



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Dizertační práce

**Využití stanovení plyných produktů pomocí
plynové chromatografie ke sledování
biodegradačních procesů s přihlédnutím
k materiálovým vlastnostem makromolekulárních
substrátů**

**Determination of gaseous products by gas chromatography for the
monitoring of biodegradation processes with the consideration of properties
of the macromolecular substrates investigated**

Autor: **Ing. Silvie Pekařová**

Studijní program: Chemie a technologie materiálů (P2808)

Studijní obor: Technologie makromolekulárních látek (2808V006)

Školitel: prof. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.

Zlín, 2018

© Silvie Pekařová

Vydala **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně** v edici **Doctoral Thesis**.
Publikace byla vydána v roce 2018.

Práce je dostupná v Knihovně UTB ve Zlíně.

Motto:

„Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less. “

[Marie-Curie Skłodovská]

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli prof. Mgr. Marku Koutnému, Ph.D. za jeho profesionální vedení, vytvoření skvělého výzkumného a studijního prostředí, otevřenost k diskuzím a ochotu sdílet jeho znalosti se mnou po celou dobu doktorského studia. Ráda bych také poděkovala paní Ing. Marii Dvořáčkové, Ph.D. za poskytování cenných rad, připomínek a času, který mi v průběhu studia věnovala. V neposlední řadě patří mé poděkování kolegům z Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí plného pozitivní motivace a podpory. Zvláštní poděkování patří mé rodině a přátelům, za jejich porozumění, trpělivost a povzbuzování po celý čas mých studijních let.

Tato práce vznikla za podpory interních grantů Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně (IGA/FT/2013/013, IGA/FT/2014/005, IGA/FT/2015/012, IGA/FT/2016/012).

ABSTRAKT

První část disertační práce je zaměřena především na studium biodegradačních procesů v anaerobním prostředí. Jednotlivé kapitoly teoretické části této práce se zabývají anaerobní fermentací, při níž je hojně využívána rostlinná biomasa, dále možnostmi předúpravy biomasy a konečně látkami, které mohou v rámci těchto předúprav vznikat a působit tak potenciálně inhibičně na obsah methanu v bioplynu. Pro samotné experimenty byly na základě studií vybrány inhibiční látky furfural, 5-hydroxymethylfurfural, kyselina galová a třísllová a byl sledován jejich vliv na produkci methanu. Největší míru inhibice produkce methanu prokázal 5-hydroxymethylfurfural již při koncentraci 0,2 g/l a následně pak furfural v koncentraci od 1 g/l. Kyselina galová a třísllová neovlivnily produkci methanu, jejich přidavkem byla spíše podpořena.

Druhá část práce je zaměřena na sledování biodegradačních procesů kyseliny polymléčné a jejich směsí v kompostu. V teoretické části jsou stručně popsány vlastnosti, výroba a využití kyseliny polymléčné (PLA), možnosti modifikace PLA přidavkem různých latek, kterými může docházet ke zlepšení jejich mechanických, chemických či fyzikálních vlastností. V experimentální části práce je popsána morfologie vyrobených směsných materiálů s PLA a následná biodegradace těchto materiálů v kompostu. Látky použité na přípravu směsných filmů byly triacetin, kyselina polyhydroxymáselná a sedm různých komerčně dostupných nemodifikovaných nebo organomodifikovaných montmorillonitů. Výrazné zrychlení biodegradace oproti čisté PLA bylo zaznamenáno u směsi PLA/Cloisite 10A, vzhledem k jeho dobré interkalaci a homogení disperzi vrstev oxidu křemičitého v polymerní matici.

Třetí, neméně významnou kapitolou je studium materiálů na bázi škrobu a jejich biologická degradace v prostředí kompostu. Tyto materiály byly připraveny různými postupy výroby, s různým stupněm modifikace a obsahem celulosových vláken. V části teoretické je stručně shrnuta problematika škrobu a jeho modifikace, v experimentální části pak průběh biodegradace těchto materiálů v závislosti na jejich složení v kompostu. V souvislosti se škrobovými materiály bylo zjišťováno složení mikrobiálního konsorcia pomocí molekulárně biologických metod. Na základě získaných výsledků bylo identifikováno mikrobiální konsorcium podílející se na biodegradaci těchto materiálů, kde byly zastoupeny převážně bakterie rodů *Tuberibacillus*, *Geobacillus* a *Alicyclobacillus*.

Klíčová slova: *bioplyn, methan, inhibice, biodegradace, kyselina polymléčná, plynová chromatografie, škrob, nanojíly*

ABSTRACT

First part of this thesis is looking at the study of the biodegradation processes on anaerobic environment. Each chapter of the theoretical part is concerning the anaerobic fermentation, where the plant biomass is used in large. And finally, the substances, which could in this case of the preparations appear and cause a potential inhibition to the biogas production. Based on the study were for the experiment purposes chosen the inhibition substances furfural, 5-hydroxymethylfurfural, gallic acid, and tannic acid and the influence of these substances on the production of methan in biogas has been observed. The highest inhibition in/of production of methan has been proved to appear with 5-hydroxymethylfurfural, already at 0,2 g/l and further then furfural in concentration from 1 g/l. It was observed that gallic and tannic acid did not influence the production of methan in biogas, moreover the production of methan was supported by the addition of these to acids.

Second part of the this work is focusing on observation of the biodegradable processes of polylactic acid and its compounds in compost. In the theoretical part the brief description of the character, process and the application of polylactic acid (PLA) as well as the possibilities of modification of PLA with the addition of different substances, that can improve its mechanical, chemical or physical properties. In the experimental part is described morphology of the produced mixed materials and subsequently their biodegradation in compost is looked at. The substances used for the preparation of mixed films were triacetin, polyhydroxybutyrate and seven other commercially accessible non-modified or organo-modified montmorillonite. Significant acceleration of biodegradation was noted with the mixtures PLA/Cloisite 10A compare to the pure PLA. Due to its easy intercalation and homogenic dispersion of silicon dioxide layers in polymer matrix.

Third, no less significant part is a chapter studying the starch-based materials and its biological degradation in the compost environment. These materials were prepared using different production processes, with different degree of modification and content of cellulose fibres. In the theoretical part the problematic of starch and its modification is briefly summarised. In the experimental part, the biodegradation of those materials in connection to its composition in compost is described. In connection to the starch materials, the composition of microbial consortium using the molecular biological methods was determined. On the bases from the gained results the microbial consortium contributing to the biodegradation of those materials was identified and was predominantly represented by bacteria *Tuberibacillus*, *Geobacillus* and *Alicyclobacillus*.

Keywords: *biogas, methane, inhibition, biodegradation, polylactic acid, gas chromatography, starch, nanoclays*

OBSAH

ABSTRAKT	5
ABSTRACT	6
OBSAH	7
1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	9
1.1 Sledování vlivu inhibičních látek na obsah methanu v bioplynu v průběhu anaerobní fermentace	10
1.1.1 Fáze anaerobní fermentace	10
1.1.2 Substráty pro bioplynové stanice	12
1.1.3 Struktura ligninocelulosoých materiálů	12
1.1.4 Předúprava rostlinné biomasy	13
1.1.5 Inhibiční látky	15
1.2 Biodegradace polymerů	17
1.2.1 Kyselina polymléčná	17
1.2.2 Směsi PLA/PHB	20
1.2.3 Směsi PLA s jílovými nanočásticemi	21
1.3 Biodegradace materiálů s obsahem termoplastického škrobu	23
1.3.1 Škrob a jeho modifikace	23
1.4 Plynová chromatografie	24
2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	27
3. MATERIÁL A METODIKA	28
3.1 Materiál	28
3.1.1 Biologický materiál a chemikálie použité při sledování inhibice produkce methanu	28
3.1.2 Biologický materiál a chemikálie použité při sledování biodegradace směsí PLA v kompostu	28
3.1.3 Materiály a chemikálie použité při sledování biodegradace materiálů na bázi termoplastického škrobu	30
3.1.4 Minerální média a roztoky	30
3.1.1 Laboratorní přístroje a pomůcky	31

3.2	Metodika	32
3.2.1	Inhibiční testy	32
3.2.2	Biodegradace PLA a PLA směsí v kompostu	35
3.2.3	Biodegradace materiálů na bázi termoplastického škrobu.....	40
3.2.4	Molekulárně biologické metody	41
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE	45
4.1	Produkce methanu obsaženého v bioplynu v přítomnosti vybraných inhibičních látek	45
4.1.1	Inhibiční efekt furfuralu a 5-hydroxymethylfurfuralu na produkci methanu.....	45
4.1.2	Inhibiční efekt kyseliny galové a tříslové na produkci methanu ..	50
4.2	Biodegradace kyseliny polymléčné a jejich směsí v podmínkách kompostu	54
4.2.1	Biodegradace směsí PLA/PHB v kompostu	54
4.2.2	Biodegradace PLA a směsí PLA nanokompozitů v kompostu....	56
4.2.3	Biodegradační test vyrobených filmů v kompostu	60
4.3	Biodegradace materiálů na bázi termoplastického škrobu	65
4.3.1	Příprava a morfologie termoplastických materiálů na bázi škrobu	65
4.3.2	Aerobní biodegradace vzorků v prostředí kompostu	67
4.3.3	Mikrobiální analýza degradujících bakterií ve vybraných vzorcích v kompostu a jejich identifikace.....	71
5.	ZÁVĚR.....	74
6.	PŘÍNOS PRO VĚDU A PRAXI.....	76
7.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	77
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	98
9.	SEZNAM TABULEK.....	100
10.	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	101
11.	CURRICULUM VITAE.....	103
12.	SEZNAM PUBLIKACÍ.....	105

1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Během minulého století vyvolal alarmující nárůst plastového odpadu značný zájem, protože představuje závažný problém pro životní prostředí. Začala celosvětová výzkumná činnost, která vedla k několika akcím a strategiím, jak se tomuto problému vyhnout a zabránit dalšímu růstu tohoto odpadu (Rudnik *et al.*, 2008) Proto je rostoucí zájem o nové materiály s dobrými zpracovatelskými vlastnostmi, které mohou nahradit syntetické plastové materiály v řadě průmyslových aplikací, převážně v zemědělství a v obalovém průmyslu. Možným řešením a alternativou k běžným polymerům jsou biodegradabilní polymery, které mohou být rozloženy mikroorganismy bez negativních dopadů na životní prostředí. Biopolymery zahrnují přírodní polymery z rostlin, jako je škrob, polymery jejichž monomery mají přirozený původ, jako je kyselina polymléčná a samozřejmě mnoho dalších (Rychter *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2009).

Dalším diskutovaným tématem je produkce bioplynu z cíleně pěstované rostlinné biomasy, která je složena z celulosy, hemicelulosy, ligninu a dalších organických látek. Lignocelulosová struktura je odolná vůči anaerobní fermentaci, vzhledem k velké asociaci mezi ligninem a hemicelulosou a je potřeba ji předupravit. Jednou z možných metod předúpravy je termicko-expanzní hydrolyza, kde je substrát zpracováván pod vysokým tlakem a teplotou. Cílem je dosáhnout dostatečné solubilizace lignocelulozy pro zvýšení hydrolyzy a tím její přístupnosti pro mikroorganismy (Bruni *et al.*, 2010). Nicméně, během tohoto procesu může docházet ke vzniku inhibičních látek, které mohou mít vliv na výslednou výtežnost bioplynu a je potřeba tyto látky sledovat a předcházet jejich vzniku.

Společným znakem obou témat je metoda stanovení plyných produktů pomocí plynové chromatografie, která umožňuje zkoumat biodegradační průběh látek v půdním či vodním prostředí. Je založena na zkoumání změn v plynné fázi uzavřeného zkušebního systému, kde dochází ke sledování oxidu uhličitého, kyslíku nebo methanu, které vznikají při biologických procesech. Tato metoda je hojně využívána v souvislosti s výše popsanou problematikou (Dřímál *et al.*, 2007).

1.1 Sledování vlivu inhibičních látek na obsah methanu v bioplynu v průběhu anaerobní fermentace

Anaerobní fermentace je známý způsob výroby energie z obnovitelných zdrojů bez přístupu vzduchu, kde dochází k rozkladu organických degradabilních materiálů na bioplyn a nerozložitelný zbytek organické hmoty (Holm-Nielsen *et al.*, 2009; Appels *et al.*, 2011). Získaný bioplyn se skládá převážně z methanu a oxidu uhličitého a je využíván pro výrobu tepla a energie. Běžně používanými substráty pro bioplynové stanice jsou rostlinná biomasa, například pšenice a kukuřičná siláž. Mohou být využity i jiné substráty jako je hnůj, organická složka komunálního odpadu nebo odpadní vody (Nallathambi *et al.*, 1997). Anaerobní fermentace je komplexním souborem na sebe navazujících procesů, který vyžaduje metabolickou součinnost. Může probíhat samovolně v přírodě nebo řízeně v bioplynových stanicích (Appels *et al.*, 2008).

1.1.1 Fáze anaerobní fermentace

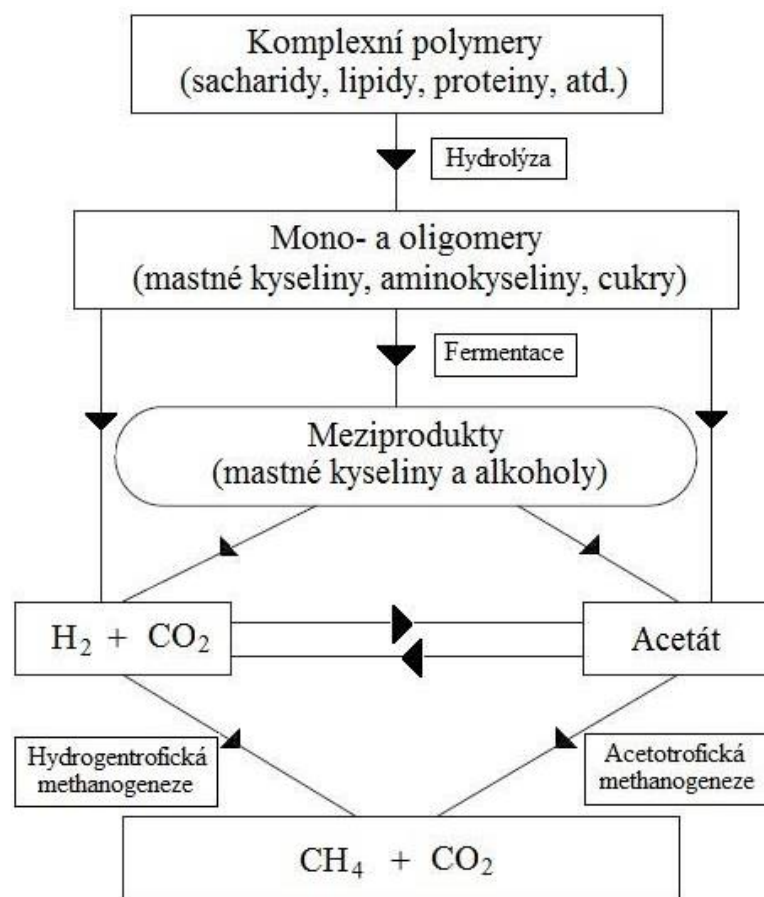
Průběh anaerobní fermentace, znázorněný na *Obr. 1.1*, se skládá ze čtyř na sebe navazujících fází (Dohányos *et al.*, 1998; Kupec, 2002):

Hydrolýza – v tomto kroku dochází k rozkladu rozpuštěných i nerozpuštěných makromolekulárních organických látek (lipidy, polysacharidy, proteiny, nukleové kyseliny) za vzniku látek nízkomolekulárních, rozpustných ve vodě. Reakce je katalyzována extracelulárními hydrolytickými enzymy produkovány fermentačními bakteriemi. Nízkomolekulární látky jsou transportovány dovnitř bakteriálních buněk, kde dochází k dalším reakcím.

Acidogeneze – v této fázi jsou produkty hydrolýzy dále štěpeny na jednodušší organické látky, jako alkoholy, kyseliny, oxid uhličitý a vodík. Prostřednictvím acidogenních bakterií vzniká řada konečných redukováných produktů závislých na charakteru počátečního substrátu a podmínkách prostředí.

Acetogeneze – je třetí fází anaerobní fermentace, ve které dochází k oxidaci vyšších mastných kyselin, alkoholů a aromatických sloučenin na oxid uhličitý a vodík.

Methanogeneze – poslední fáze procesu, v níž dochází ke tvorbě methanu a oxidu uhličitého z jednoduhlíkatých látek, vodíku a kyseliny octové.



Obr. 1.1 Schéma tvorby bioplynu z biologicky rozložitelných odpadů (Patinvoh *et al.*, 2017)

Výsledným produktem anaerobní fermentace je bioplyn, který se skládá převážně z methanu a oxidu uhličitého, v menší míře se vyskytují i vodík, dusík, sulfan a stopová množství amoniaku, těkavých mastných kyselin a dalších látek. Kromě bioplynu je produktem tohoto procesu i digestát, což je stabilizovaný zbytek po vyhnutí se sníženým obsahem biologicky rozložitelných látek. Jeho vlastnosti jsou ovlivněny druhem zpracovávané biomasy a parametry procesu (Heviánková *et al.*, 2014; Kubásek, 2012).

V dobře pracujících reaktorech dochází ke vzniku 65 – 80 % methanu, s čímž úzce souvisí i výsledná výhřevnost bioplynu, obvykle v rozmezí 13,72 – 27,44 kJ/m³ (Straka, 2003; Dohányos *et al.*, 1998). Výtěžnost procesu je ovlivňována řadou faktorů jako je teplota, pH, vlhkost a dalších, neméně důležitou roli pak hraje volba vstupního materiálu. Z důvodu dostupnosti, nízké ceny, a především relativně vysoké výtěžnosti bioplynu z jednotky hmotnosti, je nejvíce využívána rostlinná biomasa (Zábranská, 2010).

1.1.2 Substráty pro bioplynové stanice

Rostoucí počet bioplynových stanic má za následek také růst poptávky na vhodné substráty. Jako substrát pro bioplynovou stanici mohou být využity substráty obsahující sacharidy, bílkoviny, tuky, celulózu a hemicelulózu jako hlavní složky (Weiland, 2010). Nejčastěji používanými substráty u zemědělských bioplynových stanic je rostlinná biomasa, například kukuřice, která je za tímto účelem cíleně pěstována či travní siláž (Zábranská, 2010). Mezi další suroviny, které je možno zpracovávat v bioplynových stanicích patří hnůj, kejda, odpady z živočišné a rostlinné výroby, či odpadní kaly vznikající při čištění odpadních vod. Výtěžnost bioplynu se u jednotlivých substrátů značně liší v závislosti na jejich původu, obsahu organických látek a složení substrátu. Například tuky poskytují nejvyšší výtěžnost bioplynu, ale vyžadují dlouhý retenční čas kvůli špatné biologické dostupnosti (Weiland, 2010). Efektivnější průběh procesu a vyšší výtěžnosti bioplynu lze pak dosáhnout použitím kosubstrátů a jejich kombinací.

Kukuřičná a travní siláž představuje přes 50 hm. % všech substrátů. Hlavní výhody použití rostlinné biomasy pro výrobu bioplynu je relativně vysoká produkce bioplynu z jednotky hmotnosti a zavedené postupy jejího pěstování, sklizně a konzervace. Anaerobní fermentací lze pak z tuny kukuřičné siláže získat až 200 m³ bioplynu. Nevýhodou zpracování rostlinné biomasy je zejména nízká účinnost procesu daná špatnou rozložitelností rostlinných materiálů (Zábranská, 2010; Procházka *et al.*, 2012).

1.1.3 Struktura ligninocelulosových materiálů

Rostlinná biomasa je složena převážně z celulosy, hemicelulosy a ligninu. Tyto přírodní polymery spolu úzce interagují a tvoří tak komplexní matici, odolnou vůči biotické a abiotické degradaci, zvláště pak v anaerobních podmínkách (Adney *et al.*, 1991; Procházka *et al.*, 2012).

Celulosa představuje hlavní složku rostlinné biomasy, jejíž struktura je tvořena jednotkami glukosy navzájem spojenými $\beta(1\rightarrow4)$ glykosidickou vazbou. Celulosové řetězce jsou sestaveny do vláken, takzvaných mikrofibril, v nichž se střídají méně uspořádané amorfnní a vysoce organizované krystalické struktury (Hendriks *et al.*, 2009; Paulová *et al.*, 2012a).

Hemicelulosa je komplex polysacharidů, který je složen s pentosy, hexosy a cukrů kyselin. Neobsahuje prakticky žádné krystalické části a je tedy snadněji degradovatelná ve srovnání s celulosou.

Třetí složkou rostlinné biomasy je amorfnní heteropolymer lignin, který je pevně svázán s celulosovými a hemicelulosovými vlákny a dodává celé struktuře pevnost a odolnost. Je tedy nejvíce resistantní vůči mikrobiálnímu ataku (Hendriks *et al.*, 2009; Paulova *et al.*, 2015). Stupeň odolnosti rostlinné biomasy k mikrobiálnímu napadení se liší v závislosti na typu lignocelulosy, složení buněčné stěny a stáří buněk, je ale také ovlivňován různými zpracovatelskými postupy jako například sušením či ohřevem (Taherzadeh

et al., 2012). Relativní odolnost lignocelulosového komplexu vůči chemickému a biologickému rozkladu představuje významnou nevýhodu rostlinné biomasy v rámci jejího biotechnologického potenciálu z důvodu prodloužení procesu a zároveň snižování výnosů produkce bioplynu. Z těchto důvodů je nutná předúprava rostlinné biomasy, jejímž cílem je narušit organizovanou strukturu lignocelulosových celků (Fan *et al.*, 2006).

1.1.4 Předúprava rostlinné biomasy

Pro efektivní využití rostlinné biomasy při výrobě bioplynu je v první řadě nutná její hydrolýza, čímž dochází k otevření odolné lignocelulosové struktury a tím ke zlepšení přístupnosti pro degradační mikroorganismy. Rychlost a rozsah hydrolýzy závisí na síle spojení ligninu, hemicelulosity a celulosity, ale také na stupni krystalinity (Patinvoh *et al.*, 2017). K narušení struktury lignocelulosového materiálu v praxi dochází vhodně zvolenou metodou předúpravy.

Metody předúpravy

Mechanické metody – zde se využívá především procesů jako drcení, mletí, sekání aj. Tímto způsobem předúpravy dochází ke zvětšení povrchové plochy a velikosti pórů a tím ke zlepšení přístupnosti organických látek enzymatickému rozkladu. Nevýhodou těchto procesů je vysoká spotřeba elektrické energie (Bochmann *et al.*, 2013; Onyeche *et al.*, 2002; Taherzadeh *et al.*, 2008).

Fyzikální metody – do této kategorie se řadí například termická hydrolýza, autohydrolýza (exploze vodní parou), expanze čpavkových par či expanze CO₂. Výsledkem je snížení stupně polymerace spolu s částečnou hydrolýzou hemicelulosity a částečnou solubilizací ligninu (Hendriks *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2008).

Chemické metody – jsou založeny na rozkladu biomasy pomocí chemikálií, a to jak organických, tak anorganických kyselin či zásad. Společným činitelem pro tyto metody je tvorba toxických látek a inhibitorů hydrolýzy; dochází také ke korozi reaktorů. Další nevýhodou chemických metod předúpravy je také jejich finanční náročnost spojená s regenerací a recyklací použitých chemikálií, nicméně v porovnání s ostatními metodami jsou neúčinnější (Johnson *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2014).

Biologické metody – jsou založeny na využití různých druhů mikroorganismů. Nejčastěji jsou využívány některé kmeny dřevokazných hub bílé a hnědé hniloby, dále pak enzymy, či některé mikroorganismy jako například *Bacillus* sp., nebo *Aspergillus* sp. Výhodou využití těchto metod jsou nízké energetické nároky, nevýhodou je pak značná časová náročnost a vysoká cena enzymů

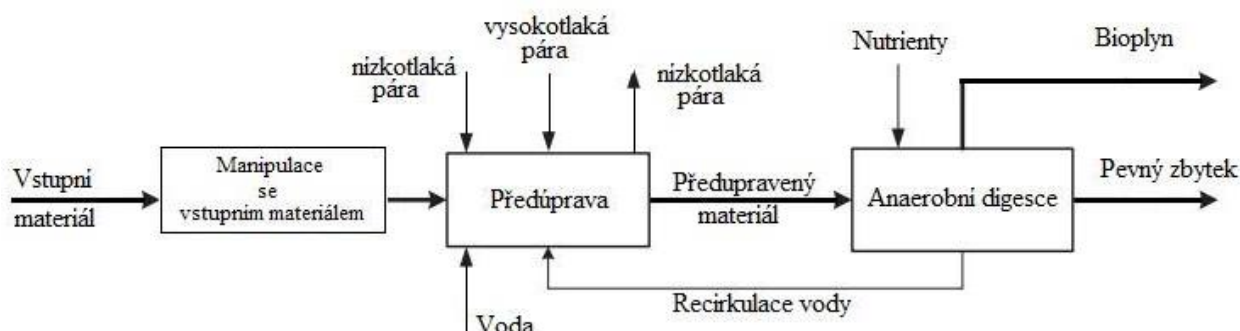
(Forgács *et al.*, 2011; Mazotto *et al.*, 2013; Patinvoh *et al.*, 2016; Zaghoul *et al.*, 2011).

Termická předúprava

Jednou z nejčastěji zkoumaných metod předúpravy, a to včetně jejího efektu na různé druhy biomasy, je termicko-expanzní hydrolýza (Olabi *et al.*, 2013; Fernández-Cegrí *et al.*, 2012; Ziemiński *et al.*, 2014; López *et al.*, 2014; Bohutskyi *et al.*, 2014; Bruni *et al.*, 2010; Galbe *et al.*, 2007). Princip termické předúpravy je znázorněn na Obr. 1.2; biomasa je za vysokého tlaku po určitou dobu zahřívána na vysokou teplotu. Následně dochází k uvolnění tlaku, čímž dochází k dalšímu narušení kavitací. Vysoká teplota naruší buňky v komplexní matici

a způsobí hydrolýzu makromolekul, jako jsou proteiny, uhlovodíky a tuky vylučované z buňky. Pomocí termické předúpravy dochází k narušení buněčné stěny, která je pak lépe přístupná pro degradační mikroorganismy (Carrere *et al.*, 2010). Bauer *et al.* (2009) studovali efekt termické předúpravy na výtěžnost methanu u pšeničné slámy, která byla podrobena úpravě po dobu 10 min při teplotě 160 °C a po dobu 15 min při 180 °C. V prvním případě došlo ke zvýšení specifického výnosu methanu o 14 % a ve druhém případě o 20 %. Se zvýšením doby zdržení na 20 min při teplotě 200 °C v reaktoru již pozitivní vliv na produkci methanu zaznamenán nebyl. Autoři dále studovali vliv této předúpravy na suché seno při teplotách v rozsahu 160 až 220 °C. Po předúpravě biomasy při 175 °C po dobu 10 min byl pozorován pozitivní vliv na výtěžnost methanu, která se zvýšila o 17 %. Při vyšších teplotách pak opět došlo k výraznému snížení výtěžku methanu. Důvodem tohoto jevu může být tvorba látek, které inhibují mikroorganismy zodpovědné za anaerobní rozklad (Bauer *et al.*, 2009; Bauer *et al.*, 2014).

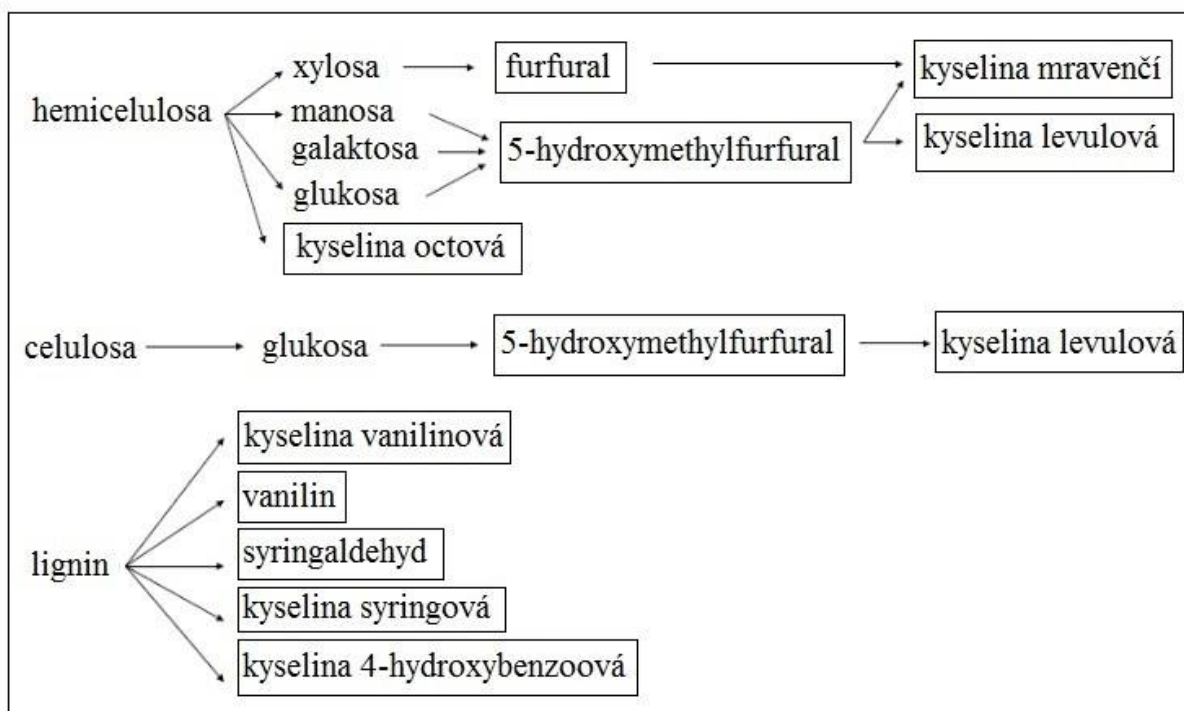
Použitím vysokých teplot a tlaků pro narušení komplexu rostlinné biomasy může docházet ke vzniku řady vedlejších toxických produktů, které mohou na samotnou produkci bioplynu působit inhibičně. Množství a zastoupení takto vzniklých inhibičních látek závisí jak na podmínkách předúpravy a hydrolýze, tak i na typu materiálu (Barakat *et al.*, 2012; Paulová *et al.*, 2012a).



Obr. 1.2 Diagram procesu produkce bioplynu z lignocelulosové biomasy s využitím termické předúpravy (Shafiei *et al.*, 2013)

1.1.5 Inhibiční látky

Mezi hlavní látky s potenciálně inhibičním účinkem se řadí fenolické sloučeniny a deriváty furanu. Mezi fenolické sloučeniny patří především vanilin, kyselina galová a kyselina tříslová, které vznikají rozkladem ligninu. Deriváty furanu jsou pak například furfural a 5-hydroxymethylfurfural, což jsou produkty dehydratace z pentos a hexos obsažených v polysacharidech. Vznik těchto látek je znázorněn na Obr. 1.3. (Palmqvist *et al.*, 2000; Barakat *et al.*, 2012)



Obr. 1.3 Přehled inhibičních látek vznikajících při předúpravě lignocelulosové biomasy (Paulová *et al.*, 2012a)

Fenolické sloučeniny

Inhibiční vliv fenolických sloučenin na produkci bioplynu byl sledován ve studii provedené Ximenesem *et al.* (2010). V rámci této studie byl sledován vliv přítomnosti vanilinu, syringaldehydu a 4-hydroxybenzoové kyseliny na produkci bioplynu; jako výchozí substrát byly použity různé materiály jako dřevo, kukuřičná či travní siláž. Bylo potvrzeno, že přítomnost testovaných látek výrazně inhibuje aktivitu enzymů katalyzujících hydrolýzu celulosy a snižuje její rychlost o 50 %.

Také ve studii Hernandez a Edyveana (2008) byl potvrzen inhibiční vliv testovaných fenolických sloučenin na produkci bioplynu. Bylo potvrzeno, že tyto sloučeniny mohou inhibovat jak degradaci snadno biologicky odbouratelných organických frakcí, tak svou vlastní biodegradaci. Bylo zjištěno, že inhibice produkce bioplynu fenolickými sloučeninami je ovlivněna řadou faktorů.

Tyto sloučeniny mohou být částečně biomethanizovány, ve studii byla potvrzena degradace kyseliny galové a kyseliny kofeinové. Inhibice methanizace pak probíhala v přítomnosti fenolických sloučenin v koncentracích mezi 800 a 1600 mgC/l.

Anaerobní rozložitelnost kyseliny galové pak byla zkoumána také ve studii Kouroutzidou *et al.* (2006), kde byl jako inokulum využit anaerobní kal z čistírny odpadních vod. Utilizace kyseliny galové anaerobními bakteriemi byla hodnocena z pohledu produkce bioplynu. Po přidavku kyseliny galové (100, 500 a 1000 mg/l) bylo pozorováno zvýšení objemu vyrobeného bioplynu, což naznačuje, že anaerobní mikroorganismy přítomné v kalu byly schopny degradace této látky. Výsledky této studie pak naznačují, že kyselina galová je za anaerobních podmínek poměrně dobře rozložitelná, a to i při vyšších koncentracích 1000 mg/l.

Využití glukosy jako faktoru zabraňujícímu inhibici zkoumali Mousa *et al.* (1999). Principem experimentu bylo přidání inhibiční sloučeniny, v tomto případě kyseliny galové do vyhnívacích nádrží spolu s glukosou a následné sledování jejich degradace. V koncentracích 10 a 20 mg/l neprokázala přítomnost kyseliny galové vliv na produkci methanu, avšak u koncentrace 50 mg/l došlo k poklesu methanu obsaženého v bioplynu o 15 %. Ze studie vyplývá, že glukosa dávkovaná v nízkých koncentracích do nádrží je schopna potlačit inhibiční účinek kyseliny galové, a naopak zrychlit její odstraňování ze substrátu (Mousa *et al.*, 1999).

Deriváty furanu

Inhibiční efekt furfuralu a 5-hydroxymethylfurfuralu byl do jisté míry zkoumán ve spojení s produkcí bioethanolu nebo biovodíku z lignocelulosových materiálů (Bellido *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2007; Oliva *et al.*, 2006; Paulová *et al.*, 2012b; Haroun *et al.*, 2016). Barakat *et al.* (2012) studovali vliv inhibičních látek pocházejících z předúpravy lignocelulosových materiálů na produkci methanu z xylosy. Zkoumanými produkty byl furfural, 5-hydroxymethylfurfural a syringaldehyd. Z této studie vyplynulo, že vedlejší produkty neinhibují anaerobní fermentaci, ale naopak vedou k produkci methanu. Paulová *et al.* (2012a) se zabývala sledováním vlivu tří vybraných inhibičních látek, a to furfuralu, 5-hydroxymethylfurfuralu a kyseliny 4-hydroxybenzoové. Tato studie byla zaměřena na testování růstových schopností tří producentů ethanolu, konkrétně kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a *Pichia stipitis* a bakterie *Zymomonas mobilis*. Toxický efekt vybraných látek v pořadí furfural, 5-hydroxymethylfurfural a kyselina 4-hydroxybenzoová klesal, nicméně u všech látek bylo prokázáno negativní ovlivnění procesu. Jako možné řešení tohoto problému autoři uvádí detoxikaci lignocelulosových hydrolyzátů před fermentací, nebo zvolení méně citlivých mikroorganismů k daným inhibitorům. (Paulová *et al.*, 2012a).

1.2 Biodegradace polymerů

Biodegradace polymerů může probíhat buď za aerobních podmínek, kde jsou konečnými produkty rozkladu oxid uhličitý, voda a vznik nové biomasy, nebo v anaerobních podmínkách, kde dochází ke vzniku methanu a oxidu uhličitého. Principem biodegradčních testů je zkoumání rozkladu dané látky mikroorganismy v environmentálních vzorcích, kterými jsou nejčastěji půda, kompost či odpadní voda za simulovaných podmínek či v reálném čase (Kyrikou *et al.*, 2007, Avérous *et al.*, 2004; Leja a Lewandowitz, 2010).

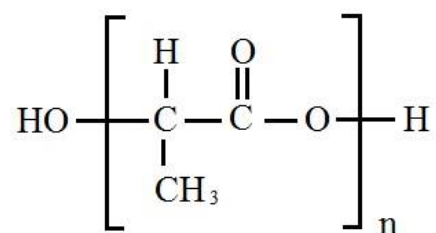
Obecný mechanismus biodegradace polymerů je složen z několika na sebe navazujících kroků, a to je biodeteriorace, depolymerizace, asimilace a mineralizace (Shah *et al.*, 2008). Biodeteriorací rozumíme degradaci materiálu, působenou obvykle v důsledku mikroorganismů vyskytujících se na povrchu a/nebo uvnitř materiálu, která mění mechanické, fyzikální a chemické vlastnosti daného materiálu. Materiál s vysokou molekulovou hmotností je rozkládán na menší fragmenty (Lucas *et al.*, 2008). U ve vodě nerozpustných polymerních materiálů, nejsou schopny mikroorganismy právě přenést tyto materiály přímo do buňky, kde probíhá většina biochemických procesů, působením extracelulárních enzymů tak dochází k depolymerizaci materiálu až na oligomery či monomery mimo buňku (Mueller, 2006). Asimilace je proces, ve kterém dochází k integraci atomů z fragmentů polymerních materiálů uvnitř mikrobiálních buněk. Ve vodě rozpustné oligo- a monomery prostupují přes buněčnou stěnu dovnitř buňky, kde slouží jako zdroj energie, prvků a elektronů; asimilace je tedy důležitá pro růst a reprodukci mikrobiálních buněk (Lucas *et al.*, 2008). Vznikající metabolity pak mohou být vylučovány do extracelulárního prostředí. Jednoduché molekuly jako CO₂, N₂, CH₄, H₂O, případně soli vzniklé z intracelulárních metabolitů, které jsou zcela oxidovány, jsou dále uvolňovány do prostředí; tato fáze se nazývá mineralizace (Lucas *et al.*, 2008).

Na degradaci polymerů, má vliv řada faktorů, a to jak environmentálních, tak fyzikálně-chemických. Mezi environmentální se řadí teplota, vlhkost, nutrienty, přítomnost nebo absence kyslíku a mezi fyzikálně-chemické pak pórovitost, čistota, molekulová hmotnost, mechanická a tepelná odolnost, teplota skelného přechodu, teplota tání, specifický povrch a přidaná aditiva a modifikátory, jako změkčovadla, plniva, katalyzátory, či barviva (Artham *et al.*, 2008; Tokiwa *et al.*, 2009; Park, 1994; Pantani *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2005; Stloukal *et al.*, 2015, Luo *et al.*, 2012).

1.2.1 Kyselina polymléčná

Kyselina polymléčná (PLA), jejíž struktura je znázorněna na *Obr. 1.4*, je biodegradabilní a biokompatibilní lineární alifatický polyester (Drumright

et al., 2000). Vysokomolekulární PLA je bezbarvý, lesklý, tuhý termoplastický polymer s vlastnostmi podobnými polystyrenu (Garlotta, 2001).



Obr. 1.4 Strukturální vzorec PLA (Garlotta, 2001)

PLA byla objevena v roce 1932 chemikem Carothersem (DuPont), který ji vyrobil pouze v nízké molekulové hmotnosti, a to zahříváním kyseliny mléčné ve vakuu. Od roku 1954 byla firmou DuPont patentována také výroba polymeru s vysokými molekulovými hmotnostmi. Kyselinu polymléčnou lze vyrábět přímo z jejího monomeru, a to kyseliny mléčné polykondenzací, nicméně touto konvenční cestou nedochází k dostatečnému nárůstu molekulové hmotnosti výsledného polymeru. Nejběžnějším způsobem, jak získávat PLA o vysokých molekulových hmotnostech je polymerace za otevření laktidového kruhu. Tento proces se skládá ze tří kroků, a to polykondenzace, depolymerace a polymerace za otevření laktidového kruhu cyklického dimeru kyseliny mléčné v přítomnosti vhodného katalyzátoru. U tohoto procesu výroby je pak vyžadováno dodatečné čištění vzniklého produktu, což je poměrně složité a nákladné (Drumright *et al.*, 2000; Garlotta, 2001; Lasprilla *et al.* 2011). Řízením doby zdržení a teploty v kombinaci s vhodným katalyzátorem a jeho koncentrací je možné řídit poměr a sekvenci D a L jednotek kyseliny mléčné ve výsledném polymeru (Gupta *et al.*, 2007.) Další méně často využívanou možností výroby PLA je azeotropická kondenzační polymerace (Garlotta, 2001).

Mechanické vlastnosti a krystalizační chování je závislé na molekulové hmotnosti, ale také na stereoregularitě polymeru. Poly-L-mléčná kyselina je produkt vznikající polymerací kyseliny L-mléčné a má krystalinitu přibližně 37 %, teplotu skelného přechodu v rozmezí 50 – 80 °C a teplotu tání mezi 173 – 178 °C. Vzhledem ke stereoregularitě řetězce jsou opticky čisté polymery, kyselina poly-L-mléčná a poly-D-mléčná, semikrystalické. Existuje také opticky neaktivní stereoizomer kyselina poly-L,D-mléčná, který je však v důsledku náhodného rozložení D a L jednotek amorfni a vykazuje tak mnohem nižší pevnost (Mahdavan Nampoothiri *et al.*, 2010; Garlotta, 2001).

PLA je zpracovávána řadou technologických postupů jako je vyfukování, vstřikování či vytlačování za tepla (Garlotta, 2001). PLA je používána například pro výrobu obalových materiálů, jako jsou nápojové kelímky, láhve, talíře, boxy na odnos jídla a podobně. Především díky unikátním fyzikálním vlastnostem umožňuje v řadě aplikací nahrazení polystyrenu či polyethylentereftalátu. (Shah *et al.*, 2008) Vzhledem ke své biodegradabilitě se hodí také pro použití v zemědělských aplikacích, a to jako mulčovací fólie

(Drumright *et al.*, 2000). Důležitou vlastností PLA je také její biokompatibilita, díky níž může být využívána ve farmaceutickém průmyslu, kde slouží jako farmaceutická složka v léčivých přípravcích s postupným uvolňováním účinku, využití nachází také pro výrobu vstřebatelných chirurgických nití. (Mahdavan Nampoothiri *et al.*, 2010)

Abiotická hydrolýza PLA

Během degradace musí být esterové vazby PLA rozštěpeny, buď hydrolyticky, nebo pomocí extracelulárních enzymů, což umožní asimilaci oligomerů a monomerů PLA. Oba paralelní procesy mohou být ovlivněny několika faktory. Enzymaticky katalyzované procesy jsou závislé na přítomnosti specifických mikroorganismů, které se v určitých prostředích mohou vyskytovat jen zřídka, pravděpodobně závisí také na optické čistotě a krystalinitě materiálu (Rudnik, 2008; Tsuji a Miyauchi, 2001a; Tsuji a Takehiko, 2011) Bylo zjištěno, že amorfní oblasti PLA jsou náchylnější k hydrolýze modelovými enzymy (Tsuji a Miyauchi, 2001b). Abiotická hydrolýza je výrazně ovlivněna teplotou, ale také obsahem krystalických a amorfních částí v polymeru. (Lyu *et al.*, 2007; Tsuji a Mizuno, 2000)

Abiotická hydrolýza PLA byla sledována Husárovou *et al.* (2014), a to při teplotách 25, 37 a 58 °C. Bylo zjištěno, že abiotická hydrolýza je s rostoucí teplotou výrazně urychlena, ale roli zde hraje i molekulová hmotnost polymeru. Důležitým poznatkem je, že průběh abiotické hydrolýzy byl téměř identický se samotnou biodegradací u všech vzorků. Lze tedy říci, že abiotická hydrolýza (ne enzymatická) je hlavním mechanismem rozkladu a řídicím faktorem míry biodegradace.

Biodegradace PLA v aerobních podmínkách v prostředí kompostu

Biodegradace PLA v kompostu probíhá relativně snadno a byla již rozsáhle zdokumentována (Itävaara *et al.*, 2002; Auras *et al.*, 2004; Kale *et al.*, 2007). Rozklad PLA je výrazně ovlivněn hlavně v termofilní fázi kompostovacího procesu, díky výskytu degradujících mikroorganismů a je také podpořen hydrolýzou v důsledku zvýšené teploty. (Tokiwa *et al.*, 2004; Lyu *et al.*, 2007) Během primární degradace dochází u PLA k chemické hydrolýze, která je závislá na teplotě i vlhkosti. Vzhledem k tomu, že molekulová hmotnost při tomto kroku klesne na 10 000 až 20 000 g/mol, mikroorganismy přítomné v půdách již začínají využívat oligomery s nízkou molekulovou hmotností a kyselinu mléčnou. Tento dvoustupňový proces se podstatně liší od degradace jiných biologicky rozložitelných polymerů. V přírodních podmínkách, ve vodách či půdách, dochází k pomalému, ale stabilnímu odbourání PLA. Tyto materiály jsou pak často využity pro aplikaci v zemědělství či zahradnictví, v těchto aplikacích je pak preferovaným způsobem zneškodňování kompostování. Při kompostování dochází k relativně rychlému biologickému rozkladu

a mineralizaci až na CO₂ a vodu (Ghorpade *et al.*, 2001; Leejakpai *et al.*, 2011; Cadar *et al.*, 2012).

Husárová *et al.* (2014) se zaměřili na degradaci PLA s molekulovou hmotností v rozsahu 34-160 kg/mol v podmínkách kompostu. Výsledky prokázaly, že míra degradace závisí na molekulové hmotnosti vzorku, kdy se míra biodegradace snižovala se zvyšující se molekulovou hmotností. Také bylo potvrzeno, že specifický povrch polymeru je důležitým faktorem pro urychlení biodegradace.

1.2.2 Směsi PLA/PHB

PLA v různých formách se jeví jako vysoce slibný biopolymer. Další široce zkoumanou látkou je první homolog ze skupiny polyhydroxyalkanoátů, jmenovitě polyhydroxy- máselná kyselina (PHB) (Asrar *et al.*, 2002). PLA a PHB mají vynikající pevnostní parametry, ale naopak poměrně nízkou houževnatost a při pokojové teplotě jsou relativně křehké, tyto vlastnosti pak mohou omezovat šíři jejich aplikací. K úpravě těchto nepříznivých charakteristik existují různé přístupy, přičemž k nejčastějším způsobům patří modifikace různými přísadami (Chodák *et al.*, 2002). Směsi PLA a PHB jsou v odborné literatuře popsány z různých úhlů pohledu. Směsi PLA a PHB vykazují obecně vyšší flexibilitu, ale i přesto je maximální deformace při hodnotách zlomu relativně nízká (Armentano *et al.*, 2015a, b). Mísitelnost PLA s PHB silně závisí na molekulové hmotnosti obou komponent. Bylo zjištěno, že PLA je mísitelné pouze s nízkomolekulárním PHB a naopak nemísitelné s komerčním bakteriálním PHB o vysoké molekulové hmotnosti (Koyama *et al.*, 1997, Ohkoshi *et al.*, 2000, Park *et al.*, 2004).

Vlastnosti směsí PLA/PHB závisí především na složení, interakci mezi složkami na hranicích fází a dále také na podmínkách zpracování. Například Abdelwahab *et al.* (2012) uvádí, že směs PLA/PHB v poměru 75:25 w/w vykazovala zlepšené mechanické vlastnosti. Babu *et al.* (2011) uvádí, že pevnost v tahu i Youngův modul klesají s rostoucím množstvím PHB ve směsi. U PHB ve směsi dochází ke krystalizaci, vytváří se velmi malé sférulity, které mohou dále působit jako nukleační centra pro PLA, takže směsi vykazovaly vyšší krystalinitu (Arrieta *et al.*, 2014a). Dalším studovaným materiálem v práci Abdelwahaba *et al.* (2012) složeným z PLA a PHB 75:25 byl film určený pro obalové aplikace. Směs, která byla připravena mícháním taveniny a následně lisováním, vykazovala zlepšenou odolnost proti nárazu, ale také lepší bariérové vlastnosti, nicméně filmy byly stále poměrně křehké. Ke snížení křehkosti směsi PLA/PHB může významně přispívat přidavek plastifikátorů. Plastifikátory by měly být přijatelné v souvislosti se zamýšlenou aplikací materiálu, mísitelné s polymerem, biologicky odbouratelné. Použitelné plastifikátory pro fázi PLA obsahují polyethylenglykol, estery kyseliny citrónové a jejich směsi (Arrieta *et al.*, 2014a) a dibenzoát nebo dioktylfthalát pro fázi PHB (Abdelwahab *et al.*, 2012).

Biodegradace PHB probíhá ve srovnání s PLA rychleji, a to pravděpodobně kvůli vyšší stabilitě PLA vůči hydrolyze (Babu *et al.*, 2011; Arrieta *et al.*, 2014a,b; Ansari *et al.*, 2014;).

1.2.3 Směsi PLA s jílovými nanočásticemi

Některé vlastnosti PLA, například špatná tepelná a mechanická odolnost mohou omezovat jeho širší průmyslové použití. Tyto problémy pak mohou být překonány smícháním polymeru s různými formami nanočástic (Fukushima *et al.*, 2009; Pandey *et al.*, 2005).

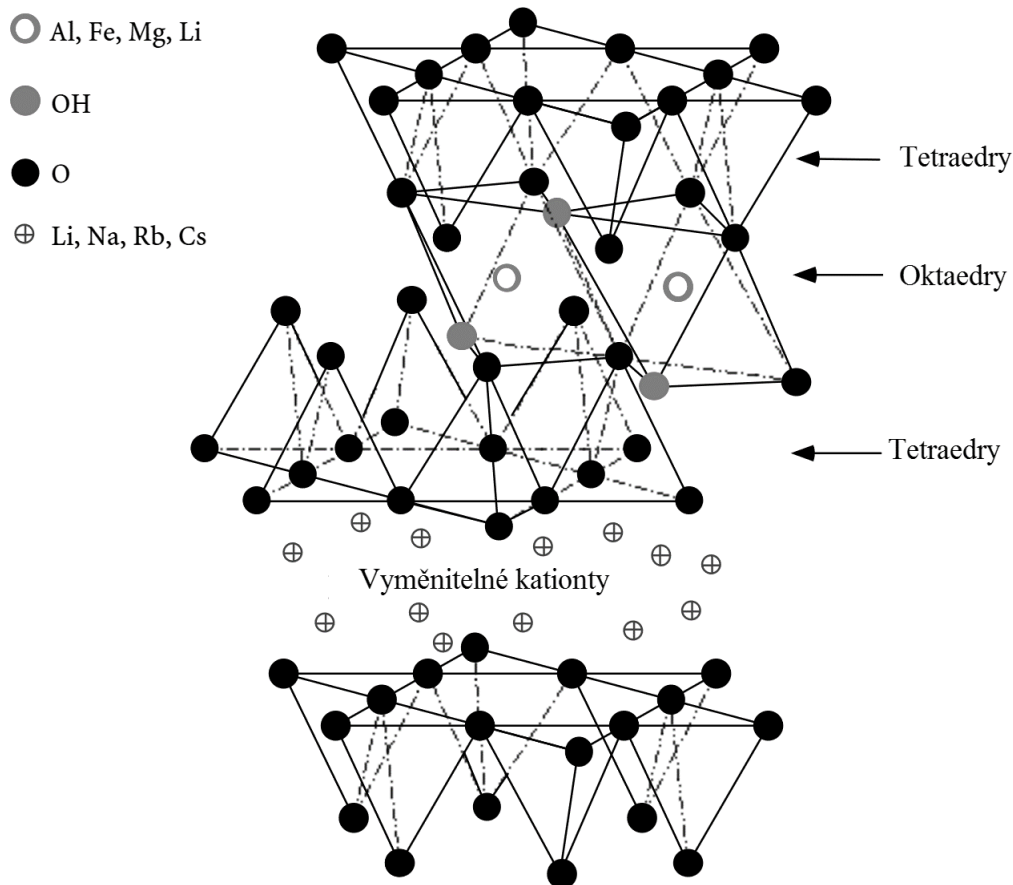
Nejčastěji studovaným aditivem v PLA polymerních systémech bývá typ jílu zvaný montmorillonit (MMT), zvláštní zájem je pak věnován modifikaci MMT organickými sloučeninami, čímž je zajištěna větší kompatibilita s polymerem (Paul *et al.*, 2003, Pluta *et al.*, 2002). Tyto materiály přitahují velkou pozornost, vykazují značné zlepšení vlastností již při velmi nízkém obsahu plniva, důležitým aspektem je však také postup výroby. V obvyklých fázově dělených kompozitech zůstává polymer a anorganický materiál nemísitelný, existují však dva možné typy hybridů: interkalovaný, kdy je polymer zabudován mezi vrstvy silikátů a exfoliovaný nebo delaminovaný, kdy interkalace dosahuje takové míry, že dochází k rozptýlení silikátových vrstev (Giannelis *et al.*, 1999).



Obr. 1.5 Schematické znázornění různých hybridních struktur směsí polymer/silikát (Giannelis *et al.*, 1999).

Montmorillonit

Montmorillonit patří do skupiny fylosilikátů neboli vrstevnatých silikátů, je řazen mezi jíly s třívrstvou strukturou (2:1); skládá se tak ze dvou vrstev tetraedrů, mezi nimiž se nachází vrstva okraedrů, obecná struktura 2:1 jílového materiálu je znázorněna na Obr. 1.6. Montmorillonit, spolu s hektoritem a saponitem jsou nejčastěji používané vrstevnaté křemičitany v nanokompozitních materiálech. Obecný chemický vzorec (Pavlidou a Papaspyrides, 2008) MMT je $M_x(Al_{4-x}Mg_x)Si_8O_{20}(OH)_4$; kde M je monovalentní kation a x je stupeň isomorfní substituce (0,5 – 1,3). Všechny jmenované silikáty jsou charakterizovány velkou aktivní plochou (u MMT až 700 - 800 m²/g), mírně negativním povrchovým nábojem a morfologií vrstev a jsou považovány za hydrofobní koloidy (Giannelis *et al.*, 1999).



Obr. 1.6 Struktura 2:1 vrstevnatého jílového materiálu (Giannelis *et al.*, 1999)

Biodegradace směsí PLA s jílovými nanočásticemi

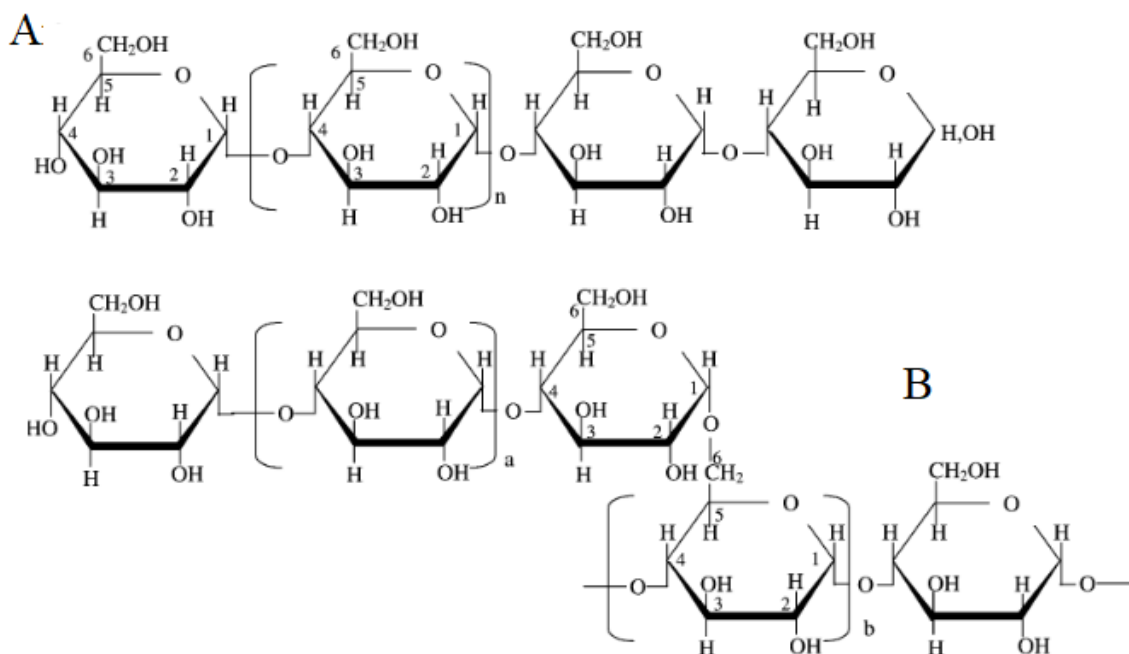
Vliv plniv na bázi nanojílu na biodegradaci PLA v prostředí kompostu bylo zkoumáno již několika autory (Paul *et al.*, 2005; Molinaro *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2013). Ti pozorovali zrychlené rozložení v kompostu ve srovnání s PLA bez přídavku jílových nanočástic. Rozdíly pak byly přisuzovány především k relativně vysoké hydrofilnosti daných nanočástic, které mohly zvýšit difúzi vody do výsledné polymerní matrice při rychlejší aktivaci procesů hydrolytické degradace (Fukushima *et al.*, 2012). Podle dalších autorů (Sinha *et al.*, 2003a; Fukushima *et al.*, 2011), může být hydrolytický proces během biodegradace zrychlen v důsledku přítomnosti terminálního hydroxylového zbytku skupiny silikátů, stejně jako přebytku hydroxylových skupin některých organických modifikátorů, za předpokladu dobré disperze těchto látek v polymerní matrice. Nicméně v současné vědecké literatuře stále chybí informace o vlivu nanočástic jílu na kinetiku a mechanismus biodegradace PLA za podmínek kompostování.

1.3 Biodegradace materiálů s obsahem termoplastického škrobu

Vývoj a výroba biologicky rozložitelných materiálů na bázi škrobu či termoplastického škrobu je považována za důležitý krok pro snížení celkového množství syntetického plastového odpadu (Nafchi *et al.*, 2013).

1.3.1 Škrob a jeho modifikace

Škrob je přírodní polymer, jehož struktura je tvořena dvěma typy α -glukanů, a to amylosem a amylopektinem. Tyto dvě podjednotky mají rozdílnou strukturu a vlastnosti; skládají se z molekul D-glukózy spojených $\alpha(1\rightarrow4)$ a $\alpha(1\rightarrow6)$ vazbami. Amylose je poměrně dlouhý, lineární α -glukan, struktura amylopektinu je naopak silně rozvětvená (Tester *et al.*, 2003); struktura těchto látek je znázorněna na Obr. 1.7.



Obr. 1.7 Struktura amylose (A) a amylopektinu (B)

Škroby jsou hlavní zásobárnou polysacharidů v potravinách rostlinného původu; škroby z obilovin pak pocházejí především z kukuřice a pšenice. Díky nízké ceně, dostupnosti, biodegradabilitě a schopnosti poskytovat širokou škálu funkčních vlastností potravinářským i jiným produktům je škrob využíván v řadě průmyslových aplikací (Bertolini, 2010). Škrob byl jako polymer úspěšně využíván v obalovém průmyslu, také díky dobré rozložitelnosti. Přírodní škrob má však několik nevýhod, jako jeho špatná zpracovatelnost a rozpustnost v běžných organických rozpouštědlech, které omezují možnosti jeho využití. Z tohoto důvodu byly v posledních několika desetiletích studovány různé modifikace škrobu vedoucí k dosažení funkcí vhodných pro různá průmyslová odvětví (Chi *et al.*, 2008; Kaur *et al.*, 2012).

Termoplastický škrob (TPS) je materiál získaný narušením struktury granulovaného škrobu při jeho zpracování za zvýšené teploty a tlaku v přítomnosti látek, jež jsou schopny narušit jeho chemickou strukturu. Tyto látky nazývané plastifikátory, jsou včleňovány mezi molekuly škrobu, kde narušují vodíkové vazby. Dochází tak k oddalování polymerních řetězců, zvýšení jejich pohyblivosti, snížení teploty skelného přechodu a modulu; materiál se tak stává plastickým s možností deformace (Da Róz *et al.*, 2006; Nafchi *et al.*, 2013). Nejpoužívanějšími plastifikátory jsou voda a glycerol (Leja a Lewandowitz, 2010), ale v současné době jsou úspěšně využívány také některé další látky jako ethylenglykol, močovina, maltodextrin či sorbitol (Da Róz *et al.*, 2006; Nafchi *et al.*, 2013). Ve srovnání v konvenčními syntetickými polymery TPS vykazuje vysokou absorpci vody a poměrně nízkou mechanickou výkonnost (Visakh *et al.*, 2012). Mezi hlavní nevýhody TPS, pak patří především retrogradace (Nafchi *et al.*, 2013). Molekulární interakce, souhrnně označované jako retrogradace jsou zapříčiněny zahříváním škrobu v přítomnosti vody a následně ochlazením, kdy dochází k přerušení řetězců škrobu tvořených amylózou a amylopektinem a opětovné formaci více uspořádaných struktur (Hoover *et al.*, 2010). Retrogradace je pak obvykle doprovázena řadou fyzikálních změn, například zvýšením stupně krystalinity, viskozity či zákalu.

Škrob může být dále různými způsoby modifikován; mezi ty nejčastější pak patří chemická, fyzikální, enzymatická nebo genetická modifikace. Škrob může být chemicky modifikován substitucí vodíku na hydroxylových skupinách, pak dochází k esterifikaci (například acetylaci), etherifikaci, roubované kopolymeraci či zesíťování. Většina těchto reakcí musí být provedena v roztoku kvůli vysoké molekulové hmotnosti amylopektinu, a tudíž vysoké viskozitě taveniny. Pokud jsou použity reakce bez roztoku, musí být molekulová hmotnost škrobových částic snížena použitím např. amyláz (Avérous a Halley, 2014; Huber a BeMiller, 2010; Nafchi *et al.*, 2013). Fyzikálně-chemické vlastnosti škrobu jsou pak spojeny se stupněm substituce vzniklých chemických skupin (Šárka *et al.*, 2011).

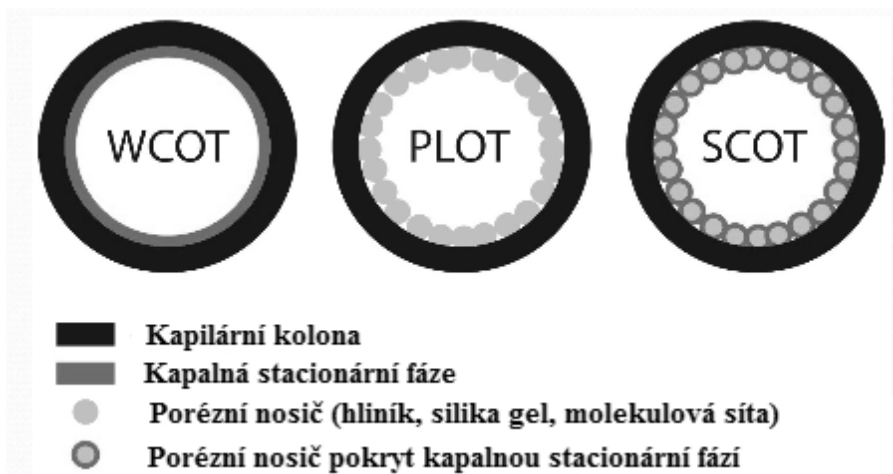
1.4 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) je nejpoužívanější analytická separační metoda, pro stanovení plyných či kapalných směsí. Výhodami této techniky je rychlá analýza, účinná separace látek a malé množství vzorku potřebné pro stanovení. GC se hojně využívá v chemickém, petrochemickém nebo farmaceutickém průmyslu. Dalším využitím GC je sledování kvality životního prostředí (aromatické polutanty v ovzduší a vodě, detekce pesticidů) a stanovení míry degradace organických látek v různých typech prostředí měřením plynů jako je methan, oxid uhličitý, kyslík, vodík a další (Englert *et al.*, 2015; Ettre, 1975).

Proces chromatografie spočívá v dělení směsi na její jednotlivé složky, čímž může být každá složka ve vzorku kvalitativně i kvantitativně stanovena.

Významným faktorem ovlivňujícím separaci cílových složek ve vzorku je volba chromatografické kolony. GC využívá dva typy kolon, a to náplňové a kapilární, které se liší hlavně permeabilitou nosného plynu procházejícího kolonou. U náplňových kolon závisí propustnost na velikosti částic náplně, protože plyn prochází v koloně vrstvou zrnitého materiálu, na které vzniká velká tlaková ztráta. U kapilárních kolon plyn stále proudí vnitřním volným prostorem a tím pádem je tlaková ztráta funkcí vnitřního volného průměru kapiláry. Permeabilita kapilárních kolon je až 1000 krát větší. Proto se v současnosti používají převážně kolony kapilární. Kapilární kolony jsou nejčastěji křemenné nebo skleněné kapiláry potažené polyamidem o průměru 0,25 – 0,50 mm a délce až 100 m. Na vnitřní stěně kapiláry je nanášena tenká vrstva stacionární fáze (polysiloxany, polyethylenglykol) a zastává tak funkci nosiče.

Kapilární kolony lze rozdělit na tři typy, průřezy těmito kolonami jsou znázorněny na Obr. 1.8:



Obr. 1.8 Průřezy tří typů kapilárních kolon (Klouda, 2003)

WCOT (Wall-coated open tubular column) – kde tenká vrstva (0,25 μm) kapalné stacionární fáze je nanášena na vnitřní stěně kolony.

SCOT (Support-coated open tubular column) – zde je kapalný polymer zakotven na nosiči zachyceném na vnitřní stěně kapiláry.

PLOT (Porous-layer Open tubular column) – což jsou otevřené kapilární kolony s pevnou vrstvou sorbentu ukotveného na stěně. (Štulík, 2004)

GC je nejčastěji aplikována s plamenovým ionizačním detektorem (FID), hmotnostním detektorem (MS) a teplotně vodivostním detektorem (TCD). Jednotlivé typy detektorů se liší principem, konstrukcí ale i selektivitou, citlivostí či mezí detekcí (Wang *et al.*, 1999).

TCD je typem univerzálního detektoru, který je tvořen tenkou kovovou spirálou žhavenou přechodem elektrického proudu umístěnou v termostatovaném bloku. Nosný plyn proudí přes vlákno, které je žhavené konstantním elektrickým proudem a ochlazuje je na určitou teplotu.

TCD pracuje se dvěma žhavenými vlákny, kdy přes jedno proudí čistý nosný plyn a přes druhé plyn z kolony. Vzhledem k tomu, že tepelná vodivost nosného plynu by se měla co nejvíce odlišovat od vodivosti stanovovaných složek, dává se přednost heliu a vodíku před dusíkem. Je hojně využíván při analýzách anorganických plynů a nízkomolekulárních organických látek. Velice často se využívá pro stanovení obsahu methanu a oxidu uhličitého ve vzorku (GC-TCD). Mez detekce touto metodou je vyjádřená objemovou koncentrací 300 ml/m³, což odpovídá hmotnostní koncentraci methanu v suchém plynu za normálních podmínek 240 mg/m³ (Kiyuna *et al.*, 2017; Sumprasit *et al.*, 2016).

FID detektor pracuje na principu vzniku iontů termální emisí z mikroskopických uhlíkových částic, které vznikají během procesu spalování. Z tohoto důvodu je při ionizaci organických látek dominantním faktorem závislost uhlíku, který přechodně vzniká během hoření. Výhodou detektoru je jeho samočištění, k jeho kontaminaci téměř nedochází, nicméně je tato skutečnost závislá od analyzovaných látek. Odezva tohoto detektoru je závislá na počtu uhlíků v separované molekule, charakteru vazeb C-C a na počtu dalších atomů v molekule. Mez detekce u FID je v rozmezí 10-12 g/s (Horák *et al.*, 2011). Spojení GC-FID je hojně využíváno například ke stanovení obsahu mastných kyselin v organickém odpadu, ve spojení s výrobou bioplynu, protože tyto kyseliny jsou hlavními zdroji uhlíku v procesu anaerobní fermentace. Mezi mastné kyseliny s krátkým řetězcem (C2 – C6) se řadí kyselina octová, propionová, máselná, valerová a další. Hladiny těchto kyselin se mohou akumulovat až na takové úrovni, kdy mohou inhibovat methanogenní mikrobiální proces (LÜTZHØFT *et al.*, 2014). Využitím GC-FID je tedy sledováno jejich zastoupení v použitém odpadu a slouží jako ukazatel efektivity výroby bioplynu (Pruksatrakul *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2015).

2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Cílem dizertační práce bylo studium vlivu vybraných potenciálně inhibičních látek vznikajících při produkci bioplynu a studium biodegradability vybraných modifikovaných materiálů na bázi kyseliny polymléčné a termoplastického škrobu v kompostu. Základním parametrem pro vyhodnocení bylo stanovování plyných produktů biodegradčních procesů pomocí plynové chromatografie.

Dílčí cíle disertační práce jsou následovné:

- Sledování vlivu degradačních produktů předúpravy biomasy na produkci methanu pomocí plynové chromatografie
- Studium biodegradace kyseliny polymléčné a jejich směsí s dalšími komponentami v prostředí kompostu, vliv složení na kinetiku biodegradace
- Studium biodegradace materiálů na bázi termoplastického škrobu v závislosti na jeho modifikaci, způsobu zpracování a přítomnosti dalších aditiv

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1 Materiál

V následující kapitole jsou vypsány biologické materiály a významné chemikálie použité v disertační práci. Běžné chemikálie použité v této práci byly od standardních dodavatelů jako je Fluka, Lachema, Sigma-Aldrich nebo Penta a pokud není uvedeno jinak byly čistoty p.a.

3.1.1 Biologický materiál a chemikálie použité při sledování inhibice produkce methanu

Mikrobiální inokulum bylo poskytnuto z bioplynové stanice Pěčín v Českých Budějovicích ve formě digestátu z kukuřičné a travní siláže (tekutý zbytek po anaerobní fermentaci probíhající při 39 °C).

Testované inhibiční látky – byly dodány firmou Sigma-Aldrich. Furfural ($C_5H_4O_2$) – Furan-2-karboxyaldehyd; $M_w = 96,08$ g/mol; tekutá forma žluté barvy; koncentrace uhlíku 62,45 %;

- 5-hydroxymethylfurfural ($C_6H_6O_3$) – 5-hydroxymethyl-2-furaldehyd; $M_w = 126,11$ g/mol;
- Kyselina galová ($C_7H_6O_5$) – 3,4,5-trihydroxybenzoová kyselina; $M_w = 170,12$ g/mol; prášková forma bílé barvy; koncentrace uhlíku 49,38 %;
- Kyselina tříslivá ($C_7H_5O_6$) – $M_w = 170,12$ g/mol; prášková forma světle žluté barvy; koncentrace uhlíku 53,61 %.

Uhlíkové substráty – byly rovněž dodány firmou Sigma-Aldrich.

- Octan sodný (OCT) – $M_w = 82,03$ g/mol; prášková forma bílé barvy; koncentrace uhlíku 29,25 %;
- Celulosa – $M_w = 162$ g/mol; prášková forma bílé barvy; koncentrace uhlíku 44,44 %.

3.1.2 Biologický materiál a chemikálie použité při sledování biodegradace směsí PLA v kompostu

Zahradnický kompost Agro (Agro CS a.s., Česká Skalice) s obsahem zkompostovatelných surovin rostlinného původu, humusu a přísadkem dolomitického vápence.

Agroperlit (Perlit s.r.o., Šenov u Nového Jičína) – Tepelně zpracovaná organická hornina sloužící jako pomocná půdní látka.

Kyselina polymléčná PLA4032D (NatureWorks LLC) – $M_n = 112\ 000$; index polydisperzity $M_w/M_n = 1,71$; obsah D izomeru = 1,4% a obsah zbytkového monomeru = 0,14 %.

Kyselina polymléčná PLA2003D (NatureWorks® Ingeo™, USA)

Typy nanojílů (Southern Clay Products, Inc., Gonzales, USA)

Cloisite Na⁺, 10A, 20A, 30B, Nanofil 116, 3010; and Garamite1958 (Tab. 3.1)

Tab. 3.1: Charakterizace komerčních montmorillonitů

Montmorillonit	Organický modifikátor	Koncentrace modifikátoru [mmol/100 g jílu]	X-ray výsledky* d ₀₀₁ [nm]
Cloisite Na⁺ (NA)	Žádný	Žádný	1,17
Nanofil 116 (NF116)	Žádný	Žádný	
Cloisite 10A (10A)	Kvartérní amoniové soli (2MBHT)	125	1,92
Cloisite 20A (20A)	Kvartérní amoniové soli (2M2HT)	95	2,42
Cloisite 30 B (30B)	Bis(2-hydroxyethyl) Dimethylammonium chlorid (MT2EtOH)	92	1,85
Nanofil 3010 (NF3010)	Kvartérní alkylammonium chlorid	Neudáno	3,6
Garamite1958 (GA)	Kvartérní amoniové soli	Neudáno	1,21

*Vzdálenost mezi vrstvami d₀₀₁ [nm] udávaná výrobcem

Poly(3-hydroxy- máselna) kyselina PHB biomer® prášek (Krailling, Německo) – krystalinita 65 – 70%; bez aditiv

Plastifikátor triacetin TAC (čistota p.a, Sigma-Aldrich) – triglycerid-1,2,3-triacetoxipropan

3.1.3 Materiály a chemikálie použité při sledování biodegradace materiálů na bázi termoplastického škrobu

Neacetylovaný, acetylovaný a propionovaný škrob A (Škrobárny Pelhřimov, Czech Republic)

Celulosové vlákna Technocell 2500 (délka 2500 μm ; Radka, Česká Republika)

3.1.4 Minerální média a roztoky

Roztoky solí

Pro přípravu 100 ml roztoků byly naváženy jednotlivé soli: 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,3 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 2,06 g FeCl_3 ; 3 g NH_4Cl ; 5 g NaCl . Po navážení na analytických vahách ($d=0,0001$ g), byla každá sůl rozpuštěna a doplněna destilovanou vodou na požadovaný objem.

Roztok stopových prvků

Pro přípravu 1000 ml roztoku byly naváženy jednotlivé soli: 0,043 g $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,057 g H_3BO_3 ; 0,043 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,037 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,025 g $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,040 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Po navážení na analytických vahách ($d=0,0001$ g) byly látky rozpuštěny a doplněny destilovanou vodou na požadovaný objem.

Minerální médium (MM)

Pro přípravu 1000 ml minerálního média bylo připraveno:

KH_2PO_4 (9,07 g/l)	5 ml
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (23,9 g/l)	45 ml
Destilovaná voda	930 ml
Roztok stopových prvků	2 ml
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 g/l)	5 ml
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3 g/l)	5 ml
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 g/l)	5 ml
NH_4Cl (30 g/l)	5 ml

Následovala sterilizace MM v autoklávu při teplotě 125 °C po dobu 30 min.

Fosfátový pufr

Pro přípravu 1000 ml roztoku fosfátového pufru bylo naváženo 13,61 g KH_2PO_4 a rozpuštěno v destilované vodě na požadovaný objem. Pufr byl zneutralizován na pH 7 a poté bylo přidáno 2 g NaN_3 k potlačení růstu mikroorganismů.

50× koncentrovaný TAE pufr

Pro přípravu 1000 ml pufru bylo použito:

2M Tris base ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) 242 g

1 M kyselina octová (CH ₃ COOH)	57,1 ml
50 mM EDTA	100 ml 0,5M EDTA

Připravená směs byla kvantitativně převedena do 1000 ml odměrné baňky a doplněna po rysku destilovanou vodou. Padesátkrát koncentrovaný roztok TAE byl pro laboratorní účely ředěn destilovanou vodou v poměru 1:50.

3.1.1 Laboratorní přístroje a pomůcky

Analytické váhy Kern 770

Analyzátor uhlíku TOC-5000A – Shimadzu (Japonsko)

Centrifuga Rotanta 460 R (Hettich, SRN)

Manometr GDH200-13, Greisinger

Míchačka magnetická MM2

Plynotěsná injekční stříkačka Hamilton, 100 μ l

Plynový chromatograf Aglient Technologies 7890A GC Systém

pH metr inoLab 720 S2 SenTix 41, pH elektroda – Electrode Sentix 41, redox elektroda – Platin Elektrod Blue Line 31 RX, Shott

Předvážky Kern 440-47

Sušárna Memmert UM100

Termostat laboratorní ST2, POL-EKO

Třepací vodní lázeň GFL 1092

Aseptický laminární box Bio II A

Box Aura PCR BIOAIR MP-300N (Major science)

Centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf AG)

DGGE – Cipher genetic analysis systém 2401-110 (C.B.S. Scientific Company)

Mikrovlnná trouba (Electrolux)

UV transluminátor, In Genius LHR (Syngene)

Automatické pipety, Nicciipet (Eppendorf AG)

SPE kolonky Isolute C18 (100 mg/3 ml; Biotage)

Mikrotitrační destička 96 jamek – GAMA, ČR

Dále byly používány běžné laboratorní pomůcky jako dávkovače, pipety, zkumavky, běžné laboratorní sklo a další laboratorní pomůcky.

3.2 Metodika

3.2.1 Inhibiční testy

Inhibiční testy byly prováděny v anaerobním prostředí tekutého média (s inokulem v podobě digestátu) a sledované látky. Testované látky byly ve zvolených koncentracích přidány do prostředí spolu s odpovídajícím substrátem jako zdrojem uhlíku. Průběh inhibice těchto látek na produkci methanu obsaženého v bioplynu byl sledován ve zvolených časových intervalech.

Příprava mikrobiálního inokula

Digestát obsahující mikrobiální společenství byl odebrán z bioplynové stanice, která využívá k výrobě bioplynu převážně kukuřičnou a travní siláž. Digestát byl přesíván přes síto o velikosti ok 1mm², z důvodu odstranění kukuřičných zrn a dalších pevných částí a byl suspendován v minerálním mediu tak, aby výsledná koncentrace sušiny byla 1 g/l. Po suspenzaci byl digestát aklimatizován 7 dní při teplotě 39 °C.

Základní charakteristiky digestátu po jeho odběru a po aklimatizaci jsou sumarizovány v Tab. 3.2. Tyto charakteristiky dokládají, že zředěné i adaptované medium ze všech tří odběrných míst měly na začátku všech experimentů podobné vlastnosti.

Tab. 3.2: Fyzikálně-chemické vlastnosti původního a adaptovaného digestátu

	Vzorkování I	Vzorkování II	Vzorkování III
Původní digestát			
ORP [mV]	-289	-383	-219
pH	7,8	8,9	8,2
TS[g/l]	5,70	3,00	28,5
Adaptovaný digestát			
ORP [mV]	-208	-253	-225
pH	7,8	8,0	8,0
TS[g/l]	1,14	0,98	0,98
% CH ₄ [acetát sodný]	62%	68%	-
% CH ₄ [celulosa]	-	49%	30%

ORP = oxidačně-redoxní potenciál; TS = sušina; %CH₄ = procento methanu s daným substrátem v počáteční fázi experimentu

Stanovení pH a oxidačně-redoxního potenciálu

Tyto parametry byly stanovovány na začátku a na konci všech experimentů. Měření pH bylo prováděno pomocí skleněné elektrody, která byla před měřením kalibrována pomocí standardních kalibračních roztoků v rozsahu pH 4 až 7. Stanovení oxidačně-redoxního potenciálu bylo prováděno redox elektrodou s platinovým čidlem.

Stanovení koncentrace sušiny digestátu

Stanovení celkového obsahu sušiny, což odpovídá veškerým pevným látkám obsaženým v kalové suspenzi, bylo prováděno ve skleněných miskách s víčkem. Do misek bylo odpipetováno 10 ml inokula a sušeno do konstantní hmotnosti při 105 °C. Následně byla vypočítána výsledná sušina digestátu.

Stanovení koncentrace rozpuštěného organického uhlíku DOC

Stanovení DOC bylo využíváno pro sledování zbytkových koncentrací uhlíku v kapalně fázi po ukončení inhibičních testů. Vzorky po ukončení experimentu byly centrifugovány, odstředěná kapalná fáze byla přefiltrována a následně použita pro stanovení koncentrace DOC, které bylo provedeno pomocí analyzátoru uhlíku Shimadzu TOC 5000A.

Principem stanovení TC je nastříknutí vzorku do vysokoteplotního generátoru, kde dochází k oxidaci veškerého uhlíku ve vzorku ve spalovací trubici s platinovým katalyzátorem při teplotě 680 °C v proudu kyslíku. Vzniklý CO₂ je detekován a jeho obsah je kvalitativně vyhodnocen ve formě píku a jeho výška je přímo úměrná koncentraci TC ve vzorku. Při stanovení IC je vzorek nastříknut do proudu kyslíku do nádoby s kyselinou fosforečnou, kde dochází k vytěsnění CO₂. Množství celkového rozpuštěného uhlíku je dáno rozdílem hodnot celkového uhlíku (TC) a anorganického uhlíku (IC).

Test inhibice produkce methanu obsaženého v bioplynu

Všechny experimenty byly prováděny ve skleněných lahvích s plynotěsným septem o celkovém objemu 300 ml, do kterých bylo přidáno 100 ml adaptovaného digestátu a uhlíkový substrát (octan sodný, celulóza) o finální koncentraci 10 g/l; celý obsah byl poté stripován dusíkem. Dále byly přidány inhibiční látky ve zvolených koncentracích (0,1 – 2 g/l). Na začátku experimentu bylo pH 7,8±0,5. Po dalším stripování dusíkem byly lahve neprodleně uzavřeny zátkami s plynotěsnými vzorkovacími ventily tak, aby nedošlo ke kontaktu s kyslíkem. Nakonec byly testovací lahve inkubovány při teplotě 39 °C ve vodní lázni s kontinuálním mícháním 55 ot/min. Kromě testovacích lahví byl proveden také slepý pokus, v němž byl obsažen pouze digestát anebo digestát se substrátem uhlíku bez testovaných inhibičních látek. Experimenty byly prováděny třikrát vedle sebe.

V průběhu testování bylo z lahví odebíráno plynotěsnou injekční stříkačkou 100 µl plynné fáze, která byla ve vybraných časových intervalech dále testována.

Tlak plynu v lahvích byl kontrolován digitálním manometrem dle ISO 11734 (1995). Na konci testu bylo u každého vzorku stanoveno pH a ORP. Vzorky byly odstředěny v uzavřených kyvetách na centrifuze při nastavení 30 000 ot/min po dobu 10 min a teplotě 25 °C. Získané vzorky supernatantu byly poté naředěny a využity ke stanovení koncentrace DOC.

Stanovení produkce methanu a oxidu uhličitého v průběhu anaerobní fermentace

Obsah methanu a oxidu uhličitého v bioplynu byla analyzována pomocí plynového chromatografu Agilent 7890A s kolonou Porapak Q a teplotně vodivostním detektorem (TCD), jako nosný plyn sloužilo helium (50 ml/min, $T_{\text{injektor}} = 200$ °C, $T_{\text{trouba}} = 50$ °C, $T_{\text{detektor}} = 220$ °C). Produkce methanu byla vyjádřena jako množství uhlíku ve formě vyprodukovaného methanu na gram vloženého uhlíku ($m(\text{CH}_4)$). Vyhodnocení bylo založeno na základě stavové rovnice ideálního plynu (Dřimal *et al.*, 2006; Hubáčková *et al.*, 2013). Koncentrace methanu a oxidu uhličitého byly stanoveny metodou kalibrační křivky, pro jejíž měření byl použit kalibrační plyn s certifikovaným složením (0,8 % CO_2 , 4 % CH_4 , 95,2 % N_2).

Pro výpočet celkového stupně biologického rozkladu D_t (%) byl použit následující vztah:

$$D_t = \frac{m_g + m_l}{m_v} \cdot 100\% \quad (3.1)$$

Kde m_g je uhlík uvolněný ve formě CH_4 a CO_2 v plynné fázi v mg, m_l je hmotnost uhlíku v kapalně fázi v mg a m_v je hmotnost uhlíku ve zkoušené látce v mg.

Matematický model

Produkce methanu v průběhu růstu mikrobiální biomasy byla vyjádřena, podle již publikované rovnice inhibice růstu biomasy (Rial *et al.*, 2011), kde množství vyprodukovaného methanu je úměrné biomase a počáteční koncentrace methanu je nula.

$$c = \ln \left(\frac{X_m}{X_0} - 1 \right) \quad (3.2)$$

$$m(\text{CH}_4) = k \left[\frac{X_0}{1 + \exp(c - \mu_m t)} - X_0 \right] \quad (3.3)$$

Kde $m(\text{CH}_4)$ je hmotnost vyprodukovaného methanu, k je konstanta proporcionality mezi biomasou a produkcí methanu, X_0 je biomasa na začátku

experimentu, X_m asymptotické maximum biomasy a μ_m je zvýšení biomasy na jednotku biomasy a časovou jednotku (t^{-1}).

Po reparametrizaci (Rial *et al.*, 2011) je modelová rovnice pro produkci methanu následující:

(3.4)

$$m(CH_4) = \frac{m(CH_4)_{MAX}}{1 + \exp\left[2 + \frac{4v_{MAX}}{m(CH_4)_{MAX}}(\lambda - t)\right]} - \frac{m(CH_4)_{MAX}}{1 + \exp\left[2 + \frac{4v_{MAX}}{m(CH_4)_{MAX}}\lambda\right]}$$

Kde $m(CH_4)_{MAX}$ je asymptotické maximum produkce methanu, v_{MAX} je maximální rychlost produkce methanu a λ je délka lagové fáze. Zabudování a vyhodnocení parametrů z experimentálních výsledků bylo provedeno součtem nelineární metody nejmenších čtverců za použití „řešitele“ v programu Microsoft Excel.

3.2.2 Biodegradace PLA a PLA směsí v kompostu

Biodegradční testy byly prováděny v aerobním prostředí v kompostu, do kterého byly přidány sledované látky.

Příprava směsí PLA/TAC a PLA/PHB/TAC

Směsi a následně vyrobené folie byly vyrobeny ve spolupracující laboratoři na Ústavu polymerů na Slovenské Akademii Věd.

Tyto směsi byly připraveny smícháním v rotačním dvojšnekovém extruderu (Labtech, Thajsko). Vlákná byla zchlazena ve vodní lázni, vysušena a nastříhána na pelety. Všechny polymery byly vysušeny před smícháním při teplotě 80 °C po dobu 3 hodin. Při stejných podmínkách byly vysušeny i finální pelety před přípravou samotných folií. Z vyrobených pelet byly lisováním v laboratorním lisu LabEcon 300 při tlaku 100 kPa připraveny filmy o tloušťce 0,2±0,01 mm. PLA a směs PLA/TAC byly lisovány při teplotě 170 °C po dobu 1 minuty a poté zchlazeny pod tlakem po dobu 2 minut na teplotu 140 °C. Směs PLA/PHB/TAC byla lisována při teplotě 180 °C po dobu 1 minuty bez následného chlazení, aby se zabránilo možnému zvýšení tepelné degradace PHB. Folie byly kompaktní bez viditelných bublin a defektů.

Příprava PLA/jílových nanokompozitů

Vzorky PLA nanokompozitů byly vyrobeny ve spolupráci s univerzitou Montanuniversitaet Leoben v Rakousku.

Před smícháním byla PLA a jíly vysušeny pod sníženým tlakem minimálně 24 hodin. Pro míchání materiálů byl použit rotační dvojšnekový extruder ZSK 25 (Coperion GmbH, Štuttgart, Německo) pracující při 200 °C. Rychlost posuvu

materiálu byla nastavena na 6 kg/hod a rychlost šroubu na 100 ot/min. V Tab. 3.3 jsou uvedeny typy jílu spolu s procesními podmínkami, včetně točivého momentu, axiálního ložiskového tlaku a reálného teplotního profilu.

Tab. 3.3: Přehled připravených PLA/jílových nanokompozitů a použité procesní podmínky

Vzorky	Typ jílu	TM [%]	Tlak [Bar]	Reálná teplota T [°C]					
				Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6
Čistá PLA		40	4	159	168	177	190	199	199
PLA-Na	Cloisite Na+	58	8	161	171	179	191	202	201
PLA-A10	Cloisite A10	52	22	154	170	178	190	200	202
PLA-A20	CloisiteA20	46	8	155	168	177	189	199	196
PLA-B30	Cloisite B30	54	22	163	170	178	190	200	202
PLA-Na3010	Nanofil3010	42	21	163	171	177	189	200	205
PLA-NA116	Nanofil116	56	7	164	171	180	191	201	204
PLA-GA	Garamite1958	48	26	159	170	174	190	200	197

TM – točivý moment

Před procesem vytlačování folií, byly pelety PLA/jílových nanokompozitů vysušeny při teplotě 40 °C po dobu 24 hodin. Pak byly extrudovány v jednošnekovém extruderu PlastiCorder (Barbender, Německo) vybaveném plochou výtlačnou hlavou při teplotě 200 °C. Filmy byly ochlazeny chladícím válcem na 40 °C.

Maloúhlová rentgenová difrakce (SAXS)

Rozptylové obrazce byly zaznamenány pomocí maloúhlého rentgenového rozptylu Bruker NanoStar (SAXS), (Bruker AXS, Karlsruhe, Německo). Systém byl vybaven rentgenovým mikroskopickým zdrojem a optikou Montel (Incoatec, Geesthacht, Německo) poskytující monochromatické X-paprsky při 0,154 nm (Cu K α). K zaznamenávání rozptylu byl použit systém Vantec 2000 2D Detektor (Bruker SAXS, Karlsruhe, Německo).

Gelová permeační chromatografie (GPC)

Průměrná molekulová hmotnost, distribuce molekulové hmotnosti ve vzorcích PLA nanokompozitů a změny během hydrolyzy byly analyzovány pomocí gelové permeační chromatografie (GPC). Analýzy GPC byly provedeny na chromatografickém systému Breeze (Waters, Milford, MA) vybaveném PLgel Mixed-D kolonou (300 – 7,8 mm², 5 μ m; Polymerní Laboratoře, Ltd.) a detektorem indexu lomu Waters 2414. Stanovení byla prováděna při teplotě 30 °C a data byla zpracována softwarem Empower Pro. Hmotnostně střední molární hmotnost (M_w), číselně střední molární hmotnost (M_n) a následně polydisperzita (M_w/M_n) testovaných vzorků byla vypočítána.

Stanovení kontaktního úhlu

Kontaktní úhly u vzorků filmů byly měřeny pomocí Kruss tensinometru K100 (Hamburg, Německo) při 25 °C podle Wilhelmyho metody pro kvantifikaci smáčivých charakteristik polymerních povrchů (Mittal, 2006). Filmy byly před měřením opláchnuty destilovanou vodou, vysušeny při 25 °C a rozřezány na kusy 20x30 mm; měření bylo následně prováděno ve vodě, rychlost měření byla 25 μm/s. Měření bylo u každého vzorku třikrát opakováno.

Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

K charakterizaci a pozorování povrchů testovaných polymerních materiálů byla použita skenovací elektronová mikroskopie (SEM) Quanta 200 FEG (FEI, Česká Republika) za použití sekundárního elektronového zobrazení při akceleračním napětí 10 kV. Před samotným pozorováním v elektronovém mikroskopu byly vzorky rozlomeny v přítomnosti tekutého dusíku. Následně byly připevněny na kovový nosič s vodivou stříbrnou pastou (Leitsilber G302; Christine Groepl, Rakousko) a nakonec pokoveny tenkou platinovou vrstvou (4 nm; vakuový rozprašovač SCD 050, Balzers, Lichtenštejnsko).

Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

TEM analýza byla provedena na mikroskopu Tecani G2 Spirit (FEI, ČR) v režimu BF (světlé pole) při maximálním urychlovacím napětí elektronů 120 kV a rozlišení 0,3 nm. Ultra tenké části byly nařezány kryo-nožem při teplotě vzorku -85 °C.

Biodegradace připravených vzorků v kompostu

Biodegradční testy byly prováděny ve skleněných lahvích (bioreaktorech) o objemu 500 ml a objemu plynné fáze 580 ml, opatřených plastovým uzávěrem a septem pro odběr plynné fáze. Lahve byly před použitím důkladně vymyty roztokem kyseliny chlorovodíkové a vysušeny; uzávěry byly sterilizovány pod UV zářením po dobu 30 min.

Do lahví byl navážen vyzrálý kompost (5 g suché hmotnosti), promytý a vysušený perlit (5 g), polymerní vzorky (50 mg) a k celému obsahu bylo přidáno 5 ml minerálního média. Takto připravené lahve byly inkubovány při teplotě 58 °C. Ve zvolených intervalech bylo prováděno odebírání 100 μl plynné fáze přes septum plynotěsnou stříkačkou a poté ručně nastříknuto do plynového chromatografu (Agilent 7890). Odběr vzorků byl operativně přizpůsoben skutečným produkcím CO₂ a spotřebě kyslíku. Ze zjištěné koncentrace CO₂ bylo vypočítáno procento mineralizace vzhledem

k počátečnímu obsahu uhlíku ve vzorku. Endogenní produkce CO₂ ve slepých vzorcích byla vždy odečtena pro získání hodnot představujících čistou mineralizaci vzorku. Každý vzorek byl testován 3x vedle sebe spolu s pozitivní kontrolou (celulosa) a se čtyřmi slepými pokusy.

Analýza oxidu uhličitého plynovou chromatografií při aerobní biodegradaci v kompostu

Testované lahve byly před samotným odběrem vzorku ochlazeny na laboratorní teplotu. Poté bylo injekční stříkačkou odebráno 100 µl plynu a nastříknuto do plynového chromatografu Agilent 7890. Analýza byla provedena na dvou sériově zapojených skleněných náplňových kolonách (1, 829 m). Na koloně Porapak Q (velikost částic 80/100 MESH) se jako první analyzoval CO₂ a poté došlo k přepnutí na druhou kolonu s molekulovým sítem (velikost částic 60/80 MESH), kde následovala analýza O₂, která sloužila jako kontrola aerobních podmínek (obsah CO₂ nesmí být vyšší jak obsah O₂). K přepínání ventilů mezi kolonami docházelo pomocí tlakového dusíku, popřípadě kyslíku, nosným plynem bylo He (čistota 4,6) a k detekci složek byl použit TCD (Tab. 3). K vyhodnocení signálů byl použit program ChemStation a koncentrace CO₂ a O₂ byla odvozena z kalibrační křivky za použití plynného standardu Linde Technoplyn, který obsahoval CO₂ (0,8 %), CH₄ (4,0 %), N₂ 95,2 %).

Tab. 3.4: Základní parametry GC analýzy

Parametr		Hodnota
Teplota [°C]	Termostat 60	60
	Injektor	200
	TCD detektor	250
Nosný plyn	Typ	Helium
	Průtok [ml/min]	53
Přepínání ventilů	Čas [min]	0,65 CO ₂ ; 1,5 O ₂
	Plyn	Vzduch, N ₂

Zpracování naměřených dat získaných z GC

Ke zpracování naměřených dat byly použity následující vzorce:

Denní produkce uhlíku ve formě CO₂:

$$m_{(d)C} = \frac{M_C \times p}{R \times T} \times \frac{V_g}{1000} \times w(CO_2) \times \frac{V_{St}}{S_{St}} \times \frac{S_{Vz}}{V_{Vz}} \times 100 \quad (3.5)$$

kde:

$m_{(d)C}$ množství vyprodukovaného uhlíku ve formě CO₂; [mg]

M_C atomární hmotnost uhlíku; [g/mol]

p tlak v okamžiku provzdušňování; [kPa]

R	molární plynová konstanta; [J·K/mol]
T	termodynamická teplota v okamžiku provzdušňování; [K]
V _g	plynný objem láhve; [ml]
w(CO ₂)	množství CO ₂ v kalibračním plynu; [%]
V _{St.} , V _{Vz.}	dávkovaný objem plynné fáze standardu, resp. vzorku do plynového chromatografu; V _{St.} , V _{Vz.}
S _{St.} , S _{Vz.}	plocha píku u standardu, resp. vzorku; [μV/s]

Kumulativní produkce uhlíku ve formě CO₂:

Pokud nedochází k provzdušňování bioreaktorů, je kumulativní produkce rovna produkci denní. Pokud je systém provzdušňován, je kumulativní produkce uhlíku ve formě CO₂ daná vztahem:

$$m_{(k)C_2} = m_{(k)C_1} + m_{(k)d_2} \quad (3.6)$$

kde:

m _{(k)C₂}	kumulativní produkce uhlíku z aktuálního měření; [mg]
m _{(k)C₁}	kumulativní produkce uhlíku z předchozího měření; [mg]
m _{(k)d₂}	denní produkce uhlíku z aktuálního měření; [mg]

Substrátová produkce uhlíku ve formě CO₂:

Je denní produkce uhlíku ze systému se vzorky, snižená o produkci uhlíku ze slepých pokusů, tj. produkce ze samotného substrátu (kompost), je daná vztahem:

$$n_{(s)C} = m_{(k)CV_z} + m_{(k)CS_l} \quad (3.7)$$

kde:

n _{(s)C}	substrátová produkce uhlíku ve formě CO ₂ ; [mg]
m _{(k)CV_z}	kumulativní produkce uhlíku z láhve se vzorkem; [mg]
m _{(k)CS_l}	denní produkce uhlíku z láhve bez vzorku; [mg]

Procento mineralizace uhlíku z hlediska produkce CO₂:

$$D_C = \frac{m_{(s)C}}{m_C \times TC_{1,2}} \times 100 \quad (3.8)$$

kde:

D _C	procento mineralizace uhlíku z hlediska produkce CO ₂ ; [%]
M _{(s)C}	substrátová produkce uhlíku ve formě CO ₂ ; [mg]
m _C	hmotnost testovaného materiálu; [mg]
TC _{1,2}	obsah celkového uhlíku v PLA nebo PLA směsích; [mg/g]

Abiotická hydrolýza PLA směsí

Abiotická hydrolýza vzorků probíhala při 58 °C v prostředí fosfátového pufru (0,1 mol/l), který byl upraven na pH 7; z důvodu potlačení růstu mikroorganismů

byl přidáván azid sodný (NaN_3 , 2 g/l). Vzorke PLA filmů byly nastříhány na zkušební tělíska 0,5 x 0,5 mm a suspendovány v 50 ml fosfátového pufru. Experiment byl stanoven 3x vedle sebe pro každý vzorek. Bylo odebráno 1,5 ml alikvotního podílu média v pravidelných intervalech, centrifugováno (10 min) a v supernatantu byl analyzován rozpuštěný organický uhlík na analyzátoru TOC-L Shimadzu.

3.2.3 Biodegradace materiálů na bázi termoplastického škrobu

Neacetylované termoplastické škrobové materiály byly připraveny dvoustupňovým procesem skládajícím se z odlévání roztoku (OR) a mícháním taveniny (MT) (Ostafińska *et al.*, 2017). Acetylované materiály na bázi škrobu byly připraveny ve dvou krocích, a to modifikací (acetylací nebo propionací) a plastifikací. Jednalo se o materiály:

- ŠP – škrob termoplastický neacetylovaný;
- ŠP-C – škrob naplněný celulosovými vlákny;
- AŠP-L, AŠP-M – acetylovaný škrob zpracovaný litím roztoku bez celulosových vláken;
- AŠP-LC – s celulosovými vlákny;
- AŠP-H – acetylované škroby s vysokým stupněm substituce;
- AŠP-HC – acetylované škroby s vysokým stupněm substituce s celulosovými vlákny;
- AŠP-HP – acetylované škroby s vysokým stupněm substituce, které byly nejprve plastifikovány a pak acetylovány;
- PŠP – termoplastický propionovaný škrob

Termoplastické materiály na bázi škrobu byly připraveny ve spolupráci s výzkumnou skupinou z Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd v Praze a jejich složení je popsáno v *Tab. 3.5*.

Tab. 3.5: Složení termoplastických škrobových materiálů

Série	Vzorek	Neacet. škrob A [%]	Acet. škrob A [%]	P1 [%]	P2 [%]	P3 [%]	P4 [%]	C [%]	SS
I.	ŠP	70	-	-	-	-	30	-	-
I.	ŠP-C	55	-	-	-	-	24	21	-
II.	AŠP-L	-	70	-	10	-	20	-	0,8
II.	AŠP-M	-	70	-	10	-	20	-	1,5
II.	AŠP-LC	-	61	-	8	-	16	15	0,8
III.	AŠP-H1	-	70	30	-	-	-	-	2,6
III.	AŠP-H2	-	35	30	-	35	-	-	2,5
III.	AŠP-H3	-	35	-	30	35	-	-	2,5
III.	AŠP-HC	-	21	18	-			40	2,5

IV.	AŠP-HP1	-	70	-	30			-	2,7
IV.	AŠP-HP2	-	70	30	-			-	2,7
V.	PŠP	70*	-	30	-			-	2,6

*propionovaný

P1; P2; P3; P4 – plastifikátory; C – celulosová vlákna; SS – stupeň substituce

Postup provedení biodegradace vzorků v kompostu, analýza oxidu uhličitého pomocí plynového chromatografu v průběhu aerobního rozkladu látek v kompostu a následné zpracování naměřených dat je již popsáno v kapitole 3.2.2.

3.2.4 Molekulárně biologické metody

V části práce, která se zabývala biodegradací různě modifikovaných škrobových materiálů byla u pěti vybraných vzorků provedena identifikace degradérů za pomoci molekulárně biologických metod ve spolupráci s diplomovou prací Evy Lušovjanové (2016). Výběr vzorků byl proveden tak, aby byla zajištěna nejvyšší pravděpodobnost rozmanitosti identifikovaných mikroorganismů, které se podílejí na degradaci takových materiálů.

Izolace DNA

Nejprve byly zvolené vzorky nastříhány na zkušební tělíska 5x5 mm a po dobu 8 dnů kompostovány; poté byly degradované, lehce očištěné zbytky vloženy do rozbíjecí zkumavky. K izolaci DNA bakteriálních konsorcií byl použit půdní kit PowerSoil™ DNA Isolation Kit (Mebio), který je vhodný pro vzorky obsahující velké množství huminových kyselin (kompost, sedimenty). Lyze buněk probíhá mechanicky i chemicky.

V prvním kroku bylo přidáno 60 µl roztoku C1, což je aniontový detergent SDS, jehož cílem je rozrušit mastné kyseliny a lipidy v buněčné membráně. Zkumavka s rozbíjecími kuličkami byla vortexována po dobu 10 minut, došlo tak k rychlé a celkové homogenizaci vzorku a k buněčnému rozkladu. K získanému supernatantu přeneseného do čisté zkumavky bylo přidáno 250 µl komerčního roztoku C2, který sráží vnitrobuněčné látky kromě DNA a vzniklá suspenze byla vortexována po dobu 5 sekund a inkubována 5 min při teplotě 4 °C a nakonec 10 minut centrifugována při 10 000 x g.

Čistý supernatant byl přenesen do čisté zkumavky a bylo přidáno 200 µl srážedla organických a anorganických látek neboli roztoku C3, poté byla suspenze zpracována stejně jako v předešlém kroku. 750 µl čistého supernatantu bylo opět přeneseno do mikrozukavky, přidáno 1200 µl koncertovaného solného roztoku C4, srážejícího DNA a krátce vortexováno.

Celé množství získané suspenze bylo zachyceno do kolonky s křemičitou membránou a centrifugováno po dobu 5 minut při 10 000 x g.

Dále bylo přidáno 500 μ l roztoku C5 na bázi ethanolu, pro odstranění zbývajících nečistot navázaných na membráně. Po centrifugaci byla kolonka přenesena do čisté 2 ml mikrokumavky. Pomocí 30 μ l roztoku C6 byla navázaná DNA na membráně eluována, ponechána 5 minut v klidu, centrifugována a následně byla kolonka vyjmuta a izolovaná DNA byla připravena pro další analýzu.

Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Reakční PCR směs obsahovala templátovou DNA (získaná výše uvedenou metodou), sadu dvou primerů, sterilní vodu pro molekulární biologii a MasterMix (GoTaq® Hot Start Green MasterMix), který obsahuje složky potřebné k amplifikaci DNA. PCR reakční směs byla připravena v reakčních objemech 20 μ l dle následující tabulky.

Tab. 3.6: Složení reakční směsi pro PCR

Komponent	Objem [μ l]
PCR voda	7
Master mix	10
Forward primer	1
Reverse primer	1
Templátová DNA	1

Vzorky byly připraveny pomocí Nested PCR, kdy byly nejdříve použity vnější primery fD1 a rD1 a v dalším kroku vnitřní primery 341F a 907R. PCR cykly jsou uvedeny v Tab. 3.7 a Tab. 3.8. Vzniklé PCR produkty byly použity pro DGGE analýzu.

Tab. 3.7: PCR program Touch down PCR

	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas [min]	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	2	1
Denaturace	95	0,5	10 -0,5 $^{\circ}$ C/cyklus
Annealing	56	1	
Elongace	72	1,5	
Denaturace	95	0,5	24
Annealing	51	1	
Elongace	72	1,5	
Závěrečná extenze	72	10	1 \times

Tab. 3.8: PCR program PCR 2

	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas [min]	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	10	1
Denaturace	95	1	25
Annealing	60	1	

Elongace	72	1,5	
Závěrečná extenze	72	10	1

Nejprve byla provedena Touch down PCR, ve které došlo k amplifikaci 1500 bp dlouhého fragmentu DNA. Poté následovala druhá PCR s vnitřními primery a byl amplifikován úsek DNA dlouhý 560 bp.

Agarozová elektroforéza

Pro kontrolu reakcí PCR byla provedena agarozová elektroforéza. Do 1 % agarozového gelu s ethidiumbromidem byly vytvořeny jamky, pomocí hřebenu příslušné velikosti, pro aplikaci vzorků. První jamka vždy obsahovala DNA Maker (Marker-Quick-Load 100bp DNA Ladder), který sloužil jako standard. Do dalších jamek bylo aplikováno 5 µl vzorku. Gel se vzorky byl vložen do elektroforetické soustavy naplněné roztokem 1x TAE. Následně došlo k připojení sestavě k napětí 100 V po dobu 25 min a tím došlo k migraci záporně nabitých nukleových kyselin od anody ke katodě. Gel byl umístěn do UV-transiluminátoru a osvětlen UV zářením.

Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)

Byl připraven polyakrylamidový gel s koncentrací denaturačních činidel (močoviny a formamidu) 30 až 70 %, vzniklý gel byl ponechán při laboratorní teplotě po dobu 2 h pro dosažení jeho úplné polymerace. Pro polymeraci byly použity tetrametyletylenediamin a peroxodisíran amonný.

Do jamek vytvořených pomocí hřebínku a vymytých příslušným pufrům bylo nadávkováno 12 µl markeru (Marker-Quick-Load 100bp DNA Ladder) a PCR produktů (vzorků).

Tab. 3.9: Podmínky provedení DGGE

Vložené napětí	120 V
Vložený proud	36 mA
Doba	900 min
Teplota v termostatu	60 °C
Použitý pufr	1x TAE

Po proběhnutí elektroforézy byl gel umístěn do barvicího roztoku – 450 ml destilované vody, 50 ml 10x TAE a 50 µl fluorescenčního barviva GelRed (Biotium), na 2 h za stálého třepání při 450 RPM/min. Pro zobrazení výsledného gelu byl použit UV-transiluminátor a poté došlo k vyřezávání bandů z gelu a jejich umístění do mikrozkupek.

Následná polymerázová řetězová reakce a purifikace

Bandy byly vyřezány z gelu a rozpouštěny přidávkem sterilní PCR vody a skleněných kuliček, vše bylo vortexováno a směs byla umístěna do lednice,

kde došlo k volnému rozpouštění gelu a uvolnění DNA do roztoku. DNA obsažená v příslušných bandech byla vyříznuta, znovu amplifikována pomocí primerů 341F bez GC svorky a 907R a purifikována kitem Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid).

Sekvenace a vyhodnocení výsledků

Byly připraveny sekvenační směsi obsahující DNA a primer 907r a zaslány na sekvenaci do firmy SEQme s.r.o. Výsledné sekvence byly upraveny pomocí programu DNA Baser a Finch TV. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí databáze BLAST (National Library of Medicine).

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Produkce methanu obsaženého v bioplynu v přítomnosti vybraných inhibičních látek

Byl studován inhibiční efekt vybraných modelových látek v prostředí simulujícím produkci bioplynu z kukuřičné a travní biomasy, která je v průmyslovém měřítku nejčastěji využívaným substrátem pro bioplynové stanice. Digestát po anaerobní fermentaci byl využit jako mikrobiální inokulum ve dvou skupinách experimentů, které probíhaly s dvěma různými substráty. První substrát, který sloužil jako zdroj uhlíku byla celulóza, která představovala všechny fáze procesu anaerobní fermentace (hydrolyza, acetogenese a methanogenese), druhým substrátem byl octan sodný, který naopak zahrnoval pouze methanogenesi. Jako modelové inhibiční látky byly zvoleny furfural a 5-hydroxymethylfurfural vznikající dehydratací produktů v průběhu termické předúpravy rostlinné biomasy (Barakat *et al.*, 2012; Chiaramonti *et al.*, 2012) a dále kyselina galová a tříslivá, jako zástupci fenolických látek vznikající v průběhu degradace rostlinného ligninu (Hernandez and Edyvean *et al.*, 2008; Barakat *et al.*, 2012).

4.1.1 Inhibiční efekt furfuralu a 5-hydroxymethylfurfuralu na produkci methanu

Inhibiční účinek furfuralu (FUR) a 5-hydroxymethylfurfuralu (HMF) byl v tomto experimentu studován v koncentracích až 2 g/l, což je výrazně více než očekávaná koncentrace v reálném procesu (Bellido *et al.*, 2011). Ze získaných dat produkce methanu byly pomocí matematického modelu vyhodnoceny parametry jako lagová fáze, maximální a mezní rychlost produkce methanu (Tab. 4.1). Následně byly uvedené parametry využity pro srovnání inhibičních účinků u jednotlivých experimentů.

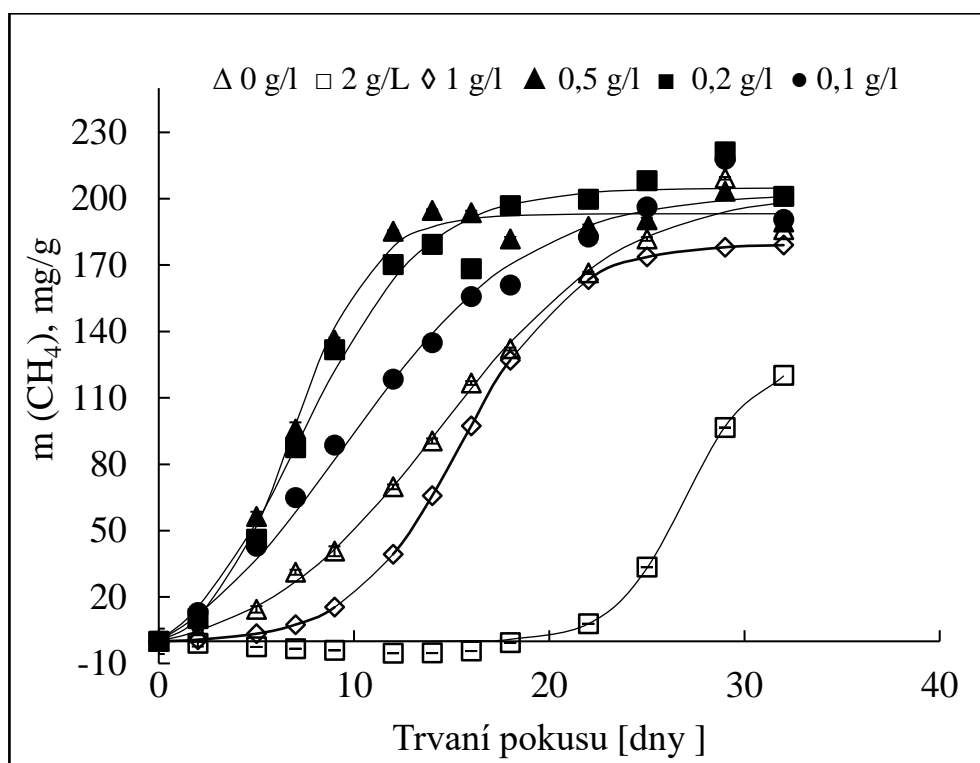
Tab. 4.1: Optimalizované parametry matematického modelu

Zdroj uhlíku - octan sodný							
C_{FUR} [g/l]	λ [d]	$m(CH_4)_{MAX}$ [mg/g]	v_{MAX} [mg/(g.d)]	C_{HMF} [g/l]	λ [d]	$m(CH_4)_{MA}$ x [mg/g]	v_{MAX} [mg/(g.d)]
0,0	5,0	213	11	0,0	15	280	4,94
0,1	0	230	12	0,1	ND	ND	ND
0,2	0,9	226	18	0,2	7,7	324	6,39
0,5	2,7	200	24	0,5	11	280	3,38
1,0	9,9	180	16	1,0	4,4	103	0,91
2,0	23	126	18	2,0	ND	ND	ND
Zdroj uhlíku – celulóza							
C_{FUR} [g/l]	λ [d]	$m(CH_4)_{MAX}$ [mg/g]	v_{MAX} [mg/(g.d)]	C_{HMF} [g/l]	λ [d]	$m(CH_4)_{MA}$ x [mg/g]	v_{MAX} [mg/(g.d)]
0,0	1,9	121	4,58	0,0	0,0	28,2	0,68

0,1	0,1	132	5,01	0,1	ND	ND	ND
0,2	3,1	114	4,28	0,2	0,0	12,9	18,0
0,5	2,7	106	4,35	0,5	3,0	4,42	17,6
1,0	23	140	4,95	1,0	20	2,57	ND
2,0	ND	0	ND	2,0	ND	ND	ND

λ - délka lagové fáze; $m(\text{CH}_4)_{\text{MAX}}$ - asymptotické maximum produkce methanu; v_{MAX} - maximální poměr produkce methanu; C_{FUR} - koncentrace furfuralu; C_{HMF} - koncentrace 5-hydroxymethylfurfuralu; ND - nedefinováno

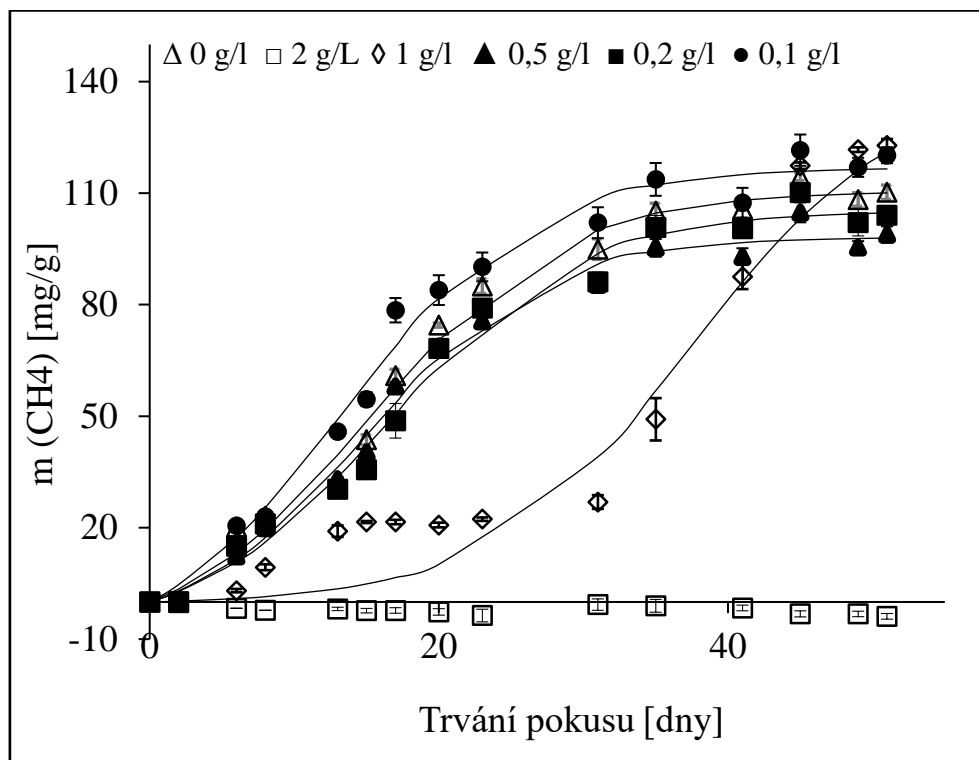
V experimentu s octanem sodným a FUR o koncentraci nižší než 1 g/l měl furfural oproti očekávání povzbudivý efekt na produkci methanu a lze tedy říci, že při takovýchto podmínkách by FUR mohl být využit mikroorganismy jako další zdroj uhlíku (Obr. 4.1). Naopak u koncentrací FUR vyšších než 1 g/l byl již zaznamenán inhibiční účinek, který se zvyšoval se stoupající koncentrací FUR až do 2 g/l. Částečné zpomalení produkce methanu bylo pozorováno jako prodloužení lagové fáze na začátku experimentů, nicméně bylo prokázáno, že i nejvyšší testovaná koncentrace FUR byla nakonec metabolizovaná čili detoxikována a po jisté době byla produkce methanu srovnatelná s produkcí kontrolního vzorku bez inhibiční sloučeniny.



Obr. 4.1 Produkce methanu v různých koncentracích FUR
Produkce methanu je vyjádřena jako gram vloženého uhlíkového substrátu neboli octanu sodného

Stejný postup byl použit i u experimentů, ve kterých sloužil jako vstupní substrát a zdroj uhlíku celulóza (Obr. 4.2). Oproti předchozímu experimentu

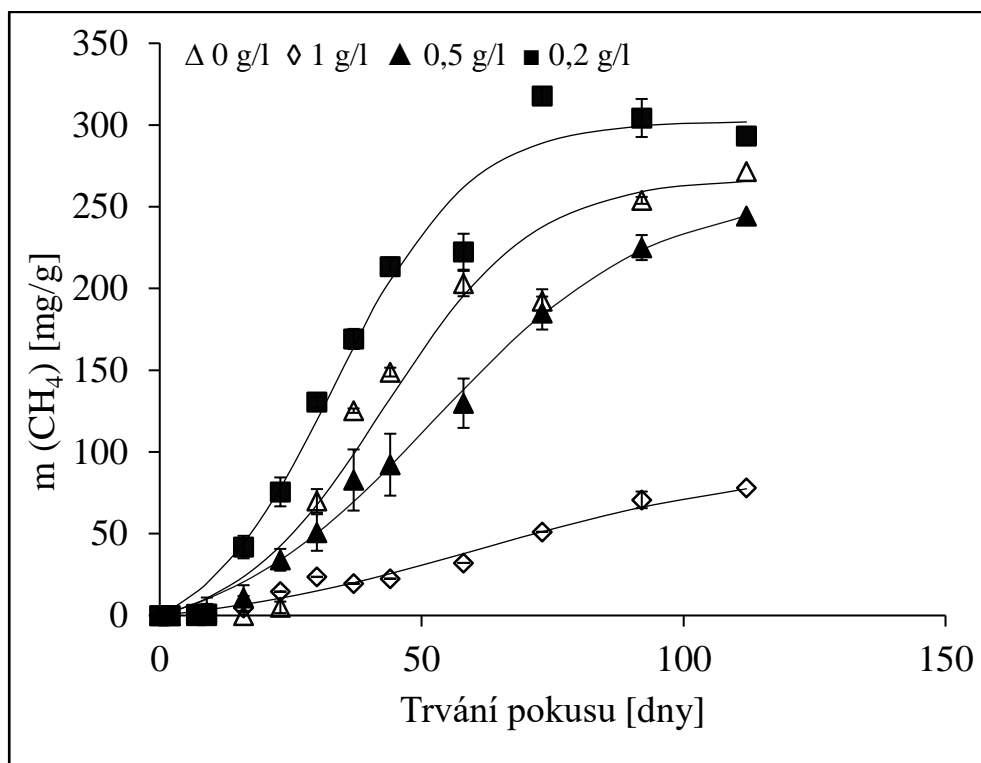
se zde inhibice projevila již při koncentraci FUR 1 g/l, je tedy možné, že methanogenesi předchází některé procesy, využívající celulosu, které jsou citlivější na přítomnost FUR než samotná methanogenese.



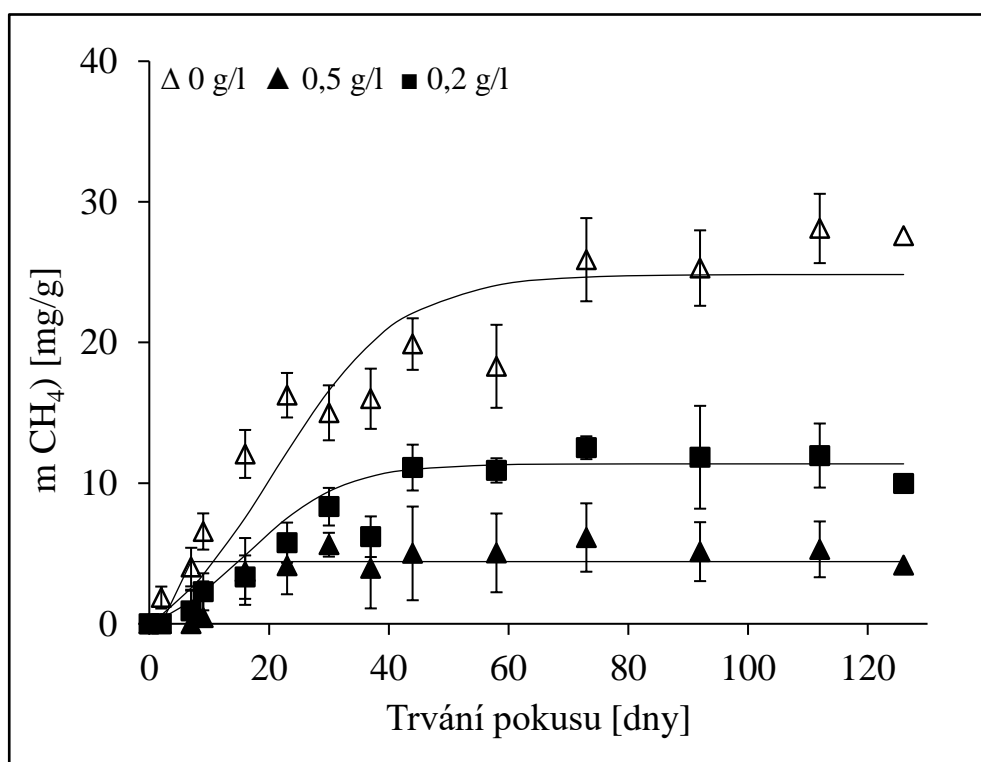
Obr. 4.2 Produkce methanu v různých koncentracích FUR.

Produkce methanu je vyjádřena jako gram vloženého uhlíkového substrátu neboli celulosy

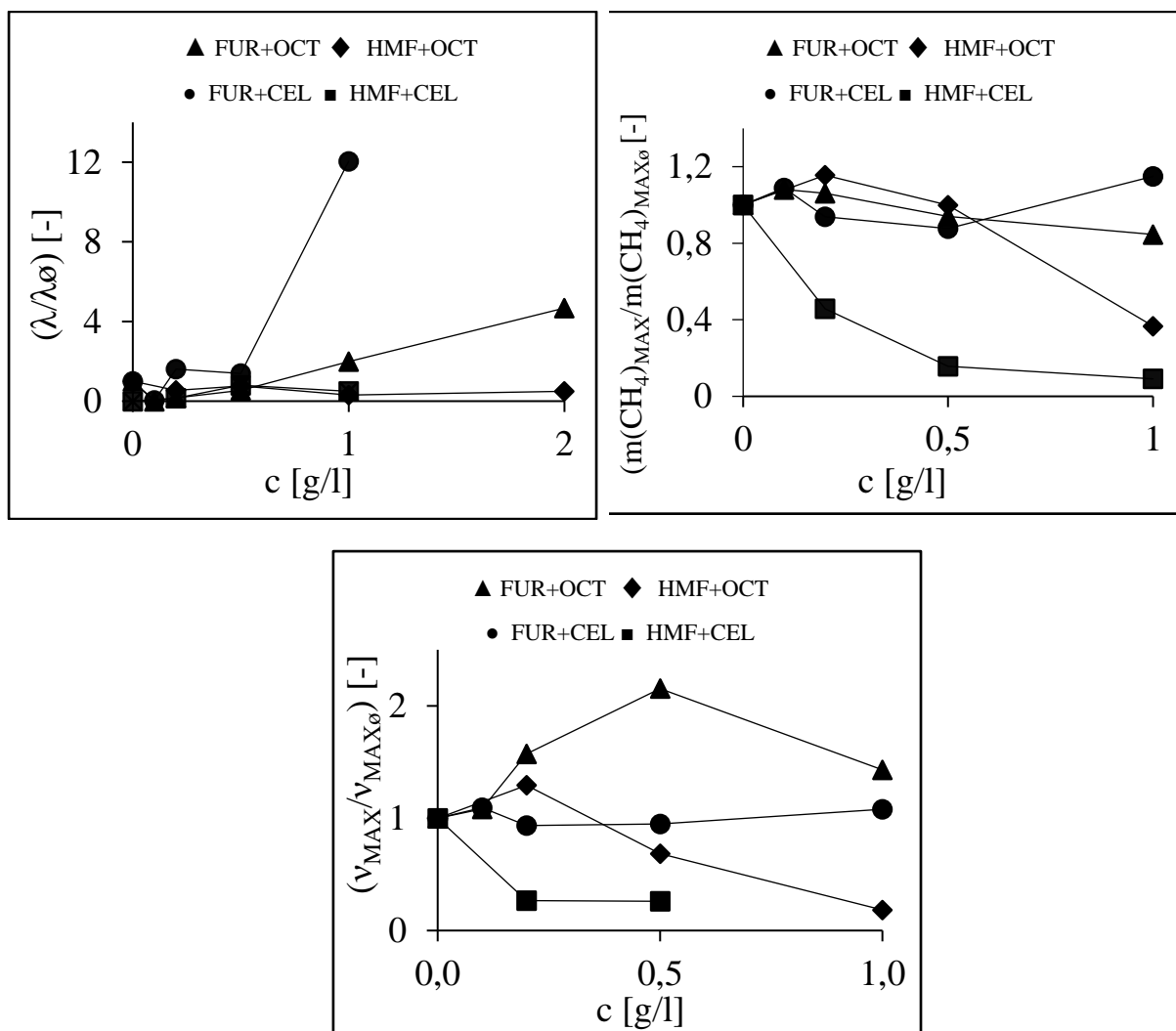
Výrazně vyšší inhibiční efekt byl prokázán u HMF, a to již u koncentrace 0,5 g/l (Obr. 4.3). Na rozdíl od FUR, došlo u HMF ke snížení maximální rychlosti a stupně produkce methanu (Obr. 4.5), bez jakéhokoliv náznaku obnovení produkce methanu po určité časové periodě. Lze tedy usoudit, že HMF nelze odstranit ze systému a způsobuje permanentní inhibici daného procesu.



Obr. 4.3 Produkce methanu v různých koncentracích HMF. Produkce methanu je vyjádřena jako gram vloženého uhlíkového substrátu neboli octanu sodného



Obr. 4.4 Produkce methanu v různých koncentracích HMF. Produkce methanu je vyjádřena jako gram vloženého uhlíkového substrátu neboli celulosy



Obr. 4.5 Parametry matematického modelu

Stejně jako u FUR byla produkce methanu v přítomnosti celulosy jako zdroje uhlíku více náchylná k inhibici než za přítomnosti octanu sodného. V tomto případě se inhibice projevila již u koncentrace HMF 0,2 g/l (Obr. 4.4). Z výsledků vyplývá, že při produkci methanu není methanogenese vybranými látkami ovlivněna tak výrazně, jako hydrolýza či acetogenese.

Na konci experimentu byly analyzovány parametry u jednotlivých zvolených koncentrací vybraných látek, které jsou charakterizovány v Tab. 4.2, pH a koncentrace rozpuštěného anorganického uhlíku (IC) značí, že přidání inhibiční sloučeniny nezpůsobilo změnu v metabolickém procesu methanogenese.

Tab. 4.2: Naměřené parametry u jednotlivých koncentrací inhibičních látek na konci experimentu

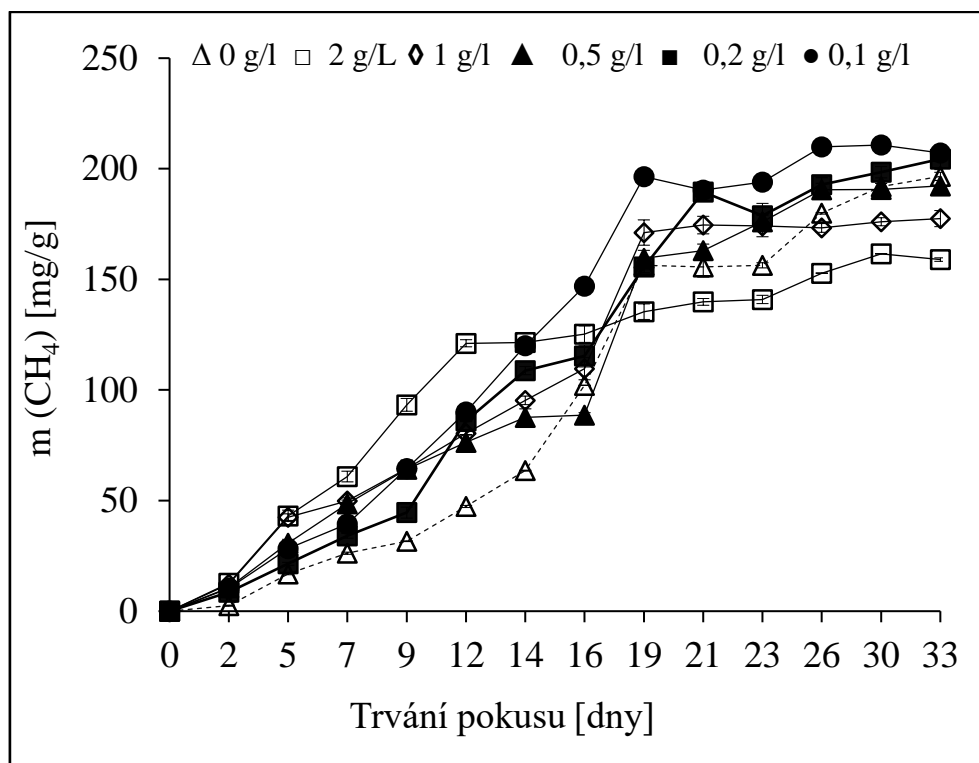
Zdroj uhlíku - octan sodný									
C _{FUR} [g/l]	pH [-]	IC [g/l]	D _t [%]	CH ₄ [%]	C _{HMF} [g/l]	pH [-]	IC [g/l]	D _t [%]	CH ₄ [%]
0,0	8,38	1,73±0,05	75	93	0,0	8,36	1,74±0,10	89	97
0,1	8,31	1,88±0,04	78	93	0,1	8,25	1,75±0,09	87	94
0,2	8,29	1,78±0,08	76	92	0,2	8,05	1,69±0,11	80	89
0,5	8,11	1,71±0,12	70	89	0,5	8,42	1,65±0,01	56	24
1,0	7,97	1,83±0,16	66	87	1,0	8,18	0,00	0	0
2,0	7,21	1,41±0,62	46	79	2,0	8,21	0,00	0	0
Zdroj uhlíku – celuloza									
C _{FUR} [g/l]	pH [-]	IC [g/l]	D _t [%]	CH ₄ [%]	C _{HMF} [g/l]	pH [-]	IC [g/l]	D _t [%]	CH ₄ [%]
0,0	7,99	1,13±0,02	42	57	0,0	8,15	1,99±0,07	51	39
0,1	8,15	1,10±0,01	42	60	0,1	8,09	2,12±0,05	50	26
0,2	8,32	1,12±0,02	40	57	0,2	8,32	2,06±0,05	47	8
0,5	8,13	1,10±0,03	39	56	0,5	8,24	2,35±0,08	47	5
1,0	8,21	1,07±0,36	37	67	1,0	8,40	0,00	0	0
2,0	8,09	0,00	0	9	2,0	8,15	0,00	0	0

Z Tab. 4.2 je patrné, že v případě octanu sodného jako srovnávací látky, byla prokázána výrazně vyšší úroveň mineralizace, což vedlo ke zvýšené tvorbě methanu. Navíc účinná koncentrace přidaných inhibičních látek postupně snižovala obsah methanu, i když dramatický účinek byl pozorován pouze u koncentrací silně inhibujících produkci methanu.

Při posledních experimentech s HMF a celulosou, jako srovnávací látkou, byl použit digestát č. 3. V těchto testech byla rychlost produkce methanu a jeho obsah v bioplynu (Tab. 3.2) poněkud nižší, což mohlo být pravděpodobně způsobeno nižším vstupním počtem methanogenních bakterií na začátku experimentu.

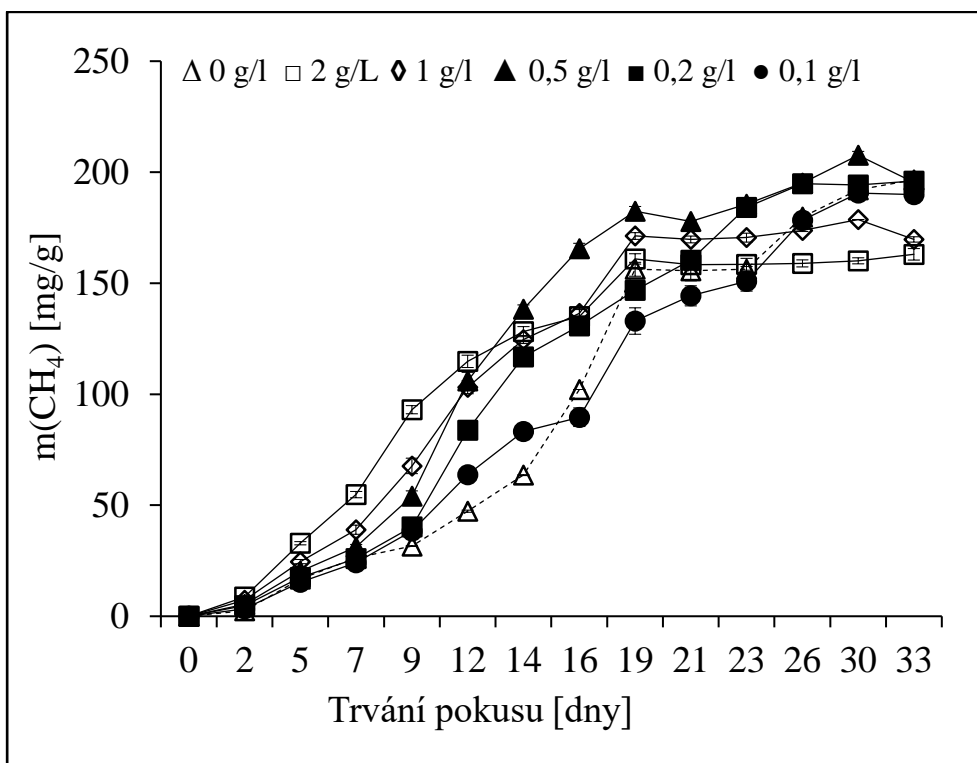
4.1.2 Inhibiční efekt kyseliny galové a tříslové na produkci methanu

V těchto experimentech byl sledován inhibiční efekt vybraných modelových fenolových sloučenin, které představují produkty degradace rostlinného ligninu. Kyselina galová (GA) a tříslová (TA) byly studovány v koncentracích do 2 g/l. Jak je vidět z Obr. 4.6 až Obr. 4.9, dokonce ani při použití nejvyšší koncentrace obou testovaných látek nedošlo k inhibici produkce methanu, a to jak v přítomnosti octanu sodného, tak v přítomnosti celulosy jako zdroje uhlíku.

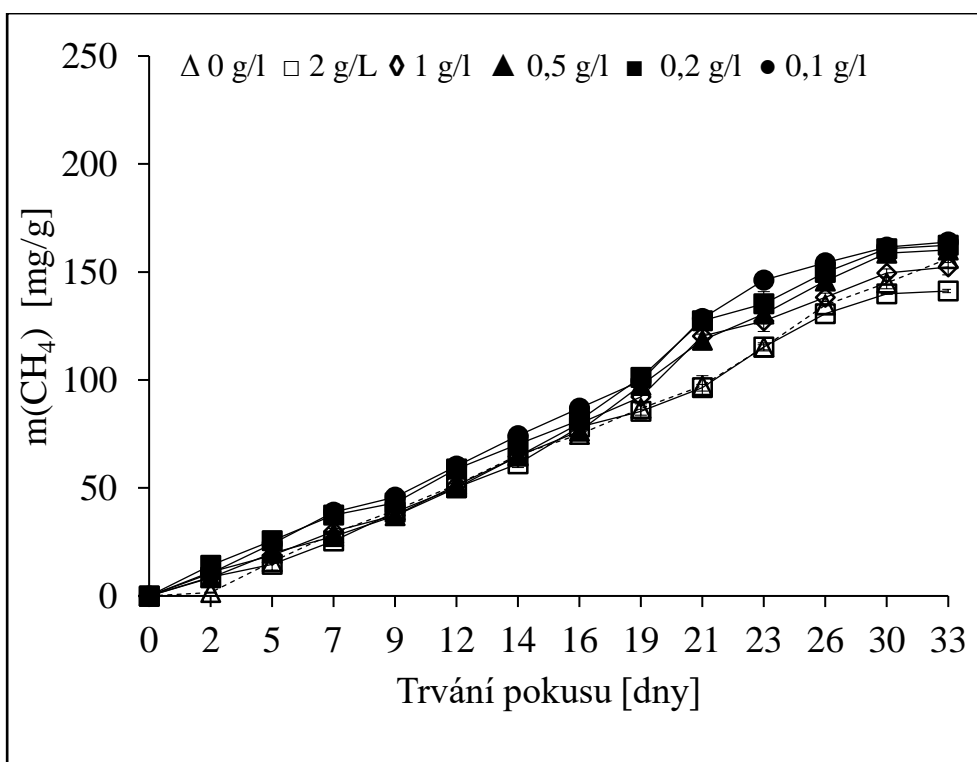


Obr. 4.6 Produkce methanu v různých koncentracích TA. Produkce methanu je vyjádřena jako gram vloženého substrátu neboli octanu sodného

Produkce methanu začala, v případě obou látek a všech zvolených koncentrací, již po 3 dnech inkubace. Nicméně v experimentech s octanem sodným jako srovnávací látkou byla v případě nejvyšší zvolené koncentrace (2 g/l) u GA i TA úroveň maximální produkce methanu mírně nižší (*Obr. 4.6*, *Obr. 4.7*). Lze předpokládat, že při vyšších koncentracích by produkce methanu obsaženého v bioplynu klesala více, avšak takto vysoké koncentrace nejsou v reálném procesu očekávány.

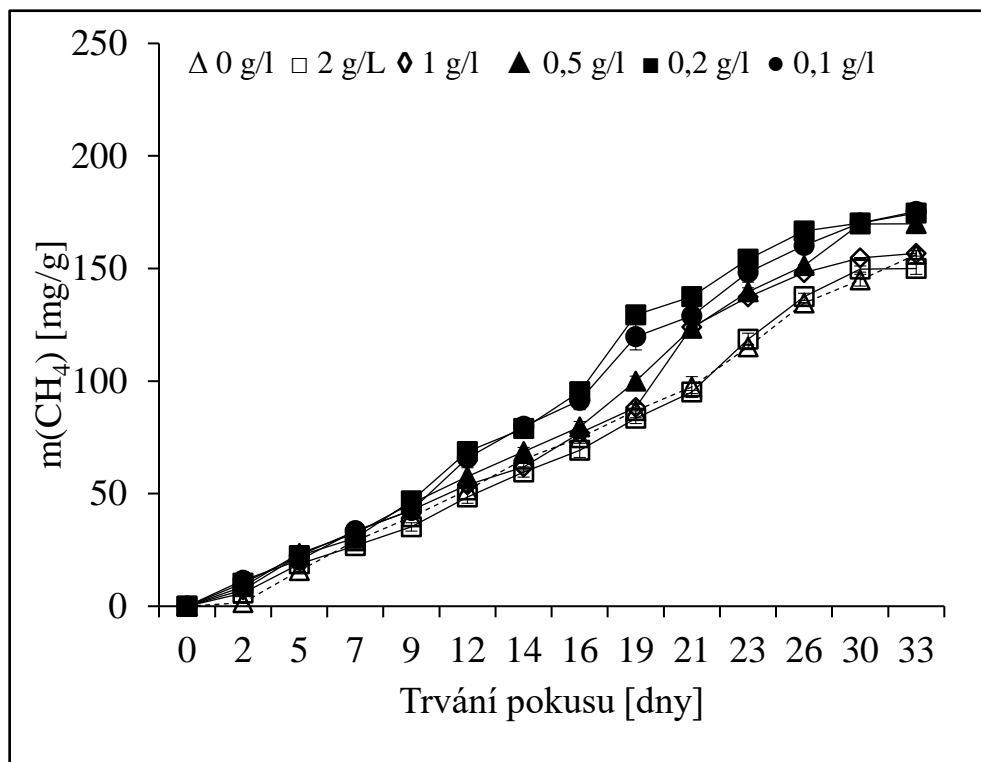


Obr. 4.7 Produkce methanu v různých koncentracích GA. Produkce methanu je vyjádřena jako gram vloženého substrátu neboli octanu sodného



Obr. 4.8 Produkce methanu v různých koncentracích TA. Produkce methanu je vyjádřena jako gram vloženého uhlíkového substrátu neboli celulosy

Provedené testy prokázaly, že v přítomnosti GA ani TA nedochází při anaerobní fermentaci u obou zvolených substrátů k inhibici procesu, ale naopak k podpoře produkce methanu.



Obr. 4.9 Produkce methanu v různých koncentracích GA. Produkce methanu je vyjádřena jako gram vloženého uhlíkového substrátu neboli celulosy

Na konci inkubační doby u všech experimentů bylo vybranými parametry matematického modelu potvrzeno, že základní chemické podmínky v procesu byly srovnatelné bez ohledu na koncentraci inhibičních látek. Mírné snížení hladiny mineralizace při nejvyšší koncentraci kyseliny galové v přítomnosti obou substrátů (Obr. 4.6 až Obr. 4.9), by mohlo signalizovat nástup inhibice v této poměrně extrémní koncentraci sloučeniny, avšak ta není ve skutečném procesu v případě bioplynových stanic očekávána.

Tato studie neprokázala inhibici produkce methanu v přítomnosti FUR v koncentracích pod 1 g/l. HMF se jevil jako silnější inhibitor se znatelným účinkem v koncentraci nad 0,2 g/l. Nicméně obě sloučeniny byly účinnějšími inhibitory v přítomnosti celulosy jako uhlíkového substrátu, což může být potencionálním důkazem vyšší citlivosti na první krok (hydrolyzu) v procesu produkce bioplynu.

V případě vybraných fenolických sloučenin GA a TA nebyl prokázán žádný inhibiční efekt při koncentracích do 2 g/l. Je možné říci, že vybrané kyseliny spíše podpořili produkci methanu.

Závěrem lze říci, že vybrané testované sloučeniny výrazně neovlivňují výrobu a výtěžnost bioplynu z rostlinné biomasy předupravenou termickou metodou.

4.2 Biodegradace kyseliny polymléčné a jejich směsí v podmínkách kompostu

V rámci těchto experimentů bylo sledováno několik fyzikálních charakteristik směsí kyseliny polymléčné (PLA) s biodegradabilními polymerními materiály během rané fáze degradace v kompostu. Průmyslové kompostování se jeví jako nejvýhodnější cesta pro odstranění takových materiálů. Změny v mechanických vlastnostech a doba biodegradčního procesu je důležitá pro dosažení co nejlepších výsledků rozkladu těchto materiálů v kompostovacích zařízeních. Experimenty byly proto prováděny v podmínkách kompostu, které jsou srovnatelné s průmyslovým kompostováním zvláště v souvislosti s teplotou procesu a dosažené výsledky by mohly být v omezené míře aplikovány také pro domácí kompostování.

Byly testovány tři vybrané materiály, a to čistá PLA, PLA s plastifikátorem triacetinem (TAC) a směs PLA/PHB/TAC, kde PHB bylo ve směsi zastoupeno z 20-ti %. Obsah PHB ve směsi byl zvolen na základě studií (Babu *et al.*, 2011; Abdelwahab *et al.*, 2012), kde byly popsány vlastnosti těchto směsí v různém procentuálním zastoupení. V průběhu kompostování pak byly monitorovány fyzikální a strukturální změny testovaných materiálů.

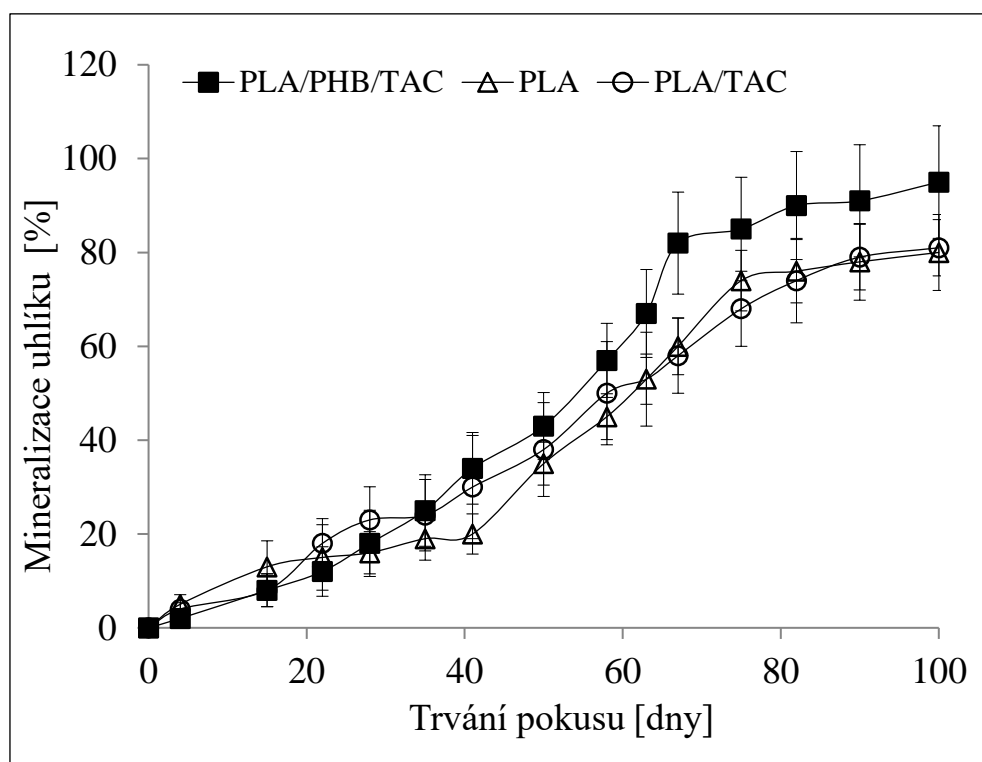
4.2.1 Biodegradace směsí PLA/PHB v kompostu

Před testováním samotných vzorků připravených směsí byl po dobu 119 dní kompostován vzorek čisté PLA při teplotách 25, 37 a 58 °C pro stanovení vhodné teploty pro samotné experimenty.

Tab. 4.3: Stupeň mineralizace čisté PLA v % v průmyslovém kompostu při teplotách 25, 37 a 58 °C

Dny	0	21	49	77	98	119
25 °C	0	3,1	4,6	9,1	13,0	14,9
37 °C	0	3,4	4,6	7,6	13,2	19,5
58 °C	0	23,9	52,2	71,0	84,8	92,3

V Tab. 4.3 je vidět významný rozdíl rychlosti degradace PLA v závislosti na teplotě, kdy při 58 °C byla mineralizace po 119 dnech téměř 100 % proti nižším teplotám. Protože teplota skelného přechodu PLA je v rozmezí 54 až 60 °C (Cadar *et al.*, 2012), tyto výsledky byly očekávány i z důvodu již publikovaných výsledků v odborné literatuře (Mochizuki *et al.*, 2002). Pro následující experimenty směsí PLA byla zvolena teplota kompostování 58 °C. Výsledky experimentu jsou graficky znázorněny na Obr. 4.10.



Obr. 4.10 Biodegradace PLA a směsí PLA v kompostu

Na Obr. 4.10 je znázorněno procento biodegradace v závislosti na čase čisté PLA, PLA/TAC a PLA/PHB/TAC. Míra biodegradace u všech tří materiálů je podobná. Nicméně PLA a PLA/TAC dosahuje mineralizace téměř 90 %, zatímco mineralizace PLA/PHB/TAC se blíží 100 % po 100 dnech v kompostu při teplotě 58 °C. Výsledné hodnoty mineralizace jsou vysoké a jsou srovnatelné s výsledky již publikovanými jinými autory (Ljungberg *et al.*, 2002; Yeh *et al.*, 2009).

V prvních 16 dnech biodegradace je stupeň mineralizace všech tří vzorků podobný a nepřesahuje 10 % hmotnosti vzorku, což bylo stanoveno z obsahu CO₂. Rozpad čistého vzorku PLA byl pozorován až po 10 dnech, zatímco zbylé dva materiály byly dezintegrovány již po 8 dnech uložení v kompostu a pro další experimenty (např. diferenční kompenzační kalorimetrie, infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací) musely být vzorky odebrány z kompostu v podobě malých kousků či hrubého prášku.

Pro biodegradaci čisté PLA je charakteristický pomalejší rozklad v počáteční fázi, což je běžné převážně pro vysokomolekulární PLA. Míra a rychlost degradace PLA v závislosti na její molekulové hmotnosti (M_w) byla popsána a prostudována několika autory (Husarova *et al.*, 2014; Stloukal *et al.*, 2016). Křivka degradace vzorku s plastifikátorem je mírně nad křivkou čisté PLA, což může být vysvětleno rychlejší degradací poměrně snadno rozložitelného plastifikátoru v první třetině testované časové periody. Směs PLA/PHB/TAC dosáhla maximální degradace a vyšší míry mineralizace dříve, což značí lepší biodegradabilitu PHB ve srovnání s PLA. Navíc přítomnost PHB ve směsi PLA může způsobit strukturální defekty vedoucí k rychlejší dekompozici a následně

ke zvýšení aktivní povrchové oblasti materiálu, čímž je dosaženo zrychlení celého procesu. Toto zrychlení je pozorováno na křivce až po 50 dnech mineralizace.

Součástí studie bylo sledování úbytku M_w v průběhu kompostování všech testovaných materiálů, jako indikátoru míry degradace polymerních vzorků. U všech tří testovaných materiálů byl pozorován pokles M_w již po několika dnech kompostování. Závislosti byly poměrně lineární, což indikuje, že rozklad je převážně reakce prvního řádu odpovídající procesu katalyzovanému bakteriálními enzymy. Po 16 dnech inkubace v kompostu došlo u směsi PLA/TAC a PLA/PHB/TAC k úbytku M_w přibližně o 93 %, v případě PLA o 89 %. Současně byla prováděna infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací pro pochopení chemických změn, které se dějí v průběhu biologického rozkladu PLA směsných folií v kompostu. Ze získaných výsledků lze konstatovat, že přítomnost TAC vedla ke zvýšení rychlosti degradace materiálu, i když není zcela zřetelné, zda změny ve spektrech byly výsledkem pouze degradace plastifikátoru anebo byly i ovlivněny strukturou PLA. Přítomnost PHB ve směsi PLA/TAC přispívá ke zvýšení rychlosti biodegradace materiálu a také že, navzdory značnému poklesu M_w , nedošlo k podstatné změně v chemickém složení testovaných materiálů. Posledním indikátorem účinnosti biodegradace těchto materiálů bylo sledování změn krystalizace vzorků v průběhu jejich biodegradace metodou diferenciální skenovací kalorimetrie. Tyto změny jsou důležité zvláště, když je brána v potaz přednostní degradace amorfní fáze před krystalickou částí, protože ta je ovlivněna mnohem méně, jestli vůbec (MacDonald *et al.*, 1996). Bylo zjištěno, že krystalizační chování všech vzorků je poměrně složité a reflektuje rozdílnou míru biodegradace jednotlivých složek ve směsi a stejně tak rozdílnou míru biodegradace krystalické a amorfní oblasti stejné sloučeniny. Plastifikátor triacetin byl ze vzorku odstraněn poměrně rychle a také se projevilo dočasné zvýšení teploty skleného přechodu (T_g), která se blížila hodnotě typické pro PLA bez plastifikátoru. Lze říci, že materiály si v průběhu kompostování drží svůj tvar po dobu 8 dní, po tomto čase dochází k defragmentaci na částice o velikosti <1 cm. Tyto testy a analýzy probíhaly ve spolupracující laboratoři na Ústavu polymerů na Slovenské Akademii Věd (Sedničková *et al.*, 2018).

4.2.2 Biodegradace PLA a směsí PLA nanokompozitů v kompostu

V této části práce bylo cílem zkoumat biodegradaci chování nanokompozitů PLA s různými komerčně dostupnými nemodifikovanými nebo organomodifikovanými montmorillonity (MMT). Nanokompozitové folie byly připraveny dvoušnekovým vytlačováním s následným plochým lisováním. Zvláštním důraz byl kladen na optimalizaci parametrů procesu a splnění dvou protichůdných cílů, a to dobré interakce jílu s PLA a minimalizace tepelné degradace PLA. Paralelně byl sledován mikrobiální rozklad, abiotická hydrolýza

a byl hodnocen vliv morfologie a vlastností vyrobených směsí PLA spolu s přítomností a typem organického modifikátoru na rychlost a mechanismus biodegradace.

Charakterizace zkoumaných materiálů

Biodegradace polymerních materiálů je významně ovlivněna vlastnostmi vstupního materiálu, jeho složením, přidanými aditivami a historií postupu výroby. Většina souvisejících studií používá komerčně dostupné materiály, u kterých jsou ovšem nedostatečné informace o jejich složení, aditivech a historii výroby. Proto bylo v této studii rozhodnuto vyrobit materiály odpovídající komerčním materiálům, avšak s důkladným řízením jejich přípravy a konečnými vlastnostmi. Vyrobené směsi byly poté zkoumány v souvislosti s jejich vlastnostmi, což bylo nezbytné pro interpretaci dat z biodegradačních experimentů.

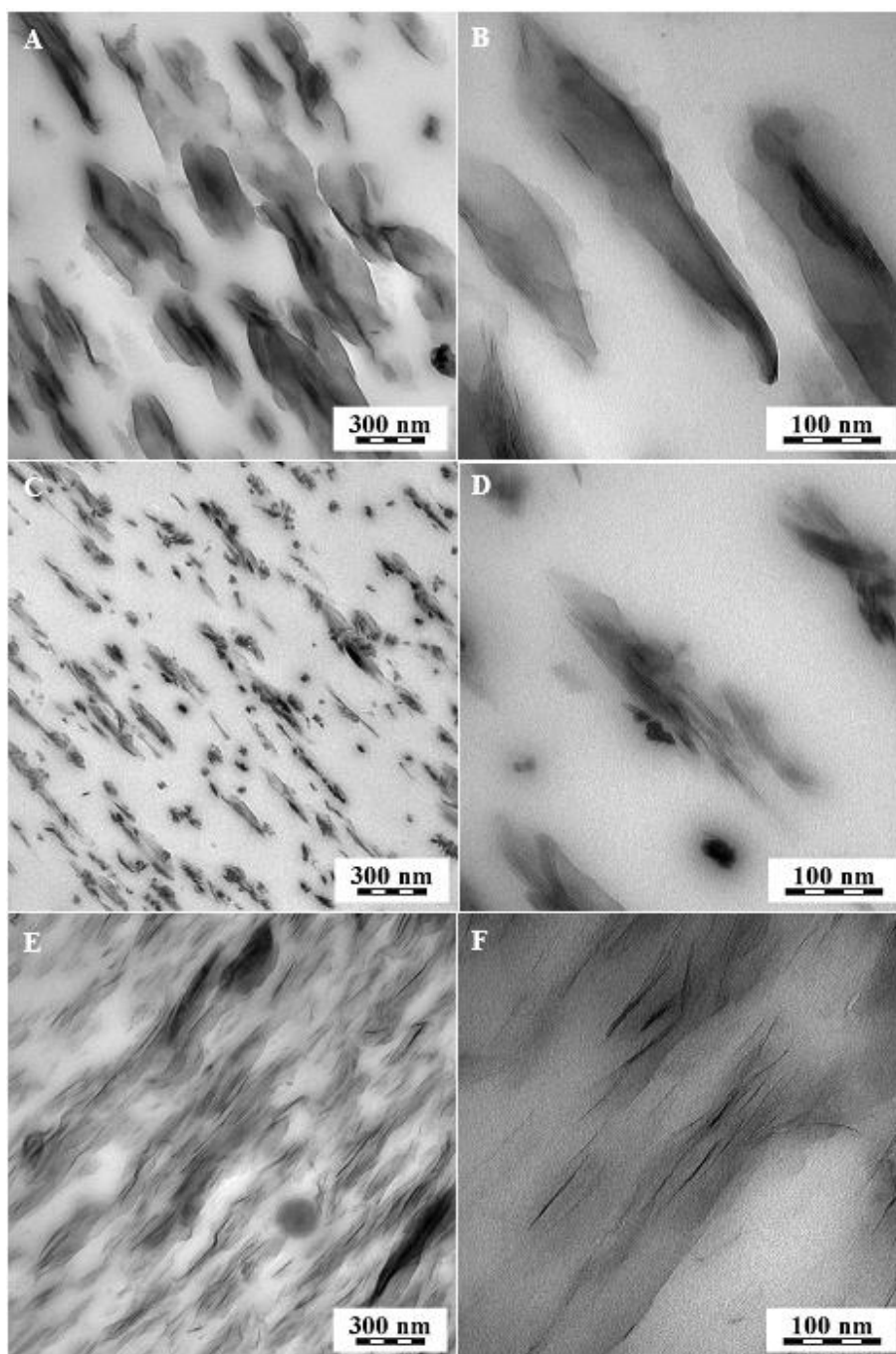
Kvalita disperze plniva v připravených nanokompozitech s různými komerčně dostupnými přírodními nebo organomodifikovanými MMT byla analyzována pomocí maloúhlové rentgenové difrakce (SAXS). Jak se očekávalo z předchozí studie (Rhim *et al.*, 2009), materiály s přírodním MMT vykazovaly nižší stupeň disperze a plnivo zůstalo v jejich počátečním uspořádání, pravděpodobně díky slabým interakcím se spíše hydrofobní PLA. Výpočet meziprostorové vzdálenosti d_{002} (Tab. 4.4) velice dobře korespondoval s počátečními hodnotami plniv (Tab. 3.1).

Tab. 4.4: Mezivrstevní vzdálenosti vypočítané z disperzních vektorů SAXS analýzou

Vzorky	PLA-10A	PLA-20A	PLA-30B	PLA-GA	PLA-NA3010
d_{001} pík1/pík2 (nm)*	3,3/ 1,6	3,5/ 1,7	3,4/ 1,7	3,7/ 1,2	3,5/ 1,8

*Vypočítané meziprostorové vzdálenosti výchozích hodnot plniva a interkalované frakce plniv

Zatímco v interkalované frakci plniv byl mezivrstevní prostor téměř dvojnásobný oproti původnímu stavu, a to zvláště v případě organomodifikovaných MMT. Takové výsledky naznačují, že rozhodující jílová část byla dobře interkalována nebo částečně exfoliována díky začlenění polymerního řetězce mezi vrstvy jílu, nicméně stále zůstávala i část neinterkalovaných aglomerátů.



Obr. 4.11 TEM snímky PLA-Na3010 (A,B), PLA-GA (C,D) a PLA-30B (E,F)

TEM snímky tří reprezentativních vzorků (Obr. 4.11) PLA-Na3010 (A,B), PLA-GA (C,D) a PLA-30B (E,F), potvrdily a rozšířily již dosažené výsledky ze SAXS analýzy. Bylo patrné, že jílové částice dispergované v nanokompozitech PLA-Na3010 byly větší než přibližně 100 nm a špatně interkalovány. Relativně dobře interkalovaná struktura s částečnou exfoliací jílových vrstev byla viditelná v případě PLA-GA, ale stále s několika menšími agregáty, naopak u vzorku PLA-30B je již viditelná vysoká míra exfoliace, agregáty nejsou patrné.

Výsledky gelové permeační chromatografie (GPC) uvedené v *Tab. 4.5* ukazují mírný pokles M_w po procesu tavení PLA ve srovnání s původní nezpracovanou PLA. Je známo (Taubner a Shishoo, 2001; Signori *et al.*, 2009) že tepelná degradace PLA v průběhu zpracování tavením vede ke ztrátě M_w , což může nepříznivě ovlivnit vlastnosti finálního produktu a jeho biodegradaci.

Štěpení řetězců nanokompozitů PLA/MMT v tavenině by také mohlo být zvýšeno hydroxylovými skupinami přítomnými v jílových organických modifikátorech a na povrchu jílových nanodestiček (Paul *et al.*, 2003). Nicméně, M_w většiny PLA/jílových nanokompozitů je téměř srovnatelná s čistou PLA. Nejvyšší snížení M_w ve srovnání s čistou PLA bylo 12 % v případě plniva Na3010. Získané výsledky naznačují, že parametry složení a následné způsoby přípravy filmů byly dobře vybalancovány s ohledem na nízkou tepelnou stabilitu PLA, tudíž snížení M_w bylo minimalizováno.

Tab. 4.5: Vlastnosti PLA-MMT nanokompozitních filmů

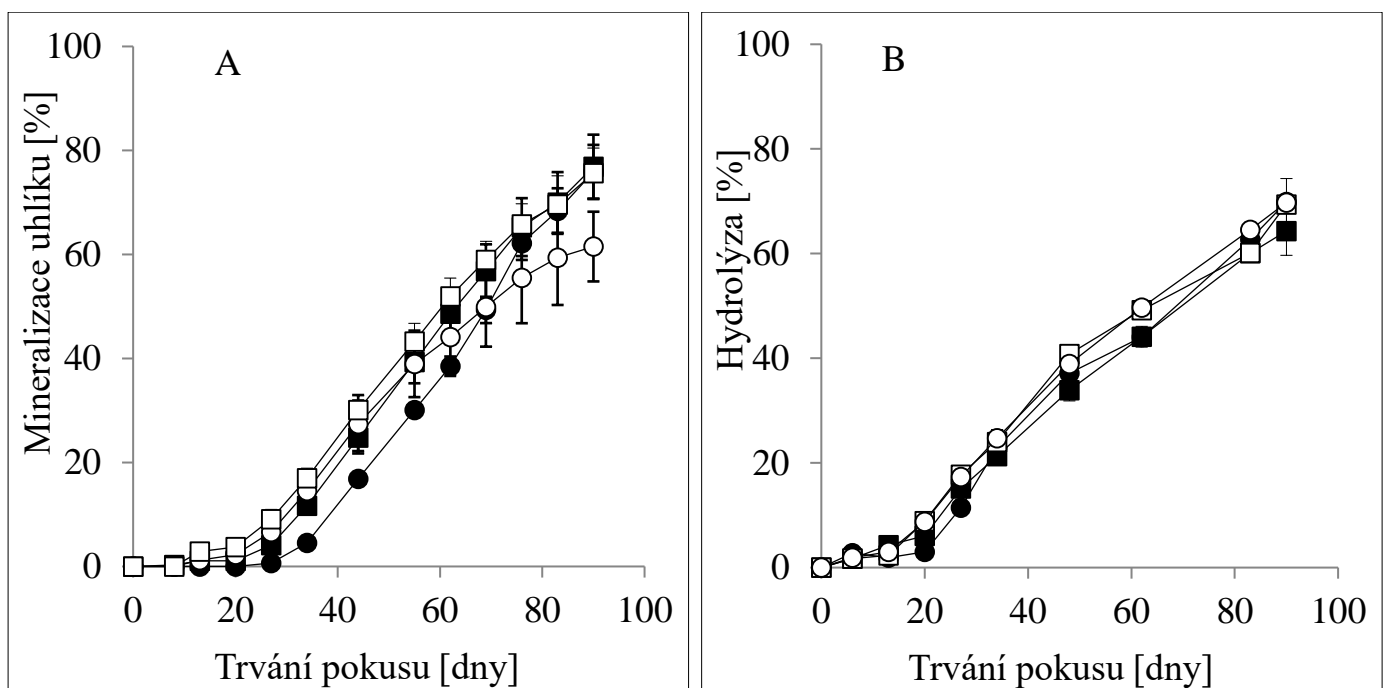
Vzorky	M_w^a [g/mol]	M_w/M_n^b	T_m^c [°C]	T_g^d [°C]	χ_c^e [%]	$\theta_c \pm \text{s.d.}^f$ [°]
PLA	212500	1,77	151,5	60,0	2,7	72,3 ± 2,7
PLA-Na	220200	1,59	157,4	60,7	4,6	66,9 ± 2,2
PLA-A10	199500	1,67	151,4	60,1	1,8	65,2 ± 1,4
PLA-A20	203400	1,66	156,3	60,0	5,5	70,1 ± 0,8
PLA-B30	232800	1,53	152,5	59,9	0,5	61,8 ± 2,0
PLA-NA3010	185800	1,76	151,7	60,1	1,8	61,1 ± 1,6
PLA-NA116	222700	1,66	153,9	59,5	2,7	58,7 ± 1,3
PLA-GA	209300	1,65	150,7	60,0	3,4	68,3 ± 1,4

^a Průměrná molekulová hmotnost; ^b Index polydisperzity; ^c Teplota tání; ^d Teplota skelného přechodu; ^e Krystalinita; ^f Rovnovážný kontaktní úhel se směrodatnou odchylkou

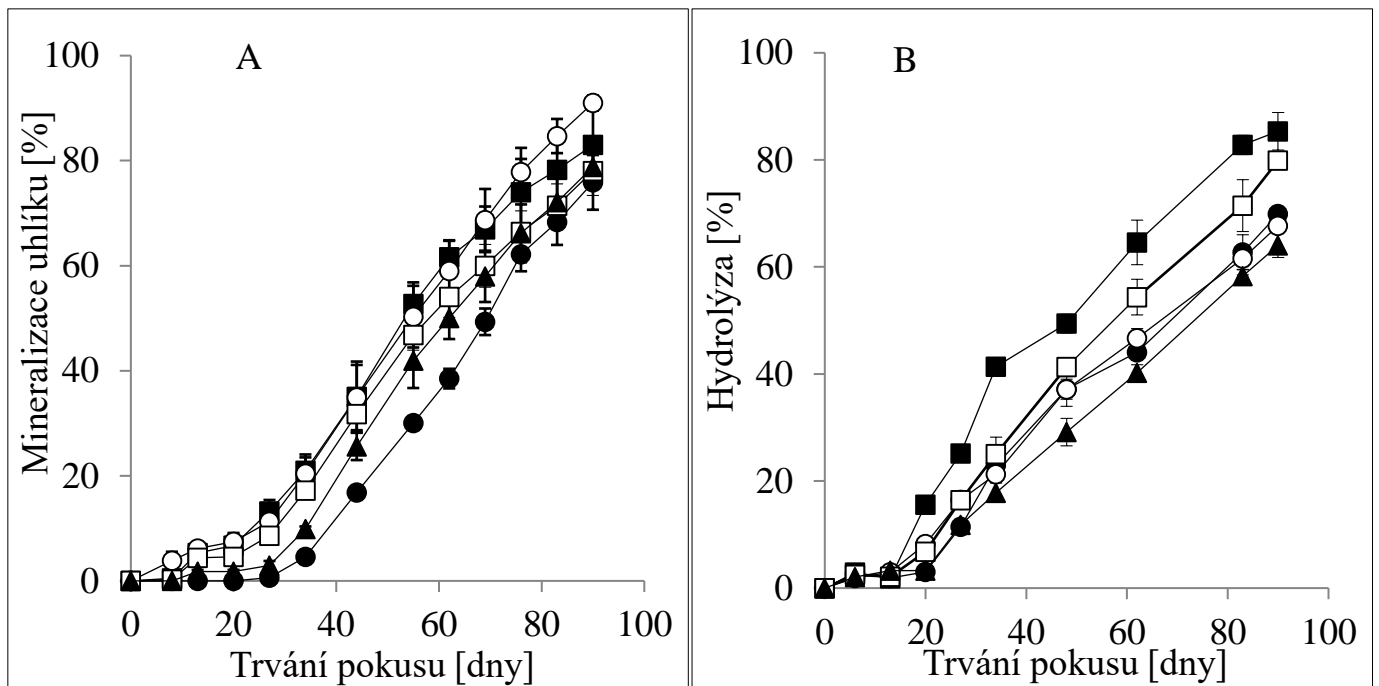
Další faktory, které mohou mít podstatný vliv na míru biologického rozkladu, jsou stupeň krystalizace a hydrofilita materiálu. Bylo zjištěno (Picard *et al.*, 2011), že vzhledem k velkému povrchu exfoliovaných organojílů mohou tyto působit jako nukleační činidlo usnadňující krystalizaci PLA. Kromě toho se předpokládá (Rudnik a Briassoulis, 2011; Kucharczyk *et al.*, 2013), že amorfni část polymeru je přednostně degradovaná a zvýšení krystalizace tedy může snížit rychlost biodegradace materiálu. Krystalinita filmů vyvozená z dat tepelné analýzy byla značně nízká a hodnoty PLA nanokompozitů byly přibližně srovnatelné s čistou PLA, což je pravděpodobně dáno relativně krátkým časem pro krystalizaci při přípravě filmů. Přítomnost hydrofilní organomodifikovaných jíílů vedla ke zvýšení smáčivosti povrchů připravených nanokompozitů, což by mohlo vést k podpoření procesu biodegradace nebo hydrolyzy esterových vazeb (Pluta *et al.*, 2006) ve srovnání s čistou PLA.

4.2.3 Biodegradční test vyrobených filmů v kompostu

Čistá PLA a vzorky nanokompozitů PLA/MMT byly inkubovány v kompostu přibližně 90 dní při teplotě 58 °C (Obr. 4.12A a Obr. 4.13A). Získané výsledky svědčí o mírně zvýšené rychlosti biodegradace pro všechny PLA/MMT nanokompozity v porovnání s čistou PLA, což je v souladu, s již popsaným fenoménem zvýšení biologického rozkladu v přítomnosti organicky modifikovaných nanočástic (Sinha *et al.*, 2003b). Lagová fáze, typická pro biodegradaci vysokomolekulární PLA, může být pro všechny vzorky rozlišena již na začátku procesu a je zřejmě výraznější pro čistou PLA a její směs s přírodním nemodifikovaným MMT Cloisite Na⁺, který vykazuje nízkou úroveň disperze a interkalace (Obr. 4.13A).



Obr. 4.12 Biodegradace v kompostu (A) a abiotická hydrolyza (B) čisté PLA a PLA/jílových nanokompozitových filmů. ■ PLA-NA116; □ PLA-GA; ○ PLA-NA3010, ● čistá PLA



Obr. 4.13 Biodegradace v kompostu (A) a abiotická hydrolyzá (B) čisté PLA a PLA/jílových nanokompozitových filmů. ▲ PLA-Na; ■ PLA -10A; ○ PLA-20A; □ PLA-30B; ● PLA

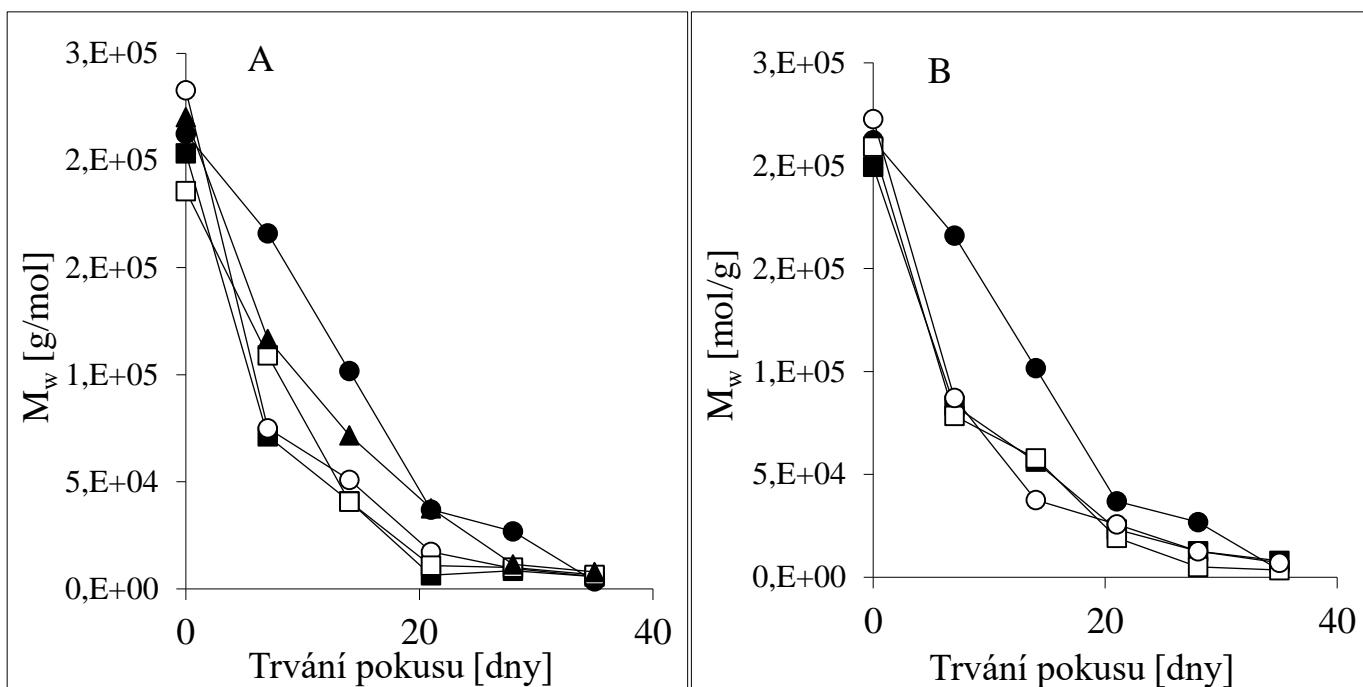
Zdá se, nanokompozity PLA-10A a PLA-20A (Obr. 4.13A) vykazovaly mírně rychlejší nástup biodegradace oproti ostatním testovaným vzorkům, kdy rozklad začal přibližně v 8 dni inkubace a po 90 dnech v kompostu dosáhly vzorky minerálního rozkladu 91 % u PLA-20A a 83 % v případě PLA-10A. Lze také vidět, že navzdory počátečnímu pomalejšímu nástupu biodegradace čisté PLA a PLA-Na, kdy lagová fáze trvala 27 dnů, byla rychlost jejich mineralizace v pozdější fázi biologického rozkladu srovnatelná s PLA/organomodifikovanými jílovými nanokompozity a materiály dosáhly přibližně 78% degradace. To může naznačovat, že povrchová hydrofilita a infiltrace molekul vody je rozhodující v počáteční fázi biodegradčního procesu.

Pro potvrzení důležité role abiotické hydrolyzá při biodegradaci PLA, proběhl experiment, kde byla sledována hydrolyzá testovaných materiálů ve vodném prostředí při 58 °C v přítomnosti látky inhibující mikrobiální růst (NaN_3). Na Obr. 4.12B a Obr. 4.13B je znázorněn průběh hydrolyzá ve stejném měřítku jako křivky biodegradace v kompostu, aby bylo možné jejich srovnání. Z výsledků je zřejmé, že průběh hydrolyzá téměř dokonale kopíruje mineralizační křivky v biodegradčním procesu, pouze s kratšími lagovými fázemi na začátku inkubace. Zároveň však, stejně jako při experimentu v kompostu, je možno pozorovat určitou úroveň zrychlení při degradaci PLA/jílových nanokompozitů, zejména pro vzorek PLA-10A. Na základě těchto výsledků, může být abiotická hydrolyzá považována za hlavní faktor, který řídí rychlost biologické degradace ve zkoumaných vzorcích nanokompozitů.

Jak již bylo zmíněno, rychlost hydrolýzy může být výsledkem několika faktorů, včetně vlastnosti jílu a úrovně disperze plniva v polymerní matrici, jakož i jejich interakcí s polymerními řetězci. Jednou z hlavních příčin urychlení hydrolýzy v PLA/jílových nanokompozitech bylo pravděpodobně zvýšení hydrofility (*Tab. 4.5*). Nicméně, rychlost akcelerace hydrolýzy PLA nebyla úměrná. Například rychlost hydrolýzy s nemodifikovaným jílem Nanofil 116 (*Obr. 4.12*), který má největší povrchovou hydrofilitu, se projevila jako jedna z nejnižších ve srovnání s ostatními PLA nanokompozity. Je tedy možné říci, že úroveň interkalace taktéž hrála významnou roli jak při biodegradaci, tak při hydrolýze.

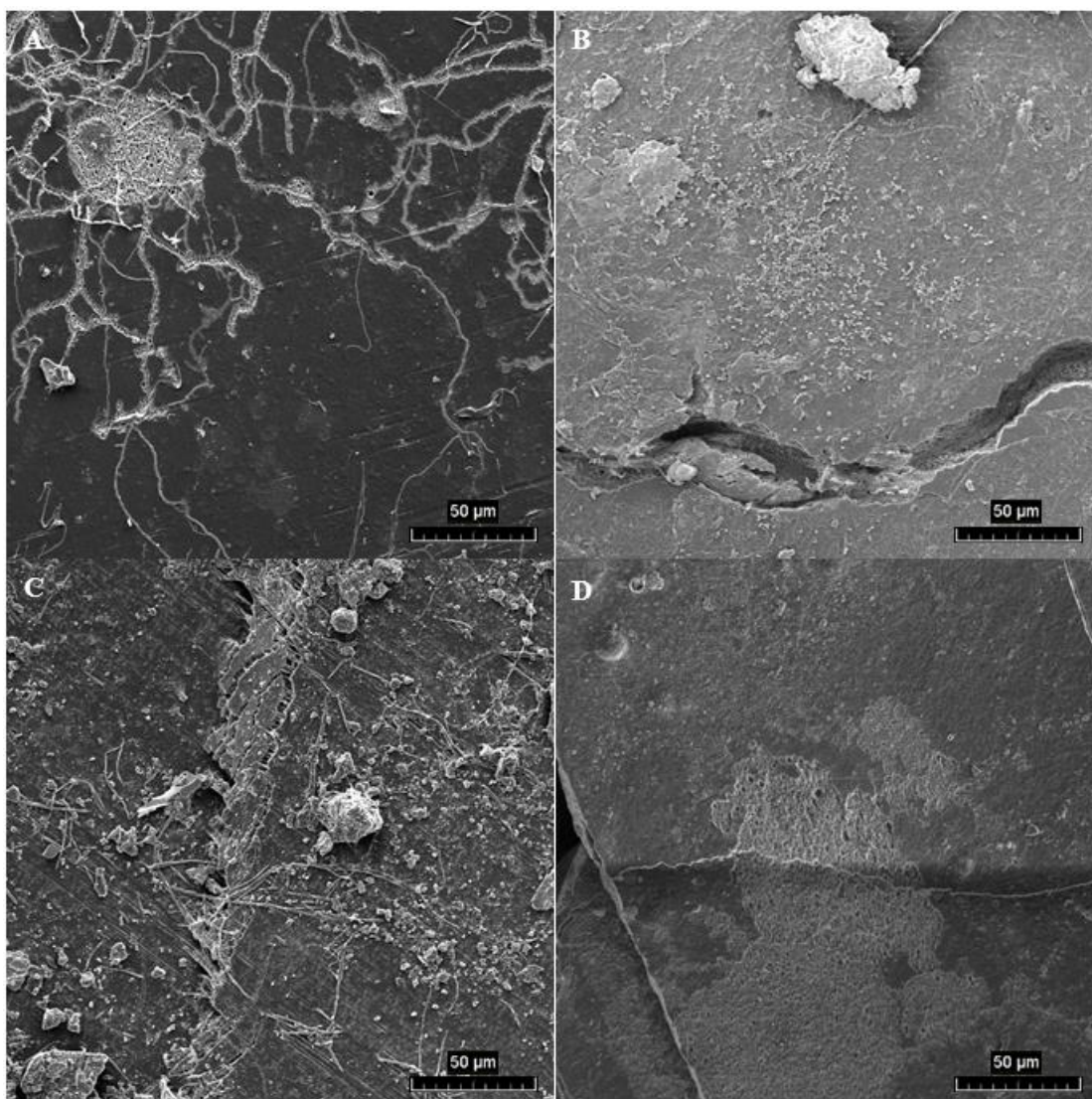
Rychlejší hydrolýza vzorku PLA-10A byla pravděpodobně způsobena dobrou interkalací a homogenní disperzí vrstev oxidu křemičitého, které by mohly podporovat hydrolýzu PLA pomocí svých hydroxylových skupin. Je zajímavé, že na rozdíl od očekávání, vzorek PLA-30B obsahující další přebytek hydroxylových skupin ve svém organickém modifikátoru, nevykazoval žádné významné zrychlení hydrolýzy navzdory značné interkalaci plniva (*Obr. 4.11*). Mohlo by to být způsobeno prodloužením difúzní dráhy molekul vody z důvodu nárůstu jejího zakřivení (prodloužení dráhy), které bylo zapříčiněno jílovými nanodestičkami interkalovanými v polymerní matrici (Paul *et al.*, 2005).

Obr. 4.14 představuje změnu M_w v prvních 35 dnech abiotické hydrolýzy při 58 °C. Měření pomocí GPC byla provedena za účelem pozorování změn ve vzorcích, které nebylo možno zjistit analýzou rozpuštěného organického uhlíku, a to zejména během první fáze procesu hydrolýzy. Údaje o vývoji M_w potvrzují předchozí zjištění, a to že štěpení řetězce PLA je spuštěno rychleji za přítomnosti organicky modifikovaných jílových nanočástic. Již po 7 dnech byl pozorován výrazně vyšší pokles M_w o více než 50 % u téměř všech PLA/jílových nanokompozitů ve srovnání s čistou PLA, kde ke snížení došlo pouze o 22 % (z 213 000 g/mol na 166 000 g/mol). Mezi nanokompozity byl nejrychlejší pokles M_w z 203 000 g/mol na 71 200 g/mol detekován u PLA-10A, zatímco nejnižší pokles M_w z 220 000 g/mol na 117 000 g/mol byl zaznamenán u směsi s přírodním nemodifikovaným MMT Na⁺ (*Obr. 4.14A*). Tyto výsledky jsou v souladu s údaji z biodegradčních experimentů v kompostu a mohou vysvětlit kratší lagovou fázi a rychlejší nástup biodegradace u vzorků PLA-10A a naopak nejpomalejší průběh v případě PLA-Na a čisté PLA. Po 35 dnech rozkladu molekulová hmotnost všech vzorků klesla o více než 95 % a byla přibližně 5000 g/mol. Od tohoto okamžiku všechny vzorky vykazovaly biologickou degradaci s přibližně podobnou mírou mineralizace (*Obr. 4.12A*, *Obr. 4.13B*), což naznačuje, že molekulová hmotnost všech vzorků byla snížena dostatečně pro započítání mikrobiálního rozkladu.



Obr. 4.14 Změna molekulové hmotnosti čisté PLA a PLA/jílových nanokompozitových filmů v průběhu experimentu abiotické hydrolyzy. A) ▲ PLA-Na; ■ PLA-10A; ○ PLA-20A; □ PLA-30B; ● PLA. B) ■ PLA1-NA116; □ PLA-GA; ○ PLA-NA3010. ● čistá PLA.

Změny na povrchu materiálu během probíhající biodegradace v kompostu byly sledovány pomocí SEM (Obr. 4.15). Čistá PLA spolu se třemi typy nanokompozitů (PLA-10A, PLA-20A, PLAGA) s nejvyšší mírou mineralizace byla pozorována po 55 dnech biodegradace v kompostu. Dokonce i povrch čisté PLA je částečně pokryt vláknitými mikroorganismy, ale značná část filmu zůstala neporušená. Naopak je zřejmé, že vzorky nanokompozitů (B, C, D) vykazovaly značný rozsah narušení povrchu.



Obr. 4.15 Snímky SEM čisté PLA (A) a PLA/jílových nanokompozitů PLA-10A (B), PLA-20A (C), PLA-GA (D) po 55 dnech inkubace v kompostu.

Během míchání a následné přípravy filmů nebyla pozorována významná redukce molekulové hmotnosti PLA/jílových nanokompozitů, což naznačuje, že parametry procesu byly správně optimalizovány s ohledem na špatnou tepelnou stabilitu PLA. Podle analýzy SAXS a TEM nanokompozity PLA s nemodifikovanými jíly Cloisite Na⁺ a Nanofil 116 vykazovaly nejnižší úroveň disperze jílu, zatímco v případě PLA-10, PLA-20A, PLA-30B a PLA-GA byla hlavní část plniva dobře interkalována a částečně exfoliována.

Přídavek nanojílu zlepšil biologickou rozložitelnost PLA nanokompozitů v porovnání s čistou PLA, a to zejména zkrácením lagové fáze na začátku procesu. Vzhledem k předpokladu, že abiotická hydrolýza je hlavním depolymerizačním mechanismem, zkrácení nástupu mineralizace může být způsobeno zrychlením hydrolytického štěpení řetězců PLA v přítomnosti jílu, zvláště těch organomodifikovaných. Rozsah zrychlení závisí na vlastnostech nanojílů, zejména pak na jejich hydrofilite, míře interkalace a exfoliace.

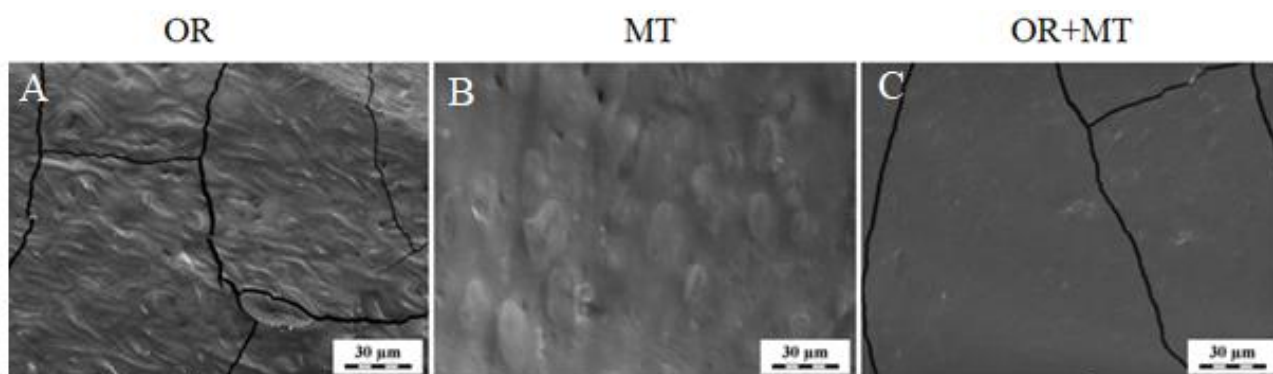
Na základě toho byl tento jev zvláště výrazný u PLA-10A v souladu se synergií popsaných faktorů tzn. s vylepšenou hydrofilitou, vynikající interkalací a homogenní disperzí vrstev oxidu křemičitého v polymerní matrici.

4.3 Biodegradace materiálů na bázi termoplastického škrobu

Cílem těchto experimentů byla charakterizace vlastností, zvláště pak analýza biodegradability několika typů materiálů na bázi termoplastického škrobu. Byly využity vzorky termoplastického neacetylovaného škrobu (ŠP) a termoplastického acetylovaného škrobu (AŠP) získané z přírodního škrobu, s přídavkem nebo bez přídavku celulosy jako plniva a plastifikátorů. Vzorky ve formě folií byly připraveny ve spolupráci s Ústavem makromolekulární chemie v Praze a jejich složení je popsáno v *Tab. 3.5*. U vybraných materiálů byla sledována biodegradace v prostředí kompostu a následně byly izolovány a identifikovány mikroorganismy u vzorků s nejvíce odlišným složením tak, aby byla prozkoumána diverzita mikroorganismů podílejících se na degradaci sledovaných polymerů. Tyto experimenty byly prováděny za pomoci mikrobiologických a molekulárně biologických metod.

4.3.1 Příprava a morfologie termoplastických materiálů na bázi škrobu

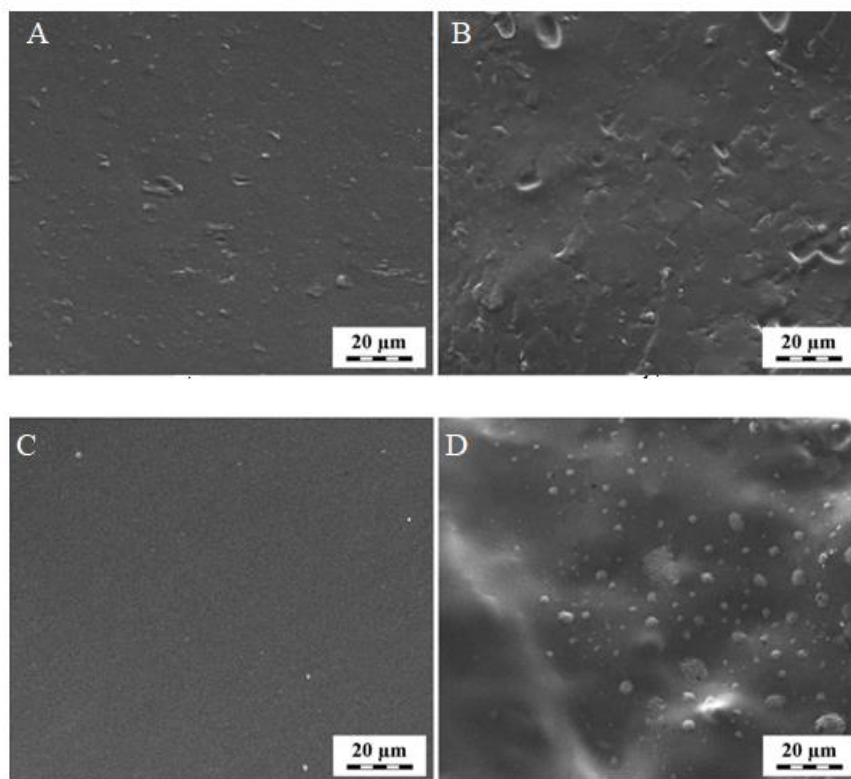
Plastifikace škrobu a příprava vzorků byla provedena buď odléváním roztoku (OR), mícháním taveniny (MT), anebo spojením obou postupů (Ostafińska *et al.*, 2017). Rozsah účinnosti plastifikace byl závislý na zvoleném postupu zpracování. Pro vyhodnocení případného výskytu škrobových zrn a jiných nehomogenit v materiálové morfologii byly vzorky ŠP pozorovány pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM), výsledky pozorování jsou znázorněny na *Obr. 4.16*.



Obr. 4.16 Snímky SEM morfologie ŠP připraveného odléváním roztoku a), mícháním taveniny b), spojením obou postupů c) byly pořízeny na Ústavu makromolekulární chemie v Praze

V případě využití obou výrobních procesů samostatně pro přípravu materiálů (*Obr. 4.16a, b*), je vidět přítomnost neplastifikovaných škrobových zrn, avšak při spojení obou metod dojde ke zlepšení homogenní struktury vzorku (*Obr. 4.16c*). Získané výsledky byly srovnatelné s již existující studií (Ostafińska *et al.*, 2017).

Snímky SEM AŠP a PŠP škrobu připraveného různými způsoby jsou znázorněny na *Obr. 4.17*. Bylo zjištěno, že při provedení acetylace škrobu před plastifikací dochází ke vzniku méně homogenních produktů ve srovnání s plastifikací neacetylovaného škrobu.



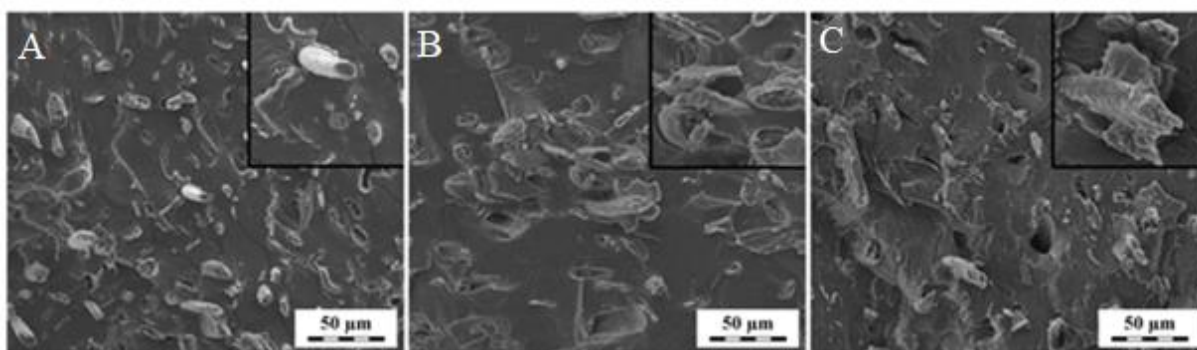
Obr. 4.17 Snímky SEM AŠP s nízkým (a) a vysokým (b) stupněm substituce, které byly připraveny OR+MT po acetylaci; AŠP s vysokým stupněm substituce připravený OR před procesy acetylace a MT; (d) PŠP připraven MT byly pořízeny na Ústavu makromolekulární chemie v Praze

Jak nízký, tak vysoký stupeň substituce u AŠP (*Obr. 4.17 a,b*) vedl k nehomogenní morfologii vzorků s četným obsahem škrobových zrn, které zůstávaly v plastifikované matrici. Je známo, že přírodní škrob obsahuje určité množství zrn s delšími řetězci, než odpovídá průměrné molekulové hmotnosti materiálu (Baranowska *et al.*, 2010). Lze tedy předpokládat, že tato zrna budou méně přístupná k plastifikaci. V případě ŠP (*Tab. 3.5*) byla plastifikace poměrně uspokojivá, avšak dokonce i v těchto materiálech se vyskytovaly neplastifikovaná nebo částečně plastifikovaná zrna, převážně v případě, pokud nebyl proveden krok odlévání roztoku, což je patrné z *Obr. 4.16b*. Naproti tomu vysoce acetylované škroby (AŠP-H) s přidavkem plastifikátoru na bázi oligosacharidů (P3) byly plastifikovány snadněji, protože působením P3 dochází k účinnému narušení struktury výše uvedených zrn s vyšší M_w . Snížení průměrné M_w ve vzorcích AŠP-H2 a AŠP-H3 po přidání P3 vedlo k nižšímu počtu neplastifikovaných zrn, zejména ve vzorku AŠP-H2, který ještě navíc obsahoval účinnější změkčovadlo P2. Ve srovnání s ostatními testovanými materiály, AŠP-

H1 obsahoval vyšší počet neplastifikovaných škrobových zrn, což potvrdilo předpoklad, že vysoký stupeň acetylce a do značné míry i absence plastifikátoru na bázi oligosacharidů jsou klíčovými faktory, vedoucími k nedostatečné plastifikaci škrobu. Na druhou stranu, po úpravě procesu, kdy škrob byl nejprve plastifikován a poté acetylován, byl získán téměř homogenní materiál (Obr. 4.17 c).

Morfologie PŠP (Obr. 4.17d) ukázala místa neesterifikovaných nebo slabě esterifikovaných škrobových oblastí – škrobové částice s tak nízkým stupněm propionace, které nebyly schopny se promíchat s propionovanou škrobovou maticí.

Za účelem dalšího zlepšení mechanických vlastností ŠP a AŠP, byla škrobová matrice zesílena přidávkou celulosových vláken. Dvoustupňový proces vedl k úspěšné plastifikaci škrobu, homogenní morfologii a disperzi plniva (Obr. 4.18). V případě vyztuženého AŠP byly navíc mechanické vlastnosti vylepšeny i stupněm acetylce.



Obr. 4.18 Snímky SEM vzorků TŠP-C (a); AŠP-LC (b) a AŠP-HC (c) škrobů s celulosovými vlákny byly pořízeny na Ústavu makromolekulární chemie v Praze

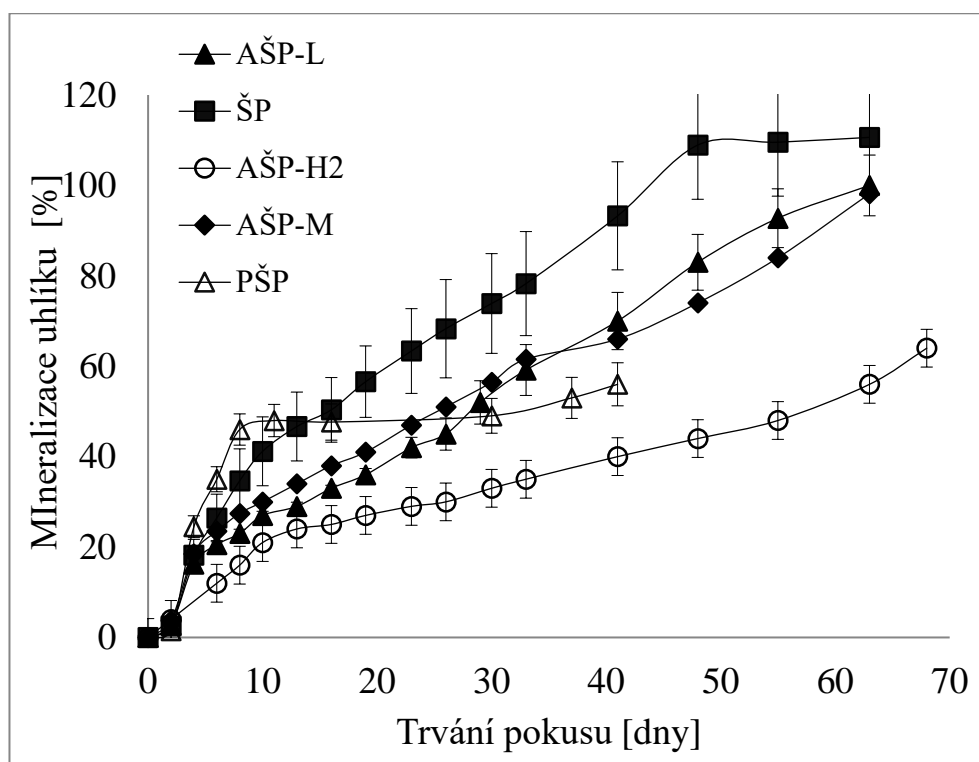
Pomocí SEM byly také pozorovány lomové plochy. Na snímcích je vidět nižší přilnavost mezi celulosovými vlákny a škrobovou maticí, zejména u vzorků s nižším stupněm acetylce (AŠP-LC; Obr. 4.18 (b)), daleko lepší je to v případě vysoce acetylovaného termoplastického škrobu (AŠP-HC; Obr. 4.18 (c)). Těmito pozorováními byly potvrzeny i výsledky testů dynamické mechanické analýzy ve smykovém napětí. Mechanická tuhost a pružnost AŠP matrice, a to zvláště v případě AŠP-HC byla vyšší než v matici ŠP.

4.3.2 Aerobní biodegradace vzorků v prostředí kompostu

Modifikace a výrobní postupy folií z ŠP, které jsou popsány v kapitole 3.2.3, vedly ke zpomalení biodegradčního procesu. Míra mineralizace uhlíku u AŠP klesala se zvyšujícím se stupněm substituce. Nízko a středně acetylované vzorky (AŠP-L; AŠP-M) prokázaly pouze mírně zpomalenou biodegradaci (Obr. 4.19) ve srovnání s neacetylovaným ŠP, protože do stupně substituce 1,5 materiály obsahují pouze malou část středně modifikovaného škrobu. Toto

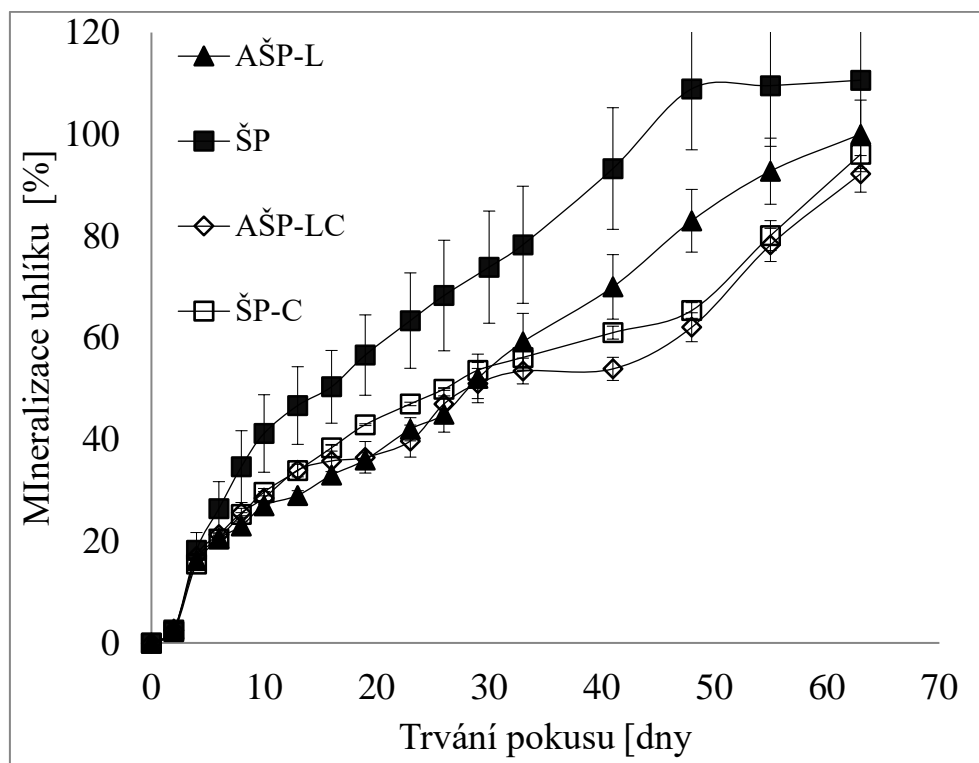
bylo spojeno s faktem, že výrobní postupy plastifikace vzorků AŠP-L a AŠP-M byly efektivní z důvodu nízkého nebo žádného výskytu plastifikovaných zrn (Obr. 4.17a). Ve srovnání s ostatními testovanými materiály (Obr. 4.19) byl nejrychleji degradován ŠP.

U propionovaného škrobu (PŠP) byly sledovány dvě rozdílné fáze mineralizace. V prvních deseti dnech probíhala biodegradace pravděpodobně nemodifikované části materiálu velice rychle, zatímco ve druhé fázi proces pokračoval pomalu a po 40 dnech došlo k mineralizaci PŠP pouze z 60 %.



Obr. 4.19 Biodegradace ŠP a AŠP v kompostu

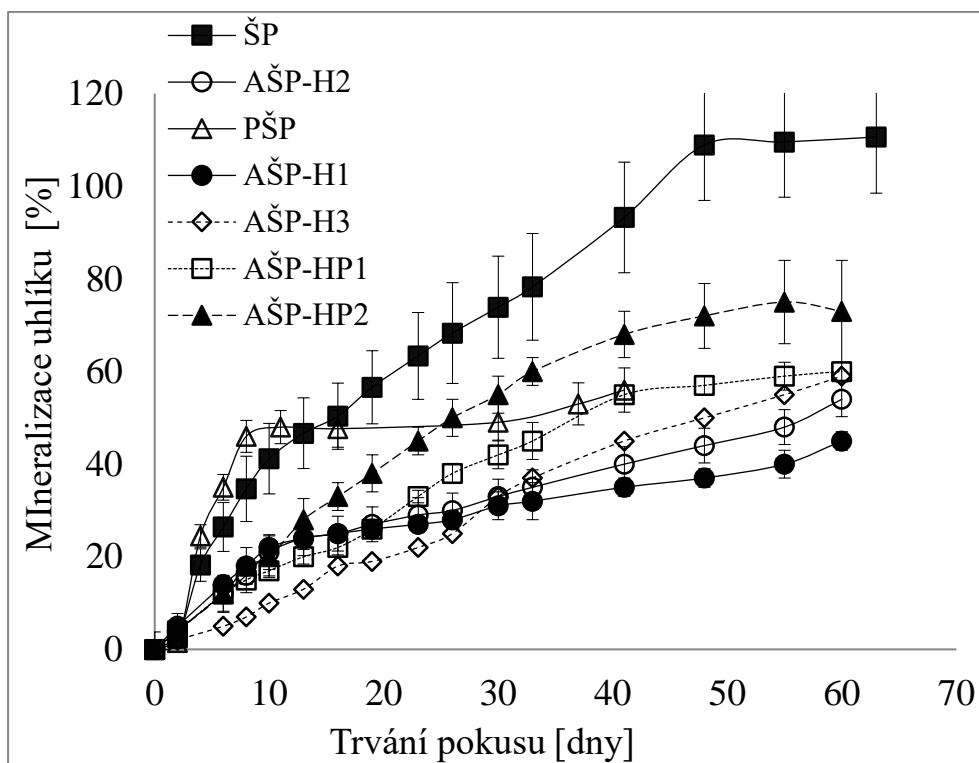
Na Obr. 4.20 je znázorněna biodegradace vzorků s celulosou v prostředí kompostu. Přidání celulosových vláken do materiálu významně neovlivnilo biologickou odbouratelnost vzorků, ale bylo zjištěno, že míra mineralizace se mírně snížila v porovnání se vzorky neobsahující celulosu.



Obr. 4.20 Biodegradace ŠP a AŠP s nebo bez přídavku celulosových vláken v kompostu

Zajímavým společným znakem u obou křivek vzorků obsahující celulosu byla přechodná retardace procesu přibližně ve 40 dnech biodegradace, kdy s největší pravděpodobností byl dokončen rozklad přístupnější části materiálu a následná biodegradace celulosových vláken již probíhala pomaleji než biodegradace škrobu.

Výsledky testů biodegradace AŠP-H jsou znázorněny na Obr. 4.21. Významné zpomalení biodegradace ve srovnání s ŠP bylo zaznamenáno u všech AŠP-H. Vzorky se lišily typem plastifikátorů a výrobními postupy (Tab. 3.5), avšak nejvýznamnějším faktorem, který ovlivňuje rychlost degradace se zdá být stupeň substituce. U vzorků se stupněm substituce nad 2,5 (AŠP-HP1, AŠP-HP2, AŠP-H1) byla biodegradace pomalejší. Na druhou stranu AŠP-H1 obsahující vyšší počet nehomogenit byl mineralizován o něco rychleji, a to hlavně v prvních 10-ti dnech experimentu. Ovšem za 60 dnů vzorek AŠP-H1 dosáhl pouze 40 % degradace, zatímco vzorky AŠP-HP1 a AŠP-HP2 degradovaly z 60 popřípadě 73 %. Významným faktorem ovlivňující rychlost mineralizace, a to hlavně v rané fázi procesu, byla přítomnost P3 ve vzorcích AŠP-H2 a AŠP-H3. V tomto případě došlo k rychlému nástupu biodegradace podobně jako u vzorku AŠP-H1, ani zde však nedošlo k mineralizaci vyšší než 60 % za 60 dní.

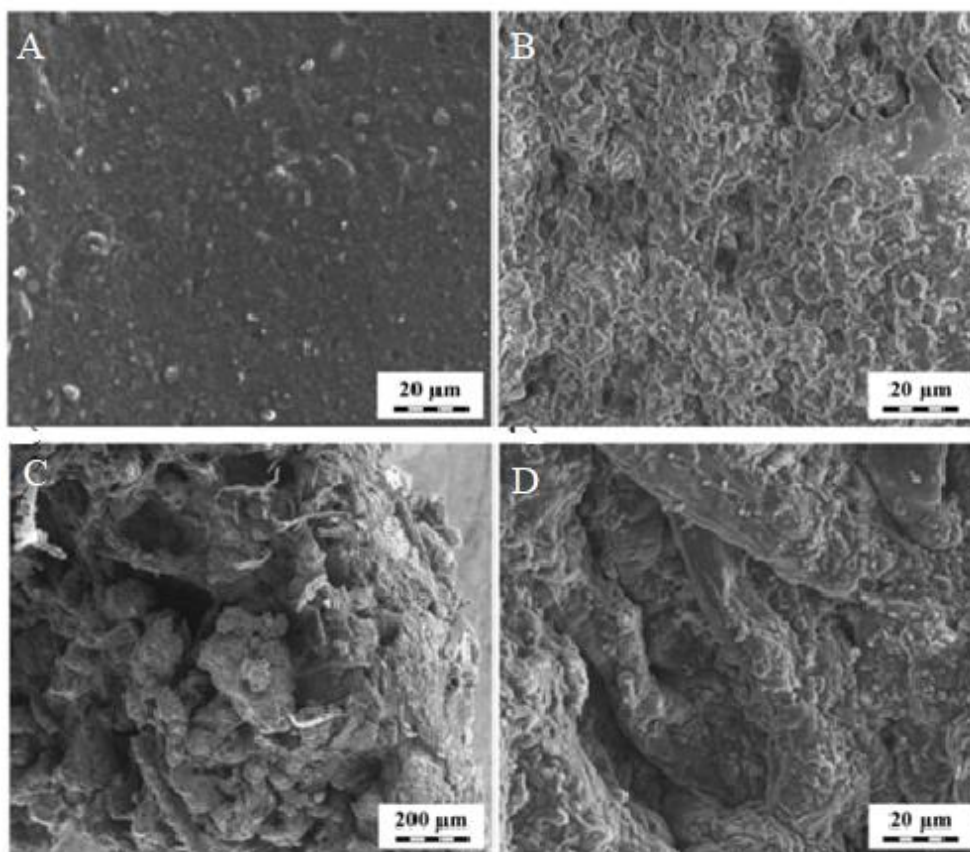


Obr. 4.21 Biodegradace ŠP a AŠP s různým složením v kompostu

Z výsledků je patrné, že biodegradace AŠP-H je značně pomalejší v porovnání s ostatními testovanými vzorky. Nicméně její průběh, a to hlavně na začátku kompostování, závisí pravděpodobně do značné míry na výrobním postupu přípravy vzorků, přidavku či absenci plniv v podobě celulosových vláken, typu plastifikátorů a stupni substituce.

Chování PŠP v průběhu biodegradace v kompostu bylo zcela odlišné ve srovnání s ostatními testovanými materiály. Navzdory skutečnosti, že propionové a acetylové skupiny jsou z fyzikálně-chemického hlediska velmi podobné, PŠP se choval rozdílně ve všech prováděných experimentech. Důvodem může být složité odhadnutí některých předpokladů, které se týkají acetylovaných škrobových materiálů a aplikovat je na škroby modifikované jinými funkčními skupinami bez ohledu na jejich chemickou podobnost.

Jak již bylo zmíněno, biodegradace vyrobených materiálů na bázi škrobu byla ovlivněna jak acetylací, tak přidavkem celulosových vláken a s touto spojitostí byly vybrány 3 vzorky (ŠP, AŠP-L, AŠP-LC) a po 7 dnech degradace v kompostu podrobeny skenovací elektronové mikroskopii (Obr. 4.22).



Obr. 4.22 Snímky SEM vzorků ŠP (a), AŠP-L (b), AŠP-LC (c,d) po 7 dnech biodegradace v kompostu

Na snímcích lze vidět významný dopad acetylce na biodegradční proces termoplastických škrobů. Z výsledků je patrné, že biodegradace ŠP probíhala homogenněji (Obr. 4.22 a), zatímco v acetylovaných vzorcích (Obr. 4.22 b) byla morfologie složitější, což pravděpodobně prokazuje ne zcela homogenní modifikaci materiálu. Houbovitou strukturu lze pozorovat ve vzorcích obsahujících celulosu (Obr. 4.22 c, d); je zřejmé, že přidavkem plniva byla struktura ještě více nesourodá, a tudíž byla možnost působení mikroorganismů na materiál pravděpodobně do značné míry omezena.

4.3.3 Mikrobiální analýza degradujících bakterií ve vybraných vzorcích v kompostu a jejich identifikace

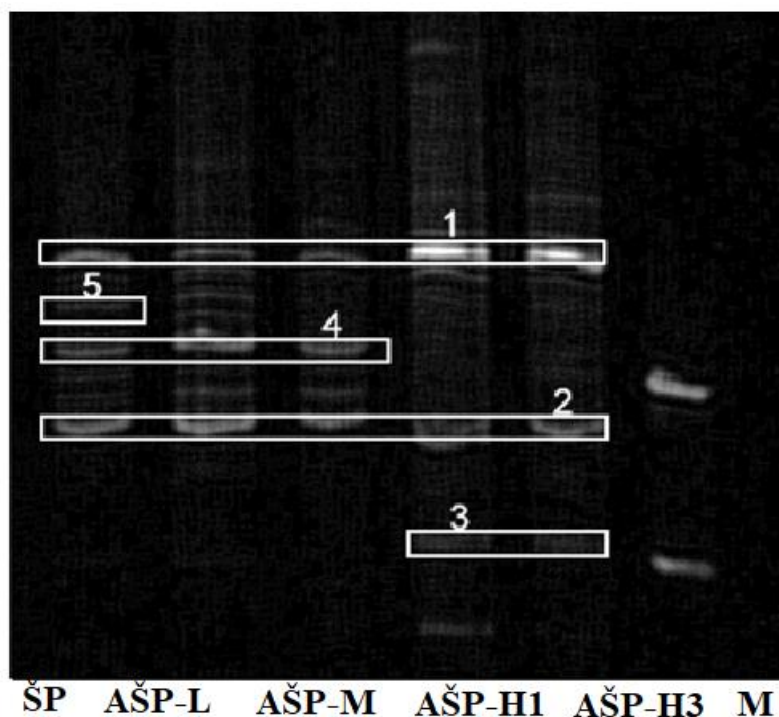
Izolace DNA degradérů byla provedena u 5-ti vybraných vzorků (Tab. 4.6), které byly zvoleny tak, aby byla zajištěna co největší pravděpodobnost rozmanitosti mikroorganismů, podílejících se na degradaci vybraných polymerních materiálů.

Tab. 4.6: Složení vzorků vybraných pro izolaci DNA degradérů

Vzorek	ŠP A [%]	AŠP A [%]	P1 [%]	P2 [%]	P3 [%]	P4 [%]	SS
ŠP	70	-	-	-	-	30	-
AŠP-L	-	70	-	10	-	20	0,8
AŠP-M	-	70	-	10	-	20	1,5
AŠP-H1	-	70	30	-	-	-	2,6
AŠP-H3	-	35	-	30	35	-	2,5

Vzorky byly kompostovány po dobu 20 dnů a následně byly odebrány vzorky izolaci DNA přítomných mikroorganismů. Podrobný postup izolace je popsán v kapitole 3.2.4. Koncentrace izolované DNA ve vzorcích byla ověřena pomocí UV/VIS spektrofotometru.

Z výsledků mikrobiologické analýzy (Obr. 4.23) je zřejmé, že i u vzorků s různým stupněm acetylace byly přítomny podobné skupiny bakterií. Vzor signálů byl velmi podobný u všech vzorků v tomto experimentu.



Obr. 4.23 DGGE gel zobrazující diverzitu bakteriální komunity na povrchu škrobových materiálů po 20 dnech v kompostu. Identifikace signálů (% shodnosti se sekvencí GenBank v závorkách): 1) *Tuberibacillus calidus* (99 %); 2) *Geobacillus* sp. (99 %); 3) *Alicyclobacillus herbarius* (100 %); 4) *Geobacillus thermodenitrificans* (99 %); 5) *Geobacillus* sp. (99 %). M, marker.

Činnost termofilních hub byla při teplotě 58 °C zanedbatelná, pozornost tedy byla zaměřena na bakterie. Mezi ŠP a AŠP nebyl prakticky žádný rozdíl

a všechny identifikované kmeny patřily do skupiny bacilů. Jisté rozdíly ve složení mikrobiální komunity byly pozorovány u vzorků AŠP-H1 a AŠP-H2, což mohlo být pravděpodobně způsobeno použitím odlišných plastifikátorů. V souvislosti s mineralizačními křivkami, které byly získány z měření produkce CO₂ (*Obr. 4.19 – Obr. 4.21*) je vidět, že modifikace škrobu nezměnila zásadně mechanismy biodegradace, ale působila nepřímo změnou fyzikálně-chemických vlastností testovaných vzorků a následně změnou rychlosti (zpomalení) biodegradace.

Tato studie prokázala, že vlastnosti a biologická rozložitelnost materiálů na bázi škrobu mohou být kontrolovány jak různými postupy plastifikace, tak esterifikací škrobu. Mechanická účinnost může být zlepšena stupněm acetylace, a zvláště dvoustupňovým zpracováním, což vede k homogenní morfologii s téměř úplně plastifikovaným škrobem. Dalšího zlepšení mechanických vlastností bylo dosaženo přidáním celulosových vláken, došlo tak k zesílení škrobové matrice.

Rychlost biodegradace klesala se stupněm acetylace termoplastického škrobového materiálu. Dalším důležitým faktorem ovlivňujícím míru biodegradace byl postup zpracování a výsledná úroveň konečné homogenity termoplastického materiálu.

Ze studie vyplývá možnost připravit materiály na bázi modifikovaného škrobu s optimalizovaným mechanickým výkonem a řízenou rychlostí biodegradace.

5. ZÁVĚR

Získávání energie v podobě bioplynu anaerobní digescí z rostlinné biomasy je výhodnou ekonomickou alternativou oproti fosilním palivům. K dosažení vysoké výtěžnosti methanu podstupuje vstupní substrát ještě před samotnou anaerobní digescí určitou předúpravu. Avšak během procesu předúpravy biomasy může docházet ke vzniku toxických látek, které mohou produkci bioplynu negativně ovlivňovat. Studium inhibičních látek a jejich vliv na průběh anaerobní fermentace a následně na výtěžnost methanu obsaženého v bioplynu, je již popsáno v řadě studií, avšak vzhledem k tomu, že bioplynové stanice pracují s různými substráty a využívají různé metody předúpravy je potřeba tuto problematiku studovat i v konkrétních případech bioplynových stanic. V první části této práce byla věnována pozornost posuzování negativního vlivu vybraných potencionálně inhibičních sloučenin, konkrétně furfuralu, 5-hydroxymethylfurfuralu, kyseliny galové a kyseliny tříslové na produkci methanu. Tyto látky mohou vznikat v průběhu termické předúpravy. Konkrétně byl pro experimenty využit digestát z kukuřičné siláže a potencionální inhibiční efekt vybraných látek na produkci methanu byl zkoumán pro reálnou bioplynovou stanici, která se nachází v Českých Budějovicích. Výsledky ukázaly, že větší pozornost by měla být věnována derivátům furanu, konkrétně furfuralu a 5-hydroxymethylfurfuralu, kdy tyto látky vykazovaly inhibiční efekt na produkci methanu již od koncentrace 0,2 g/l v případě 5-hydroxymethylfurfural a v případě furfuralu od koncentrace 1 g/l, v přítomnosti celulosy jako zdroje uhlíku. Při využití octanu sodného, jako uhlíkového substrátu, byl vliv těchto sloučenin ve zvolených koncentracích zanedbatelnější. Ze získaných výsledků lze říci, že při produkci methanu není methanogenese vybranými látkami ovlivněna tak zřetelně, jako hydrolyza či acidogenese.

V další části práce byla pozornost věnována biodegradačnímu chování kyseliny polymléčné a jejich směsí v prostředí kompostu. V práci byly testovány směsné filmy PLA/TAC a PLA/PHB/TAC. Míra biodegradace těchto materiálů byla podobná, nicméně filmy PLA/PHB/TAC dosáhly mineralizace téměř 100 % oproti vzorkům PLA s triacetinem, kde byla míra degradace 90 % za 100 dní v kompostu při 58 °C.

Dalšími testovanými látkami byly PLA nanokompozitové folie s různým obsahem modifikovaných nebo organomodifikovaných montmorillonitů. V první řadě byly zkoumány materiály charakterizovány v souvislosti s jejich vlastnostmi, aby bylo možné řádně interpretovat data z biodegradačních testů. Při přípravě filmů nedošlo ke snížení molekulové hmotnosti nanokompozitových folií, což potvrdilo, že parametry procesu výroby vzorků byly správně nastaveny s ohledem na špatnou tepelnou stabilitu PLA. Studie prokázala, že přidavek nanojílu zlepšil biodegradaci PLA ve srovnání s čistou PLA, primárně zkrácením lagové fáze v počátečních fázích procesu. Paralelně s kompostováním probíhala

i abiotická hydrolýza materiálů. Bylo vycházeno z předpokladu, že abiotická hydrolýza je hlavním depolymerizačním mechanismem a urychlení mineralizace může být tedy způsobeno zrychlením hydrolytického štěpení řetězců PLA v přítomnosti jílu. Nejvýraznější zrychlení biodegradace bylo zaznamenáno u vzorku PLA-10A, který vykazoval skvělou interkalaci, homogenní disperzi vrstev oxidu křemičitého v polymerní matici a vylepšenou hydrofilitu.

Polední třetí kapitolou této práce bylo studium biodegradace materiálů na bázi škrobu. Studie prokázala, že vlastnosti, morfologii a rozklad takových materiálů ovlivňuje stupeň acetylce škrobu, různé výrobní postupy a přidání či absence plastifikátorů a plniv. Dvoustupňovým zpracováním, kterým je dosažena homogenní morfologie s téměř úplně plastifikovaným škrobem a přidáním celulosových vláken do vzorku, čímž dojde k zesílení matrice, je zlepšena jeho mechanická odolnost. Rychlost biodegradace připravených folií byla významně zpomalena se zvyšujícím se stupněm acetylce. Míru biodegradace ovlivňovala také přítomnost plastifikátoru na bázi oligosacharidů, propionace a celková homogenita vyrobených filmů. Chování propionovaného termoplastického škrobu bylo zcela odlišné oproti ostatním vzorkům. Za 60 dní PŠP dosáhl pouze 45 % mineralizace ve srovnání s ostatními vzorky, jejichž rozklad byl v průměru o 20 % vyšší.

U pěti vybraných vzorků (ŠP, AŠP-L, AŠP-M, AŠP-H1, AŠP-H3) byla provedena mikrobiologická analýza pomocí molekulárně biologických metod, která prokázala přítomnost podobných skupin bakterií, které se podílejí na biologickém rozkladu modifikovaných škrobových materiálů, konkrétně byly zastoupeny bakterie rodů *Tuberibacillus*, *Geobacillus* a *Alicyclobacillus*.

6. PŘÍNOS PRO VĚDU A PRAXI

Studium inhibice produkce bioplynu

- Bylo vyloučeno riziko vlivu inhibičních látek, vznikajících degradací biomakromolekul, na výrobu a výtěžnost bioplynu u bioplynových stanic využívající termickou předúpravu rostlinné biomasy
- Získané poznatky mohou být využity v reálných procesech v bioplynových stanicích

Studium biodegradace PLA/jílových nanokompozitů v kompostu

- Získané informace mohou být využity zejména v zemědělství a obalovém průmyslu k výrobě biodegradabilních polymerních materiálů

Studium biodegradace materiálů na bázi škrobu v kompostu

- ▲ Získané poznatky mohou přispět k výzkumu a vývoji v oblasti obalových materiálů, nebo zemědělství. Experimenty ukázaly, že je možno nastavit rychlost degradace materiálů

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ABDELWAHAB, Mohamed A., Allison FLYNN, Bor-Sen CHIOU, Syed IMAM, William ORTS a Emo CHIellini. Thermal, mechanical and morphological characterization of plasticized PLA–PHB blends. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2012, **97**(9), 1822-1828 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2012.05.036. ISSN 01413910. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391012002108>

ADNEY, William S., Christopher J. RIVARD, Ming SHIANG a Michael E. HIMMEL. Anaerobic digestion of lignocellulosic biomass and wastes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* [online]. 1991, **30**(2), 165-183 [cit. 2017-02-24]. DOI: 10.1007/BF02921684. ISSN 02732289. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02921684>

ANSARI, Sabbir a Tasneem FATMA. Polyhydroxybutyrate - a Biodegradable Plastic and its Various Formulations. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology* [online]. 2014, **3**(2) [cit. 2018-05-29]. ISSN 2319 - 8753. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/59b4/5a03f9661ae7cd1abebb080b3788b427c73d.pdf>

APPELS, Lise, Jan BAEYENS, Jan DEGRÈVE a Raf DEWIL. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science* [online]. 2008, **34**(6), 755-781 [cit. 2017-02-23]. DOI: 10.1016/j.pecs.2008.06.002. ISSN 03601285. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360128508000312>

APPELS, Lise, Joost LAUWERS, Jan DEGRÈVE, Lieve HELSEN, Bart LIEVENS, Kris WILLEMS, Jan VAN IMPE a Raf DEWIL. Anaerobic digestion in global bio-energy production: Potential and research challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [online]. 2011, **15**(9), 4295-4301 [cit. 2017-02-23]. DOI: 10.1016/j.rser.2011.07.121. ISSN 13640321. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032111003686>

ARMENTANO, I., E. FORTUNATI, N. BURGOS, et al. Processing and characterization of plasticized PLA/PHB blends for biodegradable multiphase systems. *Express Polymer Letters* [online]. 2015a, **9**(7), 583-596 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.3144/expresspolymlett.2015.55. ISSN 1788618X. Dostupné z: <http://www.expresspolymlett.com/letolt.php?file=EPL-0005872&mi=c>

ARMENTANO, Ilaria, Elena FORTUNATI, Nuria BURGOS, et al. Bio-based PLA_PHB plasticized blend films: Processing and structural characterization. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2015b, **64**(2), 980-988 [cit. 2018-

05-29]. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.06.032. ISSN 00236438. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643815004594>

ARRIETA, Marina P., María D. SAMPER, Juan LÓPEZ a Alfonso JIMÉNEZ. Combined Effect of Poly(hydroxybutyrate) and Plasticizers on Polylactic acid Properties for Film Intended for Food Packaging. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2014, **22**(4), 460-470 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1007/s10924-014-0654-y. ISSN 1566-2543. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10924-014-0654-y>

ARTHAM, Trishul a Mukesh DOBLE. Biodegradation of Aliphatic and Aromatic Polycarbonates. *Macromolecular Bioscience* [online]. 2008, **8**(1), 14-24 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1002/mabi.200700106. ISSN 16165187. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mabi.200700106>

ASRAR, J a K. J. GRUYS. Polyesters III, Applications and commercial Products. STEINBUCHER, A a M HOFRICHTER. *Biopolymers*. Chichester: Wiley-VCH, 2003. ISBN 978-3-527-30225-3.

AURAS, Rafael, Bruce HARTE a Susan SELKE. An Overview of Poly lactides as Packaging Materials. *Macromolecular Bioscience* [online]. 2004, **4**(9), 835-864 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1002/mabi.200400043. ISSN 16165187. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mabi.200400043>

AVÉROUS, Luc. Biodegradable Multiphase Systems Based on Plasticized Starch: A Review. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews* [online]. 2004, **44**(3), 231-274 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1081/MC-200029326. ISSN 15321797. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/MC-200029326>

AVÉROUS, Luc a Peter J. HALLEY. Starch Polymers. *Starch Polymers* [online]. Elsevier, 2014, 2014, s. 3-10 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/B978-0-444-53730-0.00018-X. ISBN 9780444537300. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978044453730000018X>

BABU, Ramesh a Trevor WOODS. Polymer blends with improved mechanical properties. *Society of plastics engineers. Plastics research online* [online]. 2011, , 1-2 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1002/spepro.003515. Dostupné z: <http://www.4spepro.org/pdf/003515/003515.pdf>

BARAKAT, Abdellatif, Florian MONLAU, Jean-Philippe STEYER a Hélène CARRERE. Effect of lignin-derived and furan compounds found in lignocellulosic hydrolysates on biomethane production. *Bioresource Technology* [online]. 2012, **104**, 90-99 [cit. 2017-02-24]. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.10.060. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852411015264>

BARANOWSKA, H, M SIKORA, M KRYSTYJAN a P TOMASTIK. Contribution to understanding gelatinization of granular starch. *Starch recent advances in biopolymer science and technology*. [online]. Krakow: Bertoff. Wyd. Oddział Małopolski PTTŻ, 2010, , 13-28 [cit. 2018-05-29].

BAUER, Alexander, Peter BÖSCH, Anton FRIEDL a Thomas AMON. Analysis of methane potentials of steam-exploded wheat straw and estimation of energy yields of combined ethanol and methane production. *Journal of Biotechnology* [online]. 2009, **142**(1), 50-55 [cit. 2017-02-24]. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2009.01.017. ISSN 01681656. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165609000376>

BAUER, Alexander, Javier LIZASOAIN, Franz THEURETZBACHER, et al. Steam explosion pretreatment for enhancing biogas production of late harvested hay. *Bioresource Technology* [online]. 2014, **166**, 403-410 [cit. 2017-02-24]. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.05.025. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852414006841>

BELLIDO, Carolina, Silvia BOLADO, Mónica COCA, Susana LUCAS, Gerardo GONZÁLEZ-BENITO a María Teresa GARCÍA-CUBERO. Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. *Bioresource Technology* [online]. 2011, **102**(23), 10868-10874 [cit. 2017-02-25]. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.08.128. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852411012600>

BERTOLINI, Andréa C. *Starches: characterization, properties, and applications*. Boca Raton: Taylor & Francis, 2010. ISBN isbn978-1-4200-8023-0.

BOHUTSKYI, Pavlo, Michael J. BETENBAUGH a Edward J. BOUWER. The effects of alternative pretreatment strategies on anaerobic digestion and methane production from different algal strains. *Bioresource Technology* [online]. 2014, **155**, 366-372 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.12.095. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852413019354>

BOCHMANN, Günther a Lucy F.R. MONTGOMERY. Storage and pre-treatment of substrates for biogas production. *The Biogas Handbook* [online]. Elsevier, 2013, 2013, s. 85 [cit. 2017-02-24]. DOI: 10.1533/9780857097415.1.85. ISBN 9780857094988. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978085709498850004X>

BRUNI, Emiliano, Anders Peter JENSEN a Irini ANGELIDAKI. Steam treatment of digested biofibers for increasing biogas production. *Bioresource Technology* [online]. 2010, **101**(19), 7668-7671 [cit. 2017-02-24]. DOI:

10.1016/j.biortech.2010.04.064. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852410007509>

CADAR, Oana, Maria PAUL, Cecilia ROMAN, Mirela MICLEAN a Cornelia MAJDIK. Biodegradation behaviour of poly(lactic acid) and (lactic acid-ethylene glycol-malonic or succinic acid) copolymers under controlled composting conditions in a laboratory test system. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2012, **97**(3), 354-357 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2011.12.006. ISSN 01413910. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014139101100396X>

CARRÈRE, H., C. DUMAS, A. BATTIMELLI, D.J. BATSTONE, J.P. DELGENÈS, J.P. STEYER a I. FERRER. Pretreatment methods to improve sludge anaerobic degradability: A review. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2010, **183**(1-3), 1-15 [cit. 2017-02-24]. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2010.06.129. ISSN 03043894. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389410008824>

ČSN EN ISO 11734: *Jakost vod - Hodnocení úplné anaerobní biologické rozložitelnosti organických látek kalem z anaerobní stabilizace - Metoda stanovení produkce bioplynu*. © Český normalizační institut, 1995."

DA RÓZ, A, A CARVALHO, A GANDINI a A CURVELO. The effect of plasticizers on thermoplastic starch compositions obtained by melt processing. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2006, **63**(3), 417-424 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2005.09.017. ISSN 01448617. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861705004510> DOHÁNYOS, Michal. *Anaerobní čistírenské technologie*. Brno: NOEL 2000, c1998. ISBN 8086020193.

DRUMRIGHT, E. a P.R. GRUBER. Polylactic Acid Technology. *Advanced materials* [online]. 2000, **12**(23), 1841-1846 [cit. 2017-02-27]. Dostupné z: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1521-4095\(200012\)12:23%3C1841::AID-ADMA1841%3E3.0.CO;2-E/epdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1521-4095(200012)12:23%3C1841::AID-ADMA1841%3E3.0.CO;2-E/epdf)

DŘÍMAL, Pavel, Josef HRNČIŘÍK a Jaromír HOFFMANN. Assessing Aerobic Biodegradability of Plastics in Aqueous Environment by GC-Analyzing Composition of Equilibrium Gaseous Phase. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2006, **14**(3), 309-316 [cit. 2017-02-28]. DOI: 10.1007/s10924-006-0024-5. ISSN 15662543. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10924-006-0024-5>

DŘÍMAL, Pavel, Jaromír HOFFMANN a Martin DRUŽBÍK. Evaluating the aerobic biodegradability of plastics in soil environments through GC and IR analysis of gaseous phase. *Polymer Testing* [online]. 2007, **26**(6), 729-741 [cit.

2018-07-22]. DOI: 10.1016/j.polymeresting.2007.03.008. ISSN 01429418. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142941807000505>

ENGLERT, Michael a Walter VETTER. Tubing modifications for countercurrent chromatography (CCC): Stationary phase retention and separation efficiency. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2015, **884**, 114-123 [cit. 2017-03-05]. DOI: 10.1016/j.aca.2015.04.055. ISSN 00032670. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267015005826>

ETTRE, L.S. The development of gas chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 1975, **112**, 1-26 [cit. 2017-03-05]. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)99939-4. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967300999394>

FAN, Yao-Ting, Ya-Hui ZHANG, Shu-Fang ZHANG, Hong-Wei HOU a Bao-Zeng REN. Efficient conversion of wheat straw wastes into biohydrogen gas by cow dung compost. *Bioresource Technology* [online]. 2006, **97**(3), 500-505 [cit. 2017-02-24]. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.02.049. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852405001665>

FERNÁNDEZ-CEGRÍ, Victoria, M. ÁNGELES DE LA RUBIA, Francisco RAPOSO a Rafael BORJA. Effect of hydrothermal pretreatment of sunflower oil cake on biomethane potential focusing on fibre composition. *Bioresource Technology* [online]. 2012, **123**, 424-429 [cit. 2017-02-24]. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.07.111. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852412011650>

FORGÁCS, Gergely, Saeid ALINEZHAD, Amir MIRABDOLLAH, Elisabeth FEUK-LAGERSTEDT a Ilona Sárvári HORVÁTH. Biological treatment of chicken feather waste for improved biogas production. *Journal of Environmental Sciences* [online]. 2011, **23**(10), 1747-1753 [cit. 2017-02-24]. DOI: 10.1016/S1001-0742(10)60648-1. ISSN 10010742. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1001074210606481>

FUKUSHIMA, K., E. GIMÉNEZ, L. CABEDO, J.M. LAGARÓN a J.L. FEIJOO. Biotic degradation of poly(dl-lactide) based nanocomposites. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2012, **97**(8), 1278-1284 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2012.05.029. ISSN 01413910. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391012002030>

FUKUSHIMA, K., D. TABUANI a G. CAMINO. Nanocomposites of PLA and PCL based on montmorillonite and sepiolite. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2009, **29**(4), 1433-1441 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/j.msec.2008.11.005. ISSN 09284931. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493108003391>

FUKUSHIMA, K., D. TABUANI, M. DOTTORI, I. ARMENTANO, J.M. KENNY a G. CAMINO. Effect of temperature and nanoparticle type on hydrolytic degradation of poly(lactic acid) nanocomposites. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2011, **96**(12), 2120-2129 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2011.09.018. ISSN 01413910. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391011003211>

GALBE, Mats a Guido ZACCHI. Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production. *Biofuels* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007, s. 41 [cit. 2017-02-24]. DOI: 10.1007/10_2007_070. ISBN 9783540736509. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/10_2007_070

GARLOTTA, Donald. A Literature Review of Poly(Lactic Acid). *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2001, **9**(2), 63-84 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1023/A:1020200822435. ISSN 15662543. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1020200822435>

GHORPADE, V. Laboratory composting of extruded poly(lactic acid) sheets. *Bioresource Technology* [online]. 2001, **76**(1), 57-61 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/S0960-8524(00)00077-8. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852400000778>

GIANNELIS, E. P., R. KRISHNAMOORTI a E. MANIAS. Polymer-Silicate Nanocomposites: Model Systems for Confined Polymers and Polymer Brushes. *Polymers in confined environments*. [online]. Berlin, Heidelberg,: Springer, 1999, s. 107-147 [cit. 2018-05-29].

GUPTA, Bhuvanesh, Nilesh REVAGADE a Jöns HILBORN. Poly(lactic acid) fiber: An overview. *Progress in Polymer Science* [online]. 2007, **32**(4), 455-482 [cit. 2017-02-27]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2007.01.005. ISSN 00796700. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S007967000700007X>

HAROUN, Basem Mikhaeil, George NAKHLA, Hisham HAFEZ a Fayza Aly NASR. Impact of furfural on biohydrogen production from glucose and xylose in continuous-flow systems. *Renewable Energy* [online]. 2016, **93**, 302-311 [cit. 2017-02-25]. DOI: 10.1016/j.renene.2016.02.072. ISSN 09601481. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960148116301732>

HENDRIKS, A.T.W.M. a G. ZEEMAN. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* [online]. 2009, **100**(1), 10-18 [cit. 2017-02-24]. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.05.027. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852408004574>

HERNANDEZ, J.E. a R.G.J. EDYVEAN. Inhibition of biogas production and biodegradability by substituted phenolic compounds in anaerobic sludge. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2008, **160**(1), 20-28 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2008.02.075. ISSN 03043894. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389408003063>

HEVIÁNKOVÁ, Silvie, Miroslav KYNCL a Jana KODYMOVÁ. Study and Research on Cleaning Procedures of Anaerobic Digestion Products / Studium A Výzkum Postupů Čištění Anaerobní Digesce. *GeoScience Engineering* [online]. 2014, **60**(4), - [cit. 2017-02-23]. DOI: 10.1515/gse-2015-0005. ISSN 18025420. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/gse.2014.60.issue-4/gse-2015-0005/gse-2015-0005.xml>

HOLM-NIELSEN, J.B., T. AL SEADI a P. OLESKOWICZ-POPIEL. The future of anaerobic digestion and biogas utilization. *Bioresource Technology* [online]. 2009, **100**(22), 5478-5484 [cit. 2017-02-23]. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.12.046. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852408011012>

HOOVER, R., T. HUGHES, H.J. CHUNG a Q. LIU. Composition, molecular structure, properties, and modification of pulse starches: A review. *Food Research International* [online]. 2010, **43**(2), 399-413 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/j.foodres.2009.09.001. ISSN 09639969. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096399690900266X>

HORÁK, T. a J. ČULÍK. Základní detektory v plynové chromatografii používané v pivovarské analytice. *Kvasný Prum.* [online]. 2011, **57**(6) [cit. 2017-03-05]. Dostupné z: <http://kvasnyprumysl.cz/pdfs/kpr/2011/06/01.pdf>

HUBÁČKOVÁ, Jitka, Marie DVORACKOVA, Petr SVOBODA, et al. Influence of various starch types on PCL/starch blends anaerobic biodegradation. *Polymer Testing* [online]. 2013, **32**(6), 1011-1019 [cit. 2017-02-28]. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2013.05.008. ISSN 01429418. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142941813001050>

HUBER, K. C.; BEMILLER, J. N. Modified starch: Chemistry and properties. En: *Starches: characterization, properties and applications*, (AC Bertolini ed.) Pp 145-204. 2010.

HUSÁROVÁ, Lucie, Silvie PEKAŘOVÁ, Petr STLOUKAL, Pavel KUCHARZCYK, Vincent VERNEY, Sophie COMMEREUC, Audrey RAMONE a Marek KOUTNY. Identification of important abiotic and biotic factors in the biodegradation of poly(l-lactic acid). *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2014, **71**, 155-162 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.04.050. ISSN 01418130. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813014002773>

CHI, Hui, Kun XU, Xiuli WU, Qiang CHEN, Donghua XUE, Chunlei SONG, Wende ZHANG a Pixin WANG. Effect of acetylation on the properties of corn starch. *Food Chemistry* [online]. 2008, **106**(3), 923-928 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.07.002. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814607006802>

CHIARAMONTI, David, Matteo PRUSSI, Simone FERRERO, Luis ORIANI, Piero OTTONELLO, Paolo TORRE a Francesco CHERCHI. Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. *Biomass and Bioenergy* [online]. 2012, **46**, 25-35 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/j.biombioe.2012.04.020. ISSN 09619534. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0961953412001912>

CHODÁK, Ivan. Polyhydroxyalkanoates: Properties and Modification for High Volume Applications. SCOTT, Gerald, ed. *Degradable Polymers* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2002, 2002, s. 295-319 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1007/978-94-017-1217-0_9. ISBN 978-90-481-6091-4. Dostupné z: http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-94-017-1217-0_9

ITÄVAARA, Merja, Sari KARJOMAA a Johan-Fredrik SELIN. Biodegradation of polylactide in aerobic and anaerobic thermophilic conditions. *Chemosphere* [online]. 2002, **46**(6), 879-885 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1016/S0045-6535(01)00163-1. ISSN 00456535. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653501001631>

JOHNSON, David K. a Richard T. ELANDER. Pretreatments for Enhanced Digestibility of Feedstocks. *Biomass Recalcitrance* [online]. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2008, s. 436 [cit. 2017-02-24]. DOI: 10.1002/9781444305418.ch14. ISBN 9781444305418. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781444305418.ch14>

KALE, Gaurav, Rafael AURAS a Sher Paul SINGH. Comparison of the degradability of poly(lactide) packages in composting and ambient exposure conditions. *Packaging Technology and Science* [online]. 2007, **20**(1), 49-70 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1002/pts.742. ISSN 08943214. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pts.742>

KAUR, Bhupinder, Fazilah ARIFFIN, Rajeev BHAT a Alias A. KARIM. Progress in starch modification in the last decade. *Food Hydrocolloids* [online]. 2012, **26**(2), 398-404 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2011.02.016. ISSN 0268005X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X11000592>

KIYUNA, Luma Sayuri Mazine, Lucas Tadeu FUESS a Marcelo ZAIAT. Unraveling the influence of the COD/sulfate ratio on organic matter removal and methane production from the biodigestion of sugarcane vinasse. *Bioresource*

Technology [online]. 2017, **232**, 103-112 [cit. 2017-03-05]. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.02.028. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852417301359>

KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 8086369072.

KOUROUTZIDOU, Eleni, Irini GEORGAKI, Dionissios MANTZAVINOS a Thrassyvoulos MANIOS. Anaerobic biodegradability of gallic acid found in olive mill wastewaters. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* [online]. 2006, **81**(9), 1594-1599 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1002/jctb.1555. ISSN 0268-2575. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.1555>

KOYAMA, Naoyuki a Yoshiharu DOI. Miscibility of binary blends of poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and poly[(S)-lactic acid]. *Polymer* [online]. 1997, **38**(7), 1589-1593 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/S0032-3861(96)00685-4. ISSN 00323861. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386196006854>

KUBÁSEK, Miroslav. Co je to bioplynová stanice?. In: *EnviWeb* [online]. 2012 [cit. 2017-02-23]. Dostupné z: http://www.enviweb.cz/page/co_je_to_bioplynka

KUCHARCZYK, Pavel, Eva HNATKOVA, ZDENEKDVORAK a Vladimír SEDLARIK. Novel aspects of the degradation process of PLA based bulky samples under conditions of high partial pressure of water vapour. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2013, **98**(1), 150-157 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2012.10.016. ISSN 01413910. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391012003990>

KUPEC, Jan. *Zpracování odpadních vod a čistírenských kalů*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2002. ISBN 8073180588.

KYRIKOU, Ioanna a Demetres BRIASSOULIS. Biodegradation of Agricultural Plastic Films: A Critical Review. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2007, **15**(2), 125-150 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1007/s10924-007-0053-8. ISSN 15662543. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10924-007-0053-8>

LASPRILLA, Astrid J.R., Guillermo A.R. MARTINEZ, Betânia H. LUNELLI, André L. JARDINI a Rubens Maciel FILHO. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices — A review. *Biotechnology Advances* [online]. 2012, **30**(1), 321-328 [cit. 2017-02-27]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.06.019. ISSN 07349750. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975011000954>

LEJA a LEWANDOWICZ. Polymer Biodegradation and Biodegradable Polymers – a Review. *Polish J. of Environ. Stud* [online]. 2009, **19**(2), 255-266 [cit. 2017-03-01]. Dostupné z: <http://www.pjoes.com/pdf/19.2/255-266.pdf>

LEEJARKPAI, Thanawadee, Unchalee SUWANMANEE, Yosita RUDEEKIT a Thumrongrut MUNGCHAROEN. Biodegradable kinetics of plastics under controlled composting conditions. *Waste Management* [online]. 2011, **31**(6), 1153-1161 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/j.wasman.2010.12.011. ISSN 0956053X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956053X1000629X>

LJUNGBERG, Nadia a Bengt WESSLÉN. The effects of plasticizers on the dynamic mechanical and thermal properties of poly(lactic acid). *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2002, **86**(5), 1227-1234 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1002/app.11077. ISSN 00218995. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.11077>

LÓPEZ GONZÁLEZ, Lisbet Mailin, Ileana PEREDA REYES, Jo DEWULF, Jörn BUDDE, Monika HEIERMANN a Han VERVAEREN. Effect of liquid hot water pre-treatment on sugarcane press mud methane yield. *Bioresource Technology* [online]. 2014, **169**, 284-290 [cit. 2017-02-24]. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.06.107. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852414009614>

LUCAS, Nathalie, Christophe BIENAIME, Christian BELLOY, Michèle QUENEUDEC, Françoise SILVESTRE a José-Edmundo NAVA-SAUCEDO. Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques – A review. *Chemosphere* [online]. 2008, **73**(4), 429-442 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.06.064. ISSN 00456535. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653508008333>

LUO, Yan-Bing, Xiu-Li WANG a Yu-Zhong WANG. Effect of TiO₂ nanoparticles on the long-term hydrolytic degradation behavior of PLA. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2012, **97**(5), 721-728 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2012.02.011. ISSN 01413910. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391012000729>

LU, Peng, Li-jun CHEN, Guo-xue LI, Shi-hua SHEN, Li-li WANG, Qi-yang JIANG a Jin-feng ZHANG. Influence of furfural concentration on growth and ethanol yield of *Saccharomyces kluyveri*. *Journal of Environmental Sciences* [online]. 2007, **19**(12), 1528-1532 [cit. 2017-02-25]. DOI: 10.1016/S1001-0742(07)60249-6. ISSN 10010742. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1001074207602496>

LUŠOVJANOVÁ, Eva. *Biodegradabilita materiálů na bázi přírodních, modifikovaných a syntetických polymerů*. Zlín, 2016. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Prof. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.

LÜTZHØFT, Hans-Christian Holten, Kanokwan BOE, Cheng FANG a Irini ANGELIDAKI. Comparison of VFA titration procedures used for monitoring the biogas process. *Water Research* [online]. 2014, **54**, 262-272 [cit. 2017-03-05]. DOI: 10.1016/j.watres.2014.02.001. ISSN 00431354. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135414001110>

LYU, James SCHLEY, Brian LOY, Deanna LIND, Christopher HOBOT, Randall SPARER a Darrel UNTEREKER. Kinetics and Time–Temperature Equivalence of Polymer Degradation. *Biomacromolecules* [online]. 2007, **8**(7), 2301-2310 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1021/bm070313n. ISSN 15257797. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm070313n>

MACDONALD, Renée T., Stephen P. MCCARTHY a Richard A. GROSS. Enzymatic Degradability of Poly(lactide): Effects of Chain Stereochemistry and Material Crystallinity. *Macromolecules* [online]. 1996, **29**(23), 7356-7361 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1021/ma960513j. ISSN 0024-9297. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma960513j>

MADHAVAN NAMPOOTHIRI, K., Nimisha Rajendran NAIR a Rojan Pappy JOHN. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresource Technology* [online]. 2010, **101**(22), 8493-8501 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.05.092. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852410009508>

MAZOTTO, Ana Maria, Sonia COURI, Mônica C.T. DAMASO a Alane Beatriz VERMELHO. Degradation of feather waste by *Aspergillus niger* keratinases: Comparison of submerged and solid-state fermentation. *International Biodeterioration & Biodegradation* [online]. 2013, **85**, 189-195 [cit. 2017-02-24]. DOI: 10.1016/j.ibiod.2013.07.003. ISSN 09648305. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830513002837>

MOCHIZUKI, Masatsugu, Yoshiharu DOI a Alexander STEINBÜCHEL. Properties and Application of Aliphatic Polyester Products. STEINBÜCHEL, Alexander, ed. *Biopolymers Online* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2005, 2005-01-15 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1002/3527600035.bpol4001. ISBN 3527600035. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/3527600035.bpol4001>

MOLINARO, Stefano, Malco CRUZ ROMERO, Marta BOARO, Alessandro SENSIDONI, Corrado LAGAZIO, Michael MORRIS a Joe KERRY. Effect of nanoclay-type and PLA optical purity on the characteristics of PLA-based nanocomposite films. *Journal of Food Engineering* [online]. 2013, **117**(1), 113-

123 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.021. ISSN 02608774. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877413000381>

MOUSA, L. a C.F. FORSTER. The Use of Glucose as a Growth Factor to Counteract Inhibition in Anaerobic Digestion. *Process Safety and Environmental Protection* [online]. 1999, **77**(4), 193-198 [cit. 2017-02-25]. DOI: 10.1205/095758299530062. ISSN 09575820. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0957582099708025>

MUELLER, Rolf-Joachim. Biological degradation of synthetic polyesters—Enzymes as potential catalysts for polyester recycling. *Process Biochemistry* [online]. 2006, **41**(10), 2124-2128 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/j.procbio.2006.05.018. ISSN 13595113. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511306002200>

NAFCHI MOHAMMADI, Abdorreza, Mahdiyeh MORADPOUR, Maliheh SAEIDI a Abd Karim ALIAS. Thermoplastic starches: Properties, challenges, and prospects. *Starch - Stärke* [online]. 2013, **65**(1-2), 61-72 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1002/star.201200201. ISSN 00389056. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/star.201200201>

NALLATHAMBI GUNASEELAN, V. Anaerobic digestion of biomass for methane production: A review. *Biomass and Bioenergy* [online]. 1997, **13**(1-2), 83-114 [cit. 2017-02-23]. DOI: 10.1016/S0961-9534(97)00020-2. ISSN 09619534. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0961953497000202>

OHKOSHI, I., H. ABE a Y. DOI. Miscibility and solid-state structures for blends of poly[(S)-lactide] with atactic poly[(R,S)-3-hydroxybutyrate]. *Polymer* [online]. 2000, **41**(15), 5985-5992 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/S0032-3861(99)00781-8. ISSN 00323861. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386199007818>

OLABI, A.G. State of the art on renewable and sustainable energy. *Energy* [online]. 2013, **61**, 2-5 [cit. 2017-02-24]. DOI: 10.1016/j.energy.2013.10.013. ISSN 03605442. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360544213008463>

OLIVA, José M., María J. NEGRO, Felicia SÁEZ, Ignacio BALLESTEROS, Paloma MANZANARES, Alberto GONZÁLEZ a Mercedes BALLESTEROS. Effects of acetic acid, furfural and catechol combinations on ethanol fermentation of *Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochemistry* [online]. 2006, **41**(5), 1223-1228 [cit. 2017-02-25]. DOI: 10.1016/j.procbio.2005.12.003. ISSN 13595113. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511305004757>

ONYECHE, T.I., O. SCHLÄFER, H. BORMANN, C. SCHRÖDER a M. SIEVERS. Ultrasonic cell disruption of stabilised sludge with subsequent anaerobic digestion. *Ultrasonics* [online]. 2002, **40**(1-8), 31-35 [cit. 2017-02-24]. DOI: 10.1016/S0041-624X(02)00087-2. ISSN 0041624x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041624X02000872>

OSTAFIŇSKA, A., J. MIKEŠOVÁ, S. KREJČÍKOVÁ, M. NEVORALOVÁ, A. ŠTURCOVÁ, A. ZHIGUNOV, D. MICHÁLKOVÁ a M. ŠLOUF. Thermoplastic starch composites with TiO₂ particles: Preparation, morphology, rheology and mechanical properties. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2017, **101**, 273-282 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.03.104. ISSN 01418130. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813017300442>

PALMQVIST, Eva a Bärbel HAHN-HÄGERDAL. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology* [online]. 2000, **74**(1), 25-33 [cit. 2017-02-25]. DOI: 10.1016/S0960-8524(99)00161-3. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852499001613>

PANDEY, Jitendra K., K. RAGHUNATHA REDDY, A. PRATHEEP KUMAR a R.P. SINGH. An overview on the degradability of polymer nanocomposites. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2005, **88**(2), 234-250 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2004.09.013. ISSN 01413910. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391004003684>

PANTANI, Roberto a Andrea SORRENTINO. Influence of crystallinity on the biodegradation rate of injection-moulded poly(lactic acid) samples in controlled composting conditions. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2013, **98**(5), 1089-1096 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2013.01.005. ISSN 01413910. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391013000086>

PARK, Jun Wuk, Yoshiharu DOI a Tadahisa IWATA. Uniaxial Drawing and Mechanical Properties of Poly[(R)-3-hydroxybutyrate]/Poly(L-lactic acid) Blends. *Biomacromolecules* [online]. 2004, **5**(4), 1557-1566 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1021/bm049905l. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm049905l>

PARK, Tae Gwan. Degradation of poly(D,L-lactic acid) microspheres: effect of molecular weight. *Journal of Controlled Release* [online]. 1994, **30**(2), 161-173 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1016/0168-3659(94)90263-1. ISSN 01683659. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168365994902631>

PATINVOH, Regina J., Elisabeth FEUK-LAGERSTEDT, Magnus LUNDIN, Ilona SÁRVÁRI HORVÁTH a Mohammad J. TAHERZADEH. Biological

Pretreatment of Chicken Feather and Biogas Production from Total Broth. *Applied Biochemistry and Biotechnology* [online]. 2016, **180**(7), 1401-1415 [cit. 2017-02-24]. DOI: 10.1007/s12010-016-2175-8. ISSN 02732289. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12010-016-2175-8>

PATINVOH, Regina J., Osagie A. OSADOLOR, Konstantinos CHANDOLIAS, Ilona SÁRVÁRI HORVÁTH a Mohammad J. TAHERZADEH. Innovative pretreatment strategies for biogas production. *Bioresource Technology* [online]. 2017, **224**, 13-24 [cit. 2017-02-23]. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.11.083. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852416316042>

PAUL, M.-A., C. DELCOURT, M. ALEXANDRE, Ph. DEGÉE, F. MONTEVERDE a Ph. DUBOIS. Polylactide/montmorillonite nanocomposites: study of the hydrolytic degradation. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2005, **87**(3), 535-542 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2004.10.011. ISSN 01413910. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391004003623>

PAUL, Marie-Amélie, Michaël ALEXANDRE, Philippe DEGÉE, Catherine HENRIST, André RULMONT a Philippe DUBOIS. New nanocomposite materials based on plasticized poly(l-lactide) and organo-modified montmorillonites: thermal and morphological study. *Polymer* [online]. 2003, **44**(2), 443-450 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/S0032-3861(02)00778-4. ISSN 00323861. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386102007784>

PAULOVÁ, L. Degradční produkty vznikající při fyzikálně-chemické předúpravě lignocelulo-ové biomasy a jejich vliv na efektivitu procesu výroby bioethanolu. *Chemické listy* [online]. 2012a, (106), 626-631 [cit. 2017-02-24]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_07_626-631.pdf

PAULOVÁ, L. Bioethanol z celulozy - vliv přítomnosti inhibičních látek na produkční mikroorganismy. *Listy cukrovarnické a řepařské* [online]. 2012b, (7-8), 229-232 [cit. 2017-02-24]. Dostupné z: http://www.cukr-listy.cz/on_line/2012/PDF/229-232.pdf

PAULOVA, Leona, Petra PATAKOVA, Barbora BRANSKA, Mojmir RYCHTERA a Karel MELZOCH. Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency. *Biotechnology Advances* [online]. 2015, **33**(6), 1091-1107 [cit. 2017-02-24]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.002. ISSN 07349750. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S073497501400189X>

PAVLIDOU, S. a C.D. PAPASPYRIDES. A review on polymer-layered silicate nanocomposites. *Progress in Polymer Science* [online]. 2008, **33**(12), 1119-1198

[cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2008.07.008. ISSN 00796700. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670008000701>

PICARD, Emilie, Eliane ESPUCHE a René FULCHIRON. Effect of an organo-modified montmorillonite on PLA crystallization and gas barrier properties. *Applied Clay Science* [online]. 2011, **53**(1), 58-65 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/j.clay.2011.04.023. ISSN 01691317. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169131711001670>

PLUTA, M., A. GALESKI, M. ALEXANDRE, M.-A. PAUL a P. DUBOIS. Polylactide/montmorillonite nanocomposites and microcomposites prepared by melt blending: Structure and some physical properties. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2002, **86**(6), 1497-1506 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1002/app.11309. ISSN 0021-8995. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.11309>

PLUTA, Mirosław, Marie-Amélie PAUL, Michaël ALEXANDRE a Philippe DUBOIS. Plasticized polylactide/clay nanocomposites. II. The effect of aging on structure and properties in relation to the filler content and the nature of its organo-modification. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* [online]. 2006, **44**(2), 312-325 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1002/polb.20697. ISSN 0887-6266. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/polb.20697>

PROCHÁZKA, Jindřich, Jakub MRÁZEK, Lenka ŠTROSOVÁ, Kateřina FLIEGEROVÁ, Jana ZÁBRANSKÁ a Michal DOHÁNYOS. Enhanced biogas yield from energy crops with rumen anaerobic fungi. *Engineering in Life Sciences* [online]. 2012, **12**(3), 343-351 [cit. 2017-02-24]. DOI: 10.1002/elsc.201100076. ISSN 16180240. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elsc.201100076>

PRUKSATRAKUL, Thapanee, Pattamaporn PHOOPRAINTRA, Prapin WILAIRAT, Pimchai CHAIYEN a Rattikan CHANTIWAS. Development of a sequential injection-liquid microextraction procedure with GC-FID for analysis of short-chain fatty acids in palm oil mill effluent. *Talanta* [online]. 2017, **165**, 612-618 [cit. 2017-03-05]. DOI: 10.1016/j.talanta.2017.01.010. ISSN 00399140. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914017300115>

RHIM, Jong-Whan, Seok-In HONG a Chang-Sik HA. Tensile, water vapor barrier and antimicrobial properties of PLA/nanoclay composite films. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2009, **42**(2), 612-617 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/j.lwt.2008.02.015. ISSN 00236438. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643808000613>

RIAL, Diego, José Antonio VÁZQUEZ a Miguel Anxo MURADO. Effects of three heavy metals on the bacteria growth kinetics: a bivariate model for

toxicological assessment. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2011, **90**(3), 1095-1109 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1007/s00253-011-3138-1. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-011-3138-1>

RUDNIK, Ewa. *Compostable polymer materials*. Boston: Elsevier, c2008. ISBN 0080453716.

RUDNIK, E. a D. BRIASSOULIS. Comparative Biodegradation in Soil Behaviour of two Biodegradable Polymers Based on Renewable Resources. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2011, **19**(1), 18-39 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1007/s10924-010-0243-7. ISSN 1566-2543. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10924-010-0243-7>

RYCHTER, Piotr, Marta KOT, Krzysztof BAJER, Diana ROGACZ, Alena ŠIŠKOVÁ a Janusz KAPUŚNIAK. Utilization of starch films plasticized with urea as fertilizer for improvement of plant growth. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2016, **137**, 127-138 [cit. 2018-07-22]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.10.051. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861715010310>

SEDNIČKOVÁ, Michaela, Silvie PEKAŘOVÁ, Pavel KUCHARCZYK, et al. Changes of physical properties of PLA-based blends during early stage of biodegradation in compost. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2018, **113**, 434-442 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.02.078. ISSN 01418130. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813017333561>

SHAFIEI, Marzieh, Maryam M. KABIR, Hamid ZILOUEI, Ilona SÁRVÁRI HORVÁTH a Keikhosro KARIMI. Techno-economical study of biogas production improved by steam explosion pretreatment. *Bioresource Technology* [online]. 2013, **148**, 53-60 [cit. 2017-02-24]. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.08.111. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096085241301362X>

SHAH, Aamer Ali, Fariha HASAN, Abdul HAMEED a Safia AHMED. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances* [online]. 2008, **26**(3), 246-265 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.12.005. ISSN 07349750. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975008000141>

SIGNORI, Francesca, Maria-Beatrice COLTELLI a Simona BRONCO. Thermal degradation of poly(lactic acid) (PLA) and poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT) and their blends upon melt processing. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2009, **94**(1), 74-82 [cit. 2018-05-29]. DOI:

10.1016/j.polymdegradstab.2008.10.004. ISSN 01413910. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391008003194>

SINGH, Renu, Ashish SHUKLA, Sapna TIWARI a Monika SRIVASTAVA. A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [online]. 2014, **32**, 713-728 [cit. 2017-02-24]. DOI: 10.1016/j.rser.2014.01.051. ISSN 13640321. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032114000628>

SINHA RAY, Suprakas, Kazunobu YAMADA, Masami OKAMOTO, Akinobu OGAMI a Kazue UEDA. New Polylactide/Layered Silicate Nanocomposites. 3. High-Performance Biodegradable Materials. *Chemistry of Materials* [online]. 2003a, **15**(7), 1456-1465 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1021/cm020953r. ISSN 0897-4756. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cm020953r>

SINHA RAY, Suprakas, Kazunobu YAMADA, Masami OKAMOTO a Kazue UEDA. New polylactide-layered silicate nanocomposites. 2. Concurrent improvements of material properties, biodegradability and melt rheology. *Polymer* [online]. 2003b, **44**(3), 857-866 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/S0032-3861(02)00818-2. ISSN 00323861. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386102008182>

SONG, J. H., R. J. MURPHY, R. NARAYAN a G. B. H. DAVIES. Biodegradable and compostable alternatives to conventional plastics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. 2009, **364**(1526), 2127-2139 [cit. 2018-07-22]. DOI: 10.1098/rstb.2008.0289. ISSN 0962-8436. Dostupné z: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2008.0289>

SOUZA, Patrícia Moraes Sinohara, Nádia Aline CORROQUÉ, Ana Rita MORALES, Maria Aparecida MARIN-MORALES a Lucia Helena Innocentini MEI. PLA and Organoclays Nanocomposites: Degradation Process and Evaluation of ecotoxicity Using *Allium cepa* as Test Organism. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2013, **21**(4), 1052-1063 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1007/s10924-013-0604-0. ISSN 1566-2543. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10924-013-0604-0>

STLOUKAL, Petr, Gabriela JANDIKOVA, Marek KOUTNY a Vladimír SEDLAŘÍK. Carbodiimide additive to control hydrolytic stability and biodegradability of PLA. *Polymer Testing* [online]. 2016, **54**, 19-28 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2016.06.007. ISSN 01429418. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142941816302446>

STLOUKAL, Petr, Alena KALEDOVA, Hannelore MATTAUSCH, Stephan LASKE, Clemens HOLZER a Marek KOUTNY. The influence of a hydrolysis-

inhibiting additive on the degradation and biodegradation of PLA and its nanocomposites. *Polymer Testing* [online]. 2015, **41**, 124-132 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2014.10.015. ISSN 01429418. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142941814002499>

STRAKA, František a Michal DOHÁNYOS. *Bioplyn: [příručka pro výuku, projekci a provoz bioplynových systémů]*. Říčany: GAS, 2003. ISBN 8073280299.

SUMPRASIT, Nattapon, Nisha WAGLE, Naraporn GLANPRACHA a Ajit P. ANNACHHATRE. Biodiesel and biogas recovery from *Spirulina platensis*. *International Biodeterioration & Biodegradation* [online]. 2016, , - [cit. 2017-03-05]. DOI: 10.1016/j.ibiod.2016.11.006. ISSN 09648305. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830516306837>

ŠÁRKA, E., Z. KRULIŠ, J. KOTEK, L. RŮŽEK, A. KORBÁŘOVÁ, Z. BUBNÍK a M. RŮŽKOVÁ. Application of wheat B-starch in biodegradable plastic materials. *Czech Journal of Food Sciences* [online]. 2011, **29**(No. 3), 232-242 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.17221/292/2010-CJFS. ISSN 12121800. Dostupné z: <http://www.agriculturejournals.cz/web/cjfs.htm?volume=29&firstPage=232&type=publishedArticle>

ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 8024608529.

TAHERZADEH, M.J. a K. KARIMI. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2008, **9**(9), 1621-1651 [cit. 2017-02-24]. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/9/9/1621>

TAHERZADEH, Mohammad J. a Azam JEIHANIPOUR. Recalcitrance of Lignocellulosic Biomass to Anaerobic Digestion. *Biogas Production* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2012, 2012-05-01, s. 27 [cit. 2017-02-24]. DOI: 10.1002/9781118404089.ch2. ISBN 9781118404089. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118404089.ch2>

TAUBNER, V.; SHISHOO, R. Influence of processing parameters on the degradation of poly(L-lactide) during extrusion. *Journal of applied polymer science* [online]. 2001, **79**(12), 2128-2135 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1002/1097-4628(20010321)79:12<2128::AID-APP1020>3.0.CO;2-. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/1097-4628%2820010321%2979%3A12%3C2128%3A%3AAID-APP1020%3E3.0.CO%3B2-%23>

TESTER, Richard F., John KARKALAS a Xin QI. Starch—composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science* [online]. 2004, **39**(2), 151-165 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1016/j.jcs.2003.12.001. ISSN 07335210. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521003001139>

TOKIWA, Yutaka, Buenaventurada P. CALABIA, Charles U. UGWU a Seiichi AIBA. Biodegradability of Plastics. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2009, **10**(9), 3722-3742 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.3390/ijms10093722. ISSN 14220067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/10/9/3722/>

TOKIWA, Yutaka a Amnat JARERAT. Biodegradation of poly(l-lactide). *Biotechnology Letters* [online]. 2004, **26**(10), 771-777 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1023/B:BILE.0000025927.31028.e3. ISSN 01415492. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/B:BILE.0000025927.31028.e3>

TSUJI, Hideto a Shinya MIYAUCHI. Poly(l-lactide): VI Effects of crystallinity on enzymatic hydrolysis of poly(l-lactide) without free amorphous region. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2001a, **71**(3), 415-424 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1016/S0141-3910(00)00191-9. ISSN 01413910. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391000001919>

TSUJI, Hideto a Shinya MIYAUCHI. Enzymatic Hydrolysis of Poly(lactide)s: Effects of Molecular Weight, \n \n -Lactide Content, and Enantiomeric and Diastereoisomeric Polymer Blending. *Biomacromolecules* [online]. 2001b, **2**(2), 597-604 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1021/bm010048k. ISSN 15257797. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm010048k>

TSUJI a MIZUNO. Properties and morphology of poly(L-lactide). III. Effects of initial crystallinity on long-term in vitro hydrolysis of high molecular weight poly(L-lactide) film in phosphate-buffered solution. *Applied polymer* [online]. 2000, **7**(77), 1452-1464 [cit. 2017-03-01]. Dostupné z: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-4628\(20000815\)77:7%3C1452::AID-APP7%3E3.0.CO;2-S/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-4628(20000815)77:7%3C1452::AID-APP7%3E3.0.CO;2-S/full)

TSUJI a TAKEHIKO. Synthesis and Hydrolytic Degradation of Substituted Poly(DL-Lactic Acid)s. *Materials* [online]. 2011, **4**(8), 1384-1398 [cit. 2017-03-01]. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1996-1944/4/8/1384>

VISAKH, P. M., Aji P. MATHEW, Kristiina OKSMAN a Sabu THOMAS. Starch-Based Bionanocomposites: Processing and Properties. HABIBI, Youssef a Lucian A. LUCIA, ed. *Polysaccharide Building Blocks* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2012, 2012-03-19, s. 287-306 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1002/9781118229484.ch11. ISBN 9781118229484. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118229484.ch11>

WANG, Frank Cheng-Yu a A.Dale BURLESON. The development of pyrolysis–fast gas chromatography for analysis of synthetic polymers. *Journal of Chromatography A* [online]. 1999, **833**(1), 111-119 [cit. 2017-03-02]. DOI: 10.1016/S0021-9673(98)01013-9. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967398010139>

WEILAND, Peter. Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2010, **85**(4), 849-860 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1007/s00253-009-2246-7. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-009-2246-7>

XIMENES, Eduardo, Youngmi KIM, Nathan MOSIER, Bruce DIEN a Michael LADISCH. Inhibition of cellulases by phenols. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2010, **46**(3-4), 170-176 [cit. 2017-02-25]. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2009.11.001. ISSN 01410229. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022909002543>

YANG, Hea-Sun, Jin-San YOON a Mal-Nam KIM. Dependence of biodegradability of plastics in compost on the shape of specimens. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2005, **87**(1), 131-135 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2004.07.016. ISSN 01413910. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391004002502>

YEH, Jen-taut, Chi-yuan HUANG, Wan-lan CHAI a Kan-nan CHEN. Plasticized properties of poly (lactic acid) and triacetine blends. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2009, **112**(5), 2757-2763 [cit. 2018-05-29]. DOI: 10.1002/app.29761. ISSN 00218995. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.29761>

ZÁBRANSKÁ, Jana. Intenzifikace výroby bioplynu z rostlinných materiálů. In: *Biom.cz* [online]. 2010 [cit. 2017-02-23]. Dostupné z: <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/intenzifikace-vyroby-bioplynu-z-rostlinnych-materialu>. ISSN: 1801-2655

ZAGHLOUL, Taha I., Amira M. EMBABY a Ahmed R. ELMAHDY. Biodegradation of chicken feathers waste directed by *Bacillus subtilis* recombinant cells: Scaling up in a laboratory scale fermentor. *Bioresource Technology* [online]. 2011, **102**(3), 2387-2393 [cit. 2017-02-24]. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.10.106. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852410017621>

ZHANG, Honggen, Zhenyu WANG a Oscar LIU. Development and validation of a GC–FID method for quantitative analysis of oleic acid and related fatty acids. *Journal of Pharmaceutical Analysis* [online]. 2015, **5**(4), 223-230 [cit. 2017-03-05]. DOI: 10.1016/j.jpha.2015.01.005. ISSN 20951779. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095177915000179>

ZIEMIŃSKI, K., I. ROMANOWSKA, M. KOWALSKA-WENTEL a M. CYRAN. Effects of hydrothermal pretreatment of sugar beet pulp for methane production. *Bioresource Technology* [online]. 2014, **166**, 187-193 [cit. 2017-02-24]. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.05.021. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852414006804>

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AŠP	Acetylovaný termoplastický škrob
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C, CEL	Celulózová vlákna
DGGE	Denaturační gradientová gelová elektroforéza
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DOC	Rozpuštěný organický uhlík
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
FID	Plamenově ionizační detektor
FUR	Furfural
GA	Kyselina galová
GC	Plynová chromatografie
GLY	Glycerol
GPC	Gelová permeační chromatografie
HMF	5-hydroxymethylfurfural
IC	Anorganický uhlík
MM	Minerální médium
MMT	Montmorillonit
MS	Hmotnostní detekce
MT	Míchání taveniny
OCT	Octan sodný
OR	Odlévání roztoku
ORP	Oxidačně redukční potenciál
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PHB	Polyhydroxybutyrát
PLA	Kyselina polymléčná
PLOT	Porous-layer Open tubular column
PŠP	Propionovaný termoplastický škrob

SAXS	Small-angle X-ray scattering
SCOT	Support-coated open tubular column
SEM	Skenování elektronová mikroskopie
SS	Stupeň substituce
TA	Kyselina třísllová
TAC	Triacetin
TAE	Trisacetátový pufr
TC	Celkový uhlík
TCD	Teplotně vodivostní detektor
TEC	TEC – triethyl citrát
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
Tg	Teplota skelného přechodu
TM	Točivý moment
TOC	Celkový organický uhlík
ŠP	Termoplastický neacetylovaný škrob
TS	Sušina
UV	Ultrafialové záření
WCOT	Wall-coated open tubular column

9. SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 3.1: Charakterizace komerčních montmorillonitů</i>	29
<i>Tab. 3.2: Fyzikálně-chemické vlastnosti původního a adaptovaného digestátu</i>	32
<i>Tab. 3.3: Přehled připravených PLA/jílových nanokompozitů a použité procesní podmínky</i>	36
<i>Tab. 3.4: Základní parametry GC analýzy</i>	38
<i>Tab. 3.5: Složení termoplastických škrobových materiálů</i>	40
<i>Tab. 3.6: Složení reakční směsi pro PCR</i>	42
<i>Tab. 3.7: PCR program Touch down PCR</i>	42
<i>Tab. 3.8: PCR program PCR 2</i>	42
<i>Tab. 3.9: Podmínky provedení DGGE</i>	43
<i>Tab. 4.1: Optimalizované parametry matematického modelu</i>	45
<i>Tab. 4.2: Naměřené parametry u jednotlivých koncentrací inhibičních látek na konci experimentu</i>	50
<i>Tab. 4.3: Stupeň mineralizace čisté PLA v % v průmyslovém kompostu při teplotách 25, 37 a 58 °C</i>	54
<i>Tab. 4.4: Mezivrstevní vzdálenosti vypočítané z disperzních vektorů SAXS analýzou</i>	57
<i>Tab. 4.5: Vlastnosti PLA-MMT nanokompozitních filmů</i>	59
<i>Tab. 4.6: Složení vzorků vybraných pro izolaci DNA degradérů</i>	72

10. SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1.1 Schéma tvorby bioplynu z biologicky rozložitelných odpadů (Patinvoh et al., 2017)</i>	11
<i>Obr. 1.2 Diagram procesu produkce bioplynu z lignocelulosoové biomasy s využitím termické předúpravy (Shafiei et al., 2013).....</i>	14
<i>Obr. 1.3 Přehled inhibičních látek vznikajících při předúpravě lignocelulosoové biomasy (Paulová et al., 2012a)</i>	15
<i>Obr. 1.4 Strukturní vzorec PLA (Garlotta, 2001).....</i>	18
<i>Obr. 1.5 Schematické znázornění různých hybridních struktur směsí polymer/silikát (Giannelis et al., 1999).</i>	21
<i>Obr. 1.6 Struktura 2:1 vrstevnatého jílového materiálu (Giannelis et al., 1999)</i>	22
<i>Obr. 1.7 Struktura amylozy (A) a amylopektinu (B)</i>	23
<i>Obr. 1.8 Průřezy tří typů kapilárních kolon (Klouda, 2003)</i>	25
<i>Obr. 4.1 Produkce methanu v různých koncentracích FUR.....</i>	46
<i>Obr. 4.2 Produkce methanu v různých koncentracích FUR.</i>	47
<i>Obr. 4.3 Produkce methanu v různých koncentracích HMF. Produkce methanu je vyjádřena jako gram vloženého uhlíkového substrátu neboli octanu sodného</i>	48
<i>Obr. 4.4 Produkce methanu v různých koncentracích HMF. Produkce methanu je vyjádřena jako gram vloženého uhlíkového substrátu neboli celulosy.....</i>	48
<i>Obr. 4.5 Parametry matematického modelu</i>	49
<i>Obr. 4.6 Produkce methanu v různých koncentracích TA. Produkce methanu je vyjádřena jako gram vloženého substrátu neboli octanu sodného</i>	51
<i>Obr. 4.7 Produkce methanu v různých koncentracích GA. Produkce methanu je vyjádřena jako gram vloženého substrátu neboli octanu sodného</i>	52
<i>Obr. 4.8 Produkce methanu v různých koncentracích TA. Produkce methanu je vyjádřena jako gram vloženého uhlíkového substrátu neboli celulosy</i>	52
<i>Obr. 4.9 Produkce methanu v různých koncentracích GA. Produkce methanu je vyjádřena jako gram vloženého uhlíkového substrátu neboli celulosy</i>	53
<i>Obr. 4.10 Biodegradace PLA a směsí PLA v kompostu</i>	55
<i>Obr. 4.11 TEM snímky PLA-Na3010 (A,B), PLA-GA (C,D) a PLA-30B (E,F). 58</i>	
<i>Obr. 4.12 Biodegradace v kompostu (A) a abiotická hydrolyza (B) čisté PLA a PLA/jílových nanokompozitových filmů. ■ PLA-NA116; □ PLA-GA; ○ PLA-NA3010, ● čistá PLA.....</i>	60

<i>Obr. 4.13 Biodegradace v kompostu (A) a abiotická hydrolyza (B) čisté PLA a PLA/jílových nanokompozitových filmů. ▲ PLA-Na; ■ PLA -10A; ○ PLA-20A; □ PLA-30B; ● PLA</i>	61
<i>Obr. 4.14 Změna molekulové hmotnosti čisté PLA a PLA/jílových nanokompozitových filmů v průběhu experimentu abiotické hydrolyzy. A) ▲ PLA-Na; ■ PLA -10A; ○ PLA-20A; □ PLA-30B; ● PLA. B) ■ PLA1-NA116; □ PLA-GA; ○ PLA-NA3010. ● čistá PLA</i>	63
<i>Obr. 4.15 Snímky SEM čisté PLA (A) a PLA/jílových nanokompozitů PLA-10A (B), PLA-20A (C), PLA-GA (D) po 55 dnech inkubace v kompostu</i>	64
<i>Obr. 4.16 Snímky SEM morfologie ŠP připraveného odléváním roztoku a), mícháním taveniny b), spojením obou postupů c) byly pořízeny na Ústavu makromolekulární chemie v Praze</i>	65
<i>Obr. 4.17 Snímky SEM AŠP s nízkým (a) a vysokým (b) stupněm substituce, které byly připraveny OR+MT po acetylaci; AŠP s vysokým stupněm substituce připravený OR před procesy acetylace a MT; (d) PŠP připraven MT byly pořízeny na Ústavu makromolekulární chemie v Praze</i>	66
<i>Obr. 4.18 Snímky SEM vzorků TŠP-C (a); AŠP-LC (b) a AŠP-HC (c) škrobů s celulosovými vlákny byly pořízeny na Ústavu makromolekulární chemie v Praze</i>	67
<i>Obr. 4.19 Biodegradace ŠP a AŠP v kompostu</i>	68
<i>Obr. 4.20 Biodegradace ŠP a AŠP s nebo bez přídavku celulosových vláken v kompostu</i>	69
<i>Obr. 4.21 Biodegradace ŠP a AŠP s různým složením v kompostu</i>	70
<i>Obr. 4.22 Snímky SEM vzorků ŠP (a), AŠP-L (b), AŠP-LC (c,d) po 7 dnech biodegradace v kompostu</i>	71
<i>Obr. 4.23 DGGE gel zobrazující diverzitu bakteriální komunity na povrchu škrobových materiálů po 20 dnech v kompostu. Identifikace signálů (% shodnosti se sekvencí GenBank v závorkách): 1) <i>Tuberibacillus calidus</i> (99 %); 2) <i>Geobacillus</i> sp. (99 %); 3) <i>Alicyclobacillus herbarius</i> (100 %); 4) <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> (99 %); 5) <i>Geobacillus</i> sp. (99 %). M, marker</i>	72

11. CURRICULUM VITAE

Osobní údaje:

Jméno a příjmení: Ing. Silvie Pekařová
Datum narození: 18.1.1988
Kontaktní adresa: Na Honech I 5539, Zlín 760 05
E-mail: silvie.pekarova@gmail.com

Dosažené vzdělání:

2012– dosud *Doktorské studium*
Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Obor: Technologie makromolekulárních látek

2010 – 2012 *Navazující magisterské studium*
Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Obor: Inženýrství ochrany životního prostředí
Získaný titul: Ing.

2007 – 2010 *Bakalářské studium*
Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Obor: Chemie a technologie materiálů
Získaný titul: Bc.

Pracovní zkušenosti:

2017 – dosud *NWT a.s.*
tř. Tomáše Bati 269, 760 01 Zlín
Pracovní pozice: Projektový manažer
Popis pozice: Řízení projektu vývoje pyrolyzní jednotky s indukčním ohřevem

2016 – 2017 *SUEZ využití zdrojů a.s.,*
Němčice n. Hanou, Novosady 616,798 27
Pracovní pozice: Inženýr kvality
Popis pozice: Analýza a kontrola kvality vstupních a výstupních materiálů v rámci provozu recyklace plastů

Zahraniční studijní a pracovní pobyty:

Září/2013 *Department of Polymer Engineering and Science,*
Montanuniversität Leoben, Austria
Název projektu: Vliv zpracovatelských přísad na sensitivitu kyseliny polymléčné k degradaci

Znalosti:

Jazykové znalosti: Angličtina – dosažená úroveň C1

Počítačové znalosti – pokročilý uživatel: MS Office (Word, Excel, PowerPoint, OneNote, Outlook), GC/MSD ChemStation software

Řidičský průkaz: sk. A, B

Odborná příprava a zkušenosti:

Řešené projekty:

IGA/FT/2013/013

Nepříznivé látky a faktory v životním prostředí a v potravinách

IGA/FT/2014/005

Pokročilé chemické a biochemické metody v ochraně životního prostředí

IGA/FT/2015/012

Výzkum procesů ovlivňujících kvalitu potravin a stav životního prostředí

IGA/FT/2016/012

Výzkum procesů ke zlepšení stavu životního prostředí a kvality potravin

12. SEZNAM PUBLIKACÍ

Příspěvky v mezinárodních časopisech s impakt faktorem

Husarova, L., **Pekarova, S.**, Stloukal, P., Kucharzcyk, P., Verney, V., Commereuc, S., Ramone, A., Koutny, M., 2014. Identification of important abiotic and biotic factors in the biodegradation of poly(l-lactic acid). *International Journal of Biological Macromolecules*, roč. 71, 155-162. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.04.050. (IF=3,67)

Dvorackova, M., Svoboda, P., Kostka, L., **Pekarova, S.**, 2015. Influence of biodegradation in thermophilic anaerobic aqueous conditions on crystallization of poly(butylene succinate). *Polymer testing*, roč. 47, s. 59-70. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2015.08.006. (IF=2,46)

Stloukal, P., **Pekarova, S.**, Kalendova, A., Mattausch, H., Laske, S., Holzer, C., Bodner, S., Maier, G., Slouf, M., Koutny, M., 2015. Kinetics and mechanism of the biodegradation of PLA/clay nanocomposites during thermophilic phase of composting proces. *Waste Management*, roč. 42, s. 31-40. DOI: 10.1016/j.wasman.2015.04.006. (IF=4,03)

Sera, J., Stloukal, P., Jancova, P., Verney, V., **Pekarova, S.**, Koutny, M., 2016. Accelerated Biodegradation of Agriculture Film Based on Aromatic-Aliphatic Copolyester in Soil under Mesophilic Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, roč. 64, 5653-5661. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b01786. (IF=3,15)

Pekarova, S., Dvorackova, M., Stloukal, P., Ingr, M., Sera, J., Koutny, M., 2017. Quantitation of the inhibition effect of model compounds representing plant biomass degradation products on methane production. *BioResources*, roč. 12, 2421-2432. DOI: 10.15376/biores.12.2.2421-2432. (IF=1,33)

Sedničková M., **Pekařová S.**, Kucharzcyk P., Bočkaj J., Janigová I., Kleinová A., Johec-Mošková D., Omaníková L., Perďochová D., Koutný M., Sedlařík V., Alexy P., Chodák I., 2018. Changes of physical properties of PLA-based blends during early stage of biodegradation in compost. *International Journal of Biological Macromolecules*, roč. 2018 DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.02.078 (IF=3,67)

Nevoralova M., Koutny M., Ostafinska A., Krulis Z., Horak P., **Pekarova S.**, Sera J., Ruzek L., Ruzickova M., Krecikova S., Slouf M., 2018. Controlled biodegradability of thermoplastic starch based materials. – v recenzním řízení

Příspěvky ve sbornících z konferencí:

Pekarova, S., Julinova, M., Koutny, M., Initialiation of poly(vinyl alcohol) biodegradation in soil environment. In: 1ST INTERNATIONAL CONFERENCE IN POLYMERS WITH SPECIAL FOCUS IN EARLY STAGE RESEARCHERS, *Polymar 2013*. Castellón de la Plana: Publicacions de la Universitat Jaume I, 2013. ISBN 9788480219426

