

# IZOLACE POLYHYDROXYALKANOÁTŮ Z MIKROBIÁLNÍ BIOMASY

MARTIN ZAPLETAL a JIŘÍ TREJBAL

Ústav organické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6  
zapletam@vscht.cz

Došlo 10.4.16, přijato 16.6.16.

Klíčová slova: polyhydroxyalkanoáty, izolace, downstream, bioplasty

## Obsah

1. Úvod
2. Polyhydroxyalkanoáty – historie, syntéza a vlastnosti
3. Výroba, suroviny
4. Downstream
  - 4.1. Zakoncentrování fermentačního media
  - 4.2. Izolace a purifikace
    - 4.2.1. Extrakční postupy
    - 4.2.2. Chemická digesce buněčných komponent
    - 4.2.3. Desintegrace a mechanická izolace
    - 4.2.4. Ostatní metody
    - 4.2.5. Několik poznámek k izolaci a purifikaci
5. Závěr

## 1. Úvod

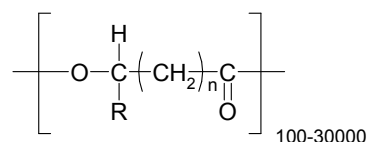
Plastické hmoty jsou bezesporu jednou z nejdůležitějších komodit současného doby a je téměř nemožné představit si svět bez nich, o čemž svědčí mimo jiné i celková roční produkce a dynamika jejího růstu. Např. v roce 2002 bylo celosvětově vyrobeno asi 204 milionů tun umělých hmot, zatímco v roce 2012 již téměř 288 milionů tun (cit.<sup>1</sup>). Největší množství plastů se spotřebuje na výrobu obalových materiálů, např. v Evropě 40 % a ve Spojených státech 42 % (cit.<sup>2</sup>).

Velkým problémem v dnešní době je samozřejmě skutečnost, že drtivá většina plastů je založena na neobnovitelných zdrojích, především ropě. Tak například na výrobu polyethylenu (PE) se spotřebuje 60 % a na výrobu polypropylenu (PP) a jeho kopolymerů se využívá cca. 64 % vyrobeného polypropylenu (90 milionů tun v roce 2014)<sup>5,6</sup>.

Další nezanedbatelnou komplikací je, jak zacházet s plasty po jejich použití. V současnosti je 20–43 % všech plastů na světě skládkováno, dalších 10–20 milionů tun

ročně končí jako odpad v mořích a oceánech a odhaduje se, že až 270 tisíc tun plastových částic zde trvale zůstává<sup>3</sup>. Ekologické dopady takového zacházení s plastovými odpady jsou značné, protože se přirozeně téměř neodbouvají a jejich poločas rozpadu v přírodě je odhadován na desítky až stovky let. Proto je posledních několik desítek let věnována této problematice značná pozornost. Známým způsobem řešení je např. spalování, které však samo o sobě další problémy, jak environmentální tak sociální, způsobuje. Jinou možností je recyklace, nicméně tímto způsobem se např. v roce 2012 v Evropě zpracovalo jen 26 % plastových odpadů a v USA dokonce pouhých 9 %. Další možností je snížení spotřeby, což se ovšem zdá, vzhledem k tomu, že spotřeba naopak roste tempem asi 4 % ročně<sup>2</sup>, nereálné.

Jednou z možných dalších alternativ je výroba plastických hmot založená na obnovitelných zdrojích uhlíku, tedy biomase, čímž by byla do jisté míry vyřešena otázka surovinové základny. Problematika plastů jakožto odpadů bude vyřešena, pokud vyrobené plasty budou zároveň biodegradabilní (vznikající oxid uhličitý není fosilního původu). Obě tyto podmínky splňují např. polyhydroxyalkanoáty (PHA), jejichž obecná struktura je uvedena na obr. 1.



Obr. 1. Obecná struktura polyhydroxyalkanoátů

## 2. Polyhydroxyalkanoáty – historie, syntéza a vlastnosti

Polyhydroxyalkanoáty, jak již název napovídá, patří do skupiny polyesterů hydroxyalkanových kyselin. Již v roce 1926 Lemoigne poprvé izoloval poly-3-hydroxybutyrát (PHB) z bakteriálního kmene *Bacillus megaterium* a popsal jej, nicméně až od roku 1958 byla této problematice věnována větší pozornost poté, co bylo zjištěno, že PHA mohou být produkovány ve významných množstvích některými bakteriemi<sup>7</sup>. Tyto polyestery si bakterie vytvářejí jako zásobní zdroj uhlíku a energie pro případ zhoršených životních podmínek. PHA se uvnitř bakteriálních buněk ukládají ve formě granulí, které jsou obaleny vrstvou fosfolipidů a proteinů, jež zásadně ovlivňují syntézu a utilizaci PHA<sup>8</sup>.

Polyhydroxyalkanoáty lze rozdělit do tří základních skupin podle počtu uhlíkových atomů v jednotlivých monomerech na PHA s krátkým řetězcem (short-chain length PHA, scl-PHA) o délce řetězce 3–5 uhlíků v monomeru, PHA se středně dlouhým řetězcem (medium-chain length PHA, mcl-PHA) o délce 6–14 uhlíků v monomeru a s dlouhým řetězcem (long-chain length PHA, lcl-PHA). Do současné doby bylo popsáno asi 150 jednotlivých monomerů, které mohou tvořit PHA, většinou se jedná o 3-hydroxy-, vzácněji 4,6-hydroxykyseliny jak nasycené, tak nenasycené, větvené, případně s dalšími funkčními skupinami. Konkrétní typ vznikajícího PHA závisí hlavně na použitém mikrobiálním kmenu, surovině, její koncentraci a délce kultivace.

Nejnámějším a nejběžnějším zástupcem scl-polyhydroxyalkanoátů je poly-3-hydroxybutyrát (P3HB). Kromě něj existuje poly-4-hydroxybutyrát (P4HB) i kopolymery např. poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) – P(3HB-co-3HV), zkráceně P3HBV.

Mechanické vlastnosti polymeru závisejí na skladbě monomerních jednotek. Tak například P3HB je zcela stereoregulární, vysoce krystalický, poměrně tvrdý a křehký s bodem tání kolem 180 °C, přičemž teplota rozkladu je asi 200 °C. Naproti tomu kopolymer P(3HB-co-3HV), i když obsahuje třeba jen 5–10 % 3-hydroxyvalerátu, má mnohem nižší bod tání 130 °C, je houževnatější s nižším stupněm krystalinity. Přehled vlastností některých PHB a polypropylenu je uveden v tab. I.

V laboratorních a průmyslových podmínkách ke tvorbě polymeru dochází v podmínkách nedostatku, když je růst samotné biomasy omezen limitací přísunu dusíku, fosforu nebo kyslíku, přičemž přísun uhlíkatých surovin zůstává neomezen<sup>9</sup>.

### 3. Výroba, suroviny

Jak již bylo zmíněno, podstatnou výhodou polyhydroxyalkanoátů je to, že lze vyrábět z biomasy namísto z neobnovitelných zdrojů. Na druhou stranu je v současnosti prozatím nezanedbatelným problémem ekonomika procesu, protože PHA vyráběná kultivačními postupy je

mnohem dražší než polymery založené na ropě<sup>10</sup>. Z analýz vyplývá, že cena substrátu zásadně ovlivňuje ekonomiku celé produkce PHA z obnovitelných zdrojů. Cílem je tedy nalézt takové obnovitelné suroviny, aby byla výroba „bioplastů“ konkurenceschopná klasickým (ropným) výrobkům.

V roce 1976 se Imperial Chemical Company (ICI) pokoušela o výrobu pod obchodním názvem Biopol®, avšak vzhledem k tomu, že nedošlo k očekávanému růstu cen ropy, produkty z PHA se kvůli ceně vyskytovaly jen velmi vzácně. V roce 1995 firma Biomer (Německo) oznámila spuštění jednotky na 1000 t/r. V polovině 90. let Monsanto odkoupilo technologii od ICI, nicméně komerční produkci PHA nikdy nezahájilo a v roce 1999 odprodalo technologii firmě Metabolix (USA). V roce 2000 firma Biocycle (Brazílie) spustila linku s kapacitou 50 t/r. V roce 2009 oznámila firma Metabolix spuštění výroby s kapacitou 50 kt/r a ve stejný rok firma Meridian (USA) oznámila spuštění výroby s kapacitou 10 kt/r. V dalších letech se však ukázalo, že výroby Metabolix a Meridian produkují v řádech stovek tun s prodejní cenou kolem 6 USD/kg, přičemž problémem je izolace a kvalita produktu. Z této anabáze je vidět, že průmyslová výroba PHA konkurenceschopná ropným produktům není jednoduchou záležitostí. V současnosti komerčně vyrábí PHA jen asi 11 firem na světě<sup>11</sup>.

Tradičním zdrojem uhlíku pro produkci PHA jsou především sacharidy, surovinou tak mohou být odpady ze zemědělské výroby (škrobové plodiny – brambory, rýže, melasa, aj.) a sacharosa získaná hydrolyzou celulosy.

Dalšími zdroji jsou odpady z výroby biodieselu (glycerol, odpadní olej), odpadní průmyslové vody obsahující organické látky (papírny), methan atd. Z ekonomických, ale i ekologických důvodů byly jako nadějně již dříve (v letech 2001–2003) označeny použité rostlinné oleje a živočišné tuky, především z přípravy jídla (smažení, fritování)<sup>12–14</sup>. Jejich hlavní ekonomická výhoda tkví v nízké ceně jakožto odpadu, ekologický přínos tohoto zpracování je zejména v tom, že tyto oleje a tuky jinak představují obtížně řešitelný problém z hlediska jejich likvidace<sup>12</sup>. Zmíněný způsob se však vyplatí jen tehdy, když budou tyto odpady k dispozici ve velkém množství

Tabulka I  
Srovnání vybraných vlastností PHB, PHBV a polypropylenu (PP)

Mechanické vlastnosti	PHB	PHBV <sup>a</sup>	PP
Bod tání, °C	179	145	170
Pevnost v tahu, MPa	40	32	34,5
Youngův modul pružnosti, GPa	3,5	1,2	1,7
Tažnost, %	6	50	100–600
Hustota, kg dm <sup>-3</sup>	1,2	1,15	0,9

<sup>a</sup> Složení: 80 % PHB a 20 % PHV

a centralizované. Těmto požadavkům vyhovují především země jihovýchodní Asie (Čína, Thajsko, aj.).

Výroba PHA se, podobně jako jiné biotechnologie, skládá ze dvou základních částí: upstreamu, tedy kultivační části a downstreamu tj. izolace a purifikace produktu.

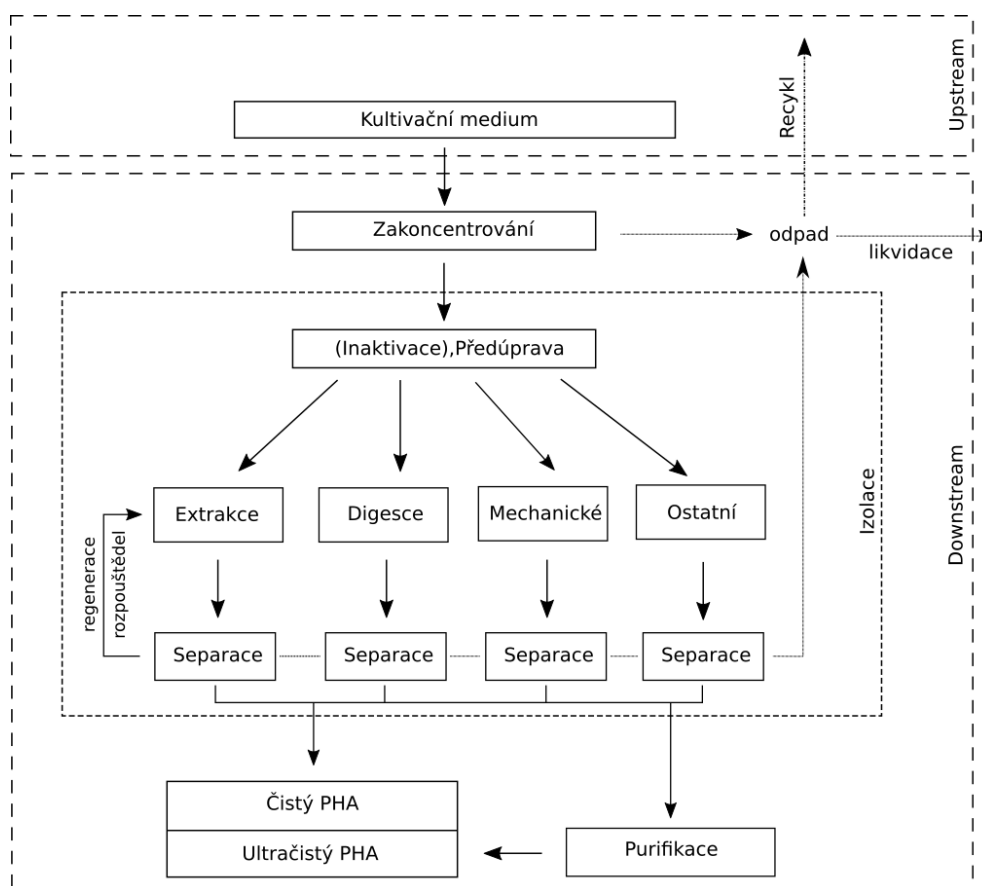
O první části se zmíníme jen velmi stručně. Důležitými faktory, které rozhodují o úspěšné výrobě, jsou použité kmeny bakterií (ačkoliv v úvahu jich připadají desítky, pro průmyslovou praxi se hodí jen několik např. *Cupriavidus necator* nebo *Alcaligenes latus*), poměr uhlíkaté suroviny ke zdroji dusíku, optimalizované množství stopových prvků, účinnost aerace, pH, strategie dávkování živiny a další. Žádoucí je pochopitelně dosáhnout co nejvyšší koncentrace buněk v kultivačním médiu a zároveň co nejvyššího podílu PHA na hmotnosti buněk – v ideálním případě lze dosáhnout více než 80 hm.%. Bohužel, tyto dva požadavky jdou do značné míry proti sobě. Upstream je možno provozovat vsádkově, semikontinuálně i kontinuálně, přičemž každý postup má své pro a proti.

Pro úplnost dodejme, že kromě uvedeného postupu, založeného na bakteriích, existují i jiné způsoby získávání PHA z obnovitelných zdrojů, jako např. s využitím geneticky modifikovaných plodin (sója, kukuřice, aj.)<sup>32</sup>.

#### 4. Downstream

Jak již bylo zmíněno, existují 3 skupiny PHA podle délky řetězce monomeru, a dále se vyskytují ve formě kopolymerů. Tento fakt značně komplikuje izolaci PHA extrakčními postupy, protože postup vhodný pro jeden typ je zcela nepoužitelný pro typ jiný. Tak např. poly-3-hydroxybutyrát (P3HB) lze izolovat z biomasy extrakcí chlorovanými rozpouštědly, pro mcl-PHA (např. poly-3-hexanoát a jeho kopolymery) jsou vhodné ketony s krátkým řetězcem, např. aceton<sup>8</sup>. Ten ale P3HB nerozpouští a nelze ho tímto rozpouštědlem extrahovat. U jiných metod tyto problémy sice odpadají, vyskytují se ale jiné, stejně závažné, viz další text.

Kultivační část technologie je obecně poměrně dobře prozkoumána, ačkoliv i zde je stále prostor pro vylepšování, hlavně pokud jde o kultivační strategie. Hlavní překážkou pro velkokapacitní komerční výrobu PHA tak je, kromě výše zmiňovaných otázek suroviny, technologie downstreamu. Jde zejména o minimalizaci energetické náročnosti, komplexní integraci částí downstreamu do celé technologie PHA, odpadové hospodářství, a to vše při vysokých požadavcích na výtěžek a čistotu (minimálně 99 %



Obr. 2. Obecné schéma variant downstream

pro výrobu obalových materiálů, pro medicínské využití jsou požadavky ještě vyšší) a na zachování vysoké molekulové hmotnosti výsledného polymeru. Tomuto procesu bylo v posledních cca 40 letech věnováno velké množství pozornosti a je popsán jak v časopisecké, tak zejména patentové literatuře, jak uvidíme dále.

Obecně lze downstream rozdělit do tří částí: 1) zakoncentrování biomasy z upstreamu, 2) izolace PHA a 3) přečištění získaného produktu, pokud je to nutné. Obecné schéma variantních řešení downstreamu je na obr. 2.

#### 4.1. Zakoncentrování kultivačního media

Před dalším zpracováním je potřeba fermentační kapalina zahustit. To se v praxi provádí hlavně odstřediváním, ale i filtrací nebo lyofilizací. Volba závisí na konkrétních vlastnostech media. Pokud se kultivační kapalina odstředuje nebo filtruje a má být delší dobu přechovávána za běžných podmínek (to je často nutné, protože upstream je většinou semikontinuální proces, kdežto downstream kontinuální a fermentační medium musí být skladováno v zásobnících), je ji třeba inaktivovat (denaturací depolymerasy, jinak může během stání docházet k degradaci PHA), což se realizuje třeba rychlým zahřátím na teploty kolem 85 °C (cit.<sup>15</sup>). Těmito postupy rovněž dojde k narušení buněčných membrán, což v dalších krocích usnadňuje izolaci.

Vedlejším produktem po zahuštění je supernatant (nebo filtrát), který obsahuje vodu, soli, metabolické produkty bakterií a zbytky nevyužitých živin. Pokud byly jako suroviny použity odpadní oleje nebo tuky, vzniklá organická fáze supernatantu se může separovat a vracet do procesu kultivace. Vodná fáze pak představuje odpad, který je možno likvidovat buď v biologické čistírně odpadních vod, nebo s výhodami v bioplynové stanici spolu s dalšími odpadními proudy z izolace.

#### 4.2. Izolace a purifikace

Další krok po zahuštění představuje samotná izolace PHA z buněk. Během let bylo vyvinuto velké množství postupů, které lze rozdělit do několika skupin – extrakce PHA, chemická digesce buněčných komponent, mechanická izolace a ostatní.

V dalším textu se budeme jednotlivými postupy zabírat podrobněji se zvláštním zřetelem k izolaci P3HB, jakožto nejrozšířenějšímu polyhydroxyalkanoátu.

##### 4.2.1. Extrakční postupy

Extrakce je nejstarším používaným postupem izolace PHA z mikrobiální biomasy. Je založena na rozpuštění PHA do vhodného rozpouštědla, přičemž zároveň dojde k desintegraci buněk jako takových. Produktem je potom většinou velmi viskózní suspenze zbytků buněčných stěn a organel (NPCM – non-PHA cell material, buněčné zbytky neobsahující PHA) v roztoku PHA. Velká viskozita následně poměrně silně komplikuje technologické provedení separace buněčných zbytků.

Prvními využívanými rozpouštědly byly pyridin, chloroform, případně další chlorované uhlovodíky (dichlorethan, trichlorethan, tetrachlorpropan atd.)<sup>16–18</sup>. K využití chlorovaných látek existuje rozsáhlá, především patentová, literatura. V pozdějších letech se začaly objevovat příspěvky popisující využití nechlorovaných rozpouštědel, a to především z ekologických a bezpečnostních důvodů. Příkladem takových rozpouštědel mohou být ethylenkarbonát a propylenkarbonát<sup>19,20</sup>. Jako rozpouštědla vhodná specificky pro P3HB a kopolymer poly(P3HB-co-P3HV) se uvádějí dioly, trioly, estery kyseliny malonové atd.<sup>21</sup>. Je možno použít i směs více rozpouštědel, případně i směs rozpouštědla a precipitantu (viz další text), který do určité koncentrace funguje jako kosolvent. Pro rozpouštění kopolymerů hydroxybutyrátu s monomery o vyšším počtu uhlíků (např. 3-hydroxyhexanoát) je možno využít nižší ketony, nižší alkoholy, ale třeba i toluen<sup>22</sup>. Např. vyšší alkoholy lze s výhodou využít, pokud je výroba PHA spjata s výrobou těchto alkoholů, což je typicky lihovar, kde vznikají jako vedlejší produkty alkoholové fermentace<sup>23</sup>. Tento způsob výroby PHA může být výhodně realizován v Brazílii, kde je ethanol vyráběn ve velkém z cukrové třtiny jako přísada do automobilového paliva E25 a navíc sacharidické odpady mohou sloužit jako surovina pro výrobu polymeru samotného.

Dalším krokem je separace NPCM od roztoku PHA. Jak již bylo uvedeno, tyto roztoky mají velmi vysokou viskozitu, což vede k tomu, že je většinou možné dosáhnout koncentrace PHA v roztoku maximálně 3–5 hm.%, při vyšších hodnotách již nejde o kapalný roztok, jako spíše o „gel“. Zjevnou slabinou extrakce je tedy nutnost použití velkého množství rozpouštědla (i více než desetinásobek vůči biomase, vztaženo na sušinu). Oddělení NPCM od roztoku je pak silně problematické, filtrace téměř nepřichází v úvahu, obvyklým způsobem je odstředivání za velmi vysokých hodnot G.

Získají se tak dvě fáze: čirý roztok PHA a vodná fáze se zbytky buněk. Po jejich rozdělení je třeba vodnou fázi dále zpracovat, protože kromě vody a zbytků buněk obsahuje i jisté množství extrakčního činidla. Nejběžnější metodou je vyvaření tohoto podílu ve vodě, rozpouštědlo z kondenzátu se regeneruje např. rektifikací nebo se vodná fáze přímo na koloně stripuje vodní parou. Rozpouštědla zbařená vodná suspenze zbytků buněk tvoří odpad, který, jak již bylo uvedeno, lze vést ke zpracování do bioplynové stanice.

Organickou fází obsahující polymer lze zpracovávat několika způsoby. Jedním z nich je přidání další složky, ve které je daný PHA nerozpustný tzv. precipitant. Např. vhodným precipitačním činidlem pro roztok P3HB v chloroformu je ethanol, aceton nebo voda.

Značnou nevýhodou těchto postupů je nutnost použití velkého množství srážecích činidel, běžně se uvádí 5–8 násobek vůči objemu rozpouštědla (kterého je, jak je uvedeno výše, i tak mnoho)! Rovněž je třeba vyřešit regeneraci jak rozpouštědla, tak precipitantu.

Dalším způsobem získání PHA je odpaření rozpouštědla z roztoku. To lze provést různě, např. nastříkáváním do

sprejové sušárny nebo pod hladinu vroucí vody v zásobníku. V prvním případě se získá už suchý produkt, a to kontinuálně, ve druhém je třeba polymer ještě vysušit a navíc se jedná o proces semikontinuální<sup>24</sup>. Jinou, opět kontinuální, variantou, která vznikla vývojem v ČR<sup>25</sup> je nastříkávání roztoku PHA do smyčky s cirkulující horkou vodou, kde dojde k odpaření rozpouštědla a vysrážený polymer je odebrán přepadem k sušení. Pokud je v této variantě rozpouštědlem PHA např. chloroform, parní fáze se po zkondenzování přímo rozdělí na dvě kapalně fáze, protože chloroform s vodou tvoří heterogenní azeotrop. Voda se z děličky vrací do smyčky a chloroform je možno rovnou recyklovat do extrakce. Další variantu separace představuje zchlazení roztoku a následně filtrace polymeru.

Na závěr této části je třeba uvést ještě dvě zásadní věci. Jednak v bakteriálních buňkách po kultivaci mohou zůstat neutilizované živiny (oleje, tuky...), jednak některé bakterie přirozeně vytvářejí další látky, např. endotoxiny<sup>26</sup>. Problémem extrakcí je, že tyto složky jsou často extrahovány spolu s PHA do roztoku a tak snižují čistotu i užitnou hodnotu produktu (pro biomedicínské aplikace PHA je přítomnost endotoxinů nežádoucí). Proto bývají mezi zahušťování kultivačního media a extrakcí PHA zařazovány ještě další extrakční kroky, jejichž účelem je nežádoucí složky odstranit. Pochopitelně je třeba volit činidla tak, aby znečišťující látky rozpouštěla a zároveň neextrahovala polymer. Například pro P3HB jsou takovými činidly nižší alkoholy nebo ketony. Účelné je ještě tomuto kroku předřadit „rozbití“ buněk, a tím usnadnit jak extrakci znečišťujících látek, tak i PHA. Tyto desintegrační postupy budou popsány dále. Nevýhodami předražené desintegrace jsou vyšší investiční náklady na celý proces a také to, že viskozita takto upraveného kultivačního media značně vzroste, což ještě více komplikuje zpracování.

Druhým problémem, který je třeba zmínit, je riziko degradace (depolymerace) PHA během celého procesu. Polymer je tepelně nestálý, proto by celková doba izolace, které je vystaven během zpracování, neměla být příliš dlouhá. Rovněž teplotu je třeba držet v rozumných mezích. Některé kmeny bakterií poskytují P3HB se střední molární hmotností (Mw) až 1,3 MDa, přičemž pro většinu aplikací je nežádoucí, aby výrazně klesla (pod 400 kDa), protože polymer ztrácí termoplastické vlastnosti. Extrakční postupy však, přes své nevýhody, o kterých byla řeč (velké objemy činidel, ekologická a bezpečnostní rizika spjatá s chlorovanými rozpouštědly, spotřeba energií) jsou schopny poskytovat velmi čistý produkt se střední molární hmotností rovnající se téměř původní hodnotě, což je jejich značná výhoda ve srovnání s digesčními metodami.

#### 4.2.2. Chemická digesce buněčných komponent

Pod tímto názvem se skrývají postupy, jež jsou principiálně opačné k metodám extrakčním. Zatímco u extrakcí je do kapalně fáze převáděn PHA, u digesce jde naopak o zachování polymeru v pevně fázi a rozpuštění ostatních částí buněk (NPCM) pomocí chemikálií. Specifickou podskupinu v této kategorii představuje použití enzymů.

Jednou z nejčastěji využívaných digesčních chemiká-

lií je chlornan sodný<sup>27</sup>, ale i draselný nebo vápenatý, kdy se využívá jejich silných oxidačních účinků. Jinými uváděnými činidly jsou chlorečnany, chlor, oxid chloričitý nebo peroxid vodíku. Další metodou je rozrušení a převedení NPCM do roztoku pomocí anionických surfaktantů, jako jsou dodecylsulfát sodný (SDS), sodné lineární alkylsulfáty, nebo neionogenních tenzidů typu TRITON100. Molekuly tenzidů se inkorporují do lipidové dvojvrstvy buněčné membrány; s rostoucí koncentrací tenzidů v obalových vrstvách roste její objem a po jejím nasycení vede další přídavek tenzidu k rozpadu buněčného obalu a vzniku micel tenzid/fosfolipid. Surfaktanty rovněž denaturují (anionické tenzidy) nebo rozpouštějí (neionogenní tenzidy) proteiny a usnadňují tak rozpad membrány<sup>28</sup>. Tímto způsobem lze získat PHA o vyšší střední molekulové hustotě než s pomocí chlornanu, ale s nižší čistotou. Proto byly testovány postupy kombinující obě látky, přičemž většinou je nejprve biomasa předupravena surfaktantem a následně zpracována chlornanem. Situace je každopádně komplikována depolymerací PHA, a to více než u extrakcí, protože pH je třeba při zpracování udržovat na poměrně vysoké hodnotě 10–12, stejně jako teplotu 80–120 °C. V každém případě nevýhodou obou digesčních způsobů je produkce velkého množství obtížně zpracovatelných odpadních vod a poměrně vysoké ceny vstupních chemikálií. Výhodou oproti extrakcím je to, že umožňují zpracovávat fermentační kapaliny ve velkých objemech a s vysokou koncentrací buněk.

Dalšími možnostmi, jak rozpustit NPCM, je použití koagulantů, chelatačních činidel, hydroxidů nebo minerálních kyselin (tzv. selektivní rozpouštění). Použití např. kyseliny sírové je zajímavé, protože podle příslušného patentu<sup>29</sup> umožňuje získat velmi čistý polymer s dobrými výtěžky, ovšem je nutno pečlivě optimalizovat pH, teplotu a dobu zpracování, protože jinak opět dochází k rozsáhlé depolymeraci PHA. Hydroxidy jsou zcela nevhodným činidlem, jelikož v jejich přítomnosti dochází k rychlé bazické hydrolyze polymeru.

Jistou kombinací extrakční a digesční metody představuje postup, využívající disperzi chlornanu sodného a chloroformu. Metoda je založena na tom, že chloroform velmi rychle rozpustí PHB, který je z buněk uvolněn pomocí chlornanu. Na minimum je tak zkrácena doba kontaktu volných granulí polymeru s chlornanem, protože dojde k rozdělení směsi na tři fáze, kdy horní obsahuje roztok chlornanu, prostřední především zbytky buněk a spodní, chloroformová, PHB. Díky tomu je výrazně potlačena depolymerace PHB.

Enzymatická hydrolyza buněk je další možností. Výhodou je vysoká selektivita, tj. enzymy vykazují vysokou hydrolytickou aktivitu vůči proteinům a dalším polymerním složkám buněk, avšak jen velmi malou nebo žádnou vůči polyhydroxyalkanoátům. Testovanými skupinami enzymů jsou proteasy, lipasy, lysosym a alkalasa. Další výhodou je kromě selektivity nízká spotřeba enzymů a ve srovnání s předešlými postupy poměrně mírné podmínky (pH, teplota). Nevýhodou je jednak vyšší cena a dále to, že sama o sobě není tato metoda schopna poskytnout produkt

Tabulka II  
Přehled izolačních metod PHA

Izolační metody	Výhody	Nevýhody	Chemikálie/metoda
Extrakční	vysoká čistota, nízký rozsah depolymerace, odstranění endotoxinů	velké množství chemikálií, vysoké energetické náklady, toxicita	chloroform, jiná chlorovaná rozpouštědla, alkoholy, ketony <sup>a</sup>
Digesční	vysoká čistota, procesně jednodušší, menší množství chemikálií	velký rozsah depolymerace <sup>b</sup> , množství odpadů	chlornan sodný, SDS, NaOH, minerální kyseliny, enzymy (alkaláza, lysozym)
Mechanické	malé množství chemikálií, zanedbatelný rozsah depolymerace	nízká čistota, nízká účinnost	homogenizace, mletí, mechanická izolace, chloroform <sup>c</sup>
Superkritické extrakce	nízká toxicita, levné, vysoká čistota	nízká účinnost	superkritický CO <sub>2</sub> , toluen, NaOH <sup>d</sup>

<sup>a</sup> V závislosti na typu PHA, <sup>b</sup> s výjimkou enzymů, <sup>c</sup> pro přečištění PHA, <sup>d</sup> kosolventy

o dostatečně vysoké čistotě. Proto může být kombinována s některými z chemických postupů, např. chlornanem, SDS nebo EDTA.

Výsledkem digesčních postupů je suspenze vodného roztoku činidel, rozpuštěných buněčných složek, enzymů a volných granulí PHA, které je třeba od roztoku oddělit. Možnosti jsou stejné jako u extrakcí, tj. hlavně odstředování, nicméně vzhledem k tomu, že v těchto případech nejsou roztoky zdaleka tak viskózní, lze použít i filtraci nebo dokonce samovolné usazování granulí PHA. Po izolaci je třeba PHA promýt, případně podrobit dalšímu zpracování, např. bělení pomocí chlornanů nebo peroxidu vodíku.

Stejně jako u extrakcí je možné kultivační medium nejdříve podrobit některému z desintegračních postupů a samotnou izolaci tak zefektivnit.

#### 4.2.3. Desintegrace a mechanická izolace

V této části budou popsány desintegrační metody, které mohou být použity k předúpravě zakoncentrované kultivační kapaliny před extrakcí nebo digescí. Dále bude řeč o několika málo postupech, které umožňují izolaci PHA z media bez použití chemikálií, čistě mechanicky.

Jednou z nejběžnějších metod předúpravy je vysokotlaká homogenizace, kdy je kultivační medium pod velmi vysokým tlakem nastříkáváno tryskou do prostoru s nižším tlakem, kde vlivem kavitačního efektu dochází k desintegraci buněk. Problémem je, že většinou nestačí jeden průchod homogenizátorem a je třeba postup opakovat. Další komplikací je, že dochází zároveň k uvolnění DNA z buněčných jader, což silně zvyšuje viskozitu kapaliny a ztěžuje následné operace, obzvláště u extrakčních metod, kde dochází k dalšímu zvýšení viskozity v důsled-

ku rozpuštění samotného PHA (viz výše). Mezi další postupy předúpravy patří mletí v kulových mlýnech, ultrasonikace a drcení v lisech<sup>30</sup>.

Na desintegraci buněk může navazovat izolace uvolněných granulí PHA s využitím několika metod bez použití chemikálií. Suspenzi granulí PHA v kapalině lze např. vést do deskového separátoru, kde dojde k rozdělení pevné fáze a kapaliny. Jeden průchod separátorem je většinou nedostačující, proto je oddělený koláč PHA často resuspendován do vody a znovu podroben separaci. Další možností je využití vzduchového vertikálního třídíče (air classifier), kdy je suchá směs granulí PHA a zbytků buněk separována v proudu vzduchu podle velikosti, tvaru a hustoty na frakce.

Při dobře optimalizovaném postupu lze dosáhnout slušných výtěžků, nicméně čistota získaného polymeru není příliš vysoká, proto bývají tyto postupy nakonec doplněny o purifikační část, založenou na extraktivních metodách. Jedná se tedy spíše o metody kombinované<sup>31,32</sup>.

#### 4.2.4. Ostatní metody

Mezi další postupy se řadí především superkritická extrakce oxidem uhličitým, která je levná a bezpečná, nicméně bylo zjištěno, že výtěžky silně závisí na procesních podmínkách extrakce a na délce kultivace biomasy. Určitých vylepšení může být dosaženo přidávkou modifikátorů, jako je např. toluen nebo hydroxid sodný. Jenom okrajově zmiňujeme další postupy jako je desintegrace buněk pomocí ozařování tvrdým gama zářením následované extrakcí, samovolné usazování granulí PHA po extrakci, využití vícefázových systémů kapalina-kapalina a náchylnost některých bakterií k samodeseintegraci<sup>24</sup>.

#### 4.2.5. Několik poznámek k izolaci a purifikaci

U všech zmíněných metod izolace a čištění PHA platí, že výtěžky a čistoty závisejí na několika faktorech, z nichž nejdůležitější je koncentrace PHA v samotných buňkách. Čím vyšší je koncentrace, tím vyššího výtěžku a čistoty lze dosáhnout za jinak stejných podmínek izolace. Dalším faktorem, projevujícím se především u extrakcí, je doba, po kterou je PHA ponechán v zásobnících. K již zmíněnému problému s degradací přistupuje další komplikace, a to krystalizace polymeru. PHA v buňkách vzniká v amorfní formě, která je dobře rozpustná, časem ale krystalizuje a rozpustnost výrazně klesá. U digesčních postupů je hlavním problémem především molekulová hmotnost produktu, která se řeší optimalizací podmínek tj. hlavně teploty, pH a času, to ovšem na druhou stranu většinou snižuje výtěžek i čistotu. Jak u digesčních, tak u mechanických separací je často nutné zařadit ještě purifikační krok, který bývá řešen extrakcí a izolací získaného PHA nebo bělením peroxidem vodíku. Přehled významných metod je uveden v tab. II.

## 5. Závěr

PHA mohou v budoucnu do jisté míry sloužit jako náhrada za běžné plasty založené na ropné bázi. Jejich využití v praxi je však prozatím limitováno několika faktory.

Prvním je celková cena, která je v porovnání s ropnými polymery stále vysoká. V tomto směru bude nutný další výzkum jak v oblasti fermentační (upstream) – využití nových nebo geneticky modifikovaných mikrobiálních kmenů a rostlin, zlepšení využití současných a nalezení nových surovin atd., tak v izolační části (downstream). Zde je prostor především v nalezení vhodných rozpouštědlových systémů (ideálně ne na bázi chlorovaných látek) u extrakčních metod, regenerace rozpouštědel, u digesčních metod optimalizace podmínek a ve všech případech je třeba se zabývat zpracováním odpadních proudů.

Druhým faktorem je samotné využití PHA. Jak již bylo řečeno, samotný P3HB má jen omezené možnosti z důvodu nepřilíš vhodných užitných vlastností. Proto nachází využití zatím hlavně v oblastech s nepřilíš vysokou přidanou hodnotou, jako jsou obalové materiály. Jistých vylepšení se dá dosáhnout jeho kopolymerací s poly-3-hydroxyvalerátem nebo přidavky aditiv a příměsí jiných polymerů. Na druhou stranu vykazuje slušnou biokompatibilitu s lidskou krví i tkáněmi, což ho činí zajímavým v oblasti biomedicínských aplikací – dočasné implantáty, materiál kapslí. V tomto směru se zdají být nadějně i další PHA<sup>33</sup>. Existují i studie, podle kterých by bylo možno PHA využít jako základ pro výrobu biopaliv, nicméně tato cesta se zdá být krajně neefektivní.

#### Seznam zkratk

EDTA kyselina ethylendiamintetraoctová  
lcl-PHA long-chain length PHA, PHA s dlouhým

řetězcem  
mcl-PHA medium-chain length PHA, PHA se středně dlouhým řetězcem  
NPCM non-PHA cell material, buněčné zbytky neobsahující PHA  
P3HB poly-3-hydroxybutyrát  
P3HBV poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát)  
P4HB poly-4-hydroxybutyrát  
PHA polyhydroxyalkanoáty  
PHB polyhydroxybutyrát  
scl-PHA short-chain length PHA, PHA s krátkým řetězcem  
SDS dodecylsulfát sodný

#### LITERATURA

1. <http://www.statista.com/statistics/282732/global-production-of-plastics-since-1950>, staženo 8.3.2016.
2. <http://www.slideshare.net/GaelleWorldwatch/plastics-1-44322645>, staženo 8.3.2016.
3. <http://www.ogj.com/articles/print/volume-111/issue-7/special-report-ethylene-report/global-ethylene-capacity-poised-for-major.html>, staženo 8.3.2016.
4. <https://www.ihs.com/products/ethylene-chemical-economics-handbook.html>, staženo 8.3.2016.
5. <https://www.ihs.com/products/propylene-chemical-economics-handbook.html>, staženo 8.3.2016.
6. <http://www.chemicals-technology.com/news/newsworldwide-demand-for-propylene-to-rise-to-130-million-tonnes-by-2023-says-ihs-4356137>, staženo 8.3.2016.
7. Macrae R. M., Wilkinson J. F.: *J. Gen. Microbiol.* 19, 210 (1958).
8. Flickinger M. C., Drew S. W. (ed.): *Encyclopedia of Bioprocess Technology– Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*, str. 2024. J. Wiley, New York 1999.
9. Ciesielski S., Mozejko J., Przybyłek G.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 5, 511 (2010).
10. Chanprateep S.: *J. Biosci. Bioeng.* 110, 621 (2010).
11. Bugnicourt E., Cinelli P., Lazzeri A., Alvarez V.: *Express. Polym. Lett.* 8, 791 (2014).
12. Taniguchi I., Kagotani K., Kimura Y.: *Green Chem.* 5, 545 (2003).
13. Chan P.-L., Yu V., Wai L., Yu H.-F.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 129, 933 (2006).
14. Vidal-Mas J., Resina-Pelfort O., Haba E., Comas J., Maresa A., Vives-Rego J.: *Antonie van Leeuwenhoek* 80, 57 (2001).
15. Mantelatto P. E., Duzzi A. M., Sato T., Duro N. A. S., Nonato R. V., Rocchiccioli C., Keserlingh S. M. (PHB Industrial S.A.): US 2007/0161096.
16. Baptist J. N. (W.R. Grace & Co.): US 3044942.
17. Coty V. F. (Mobil Oil Corp.): US 3275610.
18. Vanlautem N., Gilain J. (Solvay & Cie.): US 4310684.
19. Lafferty R. M., Heinzle E. (Agroferm AG): US 4101533.
20. Lafferty R. M., Heinzle E. (Agroferm AG): US

- 4140741.
21. Traussnig H., Kloimstein E., Kroath R. R. (Petrochemie Danubia GmbH): US 4968611.
  22. Narasimhan K., Isao N., Satkowski M. M., Cearley A. C., Gibson M. S., Welling S. J. (The Proctor & Gamble Company): PCT Int. Appl. WO 2006/031942.
  23. Mantelatto P. E., Duzzi A. M., Sato T., Durao N. A. S., Nonato R. V., Rocchiccioli C., Keserlingh S. M. (PHB Industrial S.A.): US2007/0161096.
  24. Blauhut W., Gierlinger W., Streppl F. (PCD Polymere GmbH): US5213976.
  25. Trejbal J., Zapletal M. (VČHT Praha, Nafigate Corp.): PCT Int. Appl. WO 2015185024.
  26. Jacquel N., Lo C.-W., Wei I.-H., Wu H.-S., Wang S. S.: *Biochem. Eng. J.* 39, 15 (2008).
  27. Alper R., Lundgren D. G., Marchessault, Cote W. A.: *Biopolymers* 1, 545 (1963).
  28. Ramsay J. A., Berger E., Ramsay B. A., Chavarie C.: *Biotechnol. Tech.* 4, 221 (1990).
  29. Yu J. (University of Hawaii): US 2008/0220505.
  30. Kunasundari B., Sudesh K.: *eXPRESS Polym. Lett.* 5, 622 (2011).
  31. Cooper B., Schneller A., Preishuber-Pflugl P. (BASF SE): US 2010/233768.
  32. Isao N. (The Proctor & Gamble Company): US 5849854.
  33. Gumel A. M., Annaur M. S. M., Chisti Y.: *J. Polym. Environ.* 21, 580 (2013).

**M. Zapletal and J. Trejbal** (*Department of Organic Technology, University of Chemistry and Technology, Prague*): **Isolation of Polyhydroxyalkanoates from Microbial Biomass**

This paper provides a brief review of current situation in the downstream processes of polyhydroxyalkanoates (PHA) representing a promising group of bio-based and biodegradable polymers that can replace petroleum based plastics and are produced by cultivation. Known isolation methods, such as extractions using chlorinated and non-chlorinated solvents, digestion approaches, cell disruption methods and SF extractions, are discussed together with economical and ecological aspects of the downstream process.