

*C08J 9/22* (2006.01)  
*C08L 75/06* (2006.01)  
*C08L 3/02* (2006.01)  
*C08J 9/06* (2006.01)  
*C08J 9/08* (2006.01)  
*C12N 11/093* (2020.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2020-32**  
(22) Přihlášeno: **22.01.2020**  
(40) Zveřejněno: **04.08.2021**  
**(Věstník č. 31/2021)**  
(47) Uděleno: **25.08.2021**  
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **06.10.2021**  
**(Věstník č. 40/2021)**

(56) Relevantní dokumenty:  
CZ 2017-166 A3; CZ 30634 U1.

(73) Majitel patentu:  
Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v. v. i.,  
Praha 6, Břevnov, CZ  
BioMosae, 6212AS Maastricht, NL

(72) Původce:  
Hynek Beneš, Praha 9, Hloubětín, CZ  
Sonia Bujok, 43-460 Wisła, PL  
Aleksandra Paruzel, 44-304 Wodzisław Śląski, PL  
Veronika Zajícová, Kralupy nad Vltavou, Lobečok,  
CZ  
Tereza Hnátková, Praha 6, Liboc, CZ  
Guuske Frederike Busscher, 6212AS Maastricht,  
NL  
Alex Alois Joseph Schmeets, 6212AS Maastricht,  
NL

(74) Zástupce:  
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,  
170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název vynálezu:  
**Biodegradovatelná polyuretanová pěna,  
materiál na bázi biodegradabilní  
polyuretanové pěny pro produkci enzymů  
štepících sacharidy, způsob jejich přípravy  
a jejich použití**

(57) Anotace:  
Vynález se týká způsobu syntézy biologicky rozložitelné polyuretanové pěny zahrnující následující kroky:  
i) smíchání alespoň jednoho alifatického isokyanátu nesoucího alespoň dvě isokyanátové skupiny s alespoň jedním sacharidem v hmotnostním poměru 1: 1 až 30: 1 za vzniku prekurzoru;  
ii) homogenizaci prekurzoru alespoň jednoho biologicky rozložitelného alifatického polyester-etherpolyolu s molekulovou hmotností v rozmezí od 200 do 10 000 g/mol a hydroxylovém čísle od 10 do 100 mgKOH/g, 1 až 5 % hmotn. vody a 1 až 10 % hmotn. alespoň jednoho nadouvadla jiného než voda, vztaženo na celkovou hmotnost výsledné směsi;  
iii) vypěnění homogenizované směsi z kroku ii) při teplotě od 20 do 100 °C.

## **Biodegradovatelná polyuretanová pěna, materiál na bázi biodegradabilní polyuretanové pěny pro produkci enzymů štěpících sacharidy, způsob jejich přípravy a jejich použití**

### 5 Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká biologicky rozložitelné polyuretanové pěny, která je vhodná jako porézní nosič pro imobilizaci produkčních kmenů mikroorganismů, způsobu jejich syntézy a použití, zejména v produkčních biotechnologiích ke zvýšení výtěžku průmyslových extracelulárních enzymů.

### Dosavadní stav techniky

15 Porézní materiály jsou dnes v mnoha biotechnologických procesech velmi žádoucí jako substráty a nosiče mikrobiální biomasy. Pro přírodní média (např. půda, kůra, rašelina a kompost) jsou nezbytné živiny pro růst biomasy obvykle zajišťovány samotným materiálem, který je však velmi nehomogenní a často obtížně nastavitelný pro specifické biotechnologické operace. Naproti tomu syntetické materiály, jako je vermikulit, perlit, polyetylen nebo expandovaný polyuretan, jsou biologicky neaktivní, tj. poskytují pouze povrch pro imobilizaci biomasy a tvorbu biofilmu, přičemž růst mikroorganismů je zajištěn přidaným nutričním roztokem.

Ideální nosič biomasy by měl mít vysokou specifickou plochu povrchu, vysoký obsah otevřených pórů pro snadný tok, stabilní strukturální integritu během dlouhodobého provozu a také umožňovat účinnou imobilizaci mikroorganismů a zásobování živinami.

Vzhledem k jejich proměnlivému chemickému složení, nízké hustotě, nastavitelné tuhosti a požadované morfologii buněk (vzájemně propojené otevřené póry vs. uzavřené izolované buňky) lze polyuretanové pěny považovat za nejslibnější lehčené plasty pro výrobu porézních nosičů biomasy. Povaha a variabilita chemického složení polyuretanové pěny umožňuje začlenit určité látky do struktury materiálu, které pak mohou působit jako inhibitory nebo induktory aktivity biofilmu vytvořeného na polyuretanovém nosiči.

Syntéza polyuretanových pěn je založena na dvou základních reakcích. První reakce je polyadice mezi alkoholem nesoucím dvě nebo více hydroxylových (OH) skupin (polyol) a isokyanátem nesoucím dvě nebo více isokyanátových (NCO) skupin (polyisokyanát), což vede k produkci polyuretanů a tvorbě chemicky zesítené struktury. Tato reakce se proto často nazývá „gelovací reakce“. Druhá reakce ("nadouvací reakce") probíhá mezi polyisokyanátem a vodou za vzniku oxidu uhličitého a primárního aminu. Vytvořený amin reaguje velmi rychle s jinými isokyanátovými (NCO) skupinami za vzniku disubstituované močoviny. Vyráběný oxid uhličitý je tedy zodpovědný za pění. Protože oxid uhličitý vzniká během chemické reakce, přidaná voda se považuje za chemické nadouvadlo. Vyrobené polyuretanové pěny se proto nazývají „vypěňované vodou“. Další fyzikální nadouvadla (chlorfluoruhlodivky - CFC, cyklopentan, hexan atd.) se přidávají do receptury zejména v případě tvrdých pěn k dosažení požadovaných tepelně izolačních vlastností a nízké hustoty. Z environmentálního hlediska je však jejich použití nevhodné a často legislativně omezené.

V současné době se prakticky výhradně používají k výrobě polyuretanových pěn aromatické polyisokyanáty, protože jsou mnohem reaktivnější vůči OH skupinám než alifatické. Rychlá a dobře kontrolovaná buněčná struktura je hlavní výhodou a důvodem, proč jsou polyuretanové pěny tak populární ve srovnání s jinými polymerovými pěny, které vyžadují intenzivní mechanické míchání, přívod plynu nebo intenzivní zahřívání. Na druhé straně mají běžné polyuretanové pěny několik nevýhod, např. obtížná recyklovatelnost (kvůli chemicky zesítené struktuře), možná přítomnost zbytkových toxických aromatických isokyanátů nebo produkce toxických sloučenin během degradace pěny (typicky tvorba aromatických diaminů během fotooxidace pěn), které jsou

nebezpečné pro životní prostředí. Tyto pěny navíc nejsou biologicky aktivní (neslouží jako zdroj živin pro mikroorganismy nebo se biologicky nerozkládají).

Použití konvenční aromatické polyuretanové pěny jako nosiče pro mikrobiální biomasu je známé. Pro přípravu nosiče biomasy jsou však výhodně výhradně alifatické polyuretanové pěny, které vykazují biologickou aktivitu, jsou netoxické, stejně tak jako produkty jejich rozkladu. Jejich příprava je však komplikovanější z důvodu nízké reaktivity alifatických isokyanátů. To lze zvýšit použitím kombinace triethanolaminů a cín-olovnatých katalyzátorů [US 4748192]. Lee a kol. připravil plně alifatickou polyuretanovou pěnu z 1,6-hexamethylendiisokyanátu (HDI) a směs kyseliny polymléčné a polyethylenglykolu. [LEE, Jung-Min a kol. *Fibers and Polymers*, 2014, 15 (7), 1349-1356.]. Kvůli nízké reaktivitě HDI byla reakce prováděna při zvýšené teplotě.

Dokumenty popisující produkci enzymů bakteriálními kmeny využívají složky běžných médií, jako jsou vývar, pepton, trypton, glukóza, fruktóza, agar, škrob, sója, želatina atd. [US 2016/242422; CN 104450561; CN 104357361; CN 107099467; CN 104893997; CN 103088005; CN 103571810; CN 104694516; CN 104130961]. US 9868811 popisuje způsob přípravy polyuretanové pěny se zabudovaným polysacharidem-chitinem, chitosanem, glukosaminem, *N*-acetylglukosaminem, guarem, celulózu. Nevýhodou popsaného postupu je však potřeba chemické modifikace chitosanu a použití rozpouštědla (vody nebo vodného roztoku kyseliny), které musí být z konečné pěny odstraněno.

Bakteriální kmeny *Aeribacillus pallidus*, *Pseudomonas gessardii* a *Bacillus cereus* jsou běžně komerčně dostupné a používají se jako průmyslově produkční mikroorganismy pro produkci enzymů. Bakterie *Aeribacillus pallidus* se využívá pro produkci lipáz (Ktata et al., *Environmental Science and Pollution Research*, <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07853-x>), proteáz (Sondes et al., *International Journal of Biological Macromolecules* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.112>) a exopolysacharidů (Radchenkova et al., *Journal of Applied Microbiology* 119, 1301–1309 © 2015 The Society for Applied Microbiology). *Pseudomonas gessardii* se využívá pro produkci lipáz (K. Ramani et al., *Process Biochemistry* 45 (2010) 1683-1691) a *Bacillus cereus* se využívá pro produkci celuláz, proteáz, aminopeptináz (CN 109251914 A, CN 106754464 A, CN 104651283 A).

### Podstata vynálezu

Předkládaný vynález eliminuje výše uvedené nevýhody výroby biotechnologických enzymů použitím porézního polyuretanu jako nosiče biomasy se zabudovanými uhlovodíkovými jednotkami, které slouží jako induktor enzymatické aktivity, což umožňuje účinnou imobilizaci bakterií a zvýšenou enzymatickou produkci při snížených provozních nákladech fermentačního procesu.

Vynález je založen na experimentálním zjištění, že za použití specifických podmínek vypěňování může být připravena polyuretanová pěna s otevřenou porézní strukturou. Polyuretanová pěna je složena z alifatických polyolů a alifatických polyisokyanátových segmentů a přírodní uhlovodíkové jednotky a vykazuje biologickou rozložitelnost. Překvapivě bylo zjištěno, že takto připravený porézní materiál je velmi vhodný pro imobilizaci produkčního mikrobiálního kmene, např. z rodu *Pseudomonas*, a navíc slouží jako účinný zdroj uhlíku a dusíku pro bakterie. Protože kmen *Pseudomonas* umožňuje produkci řady průmyslových enzymů, připravený porézní materiál může sloužit jako nosič pro mikrobiální biomasu v produkčních biotechnologických kulturách. Kromě toho bylo zjištěno, že produkce konkrétního typu enzymu je indukována vhodným výběrem sacharidové jednotky, která tedy slouží jako induktor enzymatické aktivity. V biotechnologických procesech lze pak aplikací připraveného porézního nosiče s navázaným/zabudovaným induktorem enzymu docílit následujících výhod: (i) vyšší produktivita procesu v menším rozsahu objemu bioreaktoru - kvůli vyšší hustotě mikrobiální populace, (ii) vyšší stabilita fermentačního procesu díky lepší ochraně imobilizované bakteriální populace; iii) opakované použití imobilizované

biomasy. Otevřená porézní struktura zajišťuje optimální difúzi skrz nosič, vysoký obsah a stabilitu imobilizované biomasy, což umožňuje výrazně zvýšit výtěžky biotechnologických procesů oproti existujícím řešením. Předkládaný vynález tedy poskytuje porézní (biologicky rozložitelný) nosič na bázi expandovaných polyuretanů, který obsahuje zabudovaný induktor enzymatické aktivity,  
5 který slouží k imobilizaci produkčních kmenů mikroorganismů v průmyslových biotechnologiích.

Předmětem předkládaného vynálezu je způsob syntézy biologicky rozložitelné polyuretanové pěny, který zahrnuje následující kroky:

10 i) smíchání alespoň jednoho alifatického isokyanátu, nesoucího alespoň dvě isokyanátové (-NCO) skupiny, s alespoň jedním sacharidem v hmotnostním poměru v rozmezí od 1: 1 do 30: 1 za vzniku prekurzoru sacharid-isokyanát;

15 ii) homogenizace prekurzoru sacharid-isokyanát z kroku i) s 20 až 70 % hmotn. alespoň jednoho biologicky rozložitelného alifatického polyester-etherpolyolu s molekulovou hmotností v rozmezí od 200 do 10 000 g/mol a hydroxylovým číslem od 10 do 100 mg KOH/g, 1 až 5 % hmotn. vody a 1 až 10% hmotn. alespoň jednoho nadouvadla jiného než voda, vztaženo na celkovou hmotnost výsledné směsi;

20 iii) vypěnění homogenizované směsi z kroku ii) při teplotě v rozmezí od 20 do 100 °C, což vede k biologicky rozložitelné polyuretanové pěně obsahující inkorporovaný sacharid, která má hustotu menší než 70 kg/m<sup>3</sup> a obsah otevřených buněk alespoň 70 %. S výhodou se vypěnění provádí po dobu alespoň 1 minuty, výhodněji od 5 do 30 minut.

25 Krok iii) se s výhodou provádí nalitím homogenizované směsi z kroku ii) do formy a udržováním při požadované teplotě. Pěnivý proces odpovídá reakci mezi isokyanátem, vodou a nadouvadly jinými než voda za vzniku oxidu uhličitého, který je zodpovědný za pěnění, a primárním aminem. Vytvořený amin reaguje velmi rychle s dalšími isokyanátovými (-NCO) skupinami za vzniku disubstituované močoviny.

30 Sacharid může být monosacharid (např. glukóza, fruktóza, galaktóza), disacharid (např. sacharóza, laktóza) nebo polysacharid (např. škrob, chitin, glykogen, inulin, celulóza, pektin). Hydroxylové číslo je definováno jako počet miligramů hydroxidu draselného potřebný k neutralizaci kyseliny octové spotřebované po acetylaci jednoho gramu polyolu.

35 Inkorporovaný sacharid znamená, že sacharid (monosacharid, disacharid nebo polysacharid) je kovalentně a/nebo nekovalentně vázán na polymerní kostru biologicky rozložitelné polyuretanové pěny. Nekovalentní vazba je, např. vázání prostřednictvím van der Waalsových sil. S výhodou je hmotnostní poměr alifatického isokyanátu a sacharidu v kroku i) v rozmezí od 2:1 do 25:1,  
40 výhodněji v rozmezí od 5:1 do 20:1, ještě výhodněji v rozmezí od 10:1 do 15:1.

Obsah biologicky rozložitelného alifatického polyester-etherpolyolu, vztaženo na celkovou hmotnost výsledné směsi z kroku ii), je s výhodou v rozmezí od 25 do 65 % hmotn., výhodněji v rozmezí od 35 do 55 % hmotn., ještě výhodněji v rozmezí od 45 do 50 % hmotn.

45 Výhodně je hydroxylové číslo biodegradovatelného alifatického polyester-etherpolyolu v rozmezí od 20 do 80 mg KOH/g, výhodněji od 30 do 70 mg KOH/g, ještě výhodněji od 40 do 60 mg KOH/g, nejvýhodněji 50 mg KOH/g.

50 Během pěnivé reakce slouží jako nadouvadlo voda. Výhodně je obsah vody, vztaženo na celkovou hmotnost výsledné směsi z kroku ii), od 1,5 do 4 % hmotn., výhodněji od 2 do 3,5 % hmotn., ještě výhodněji od 2,5 do 3 % hmotn.

55 S výhodou je obsah dalšího nadouvadla jiného než voda, vztaženo na celkovou hmotnost výsledné směsi z kroku ii), od 2 do 8,5 % hmotn., výhodněji od 3 do 7 % hmotn. , ještě výhodněji od 4 do

6 % hmotn., nejméně 5 % hmotn.

Homogenizace v kroku ii) může být provedena použitím konvenčních homogenizačních technik, jako je vysokorychlostní míchání (např. 2000 ot./min), sonifikace, staticko-dynamický dvousložkový směšovací systém a dynamická směšovací hlava.

V jednom provedení je ke směsi, která má být homogenizována v kroku ii), přidána povrchově aktivní látka. Povrchově aktivní látka je kationtová povrchově aktivní látka, aniontová povrchově aktivní látka, zwitteriontová povrchově aktivní látka nebo neiontová povrchově aktivní látka. S výhodou je povrchově aktivní látka vybrána ze skupiny zahrnující polysorbát (polysorbát 20, polysorbát 80), lecitin, alkoholethoxylát nebo hydrogenovaný ricinový olej PEG- 40, silikonové povrchově aktivní činidlo nebo jejich kombinace. S výhodou se povrchově aktivní látka přidává v množství od 0,5 do 1,5 % hmotn., vztaheno na celkovou hmotnost výsledné směsi z kroku ii), výhodněji od 0,6 do 1,2 % hmotn., ještě výhodněji od 0,7 do 1 % hmotn., nejméně od 0,8 do 0,9% hmotn., vztaheno na celkovou hmotnost výsledné směsi z kroku ii).

V jednom provedení se přidá ke směsi, která má být homogenizována v kroku ii), katalyzátor. Katalyzátor je vybrán ze skupiny obsahující oktanoát cínatý, dibutylcindilaurát (DBTL), N,N-dimethylbenzylamin, N,N,N',N'',N'''-pentamethyldiethylentriamin (PMDTA), dimethylethanolamin, triethylendiamin (DABCO), 3-aminopropyl dimethylamin, dimethylcyklohexylamin, propylenglykol, N-methylmorfolin, bis-(2-dimethylaminoethyl)ether, 1,3,5-tris [3-(dimethylamino)propyl]hexahydro-1,3,5-triazin nebo jejich kombinace. S výhodou se katalyzátor přidává v množství od 0,5 do 5 % hmotn., vztaheno na celkovou hmotnost výsledné směsi z kroku ii), výhodněji od 0,7 do 3 % hmotn., ještě výhodněji od 1 do 2 % hmotn., nejméně 1,5 % hmotn., vztaheno na celkovou hmotnost výsledné směsi z kroku ii).

V jednom provedení je alifatický isokyanát vybrán ze skupiny obsahující (C2 až C60) alifatický polyisokyanát, kde jeden nebo více atomů C je nahrazeno heteroatomy vybranými z O, S, N a/nebo substituovaných skupinou (=O).

V jednom provedení je alifatický isokyanát vybrán ze skupiny, zahrnující pentamethylendiisokyanát (PDI), hexamethylendiisokyanát (HDI), dimery pentamethylendiisokyanátu, dimery hexamethylendiisokyanátu, trimery methylendicyklohexyldiisokyanát (HM DI), isoforondiisokyanát (IPDI), polyisokyanáty z rostlinných olejů (jako je sójový olej, ricinový olej, řepkový olej, olivový olej, palmový olej, rýžový otrubový olej), methylester L-lysin diisokyanátu, ethylester L-lysin diisokyanátu, jak je znázorněno ve schématu 1. Všechny znázorněné struktury jsou komerčně dostupné. Na rozdíl od aromatických isokyanátů jsou alifatické isokyanáty výhodné díky své nízké toxicitě, takže výsledná polyuretanová pěna je během výroby netoxická a také netoxická pro kultivaci mikroorganismů na ní pěstovaných. Produkty biodegradace polyuretanové pěny jsou také netoxické.

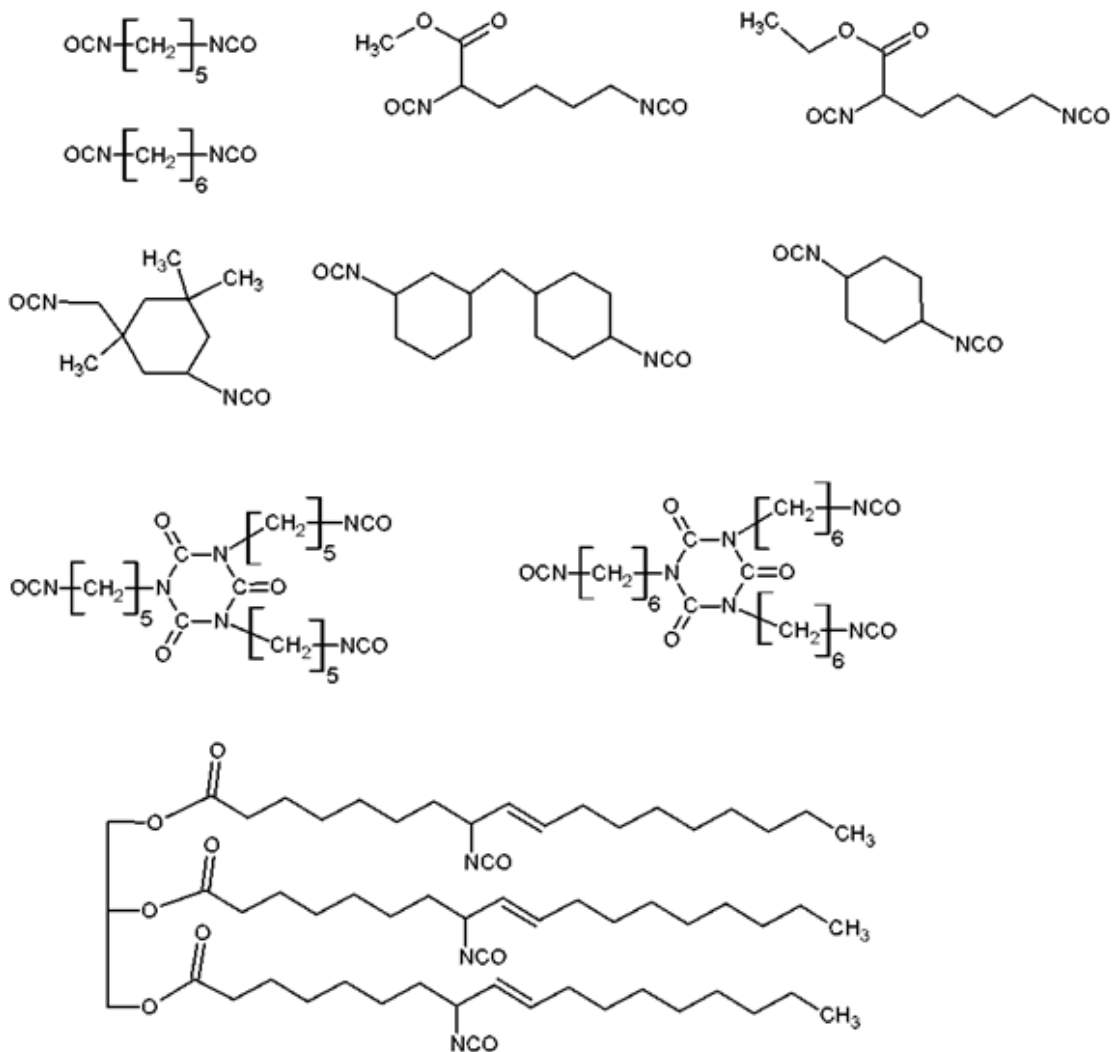
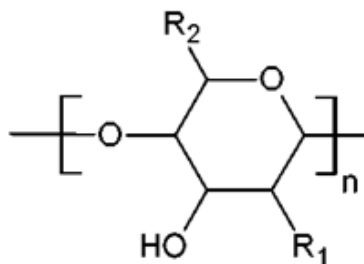


Schéma 1: Příklady alifatických isokyanátů pro použití ve způsobu podle předkládaného vynálezu.

- 5 V jednom provedení je sacharidem monosacharid nebo sacharid vybraný ze skupiny obsahující sacharidy obecného vzorce I



(I),

10

kde

$n$  je celé číslo v rozmezí od 2 do 50 000;

15

$R_1$  je vybrán ze skupiny sestávající z  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-NH-C(=O)-CH_3$ ,  $-O-C(=O)-R_3$ ;

$R_2$  je vybrán ze skupiny sestávající z  $-CH_2-OH$ ,  $-CH_2-O-C(=O)-R_3$ ,  $-C(=O)-OM$ ;

R<sub>3</sub> je (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyl, který může být lineární nebo rozvětvený;

5 M je vodík, kationt amonný, kationt alkalického kovu (např. Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) nebo kationt kovu alkalických zemin (např. Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>).

10 V jednom výhodném provedení je sacharid vybrán ze skupiny zahrnující pšeničný B-škrob (Amylon), pšeničný A-škrob (Amylon), maltodextrin, s výhodou s ekvivalentem dextrózy v rozmezí od 20 do 30, glukóza, celulóza, chitin.

10 V jednom provedení má alifatický polyester-etherpolyol molekulovou hmotnost od 400 do 8000 g/mol, výhodněji od 1000 do 6000 g/mol, ještě výhodněji od 2000 do 4000 g/mol.

15 V jednom provedení je alifatický polyester-etherpolyol vybrán ze skupiny zahrnující poly(diethylenglykoladipát) diol, poly(triethylenglykoladipát) diol, poly(tetraethylenglykoladipát) diol, poly(diethylenglykoladipát) triol, poly(triethylenglykoladipát) triol, poly(tetraethylenglykoladipát) triol, poly(diethylenglykolsukcinát) diol, poly(triethylenglykolsukcinát) diol, poly(tetraethylenglykolsukcinát) diol, poly(diethylenglykolsukcinát) triol, poly(triethylenglykolsukcinát) triol, poly(tetraethylenglykolsukcinát) triol. Výhodou použití alifatického polyester-etherpolyolu při syntéze biologicky rozložitelné polyuretanové pěny je zvýšení hydrofilnosti (díky etherové části polyolu) a současně zachování biologické rozložitelnosti (díky esterové části polyolu). Kromě toho jsou alifatické polyester-etherpolyoly plně amorfní a nekystalizují, což je výhodné jak z hlediska zpracování (snadná homogenizace a růst pěny), tak z hlediska rychlosti biologického rozkladu (rychlost biologické degradace je v krystalické fázi nižší).

30 V jednom provedení může být do směsi, která má být homogenizována v kroku ii), přidán jeden nebo více polyetherdiolů v množství až 20 % hmotn., vztaženo na celkovou hmotnost výsledné směsi. Polyetherdiol je s výhodou vybrán ze skupiny zahrnující polyethylenglykol s molekulovou hmotností cca 3000 Daltonů nebo nižší, s výhodou cca 2000 nebo nižší, jako například cca 400, cca 500 nebo cca 700. Přidání polyetherdiolu dále zvyšuje hydrofilitu výsledné biologicky rozložitelné polyuretanové pěny.

35 V jednom provedení je další nadouvadlo jiné než voda vybráno ze skupiny obsahující hydrogenuhličitan amonný, hydrogenuhličitan sodný, směs kyseliny citronové a hydrogenuhličitanu sodného, azodikarbonamid, polyethyleniminy s roubovanými adukty oxidu uhličitého.

40 Dalším předmětem předkládaného vynálezu je biologicky rozložitelná polyuretanová pěna připravitelná způsobem podle předkládaného vynálezu. Tato pěna obsahuje inkorporovaný sacharid a její hustota je menší než 70 kg/m<sup>3</sup>, s výhodou v rozmezí od 10 do 50 kg/m<sup>3</sup>, výhodněji od 20 do 40 kg/m<sup>3</sup>, nejvýhodněji 30 kg/m<sup>3</sup>, a obsah otevřených buněk je v rozmezí od 70 % do 100 %, výhodněji od 80 % do 100 % a nejvýhodněji od 90 % do 100 %. Velikost buněk je v rozmezí od 0,1 do 9 mm, s výhodou od 0,2 do 3 mm. Taková velikost buněk znamená, že přibližně 90 % objemu pěny má takovou velikost buněk, s výhodou alespoň přibližně 95 % objemu pěny má takovou velikost buněk. Velikost buněk může být měřena řezáním pěny a měřením velikosti buněk (průměr) pěny 5 cm x 5 cm.

50 Vynález je dále zaměřen na biologicky rozložitelný materiál na bázi polyuretanové pěny pro produkci enzymů štěpících sacharidy a na způsob jeho výroby.

55 Předmětem předkládaného vynálezu je biodegradovatelný materiál na bázi polyuretanové pěny pro produkci enzymů štěpících sacharidy zahrnuje biologicky degradovatelnou polyuretanovou pěnu podle předkládaného vynálezu a imobilizovanou mikrobiální biomasu, jako je bakteriální kmen, kde mikrobiální biomasa (např. bakteriální kmen) je schopna produkovat sacharid- štěpící enzym,

s výhodou enzym štěpící sacharid obecného vzorce I, výhodněji je imobilizovaný bakteriální kmen schopen produkovat amylázu, glukosidázu, chitinázu, glykogen fosforylázu, inulinázu, celulózu, pektin degradující enzymy.

- 5 Mikrobiální biomasa může být jakákoli v oboru známá, která je schopna produkovat enzym štěpící sacharidy. Biodegradovatelná polyuretanová pěna podle předkládaného vynálezu umožňuje mikroorganismům růst na svém povrchu a v pórech tohoto porézního materiálu a vytvářet biofilm. Protože biologicky rozložitelná polyuretanová pěna podle předkládaného vynálezu obsahuje inkorporovaný sacharid (jak je definován výše), tento sacharid indukuje v mikroorganismu  
10 produkci konkrétního enzymu štěpícího sacharid. Navíc tento sacharid také slouží jako zdroj dusíku a uhlíku pro přítomný mikroorganismus, čímž zajišťuje a zlepšuje imobilizaci mikroorganismu produkujícího enzymy.

Vhodná mikrobiální biomasa pro imobilizaci v biologicky rozložitelné polyuretanové pění a  
15 produkci enzymů může být vybrána ze skupiny obsahující bakteriální kmen rodu *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Aeribacillus*, *Geobacillus*, *Rhodococcus*; výhodně je imobilizovaným bakteriálním kmenem *Pseudomonas gessardii*, *Bacillus cereus*, *Aeribacillus pallidus*, výhodněji *Pseudomonas gessardii* CCM 8663 (Česká sbírka mikroorganismů (CCM), Česká republika).

20 Způsob produkce enzymů štěpících sacharidy za použití biologicky rozložitelného materiálu na bázi polyuretanové pěny pro produkci enzymů štěpících sacharidy zahrnuje následující kroky:

i) příprava biologicky rozložitelné polyuretanové pěny obsahující zabudovaný sacharid podle  
25 předkládaného vynálezu;

ii) imobilizaci mikroorganismů produkujících enzymy v biologicky rozložitelné polyuretanové  
pění z kroku i), čímž se získá materiál na bázi biologicky rozložitelné polyuretanové pěny pro  
30 produkci enzymů štěpících sacharidy podle předkládaného vynálezu; Imobilizace je indukována inokulací biologicky rozložitelné polyuretanové pěny z kroku i) mikroorganismem produkujícím enzym štěpícím sacharid, následovaným kultivací mikroorganismu produkujícího enzym štěpícího sacharid, dokud se nevytvoří biofilm, čímž se získá biologicky rozložitelný materiál na bázi polyuretanové pěny pro produkce enzymu štěpícího sacharid s mikroorganismem produkujícím imobilizovaný sacharid štěpící enzym; mikroorganismy tvoří biofilm, a tím se imobilizují na  
35 biologicky rozložitelnou polyuretanovou pěnu.

iii) fermentaci mikroorganismu produkujícího enzym štěpícího sacharid (např. bakteriálního  
kmene) imobilizovaného na biologicky rozložitelném materiálu na bázi polyuretanové pěny, což  
vede k produkci enzymu štěpícího sacharid;

40 iv) separaci enzymu štěpícího sacharid od materiálu na bázi biologicky rozložitelné polyuretanové pěny.

ad i) Poskytnutí biologicky rozložitelné polyuretanové pěny podle předkládaného vynálezu se  
45 provádí způsobem přípravy biologicky rozložitelné polyuretanové pěny popsáním výše.

ad ii) Imobilizace enzym-produkujícího mikroorganismu v biologicky rozložitelné polyuretanové  
pění zahrnuje naočkování (inokulaci) mikroorganismu na biologicky rozložitelnou  
polyuretanovou pěnu a umožnění jeho růstu po přiměřenou dobu. Přbytek neimobilizovaného  
50 mikroorganismu se poté smyje, čímž se získá biologicky rozložitelná polyuretanová pěna s imobilizovaným mikroorganismem.

ad iii) Fermentace imobilizovaného enzym-produkujícího mikroorganismu se obvykle provádí v  
nádobě, která je obvykle provzdušňována během fermentačního procesu (aerace závisí na typu  
použitého mikroorganismu - aerobní mikroorganismus vyžaduje provzdušňování, anaerobní ne),  
55 včetně růstové fáze a kultivační fáze fermentace. Během fermentace se do imobilizovaného



mikroorganismu dodává růstové médium. Podmínky fermentace obecně zahrnují teplotu alespoň 20 °C, např. 25 °C, 30 °C nebo 35 °C. Pokud nejsou použity termofilní mikroorganismy, měla by být maximální teplota asi 45 °C. Hodnota pH je obvykle v rozmezí od přibližně 4 do přibližně 9, proto je mírně kyselá, neutrální nebo mírně zásaditá (pH přibližně 6, přibližně 7 nebo přibližně 8).  
5 Obecně se kultivace provádí po dobu několika dní, aby se dosáhlo vhodného množství produkovaného enzymu.

ad iv) Sacharid-štěpící enzym produkovaný během fermentace je obsažen v růstovém médiu, které lze oddělit od mikroorganismu pomocí filtrace nebo dekantace, a může být izolován z růstového  
10 média obvyklými izolačními technikami. Vhodná růstová média jsou v oboru známa a zahrnují všechny podstatné prvky a živiny pro konkrétní mikroorganismy (uhlík, dusík, síra, fosfor atd.), příkladem vhodného růstového média je bazální solné médium (BSM) doplněné o některé C a/nebo N zdroje. Příklad takového média je v tabulce 1 :

Chemické složení	Koncentrace (g/l)	Stopové prvky	Koncentrace (mg/l)
$K_2HPO_4$	4,2	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	6,0
$KH_2HPO_4$	3,4	$MnSO_4 \cdot H_2O$	169
$(NH_4)_2SO_4$	1,5	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	2,0
		$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	3,2
		$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	2,0
		$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	2,0

15 Sacharid může být přítomen nejen v biologicky rozložitelné polyuretanové pěně, ale může být také přidán do růstového média, což umožňuje kontinuální produkci enzymů.

Sacharid-štěpící enzym produkovaný imobilizovaným mikroorganismem tedy závisí na typu sacharidu obsaženého v biologicky rozložitelné polyuretanové pěně. Proto pěna obsahující škrob  
20 nebo maltodextrin je vhodná pro výrobu amylázy, pěna obsahující chitin je vhodná pro výrobu chitinázy, pěna obsahující glykogen je vhodná pro výrobu glykogenové fosforylázy, pěna obsahující inulin je vhodná pro výrobu inulinázy, pěna obsahující celulózu je vhodná pro výrobu celulózy, pěna obsahující glukózu je vhodná pro produkci glukosidázy a pektin obsahující pěna je  
25 vhodná pro produkci enzymů degradujících pektin.

Dalším předmětem předkládaného vynálezu je použití biologicky rozložitelné polyuretanové pěny podle předkládaného vynálezu v průmyslové mikrobiologii jako nosiče pro imobilizaci mikrobiální  
30 biomasy.

Biologicky rozložitelnou polyuretanovou pěnu podle předkládaného vynálezu lze použít jako nosič pro imobilizaci biomasy, s výhodou pro imobilizaci průmyslových produkčních mikroorganismů, výhodněji pro imobilizaci bakterií z rodu *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Aeribacillus*, *Geobacillus*, *Rhodococcus*; ještě výhodněji *Pseudomonas gessardii*, *Bacillus cereus*, *Aeribacillus pallidus*,  
35 nejvýhodněji *Pseudomonas gessardii* CCM 8663.

Dalším předmětem předkládaného vynálezu je použití materiálu na bázi biologicky rozložitelné polyuretanové pěny s imobilizovanými mikroorganismy podle předkládaného vynálezu pro  
40 produkci sacharid-štěpícího enzymu, s výhodou je sacharid-štěpící enzym vybrán ze skupiny zahrnující amylázu, glukosidázu, glykogen fosforylázu, inulinázu, celulózu, enzymy degradující pektin.

Objasnění výkresů

Obr. 1: Fotografie biofilmů *Pseudomonas sp.* (a, b), *Bacillus cereus* (c, d) a *Aeribacillus pallidus* (e, f), kultivované na biologicky rozložitelné polyuretanové pěně ze srovnávacího příkladu 2, s glukózovým substrátem po 2 (a, c, e) a 5 (b, d, f) hodinách.

Příklady uskutečnění vynálezu

## 10 Materiály a metody

V příkladech byly použity následující metody hodnocení vlastností připravených materiálů:

15 Čas do začátku růstu polyuretanové pěny – detekován změnou objemu materiálu.

Čas gelace polyuretanové pěny – detekován jako doba, kdy může být polymerní struna vytvořena ponořením zkušební tyče do systému, tj. je vytvořena trojrozměrná struktura.

20 Čas konce růstu polyuretanové pěny – detekován stálou výškou vytvořené pěny.

Čas zavadnutí povrchu polyuretanové pěny – detekován nelepivým povrchem vytvořené pěny. Volná objemová hmotnost polyuretanové pěny byla stanovena podle české národní normy č. ČSN EN ISO 845.

25 Obsah otevřených buněk v polyuretanové pěně byl stanoven pyknometricky podle standardního zkušební postupu pro obsah otevřených buněk v tuhém lehčeném plastu č. ASTM D 6226-05. Distribuce velikosti buněk v polyuretanové pěně byla stanovena optickou mikroskopií.

## 30 Příklad 1

Směs 4 g pšeničného B-škrobu Soltex NP6 (Amylon) a 63 g trimeru hexamethylendiisokyanátu (Desmodur<sup>TM</sup> N 3300, Covestro) byla homogenizována v plastovém kelímku po dobu 10 minut za použití vysokorychlostního míchadla (2000 ot./min). Poté se ke směsi přidalo 80 g poly(diethylenglykoladipátu)diolu s hydroxylovým číslem 47 mg KOH/g, 2,4 g vody, 4,4 g hydrogenuhličitanu amonného, 1,4 g silikonové povrchově aktivní látky Niax<sup>TM</sup> Silicone L-6900 (Momentive Performance Materials), 1,2 g dibutylcindilaurátu (DBTL, Aldrich, Německo) a 1,2 g *N,N,N',N'',N'''*-pentamethyldiethylentriaminu (Polycat<sup>TM</sup> 9, Air Products) a směs se homogenizovala dalších 60 s. Reakční směs se poté nalila do otevřené formy a nechala se volně vypěnit při 25 °C a poté dotvrdit při pokojové teplotě po dobu 48 hodin. Procesní charakteristiky pěny a vlastnosti připravené pěny jsou shrnuty v tabulce 2. Připravený blok pěny byl nařezán na kostky 10x10x10 mm, které byly použity jako porézní nosiče mikrobiální biomasy podle příkladu 13.

## 45 Příklad 2

Směs 2,2 g pšeničného A-škrobu Soltex NP1 (Amylon) a 63 g trimeru hexamethylendiisokyanátu (Desmodur<sup>TM</sup> N 3300, Covestro) byla homogenizována v plastovém kelímku po dobu 10 minut za použití vysokorychlostního míchadla (2000 ot./min). Poté se ke směsi přidalo 80 g poly(diethylenglykoladipátu) diolu s hydroxylovým číslem 47 mg KOH/g, 2,4 g vody, 7,3 g hydrogenuhličitanu amonného, 1,4 g silikonové povrchově aktivní látky Niax<sup>TM</sup> Silicone L-6900 (Momentive Performance Materials), 1,2 g dibutylcindilaurátu (DBTL, Aldrich, Německo) a 1,2 g *N,N,N',N'',N'''*-pentamethyldiethylentriaminu (Polycat<sup>TM</sup> 9, Air Products) a směs se homogenizovala dalších 60 s. Reakční směs se poté nalila do otevřené formy a nechala se volně vypěnit při 45 °C a poté dotvrdit při pokojové teplotě po dobu 48 hodin. Procesní charakteristiky pěny a vlastnosti připravené pěny jsou shrnuty v tabulce 2. Připravený blok pěny byl nařezán na

kostky 10x10x10 mm, které byly použity jako porézní nosiče mikrobiální biomasy podle příkladu 13.

#### Příklad 3

5

Směs 5 g maltodextrinu o dextrózovém ekvivalentu 22 a 78 g trimeru hexamethylendiisokyanátu (Desmodur<sup>TM</sup> N 3300, Covestro) byla homogenizována v plastovém kelímku po dobu 10 minut za použití vysokorychlostního míchadla (2000 ot./min). Poté se ke směsi přidalo 80 g poly(diethylenglykoladipátu) triolu s hydroxylovým číslem 59 mg KOH/g, 3,0 g vody, 8,0 g hydrogenuhličitanu amonného, 1,6 g silikonové povrchově aktivní látky Niax<sup>TM</sup> Silicone L-6900 (Momentive Performance Materials), 1,2 g dibutylcindilaurátu (DBTL, Aldrich, Německo) a 1,2 g *N,N,N',N'',N'''*-pentamethyldiethylentriaminu (Polycat<sup>TM</sup> 9, Air Products) a směs se homogenizovala dalších 60 s. Reakční směs se poté nalila do otevřené formy a nechala se volně vypěnit při 25 °C a poté dotvrdit při pokojové teplotě po dobu 48 hodin. Procesní charakteristiky pěny a vlastnosti připravené pěny jsou shrnuty v tabulce 2. Připravený blok pěny byl nařezán na kostky 10x10x10 mm, které byly použity jako porézní nosiče mikrobiální biomasy podle příkladu 13.

#### Příklad 4

20

Směs 30 g maltodextrinu o dextrózovém ekvivalentu 22 a 56 g trimeru pentamethylendiisokyanátu (Desmodur<sup>TM</sup> eco N 7300, Covestro) byla homogenizována v plastovém kelímku po dobu 10 minut za použití vysokorychlostního míchadla (2000 ot./min). Poté se ke směsi přidalo 45 g poly(diethylenglykoladipátu) diolu s hydroxylovým číslem 49 mg KOH/g, 2,3 g vody, 8,7 g hydrogenuhličitanu amonného, 0,9 g silikonové povrchově aktivní látky Niax<sup>TM</sup> Silicone L-6900 (Momentive Performance Materials), 0,6 g dibutylcindilaurátu (DBTL, Aldrich, Německo) a 0,5 g *N,N,N',N'',N'''*-pentamethyldiethylentriaminu (Polycat<sup>TM</sup> 9, Air Products) a směs se homogenizovala dalších 60 s. Reakční směs se poté nalila do otevřené formy a nechala se volně vypěnit při 30 °C a poté dotvrdit při pokojové teplotě po dobu 48 hodin. Procesní charakteristiky pěny a vlastnosti připravené pěny jsou shrnuty v tabulce 2. Připravený blok pěny byl nařezán na kostky 10x10x10 mm, které byly použity jako porézní nosiče mikrobiální biomasy podle příkladu 13.

#### Příklad 5

35

Směs 30 g pšeničného A-škrobu Soltex NP1 (Amylon) a 40 g trimeru pentamethylendiisokyanátu (Desmodur<sup>TM</sup> eco N 7300, Covestro) byla homogenizována v plastovém kelímku po dobu 10 minut za použití vysokorychlostního míchadla (2000 ot./min). Poté se ke směsi přidalo 30 g poly(tetraethylenglykoladipátu) diolu s hydroxylovým číslem 51 mg KOH/g, 1,6 g vody, 9,4 g hydrogenuhličitanu sodného, 0,9 g silikonové povrchově aktivní látky Niax<sup>TM</sup> Silicone L-6900 (Momentive Performance Materials), 0,8 g dibutylcindilaurátu (DBTL, Aldrich, Německo) a 0,9 g *N,N,N',N'',N'''*-pentamethyldiethylentriaminu (Polycat<sup>TM</sup> 9, Air Products) a směs se homogenizovala dalších 60 s. Reakční směs se poté nalila do otevřené formy a nechala se volně vypěnit při 55 °C a poté dotvrdit při pokojové teplotě po dobu 48 hodin. Procesní charakteristiky pěny a vlastnosti připravené pěny jsou shrnuty v tabulce 2. Připravený blok pěny byl nařezán na kostky 10x10x10 mm, které byly použity jako porézní nosiče mikrobiální biomasy podle příkladu 13.

#### Příklad 6

50

Směs 10 g pšeničného A-škrobu Soltex NP1 (Amylon) a 50 g hexamethylendiisokyanátu (Sigma-Aldrich) byla homogenizována v plastovém kelímku po dobu 5 minut za použití vysokorychlostního míchadla (2000 ot./min). Poté se ke směsi přidalo 53 g poly(diethylenglykolsukcinátu) triolu s hydroxylovým číslem 83 mg KOH/g, 4,7 g vody, 3,2 g hydrogenuhličitanu amonného, 0,7 g silikonové povrchově aktivní látky Niax<sup>TM</sup> Silicone L- 6900

55

(Momentive Performance Materials), 0,5 g dibutylcindilaurátu (DBTL, Aldrich, Německo) a 0,5 g *N,N,N',N'',N'''*-pentamethyldiethylentriaminu (Polycat™ 9, Air Products) a směs se homogenizovala dalších 30 s. Reakční směs se poté nalila do otevřené formy a nechala se volně vypěnit při 20 °C a poté dotvrdit při pokojové teplotě po dobu 48 hodin. Procesní charakteristiky pěny a vlastnosti připravené pěny jsou shrnuty v tabulce 2. Připravený blok pěny byl nařezán na kostky 10x10x10 mm, které byly použity jako porézní nosiče mikrobiální biomasy podle příkladu 13.

#### Příklad 7

Směs 7,5 g pšeničného B-škrobu Soltex NP6 (Amylon) a 50 g trimeru pentamethylendiisokyanátu (Desmodur™ eco N 7300, Covestro) byla homogenizována v plastovém kelímku po dobu 10 minut za použití vysokorychlostního míchadla (2000 ot./min). Poté se ke směsi přidalo 89 g poly(diethylenglykoladipátu) triolu s hydroxylovým číslem 22 mg KOH/g, 2,1 g vody, 3,4 g hydrogenuhličitanu sodného, 1,5 g silikonové povrchově aktivní látky Niax™ Silicone L-6900 (Momentive Performance Materials), 1,1 g dibutylcindilaurátu (DBTL, Aldrich, Německo) a 1,1 g *N,N,N',N'',N'''*-pentamethyldiethylentriaminu (Polycat™ 9, Air Products) a směs se homogenizovala dalších 60 s. Reakční směs se poté nalila do otevřené formy a nechala se volně vypěnit při 75 °C a poté dotvrdit při pokojové teplotě po dobu 48 hodin. Procesní charakteristiky pěny a vlastnosti připravené pěny jsou shrnuty v tabulce 2. Připravený blok pěny byl nařezán na kostky 10x10x10 mm, které byly použity jako porézní nosiče mikrobiální biomasy podle příkladu 13.

#### Příklad 8

Směs 7,3 g chitinu (Sigma-Aldrich) a 75 g trimeru hexamethylendiisokyanátu (Desmodur™ N 3300, Covestro) byla homogenizována v plastovém kelímku po dobu 10 minut za použití vysokorychlostního míchadla (2000 ot./min). Poté se ke směsi přidalo 60 g poly(tetraethylenglykoladipátu) triolu s hydroxylovým číslem 49 mg KOH/g, 3,1 g vody, 3,1 g hydrogenuhličitanu amonného, 1,4 g silikonové povrchově aktivní látky Niax™ Silicone L-6900 (Momentive Performance Materials), 1,1 g dibutylcindilaurátu (DBTL, Aldrich, Německo) a 1,1 g *N,N,N',N'',N'''*-pentamethyldiethylentriaminu (Polycat™ 9, Air Products) a směs se homogenizovala dalších 60 s. Reakční směs se poté nalila do otevřené formy a nechala se volně vypěnit při 55 °C a poté dotvrdit při pokojové teplotě po dobu 48 hodin. Procesní charakteristiky pěny a vlastnosti připravené pěny jsou shrnuty v tabulce 2. Připravený blok pěny měl 5% hmotn. (8B) obsah chitinu a byl nařezán na kostky 10x10x10 mm, které byly použity jako porézní nosiče mikrobiální biomasy podle příkladu 13. Analogicky byly připraveny biologicky rozložitelné polyuretanové pěny s 2,5 (8A) a 7,5% hmotn. (8C) chitinu za použití 3,6 nebo 15 g chitinu pro syntézu.

#### Příklad 9

Směs 30 g acetátu celulózy (Sigma-Aldrich) a 65 g trimeru hexamethylendiisokyanátu (Desmodur™ N 3300, Covestro) byla homogenizována v plastovém kelímku po dobu 10 minut za použití vysokorychlostního míchadla (2000 ot./min). Poté se ke směsi přidalo 57 g poly(diethylenglykoladipátu) triolu s hydroxylovým číslem 45 mg KOH/g, 2,9 g vody, 5,5 g hydrogenuhličitanu amonného, 1,3 g silikonové povrchově aktivní látky Niax™ Silicone L-6900 (Momentive Performance Materials), 1,0 g dibutylcindilaurátu (DBTL, Aldrich, Německo) a 1,0 g *N,N,N',N'',N'''*-pentamethyldiethylentriaminu (Polycat™ 9, Air Products) a směs se homogenizovala dalších 60 s. Reakční směs se poté nalila do otevřené formy a nechala se volně vypěnit při 30 °C a poté dotvrdit při pokojové teplotě po dobu 48 hodin. Procesní charakteristiky pěny a vlastnosti připravené pěny jsou shrnuty v tabulce 2. Připravený blok pěny byl nařezán na kostky 10x10x10 mm, které byly použity jako porézní nosiče mikrobiální biomasy podle příkladu 13.

## Příklad 10

Směs 2,2 g glukózy a 63 g trimeru hexamethylendiisokyanátu (Desmodur<sup>TM</sup> N 3300, Covestro) byla homogenizována v plastovém kelímku po dobu 10 minut za použití vysokorychlostního míchadla (2000 ot./min). Poté se ke směsi přidalo 80 g poly(diethylenglykoladipátu)diolu s hydroxylovým číslem 47 mg KOH/g, 2,4 g vody, 7,7 g hydrogenuhlíčitanu amonného, 1,4 g silikonové povrchově aktivní látky Niax<sup>TM</sup> Silicone L-6900 (Momentive Performance Materials), 1,2 g dibutylcindilaurátu (DBTL, Aldrich, Německo) a 1,2 g *N,N,N',N'',N'''*-pentamethyldiethylentriaminu (Polycat<sup>TM</sup> 9, Air Products) a směs se homogenizovala dalších 60 s. Reakční směs se poté nalila do otevřené formy a nechala se volně vypěnit při 23 °C a poté dotvrdit při pokojové teplotě po dobu 48 hodin. Procesní charakteristiky pěny a vlastnosti připravené pěny jsou shrnuty v tabulce 2. Připravený blok pěny byl nařezán na kostky 10x10x10 mm, které byly použity jako porézní nosiče mikrobiální biomasy podle příkladu 13.

## 15 Srovnávací příklad 1

Směs 4 g pšeničného B-škrobu Soltex NP6 (Amylon) a 63 g trimeru hexamethylendiisokyanátu (Desmodur<sup>TM</sup> N 3300, Covestro) byla homogenizována v plastovém kelímku po dobu 10 minut za použití vysokorychlostního míchadla (2000 ot./min). Poté se ke směsi přidalo 80 g poly(diethylenglykoladipátu) diolu s hydroxylovým číslem 47 mg KOH/g, 2,4 g vody, 1,4 g silikonové povrchově aktivní látky Niax<sup>TM</sup> Silicone L-6900 (Momentive Performance Materials), 1,2 g dibutylcindilaurátu (DBTL, Aldrich, Německo) a 1,2 g *N,N,N',N'',N'''*-pentamethyldiethylentriaminu (Polycat<sup>TM</sup> 9, Air Products) a směs se homogenizovala dalších 60 s. Reakční směs se poté nalila do otevřené formy a nechala se volně vypěnit při 25 °C a poté dotvrdit při pokojové teplotě po dobu 48 hodin. Procesní charakteristiky pěny a vlastnosti připravené pěny jsou shrnuty v tabulce 2. Připravený blok pěny byl nařezán na kostky 10x10x10 mm, které byly použity jako porézní nosiče mikrobiální biomasy podle příkladu 13.

## 30 Srovnávací příklad 2

80 g poly(diethylenglykoladipátu)diolu s hydroxylovým číslem 47 mg KOH/g, 2,4 g vody, 1,4 g silikonové povrchově aktivní látky Niax<sup>TM</sup> Silicone L-6900 (Momentive Performance Materials), 1,2 g dibutylcindilaurátu (DBTL, Aldrich, Německo) a 1,2 g *N,N,N',N'',N'''*-pentamethyldiethylentriaminu (Polycat<sup>TM</sup> 9, Air Products) bylo smícháno a zhomogenizováno v plastovém kelímku po dobu 5 minut za použití vysokorychlostního míchadla (2000 ot./min). Poté bylo do směsi přidáno 63 g trimeru hexamethylendiisokyanátu (Desmodur<sup>TM</sup> N 3300, Covestro) a směs se homogenizovala dalších 60 s. Reakční směs se poté nalila do otevřené formy a nechala se volně vypěnit při 23 °C a poté dotvrdit při pokojové teplotě po dobu 48 hodin. Procesní charakteristiky pěny a vlastnosti připravené pěny jsou shrnuty v tabulce 2. Připravený blok pěny byl nařezán na kostky 10x10x10 mm, které byly použity jako porézní nosiče mikrobiální biomasy podle příkladu 13.

45 Tabulka 2: Charakteristiky vypěňování a získaných porézních polyuretanových pěn

	Inkorporovaný induktor	t <sub>1</sub> / t <sub>2</sub> / t <sub>3</sub> / t <sub>4</sub> (min)	ρ (kg/m <sup>3</sup> )	Ov (%)	Průměrná velikost pórů (mm)
Příklad 1	B-škrob (2,5 %)	2,0 / 5,5 / 6,0 / 8,0	68	94	0,45
Příklad 2	A-škrob (1,2 %)	1,75 / 5,0 / 5,25 / 6,5	66	95	0,49
Příklad 3	Maltodextrin (2,5 %)	2,5 / 5,5 / 7,5 / 10,3	55	94	0,36
Příklad 4	Maltodextrin	2,1 / 4,9 / 7,0 / 9,5	65	90	0,31

	(21 %)				
Příklad 5	A-škrob (30 %)	1,8 / 3,7 / 4,6 / 6,5	61	85	0,35
Příklad 6	A-škrob (9 %)	1,9 / 5,8 / 6,5 / 8,5	52	94	0,48
Příklad 7	B-škrob (5 %)	1,7 / 2,1 / 2,6 / 2,9	66	89	0,35
Příklad 8	Chitin (5,0 %, 2,5 % a 7,0 %)	1,8 / 3,7 / 4,6 / 6,5	68	94	0,50
Příklad 9	Acetát celulózy (20 %)	4,2 / 7,3 / 7,8 / 8,3	64	94	0,56
Příklad 10	Glukóza (1,2 %)	2,5 / 5,5 / 6,7 / 8,5	55	95	0,30
Srovnávací příklad 1	B-škrob (2,5%)	2,0 / 4,5 / 6,25 / 8,8	100	45	0,29
Srovnávací příklad 2	(0 %)	1,9 / 3,7 / 4,2 / 12	112	64	0,70

$t_1$  – čas do začátku růstu polyuretanové pěny;  $t_2$  – čas gelace polyuretanové pěny;  $t_3$  – čas konce růstu polyuretanové pěny;  $t_4$  – čas zavadnutí povrchu polyuretanové pěny;  $\rho$  volná objemová hmotnost polyuretanové pěny;  $O_v$  % otevřených buněk v polyuretanové pěně.

5

Příklad 11: Mikroorganismy použité pro produkci enzymů

Testované bakteriální druhy (*Pseudomonas gessardi*, *Bacillus cereus* a *Aeribacillus pallidus*) byly skladovány v mrazničce při  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  (Liebherr CP 4023) v roztoku 25% glycerolu v mikrotrubičkách. Před testováním byly všechny bakteriální kultury asepticky (ve flowboxu) naočkovány v Petriho misce obsahující růstové médium (DEV agar), obsahy DEV agaru, jak je uvedeno výrobcem, jsou uvedeny v tabulce 3. Naočkované Petriho misky byly umístěny do exsikátoru, kde došlo ke kultivaci při pokojové teplotě.

15 Tabulka 3: Obsahy DEV agaru

DEV agar
Agar $15\text{ g.l}^{-1}$
Zelatina $10\text{ g.l}^{-1}$
Extrakt z masa $10\text{ g.l}^{-1}$
Pepton z masa $10\text{ g.l}^{-1}$
Chlorid sodný $5\text{ g.l}^{-1}$

Příklad 12: Mikroskopická analýza pěny

20 Mikroskopie byla provedena pomocí mikroskopu Olympus BX40 a fotografie byly pořízeny fotoaparátem Canon EOS 700D.

Fotografie biologicky rozložitelné polyuretanové pěny, která se dále používala pro kultivaci mikrobiálních biofilmů, byly pořízeny nebarvené a barvené. Barvení bylo provedeno pomocí Gram I - Gial Violet, Sigma-ALDRICH, USA, G2039-256, Gram II - jód draselný + resublimovaný jód a Safranin O, Sigma-ALDRICH, USA, 84120-256, termofilní bakterie byly barveny inkoustem.

Příklad 13: Mikrobiální kultivace biofilmu na biologicky rozložitelné polyuretanové pěně

30

Mikrobiální kultivace biofilmu byla prováděna v 250ml Erlenmayerových bankách, každá kultivace byla opakována dvakrát. Každý testovaný mikroorganismus byl kultivován v přítomnosti a nepřítomnosti konkrétního substrátu (glukóza, pepton, ethanol). Do každé kultivační baňky byly vloženy čtyři kousky biologicky rozložitelné polyuretanové pěny připravené podle tohoto vynálezu. Mikrobiální kultura byla potom pěstována s použitím konkrétního substrátu a byla změřena optická hustota jednotlivých vzorků 1 kus pěny a 1 ml substrátu. Jako růstové médium bylo použito bakteriální standardní médium (BSM), které mělo následující složení: 6,8 [g.l<sup>-1</sup>] KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,6 [g.l<sup>-1</sup>] K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4 [g.l<sup>-1</sup>] (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,68 [g.l<sup>-1</sup>] MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 200 [μl.l<sup>-1</sup>] stopových prvků, médium BSM bylo připraveno rozpuštěním výše uvedených množství K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (99 %, PENTA, číslo šarže 280308) a KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (99 %, Lach-Ner, číslo šarže PP/2010/06505) v 1 litru destilované vody, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (99 %, PENTA, číslo šarže 150596), MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (99 %, Lach-Ner), PP/2012/06969) a stopové prvky, uvedené v tabulce 4, byly rozpuštěny v dalším 1 litru destilované vody. Oba roztoky byly sterilizovány při 121 °C v autoklávu a poté smíchány za aseptických podmínek (v Flowboux Safe Fast Elita).

15

Tabulka 4: Stopové prvky používané pro médium BSM

Složka	Koncentrace [g.l <sup>-1</sup> ]
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	6
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	2
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	2
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3,2
CaSO <sub>4</sub> .0,5H <sub>2</sub> O	3
CoSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2
N <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> .10H <sub>2</sub> O	2

Bakteriální buňky každého testovaného druhu, kultivované v Petriho miskách podle příkladu 11, byly použity k inokulaci sterilních 250ml Erlenmayerových baněk obsahujících 70 ml BSM média a 70 ml sterilní destilované vody, aby se dosáhlo počáteční optické hustoty 0,2. Výsledné suspenze byly obohaceny výše uvedenými substráty a kultivovány při 30 °C a 120 ot./min (laboratorní třepačka).

Po 5 hodinách byly do jednotlivých suspenzí umístěny sterilní biologicky rozložitelné polyuretanové pěny podle tohoto vynálezu (biologicky rozložitelné polyuretanové pěny byly sterilizovány při 110 °C v sušící komoře Zalimp, KBC G16/250, Polsko).

Byla měřena skutečná koncentrace substrátu (HPLC) a optická hustota. Suspenze byly dále třepány při 30 °C a 120 ot./min (laboratorní třepačka) a další vzorky byly odebrány po 2, 3, 4 a 5 hodinách kultivace. Vzorky biodegradovatelné polyuretanové pěny byly poté zbarveny za použití Gramova barvení a analyzovány pomocí mikroskopie (mikroskop Olympus BX40, zoom 40x). Pro každý vzorek byla poté vypočtena plocha pokrytá konkrétním biofilmem.

Optická hustota byla měřena pomocí spektrofotometru (Biochrom, Libra S22, vlnová délka 600 nm) pro analýzu skutečného růstu bakteriální kultury v konkrétní suspenzi. Byla pozorována korelace s růstem biofilmu.

Růst biofilmu byl analyzován s použitím fotografií biologicky rozložitelné polyuretanové pěny (syntetizované ve Srovnávacím příkladu 2) odebraných z kultivační suspenze po 2, 3, 4 a 5 hodinách pomocí programu NIS-elements AR 3.0. Obr. 1 zobrazuje fotografie biofilmů *Pseudomonas* sp, *Bacillus cereus* a *Aeribacillus pallidus*, kultivovaných na biologicky rozložitelné polyuretanové pěně ze Srovnávacího příkladu 2, s glukózovým substrátem po 2 a 5 hodinách, jiné kultivace používající jiné biologicky rozložitelné polyuretanové pěny podle předkládaného vynálezu (jako substráty) vykazovaly podobný nárůst biofilmu.

Příklad 14: Příklady produkčních kultivací a stanovení enzymatické aktivity

Podmínky kultivace:

Teplota: 22 °C

5

Růstové médium: BSM

pH: 7,5

10 Přidání buněčné suspenze: 200 µl buněčné suspenze do 50 ml BSM (optická hustota cca 0,1)

Kultivace za použití laboratorní třepačky

Přidání ethanolu: 19 µl (na začátku kultivace) a 32 µl (2. den kultivace)

15

Testované mikroorganismy a podmínky jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5

	induktor	Substrát	Testovaný mikroorganismus
esterázy (lipázová aktivita)	samotná pěna	pHPA, pNPB, p-NPD	<i>Pseudomonas gessardi</i> <i>Bacillus cereus</i>
amylázy	maltodextrin	4-Nitrofenyl a-D-maltohexaosid (aktivita alfa-amylázy)	<i>Pseudomonas gessardi</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Aeribacillus pallidus</i>
amylázy	škrob	4-Nitrofenyl a-D-maltohexaosid (aktivita alfa-amylázy)	<i>Pseudomonas gessardi</i> <i>Bacillus cereus</i>
chitinázy	chitin	MUFN	<i>Pseudomonas gessardi</i>

20

50 ml sterilního BSM bylo přidáno do sterilní Erlenmayerovy baňky s 0,5 g biologicky rozložitelnou polyuretanovou pěnou podle předkládaného vynálezu obsahující 5 % hmotn. chitinu (příklad 8B), 5 % hmotn. B-škrobu (příklad 7) a 2,5 % hmotn. maltodextrinu (příklad 3), a komerční pěny jako kontroly. Do každé baňky byla přidána buněčná suspenze tak, aby výsledná optická hustota byla asi 0,1; celkem bylo připraveno 10 vzorků (3 vzorky každé biologicky rozložitelné pěny a 1 kontrola), ke kontrolnímu vzorku a ke dvěma ze tří vzorků každé pěny podle předkládaného vynálezu byl přidán ethanol.

25

Druhý den kultivace byl ke vzorkům přidán ethanol. Na konci kultivace byla enzymatická aktivita měřena spektrofotometricky při vlnové délce 405 nm. Měření byla prováděna bezprostředně po začátku enzymatické reakce, poté po 0,5 hodině, 1,5 hodiny, 2,5 hodiny a 3,5 hodiny po začátku enzymatické reakce. Tabulka 6 ukazuje hodnoty optické hustoty získané na začátku kultivace a po 5 dnech kultivace.

30

35 Tabulka 6

sacharid inkorporovaný do pěny	Příklad č.	hmotnost použité pěny (g)	Optická hustota (začátek)	Optická hustota (konec)
Chitin 1 + EtOH	Příklad 8B	0,51	0,079	0,598
Chitin 2 + EtOH	Příklad 8B	0,49	0,113	0,594
Chitin 3	Příklad 8B	0,51	0,139	0,279
Škrob 1 + EtOH	Příklad 7	0,50	0,109	0,620
Škrob 2 + EtOH	Příklad 7	0,51	0,116	0,602



Škrob 3	Příklad 7	0,50	0,115	0,272
Maltodextrin 1 + EtOH	Příklad 3	0,52	0,117	0,636
Maltodextrin 2 + EtOH	Příklad 3	0,51	0,104	0,609
Maltodextrin 3	Příklad 3	0,51	0,101	0,293
Komerční pěna + EtOH	–	0,49	0,100	0,670

Poznámka: Každá pěna měla tři paralelní vzorky, ke dvěma ze tří vzorků každé pěny byl přidán EtOH.

- 5 Enzymatické aktivity jsou uvedeny v tabulce 7, nejvyšší enzymatická aktivita byla pozorována u chitináz produkovaných *Pseudomonas gessardi* a lipáz produkovaných *Pseudomonas gessardi*.

Tabulka 7: Enzymatické aktivity

<b>Amylázová aktivita (<math>\mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{l}^{-1}</math>)</b>	
0,2 ± 0,04 (+EtOH)	pěna s inkorporovaným škrobem - příklad 7 ( <i>Aeribacillus pallidus</i> )
0,2 ± 0,03 (+EtOH)	
0,222 ± 0,051	
0,1 ± 0,026 (+EtOH)	pěna s inkorporovaným škrobem - příklad 7 ( <i>Pseudomonas gessardi</i> )
0,7 ± 0,014	
0,19 ± 0,037 (+EtOH)	pěna ze Srovnávacího příkladu 2 ( <i>Pseudomonas gessardi</i> )
0,17 ± 0,051 (+EtOH)	
0,17 ± 0,048	
0,2 ± 0,037 (+EtOH)	pěna s inkorporovaným maltodextrinem - příklad 3 ( <i>Bacillus cereus</i> )
0,2 ± 0,057	
0,21 ± 0,019 (+EtOH)	pěna s inkorporovaným maltodextrinem - příklad 3 ( <i>Aeribacillus pallidus</i> )
0,3 ± 0,081 (+EtOH)	pěna s inkorporovaným maltodextrinem - příklad 3 ( <i>Pseudomonas gessardi</i> )
<b>Chitinázová aktivita (<math>\mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{l}^{-1}</math>)</b>	
0,62 ± 0,035 (+EtOH)	pěna s inkorporovaným chitinem - příklad 8B ( <i>Pseudomonas gessardi</i> )
0,49 ± 0,039	pěna ze Srovnávacího příkladu 2 ( <i>Pseudomonas gessardi</i> )

10

Příklad 15: Produkce chitinázy bakteriemi imobilizovanými na biologicky rozložitelné polyuretanové pěně z příkladu 8

- 15 Porézní biologicky rozložitelná polyuretanová pěna byla syntetizována podle příkladu 8, přičemž složení je uvedeno v tabulce 8. V tabulce 9, jsou podrobně uvedeny výsledky produkce chitinázy.

Tabulka 8: Složení biologicky rozložitelných polyuretanových pěn

	pěna 8A	pěna 8B	pěna 8C
chitin	2,5 % (3,6 g)	5 % (7,3 g)	7,5 % (15 g)
Desmodur™ N 3300	75 g	75 g	75 g
poly(tetraethylenglykoladipát) triol	60 g	60 g	60 g
voda	3,1 g	3,1 g	3,1 g
hydrogenuhlíčitan sodný	3,1 g	3,1 g	3,1 g
Niax™ Silicone L-6900	1,4 g	1,4 g	1,4 g

Dibutylcindilaurát	1,1 g	1,1 g	1,1 g
Polycat™ 9	1,1 g	1,1 g	1,1 g

Kmen bakterií *Pseudomonas gessardii* CCM 8663 byl imobilizován na biologicky rozložitelné polyuretanové pěny podle předchozích příkladů 13 a 14.

- 5 Imobilizované bakterie byly kultivovány v médiu BSM. K tomu byla případně přidána glukóza (1% roztok) nebo ethanol (1% roztok). Byl pozorován růst biomasy a bylo prokázáno, že i v prostředí s nízkým obsahem uhlíku (i, e, pouze BSM), došlo k bakteriálnímu růstu. Navíc byl pozorován významný růst u vzorků s přidanou glukózou.
- 10 Byly provedeny tři experimenty s 2,5% (8A), 5% (8B) a 7,5% (8C) chitinem, produkce chitinázy ze tří pěn (8A, 8B a 8C) byla měřena během 72 hodin při 25 °C, jak je uvedeno v tabulce 9.

Tabulka 9: Podrobnosti o produkci chitinázy

Koncentrace chitinu (%)	Koncentrace chitinázy (μM/h/l)		
	24 h	48 h	72 h
2,5	6,46	1,67	0,63
5	8,75	1,25	0,94
7,5	15,21	0,83	5,00

15

V dalším sérii experimentů byla pěna s 5% chitinem použita pro měření plochy pokryté bakteriemi po 24 hodinách při 20, 25 a 30 °C. Pokrytí bylo dobré v případě všech experimentů (> 70 %), ale nejvyšší pokrytí bylo dosaženo při reakci prováděné při 25 °C (92 %). Tato hodnota byla ovlivněna množstvím použitého inokula. Ačkoli všechna množství mezi 0,5 a 2 % (v/v) jsou dobrá (inokulum obsahovalo 108 bakterií), nejlepší výsledky (92 %) byly získány s 1 % (v/v) inokula.

20

Produkce chitinázy na třech pěnách byla měřena během 72 hodin při 25 °C, jak je uvedeno v Tabulce 10.

25

Tabulka 10

Inokulace (v/v %)	Koncentrace chitinázy (μM/h/l)		
	24 h	48 h	72 h
0,5	26,88	10,42	5,63
1	20,00	15,42	10,63
2	25,21	10,42	13,13

Všechna tři očkovací množství poskytla dobré výsledky, 1 obj. % pak poskytla výsledky nejvíce konzistentní.

30

V dalším souboru experimentů byly testovány tři zdroje uhlíku při koncentraci 200 mg/l, fermentace při 25 °C a pH 7. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 11.

35

Tabulka 11

Zdroj uhlíku	Koncentrace chitinázy (μM/h/l)		
	24 h	48 h	72 h
Pepton	25,63	10,42	13,33
Výtažek z kvasnic	30,83	14,17	12,08
Glukóza	20,00	15,42	10,63

Všechny tři zdroje lze použít s dobrými výsledky.

- 5 Další testy byly prováděny při pH od 6 do 8 a pufrovány za použití vhodného množství solí fosfátových kyselin. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 12. Pokrytí pěny bakteriemi bylo > 90 % při pH 7 i pH 8. Produkce byla měřena 72 hodin při 25 °C.

Tabulka 12

Hodnota pH	Koncentrace chitinázy ( $\mu\text{M}/\text{h/l}$ )		
	24 h	48 h	72 h
6	23,54	5,00	8,54
7	7,71	16,67	4,38
8	16,25	13,54	12,29

- 10 Všechny výsledky jsou považovány za dobré. Použitý bakteriální kmen vykazuje nejlepší výsledky při pH 8.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob přípravy biodegradovatelné polyuretanové pěny pro imobilizaci mikrobiální biomasy, **vyznačující se tím**, že zahrnuje následující kroky:

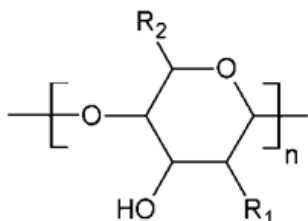
i) smíchání alespoň jednoho alifatického isokyanátu nesoucího alespoň dvě isokyanátové skupiny s alespoň jedním sacharidem v hmotnostním poměru v rozmezí od 1:1 do 30:1 za vzniku prekurzoru sacharid-isokyanát;

ii) homogenizaci prekurzoru sacharid-isokyanát z kroku i) s 20 až 70 % hmotn., vztaženo na celkovou hmotnost výsledné směsi, alespoň jednoho biologicky rozložitelného alifatického polyester-etherpolyolu s molekulovou hmotností v rozmezí od 200 do 10 000 g/mol a hydroxylovým číslem od 10 do 100 mg KOH/g; s 1 až 5 % hmotn., vztaženo na celkovou hmotnost výsledné směsi, vody a s 1 až 10 % hmotn. alespoň jednoho dalšího nadouvadla jiného než voda, vztaženo na celkovou hmotnost výsledné směsi;

iii) vypěnění homogenizované směsi z kroku ii) při teplotě v rozmezí od 20 do 100 °C, za vzniku biodegradovatelné polyuretanové pěny obsahující inkorporovaný sacharid, mající hustotu menší než 70 kg/m<sup>3</sup> a obsah otevřených buněk alespoň 70 %.

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že další nadouvadlo je vybráno ze skupiny zahrnující hydrogenuhličitan amonný, hydrogenuhličitan sodný, směs kyseliny citronové a hydrogenuhličitanu sodného, azodikarbonamid, polyethyleniminy s roubovanými adukty oxidu uhličitého.

3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že sacharidem je monosacharid nebo sacharid vybraný ze skupiny obsahující sacharidy obecného vzorce I



(I),

kde

n je celé číslo v rozmezí od 2 do 50 000;

R<sub>1</sub> je vybrán ze skupiny sestávající z -OH, -NH<sub>2</sub>, -NH-C(=O)-CH<sub>3</sub>, -O-C(=O)-R<sub>3</sub>;

R<sub>2</sub> je vybrán ze skupiny sestávající z -CH<sub>2</sub>-OH, -CH<sub>2</sub>-O-C(=O)-R<sub>3</sub>, -C(=O)-OM;

R<sub>3</sub> je (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyl, který může být lineární nebo rozvětvený;

M je vodík, kationt amonný, kationt alkalického kovu nebo kationt kovu alkalických zemin.

4. Způsob podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že alifatický isokyanát je vybrán ze skupiny zahrnující pentamethylendiisokyanát, hexamethylendiisokyanát, dimery pentamethylendiisokyanátu, dimery hexamethylendiisokyanátu, trimery pentamethylendiisokyanátu, trimery hexamethylendiisokyanátu, cyklohexyldiisokyanát,

methylenicyklohexyldiisokyanát, isoforondiisokyanát, polyisokyanáty z rostlinných olejů, methylester L-lysindiisokyanátu, ethylester L-lysindiisokyanátu.

5 5. Způsob podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že alifatický polyesteretherpolyol je vybrán ze skupiny zahrnující poly(diethylenglykoladipát)diol, poly(triethylenglykoladipát)diol, poly(tetraethylenglykoladipát)diol, poly(diethylenglykoladipát)triol, poly(triethylenglykoladipát)triol, poly(tetraethylenglykoladipát)triol, poly(diethylenglykolsukcinát)diol, poly(triethylenglykolsukcinát)diol, poly(tetraethylenglykolsukcinát)diol, poly(diethylenglykolsukcinát)triol, poly(triethylenglykolsukcinát)triol, poly(tetraethylenglykolsukcinát)triol.

15 6. Způsob podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že se ke směsi, která má být homogenizována v kroku ii), přidá povrchově aktivní látka.

7. Způsob podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že se ke směsi, která má být homogenizována v kroku ii), přidá katalyzátor, vybraný ze skupiny obsahující oktanoát cínatý, dibutylcindilaurát, *N,N*-dimethylbenzylamin, *N,N,N',N'',N'''*-pentamethyldiethylentriamin, dimethylethanolamin, triethylenediamin, 3-aminopropyl dimethylamin, dimethylcyklohexylamin, propylenglykol, *N*-methylmorfolin, bis-(2-dimethylaminoethyl)ether, 1,3,5-tris[3-(dimethylamino)propyl]hexahydro-1,3,5-triazin a jejich kombinace.

20 8. Biodegradovatelná polyuretanová pěna obsahující inkorporovaný sacharid, mající hustotu menší než 70 kg/m<sup>3</sup> a obsah otevřených buněk alespoň 70 %, připravitelná způsobem podle kteréhokoliv z předcházejících nároků.

9. Biodegradovatelný materiál na bázi polyuretanové pěny pro produkci sacharid-štěpícího enzymu, **vyznačený tím**, že zahrnuje biodegradovatelnou polyuretanovou pěnu podle nároku 8 a imobilizovaný bakteriální kmen vybraný ze skupiny obsahující *Pseudomonas gessardii*, *Bacillus cereus*, *Aeribacillus pallidus*, pro produkci sacharid-štěpícího enzymu, přičemž sacharid inkorporovaný do biodegradovatelné polyuretanové pěny je stejný jako substrát pro sacharid-štěpící enzym produkovaný imobilizovaným bakteriálním kmenem.

10. Způsob produkce sacharid-štěpících enzymů, **vyznačený tím**, že zahrnuje následující kroky:

35

i) příprava biodegradovatelné polyuretanové pěny podle nároku 1 až 7;

ii) inokulaci biodegradovatelné polyuretanové pěny z kroku i) bakteriálním kmenem produkujícím sacharid-štěpící enzym a kultivaci tohoto bakteriálního kmene produkujícího sacharid-štěpící enzym do vytvoření biofilmu, čímž se získá biodegradovatelný materiál na bázi polyuretanové pěny pro produkci sacharid-štěpícího enzymu s imobilizovaným bakteriálním kmenem produkující sacharid-štěpící enzym podle nároku 9;

40 45 iii) fermentaci bakteriálního kmene, produkujícího sacharid-štěpící enzym, imobilizovaného na biodegradovatelné polyuretanové pěně, což vede k produkci sacharid-štěpícího enzymu;

iv) separaci sacharid-štěpícího enzymu od materiálu na bázi biodegradovatelné polyuretanové pěny.

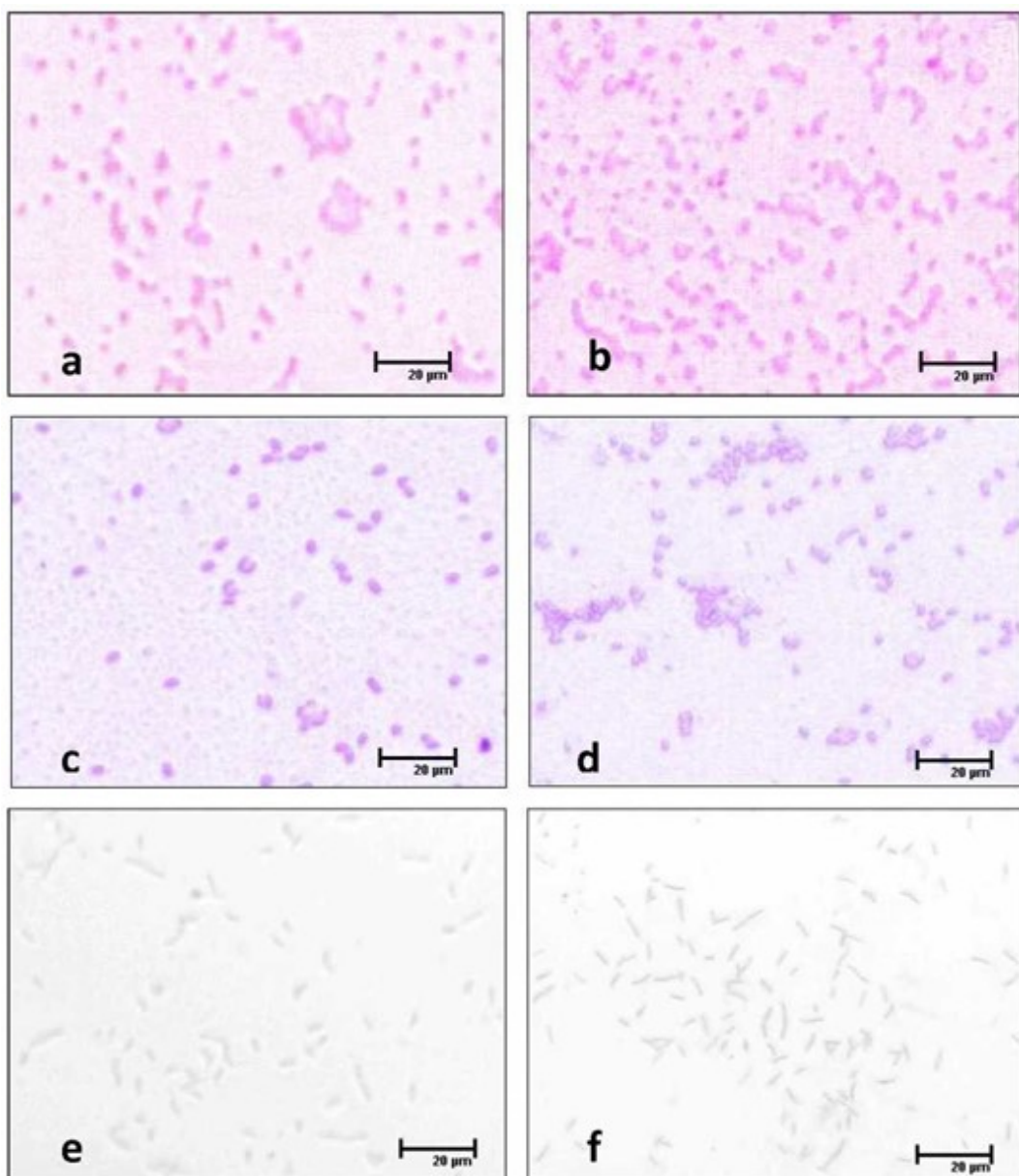
50 11. Použití biodegradovatelné polyuretanové pěny podle nároku 8 v průmyslové mikrobiologii jako nosiče pro imobilizaci mikrobiální biomasy.

12. Použití biodegradovatelné polyuretanové pěny podle nároku 8 jako nosiče pro imobilizaci průmyslových produkčních mikroorganismů, vybraných ze skupiny zahrnující *Pseudomonas gessardii*, *Bacillus cereus*, *Aeribacillus pallidus*.

55

- 5 13. Použití biodegradovatelného materiálu na bázi polyuretanové pěny podle nároku 9 pro produkci sacharid-štěpícího enzymu, s výhodou je sacharid-štěpící enzym vybrán ze skupiny zahrnující amylázu, glukosidázu, glykogen fosforylázu, inulinázu, celulózu, pektin degradující enzymy.

1 výkres



Obr. 1