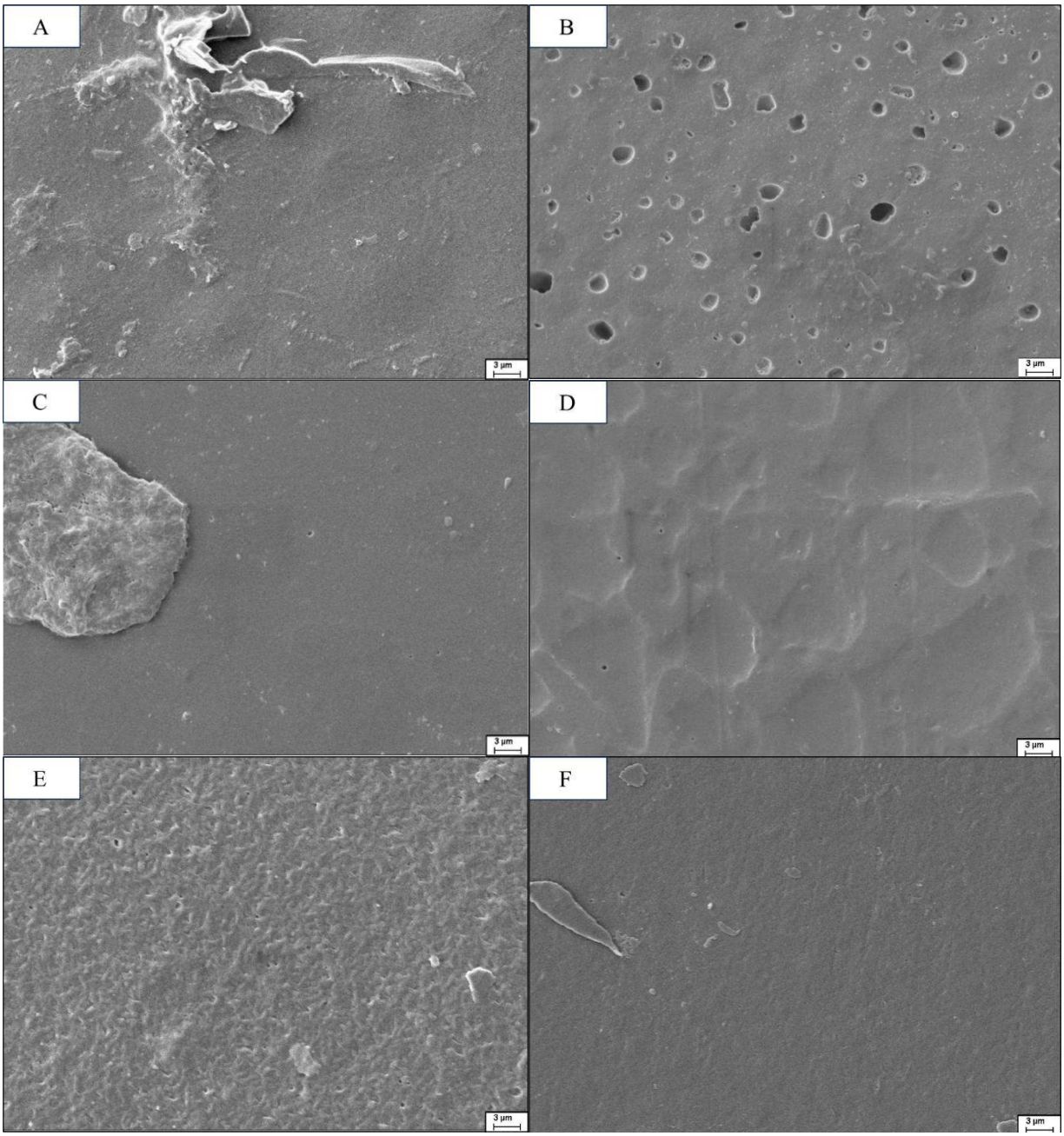
Z absorpčních spekter (viz příloha 8.2) byl vytvořen graf vývoje zdánlivé absorbance při 450 nm (viz Graf 4). Z něj vyplývá, že hodnoty zdánlivé absorbance v čase 96 hodin odpovídají těm z předchozího experimentu. U semikrystalického PLA zákal s delším časem degradace roste, zatímco u PHB zůstávají hodnoty víceméně konstantní. Amorfní PLA vykazuje prudký nárůst v čase 168 hodin, následovaný poklesem v 336 hodinách.



Graf 4: Vývoj zdánlivé absorbance při 450 nm roztoků po namáhání všech typů materiálů, 2. experiment

Možným vysvětlením anomálií, při kterých dojde k rapidnímu nárůstu zdánlivé absorbance, může být vznik lokálních defektů (trhliny, dutiny, póry) způsobených nedokonalým nanesením vrstvy polymerního roztoku, v důsledku čehož se může mechanické namáhání lokalizovat do míst povrchu s nižší mechanickou odolností. V těchto místech pravděpodobně dochází ke zvýšenému uvolňování částic. Následný rychlý pokles zákalu může být způsoben sedimentací částic nebo jejich adsorpcí na lahev (v případě PLA).

Pro potvrzení hypotézy byly vybrané vzorky polymerních fólií z prvního a druhého experimentu analyzovány pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM). Na získaných snímcích je možné detailně sledovat a porovnat morfologické změny polymerních fólií před a po degradaci. Z Obrázku 24 je patrné, že degradace neprobíhá rovnoměrně – nedochází tedy k otěru z celé plochy fólie stejně intenzivně. U semikrystalického PLA dochází pravděpodobně k otěru především v amorfních nebo méně krystalických oblastech, což má za následek tvorbu děr (Obrázek 24B). Možným důvodem vzniku děr může být také odpařování rozpouštědla. Amorfní PLA vykazuje vyšší homogenitu otěru, avšak i zde jsou patrná místa s intenzivnějším uvolňováním částic a místa méně narušená (Obrázek 24D). PHB fólie se zdají být nejrovnoměrněji otírané (Obrázek 24F).



Obrázek 24: SEM snímky při původním zvětšení 5 000×.
A – sPLA fólie před, B – sPLA fólie po 96 hodinách degradace, C – aPLA fólie před, D – aPLA fólie po 48 hodinách degradace, E – PHB fólie před, F – PHB fólie po 216 hodinách degradace

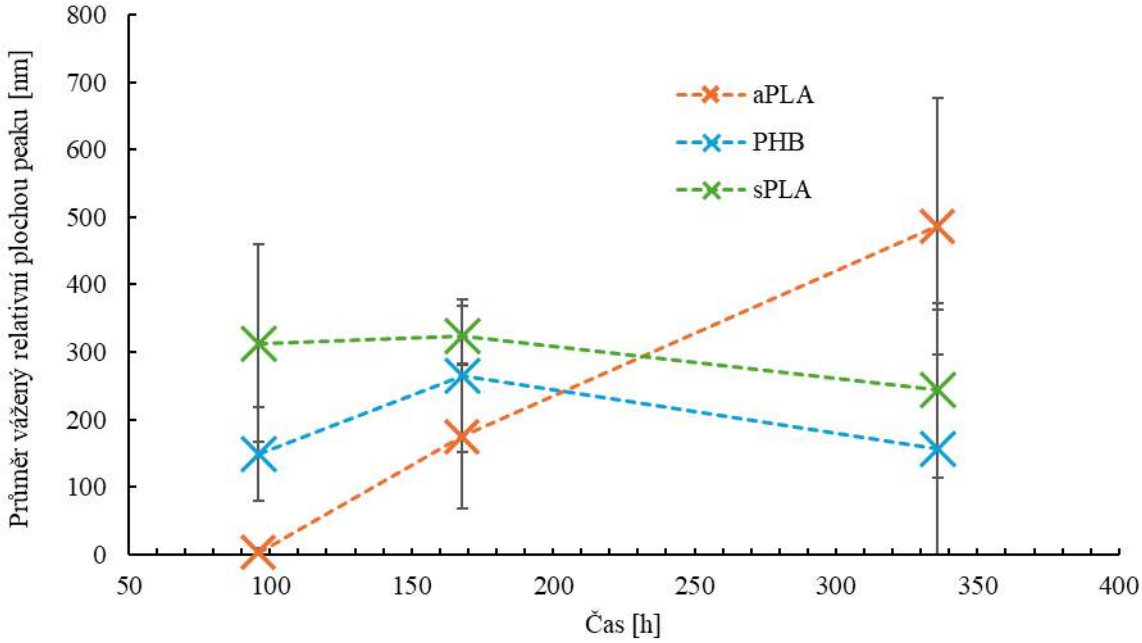
Charakterizace uvolněných částic byla provedena pomocí dynamického rozptylu světla (DLS). Ze surových dat na základě intenzitní distribuce velikosti (intensity PSD) byl spočítán plochou vážený průměr podle vzorce (1): z dat byly identifikovány tři hlavní peaky; ty s hodnotami přesahujícími 1 000 nm byly vyloučeny, neboť překračují měřicí rozsah přístroje a mohou výrazně ovlivnit správné určení střední hodnoty velikosti částic poskytnuté měřicím softwarem. Pro výpočet byl následně použit průměr pozic maxim těchto zbylých peaků, vážený jejich relativním zastoupením (relativní podíl signálu). Dalo by se tedy říct, že se jedná o průměr vážený relativní plochou peaků.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^{n} (P_i \cdot R_i)}{100} \tag{1}$$

kde:

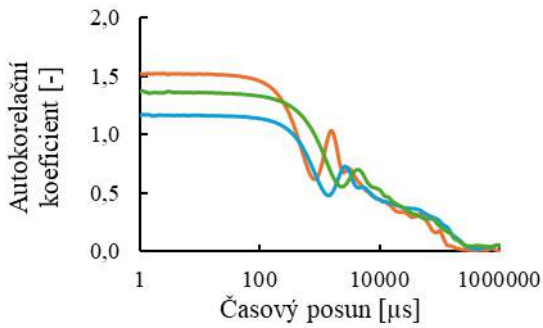
- $\bar{x}$ je výsledný průměr velikosti částic vážený relativní plochou peaku,
- P_i je pozice maxima i-tého peaku (v nm),
- R_i je relativní zastoupení i-tého peaku (v %),
- n je počet peaků zahrnutých do výpočtu (1–3, peaky s hodnotami nad 1 000 nm se ze zpracování vylučují).

Na základě takto vypočtených hodnot byl sestaven Graf 5, který ukazuje vývoj této veličiny v čase pro jednotlivé polymerní materiály.



Graf 5: Časový vývoj vážených velikostí částic získaných z DLS měřením roztoků po namáhání fólií, 2. experiment

Kvalita naměřených dat z DLS však nebyla ideální, což lze usuzovat z tvaru autokorelačních funkcí (například Graf 6 pro PHB po 168 hodinách degradace).



Graf 6: Autokorelační křivka při měření roztoku po namáhání PHB po dobu 168 hodin, 2. experiment

Možným důvodem nízké kvality měření je přítomnost příliš velkých částic mimo rozsah přístroje, které přístroj nedokáže adekvátně vyhodnotit. Tyto částice zároveň sedimentují, což dále snižuje kvalitu dat. Zároveň se jedná o vzorky s polydisperzitou větší než jedna, což není pro DLS analýzu vhodné. Možnými řešeními by mohlo být ředění vzorků, jejich filtrování nebo centrifugace před měřením.

Z výsledků tohoto experimentu vyplývá, že testované materiály jsou nehomogenní, což vede k nerovnoměrnému otěru a tím i k nestejnému uvolňování částic v čase. Tuto hypotézu podporují pozorování ze SEM analýzy, kde lze identifikovat lokální defekty a porušení povrchu.

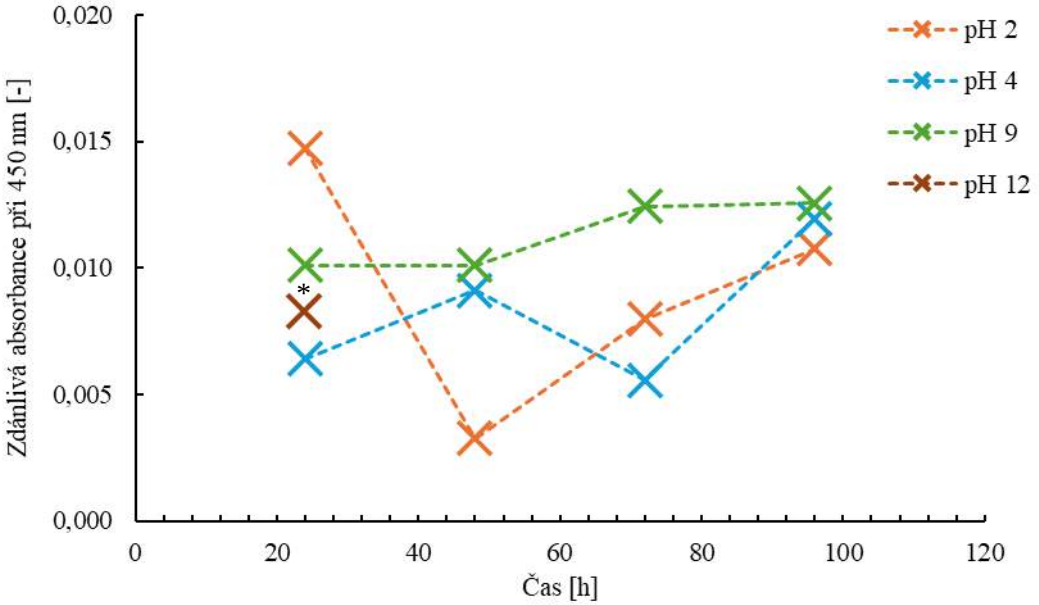
Co se týče DLS a UV-VIS analýzy, nebyla pozorována jednoznačná korelace mezi mírou zákalu a velikostí uvolněných částic. Výsledky z DLS nebyly příliš spolehlivé, pravděpodobně kvůli vysoké polydisperzitě vzorků a přítomnosti částic mimo měřící rozsah přístroje. Úpravou vzorků před měřením by bylo možné zvýšit kvalitu výsledků.

U PHB fólií připravených pipetováním došlo k uvolnění částic v množství srovnatelném s prvním experimentem. Toto množství se však během sledovaného období výrazně neměnilo, pravděpodobně kvůli omezené efektivitě otěru způsobené zkroucení fólií. Do budoucna by tedy bylo vhodnější vrátit se k přípravě vrstevnatých fólií, které vykazují rovnoměrnější degradaci.

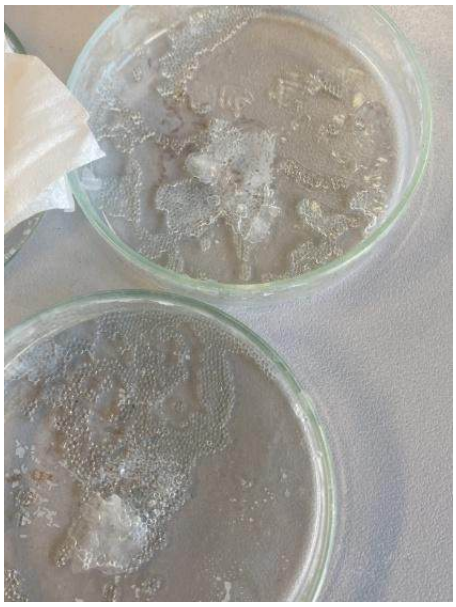
4.3 Třetí experiment: zkoumání vlivu pH na polymerní fólie

Cílem tohoto experimentu bylo posoudit vliv prostředí s odlišným pH na degradační chování polymerních fólií z PHB a PLA. Fólie byly vystaveny nejen mechanickému otěru simulujícímu fyzikální stres, ale zároveň chemickému namáhání prostřednictvím pufrovaných roztoků o definovaném pH (2, 4, 9 a 12).

Z vývoje zdánlivé absorbance při vlnové délce 450 nm u PHB (Graf 7) je zřejmé, že nejdrastičtější účinek mělo zásadité prostředí o pH 12, které vedlo k prakticky úplné destrukci fólie již po 24 hodinách (viz Obrázek 25). V kyselém prostředí (pH 2) byl pozorován po 24 hodinách zvýšený zákal, který se však později snížil – pravděpodobně vlivem sedimentace částic. Naopak roztoky o pH 4 a 9 vykazovaly relativně stabilní průběh zdánlivé absorbance. I přesto lze pozorovat mírně vyšší hodnoty při pH 9, což naznačuje, že zásadité prostředí obecně zrychluje degradaci PHB více než mírně kyselé.

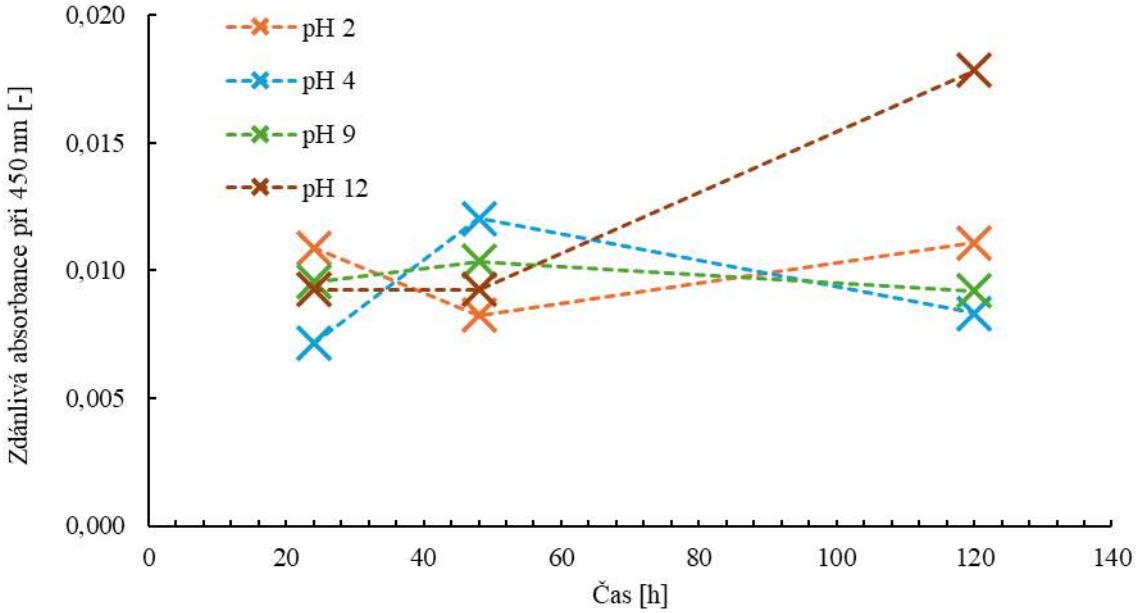


*Graf 7: Vývoj zdánlivé absorbance při 450 nm roztoků po namáhání PHB ve všech pH (*Pozn. poté došlo k totální destrukci fólie)*



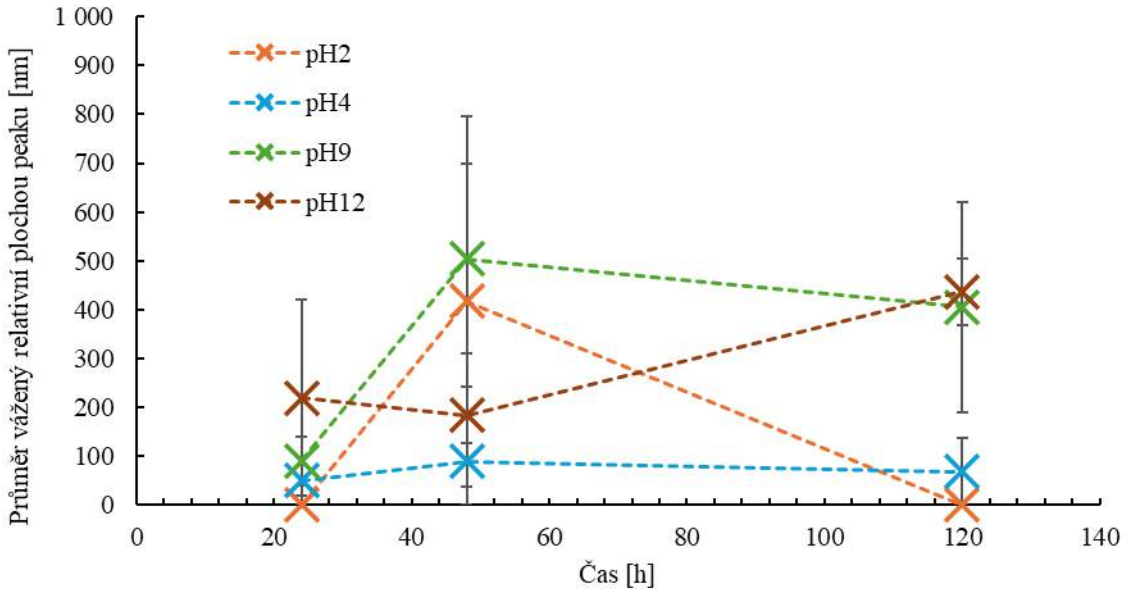
Obrázek 25: PHB fólie po 24 h expozici v roztoku pH 12; patrná úplná destrukce materiálu

Pro srovnání je v Grafu 8 stejná závislost pro semikrystalické PLA. Z grafu je patrné, že různé hodnoty pH neměly na PLA fólii tak výrazný degradační účinek jako v případě PHB. Významnější nárůst zdánlivé absorbance byl pozorován pouze u pH 12 po 120 hodinách, ale i zde fólie zůstala strukturálně zachovaná. Celkově lze tedy říct, že PLA fólie je vůči změnám pH odolnější. Graf pro aPLA v příloze 8.3.

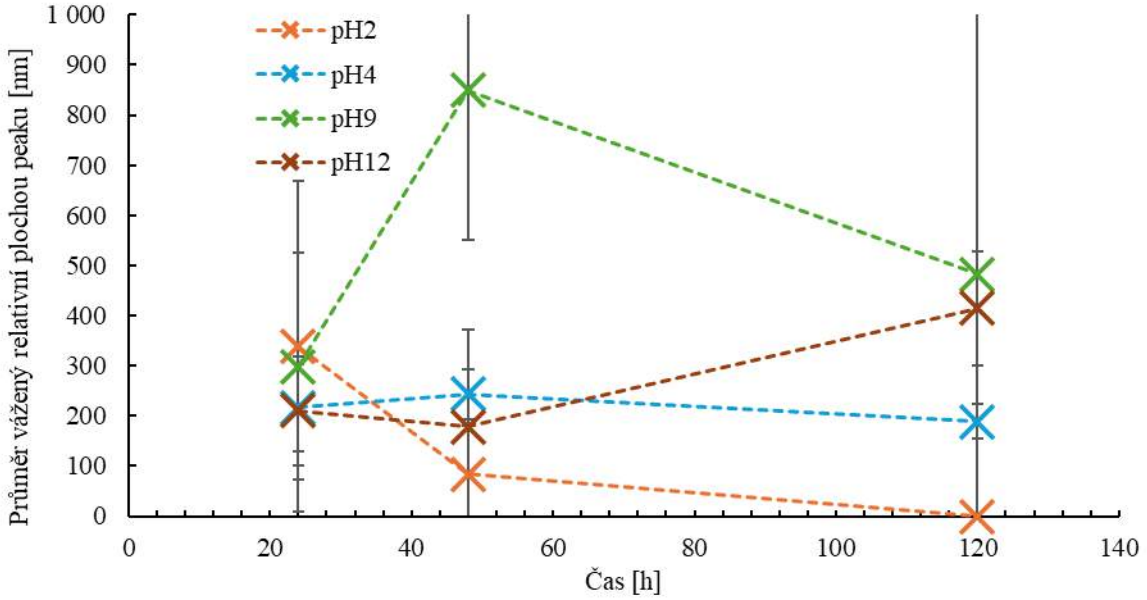


Graf 8: Vývoj zdánlivé absorbance při 450 nm roztoků po namáhání sPLA ve všech pH

Z výsledků DLS analýzy pro semikrystalické PLA (Graf 9) a amorfní PLA (Graf 10) můžeme říct, že vlivem kyselého pH (pH 2) vznikají spíše menší částice, zatímco vlivem zásaditějšího pH (např. pH 9) vznikají větší částice. Tyto rozdíly jsou nejspíš spojeny s rozdílným průběhem kyselé a alkalické hydrolýzy. Graf pro PHB viz příloha 8.3.



Graf 9: Vývoj vážené velikosti částic získaných z DLS roztoků po namáhání sPLA při různých pH prostředí



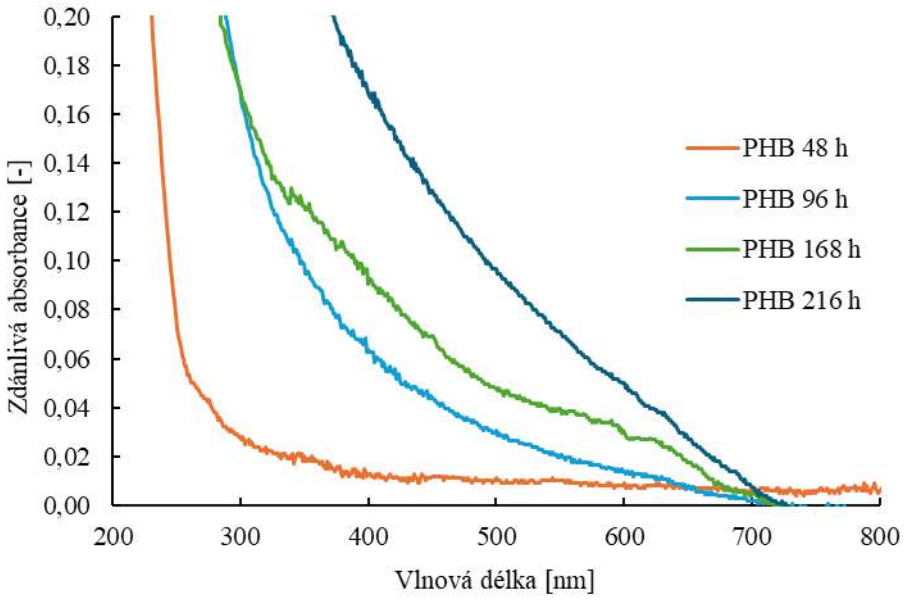
Graf 10: Vývoj vážené velikosti částic získaných z DLS roztoků po namáhání aPLA při různých pH prostředí

Vlivem rozdílných pH roztoků nebyl pozorován významný rozdíl v zákalu oproti předešlým experimentům, kromě pH 12, které bylo pro PHB destruktivní již po 24 hodinách expozice. Z porovnání výsledků UV-VIS a DLS analýzy by se dalo říct, že v důsledku přítomnosti H^+ iontů docházelo ke kysele katalyzované hydrolýze, která probíhala mírněji a rovnoměrněji, a vedla ke vzniku menších degradačních produktů. V zásaditém prostředí naopak probíhala hydrolýza agresivněji a způsobila rozpad polymeru na větší částice nebo agregáty. Ačkoli nebyl sledován jednoznačný trend ve všech pH hodnotách, experiment ukázal, že zásadité prostředí (pH 12) je pro PHB nejvíce zatěžující, a že PLA je vůči pH podmínkám odolnější. Pro budoucí experimenty by bylo vhodné prodloužit dobu expozice (např. na 7 dní), případně sledovat také změny hmotnosti, mechanických vlastností nebo chemického složení (např. pomocí FTIR).

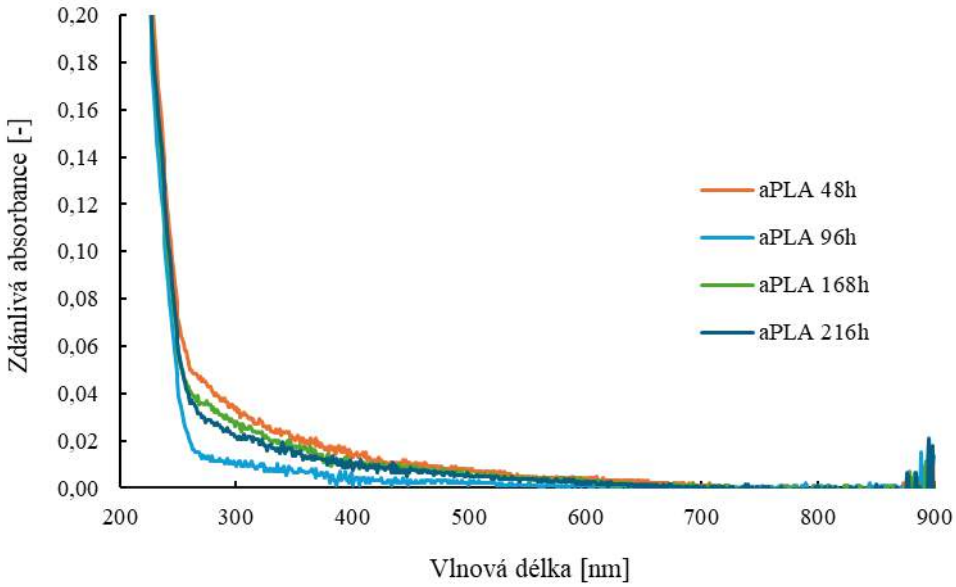
4.4 Čtvrtý experiment: optimalizace kvality výstupů DLS analýzy

Cílem čtvrtého experimentu byla optimalizace kvality dat získaných metodou dynamického rozptylu světla (DLS). V rámci toho byly zároveň sledovány trendy uvolňování částic prostřednictvím UV-VIS spektroskopie. V Grafu 11 vidíme absorpční spektrum vzorků PHB, které vykazuje postupné zvyšování zákalu s časem. V Grafu 12 je zobrazeno absorpční spektrum vzorků amorfního PLA. Spektrum pro semikrystalické PLA je v příloze 8.4.

U PHB je patrné postupné zvyšování zákalu s časem, zatímco u obou typů PLA lze pozorovat rychlý nárůst zdánlivé absorbance již při krátkých degradačních časech, srovnatelný s nárůstem u PHB, který však dále nepokračuje.

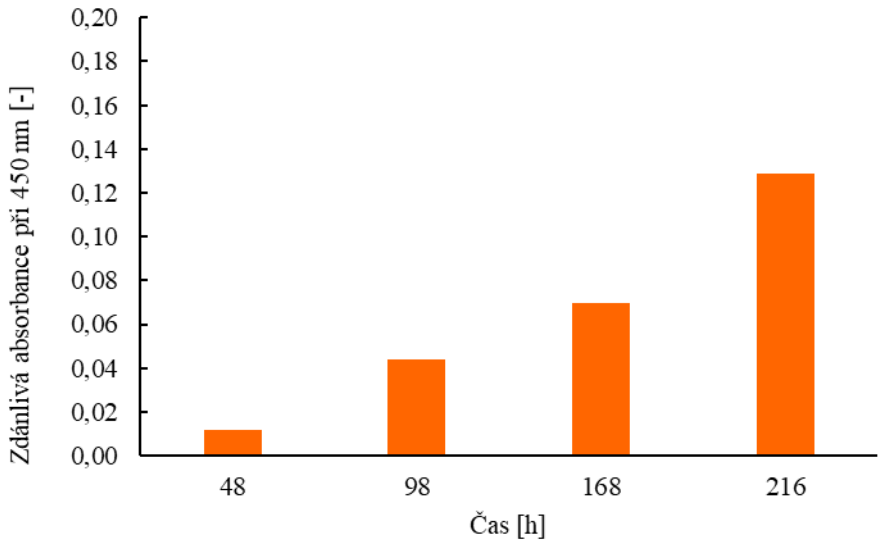


Graf 11: Absorpční spektrum roztoků po namáhání PHB ze čtvrtého experimentu

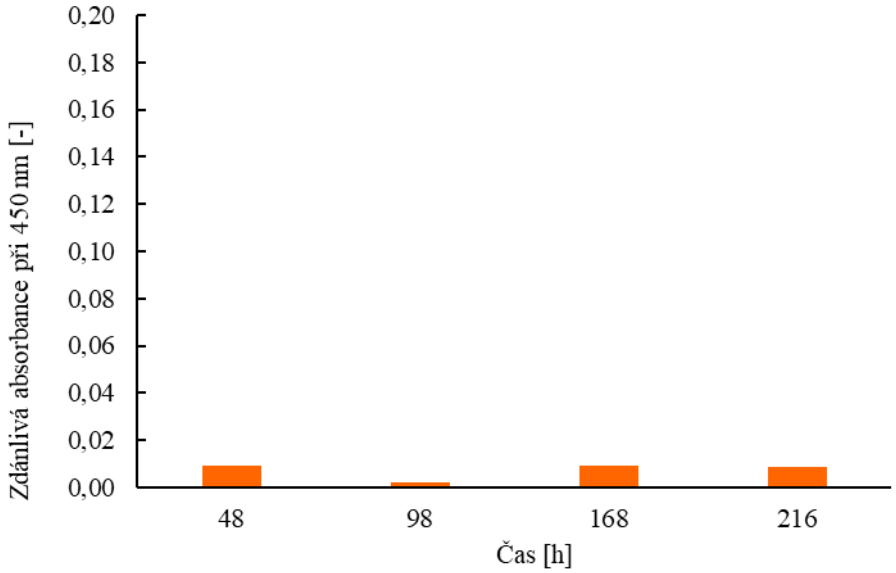


Graf 12: Absorpční spektrum roztoků po namáhání aPLA ze čtvrtého experimentu

Pozorováním vývoje hodnot zdánlivé absorbance při vlnové délce 450 nm u PHB (Graf 13) a aPLA (Graf 14) lze sledovat postupné zvyšování zákalu u fólie z PHB. Oproti tomu se zdá, že PLA během prvních hodin prudce uvolňuje částice z méně stabilních oblastí, které pak sedimentují nebo nepřispívají k zákalu v UV-VIS oblasti. Absence trendu u PLA může být tedy kombinací sedimentace, tvorby agregátů a rychlého vyčerpání snadněji degradovatelných oblastí. Graf pro sPLA je v příloze 8.4.

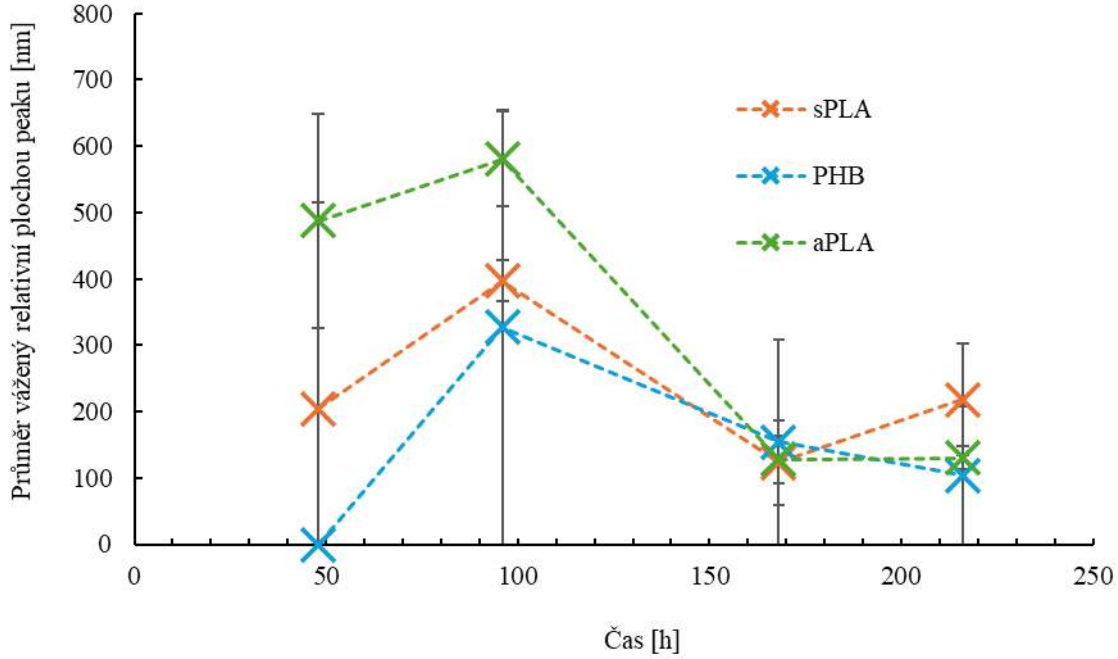


Graf 13: Vývoj zdánlivé absorbance při 450 nm roztoků po namáhání PHB ze čtvrtého experimentu



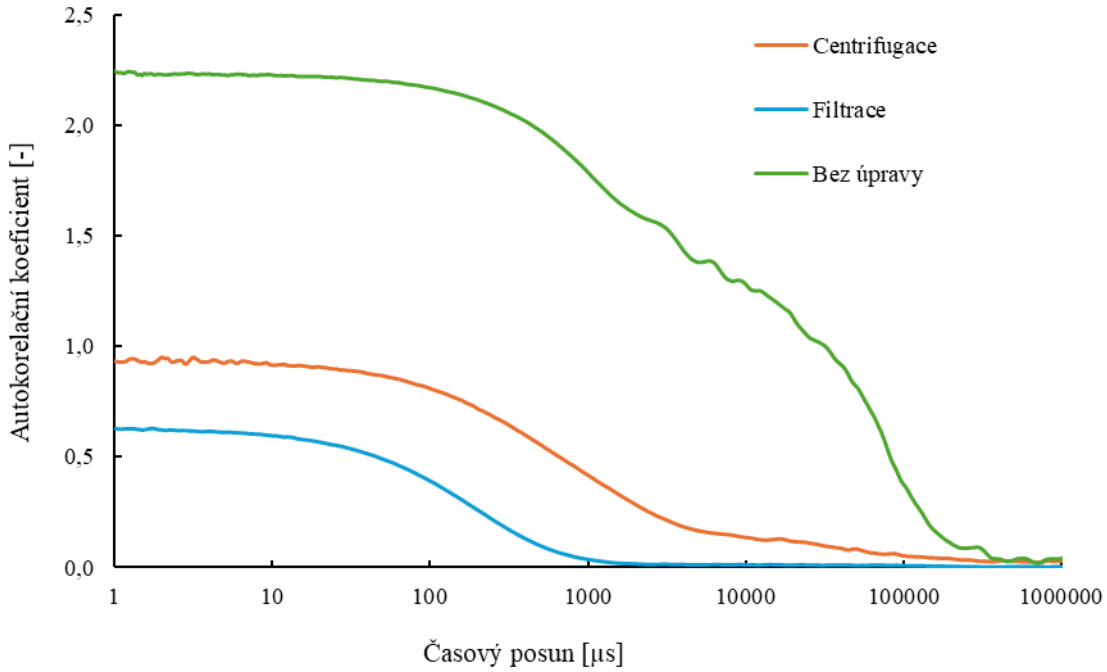
Graf 14: Vývoj zdánlivé absorbance při 450 nm roztoků po namáhání aPLA ze čtvrtého experimentu

Ze surových dat intenzitní distribuce velikosti z DLS byl, dle postupu popsaného ve druhém experimentu, spočítán plochou vážený průměr. Získané hodnoty pro všechny tři biopolymery byly vyneseny do Grafu 15. Z něj je zřejmé, že velikost částic v čase nevykazuje konzistentní trend, hodnoty se výrazně liší. Při měření bylo kontrolou kvality na měřícím přístroji konstatováno, že jsou ve vzorcích přítomny velké, špatně charakterizované částice, agregáty či prach, které ovlivňují kvalitu měření.



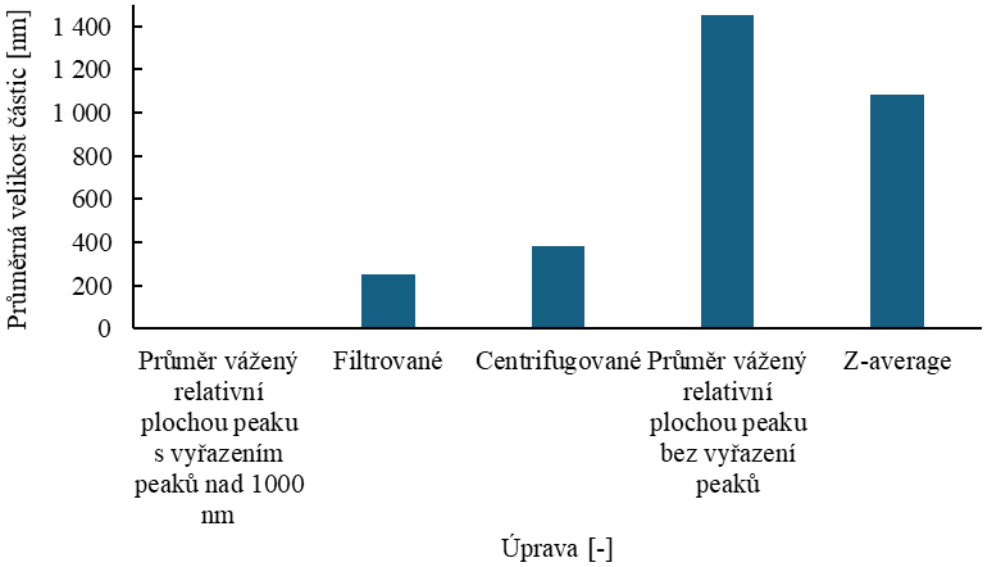
Graf 15: Vývoj vážené velikosti částic získaných z DLS měřením roztoků po namáhání fólií, 4. experiment

V reakci na tyto výsledky byl učiněn pokus vyřešit problém těchto špatně charakterizovaných velkých částic, které negativně ovlivňovaly kvalitu měření. Byla zvolena filtrace přes nylonový filtr s velikostí pórů 0,45 µm, a také centrifugace (5 minut při 6 000 rpm). Graf 16 zobrazuje autokorelogram vypovídající o kvalitě měření vzorku PHB 48 hodin před a po těchto úpravách.



Graf 16: Autokorelační křivka při optimalizaci kvality dat, měření roztoku po namáhání PHB po dobu 48 hodin, 4. experiment

Bylo také vytvořeno sloupcové porovnání velikostí částic uvolněných do roztoku z PHB fólie po 48 hodinách při různých formách úpravy vzorků či výsledků (viz Graf 17).



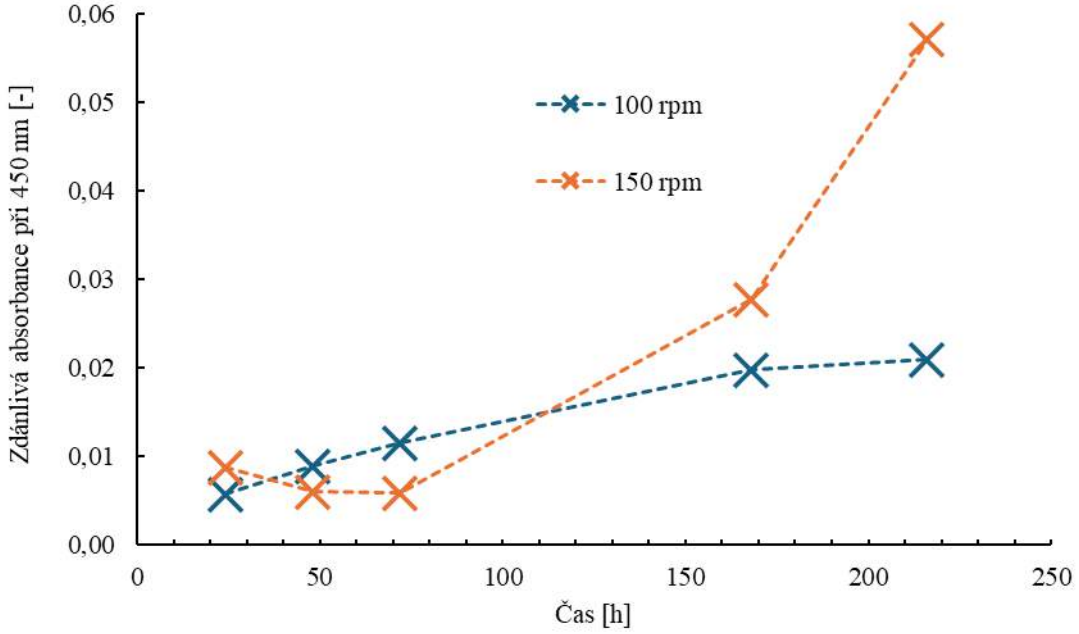
Graf 17: Porovnání velikostí částic v závislosti na formě úpravy vzorku či výsledku

Z výsledků vyplývá, že filtrace vzorků přes nylonový filtr o velikosti pórů 0,45 µm výrazně zvyšuje kvalitu dat z DLS měření. Tato metoda umožňuje selektivní analýzu menších částic (např. v oblasti nanorozměrů), na něž se tato práce zaměřuje. V případě zájmu o charakterizaci větších částic by bylo vhodné analyzovat frakci zachycenou na filtru pomocí alternativních metod (např. SEM nebo s využitím FTIR příp. Ramanské mikrospektroskopie).

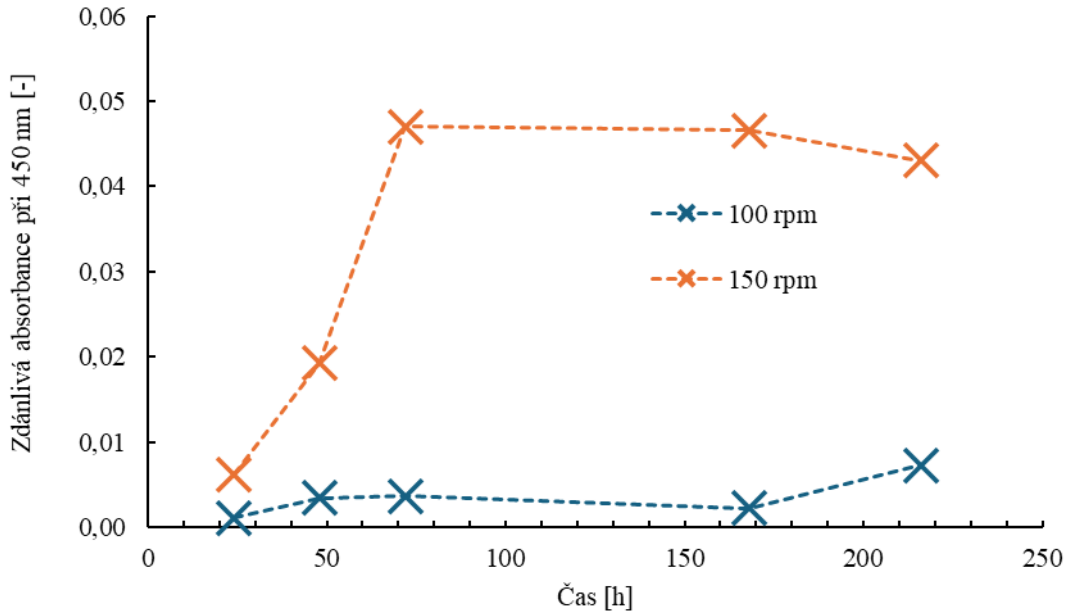
4.5 Pátý experiment: vliv rychlosti třepání na degradaci

V tomto experimentu byly fólie umístěny na dno Erlenmeyerových baněk a třepány při dvou různých rychlostech: 100 rpm a 150 rpm. Cílem bylo vystavit fólie intenzivnímu mechanickému namáhání a sledovat, jaký vliv má rozdílná intenzita otěru na jejich degradaci.

Z hlediska zákalu, kvantifikovaného pomocí UV-VIS spektrofotometru, byly zaznamenány výrazné rozdíly mezi oběma rychlostmi třepání. Jak u PHB (Graf 18) tak u amorfního PLA byly při 150 rpm pozorovány výrazně vyšší hodnoty zákalu. Největší rozdíl byl patrný u amorfního PLA (Graf 19). Graf pro sPLA je v příloze 8.4.

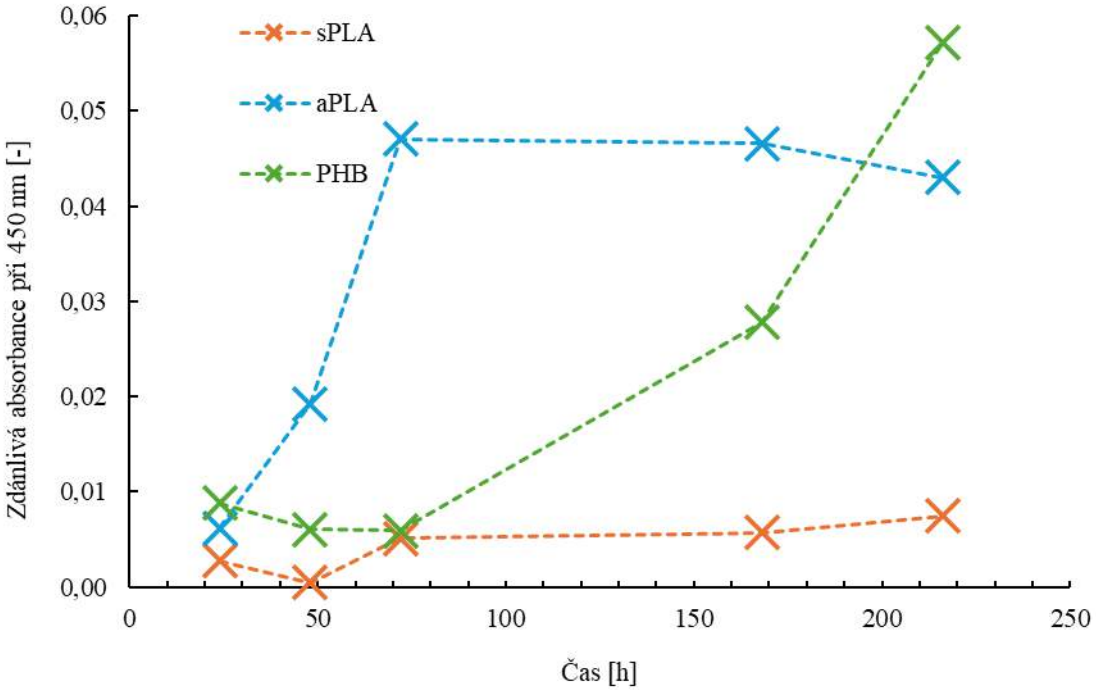


Graf 18: Závislost zdánlivé absorbance při 450 nm na čase pro obě rychlosti otáček roztoků po namáhání PHB



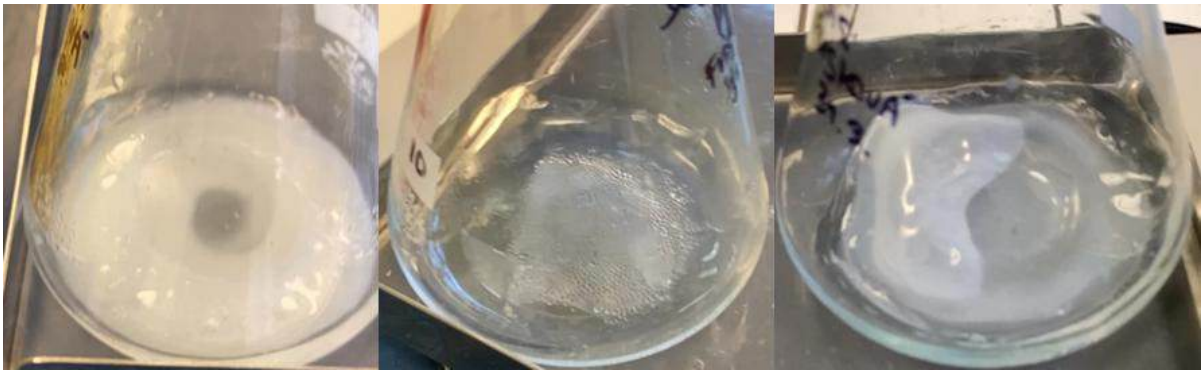
Graf 19: Závislost zdánlivé absorbance při 450 nm na čase pro obě rychlosti otáček roztoků po namáhání aPLA

Vynesením hodnot zdánlivé absorbance při 450 nm pro rychlost otáčení 150 rpm u všech testovaných materiálů (Graf 20) je zřejmé, že nejvíce byla ovlivněna fólie z amorfního PLA, následovaná PHB. Semikrystalické PLA bylo vůči nim rychlostí otáčení ovlivněno nejméně.



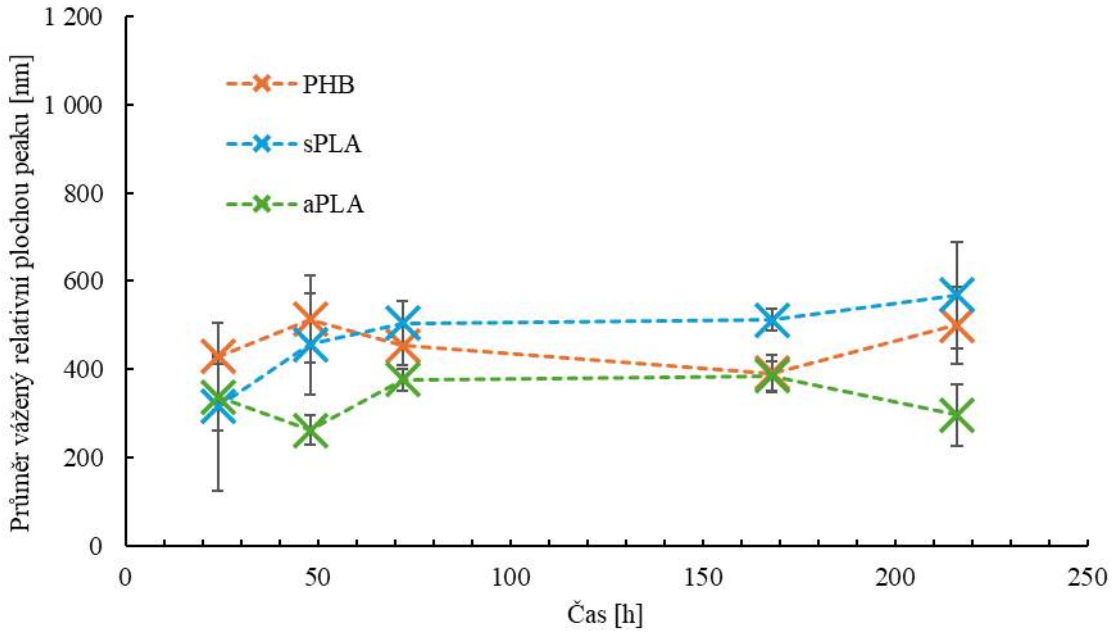
Graf 20: Závislost zdánlivé absorbance při 450 nm na čase při 150 rpm roztoků po namáhání všech materiálů

Rozdíly v míře degradace lze vysvětlit rozdílnou efektivitou kontaktu mezi skleněnými kuličkami a povrchem fólií. Jak je patrné z Obrázku 26, fólie z amorfního PLA (vlevo) zůstala po celou dobu experimentu přilepená ke dnu baňky, a docházelo tak k rovnoměrnému mechanickému otěru po celém povrchu. Fólie z PHB (uprostřed) se vlivem vysokých otáček a malé tloušťky začala trhat na menší kusy, které následně volně cirkulovaly s kuličkami. Fólie ze semikrystalického PLA (vpravo) se odlepila ode dna a plavala nad kuličkami, čímž byl mechanický kontakt omezen, a proto zde nebyl pozorován výraznější zákal.

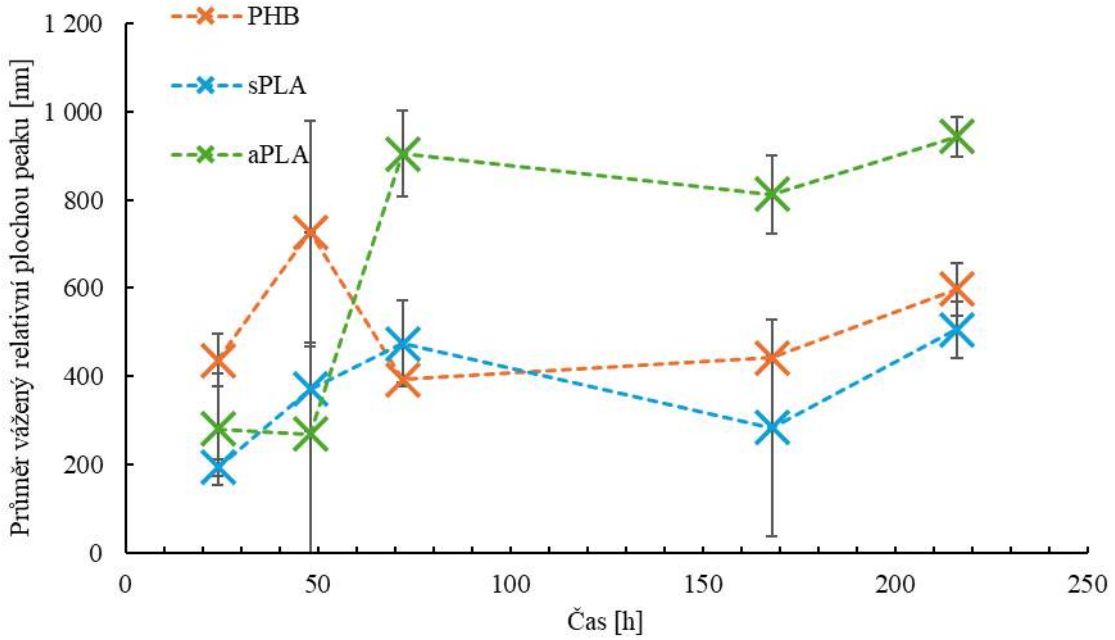


Obrázek 26: Degradace fólie z aPLA (vlevo), PHB (uprostřed) a sPLA (vpravo) při 150 rpm

Pro porovnání průměrné velikosti uvolněných částic při 100 a 150 rpm byly vzorky analyzovány metodou DLS. Na základě intenzitní distribuce byl vypočten plochou vážený průměr velikosti částic a jeho časový vývoj byl vynesen do grafů. Graf 21 ukazuje data pro 100 rpm, Graf 22 pro 150 rpm. Jak na grafech můžeme vidět, při 100 rpm byly detekovány částice o velikosti 200–600 nm, zatímco při 150 rpm se velikosti pohybovaly od 200 až téměř do 1 000 nm. Rozpětí velikostí bylo tedy větší při rychlejších otáčkách. Data z UV-VIS i DLS vzájemně korelují zejména u aPLA; s časem roste nejen zákal, ale také průměrná velikost částic.



Graf 21: Vývoj vážené velikosti částic získaných z DLS u roztoků po namáhání fólií při 100 rpm



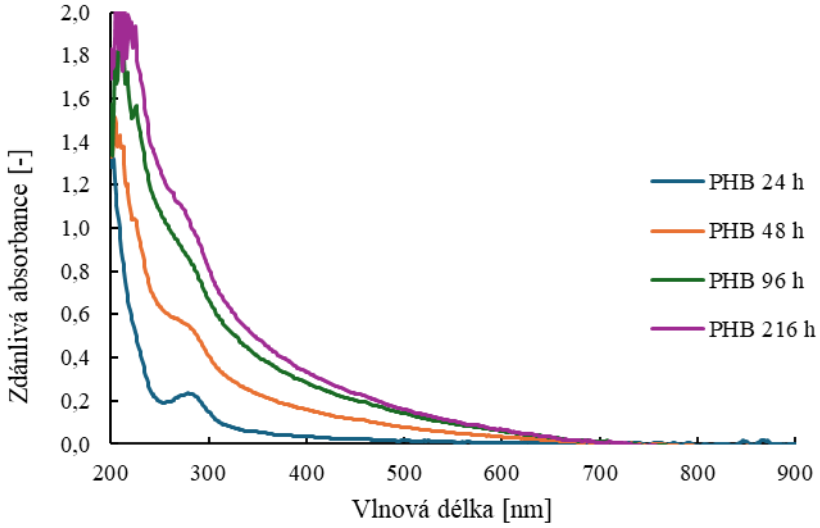
Graf 22: Vývoj vážené velikosti částic získaných z DLS u roztoků po namáhání fólií při 150 rpm

Z výsledků pátého experimentu jednoznačně vyplývá, že rychlost třepání má vliv na míru degradace polymerních fólií, a to jak z pohledu zákalu roztoku, tak i velikosti vznikajících částic. Vyšší rychlost (150 rpm) způsobila intenzivnější mechanické namáhání u fólií přicházejících do aktivního stylu s abrazivem, což vedlo k rychlejší a výraznější fragmentaci zejména u amorfního PLA, kde byl zákal i růst částic nejvýraznější. PHB vykazovalo rovněž zvýšenou degradaci, i když mechanismus byl odlišný – fólie se mechanicky trhala a fragmenty se volně pohybovaly. Naproti tomu semikrystalické PLA bylo touto metodou ovlivněno jen minimálně, což bylo zřejmě způsobeno jeho odlepením od dna baňky a nedokonalým kontaktem s abrazivem. Do budoucna by bylo vhodné u tohoto materiálu zajistit lepší fixaci ke dnu, aby byl mechanický kontakt efektivnější.

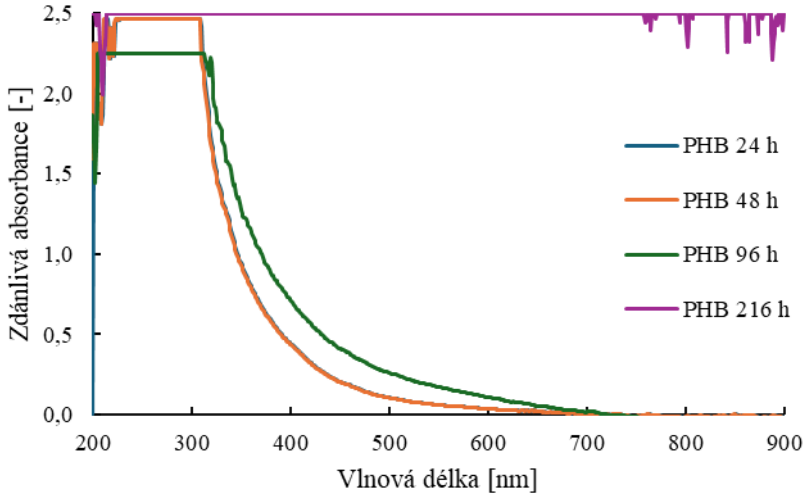
4.6 Šestý experiment: vliv enzymů (biotická degradace)

V tomto experimentu byly zkombinovány metodologické poznatky z předchozích experimentů – fólie byly umístěny na dno Erlenmeyerových baněk, třepány při 150 rpm a před analýzou DLS byly vzorky přefiltrovány. Cílem bylo vystavit polymerní fólie biotickému rozkladu a sledovat vliv enzymů proteázy a lipázy na degradaci PHB a PLA (amorfního a semikrystalického).

Absorpční spektra PHB degradovaného v lipáze (Graf 23) a proteáze (Graf 24) ukazují, jak se zdánlivá absorbance mění v závislosti na vlnové délce dopadajícího světla. V případě PHB degradovaného 216 hodin v proteáze dosahovaly hodnoty zdánlivé absorbance neměřitelně vysokých hodnot. Tyto hodnoty jsou v grafu zaneseny jen pro představu, nelze je dále zpracovávat, protože překračují detekční limity přístroje. V absorpčním spektru lipázy je patrný slabý peak, který je způsoben enzymem. Je pravda, že samotná přítomnost enzymu může přispívat k zákalu, nicméně tento příspěvek by měl být konstantní v čase. Pokud tedy pozorujeme zvyšující se zdánlivou absorbanci, lze usuzovat, že se jedná o degradací uvolněné částice, nikoli vliv enzymu samotného.



Graf 23: Absorpční spektrum roztoků po namáhání PHB v lipáze

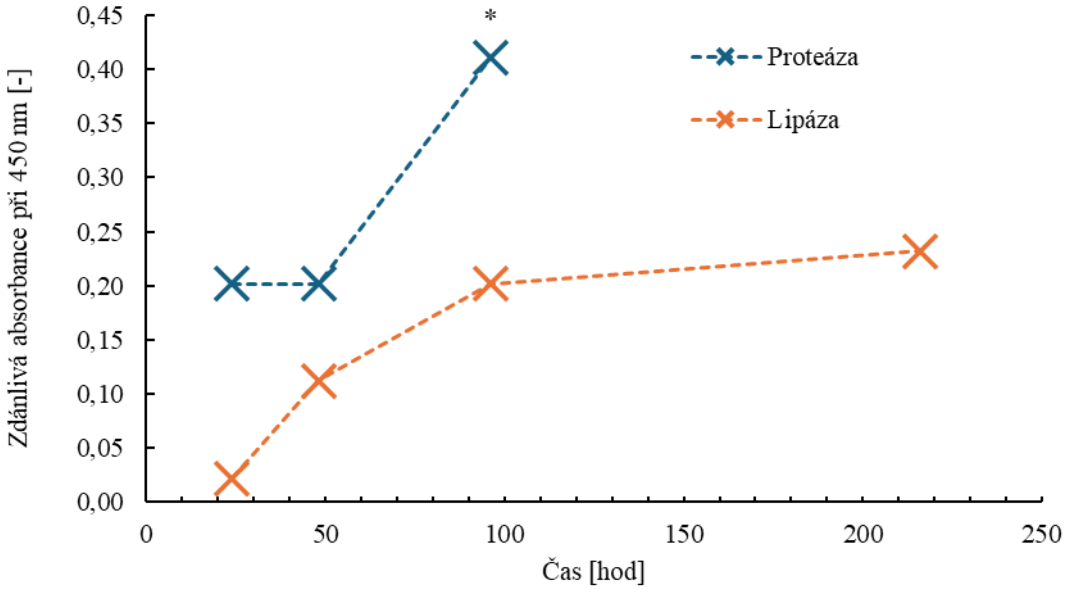


Graf 24: Absorpční spektrum roztoků po namáhání PHB v proteáze

Ve všech třech testovaných materiálech byl zákal vzorků degradovaných v lipáze srovnatelný s předchozími experimenty. Naopak u vzorků degradovaných v proteáze byl zákal významně vyšší, od hodnoty 0,20 (při vlnové délce 450 nm) až po limity měřícího přístroje. Po 216 hodin již nebylo možné změřit absorpční spektrum vzorků v proteáze, protože roztoky byly příliš zakalené a husté (viz Obrázek 27).

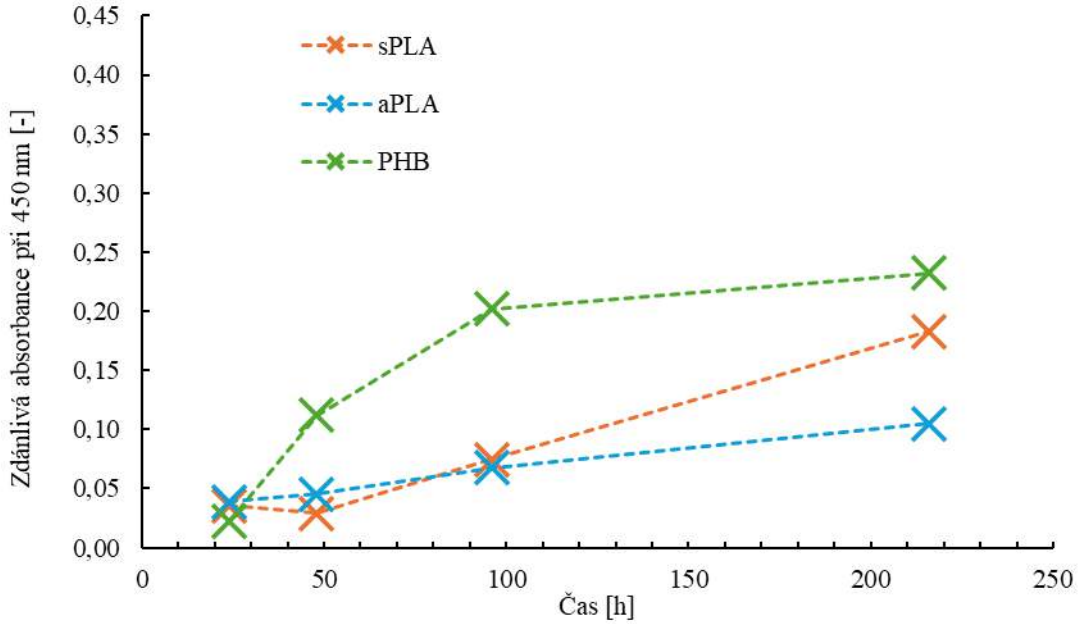
Obrázek 27: Vzorek sPLA po 48 hodinách degradace v proteáze (*vlevo*)*. Erlenmeyerova baňka s degradující sPLA fólií, kde jsou okem viditelné uvolněné částice* (*uprostřed*)*. Vzorky po 216 hodinách degradace v proteáze* (*napravo*)*.*

Časový vývoj zdánlivé absorbance při 450 nm při působení enzymů na PHB je znázorněn v Grafu 25. Oba typy PLA (semikrystalické i amorfní) vykazovaly podobný trend (viz příloha 8.6).

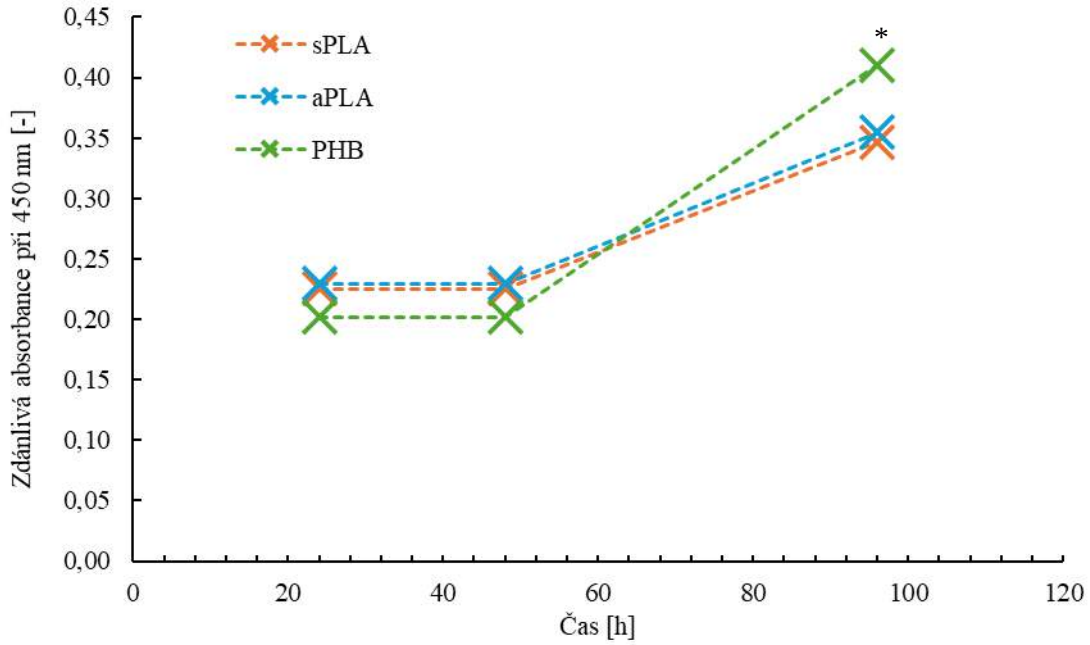


Graf 25: Vývoj zdánlivé absorbance při 450 nm roztoků po degradaci PHB enzymy
(** Pozn. vzorek byl tak zakalený, že ho nebylo možné na přístroji změřit*)

Z porovnání časového vývoje zdánlivé absorbance při 450 nm při působení lipázy (Graf 26) vyplývá, že lipáza má největší vliv na PHB, zatímco její účinek na PLA je nižší. V případě proteázy je její účinek rovnoměrně silný pro všechny typy testovaných polymerů, jak je patrné z Grafu 27.

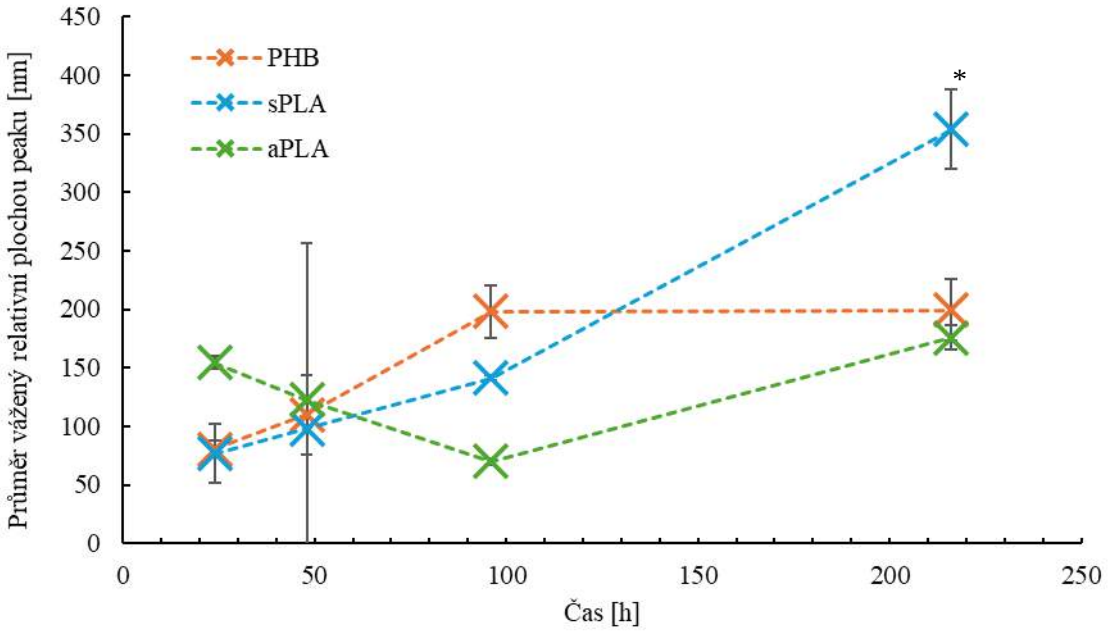


Graf 26: Časový vývoj zdánlivé absorbance při 450 nm roztoků po degradaci fólií lipázou

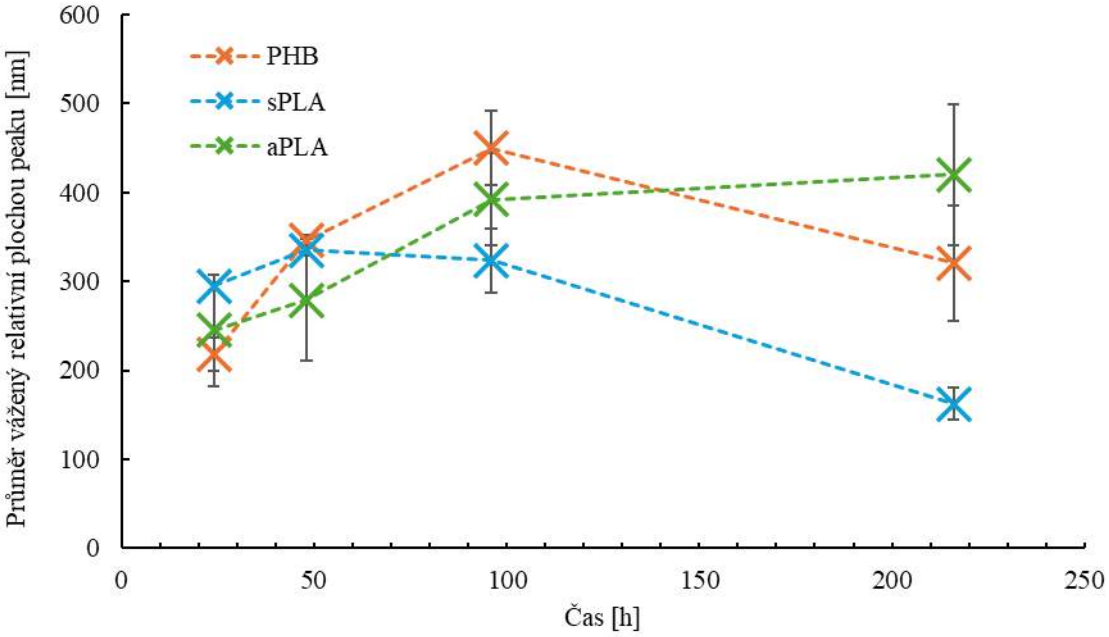


Graf 27: Časový vývoj zdánlivé absorbance při 450 nm roztoků po degradaci fólií v proteáze
(**Pozn. vzorky byly v tomto čase desítkově ředěny, protože byly moc husté na přefiltrování*)

Analýza metodou DLS ukázala, že velikost uvolňovaných částic závisí na použitém enzymu. U proteázy se jejich velikost pohybovala mezi 100–300nm (Graf 28), zatímco u lipázy 200–600 nm (Graf 29).



Graf 28: Distribuce vážené velikosti částic při degradaci polymerů v proteáze (*DLS*)
(**Pozn. vzorky byly v tomto čase desítkově ředěny, protože byly moc husté na přefiltrování*)



Graf 29: Distribuce vážené velikosti částic při degradaci polymerů v lipáze (*DLS*)

Z výsledků experimentu vyplývá, že enzymy mají vliv na degradaci polymerních fólií, a to jak z pohledu zákalu roztoku, tak i velikosti vznikajících částic. Proteáza způsobovala ve všech případech vyšší míru degradace než lipáza – zákal extrémních hodnot, který v časech 216 hodin přesahoval možnosti měřicího přístroje. Naopak lipáza působila selektivněji – nejsilnější efekt byl pozorován u PHB, zatímco PLA bylo degradováno méně.

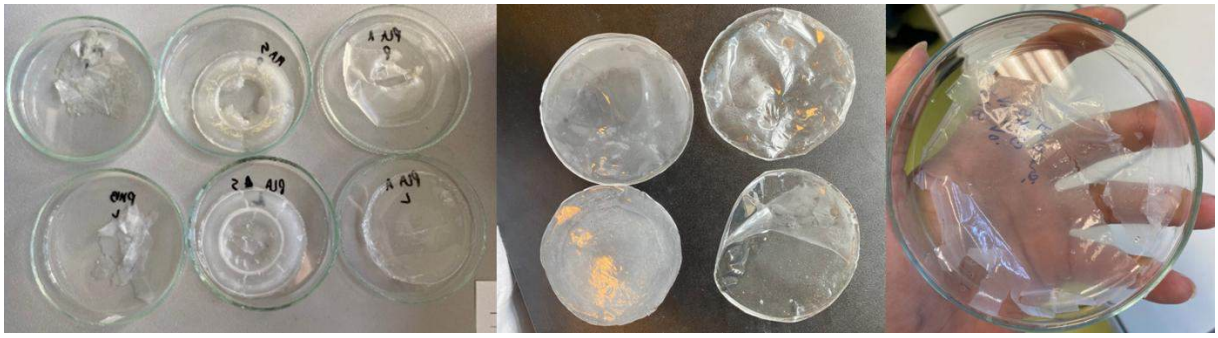
Proteázy jsou primárně enzymy štěpící peptidové vazby v bílkovinách, ale některé z nich mohou mít nespecifickou hydrolytickou aktivitu, která umožňuje štěpení esterových vazeb – obsažených jak v

PHB, tak v PLA. Proto bylo možné pozorovat vysoký zákal i u materiálů, u kterých by se dalo očekávat menší působení, jako např. PLA. Proteáza pravděpodobně iniciovala převážně povrchovou hydrolytickou erozi, přičemž fragmentace vedla k následnému uvolňování menších částic do roztoku.

Lipázy štěpí esterové vazby v lipidech a jejich účinnost na syntetické bioplasty závisí na tom, zda polymer obsahuje vhodné substráty. PHB je polyester přírodního původu, a proto je mnohem náchylnější k působení lipáz. To vysvětluje, proč byl účinek lipázy nejsilnější právě u PHB. PLA má sice také esterové vazby, ale jeho molekulová struktura (prostorová orientace, stupeň krystalinity) může působit jako bariéra pro enzymatický přístup.

Na základě výsledků lze usuzovat, že proteáza vykazuje vyšší degradaci napříč materiály, avšak s nižší substrátovou selektivitou ve srovnání s lipázou. DLS analýza potvrdila i rozdíly ve velikosti uvolněných částic v závislosti na enzymu.

Na rozdíl od čistě mechanického třepání, kde docházelo primárně k mechanické fragmentaci, se zde zároveň jednalo o chemickou (enzymatickou) degradaci, při které se narušují konkrétní chemické vazby. Z tohoto důvodu byla degradace samotných fólií znatelnější, než v předešlých experimentech (viz Obrázek 28).



Obrázek 28: Fólie po 216 hodinách degradace v roztocích enzymů (vlevo)*, sPLA a aPLA fólie* (*uprostřed*) *a PHB fólie* (vpravo) *po 216 hodinách namáhání abrazivem*

5 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývala problematikou vzniku mikro- a nanočástic vznikajících degradací biodegradabilních polymerních materiálů, zejména s ohledem na jejich v současnosti stále více diskutované ekologické dopady. V první části byla zpracována literární rešerše zaměřená na ekologické a ekonomické aspekty využívání biodegradabilních polymerů jako alternativy ke konvenčním plastům. Na základě těchto poznatků byl vybrán soubor polymerních biodegradabilních materiálů – konkrétně PLA ve dvou formách (amorfní a semikrystalické) a PHB.

Hlavním cílem práce bylo navrhnout a realizovat experiment pro studium rychlosti uvolňování mikro- a nanočástic z těchto polymerních fólií ve vodném prostředí. Součástí experimentu byla také jejich koloidní charakterizace pomocí metod UV-VIS spektroskopie, dynamického rozptylu světla (DLS) a skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Dále byl proveden doplňující experiment sledující vliv enzymatické (biotické) degradace na vznik částic. Motivací práce bylo tímto způsobem vyvinout experimentální metodu, která by v budoucnu mohla sloužit jako nástroj pro produkci disperzí mikro- a nanočástic biodegradabilních polymerů. Tyto disperze by pak bylo možné cíleně aplikovat na modelové ekosystémy a zkoumat jejich ekologické dopady – např. na vodní či půdní organismy.

V šesti navazujících experimentech byly testovány různé degradační scénáře – od čistě mechanického namáhání, přes působení pH, vliv rychlosti otěru, až po biotickou enzymatickou degradaci. Z výsledků vyplývá, že částice se uvolňují i při pouhém mechanickém otěru bez přítomnosti biologických nebo chemických vlivů. Degradační účinek se však zvyšuje při kombinaci více faktorů, což lépe odráží reálné podmínky v přírodním prostředí, kde působí zároveň např. UV záření, změny teplot, mikrobiální aktivita a mechanické namáhání v půdě nebo sladké vodě.

Zvláště výrazné bylo působení enzymu proteázy, který vedl k intenzivnímu zákalu a fragmentaci všech testovaných polymerů. Lipáza vykazovala selektivnější účinek, s nejvyšší efektivitou vůči PHB. Pozorované částice měly velikost v řádu stovek nanometrů, což je rozměr, který jim umožňuje interakci s vodními organismy a průnik do biologických struktur.

Zvolený experimentální přístup se ukázal jako vhodný pro hodnocení degradační odolnosti různých polymerů. UV-VIS poskytuje rychlé a citlivé informace o celkovém množství částic, zatímco DLS doplňuje velikostní distribuci. SEM umožňuje přímé pozorování změn povrchu fólií. Je však třeba brát v úvahu omezení jednotlivých metod – DLS je náchylné k chybám při přítomnosti větších agregátů nebo sedimentace a vyžaduje úpravu vzorků (třeba v podobě filtrace), zatímco zákal nezohledňuje chemické složení částic.

Z hlediska diskuse ekologické role bioplastů výsledky pilotních experimentů realizovaných v této práci potvrzují, že biodegradabilní polymery nejsou zcela bez rizik. Abiotická a biotická fragmentace jejich povrchu vede k uvolnění částic, které se mohou chovat obdobně jako mikroplasty z konvenčních plastů – akumulovat toxické látky, pronikat do potravních řetězců nebo působit jako stresový faktor pro vodní a půdní organismy. Ačkoli jsou tedy tyto materiály označovány za ekologicky příznivější, jejich rozklad probíhá často jen za specifických podmínek, navíc pomalu a ne vždy úplně. Na druhou stranu je třeba hodnotit krátkodobá ekologická rizika vedle dlouhodobých benefitů. Tomu by měl odpovídat i návrh experimentálních studií, jejichž cílem je objektivně posoudit ekologické výhody a nevýhody biodegradabilních polymerů. Zatímco v počátečních fázích degradace může docházet k uvolnění částic v podobném či dokonce vyšším množství než u ropných konvenčních plastů – a někdy i se srovnatelným toxickým účinkem – jejich zásadní výhodou zůstává nižší dlouhodobá perzistence v prostředí, což představuje významný potenciál pro zmírnění dopadů plastového znečištěn

Z ekonomického hlediska jsou tyto materiály stále nákladnější na výrobu než běžné plasty. Jejich využití dává smysl především v aplikacích, kde nelze zajistit sběr a recyklaci – např. v zemědělství, potravinářství nebo zdravotnictví.

Práce představuje krok směrem k vytvoření opakovatelné a flexibilní metody pro generování disperzí částic z biodegradabilních polymerů. Tato metoda umožňuje cíleně kontrolovat koncentraci i složení částic (např. změnou pH roztoku nebo rychlostí otáček při namáhání), a tím vytvořit základ pro budoucí testování jejich vlivů na různé složky životního prostředí. Do budoucna by bylo vhodné doplnit sledování hmotnostních úbytků, chemických změn (např. pomocí FTIR), testování ve skutečných environmentálních podmínkách (např. říční voda, kompost) a doplnit o biologické testy toxicity na modelových organismech. Srovnání výsledků s chováním běžných syntetických polymerů (např. PET) by rovněž mohlo přinést cenné informace o relativním přínosu a rizicích biodegradabilních plastů.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

DLS	dynamický rozptyl světla *(Dynamic Light Scattering)*
LA	kyselina mléčná *(Lactic Acid)*
lcl-PHA	polyhydroxyalkanoáty s dlouhým řetězcem *(long-chain-length polyhydroxyalkanoates)*
mcl-PHA	polyhydroxyalkanoáty se středním řetězcem *(medium-chain-length polyhydroxyalkanoates)*
PBAT	polybutylen-adipát-tereftalát
PBSA	polybutylen-sukcinát-adipát
P3HB3HV3HHx	poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát-co-3-hydroxyhexanoát)
PDLA	poly(D-laktid) *(poly-D-lactic acid)*
PHA	polyhydroxyalkanoáty
PHB	poly(3-hydroxybutyrát)
PHBHx	poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyhexanoát)
PHBO	poly(hydroxybutyrát-co-hydroxyoctanoát)
PHBV	poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát)
PLA	kyselina polymléčná *(polylaktid)*
PLLA	poly(L-laktid) *(poly-L-lactic acid)*
aPLA	amorfní kyselina polymléčná *(polylaktid)*
sPLA	semikrystalická kyselina polymléčná *(polylaktid)*
ROP	polymerace otevřením kruhu *(Ring-Opening Polymerization)*
rpm	revolutions per minute (*otáčky za minutu*)
scl-PHA	polyhydroxyalkanoáty s krátkým řetězcem *(short-chain-length polyhydroxyalkanoates)*
SEM	skenovací elektronová mikroskopie *(Scanning Electron Microscopy)*
SIC	krystalizace vyvolaná rozpouštědlem *(Solvent-Induced Crystallization)*
UV-VIS	ultrafialová a viditelná spektroskopie *(Ultraviolet-visible spectroscopy)*

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] BUGNICOURT, E.; CINELLI, P.; LAZZERI, A. a ALVAREZ, V. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. Online. *Express Polymer Letters*. 2014, roč. 8, č. 11, s. 791-808. ISSN 1788618X. Dostupné z: https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2014.82. [cit. 2025-01-01].

[2] IBRAHIM, Mohammad I.; ALSAFADI, Diya; ALAMRY, Khalid A. a HUSSEIN, Mahmoud A. Properties and Applications of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Biocomposites. Online. *Journal of Polymers and the Environment*. 2021, roč. 29, č. 4, s. 1010-1030. ISSN 1566-2543. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s10924-020-01946-x. [cit. 2025-01-01].

[3] DOPPALAPUDI, Sindhu; JAIN, Anjali; KHAN, Wahid a DOMB, Abraham J. Biodegradable polymers—an overview. Online. *Polymers for Advanced Technologies*. 2014, roč. 25, č. 5, s. 427-435. ISSN 1042-7147. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/pat.3305. [cit. 2025-01-01].

[4] REDDY, Murali M.; VIVEKANANDHAN, Singaravelu; MISRA, Manjusri; BHATIA, Sujata K. a MOHANTY, Amar K. Biobased plastics and bionanocomposites: Current status and future opportunities. Online. *Progress in Polymer Science*. 2013, roč. 38, č. 10-11, s. 1653-1689. ISSN 00796700. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.05.006. [cit. 2025-01-01].

[5] KUSUMA, Heri Septya; SABITA, Atna; PUTRI, Najla Anira; AZLIZA, Nadhira; ILLIYANASAFA, Nafisa et al. Waste to wealth: Polyhydroxyalkanoates (PHA) production from food waste for a sustainable packaging paradigm. Online. *Food Chemistry: Molecular Sciences*. 2024, roč. 9. ISSN 26665662. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.fochms.2024.100225. [cit. 2025-01-01].

[6] REHM, Bernd H. A. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. Online. *Biochemical Journal*. 2003, roč. 376, č. 1, s. 15-33. ISSN 0264-6021. Dostupné z: https://doi.org/10.1042/bj20031254. [cit. 2025-01-01].

[7] LU, Jingnan; TAPPEL, Ryan C. a NOMURA, Christopher T. Mini-Review: Biosynthesis of Poly(hydroxyalkanoates). Online. *Polymer Reviews*. 2009, roč. 49, č. 3, s. 226-248. ISSN 1558-3724. Dostupné z: https://doi.org/10.1080/15583720903048243. [cit. 2025-01-01].

[8] ZINN, M. a HANY, R. Tailored Material Properties of Polyhydroxyalkanoates through Biosynthesis and Chemical Modification. Online. *Advanced Engineering Materials*. 2005, roč. 7, č. 5, s. 408-411. ISSN 1438-1656. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/adem.200500053. [cit. 2025-01-01].

[9] ZHOU, Wen; BERGSMA, Simon; COLPA, Dana Irene; EUVERINK, Gert-Jan Willem a KROONEMAN, Janneke. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) synthesis and degradation by microbes and applications towards a circular economy. Online. *Journal of Environmental Management*. 2023, roč. 341. ISSN 03014797. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.118033. [cit. 2025-03-07].

[10] BHER, Anibal; MAYEKAR, Pooja C.; AURAS, Rafael A. a SCHVEZOV, Carlos E. Biodegradation of Biodegradable Polymers in Mesophilic Aerobic Environments. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, roč. 23, č. 20. ISSN 1422-0067. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/ijms232012165. [cit. 2025-04-10].

[11] FENG, Li; YAN, Jinyuan; JIANG, Zhitong; CHEN, Xue; LI, Zhoukun et al. Characterization of polyhydroxybutyrate (PHB) synthesized by newly isolated rare actinomycetes Aquabacterium sp. A7-Y. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023, roč. 232. ISSN 01418130. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123366. [cit. 2025-01-01].

[12] CASTRO-AGUIRRE, E.; IÑIGUEZ-FRANCO, F.; SAMSUDIN, H.; FANG, X. a AURAS, R. Poly(lactic acid)—Mass production, processing, industrial applications, and end of life. Online. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, roč. 107, s. 333-366. ISSN 0169409X. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.03.010. [cit. 2025-01-01].

[13] CHE, Lin; JIN, Wenbiao; ZHOU, Xu; HAN, Wei; CHEN, Yidi et al. Current status and future perspectives on the biological production of polyhydroxyalkanoates. Online. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*. 2023, roč. 18, č. 3. ISSN 1932-2135. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/apj.2899. [cit. 2025-03-06].

[14] KHOURI, Nadia G.; BAHÚ, Juliana O.; BLANCO-LLAMERO, Cristina; SEVERINO, Patricia; CONCHA, Viktor O.C. et al. Online. *Journal of Molecular Structure*. 2024, roč. 1309. ISSN 00222860. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2024.138243. [cit. 2025-01-01].

[15] TYLER, Betty; GULLOTTI, David; MANGRAVITI, Antonella; UTSUKI, Tadanobu a BREM, Henry. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. Online. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, roč. 107, s. 163-175. ISSN 0169409X. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.018. [cit. 2025-01-01].

[16] STEPHEN, Jain Maria a SALEH, Arabi Mohammed. Homofermentative Lactobacilli isolated from organic sources exhibit potential ability of lactic acid production. Online. *Frontiers in Microbiology*. 2023, roč. 14. ISSN 1664-302X. Dostupné z: https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1297036. [cit. 2025-01-01].

[17] SHRIVASTAV, Anupama; KIM, Hae-Yeong a KIM, Young-Rok. Advances in the Applications of Polyhydroxyalkanoate Nanoparticles for Novel Drug Delivery System. Online. *BioMed Research International*. 2013, roč. 2013, s. 1-12. ISSN 2314-6133. Dostupné z: https://doi.org/10.1155/2013/581684. [cit. 2025-03-06].

[18] DUBEY, Satya; ABHYANKAR, Hrushikesh; MARCHANTE, Veronica; BRIGHTON, James; BLACKBURN, Kim et al. Modelling and Validation of Synthesis of Poly Lactic Acid Using an Alternative Energy Source through a Continuous Reactive Extrusion Process. Online. *Polymers*. 2016, roč. 8, č. 4. ISSN 2073-4360. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/polym8040164. [cit. 2025-01-01].

[19] JAMSHIDIAN, Majid; TEHRANY, Elmira Arab; IMRAN, Muhammad; JACQUOT, Muriel a DESOBRY, Stéphane. Poly-Lactic Acid: Production, Applications, Nanocomposites, and Release Studies. Online. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2010, roč. 9, č. 5, s. 552-571. ISSN 1541-4337. Dostupné z: https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00126.x. [cit. 2025-01-01].

[20] PANG, Xuan; ZHUANG, Xiuli; TANG, Zhaohui a CHEN, Xuesi. Online. *Biotechnology Journal*. 2010, roč. 5, č. 11. ISSN 1860-6768. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/biot.201000135. [cit. 2025-01-01].

[21] GUPTA, Bhuvanesh; REVAGADE, Nilesh a HILBORN, Jöns. Poly(lactic acid) fiber: An overview. Online. *Progress in Polymer Science*. 2007, roč. 32, č. 4, s. 455-482. ISSN 00796700. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.01.005. [cit. 2025-01-01].

[22] SAINI, P.; ARORA, M. a KUMAR, M.N.V. Ravi. Poly(lactic acid) blends in biomedical applications. Online. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, roč. 107, s. 47-59. ISSN 0169409X. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.014. [cit. 2025-01-01].

[23] PRAJAPATI, Karan; NAYAK, Radhika; SHUKLA, Arpit; PARMAR, Paritosh; GOSWAMI, Dweipayan et al. Polyhydroxyalkanoates: An Exotic Gleam in the Gloomy Tale of Plastics. Online. *Journal of Polymers and the Environment*. 2021, roč. 29, č. 7, s. 2013-2032. ISSN 1566-2543. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s10924-020-02025-x. [cit. 2025-01-01].

[24] KHOSRAVI-DARANI, K. Application of Poly(hydroxyalkanoate) In Food Packaging: Improvements by Nanotechnology. Online. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. 2015, roč. 29, č. 2, s. 275-285. ISSN 03529568. Dostupné z: https://doi.org/10.15255/CABEQ.2014.2260. [cit. 2025-01-01].

[25] PEELMAN, Nanou; RAGAERT, Peter; DE MEULENAER, Bruno; ADONS, Dimitri; PEETERS, Roos et al. Application of bioplastics for food packaging. Online. 2013, roč. 32, č. 2, s. 128-141. ISSN 09242244. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.06.003. [cit. 2025-01-01].

[26] RAVINDRAN, Rajeev a JAISWAL, Amit K. Exploitation of Food Industry Waste for High-Value Products. Online. *Trends in Biotechnology*. 2016, roč. 34, č. 1, s. 58-69. ISSN 01677799. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.10.008. [cit. 2025-01-01].

[27] NIELSEN, Chad; RAHMAN, Asif; REHMAN, Asad Ur; WALSH, Marie K. a MILLER, Charles D. Food waste conversion to microbial polyhydroxyalkanoates. Online. *Microbial Biotechnology*. 2017, roč. 10, č. 6, s. 1338-1352. ISSN 1751-7915. Dostupné z: https://doi.org/10.1111/1751-7915.12776. [cit. 2025-01-01].

[28] KOLLER, Martin. Biodegradable and Biocompatible Polyhydroxy-alkanoates (PHA): Auspicious Microbial Macromolecules for Pharmaceutical and Therapeutic Applications. Online. *Molecules*. 2018, roč. 23, č. 2. ISSN 1420-3049. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/molecules23020362. [cit. 2025-01-01].

[29] WARD, Patrick G.; DE ROO, Guy a O'CONNOR, Kevin E. Accumulation of Polyhydroxyalkanoate from Styrene and Phenylacetic Acid by Pseudomonas putida CA-3. Online. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, roč. 71, č. 4, s. 2046-2052. ISSN 0099-2240. Dostupné z: https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.2046-2052.2005. [cit. 2025-03-06].

[30] LEE, Sang Yup; LEE, Yoo Kyung a CHANG, Ho Nam. Stimulatory effects of amino acids and oleic acid on poly(3-hydroxybutyric acid) synthesis by recombinant Escherichia coli. Online. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1995, roč. 79, č. 2, s. 177-180. ISSN 0922338X. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/0922-338X(95)94089-A. [cit. 2025-03-06].

[31] DOI, Yoshiharu; TAMAKI, Akira; KUNIOKA, Masao a SOGA, Kazuo. Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by Alcaligenes eutrophus from butyric and pentanoic acids. Online. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1988, roč. 28, č. 4-5, s. 330-334. ISSN 0175-7598. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/BF00268190. [cit. 2025-03-06].

[32] MENG, De-Chuan; SHEN, Rui; YAO, Hui; CHEN, Jin-Chun; WU, Qiong et al. Engineering the diversity of polyesters. Online. *Current Opinion in Biotechnology*. 2014, roč. 29, s. 24-33. ISSN 09581669. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.02.013. [cit. 2025-03-06].

[33] LIU, Qian; LUO, Ge; ZHOU, Xin Rong a CHEN, Guo-Qiang. Biosynthesis of poly(3-hydroxydecanoate) and 3-hydroxydodecanoate dominating polyhydroxyalkanoates by β-oxidation

pathway inhibited Pseudomonas putida. Online. *Metabolic Engineering*. 2011, roč. 13, č. 1, s. 11-17. ISSN 10967176. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.ymben.2010.10.004. [cit. 2025-03-06].

[34] LI, Mengyi; CHEN, Xiangbin; CHE, Xuemei; ZHANG, Haoqian; WU, Lin-Ping et al. Engineering Pseudomonas entomophila for synthesis of copolymers with defined fractions of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates. Online. *Metabolic Engineering*. 2019, roč. 52, s. 253-262. ISSN 10967176. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.12.007. [cit. 2025-03-06].

[35] TSUGE, Takeharu; TAGUCHI, Kazunori; SEIICHI; TAGUCHI a DOI, Yoshiharu. Molecular characterization and properties of (R)-specific enoyl-CoA hydratases from Pseudomonas aeruginosa: metabolic tools for synthesis of polyhydroxyalkanoates via fatty acid ß-oxidation. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2003, roč. 31, č. 4-5. ISSN 01418130. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/S0141-8130(02)00082-X. [cit. 2025-03-06].

[36] BUSTAMANTE, Daniel; SEGARRA, Silvia; TORTAJADA, Marta; RAMÓN, Daniel; DEL CERRO, Carlos et al. In silico prospection of microorganisms to produce polyhydroxyalkanoate from whey: Caulobacter segnis DSM 29236 as a suitable industrial strain. Online. *Microbial Biotechnology*. 2019, roč. 12, č. 3, s. 487-501. ISSN 1751-7915. Dostupné z: https://doi.org/10.1111/1751-7915.13371. [cit. 2025-03-06].

[37] BERWIG, Karina Hammel; BALDASSO, Camila a DETTMER, Aline. Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate) generated by Alcaligenes latus using lactose and whey after acid protein precipitation process. Online. *Bioresource Technology*. 2016, roč. 218, s. 31-37. ISSN 09608524. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.067. [cit. 2025-03-06].

[38] MOŻEJKO-CIESIELSKA, Justyna a POKOJ, Tomasz. Exploring nutrient limitation for polyhydroxyalkanoates synthesis by newly isolated strains of Aeromonas sp. using biodiesel-derived glycerol as a substrate. Online. *PeerJ*. 2018, roč. 6. ISSN 2167-8359. Dostupné z: https://doi.org/10.7717/peerj.5838. [cit. 2025-03-06].

[39] POBLETE-CASTRO, Ignacio; BINGER, Danielle; OEHLERT, Rene a ROHDE, Manfred. Comparison of mcl-Poly(3-hydroxyalkanoates) synthesis by different Pseudomonas putida strains from crude glycerol: citrate accumulates at high titer under PHA-producing conditions. Online. *BMC Biotechnology*. 2014, roč. 14, č. 1. ISSN 1472-6750. Dostupné z: https://doi.org/10.1186/s12896-014-0110-z. [cit. 2025-03-06].

[40] SHAMALA, T. R.; VIJAYENDRA, S.V.N. a JOSHI, G.J. Agro-industrial residues and starch for growth and co-production of polyhydroxyalkanoate copolymer and α-amylase by Bacillus sp. CFR-67. Online. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2012, roč. 43, č. 3, s. 1094-1102. ISSN 1517-8382. Dostupné z: https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000300036. [cit. 2025-03-06].

[41] HUANG, Ting-Yen; DUAN, Kow-Jen; HUANG, Shih-Yow a CHEN, C. Will. Production of polyhydroxyalkanoates from inexpensive extruded rice bran and starch by Haloferax mediterranei. Online. 2006, roč. 33, č. 8, s. 701-706. ISSN 1367-5435. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s10295-006-0098-z. [cit. 2025-03-06].

[42] OH, Young Hoon; LEE, Seung Hwan; JANG, Young-Ah; CHOI, Jae Woo; HONG, Kyung Sik et al. Development of rice bran treatment process and its use for the synthesis of polyhydroxyalkanoates from rice bran hydrolysate solution. Online. *Bioresource Technology*. 2015, roč. 181, s. 283-290. ISSN 09608524. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.075. [cit. 2025-03-06].

[43] GROSS, Richard A.; LENZ, Robert W. a FULLER, R. Clinton. Plastics from bacteria and for bacteria: Poly(β-hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters.

Online. *Microbial Bioproducts*. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. 1990, s. 77-93. ISBN 3-540-52569-6. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/BFb0010232. [cit. 2025-03-17].

[44] ROBERT, Jennifer L. a AUBRECHT, Katherine B. Ring-Opening Polymerization of Lactide To Form a Biodegradable Polymer. Online. *Journal of Chemical Education*. 2008, roč. 85, č. 2. ISSN 0021-9584. Dostupné z: https://doi.org/10.1021/ed085p258. [cit. 2025-03-07].

[45] MEEREBOER, Kjeld W.; MISRA, Manjusri a MOHANTY, Amar K. Review of recent advances in the biodegradability of polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastics and their composites. Online. *Green Chemistry*. 2020, roč. 22, č. 17, s. 5519-5558. ISSN 1463-9262. Dostupné z: https://doi.org/10.1039/D0GC01647K. [cit. 2025-03-17].

[46] HARTMANN, M. H. High Molecular Weight Polylactic Acid Polymers. Online. *Biopolymers from Renewable Resources*. 1998. ISBN 978-3-642-08341-9. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-662-03680-8_15. [cit. 2025-03-10].

[47] VAN DER HOEVEN, Diederik. *PHA: promising, versatile, biodegradable*. Online. In: Bio Based Press. 21 August 2016. Dostupné z: https://www.biobasedpress.eu/2016/08/pha-promising-versatile-biodegradable/. [cit. 2025-03-20].

[48] XIAO, Lin; WANG, Bo; YANG, Guang a GAUTHIER, Mario. Poly(Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications. Online. *Biomedical Science, Engineering and Technology*. 2012. ISBN 978-953-307-471-9. Dostupné z: https://doi.org/10.5772/23927. [cit. 2025-03-10].

[49] EMADIAN, S. Mehdi; ONAY, Turgut T. a DEMIREL, Burak. Biodegradation of bioplastics in natural environments. Online. *Waste Management*. 2017, roč. 59, s. 526-536. ISSN 0956053X. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.10.006. [cit. 2025-03-11].

[50] LUCAS, Nathalie; BIENAIME, Christophe; BELLOY, Christian; QUENEUDEC, Michèle; SILVESTRE, Françoise et al. Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques – A review. Online. *Chemosphere*. 2008, roč. 73, č. 4, s. 429-442. ISSN 00456535. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.06.064. [cit. 2025-03-11].

[51] ANSTEY, Andrew; MUNIYASAMY, Sudhakar; REDDY, Murali M.; MISRA, Manjusri a MOHANTY, Amar. Processability and Biodegradability Evaluation of Composites from Poly(butylene succinate) (PBS) Bioplastic and Biofuel Co-products from Ontario. Online. *Journal of Polymers and the Environment*. 2014, roč. 22, č. 2, s. 209-218. ISSN 1566-2543. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s10924-013-0633-8. [cit. 2025-03-20].

[52] CHAUDHRY, Waqas Nasir; JAMIL, Nazia; ALI, Iftikhar; AYAZ, Mian Hashim a HASNAIN, Shahida. Screening for polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacterial strains and comparison of PHA production from various inexpensive carbon sources. Online. *Annals of Microbiology*. 2011, roč. 61, č. 3, s. 623-629. ISSN 1590-4261. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s13213-010-0181-6. [cit. 2025-03-11].

[53] LEE, Gi a NA, Jonguk. Future of microbial polyesters. Online. *Microbial Cell Factories*. 2013, roč. 12, č. 1. ISSN 1475-2859. Dostupné z: https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-54. [cit. 2025-03-11].

[54] CHOI, J. a LEE, S. Y. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. Online. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1999, roč. 51, č. 1, s. 13-21. ISSN 0175-7598. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s002530051357. [cit. 2025-03-11].

[55] CHANPRATEEP, Suchada. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. Online. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2010, roč. 110, č. 6, s. 621-632. ISSN 13891723. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.07.014. [cit. 2025-03-11].

[56] KHANNA, Shilpi a SRIVASTAVA, Ashok K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. Online. *Process Biochemistry*. 2005, roč. 40, č. 2, s. 607-619. ISSN 13595113. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.053. [cit. 2025-03-11].

[57] URTUVIA, Viviana, Pamela VILLEGAS, Myriam GONZÁLEZ a Michael SEEGER. Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates. International Journal of Biological Macromolecules[online]. Elsevier B.V, 2014, 70, 208-213 [cit. 2018-12-02]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.06.001. ISSN 0141-8130.

[58] KIM, Beom Soo. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. Online. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000, roč. 27, č. 10, s. 774-777. ISSN 01410229. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00299-4. [cit. 2025-03-11].

[59] RAZA, Zulfiqar Ali; ABID, Sharjeel a BANAT, Ibrahim M. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. Online. 2018, roč. 126, s. 45-56. ISSN 09648305. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.10.001. [cit. 2025-03-11].

[60] SOONG, Ya-Hue Valerie; SOBKOWICZ, Margaret J. a XIE. Online. *Bioengineering*. 2022, roč. 9, č. 3. ISSN 2306-5354. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/bioengineering9030098. [cit. 2025-03-15].

[61] GRIZZI, I.; GARREAU, H.; LI, S. a VERT, M. Hydrolytic degradation of devices based on poly(dl-lactic acid) size-dependence. Online. *Biomaterials*. 1995, roč. 16, č. 4, s. 305-311. ISSN 01429612. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/0142-9612(95)93258-F. [cit. 2025-03-15].

[62] ALSABRI, Amzan; TAHIR, Furqan a AL-GHAMDI, Sami G. Environmental impacts of polypropylene (PP) production and prospects of its recycling in the GCC region. Online. *Materials Today: Proceedings*. 2022, roč. 56, s. 2245-2251. ISSN 22147853. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.11.574. [cit. 2025-03-15].

[63] PALMER, Kevin J.; LAUDER, Kerri; CHRISTOPHER, Kyeshaun; GUERRA, Fatima; WELCH, Rebecca et al. Biodegradation of Expanded Polystyrene by Larval and Adult Stages of Tenebrio molitor with Varying Substrates and Beddings. Online. *Environmental Processes*. 2022, roč. 9, č. 1. ISSN 2198-7491. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s40710-021-00556-6. [cit. 2025-03-15].

[64] *Hodnocení rozkladu různých typů degradovatelných plastů v laboratorních podmínkách kompostování*. Online, Diplomová práce, vedoucí Mgr. Ing. Magdalena Daria Vaverková, Ph.D. Brno: Mendelova univerzita, 2015. Dostupné z: https://theses.cz/id/g57z78/zaverecna_prace.pdf?utm_source=chatgpt.com. [cit. 2025-03-15].

[65] RAMAKRISHNA, S; MAYER, J; WINTERMANTEL, E a LEONG, Kam W. Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. Online. *Composites Science and Technology*. 2001, roč. 61, č. 9, s. 1189-1224. ISSN 02663538. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/S0266-3538(00)00241-4. [cit. 2025-03-16].

[66] H., Tsuji. *Hydrolytic Degradation*. Online. Copyright 2014 Elsevier B.V., 2010. ISBN 978-047029366-9. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/9780470649848.ch21. [cit. 2025-03-21].

[67] MARQUAL IT SOLUTIONS PVT. LTD (KBV RESEARCH). *Polyhydroxyalkanoate (PHA) Market Size, Share & Trends Analysis Report By Type, By Production Method (Sugar Fermentation,*

Vegetable Oil Fermentation, and Methane Fermentation), By Application, By Regional Outlook and Forecast, 2024 - 2031. Online. July 2024. Dostupné z: https://www.researchandmarkets.com/reports/5988739/polyhydroxyalkanoate-pha-market-size-share-and. [cit. 2025-03-17].

[68] DE JONG, S.J; ARIAS, E.R; RIJKERS, D.T.S; VAN NOSTRUM, C.F; KETTENES-VAN DEN BOSCH, J.J et al. New insights into the hydrolytic degradation of poly(lactic acid): participation of the alcohol terminus. Online. *Polymer*. 2001, roč. 42, č. 7, s. 2795-2802. ISSN 00323861. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00646-7. [cit. 2025-03-21].

[69] TOKIWA, Yutaka; CALABIA, Buenaventurada P.; UGWU, Charles U. a AIBA, Seiichi. Biodegradability of Plastics. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2009, roč. 10, č. 9, s. 3722-3742. ISSN 1422-0067. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/ijms10093722. [cit. 2025-03-17].

[70] BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. Online. *Bioresource Technology*. 2000, roč. 74, č. 1, s. 63-67. ISSN 09608524. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00144-3. [cit. 2025-03-17].

[71] LEE, Sang Yup. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. Online. *Trends in Biotechnology*. 1996, roč. 14, č. 11, s. 431-438. ISSN 01677799. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)10061-5. [cit. 2025-03-17].

[72] MERGAERT, J a SWINGS, J. Biodiversity of microorganisms that degrade bacterial and synthetic polyesters. Online. 1996, roč. 17, č. 5-6, s. 463-469. ISSN 0169-4146. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/BF01574777. [cit. 2025-03-17].

[73] SUYAMA, Tetsushi; TOKIWA, Yutaka; OUICHANPAGDEE, Pornpimol; KANAGAWA, Takahiro a KAMAGATA, Yoichi. Phylogenetic Affiliation of Soil Bacteria That Degrade Aliphatic Polyesters Available Commercially as Biodegradable Plastics. Online. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998, roč. 64, č. 12, s. 5008-5011. ISSN 0099-2240. Dostupné z: https://doi.org/10.1128/AEM.64.12.5008-5011.1998. [cit. 2025-03-17].

[74] YUP LEE, Sang. Bacterial polyhydroxyalkanoates. Online. *Biotech nology and Bioengineering*. 1996, vol. 49, no. 1, s. 1-14. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960105)49:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-P. [cit. 2025-03-17].

[75] TOKIWA, Yutaka; IWAMOTO, Akira; KOYAMA, Masatoshi; KATAOKA, Naoaki a NISHIDA, Haruo. Biological recycling of plastics containing ester bonds. Online. *Makromolekulare Chemie. Macromolecular Symposia*. 1992, roč. 57, č. 1, s. 273-279. ISSN 0258-0322. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/masy.19920570125. [cit. 2025-03-17].

[76] SANCHEZ, James G.; TSUCHII, Akio a TOKIWA, Yutaka. Online. *Biotechnology Letters*. Roč. 22, č. 10, s. 849-853. ISSN 01415492. Dostupné z: https://doi.org/10.1023/A:1005603112688. [cit. 2025-03-17].

[77] SATO, Shuichi; GONDO, Daiki; WADA, Takayuki; KANEHASHI, Shinji a NAGAI, Kazukiyo. Effects of various liquid organic solvents on solvent-induced crystallization of amorphous poly(lactic acid) film. Online. *Journal of Applied Polymer Science*. 2013, roč. 129, č. 3, s. 1607-1617. ISSN 0021-8995. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/app.38833. [cit. 2025-03-21].

[78] *Stárnutí polymerů*. Online. In: Publi.cz. 2021. Dostupné z: https://publi.cz/books/180/16.html. [cit. 2025-03-21].

[79] IOVINO, R. a ZULLO, R. Online. *Polymer Degradation and Stability*. 2008, roč. 93, č. 1. ISSN 01413910. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2007.10.011. [cit. 2025-03-21].

[80] *Polymer*. Online. 1996, roč. 37, č. 4. 1996. ISSN 00323861. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0032386196831521. [cit. 2025-03-21].

[81] GONZÁLEZ-PLEITER, Miguel; TAMAYO-BELDA, Miguel; PULIDO-REYES, Gerardo; AMARIEI, Georgiana; LEGANÉS, Francisco et al. Secondary nanoplastics released from a biodegradable microplastic severely impact freshwater environments. Online. *Environmental Science: Nano*. 2019, roč. 6, č. 5, s. 1382-1392. ISSN 2051-8153. Dostupné z: https://doi.org/10.1039/C8EN01427B. [cit. 2025-03-27].

[82] SINTIM, Henry Y.; BARY, Andy I.; HAYES, Douglas G.; WADSWORTH, Larry C.; ANUNCIADO, Marife B. et al. Online. *Science of The Total Environment*. 2020, roč. 727. ISSN 00489697. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138668. [cit. 2025-03-30].

[83] SERRANO-RUÍZ, H.; MARTÍN-CLOSAS, L. a PELACHO, A.M. Online. *Polymer Degradation and Stability*. 2018, roč. 158. ISSN 01413910. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2018.10.016. [cit. 2025-03-30].

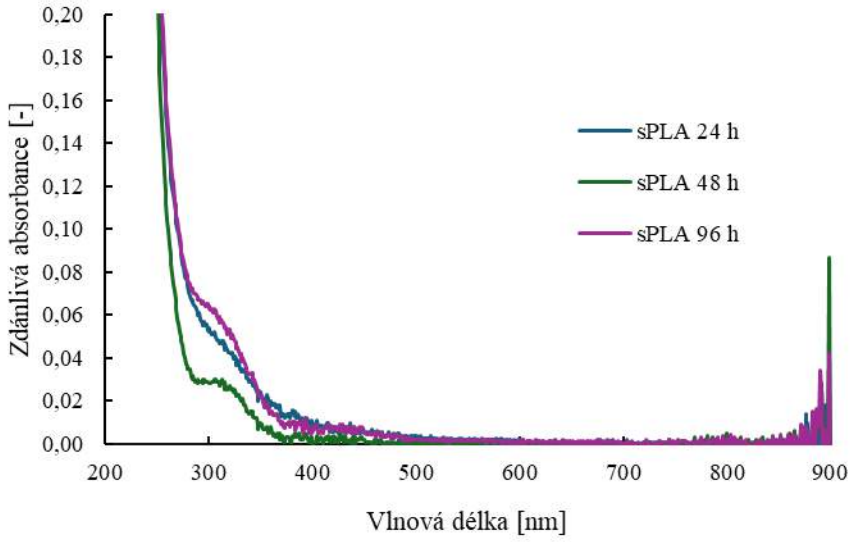
[84] ZIMMERMANN, Lisa; DOMBROWSKI, Andrea; VÖLKER, Carolin a WAGNER, Martin. Are bioplastics and plant-based materials safer than conventional plastics? In vitro toxicity and chemical composition. Online. *Environment International*. 2020, roč. 145. ISSN 01604120. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106066. [cit. 2025-03-30].

[85] URIBE-ECHEVERRÍA, Teresa a BEIRAS, Ricardo. Acute toxicity of bioplastic leachates to Paracentrotus lividus sea urchin larvae. Online. *Marine Environmental Research*. 2022, roč. 176. ISSN 01411136. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2022.105605. [cit. 2025-03-30].

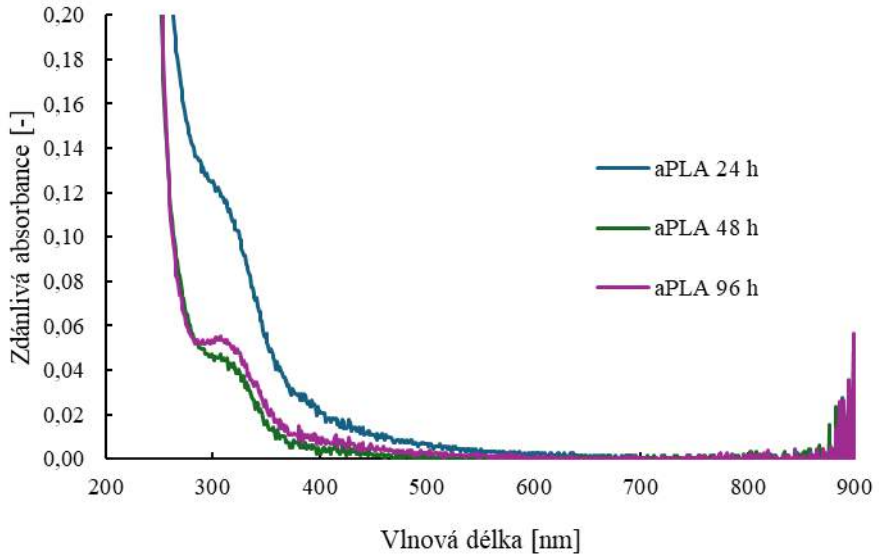
[86] KHOURI, Nadia G.; BAHÚ, Juliana O.; BLANCO-LLAMERO, Cristina; SEVERINO, Patricia; CONCHA, Viktor O.C. et al. Polylactic acid (PLA): Properties, synthesis, and biomedical applications – A review of the literature. Online. *Journal of Molecular Structure*. 2024, roč. 1309. ISSN 00222860. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2024.138243. [cit. 2025-04-15].

8 PŘÍLOHY

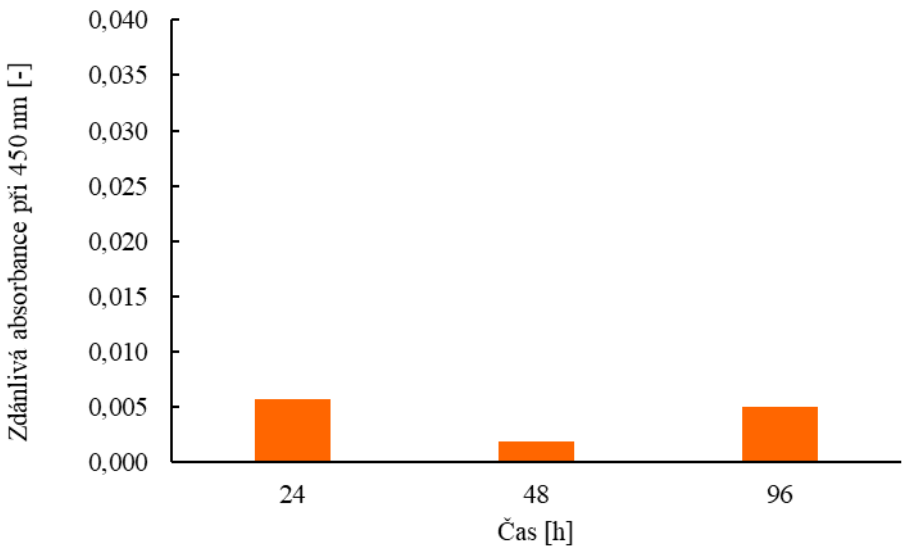
8.1 Data z prvního experimentu



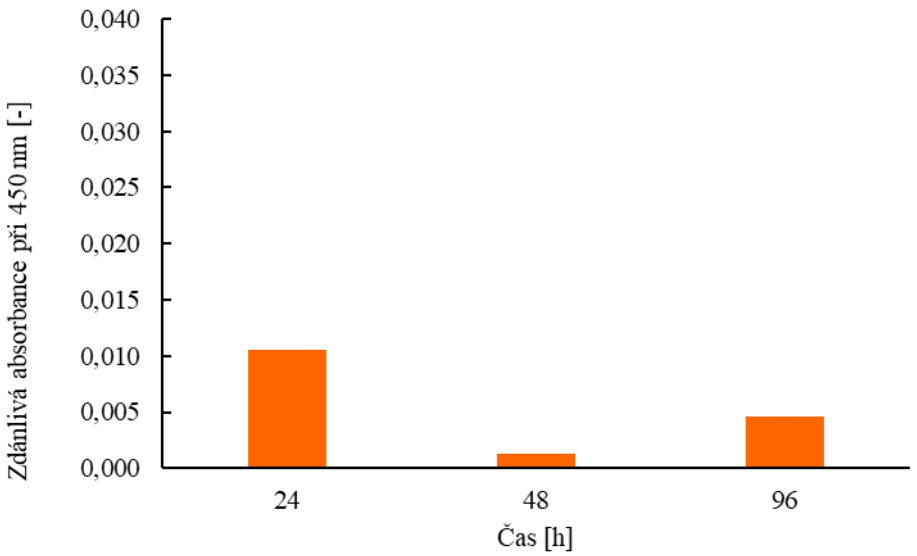
Graf 30: Absorpční spektrum roztoků po namáhání sPLA z prvního experimentu



Graf 31: Absorpční spektrum roztoků po namáhání aPLA z prvního experimentu

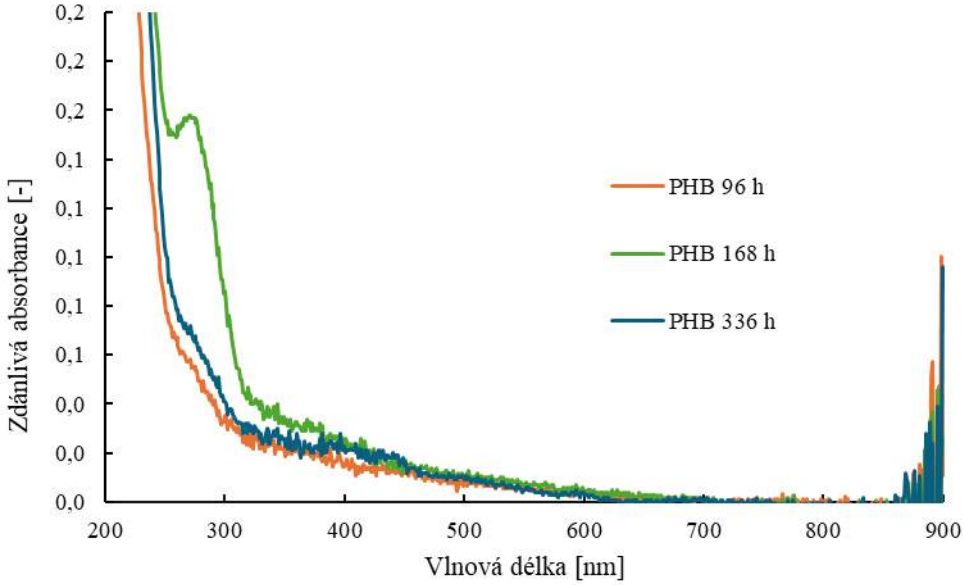


Graf 32: Vývoj zdánlivé absorbance při 450 nm roztoků po namáhání sPLA z prvního experiment

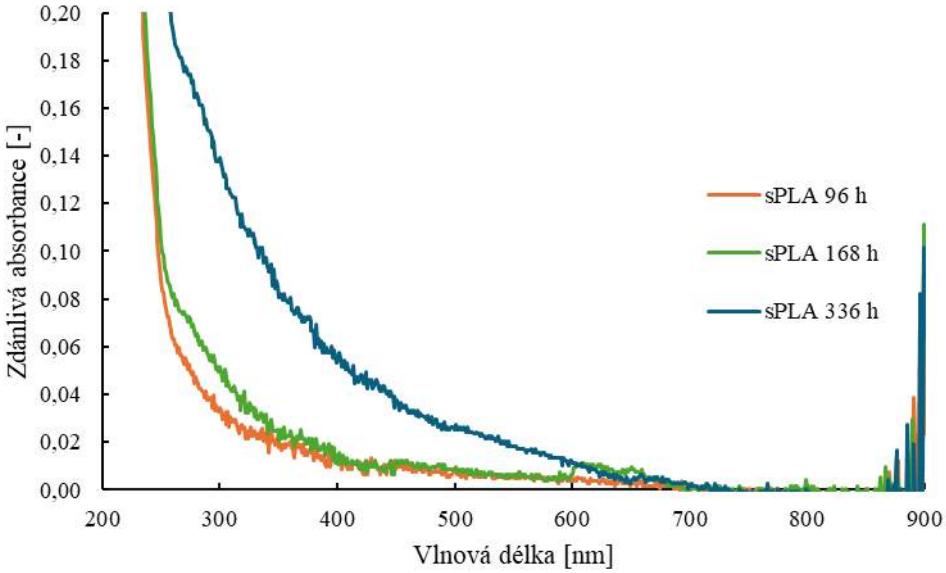


Graf 33: Vývoj zdánlivé absorbance při 450 nm roztoků po namáhání aPLA z prvního experiment

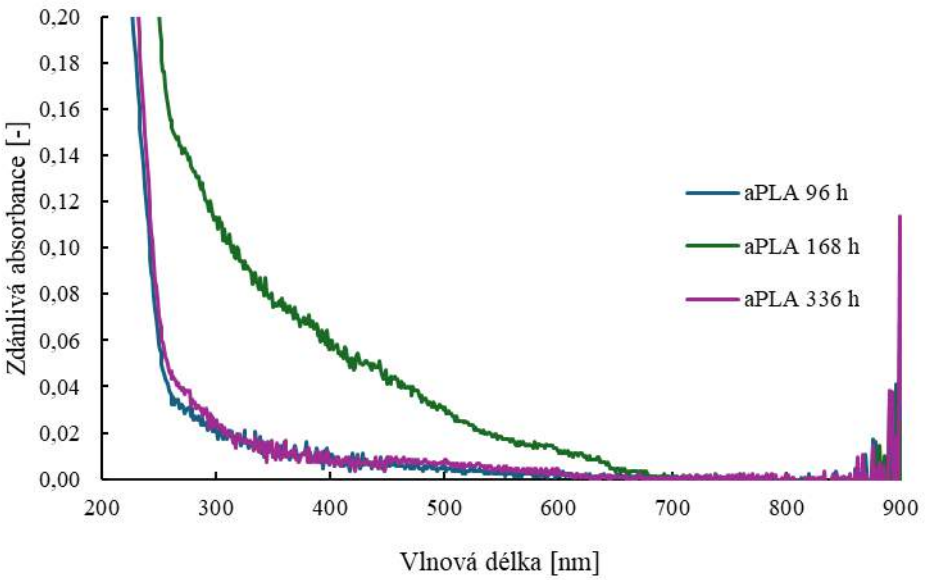
8.2 Data z druhého experimentu



Graf 34: Absorpční spektrum roztoků po namáhání PHB z druhého experimentu

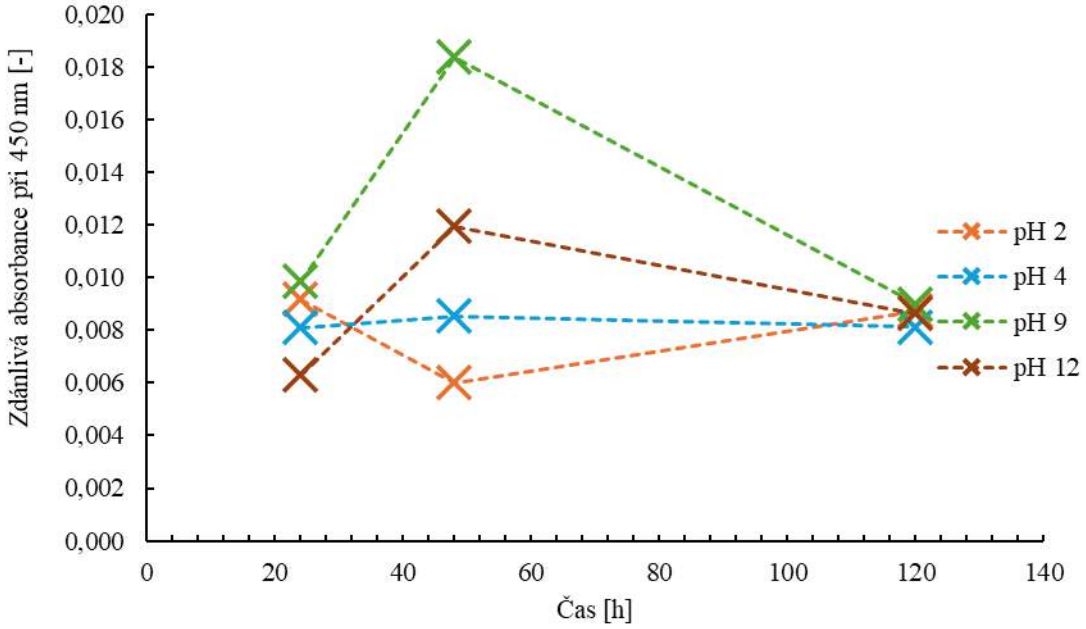


Graf 35: Absorpční spektrum roztoků po namáhání sPLA z druhého experimentu

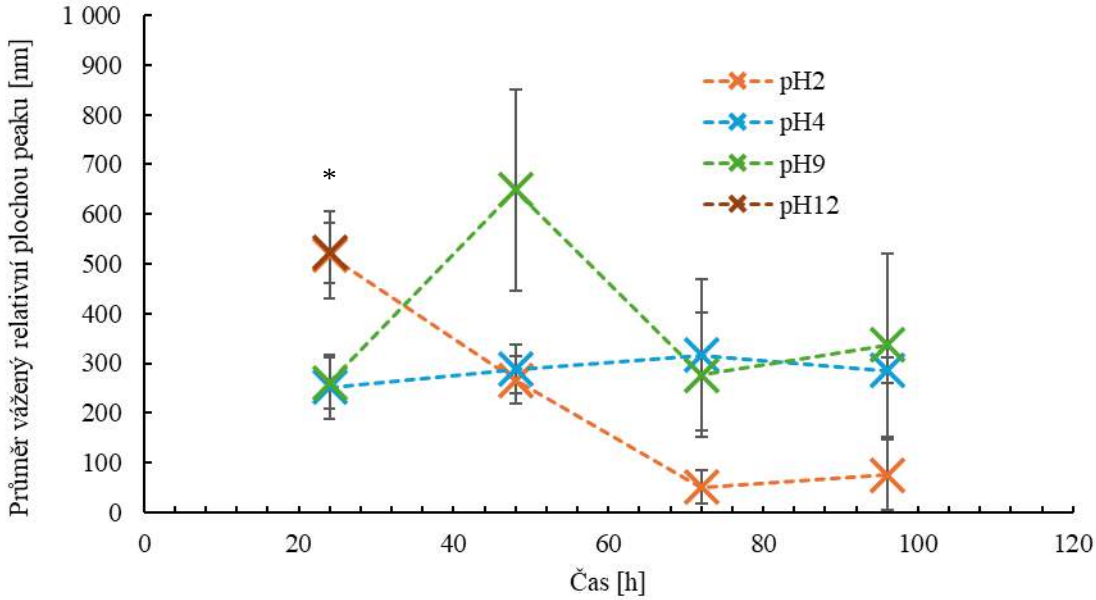


Graf 36: Absorpční spektrum roztoků po namáhání aPLA z druhého experimentu

8.3 Data z třetího experimentu

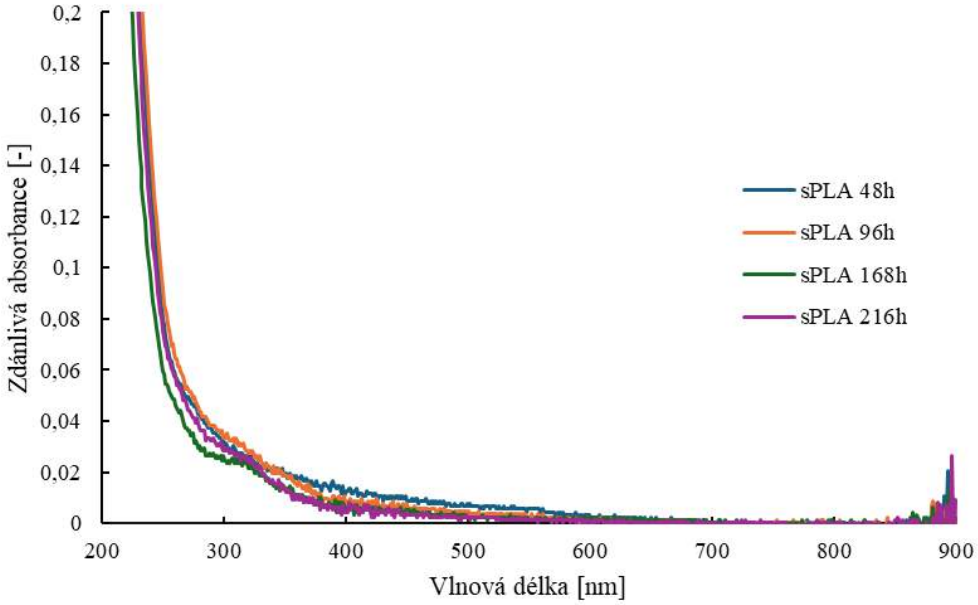


Graf 37: Vývoj zdánlivé absorbance při 450 nm roztoků po namáhání aPLA ve všech pH

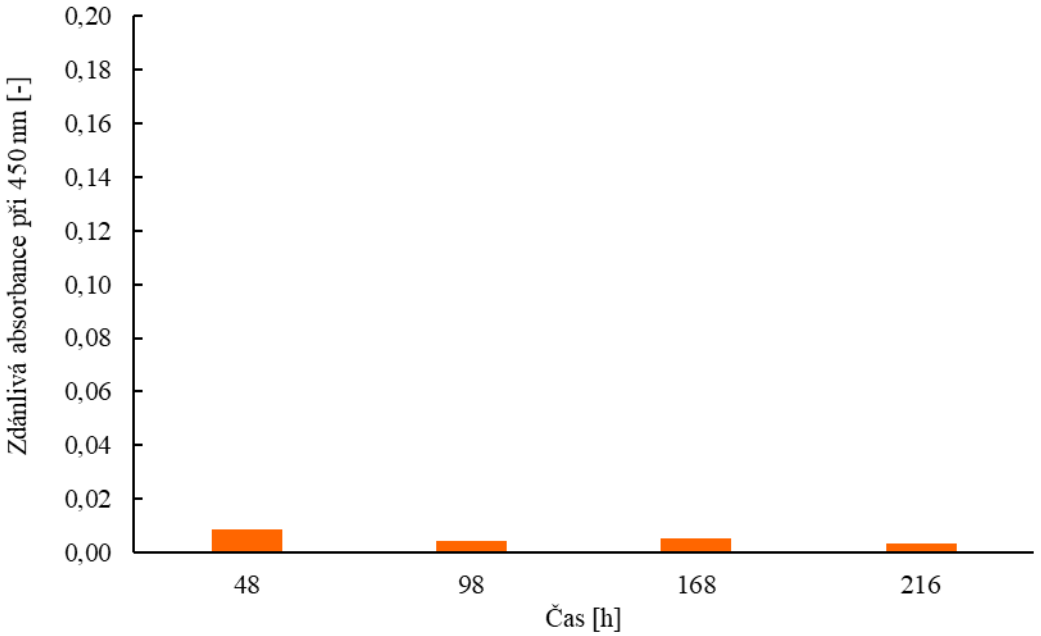


Graf 38: Časový vývoj vážené velikosti částic získaných z DLS roztoků po namáhání PHB v různých pH (** Pozn. u pH 12 došlo po 24 hodinách k úplné destrukci materiálu*)

8.4 Data ze čtvrtého experimentu

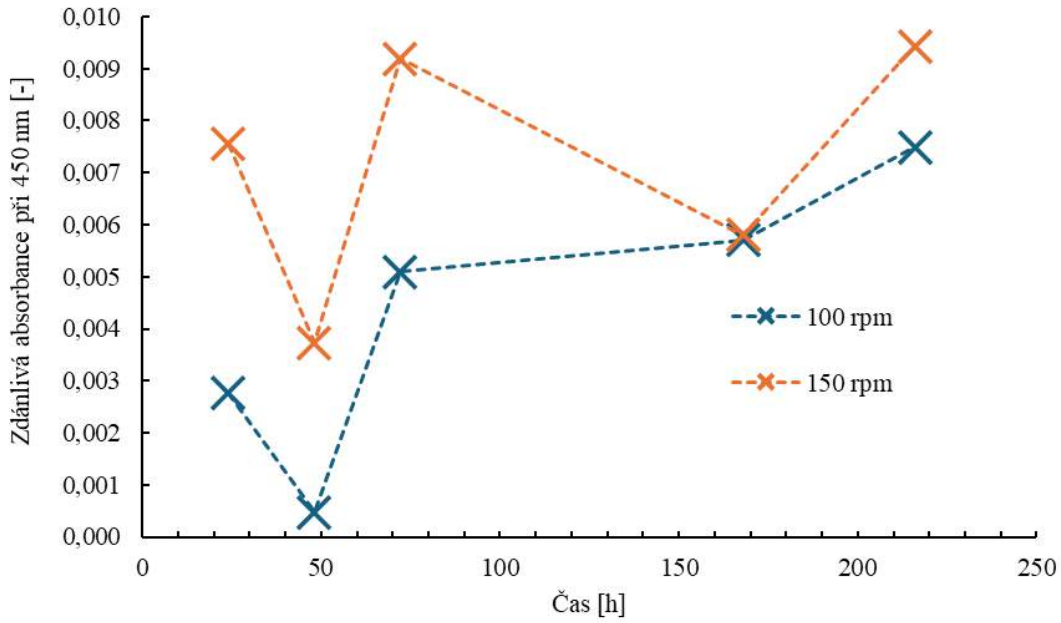


Graf 39: Absorpční spektrum roztoků po namáhání sPLA ze čtvrtého experimentu



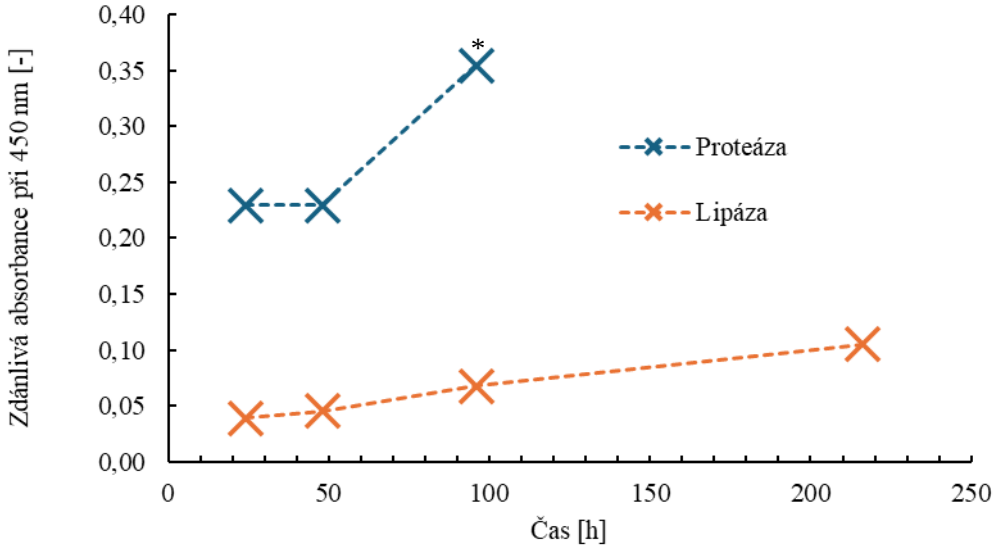
Graf 40: Vývoj zdánlivé absorbance při 450 nm roztoků po namáhání sPLA ze čtvrtého experimentu

8.5 Data z pátého experimentu

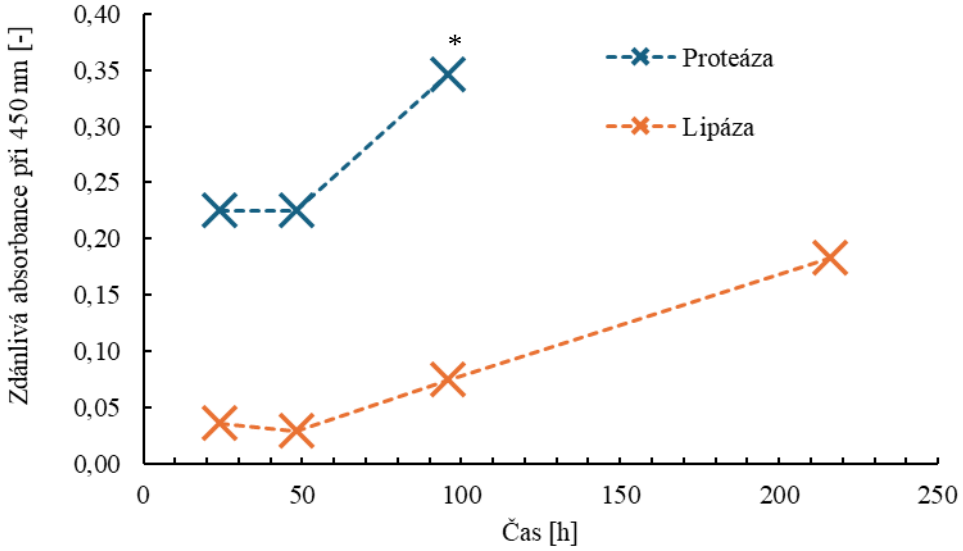


Graf 41: Závislost zdánlivé absorbance při 450 nm na čase pro obě rychlosti otáček roztoků po namáhání sPLA

8.6 Data z šestého experimentu



Graf 42: Vývoj zdánlivé absorbance při 450 nm roztoků po degradaci aPLA enzymy
(** Pozn. vzorek byl tak zakalený, že ho nebylo možné na přístroji změřit*)



Graf 43: Vývoj zdánlivé absorbance při 450 nm roztoků po degradaci sPLA enzymy
(** Pozn. vzorek byl tak zakalený, že ho nebylo možné na přístroji změřit*)