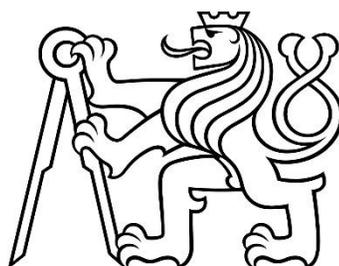


ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE  
FAKULTA STROJNÍ  
ÚSTAV MATERIÁLOVÉHO INŽENÝRSTVÍ



DIPLOMOVÁ PRÁCE

PŘÍPRAVA BIOPOLYMERU PRO 3D TISK  
PREPARATION OF BIOPOLYMER FOR 3D PRINTING

AUTOR: Bc. Radek Čech

STUDIJNÍ PROGRAM: Výrobní inženýrství

VEDOUCÍ PRÁCE: Ing. Zdeňka Jeníková, Ph. D.

**PRAHA 2023**

## I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: Čech Jméno: Radek Osobní číslo: 475009  
Fakulta/ústav: Fakulta strojní  
Zadávací katedra/ústav: Ústav materiálového inženýrství  
Studijní program: Výrobní inženýrství  
Specializace: Bez specializace

## II. ÚDAJE K DIPLOMOVÉ PRÁCI

Název diplomové práce:

**Příprava biopolymeru pro 3D tisk**

Název diplomové práce anglicky:

**Preparation of biopolymer for 3D printing**

Pokyny pro vypracování:

Cíl: Pokus o vytvoření biopolymeru v amatérských podmínkách, který bude použit pro vytvoření struny pro 3D tisk testovacích vzorků

1. Rešerše dostupných pramenů k přípravě biopolymeru
2. Vytvoření vzorků z biopolymeru a jejich charakterizace
3. Příprava struny, volba parametrů tisku
4. Tisk těles a testování zvolených vlastností
5. Diskuse a závěr

Seznam doporučené literatury:

- [1] ENDRES, Hans-Josef a Andrea SIEBERT-RATHS. Engineering biopolymers: markets, manufacturing, properties, and applications. Munich: Hanser, ©2011. xvi, 674 s. ISBN 978-1-56990-461-9.  
[2] CHUA, Chee Kai a Kah Fai LEONG. 3D printing and additive manufacturing: principles and applications. 5th edition of Rapid prototyping. New Jersey: World Scientific, [2017], ©2017. xxx, 426 stran. ISBN 978-981-3146-76-1.  
[3] BÍLKOVÁ, Anna. CHARAKTERIZACE Vlivu TEPELNÉHO ZPRACOVÁNÍ NA STRUKTURU POLYHYDROXYALKANOÁTU. Praha, 2020. Bakalářská práce. ČVUT v Praze. Vedoucí práce Jeníková Zdeňka.

Jméno a pracoviště vedoucí(ho) diplomové práce:

**Ing. Zdeňka Jeníková, Ph.D. ústav materiálového inženýrství FS**

Jméno a pracoviště druhé(ho) vedoucí(ho) nebo konzultanta(ky) diplomové práce:

Datum zadání diplomové práce: **23.03.2023** Termín odevzdání diplomové práce: **31.07.2023**

Platnost zadání diplomové práce: \_\_\_\_\_

Ing. Zdeňka Jeníková, Ph.D.  
podpis vedoucí(ho) práce

doc. Ing. Ladislav Cvrček, Ph.D.  
podpis vedoucí(ho) ústavu/katedry

doc. Ing. Miroslav Španiel, CSc.  
podpis děkana(ky)

## III. PŘEVZETÍ ZADÁNÍ

Diplomant bere na vědomí, že je povinen vypracovat diplomovou práci samostatně, bez cizí pomoci, s výjimkou poskytnutých konzultací. Seznam použité literatury, jiných pramenů a jmen konzultantů je třeba uvést v diplomové práci.

\_\_\_\_\_  
Datum převzetí zadání

\_\_\_\_\_  
Podpis studenta

## **Poděkování**

Tímto bych chtěl poděkovat vedoucí mé diplomové práce Ing. Zdeňce Jeníkové, Ph.D., za její nesmírnou ochotu, cenné rady při výzkumu a vlídnost, se kterou mi předávala veškeré informace potřebné pro vznik této studie.

Zároveň děkuji všem, kteří se na vzniku podíleli nebo mě při tvorbě podporovali.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně a použil jsem literárních pramenů a informací, které uvádím v seznamu použité literatury a zdrojů informací. Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 Zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon)

V Praze dne: .....

.....

podpis

## **Abstrakt**

Diplomová práce se zaměřuje na extrakci polyhydroxybutyrátu z vlastní vypěstované řasy. Dále se soustředí na výzkum směsí biopolymerů, spojený s výrobou filamentu. Vytvořený filament se použil pro 3D tisk vzorků, na kterých se zkoumaly mechanické vlastnosti, mísitelnost směsi a vnitřní struktura. Závěrem se práce věnuje také degradaci biopolymerů, která je v této oblasti často diskutovaným tématem.

## **Klíčová slova**

biopolymer, polyhydroxybutyrát, polyhydroxyalkanoát, kyselina polymléčná, spirulina platensis, 3D tisk

## **Abstract**

The diploma thesis focuses on the extraction of polyhydroxybutyrate from self-grown algae. Furthermore, it concentrates on the research of biopolymer mixtures, connected to the production of filament. The created filament was used for 3D printing of samples on which the mechanical properties, miscibility of the mixture and internal structure were investigated. In conclusion, the work also deals with the degradation of biopolymers, which is a frequently discussed topic in this area.

## **Keywords**

biopolymer, polyhydroxybutyrate, polylactic acid, 3D printing, polyhydroxyalkanoate, spirulina platensis

## Seznam použitých zkratk

A	Tažnost
DSC	Diferenciální skenovací kalorimetrie
E	Entalpie tání
$E_o$	Modul pružnosti v ohybu
PHA	Polyhydroxyalkanoáty
PHB	Polyhydroxybutyrát
PHBV	Kopolymer polyhydroxybutyrátu a polyhydroxyvalerátu
PHV	Polyhydroxyvalerát
PLA	Kyselina polymléčná
PLA <sub>fil</sub>	PLA z různorodého nasekaného filamentu pro 3D tisk
PLA <sub>trans</sub>	PLA Luminy LX175
$R_m$	Mez pevnosti v tahu
$T_g$	Teplota skelného přechodu
$T_k$	Teplota krystalizace
$T_m$	Teplota tání
$\rho$	Hustota materiálu

# Obsah

Úvod.....	10
1. Biopolymery.....	11
1.1 Typy biopolymerů.....	11
1.1.1 Biopolymery na bázi polyesterů .....	12
2. Polyhydroxyalkanoáty .....	12
2.1 Polyhydroxybutyrát .....	13
2.1.1 Vytváření PHB .....	13
2.1.2 Biologický rozklad PHB .....	14
2.1.3 Recyklace PHB .....	14
2.2 Polyhydroxyvalerát.....	15
3. PLA .....	16
3.1 Recyklace PLA.....	17
3.2 Biologický rozklad PLA.....	17
4. Směs PLA a PHB .....	18
4.1 Mechanické vlastnosti směsi .....	18
4.2 DSC zkouška směsi PLA-PHB .....	19
4.3 Morfologie směsi PLA a PHB .....	20
4.3.1 Struktura dle vzájemné koncentrace biopolymerů .....	20
4.3.2 Struktura dle použité technologie zpracování .....	22
4.4 Bariérové vlastnosti směsi PLA-PHB.....	23
4.5 Více násobná extruze směsi PLA-PHB.....	25
5. <i>Arthrospira platensis</i> .....	26
5.1 Průmyslové využití spiruliny .....	26
5.2 Získávání biopolymeru PHB z řasy <i>Arthrospira platensis</i> .....	26
5.2.1 Získání PHB z řasy pomocí rozpouštědla .....	27
5.2.2 Použití chlornanu sodného .....	27
Praktická část .....	28

Návrh a provedení experimentu .....	28
6. Použité přístroje a pomůcky.....	29
6.1 Pěstování spiruliny .....	29
6.2 Extrakce PHB .....	32
7. Zařízení potřebná pro stanovení vlastností vzorků .....	33
7.1 Stanovení pevnosti v tahu .....	33
7.2 Diferenciální skenovací kalorimetrie .....	34
7.3 Struktura vzorků .....	34
8. Pěstování spiruliny .....	35
8.1 Použité látky.....	35
8.2 Zajištění nákupu živé kultury řasy .....	36
8.3 Pěstební médium.....	37
8.4 Krmné médium .....	38
8.5 Zahájení pěstování .....	38
8.6 Druhá kultura řasy .....	40
8.7 Sklizeň řasy.....	41
9. Extrakce PHB ze spiruliny .....	43
10. Struktura vytvořených vzorků .....	45
10.1 Nezpracovaná spirulina .....	45
10.2 Extrahované PHB .....	46
10.3 Závěr extrakce PHB ze spiruliny .....	47
11. Spečení vzorků PLA, PHA a jejich směsi .....	48
11.1 Spečení PHA .....	48
11.1.1 Vliv způsobu ochlazování na PHA vzorky .....	49
11.2 Spečení PLA .....	51
11.3 Spečení směsi PLA-PHA.....	52
12. Extruze filamentu PLA, PHA a jejich směsi .....	53
12.1 Extruze PLA filamentu .....	54



12.2	Extruze PHA filamentu.....	56
12.3	Extruze filamentu směsi PLA-PHA.....	57
13.	Tisk vzorků na 3D tiskárně.....	57
13.1	Druhy 3D tisku polymerů.....	57
13.2	Tisk vzorků.....	58
13.3	Směs 95-5 – PLA-PHA.....	59
13.4	Směs 90-10 – PLA-PHA.....	59
13.5	Směs 85-15 – PLA-PHA.....	59
13.6	Směs 80-20 – PLA-PHA.....	59
13.7	Směs 75-25 – PLA-PHA.....	60
14.	Vyhodnocení vlastností vytisknutých vzorků.....	60
14.1	Struktura směsi.....	60
14.2	Stanovení pevnosti v tahu.....	61
14.3	Stanovení tažnosti.....	62
14.4	Zkouška DSC.....	63
15.	Degradace PHA.....	65
16.	Diskuze.....	67
17.	Závěr.....	69
18.	Bibliografie.....	70
19.	Seznam příloh.....	73

# Úvod

Biopolymery jsou v dnešní době velmi projednávaným tématem. Celosvětově je snaha o nahrazení co nejvíce syntetických polymerů právě obnovitelnými materiály. Nejzásadnější výhodou u těchto materiálů je jejich biodegradabilita, což v praxi znamená, že se polymer za určitých podmínek rozloží aniž by poškodil životní prostředí. Obecně je však výroba biopolymerů velice nákladná a jejich vlastnosti se odvíjí od použité suroviny, u které může její rostlinný nebo živočišný původ ovlivnit výsledné vlastnosti materiálu. Dalším aspektem je jejich recyklace, která je nákladnější než u běžných plastů a při vícenásobném zpracování biopolymerů dochází k jejich degradaci, způsobující snížení pevnosti a houževnatosti. Proto také vzniká velké množství výzkumů, které se snaží dosáhnout co nejlepších fyzikálních a mechanických vlastností, s ohledem na co nejnižší degradaci materiálu během výroby.

Teoretická část této studie se zaměřuje na rešerši biopolymerů PHB, PLA a jejich vzájemné směsi. U každého z polymerů se definují jejich základní mechanické a fyzikální vlastnosti. Dále se práce zaměřuje na jejich praktické použití a především se soustředí na biologický rozklad a recyklaci po dosažení jejich mezního stavu. Poslední zkoumanou vlastností je vzájemná mísitelnost směsi obsahující PHB a PLA. S mísitelností souvisí také morfologie závislá na rozdílných poměrech biopolymerů ve směsi a vliv technologie zpracování na strukturu.

V neposlední řadě se teoretická část soustředí na popis řasy *spirulina platensis* a její využití v praxi. Důvodem volby této řasy jsou její buňky, které obsahují biopolymer PHB. Metod získání PHB z této řasy je více, avšak nejčastější způsoby jsou v teoretické části uvedeny.

Praktická část studie se nejprve zaměří na samotné pěstování řasy. Dále se bude práce zabývat problematikou extrakce PHB v domácích podmínkách, kde se jako nejvhodnější metoda zvolila extrakce rozpouštědlem na bázi chloru, které rozruší buňky řasy. Pro oddělení biopolymeru od zbytků řasy se provede odstředění pomocí laboratorní centrifugy. Předpokládá se však malé množství takto vytvořeného biopolymeru a proto se dále výzkum bude soustředit na komerčně dostupné biomateriály PHA, PLA a jejich směs. U těchto materiálů se provede DSC zkouška, určí se mechanické vlastnosti a pokusí se z nich vytvořit filament, který by měl být použitelný pro 3D tisk. Takto vytisknuté vzorky se následně znovu podrobí zkoušce pevnosti v tahu a termické analýze. V samém závěru se studie zaměří na degradaci polymeru PHA vlivem vícenásobného zpracování, které bude probíhat během celého experimentu.

# 1. Biopolymery

Biopolymery jsou polymerní materiály vyráběny z přírodních zdrojů, jako jsou například rostliny nebo mikroorganismy. Základním prvkem je monomer, který získáváme buď chemickou syntézou z biologických materiálů, nebo biosyntézou živými organismy. Následným spojením monomerů pomocí kovalentních vazeb dosáhneme vzniku makromolekuly zvané polymer. [1; 2]

Zásadním rozdílem od syntetických plastů je tedy jejich biologický původ, díky kterému jsou biopolymery rozložitelným a obnovitelným zdrojem. Zároveň jsou netoxické a jejich biokompatibilita se může využít v různých odvětvích od potravinářského průmyslu přes výrobu, balení až po biomedicínské inženýrství. [1; 2]

## 1.1 Typy biopolymerů

Existuje mnoho typů biopolymerů, z nichž každý má své specifické vlastnosti a funkce. Níže jsou uvedeny některé z nejčastějších typů biopolymerů a jejich praktické příklady:

- **Proteiny (bílkoviny)** jsou tvořeny řetězcem aminokyselin, spojených peptidovými vazbami. Tento biopolymer má důležitou funkci v těle živočichů, například přenos kyslíku, enzymatickou katalýzu nebo strukturální podporu. Příkladem proteinů jsou hemoglobin, kolagen, keratin nebo enzymy. [3]
- **Sacharidy (polysacharidy)** jejichž řetězec je tvořený monosacharidy, spojených glykosidickou vazbou. Tyto biopolymery jsou důležité pro zásobu energie v organismech. Příkladem je škrob, glykogen nebo celulóza. [3]
- **Nukleové kyseliny** tvoří řetězec nukleotidů, spojených fosfodiesterovou vazbou. Tyto biopolymery jsou důležité pro uchování a přenos genetické informace, příkladem jsou DNA (deoxyribonukleová kyselina) a RNA (ribonukleová kyselina). [3]
- **Lipidy** mají základní prvek řetězec mastných kyselin, spojených esterovou vazbou a alkoholem. Tyto biopolymery, jsou stejně jako proteiny, důležité pro strukturální podporu v membránách buněk. Zároveň ale také mohou sloužit jako zdroj energie. Možným příkladem lipidů jsou tuky, vosky nebo fosfolipidy. [3]
- **Glykoproteiny** jsou tvořeny proteinovou a sacharidovou částí. Tyto biopolymery jsou důležité pro imunitu a vzájemnou adhezi buněk v těle živočichů. Příkladem glykoproteinů jsou imunoglobuliny, fibrinogen nebo mukus. [3]

## 1.1.1 Biopolymery na bázi polyesterů

U polyesterových biopolymerových materiálů jsou řetězce tvořeny z monomerů, které spojuje esterová vazba. Nejpoužívanější zástupci těchto biopolymerů jsou uvedeny níže: [1]

- **Polyhydroxyalkanoáty (PHA)**, u kterých jsou monomery produkovány některými bakteriemi jako zdroj pro ukládání energie a uhlíku. Tyto materiály mohou být použity v mnoha průmyslových aplikacích, jako jsou obaly potravin, zemědělství, lékařské nástroje a další. [3]
- **Polyglykolová kyselina (PGA)** je vyráběna synteticky z glykolové kyseliny. PGA se používá především k výrobě obalů nebo chirurgických stehů. [2]
- **Kyselina polymléčná (PLA)** je vyráběna synteticky z kyseliny mléčné. Používá se v mnoha průmyslových odvětvích příkladem mohou být stavební průmysl, textilní průmysl, zdravotnické potřeby. Zároveň se jedná o nejpoužívanější materiál využívaný pro 3D tisk. [4]
- **Polykaprolakton (PCL)** produkován z kaprolaktonu se používá především v medicíně pro výrobu implantátů, zubních vložek a podobně. [2]

Všechny tyto polyesterové biopolymerové materiály mají výhodu, že jsou biodegradabilní, obnovitelné a šetrné k životnímu prostředí. [1]

## 2. Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou biologicky rozložitelné. Mohou být tedy odbourávány v přírodě mikroorganismy, pokud se dostanou do kontaktu s půdou, vodou nebo jinými živými organismy. Na rozdíl od syntetických plastů, které mohou zůstat v životním prostředí po staletí, PHA mohou být kompletně rozloženy během několika týdnů až měsíců, což minimalizuje dopad na životní prostředí. [5]

PHA také nabízí řadu možností v oblasti biomedicíny, jako jsou například implantáty a stehy. Díky biokompatibilitě jsou PHA velmi zajímavým materiálem pro vývoj nových biomedicínských produktů. [6]

Typy PHA se liší počtem a typem uhlíkových atomů v jejich řetězcích, což ovlivňuje jejich vlastnosti. Mezi nejčastěji používané PHA patří polyhydroxybutyrát (PHB), který se vyznačuje vysokou pevností a tuhostí, a polyhydroxyvalerát (PHV), který má nižší pevnost ale větší elasticitu. PHA lze také modifikovat nebo kombinovat s jinými polymery, aby se dosáhlo specifických vlastností pro konkrétní aplikace. [2]

## 2.1 Polyhydroxybutyrát

Jak je již výše zmíněno PHB se řadí do podskupiny PHA, jedná se o biodegradabilní polymer, který vytvářejí některé druhy bakterií, konkrétně se jedná o bakterie rodu *Ralstonia eutropha*, *Cupriavidus necator* a *Azotobacter vinelandii*. Bakterie si PHB samy syntetizují a využívají ho jako způsob ukládání energie a uchování živin v nepříznivých podmínkách. Pro průmyslovou výrobu PHB jsou nejčastěji používány geneticky upravené kmeny těchto bakterií, které jsou schopné produkovat PHB ve množstvím a s lepšími vlastnostmi. Množství produkce PHB závisí na podmínkách prostředí, ve kterém se bakterie vyskytují, ať už se jedná o živné médium, teplotu nebo okolní vlhkost. [7]

PHB je tvořen monomery 3-hydroxybutyrátových (3HB) jednotek, které jsou propojené esterovou vazbou. Jeho chemický vzorec je  $(C_4H_6O_2)_n$ , kde  $n$  představuje počet 3HB jednotek v polymerovém řetězci. [2]

Vlastnosti PHB se v mnoha ohledech podobají vlastnostem tradičních plastů, jako je například polypropylen. Srovnání běžných materiálových charakteristik, těchto dvou polymerů, zaznamenává Tab. 1. Hodnoty jsou uváděny v rozptylu, neboť záleží na dodavateli a také na chemickém řetězci materiálu, například zda se jedná o izotaktický, syndiotaktický nebo ataktický polymer. Nebo v případě PHB může hrát významnou roli jakým druhem bakterií a za jakých podmínek byl monomer syntetizován. [1]

Tab. 1 Materiálové charakteristiky PHB a PP (data převzata z [3; 8])

Materiál	$R_m$ [MPa]	$\rho$ [g /cm <sup>3</sup> ]	$T_m$ [°C]	$E_o$ [MPa]
PHB	20 - 40	1,18 - 1,26	150 - 170	1 500 - 2 000
Polypropylen PP	34 - 38	0,9 - 0,92	160 - 175	1 100 - 1500

### 2.1.1 Vytváření PHB

Polyhydroxybutyrát se získává kultivací bakterií probíhající ve fermentační nádobě s vhodným živným roztokem, obsahujícím monosacharidy, jako je glukóza nebo sacharóza, které slouží jako zdroj energie. Bakterie cukry konzumují a ukládají je ve formě granulí uvnitř buněk. Dusičnany ve formě aminokyselin a amonných solí poskytují dusík pro biosyntézu proteinů a dalších dusíkatých sloučenin v buňkách bakterií. Další důležité živiny pro růst a metabolické procesy bakterií jsou fosfor, síra, hořčík, draslík, vápník a další stopové prvky. Zároveň každá bakterie reaguje různorodě na okolní látky, které přidáváme

do živného roztoku. Například pokud bakterii *Cupriavidus necator* vystavíme na počátku její stacionární fáze ethanolu nebo peroxidu vodíku, zvýší se produkce PHB až o 30 %. [7]

Zásadním elementem jsou také okolní podmínky pro růst, jako je teplota, pH média, tlak a kyslík. Změna těchto podmínek může ovlivnit produkci PHB a může vést k tvorbě různých forem PHB s odlišnými finálními vlastnostmi. [7]

Po dosažení požadované koncentrace PHB jsou bakterie odděleny od kultivace a polymer PHB je z nich získán extrakcí způsobenou rozkladem buněk. Tohoto rozkladu může být docíleno rozrušením buněk pomocí organických rozpouštědel. [3; 9]

Získané granule PHB se dále čistí, suší a přeměňují na finální výrobky. V závislosti na požadovaných vlastnostech může být PHB modifikován různými způsoby, například přidáním dalších monomerů pro zlepšení pevnosti, tuhosti nebo teplotní stability. [3]

## 2.1.2 Biologický rozklad PHB

Biologický rozklad polymeru probíhá v zásadě dle tří možných variant:

- **Enzymatická hydrolýza:** U této se využívají k rozkladu jednoduché proteiny konkrétně enzymy hydrolasy, které rozštěpí řetězce PHB na jednotlivé monomery (butyrátové kyseliny). Tyto monomery mohou být následně využity pro syntézu nových biologických molekul. [2; 5]
- **Mikrobiální rozklad:** Jedná se o obdobnou metodu jako je enzymatická hydrolýza, avšak enzymy, které nám rozštěpí polymerové řetězce, jsou produkovány mikroorganismy, jako jsou bakterie, houby a řasy. [2; 5]
- **Oxidace:** Polymer PHB může být také rozložen pomocí vysoké vlhkosti 80 - 90 %, vyšší teploty, řádově 50 °C - 70 °C a přístupu kyslíku. Pokud jsou splněny všechny tyto podmínky, dochází k rozpadu PHB na oxid uhličitý a vodu. [2; 5]

Výsledkem biologického rozkladu PHB je snížení objemu odpadu, protože PHB se přemění na organickou hmotu a CO<sub>2</sub>, které jsou snadno zpracovatelné v rámci přírodního cyklu. Tento proces je ekologický a udržitelný, neboť nevyžaduje použití chemických látek a nevzniká při něm škodlivý odpad. [2; 5]

## 2.1.3 Recyklace PHB

Druhou možností zpracování výrobků z PHB, na konci jejich životního cyklu, je recyklace, která probíhá zpravidla následujícím způsobem. [1; 10]

Nejdříve dochází ke shromáždění odpadního materiálu. Následuje rozdrčení a poté čištění, kde se nadrcené části proplachují vodou, k odstranění nečistot. Proces pokračuje aplikací rozpouštědla, nejčastěji se jedná o kyselinu octovou nebo ethanol. V tomto kroku dochází k chemickému oddělení PHB od zbylých látek, kdy se následně pomocí filtrace získá

samotné PHB. Tento proces se několikrát opakuje k zajištění co nejčistšího biopolymeru PHB. Po dosažení požadované čistoty se materiál může použít k výrobě nových výrobků, obvykle ale za současného přidání nového nedegradovaného PHB. [1; 10]

Recyklace polymeru PHB je relativně nově zaváděný proces, ale získává na popularitě kvůli svému minimálnímu dopadu na životní prostředí. [1; 10]

## 2.2 Polyhydroxyvalerát

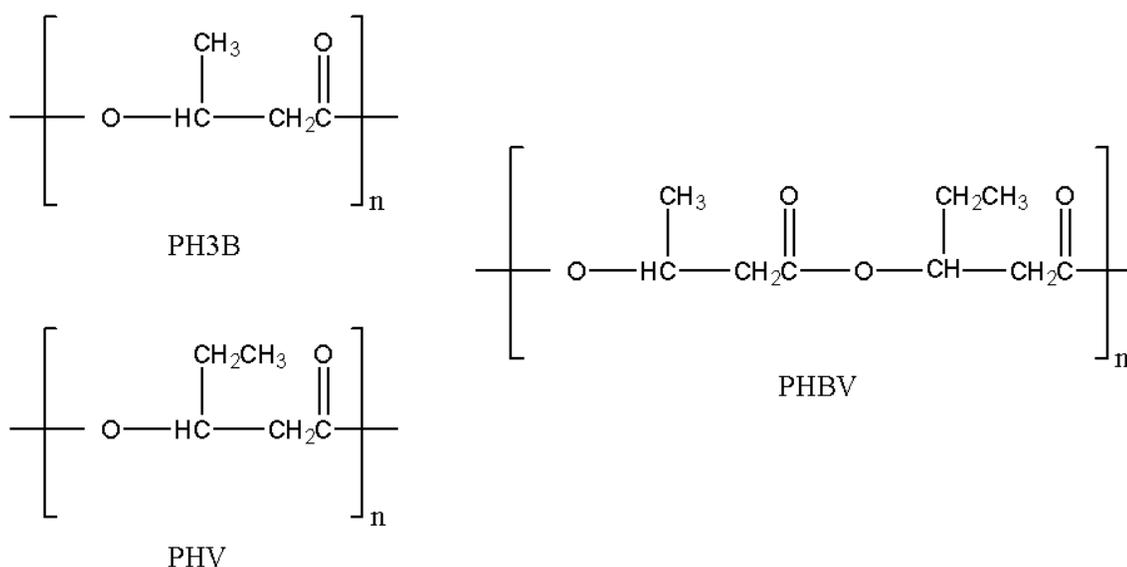
Druhý nejpoužívanější biopolymer, který se řadí do podskupiny PHA je polyhydroxyvalerát (PHV). Strukturní vzorec PHV obsahuje molekuly 3 -hydroxyvalerátu, což je organická kyselina se třemi hydroxylovými skupinami. [1]

PHV je také získáván z mikroorganismů, jako jsou například bakterie *Ralstonia eutropha* nebo *Alcaligenes eutrophus*. Tyto bakterie produkují polymer PHV, pokud jsou vystaveny stresovým podmínkám, stejně jako v případě PHB. [3]

PHV má mnoho vlastností, které ho činí atraktivním bioplastem. Kromě biologické odbouratelnosti, je také biokompatibilní a nevyvolává v těle imunitní reakce. PHV má vynikající vlastnosti jako materiál pro výrobu obalů, tašek, kelímků a podobně. Oproti PHB má PHV větší elasticitu a je houževnatější, proto se často využívá v kombinaci s PHB, kdy se výsledný polymer zbaví křehkosti typické pro PHB, ale zachová si jeho pevnost. Strukturní vzorce samotných biopolymerů a výsledný vzorec jejich směsi, jsou zobrazeny na Obr. 1. Porovnání základních vlastností PHB se směsí PHB-PHV o různé koncentraci je shrnuto v Tab. 2 uvedené níže. [3]

Tab. 2 Porovnání vlastností čistého PHB a PHB s příměsí PHV o různých koncentracích (data převzata z [1])

Materiál	T <sub>g</sub> [°C]	T <sub>m</sub> [°C]	E <sub>o</sub> [GPa]	R <sub>m</sub> [MPa]	A [%]
PHB	9	175	3,8	45	4
PHBV (11 % HV)	2	157	3,7	38	5
PHBV (20 % HV)	-5	114	1,9	26	27
PHBV (34 % HV)	-9	97	1,2	18	900



Obr. 1 Porovnání strukturních vzorců PHB, PHV a PHBV (převzato z [26])

### 3. PLA

PLA je také biodegradabilní polymer, výroba je však založena na jiných obnovitelných zdrojích než v případě PHA. Monomerem je v tomto případě kyselina mléčná (laktid), který se získává fermentací sacharidů ze surovin jako je kukuřičný škrob, cukrová třtina nebo bramborový škrob. Poté se monomery polymerizují na delší řetězce pomocí tepelného zpracování, což vytváří polymer PLA. Výsledný materiál má nízkou emisi CO<sub>2</sub> během výroby a degradace. [4]

Polymer PLA má výborné mechanické vlastnosti, jako je vysoká pevnost, tuhost a tvrdost, což z něj dělá ideální materiál pro 3D tiskové aplikace. Zároveň materiál neobsahuje toxické látky, proto bývá často využíván v potravinářském průmyslu. [6]

Jedním z největších problémů biopolymeru PLA je jeho nízká tepelná odolnost. Materiál při teplotě 45 - 50 °C značně ztrácí svoji pevnost a při dlouhodobém vystavení těmto teplotám dochází ke zkřehnutí, což omezuje jeho použití v aplikacích s vysokými nároky na pevnost a trvanlivost. [4]

V závislosti na výrobci a použitém postupu výroby může mít polymer PLA různé vlastnosti. Například vizuální jako je barva a transparentnost materiálu, nebo mechanické vlastnosti, kde je snaha zvýšit houževnatost, která je v případě PLA velmi nízká. Zároveň může být PLA využit jako matrice pro kompozitní materiál, kde výztuž zvyšuje celkovou pevnost. Představitelem pro zlepšení fyzikálních a chemických vlastností je rychle tuhnutí PLA. [4; 11]



## 3.1 Recyklace PLA

Recyklace polymeru PLA vyžaduje složitější procesy než u tradičních plastů, jako je například PET. PLA lze recyklovat pomocí různých metod, zahrnujících mechanické a chemické zpracování. [4; 12]

Mechanické zpracování zahrnuje rozemletí materiálu na malé kousky a následné znovupoužití jako vstupní materiál pro novou výrobu PLA. Tento proces však může snížit mechanické vlastnosti materiálu a také vyžaduje, aby se recyklovaný výrobek skládal pouze z čistého PLA. [13]

Chemická recyklace zahrnuje rozklad PLA na základní složky, pomocí chemických procesů. Tyto procesy ale nejsou v současné době příliš rozvinuté a jsou obvykle nákladné. [5]

Poslední možností recyklace PLA je biologický rozklad popsany podrobněji dále v podkapitole 3.2. Tento způsob je ze všech nejpoužívanější, díky jeho nízkým nákladům a šetrnosti vůči životnímu prostředí. Nicméně výzkum a vývoj nových metod recyklace PLA stále pokračuje s cílem vytvořit více udržitelný a ekologický způsob jeho zpracování. [4; 14]

## 3.2 Biologický rozklad PLA

PLA podléhá mikrobiálnímu rozkladu za přítomnosti kyslíku a vody. Během rozkladu mikroorganismy spotřebovávají polymer a přeměňují ho na oxid uhličitý, vodu a biomasu. Prostor musí splňovat níže uvedené podmínky: [4; 14]

- **Vysoká vlhkost:** mikroorganismy potřebují vodu pro růst a aktivitu, takže biologický rozklad PLA je obvykle účinnější v prostředí s vysokou vlhkostí okolo 90 %.
- **Teplota:** vysoká teplota zvyšuje rychlost biologického rozkladu PLA tím, že podporuje aktivitu mikroorganismů. V ideálním případě by teplota prostředí měla být kolem 60 °C. U vyšší teploty hrozí zahubení mikroorganismů.
- **Přítomnost kyslíku:** mikroorganismy potřebují přístup kyslíku, aby mohly kyselinu mléčnou metabolizovat a rozložit.

Délka biologického rozkladu PLA závisí na konkrétních podmínkách prostředí. Zároveň ne všechny produkty z PLA jsou biologicky odbouratelné v praxi, výrobky mohou obsahovat různé přísady, které proces rozkladu mohou brzdit nebo zcela zastavit. [4; 14]

## 4. Směs PLA a PHB

Z důvodu očekávaného malého množství extrahovaného polymeru PHB se práce musí zaměřit na možném smíchání s jiným biopolymerem. Jako nejvhodnější a nejdostupnější polymer, který se běžně využívá pro 3D tisk je výše zmíněné PLA.

Výsledný materiál by mohl mít různé vlastnosti v závislosti na poměru těchto dvou biopolymerů. Při vysokém obsahu PHB by se mohla zlepšit biodegradabilita, ale mohla by se snížit pevnost a snížit teplota skelného přechodu. Naopak při vysokém obsahu PLA by se mohla pevnost zvýšit, ale mohlo by dojít ke zhoršení biodegradability. [15]

V praxi se směsi polymerů PLA a PHB často používají jako biologicky odbouratelné náhrady za tradiční plasty. Například mohou být použity pro výrobu biologicky odbouratelných filmů pro zemědělské a potravinářské účely. Broniarz a kol. navrhli, že směs vytvořená ze 70 hm. % PLA a 30 hm. % PHB by mohla být využita jako účinný materiál pro gelový polymerní elektrolyt, používaný v aplikacích Li-Ion baterií. Membrána zhotovená z tohoto materiálu vykazovala vysokou poréznost, vodivost a vysoké elektrochemické vlastnosti. [12]

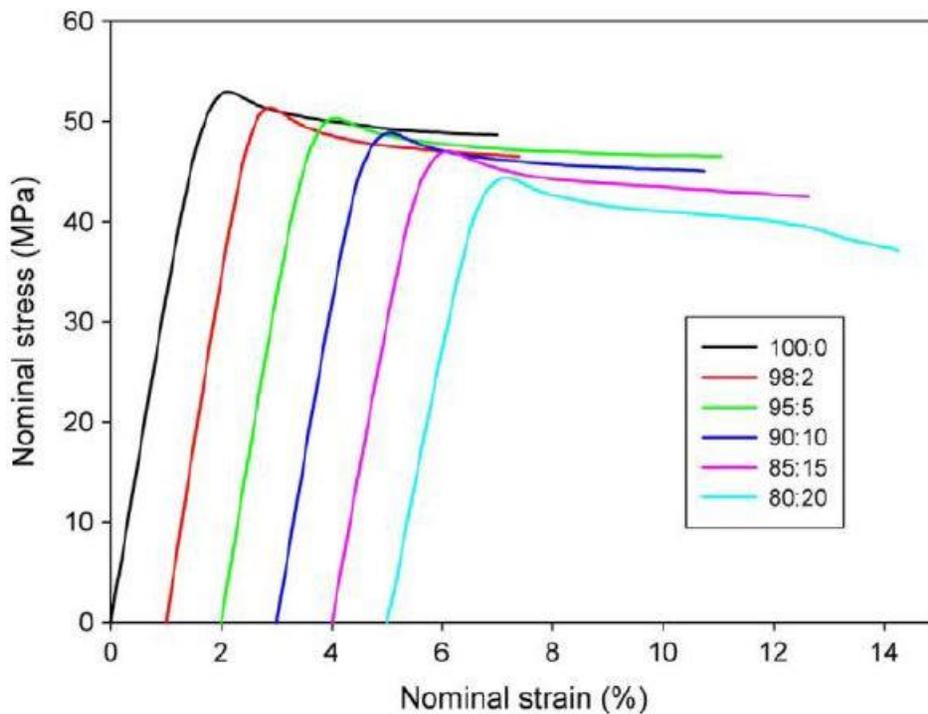
Odborné výzkumy zaměřující se na tuto problematiku, označují směs těchto dvou biopolymerů za částečně mísitelnou. Zdůvodněním je že PHB má semikrystalickou strukturu a PLA primárně amorfni. [12; 15]

### 4.1 Mechanické vlastnosti směsi

Pokles pevnosti, který je úměrný zvyšujícímu se procentu PHB ve směsi PLA-PHB, je uvedený v Tab. 3. Ta obsahuje jednotlivé koncentrace směsi, ke kterým je zaznamenána pevnost, modul pružnosti a prodloužení. Grafické znázornění pevnosti v tahu závislé na koncentraci směsi je zobrazeno na Obr. 2. Pro lepší přehlednost grafu, je každá koncentrace posunuta o 1 % prodloužení doprava ve směru osy x. [15]

Tab. 3 Závislost koncentrace směsi PLA/PHB na pevnostních charakteristikách (Data převzata z [15])

Koncentrace PLA-PHB [hm. %]	$E_0$ [GPa]	$R_m$ [MPa]	A [%]
100/0	3,49	51,7	6,6
98/2	3,48	51,4	4,7
95/5	3,31	50,5	12,5
90/10	3,21	49,2	7,7
85/15	3,11	47,5	7,8
80/20	2,91	43,9	11,8



Obr. 2 Grafická závislost mechanických vlastností na jednotlivých koncentracích, Překlad: Nominal strain - jmenovité prodloužení; Nominal stress - jmenovité napětí (Převzato z [15])

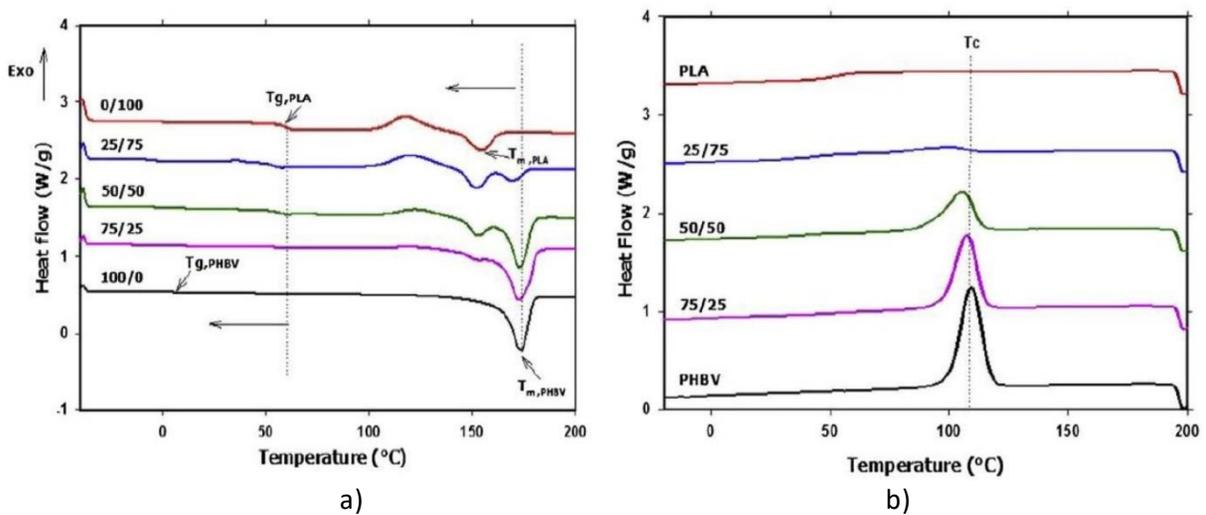
## 4.2 DSC zkouška směsi PLA-PHB

Diferenční snímací kalorimetrie neboli DSC je metoda měření, která slouží pro termickou analýzu materiálů, v tomto případě polymerů. Hlavní charakteristiky z této zkoušky jsou teplota tání a teplota krystalizace. [16]

Pomocí této metody se dá také určit mísitelnost a možné interakce mezi jednotlivými složkami ve směsi. V Tab. 4 jsou uvedeny teploty skelného přechodu -  $T_g$ , teploty tání -  $T_m$  a teploty krystalizace -  $T_k$ , vždy pro obě složky směsi PLA-PHB. Z grafického znázornění DSC křivek pro ohřev, na Obr. 3 a) je patrné, že směs je nemísitelná. Nejlepším příkladem je směs o koncentraci 50/50. Na této křivce se vyskytují dva vrcholy, které značí dvě odlišné teploty tání, jedna pro PHB a druhá pro PLA. [16]

Tab. 4 Teploty skelného přechodu, tání a krystalizace zjištěné z DSC zkoušky (Data převzata z [16])

Koncentrace PLA-PHB [hm. %]	$T_{g, PLA}$ [°C]	$T_{g, PHB}$ [°C]	$T_{m, PLA}$ [°C]	$T_{m, PHB}$ [°C]	$T_k$ [°C]
PLA 100-PHB 0	59,8	-	154	-	-
PLA 75-PHB 25	58,4	4,5	152,6	170,1	101,3
PLA 50-PHB 50	57,9	3,3	153,2	172,8	105,6
PLA 25-PHB 75	57,1	3	151	173,1	107,1
PLA 0-PHB 100	-	2,8	-	174	109,3



Obr. 3 DSC křivky pro směs PLA/PHB - a) ohřev, b) ochlazování, Překlad: Heat flow - tepelný tok, Temperature - teplota (převzata z [16])

## 4.3 Morfologie směsi PLA a PHB

Techonologie SEM je nejvhodnějším zobrazovacím nástrojem, jak zjistit rozptýlení PLA a PHB ve struktuře. Ze snímků se dá posoudit vzájemná mísitelnost těchto biopolymerů. Proto pro obě následující kapitoly 4.3.1 a 4.3.2, byly dohledány snímky pořízené právě pomocí technologie SEM.

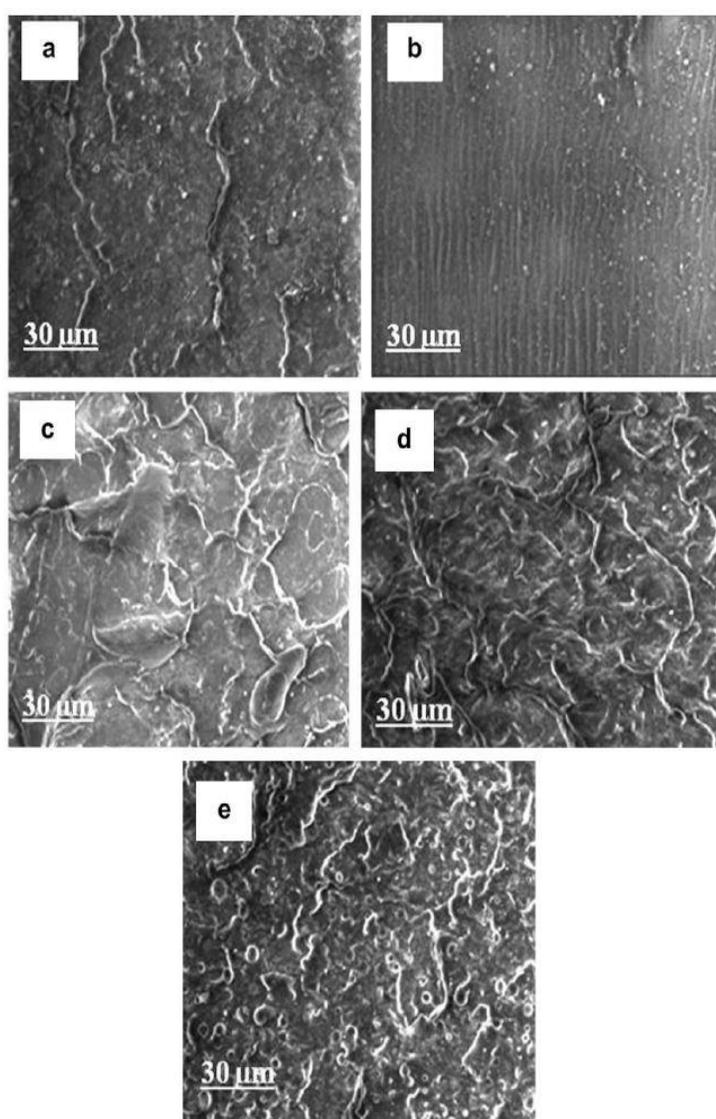
### 4.3.1 Struktura dle vzájemné koncentrace biopolymerů

Na níže uvedeném Obr. 4 je zaznamenána struktura čistého PHB, čistého PLA a jejich vzájemný poměr uvedený v hmotnostních procentech.

Čistý PHB znázorněný na Obr. 4 a) vykazuje členěný povrch, který odpovídá semikrystalické struktuře. Na rozdíl od čistého PLA uvedeného na Obr. 4 b), kde je povrch

jednotný a hladký, což odpovídá amorfní struktuře. Výsledná struktura tedy bude nejspíše nehomogenní a mísitelnost bude pouze částečná. [16]

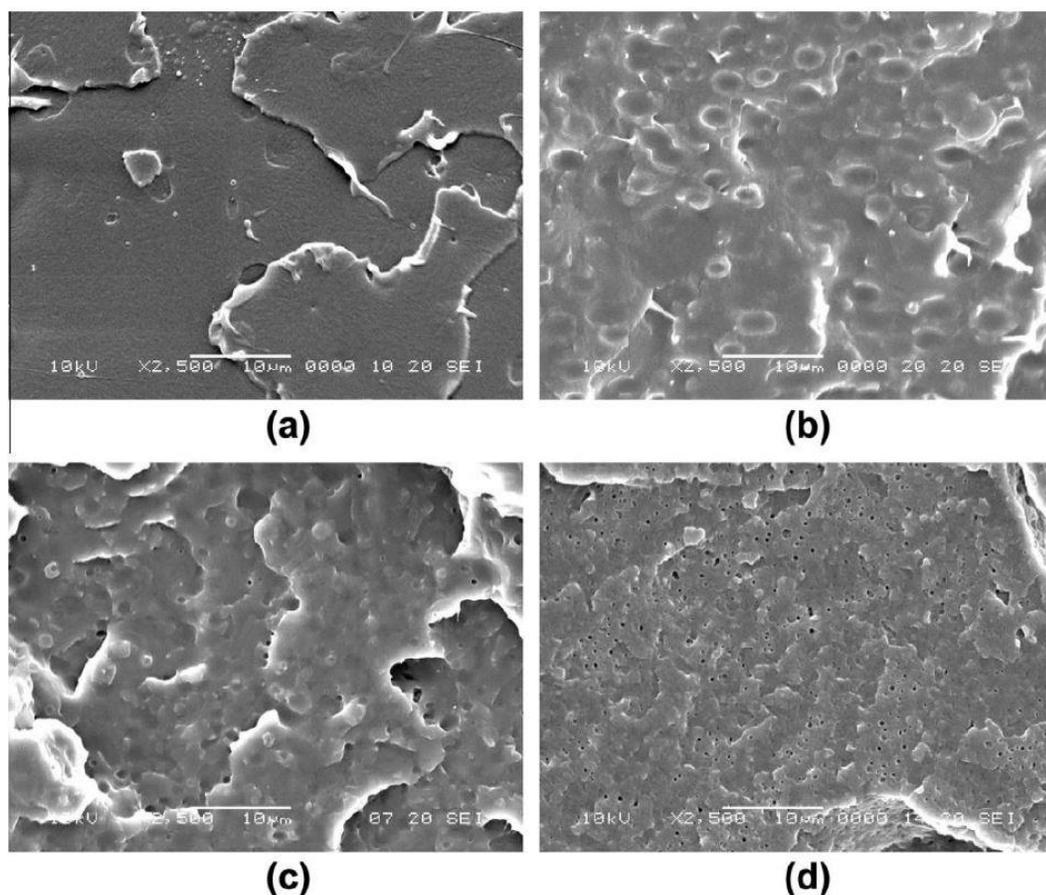
Ze struktur zaznamenaných na Obr. 4 c), d) a e) je možné vidět, že čím vyšší hmotnostní procento PHB, se vyskytuje ve směsi, tím hrubší je povrch. Při porovnání snímků s čistými polymery se zdá, že tato drsnost by mohla být způsobena právě fázovou separací semikrystalického a amorfního polymeru. Při vyšším procentu PHB jsou krystalické útvary jednotné a výrazné, kdežto u vyššího obsahu PLA je možné vidět, že krystalické útvary PHB jsou drobné. V případě Obr. 4 e), kdy je základní fází struktury PLA, je viditelné že inkluze PLA ve tvaru perliček jsou i v krystalických oblastech PHB. Kontinuální morfologie je nejpatrnější právě u 50 hm. % PLA a 50hm. % PHB. [16]



Obr. 4 Snímek mikrostruktury směsi PHB/PLA pořízený pomocí technologie SEM, a) 100 % PHB, b) 100 % PLA, c) 75 % PHB 25 % PLA, d) 50 % PHB 50 % PLA, e) 25 % PHB 75 % PLA (převzato z [16])

### 4.3.2 Struktura dle použité technologie zpracování

Vliv na výslednou strukturu směsi má i použitá technologie zpracování. Na Obr. 5 uvedeném níže, jsou zaznamenány rozdíly mezi směsí připravenou pomocí roztoku  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , smícháním směsi v roztaveném stavu pomocí mixéru a směsí vytvořenou na šnekovém extrudéru. Hmotnostní poměr směsi je ve všech uvedených případech 80 % PLA a 20 % PHB. [15]



Obr. 5 Snímek mikrostruktury směsi PHB/PLA pořízený pomocí technologie SEM; a) čisté PLA, b) směs připravená pomocí roztoku, c) smíchání směsi v roztaveném stavu pomocí mixéru, d) extrudovaná směs (převzato z [15])

Z důvodu nám dostupných technologií v laboratoři pro praktickou část, jsou pro tuto práci podstatné metody přípravy pomocí smíchání v tekutém stavu a pomocí šnekového extrudéru. Zároveň s ohledem na znázorněnou strukturu na Obr. 5 d), se jeví extrudované vzorky jako nejvhodnější. Vykazují nejlepší promíchání směsi a mikrostruktura vypadá nejvíce homogenně.

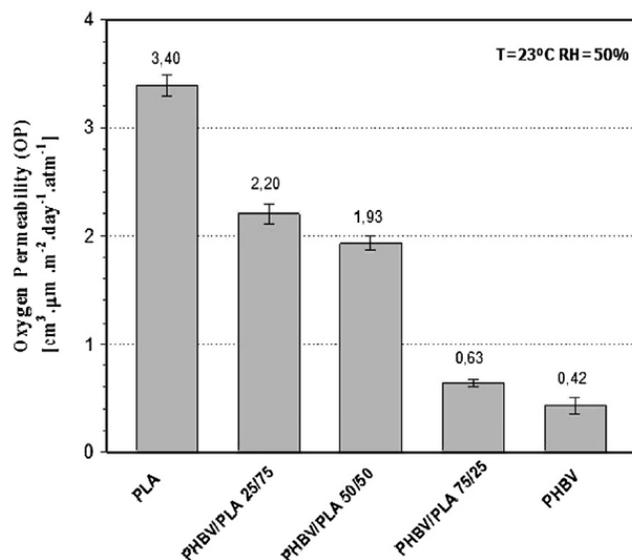
## 4.4 Bariérové vlastnosti směsi PLA-PHB

Propustnost plynů polymerním materiálem je komplexní jev, který je složen ze čtyř fází. Prvním je sorpce molekul plynu na povrchu filmu, následuje rozpuštění plynu na povrchu polymeru. Po nasycení povrchových vrstev, přechází plyn difúzně do materiálu, až z něj na jeho protilehlém povrchu vystoupí, takzvanou desorpcí. [16]

Bariérové vlastnosti se zkoumají převážně na tenkých fóliích a filmech, využívaných nejčastěji v potravinářském a chemickém průmyslu. U těchto odvětví je důležité, aby obalové materiály nepropouštěly ochranou atmosféru chránící výrobek v balení. A zároveň je snahou docílit, aby okolní atmosféra obsahující kyslík a vlhkost nevnikla dovnitř obalu. [12]

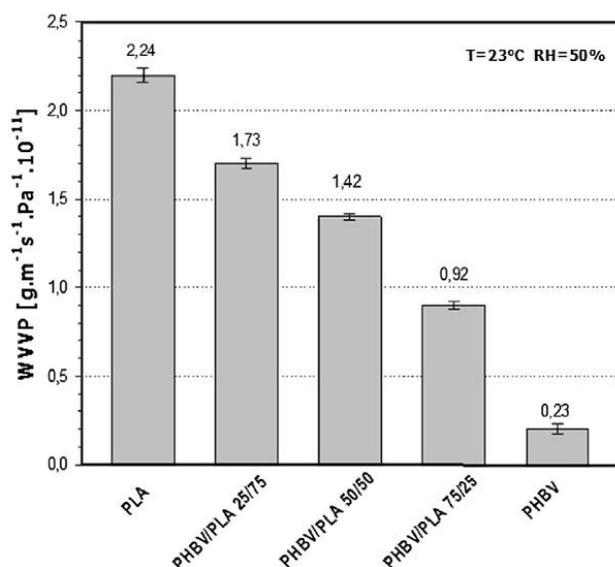
Propustnost plynů u polymerních materiálů probíhá zpravidla v amorfní fázi. Krystalická fáze je pro průnik plynu překážkou. U semikrystalických materiálů tedy dochází k narušení difúzní přímočaré dráhy, probíhající uvnitř materiálu, vlivem pravidelně uspořádané krystalické struktury. Částice plynu se tedy vychýlí a tím dochází k zakřivení jejich prostupující trajektorie. Zvýšení krystalinity v semikrystalickém polymeru, vede ke snížení amorfní fáze v celkovém objemu a zvýšení krystalické fáze, která plynu zabraňuje v jeho šíření uvnitř materiálu. [16]

Data uvedená v histogramu na Obr. 6, výše popsaný průběh demonstrují. Pokud se uváží že PLA je amorfní polymer a PHB je semikrystalický polymer, potom po jejich smíchání musí dojít ke zlepšení bariérových vlastností. Jak naměřené hodnoty vykazují, i při relativně malém množství PHB ve směsi, konkrétně 25 %, dochází ke zvýšení nepropustnosti kyslíku o 35 % oproti samotnému PLA. Při zvýšení obsahu na 50 % PHB ve struktuře, už nedochází k tak markantnímu zlepšení. Ovšem pokud se obsah PHB zvýší na 75 %, jsou bariérové vlastnosti materiálu zlepšeny o 81,5 %, opět v porovnání se samotným PLA. [16]



Obr. 6 Vliv koncentrace směsi PHBV/PLA na propustnost kyslíku skrze fólii,  
Příklad: Oxygen permeability - propustnost kyslíku (převzato z [16])

Ke stejnému závěru se dochází i v případě bariérových vlastností směsi, vůči vodní páře. Propustnosti vztahované k jednotlivým poměrům PHB/PLA je možné vidět v histogramu na Obr. 7. Ten opět znázorňuje že čím vyšší je poměr krystalické fáze ve směsi, v tomto případě zastoupené polymerem PHB, tím nižší je propustnost vodní páry. U propustnosti vodní páry, se však jedná o postupné úměrné snižování, vyvozené zvyšujícím se množstvím PHB ve směsi. [16]



Obr. 7 Vliv koncentrace směsi PHBV/PLA na propustnost vodní páry skrze fólii,  
Popis svislé osy: WVVP - propustnost vodní páry (převzato z [16])



## 4.5 Více násobná extruze směsi PLA-PHB

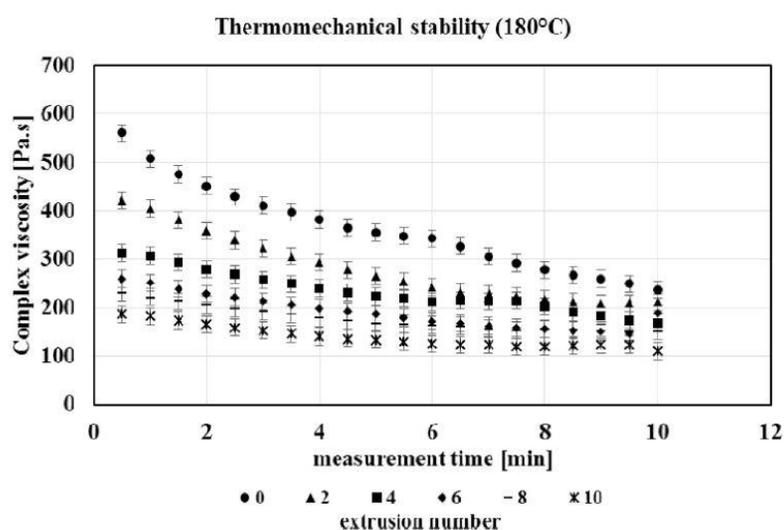
Biodegradabilní plasty z obnovitelných zdrojů, vykazují řadu nevýhod jako je křehkost, degradace při zpracování, ale především nemožnost materiálové recyklace s běžně používanými syntetickými plasty. [12]

Po prozkoumání různých strategií nakládání s plastovým odpadem od prosté recyklace mechanické, chemické nebo použití termolýzy, se došlo k závěru, že běžná mechanická recyklace je nejvhodnější variantou. Neznečišťuje životní prostředí, v porovnání se spalováním, a navíc má dobrou využitelnost odpadu. [12]

Zároveň dle evropské strategie, by veškeré obalové materiály vyprodukované na území Evropské Unie, měly být buď znovu použitelné, nebo by je mělo být možné efektivním způsobem recyklovat. Druhý požadavek je zajištění, více než poloviny plastového odpadu vyprodukovaného v Evropě recyklovat. [12]

Vzhledem k tomu že proces má za následek různé stupně degradace materiálu, je mechanická recyklace omezena počtem zpracovatelských cyklů. [12]

Na Obr. 8 je možné vidět snižující se viskozitu směsi PHB-PLA, závislou na počtu zpracování, v tomto případě extruzí. Viskozita se měřila vždy při konstantní teplotě 180 °C. První měření probíhalo 15 vteřin po extruzi, a poslední bylo provedeno 10 minut po extruzi. [12]



Obr. 8 Závislost komplexní viskozity na počtu extruzí a čase při konstantní teplotě 180 °C, Příklad: Thermomechanical stability - termomechanickou stabilitu; complex viscosity - komplexní viskozita; measurement time - čas měření; extrusion number - počet extruzí (převzato z [12])

## 5. Arthrospira platensis

Arthrospira platensis neboli spirulina je mikroskopická sladkovodní řasa, která patří do čeledi Cyanobacteria, dříve známé jako modrozelené řasy. Tento organismus se vyskytuje v přirozených vodních prostředích po celém světě, v posledních letech je však stále častěji kultivován v umělých nádržích pro průmyslové účely. Spirulina je využívána především v potravinářském průmyslu pro své výživové vlastnosti, díky kterým se z ní nejčastěji připravují doplňky stravy. [17]

Spirulina má typický spirálovitý tvar, který je viditelný pouhým okem. Její barva se může pohybovat od světle zelené až po tmavě modrou, a to díky pigmentu zvanému fykocyanin. Tento pigment má antioxidační vlastnosti a pomáhá tak tělu při detoxikaci. Spirulina je zároveň bohatým zdrojem chlorofylu, ten dopomáhá v lidském organismu k lepšímu okysličení a tvorbě krve. [17]

Spirulina obsahuje velké množství bílkovin, které jsou snadno stravitelné a přijatelné pro lidské tělo. Obsahuje všechny esenciální aminokyseliny, které jsou nutné pro tvorbu proteinů v těle. Navíc obsahuje vysoké množství vitamínů a minerálů, včetně železa, vitamínu B12, beta-karotenu, vápníku a dalších. Využívá se také pro snížení zánětu v těle nebo k ochraně buněk před poškozením volnými radikály. [17]

### 5.1 Průmyslové využití spiruliny

Z výše uvedených odstavců je zřejmé, že primární využití spiruliny je především v potravinářském průmyslu, v podobě doplňků stravy nebo jako barvivo do výrobků. Ve farmaceutickém průmyslu se využívá jako antioxidant nebo pro posílení imunitního systému. Kosmetický průmysl využívá řasu jako přísadu do krémů a masek, kvůli hydratačním a zklidňujícím účinkům. Své využití spirulina nachází i ve vodním hospodářství, kde je pěstována v odpadních vodách nebo v rybnících, což napomáhá k čištění vody. [18]

Pro tuto práci je však zásadní její schopnost akumulovat polymer PHB, který se nachází uvnitř buněk řasy. [9]

### 5.2 Získávání biopolymeru PHB ze spiruliny

Pro získání PHB z řasy, je potřeba nejprve oddělit buňky řasy od jejich vegetačního prostředí. Poté jsou buňky řasy omyty a rozdrčeny, aby se uvolnilo PHB. Následně se PHB oddělí od ostatních složek řasy pomocí fyzikálních a chemických procesů. Příkladem mohou být extrakce rozpouštědlem, krystalizace, ultrafiltrace nebo kombinace těchto metod. [9; 19]

Získání PHB z řasy spirulina není ekonomicky výhodné pro průmyslovou výrobu PHB, protože řasa obsahuje pouze malé množství PHB. Pro průmyslovou výrobu PHB jsou využívány jiné bakterie, které mají schopnost produkce PHB ve větším množství a s lepšími vlastnostmi. [9; 19]

V této studii byla použita řasa spirulina především z důvodu její dostupnosti a možnosti domácího pěstování. Spirulina je nenáročná na okolní prostředí a je možné připravit živné médium pomocí specifických, ale běžně dostupných chemických látek.

### **5.2.1 Získání PHB z řasy pomocí rozpouštědla**

Nejběžnější metodou získání PHB z řasy, je pomocí rozpouštědla na bázi chloru. Tento postup se též nazývá rozpouštědlová extrakce. [9; 19]

Obecný postup je následující, řasa se nejprve sklídí a promyje vodou, aby se odstranily nečistoty a další organické látky. V dalším kroku se naruší buněčná stěna řasy například tím, že se rozemele, rozdrtí nebo slisuje, aby se uvolnilo PHB a další organické sloučeniny. Uvolněné sloučeniny, včetně PHB, jsou odděleny od zbytku buněk pomocí rozpouštědla. Rozpuštěný extrakt se filtruje, aby se odstranily zbytky buněk řasy a další nečistoty. Následně se rozpouštědlo odpaří, aby se získal čistý PHB. Tento krok se v případě použití chloroformu provádí nejčastěji ve vakuové nádobě, kde díky nízkému tlaku a teplotě probíhá nejefektivnější odpaření. Vzniklý polymer se vysuší a dalšími procesy se připraví pro použití. [9; 19]

Praktický postup extrakce, převzatý z odborné studie, zaměřující se na získání PHB ze spiruliny, je popsán v následující podkapitole 5.2.2. [19]

### **5.2.2 Použití chlornanu sodného**

Základní kroky extrakce PHB pomocí této metody, začínají centrifugací vlhkého vzorku řasy o objemu 10 ml, po dobu 10 minut při  $n = 4000$  ot. /min. Poté se buňky rozruší rozpouštědlem NaClO o 4 % koncentraci. Následně probíhá inkubace vzorku při teplotě 20 °C po dobu 2 hodin. Pro odstranění rozpouštědla a usnadnění sušení se vzniklá směs propláchne 20 ml destilované vody, 20 ml acetonu a 20 ml methanolu. Posledním krokem je čištění extrahovaného PHB prolitím horkým chloroformem, ten oddělí polymer od rozpouštědla a vytvoření tenký film na Petriho misce. [19]

# Praktická část

## Návrh a provedení experimentu

Praktická část studie se bude nejprve zabývat extrakcí polymeru PHB z vlastní vypěstované řasy *spirulina platensis*. Hlavním důvodem, proč se pro extrakci PHB zvolila řasa *spirulina*, je její vcelku dobrá dostupnost a nízká náročnost na pěstování. Zároveň i samotné získání polymeru z řasy je možné provést téměř v domácích podmínkách.

Extrakce PHB bude probíhat za přítomnosti rozpouštědel na bázi chloru, nejznámějším zástupcem je 5 % chlornan sodný, obchodně známý jako Savo. Tato koncentrace by měla být dostačující pro extrakci PHB. Vytvořený materiál se podrobí světelné mikroskopii, pro zjištění vnitřní struktury.

Očekává se však malé množství vyextrahovaného PHB, proto se experiment dále zaměří na vytvoření směsi s biopolymerem PLA. To především z důvodu, abychom docílili požadovaného množství materiálu, pro vytvoření dostatečné délky struny k vytisknutí vzorků. Při extruzi struny se polymery zahřívají a vzájemně mísí. Proto musíme nejdříve z termické analýzy zjistit, teploty tání a zda při vícenásobném ohřevu biopolymer nedegraduje.

První metodou přípravy bude metoda spečení samotných biopolymerů v peci a následně vytvoření struny obsahující pouze jeden z materiálů. Díky tomu zjistíme vlastnosti samotných materiálů, které budou porovnatelné se směsí PLA-PHA.

Dalším krokem tedy bude vytvoření filamentu ze směsi PLA-PHA s následným tiskem zkušebních vzorků na 3D tiskárně. Rozměry veškerých tisknutých tělísek budou inspirovány normou ČSN EN ISO 527-2, ovšem nastavení parametrů samotného tisku norma nedefinuje. Vstupní charakteristiky pro tisk, tak budou určeny experimentálně.

Poslední část se zaměří na mechanické zkoušky vytvořených těles, především na pevnost v tahu, kde se určí, zda u směsi PLA-PHA dochází k navýšení pevnosti oproti vzorkům obsahující pouze jeden biopolymer. Vzájemná mísitelnost vzorků se zjistí z termické analýzy, a především ze struktury zjištěné pomocí polarizačního mikroskopu.

V neposlední řadě se studie také zaměří na degradaci PHA, která by mohla vzniknout během vícenásobného procesu zpracování. Proto v experimentu bude snahou využívat PHA stále dokola. Výsledné degradované vzorky se pak porovnají se vzorky jednou zpracovanými.

## 6. Použité přístroje a pomůcky

### 6.1 Pěstování spiruliny

- **Akvárium**

Pro pěstování řasy bylo použito akvárium značky Diversa, které je znázorněno na Obr. 9. Akvárium má objem 20 litrů při rozměrech 39x25x21,5 cm. Zároveň disponuje horním panelem s 8W LED zdrojem pro dodatečné osvětlení řasy v neslunečných dnech. Velikost nádoby pro pěstování je zásadní, odvíjí se od ní veškeré další komponenty, a především větší nádoba neznámá větší sklizeň. Pokud se řasa nachází ve vegetační fázi a znásobí své množství, celý její objem má pak typickou tmavě zelenou barvu. Ta brání k pronikání světelných paprsků ať už od Slunce nebo od umělého zdroje. Obecně platí že v nejsilnějším období vegetace řasy, Slunce prosvítí do vzdálenosti 20 cm od stěny nádoby, buňky které jsou ve větší vzdálenosti, umírají.



Obr. 9 Pěstební nádoba

- **Topítko**

Výhřev pěstební nádoby je zajištěn pomocí topítka znázorněném na Obr. 10. Jedná se o topítko značky Jeneca s označením AL-2201, jehož výkon je 25 W. Topítko je celoponorné a disponuje zabudovaným nastavitelným termostatem, u něhož jde nastavit teplota od 22 °C do 34 °C, což je pro nás ideální rozsah pro pěstování.



Obr. 10 Topítko Jeneca AL-2201

- **Kompresor**

Vzduchování řasy je zabezpečeno pomocí akvarijního kompresoru, značky Hagen Marina s modelovým označením 50. Ten je pro svůj výkon vhodný pro akvária do objemu 60 litrů. Jeho vzduchovací výkon je 50 l /h.

- **Akvarijní teploměr**

Aktuální teplota v nádrži se zjistí za pomoci akvarijního teploměru, který musí být umístěný uvnitř nádrže. Hodnoty teploty z termo nálepky, která se lepí z vnější strany akvária, jsou zavádějící. Pokud by se nádrž umístila na místo, kde by na proužek svítilo Slunce, odečítali bychom špatnou teplotu média v nádrži.

- **pH metr**

Správné pH pěstebního média je velice důležitým faktorem, pomocí hodnoty pH pozorujeme, v jakém cyklu se řasa aktuálně nachází. Zda je v období výnosu, nebo zda je pěstební médium chudé na minerální látky a řasa uvadá. K určení hodnoty pH, slouží digitální měřič značky Parkside uvedený na Obr. 11.



Obr. 11 Měřič pH PPHM 14 A1

- **Spínací hodiny**

Pro zajištění ideálního teplotního cyklu, je důležité nastavit na topítku požadovanou teplotu a tu následně regulovat právě pomocí spínacích hodin. Spirulina má ráda kolísající teplotní cyklus. Optimální teploty během dne jsou 30 - 36 °C. Při teplotě nad 39 °C, začne kultura zanikat. Přes noc je naopak dobré teplotu snížit, ne však pod 15 °C, pod touto teplotou spirulina sníží svoji aktivitu a potlačuje se tak vegetační fáze.

- **Druhá nádrž na sklizení řasy**

Ke sklizení je zapotřebí si zajistit druhou nádobu, do které se bude spirulina přečerpávat, pro tento výzkum bylo použito druhé akvárium o větším objemu než pěstební nádoba, aby nemohlo dojít k přelití.

- **Plátno na sklizení řasy**

Sklizeň řasy se provádí filtrací pěstebního média s řasou přes filtrační tkaninu. Ta musí mít požadovanou jemnost, aby se v ní spirulina zachytila, ale zároveň i dobrou propustnost pro minerální látky obsažené v médiu, které se po přefiltrování opět použijí. Ideálním zástupcem splňující výše uvedené podmínky je netkaná textilie Evo 100 od firmy polytex.eu. Textilie je složena ze 70 % polyesteru a 30 % polyamidu. Výrobce u této tkaniny zaručuje její nezávadnost dle certifikace Öeko-tex.

- **Akvarijní čerpadlo**

Čerpadlo na Obr. 12, použijeme pro přesun řasy z pěstebního akvária do druhé nádrže, sloužící k filtraci.



Obr. 12 Akvarijní čerpadlo

- **Váha**

Váha MyWeight Triton T3 znázorněná na Obr. 13, slouží k namíchání pěstebního a krmného média, a k určení množství sklizené spiruliny. Přesnost měření hmotnosti této váhy je 0,01 g, což je dostačující přesnost pro zvažení stopových látek do pěstebních médií.



Obr. 13 Váha MyWeight Triton T3

- **Kompletní pěstební sestava**

Na Obr. 14 je snímek kompletní sestavy pro pěstování řasy, kromě výše uvedených položek, se pro vzduchování akvária použily průhledné silikonové hadice o  $\varnothing$  3,5 mm. Pro regulaci dodávaného vzduchu, byl použit nástavec na přívodní hadici, který pomocí ozubeného kolečka zmenšuje průřez hadice a tím i množství dodávaného vzduchu. Další položkou je zpětný ventil, který nám zajistí, aby při vypnutí kompresoru nedošlo k jeho poškození tím, že se dovnitř dostane pěstební médium. Rovnoměrné rozvedení vzduchu po celém objemu akvária, bylo zajištěno T - redukcí připojenou na konci přívodní hadice od kompresoru. Na redukci se napojila silikonová hadice s vytvořenými dírami, která byla uchycená u dna nádoby podél její stěn.



*Obr. 14 Pěstební sestava*

## 6.2 Extrakce PHB

- **Laboratorní centrifuga**

Pro extrakci PHB je zapotřebí laboratorní centrifuga. Ta slouží k oddělení polymeru PHB z buněčné struktury řasy. Pro tento experiment byla použita elektrická odstředivka Centrifuge 800D znázorněná na Obr. 15. Její maximální otáčky jsou  $n_{\max} = 4000$  ot. /min, při kterých na vzorky působí maximální přetížení  $RCF_{\max} = 1790^*g$ . Kapacita centrifugy je 6 zkumavek o objemu 20 ml.





Obr. 15 Laboratorní centrifuga

- **Mixér**

Mixér je potřebný pro smíchání rozpouštědla s řasou.

- **Plátno pro filtraci**

Po odstředění je důležité vzniklou směs přefiltrovat od rozpouštědla nebo ethanolu. Pro tento krok se využije rovněž netkaná textilie Evo 100, která byla použita i v případě filtrace samotné spiruliny.

## 7. Zařízení potřebná pro stanovení vlastností vzorků

### 7.1 Stanovení pevnosti v tahu

Veškeré tahové zkoušky byly provedené na trhacím stroji MTS Exceed model E42, který je znázorněn na Obr. 16. Limitní tahová síla tohoto stroje je 5 000 N. Na tuto sílu tedy musel být brán zřetel zvláště u vzorků spečených s peci, kdy se při velkém průřezu vzorků síla blížila k této hranici. Rychlost zatěžování byla nastavena na 50 mm/min.



Obr. 16 Trhací stroj MTS Exceed model E42

Zkušební vzorky připravené metodou spečení měly rozměry vztažené k velikosti jednoho pole silikonové formy, tedy 49 x 26 mm. Výška vzorku se odvíjela od hmotnosti použitého biopolymeru.

Rozměry vzorků vytištěných na 3D tiskárně určovala norma ČSN EN ISO 527-2. Konkrétně se zvolilo zkušební těleso typu 1BA. Jedná se o malé zkušební těleso, které se volilo z důvodu co možná nejmenší spotřeby materiálu u extruze a následně filamentu u tisku.

Tahová zkouška probíhala dle výše uvedené normy, jelikož norma pro 3D tisknutá tělesa zatím není definována.

## 7.2 Diferenciální skenovací kalorimetrie

Diferenciální skenovací kalorimetrie neboli DSC, je metoda měření, která slouží pro termickou analýzu materiálů, v tomto případě polymerů. Hlavní určující charakteristiky z této zkoušky jsou teplota tání a teplota krystalizace. Zkouška zároveň vyhodnotí i pro tuto studii méně potřebné charakteristiky, jako jsou měrné teplo z endotermní reakce, což je energie potřebná k přechodu z pevného skupenství do kapalného, neboli entalpie tání. Naopak při chladnutí vzorku, DSC zachycuje exotermní reakci, která určuje potřebnou entalpii pro krystalizaci.

Průběh zkoušky spočívá ve vystavování zkoumaného vzorku, uloženého v kelímku, a referenčního (prázdného) kelímku, lineárnímu ohřevu nebo ochlazování. Při tomto ději se plynule mění velikost tepelného příkonu. Výstupem je křivka zaznamenávající závislost rozdílu tepelného toku na čase či teplotě. Všeobecně se považuje endotermní reakce za kladnou a exotermní reakce za zápornou, vzhledem ke svislé ose.

Měření těchto materiálových charakteristik probíhalo na přístroji STA 409PG LUXX od společnosti Netzsch, kde rychlost ohřevu byla nastavena na 10 °C /min a rychlost ochlazování na 5 °C /min.

## 7.3 Struktura vzorků

K pozorování struktury polymerních vzorků se nejčastěji využívá polarizační mikroskopie, která funguje na kombinovaném principu světelné mikroskopie a polarimetru.

Elektromagnetické vlnění, známé jako světlo, je charakterizováno dvěma kolmými vektory - intenzitou elektrického pole  $E$  a magnetickou indukcí  $B$ . V normálním světle jsou tyto vektory náhodně orientovány, není preferován žádný specifický směr. Avšak, když

dochází k jejich kmitání v jedné rovině, hovoříme o polarizovaném světle. Polarizace světla může nastat prostřednictvím odrazu, lomu nebo prostřednictvím polarizačních filtrů. [20]

Pokud bychom pozorovaly látky s jedním indexem lomu, viděli bychom pouze tmavé pole, neboť takové látky neovlivňují polarizaci světla. Naopak látky s dvojitým indexem lomu rozdělí polarizované světlo na dva paprsky - řádný a mimořádný. Tyto paprsky jsou vzájemně fázově posunuty. Po průchodu analyzátozem dochází k interferenci (skládání) těchto dvou paprsků do stejné roviny kmitu. V důsledku toho se obraz objektu na pozadí jeví jako světlý na tmavém pozadí nebo při použití bílého, tedy složeného světla, barevný na tmavém pozadí. [20]

Samotnému pozorování polymerů polarizační mikroskopií předchází příprava preparátu. Ta probíhá vytvořením tenké fólie na řezačce, tloušťka takové fólie se pohybuje od 0,01 do 0,02 mm. Fólie se následně umístí na pozorovací sklíčko, zalije se olejem dodávaným od výrobce mikroskopu a na vrch se umístí krycí sklíčko. Takto vytvořený preparát je možné použít pro pozorování.

## 8. Pěstování spiruliny

### 8.1 Použité látky

Níže jsou uvedeny látky potřebné pro pěstování spiruliny:

- Hydrogenuhličitan sodný  $\text{NaHCO}_3$
- Dusičnan draselný  $\text{KNO}_3$
- Mořská sůl  $\text{NaCl}$
- Síran draselný  $\text{K}_2\text{SO}_4$
- Síran hořečnatý  $\text{MgSO}_4$
- Chlorid vápenatý  $\text{CaCl}_2$
- Fosforečnan amonný  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$
- Chelátové železo - železo v tekutém stavu

Níže jsou uvedeny látky potřebné pro extrakci PHB ze spiruliny:

- Chlornan sodný  $\text{NaClO}$
- Aceton  $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$

## 8.2 Zajištění nákupu živé kultury řasy

Základním požadavkem při shánění živého kmenu spiruliny, bylo sehnat silnou kulturu řas, která nejen že vydrží přepravu, ale zároveň její buňky budou bohatým zdrojem polymeru PHB.

Vzhledem k prvnímu zmiňovanému aspektu, se takový kmen hledal na území České republiky, aby doprava byla co možná nejrychlejší a řasa se tak nevystavovala zbytečným stresovým podmínkám. Po poptávkách u tuzemských botanických zahrad a středisek, které se obdobnými záležitostmi zabývají, se došlo k závěru, že sehnat živou kulturu řasy spirulina na českém území není možné.

Jedinou možností tedy bylo, poohlédnout se po zahraničních zdrojích. Ovšem stále bylo snahou najít společnost sídlící co nejbližže České republice, aby cesta byla co nejkratší. Po důkladném projití zahraničních webů, se objevila společnost HealthAlgae, která se zabývá právě pěstováním a následnou distribucí živé spiruliny. Její produkty byly dle recenzí kvalitní a zároveň díky jejich pěstování ve výkonných bioreaktorech, dokázaly buňky řasy na přepravu desetkrát více zhustit.

Zásadní nevýhoda této společnosti, je její sídlo, které se nachází ve Švédsku. Po zkontaktování vedení firmy, bylo zjištěno, že řasa vydrží přepravu trvající maximálně sedm dní. Při delším časovém horizontu spirulina začne umírat v důsledku nedostatku světla a kyslíku. Dohodlo se tedy, že se před přepravou řasa zchladí na teplotu 4 °C, aby snížila svoji aktivitu. Pro docílení co nejdelšího setrvání této nízké teplotě, se láhev s řasou zabalí do termoizolační fólie. Na Obr. 17 je obdržená lahev s živou kulturou řasy a manuálem pro pěstování.



Obr. 17 Živá kultura řasy spirulina platensis

## 8.3 Pěstební médium

Řasa pro svůj růst a vývoj potřebuje vhodné médium, ze kterého čerpá minerální látky. Zároveň médium příznivě ovlivňuje pH. Správné pH má vliv nejen na optimální spotřebování živin ve vegetačním období, ale také se díky němu dá určit, kdy má proběhnout sklizeň řasy. Na začátku pěstování se pH média pohybuje okolo 8,5 a každým dnem by se mělo postupně zvyšovat. První sklizeň může proběhnout při dosažení pH 10, přičemž vždy se sklízí, pH klesne na úroveň okolo 9,5. [21]

Pokud médium dosáhne hodnoty pH 11, jedná se o první signalizaci, že dochází k vyčerpání živin z pěstebního média a je potřebné jej obnovit. [21]

Jako vhodné pěstební médium se dle průzkumů osvědčilo Zarroukovo médium, které bylo objeveno v roce 1966. Původním záměrem bylo použít toto médium k pěstování cyanobakterií, též známých jako sinice. Po prozkoumání se však ukázalo, že toto médium má širší použití a hodí se i pro pěstování jiných druhů bakterií. [22]

Většina pěstebních médií se tedy odráží od tohoto předpisu, avšak některá média obsahují více či méně stopových prvků. Nicméně poměry důležitých látek pro správný růst jsou zachovány. [22]

Níže uvedená Tab. 5, uvádí jednotlivé hmotnosti látek, které jsou potřebné pro namíchání 5 litrů pěstebního média.

Tab. 5 Hmotnosti jednotlivých látek potřebných pro výrobu pěstebního média

Látka	NaHCO <sub>3</sub>	KNO <sub>3</sub>	NaCl	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
Množství [g]	80	10	5	2,5	0,5	0,5	0,5

Látky se v tomto množství promíchají s 5 litry alespoň den odstáté vody, aby z ní vyrchla chlor, který by nepříznivě působil na růst řasy. Po přidání všech látek se přidá 0,625 ml tekutého železa a voda se nechá další 4 hodiny odstát, aby došlo ke kompletnímu rozpuštění veškerých složek. Snímek z přípravy pěstebního média je uvedený na Obr. 18.



Obr. 18 Příprava pěstebního média - na obrázku zleva: tekuté železo, odstátá voda, pěstební

## 8.4 Krmné médium

Po sklizení řasy se musí doplnit živiny, které slouží k jejímu dalšímu vývoji a růstu. K tomu je určeno krmné médium. Látky se od pěstebního média liší pouze tím, že do krmné směsi nepřidáváme  $\text{NaHCO}_3$  a  $\text{NaCl}$ . Pro vytvoření 75,5 gramů krmné směsi, jsou jednotlivé složky smíchané v následujících hmotnostních poměrech uvedených v Tab. 6.

Tab. 6 Hmotnosti jednotlivých látek potřebných pro výrobu krmného média

Látka	$\text{KNO}_3$	$(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$	$\text{K}_2\text{SO}_4$	$\text{MgSO}_4$	$\text{CaCl}_2$
Množství [g]	70	2,5	1,5	1	0,5

Takto připravená směs se umístí do neprodyšné nádoby, aby nedošlo ke zvlhnutí a dávkuje se dle potřeby. Obecně platí, že na 1 lžící sklizené řasy se přidá 1 čajová lžička krmné směsi a 0,1 ml tekutého železa.

## 8.5 Zahájení pěstování

Vzhledem k obdrženému objemu 500 ml živé kultury, byl pro zahájení pěstování odpovídající objem 5 l pěstebního média. Více média by mělo za následek zvětšení vzdáleností mezi buňkami řasy, a tudíž zpomalení růstu. V krajních případech kvůli nízké koncentraci řasy v médiu také zániku kultury.

Po obdržení řasy, se do pěstební nádoby nalilo 5 l média a 450 ml živé kultury. Zbýlých 50 ml se oddělilo do rezervní nádoby znázorněné na Obr. 19. Tato nádoba slouží jako záloha, pokud by řasa ve velké pěstební nádobě zahynula.

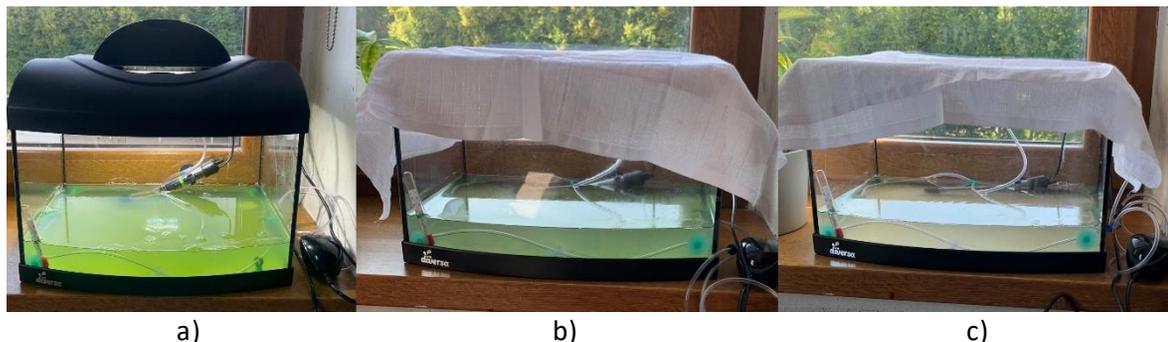


Obr. 19 Rezervní nádoba

Z důvodu časově náročné dopravy, bylo jasné, že první dny budou pro kulturu kritické. Při prvotním otevření lahve s kulturou, byl cítit zápach, který sice po pár hodinách vymizel, avšak barva kultury každým dnem bledla, jak je možno vidět na Obr. 20.

Druhý den byl horní kryt akvária nahrazen prodyšnou látkou, pro lepší přístup kyslíku. Se sundáním horního krytu se také odstranilo umělé LED osvětlení viz Obr. 20 b).

Čtvrtý den od zahájení pěstebního procesu, bylo jasně viditelné, že kultura z velké části odumřela, to je možné vidět na Obr. 20 c). V tento den se do pěstební nádoby nalila zbylá rezervní kultura, která se na počátku oddělila pro záložní účely.



Obr. 20 Počáteční průběh pěstování - a) první den pěstování, b) druhý den pěstování c) čtvrtý den pěstování

Vzhledem k tomuto vývoji, se předpokládalo že kultura zahynula během dopravy. Musela se tedy objednat další živá kultura, opět od společnosti HealthAlgae, se kterou se vykomunikovala co možná nejrychlejší doprava na území České republiky.

Původní kultura se ponechala na stejném slunném místě a nechalo se u ní zapnuté vzduchování. Po dvaceti dnech od zahájení pěstování, se nádrž kultury zbarvila do světle zelené barvy a řasa začala být každým dnem silnější. Což bylo znatelné právě podle tmavnoucího odstínu zelené barvy. Po týdnu se do nádrže přidalo dalších 5 litrů pěstebního média, tento stav je možné vidět na Obr. 21 a).

Následující týden se přidalo dalších 5 litrů média a po 14ti dnech bylo viditelné, že kultura se vyvíjí dle očekávání, toto stádium je možné vidět Obr. 21 b).



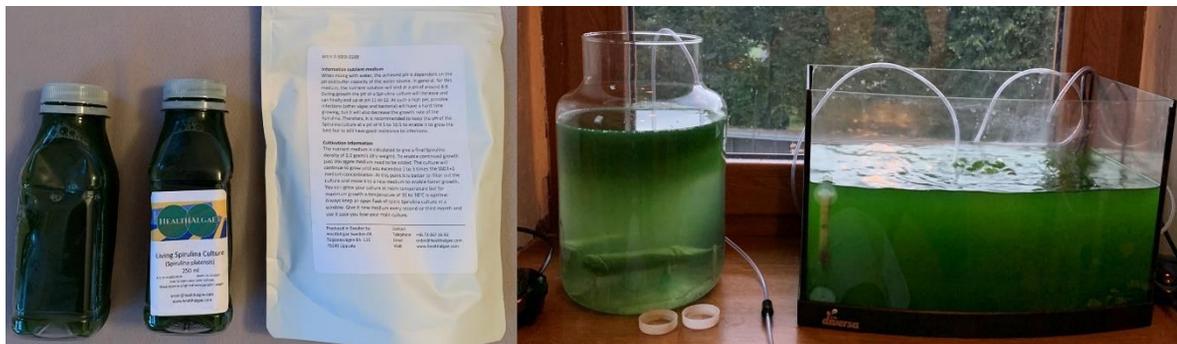
a)

b)

Obr. 21 Pokročilá fáze pěstování - a) 20. den pěstování, b) 34. den pěstování

## 8.6 Druhá kultura řasy

V období kdy už začala být původní řasa dostatečně silná a její barva se měnila do tmavě zelené, dorazila druhá objednaná kultura viz Obr. 22 a). Tentokrát byla doprava rychlejší a po otevření lahve spirulina nezapáchala. Kultura se v tomto případě do nádrže s médiem, umístila ve svém původním balení, které se pouze otevřelo a položilo na dno. Účelem bylo zabezpečit co nejlepší a nejšetrnější podmínky na začátku pěstování. Vzduchování bylo zajištěno dalším kompresorem. Snímek obou pěstebních nádrží se nachází na Obr. 22 b). Rezervní nádoba se v tomto případě nevytvářela, neboť v první pěstební nádobě - akváriu, se už řase dařilo dobře, a proto by jako záloha sloužila původní kultura řasy.



a)

b)

Obr. 22 a) druhá dávka živé kultury spirulina platensis, b) zahájení pěstování druhé kultury



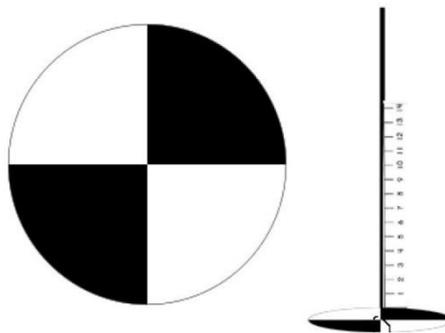
## 8.7 Sklizeň řasy

Prvním signifikantním ukazatelem, že je řasa připravená na sklizeň je její odstín. Kultura se postupně do svého středu zhutňuje a tím se snižuje její průsvitnost. Odstín zelené barvy se plynule mění od stěn nádoby, kde je nejsvětlejší, do středu nádoby, kde kultura působí velmi tmavým zeleným odstínem. Tento jev je možné vidět na níže uvedeném Obr. 23.



Obr. 23 Obě nádrže připravené na sklizeň

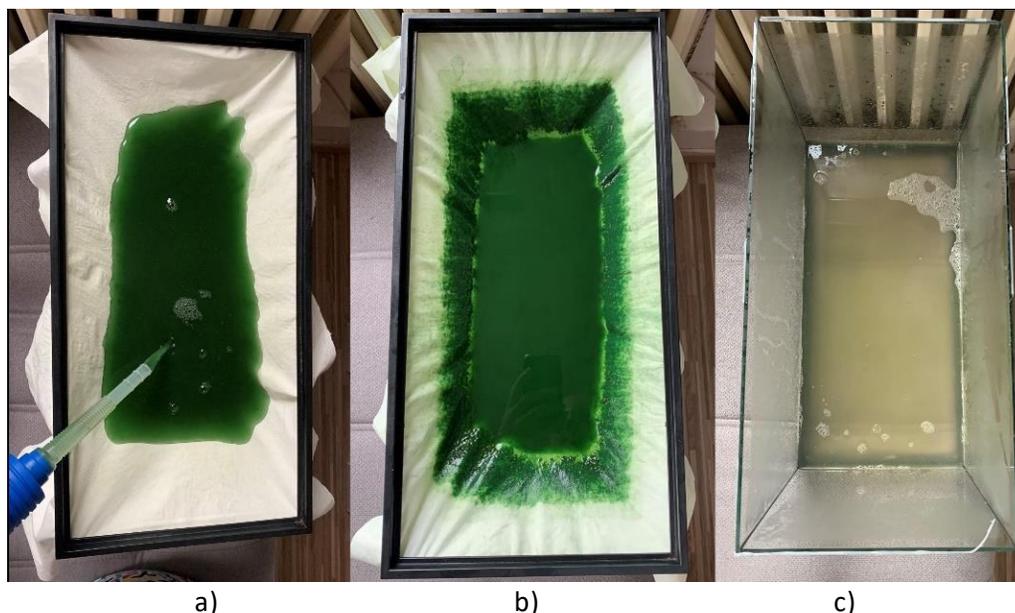
Druhým ukazatelem, který je založený na obdobném principu je Secchiho disk, znázorněný na Obr. 24. Tento disk se připevní na pravítko a sleduje se, v jaké hloubce začínají pole disku splývat tak, že lidské oko nepozná rozdíl, zda se jedná o černé nebo světlé pole. Pokud se tohoto jevu dosáhne v minimální hloubce 4 cm, je řasa připravená na sklizeň. [21]



Obr. 24 Secchi disk (převzato z [21])

Třetím parametrem je pH, kde jak je již výše zmíněno, v podkapitole 8.3, hodnoty pH pěstebního média, by se měly pohybovat od 10 do 11. Přičemž hodnoty nad úroveň 11, jsou signalizační pro nedostatek živin v médiu a je potřebná jeho kompletní výměna. Pokud se však řasa zdá být vizuálně i pomocí Secchi metody připravená na sklizeň, a její pH je stále nižší než 10, je potřebné pár dní sečkat, než pH vystoupá nad tuto hranici. Pokud se stupeň pH nezvyšuje, druhou možností je přidat do média živiny, ze kterých bude moci řasa čerpat energii a díky tomu se zvýší i stupeň pH.

Ke sklizni řasy se využije druhá nádoba, přes kterou je přetažená filtrační tkanina, ta zachytí buňky řasy a propustí médium obsahující minerální látky. Čerpání je zajištěno pomocí akvarijního čerpadla, proces sklizně je znázorněn na Obr. 25.



Obr. 25 Proces sklizně - a) přečerpání média s řasou do filtrační tkaniny připevněné na nádobě pro sklizeň, b) filtrování řasy od média, c) pěstební médium bez řasy

Nikdy by se neměla sklízet více jak polovina celkového objemu kultury, čím větší je množství sklizené řasy, tím déle trvá její obnova. Ideálním množstvím je 1/3 objemu, kdy v nádrži zůstává velké množství buněk, které se mohou dále množit. Lepší je tedy sklízet menší množství častěji, než velké množství po delších intervalech. Řase se při méně objemném a častějším sklizení, sníží její stresové podmínky, což má za následek silnější a kvalitnější úrodu. Zároveň využívá minerální látky z média v menším množství, to má za následek prodloužení intervalů mezi celkovými výměnami pěstebního média. To však může být také způsobené tím, že při každé sklizni, se dodají minerální látky obsažené v krmném médiu.

Urychlení filtračního procesu se dá docílit mícháním řasy, kdy těžké buňky ulpí na dně filtrační tkaniny a vytvoří sediment znázorněný na Obr. 26 a), přes který médium neprotéká. Po překapání média se tkanina sbalí způsobem, kdy na středu zůstává mokrá řasa a zbylé médium se vymačká v gumových rukavicích. Po rozbalení tkaniny se řasa seškrábe, jak je možné vidět na Obr. 26 b). Takto sklizená řasa je připravená na další zpracování.

Do média, ze kterého byla odfiltrována řasa, se přidá již zmiňované krmné médium. Po přidání krmného média se do akvária umístí filtrační tkanina obsahující zbytky řasy, které nešly seškrábat. Díky tomu se barva přefiltrovaného média opět zbarví do zeleného odstínu a takto připravenou kapalinu znázorněnou na Obr. 26 c), můžeme opět přelít do pěstební nádrže.

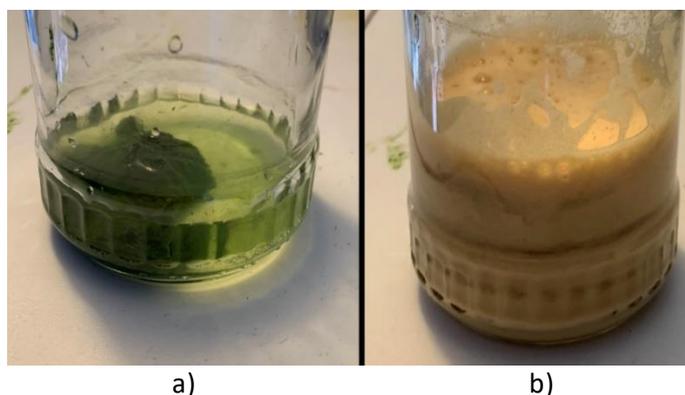


Obr. 26 a) filtrační tkanina pod oddělení řasy od pěstebního média, b) shromážděná řasa z filtrační tkaniny, c) vyprání tkaniny v přefiltrovaném pěstebním médiu z důvodu využití zbytků řasy ulpělé na tkanině

## 9. Extrakce PHB ze spiruliny

Po sklizení řasy se přechází na samotnou extrakci PHB ze spiruliny pomocí rozpouštědla. Způsob zpracování je následující:

- Čerstvě sklizená řasa se umístí do nádoby, do které se přidá chlornan sodný v 5% koncentraci. Tento krok je znázorněn na Obr. 27 a).
- Mixérem se tato směs rozmíchá a nechá se od stát, pro zajištění kompletního rozkladu buněk. Snímek rozmíchané směsi je uvedený na Obr. 27 b).



Obr. 27 a) spirulina zalitá chlornanem sodným, b) rozmíchání spiruliny s chlornanem sodným

- Laboratorní centrifugou se oddělí rozložená buněčná struktura řasy od chlornanu sodného. Zkumavky připravené k odstředění jsou vidět na Obr. 28 a). Výsledný stav po centrifugaci je znázorněný na Obr. 28 b).



*Obr. 28 a) rozmíchaná směs spiruliny s chlornanem sodným, b) odstředěná směs*

- Následuje vícenásobný proplach vzniklého sedimentu destilovanou vodou, přes filtrační tkaninu. Obvykle 5 proplachů stačí, aby se chlornan sodný zcela odstranil.
- V následujícím kroku se tato směs propláche acetonem, který slouží pro vyčištění směsi a urychlení sušení. Výsledná směs je znázorněná na Obr. 29.



*Obr. 29 Výsledná směs vytvořená rozrušením buněk spiruliny pomocí rozpouštědla*

Z důvodu velkého množství pokusů extrakce, se v následující Tab. 7, uvádí parametry nejzdrárnějšího pokusu. Výsledný vzorek se prověřil pomocí světelné mikroskopie.

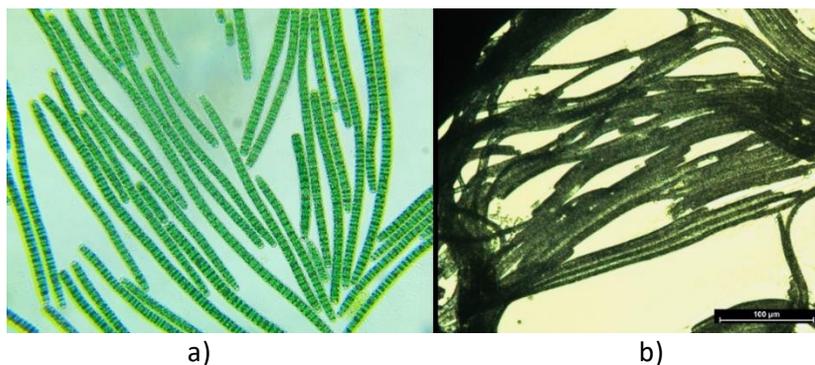
Tab. 7 Parametry použité při extrakci PHB ze spiruliny

Akce	Použitý parametr
Hmotnost sklizené spiruliny	10 g
Objem chlornanu sodného	20 ml
Doba míchání mixérem	5 minut
Doba potřebná pro rozklad buněk	30 minut
Otáčky centrifugy	4000 ot./min
Doba odstředování	20 minut
Proplach destilovanou vodou	5x
Proplach acetonem	2x
Doba sušení na vzduchu	48 hodin

## 10. Struktura vytvořených vzorků

### 10.1 Nezpracovaná spirulina

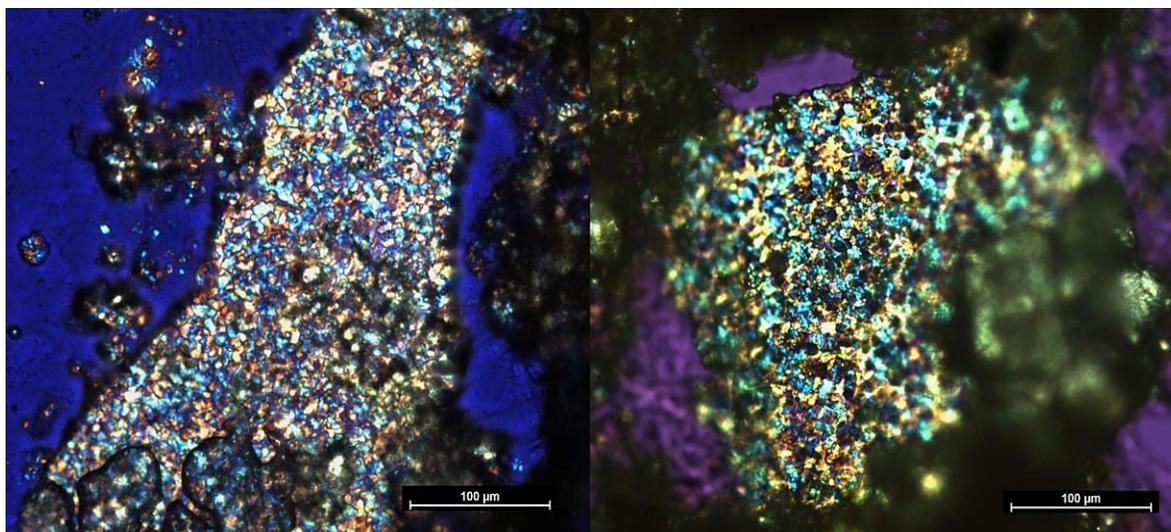
Na níže uvedeném Obr. 30 b), je možné porovnat strukturu vypěstované spiruliny, se spirulinou zachycenou v odborné literatuře, znázorněnou na Obr. 30 a). Oba snímky jsou zaznamenané světelnou mikroskopií. Z porovnání je viditelné, že struktury jsou shodné, jediným rozdílem je silnější světelný zdroj v případě Obr. 30 a), což má za následek lepší zobrazení členitosti na jednotlivých řetězcích řasy. Z ostatních hledisek vypadají snímky podobně, a proto lze s jistotou tvrdit, že na Obr. 30 b) se skutečně jedná o spirulinu *platensis*.



Obr. 30 Porovnání snímků spiruliny ze světelného mikroskopu - a) snímek z odborného článku (převzato z [23]), b) 10x přiblížený snímek vypěstované spiruliny

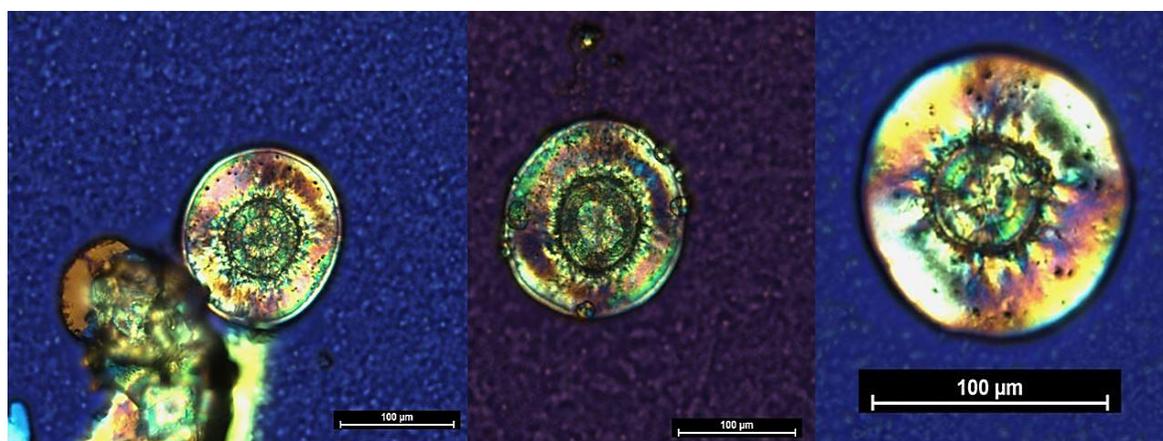
## 10.2 Extrahované PHB

Následující snímky na Obr. 31, Obr. 32 a Obr. 33 zachycují struktury vyextrahovaného PHB, na polarizačním mikroskopu. Jak je na Obr. 31 viditelné, struktura se jeví jako krystalická a je možné vidět útvary připomínající sférolity.



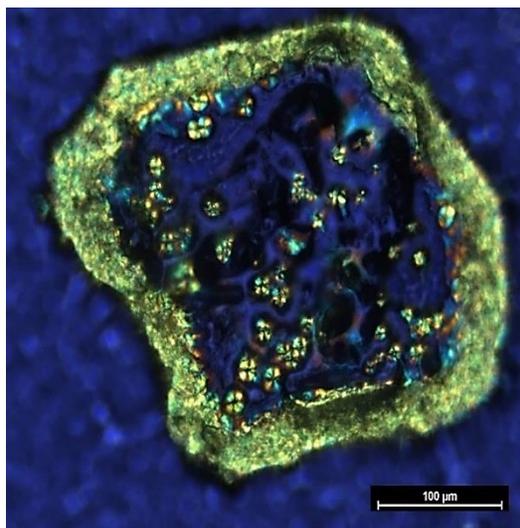
*Obr. 31 Snímky struktury extrahovaného PHB z polarizačního mikroskopu - struktura připomínající sférolity*

Na Obr. 32 jsou zaznamenané útvary, které byly nalezeny ve struktuře vždy samostatně. Předpoklad pro tyto útvary jsou rozpouštědlem rozrušené buňky řasy. Avšak nedošlo u nich ke kompletní extrakci, a proto se tyto útvary nespojili s ostatní strukturou uvedenou na Obr. 31.



*Obr. 32 Snímek struktury extrahovaného PHB z polarizačního mikroskopu - zachycené rozložené buňky řasy*

Poslední snímek z polarizačního mikroskopu je Obr. 33, na kterém je možné vidět z krajů se rozrůstající strukturu, která však nebyla dokončena a uprostřed tohoto útvaru je možné zaznamenat jednotlivé sférolity.



*Obr. 33 Snímek struktury extrahovaného PHB z polarizačního mikroskopu - sférolity vyskytující se v ohraničené oblasti*

### **10.3 Závěr extrakce PHB ze spiruliny**

Extrahování biopolymeru z vlastní vypěstované řasy je náročný proces, u kterého nestačí mít pouze domácí vybavení. K extrakci jsou zapotřebí látky, které nejsou běžně dostupné, jako je například chloroform. Pokud by se tento proces provedl v laboratorním prostředí, je pravděpodobné že množství extrahovaného PHB ze spiruliny, by bylo větší. Díky tomu by se mohlo provést více zkoušek, které by vytvořené PHB lépe definovaly.

Zároveň je nutno podotknout, že *Spirulina platensis* neprodukuje velké množství PHB. Existují řasy a sinice, které za specifických podmínek pěstování, produkují větší množství PHB. Jak je již ale výše zmíněno, *Spirulina* byla zvolena především z důvodu nenáročnosti pěstování, kterou lze provádět i v domácích podmínkách.

## 11. Spečení vzorků PLA, PHA a jejich směsi

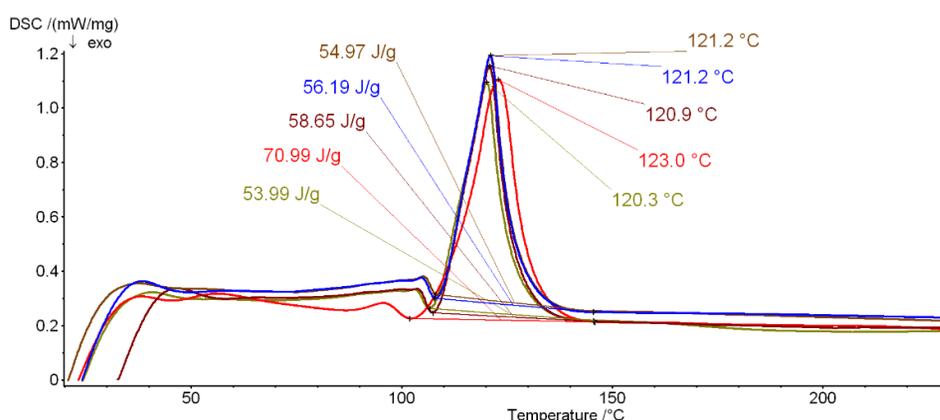
Pro pokračování experimentu se tedy musel zvolit postup, kde se využije PHB, které je vyextrahované specializovaným výrobcem. Bohužel výrobce nedodal kompletní specifikaci o materiálu, a proto není možné s jistotou tvrdit, že se jedná o samotné PHB nebo kopolymer PHBV. Směs PHBV je popsána v teoretické části studie v podkapitole 2.2. Kvůli chybějící specifikaci, se tak bude v práci dále používat obecný název, pro tuto skupinu biopolymerů a to PHA.

Druhým použitým biopolymerem pro výzkum, jsou dva druhy PLA. První byl získaný nasekáním různých PLA filamentů pro 3D tisk. Toto PLA je v práci dále označováno jako PLA<sub>fil</sub>. Druhé zkoumané PLA, dále označované jako PLA<sub>trans</sub>, je transparentní granulát, vedený u výrobce pod označením PLA Luminy LX175. Materiálový list tohoto materiálu je zahrnutý v příloze. [24]

### 11.1 Spečení PHA

Aby se docílilo komplexního výzkumu, bylo zapotřebí zjistit, jak se polymery chovají při různých způsobech zpracování. Prvním bylo prosté spečení PHA v troubě při teplotě 160 °C. Tato teplota se určila z termické analýzy samotného polymeru PHA. Křivka ohřevů je znázorněná na Obr. 34. Při prvním spékání bylo důležité zjistit, kolik gramů prášku je potřeba k vyhotovení vzorků ideálních rozměrů. Při velké tloušťce vzorku, je síla potřebná pro jeho přetržení, nad limitem trhacího zařízení. Naopak malé množství prášku vede k nevyplnění formy a výsledný vzorek je necelistvý, to je možné vidět Obr. 35.

Ke zjištění degradace PHA se provedlo 5 ohřevů pro jeden vzorek. Jak je z křivek na Obr. 34 patrné, první ohřev - červená křivka, má nejvyšší teplotu tání i entalpii tání. Pro každý další ohřev, se tyto vlastnosti snižují. Je tedy důležité brát, postupnou degradaci PHA během zpracování, v potaz.



Obr. 34 DSC křivky pro pětinasobným ohřev PHA, Překlad: Temperature - teplota



Pro veškeré přípravy vzorků v peci, se využila silikonová forma, která odolává teplotám až do 230 °C. Forma znázorněná na Obr. 35, je rozdělena na 20 polí, kde rozměr každého z nich je  $d \times š \times v = 49 \times 26 \times 11$  mm.



Obr. 35 Silikonová forma pro výrobu spečených vzorků

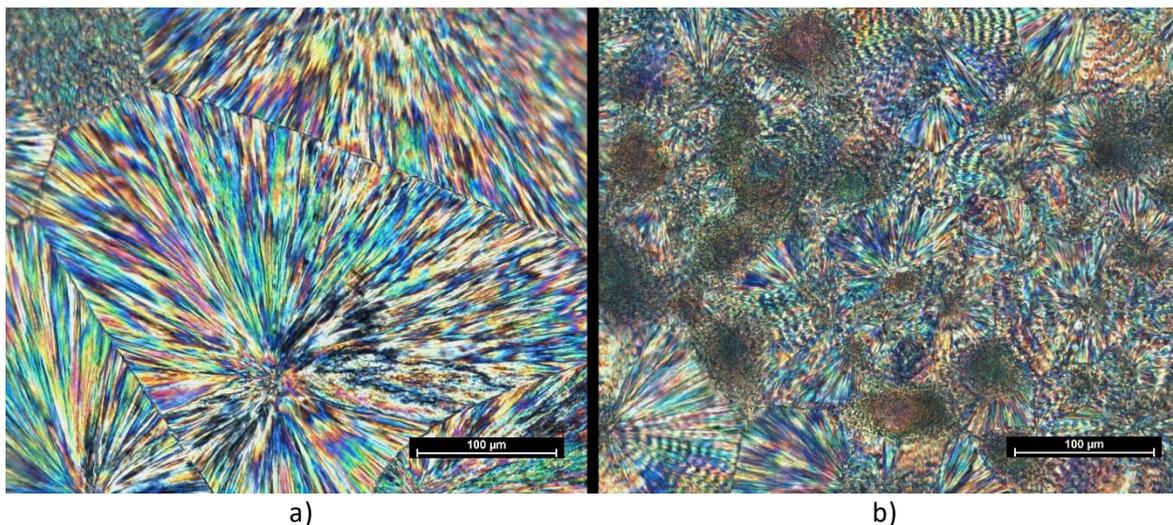
### 11.1.1 Vliv způsobu ochlazování na PHA vzorky

Dále bylo zapotřebí zjistit, jaký vliv na strukturu mají dva odlišné způsoby ochlazování. Tato zkouška se prováděla především kvůli teplotním cyklům, kterým se vystavuje materiál během 3D tisku.

Na Obr. 36 a) je možné vidět strukturu, která se vytvořila po 10 minutách v peci, při teplotě 160 °C s následným ponecháním vzorků ve vypnuté peci. Pec chladla až do teploty 60 °C. Od této teploty se dle DSC křivek, struktura polymeru nijak zásadně nemění. Navíc na tuto teplotu se nahřívá podložka při 3D tisku.

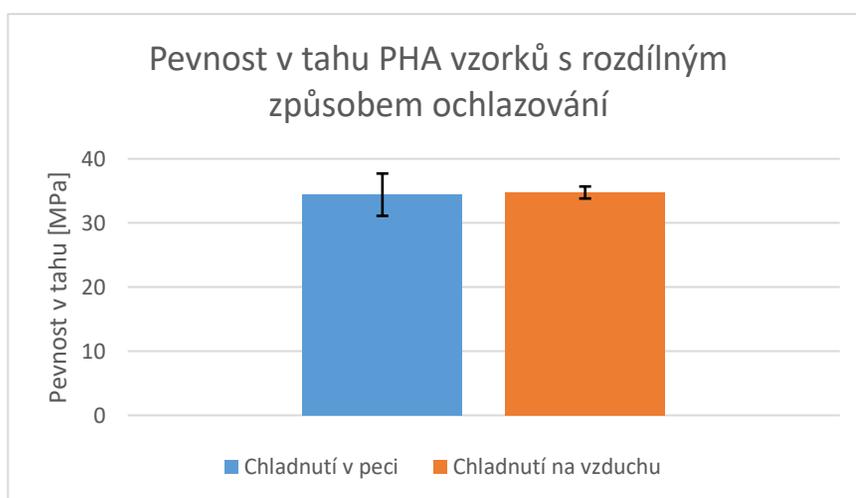
Na Obr. 36 b) je zaznamenaná struktura, která vznikla po rychlém ochlazení na vzduchu. PHA bylo tedy opět spečeno v peci při teplotě 160 °C po 10 minut a následně došlo k jeho vyndání na kamenný stůl.

Při porovnání obou struktur je jasně viditelné, že pomalu ochlazená struktura na Obr. 36 a), má větší sférolity oproti rychle ochlazeným vzorkům, jejichž struktura znázorněná na Obr. 36 b), je o poznání jemnější.



Obr. 36 Rozdíl struktury PHA v závislosti na způsobu ochlazování - a) pomalé chladnutí v peci, b) rychlé ochlazení na vzduchu

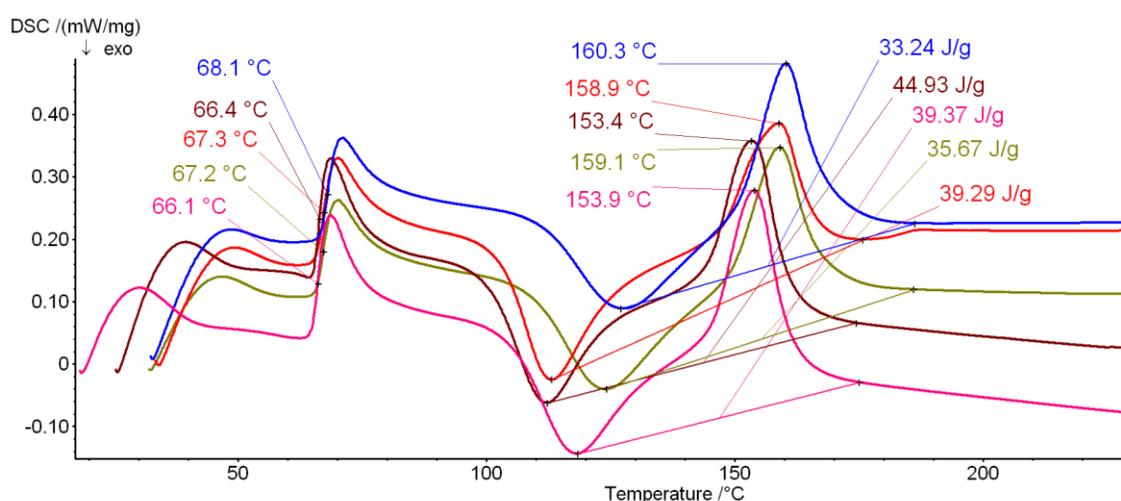
Po tomto zjištění se vzorky podrobily tahové zkoušce, ze které se určila pevnost v tahu  $34,4 \pm 3,3$  MPa pro vzorky ochlazené v peci a  $34,8 \pm 0,9$  MPa pro vzorky ochlazené na vzduchu. Rozdíl v pevnosti tedy není nijak zásadní. Rozdílná však byla větší odchylka pevnosti v případě vzorků chladnoucích v peci. To může být způsobeno odlišně velkými sférolity, které byly ve struktuře vyzorovány a vytvářely tak ve vzorku nekonzistentnost struktury. V porovnání s jemnou strukturou na Obr. 36 b), je viditelné že sférolity mají podobný rozměr, a tedy i výsledky pevnosti jsou s menší odchylkou. Grafické porovnání pevností je uvedené na Obr. 37.



Obr. 37 Grafické znázornění pevnosti v tahu PHA, závislé na způsobu ochlazování

## 11.2 Spečení PLA

Pro spečení vzorků z PLA, se musela teplota v peci zvýšit na 210 °C, přesto tato teplota vedla v případě PLA<sub>fil</sub>, pouze ke spojení jednotlivých částí nasekaného filamentu. Nedošlo k úplnému roztavení a povrch vzorků byl strukturovaný, což vedlo k proměnlivé tloušťce vzorku. Pevnost v tahu takto vytvořených vzorků, je uvedena v podkapitole 12.1, ve které se zároveň porovnává pevnost, v rámci přípravy technologií spečení a 3D tisknutí. Na Obr. 38 jsou zaznamenané DSC křivky pro ohřev vybraných druhů filamentů. Teplota vyskytující se vlevo na Obr. 38, je teplota skelného přechodu, další charakteristikou je teplota tání a posledním údajem je entalpie tání.

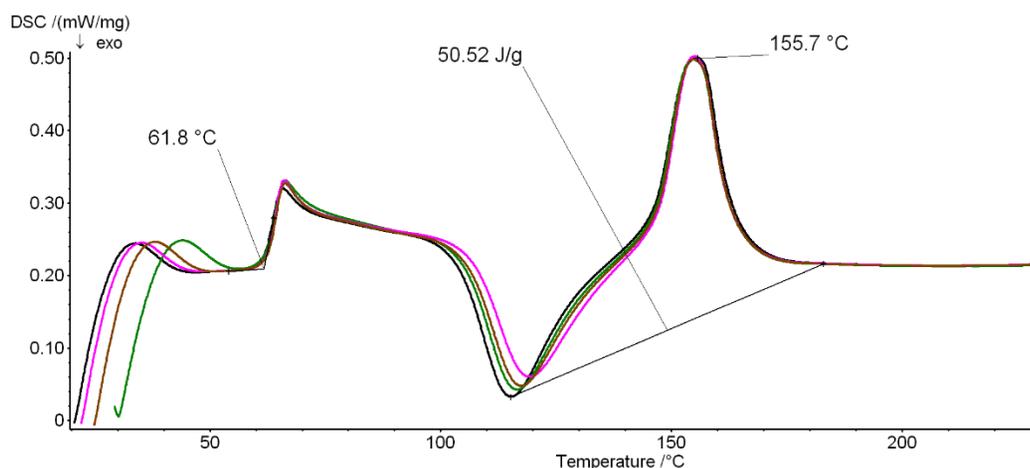


Obr. 38 DSC křivky ohřevu PLA<sub>fil</sub> pro vybrané druhy filamentu, Překlad: Temperature - teplota

Druhé PLA<sub>trans</sub>, bylo také zpracovááno v peci při teplotě 210 °C. V tomto případě se však materiál roztavil a vytvořil rovnoměrné vzorky s konstantní tloušťkou. Důvodem nerovnoměrných vzorků v případě PLA<sub>fil</sub>, mohla být přidaná aditiva a barviva, která proces roztavení omezovala.

Křivky z DSC zkoušky, jsou uvedeny na Obr. 39. V tomto případě se opět provádělo 5 ohřevů jednoho vzorku, pro zjištění možné degradace materiálu během zpracování. Jak je ale možné vidět, křivky jsou pro všechny ohřevy téměř totožné.

Struktura u obou typů PLA vzorků, se v rámci různých druhů ochlazování neměnila, a proto nebylo potřebné jí zaznamenávat. Avšak struktura samotného PLA<sub>trans</sub>, se ve studii vyskytuje, v rámci porovnání struktur v podkapitole 12.1.



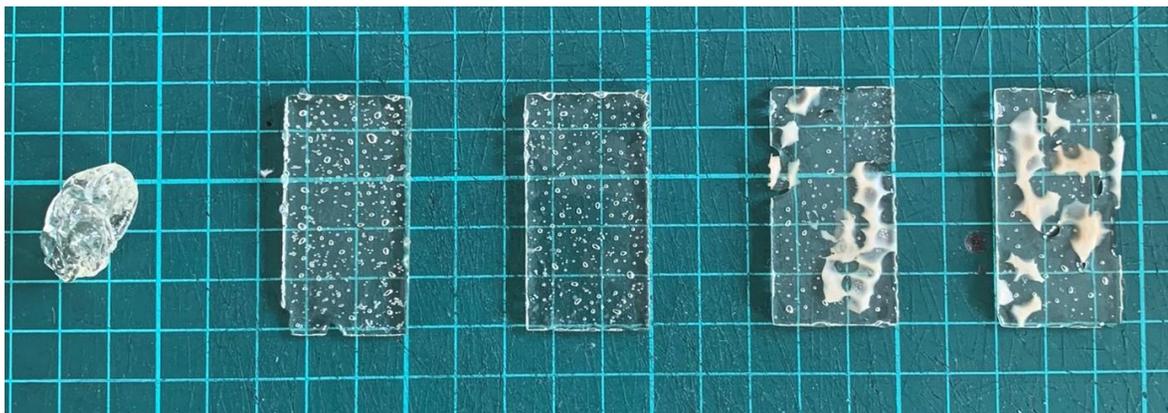
Obr. 39 DSC křivky pro pětinasobný ohřev PLA *trans*, Překlad: Temperature - teplota

### 11.3 Spečení směsi PLA-PHA

Po prvních spečených vzorcích, připravených pouze z jednoho či druhého biopolymeru, se přešlo na pokus, kdy se do formy vložila směs PLA-PHA v následujících koncentracích: 95-5, 90-10, 85-15. Od této části se zároveň zvolil pouze jeden materiál PLA, kdy se usoudilo, že pro lepší zkoumání vzájemného mísení a konečných vlastností, bude lepším zástupcem PLA<sub>trans</sub>, které není směsí různých druhů PLA. Tím se eliminují možné vlivy přísad, které se v PLA<sub>fil</sub> vyskytují.

Předpokladem pro spečení této směsi byla potřebná vyšší teplota, než při spékání samotného PHA. Z termické analýzy PHA, kde se ohřevy prováděly do teploty 230 °C, bylo viditelné, že polymer ani při této teplotě nedegraduje. Zvolila se tudíž stejná teplota, jako v případě zpracování samotného PLA<sub>trans</sub>, tedy 210 °C.

Při praktickém pokusu, kdy obě složky překonaly teplotu tání, však nedošlo k postupnému promísení vlivem difúzních jevů. Viskozita taveniny byla stále příliš velká, a proto se zkusilo taveninu ve formě rozmístit manuálně. Výsledkem bylo, že se vlivem PLA tavenina lepila na nástroj. Takto zamíchaný vzorek je možné vidět vlevo na Obr. 40. Po tomto pokusu se přešlo na technologii extruze, kde se předpokládalo lepší promísení obou polymerů.



*Obr. 40 Spečené PLA vzorky - zleva: pokus o promísení při ohřevu nad teplotu tání PLA, samotné PLA - malé množství granulátu granulátu nedoteklý vzorek, samotné PLA*

## 12. Extruze filamentu PLA, PHA a jejich směsi

Vytvoření filamentu bylo zajištěno extrudérem Noztek Pro, který je znázorněn na Obr. 41. Do zásobníku se vkládá polymerový granulát, který je vyhříváným šnekem unášen k trysce. Vnitřní průměr trysky je volen dle požadovaného průměru vystupujícího filamentu. Pro tuto práci se využívala tryska s vnitřním  $\varnothing$  1,75 mm. Při zvolení většího průměru, bychom nemohli filament použít pro nám dostupné 3D FDM tiskárny, které mají trysku a především extrudér přizpůsobený právě k  $\varnothing$  1,75 mm. Naopak při menších průměrech filamentu, by nebyl unášecí mechanismus extrudéru v 3D tiskárně v kontaktu se strunou a nedocházelo by tak k jeho posouvání a tím pádem k samotnému tisknutí.

Druhý regulační parametr extrudéru Noztek Pro je teplota šneku. Výhřev se zpravidla volí pod teplotou tání zpracovávaného polymeru. Při nastavení teploty na teplotu tání daného plastu, by nedocházelo k tvorbě filamentu, nýbrž k tečení roztaveného materiálu z trysky. Naopak při nízkých teplotách je šnek více namáhán a především nedochází k požadovanému promísení plastu.

Šnek je poháněn elektromotorem Phidgets o výkonu 25 W. Tento výkon nelze regulovat, tudíž otáčky šneku jsou fixně nastaveny výrobcem na 60 ot./min.

Třetí regulační člen je navíjecí cívka, která slouží k navíjení vytvořeného filamentu. Filament tedy vystupuje z trysky, pokračuje do pasivního hliníkového chlazení a následně se navíjí na cívku. Rychlost navíjení cívky se dá regulovat pomocí potenciometru. Pokud se cívka otáčí rychleji, než je výstupní rychlost filamentu z trysky, struna má tendenci se ztenčovat a následně může dojít k jejímu přetrhnutí. Naopak při pomalé rychlosti navíjení se filament mezi tryskou a pasivním chlazením prověšuje a díky jeho vlastní váze může dojít ke ztenčení a následnému přetrhnutí. To se děje především u polymerů s vysokým tzv. melt flow indexem, který definuje tok taveniny termoplastického polymeru.

Polymer který má nízký melt flow index, je soudržnější a nedojde tak snadno k přetržení filamentu. U takového polymeru dochází při nízkých otáčkách navíjecí cívky k jeho vrstvení na ochranné mřížce větráku na extrudéru. Takto navrstvený filament se k sobě přitaví a stává se pro další zpracování nepoužitelným.



Obr. 41 Šnekový extrudér Noztek Pro

## 12.1 Extruze PLA filamentu

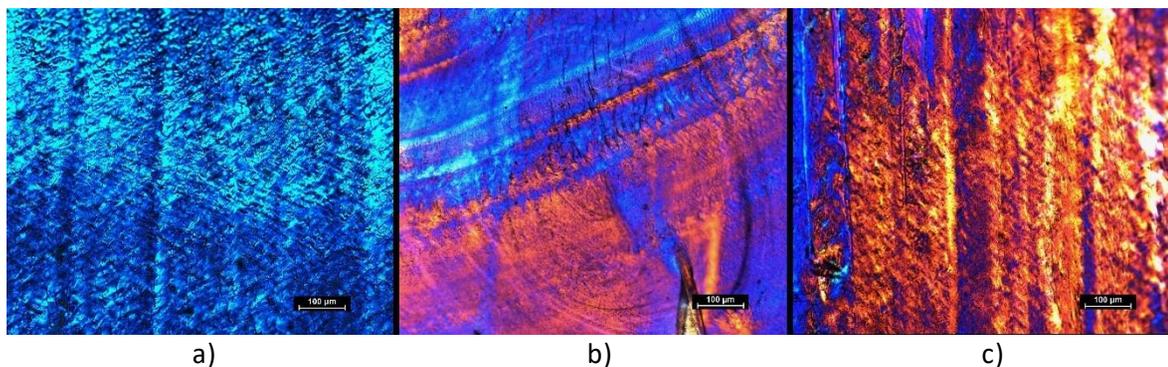
Prvním pokusem na extrudéru, bylo zpracování obou druhů PLA aby bylo možné porovnat jejich pevnosti. Teplota extruze PLA, se určila nejprve z termické analýzy a následně z experimentálního zkoušení. Jako nejhodnější se jevila teplota 150 °C.

Výsledný filament pro PLA<sub>fil</sub>, je znázorněný na Obr. 42 a), filament z PLA<sub>trans</sub> je na Obr. 42 c) a porovnání obou filamentů se vstupním materiálem, je možné vidět na Obr. 42 b). Struna měla v obou případech téměř konstantní průměr, pohybující se od Ø 1,5 do Ø 1,8 mm. Vzhledem k tomu bylo možné bez jakýchkoli problémů použít filament pro 3D tisk.



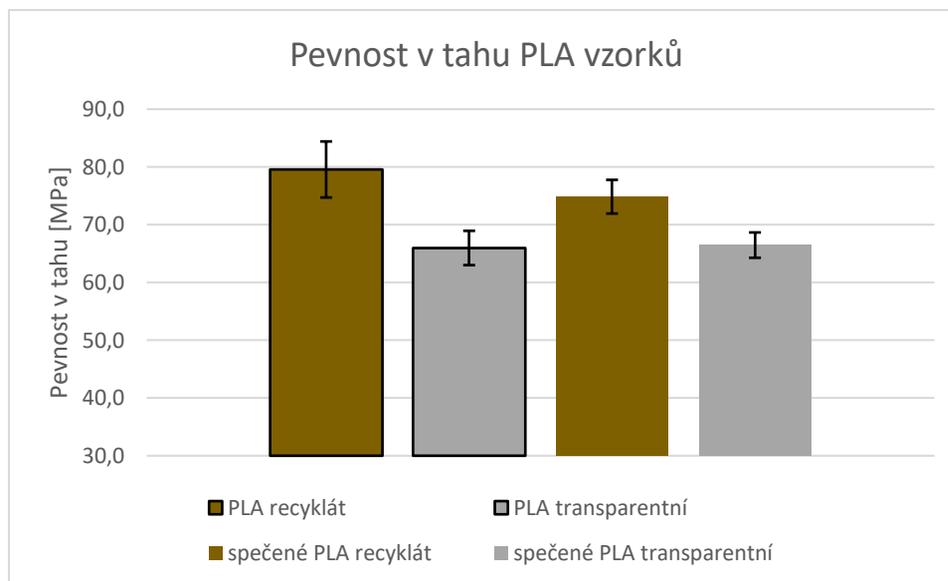
Obr. 42 PLA filament - a) filament PLA<sub>fil</sub>, b) porovnání obou vstupních materiálů a filamentů, c) filament PLA<sub>trans</sub>

Na Obr. 43 je uvedená struktura spečeného vzorku, extrudovaného filamentu a vytištěného vzorku. Z porovnání je viditelné, že se jedná o amorfní strukturu, a druh zpracování na ní nemá významný vliv. Ve strukturách si lze povšimnout rovnoběžných linií, ty jsou způsobeny od břitu nože při řezání fólie. Tyto linie jsou viditelné především na Obr. 43 a) a Obr. 43 b). Na Obr. 43 c) jsou rovnoběžné linie více znatelné, to je způsobeno druhem zpracování, kdy jednotlivé linie, odpovídají vrstvám vznikajících při 3D tisku.



Obr. 43 Struktura PLA na způsobu zpracování - a) spečený vzorek, b) vytvořený filament, c) vytisknutý vzorek

Spečené a vytištěné vzorky se podrobily zkoušce pevnosti v tahu. Výstupem je grafické porovnání pevností na Obr. 44. Z této zkoušky lze zhodnotit, že metoda přípravy nemá na pevnost zásadní vliv. Větší rozdíl pevností se vyskytuje u vzorků z PLA<sub>fil</sub>. Tento jev je nejspíše způsobený obsahem vzduchových bublin ve spečeném vzorku. Vzduch se mezi jednotlivými kusy filamentu nedostal na povrch vzorku a vytvořil ve struktuře bubliny, které následně ovlivnily průřez vzorku. Vyšší pevnost v případě PLA<sub>fil</sub>, je nejspíše způsobená aditivou, které se v PLA<sub>fil</sub> vyskytují.



Obr. 44 Grafické znázornění pevnosti v tahu pro PLA<sub>fil</sub> a PLA<sub>trans</sub>

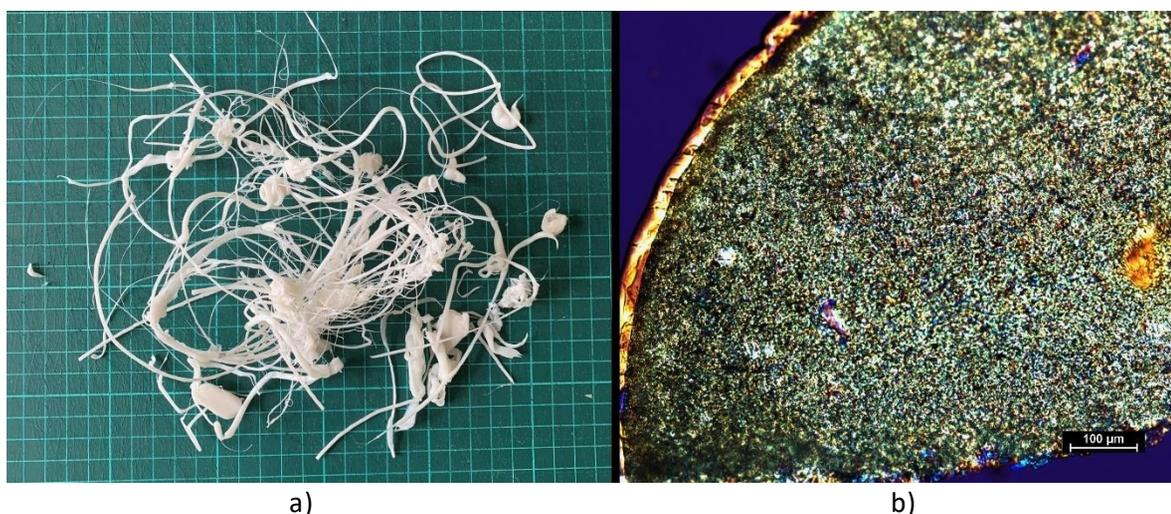
## 12.2 Extruze PHA filamentu

Pro extruzi PHA filamentu, byl použit materiál, který se nejdříve spekl v peci. Následně byly vzorky podrobené tahové zkoušce, po které došlo opět k roztavení vzorků. Účelem tohoto roztavení byla snaha o vytvoření fólie, která se nastříhá a rozseká na malé dílky, které bude možné zpracovat na extrudéru. Tento proces nejen že demonstruje proces recyklace, ale zároveň eliminuje problém s propadáváním polymeru ve formě prášku skrz extrudér.

Teplota extruze se opět orientačně určila z DSC zkoušky pro PHA. Přesněji se teplota experimentálně určila až u extrudéru, kdy se postupně zvyšovala po 5 °C. Nejlepší průběh extruze byl zaznamenaný při teplotě 110 °C.

Jak je vidět na Obr. 45, výsledný filament je pro 3D tisk nepoužitelný. Jeho průměr se pohybuje od 0,1 mm do 3 mm. Tenké vlákno z trysky vystupovalo i bez zapřícení navíjecí cívky, která by tloušťku struny mohla ovlivnit. Filament se tedy navíjel ručně, jelikož na své trase k navíjecí cívice, se obvykle díky svému malému průměru přetrhl. Navíc regulace otáček cívky má určitou prodlevu k vystupujícímu filamentu, což v tomto případě zapříčinilo neregulovatelný proces. Dalším důvodem proč samotné PHA není dobrým kandidátem na vytváření filamentů je, že i přes tenkou tloušťku se v některých místech u trysky náhle začal hromadit vystupující materiál a vytvořil na struně velké částice.

Výše popsané důvody měly za následek přehodnocení tvorby filamentu z čistého PHA. Studie se proto dále orientovala k tvorbě filamentu na bázi směsi PLA-PHA.



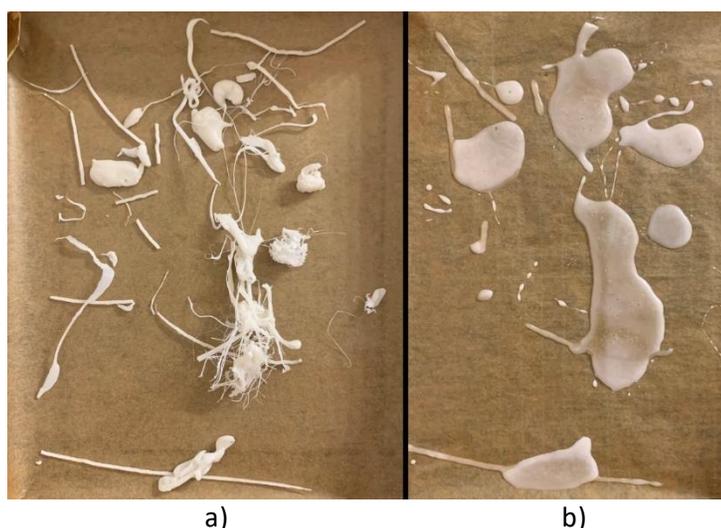
Obr. 45 PHA filament - a) vytvořený filament z extrudéru, b) 10x přiblížený snímek struktury z polarizačního mikroskopu



## 12.3 Extruze filamentu směsi PLA-PHA

Pro zachování maximálního využití už jednou použitého materiálu a možnosti výzkumu degradace PHA, se vzniklá struna opět zpracovala, aby se z ní vytvořil granulát použitelný pro další extruzi.

Vytvořený filament z kapitoly 12.2 se umístil do pece, kde se znovu roztavil při teplotě 160 °C po dobu 15 minut. Po roztavení a opětovném ochlazení, se vzniklá fólie znázorněná na Obr. 46 b), opět nastříhala a rozdrtila na malé části simulující granulát.



Obr. 46 Příprava PHA granulátu pro extruzi - a) nepovedený filament, b) PHA fólie připravená k nadrcení

Směs polymerů PLA-PHA se pro extrudér připravila v hmotnostních poměrech 95-5, 90-10, 85-15, 80-20, 75-25, kde první hodnota je vždy množství PLA a druhá množství PHA ve směsi.

Připravené směsi se po vyčištění extrudéru samotným PLA, dávkovali do zásobníku po jednotlivých koncentracích.

## 13. Tisk vzorků na 3D tiskárně

### 13.1 Druhy 3D tisku polymerů

Existují různé metody 3D tisku polymerů, níže je popis několika nejpoužívanějších principů: [25]

- **Fused Deposition Modeling (FDM)** je nejvíce rozšířená metoda 3D tisku. Při této metodě se termoplastický filament, roztavuje v tiskové hlavě a tryskou se postupně nanáší na podložku vrstvu po vrstvě, čímž se vytváří 3D objekt.

- **Stereolitografie (SLA)** je metoda 3D tisku, která využívá fotosenzitivních pryskyřic, které tuhnou pomocí UV záření. Při tisku je vrstva pryskyřice vystavena laserovému paprsku, který ji vytvrdí. Modely vytištěné metodou SLA dosahují velmi vysokých detailů a přesnosti.
- **PolyJet** princip této metody je obdobný jako u inkoustové tiskárny. Při tisku z hlavy tryská fotopolymerní materiál na podložku v tenkých vrstvách. Ten je následně vystaven UV světlu, díky kterému se vytvrdí. PolyJet umožňuje tisknout s různými materiály a vytvářet vícebarevné objekty.

## 13.2 Tisk vzorků

Pro zajištění stejných podmínek tisku, probíhala příprava veškerých zkušebních vzorků na jedné FDM tiskárně Creality Ender 3 Pro, znázorněné na Obr. 47. Tato tiskárna se zvolila z důvodu dobré flexibility odvíjející se z odděleného extrudéru a tiskové hlavy. Vzhledem tomu je možné nastavovat filament, aniž by došlo k přerušení tisku. Tato vlastnost je vhodná především pokud je průměr filamentu proměnlivý a je potřebné část, která neprojde extrudérem, nastavit strunou s menším průměrem. V níže uvedené Tab. 8, jsou uvedeny parametry tisku, které se experimentálně určili jako nejvhodnější a následně byly použité pro veškeré vzorky.

Tab. 8 Použité parametry tisku

Výška první vrstvy	0,2 mm	Průměr trysky	0,4 mm
Výška vrstvy	0,12 mm	Teplota trysky první vrstvy	210 °C
Hustota výplně	100 %	Teplota trysky ostatních vrstev	205 °C
Vzor výplně	přímočarý	Teplota podložky	60 °C
Úhel výplně	45°	Čas tisku jednoho vzorku	15 min
Perimetry	3	Spotřeba filamentu	0,51 m



Obr. 47 3D tiskárna Creality Ender 3 Pro

### 13.3 Směs 95-5 – PLA-PHA

Jak je možné vidět na Obr. 48, filament vzniklý z tohoto poměru směsi, měl velký průměr. Tím pádem jej nebylo možné použít pro 3D tisk, jelikož ani jedna část vzniklé struny neměla průměr menší jak 2 mm. Tento průměr je limitní hodnotou pro extrudér v 3D tiskárně Creality Ender Unity.

U této koncentrace směsi tedy proběhla tahová zkouška ze struny, nikoli z vytištěných vzorků, jak tomu bylo u ostatních koncentrací.

### 13.4 Směs 90-10 – PLA-PHA

Tisk z tohoto filamentu byl stále problematický, průměr byl na většině částech struny nad 2 mm. Bylo však možné najít části, které byly pod touto hodnotou, obvykle ale tato část nestačila pro vytištění jednoho vzorku, a tak se filament musel v extrudéru 3D tiskárny nastavovat. Jakmile se průměr struny zvětšil nad 2 mm, filament se zasekl v extrudéru a tisk pokračoval tzv. ve vzduchu.

### 13.5 Směs 85-15 – PLA-PHA

V případě tohoto poměru směsi bylo tištění vzorků snazší. Na filamentu bylo možné najít části, ze kterých se dal vytisknout celý vzorek, bez nastavování struny.

### 13.6 Směs 80-20 – PLA-PHA

Tento poměr směsi byl ze všech nejvíce vyhovující. Průměr filamentu se stále pohyboval okolo kritické hranice 2 mm, avšak některé části struny, bylo možné použít pro tisk dvou vzorků, aniž by se musela struna měnit, či jakkoli nastavovat. Jak je z Obr. 48 patrné, filament připravený ze směsi 95-5, má o poznání větší průměr, než filament ze směsi 80-20.



Obr. 48 Extrudovaný filament ze směsi PLA-PHA na obrázku vlevo 95-5, vpravo 80-20

## 13.7 Směs 75-25 – PLA-PHA

Se zvyšujícím poměrem PHA ve směsi, se začaly projevovat problémy, které byly obdobné jako při extruzi filamentu obsahujícího pouze PHA. Filament směsi 75-25, zobrazený na Obr. 49, zásadně měnil svůj průměr, aniž by došlo ke změně podmínek extruze. Průměr struny nyní kolísá spíše k nižším hodnotám, což je pro extrudér v 3D tiskárně také nevhodné. Malý průměr má zapříčinění toho, že mechanismus extrudéru není s filamentem v kontaktu, a tím pádem se filament nedostává do tiskové hlavy.

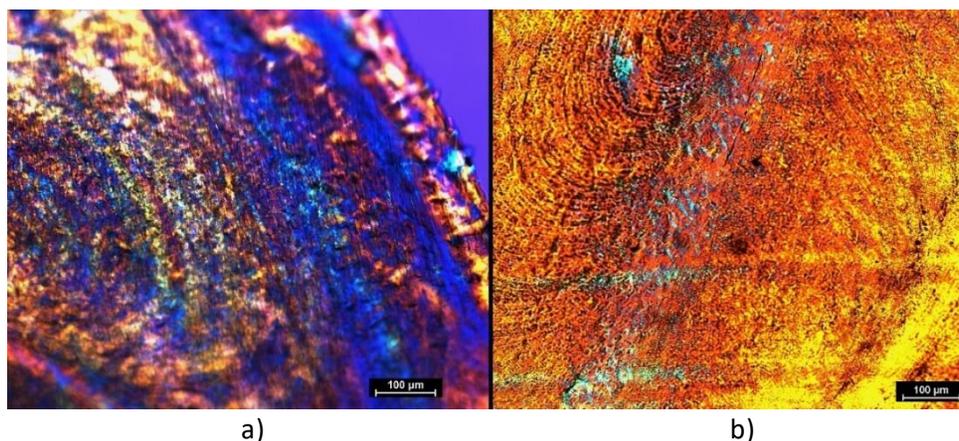


Obr. 49 Extrudovaný filament směsi 75-25

## 14. Vyhodnocení vlastností vytisknutých vzorků

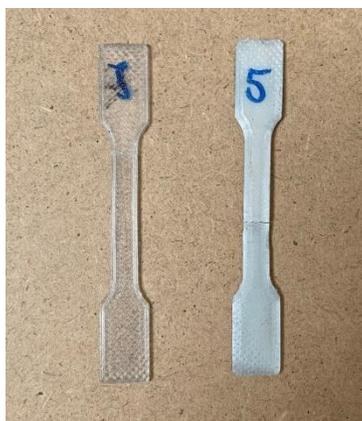
### 14.1 Struktura směsi

Na níže uvedeném Obr. 50, jsou zobrazeny snímky struktury směsi PLA-PHA 75-25 z polarizačního mikroskopu. Tato směs se zvolila z důvodu nejvyšší koncentrace PHA, ze všech vyrobených vzorků. Struktura by tedy měla obsahovat nejvíce krystalických oblastí, které jsou charakteristické pro PHA. Zároveň snímky slouží pro porovnání struktury vytvořeného filamentu, nacházejícího se na Obr. 50 a), s vytištěným vzorkem, jehož struktura je uvedena na Obr. 50 b). Na obou snímcích je možné vidět oblasti PHA rozložené v amorfni struktuře PLA.



Obr. 50 Směs 75-25 (PLA-PHA) - a) vytvořený filament, b) vytisknutý vzorek

Vizuální rozdíl vytisknutých vzorků, je možné i na první pohled vidět z makroskopického měřítka. Pro názornost se na níže uvedeném Obr. 51, vyskytují vzorky vlevo PLA<sub>trans</sub> a vpravo PLA-PHA 75-25.



Obr. 51 Vytisknuté vzorky pro zkoušku tahem - na obrázku vlevo PLA<sub>trans</sub>, vpravo PLA-PHA 75-25

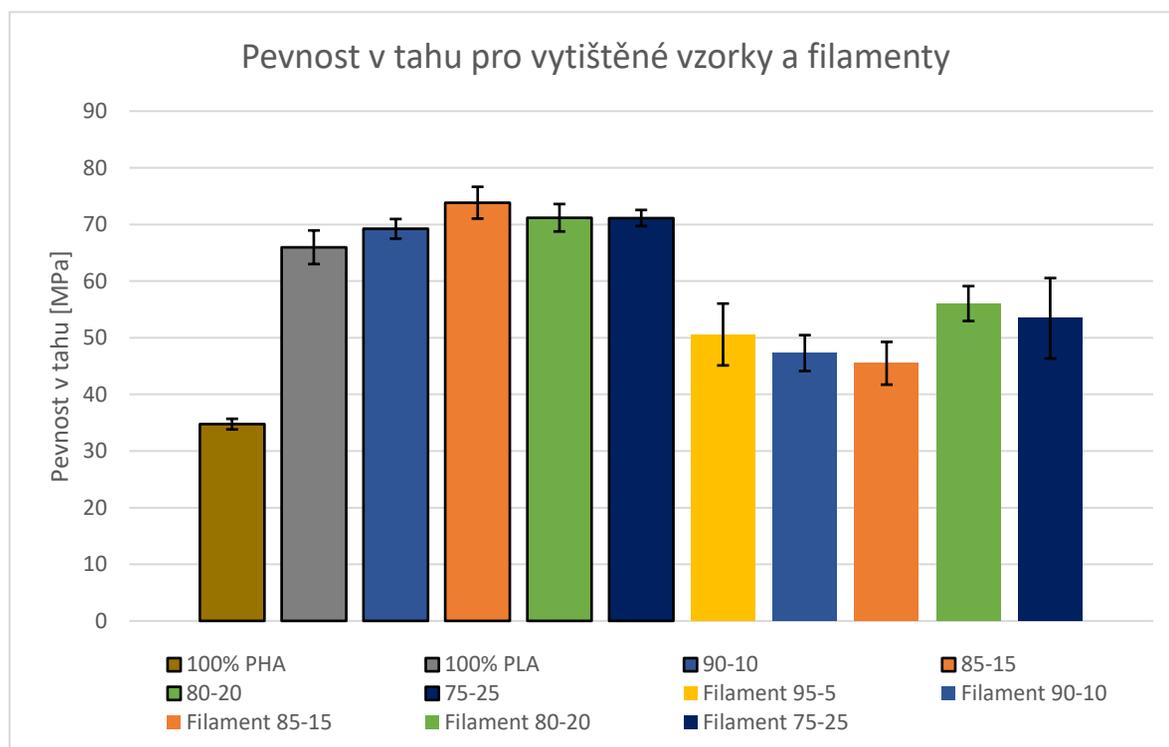
## 14.2 Stanovení pevnosti v tahu

Sloupcový graf na Obr. 52, zaznamenává veškeré pevnosti vytvořených filamentů a vytištěných vzorků, v porovnání se samotným PLA<sub>trans</sub> a PHA. Pevnost PHA se volila pouze ze spečených vzorků, neboť z filamentu nebylo možné vzorky vytisknout.

Jak je z grafického porovnání na Obr. 52 patrné, přidáním polymeru PHA do PLA<sub>trans</sub>, příznivě ovlivňuje výslednou pevnost vytištěných vzorků. Z experimentu se jako nejideálnější poměr směsi jeví 85-15, jehož pevnost dosahuje hodnoty 73,8 MPa. V porovnání s PLA<sub>trans</sub>, u kterého je pevnost vytištěných vzorků 66 MPa, došlo ke zlepšení pevnosti v tahu o 10 %.

U filamentů jsou pevnosti nižší, to je nejspíše způsobeno proměnlivou tloušťkou struny a teoretickým chybám ve struktuře, které mohou být způsobeny nedokonalým navíjením struny. Další možností je nedostatečné chlazení struny, kde i přes použití pasivního hliníkového hlazení, docházelo ke spečení jednotlivých závitů filamentu na cívce.

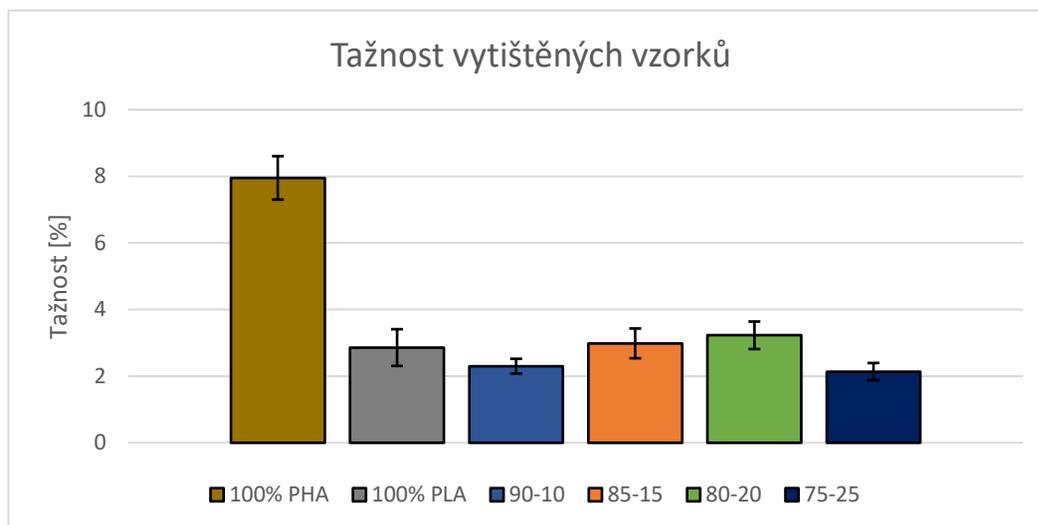
Takto spečená struna se musela následně od sebe mechanicky oddělit, což mohlo mít také vliv na její strukturu a následnou pevnost. Nicméně pevnost filamentu 80-20 dosahovala hodnoty 56 MPa, což je pouze o 15 % méně, než vytištěné vzorky z PLA<sub>trans</sub>.



Obr. 52 Grafické znázornění pevnosti pro PHA, PLA a jejich vzájemné směsi

### 14.3 Stanovení tažnosti

Sloupcový graf na Obr. 53 jasně demonstruje, že největší tažnost má samotné PHA  $A_{PHA} = 8 \%$ . Dle předpokladu samotné PLA<sub>trans</sub> má tažnost nižší, konkrétně  $A_{PLA} = 2,9 \%$ . Tažnost vzorků připravených ze směsí, se pohybovala byla blíže hodnotám pro PLA<sub>trans</sub>. Zlepšení tažnosti se vyskytlo u koncentrace 80-20, kde se tažnost v porovnání s PLA<sub>trans</sub>, zlepšila o 0,3 %. Tato charakteristika opět přispěla k hledisku, že nejlepší koncentrace směsi je 85-15 nebo 80-20. Při vyšším nebo nižším množství PHA v PLA dochází ke zhoršení mechanických vlastností.



Obr. 53 Grafické znázornění tažnosti pro PHA, PLA a jejich vzájemné směsi

## 14.4 Zkouška DSC

Odborná literatura tvrdí, že polymery PHA a PLA jsou nemísitelné, což potvrzují i níže uvedené DSC křivky znázorněné na Obr. 54. Na křivkách pro směs se vždy vyskytují dvě teploty tání, první je pro PHA složku a druhá pro PLA složku ve směsi. Pokud by byly polymery zcela mísitelné, tyto teploty by se spojily do jednoho vrcholu a směs by měla pouze jednu teplotu tání.

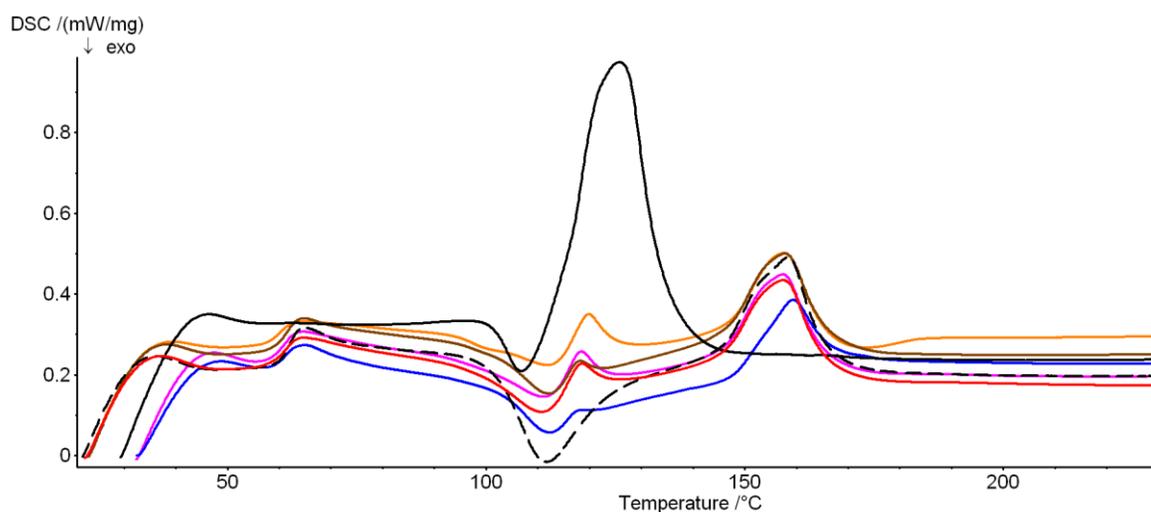
Pro lepší názornost se z DSC křivek zobrazených na Obr. 54, detailně popíše pouze porovnání samotného  $PLA_{trans}$  (černá čárkovaná křivka), samotné PHA (černá křivka) a jejich směs o koncentraci 75-25 (žlutá křivka). K porovnání se volí tato koncentrace z důvodu největšího obsahu PHA ze všech směsí. Vzhledem k tomu můžeme pozorovat, nejvýraznější rozdíly v porovnání s křivkami, obsahující pouze samotné polymery.

Zjištěné charakteristiky pro ostatní koncentrace jsou uvedeny v Tab. 9. Hodnoty odpovídají obdobnému, níže popsanému, průběhu. Jediným rozdílem je snižující se množství PHA ve směsi, díky čemuž se na křivkách projevuje více  $PLA_{trans}$ .

První charakteristikou je teplota skelného přechodu, u samotného PHA se pohybuje okolo 4 °C, což je naší dostupnou technikou neměřitelné. U  $PLA_{trans}$  se tato teplota pohybuje ve vyšších, námi měřitelných hodnotách. Proto bylo možné z DSC křivky pomocí inflexního bodu určit  $T_g_{PLA_{trans}} = 62,1$  °C. U směsi 75-25 byla tato teplota nižší o 1,8 °C tedy  $T_g_{75-25} = 60,3$  °C. Následujícím parametrem je teplota tání, která je porovnatelná pro oba polymery i jejich směs. Teplota tání pro samotné PHA byla  $T_m_{PHA} = 125,8$  °C, ve směsi se tato teplota snížila na  $T_{m_{PHA\ 75-25}} = 119,9$  °C. V případě samotného  $PLA_{trans}$  byla  $T_m_{PLA} = 158,4$  °C a pro směs  $T_{m_{PLA\ 75-25}} = 157,5$  °C, v obou případech tak ve směsi dochází ke snížení teploty tání. Dle toho je možné usoudit, že se polymery vzájemně ovlivňují. Zároveň díky vícenásobným ohřevům, uvedených v podkapitole 11.1 a 11.2, je možné usoudit, že tato

teplotní změna nemá souvislost, s degradací polymerů v důsledku vícenásobného tepelného zpracování.

Posledním zjištěnou charakteristikou směsi, je entalpie tání, která se snížila z  $E_{PLA} = 61,28 \text{ J/g}$  a  $E_{PHA} = 71,51 \text{ J/g}$  na  $E_{75-25} = 30,63 \text{ J/g}$ . Z DSC křivek je dále možné vypočítat, že v případě směsi se oproti samotným polymerům, markantně snížila oblast dokrystalizace. Ta je obecně definovaná jako energie potřebná pro dokrystalizování struktury v závislosti na zvyšující se teplotě. Tato energie je pro směs 75-25 téměř nulová.



Obr. 54 DSC křivky ohřevu pro PHA, PLA a jejich vzájemné směsi, Překlad: Temperature - teplota

Tab. 9 Charakteristiky samotných polymerů a směsí určených z DSC zkoušky

Vzorek	$T_g$ [°C]	$T_m$ PHA [°C]	$T_m$ PLA [°C]	E [J/g]
100 PHA	-	125,8	-	71,51
95-5	61,4	118,9	159,4	25,31
90-10	61,6	112,1	157,8	38,82
85-15	61,1	118,5	157,5	34,65
80-20	61,5	118,7	157,5	40
75-25	60,3	119,9	157,5	30,63
100 PLA <sub>trans</sub> (čárkovaná)	62,1	-	158,4	61,28



## 15. Degradace PHA

Jedna z nejdiskutovanějších vlastností u biopolymerů je jejich degradace vznikající vlivem vícenásobného zpracování.

Jak je již výše uvedeno, v této studii byla snaha využít malé množství biopolymeru PHA k získání co nejvíce výsledků. Zkoumaný degradovaný PHA vzorek, byl během studie podroben následným zpracovatelským metodám a zkouškám:

- Spečení polymeru PHA v peci při teplotě 160 °C po dobu 10 minut, s následným ochlazením na vzduchu. U takto vytvořených vzorků proběhla tahová zkouška.
- Přetrhnuté vzorky byly opět spečeny v peci při teplotě 160 °C po dobu 10 minut za účelem vytvoření tenké fólie. Ta se následně rozešla na malé části, potřebné pro extruzi.
- Extruze při 115 °C - vytvoření nepovedeného filamentu, viz kapitola 12.2.
- Spečení filamentu při teplotě 160 °C po dobu 10 minut, opět za účelem vytvoření tenké fólie, která se rozešla na malé části.
- Tyto vytvořené části se spekly v silikonové formě při teplotě 160 °C po dobu 10 minut a následně u nich proběhla zkouška tahem.

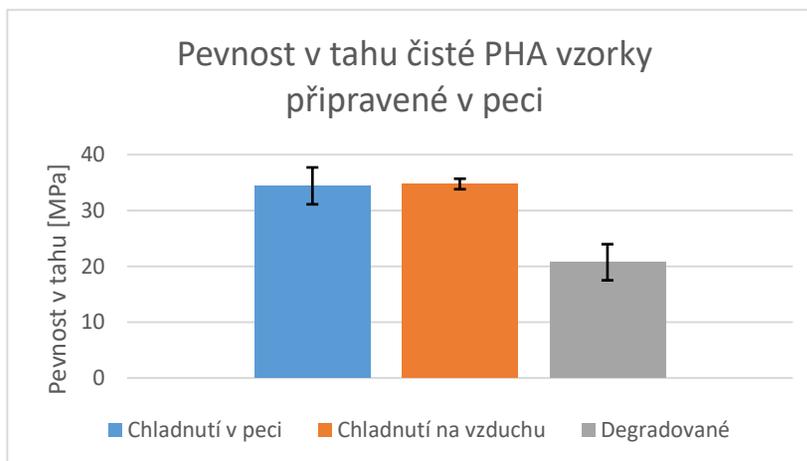
Degradace PHA je patrná už od prvního pohledu. Degradované vzorky, nacházející se v horní řadě na Obr. 55, mají tmavší vzhled a jsou na nich viditelné mapy. Jednou zpracované vzorky, se nacházejí ve spodní řadě na Obr. 55.



Obr. 55 Horní řada degradované vzorky PHA; spodní řada vzorky PHA jednou zpracované v peci

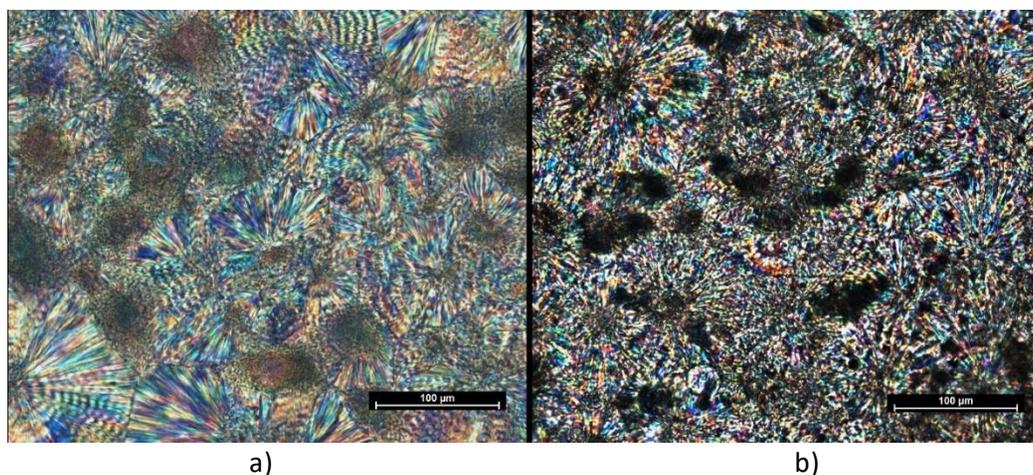
Diagram na Obr. 56 porovnává pevnost v tahu PHA vzorků. První dva sloupce jsou pro vzorky, které prošly jedním zpracováním s rozdílným ochlazením. Poslední sloupec udává pevnost v tahu degradovaných vzorků.

Pevnost v tahu degradovaného PHA byla 20,7 MPa, u vzorků s jedním ohřevem byla pevnost 34,8 MPa. Rozdíl je tedy 14,1 MPa. To je z procentuálního hlediska snížení pevnosti o 40 %.



Obr. 56 Grafické znázornění pevnosti PHA vzorků po prvním zpracování (Chladnutí v peci a Chladnutí na vzduchu) v porovnání s pětinasobným zpracováním (Degradované)

Snímek struktury degradovaného a jednou zpracovaného vzorku, je znázorněný na Obr. 57. Pro porovnání je uveden vzorek, který byl připraven spečením v peci, s následným ochlazením na vzduchu.



Obr. 57 Porovnání struktury PHA - a) jeden cyklus zpracování s následným chladnutím na vzduchu, b) pětinasobné zpracování

Z porovnání je jasně viditelné, že struktura jeví značné známky degradace. Sfěrolity jsou u degradované struktury o poznání tmavší a v některých místech došlo k jejich úplné degradaci v podobě černých skvrn ve struktuře. Tato skutečnost má nejspíše za následek nižší pevnost a vyšší křehkost vzorků.

## 16. Diskuze

První část výzkumu, se zaměřovala na pěstování řasy spirulina platensis, ze které se následně pomocí extrakce rozpouštědlem vytvářel biopolymer PHB. Vyextrahovaná směs se podrobila polarizační mikroskopii. Ve struktuře se objevovaly útvary připomínající polymerní sférolity, jejich počet byl ale nedostatečný pro další zkoušky. Přesto po tomto zjištění, proběhlo přezkoumání veškerých látek použitých během pěstování a zpracování řasy. Ty se ale projevovaly na polarizačním mikroskopu jiným způsobem. Je tedy velmi pravděpodobné, že se na snímcích struktury jedná o látku nově vytvořenou.

- Metoda extrakce se prováděla v domácích podmínkách, lze tedy usoudit, že pokud by se výzkum přenesl do laboratorního prostředí, bylo by možné z řasy získat biopolymeru více.

Z důvodu malého množství extrahovaného PHB, se ve druhé části experimentu, musel zvolit komerčně dostupný biopolymer PHB. Bohužel výrobce nedodal kompletní specifikaci o materiálu, a proto není možné s jistotou tvrdit, že se jedná o samotné PHB, nebo kopolymer PHBV. Proto se ve studii zvolilo obecné označení této skupiny biopolymerů - PHA. Zároveň se do výzkumu zahrnul i dostupnější biopolymer PLA, často využívaný pro 3D tisk.

Experiment se dále zaměřoval na výzkum samotného PHA, PLA a jejich směsi PLA-PHA. Pro vytvoření směsi s nejprve musela provést termická analýza. Z ní se zjistily teploty tání a krystalizace obou materiálů a ověřila se možná degradace pro vícenásobné ohřevy. Zároveň se musel zjistit vliv PHA na vyšší teploty, které jsou potřebné pro zpracování PLA. Výsledky z těchto zkoušek byly pozitivní, nedocházelo k žádné degradaci a mohlo se pokračovat v dalším výzkumu.

První zkoumanou vlastností byl vliv rychlosti ochlazování na PHA. V prvním případě došlo k rychlému ochlazení a ve druhém k pomalému. Tyto změny se projeví ve struktuře, ale v pevnost se lišila pouze o 1 %. Vliv způsobu ochlazování PLA, nebyl ve struktuře znatelný, a proto se dále nezkoumal.

Po spečení samotných biopolymerů se mohlo přejít k vytvoření směsi v peci. Tato metoda se ale ukázala jako nevhodná a nedošlo téměř k žádnému promísení. Proto se muselo přejít na metodu extruze filamentu, která zaručovala dobré promísení obou složek.

Nejdříve se vytvořil filament z PLA, ze kterého se následně vytiskly vzorky na 3D tiskárně. V případě extruze PHA, filament neustále měnil svůj průřez, což mělo za následek nemožnost použití pro 3D tisk.

- Pro další výzkum extruze samotného PHA, by bylo vhodné použít extrudér s více regulačními prvky, jako je například rychlost otáčení šneku.

Z tohoto důvodu se vytvořily směsi o různých koncentracích PHA a PLA, ze kterých se vyextrudoval filament. U těchto filamentů, se měnící průřez způsobený biopolymerem PHA omezil. Ze struny bylo možné vytisknout vzorky, které se podrobily zkoušce pevnosti v tahu. Veškeré vytištěné vzorky ze směsi PLA-PHA, prokázaly zvýšení pevnosti oproti samotným biopolymerům. Nejlepší koncentrace byla 85-15 (PLA-PHA), u které došlo ke zlepšení pevnosti o 10 %.

Tažnost byla spočítána z pevnostních charakteristik a vyšla pro veškeré koncentrace směsí podobná jako u PLA<sub>trans</sub>. Největší zlepšení tažnosti se vyskytlo u koncentrace 80-20, kde se tažnost oproti samotnému PLA<sub>trans</sub>, zlepšila o 0,3 %.

Pro potvrzení přítomnosti obou biopolymerů ve směsi, se pro veškeré koncentrace provedla DSC zkouška. Z vytvořených křivek bylo jasně viditelné, že čím více PHA je ve struktuře, tím více se jeho vlastnosti ve směsi projeví. Zároveň pomocí DSC křivek se potvrdila omezená mísitelnost těchto biopolymerů, která se prokázala dvěma vrcholy značící teplotu tání na křivce ohřevu.

Omezená mísitelnost byla znatelná i na snímcích struktury, kde bylo možné pozorovat, jak se shluky krystalických oblastí, typických pro PHA nachází v amorfním PLA.

Závěrem studie se zkoumala degradace materiálu PHA, který byl během experimentu pětkrát technologicky zpracován. Pevnost těchto degradovaných vzorků se oproti původním, jednou zpracovaným vzorkům, snížila o 40 %. Při porovnání snímků struktury degradovaného a jednou zpracovaného materiálu, byly ve struktuře znatelné rozdíly v podobě degradovaných sférolitů.

## 17. Závěr

Experimentální část studie se nejprve věnovala **pěstování řasy**, ze které se následně **extrahoval biopolymer PHB**. Ze snímků z polarizačního mikroskopu, lze usoudit, že se ve struktuře nacházely **útvary připomínající polymerní sférolity**. Jejich množství ale bylo minimální, a nebylo tak možné provést více materiálových zkoušek. Z tohoto důvodu byl pro další výzkum zvolen komerčně dostupný materiál **PHA**.

V druhé části experimentu se vstupní materiál rozšířil o biopolymer **PLA**, pro zjištění vlastností **směsi PLA-PHA**.

**Metoda spečení v peci** se ukázala pro vytvoření směsi jako **nevhodná**. Druhou metodou byla **extruze filamentu**, při které došlo k lepšímu vzájemnému promíchání obou biopolymerů. Z filamentu se **vytiskly vzorky na 3D tiskárně**. U všech **vytištěných vzorků** došlo ke **zvýšení pevnosti oproti samotným biopolymerům PHA a PLA**. Nejlepší koncentrace byla **85-15 (PLA-PHA)**, u které došlo ke **zlepšení pevnosti o 10 %**.

Pro zjištění mísitelnosti se vzorky podrobily **diferenciální skenovací kalorimetrii**, ve které se projevila **omezená mísitelnost těchto biopolymerů**. Tato vlastnost byla **potvrzena i na snímcích struktury**.

Závěrem studie se zkoumala degradace materiálu PHA. **Pevnost degradovaných vzorků** se oproti původním, jednou zpracovaným vzorkům, **snížila o 40 %**. Při porovnání snímků struktury degradovaného a jednou zpracovaného materiálu, byly **ve struktuře znatelné rozdíly v podobě degradovaných sférolitů**.

Cíle diplomové práce byly splněny.

## 18. Bibliografie

- [1] EBNESAJJAD, Sina. *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics: Properties, Processing and Applications*. 1st. United States: Elsevier, 2013. ISBN 978-1-4557-2834-3.
- [2] *Biodegradable Polymers: Recent Developments and New Perspectives*. 1st. Croatia, Zagreb: IAPC Publishing, 2017. ISBN 978-953-56942-5-0.
- [3] *Natural Polymers, Biopolymers, Biomaterials, and Their Composites, Blends, and IPNs*. 1st. Canada: Apple Academic Press, Inc, 2012. ISBN 13: 978-1-4665-5939-4.
- [4] *POLY(LACTIC ACID): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications*. 1st. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2010. ISBN 978-0-470-29366-9.
- [5] KHATAMI, Kasra, Mariel PEREZ-ZABALETA, Isaac OWUSU-AGYEMAN a Zeynep CETECIOGLU. Waste to bioplastics: How close are we to sustainable polyhydroxyalkanoates production?. *Waste Management* [online]. 2021, 119, 374-388 [cit. 2023-03-20]. ISSN 0956053X. Dostupné z: doi:10.1016/j.wasman.2020.10.008
- [6] D'ANNA, , ARRIGO a FRACHE. PLA/PHB Blends: Biocompatibilizer Effects. *Polymers* [online]. 2019, 11(9) [cit. 2023-03-20]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym11091416
- [7] HOSEINABADI, Akram, Iraj RASOOLI a Mojtaba TARAN. Isolation and Identification of Poly  $\beta$ -Hydroxybutyrate Over-Producing Bacteria and Optimization of Production Medium. *Jundishapur Journal of Microbiology* [online]. 2015, 8(7) [cit. 2023-03-20]. ISSN 2008-3645. Dostupné z: doi:10.5812/jjm.16965v2
- [8] Polymery. In: <https://publi.cz/> [online]. Liberec: <https://publi.cz>, 2014 [cit. 2020-11-23]. Dostupné z: <https://publi.cz/books/180/Uvod.html>
- [9] DIANURSANTI, , Kanya ALIFIA a Putri SARI. *Solvent extraction of polyhydroxybutyrate with NaClO from Spirulina platensis for capsule ingredients* [online]. 030005- [cit. 2023-02-25]. Dostupné z: doi:10.1063/1.5139342
- [10] RHU, D.H., W.H. LEE, J.Y. KIM a E. CHOI. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production from waste. *Water Science and Technology* [online]. 2003, 48(8), 221-228 [cit. 2023-02-24]. ISSN 0273-1223. Dostupné z: <https://iwaponline.com/wst/article/48/8/221/9203/Polyhydroxyalkanoate-PHA-production-from-waste>

- [11] MUKHERJEE, Tapasi a Nhol KAO. PLA Based Biopolymer Reinforced with Natural Fibre: A Review. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2011, 19(3), 714-725 [cit. 2023-03-20]. ISSN 1566-2543. Dostupné z: doi:10.1007/s10924-011-0320-6
- [12] PLAVEC, Roderik, Slávka HLAVÁČIKOVÁ, Leona OMANÍKOVÁ et al. Recycling possibilities of bioplastics based on PLA/PHB blends. *Polymer Testing* [online]. 2020, 92 [cit. 2023-03-20]. ISSN 01429418. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymertesting.2020.106880
- [13] GIL MUÑOZ, Victor, Luisa MUNETA, Ruth CARRASCO-GALLEGO, Juan DE JUANES MARQUEZ a David HIDALGO-CARVAJAL. Evaluation of the Circularity of Recycled PLA Filaments for 3D Printers. *Applied Sciences* [online]. 2020, 10(24) [cit. 2023-03-20]. ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app10248967
- [14] ALI, Wajid, Hazrat ALI, Sayed GILLANI, Philippe ZINCK a Sami SOUISSI. Polylactic acid synthesis, biodegradability, conversion to microplastics and toxicity: a review. *Environmental Chemistry Letters* [online]. 2023, 21(3), 1761-1786 [cit. 2023-07-21]. ISSN 1610-3653. Dostupné z: doi:10.1007/s10311-023-01564-8
- [15] BARTCZAK, Zbigniew, Andrzej GALESKI a KOWALCZUK. Tough blends of poly(lactide) and amorphous poly([R,S]-3-hydroxy butyrate) – morphology and properties. *European Polymer Journal* [online]. 2013, 49(11), 12 [cit. 2023-03-20]. ISSN 00143057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2013.07.033
- [16] ZEMBOUAI, Idris, Mustapha KACI, Stéphane BRUZAUD, Aida BENHAMIDA, Yves-Marie CORRE a Yves GROHENS. A study of morphological, thermal, rheological and barrier properties of Poly(3-hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate)/polylactide blends prepared by melt mixing. *Polymer Testing* [online]. 2013, 32(5), 842-851 [cit. 2023-03-20]. ISSN 01429418. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymertesting.2013.04.004
- [17] KARKOS, P., S. LEONG, C. KARKOS, N. SIVAJI a D. ASSIMAKOPOULOS. Spirulina in Clinical Practice: Evidence-Based Human Applications. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [online]. 2011, 2011, 1-4 [cit. 2023-07-21]. ISSN 1741-427X. Dostupné z: doi:10.1093/ecam/nen058
- [18] A REVIEW ON CULTURE, PRODUCTION AND USE OF SPIRULINA AS FOOD FOR HUMANS AND FEEDS FOR DOMESTIC ANIMALS AND FISH. In: *Fao.org* [online]. Worldwide offices: -, - [cit. 2023-07-21]. Dostupné z: <https://www.fao.org/3/i0424e/i0424e00.pdf>
- [19] MORAIS, Michele, Christopher STILLINGS, Roland DERSCH, Markus RUDISILE, Patricia PRANKE, Jorge COSTA a Joachim WENDORFF. Extraction of poly(3-hydroxybutyrate)

- from Spirulina LEB 18 for developing nanofibers. *Polímeros* [online]. 2015, 25(2), 8 [cit. 2023-02-25]. ISSN 0104-1428. Dostupné z: doi:10.1590/0104-1428.1686
- [20] DELLY, John Gustav. Essentials of Polarized Light Microscopy. *Essentials of Polarized Light Microscopy*, [online]. Westmont, Illinois: College of Microscopy, 2008, 2008(), 28 [cit. 2023-07-29]. Dostupné z: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/http://www.jysco.com/archives/asbestos/PLM\_reading\_McCrone.pdf
- [21] How to Grow Spirulina at Home. *Amazon Web Services* [online]. USA: Amazon, -, 2006(1), 31 [cit. 2023-02-27]. Dostupné z: <https://s3.amazonaws.com/arena-attachments/359243/e8e0b16c6589a4ceb348786a97dddddfe.pdf>
- [22] Effect of Modified Zarrouk's Medium on Growth of Different Spirulina Strains. *Walailak Journal* [online]. 2014, 2014(1), 9 [cit. 2023-07-29]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/291699334\\_Effect\\_of\\_Modified\\_Zarrouk's\\_Medium\\_on\\_Growth\\_of\\_Different\\_Spirulina\\_Strains](https://www.researchgate.net/publication/291699334_Effect_of_Modified_Zarrouk's_Medium_on_Growth_of_Different_Spirulina_Strains)
- [23] Spirulina picture. In: *Algae-lab.com* [online]. England: -, - [cit. 2023-07-23]. Dostupné z: <https://algae-lab.com/shop/living-algae/culture-sample/spirulina-platensis-m1/>
- [24] Product data sheet: PLA Luminy LX175. In: *Totalenergies-corbion.com* [online]. Netherlands: -, 2022 [cit. 2023-07-30]. Dostupné z: [https://www.totalenergies-corbion.com/media/03xnhcab/pds-luminy-lx175-20220722.pdf?fbclid=IwAR1ZDogeD1b1ddMs\\_EAVQc2XF1L4VjLzmKa1gLdL82Qprz1qKXsstBbuYSU](https://www.totalenergies-corbion.com/media/03xnhcab/pds-luminy-lx175-20220722.pdf?fbclid=IwAR1ZDogeD1b1ddMs_EAVQc2XF1L4VjLzmKa1gLdL82Qprz1qKXsstBbuYSU)
- [25] CHUA, Chee a Kah LEONG. *3D Printing and Additive Manufacturing: Principles and Applications*. 5th edition. Singapore: World Scientific, 2017. ISBN 978-981-3149-28-1.
- [26] Polyhydroxyalkanoates. In: *Biobasedpress.eu* [online]. Amsterdam: -, 2021 [cit. 2023-07-21]. Dostupné z: <https://www.biobasedpress.eu/wp-content/uploads/2022/02/Polyhydroxyalkanoates.png>



## **19. Seznam příloh**

Příloha č. 1 Materiálový list PLA Luminy LX175