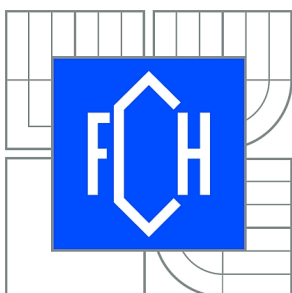


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE MATERIÁLŮ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE

STUDIUM BIODEGRADABILITY POLYKAPROLAKTONU

STUDY OF POLYCAPROLACTONE BIODEGRADABILITY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

IVANA CHAMRADOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. STANISLAVA VOBĚRKOVÁ,
Ph.D.

BRNO 2010



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0413/2009	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav chemie materiálů	
Student(ka):	Ivana Chamradová	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie, technologie a vlastnosti materiálů (2808R016)	
Vedoucí práce	Mgr. Stanislava Voběrková, Ph.D.	
Konzultanti:	Mgr. Soňa Hermanová, Ph.D.	

Název bakalářské práce:

Studium biodegradability polykaprolaktonu

Zadání bakalářské práce:

Cílem je zpracování literární rešerše problematiky biodegradability PCL, zahrnující publikované druhy používaných mikroorganismů a vlastních enzymů, dále různé způsoby studia biodegradability za různých experimentálních podmínek a to včetně vlastního vyhodnocování biodegradačních procesů. Experimentálním cílem bude vypracování metodiky biodegradačních testů a provedení série experimentů se zvoleným mikroorganismem a enzymem. Polymerní vzorky o vhodné molekulové hmotnosti budou ve formě fólie o definovaných rozměrech, připravené metodou "solution casting". Proces biodegradace bude vyhodnocen na základě změn molekulové hmotnosti, distribuce molekulových hmotností, teploty tání, krystalinity a povrchových změn zkoumaného materiálu

Termín odevzdání bakalářské práce: 28.5.2010

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Ivana Chamradová
Student(ka)

Mgr. Stanislava Voběrková, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Josef Jančář, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Alifatické polyestery představují skupinu degradovatelných polymerních materiálů. Tyto materiály našly své využití především v biomedicínských aplikacích a jako obalové materiály. V teoretické části práce je shrnuta literární rešerše zabývající se výzkumem enzymatické a mikrobiální degradace poly(ϵ -kaprolaktonu) (PCL).

V experimentální části byla vypracována metodika biodegradačních testů PCL a provedena série experimentů s *Bacillus subtilis* a *Aspergillus*-lipázou. Polymerní vzorky o molekulové hmotnosti $M_n = 19\,300$ g/mol byly připraveny ve formě fólie o tloušťce 100 μm a průměru 1 cm pro enzymatickou degradaci nebo 3 cm pro mikrobiální degradaci metodou "solution casting". Proces biodegradace byl vyhodnocen na základě změn molekulové hmotnosti, polydisperzity, teploty tání, krystalinity a povrchových změn polymerního materiálu.

ABSTRACT

Aliphatic polyesters represent a group of degradable polymeric materials. These materials found their utilization almost in biomedical applications and as packing materials. In the theoretical part, the literature review on enzymatic and microbial degradation research of poly(ϵ -caprolactone)(PCL) is summarized .

In the experimental part, the methodology of biodegradation testing of PCL was formed and a series of experiments with a *Bacillus subtilis* and *Aspergillus*-Lipase was carried out.

Polymeric samples of $M_n = 19\,300$ g/mol the film form with 100 μm thickness and 1 cm diameter were subjected to enzymatic degradation. Samples with 3 cm diameter were exposed to microbial degradation by the "solution casting" method. Biodegradable process was interpreted on the basis of changes of the molecular weight, melting point, crystallinity and changes on the surface of polymeric materials.

KLÍČOVÁ SLOVA

poly(ϵ -kaprolakton), degradace, lipasa z *Aspergillus* sp., *Bacillus subtilis*

KEYWORDS

poly(ϵ -caprolactone), degradation, *Aspergillus lipase*, *Bacillus subtilis*

CHAMRADOVÁ, I. *Studium biodegradability polykaprolaktonu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 39 s. Vedoucí bakalářské práce Mgr. Stanislava Voběrková, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla především poděkovat Mgr. Stanislavě Voběrkové, Ph.D. za odborné vedení a Mgr. Soni Hermanové, Ph.D. za konzultace a cenné rady při plnění zadání této práce. Děkuji také Bc. Zdeňce Neumayerové za přípravu polymerních vzorků, Ing. Zdeňku Cihlářovi za pomoc při vyhodnocení DSC analýz, Ing. Radce Bálkové, Ph.D. za charakteristiku morfologie povrchu PCL a pořizování snímků na CLSM a panu Jiřímu Dvořákovi za pořizování snímků na SEM.

Obsah

1. Úvod.....	3
2. Teoretická část.....	7
2.2. Typy degradace PCL podle mechanismu.....	10
2.2.1 Mikrobiální degradace.....	10
2.3.2 Enzymatická degradace.....	12
3. Experimentální část.....	15
3.1 Materiál přístroje.....	15
3.1.1 Použité chemikálie.....	15
3.1.2 Biologický materiál.....	15
3.1.3 Použitý polymer.....	15
4. Příprava roztoků.....	16
4.2 Příprava kultivačního živného bujónu (NBG+OO).....	16
4.3 Příprava fosforečnanového pufru.....	16
5. Pracovní postupy.....	17
5.1 Příprava vzorků PCL.....	17
5.2 Enzymatická degradace.....	18
5.3 Mikrobiální degradace.....	18
5.3.1 Oživení želatinových disků.....	18
5.3.2 Očkování šikmých agarů.....	18
5.3.3 Převedení do fosforečnanového pufru.....	18
6. Metody charakterizace polymerů.....	19
6.1 Gelová permeační chromatografie (GPC).....	19
6.2 Diferenční skenování kalorimetrie (DSC).....	19
6.3 Skenovací elektronový mikroskop (SEM).....	19
6.4 Konfokální mikroskop (CLSM).....	19
7. Výsledky a diskuze.....	20
8. Závěr.....	30
9. Seznam použitých zkratk a symbolů.....	31
10. Seznam použitých zdrojů.....	32
11. Seznam použitých příloh.....	36

1. ÚVOD

V současné době je na celém světě vyprodukováno přibližně 140 mil. tun syntetických polymerů ročně. Výrobky z těchto polymerů jsou relativně stabilní i po ukončení doby používání spotřebiteli a rovněž jsou poměrně odolné vůči degradačním cyklům probíhajícím běžně v biosféře. Následkem je hromadění obtížně recyklovatelného plastového odpadu a v posledních letech zejména kumulace rozpustných plastů v odpadních vodách [1]. V posledních 20ti letech, byla prokázána biodegradabilita u řady plastů jak z obnovitelných zdrojů tak i syntetických a byl také objasněn mechanismus jejich degradace. Získávané znalosti molekulární stavby biodegradabilních polymerů přispívají k rozvoji biotechnologií pro znovu využití či likvidaci syntetického odpadu [2]. Současně narůstá snaha syntetizovat takové druhy polymerů, které jsou degradovány bakteriemi a houbami až na oxid uhličitý a vodu jako konečné produkty. Tyto polymery mohou být rozděleny do tří hlavních skupin; polyestery produkované mikroorganismy (poly(3-hydroxybutyrát)), přírodní polysacharidy (škrob) a syntetické alifatické polymery [3].

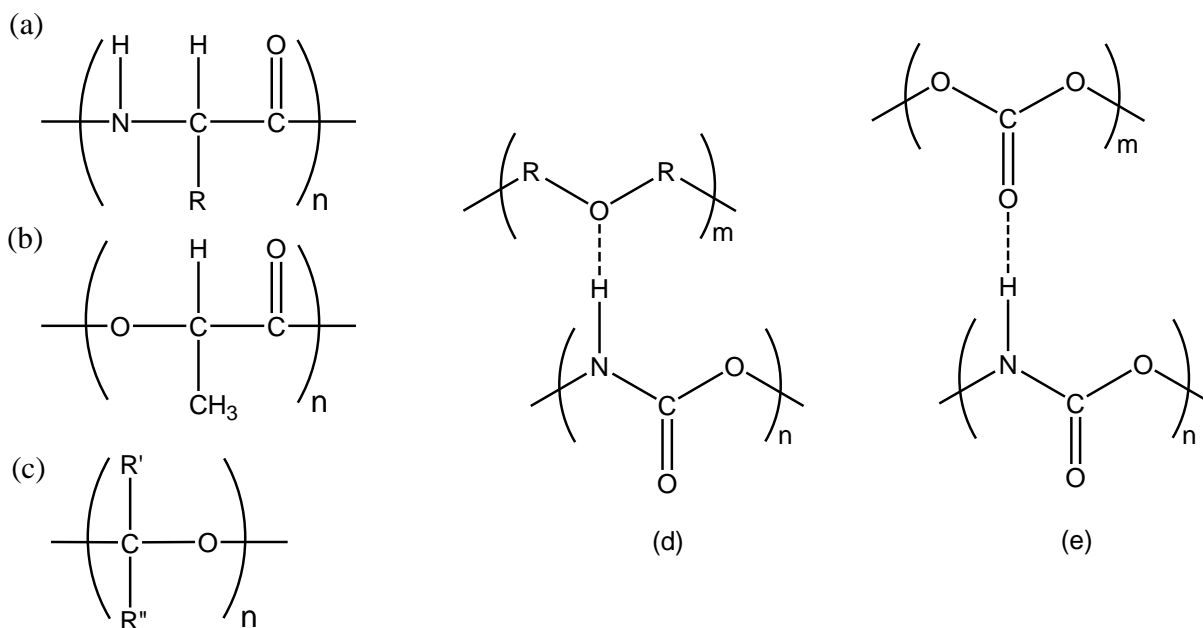
V rámci této práce byla studována enzymatická a mikrobiální (bio)degradabilita alifatického polyesteru poly(ϵ -kaprolaktonu) (PCL). Hlavním cílem bylo vypracování metodiky vlastních biodegradačních testů a provedení série experimentů s bakteriálním kmenem *Bacillus subtilis* a komerční lipázou-enzymem z *Aspergillus sp.* Pro studie byl použit bimodální PCL připravený v Laboratoři *Syntézy polymerů* o molekulové hmotnosti $M_n = 19\,300$ g/mol a $M_w/M_n = 6,8$. Polymerní vzorky byly připraveny metodou SC (solution casting) a použity ve formě filmu o tloušťce 100 μm .

2. TEORETICKÁ ČÁST

Termín biodegradace je v dostupné literatuře používán často protichůdně a nebo dokonce definován nevhodně. V oblasti medicínských aplikací, zahrnujících polyesterové materiály pro vstřebatelné švy, rekonstrukce kostní tkáně a pro nosiče léků termín biodegradace znamená hydrolyzu esterových vazeb nastávající za fyziologických podmínek. V oblasti degradovatelných obalových materiálů probíhá proces biodegradace za účasti živých organismů. V této práci je tedy biodegradace definována jako degradace nastávající působením živých organismů, která vede v konečném důsledku k mineralizaci polymerního materiálu a/nebo jeho přeměně na biomasu [3].

Biodegradabilním polymerním materiálům dominují zejména polymery obsahující heteroatomy (N, O) v hlavním řetězci. Polymerní řetězce obsahující etherové, amidové, nebo esterové vazby (Obr. 1) mohou podstoupit hydrolytické štěpení vedoucí ke vzniku níže-molekulárních produktů. Původní, dlouhé polymerní řetězce neprojdou buněčnou membránou, degradace musí tedy probíhat nejprve přes oligomerní meziprodukty. Konečné produkty degradace-monomery mohou být následně absorbovány a využity mikrobiální buňkou. [4]

Počáteční štěpení polymerních řetězců může nastat v důsledku nejen biologických, ale také řady fyzikálních a chemických faktorů [5]. Fyzikální síly uplatňující se během zahřívání/chlazení, tání/tuhnutí nebo hydratace/sušení vzorků mohou vést k mechanickému poškození polymerního materiálu [6].

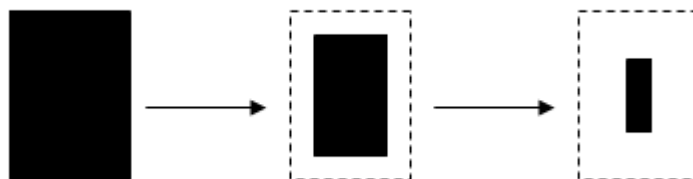


- (a) amidová vazba
 (b) etherová vazba
 (c) esterová vazba

- (d) polyether-polyuretan
 (e) polyester-polyuretan

Obr. 1: Polymery s hydrolyzovatelnými vazbami

Degradace probíhá buď na povrchu vzorku (homogenní)(Obr.2) nebo v celém jejím objemu (heterogenní). Všeobecně je degradace řízená složením materiálu a dále proměnnými vlastnostmi jako jsou například morfologie matrice, orientace řetězců, chemické složení, stereochemická struktura, distribuce monomerních jednotek, molární hmotnost a její distribuce, přítomnost nezreagovaného monomeru, oligomeru a jiného nízko-molekulárního produktu, velikost a tvar vzorku, vlastní prostředí degradace zahrnující přítomnost vlhkosti a kyslíku, dále druh mikroorganismu a enzymu, pH prostředí, teplota atd.

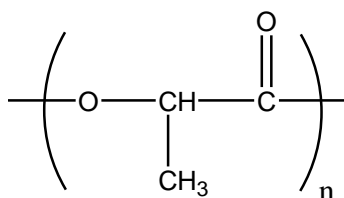


Obr. 2 Princip eroze uplatňující se na povrchu vzorku

Degradace alifatických polyesterů může obecně probíhat několika způsoby zahrnujícími chemickou hydrolýzu, mikrobiální, enzymatickou a termickou degradaci. Mechanismus degradace, který se uplatní jako hlavní závisí především na struktuře polyesteru a prostředí, ve kterém je materiál exponován [7].

Jelikož byla v této práci zaměřena pozornost na poly(ϵ -kaprolakton) patřící do skupiny alifatických polyesterů, budou stručně představeny další nejvýznamnější zástupci. Vedle syntetického polykaprolaktonu (PCL) mezi ně patří ještě poly(mléčná) kyselina (PLA), a poly(3-hydroxybutyrát) (PHB).

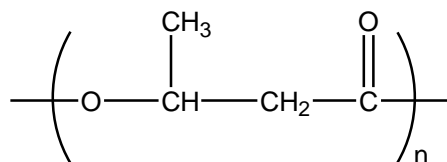
Poly(mléčná) kyselina (PLA) je velmi používaným zástupcem polyesterů v biomedicínských aplikacích například pro výrobu chirurgicky vstřebávatelných švů, zubních implantátů, kloubních náhrad, nosičů léků, apod. K předním parametrům určujícím její použití patří zejména vysoká pevnost, biokompatibilita a biodegradabilita (Obr. 3). V posledních letech stoupá také využití PLA jako alternativní náhrady tradičního plastového zboží v oblasti obalových výrobků [8]. Značnou výhodou je možnost syntézy výchozích monomerů z obnovitelných zdrojů (kukuřice, cukrová třtina, brambory) [9].



Obr. 3: Monomerní jednotka PLA řetězce

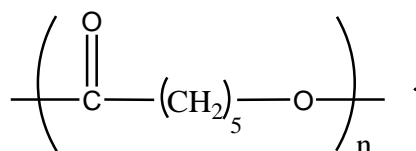
Jako obalový materiál je dále používán poly(3-hydroxybutyrát) (PHB) (Obr. 4). Tento polyester produkovaný četnými bakteriemi v přírodě jako vnitrobuněčná rezerva uhlíku nebo energie byl poprvé nalezen v *Bacillus megaterium* v roce 1925 [10]. PHB je často srovnáván s polypropylenem (PP) díky svým fyzikálním vlastnostem (bod tání, krystalinita, teplota skelného přechodu, apod.) [11]. PHB vyniká relativně velkou odolností vůči vlhkosti zároveň

je však degradovatelný celou řadou mikroorganismů [12]. V roce 1996 byla popsána enzymatická degradace PHB Tomasi a kol., kdy enzym přednostně katalyzoval degradaci amorfních oblastí [13].



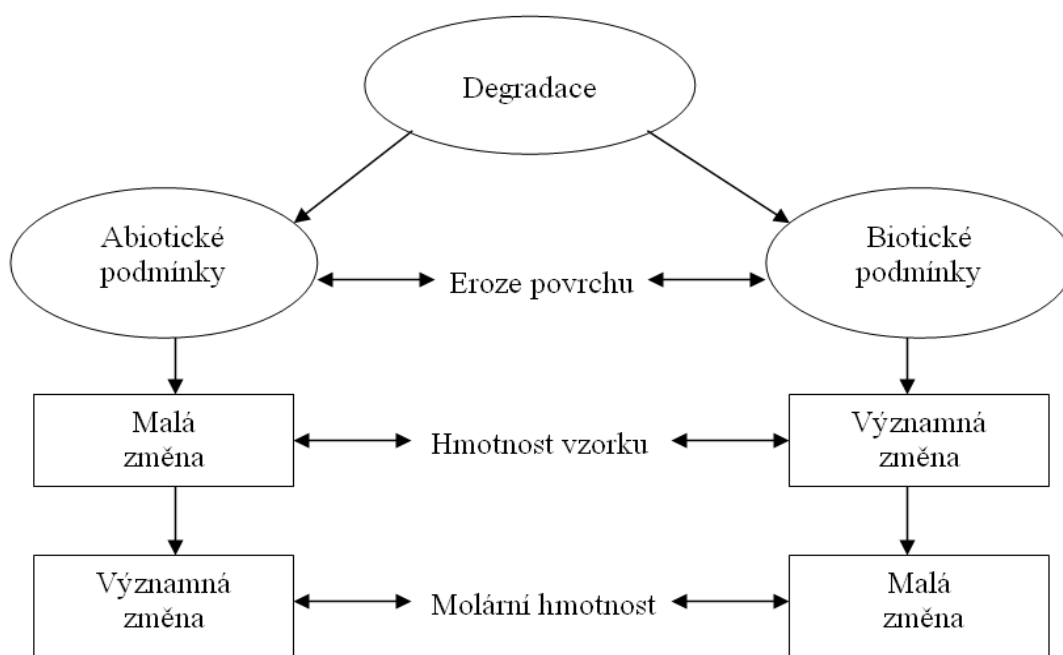
Obr. 4: Monomerní jednotka PHB

Polykaprolakton (PCL) (Obr. 5) nepochází na rozdíl od předchozích alifatických polyesterů z obnovitelných zdrojů. PCL je lineární, hydrofobní polyester. Předchozí studie prokázaly, že PCL patří mezi semi-krytalické polyestery s krystalinitou 40-60 % [14]. Je také známo, že počáteční krystalinita významně ovlivňuje degradaci alifatických polyesterů [15]. PCL je vyráběn polymerací za otevření kruhu (ROP) cyklického ϵ -kaprolaktonu. Vyznačuje se relativně nízkou teplotou tání ($t_t = 59-64 \text{ }^\circ\text{C}$) i skelného přechodu ($t_g = -71 \text{ }^\circ\text{C}$) [7, 16]. PCL byl původně využíván pro svou degradabilitu působením mikroorganismů zejména v oblasti obalových materiálů. Postupně získal značnou pozornost jako implantovatelný materiál, jelikož je degradován i hydrolýzou za fyziologických podmínek. Tento netoxický a biokompatibilní materiál je používán pro výrobu nosičů léků, vstřebatelných švů, materiálu k rekonstrukci kostí apod. [17, 18]. Kopolymery nebo směsi PCL mívají obecně lepší mechanické vlastnosti, zpracovatelnost i vyšší permeabilitu než samotný homopolymer, což rozšířilo jeho využití v mnoha různých aplikacích [10, 19].



Obr. 5: Monomerní jednotka PCL

Na základě řady studií bylo obecně postulováno, že důsledkem biodegradace PCL v biotickém prostředí je relativně velký úbytek hmotnosti vzorku doprovázený relativně malou změnou jeho molární hmotnosti (Obr. 6). Naproti tomu v abiotickém prostředí byl v důsledku degradačního procesu zjištěn zpravidla malý pokles celkové hmotnosti studovaného vzorku polymeru doprovázený ale významným snížením jeho molární hmotnosti [7]. Působením mikroorganismů dochází k degradaci na povrchu studovaného vzorku (Obr. 2)



Obr. 6: Důsledky degradace PCL v abiotických a biotických podmínkách

V následujících kapitole bude shrnuta literární rešerše problematiky výzkumu biodegradability PCL, zahrnující publikované druhy používaných mikroorganismů a vlastních enzymů, dále různé způsoby studia biodegradability za různých experimentálních podmínek a to včetně vlastního vyhodnocování biodegradčních procesů.

1.3. Typy degradace PCL podle mechanismu

1.3.1 Mikrobiální degradace

Mikrobiální degradace nastává obecně v důsledku aktivity mikroorganismů rostoucích na povrchu nebo v celém objemu daného materiálu [20, 21]. Mikroorganismy atakují polymerní materiál mechanickým působením, chemickou a/nebo enzymatickou cestou [22] a využívají polymer a/nebo aditiva (škrob) jako zdroje uhlíku a energie [23]. Mikrobiální degradabilita polyesteru závisí na konkrétním složení a vlastnostech polymerního materiálu a specifických podmínkách prostředí degradace jako jsou vlhkost, počasí a přítomnost škodlivin v atmosféře a na mikrobiální aktivitě tj. druhu použitého mikroorganismu, jeho množství a typu enzymu, který produkuje [24, 25]. Z řady studií je známo, že aerobní a anaerobní mikroorganismy snadno mineralizují řadu alifatických polyesterů, zatímco aromatické polyestery jsou vůči mikrobiálnímu ataku poměrně odolné [26]. Ze studovaných mikroorganismů byly pro degradace PCL nejčastěji využity vláknité houby, plísňe, kvasinky a bakterie.

a) Biodegradace PCL v přítomnosti hub a plísní

Pro studium biodegradace byly ve velké míře využívány rody *Penicillium*, *Aspergillus* a *Fusarium*.

Tokiwa v roce 1976 studoval degradabilitu výše-molekulárního PCL filmu ($M_n = 25000-35000$ g/mol) v přítomnosti *Penicillium* sp. kmen 26-1 (ATCC 36507). Studovaný vzorek PCL byl kompletně degradován během 12 denní periody [27]. Následující studie prokázala, že *Aspergillus fischeri*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium funiculosum* a *Fusarium* sp. jsou schopny rozkládat a využívat PCL o rozsahu molárních hmotností $M_n = 7130-35000$ g/mol. Obecně však bylo zjištěno, že s rostoucí hodnotou molární hmotnosti biodegradabilita polyesterů klesá [28].

Kim a kolektiv studoval v roce 1995 degradaci PCL působením *Aspergillus niger*. Degradace PCL ve formě filmu byla prováděna po dobu 3 týdnů při teplotě 30 °C. V případě kultivace mikroorganismu přímo na povrchu vzorku došlo pravděpodobně k uplatnění jak účinku produkovaných enzymů tak i ostatních biofyzikálních a biochemických vlivů. Úbytek hmotnosti byl 5,1 hmot. %. Pokud však bylo mycelium rozsuspendováno v agaru a následně nalito na vzorek, došlo k uplatnění pouze degradace enzymatické a úbytek hmotnosti vzorku činil téměř 14 hmot. %. Polydisperzita však zůstala nezměněna. V obou případech experimentů došlo na povrchu materiálu k fyzikálním změnám, vytvořily se díry a byl zaznamenán hmotnostní úbytek vzorku a změna pH média [29].

Sanchez a kol. studovali biodegradace PCL v přítomnosti termotolerantní houby *Aspergillus* sp., kmen ST-01. Film byl při teplotě 50 °C v médiu s přidavkem kvasničného extraktu po 6 dnech zcela degradován. Jako degradační produkty, analyzované pomocí kapalinové chromatografie (HPCL), byly identifikovány kyseliny jantarová, máselná, valerová a kapronová [30].

Biodegradaci krystalických a amorfních oblastí PCL působením *Aspergillus fumigatus* se v roce 2000 rovněž zabývali Eldsäter a kol. Degradace v biotickém prostředí měla za následek výrazné snížení číselně-střední molekulové hmotnosti (M_n) ve srovnání s hmotnostně-střední M_w . K poklesu M_n došlo pravděpodobně v důsledku přednostního uplatnění degradace u konců polymerních řetězců, které se nacházejí zpravidla v amorfní oblasti [31].

b) Biodegradace PCL v přítomnosti kvasinek

Fields v roce 1973 studoval biodegradaci PCL a dalších polyesterů s rostoucí molární hmotností v přítomnosti „černé kvasinky“ *Aureobasidium pullulans*. U studovaného materiálu docházelo ke ztrátě hmotnosti a přednostně byly odbourávány nízkomolekulární frakce [32].

Lefebvre a kol. studovali v roce 1994 degradaci vzorků PCL s koncovými hydroxylovými a methoxylovými skupinami působením směsné kultury mikroorganismů získané z kompostu a čistou kulturou *Actinomyces* sp. získanou rovněž z kompostu. Studie prokázala, že k degradaci docházelo v okolí konců řetězců [33].

c) Biodegradace PCL v přítomnosti bakterií

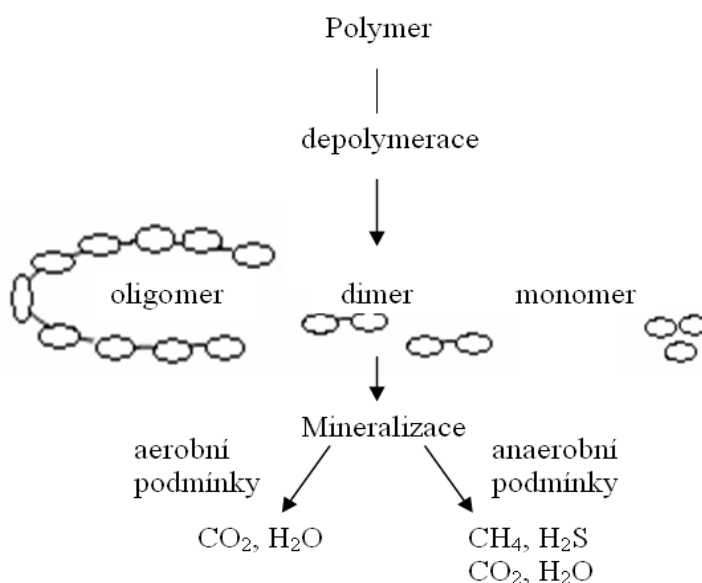
Yavuz a kol. se v roce 2001 zabývali studií degradace homopolymeru PCL a kopolymeru PCL/PLA ve vodném roztoku za přítomnosti i za absence mikroorganismu *Pseudomonas putina*. Během 60 dnů experimentu došlo ke snížení molekulové hmotnosti vzorku, ke změně pevnosti v tahu a modulu pružnosti u kopolymerů (u homopolymeru zůstaly vlastnosti nezměněny). Ze získaných výsledků lze usuzovat na vyšší rychlost degradace kopolymerů ve srovnání s homopolymery [34].

Na základě výše uvedených studií lze předpokládat, že rychlost a průběh degradace jsou ovlivněny jednak kultivačními faktory tj. druhem použitého mikroorganismu a způsobem vedení experimentu a jednak výchozími vlastnostmi polymeru jako jsou molekulová hmotnost a distribuce (stupeň polydisperzity) a také krystalinita. Ve většině případů byla degradace polyesterů provázena poklesem molekulových hmotností a uplatňovala se především v okolí konců polymerních řetězců. Jelikož byly jednotlivé studie vedeny za různých experimentálních podmínek nelze dané výsledky jednoduše srovnávat. Pro získání uceleného pohledu na mechanismus degradace polykaprolaktonu s různými výchozími vlastnostmi působením různých mikroorganismů či enzymů je nutné vést studie za stejných podmínek a za využití řady analytických metod.

V této práci byl pro studium biodegradability PCL zvolen mikroorganismus *Bacillus subtilis*. Jedná se o gram-pozitivní aerobní bakterii, která se vyskytuje v půdě a produkuje celou řadu enzymů (α -amylásu, lipásu, endocellulásu a mnoho dalších), které jsou ceněny pro svůj biotechnologický potenciál. Navíc je tento mikroorganismus označován jako tzv. *GRAS* organismus (*Generally Recognized As Safe*) [35, 36]. Lipása produkovaná touto baktérií patří co do velikosti k typu I.4, tj. k nejmenším známým lipásám s molekulovou hmotností 19 600 g/mol [37]. *Bacillus subtilis* byl dosud studován zejména v rámci mikrobiální degradace kopolymerů PCL se škrobem a jilem a blendů poly(ϵ -kaprolaktonu) a polyvinylbutyralu (PCL/PVB) [38, 39].

1.3.2 Enzymatická degradace

Mikroorganismy obecně produkují dva typy enzymů - biokatalyzátorů štěpících polymerní řetězce. Exoenzymy – depolymerázy štěpí (depolymerují) dlouhé uhlíkaté řetězce na kratší (menší fragmenty) a dále až na monomery, které pak snadno penetrují dovnitř buňky. Endoenzymy zapojují tyto produkty degradací do biochemických procesů, ve kterých jsou využívány jako zdroje energie za vzniku CO_2 , H_2O nebo CH_4 jako konečných produktů mineralizace (Obr. 7). Charakter koncových produktů je dán aerobními nebo anaerobními podmínkami [1]. Je známo, že monomery, dimery a oligomery degradují velmi snadno, zatímco materiály s vyšší molární hmotností degradují velmi obtížně.



Obr. 7: Proces mineralizace

V případě degradace alifatických polyesterů, ke kterým patří i studovaný PCL, byl pro studium enzymatické degradace využíván zejména enzym lipása. Lipázy jsou v současné době produkovány komerčně - z bakterií a hub a nacházejí své uplatnění nejen při zpracování tuků, olejů, detergentů a potravin, ale i v papírenském, chemickém a kosmetickém průmyslu a také při výrobě léčiv [40, 41].

Lipázy patří mezi enzymy induktivního charakteru a jsou mikroorganismem produkovány za přítomnosti induktoru - alifatického polyesteru. Předpokládá se, že k aktivaci těchto depolymeráz dochází v důsledku konformační změny vyvolané adsorpčním navázáním na hydrofobní povrch polymerního substrátu. Lipáza pak funguje jako biokatalyzátor při štěpení dostupných esterových vazeb za vzniku níže-molekulových fragmentů polymerního řetězce [42].

Studie biodegradability PCL prokázaly, že v přítomnosti tří druhů lipás; *Rhizopus delemere*, *Rhizopus arrhizus* a *Pseudomonas aeruginosa* dochází k významnému urychlení hydrolytické degradace [43, 44, 45].

Iwamoto a Tokiwa studovali v roce 1994 enzymatickou degradaci směsi PCL s běžnými komoditními polymery jako jsou polystyren (PS), polypropylen (PP), polyethylen (PE), nylon (NY) a polyethylentereftalát (PET). Enzym lipáza pro studie byl izolován z houby *Rhizopus arrhizus*. PCL si zachoval vysokou degradabilitu ve směsi s PE a PP. V případě PCL s NY nedošlo ke změně materiálu procesem degradace. Na druhou stranu u směsi PCL s PS a PET došlo k výraznému snížení degradability [46].

V literatuře lze nalézt celou řadu studií věnovaných biodegradačním účinkům lipás. Chen a kol. se zabývali v roce 1999 degradací mikročástic PCL po dobu 9 týdnů při teplotě 37 ± 1 °C a pH = 7,4. Krystalinita vzorků v prostředí s přidaným enzymem rostla ve srovnání s kontrolními vzorky i původním materiálem. Proces degradace probíhal pravděpodobně přednostně v amorfní oblasti vzorků [47].

Sivalingam a kol. v roce 2002 degradovali PCL film v přítomnosti enzymů lipáza z různých zdrojů; Novozyme 435 (*Candida antarctica*) a Lipolasa. Jako prostředí degradací byly zvoleny aceton, toluen, benzen a benzylalkohol při teplotě 45 °C. Ve všech případech byla míra degradace u lipázy - Novozymu vyšší než u lipázy Lipolasy. Co se týká použitých rozpouštědel byla aktivita enzymu největší v prostředí acetonu a benzylalkoholu. Na základě získaných výsledků byla navržena korelace mezi rychlostí degradace, viskozitou a polaritou konkrétního rozpouštědla [48].

Hostino a Isono provedli v roce 2002 studii degradace PCL filmu ($M_w = 40\,000$ g/mol) v přítomnosti lipázy (získané z *Chromobacterium viscosum*) ve fosforečnanovém pufru při teplotě 37 °C a pH = 7,0. Degradací experimenty byly ukončeny již po 6 dnech, kdy byl film PCL kompletně degradován [49].

V dnešní době je využití PCL směřováno především do přípravy směsí s různými přírodními i syntetickými polymery. Tímto způsobem jsou pak připraveny materiály s řízenou dobou degradace.

Sekosan a kol. v roce 2009 studovali enzymatickou degradaci PCL s rozdílnou hodnotou počáteční krystalinity. Rozdílného stupně krystalinity bylo dosaženo temperováním vzorků v peci (do 50 °C), kde stupeň krystalinity vzorků rostl se zvyšující se teplotou. Studie ukázala, že úbytek hmotnosti vzorku během enzymatické degradace PCL byl ovlivněn stupněm krystalinity materiálu. Obecně bylo zjištěno, že film s nižší krystalinitou (24 %) degradoval rychleji než film s vyšší krystalinitou (45 %).

PCL film byl dále v roztoku fosforečnanového pufru za přítomnosti enzymu *Pseudomonas* lipáza temperován na 25 °C a 37 °C. Během 12 denních degradačních experimentů byla

prokázána závislost enzymatické degradace na počátečním stupni krystalinity PCL filmu bez ohledu na teplotu degradace [50].

V případě degradačních studií za použití komerčních enzymů, je rychlost degradace opět ovlivněna zdrojem z něhož se lipása získala a nastává v řádu dnů [49] až týdnů [46].

Degradace je rovněž ovlivněna počátečním stupněm krystalinity a to bez ohledu na teplotu degradace, dochází k ní přednostně v amorfních oblastech a projevuje se nárůstem stupně krystalinity.

V této práci byl pro studium enzymatické biodegradace PCL použit komerční preparát lipása z *Aspergillus sp.* [31, 33]

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 MATERIÁL A PŘÍSTROJE

3.1.1 Použité chemikálie

- Tetrahydrofuran (THF) p.a.
- Methanol p.a.
- Kyselina chlorovodíková p.a.
- Hydroxid sodný p.a.
- Chloroform p.a.
- Chlorid sodný p.a.
- Azid sodný p.a.

Všechny uvedené chemikálie byly použity od výrobce Lach-ner s.r.o.

- Dodekahydrát hydrogenfosforečnan sodného - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, Spolek pro chemickou a hutní výrobu, národní podnik Praha
- Fosforečnan sodný (kyselý) Lachema a.s.
- D-glukóza
- Pepton
- Kvasniční extrakt
- Masopeptonový agar (MPA)

Všechny uvedené chemikálie byly použity od výrobce Himedia Laboratories Limited

- Olivový olej Aromatica s.r.o.

3.1.2 Biologický materiál

- Enzym, Lipasa z *Aspergillus* sp., Mucos Pharma We-Nr.916028
- *Bacillus subtilis* CCM 1999 – použitá bakteriální kultura je ze sbírky Česká sbírka mikroorganismů (CCM), Masarykova Univerzita Brno, Přírodovědecká Fakulta

3.1.3 Studovaný polymer

Lineární, alifatický polyester – poly(ϵ -kaprolakton) (PCL) byl připraven polymerací za otevření kruhu (ROP) pomocí organického N-heterocyklického karbenu a benzylalkoholu v tetrahydrofuranu při 25 °C. Polymer byl třikrát přečištěn rozpuštěním v minimálním množství THF a vysrážen v methanolu při -10 °C. Produkt byl izolován filtrací za sníženého tlaku na Büchnerově nálevce. Postup přečišťování byl opakován 3krát z důvodu odstranění zbytkového katalyzátoru a nezreagovaného monomeru. Dále byl polymer (ve formě bílého prášku) sušen do konstantní hmotnosti za tlaku 3 Pa a následně uchovávan v exsikátoru. Pro degrační experimenty byl použit ve formě filmu připraveného odpařením rozpouštědla (chloroformu) z nasyceného roztoku.

Charakteristika syntetizovaného PCL

	M_n^a	M_w^a	M_w/M_n^a	T_m (°C) ^b	ΔH_m (2) (J·g ⁻¹) ^b	Krystalinita (%) ^c
PCL-film (mikrob.)	19 400	132000	6,8	55,8	68,9	49,4
PCL-film (enzym.)	25 400	164900	6,5	54,3	62,5	44,8

^aStanoveno nízkoteplotní GPC s PS standardy v THF

^bMěřeno DSC kalorimetrií, T_m byla získána pomocí DSC - z maxima píku při druhém zahřívání

^b $\Delta H_m(2)$ je integrovaná plocha pod píkem z druhého zahřívání vzorku

^cKryštalinita (%) (ΔX_c) vzorků PCL vyhodnocena na základě druhého zahřívání,

$\Delta X_c = \Delta H_m / \Delta H_m^0$, kde je $\Delta H_m^0 = 139,5 \text{ J/g}$

Přístrojové vybavení

- Váhy analytické Mettler Toledo
- Váhy analytické GR Series, A&D Instrument Ltd.
- Centrifuga, 5417R Eppendorf
- Třepačka, RS 10 basic MANEKO s.r.o.
- Předvážky, SAS 50 Scaltec
- Mikropipeta, Hirschmann Merci
- Sušárna Binder
- Laminární box AURA mini Biotech a.s
- GPC, Agilent Technologies 1100 series
- DSC, TA Instruments Q 2000
- pH metr Merci s.r.o
- Autokláv, Vaspoteri Brněnská medicínská technika a.s
- Mikrobiologický inkubátor Binder BD

4. PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

2.1 Příprava šikmých agarů

Pro přípravu šikmých agarů bylo použito 40 g masopeptonového agaru (MPA), který byl rozmíchán v 1000 cm³ destilované vody. Směs byla následně uvedena k varu a zahřívána, dokud agar nebyl kompletně rozpuštěn. Vzniklé médium bylo sterilizováno v autoklávu při teplotě 121 °C a tlaku 103,4 kPa po dobu 15 minut. Standardní složení masopeptonového agaru (MPA) je následující: 10 g/dm³ peptonového výtažku se zvířecích tkání; 10 g/dm³ hovězího extraktu; 5 g/dm³ chloridu sodného; 15 g/dm³ agaru.

4.2 Příprava kultivačního živného bujónu (NBG+OO)

Složení kultivačního živného bujónu (NBG+OO) bylo následující: 3 g peptonu; 1 g kvasničného extraktu; 0,5 g NaCl; 2 g glukózy; 1 cm³ olivového oleje. Vzniklý roztok byl doplněn do 100 cm³ destilovanou vodou a následně sterilizován v autoklávu při 121 °C, tlaku 103,4 kPa po dobu 20 minut.

4.3 Příprava fosforečnanového pufru

Pro experimenty enzymatické degradace byl použit sterilní tlumivý roztok pH = 7 při teplotě 20 °C. Odděleně byly připraveny dva následující roztoky:

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	71,46 g/ dm ³	roztok A	7,146g / 100 cm ³
NaH ₂ PO ₄	2,78 g/ dm ³	roztok B	2,78g / 100 cm ³

Při přípravě fosforečnanového pufru bylo smícháno 30,5 cm³ roztoku (A) s 19,5 cm³ roztoku (B). Pufr byl doplněn v odměrné baňce na objem 200 cm³. Pro enzymatické degradace nebyla nutná sterilizace v autoklávu, pro mikrobiální byl pufr sterilizován v autoklávu při 121 °C 20 minut.

5. PRACOVNÍ POSTUPY

5.1 Příprava vzorků PCL

PCL filmy byly připraveny metodou odpařením rozpouštědla z roztoku (solution casting). Přečištěný vzorek PCL byl navážen do kádinky, pomocí odměrného válce bylo přidáno vypočítané množství chloroformu (2 % roztok) a vzniklá suspenze byla míchána pomocí magnetického míchadla do vzniku čirého roztoku. Vzniklý roztok byl (4 cm³) pipetován do Petriho misky (Ø 3 cm), kde byl ponechán volně odpařovat při laboratorní teplotě v digestoři po dobu 2 dnů. Vzniklý film byl dále sušen ve vakuové sušárně za tlaku 3 Pa do konstantní hmotnosti (24 hodin). Připravené filmy byly dále upraveny podle typu degradace:

– enzymatická degradace

Jednotlivé vzorky o hmotnosti 7-9 mg byly vyraženy z původního filmu o tloušťce 115 μm průrazníkem o průměru 1 cm (Obr. 8). Tloušťka vzorku byla stanovena na příčném řezu pomocí SEM (Příloha 1, Obr. 1).



Obr. 8: Vzorky PCL pro enzymatickou degradaci

– mikrobiální degradace

Jednotlivé vzorky byly přímo vyjmuty z původní Petriho misky a použity. Filmy o tloušťce 70 μm a průměru 3 cm vážily ~ 90 mg (Obr. 8). Tloušťka vzorku byla stanovena na příčném řezu pomocí SEM (Příloha 1, Obr. 2). Před každým převedením do média byl vzorek sterilizován UV zářením po dobu 30 minut na každé straně.



Obr. 9: Vzorky PCL pro mikrobiální degradaci

5.2 Enzymatická degradace

Film (100 μm) o průměru 1 cm byl umístěn do kádinky (25 cm^3), dále byl přidán enzym (1,5 mg) a fosforečnanový pufr (3 cm^3). Kádinka byla zakryta hliníkovým víčkem a temperována v termostatu při 37 °C. Kontrolní experimenty byly vedeny za stejných podmínek, ovšem bez přítomnosti enzymu. Aby byla dodržena sterilita prostředí byl ke kontrolním vzorkům přidáván azid sodný. Výměna enzymu se prováděla každé tři dny z důvodu zachování stejné hodnoty enzymatické aktivity. Vzorky byly odebírány ve 14 denních intervalech, vždy jeden vzorek a jeden kontrolní vzorek, opláchnuty destilovanou vodou, sušeny za vakua při laboratorní teplotě a tlaku 3 Pa po dobu 7 dní a váženy na analytických vahách pro stanovení hmotnostního úbytku.

5.3 Mikrobiální degradace

5.3.1 Oživení želatinových disků

Při oživení kultur z želatinových disků byla prováděna kultivace na šikmém masopeptonovém agaru. Nejdříve byly disky ponechány cca 10 min při laboratorní teplotě. Vyžíhanou očkovací jehlou byl disk přenesen do kondenzní vody šikmého MPA agaru a inkubován při teplotě 29 ± 1 °C. Zkumavka byla nakloněna tak, aby suspenze pozvolna stekla po celém povrchu šikmého agaru. Inkubace probíhala při teplotě 29 ± 1 °C, 24 hodin.

5.3.2 Očkování šikmých agarů

Očkování šikmých masopeptonových agarů pomocí *Bacillus subtilis* bylo prováděno v laminárním boxu. Do levé ruky byly uchopeny dvě zkumavky, v jedné byl naočkovaný šikmý agar s mikroorganismem *Bacillus subtilis*, ve druhé sterilní šikmý agar. V pravé ruce byla mikrobiální klička, která byla opálena v plameni. Opálena klička byla ochlazená o hrdlo zkumavky s naočkovaným agarem. *Bacillus subtilis* byl odebrán pohybem směřujícím ode dna zkumavky k hrdlu a přenesen do zkumavky se šikmým sterilním agarem. Nanášení bylo prováděno vlnitým pohybem ode dna zkumavky k hrdlu. Před uzavřením byla zátka i hrdlo opáleny, zkumavky byly poté uzavřeny a inkubovány v termostatu při 29 ± 1 °C.

5.3.3 Převedení do fosforečnanového pufru

K převodu *Bacillus subtilis* do fosforečnanového pufru bylo zapotřebí sterilního pufru, sterilních špiček a naočkovaného šikmého agaru. Po otevření zkumavky bylo hrdlo i zátka opáleno. Mikropipetou se sterilní špičkou byl nabrán 1 cm^3 pufru a převeden do zkumavky s narostlým mikroorganismem. Po náležitém protřepání se uvolnily buňky do pufru otíráním očkovací kličky o agar a to směrem ode dna zkumavky k hrdlu a zkumavka byla opět protřepána.

Do 250 cm^3 Erlenmayerových baněk bylo připraveno 100 cm^3 nutričního média s přísadami glukózy a olivového oleje (NBG + OO). Do Erlenmayerových baněk určených pro mikrobiální degradaci byl kvantitativně převeden pufr s mikroorganismem. Po hodinové dynamické kultivaci (90 ot/min), byly vzorky sterilně přeneseny do média pomocí pinzety namočené v ethanolu tak, aby nedošlo k poškození povrchu vzorku. Výměna média byla prováděna 2x týdně. Při každé výměně bylo odebráno asi 10 cm^3 média pro další možné analýzy. Kontrolní

experiment byl veden za stejných podmínek, ale bez přidání mikroorganismu. Aby byla dodržena sterilita prostředí byl ke kontrolním vzorkům přidáván azid sodný.

Polymerní vzorky byly odebírány ve 14 denních intervalech. Vzorky byly opláchnuty destilovanou vodou a methanolem a sušeny po dobu 7 dní při laboratorní teplotě za vakua (3 Pa) a váženy na analytických vahách pro vyhodnocení hmotnostního úbytku.

6. METODY CHARAKTERIZACE POLYMERŮ

6.1 Gelová permeační chromatografie (GPC)

Molekulová hmotnost a distribuce molekulových hmotností byly analyzovány nízkoteplotní gelovou permeační chromatografií na GPC zařízení: Agilent Technologies 1100 series s kolonou PL gel 5 μm MIXED-C 300 x 7,5 mm a předkolonou (50 x 7,5 mm, 5 μm) za použití THF jako mobilní fáze. Kolony byly kalibrovány na polystyrenové standardy v rozsahu $M_r = 580 - 377400$ g/mol. Na analýzu byly naváženy 4 mg polymeru, které byly rozpuštěny v 1 cm^3 THF.

6.2 Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC)

Teplota tání (T_m) a stupně krystalinity polymeru byly charakterizovány pomocí diferenční skenovací kalorimetrie. Analýza byla prováděna na přístroji TA Instruments Q 2000 pod atmosférou dusíku. Vzorek byl nejprve ochlazen na 0 °C. Z této teploty byl temperován na teplotu 100 °C rychlostí 10 °C/min, na této teplotě setrval po dobu 5 min. Poté byl ochlazen ze 100 °C na -80 °C rychlostí 5 °C/min, na této teplotě setrval 5 min. Poté byl vzorek temperován z -80 °C na 90 °C rychlostí ohřevu 5 °C/min. Pro DSC analýzu bylo naváženo přibližně 2 mg vzorku polymeru. Získaný DSC termogram byl vyhodnocen pomocí programu Universal Analysis 2000.

6.3 Rastrovací elektronová mikroskopie (SEM)

Morfologie povrchu byla charakterizována pomocí rastrovací elektronové mikroskopie na zařízení TESLA BS340. Vzorky byly pokoveny Au/Pd za použití Sputter Quorum Polaron SC 7640.

6.4 Konfokální laserová skenovací mikroskopie (CLSM)

Povrchu vzorku PCL byl analyzován konfokální laserovou skenovací mikroskopií (CLSM) na přístroji LEXT OLS 3000, OLYMPUS. Vzorky byly ponechány před analýzou po dobu 5 dní ve vakuové sušárně při tlaku 3 Pa a teplotě 23 °C.

7. VÝSLEDKY A DISKUZE

V této práci byla studována biodegradabilita poly(ϵ -kaprolaktonu), který byl připraven polymerací za otevření kruhu ϵ -kaprolaktonu v Laboratoři *Syntézy Polymerů*. Série polymerací za katalýzy N-heterocyklickým karbenovým katalyzátorem a v přítomnosti benzylalkoholu v tetrahydrofuranu při 25 °C poskytla polymery s celou řadou molekulových hmotností. Jelikož je známo, že vedle molekulové hmotnosti ovlivňuje rychlost degradace také šířka distribuce molekulových hmotností, byl pro naše studium zvolen bimodální vzorek. Při přípravě filmů pro degradační experimenty byly získány poněkud odlišné charakteristiky výchozích materiálů. Pro enzymatickou PCL film s $M_n = 25\,400$ g/mol a $M_w/M_n = 6,5$; pro mikrobiální $M_n = 19\,400$ g/mol a $M_w/M_n = 6,8$.

Výhoda použití námi připraveného materiálu před komerčním pro dané experimenty spočívala především v jeho přečištění vedoucím k odstranění nežádoucích polymeračních komponent. Přítomnost zbytkového katalyzátoru a nezreagovaného monomeru by se následně mohla projevit na inhibici růstu mikroorganismu nebo naopak vstupovat do mechanismu degradace a zkreslovat tak výsledky. Vzorky byly použity ve formě fólií o definovaných rozměrech pro zajištění konstantní plochy povrchu ve všech experimentech.

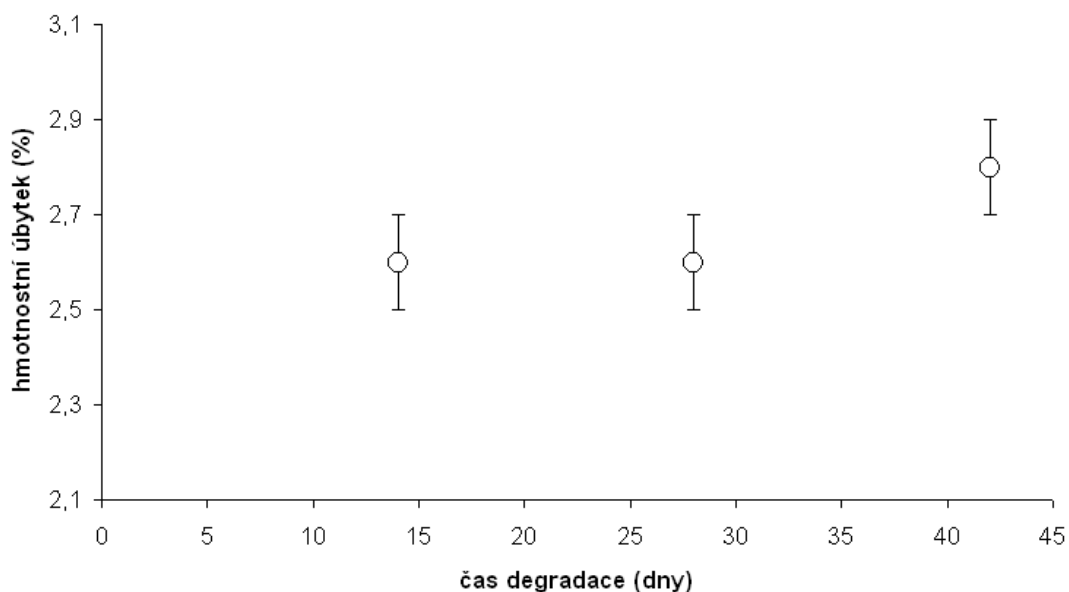
Enzymatická degradace PCL lipázou z *Aspergillus* sp. byla studována v prostředí fosforečnanového pufru (pH = 7) při teplotě 37 °C. Tento enzym byl zvolen na základě jeho schopnosti štěpit PCL v širokém rozsahu molekulových hmotností ($M_n = 13\,000$ -80 000) [33, 51] a tedy jeho dalšího možného využití pro navazující studie.

Mikrobiální degradace PCL filmů byla studována v přítomnosti mikroorganismu *Bacillus subtilis* v nutričním médiu s přidavkem glukózy a olivového oleje (NBG+OO). Jedná se o nepatogenní mikroorganismus, který je velmi dobře kultivován a navíc byl do dnešní doby využíván v degradačních experimentech kopolymeru PCL se škrobem spíše pro produkci α -amylázy [39]. Z literární rešerše bylo zjištěno, že tento mikroorganismus byl dosud studován zejména v případě biodegradací různých druhů kopolymerů poly(ϵ -kaprolaktonu) a poly(vinylbutyralu)(PCL/PVB), PCL/škrob nebo triblokových kopolymerů PCL/PDMAEMA⁻H⁺ [38, 39, 52].

Studie mikrobiální i enzymatické degradace byla vedena po dobu 42 dní. V pravidelných intervalech (14→28→42 dní) byly odebírány vzorky pro vyhodnocení úbytku hmotnosti, změny molekulové hmotnosti a její distribuce, změny stupně krystalinity a změny morfologie povrchu. Degradované vzorky byly srovnávány s kontrolními, které byly exponovány za stejných podmínek ovšem bez daného enzymu či mikroorganismu. Vzorky po degradaci (enzymatické i mikrobiální) byly vyhodnoceny gravimetricky na základě dvou paralelních degradačních experimentů.

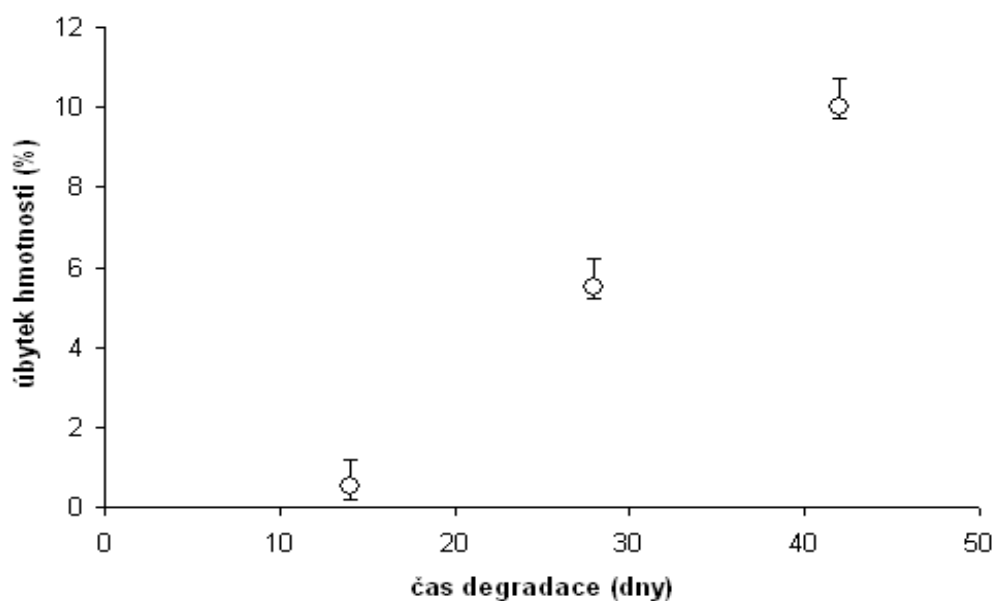
Hmotnostní úbytek vzorků

V případě degradačních experimentů v přítomnosti lipázy z *Aspergillus* sp. byl zaznamenán mírný úbytek hmotnosti vzorků (Obr. 10). Celkový pokles zaznamenaný po 42 dnech činil pouze 3 hmot. %. Úbytek hmotnosti u kontrolních vzorků byl minimální < 1 hmot. %.



Obr. 10: Úbytek hmotnosti PCL v závislosti na době enzymatické degradace

U mikrobiální degradace byl zaznamenán odlišný trend poklesu hmotnosti vzorku vzhledem k enzymatické degradaci. Po 14 dnech experimentu byl zaznamenán pouze minimální hmotnostní úbytek (~ 0,5 hmot. %). V následujících časových intervalech byl pozorován lineární nárůst úbytku hmotnosti vzorků (Obr. 11) naznačující uplatnění aktivity mikroorganismu. Vyšší hmotnostní úbytek u mikrobiální degradace (10 hmot. % po 42 dnech) ve srovnání s enzymatickou mohl nastat v důsledku současného působení několika dalších faktorů vedle vlastního účinku enzymů-lipáz produkovaných mikroorganismem „*in situ*“. Jedním z nich je biofyzikální účinek mikrobiálních buněk rostoucích na povrchu testovaného materiálu, který může způsobovat jeho mechanické poškození. Rozsah mechanického poškození může být dále zvyšován dynamickými podmínkami vlastního vedení experimentu [53].



Obr. 11: Úbytek hmotnosti PCL v závislosti na době mikrobiální degradace

Změna morfologie povrchu

Pro hlubší pochopení procesu degradace byly polymerní vzorky analyzovány pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie (CLSM) a rastrovací elektronové mikroskopie (SEM).

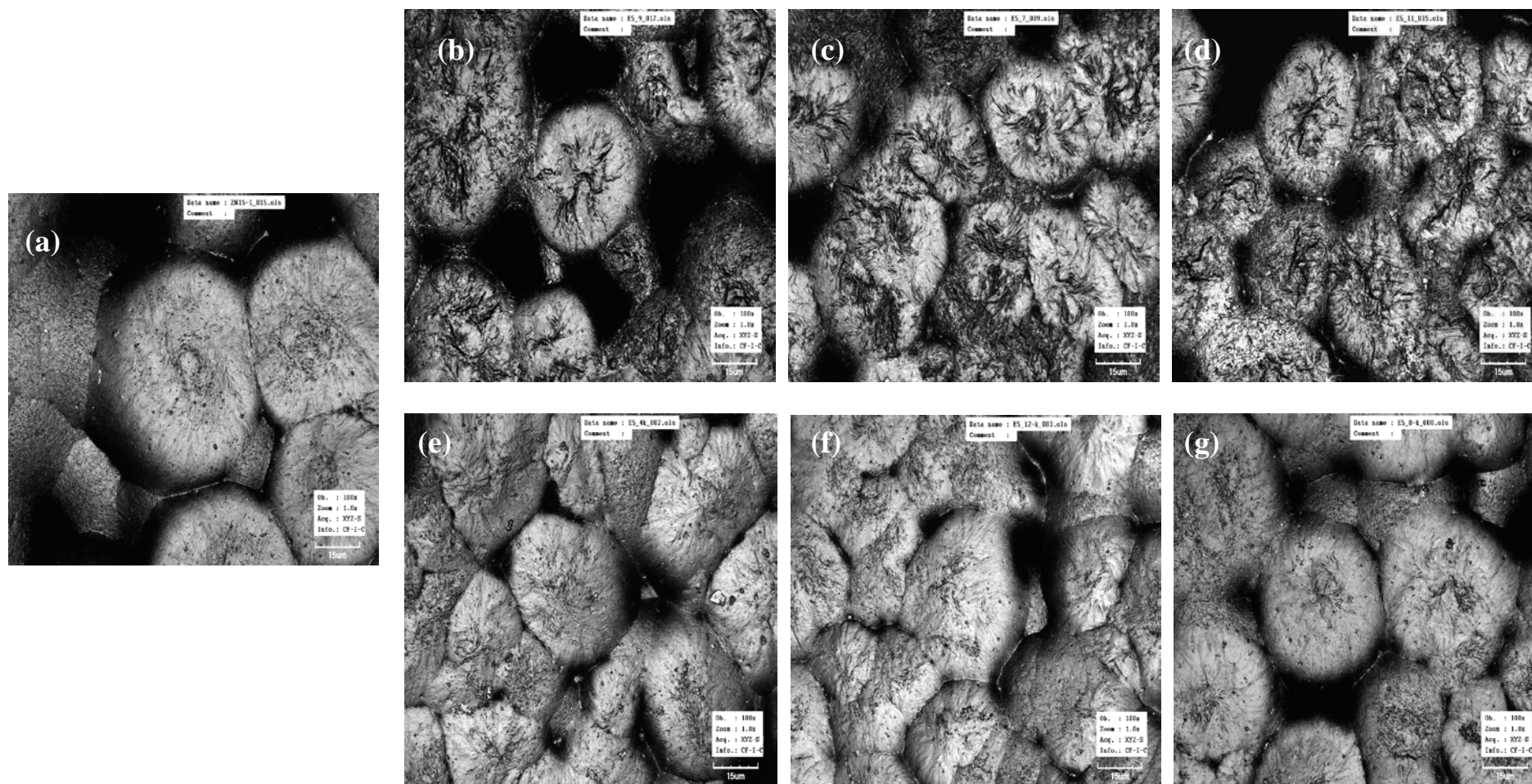
Původní film PCL byl připravený postupným odpařením rozpouštědla z roztoku (metoda solution casting) při laboratorní teplotě. Výsledkem byl vznik nepravidelných sférolitů tvořených skládanými řetězci tzv. lamelami. Způsob, jakým se jednotlivé řetězce skládají nelze přímo pozorovat, pravděpodobně se jedná o kombinaci pravidelného těsného skládání a volnějšího náhodného uspořádání řetězců. V případě sférolitů jsou lamely uspořádány radiálně z jejich středu (Příloha 2, Obr. 3)

Vzorky i jejich kontroly byly odebrány po 14, 28 a 42 dnech degradace v přítomnosti enzymu lipázy z *Aspergillus* sp. (Obr. 12 b, c, d) Průměrná velikost sférolitů se pohybovala okolo 30 μm . Po 14 dnech degradačních experimentů lze pozorovat porušení povrchu sférolitů. Byly patrné náhodně orientované trhliny (kreký) ve srovnání s původním vzorkem (Příloha 3, Obr. 5 a) a s kontrolními vzorky (Příloha 3, Obr. 5 e, f, g). Četnost kreků výrazně vzrostla po 28 dnech. Po 14 dnech se na povrchu vzorku PCL vyvinuly kreký o velikosti 2-3 μm (Příloha 3, Obr. 5 b), po 28 dnech byla zaznamenána délka okolo 5 μm (Příloha 3, Obr. 5 c) a po 42 dnech dosahovaly kreký délky až 9-10 μm (Příloha 3, Obr. 5 d). Trhliny, které jsou situovány především ve středu sférolitu, tedy v místě, kde z původního nukleusu začal růst sférolit, dosahovala hloubky až 2,8 μm . Lze tedy předpokládat, že degradace probíhala nejen na povrchu (Příloha 3), ale i uvnitř vzorku. Fragmenty, které jsou případně štěpeny uvnitř vzorku nejsou v důsledku chybějících dynamických podmínek odplavovány ze vzorku tak rychle, jako je tomu u mikrobiální degradace.

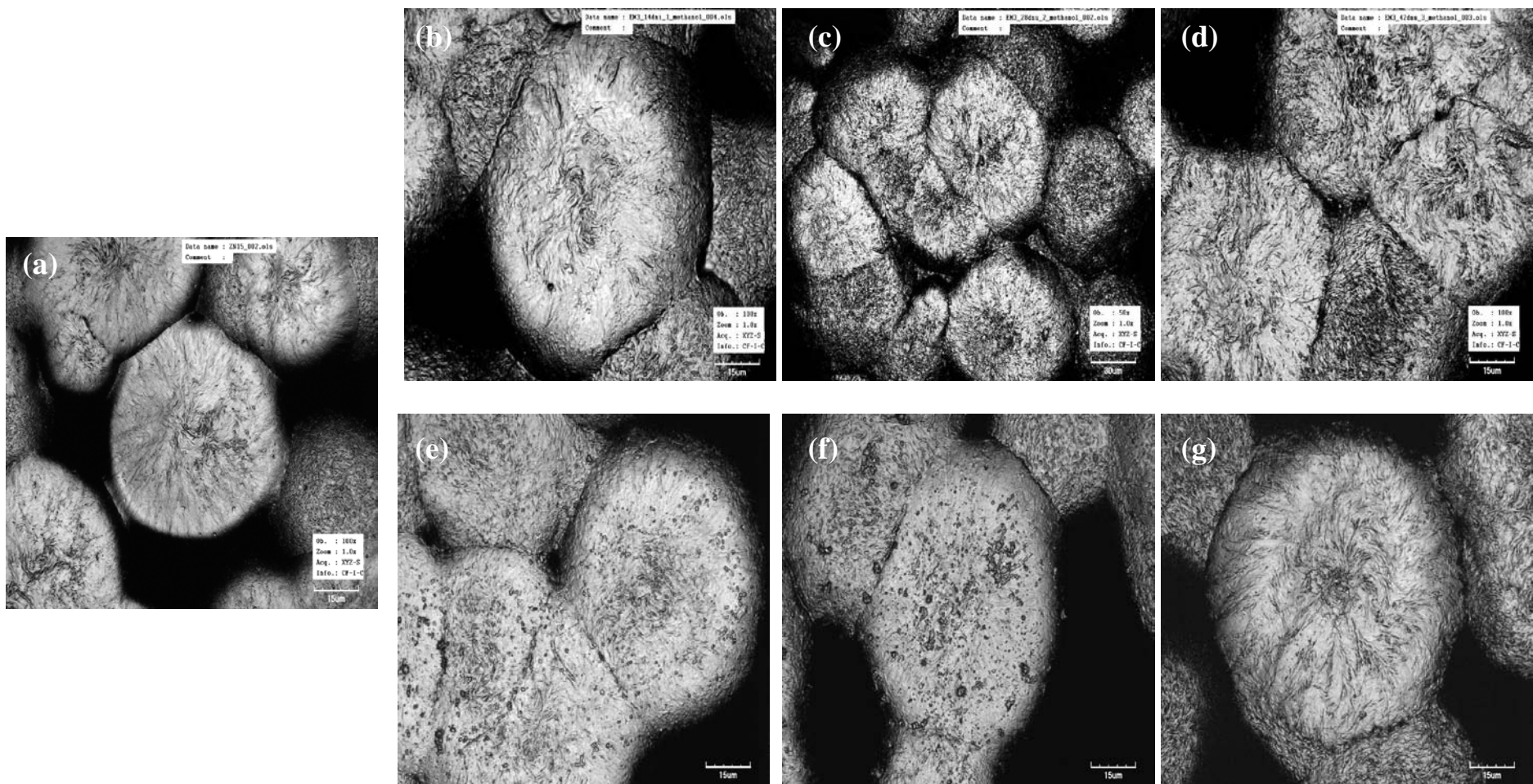
Vzorky po degradačních experimentech kultivované v přítomnosti bakterie *Bacillus subtilis* (Obr. 13 b, c, d) byly odebrány ve stejných časových intervalech jako u enzymatické degradace. Průměrná velikost sférolitů byla 60-70 μm . V průběhu degradace docházelo k plošnému povrchovému porušení vzorku a k odhalení sférolitické struktury. Trhliny zde již nejsou tak výrazné a početné a po 42 dnech dosahovaly hloubky maximálně 0,7 μm , z čehož lze usuzovat, že degradace probíhala přednostně na povrchu vzorků. Dynamické podmínky, které byly u mikrobiální degradace použity pro lepší nárůst použitého mikroorganismu, usnadňují vyplavování degradačních fragmentů z povrchu vzorků.

Testovaný kmen *Bacillus subtilis* využíval během svého růstu PCL jako zdroj uhlíku, degradace byla viditelná jednak na fotkách ze SEM a CLSM, ale i pouhým okem (Obr. 14b, c, d). Docházelo ke zřetelné dezintegraci vzorku. Ta pravděpodobně nastala v místech s větší koncentrací amorfni struktury.

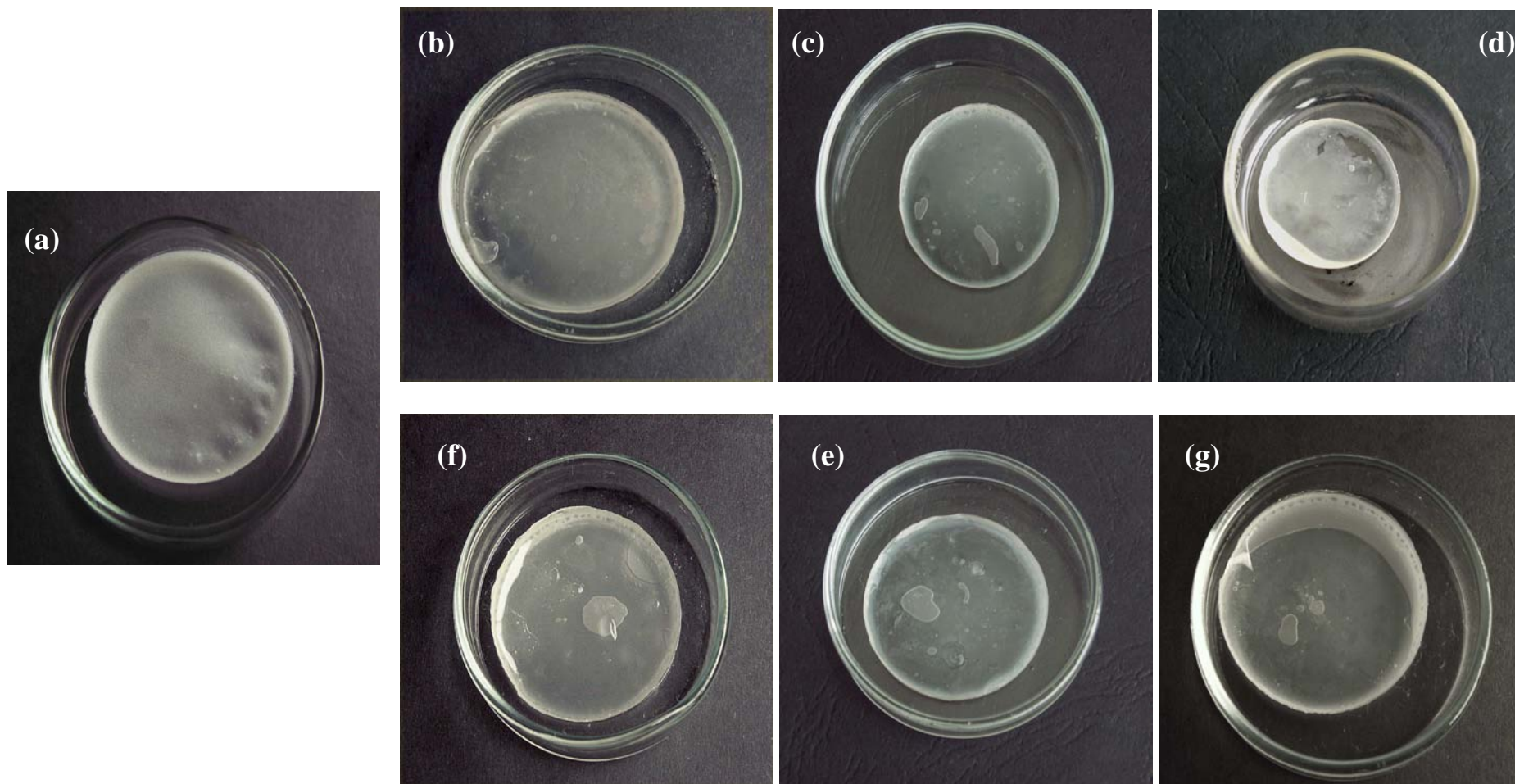
Co se týká hranice srůstu sférolitů, které obvykle představují slabá místa materiálu, docházelo v případě enzymatické i mikrobiální degradace k dostatečně pevnému srůstu. To mělo za následek jednak povrchovou degradaci a jednak šíření trhlin napříč sférolity (Příloha 2, Obr. 4). U kontrolních vzorků enzymatické i mikrobiální degradace (Obr. 12, 13, 14 e, f, g) zůstal povrch neporušen. Z toho je patrné, že bez přítomnosti enzymu či mikroorganismu nedocházelo k degradaci materiálu.



Obr. 12: CLSM snímky povrchu PCL filmů v přítomnosti enzymu lipázy z *Aspergillus sp.* (a) původní vzorek PCL (b) vzorek po 14 dnech (c) vzorek po 28 dnech (d) vzorek 42 dnech (e) kontrolní vzorek po 14 dnech (f) po 28 dnech (g) po 42 dnech



Obr. 13: CLSM snímky povrchu PCL filmů vystavené působení *Bacillus subtilis* (a) původní vzorek PCL (b) vzorek po 14 dnech (c) vzorek po 28 dnech (d) vzorek 42 dnech (e) kontrolní vzorek po 14 dnech (f) vzorek po 28 dnech (g) kontrolní vorek po 42 dnech h



Obr. 14: Snímky filmů PCL vystavené působení *Bacillus subtilis* (a) původní vzorek PCL (b) vzorek po 14 dnech (c) vzorek po 28 dnech (d) vzorek 42 dnech (e) kontrolní vzorek po 14 dnech (f) vzorek po 28 dnech (g) kontrolní vzorek po 42 dnech

Vyhodnocení změny molekulových hmotností

Během enzymatické degradace došlo k postupnému poklesu číselně-střední (M_n) molekulové hmotnosti (25→23→19 kg/mol). Hmotnostně-střední molekulová hmotnost (M_w) významně klesla po prvních 14 dnech a dále se již neměnila (Tabulka 1).

Tabulka 1: Vlastnosti studovaného PCL vystaveného enzymatické degradaci

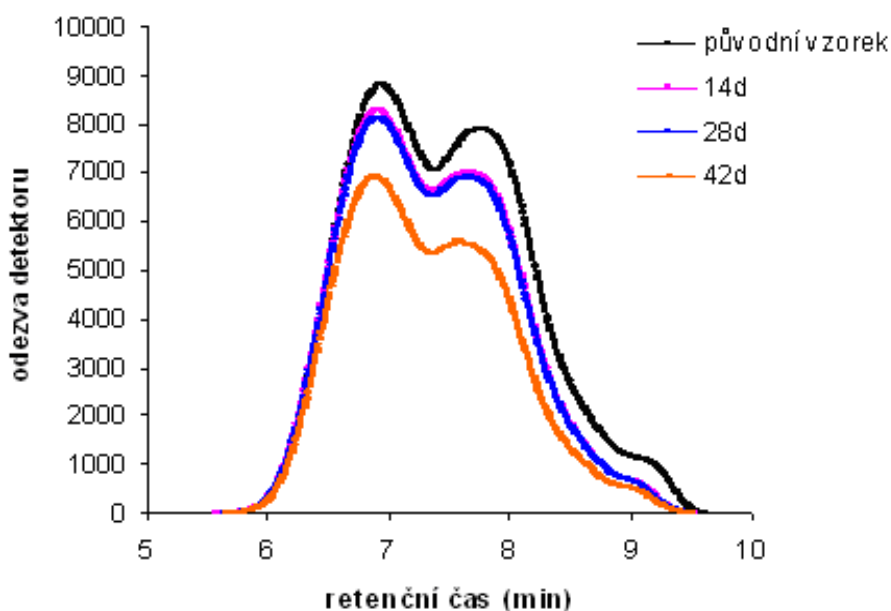
	M_n^b	M_w^b	M_w/M_n	T_m^c	$\Delta H_m(1)^c$	$\Delta H_m(2)^c$	ΔX_c^c	úbytek hmotnosti (%)
PCL-film ^a	25 400	164 900	6,5	54,3	88,9	62,5	44,8	-
14d	23 500	142 300	6,2	56,5	74,9	60,0	43,0	2,6
28d	22 600	142 600	7,7	56,3	92,9	60,2	42,4	2,6
42d	19 000	143 300	7,5	56,6	64,8	53,4	39,3	2,8

^a 14d, 28d, 42d = 14 dní, 28 dní, 42 dní

^b Hodnoty M_n , M_w byly získány pomocí GPC

^c Hodnota T_m byla získána pomocí DSC- z maxima píku při druhém zahřívání, $\Delta H_m(1)$, $\Delta H_m(2)$ jsou integrované plochy pod píkem z grafu DSC prvního a druhého zahřívání vzorku ΔX_c je podíl krystalinity (v%) vzorků PCL vypočítaných na základě druhého zahřívání

Z charakteru GPC chromatogramu na Obr. 15 je patrný pokles koncentrace níže-molekulárních podílů polykaprolaktonu během experimentů, který je nejvýraznější po 42 dnech.



Obr. 15: GPC křivky původního materiálu a enzymaticky degradovaných vzorků

Vyhodnocení GPC analýzy u vzorků vystavených mikrobiální degradaci ukázalo významný pokles molekulových hmotností – M_n i M_w a to již po 14 dnech experimentu. V následujících intervalech (28 a 42 dnů) byl již pokles velmi pozvolný (Tabulka 2). Pokles M_w až o 62 %

oproti původní hodnotě ukazoval na štěpení nejdelších polymerních řetězců. Ke štěpení právě vysoko-molekulární řetězců mohlo vedle působení enzymů synergicky přispívat mechanické působení narůstajících bakteriálních kolonií.

Tabulka 2: Vlastnosti vzorku PCL vystaveného mikrobiální degradaci

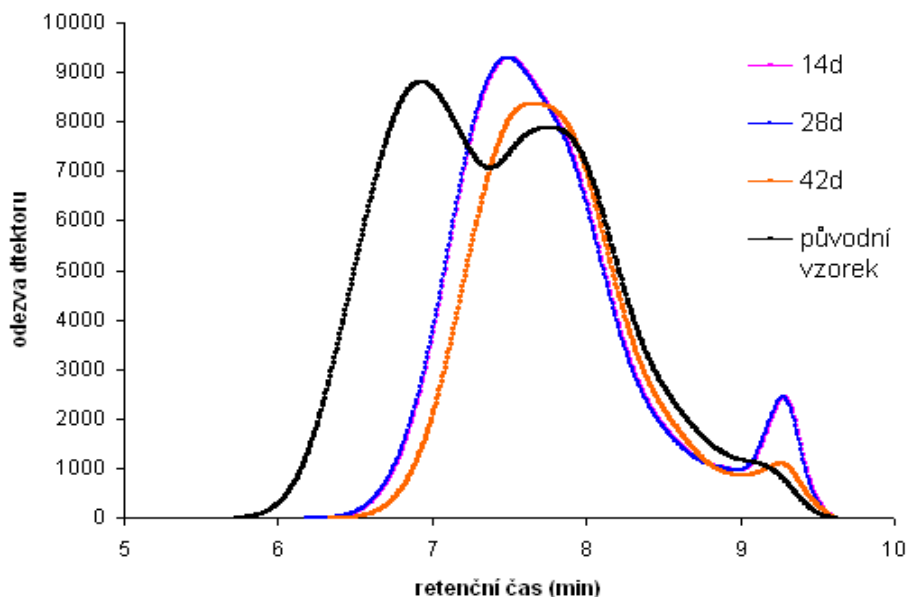
	M_n^b	M_w^b	M_w/M_n	T_m^c	$\Delta H_m(1)^c$	$\Delta H_m(2)^c$	ΔX_c^c	úbytek hmotnosti (%)
PCL-film ^a	19 400	132 000	6,8	55,8	71,4	68,9	49,4	-
14d	12 000	50 000	4,1	54,1	86,0	64,6	46,3	0,5
28d	11 700	46 700	4,2	54,2	82,1	59,9	43	5,5
42d	10 600	37 800	3,2	52,3	75,3	55,3	39,6	10

^a 14d, 28d, 42d = 14 dní, 28 dní, 42 dní

^b Hodnoty M_n , M_w byly získány pomocí GPC

^c Hodnota T_m byla získána pomocí DSC- z maxima píku při druhém zahřívání, $\Delta H_m(1)$, $\Delta H_m(2)$ jsou integrované plochy pod píkem z grafu DSC prvního a druhého zahřívání vzorku ΔX_c je podíl krystalinity (v%) vzorků PCL vypočítaných podle druhého zahřívání

Na základě vyhodnocení GPC analýzy byla pozorována významná změna charakteru distribuce molekulových hmotností (Obr. 16). Vedle snížení koncentrace vysoko-molekulárních řetězců nabyla eluční křivka téměř monomodálního charakteru. Mírný nárůst koncentrace nízkomolekulárních řetězců mohl být důkazem aktivity mikroorganismu.



Obr. 16: Vyhodnocení poklesu molekulové hmotnosti po mikrobiální degradaci

V případě studie jak enzymatické tak mikrobiální degradace byly zjištěny změny hmotnosti i molekulové hmotnosti výchozího materiálu naznačující uplatnění enzymů-lipáz jako depolymeráz tedy katalyzátorů štěpení esterových vazeb v makromolekulách. Důkazem

uplatnění enzymů bylo vyhodnocení kontrolních vzorků, u kterých se hmotnost změnila pouze zanedbatelně (méně než 1 hmot. %). Vyšší relativní hodnoty poklesu hmotnosti či změny molekulových hmotností v případě mikrobiální degradace mohly být důsledkem uplatnění dalších faktorů (fyzikálních i chemických) vedle vlivu samotného enzymu.

Vyhodnocení změny počáteční krystalinity

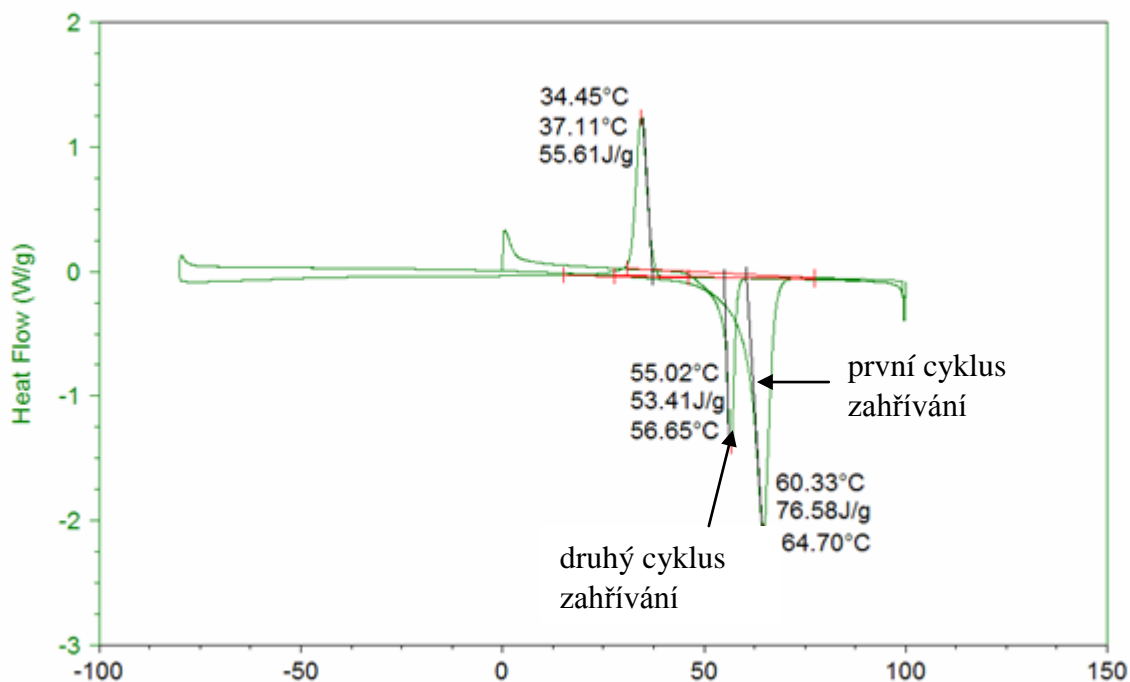
Podíl krystalické fáze (krystalinita) ve studovaném polyesteru byl vyhodnocen pomocí diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) a to z druhého zahřívání. Výpočet z druhého cyklu zahřívání byl zvolen z důvodu smazání tepelné historie vzorků v rámci přetavení v průběhu prvního cyklu zahřívání. Současně byla z druhého cyklu vyhodnocena i T_m . Výpočet krystalinity byl proveden podle rovnice 1, kde $\Delta H_m^0 = 139,5 \text{ J/g}$ [51, 54]

$$X_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0} \cdot 100 \quad (\text{rovnice 1})$$

ΔH_m = stanovená vnitřní entalpie vzorku J/g

ΔH_m^0 = referenční vnitřní entalpie J/g – z literatury převzatá hodnota krystalického PCL [54]

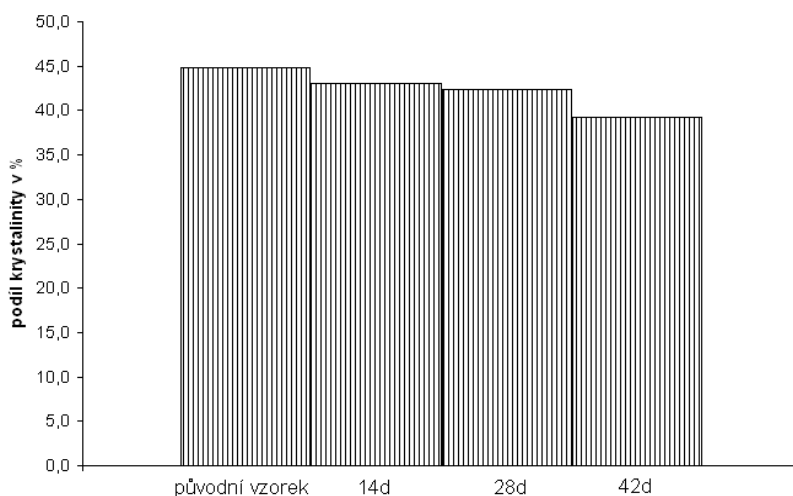
Vyhodnocené výsledky T_m , $\Delta H_m(1)$, $\Delta H_m(2)$, které jsou uvedeny v Tabulkách 1,2 jsou zprůměrnovanými hodnotami ze dvou měření. Na Obr. 17 je uveden vzorový DSC termogram enzymaticky degradovaného vzorku.



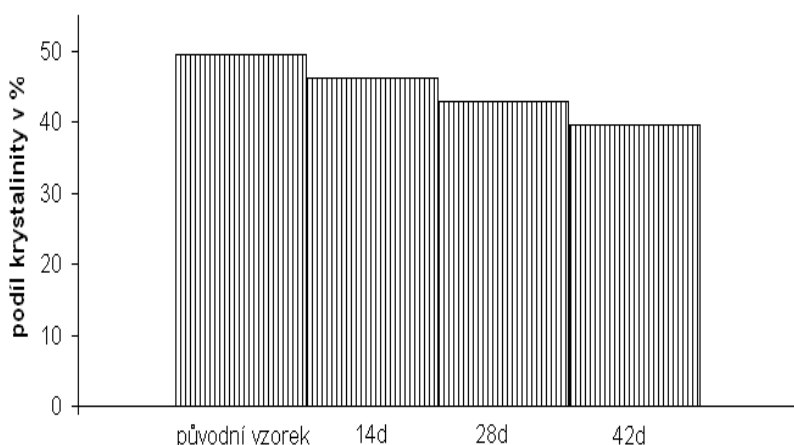
Obr. 17 : Vzorový DSC termogram vyhodnocení enzymatické degradace po 42 dnech

Výchozí polymer pro enzymatickou degradaci měl hodnotu krystalinity 45 %, pro mikrobiální 49 %. Na rozdíl od předpokládaného trendu dosud publikovaného v literatuře byl pozorován u obou typů degradačních experimentů postupný pokles krystalinity polymeru.

U enzymatické v poněkud menším rozsahu (4 %→5,4 %→12,3 %) (Obr. 18) než u mikrobiální (6,5 %→13,1 %→20 %) (Obr.19).



Obr. 18: Pokles krystalinity vzorku PCL vystaveného enzymatické degradaci



Obr. 19: Pokles krystalinity vzorku PCL vystaveného *Bacillus subtilis*

Všeobecně je krystalinita vedle molekulové hmotnosti a její distribuce dominujícím faktorem určujícím degradabilitu polymeru. V důsledku selektivního chování mikroorganismů přednostně dochází k degradaci v amorfni fázi [28, 55, 56,]. V našem případě pokles krystalinity jak u PCL vystaveného *Bacillus subtilis* tak i u PCL degradovaného komerčním enzymem naznačoval, že docházelo k uplatňování degradace krystalické fáze PCL. Vysvětlením by bylo, že ke štěpení řetězců docházelo v méně uspořádaných oblastech krystalické fáze (smyčky, ohyby řetězců). Řetězce, uspořádané velmi blízko sebe, situované v amorfni oblasti se mohly jevit jako krystalické a přispívat tak k celkovému stupni krystalinity polymeru. Během degradace pak došlo ke štěpení amorfni části krystalické fáze na kratší řetězce – oligomery, které byly následně vyplaveny z povrchu vzorku – při výměně

enzymu, nebo v případě mikrobiální degradace asimilovány mikroorganismem jako zdroj uhlíku.

8. ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo vypracování metodiky biodegradačních testů a provedení série experimentů se zvoleným mikroorganismem a enzymem. Jako testovaný materiál byl použit poly(ϵ -caprolactone) (PCL) připravený v Laboratoři *Syntézy Polymerů*. Polymerní vzorky o vhodné molekulové hmotnosti byly ve formě fólie o definovaných rozměrech, připravené procesem „solution casting“. Míra biodegradace byla vyhodnocena na základě hmotnostního úbytku, změn molekulové hmotnosti, distribuce molekulových hmotností, teploty tání, krystalinity a povrchových změn zkoumaného materiálu.

Degradační experimenty byly vedeny jednak enzymaticky tj. za použití komerčního enzymu (zdroj *Aspergillus* sp.) a jednak mikrobiálně pomocí bakterie *Bacillus subtilis*. V obou případech byl pozorován hmotnostní úbytek, výraznější byl v případě mikrobiální degradace, kdy došlo k poklesu hmotnosti o 10 hmot. % ve srovnání s enzymatickou kde za stejnou časovou periodu ubyla 3 hmot.%. Na základě vyhodnocení GPC analýz byl u obou experimentů zaznamenán pokles molekulových hmotností a to číselně-střední (M_n) i hmotnostně-střední (M_w) molekulové hmotnosti. Došlo k úbytku koncentrace níže-molekulárních řetězců. V případě kdy byly vzorky vystaveny působení *Bacillus subtilis* došlo také ke snížení koncentrace vysoko-molekulárních řetězců. Vyšší relativní hodnoty poklesu hmotnosti či změny molekulových hmotností v případě mikrobiální degradace mohly být důsledkem uplatnění dalších faktorů (mechanických, fyzikálních i chemických) vedle vlivu samotného enzymu. Stupeň počáteční krystalinity u enzymatické degradace klesl o 12,3 % a u mikrobiální degradace o 20 %. Ke štěpení řetězců docházelo nejspíše v méně uspořádaných oblastech krystalické fáze (smyčky, ohyby řetězců), které přispívají ke stupni krystalinity polymeru.

Změny T_m byly v průběhu obou experimentů nepatrné, můžeme je přičítat druhu použitého enzymu nebo vlivu kultivačního prostředí. To je však pouze předpoklad, detailnější zkoumání bude předmětem dalších experimentů.

Na základě mikroskopických analýz bylo prokázáno, že biotická degradace PCL probíhala přednostně na povrchu připravených filmů. Změny povrchu byly vyhodnoceny pomocí CLSM a SEM. Vzorek v přítomnosti enzymu lipázy z *Aspergillus* sp. vykazoval trhliny, které byly situovány především ve středu sférolitu a dosahovaly hloubky až 2,8 μm . V případě enzymatické degradace se dá tedy předpokládat, že degradace probíhala nejen na povrchu, ale i uvnitř vzorku.

Vzorky v přítomnosti bakterie *Bacillus subtilis* vykazovaly po ukončení degradačních experimentů také povrchové porušení a to do hloubky maximálně 0,7 μm , z čehož lze usuzovat, že degradace probíhala zejména na povrchu vzorků.

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

CLSM	Konfokální laserová skenovací mikroskopie
DSC	Diferenční skenovací chromatografie
GPC	Gelová permeační chromatografie
H_m	Entalpie polymeru
H_m⁰	Referenční entalpie
MPA	Masopeptonový agar
M_n	Početně střední molekulová hmotnost
M_w	Hmotnostně střední molekulová hmotnost
NBG + OO	nutričního médium s přísadkou glukózy a olivového oleje
PCL	Poly(ε-kaprolakton)
PDMAEMA-H⁺	Poly(N,N-dimethylamino-2-ethylmethakrylát)
PHB	Poly(3-hydroxybutyrát)
PLA	Poly(mléčná) kyselina
PVB	Polyvinylbutyral
ROP	Ring-opening polymerization
SEM	Rastrovací elektronová mikroskopie
T_m	Teplota tání
THF	Tetrahydrofuran
X_c	Stupeň krystalinity polymeru

10. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. Premraj, R., Mukesh, D. Biodegradation of polymers. *Indian Journal of Biotechnology* 2005, vol. 5, pp. 186-193
2. Mueller, R.J. Biological degradation of synthetic polyesters-Enzymes as potential catalysts for polyester recycling. *Process Biochemistry*, 2006, vol. 41, pp. 2124-2128
3. Schink, B., Janessen, P.H., Frings, J. Microbial degradation of natural and few syntetic polymers. *FEMS Microbiol*, 1992, vol 103, pp.311-316
4. Van der Zee, M. Polymers: Sustainable Polymer Science and Technology. *An Overview of Available Testing Methods*,. 2001, pp. 265-279
5. Degradation of Polymers in Natur. *Health Environmnt & Regulatory Affairs (HERA)*, 1998
6. In Hamid, S.H., Ami, M.B., Maadhan., A. G. Eds., *Handbook of Polymer degradation*, 1997, pp. 1-4
7. Hakkarainen, M. Aliphatic polyesters: Abiotic and biotic degradation and degradation products, *Adv. Polym. Sci.*, vol. 157, pp. 113-138
Degradation Products. *Advances in Polymer Science*. 2002. vol. 157, pp.113-138
8. Tokiwa, Y., Calabia, B.P. Biodegradability and biodegradation of poly(lactide). *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006, vol. 72, pp. 244-251
9. Garlotta, D., A Literature Review of poly(lactide). *Journal of Polymers and the Environment*. 2001, vol. 9, pp. 63-84
10. Lemoigne, M. *Ann Inst Pasteur*, 1925, vol. 39, pp. 144
11. Holmes, P.A. Applications of PHB - a microbial produced biodegradable thermoplastic. *Physics in Technology*, vol. 16., pp. 32-36
12. Kaneshawa, Y., Tanashi, N., Doi, Y., Saito, T., Enzymatic degradation of microbial polypoly(3-hydroxyalkanoates), *Polymer Degradation and Stability*, 1994, vol. 45, pp.179-185
13. Tomasi, G., Scandola, M., Briese, B.H., Jendrossek, D., H NMR Imaging Study of Enzymatic Degradation in Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). Evidence for Preferential Degradation of the Amorphous Phase by PHB Depolymerase B from *Pseudomonas lemoignei*, *Macromolecules*, 1997, vol. 30, pp 8218–8225
14. Yong, H., Yoshio, I. Novel FTIR method for determining the crystallinity of poly(ϵ -caprolactone). *Polymer International*, 2000, vol. 49, pp.623-626
15. Iwata, T., Doi, Y. Morphology and enzymatic degradation of poly(ϵ -caprolactone) single crystals: does a polymer single crystal consist of micro-crystals. *Polymer International*, 2002, vol. 51, pp. 852-858
16. Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Shoen, F.J., Lemons, J.E. An Introduction to Materials in Medicine. *Biomaterials science*, 1996, pp. 66,
17. Sandrers, L.M., Hendren, R.W. Protein delivery: Physical systéme *Pharmaceutical Biotechnology*. 1997, vol. 10, pp. 55-56.
18. Bowlin, G.L., Wnek, G. Informa healthcare, *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*., 2004. vol. 25, pp. 2695-2711 ISBN 978-0-8247-5497-6.
19. Williamson, M., Coombes, A. Gravity spinning of polycaprolactone fibres for applications in tissue engineering *Biomaterials*, 2004, vol. 25, pp. 459–465.

20. Hueck, H.J. The biodegradation of materials: an appraisal. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2001, vol. 48, pp. 5-11.
21. Walsh, J.H. Ecological consideration of biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2001, vol. 48 , pp. 16-25.
22. Gu, J. D. Microbiological deterioration and degradation of synthetic. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2003, vol. 52, pp. 69-91.
23. Gu, J.D., Lu, C., Thopr., K., Crasto, A., Mitchell, R. Fiber-reinforced polymeric composites are susceptible to microbial degradation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1997, vol. 18, pp. 364-369
24. Mayer, J.M., Kaplan, D.L. Biodegradable materials. balancing degradability and performance. *TRIP /Reviews 2*, pp. 227-235
25. Lugauskas, A., Levinskaite, L., Peculyte, D. Micromycetes as deterioration. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2003, vol. 52, pp. 233-242.
26. Kim, D.Y, Rhee, Y.H. Biodegradation of microbial and synthetic polyesters by fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2003, vol. 61, pp. 300-308.
27. Tokiwa, Y., Ando, T., Suzuki, T. Degradation of polycaprolactone by a fungus. *J. Ferm. Technol.*, 1976, vol. 54, pp. 603-608
28. Benedikt, C.V., Cook W.J., Jarrett, P., Cameron, J.A., Fungal degradation of polycaprolactones. *Journal of Applied Polymer*, 1983, vol. 28, pp. 327-334
29. Kim, Y. CH., Jun, H.S. Effect of polymer position in nutrient-salt agar medium on fungal degradation of polycaprolactone . *Korean Journal of Chemical Engineering*, 1995, VOL 12, pp. 320-324
30. Sanchez, J.G., Tsuchii, I, A., Tokiwa, Y.. Degradation of polycaprolactone at 50 °C by a thermotolerant Aspergillus. *Biotechnology Letters*, 2000, pp. 849-853.
31. Eldsäter, C., Erlandsson, B., Renstad, R., Albertsson, A.C., Karlsson, S.J. The biodegradation of amorphous and crystalline regions in film blown poly(ϵ -caprolactone) *Polymer*, 2000, vol. 41, pp. 1297-1304
32. Fields, R.D., Rodriguez, F., Finn, R.K. Microbial Degradation of Polyesters: Polycaprolactone Degraded by *P. pulluluns*. *J. of Apllied Polym. Science*, 1974, vol. 18. pp. 3571-3579
33. Lefebvre, F., David, S., Wauven, C. V. Biodegradation of polycaprolactone from an industrial compost of household refuse. *Polymer Degradation and Stability*, 1994, pp.347-353
34. Yavuz, H., Baba. C , Tuzlakolu, K, Pikin E. Preparation and degradation of L-lactide and ϵ -caprolactone homo a copolymers films. *Polymer Degradation and Stability*. 2002, vol. 75., pp. 431-437
35. Westers, L., Westers, H, Quax, W.J. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism, *Biochim. Biophys. Acta*, 2004, vol. 1694, pp. 299-310
36. Priest, F.G. Extracellular Enzyme Synthesis in the Genus *Bacillus*. *Bacteriological reviews*, 1977, vol. 41, pp. 711-753
37. Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T. BACTERIAL BIOCATALYSTS: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipase. *Annual Review of Mikrobiology*, 1999, vol. 53, pp. 315-351

38. Rohindra, D., Sharma, P., Khurma, J. Soil and Microbial Degradation Study of Poly(ϵ -caprolactone) – Poly(vinyl butyral) Blends. *Macromol. Symp.* 2005, vol. 224, pp. 323-331
39. Wu, K.-J., Wu, CH.-S., b, CHang, J.-S. Biodegradability and mechanical properties of polycaprolactone composites encapsulating phosphate-solubilizing bakterium acillus sp. PG01, *Process Biochemistry*, 2007, vol. 42, pp. 669–675
40. Rubin, B., Dennis, E.A. Lipases: Part A. Biotechnology. *Methods in enzymology*, vol. 284, New York: Academic Press, 1997a, pp. 1-408
41. Rubin, B., Dennis, E.A. Lipases: Part B. Enzyme characterization und utilization *Methods in enzymology*, vol. 286. New York: Academic Press, 1997b, pp. 1 - 563
42. Ferrato, F., Carriere, F., Sarda, L., Verger, R.A. Acritical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. *Methods Enzymol*, 1997, pp. 286:327
43. Fukuzaki, H., Yoshida, M., Asano, M., Kumakura., M. Synthesis of low molecular weight copoly(L-lactic acid/ ϵ -caprolactone) by direkt copolycondensation in the absence of catalysts, and enzymatic degradation of the polymers. *Polymer*, 1990. vol. 31, pp. 2006
44. Mochizuki, M., Hirano, M. Kanmuri, Z., Tokiwa, Y. Hydrolysis of polycaprolactone fibers by lipase: Effects of draw ratio on enzymatic degradation. *Journal of Applied Polymer Science*, 1995, vol. 55, pp. 289
45. Gan, Z., Yu, D., Zhong, Z, Liang, Q., Jing, X. Enzymatic degradation of poly(ϵ -caprolactone)/ poly(L-lactide) blends in phosphate buffer solution. *Polymer*, 1999, vol. 40, pp. 2859-2862
46. Iwamoto, A., Tokiwa, Y. Enzymatic degradation of plastics containing polycaprolactone. *Polymer Degradation and Stability*, 1994, vol. 45, pp. 205-213
47. Chen, D.R., Bei, J.Z., Wang, S.G. Polycaprolactone microparticles and their biodegradation. *Polymer Degradation and Stability*, 2000, vol. 67, pp. 455-459
48. Sivalingam, G., et al. Solvent effects on the lipase catalyzed biodegradation of poly (ϵ -caprolactone) in solution. *Polymer Degrad. and Stab.*, 2003, vol. 79, pp. 413-418
49. Hosino, A., Isono, Y. Degradation of aliphatic polyester films by commercially available lipase with special reference to rapid and complete degradation of poly(L-lactide) film by lipase PL derived from *Alcaligenes* sp. *Biodegradation*, 2002, vol. 13 pp.141–147
50. Sekosan, G., Vasanthan, N. Morphological Changes of Annealed Poly- ϵ -caprolactone by Enzymatic Degradation with Lipase. *Journal of Polymer Science*, 2010, vol. 48, pp. 202-211
51. Koenig, G, M.F., Huang, J.S. Biodegradable blends and composites of polycaprolactone and starch derivates. *Polymer*. 1995, vol. 36, pp. 1877-1882
52. Miguel, S.V, Peinado, C., Calina, F., Abrusci, C. Bioremediation of naphthalene in water by *Sphingomonas paucimobilis* using new biodegradable surfactants based on poly (ϵ -caprolactone), *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2009, vol. 63, pp. 217-223
53. Maddever, W., CHapman, G.M. Modified Starch-Based Biodegradable Plastics, *Plastics Engineering.*, 1989, vol. 39, pp. 363-370

54. Crescenzi, V., Manzini, G., Calzolari, G. Borri, C. Thermodynamics of fusion of poly-3-propiolactone and poly- ϵ -caprolactone komparative analysis of the melting aliphatic polylactone and polyester chains. *European Polymer Journal*, 1972, vol. 8, pp. 449-463.
55. Cook, W.J., Cameron., J.A., Bell, J.P., Huang, S.J. *J. Polym. Sci. Lett. Ed.* vol.19, pp. 159-165
56. Jarrett, P., et al. *Polymers as Biomaterials*, 1984, Plenum Press, pp. 181-192

11. SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍLOH

Příloha 1 Obr. 1: Tloušťka filmu pro enzymatickou degradaci

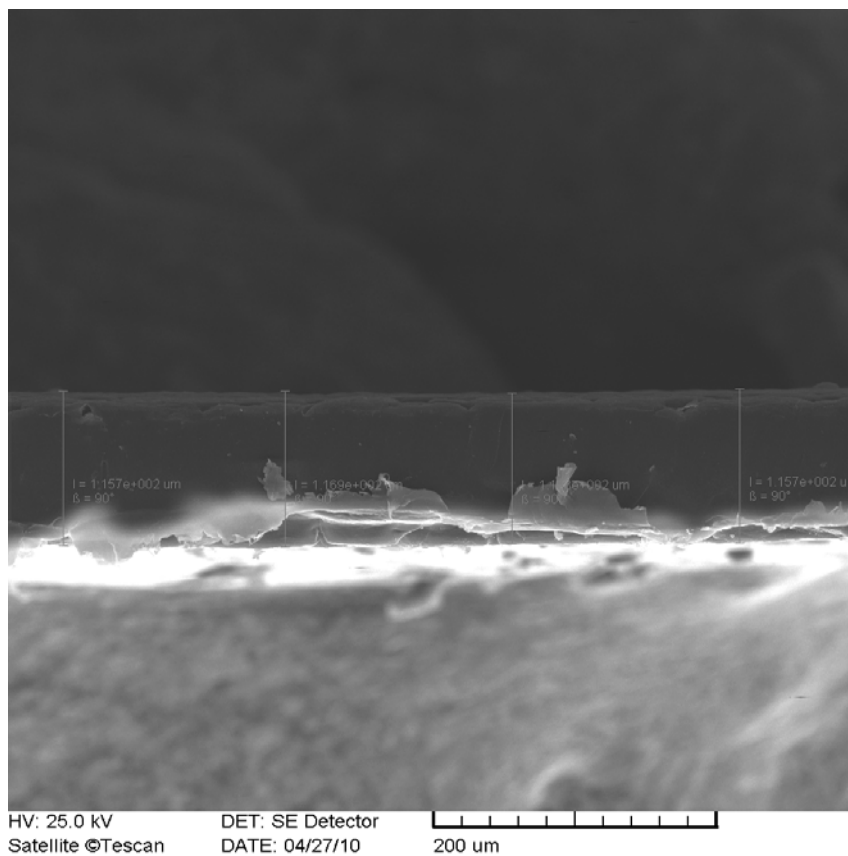
Obr. 2: Tloušťka filmu pro mikrobiální degradaci

Příloha 2 Obr. 3: Snímek CLSM – radiální uspořádání lamel ve sférolitech

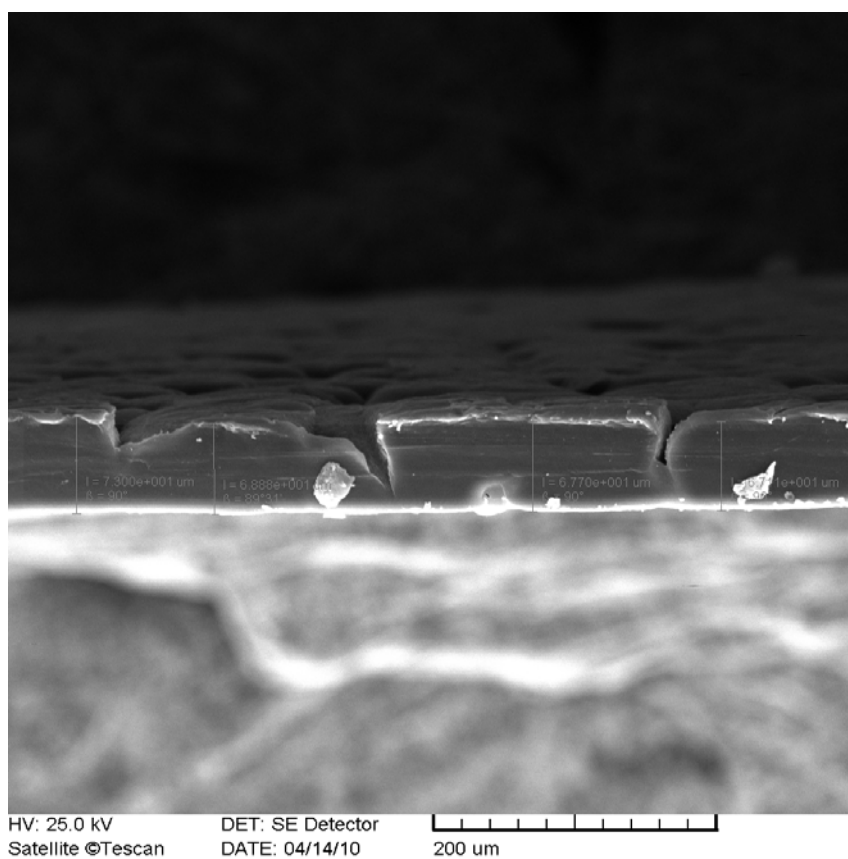
Obr. 4: Snímek CLSM – trhlina napříč sférolity po 42 dnech mikrobiální degradace

Příloha 3 Obr. 5: SEM snímky povrchu PCL filmů před a po enzymatické degradaci

Příloha 1

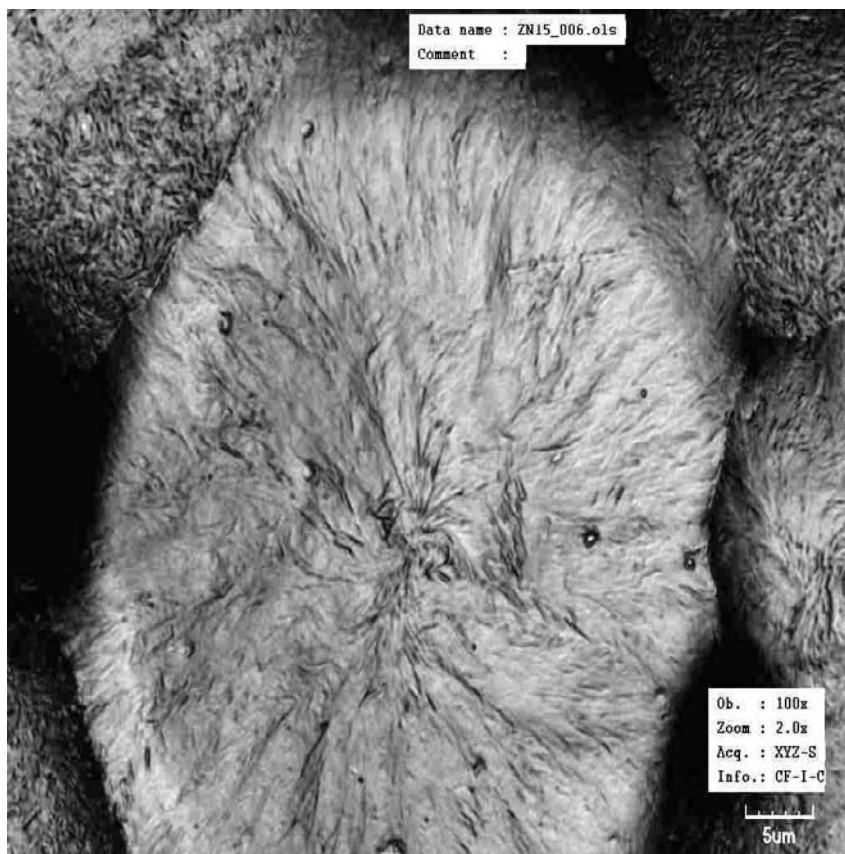


Obr. 1: Tloušťka filmu pro enzymatickou degradaci

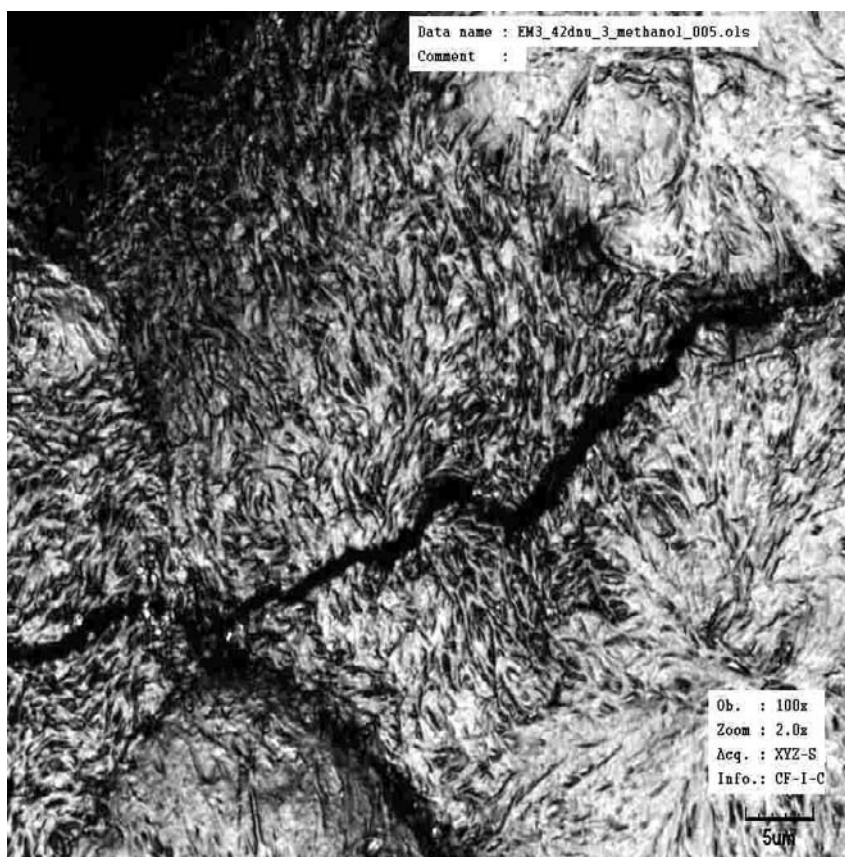


Obr. 2: Tloušťka filmu pro mikrobiální degradaci

Příloha 2

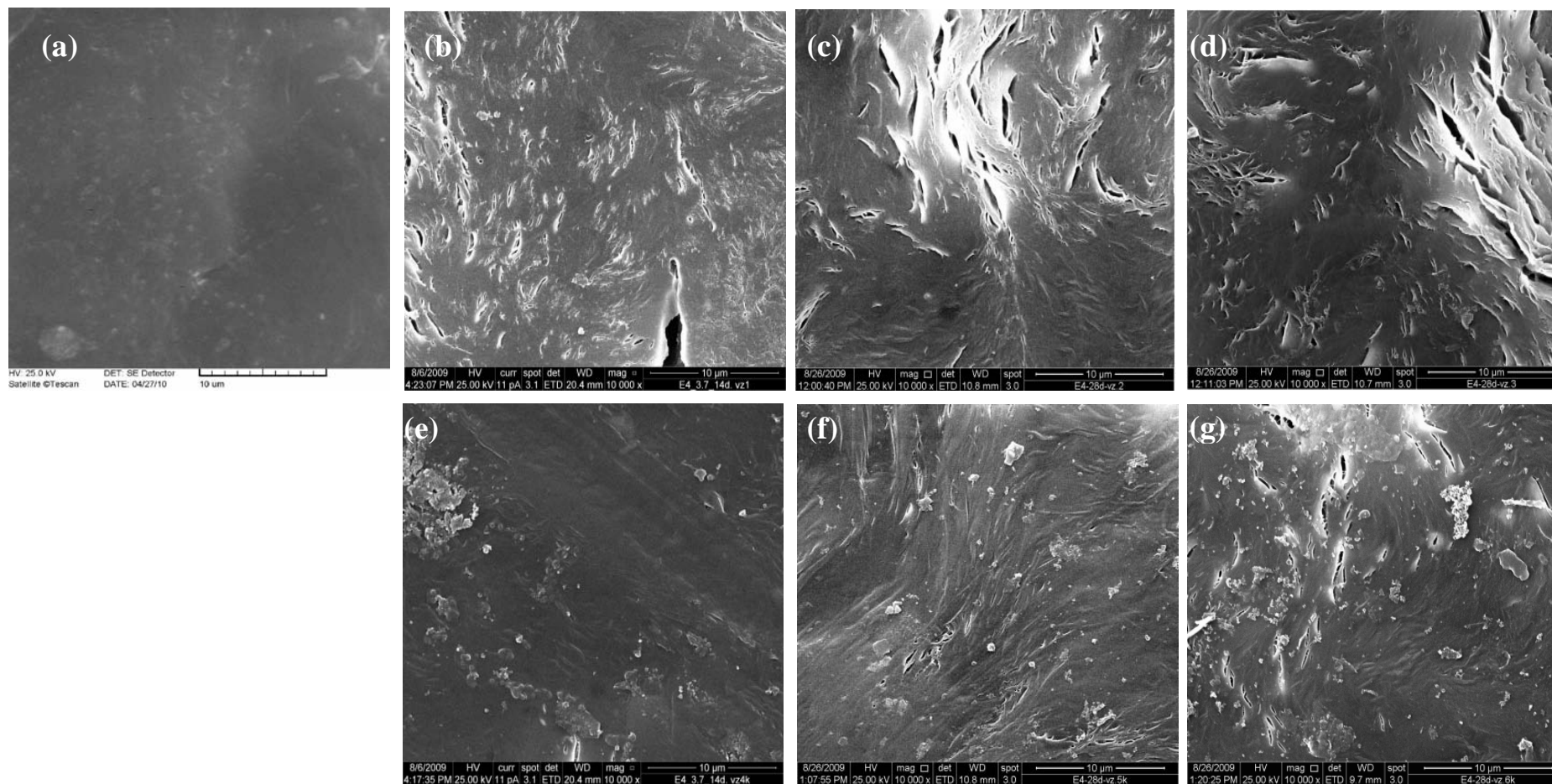


Obr. 3: Snímek CLSM – radiální uspořádání lamel ve sférolitech



Obr. 4: Obr. 3: Snímek CLSM – trhlina napříč sférolity - po 42 dnech mikrobiální degradace

Příloha 3



Obr. 5: SEM snímky povrchu PCL filmů (a) původní vzorek PCL (b) vzorek po 14 dnech (c) po 28 dnech (d) po 42 dnech (e) kontrolní vzorek po 14 dnech (f) po 28 dnech (g) po 42 dnech